様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９　（共通）

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

令和　７ 年　 ５ 月 ３１ 日現在

機関番号：１７７０１
研究種目：挑戦的研究（萌芽）
研究期間：2023～2024
課題番号：２３Ｋ１８０８１

研究課題名（和文）匂いによる排便制御メカニズムの解明

研究課題名（英文）Elucidation of the Mechanism of Odor-Induced Defecation

研究代表者
内藤　清惟（NAITOU, Kiyotada）

鹿児島大学・農水産獣医学域獣医学系・准教授

研究者番号：３０７９４９０３

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　5,000,000円

研究成果の概要（和文）：　匂いと排便制御を関連付ける脳領域をスクリーニングするための実験系の構築を行った。匂いによる排便への影響をスクリーニングするための実験系と、匂いが影響を与えた脳領域をスクリーニングする実験系を確立するために実験を行った。匂いによる排便への影響をスクリーニングするための実験では、匂い刺激が排便を誘起することを確認した。匂いと排便制御を関連付ける脳領域をスクリーニングするために、ラット全脳の網羅的に調べることができる組織透明化とライトシート顕微鏡を用いたスクリーニング法の開発を行なった。ラット全脳に最適化された透明化法の条件検討と、ラット全脳に最適化されたライトシート顕微鏡の研究開発を行なった。

研究成果の学術的意義や社会的意義
　排便は生活と密接に関係しているために、その問題はquality of life (QOL)の著しい低下をもたらし、社会的に大きな問題となっている。しかしながら、中枢神経系がどのように排便を制御しているのかに関する情報は不足しており、中枢神経系を対象とした排便制御法は確立されていない。本研究では、排便に影響する匂いを見つけ出し、その匂いが作用するメカニズムの解明を目的とする。これにより、匂いによる排便の制御法の確立を目指して研究を行う。本研究により、この分野の研究を飛躍的に進展させることを目指し、排便障害の病態の解明、新たな治療法・予防法の開発に貢献する。

研究成果の概要（英文）：We established an experimental system to screen brain regions that link olfaction to defecation control. To achieve this, we developed two experimental systems: one to screen the effects of odor on defecation, and another to identify the brain regions influenced by odor stimuli. In the experiment designed to assess the impact of odor on defecation, we confirmed that odor stimulation can induce defecation. To screen brain regions associated with olfaction and defecation control, we developed a method using tissue clearing and light-sheet microscopy that enables comprehensive analysis of the entire rat brain. We optimized the tissue clearing protocol for the rat brain and conducted research and development of a light-sheet microscope adapted for imaging the whole rat brain.

研究分野：匂い

キーワード：排便制御

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

１．研究開始当初の背景

中枢神経系による排便の制御には、脳にある上脊髄排便中枢と脊髄の腰仙髄部にある脊髄排便中枢が重要な役割をもつと考えられている。脳にある上脊髄排便中枢が脊髄の排便中枢を促進性または抑制性に制御し、脊髄の排便中枢が自律神経系を介して大腸の運動を制御していると考えられている。しかしながら、上脊髄排便中枢と脊髄排便中枢の詳細については、今のところ不明な部分がかなり残されているのが現状である。

中枢神経系による大腸運動の調節メカニズムの解明が遅れている理由として、中枢神経系における基礎的な情報が不足していることが挙げられる。例えば、どのような神経伝達物質が中枢神経系での大腸運動制御に関わっているのか、などである。そこで私たちの研究グループでは、中枢神経系による大腸運動の制御メカニズムを解明するために、中枢神経系で大腸運動の制御に関わる神経伝達物質について、脊髄を中心とした検索を実施し、中枢神経系による大腸運動の制御メカニズムにおける基礎的な情報を明らかにしてきた。この中で、摂食の調節に関わる消化管ホルモンであるグレリン［1、2］、モノアミン神経伝達物質であるノルアドレナリン［3］、ドパミン［4］、セロトニン［5］、消化管機能の調節に関わる消化管ホルモンとして知られるソマトスタチン［6］、視床下部で摂食の制御に関わるα-メラノサイト刺激ホルモン［7］が脊髄排便中枢に作用することで大腸運動を促進することが示された。これらの伝達物質のうち、モノアミン伝達物質であるノルアドレナリン、ドパミン、セロトニンについては、それぞれ脳の青斑核（Ａ６）、Ａ１１領域、延髄縫線核群（Ｂ１－３）から脊髄に投射する神経によって、脊髄排便中枢に放出されることで大腸運動が亢進することを報告した［8、9］。さらに、これらのうちドパミンとセロトニンは、大腸内へのカプサイシン投与による侵害刺激によって脳から下行性に脊髄に放出され、大腸運動を亢進することも報告している［10］。

