

修士学位論文

題名

フレリトゲアメフラシ（軟体動物後鰓類）の消化管
神経系の活動と中枢との神経連関

指導教員 黒川 信 准教授

2018年 7月10日 提出

首都大学東京大学院

理工学研究科 生命科学 専攻

学修番号 16881352

氏名 近藤 日名子

論文要旨

16881352 近藤日名子

アメフラシ類は、中枢神経系のニューロン細胞体が多いことから、単一ニューロンレベルで神経機能を解析できる好材料として広く行動の神経機構研究に用いられている。一方、末梢にも多くのニューロン細胞体から構成される末梢神経系が存在し、末梢ニューロン回路の機能や、中枢神経系との連関機構などの研究が行われている。アメフラシ類では、消化管神経系にも比較的大型のニューロン細胞体が多数存在するため、消化管外表面上から直接これらの活動を記録できるなどの利点に着目した研究が行われている。

アメフラシ(*Aplysia kurodai*)とフレリトゲアメフラシ(*Bursatella leachii*)の食性はそれぞれ大型海藻食、付着藻類食で異っており、また消化管の構造は、前者の「そ嚢」が後者より著しく大きいなどの違いがある。消化管運動は両者とも消化管神経系に内在するニューロン群のペースメーカーを起源とする神経原性リズムの自律的運動であることが示されている。ペースメーカーニューロン群はアメフラシでは「後砂嚢」上に局在し、同部域で先行して収縮が起こった後、上行した神経活動により上位の「そ嚢」での蠕動運動が惹起されることが明らかにされている。本研究では、これまでほとんど研究されてこなかったフレリトゲアメフラシの消化管神経系の構造を調べ、不明であったペースメーカーの局在を解明し、これと中枢神経系との関係を調べ、アメフラシと比較することを目的とした。まずメチレンブルー染色により消化管外表面上の消化管神経系を観察し、ニューロン細胞体の分布を調べた。細胞体は、数個ないし10個程度のクラスターとして「そ嚢」および「後砂嚢」上に多く分布し、また「そ嚢」と「前砂嚢」の境界に存在する環状神経にも高密度に存在した。さらに、「前

砂囊」表面上には細胞体は観察されないなどの特徴は、消化管形状が大きく異なるにもかかわらずアメフラシにおけるニューロン分布と一致した。

電気生理学的手法を用いて、フレリトゲアメフラシの消化管神経系ニューロンの活動や神経回路の活動を調べたところ、消化管の自律運動のペースメーカーニューロン群の所在に関して「そ囊」上に局在することを示した。消化管の蠕動運動を観察したところ、まずペースメーカーニューロン群が局在する「そ囊」で先行して収縮が起こった後、下位の「後砂囊」へ神経活動および収縮が伝播した。このことは、アメフラシのペースメーカー群が後砂囊上に存在し、同部位でまず収縮が起こることなどと異なっていた。

中枢神経系（口球神経節）を出た左右1対の食道神経は、食道上を下降し消化管神経系と合流する。中枢神経系と消化管神経系の関係を明らかにすることを目的に食道神経の切断による中枢神経系切除前後の消化管神経系ニューロン群の活動を比較した。バースト活動の頻度とともにバースト発火の規則性が中枢神経系の切除により増大した。食道神経の遠心性電気刺激は、腸管神経系ニューロン群のバースト活動を興奮性ないし抑制性に変化させた。また、片側の食道神経の求心性刺激は、反対側の同神経の活動を増大させ消化管神経系のバースト活動を変化させた。これらのことから食道神経を介した消化管の自律運動の中枢神経系による反射的制御の存在が示唆された。

Activities of the gastrointestinal-tract nervous system of *Bursatella leachii* (Mollusca: ‘Opisthobranchia’) and its relationship with the central nervous system

Hinako Kondo

The characteristics of *Aplysia sp.* make members of these species suitable for studies of the neural mechanisms underlying movements, behaviors, learning, etc. The peripheral nervous system (PNS) of *Aplysia sp.* contains many neuronal somata, and the functions of the peripheral neural circuits have been studied in relation to the central nervous system (CNS). The gastrointestinal (GI) tract of the animal contains a peripheral neural network, the GI-tract nervous system, consisting of a large number of neurons; accordingly, this system is sometimes termed the “second brain”. Relatively large neuronal cell bodies and neural processes reside on the outer surface of the GI tract, making it convenient to directly record the activity of the GI-tract nervous system.

The feeding habits of *Aplysia kurodai* and *Bursatella leachii* differ: the former feeds on large seaweed and the latter on epilithic algae. *A. kurodai* has a neurogenic rhythm in the autonomous motility of the GI tract, originating from pacemaker neurons on the gizzard, whereas in *B. leachii* the analogous neurons have not been localized yet. In this study, we investigated the GI-tract nervous system of *B. leachii* to reveal the structure and function of the nervous system and its relationship with the central nervous system

in comparison with those of *A. kurodai*. First, we performed methylene blue staining to delineate the layout of the peripheral neural network distributed on the outer surface of the whole GI tract, i.e., the esophagus, crop, and anterior and posterior gizzards. Clusters of cell bodies were found on the crop and posterior gizzard. Many clusters were distributed on the ring nerves, which are localized between the crop and anterior gizzard, whereas few cell bodies were present on the outer surfaces of the anterior gizzard. Together, these observations indicate that the distribution of peripheral neurons is similar between *B. leachii* and *A. kurodai*, even though the gross anatomy of the GI tract differs between the two species.

Activities of the GI-tract nervous system in *B. leachii* were then recorded extracellularly. It was found that neurons on the crop were a neurogenic origin of the rhythmic autonomous contraction of the GI tract. The burst activities in the crop were initially followed by contraction of the crop itself in *B. leachii*. The activity conducted from the pacemaker region, the crop, to the gizzard in a downward direction, while in *A. kurodai* from the posterior gizzard to the crop in an upward direction, which resulted in the late contraction at the respective regions. A pair of esophageal nerves from the buccal ganglia, a part of the CNS innervates the GI tract. The bursting activities of the GI-tract nervous system became more regular after removal of CNS by cutting the

esophageal nerves. The efferent electrical stimulation of the esophageal nerve exerted excitatory and/or inhibitory effects on the bursting activities. Afferent stimulation of the esophageal nerve on one side increased the activities of the same nerve on the opposite side and subsequently changed the bursting activities. From these results, it is suggested that there is a reflex central control of the spontaneous activities of the GI-tract nervous system via the esophageal nerve.

目次

序論	1
材料および方法	4
結果	7
1. 形態学的観察	
解剖学的観察	
消化管神経系内の末梢ニューロンの細胞体分布	
2. 電気生理学的実験	
消化管神経系ニューロンの自発活動リズムの同時記録	
バースト活動に対する CNS の影響	
食道神経の遠心性刺激実験	
食道神経の求心性刺激実験	
考察	13
1. 消化管神経ニューロンの分布とペースメーカーの所在部位	
2. CNS による消化管神経系の神経支配	
3. CNS による反射的制御	
謝辞	18
引用文献	20
図および図の説明	25

序論

無脊椎動物および脊椎動物の消化管において一般的にニューロン細胞体を有する神経集網構造の消化管神経系 (gastrointestinal, GI-tract nervous system) が存在することが知られている(Brusca. & Brusca., 1990)。消化管神経系は、刺胞動物の散在神経系に起源すると考えられ (清水 & 岡部, 2007)、中枢神経系を持つようになった三胚葉動物の消化管にも普遍的に存在する。そこでは多くの既知の神経伝達物質に加えて、“脳-腸管ペプチド” (矢内原ら, 1981、中里, 2003、海谷, 2006)が発見され、多数のニューロンが複雑なネットワークを構成していることから、「第二の脳」(Gershon, 1998)とも称される。消化管の運動や分泌などの機能の神経支配は、消化管神経系と、中枢神経系からの外来神経により行われており、前者は自律的に消化管運動を支配し、後者がそれを調節すると考えられている。自律的運動の神経支配については、節足動物において、消化管近傍に存在する神経節である甲殻類の胃腸神経節(stomatogastric ganglion)や昆虫類の前頭神経節(frontal ganglion)と 脳下神経節(hypocerebral ganglion)(Rand *et al.*, 2012)によるものの研究が進んでいる。一方鱗翅目昆虫の消化器系では前頭神経節による支配のほかに消化管自身にも末梢ニューロンが内在する末梢神経系がある (Matsushita, 2001)が、これら消化管自身に内在する消化管神経系そのものの研究は少ない。哺乳類では、筋層間神経叢 myenteric plexus (Auerbach's plexus) と粘膜下神経叢 submucosal plexus (Meissner's plexus) のニューロン回路が調べられているが、単一ニューロンレベルで個々のニューロン活動を調べた研究は少ない。

アメフラシ類は、日本には 18 種分布することが知られており (Kayaba, 2007) (Fig. 1)、中枢神経系のニューロン細胞体大きいことから、単一ニューロンレ

ベルで神経機能を解析できる好材料として広く行動の神経機構研究に用いられている(Kandel, 1979)。一方、末梢にも多くのニューロン細胞体から構成される末梢神経系が存在し、末梢ニューロン回路の機能や、中枢神経系との連関機構などの研究が行われている(Kurokawa & Kuwasawa,1985a, b; Kurokawa *et al.*, 1999)。消化管神経系にも比較的大型のニューロン細胞体が多数存在し、消化管外表面上から直接これらの活動を記録できるなどの利点に着目した研究が行われている。

アメフラシ(*Aplysia kurodai*)とフレリトゲアメフラシ(*Bursatella leachii*)の食性はそれぞれ大型海藻食、付着藻類食で異っており(Kurokawa & Tanaka,2015)、また消化管の構造は、前者の「そ嚢」が後者より著しく大きいなどの違いがある(Kurokawa & Tanaka,2015)。アメフラシもフレリトゲアメフラシも消化管系は頭部側より口球(buccal mass)、食道(esophagus)、そ嚢(crop)、前後の領域からなる砂嚢(anterior 及び posterior gizzard)、盲腸(caecum)、腸(intestine)、直腸(rectum)から構成される(Eales, 1921)。アメフラシの消化管での消化吸収は以下のように行われる。摂食した食べ物は口球内の歯舌により小片にされ唾液と混ぜ合わされる。その後食道を通りそ嚢へ入る。そ嚢で摂食物は一時的に貯蓄され、その後咀嚼歯のある前砂嚢、後砂嚢に入り、圧搾されながら、弁により容量を調節されながら胃へと入る。肝膵臓から出される消化液と混ざりゆっくりと盲腸へと運ばれる。肝膵臓や盲腸において栄養の吸収が行われたのち、排せつ物は腸を通り肛門により排出される。消化、吸収の活動は、それぞれ各部位毎に特徴的な律動的運動により行われている。この律動的運動リズムの起源、すなわちペースメーカー機能は従来、消化管筋肉自身が担う、すなわち筋原性であるとされてきた。しかし、カハールの間質細胞(Cajal, 1893)を調べた研究で、哺乳動物で筋原性以外のペースメーカー機能が実証された(Sanders, 2002)。アメフラシ、

モノアラガイやフレリトゲアメフラシの消化管運動リズムも消化管神経系に内在するニューロン群のペースメーカーを起源とする神経原性の自律的運動であることが示された(Kurokawa & Tanaka,2015; Kurokawa *et al.*, 2007)。ペースメーカーニューロン群はアメフラシでは「後砂囊」上に局在し、同部域で先行して収縮が起こった後、上行した神経活動により上位の「そ囊」での蠕動運動が惹起されることが明らかにされている(Ito & Kurokawa, 2007)。またモノアラガイは「そ囊」に神経原性のペースメーカーが存在することが報告されている(Okamoto and Kurokawa, 2010)。本研究では、1)これまであまり研究されていなかったフレリトゲアメフラシの消化管神経系の構造を調べ、ペースメーカーの所在を明らかにすること、2)この消化管神経系と中枢神経系との関係を調べ、アメフラシと比較することにより、消化管の神経支配機構を比較生理学的に調べることを目的とした。

