

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 24 日現在

機関番号：22604

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25440173

研究課題名(和文) 消化管系の連動運動の中枢および末梢神経機構

研究課題名(英文) Central and peripheral neural mechanisms in coordination of the gastrointestinal motility

研究代表者

黒川 信 (Kurokawa, Makoto)

首都大学東京・理工学研究科・准教授

研究者番号：50211222

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：軟体動物腹足類アメフラシ、トゲアメフラシ、ツツナミガイ(アメフラシ科)とモノアラガイ(有肺類)の消化管神経系(ENS)の消化管運動支配を比較生理学的に調べた。自律運動リズムの起原はいずれの動物でもENS内のペースメーカーを起原とする神経原性だった。ペースメーカーニューロン群はアメフラシでは後砂嚢上に、その他の動物ではそ嚢上にあり、自律運動は先ずその各領域から生じた。このことはアメフラシが大型海藻食で噛み切りながら大量に摂食し、そ嚢が著しく大きいのに対し、他は附着藻類などを切削しつつ摂食し、そ嚢が小さいことに対応した。同等に分布しているENSが食性に適応して異なる機能を果たしていることを示す。

研究成果の概要(英文)：Four gastropod species were used; *Aplysia* sp., *Bursatella leachii*, and *Dolabella auricularia* from Aplysiidae, and *Lymnaea stagnalis* from Pulmonata. *Aplysia* feeds on large seaweeds, and the others, on epilithic algae. *Aplysia* has a larger crop than the other species. In all these species, peripheral neurons in the enteric nervous system (ENS) exhibited autonomous synchronous periodic-burst activity. Simultaneous recording of the neuronal activities and movements of the gastrointestinal tract revealed that the periodic bursts first caused contractions of the gizzard in *Aplysia*. In the other species, the activity caused, at first, contractions of the crop. These observations show that the ENS contains pacemaker neurons responsible for the neurogenic rhythmicity of these movements. The pacemaker region was localized on the posterior gizzard in *Aplysia* and on the crop in the other species. The results may indicate how ENS functions in the GI tract evolved to suit specific diets.

研究分野：比較神経生物学

キーワード：消化管神経系 消化管運動 末梢神経系 アメフラシ モノアラガイ ツツナミガイ トゲアメフラシ

## 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(5,6)、消化管神経系の構造や神経伝達物質に関する薬理的・免疫組織化学的研究(1)等とともに、応募者らによる消化管神経系の構造と機能に関わる研究(2,3,4,7)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、「非筋原性」の運動起原が明らかにされた(8)。また、申請者は軟体動物の2種、アメフラシとモノアラガイの消化管に消化管神経系内の末梢ニューロンに起原する神経原性の律動運動が存在する事を明らかにした(3)。これらの従来の研究の多くは、もっぱら消化管の一部域に注目して進められてきた。しかし、消化管系が統一的な消化機能を果たすためには系全体としての動きの機能的連関が必須であり、消化管運動全体の理解のためにはこの機構解明が求められていた。

消化管神経系は「第2の脳」とも称されるように、非常に多様なニューロンを含む複雑な神経回路網であり、その機能解明は古くからの研究テーマである一方で未解明の部分が多く残されている。これまでもっぱら消化管運動研究が「胃」「結腸」「直腸」のように部域毎に切り分けた標本で行われてきたこと、筋原性運動が主体と考えられてきた消化管において、運動連関は基本的に筋肉の電氣的、機能的連関によるところ

が大きいと考えられてきたことなどから、本研究で取り組む「部域間での運動連関」に関する研究アプローチは殆どなされていなかった。一方で、ほ乳類を含め非筋原性の律動運動起原が同定された事は運動連関機構についての従来の考え方の再検討が必要な事を示していた。比較生理学的見地から複数の軟体動物腹足類をモデル動物として実施する本研究により、消化管神経系の部域の境界を越えた神経連関やそれらに対する中枢神経系による制御機構が明らかになれば、ほ乳類を含む動物に普遍的な消化管運動連関機構の一モデルを提出することになると考えた。

## 2. 研究の目的

消化管系は、動物の体制や食性等に応じて多様に分化しており、個々の消化管においても部域特異的に構造的・機能的に分化し、部域ごとに独自の運動を行い個々の機能を果たすとともに、それらが相互に連動し一連の消化機能を果たしている。また、各部域にはそれぞれに数多くの多様なニューロンから構成される神経集網構造である消化管神経系(腸管神経系)が内在するのに加え、中枢神経からの支配を受けており、それらにより各部域の運動が個別に制御されるとともに、部域間の連動の維持、調整がなされていると考えられる。しかし、これまで食道や砂嚢など部域ごとの神経支配の研究は進められているが、部域間の連動についての知見は限定的であり、消化運動を消化管系全体で捉えて行われた研究は少ない。そこで本研究は代表者がこれまで用いてきたアメフラシ、モノアラガイに加えて食性の異なる複数の軟体動物腹足類の消化管系をモデルに、各部域間の運動の連関機構を比較生理学的見地から解明することを目指して進められた。

