

下行性セロトニン神経による脊髄排便中枢を
介した大腸運動制御に関する研究

2017年

岐阜大学大学院連合獣医学研究科
(岐阜大学)

中 森 裕 之

下行性セロトニン神経による脊髄排便中枢を介した大腸運動制御に関する研究

中森 裕之

目 次

略語一覧	1
緒言	2
実験材料及び実験方法	6
第 1 章	14
脊髄排便中枢におけるセロトニンの役割	
結果	
考察	
第 2 章	30
脊髄排便中枢のモノアミン類による相互作用の検討	
結果	
考察	
第 3 章	42
脊髄排便中枢にセロトニンを放出する起始核の検討	
結果	
考察	
第 4 章	57
カプサイシンによる大腸運動促進作用へのセロトニンの関与の検討	
結果	
考察	
総合考察	63
結論	68
謝辞	69
文献	70

略語一覧

5-HT	5-hydroxytryptamine (セロトニン)
GABA	γ -aminobutyric acid (γ -アミノ酪酸)
GHSR1a	growth hormone secretagogue receptor 1a
IBS	irritable bowel syndrome (過敏性腸症候群)
i.L.	intraluminal injection (管腔内投与)
i.t.	intrathecal injection (脊髄腔内投与)
i.v.	intravenous injection (静脈内投与)

緒 言

大腸を含む消化管には、特有の機構である内在神経系が存在している。大腸では、糞塊などによる腸管壁への機械刺激や化学刺激により、内在神経系の一次求心性神経が興奮すると、消化管における介在神経が活性化される。その後、興奮性運動神経（アセチルコリン作動性神経やタキキニン作動性神経）および抑制性運動神経（一酸化窒素作動性神経や ATP 作動性神経など）、さらにはカハールの間質細胞やグリア細胞による制御がかかり、運動した平滑筋の収縮と弛緩が起こる（4, 70）。この平滑筋の巧みな動きにより、口側から肛門側へと糞塊が輸送される蠕動運動が引き起こされる。このような大腸の運動性は、中枢から切り離された状態でも保つことができることから、大腸の運動制御に対する中枢神経系の寄与はわずかであると考えられてきた。そのため、内在神経系に比べて、中枢神経系の大腸運動制御に関する研究はあまり進んでおらず、未だ不明な点が多い。

これまで、中枢性の大腸運動の制御機構については、あまり重要視されてこなかった。しかしながら、ストレスによる下痢や便秘といった排便障害が社会的な問題となり、中枢神経系の重要性が再認識されている。ストレス性の下部消化管疾患のひとつである過敏性腸症候群（irritable bowel syndrome; IBS）は腹痛や腹部不快感とともに排便障害が引き起こされる消化管疾患であり、青年期以上の年齢の 10-20%で症状がみられ、生活の質の低下や、医療費の増大などが大きな問題となっている（36）。IBS は、便秘型 IBS、下痢型 IBS、混合型 IBS、分類不能型 IBS の 4 つのタイプに分類される。IBS は複数の因子によって引き起こされるため、複合的な病因が根底にあると考えられており、正確な分子病態については理解からほど遠い（10）。IBS における機能的な変化としては、内臓知覚の変化、脳の機能的変化、消化管の運動異常および分泌障害がある。さらに、消化管の神経系、粘膜上皮、免疫系、腸内細菌において IBS に付随した異常が確認されている。しかしながら、特定の病態と IBS の症状との関連性は、未だ確証が得られていない。現在の治療薬は、グアニル

酸シクラーゼ C 作動薬や 5-HT (5-hydroxytryptamine; セロトニン) ₄ 受容体作動薬が便秘型 IBS に対して使用され、 μ オピオイド受容体作動薬や 5-HT₃ 受容体拮抗薬が下痢型 IBS に対して使用されている (10)。これらの治療薬は、末梢の消化管内在神経系に作用することを期待して開発されている。一方、ストレスが症状の引き金や増悪因子であることから、IBS の病態に中枢神経系が重要な役割を果たしていると考えられており、中枢への作用が期待できる三環系抗うつ薬や選択的セロトニン再取込阻害薬は、IBS に有効であることが知られている。しかし、世界各国で IBS 治療に対する認可が下りていないのが現状である (10)。そのような状況に陥る原因として、中枢神経系による排便制御についての研究が十分にされておらず、薬剤の中枢に対する作用機序が曖昧なままであることが挙げられる。このことから、中枢性の排便制御メカニズムを解明することは、重要な課題であるといえる。