本研究の一部は既に学会で発表した(近藤 & 黒川, 2018a)とともに、発表予定である(近藤 & 黒川, 2018b)。

材料および方法

1. 材料

材料には、海産軟体動物腹足綱後鰓類アメフラシ科 (*Opisthobranchia Aplysiidae*) フレリトゲアメフラシの成体を用いた。動物は、神奈川県横浜市金沢区沿岸、横須賀市長井沿岸、東京都港区台場沿岸で採集した。水深 5 m 以浅の砂泥地に多く生息しており、水深 3m ほどの場所ではシュノーケリングにより採集した。大潮の干潮時に磯場の水深 1 m ほどの場所で胴長で入り採集する場合もあった。採集した動物は、南大沢キャンパスの飼育棟水性生物室で、水温を約 15°C に保った自然海水を常時循環させた水槽で飼育した。水槽のガラス壁面に付着した藍藻、ハネモなどの柔らかい緑藻、茶ゴケや石灰藻など水槽内に自然に付着生育したものを餌とした。実験には、体重 20~160g の個体を用いた。本研究全体で約 50 個体用いた。

2. 解剖および標本の作製

麻酔のため、動物に体液と等張(0.36 M)の塩化マグネシウム溶液を体重の約 3 分の 1 量注射した。生理的食塩水の代用として用いた濾過海水を満たし、ソフトプラスチック (Dow Corning、Silpot) を敷いた解剖用シャーレ内で、腹側を正中線沿いに切開し、腹足をピンで底面に固定した。消化管を支える組織を除去し、水管と隣接している肛門を切り離すことにより口球から、消化管、肝膵臓を含む、肛門までの全消化管標本を摘出した。

この摘出標本を電気生理用実験用チェンバーに移し、左右 1 対の口球神経節 (buccal ganglion) とそれにつながる脳神経節 (cerebral ganglion) を残して、他の中枢神経系である側神経節 (pleural ganglion)、足神経節 (pedal ganglion) などは切除した。

3. メチレンブルー染色

神経の分布やニューロン細胞体を観察するために、氷冷した濾過海水を満たしたシャーレ内に摘出標本をピンで留めて、一般的に用いられている成体染色を行った。1%メチレンブルー溶液を数滴滴下し、0.5-1 時間生体染色を行った。新しい氷冷した濾過海水に数回交換することでメチレンブルーを洗ったのち、消化管上の神経および細胞体を観察した。染色が薄い場合は、適宜メチレンブルー溶液で再染色を行った。

4. 電気生理学

摘出標本を氷冷した濾過海水で満たした電気生理用実験チェンバーにピンで固定した。実験用チェンバーには、実験中常時濾過海水(約 12°C前後)を流入し、吸引ポンプを用いて常に流入量と等量の溶液を吸い出すことで灌流した。

細胞外誘導には、ガラス毛細管電極内に不分極電極である銀-塩化銀(Ag-AgCl)電極を装填したガラス管吸引電極を用いた。記録は、多くの場合神経束を切断せずに吸引して行い、神経束を切断しその切断端を吸引して行った場合は記述した。実験用チェンバーの底に Ag-AgCl 線を固定し、不関電極とした。誘導した信号はインプットボックス (日本光電、JB-210J または JD-621G) と AC アンプ (日本光電、AVB-21; AVM-11; AB-621G または World Precision Instruments、DAM80) を介して陰極線オシロスコープ (日本光電、VC-11) へ入力し、さらに Power Lab システム (ADInstruments) により 4000/秒のサンプリングレートで記録するとともに、DC アンプ (日本光電、AB-621G) を介してペンレコーダー (日本光電、WI-641G) で記録した。Power Lab システムに保存したデータは、専用ソフトウェア(AD Instruments、Chart および Extensions)を用い

て解析を行った。電気刺激は、ガラス管吸引電極で神経束の切断端を吸引しアイソレーター（日本光電、SS-102J または SS-201J）を介し電気刺激装置（日本光電、SEN-7203）に接続し行った。

結果

1. 形態学的観察

アメフラシとフレリトゲアメフラシの比較解剖

フレリトゲアメフラシを解剖し、中枢神経節の構成と配置、消化管へ伸びる神経束の走行、支配する末梢神経器官、消化管の構造について、特に同じアメフラシ科のアメフラシ (*Ap. kurodai*) の構造と比較した Fig. 2 は消化管の構造の模式図である。フレリトゲアメフラシの消化管は、食物が入る順に追うと、口球、食道、そ嚢、砂嚢（前砂嚢、後砂嚢）、腸、肛門となっている。これは、アメフラシの消化管構造と同じであるといえる。しかし、体長に対する食道の長さがアメフラシの方がフレリトゲアメフラシよりも相対的に若干長いとともに、そ嚢の大きさがアメフラシに較べては、フレリトゲアメフラシは著しく小さいといえる。すなわちアメフラシは、そ嚢の長さが口球から後砂嚢までの長さの約 2/3 を占めている。これは、アメフラシのそ嚢の長さには、食べ物が一時的に貯蔵される貯蓄機能がある (Eales, 1921) ことと関連するものと考えられる。一方フレリトゲアメフラシでは、そ嚢が口球から後砂嚢までの長さに対して約 1/10 であった。

また、消化管内部構造を観察した。Fig. 3 B は、フレリトゲアメフラシの腹側から撮った写真である。消化管と口球の腹側表面に口球神経節 (buccal ganglion)、

それとつながって裏に脳神経節 (cerebral ganglion) がそれぞれ対で存在している (Watanabe, 2007)。それら対になった二つの神経節を中枢神経系 (CNS) と呼ぶことにした。食道とそ嚢の間に弁様構造 (Fig. 3 C1) がある。このような弁様構造はアメフラシにはない構造であった。砂嚢 (前砂嚢、後砂嚢) の内部表面には咀嚼歯がある (Fig. 3 C2)。前砂嚢は、厚い筋肉を持ち、その内側に三角錐形のクチクラの大型咀嚼歯が厚い筋肉質の前砂嚢の内側に隙間なく並んでいた。さらに、前砂嚢とそ嚢の境界に中型と小型の咀嚼歯が存在した。また、後砂嚢には、中型の三角錐形の咀嚼歯がまばらにあり、小型の細長い歯が並んでいた。アメフラシの砂嚢内側にも咀嚼歯がある (Kasuya, 2010) が、総数が前砂嚢のほうがやや多い点で若干の違いがあるように認められた。

消化管神経系内の末梢ニューロンの細胞体分布

アメフラシの消化管には、外表面から消化管壁全層に広範囲にわたりニューロン細胞体が分布していることが知られている (Ito & Kurokawa, 2007)。フレリトゲアメフラシの消化管外表面のニューロン細胞体の分布を調べるためにメチレンブルー染色を行った (Fig. 4)。1 対の口球神経節からそれぞれ食道に沿ってそ嚢まで神経が伸びていることが確認できた。そ嚢での神経系は、複雑に入り組むとともにネットワーク構造を作り、その交差や分岐するところどころにニューロン細胞体が分布していた。食道やそ嚢ではニューロン細胞体が低密度に存在していた。そ嚢と砂嚢の境界には消化管を一周する消化管神経環 (stomatogastric ring)、または、環状神経 (ring nerve) が存在する。その環状神

経上には高密度に存在し、数個が集ってクラスターを形成することもあった。前砂嚢上には、環状神経と後砂嚢を結ぶ 3 本の神経束が観察されたが、ネットワーク構造やニューロン細胞体は、観察できなかった。Fig. 4 以降の模式図や Fig. 5B の写真では、背側の 2 本の神経束のみが示されている。後砂嚢上では、神経ネットワーク構造とともに多数のニューロン細胞体が観察され、それらは数個が集まって細胞体クラスターを形成することも多く見られた。前砂嚢から伸びてきた 3 本の神経束は後砂嚢上で分枝しながら交差しネットワーク構造に合流した。腸ではニューロン細胞体は観察されなかった。ニューロン細胞体が、そ嚢、環状神経、後砂嚢外表面上に分布し、前砂嚢には存在しない点で基本的にアメフラシのニューロンの分布(Ito & Kurokawa, 2007)と類似していた。

中枢神経系の左右の口球神経節からは、それぞれ食道神経(esophageal nerve)が食道上に分岐しながら伸び、その主幹を食道とそ嚢の境界まで追う神経を切断した (Fig. 5 挿図) ところ、A で得られた同調した周期的バースト発火が消え (Fig. 5 B)、A で記録された周期的バースト発火は、そ嚢でのみ維持された。このことから周期的バーストのペースメーカーがそ嚢上のニューロンに存在することが示唆された。

フレリトゲアメフラシのペースメーカーがそ嚢上にあることをさらに確かめるために、前砂嚢上で切断した神経の切断端に吸引電極を装着し、そ嚢上のニューロンの活動と細胞外同時記録を行った (Fig. 6)。そ嚢上のニューロンの活動と同期した周期的バースト活動が切断端で記録されたことから、そ嚢上のペー

スメーカーから後砂嚢に向かってバーストが伝播していることがわかった。

バースト活動に対する CNS の影響

中枢神経系と自律的な消化管神経系との関係について調べるために、CNS 切除前の標本と CNS を切除した標本との間で消化管神経系ニューロンのバースト活動を比較した (Fig. 7)。CNS がある状態 (Fig. 7 A) ではバースト間隔が 30 秒から 60 秒と幅広かった。しかし、CNS 切除後 (Fig. 7 B) では、間隔が短くなる、すなわちバースト頻度が増大するとともに間隔のばらつきがほとんどなくなった。

CNS 切除前から切除後の変化を見るために、Fig. 7 を含めた 3 個体の切除前後の数分から数十分のバースト間隔平均をグラフで表した (Fig. 8)。個体①は、切除前 80.3 秒だったが、切除後は、36.8 秒になった。個体②は、切除前 38.7 秒だったが、切除後は、8.5 秒になった。個体③は、切除前 27.2 秒だったが、切除後は、14.2 秒になった。いずれの個体も CNS 切除によって、バースト間隔が短くなり、すなわち平均バースト頻度が 1.9-4.4 倍に増大した。このことは、CNS からの抑制性神経支配の存在を示唆している。

CNS 切除前後のバースト間隔のばらつきの変化を見るために Fig. 7 を含めた 3 個体のバースト間隔の標準偏差をグラフで示した (Fig. 9)。個体①は、切除前

58.2 秒だったが、切除後は、20.0 秒になった。個体②は、切除前 28.1 秒だったが、切除後は、1.5 秒になった。個体③は、切除前 11.7 秒だったが、切除後は、5.3 秒になった。CNS 切除によりバースト間隔のばらつきが下がったことは、CNS からの外来性支配の存在を示唆する。

食道神経の遠心性刺激実験

CNS から出て消化管神経系に至る食道神経を遠心性刺激し、CNS との関係を知るための実験を行った(Fig. 10, 11,12)。Fig. 6 で示したように、そ嚢上のニューロンの活動は、前砂嚢上の神経からも記録される。そこで、CNS を切除した標本で片側の食道神経の切断端から吸引電極を用いて電気刺激を行い、前砂嚢上の神経から記録される消化管神経系ニューロンの活動に対する効果を調べた(Fig. 10)。バースト活動の頻度が比較的低いときに 5V 1ms 10Hz 20 発の頻回刺激を片側の食道神経切断端に与えたところ、前砂嚢上の神経のバースト活動間隔が短くなる（バースト頻度が増大する）興奮性効果が得られた(Fig. 10 A)。2 倍の刺激量(40 発)の刺激を与えてもほぼ同様の興奮性効果が得られた(Fig. 10 B)。しかし、同じ標本において比較的高いときに同じ 2 倍の量の刺激を与えたところ逆に、バースト活動間隔が長くなる（バースト頻度が減少する）抑制性効果が得られた(Fig. 11 B)。Fig. 11 A には、比較のために Fig. 10

