

【目的】排便の制御は末梢性と中枢性の両方の調節を受けている。脳にある排便中枢が脊髄にある排便中枢を、脊髄の排便中枢が大腸の内在神経系をコントロールすることで、排便が制御されると考えられている。近年、過敏性腸症候群などのストレス性の排便障害が社会的に大きな問題となってきたことで、中枢神経系による排便の制御メカニズムの解明が重要視されるようになった。しかしながら、中枢神経系による排便制御の仕組みの解明はあまり進んでいない。我々は、これまで麻酔下のラットを用いた *in vivo* の実験法を用いて、脊髄による排便制御に着目した研究を行ってきた。本研究では、これまでの研究で明らかにしてきた脊髄排便中枢で作用する伝達物質が、脊髄または脳のどの領域から投射する神経に由来するのかを、逆行性トレーサーおよび蛍光抗体法を用いて組織学的に検討した。

【方法】実験には、SD 系統の雄ラット (250~300 g) を用いた。神経に蛍光タンパク質の mCherry を発現させるアデノ随伴ウイルスベクターを L6-S1 領域の脊髄に投与し、脊髄の排便中枢に投射する神経に mCherry を発現させた。4 週間回復させたラットに灌流固定を行い、脳と脊髄を摘出し 4%パラホルムアルデヒド・リン酸緩衝液で固定した。固定後、組織を 0.5 mm、1 mm、2 mm の厚さに切り出し、CUBIC-L 試薬によって脱脂・脱色し、CUBIC-R+ 試薬によって屈折率を調整し、組織を透明化した。屈折率を調整した組織は、CUBIC-R+ 試薬でマウントした。封入した組織は共焦点顕微鏡を用いて観察し、画像を取得した。一部のサンプルでは免疫蛍光染色も行った。脱脂・脱色後の組織を HEPES-TCS 緩衝液でブロッキングし、一次抗体と蛍光標識された Fab フラグメントの複合体を用いて組織に抗体を感作させた。抗体感作後、組織を洗浄・固定し、CUBIC-R+ 試薬を用いて屈折率調整を行った。

【結果】脳の連続切片の透明化に適した切片の厚さを調べるために、0.5 mm、1 mm、2 mm 厚の脳切片を作製し検討した。0.5 mm 厚では連続切片を作製することが困難であり、2 mm 厚では透明化および共焦点顕微鏡での観察が困難であった。1 mm 厚で連続切片を作製したところ、厚さの安定した脳の連続切片を作製することができたため、以降の検討は 1 mm 厚の切片で行った。スライドガラスに封入した透明化組織標本を、共焦点顕微鏡を用いて観察・撮影し、画像を取得した。共焦点顕微鏡によって得られた画像上で、mCherry を発現した神経を確認することができた。このことは、L6-S1 領域に位置する脊髄排便中枢に脳から軸索を伸ばしている神経が存在することを示している。また、1 mm という非常に厚い組織スライスを観察に用いることで、標的細胞の 3 次元的な位置関係を知ることが可能となり、脊髄排便中枢を含む神経回路のより詳細な解析が飛躍的に進展することが期待できる。しかしながら、蛍光標識された神経を同定するためには、蛍光抗体を用いた免疫蛍光染色によって検討する必要がある。現在、蛍光抗体を用いた多重免疫染色を行い、mCherry と各種神経マーカーの共発現を検討している。

共焦点レーザー顕微鏡を用いた透明化組織標本の観察

