

令和 2 年 5 月 30 日現在

機関番号：12605

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08121

研究課題名(和文)ウサギの盲腸糞形成と輸送に関する腸神経系の免疫組織化学的研究

研究課題名(英文)Immunohistochemical study on the rabbit intestinal nervous system involved in soft feces formation and transportation

研究代表者

柴田 秀史 (Shibata, Hideshi)

東京農工大学・(連合)農学研究科(研究院)・教授

研究者番号：50145190

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：ウサギ大腸における各分節の組織学的構造と神経組織の構築および神経関連化学物質の分布を明らかにした。腸壁は、結腸紡錘と直腸でもっとも厚く、盲腸でもっとも薄かった。結腸紡錘では粘膜が、直腸では筋層が他の分節と比べてもっとも厚く、粘液細胞は結腸紡錘でもっとも多く、盲腸ではもっとも少なかった。筋層間神経叢の分布および数種の神経関連物質の分布は、近位結腸でもっとも豊富で盲腸で最も疎であった。以上の結果、近位結腸が複雑な腸管運動を行い、結腸紡錘は盲腸糞を包む粘液の分泌に関与し、盲腸は腸内微生物による発酵による栄養素の形成に適した構造を示すことが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究によって、盲腸糞の形成という特異な消化機構を有するウサギにおける大腸壁の構築と腸管運動を制御する腸神経系の構築が明らかになった。これらの結果は、近年、伴侶動物として飼育数が増加しているウサギに多発する消化管疾患の治療法の開発においても、その基盤となる基礎獣医学的知見となった。

研究成果の概要(英文)：The present study clarified the structural features of the wall and nervous tissues in each segment of the rabbit large intestine. The fusus coli and rectum have the thickest intestinal wall, followed by the proximal colon and distal colon, and the cecum has the thinnest wall. The fusus coli has the thickest mucosa whereas the rectum has the thickest muscular layer. Furthermore, the fusus coli has the most numerous mucous cells whereas the cecum has the fewest. The enteric nervous tissue is the richest in the proximal colon, followed by the fusus coli, distal colon, and cecum. Some neurochemical substances are distributed in a similar fashion. These findings suggest that the proximal colon may control complex bowel motility with the most well-developed neuronal network, the fusus coli may secrete rich mucus that enwraps the soft feces, and the cecum may gently contract for fermentation of the cecal contents with the least developed wall and nerve plexus.

研究分野：獣医解剖学

キーワード：大腸 ウサギ 腸神経系 腸壁 構造

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) ウサギ大腸の重要性

腸管内微生物叢 (マイクロフローラ) はヒトおよび動物の栄養や免疫機能に重要な役割を果たすことが近年明らかになりつつある (Kährström, et al., 2016). ウサギは、マイクロフローラによって産生されるアミノ酸やビタミンといった栄養素に富む盲腸糞 (軟糞) を排泄し、それを直ちに摂食することによって必須の栄養素を小腸から吸収する (Varga, 2014). 盲腸糞の形成に際し、盲腸と結腸は、盲腸糞が一般の糞 (通常糞あるいは硬糞) と混合しないように肛門へ向けて移送する. そのためウサギでは、盲腸と結腸の構造や機能が、他の動物種と比べて著しく複雑である. このような糞便移送のために必要な盲腸と結腸の消化管運動は、腸神経系によって制御されており、それらの分節における腸神経系の構築が解明できれば、ウサギに特有の消化吸收機構が理解できると考えられる. しかし、ウサギにおける腸神経系の解剖学的構築は現在までに、ほとんど解明されていない.

(2) ウサギ大腸の解剖学および機能的特徴

ウサギの大腸は、盲腸、上行結腸、横行結腸、下行結腸、直腸に区分される (図1). 盲腸と上行結腸は、他の動物種とは異なって、著しく発達し、回腸遠位部とともに回転して回盲結腸複合体を形成する. 盲腸は内部にラセン弁が存在し、遠位部は発達した虫垂となる. 結腸は機能的には以下のように区分される (図1). 近位結腸は、3条の腸ヒモと3列の膨起を備える第一分節と、その遠位で1条の腸ヒモと1列の膨起を備える第二分節からなる. 近位結腸に続くのが結腸紡錘であり、ここには腸ヒモも膨起も存在しない. 結腸紡錘の遠位が遠位結腸である. 近位結腸に送られた内容物は、結腸紡錘の制御によって粗繊維と液状成分に分けられ、前者は遠位結腸から肛門へ向かって徐々に移送されて水分を吸収された後に通常糞を形成するのに対し、後者は盲腸に移送されて微生物発酵の原材料として使用される. 発酵の結果産生されたアミノ酸やミネラルに富む液状成分は結腸紡錘に移送され、そこで粘液に包まれて盲腸糞となって短時間で肛門から排泄される. 以上のように、ウサギの栄養摂取に必須の盲腸糞の形成には、盲腸、近位結腸、結腸紡錘、遠位結腸が内容物に応じて協調的に運動することが必要である. 従って、結腸と盲腸の腸管運動を支配する腸神経系が極めて重要であると考えられる (Varga, 2014).