２．研究の目的

これまでの研究から、中枢神経系による排便制御が、脳、脊髄、大腸をつなぐ神経回路によって行われていることが示されてきた。本研究では、この神経回路に影響を与える刺激として匂い刺激が関わるのではないかと考え、匂いと排便制御との関わりについて検討することを目的とした。

３．研究の方法

研究には、申請者の研究室で構築した匂い刺激による排便行動の解析が可能な実験系と、新規に構築したカスタムライトシート顕微鏡を用いた。

４．研究成果

（１）匂い刺激と排便制御の関わりを調べるために、匂い刺激によって排便が誘起されるかを検討した。まず、覚醒下のラットにおいて経時的に糞便の排出を記録できる実験系を構築した。この実験系では、ラットを透明なケージに入れた状態で下方から連続的に画像を取得し、この画像を解析することでラットの排便の回数とタイミングを記録できる。これによって、ラットに匂い刺激を与えてから１時間の排便数とタイミングを検討した。複数の匂い刺激を与えたところ、特定の匂い刺激を与えた場合のみ、排便数が増加することが確認された。

（２）従来、組織観察は光の透過性および抗体の浸透性の制限により、1～50 μm の薄切組織を対象として行われてきた。この問題を解決するために、組織透明化および深部免疫染色法が開発、発展してきている。組織透明化は主に脱脂、脱色、および屈折率の調整によって達成される。これまでに様々な組織透明化法が報告されている。最近では、生体動物の一部を透明化することも可能になってきている。一方で、厚い透明化組織に対する深部免疫染色法も多数提案されている。これらの組織透明化および深部免疫染色法は継続的に発展を続けており、ライトシート顕微鏡との組み合わせにより、大きく厚い組織の三次元解析が可能となっている。しかし、深部免疫染色のプロトコールは複雑で従来法とは大きく異なる点や、透明化組織の観察には高価なライトシート顕微鏡が必要となることから、その普及を妨げている。

ライトシート顕微鏡（Light Sheet Fluorescence Microscopy, LSFM）は、生体試料の三次元観察に適した蛍光顕微鏡技術である。薄い光シートを試料に横から照明することで、光学断層像をカメラで撮影する。光毒性や退色を最小限に抑えつつ高速に画像取得が可能であるため、従来の共焦点顕微鏡や二光子顕微鏡に比べ、観察中の試料へのダメージが少なく、長時間のライブイメージングや大きなサンプルの三次元試料にも対応できる点が大きな利点である。しかしながら、非常に高額な機器となっており、施設への導入が遅れているため、多くの研究者が利用できない状況にある。本研究では、ライトシート顕微鏡を利用したラット脳の解析を行うために、ベンチサイドに設置可能な DIY ライトシート顕微鏡である descSPIM を導入した。

descSPIM は、非常にシンプルかつコンパクトに設計されたライトシート顕微鏡で、施設レベルではなく研究室レベルでの導入を想定された、比較的安価に構築できる DIY ライトシート顕

微鏡である。レーザー光源から射出された励起光をコリメートし、シリンドリカルレンズを用いて１方向のみ集光させることで、ライトシートを形成する SPIM 系に属するライトシート顕微鏡である。このライトシートに対して、サンプルを連続的に移動させ、CMOS カメラで連続的に画像を取得することで、蛍光の光学断層像を取得する。10 ㎜厚のサンプルを数分でスキャン可能であり、非常に高速に三次元画像の取得ができる。さらに、ライトシートの厚さが z 深度方向の分解能に大きく影響を与えることから、ライトシートを形成するシリンドリカルレンズは焦点距離 150 ㎜と 500 ㎜の二種類から選択可能となっており、見たいサンプルに合わせて変更が可能である。透明化したラット脳の数 ㎜厚のスライスの撮影を行い、descSPIM によってラット脳の撮影が可能であることを確認した。

（３）descSPIM はシンプルかつ汎用的な構成となっているために、特定の用途に特化した構成とはなっていない。descSPIM の特徴として、その拡張性の高さが挙げられる。対象とするサンプルに合わせて構成を変えたり、パーツを追加することで、カスタムすることが可能である。本研究では、ラットの脳を対象として解析を行う必要がある。そこで、descSPIM を改良することで、ラット脳に最適化されたカスタムメイド・ライトシート顕微鏡の開発を行なった。descSPIM では、サンプルに対して片側からのみ励起光のライトシートを照射するため、大きなサンプルでは励起光が減衰してしまい、照射側とは反対側の蛍光が弱くなってしまう。この問題を解決するために、励起光学系にビームスプリッタを導入して光路を二つに分け、サンプルの両側からライトシートを照射するように改変した。これにより、励起光の減衰によって照射側とは反対側の蛍光が弱くなってしまうという問題が解決し、視野全体にわたって明るい蛍光画像が得られるようになった。ラット脳の数 ㎜厚のスライスを免疫染色後に透明化して観察したところ、片側からの励起光の照射では照射側とは反対側の神経を観察することは困難であったが、両側から励起光を照射すると両側の神経を観察することができた。