Bと同じデータを再掲した。

Fig. 12 は、Fig. 10,11 と同じ標本において、バースト活動の頻度が比較的高いとき (Fig. 12 A) それが高いとき (Fig. 12 B) に低頻度 (1Hz) の刺激を約 2 分間与えた実験の結果である。この刺激では、いずれの場合もバースト活動間隔が長くなる (バースト頻度が減少する) 抑制性効果が得られた。

食道神経の求心性刺激実験

これまでの刺激実験で CNS から消化管神経系に対する興奮性および抑制性神経支配の存在が示された。この神経の CNS 内での神経回路を調べるために次に食道神経の求心性刺激実験を行った (Fig. 13, 14, 15)。片側の食道神経を切断し、その中枢側切断端から CNS に向かって電気刺激をした。前砂囊上の神経から記録される消化管神経系ニューロンの活動に対する効果を調べた。食道神経の遠心性刺激を単発パルスで与えたときは、消化管神経のバースト活動に一切の変化が認められなかったのに対して、求心性刺激は、単発刺激であってもバースト活動に顕著な効果をもたらすことがわかった。Fig. 13 は、抑制性効果が得られた一例を示す。この作用は、おそらく CNS から食道神経を経て消化管神経系へもたらされる遠心性出力によるものと考えられる。そのことを確かめるために、両側の食道神経を切断し、一方の切断端から CNS に向けて求心性刺激を与

え、それに対する反応を反対側の食道神経切断端から求心性刺激を行い、反対側から遠心性インパルスの反応を記録した。Fig. 14 は、同じ単発刺激に対する反応の二例を示す。刺激直後に発生するインパルスの他に刺激ごとに異なる、長い潜時で生じるインパルスが少なくとも 4 種類あった。これらのインパルスの中に消化管神経系に対する興奮や抑制の支配に関わるものがあると考えられた。

求心性刺激の効果をより明白にするために頻回刺激を与え、食道神経の遠心性出力と消化管神経系のバースト活動を同時記録し反応を調べた(Fig. 15)。10Hz 10 発の頻回刺激に対し、食道神経から多数のインパルスの高頻度の持続的活動が記録され、また消化管神経系のバースト活動には顕著な抑制が引き起こされた (Fig. 15 A)。一方刺激パルスの電圧を倍にしたより強い刺激をあたえたところ、食道神経の遠心性インパルスの発生数は減り、また消化管神経系への抑制性効果は見られず、むしろ弱い興奮性効果が生じた。

考察

1. 消化管神経ニューロンの分布とペースメーカーの所在部位

フレリトゲアメフラシの消化管運動も、アメフラシなどとともに消化管神経系に内在するニューロン群のペースメーカーを起源とする神経原性リズムの自律的運動であることが示されている (Ito & Kurokawa, 2007; Kurokawa & Tanaka, 2015)。ペースメーカーニューロン群はアメフラシでは後砂囊上に局在し、同部域で先行して収縮が起こった後、上行する神経活動により上位のそ囊で蠕動運動が惹起されることが明らかにされている (Ito & Kurokawa, 2007)。アメフラシとフレリトゲアメフラシの消化管の形態は、そ囊の相対的な大きさなどで大きく異なっていた (Fig. 2) にもかかわらず、メチレンブルー染色の結果 (Fig. 4) から、ニューロン細胞体の分布の特徴、すなわち、そ囊、環状神経、後砂囊外表面上に分布し、前砂囊には存在しない点で基本的に両者は類似していることが明らかになった。

電気生理学的手法を用いた実験で、フレリトゲアメフラシの消化管神経系ニューロンの活動や神経回路の活動を調べ、消化管の自律運動のペースメーカーニューロン群の所在に関してそ囊上に局在することを示した (Fig. 3, 4)。消化管の上下運動は、ペースメーカーニューロン群が局在することが明らかになったそ囊で先行して顕著な収縮が起こり、神経活動とともに神経活動の下降にもなって収縮も後砂囊へ伝播していることがわかった。ペースメーカーニューロン群の所在に関して、アメフラシが後砂囊上であったこと (Ito & Kurokawa, 2007) と、今回明らかになったフレリトゲアメフラシの結果は、異なっていた。一方アメフラシ科ではないモノアラガイでは、フレリトゲアメフラシと同じそ囊上に存在することが示されている (Okamoto, 2006)。それぞれの種において、

ペースメーカーの存在部位は、いずれも、もっとも先行して顕著な収縮が起こる場所であったということができた。

フレリトゲアメフラシの食道-そ嚢間に弁様構造が存在した (Fig. 3)。一方、アメフラシには、弁様構造が後砂嚢と胃(stomach)との間に存在する(Eles, 1921)。したがっていずれの種も弁様構造の前ないし後の消化管部位にペースメーカーニューロンが存在し、その部位がもっとも早く顕著な収縮リズムを開始することになる。フレリトゲアメフラシでは、食道-そ嚢間の弁様構造の下位にペースメーカーがある。食道から運ばれてきた食物は、そ嚢に入りそ嚢から生じる収縮により、そ嚢-前砂嚢-後砂嚢で上下に移動しながら消化される。この時そ嚢は膨大し、強い収縮を起こす。このとき弁は、そ嚢から食道への食物の逆流を避ける機能を果たしていると考えられる。アメフラシの場合は、ペースメーカーニューロンが存在する後砂嚢の強い収縮が、食物を後砂嚢-前砂嚢-そ嚢へ押し上げ、またそれが戻るといふ上下運動をしながら消化が行われる。後砂嚢-胃の間にある弁様構造は、後砂嚢から胃へ流れ出る食物をとどめる機能をもつと考えられる。アメフラシは、フレリトゲアメフラシと違いそ嚢が相対的にとても大きく (Fig. 2)貯蓄機能があり (Eles, 1921)、大型海藻を大量に食べている。このため、上下運動は、質的量的に多くある必要があり、弁様構造の機能は、重要であると思われる。

2. CNS による消化管神経系の神経支配

CNS と消化管神経との関係を調べるために CNS の切除前後で消化管上のニューロンのバースト活動を比較したところ、CNS 切除後バースト活動の頻度が上昇した (Fig. 7, 8)。このことは、CNS から抑制性神経支配が消化管神経系にもたらされていることを示唆している。一方、切除後のバースト活動間隔の標準

偏差が、減少したこと(Fig. 9)は、CNSからの抑制性神経支配が持続的に一定にもたらされているのではないこと、あるいは抑制性神経支配とともに興奮性神経支配が拮抗的にもたらされていることを示唆する。

興奮および抑制性神経支配の存在は、食道神経の遠心性刺激実験から示される。バースト間隔が約30秒の低頻度で活動しているとき、食道神経の頻回刺激は興奮性効果をもたらした(Fig. 10)。一方より高頻度のときは、同じ強さの刺激であるにもかかわらず、抑制性効果をもたらした(Fig. 11)。これらのことは、CNSから食道神経を介して興奮性および抑制性神経が消化管神経系へ伸びていることを示している。Fig. 11で同じ強さの刺激であるにもかかわらず効果が異なっているのは、次のように考えることができる。すなわち、食道神経に含まれる興奮性および抑制性神経はともに刺激により興奮しているにもかかわらず、刺激前の状態が興奮ないし抑制性効果の最大値に達している（シーリングしている）ためと考えることができる。Fig. 10において、より強い（刺激期間の長い）頻回刺激をしたにもかかわらず、同程度の興奮性効果しか生じなかったことは刺激期間の後半に抑制性神経の効果が重畳し、興奮性神経の作用を打ち消したことによると考えられる。遠心性低頻度刺激実験(Fig. 12)では、刺激前のバースト頻度にも関わらず抑制性効果を得た。このことは、通常のイオンチャンネル結合型受容体を介した神経支配ではなく代謝型受容体を介した抑制性神経支配も存在することを示すのかもしれない。

3. CNSによる反射的制御

CNSを反射中枢とする消化管の制御機構について調べるために片側の食道神経を切断し求心性刺激実験を行った。結果には示さなかったが、食道神経を単発刺激パルスで末梢に向かって直接遠心性刺激をしたときは、消化管神経系ニ

ニューロンのバースト活動に変化は認められなかった。しかし、求心性刺激は、たとえ単発刺激であっても、バースト活動に顕著な効果を及ぼすことがわかった(Fig. 13)。このことは、消化管から中枢への感覚入力がある CNS 内のニューロンによって増幅され、反射的に消化管神経系に向けて遠心的に出力されていることを示唆する。実際、単発の求心性刺激に対して、反対側の食道神経から複数種類の遠心性インパルスが記録された(Fig. 14)。このインパルスの中に Fig. 13 で見られたバーストの抑制性作用をもたらすニューロンのものが含まれていると見なすことができる。

食道神経の求心性刺激を頻回刺激パルスで与えたところ、より顕著な反射を見ることができた(Fig. 15)。ある強さ (10V 10Hz 10 発) の頻回刺激に対し、反対側の食道神経から反射的に多数の遠心性インパルスの高頻度の持続的活動が記録され、また、消化管神経系のバースト活動には、顕著な抑制が引き起こされた。一方、2 倍の電圧 (20V) の刺激では、遠心性インパルスの頻度は少なく、また、消化管神経系への抑制性効果は見られず、むしろ弱い興奮性効果が生じた。これらのことは、求心性入力により消化管神経系に対する興奮性および抑制性出力の神経が反射的に活性化する回路がある CNS 内に存在することを示すと考えられる。刺激の強さを倍の電圧にすることで、食道神経の遠心性インパルスの頻度が少なくなった原因は、抑制性の求心性入力がある CNS から消化管神経系の抑制を支配するニューロンを抑制したことによりバーストの抑制性効果が消失したものと考えられる。

本研究で注目した消化管表面上に広く分布するニューロンとともに、消化管壁内の各層にもニューロンが分布していることがアメフラシ(Ito & Kurokawa, 2007)やリングマイマイ *Helix pomatia* (Hernadi *et al.*, 1998) で知られている。

本論文では示さなかったが、パラフィン切片を用いた予備的な組織学的観察により、フレリトゲアメフラシでも同様なニューロンの存在を観察した。これらのニューロンの中に感覚ニューロンが含まれ、上述の求心性入力を CNS にもたらしていると考えられる。

以上のことから、1) 消化管神経系ニューロンはそ嚢のニューロンをペースメーカーとして消化管の運動リズムの起源となっていたこと、2) この消化管神経系に対して CNS からは、興奮性および抑制性神経支配がもたらされていることが示され、3) 消化管からの求心性入力により、これらのニューロンを興奮ないし、抑制する反射回路の存在が示された。

今後は、食道神経から CNS に向かって逆行性ニッケルコバルト染色を行い、消化管神経回路に関与する候補ニューロンを探索した後、それらのニューロンの細胞内記録を行いながら、消化管神経の細胞外同時記録を行い、両者の関係を直接調べる。これにより上記2) 3) を単一ニューロンレベルで実証し、求心性入力が実際にどのような感覚によってもたらされているかを明らかにすることにより、消化管運動支配の制御の仕組みを解明することを目指す。

謝辞

本研究を進め、論文を作成するにあたり、始終親切にご指導くださいました神経生物学研究室准教授・黒川信先生に厚くお礼申し上げます。また、研究および論文作成の際、貴重なご助言、ご協力をいただきました東京都立大学名誉教授・桑澤清明先生、首都大学東京・福田公子先生、坂井貴臣先生、可知直毅先生、神経生物学研究室大学院生および卒業研究生、特に、榎本萌花さんには厚く御礼申し上げます。

また本研究の推進に当り、実験動物の採集や情報提供でご協力を頂いた神奈川県横須賀市長井新宿漁港の皆様、東邦大学・須之部友基先生、神尾道也先生、東邦大学・多留聖典先生、日本水中科学協会・須賀次郎様、東京港水中生物研究会の皆様には厚く御礼申し上げます。

引用文献

Brusca, R.C. & Brusca, G.J. (1990) *Invertebrates* Sunderland, Massachusetts

Cajal, S. R. (1893) Sur les ganglions et plexus nerveux de l'intestin. *C. R. Soc. Boil.* 45:217-223

Rand D., Knebel, D., Ayali, A. (2012) The effect of octpamine on the locust stomatogastric nervous system. *Frontiers in Physoology* 3(288):1-9

Eales, N.B. (1921) *LMBC Memoris XXIV, Aplysia.* Liverpool University Press, Liverpool

Gershon M. D. (1998) *The Second Brain* Harper, New York

Hernadi, L., Erdelyi, L., Hiripi, L., and Elekes, K. (1998) The organization of serotonin, and FMRFamide-containing neuronal elements and their possible role in the regulation of spontaneous contraction of the gastrointestinal tract in the snail *Helix pomatia*. *J. Neurocytology* 27:761-775

Ito, S. & Kurokawa, M. (2007) Coordinated periperipheral neuronal activities among the different regions of the digestive tract in *Aplysia*.