### 3. 研究の方法

#### (1) 実験動物・解剖

食性が異なる4種の軟体動物腹足類アメフラシ *Aplysia kurodai*、トゲアメフラシ *Bursatella leachii*、タツナミガイ *Dolabella auricularia* (以上アメフラシ科) と有肺類モノアラガイ *Lymnaea stagnalis* を用い比較生理学的に研究を進めた。

動物は体液と等張の塩化マグネシウム溶液を体重の30%量注射することにより麻酔し腹足側から切開し消化管系および中枢神経系を摘出した。

#### (2) 消化管と消化管神経系の比較形態学・組織学

消化管の部域構成とその外部、内部形態を観察した。①メチレンブルー染色等により消化管神経系の神経線維、末梢ニューロン細胞体の分布を観察した。②逆行性ないし順行性染色により末梢の単一ニューロンを染色し形態を調べた。

#### (3) 比較生理学的実験

食道-そ嚢-前・後砂嚢からなる摘出消化管標本で消化管神経系の活動をガラス管微小電極で記録するとともに、異なる部域の運動をビデオ記録し、それらの関係を2次元動画計測ソフトウェアで解析した。

### 4. 研究成果

#### (1) 解剖・形態・組織化学

用いたすべて種の消化管系の「口球-食道-そ嚢-砂嚢-腸」という基本構造は共通だったが、それぞれの部域の大きさは同じアメフラシ科内でも著しく異なっていた。トゲアメフラシとタツナミガイのそ嚢はアメフラシのそ嚢に較べ著しく小型で、その特徴はむしろモノアラガイと類似していた(図1)。

消化管上に分布する消化管神経系の分布

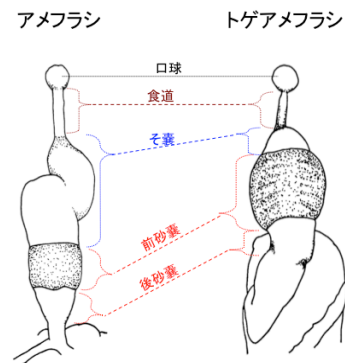


図1 アメフラシとトゲアメフラシの消化管構造の比較

はアメフラシ科で以下の特徴を共有した。すなわち神経線維束のネットワークはそ嚢と後砂嚢で密に分布し、その中に数個ないし10個の末梢ニューロン細胞体が集まったクラスターが多数分布していたが、ニューロンは前砂嚢には認められなかった。そ嚢と前砂嚢の境界には環状神経束が存在しその上にもニューロン細胞体が多く存在した。

#### (2) 消化管自律運動の起原とペースメーカー部位

摘出した消化管ではいずれの種においても自律的な運動が観察され、これは中枢神経系を切除しても継続した。軟体動物の消化管運動の自動性について従来は筋肉細胞に起原する「筋原性」と考えられていた。しかし本研究で調べたいずれの種においても、「神経原性」である、即ち消化管運動の自律性は消化管神経系に分布する末梢ニューロンの周期的なバースト活動に起原することが明白に示された。

一方、消化管神経系内のどの部域のニューロンがペースメーカー機能を果たしているかについて、種間で異なることを発見した。1、部域ごとの切断実験で最も早い周期のバースト活動を維持するニューロン群の探索、2、同時記録による神経活動の伝導方向の解析などから、アメフラシでは、後砂嚢上のニューロン群が、またその他の種ではそ嚢上のニューロン群がペースメーカー機能を持つ

ことを明らかにした。即ち、同じアメフラシ科で同様な消化管神経系を持つ動物であるにもかかわらず、ペースメーカー機能の局在部域に差があることがわかった。

### (3) 部域間の運動の連関

二次元動画計測ソフトウェアによる画像解析の結果、消化管の周期的運動が最も先行する部域がアメフラシでは後砂囊(図2)、トゲアメフラシ、タツナミガイおよびモノアラガイではそ囊であった(図3)。即ち、ペースメーカーニューロン群の存在する部域自身がニューロンのバーストリズムに従って直後に律動運動を惹起した。アメフラシでは後砂囊の運動に続いて上位に位置するそ囊の蠕動運動が惹起された(図2)。一方、トゲアメフラシやタツナミガイなどではそ囊の運動に続いて逆に下位の後砂囊の運動が起きることが明らかになった(図3)。