(3) 従来の研究報告

現在まで、腸神経系の形態学的研究は主としてモルモットを中心とした齧歯類で行われており、神経叢の構築や神経叢内のニューロンに含まれる神経関連物質が動物種によって異なることが明らかになっている (Furness, 2006). しかし、ウサギ大腸では、基本的な腸神経系の構築、ニューロンに存在する神経関連物質の種類と分布、およびそれらの大腸各部における差異に関してほとんど明らかになっていない. 特に結腸紡錘については、この分節が大腸運動を制御するとされているものの、その根拠となる神経叢の構築は明らかになっていない (Snipes, 1982).

2. 研究の目的

ウサギにおける盲腸糞の形成と輸送に必要な盲腸と結腸の基礎的解剖学的特徴と、腸管運動を制御する腸神経系の神経分布、神経細胞の免疫組織化学的特性についてはまだ明らかではない. そこで、以下を明らかにすることを目的とした.

- (1) 大腸各分節の腸壁の厚さと粘液細胞の分布の解明
- (2) 大腸各分節における筋層間神経叢全体の分布の特徴
- (3) 大腸各分節における筋層間神経叢全体における神経関連物質の分布の特徴

3. 研究の方法

東京農工大学・研究倫理委員会・動物実験小委員会によって動物実験実施の承認を得た後、実験を開始した.

雌雄ニュージーランドホワイトの成ウサギに致死量以上のペントバルビタールナトリウムを静脈内投与した. 安楽死後、直ちに開腹し、大腸の各分節を採材して、4%パラホルムアルデヒドリン酸緩衝液で一晩固定した. 続いて、各分節の一部を常法に従ってパラフィン包埋し切片を作成して、ヘマトキシリン・エオジン染色を施した. さらに、粘液細胞を明確に観察する目的でアルシアンブルー (AB) 染色、過ヨウ素酸シフ (PAS) 染色、AB-PAS 同時染色を行った.

また、各分節の一部を凍結マイクロトームによって接線方向に薄切した切片を、浮遊状態のまま、間接酵素抗体法により免疫組織化学染色に供し神経関連物質をジアミノベンジジンによって可視化した.

免疫組織化学染色に使用した抗体は以下の通りである. ヤギ抗 protein gene product 9.5 (PGP9.5) IgG (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MI, USA); ヤギ抗神経性一酸化窒素合成酵素 (nNOS) IgG (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA); ヤギ抗カルベインディン D28K (CB) IgG



図1 ウサギ大腸の模式図. 腹腔内で回転し3次的に配列している大腸を平面的に展開して示す.

(Thermo Fisher Scientific, Waltham, IL, USA) ; マウス抗ソマトスタチン (SST) IgG (Thermo Fisher Scientific) ; 過酸化酵素結合ウサギ抗ヤギ IgG (Jackson ImmunoResearch laboratories, West Grove, PA, USA) ; 過酸化酵素結合ヤギ抗マウス IgG (Jackson ImmunoResearch laboratories).

標本は、光学顕微鏡 (Eclipse Ni-U, Nikon Instruments, Tokyo, Japan) で観察し、デジタルカメラ (DS-Ri1, Nikon Instruments) および NIS Elements (Nikon Instruments) によってデジタルイメージを取得した。取得したイメージは Adobe Photoshop (Adobe Systems, San Jose, CA, USA) で画質調整した。定量データの計測には ImageJ (NIH, Bethesda, ML, USA) を用いた。定量データは Excel (Microsoft, Redmond, WA, USA) で取りまとめ、GraphPad Prism 8 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) で統計検定を行った。

4. 研究成果

ウサギ大腸における各分節の組織学的構造と神経組織の構築および神経関連物質の分布を明らかにした。

(1) 腸壁の厚さおよび粘液細胞の分布の比較 (図2)