Zool.Sci.24(7):714-722

海谷 啓之 (2006) 新規脳腸管ペプチドホルモン・グレリン. 日本比較内分泌学会ニュース 2006 巻 (2006) 122 号: 122_2-122_16

Kandel, E. (1979) Behavioral Biology of Aplysia. W. H. Freeman and Co., San Francisco

Kasuya Y. (2010) アメフラシ消化管運動の部位機関連関とその神経制御. 首都大学東京大学院 修士学位論文

Kayaba U. (2007) 海産軟体動物アマクサアメフラシの同所的二型: 比較生理学的、遺伝学的解析. 首都大学東京大学院 修士学位論文

近藤日名子, 黒川信 (2018a) トゲアメフラシ消化管に対する消化管神経系による支配とその中枢制御. 日本動物学会関東支部 第70回大会要旨集

近藤日名子, 黒川信 (2018b) 軟体動物消化管に対する消化管神経系と中枢からの興奮と抑制の連関 (フレリトゲアメフラシ). 日本動物学会 第89回大会 発表予定

Kurokawa, M. & Kuwasawa K. (1985a) Electrophysiological studies on the branchial ganglion in the opisthobranch molluscs (*Aplysia* and *Dolabella*). J. comp. physiol. A 156:35-44

Kurokawa, M. & Kuwasawa K. (1985b) Multimodal motor-innervation of the gill of aplysiid gastropods, *Aplysia kurodai* and *Aplysia juliana*. J. comp. physiol. A 157:483-489

Kurokawa, M. & Kuwasawa, K. & Matsumura, S. (1999) Identification of an abdominal ganglion neuron antagonizing L7-driven gill contraction in *Aplysia*. J comp physiol A 185:11-19

Kurokawa, M. & Tanaka, K. (2015) Comparative aspects of rhythmic movements of the gastrointestinal tract induced by the enteric nervous system in some gastropods, mollusks. The 13th International Society for Invertebrate Neurobiology Symposium (Tihany, Hungary)

Kurokawa, M. ,Ito, S. and Okamoto, T. (2007) Activities and functions of Peripheral Neurons in the Enteric Nervous system of *Aplysia* and *Lymnaea*. Acta. Biologica Hungarica 59:65-71

Matsushita, T. (2001) Neural and neurohumoral control of the circulatory and digestive systems in lepidopterous insects. 東京都立大学 博士学位論文

中里 雅光 (2003) 2. 胃から発見された摂食亢進ペプチド:グレリン 第 124 回日本医学会シンポジウム記録集 肥満の科学:45-52

Okamoto, T. (2006) オランダ産モノアラガイ (*Lymnaea stagnalis*) における消化器官と生殖器官の末梢神経による連関 東京都立大学 修士学位論文

Okamoto, T. & Kurokawa, M. (2010) The role of the peripheral enteric nervous system in the control of gut motility in the snail *Lymnaea stagnalis*. *Zool. Sci.*,27(7):602-610

Sanders, K. M, Ördög, T. & Ward, S. M. (2002) Pysiology and pathophysiology of the interstitial cells of Cajal: From bench to bedside. IV. Genetic and animal models of GI motility disorders carsed by loss of interstitial cells of Cajal. *Am. J. Phytisol.-Gastrointestinal and Liver physiology* 282:G747-G756

清水裕・岡部正隆 (2007) 消化管の進化的起源 刺胞動物ヒドラにおける基本構造と機能. 蛋白質 核酸 酵素 Vol.52 No.2:112-118

Watanabe H. (2007) フレリトゲアメフラシ神経束上の新奇なニューロン細胞体とその神経機構 首都大学東京大学院 修士学位論文

Yamada S. (2012) アメフラシ消化管運動の中枢および末梢神経系による支配. 首都大学東京大学院 修士学位論文

矢内原 昇, 矢内原 千鶴子, 望月 徹, 坂上 政則, 窪田 真理 (1981) 1. 脳・腸管

ペプチドの構造と機能 日本内分泌学会雑誌 57 卷 (1981) 2 号: 208-213

Fig. 1 日本に分布しているアメフラシ科(*Aplysidae*)。

日本沿岸で確認されているアメフラシ科 18 種のうち、7 種を示す。*Aplysia kurodai* は、和名アメフラシ (右一段目)。*A. argus* は、ジャノメアメフラシ (左一段目)。*A. juliana* は、アマクサアメフラシ (左三段目)。*A. oculifera* は、ミドリアメフラシ (右三段目)。*Stylocheilus striatus* は、クロスジアメフラシ (右 2 段目)。*Dolabella auricularia* は、タツナミガイ (左二段目)。*Bursatella leachii* は、今回の材料のフレリトゲアメフラシ (中央)。成体の体長は *S. striatus* と *A. oculifera* を除き、概して数 cm~数 10cm、体重数 g~数 100g に及ぶ。*S. striatus* と *A. oculifera* は、比較的小型の種で同数 cm~10cm、数 g~10 数 g である。

Fig. 2 アメフラシとフレリトゲアメフラシの消化管構造の比較。

いずれも上部から口球、食道、そ嚢、前砂嚢、後砂嚢、から腸に至り肛門へとつながる (腸より下は、描かれていない)。それぞれの部位の大きさの比は大きく異なる (本文参照)。

Fig. 3 フレリトゲアメフラシの消化管全体構造とその解剖。

A: 成体のフレリトゲアメフラシ。体長は 7cm から大きい物では 15cm になる。

B: 摘出した中枢神経系と消化管標本を腹側から見たもの。中枢神経系は、口球神経節と脳神経節のみを残し、その他は、除去した。

C: 消化管の内部構造。C1 は、そ嚢を縦方向に食道との境界部まで切開し、内部を見たもの。境界部に弁様構造が見られる。C2 は、砂嚢を縦方向に切開して内部を見た写真。

Fig. 4 消化管神経系内の消化管神経系。

それぞれの部位の外部表面を生体染色（メチレンブルー染色）で観察した。オレンジないし、青色の丸い構造がニューロンの細胞体。染色の強さにより、細胞体自身のオレンジ色が強く見えたり、メチレンブルーの青色が強く見えたりしている。

Fig. 5 消化管神経系ニューロンの自発活動リズムの同時記録。

中枢神経系を切除した消化管摘出標本での記録。A,B それぞれ上下のトレースは、それぞれそ嚢上、後砂嚢上ニューロンの活動の同時記録。

A: そ嚢と後砂嚢との間の神経を切除する前の記録。

B: 切除後の記録。左の写真は、切除されたそ嚢と後砂嚢をつなぐ神経を示す。

Aで見られた周期的バースト活動は、切断後（B）は、そ嚢上のニューロンのみで見られた。

Fig. 6 消化管神経系ニューロンの自発的バースト活動リズムの起源。

Fig. 5 で用いたそ嚢と後砂嚢とを結ぶ神経を切断した後の標本で得られた結果。そ嚢上のニューロン（上トレース）および前砂嚢上の神経の切断端（下トレース）からの同時記録。

そ嚢上で記録されるバースト活動が、前砂嚢上の神経を経由して後砂嚢上のニューロンへと伝播していると考えられた。

Fig. 7 消化管神経系ニューロンの自発的バースト活動に対する CNS の影響

(1)

砂嚢上からのニューロンの活動記録。

A: CNS 中枢神経系がついた状態の消化管摘出標本での記録。

B: CNS を切除後の記録。左の挿図は、CNS を切除するために切断した左右の食道神経を示す。

Fig. 8 消化管神経系ニューロンの自発的バースト活動に対する CNS の影響
(2)

Fig. 7 に示した標本 (#③) を含む三個体で、CNS 切断前後のバースト活動の各バースト活動の間隔の平均をグラフ化したもの。切断前の 9~68 分間、切断後の 3~11 分間に測定した値から求めた。

Fig. 9 消化管神経系ニューロンの自発的バースト活動に対する CNS の影響
(3)

Fig. 7 に示した標本 (#③) を含む三個体で、CNS 切断前後のバースト活動の各バースト活動の間隔の標準偏差をグラフ化したもの。測定期間は Fig.8 と同じ。

Fig. 10 消化管神経系ニューロンのバースト活動に対する食道神経の遠心性刺激の効果 (1)

前砂囊上の神経からの記録。バースト活動の頻度が比較的低いとき、A で与えた頻回刺激 (横棒) の 2 倍の量の刺激を B で与えた。刺激期間に発生する大きな振幅の電位は刺激電流から生じたアーティファクト (Fig. 11, Fig. 11 も同)

Fig. 11 消化管神経系ニューロンのバースト活動に対する食道神経の遠心性刺激の効果 (2)

Fig. 10 と同じ標本での前砂囊上の神経からの記録。バースト活動の頻度が低い

とき(A)ないし、それが高いとき(B)に、同じ頻回刺激（横棒）を食道神経の切断端に与えた。

Fig. 12 消化管神経系ニューロンのバースト活動に対する食道神経の遠心性刺激の効果（3）

Fig. 10, 11 と同じ標本での前砂囊上の神経からの記録。バースト活動の頻度が比較的高いとき(A)、ないしそれが低いとき(B)に、低頻度の頻回刺激（横棒）を長い期間食道神経の切断端に与えた。

いずれのデータもデータ取得後ローカットフィルター(75Hz)でデジタル処理したため減少した刺激のアーティファクトがみられる。

Fig. 13 食道神経の求心性刺激に対する効果（1）

食道神経を片側のみ切断し、その切断端から CNS に向かって単発刺激（青丸）を与えた。前砂囊上の神経から記録した消化管神経系ニューロンのバースト活動に対する効果を示す。

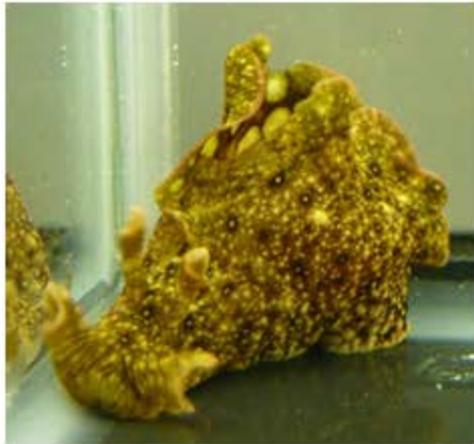
Fig. 14 食道神経の求心性刺激に対する効果（2）

両側の食道神経を切断した標本を用い、片側切断端から CNS に向かって単発刺激（青丸）を与えた。刺激と反対側の食道神経の遠心性活動に対する効果の 2 例を示す。CNS の単離標本で行った実験。

