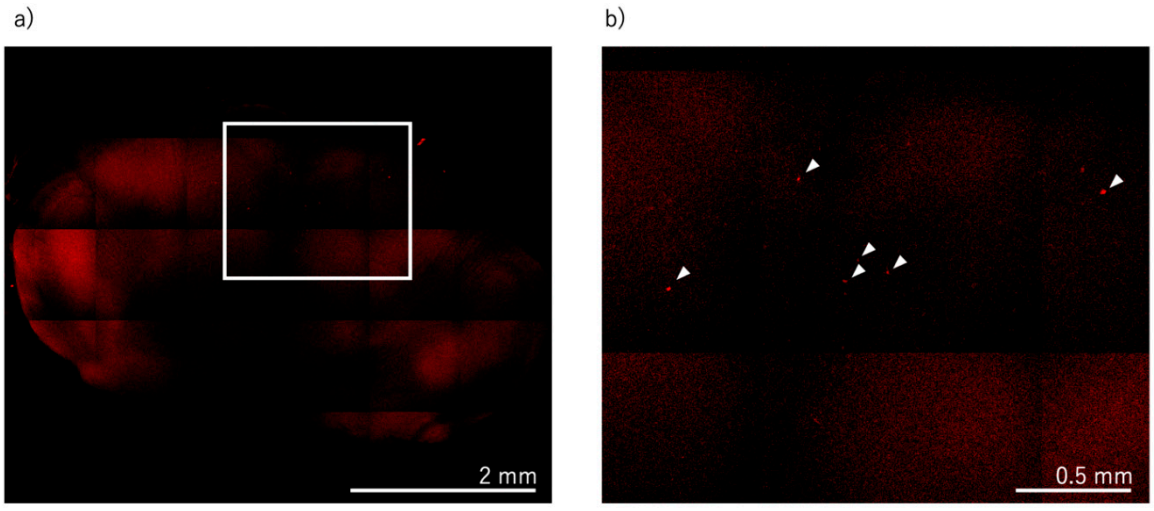
151　中枢神経による排便制御における脊髄の神経回路の解析	内藤　清惟

【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。スライドグ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



151. 中枢神経による排便制御における脊髄の神経回路の解析

内藤　清惟

鹿児島大学 共同獣医学部 基礎獣医学講座

Key words：排便中枢，大腸運動，脊髄，脳，神経回路

緒　言

消化管の機能は、内在神経系による末梢性の調節を受ける。内在神経系は消化管に特有な末梢神経系であり、消化管内の状態に合わせて機能を制御している。さらに、消化管の機能は脳や脊髄による中枢性の調節も受けている。排便の制御も末梢性と中枢性の両方の調節を受けており、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。

排便の制御メカニズムの研究において、中枢神経系による制御メカニズムの研究はあまり行われていない。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おらず、ストレス性の排便障害の病態解明が進まない原因となっている。

我々は、これまで脊髄による排便制御に着目した研究を行ってきた。麻酔下のラットを用いた *in vivo* の実験により、ノルアドレナリン、ドパミン、セロトニン、ソマトスタチン、α-メラノサイト刺激ホルモンなどの伝達物質が、脊髄の排便中枢に作用することで大腸運動を活性化することを明らかにしてきた［1〜5］。脊髄におけるこの発見を足がかりに、排便制御に関わる脳の神経領域の同定、大腸への侵害刺激によって活性化する神経回路および腹痛と大腸運動の関係を明らかにした［6〜8］。

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

1. アデノ随伴ウイルスベクターによるマーカータンパク質の発現

実験には、感染した神経に蛍光タンパク質である mCherry を発現させるアデノ随伴ウイルスベクターを用いた。SD 系統の雄ラット（250〜300 g）に三種混合麻酔で麻酔を行った。麻酔下ラットにイヤーバーを着けて脳・脊髄定位固定装置で脊椎を固定した。ラットの背部を切開して腰仙髄部脊椎を露出し、L6-S1 領域脊髄が位置する T13-L1 椎体の椎弓を切除し、脊髄を露出させた。マイクロシリンジにアデノ随伴ウイルスベクター溶液を充填し、脊髄正中から横±0.6 mm、深さ 1 mm の位置に挿入した。マイクロインジェクターを用いて、流速 20 μL/min で 100 μL のアデノ随伴ウイルスベクター溶液を注入した。注入後、5 分間静置した後、シリンジを引き抜いた。アデノ随伴ウイルスベクター溶液は脊髄の両側に注入した。注入後、接着剤で脊椎を塞ぎ、背部皮膚を縫合した。術後 3 日間、感染予防のために抗生物質を 1 日 1 回、術後鎮痛剤を 1 日 2 回皮下投与した。マーカータンパク質を十分に発現させるため、アデノ随伴ウイルスベクター注入後、4 週間飼育した。