定性的には、盲腸は腸壁が薄く、近位結腸、結腸紡錘で厚くなり、遠位結腸で薄くなって、直腸で再び厚くなる傾向が観察された。腸壁と壁を構成する各層の厚さを計測し統計検定すると、結腸紡錘と直腸の腸壁が近位結腸、遠位結腸、盲腸と比較して有意に厚く、盲腸の壁が他の分節と比較して有意に薄いことが明らかになった。近位結腸と遠位結腸の厚さには有意差は存在しなかった。粘膜は結腸紡錘が、筋層は直腸が、他の分節と比較して有意に厚いことがわかった。粘液細胞は結腸紡錘でもっとも多く、盲腸でもっとも少なかった。以上の結果、結腸紡錘には盲腸嚢を被包するのに必要な粘液分泌能が存在する可能性、直腸には排便時に必要な強い筋収縮能力が存在する可能性、盲腸にはあまり強い消化管運動や粘液分泌能が存在せず、腸内発酵に適した構造である可能性が示唆された。

(2) 筋層間神経叢の分布パターンと、筋層間神経叢における nNOS 陽性ニューロンおよび CB 陽性ニューロンの分布

汎神経マーカーである抗 PGP9.5 抗体を使用した免疫染色によって筋層間神経叢を可視化すると、近位結腸第一分節において神経節がもっとも大きく、神経節間を結合する神経束が太く、分布が密であった (図3)。ついで、近位結腸第二分節、結腸紡錘、遠位結腸、盲腸の順に神経節が小さくなり神経束が細くなって分布が疎になった (図3)。nNOS および CB 陽性神経構造の分布パターンも同様であった (図4, 5)。ただし、神経細胞体および線維は nNOS 陽性のものの方が CB 陽性のものよりも多かった。nNOS は抑制性運動ニューロンのマーカーであり、CB は内在性一次求心性ニューロンのマーカーであると考えられることから、近位結腸がもっとも精密な腸管運動の制御を筋層間神経叢から受ける可能性と、盲腸は筋層間神経叢による腸管運動制御は顕著でない可能性が示唆された。従って、近

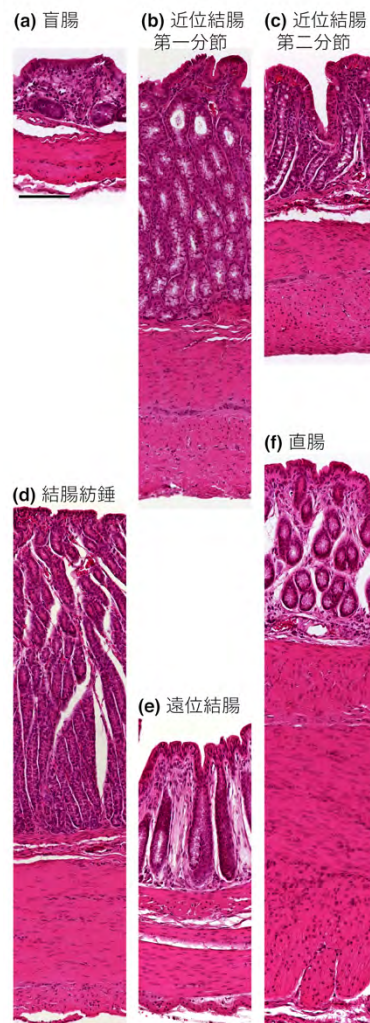


図2 大腸各分節のヘマトキシリンエオジン染色像. バーは100 μ m.