Fig. 15 食道神経の求心性刺激に対する効果（3）

A,B それぞれ上のトレースは、前砂囊上の神経から記録した消化管神経系ニューロンのバースト活動。下のトレースは、刺激と反対側の消化管神経の活動記

録。A で与えた頻回刺激（横棒）の 2 倍の量の刺激を B で与えた。



Aplysia argus



Aplysia kurodai



Dolabella auricularia



Bursatella leachii



Stylocheilus striatus



Aplysia juliana



Aplysia oculifera

Fig.1 日本に分布しているアメフラシ科



アメフラシ

フレリトゲアメフラシ

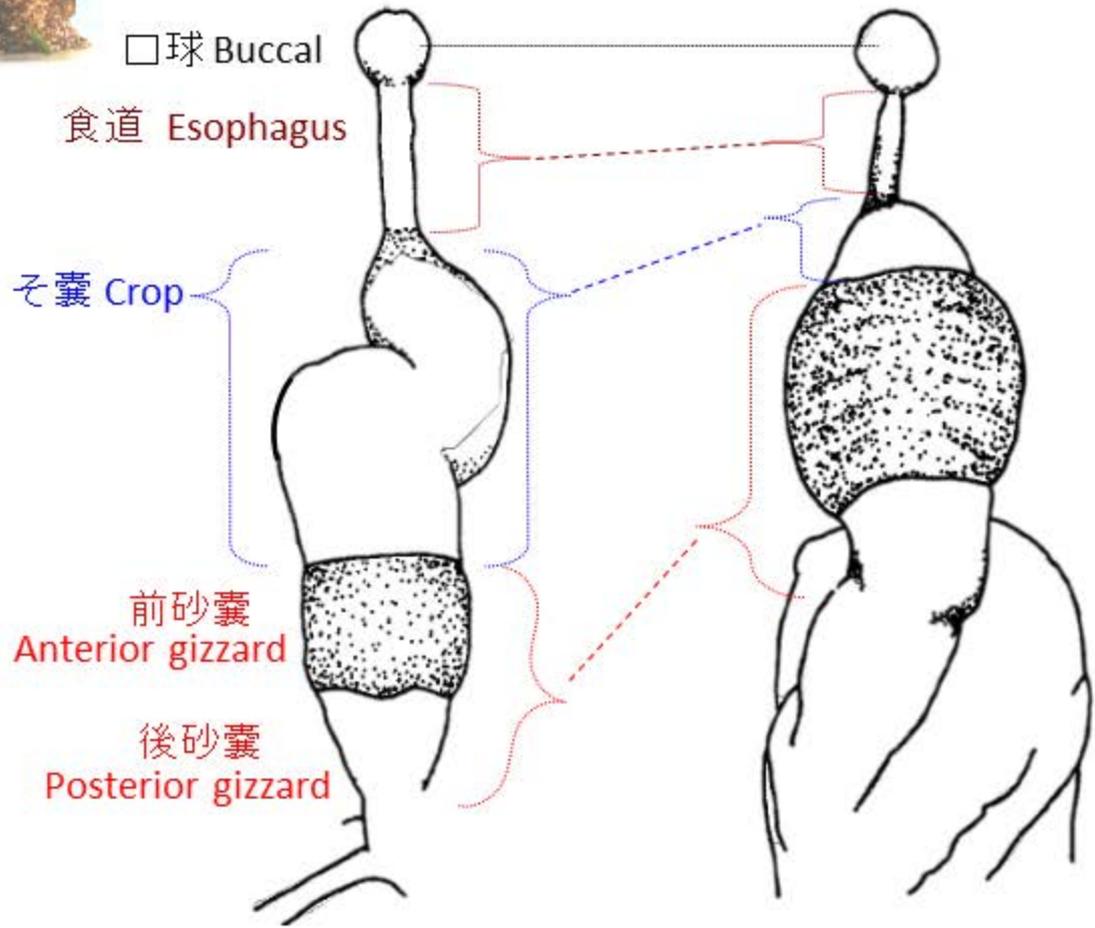
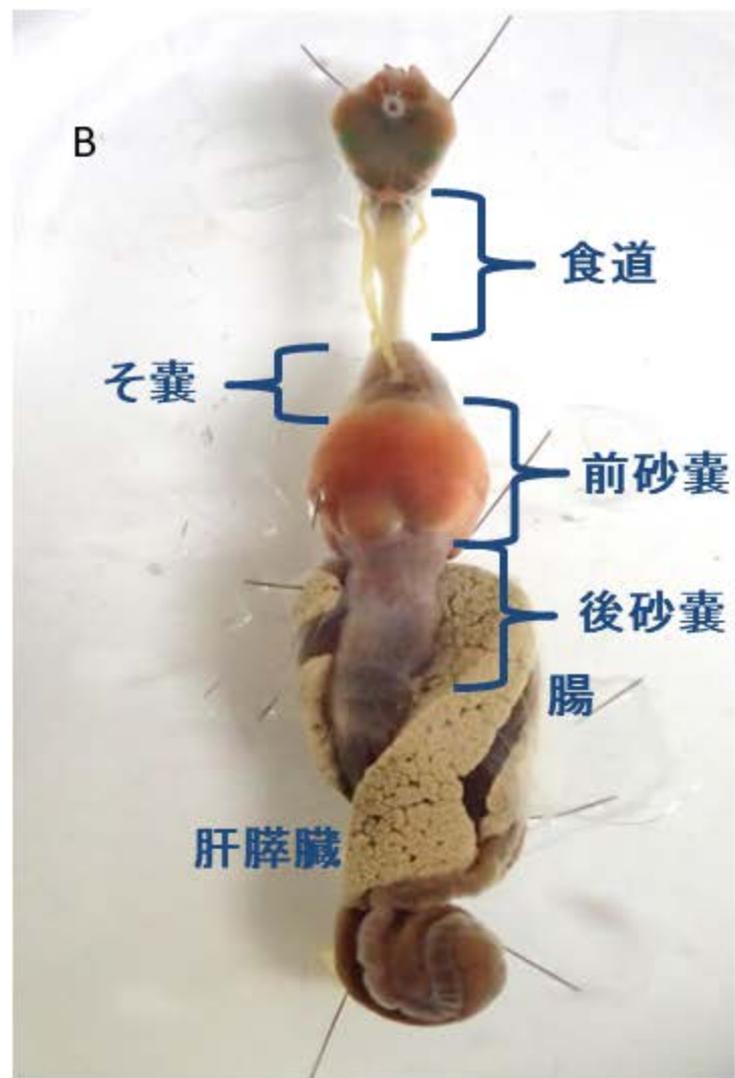


Fig.2 消化管構造の比較

A



B

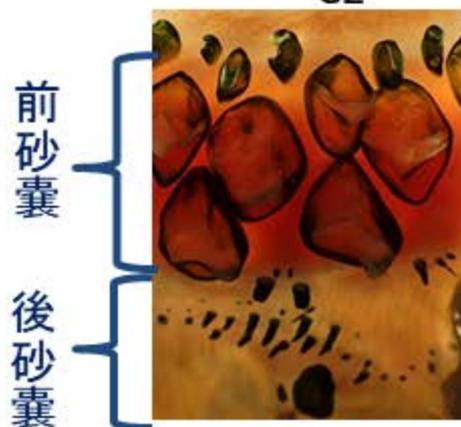


C1



食道-そ囊境界部
弁構造

C2



前・後砂囊周辺内側の
咀嚼歯

Fig.3 フレリトゲアメフラシの消化管全体とその解剖

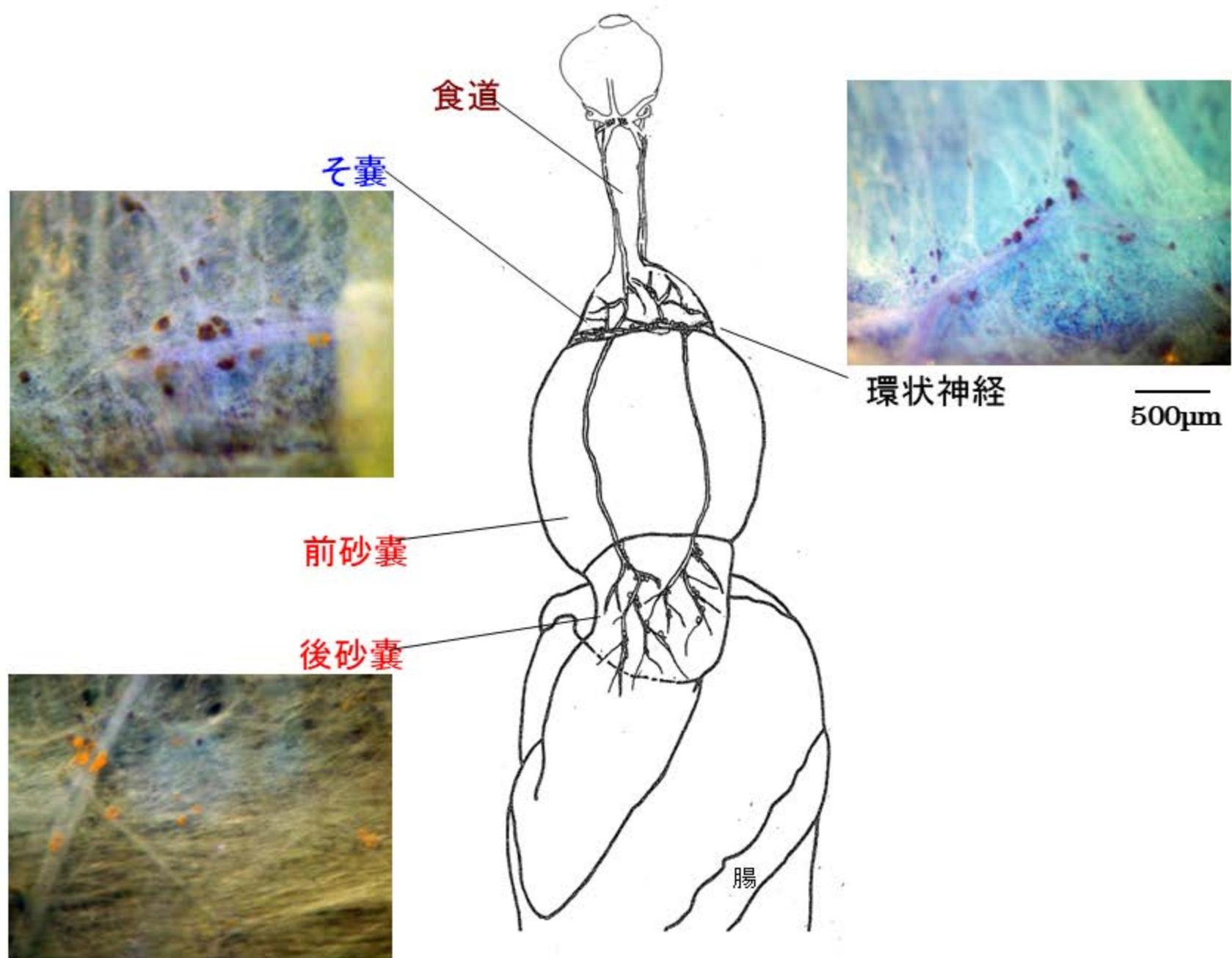
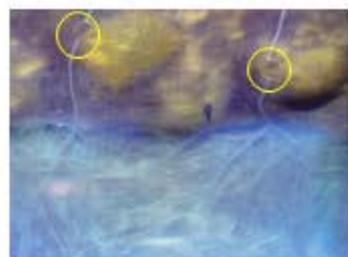
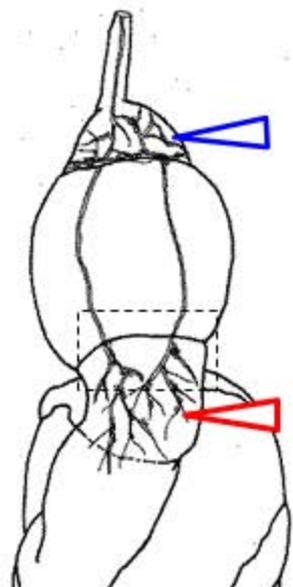