中枢神経系は自律神経を介して内在神経系を調節することで、大腸運動を制御している。Takaki らによる切断実験により、大腸の運動は中枢神経系に存在する 2 つの排便中枢によって調節されていることが証明された (75, 76)。ひとつは主に橋を中心とした脳に存在する上脊髄排便中枢、もうひとつは脊髄の腰仙髄部に存在する脊髄排便中枢である。大腸に対する物理的および化学的な刺激によって、大腸運動が亢進し、この反応は脊髄排便中枢よりも尾側の脊髄を切断すると消失する (75)。また、脊髄排便中枢よりも頭側を切断しても消失はしないが、大腸刺激に対する運動亢進反応の閾値が上昇する (45, 76)。これらのことから、大腸運動制御は大腸と脊髄排便中枢からなる反射弓で成り立っており、上脊髄排便中枢がこの反射の閾値を調節していると考えられている。また、自律神経を切除する実験により、脊髄腰部における交感神経の結腸神経が大腸運動を抑制性に制御し、脊髄仙部における副交感神経の骨盤神経が大腸運動を促進性に制御していることが明らかとなっている (77, 84)。このように排便に関わる中枢神経系の存在は知られていたが、その制御に関与する具体的な神経核とその伝達物質については不明のままである。

この現状を打開するように、脊髄排便中枢に関与する神経伝達物質が、次々と発見され

た。まず、脊髄排便中枢にグレリンが作用すると、大腸運動が亢進することが明らかとなった (66)。このグレリンの作用は、骨盤神経を介し内在神経を活性化させること、デスアシル・グレリンにより拮抗されることが明らかとなっている (18, 66)。また、視床下部におけるグレリン感受性神経とは異なり、AMP キナーゼを活性化しないこと、レプチンによる拮抗作用はないこと、ニューロペプチド Y の関与はないことも証明された (50)。このように、グレリンによる大腸運動の促進作用について、詳細な検討が行われたが、脊髄排便中枢の制御メカニズムを解明する糸口は見つからなかった。近年、モノアミン神経伝達物質であるドパミンとノルアドレナリンも脊髄排便中枢を活性化させ、大腸運動を促進させる働きがあることがわかった (47, 48)。これらのモノアミン類は、それぞれ D2 様ドパミン受容体と $\alpha 1$ アドレナリン受容体に作用し、骨盤神経を介して大腸運動を亢進させる。この 2 つのモノアミン類は、脊髄にその細胞体がほとんどないことから、脳から脊髄に投射される神経によって放出されると考えられている (41)。脳と脊髄を介して大腸運動が亢進する反応のひとつに、カプサイシンの大腸管腔内投与がある (46)。このカプサイシンの反応は、脊髄に投与したドパミン受容体の拮抗薬により抑制されることから (46)、カプサイシンによる大腸運動の亢進反応はドパミンの下行路が活性化されることで引き起こされたと考えられ、ドパミンが内在的に機能していることが示唆された。

脳から脊髄へ投射するモノアミン神経伝達物質は、ドパミンやノルアドレナリン以外にも存在することが知られている。そのひとつがセロトニンであり (41)、下行性のセロトニン神経は、痛みの伝達や排尿反射を制御していることが知られている (1, 24, 60)。セロトニンは大縫線核を含めた延髄縫線核群から脊髄へ投射している (26, 35, 37, 41)。さらに、大縫線核を電気刺激すると、脊髄後角からセロトニンが拡散伝達されること、そのセロトニンは中間帯外側細胞柱まで伝達されていることが明らかとなっている (17)。また、7 つのサブタイプに大別される 5-HT 受容体 (5-HT₁ 受容体から 5-HT₇ 受容体) は、*in situ* ハイブリダイゼーション法により、脊髄に存在することが確認されている (13)。これらのこと

から、縫線核から放出されるセロトニンが脊髄排便中枢に作用する可能性は十分にある。

そこで本研究では、縫線核に由来する神経伝達物質であるセロトニンが、脊髄排便中枢に影響を及ぼすかどうかを検討することにより、中枢神経系による大腸運動の制御機構を解明することを目的とした。第 1 章では、セロトニンが脊髄排便中枢に作用し大腸運動を促進させることを見出し、その詳細な作用経路について検討した。第 2 章では、脊髄において大腸運動を促進させるモノアミン類の脊髄排便中枢に対する相互作用の有無を検討した。第 3 章では、脊髄にセロトニンを放出させる縫線核を刺激し、大腸運動に影響を及ぼすかどうかを検討した。第 4 章では、カプサイシンの大腸運動亢進作用に、脊髄のセロトニンが関与するかどうかを検討した。