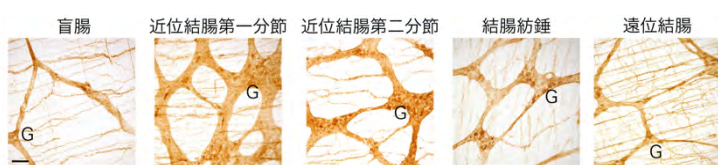


図3 大腸各分節における PGP9.5 免疫染色による神経組織の分布. G は神経節, バーは 100 μ m

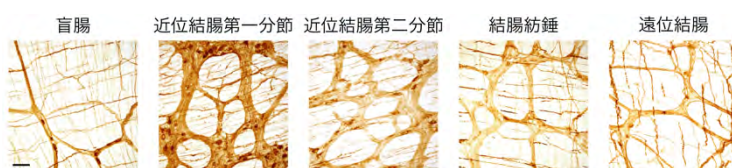


図4 大腸各分節における nNOS 陽性神経組織の分布. バーは 100 μ m

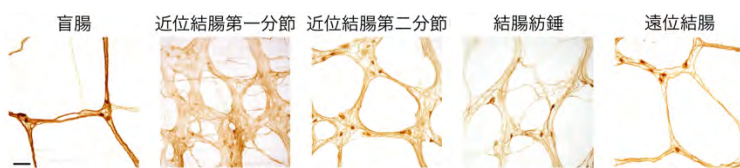


図5 大腸各分節における CB 陽性神経組織の分布. バーは 100 μ m



図6 大腸各分節の筋層間神経叢における SST 陽性神経組織の分布. バーは 100 μ m

位結腸，特にその第一分節が盲腸糞の形成に必要な腸管運動を制御するもっとも重要な役割を担っている可能性が考えられた。

(3) 筋層間神経叢，粘膜下神経叢，粘膜における SST 陽性神経の分布

大腸各分節の筋層間神経叢における SST 陽性神経細胞体および線維は，結腸紡錘にもっとも豊富に分布し，ついで，遠位結腸，近位結腸（第一および第二分節），盲腸の順に分布が減少した（図6）．それに対して粘膜下神経叢では，近位結腸（第一および第二分節）にもっとも豊富で，ついで，結腸紡錘，遠位結腸，盲腸の順に分布が減少した．さらに，粘膜における SST 陽性線維は，近位結腸第二分節と結腸紡錘にもっとも豊富で，近位結腸第一分節，遠位結腸，盲腸の順に減少した．これらの結果，筋層間神経叢に存在し腸管運動を制御する下行性介在ニューロンの一部である SST 陽性ニューロンが結腸紡錘に豊富であることと，粘膜下神経叢に存在し粘膜に線維を伸ばして液状成分の輸送制御に関与する SST 陽性ニューロンが近位結腸に豊富であることがわかった．従って，これらの分節が大腸機能，特に，結腸紡錘は通常糞と盲腸糞の形成に必須である腸管運動制御において，近位結腸は腸管内容物の水分量調節において重要な役割を果たすことが示唆された．

(4) 得られた成果の位置づけ，インパクト，今後の展望

本研究の結果，近位結腸と結腸紡錘が腸神経系による非常に精密な腸管運動の制御を受け，さらに近位結腸は内容物の水分量調節，結腸紡錘が腸管運動の制御と同時に盲腸糞を被包する粘液分泌に重要な役割を果たす可能性が明らかになった．

ウサギ大腸の構造解明の研究は Snipes (1982)以降はまとまった研究が行われておらず，特に神経叢の構造研究は殆ど行われて来なかった．従って，本研究がウサギ大腸腸神経系の構造解明の第一歩となるものであると言える．今後，大腸各分節の腸神経系において，血管作用性腸管ポリペプチドやカルシトニン遺伝子関連ペプチドといった他の神経関連物質の局在を明かにするとともに，それぞれの化学物質を含有したニューロン間の結合関係が解明されれば，さらに大腸の機能形態学が進展すると考えられる．それらの知見は，伴侶動物としての飼育数が増加しつつあるウサギに頻発する消化器系疾患の治療法の開発に寄与する基礎獣医学的データになると考えられる．

<引用文献>

- Furness, J.B. 2006 *The Enteric Nervous System*, Malden, Blackwell Publishing, Inc.
- Kährström, C.T. et al. 2016 Intestinal microbiota in health and disease. *Nature* 2016 535:47.
- Snipes, R.L. et al. 1982 Structural and functional differences in various divisions of the rabbit colon. *Cell Tissue Res.* 225: 331-346.
- Varga, M. 2014 Rabbit basic science. pp. 3-108. *In: Textbook of Rabbit Medicine*, 2nd ed., Butterworth-Heinemann, Oxford.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Ahmad Faisal AMIRY, Tetsuhito KIGATA and Hideshi SHIBATA	4. 巻 81
2. 論文標題 Wall thickness and mucous cell distribution in the rabbit large intestine	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The Journal of Veterinary Medical Science	6. 最初と最後の頁 990-999
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1292/jvms.19-0159	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 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Ahmad Faisal Amiry, Tetsuhito Kigata, and Hideshi Shibata
2. 発表標題 Wall thickness of the rabbit large bowel
3. 学会等名 第105回日本解剖学会関東支部学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Ahmad Faisal Amiry, Tetsuhito Kigata, and Hideshi Shibata
2. 発表標題 Mucus cell distribution in the rabbit large intestine
3. 学会等名 The 9th Joint Symposium of Veterinary Research in East Asia（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Ahmad Faisal Amiry, Tetsuhito Kigata, and Hideshi Shibata
2. 発表標題 Structural organization of the myenteric plexus in the rabbit large intestine
3. 学会等名 第123回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Ahmad Faisal Amiry, Tetsuhito Kigata, and Hideshi Shibata
2. 発表標題 Immunohistochemical study of somatostatin-immunoreactive nerve structures in the rabbit large intestine
3. 学会等名 第124回日本解剖学会総会全国学術集会
4. 発表年 2019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