

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 17 日現在

機関番号：22604

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2012

課題番号：21570080

研究課題名（和文）消化管神経系の構造と機能の比較生理学的研究

研究課題名（英文）Comparative physiology of morphology and function of the enteric nervous system.

研究代表者

黒川 信（KUROKAWA MAKOTO）

首都大学東京・大学院理工学研究科・准教授

研究者番号：50211222

研究成果の概要（和文）：

様々な動物門から代表的な実験動物アメフラシ、モノアラガイなど（軟体動物）、クルマエビなど（節足動物）、マナマコ（棘皮動物）などを選び、神経系の起原ともいえる消化管神経系の構造と機能を比較生理学的に研究した。棘皮動物ではドーパミンとアセチルコリン作動性、甲殻類ではドーパミンとアセチルコリン作動性、グルタミン酸、軟体動物ではセロトニン、FMRFamide 作動性の神経支配様式を明らかにした。軟体動物で神経原性のペースメーカーを消化管神経系内で発見した。ペースメーカー部位の種間での相違を明らかにし、消化管構造や運動様式の違いとの関連を示した。その他の動物の消化管律動運動では筋原性ペースメーカーによるものが主体と考えられた。

研究成果の概要（英文）：

In a wide variety of animals, the enteric nervous system (ENS) consists of a network of neurons intrinsic to the gastrointestinal tract. In this study, we compared the structure and function of the ENS among animals beyond phylum: sea snail and pond snail from mollusks, shrimps and isopod from arthropods, and sea-cucumbers from echinoderms. In most of animals, ENS neurons exhibited autonomous periodic-burst activity. Simultaneous recording of neuronal activities and movements of the gastrointestinal tract revealed that only in mollusks, but not in arthropods nor echinoderms, the periodic bursts were followed by peristaltic movements. This observation shows that the ENS in mollusks contains pacemaker neurons responsible for the neurogenic rhythmicity of peristalsis. In other animals, the rhythmicity of the gut motility originated in the myogenic pacemaker. The "pacemaker region" was localized differently among related species due to the structural differences of the gastrointestinal tract. For example, *Bursatella* shared common characteristics with *Lymnaea* rather than *Aplysia*, even though the latter species is more closely related to *Bursatella*.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2010 年度	700,000	210,000	910,000
2011 年度	800,000	240,000	1,040,000
2012 年度	500,000	150,000	650,000
総計	3,800,000	1,140,000	4,940,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学・動物生理・行動

キーワード：消化管神経系・末梢神経系・消化管運動・ペースメーカー・アメフラシ・比較生理学

## 1. 研究開始当初の背景

軟体動物腹足類は中枢神経系を構成するニューロン細胞体が大きく同定可能である利点などから神経生理学研究のモデル材料となっており、摂食や消化の神経支配に関する研究も多い。これらの中にはアメフラシやモノアラガイを材料とした中枢神経系内の同定ニューロンに関するもの、消化管神経系の構造や神経伝達物質に関する免疫組織化学的、薬理的な先行研究とともに、我々の消化管神経系の構造と機能に関わる研究がある。消化管の運動で普遍的に見られる律動的な自律性について、これまでは一般的に筋肉細胞自身にその起原がある、すなわち「筋原性」であると長く考えられてきた。

しかし近年、哺乳類において消化管神経系に内在する細胞に「ペースメーカー」機能が同定され、「神経原性」の運動起原が明らかにされた。また、我々は軟体動物の2種、アメフラシとモノアラガイの消化管に神経原性起原の律動運動が存在する事を明らかにした。一方で、相同の消化管系を持つ近縁の両種間で、神経原性運動の起原となるニューロンの存在部位に相違があることも示唆された。また、アメフラシの消化管運動には筋原性律動運動も存在し、神経原性と筋原性の異なるリズムの運動が共存していた。