2. 組織の採取と透明化

4 週間回復させたラットにセコバルビタールを腹腔内投与して麻酔し、D-PBS を心臓から灌流させた後、4%パラホルムアルデヒド・リン酸緩衝液で灌流固定した。灌流固定後、脳と脊髄を摘出し 4%パラホルムアルデヒド・リン酸緩衝液に一晩浸漬した。固定後、ブレインマトリックスを用いて、組織を 0.5 mm、1 mm、2 mm 厚に切り出し、0.01 M

リン酸緩衝液（pH 7.2～7.4）で 30 分間の洗浄を 3 回行った。組織の脱脂・脱色を行うために、切り出した組織を CUBIC-L 試薬［9］に浸漬し、37℃で振とうさせた。1、2、3、5 日目に CUBIC-L 試薬を新しいものに交換し、7 日間浸漬した。脱脂・脱色された組織を 0.01 M リン酸緩衝液（pH 7.2～7.4）で 30 分間の洗浄を 3 回行った。組織の屈折率の調整するために、脱脂・脱色された組織を CUBIC-R＋試薬［9］に浸漬し、37℃で振とうさせた。1、2、3 日目に CUBIC-R＋試薬を新しいものに交換し、5 日間浸漬した。屈折率を調整した組織は、シリコンシートを貼り付けたスライドグラス上に、CUBIC-R＋試薬でマウントし、カバーガラスを被せて封入した。封入した組織は共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察し、画像を取得した。

3. 透明化組織の免疫蛍光染色

免疫蛍光染色は、CUBIC-L 試薬を用いた組織の脱脂・脱色後に行った。脱脂・脱色後の組織を 0.01 M リン酸緩衝液（pH 7.2～7.4）で 2 時間、3 回洗浄した。組織を HEPES-TCS 緩衝液（10 mM HEPES 緩衝液 pH 7.5、10% TritonX-100、0.5%カゼイン、200 mM NaCl）［10］に入れ、32℃で 90 分間緩やかに振とうしてブロッキングした。一次抗体と蛍光標識された Fab フラグメントの複合体を形成させるために、一次抗体と Fab フラグメントを混合し、90 分間 37℃で加温した。加温中、30 分毎に混合液を撹拌した。一次抗体と Fab フラグメントの複合体を HEPES-TCS 緩衝液で希釈してから組織を浸け、32℃で 48 時間緩やかに振とうして抗体を感作させた。抗体感作後、組織を HEPES-TCS 緩衝液に移し、4℃で 24 時間緩やかに振とうさせた。その後、組織を 10% TritonX-100 含有 0.01 M リン酸緩衝液（pH 7.2～7.4）に移し 32℃で 2 時間振とうして洗浄した。0.01 M リン酸緩衝液（pH 7.2～7.4）で 32℃、2 時間の振とう洗浄を 2 回行った。洗浄後の組織を 1%パラホルムアルデヒド・リン酸緩衝液に入れ、24 時間振とうして固定した。固定後、組織を 0.01 M リン酸緩衝液（pH 7.2～7.4）で 2 時間の洗浄を 3 回行った。洗浄後、CUBIC-R＋試薬を用いて屈折率調整を行い、封入・観察した。

結果および考察

1. 脳の連続切片作製と組織の透明化

脳の連続切片の透明化に適した切片の厚さを決めるために、0.5 mm、1 mm、2 mm 厚の脳切片を作製し検討した。脳を 0.5 mm の厚さで連続切片にすると、組織が歪んでしまい厚さが均一にならなかった。そこで安定的に連続切片を作製するために、より厚い切片を作製することにした。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（図 1a）。2 mm 厚でも連続切片の作製は容易にできたが、透明化処理および共焦点顕微鏡での画像取得に支障があったため、以降の検討は 1 mm 厚の切片で行った。

1 mm 厚の切片を CUBIC-L 試薬を用いた脱脂・脱色と CUBIC-R＋試薬を用いた屈折率調整により透明化したところ、図 1b の様に透明化された連続切片が得られた。透明化処理前と処理後の脳切片を比較すると、透明化処理により組織が膨潤して大きくなっていた。このことから、組織を観察する際にはより広い範囲を観察する必要があり、共焦点顕微鏡で観察・撮影する時間が長くなることが問題点としてあげられた。