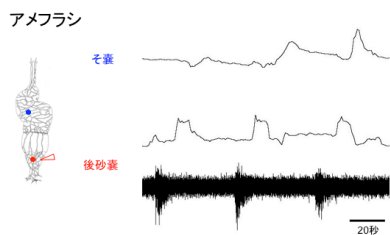


図2 アメフラシでの消化管神経系のニューロン活動と多点での運動の同時記録。後砂囊上のペースメーカーニューロンの活動(下段)とそれに続いて後砂囊(中段)、そ囊(上段)の順に惹起された運動。

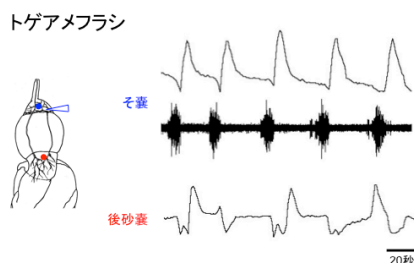


図3 トゲアメフラシでの消化管神経系のニューロン活動と多点での運動の同時記録。そ囊上のペースメーカーニューロンの活動(中段)とそれに続いてそ囊(上段)、後砂囊(下段)の順に惹起された運動。

この消化管運動連関にみられた相違は、タツナミガイやトゲアメフラシが藻類表面や

付着藻類を切削しながら少しずつ摂食し、比較的小さいそ囊を持つ対して、アメフラシは大型海藻食で噛み切りながら大量に摂食し、そ囊が著しく大きいという、両者間の摂食様式と消化機能の相違と対応していることが明らかになった。このことは、同等に分布している消化管神経系が食性に適応して異なる機能を果たしていることを示すと考えられる。本実験では、消化管内容物の条件を一定にして調べてきたが、消化管運動は内容物の条件によってダイナミックに変化していると思われる。今後、消化管モデルを用いてペースメーカーの位置や活性、部域間の連関の個体内での変化に関する新たな知見を得ることが可能となるかもしれない。

### 引用文献

- 1 Hernádi, L. *et al.*, *J. Neurocytology* 27:761-775 (1998)
- 2 Ito S. and Kurokawa M. *Zoological Science* 24:714-722 (2007).
- 3 Kurokawa M. *et al.*, *Acta Biologica Hungarica* 59:65-71 (2008).
- 4 Kurokawa M. *et al.*, *Acta Biologica Hungarica* 63:328-331 (2012).
- 5 Lloyd P. E. *et al.*, *J. Neurophysiol.* 59:1613-1626 (1988)
- 6 Nagahama T. and Takata M., *J. Comp. Physiol.* 166:143-150 (1989)
- 7 Okamoto T., and Kurokawa M., *Zoological Science* 27:602-610 (2010).
- 8 Sanders K.M., *Gastroenterology* 111:492-515 (1996)

### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計3件)

- ① Tanaka, K., Ito, S. and Kurokawa, M. (2016) Central pathways of the hindgut movement in the penaeid shrimp, *Marsupenaeus japonicus*. *Kyorin J. Arts and Sciences*, 33 : 1-7. 査読無

- ② Chiken, S., Sato, A., Ohta, C., Kurokawa, M., Arai, S., Maeshima, J., Sunayama-Morita, T., Sasaoka, T., Nambu, A. (2015) Dopamine D1 receptor-mediated transmission maintains information flow through the cortico-striato-entopeduncular edirect pathway to release movements. *Cereb. Cortex* 25 : 12(2015) 4885-4897 doi: 10.1093/cercor/bhv209. First published online: October 6. 査読有
- ③ Tanaka, K., Takagi, K., Ito S. and Kurokawa, M. (2014) Neural control of the rectum in a penaeid shrimp, *Marsupenaeus japonicus*. *Kyorin J. Arts and Sciences*, 31: 1-8. 査読無

[学会発表] (計 15 件)