〈引用文献〉

1: Naitou K, Shiina T, Sugita R, Nakamori H, Shimizu Y. Characterization of ghrelin-sensitive neurons in the lumbosacral defecation center in rats. Neurogastroenterol Motil. 2015. 27(1):147-155. doi: 10.1111/nmo.12492.

2: Naitou K, Mamerto TP, Pustovit RV, Callaghan B, Rivera LR, Chan AJ, Ringuet MT, Pietra C, Furness JB. Site and mechanism of the colokinetic action of the ghrelin receptor agonist, HM01. Neurogastroenterol Motil. 2015. 27(12):1764-1771. doi: 10.1111/nmo.12688.

3: Naitou K, Shiina T, Kato K, Nakamori H, Sano Y, Shimizu Y. Colokinetic effect of noradrenaline in the spinal defecation center: implication for motility disorders. Sci Rep. 2015. 5:12623. doi: 10.1038/srep12623.

4: Naitou K, Nakamori H, Shiina T, Ikeda A, Nozue Y, Sano Y, Yokoyama T, Yamamoto Y, Yamada A, Akimoto N, Furue H, Shimizu Y. Stimulation of dopamine D2-like receptors in the lumbosacral defaecation centre causes propulsive colorectal contractions in rats. J Physiol. 2016. 594(15):4339-4350. doi: 10.1113/JP272073.

5: Nakamori H, Naitou K, Sano Y, Shimaoka H, Shiina T, Shimizu Y. Exogenous serotonin regulates colorectal motility via the 5-HT2 and 5-HT3 receptors in the spinal cord of rats. Neurogastroenterol Motil. 2018. 30(3):13182. doi: 10.1111/nmo.13183.

6: Naitou K, Shiina T, Nakamori H, Sano Y, Shimaoka H, Shimizu Y. Colokinetic effect of somatostatin in the spinal defecation center in rats. J Physiol Sci. 2018. 68(3):243-251. doi: 10.1007/s12576-017-0524-1.

7: Ueda HH, Naitou K, Nakamori H, Horii K, Shiina T, Masatani T, Shiraishi M, Shimizu Y. α-MSH-induced activation of spinal MC1R but not MC4R enhances colorectal motility in anaesthetised rats. Sci Rep. 2021. 11(1):487. doi: 10.1038/s41598-020-80020-x.

8: Nakamori H, Naitou K, Horii Y, Shimaoka H, Horii K, Sakai H, Yamada A, Furue H, Shiina T, Shimizu Y. Medullary raphe nuclei activate the lumbosacral defecation center through the descending serotonergic pathway to regulate colorectal motility in rats. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 2018. 314(3):G341-G348. doi: 10.1152/ajpgi.00317.2017.

9: Nakamori H, Naitou K, Horii Y, Shimaoka H, Horii K, Sakai H, Yamada A, Furue H, Shiina T, Shimizu Y. Roles of the noradrenergic nucleus locus coeruleus and dopaminergic nucleus A11 region as supraspinal defecation centers in rats. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 2019. 317(4):G545-G555. doi: 10.1152/ajpgi.00062.2019.

10: Naitou K, Nakamori H, Horii K, Kato K, Horii Y, Shimaoka H, Shiina T, Shimizu Y. Descending monoaminergic pathways projecting to the spinal defecation center enhance colorectal motility in rats. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 2018.

315(4):G631-G637. doi: 10.1152/ajpgi.00178.2018.

５．主な発表論文等

〔雑誌論文〕　計7件（うち査読付論文　7件／うち国際共著　5件／うちオープンアクセス　4件）

１．著者名 Takuto Matano, Kiyotada Naitou, Jannatul Ferdous, Takahiko Shiina, Mitsuya Shiraishi	４．巻 127
２．論文標題 Proposal for a simple and easy-to-implement protocol for three-dimensional tissue imaging that is compatible with observation using a confocal microscope	５．発行年 2025年
３．雑誌名 Acta Histochemica	６．最初と最後の頁 152257
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.acthis.2025.152257	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

