

氏名 (本籍)	椎名 貴彦 (千葉県)				
学位の種類	博士 (獣医)				
学位記番号	獣医博乙第79号				
学位授与年月日	平成18年3月13日				
学位授与の要件	学位規則第3条第2項該当				
学位論文題目	Studies on the Mechanism of a Local Neural Reflex in the Striated Muscle Motility of the Rat Esophagus (ラット食道横紋筋運動における局所神経反射機序に関する 研究)				
審査委員	主査	岐阜大学	教授	武脇	義
	副査	帯広畜産大学	教授	西村	昌数
	副査	岩手大学	教授	谷口	和之
	副査	東京農工大学	教授	田谷	一善
	副査	岐阜大学	教授	小森	成一

### 論文の内容の要旨

動物の胃や小腸、大腸の壁内には、知覚神経、介在神経、運動神経から構成される発達した内在神経ネットワークが存在している。このようないわゆる「腸神経系」は、消化管平滑筋の収縮及び弛緩を制御し、消化管運動の統合に大きく寄与している。一方、消化管の入り口に位置する食道は、その筋層の一部または全長が横紋筋で構成されている。そして、延髄を中枢とした外来神経（迷走神経）による反射が、食塊を胃に移送する蠕動運動の調節に中心的な役割を果たすと理解されている。しかしながら、食道壁にも発達した内在神経叢が存在し、一部の内在神経線維の末端は横紋筋運動終板の近傍に位置していることが示されている。このような形態学的な知見は、内在神経が食道横紋筋の運動制御に関わっていることを示唆するものであるが、食道横紋筋運動に対する内在神経の役割について、未だ十分には明らかにされていない。そこで本研究では、横紋筋のみで構成されるラットの食道を用いて、その運動制御に関わる内在神経の役割について解析を行った。

第1章では、ラットの食道横紋筋運動に対して内在神経が影響を及ぼすか否かについて調べた。Wistar系ラットから食道を分離して、オルガンバスにセットした。フォーストランスデューサーを用いて、食道運動を等尺性に記録した。ラットの食道では、内在神経叢は知覚神経の入力を受けているので、知覚神経を刺激する作用を持つカプサイシンを利用して、知覚神経を介した食道内在神経の刺激を試みた。具体的には、食道筋を支配する迷走運動神経に電気刺激を与え、そのときに発生する収縮が、カプサイシン投与によって影響を受けるか否か観察することにより、内在神経の役割を調べた。迷走神経を単刺激すると、食道横紋筋は刺激に応じて単収縮した。こ

の単収縮は、カプサイシン投与によって抑制された。経壁電気刺激によって食道横紋筋を直接刺激したときの収縮は、カプサイシンによって抑制されなかった。また、カプサイシン感受性知覚神経を破壊したラットの食道においては、カプサイシンの抑制作用は認められなかった。これらの結果は、カプサイシンが横紋筋に直接作用することなく、内在神経を介して筋収縮を抑制することを示すものである。また、<sup>3</sup>H-choline を用いてアセチルコリン (ACh) をラベルし、食道標本からの放出量を測定したところ、カプサイシン投与によって ACh 放出量が減少することが明らかになった。さらに、このカプサイシンによる単収縮抑制効果は、一酸化窒素 (NO) 合成酵素 (NOS) 阻害薬の前処置によって阻害され、NO 供与体の投与によって再現された。これらの結果は、ラット食道には横紋筋運動を抑制する知覚神経-内在 NO 作動性神経による局所反射経路が存在し、カプサイシンはその反射経路を興奮させることを示唆している。