消化・吸収という本来的機能はすべての種で基本的に保存されている一方で、消化管は多様に適応・分化を遂げている。従ってそこに内在する消化管神経系について系統的な普遍性と特異性をとらえる事が出来れば、神経系の適応と進化を考察する上での重要な一モデルになると考え、本研究をスタートさせた。

## 2. 研究の目的

本研究では、前口動物の軟体動物、節足動物、後口動物の棘皮動物と原索動物の消化管神経系について以下を明らかにし、比較する。

(1)消化管と消化管神経系のニューロン構築：消化管のそれぞれの部位に分布する神経系を調べる。神経繊維束と内在するニューロンの分布を神経解剖学的に明らかにし、比較する。

(2)神経伝達物質の分布：内在するニューロンおよびそこに分布する神経繊維束について免疫細胞化学的に神経伝達物質の分布を明らかにする。候補神経伝達物質として検出対象とするものは、セロトニン、ドーパミンなどのアミン類、FMRFアミドなどの神経ペプチド類。各動物での消化管神経系の伝達物質分布の相同性と特異性を明らかにする。また、中枢神経系からの外来性神経の分布とその神経伝達物質を明らかにする。

(3)ニューロン回路の解析：消化管神経系内の同時記録により内在するニューロン間の活動の相関を解析する。薬理学的手法や刺激実験を組み合わせる事により、神経系内のニューロン回路を明らかにする。特に、部位ごとに分布するニューロン群内およびニューロン群間の関係、中枢神経系からの入力について比較生理学的な観点での解析を行う。

(4)自律運動の起原の解明：これが筋原性であるか、神経原性であるか、両者が共存するかを明らかにする。またそれらの起原の存在部位を明らかにする。

### 3. 研究の方法

実験材料の確保と飼育維持：カイコ、クルマエビなどは商業的に入手し、アメフラシは太平洋沿岸より採集したもの、オオグソクムシは漁師が深海トラップで捕獲したものをを用いる。これらは学内飼育施設で飼育維持し、全シーズンに渡って実験を行える体制をとった。実験に用いる種の順番は予め決めずに適宜取組み、手法によっては複数種を同時並行で実験処理を進めた。

(1) 消化管を全長に渡って摘出し、メチレンブルー生体染色により消化管神経系の神経繊維束とニューロン細胞体の分布を顕微鏡下で観察した。消化管各部位のパラフィン切片を作成しヘマトキシリン-エオシン染色等によりニューロン細胞体および神経繊維の分布を調べた。

(2) クリオスタットないしパラフィン切片を用いた免疫細胞化学的方法により、切片標本および全載標本で候補神経伝達物質の存在、分布を調べた。

(3) 電気生理学的実験：消化管神経系の部域ごとにニューロンの自発活動を吸引電極で記録した。

(4) 消化管全体の運動をビデオ記録ないし部域毎に機械記録を行い、電気的活動と同時誘導する事で両者の相関を調べ、消化管神経系のニューロンの機能を解析した。ニューロン細胞体から直接細胞内誘導も行った。律動運動の起原を明らかにするために、消化管を部位ごとに分離する実験も行った。

### 4. 研究成果

神経系の起原ともいえる消化管神経系の構造と機能を比較生理学的に明らかにする目的で、様々な動物門から代表的な実験動物を選び、研究を進めた。

(1) 消化管神経系のニューロン分布と中枢神経系との関連

① 棘皮動物トラフナマコおよびマナマコにおいて消化管上位(食道、下行性小腸上位)に限定してドーパミン作動性の細胞体や神経繊維からなる神経叢が分布していることを明らかにした。ドーパミン投与による収縮はTTXで阻害されたがアセチルコリン投与による収縮は阻害されなかったことから、消化管神経系内にコリン作動性の運動ニューロンが存在し、それに対してドーパミン作動性ニューロンが興奮性シナプス結合していることが明らかになった。