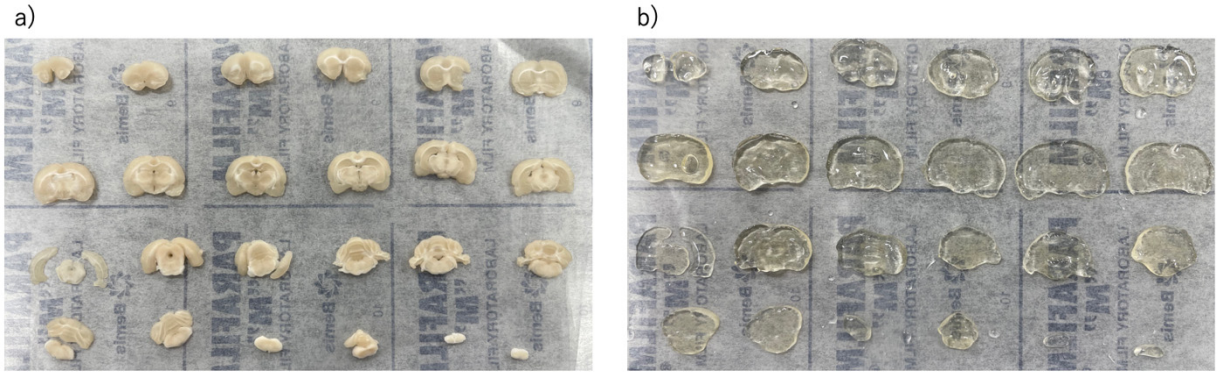


図 1. 透明化処理前および処理後の脳の連続切片

透明化処理前と処理後の同一の脳の連続切片の肉眼像。透明化処理後の脳切片は、透明化処理前のものと比べて、CUBIC 試薬によって膨潤し、大きくなっている。

a) 透明化処理前の脳の 1 mm 厚の連続切片（環状断面）。左上から右下に向かって、頭側から尾側へ向かう連続切片となっている。

b) 透明化処理後の脳の 1 mm 厚の連続切片（環状断面）。左上から右下に向かって、頭側から尾側へ向かう連続切片となっている。

2. 共焦点レーザー顕微鏡を用いた透明化組織標本の観察

スライドグ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。透明化組織標本ではバックグラウンドの蛍光が強く、ハロゲン光源を用いた肉眼での観察では mCherry を発現した細胞は確認できなかった。しかしながら、レーザースキャンによって得られた画像上では、mCherry を発現した細胞を確認することができた（図 2a、b）。バックグラウンドの高さを考慮すると、透明化組織標本の観察では標的となる蛍光タンパク質の高い発現量が良好な画像の取得に必要であると考えられる。また、脳スライスを透明化すると各神経領域を特定するためのランドマークとなる構造を確認することができない。そのため、mCherry を発現する神経細胞を同定することができず、脊髄排便中枢を含む神経回路に重要な脳領域の特定に至らなかった。この問題を解決するために、mCherry 発現細胞と各種神経マーカーの発現を、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。

本研究では、mCherry を発現させるアデノ随伴ウイルスベクターをラットの脊髄 L6-S1 領域に投与し、その脳の連続切片の透明化標本を作製することで、mCherry を発現する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。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、標識された細胞を見落としなく確認することができる。このことは、標識された細胞の見落としを防ぐだけでなく、これまでの数十μm の切片を用いた確認では難しかった標的細胞の 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、今回の研究では mCherry を発現する神経の存在領域や神経種の同定まで到達することができなかった。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の確認を行っているところである。これによって、脊髄排便中枢を含む神経回路に関わる脳領域について、脳の全領域の検索および、神経領域と神経種の特定が可能になり、脊髄排便中枢を中心とした排便制御システムの解明につながると考えている。