消化管内容物を口腔側から肛門側へ輸送することが、蠕動運動の重要な役割である。したがって、蠕動による内容物の推送量は、食道運動を解析するための有用な指標 (パラメーター) と考えられる。これまで、蠕動運動を評価するパラメーターとして消化管標本の内腔圧変化や蠕動頻度がよく利用されているが、内容物の推送量を指標とした研究は、食道だけでなく、小腸や大腸においても少ない。そこで、第2章では、比較的良好に蠕動研究に用いられる回腸標本を用いて、推送量の測定が蠕動運動を評価する手法として有用であるかどうかを検討した。さらに、得られた結果を食道標本に適用し、推送量を指標としてカプサイシンの効果を検証することを試みた。回腸標本において内腔圧変化を記録したところ、蠕動運動の発生はモニターできたが、完全な蠕動と不完全な蠕動、あるいは逆蠕動といったパターンの違いを区別することができなかった。一方、推送量は蠕動運動のパターンに応じて増減した。さらに、NOS 阻害薬を投与したところ、蠕動が発生する頻度は増加したのに対し、推送量は逆に減少した。頻度のみを指標とした場合は、NO 作動性神経の役割は単なる蠕動の抑制であると評価されることになるが、推送量を同時に測定することによって、NO 作動性神経が内容物の効率的な輸送に寄与することを明示できた。すなわち、これらの結果より、消化管標本における推送量の測定は、蠕動運動を調節する神経回路を解析するために有用な手法であり、食道運動を調べる実験に応用する価値があると言える。実際に、食道標本から推送量を測定してみると、迷走神経刺激に伴って口腔側から胃側に向かって食道内腔の溶液が移送されること、そして、この推送量はカプサイシン投与によって抑制されることがわかった。また、この抑制効果は NOS 阻害薬の前処置によって阻害された。これらの結果は、第1章で明らかにした局所反射経路が、食道蠕動運動による内容物の移送能力の制御にも関与していることを示している。

食道には、NO 作動性神経以外に、タキキニンのようなペプチド性伝達物質を有する神経が豊富に存在している。そこで、第3章では、食道運動を制御する局所反射経路に関わる神経伝達物質について検討した。カプサイシンによる食道横紋筋の単収縮および推送量の抑制は、知覚神経の主要な伝達物質であるタキキニンの受容体拮抗薬の投与によって阻害された。さらに、タキキニン受容体作動薬は、食道横紋筋の単収縮反応を抑制し、この抑制効果は NOS 阻害薬の前処置によって消失した。これらの結果は、食道横紋筋の局所反射経路には、知覚神経から放出されたタキキニンが関与していることを示唆している。

以上の結果から、ラット食道横紋筋には、タキキニン作動性知覚神経とその支配を受ける NO 作動性神経によって構成される局所反射経路が存在していること、この反射経路は迷走神経からの ACh 放出を抑制することにより、食道横紋筋運動を制御していることが示唆された。

## 審 査 結 果 の 要 旨

動物の消化管壁内には、知覚神経、介在神経、運動神経から構成される発達した内在神経ネットワークが存在し、胃腸管運動に対する役割が明らかになってきている。しかしながら、食道運動に対する内在神経の役割については、未だ十分には明らかにされていない。そこで本研究では、横紋筋のみで構成されるラットの食道を用いて、その運動制御に関わる内在神経の役割について解析を行った。(1) 迷走神経を刺激すると食道横紋筋は収縮し、神経終末からの ACh 放出量は増大していた。知覚神経刺激薬であるカプサイシンの投与により、神経性収縮は抑制され、ACh 放出量も減少していた。カプサイシンによる収縮抑制効果は、一酸化窒素 (NO) 合成酵素阻害薬の前処置によって阻害され、NO 供与体の投与によって再現されたことから、食道には横紋筋運動を抑制する知覚神経-内在 NO 作動性神経による局所反射経路が存在し、カプサイシンはその反射経路を興奮させることが示唆された。(2) 食道の蠕動運動を調節する神経回路を内容移送から解析すると、迷走神経刺激に伴って口腔側から胃側に向かって食道内腔の溶液が移送され、この推送量はカプサイシン投与によって抑制されることがわかった。また、この抑制効果は NO 合成酵素阻害薬の前処置によって阻害された。これらの結果から、(1) で明らかにした局所反射経路が、食道蠕動運動による内容物の移送能力の制御にも関与しているという知見を得た。(3) 知覚神経から内在神経への経路について解析したところ、タキキニン受容体作動薬はカプサイシン効果を模倣して食道横紋筋の単収縮反応を抑制し、さらにこの抑制効果は NO 合成酵素阻害薬の前処置によって消失した。これらの結果は、食道横紋筋の局所反射経路には、知覚神経から放出されたタキキニンが関与していることを示唆している。

以上の結果から、ラット食道横紋筋にはタキキニン作動性知覚神経とその支配を受ける NO 作動性神経によって構成される局所反射経路が存在していること、この反射経路は迷走神経からの ACh 放出を抑制することにより、食道横紋筋運動を制御していることを明らかにした。本研究の新知見は、今後の研究に不可欠な基盤となるはずである。