② アメフラシの消化管運動に関わる中枢神経系としてこれまで解析が進んでいた口球神経節とは別に腹部神経節内の2カ所に消化管に軸索を延ばすニューロン細胞体群を発見した。そのあるものは抗セロトニン免疫陽性反応を示した。候補神経伝達物質であるセロトニン、FMRFamideの投与は神経活動と神経原性の運動を抑制した。腹部神経節から伸びる貯精囊神経分枝の電気刺激で末梢ニューロンの活動及び神経原性の運動が抑制されたことから、腹部神経節から消化管神経系の神経原性ペースメーカーに対するセロトニン作動性の抑制性神経支配の存在を示した。

③ 甲殻類を用いた研究では十脚類直腸の神経支配を調べた。クルマエビにおいて腹部第6神経節から伸びる直腸神経による直腸の支配を示した。同神経の電気刺激は直腸の張力上昇および、筋原性の律動的収縮を惹起した。薬理学的実験から、アセチルコリン、ドーパミンおよびグルタミン酸が、神経伝達物質候補であると考えられた。これらの成果は、個々の動物で未解明であった事柄を明らかにしたという意義とともに、系統進化的に消化管神経系の機能を捉える本研究を推進する上での基盤とした。

## (2) 消化管自律運動起原の解析

軟体動物のアメフラシ科の近縁種アメフラシとトゲアメフラシ、および有肺類モノアラガイにおいて、消化管の自律的収縮運動のリズムがいずれの種でも消化管神経系内のペースメーカーニューロン群に起原する、すなわち神経原性の消化管運動が存在することを示した。従来、消化管自律運動のリズム起原は筋肉にある（筋原性）と広く考えられていたのに対し、近年哺乳類で非筋原性起原が発見されたのに続き、軟体動物でも神経原性ペースメーカーが発見されたことになる。これまで消化管運動調節の神経支配に関する研究の多くが筋肉のペースメーカーに対する直接支配の存在を前提に行われており、今回の発見は従来の実験結果の再考察の必要性を示す。

節足動物甲殻類では、これまで口胃神経節による胃の神経原性自律運動支配が知られ、その機構が詳しく調べられて来た一方、より下方の後腸、直腸部分についての知見は得られていなかった。今回、多くの系統にまたがる多様な種で神経原性の律動運動起原の存否を検討したが、甲殻類の等脚類オオグソクムシや十脚類クルマエビ、節足動物昆虫類のカイコ、棘皮動物マナマコ、トラフナマコなど、いずれも末梢ニューロンが多く内在する消化管神経系は存在したが、その中に律動運動のペースメーカーは発見されず、神経原性運動は存在しないものと考えられた。

## (3) 消化管神経系の神経回路

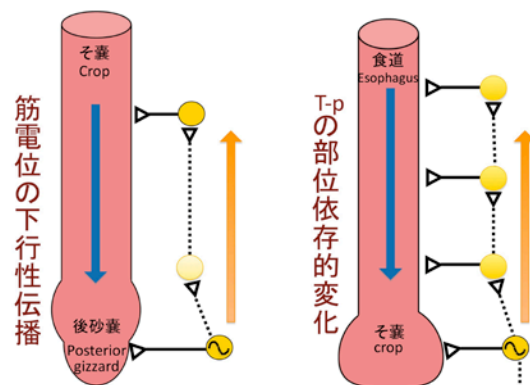
### ① ペースメーカーニューロンの存在部位

軟体動物をモデルとした研究では、消化管神経系の末梢ニューロンは食性や消化管のつくりが異なる上記3種の軟体動物腹足類のいずれの種でも、そ嚢から砂嚢上に多く分布していることを解剖学的、組織化学的に示した。そこに内在する神経原性律動運動のペースメーカーニュー

ロン群はモノアラガイとトゲアメフラシではそ嚢上に、アメフラシでは後砂嚢上に局在していた。モノアラガイとトゲアメフラシは、トゲアメフラシと近縁のアメフラシに比べて食道が長く、そ嚢が小さいという点で似ていた。即ち、ニューロンの機能的分布は種間の系統的關係とは一致せず、消化管のつくりや運動様式の種間の相違と関連があると考えられた。