１．著者名 FERDOUS Jannatul、MAKINO Haruka、MASATANI Tatsunori、FUJIMOTO Yoshikazu、NAITOU Kiyotada、SHIRAISHI Mitsuya	４．巻 87
２．論文標題 <i>In vitro</i> susceptibility of differentiated SH-SY5Y human neuroblastoma cells to herpes simplex virus type 1 and Japanese encephalitis virus infection	５．発行年 2025年
３．雑誌名 Journal of Veterinary Medical Science	６．最初と最後の頁 426～430
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1292/jvms.24-0405	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

１．著者名 FERDOUS Jannatul、NAITOU Kiyotada、SHIRAISHI Mitsuya	４．巻 86
２．論文標題 A peptide against the N-terminus of myristoylated alanine-rich C kinase substrate promotes neuronal differentiation in SH-SY5Y human neuroblastoma cells	５．発行年 2024年
３．雑誌名 Journal of Veterinary Medical Science	６．最初と最後の頁 1136～1144
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1292/jvms.24-0276	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

１．著者名 Ferdous Jannatul、Naitou Kiyotada、Shiraishi Mitsuya	４．巻 in press
２．論文標題 Distinct In Vitro Differentiation Protocols Differentially Affect Cytotoxicity Induced by Heavy Metals in Human Neuroblastoma SH-SY5Y Cells	５．発行年 2024年
３．雑誌名 Biological Trace Element Research	６．最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s12011-024-04342-x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1．著者名 Otomo K et.al.	4．巻 15
2．論文標題 descSPIM: an affordable and easy-to-build light-sheet microscope optimized for tissue clearing techniques	5．発行年 2024年
3．雑誌名 Nature Communications	6．最初と最後の頁 4941
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-024-49131-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1．著者名 Sawamura Tomoya、Yuki Natsufu、Aoki Kanae、Horii Kazuhiro、Horii Yuuki、Naitou Kiyotada、Tsukamoto Shumpei、Shiina Takahiko、Shimizu Yasutake	4．巻 326
2．論文標題 Alterations in descending brain-spinal pathways regulating colorectal motility in a rat model of Parkinson’s disease	5．発行年 2024年
3．雑誌名 American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology	6．最初と最後の頁 G195～G204
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1152/ajpgi.00181.2023	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 －

1．著者名 Sawamura Tomoya、Yuki Natsufu、Horii Kazuhiro、Naitou Kiyotada、Yamaguchi Hiroshi、Yamanaka Akihiro、Shiina Takahiko、Shimizu Yasutake	4．巻 324
2．論文標題 Essential roles of the hypothalamic A11 region and the medullary raphe nuclei in regulation of colorectal motility in rats	5．発行年 2023年
3．雑誌名 American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology	6．最初と最後の頁 G466～G475
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1152/ajpgi.00019.2023	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 －

〔学会発表〕　計6件（うち招待講演　0件／うち国際学会　1件）

1．発表者名 俣野 拓友、植田 大海、Ferdous Jannatul、白石 光也、内藤 清惟
2．発表標題 ニューロペプチドに着目した中枢神経系による排便制御メカニズムの検討
3．学会等名 第47回日本分子生物学会年会
4．発表年 2024年

１．発表者名
俣野 拓友、植田 大海、Jannatul Ferdous、髙木 隆太、藤本 佳万、白石 光也、内藤 清惟

２．発表標題
ラット脊髄腰仙髄部に投与したコレシストキニンが大腸運動を活性化する

３．学会等名
第167回 日本獣医学会学術会議

４．発表年
2024年

１．発表者名
Jannatul FERDOUS, Kiyotada NAITOU, Mitsuya SHIRAISHI

２．発表標題
Comparison of in vitro differentiation protocols for heavy metal-induced cytotoxicity in human neuroblastoma SH-SY5Y cells

３．学会等名
第51回日本毒性学会年会

４．発表年
2024年

１．発表者名
Kiyotada NAITOU, Kohei OTOMO, Etsuo A. SUSAKI

２．発表標題
descSPIM-Fullmoon: development of an enhanced descSPIM for wide-field cleared tissue imaging

３．学会等名
Focus on Microscopy 2025（国際学会）

４．発表年
2025年

１．発表者名
内藤清惟、児島一州、植田大海、白石光也、奥谷公亮、 小澤真、正谷達謄

２．発表標題
腰仙髄部脊髄における1型メラノコルチン受容体の発現および局在の検討

３．学会等名
第32回日本病態生理学会大会

４．発表年
2023年

１．発表者名 俣野拓友、髙木隆太、植田大海、藤本佳万、白石光也、内藤清惟
２．発表標題 Investigation of effects of cholecystokinin in the spinal defecation center
３．学会等名 第101回日本生理学会大会
４．発表年 2024年

〔図書〕　計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

―

６．研究組織

	氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考

７．科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕　計0件

８．本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関