- ① 朱顔, 黒川信 (2016 年 3 月 12 日) アメフラシ (*Aplysia kurodai*) の睡眠様行動の解析 日本動物学会第 68 回関東支部大会 (神奈川県横浜キャンパス: 横浜)
- ② Okutani, M. and Kurokawa, M. (2015 年 12 月 12 日) Peripheral neuronal regulation of the labial palps in suspension feeding of *Mytilus galloprovincialis*. 第 40 回日本比較内分泌学会大会・日本比較生理生化学会第 37 回大会 合同大会 (JMS アステールプラザ: 広島)
- ③ Okutani, M. and Kurokawa M. (2015 年 8 月 28 日) Neuronal mechanism of regulation of the labial palps in the suspension feeding of the mussel, *Mytilus galloprovincialis*. The 13<sup>th</sup> International Society for Invertebrate Neurobiology Symposium (Tihany, Hungary)
- ④ Kurokawa, M. and Tanaka, K. (2015 年 8 月 28 日) Comparative aspects of rhythmic movements of the gastrointestinal tract induced by the enteric nervous system in some gastropods, mollusks. The 13<sup>th</sup> International Society for Invertebrate Neurobiology Symposium (Tihany, Hungary)
- ⑤ Kurokawa, M. and Tanaka, K. (2015 年 8 月 26 日) Comparative physiology of rhythmic movements of the gastrointestinal tract regulated by the enteric nervous system in gastropods. Invited lecture in Symposium entitled Comparative Physiology of Gastrointestinal Tract and Enteric Nervous System. The 9<sup>th</sup> International Congress of Comparative Physiology and Biochemistry (Kraków, Poland)
- ⑥ Tanaka, K. and Ito, S. (2015 年 8 月 26 日) Neural control of the hindgut in a penaeid shrimp, *Marsupenaeus japonicas*. Invited lecture in Symposium entitled Comparative Physiology of Gastrointestinal Tract and Enteric Nervous System. The 9<sup>th</sup> International Congress of Comparative Physiology and Biochemistry (Kraków, Poland)
- ⑦ 奥溪真人, 黒川信 (2015 年 3 月 14 日) ムラサキイガイ (*Mytilus galloprovincialis*) の繊毛粘液摂食における粒子選別機構の解析. 日本動物学会関東支部第 67 回大会 (早稲田大学先端生命医科学センター: 東京)
- ⑧ 奥溪真人, 黒川信 (2014 年 3 月 15 日) ムラサキイガイ (*Mytilus galloprovincialis*) の摂食行動の解析—唇弁の神経支配— 日本動物学会関東

支部第 66 回大会 (東京大学大気海洋研究所 : 千葉)

- ⑨ 黒川信, 奥溪真人, 田中浩輔 (2014 年 7 月 31 日) Comparative physiology of the autonomous movements of the gastrointestinal tract in mollusks. The 11<sup>th</sup> International Congress of Neuroethology (ICN) and The 36<sup>th</sup> Annual Meeting of the Japanese Society for Comparative Physiology and Biochemistry (札幌コンベンションセンター : 札幌)
- ⑩ 田中浩輔, 伊藤慎, 黒川信 (2014 年 7 月 29 日) Neural control of the rectum in the penaeid shrimp, *Marsupenaeus japonicus*. The 11<sup>th</sup> International Congress of Neuroethology (ICN) and The 36<sup>th</sup> Annual Meeting of the Japanese Society for Comparative Physiology and Biochemistry (札幌コンベンションセンター : 札幌)
- ⑪ 山田沙佳, 黒川信 (2013 年 9 月 27 日) アメフラシ消化管の神経原性および筋原性自律運動に対する神経伝達物質の効果. 日本動物学会第 84 回大会 (岡山大学 : 岡山)
- ⑫ 高木賢司, 田中浩輔, 伊藤慎, 黒川信 (2013 年 7 月 13 日) An anatomical and electrophysiological study of neural control of rectum in the penaeid shrimp, *Marsupenaeus japonicus*. 日本比較生理生化学会第 35 回大会 (イーグレひめじ : 姫路)
- ⑬ 黒川信, 山田沙佳 (2013 年 7 月 13 日) Comparative physiology of the autonomous movements of the gastrointestinal tract in mollusks. 日本比較生理生化学会第 35 回大会 (イーグレひめじ : 姫路)

[図書] (計 3 件)

- ① 黒川 信 (2015) 「動物はみんな時々、ドキドキ・ドッキン (ホンドオニヤドカリ、アメフラシ)」研究者が教える動物実験 第 2 巻 神経・筋 221 ページ (177-180 ページ) 日本比較生理生化学会編 (共立出版) (共著)
- ② 田中浩輔 (2015) 「心臓の自動能とペースメーカーを調べる (トノサマガエル、ウシガエル)」研究者が教える動物実験 第 2 巻 神経・筋 221 ページ (181-183 ページ) 日本比較生理生化学会編 (共立出版) (共著)

[その他]

- ① アウトリーチ活動  
黒川 信 (2015 年 10 月 23 日-11 月 8 日) 企画展「東京の海・山・島に」の企画・出展 (首都大学東京南大沢キャンパス : 東京)
- ② 新聞報道  
黒川 信 (2015 年 10 月 28 日) 上記アウトリーチ活動の紹介記事 (朝日新聞朝刊多摩版)

## 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

田中 浩輔 (TANAKA Kosuke)

杏林大学保健学部・教授

研究者番号 : 50236585