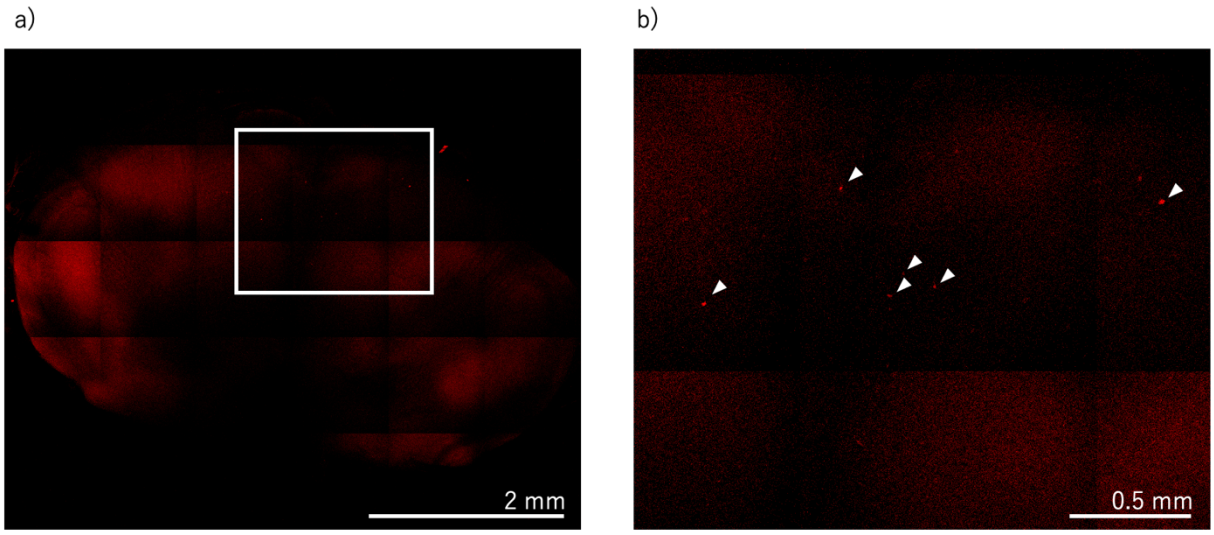


図 2. 共焦点レーザー顕微鏡を用いた透明化組織標本の観察

CUBIC試薬を用いて透明化した脳幹部を共焦点レーザー顕微鏡で撮影した画像。

a) 脳幹部の全体像。縦 5、横 6 の計 30 領域について、1 mm 厚の組織を z 軸方向に連続撮影し、取得された画像を一枚に合成した。

b) 図 2a 中の四角で囲まれた部分を拡大した画像。矢頭は mCherry を発現している神経を指す。

文　献

1) 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 Jul 28;5:12623. doi: 10.1038/srep12623. PMID: 26218221

2) 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 Aug 1;594(15):4339-50. doi: 10.1113/JP272073. Epub 2016 Apr 28. PMID: 26999074

3) 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 Mar;30(3). doi: 10.1111/nmo.13183. Epub 2017 Aug 10. PMID: 28795477

4) 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 May;68(3):243-251. doi: 10.1007/s12576-017-0524-1. Epub 2017 Jan 25. PMID: 28124286

5) 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 Jan 12;11(1):487. doi: 10.1038/s41598-020-80020-x. PMID: 33436759

6) 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 Mar 1;314(3):G341-G348. doi: 10.1152/ajpgi.00317.2017. Epub 2017 Nov 22. PMID: 29167116

7) 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 Oct 1;315(4):G631-G637. doi: 10.1152/ajpgi.00178.2018. Epub 2018 Aug 2. PMID: 30070581

8) 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 Oct 1;317(4):G545-G555. doi: 10.1152/ajpgi.00062.2019. Epub 2019 Aug 28. PMID: 31460791

9) Tainaka K, Murakami TC, Susaki EA, Shimizu C, Saito R, Takahashi K, Hayashi-Takagi A, Sekiya H, Arima Y, Nojima S, Ikemura M, Ushiku T, Shimizu Y, Murakami M, Tanaka KF, Iino M, Kasai H, Sasaoka T, Kobayashi K, Miyazono K, Morii E, Isa T, Fukayama M, Kakita A, Ueda HR. Chemical Landscape for Tissue Clearing Based on Hydrophilic Reagents. Cell Rep. 2018 Aug 21;24(8):2196-2210.e9. doi: 10.1016/j.celrep.2018.07.056. PMID: 30134179

10) Susaki EA, Shimizu C, Kuno A, Tainaka K, Li X, Nishi K, Morishima K, Ono H, Ode KL, Saeki Y, Miyamichi K, Isa K, Yokoyama C, Kitaura H, Ikemura M, Ushiku T, Shimizu Y, Saito T, Saido TC, Fukayama M, Onoe H, Touhara K, Isa T, Kakita A, Shibayama M, Ueda HR. Versatile whole-organ/body staining and imaging based on electrolyte-gel properties of biological tissues. Nat Commun. 2020 Apr 27;11(1):1982. doi: 10.1038/s41467-020-15906-5. PMID: 32341345