Fig.4 消化管神経系内の末梢ニューロン(メチレンブルー染色)



A左図中の 部分。
○が切断場所。

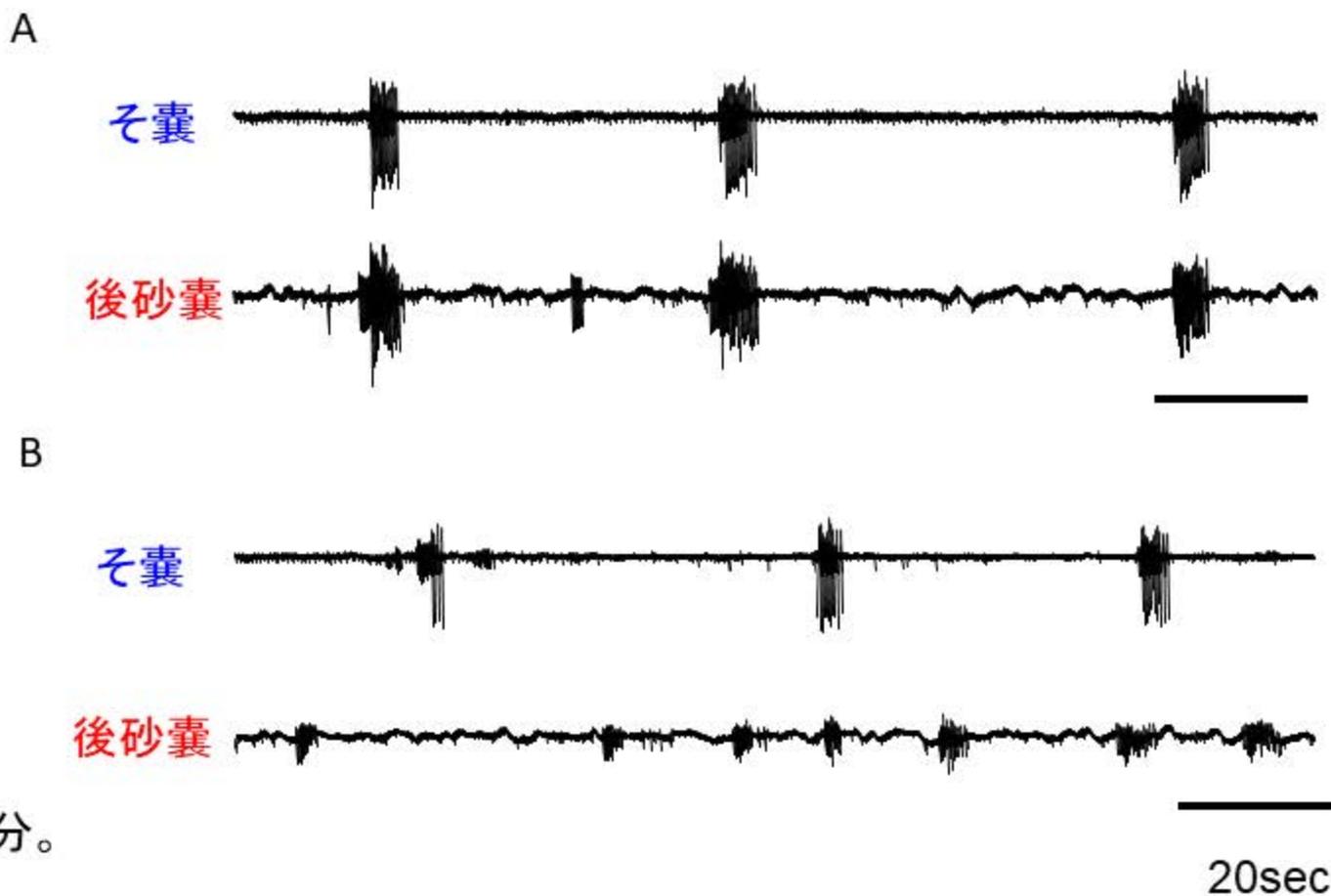


Fig.5 消化管神経系ニューロンの自発活動リズムの同時記録

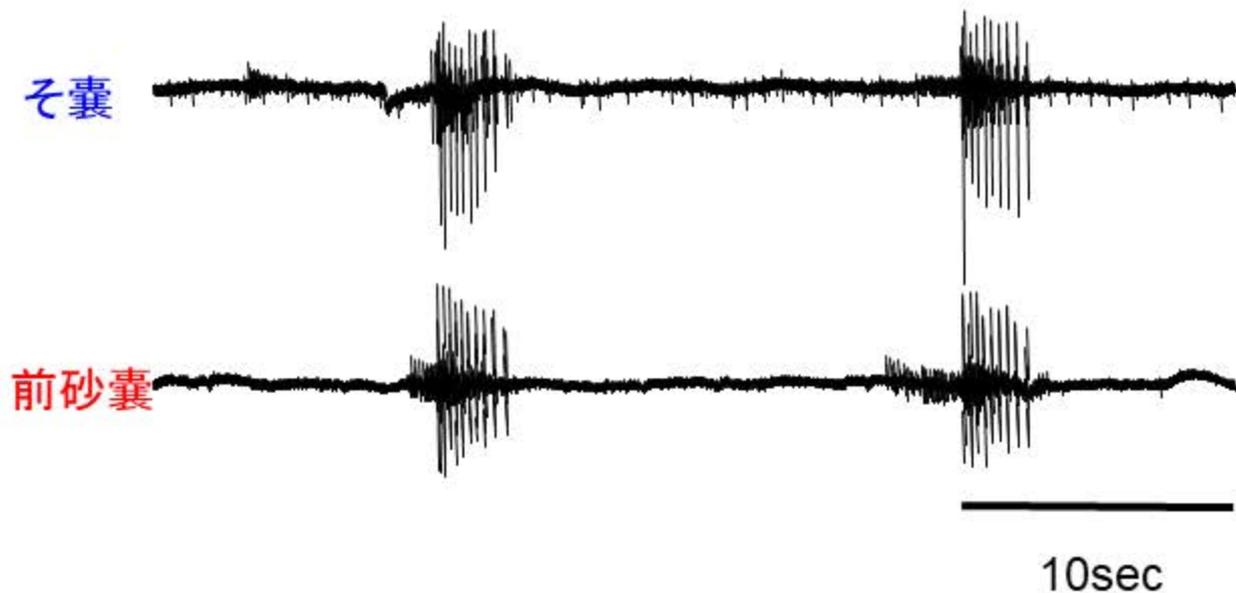
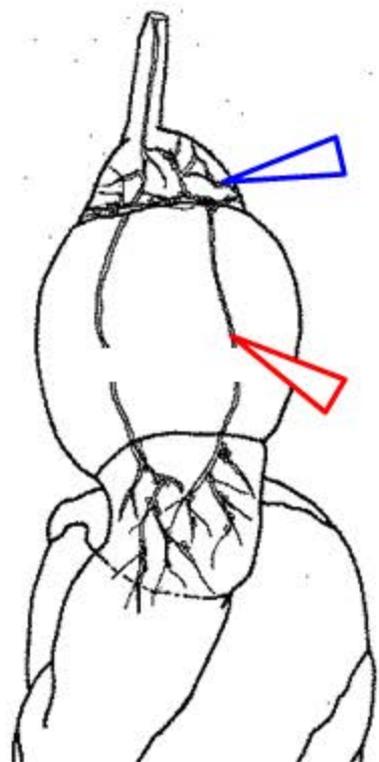


Fig.6 消化管神経系ニューロンの
自発的バースト活動リズムの起源

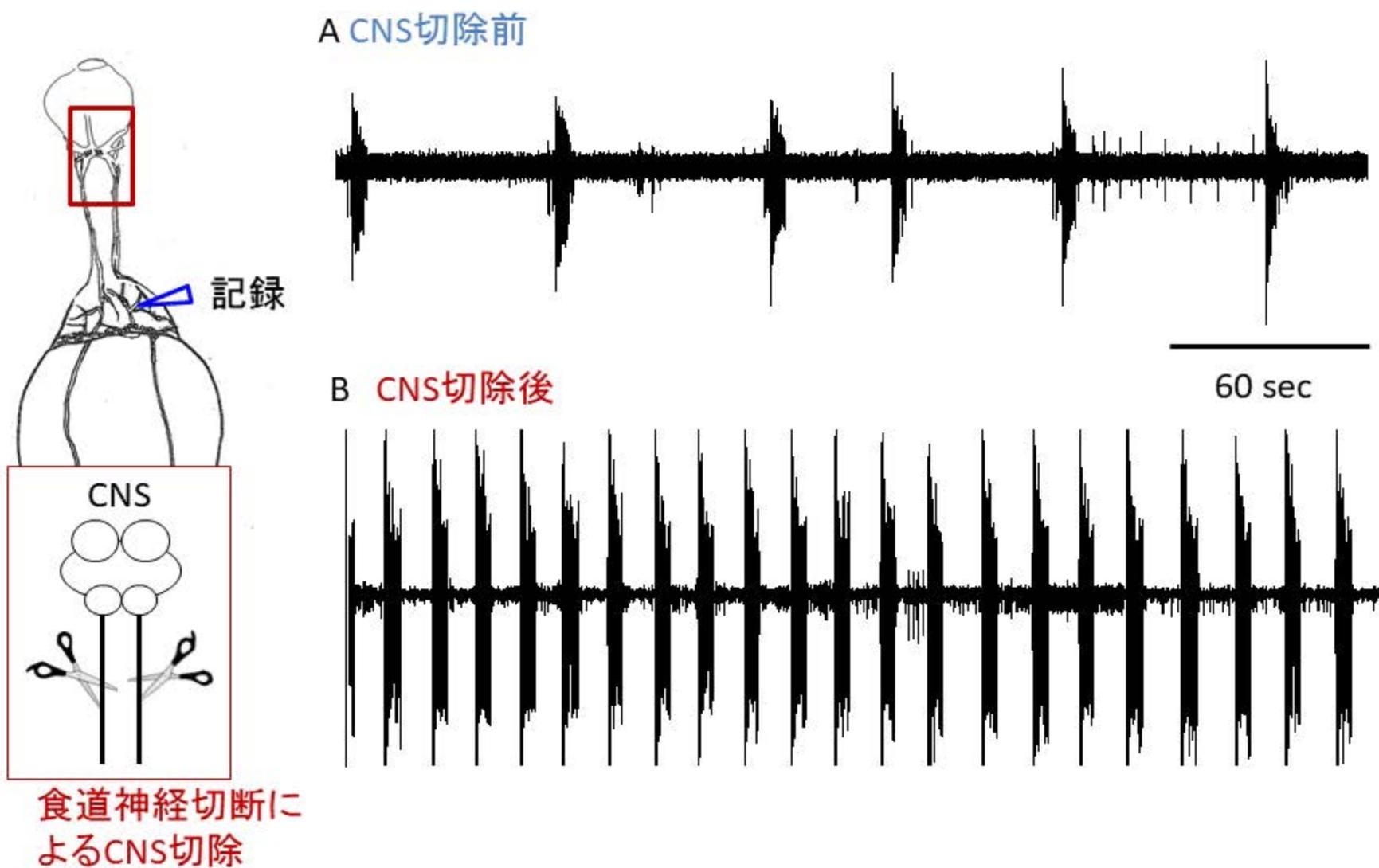


Fig.7 バースト活動に対するCNSの影響(1)