以上について、審査委員全員一致で本論文が岐阜大学大学院連合獣医学研究科の学位論文として十分価値のあるものと認めた。

学位論文の基礎となる学術論文

- 1) 題 目 : Measurement of the propelled liquid by isolated hamster ileum as a parameter to evaluate peristalsis  
著 者 名 : Shiina, T., Shimizu, Y., Suzuki, Y., Nikami, H. and Takewaki, T.  
学術雑誌名 : European Journal of Pharmacology  
巻・号・頁・発行年 : 517 (1-2) : 120-126, 2005
  
- 2) 題 目 : Tachykinins are involved in local reflex modulation of vagally mediated striated muscle contractions in the rat esophagus via tachykinin NK1 receptors  
著 者 名 : Shiina, T., Shimizu, Y., Boudaka, A., Wörl, J. and Takewaki, T.  
学術雑誌名 : Neuroscience  
巻・号・頁・発行年 : 139 (2) : 495-503, 2006

既発表学術論文

- 1) 題 目 : Genomic organization, chromosomal localization, and promoter analysis of the mouse *Mail* gene  
著 者 名 : Shiina, T., Morimatsu, M., Kitamura, H., Ito, T., Kidou, S., Matsubara, K., Matsuda, Y., Saito, M. and Syuto, B.  
学術雑誌名 : Immunogenetics  
巻・号・頁・発行年 : 53 (8) : 649-655, 2001年
  
- 2) 題 目 : Bacterial lipopolysaccharide induces mRNA expression of an I $\kappa$ B MAIL through toll-like receptor 4  
著 者 名 : Kitamura, H., Kanehira, K., Shiina, T., Morimatsu, M., Jung, B.D., Akashi, S. and Saito, M.  
学術雑誌名 : The Journal of Veterinary Medical Science  
巻・号・頁・発行年 : 64 (5) : 419-422, 2002
  
- 3) 題 目 : ウシMAIL cDNAのクローニングと末梢白血球におけるmRNA発現  
著 者 名 : 山地大介, 北村浩, 松下由紀子, 椎名貴彦, 森松正美, 斉藤昌之  
学術雑誌名 : 獣医生化学  
巻・号・頁・発行年 : 39 (2) : 13-18, 2002
  
- 4) 題 目 : Cloning of bovine MAIL and its mRNA expression in white blood cells of Holstein cows  
著 者 名 : Yamaji, D., Kitamura, H., Kimura, K., Matsushita, Y., Okada, H., Shiina, T., Morimatsu, M. and Saito, M.  
学術雑誌名 : Veterinary Immunology and Immunopathology  
巻・号・頁・発行年 : 98 (3-4) : 175-184, 2004
  
- 5) 題 目 : Mechanism of hypoglycaemic and immunopotentiating effect of *Nigella sativa* L. oil in streptozotocin-induced diabetic hamsters  
著 者 名 : Fararh, K.M., Atoji, Y., Shimizu, Y., Shiina, T., Nikami, H. and Takewaki, T.  
学術雑誌名 : Research in Veterinary Science  
巻・号・頁・発行年 : 77 (2) : 123-129, 2004