### ② ペースメーカーニューロンと蠕動運動生成機構

ペースメーカーニューロン群の存在場所はいずれの種でも蠕動運動起始部より下方であった。ペースメーカー部位に発生したインパルスの周期的バースト発火は消化管神経系内を上行性に伝播していた。この上行性の神経活動が逆に下降性蠕動運動を惹き起すという一見矛盾した現象を見いだした。アメフラシでは上部に伝播した神経活動が上位で蠕動運動のスタートのみをトリガーし、蠕動自身は神経活動とは独立に伝播していた。これに対して、モノアラガイでは各部の蠕動の収縮が神経活動によって直接惹き起さ



アメフラシ(左)とモノアラガイ(右)での蠕動運動形成の神経機構の違い。いずれの場合も周期的神経活動の起原(ペースメーカー部位)は消化管の下位にあり、そこからバースト活動は上行性に伝播し、その活動が下行性の蠕動運動を惹起する。

れていた。これには、神経活動が生じてから最大収縮に達するまでの時間が、下位ほど長いことが関わっていることが明らかになった。(挿図参照)

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 9 件)

- ① Kurokawa, M., Kasuya, Y. and Okamoto, T. (2012) Origin of automaticity and neural regulation of peristalsis in the gastrointestinal tract of *Aplysia* and *Lymnaea*. *Acta Biologica Hungarica* 63:328-331. 査読有 DOI:10.1556/ABiol.63.2012.Suppl.2.26
- ② Tanaka, K., Kuwasawa, K. and Kurokawa, M. (2011) Neural pathways to cardioaccelerator neurons in the isopod crustacean *Bathynomus doederleini*: cholinergic activation by somatic movements. *Comparative Biochemistry and Physiology*, A159: 66-74. 査読有 DOI:10.1016/j.cbpa.2011.01.022
- ③ Okamoto, T. and Kurokawa, M. (2010) The role of the peripheral enteric nervous system in the control of the gut motility in the snail *Lymnaea stagnalis*. *Zoological Science* 27: 602-610. 査読有 DOI:10.2108/zsj.27.602

[学会発表] (計 36 件)

- ① 黒川信, 山田沙佳 消化管自律運動の比較生理学. 日本動物学会関東支部第 65 回大会 (東京工業大学、東京) 2013 年 3 月 16 日
- ② 高木賢司, 三田純子, 山田由里愛, 田中浩輔, 黒川信 甲殻類クルマエビ (*Marsupenaeus japonicus*) 直腸の神経支配. 日本動物学会関東支部第 65 回大会 (東京工業大学、東京) 2013 年 3 月 16 日
- ③ 山田沙佳, 黒川信 (2012) Effects of serotonin and

FMRFamide on the neuronal activities and motility of the gastrointestinal tract in *Aplysia*. 日本比較生理生化学会第 34 回大会 (総合研究大学院大学、葉山) 2012 年 7 月 7 日

- ④ 山田沙佳, 黒川信 アメフラシ消化管の神経原性及び筋原性自律運動とその神経支配. 日本動物学会関東支部第 63 回大会 (東邦大学、千葉) 2012 年 3 月 17 日
- ⑤ 黄瀬幸雄, 黒川信 ナマコ類消化管のモノアミン分布とその運動支配機構. 日本動物学会第 82 回大会 (旭川アリーナ、旭川) 2011 年 9 月 22 日
- ⑥ 山田沙佳, 黒川信 アメフラシ消化管におけるセロトニン作動性神経の中樞起源とその機能. 日本動物学会第 82 回大会 (旭川大雪クリスタルホール、旭川) 2011 年 9 月 22 日
- ⑦ Kurokawa, M., Kasuya, Y., Okamoto, T. Origin of automanism and its neural regulation of the gut molities in Gastropods, *Aplysia* and *Lymnaea*. (2011) 12th Symposium on Invertebrate Neurobiology (Tihany, Hungary) 2011 年 9 月 1-4 日
- ⑧ Kurokawa, M., Kasuya, Y., Okamoto, T. Comparative physiology of peristalsis in the gastrointestinal tract of *Aplysia* and *Lymnaea*, Gastropoda, Mollusca. 8th International Congress of Comparative Physiology and Biochemistry (ICCPB 2011) (Nagoya) 2011 年 6 月 4 日
- ⑨ 黄瀬幸雄, 黒川信 ナマコ類消化管のモノアミン分布とその特異的効果. 日本動物学会関東支部第 62 回大会 (慶応大学、横浜: 東日本大震災により中止) 2011 年 3 月 12 日