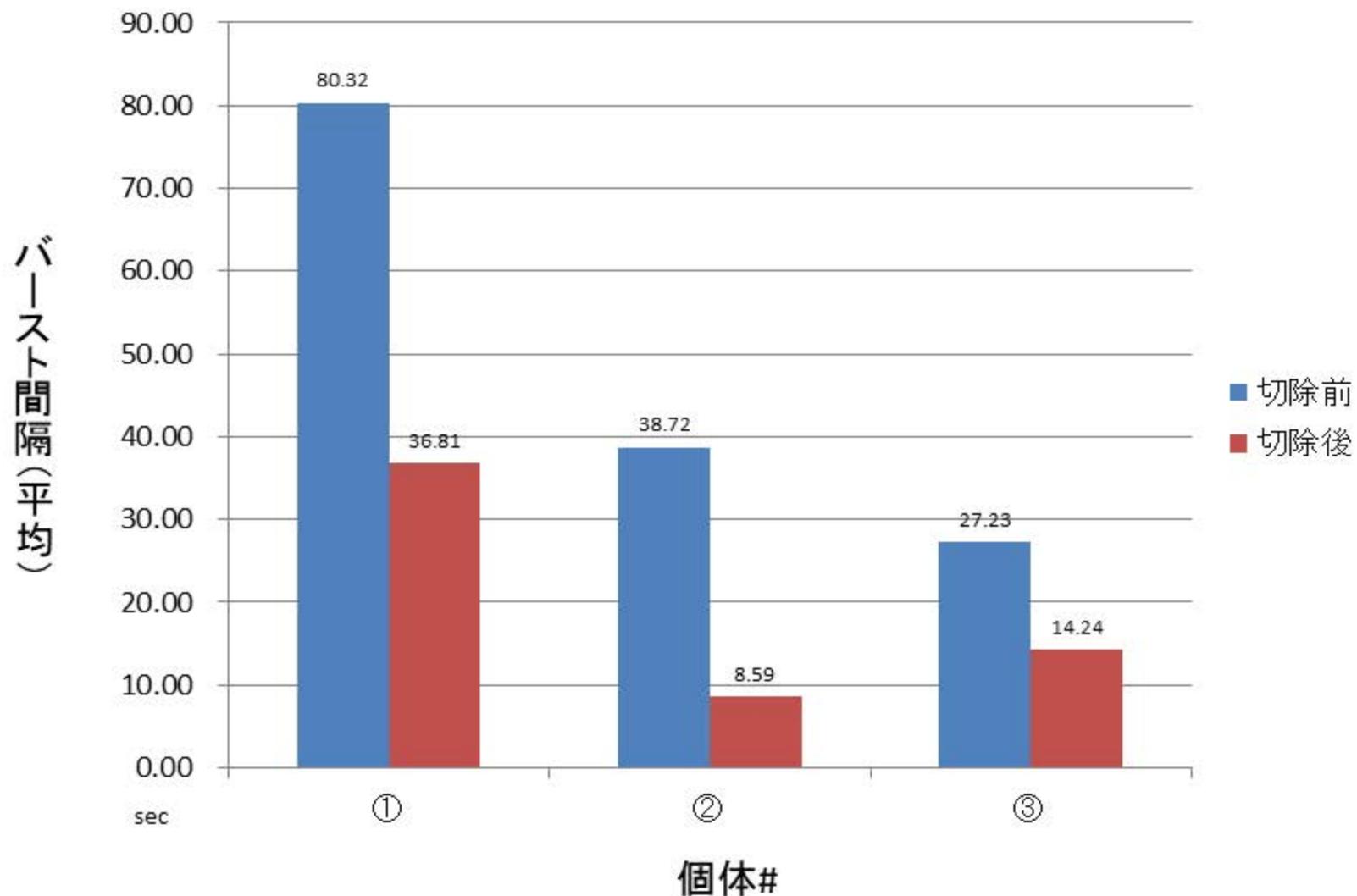


Fig.8 バースト活動に対するCNSの影響(1)

バースト間隔の標準偏差

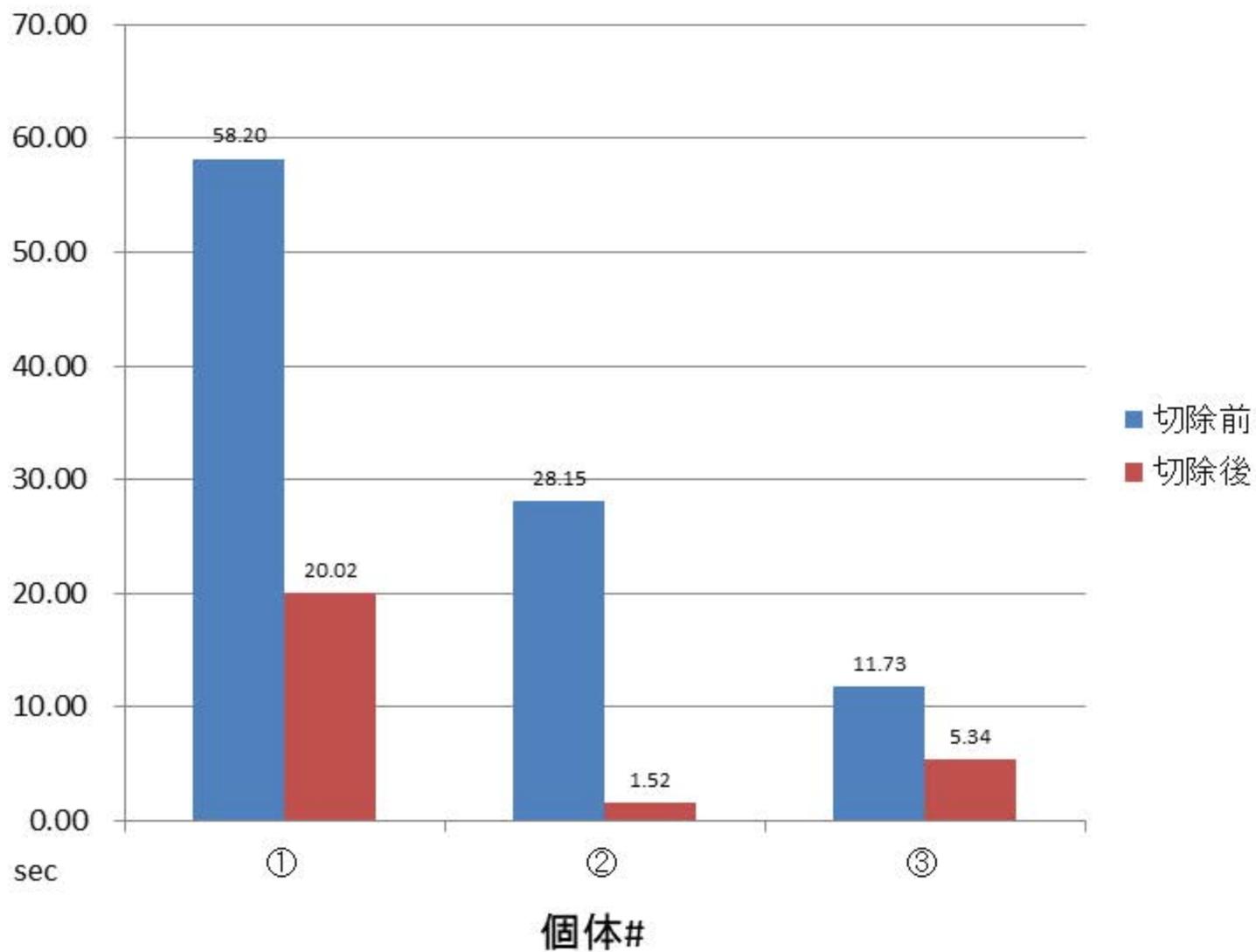


Fig.9 バースト活動に対するCNSの影響(2)

A. 興奮性効果



頻回刺激 (5V 1ms 10Hz × 20)

B. 興奮性効果

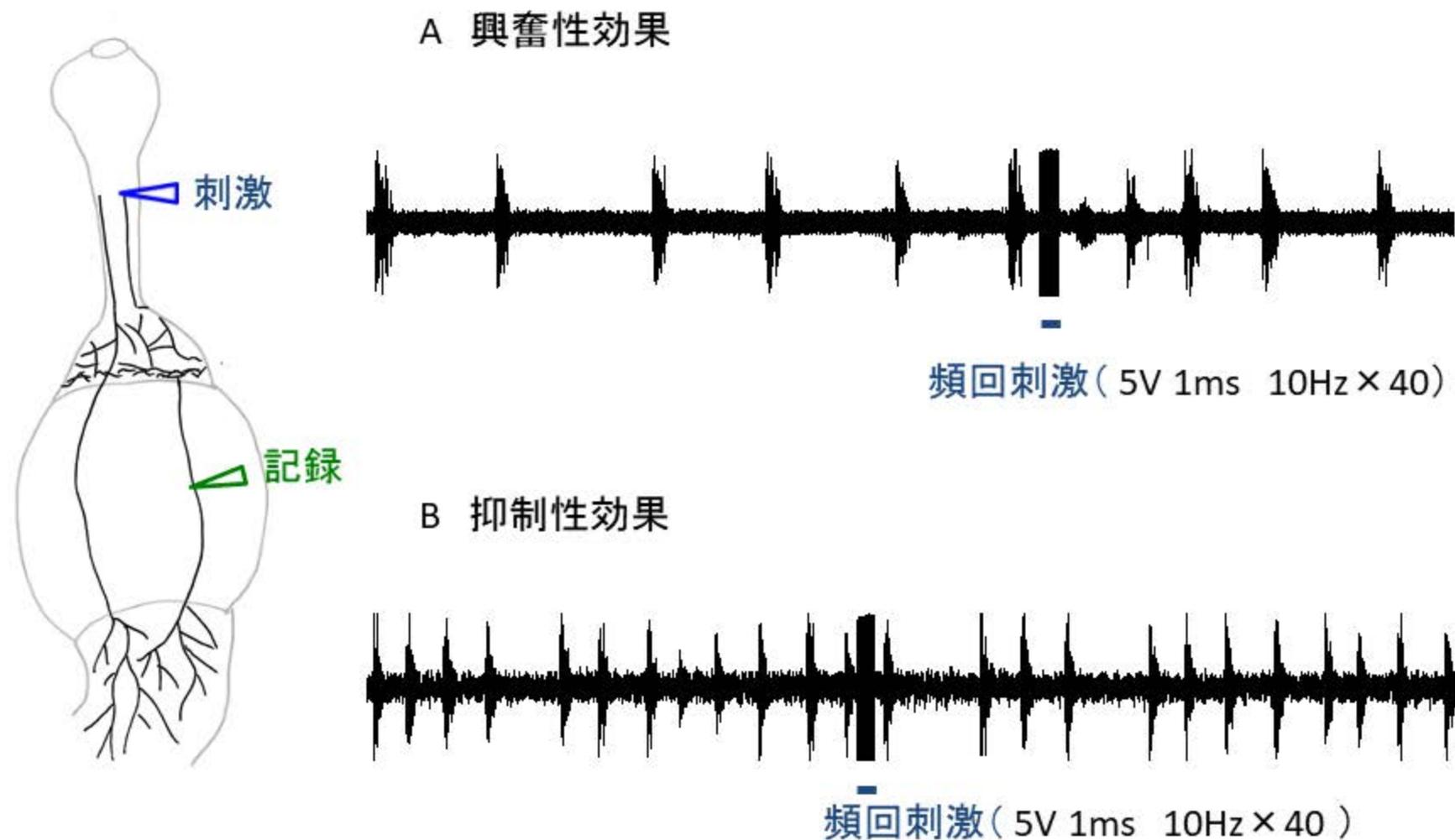


頻回刺激 (5v 1ms 10Hz × 40)