- 6) 題 目 : Transcriptional regulation of the MAIL gene in LPS-stimulated RAW264 mouse macrophages  
著 者 名 : Ito, T., Morimatsu, M., Oonuma, T., Shiina, T., Kitamura, H. and Syuto, B.  
学術雑誌名 : Gene  
卷・号・頁・発行年 : 342 (1) : 137-143, 2004
- 7) 題 目 : Targeted disruption of MAIL, a nuclear I $\kappa$ B protein, leads to severe atopic dermatitis-like disease  
著 者 名 : Shiina, T., Konno, A., Oonuma, T., Kitamura, H., Imaoka, K., Takeda, N., Todokoro, K. and Morimatsu, M.  
学術雑誌名 : The Journal of Biological Chemistry  
卷・号・頁・発行年 : 279 (53) : 55493-55498, 2004
- 8) 題 目 : Successful abrogation by thymoquinone against induction of diabetes mellitus with streptozotocin via nitric oxide inhibitory mechanism  
著 者 名 : El-Mahmoudy, A., Shimizu, Y., Shiina, T., Matsuyama, H., El-Sayed, M. and Takewaki, T.  
学術雑誌名 : International Immunopharmacology  
卷・号・頁・発行年 : 5 (1) : 195-207, 2005
- 9) 題 目 : A comparative histological study on the distribution of striated and smooth muscles and glands in the esophagus of wild birds and mammals  
著 者 名 : Shiina, T., Shimizu, Y., Izumi, N., Suzuki, Y., Asano, M., Atoji, Y., Nikami, H. and Takewaki, T.  
学術雑誌名 : The Journal of Veterinary Medical Science  
卷・号・頁・発行年 : 67 (1) : 115-117, 2005
- 10) 題 目 : An electrophysiological study of excitatory purinergic neuromuscular transmission in longitudinal smooth muscle of chicken anterior mesenteric artery  
著 者 名 : Khalifa, M., El-Mahmoudy, A., Shiina, T., Shimizu, Y., Nikami, H., El-Sayed, M., Kobayashi, H. and Takewaki, T.  
学術雑誌名 : British Journal of Pharmacology  
卷・号・頁・発行年 : 144 (6) : 830-839, 2005
- 11) 題 目 : Macrophage-derived cytokine and nitric oxide profiles in type I and type II diabetes mellitus: effect of thymoquinone  
著 者 名 : El-Mahmoudy, A., Shimizu, Y., Shiina, T., Matsuyama, H., Nikami, H. and Takewaki, T.  
学術雑誌名 : Acta Diabetologica  
卷・号・頁・発行年 : 42 (1) : 23-30, 2005
- 12) 題 目 : A neurophysiological evidence of capsaicin-sensitive nerve components innervating interscapular brown adipose tissue  
著 者 名 : Shinozaki, K., Shimizu, Y., Shiina, T., Nishijima, K., Atoji, Y., Nikami, H., Nishijima, A. and Takewaki, T.  
学術雑誌名 : Autonomic Neuroscience  
卷・号・頁・発行年 : 119 (1) : 16-24, 2005

- 1 3) 題 目 : Thymoquinone reduces hepatic glucose production in diabetic hamsters  
著 者 名 : Fararh, K.M., Shimizu, Y., Shiina, T., Nikami, H., Ghanem, M.M. and Takewaki, T.  
学術雑誌名 : Research in Veterinary Science  
卷・号・頁・発行年 : 79 (3) : 219-223, 2005
- 1 4) 題 目 : Neurally released ATP mediates endothelium-dependent hyperpolarization in the circular smooth muscle cells of chicken anterior mesenteric artery  
著 者 名 : Draid, M., Shiina, T., El-Mahmoudy, A., Boudaka, A., Shimizu, Y. and Takewaki, T.  
学術雑誌名 : British Journal of Pharmacology  
卷・号・頁・発行年 : 146 (7) : 983-989, 2005
- 1 5) 題 目 : NANC inhibitory neuromuscular transmission in the hamster distal colon  
著 者 名 : El-Mahmoudy, A., Khalifa, M., Draid, M., Shiina, T., Shimizu, Y., El-Sayed, M. and Takewaki, T.  
学術雑誌名 : Pharmacological Research  
卷・号・頁・発行年 : 54 (6) : 452-460, 2006
- 1 6) 題 目 : Purinergic control of the quail rectum: Modulation of adenosine 5'-triphosphate-mediated contraction with acetylcholine  
著 者 名 : Shiina, T., El-Mahmoudy, A., Khalifa, M., Draid, M., Shimizu, Y. and Takewaki, T.  
学術雑誌名 : Research in Veterinary Science  
卷・号・頁・発行年 : In Press
- 1 7) 題 目 : Involvement of TRPV1-dependent and -independent components in the regulation of vagally induced contractions in the mouse esophagus  
著 者 名 : Boudaka, A., Wörl, J., Shiina, T., Neuhuber, W. L., Kobayashi, H., Shimizu, Y. and Takewaki, T.  
学術雑誌名 : European Journal of Pharmacology  
卷・号・頁・発行年 : 556 (1-3) : 157-165, 2007
- 1 8) 題 目 : Key role of mucosal primary afferents in mediating the inhibitory influence of capsaicin on vagally mediated contractions in the mouse esophagus  
著 者 名 : Boudaka, A., Wörl, J., Shiina, T., Saito, S., Atoji, Y., Kobayashi, H., Shimizu, Y. and Takewaki, T.  
学術雑誌名 : The Journal of Veterinary Medical Science  
卷・号・頁・発行年 : In Press