- ⑩黒川信, 岡本崇伸, 粕谷雄志 消化管蠕動運動の神経支配: アメフラシとモノアラガイの比較. 日本動物学会第 81 回大会 (東京大学、東京) 2010 年 9 月 25 日
- ⑪黄瀬幸雄, 黒川信 マナマコ消化管のモノアミン分布とその部位特異的効果. 日本比較生理生化学会第 32 回大会 (九州産業大学、福岡) 2010 年 7 月 17 日
- ⑫太田雄一郎, 黒川信 アメフラシの生殖神経節による生殖器官と鰓の連関的支配. 日本動物学会第 61 回関東支部大会 (筑波大学、筑波) 2010 年 3 月 13 日
- ⑬粕谷雄志, 黒川信 アメフラシ消化管運動の部域間連関とその神経制御. 日本動物学会第 61 回関東支部大会 (筑波大学、筑波) 2010 年 3 月 13 日
- ⑭鈴木祐美子, 黒川信 フレリトゲアメフラシの特異な生殖神経上ニューロンの神経機構. 日本動物学会第 61 回関東支部大会 (筑波大学、筑波) 2010 年 3 月 13 日
- ⑮岡本崇伸, 黒川信 モノアラガイにおける食道運動の部位依存性についての電気生理学的解析. 日本比較生理生化学会第 31 回大会 (千里ライフサイエンスセンター、大阪) 2009 年 10 月 23 日
- ⑯粕谷雄志, 黒川信 アメフラシ消化管の部域間連関的収縮とその神経制御. 日本比較生理生化学会第 31 回大会 (千里ライフサイエンスセンター、大阪) 2009 年 10 月 23 日
- ⑰岡本崇伸, 黒川信 モノアラガイ食道上を上行性に伝播する神経活動とそれにより惹起される下降性蠕動運動. 日本神経消化器病学会第 11 回大会 (仙台) 2009 年 9 月 25 日
- ⑱岡本崇伸, 黒川信 モノアラガイ食道を上行性に伝播する神経活動とそれにより惹起される下降性蠕動運動. 日本動物学会第 80 回大会 (静岡県コンベンションアーツセンター、静岡) 2009 年 9 月 17 日

- ⑲太田雄一郎, 黒川信 アメフラシの生殖神経節ニューロンの軸索分布. 日本動物学会第 80 回大会 (静岡県コンベンションアーツセンター、静岡) 2009 年 9 月 17 日

[図書] (計 3 件)

黒川信 (2009) アメフラシ類の神経系と行動能力. 日本比較生理生化学会編 動物の多様な生き方 第 5 巻 73-90 「さまざまな神経系をもつ動物たち」 共立出版.

[その他]

- ①アウトリーチ活動

特別公開企画展・公開講演会「東京の大自然と生命科学研究」2012 年 10 月 24 日-11 月 6 日 (講演会 10 月 27 日) の企画・出展・講演

- ②新聞報道

上記アウトリーチ活動の紹介記事 東京新聞 2012 年 11 月 2 日)

## 6. 研究組織

- (1) 研究代表者

黒川 信 (KUROKAWA MAKOTO)

首都大学東京・大学院理工学研究科・准教授

研究者番号: 50211222

- (2) 研究分担者

無し

- (3) 連携研究者

無し