30 sec

Fig.10 食道神経の遠心性刺激(1)





60 sec

Fig.11 食道神経の遠心性刺激(2)

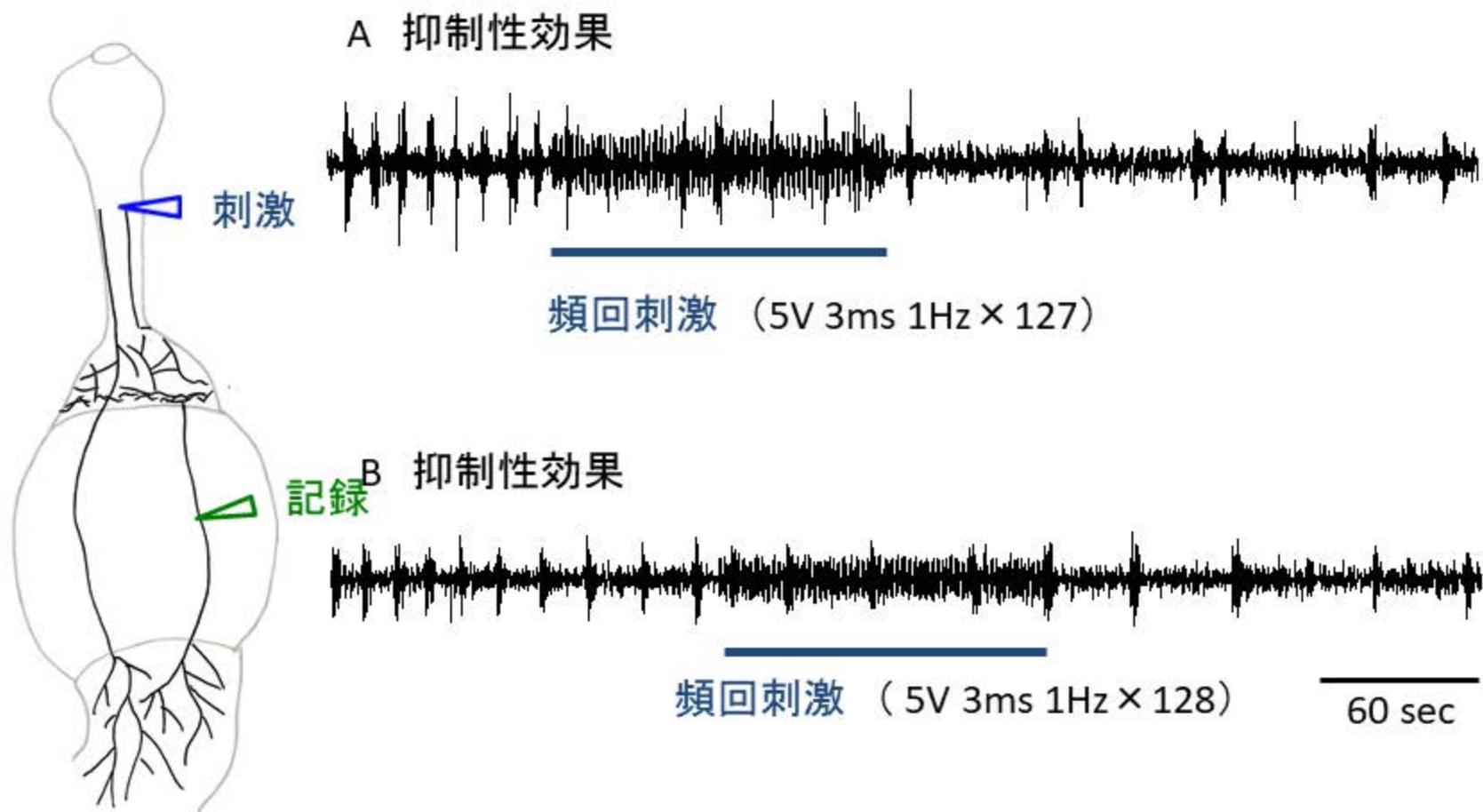


Fig.12 食道神経の遠心性刺激(3)



抑制性効果



● 単発刺激 (5V 2ms × 1)

60 sec

Fig.13 食道神経の求心性刺激実験(1)

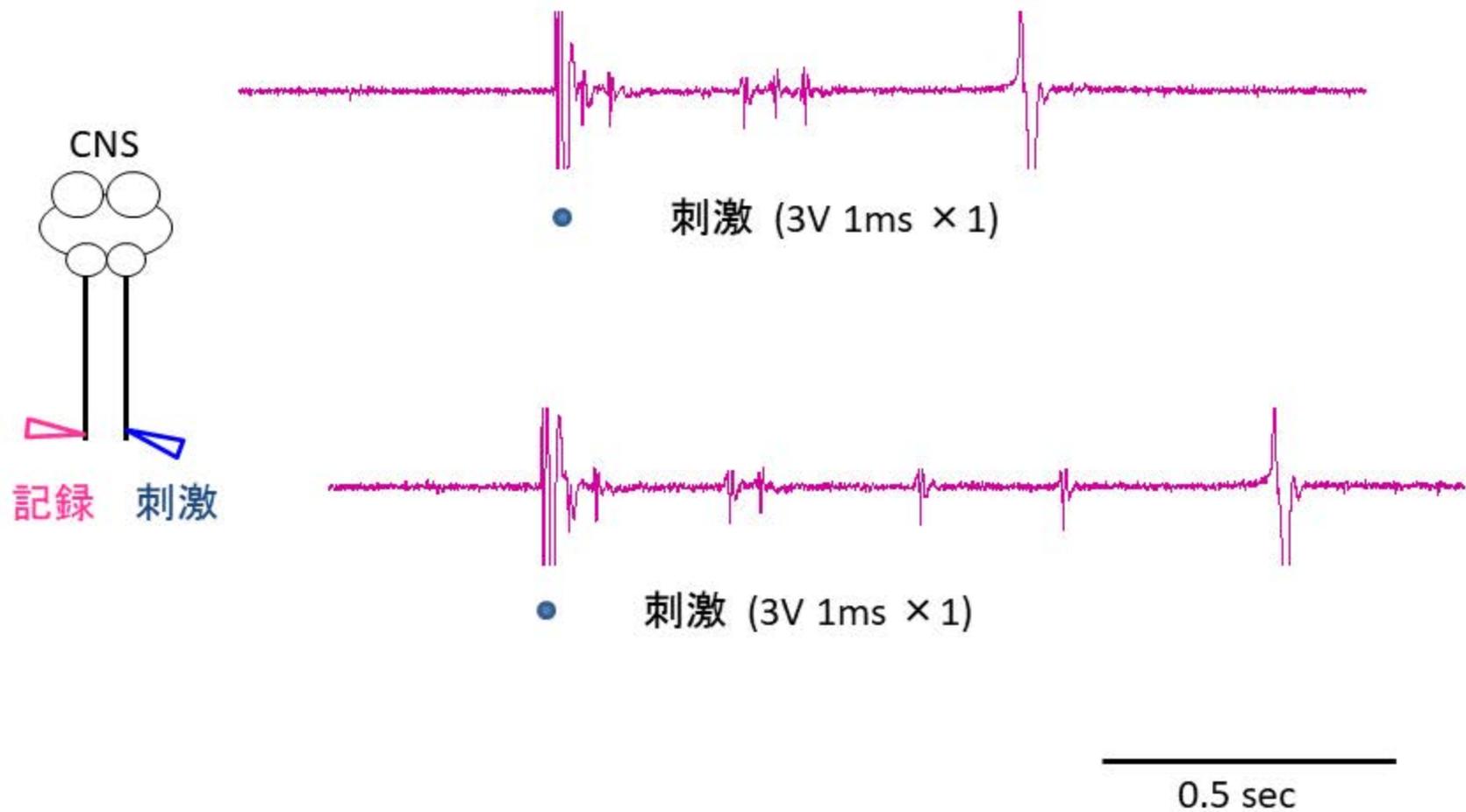


Fig.14 食道神経の求心性刺激実験(2)

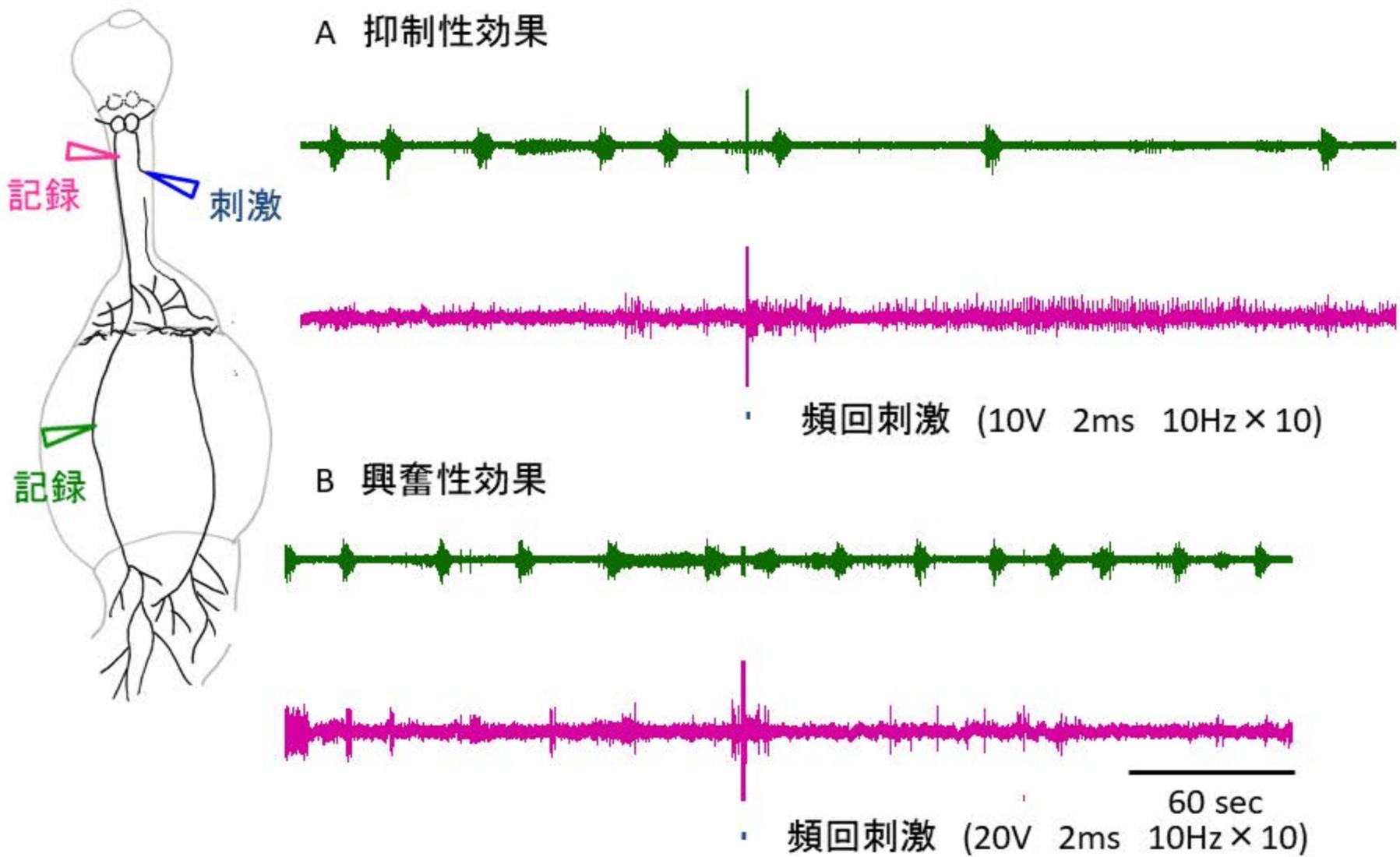


Fig.15 食道神経の求心性刺激実験(3)