実験材料及び実験方法

実験動物

実験には体重 300-450 g の Sprague-Dawley 系統の雄ラット (Japan SLC, Inc., Shizuoka, Japan) を用いた。ラットは室温 23°C, 明期 12 時間, 暗期 12 時間の周期に設定された環境で飼育し, 餌は MF (Oriental Yeast Co., Ltd., Tokyo, Japan) を与えた。餌と水は自由に摂取できるようにした。本研究における動物実験は全て, 岐阜大学動物実験委員会および応用生物学部実験審査委員会で審査を受けた後に許可されたものであり, 岐阜大学動物実験取扱規程に従って実施した (承認番号: 12121, 13076, 14100, 15094, 17011)。

マリオット・ボトルを使用した大腸の蠕動運動測定

大腸蠕動運動測定系 (18, 46~50, 66) の概要を図 1 に示した。ラットはケタミン (50 mg/kg) の筋肉内注射によって鎮静をかけたのち, α -クロラロース (60 mg/kg) の尾静脈内投与によって麻酔を行った。十分な麻酔深度が得られたのちに, 大腿動脈にポリエチレン・チューブを挿入, 固定した。挿入したカニューレを分岐して, 一方を圧トランスデューサー (MLT0699 Disposable BP Transducer; ADInstruments Pty. Ltd., NSW, Australia) に接続して観血的血圧測定を行った。分岐したもう一方は, 安定した麻酔深度を得るために, インフュージョン・ポンプにつなぎ, 麻酔薬 (α -クロラロース, 10-20 mg/kg/h とケタミン, 3-5 mg/kg/h) の持続投与を行った。麻酔下のラットの腹部を正中切開し, 膀胱の背側に位置する遠位結腸を露出して, 結腸に対して垂直方向に小切開を行い, ガラス・チューブを肛門方向に向かって挿入, 固定し, 閉腹した。結直腸内の糞塊を生理食塩水で洗い流した後, 肛門にもガラス・チューブを挿入, 固定した。大腸内腔の圧力を一定に保つために, 口側のチューブをマリオット・ボトルに接続し, 37°C に温めた生理食塩水で内腔を満たした。一方, 肛門側のチューブは, シリコン・チューブをつなげて分岐させ, 一方を圧トランスデューサー

ーに接続して大腸内腔圧の変動を記録した。もう一方は、逆流防止弁（S-205; SUDO & COMPANY Inc., Aichi, Japan）を介したのちに排出口とした。この排出口から送り出されてきた内容液をシリンダーで受け止めて、アンプ（AC STRAIN AMPLIFIER AS1202; NEC Corporation., Tokyo, Japan）に接続した歪みトランスデューサー（T7-30-240; 株式会社エー・アンド・デイ, Tokyo, Japan）で重さを測り、大腸運動に伴う内容液の推送量を測定した。大腸の内腔圧はマリOTT・ボトルと排出口の高さを調節し、3-5 mm Hg となるように設定した。大腸運動に対する膀胱容量の変化の影響を排除するために、膀胱を小切開しポリエチレン細管を挿入、固定し排尿を行った。全ての手術が完了したのち、大腸運動および血圧が安定するまで約1時間ラットを静置した。

大腸バルーンを使用した電気刺激時の大腸運動測定

大腸バルーンによる大腸運動測定系（75~77）の概要を図2に示した。ラットはウレタン（1.5 g/kg）の腹腔内投与によって麻酔を行った。十分な麻酔深度が得られたのちに、気管にポリエチレン・チューブを挿入、固定した。挿入したカニューレはベンチレーターに接続し、人工呼吸（80 strokes/min, 4 mL/stroke）を行った。大腿動脈にポリエチレン・チューブを挿入、固定した。挿入したカニューレを分岐して、一方を圧トランスデューサーに接続して観血的血圧測定を行った。分岐したもう一方は、カニューレの詰まりを防ぐために、インフュージョン・ポンプにつなぎ、生理食塩水の持続投与（0.9 mL/h）を行った。麻酔下のラットの腹部を正中切開し、バルーンによる大腸収縮圧の測定に対する糞塊の影響を排除するために、盲腸を小切開した後、ガラス・チューブを挿入し、結直腸内の糞塊を生理食塩水で洗い流した。その後、ガラス・チューブを外し、切開部位を縫合、閉腹した。ポリエチレン・チューブに取り付けた大腸バルーンは容量が蒸留水 0.3 mL のときに直径が 1 cm になるように作製した。バルーンの容量を 0.3 mL に設定すると、バルーンの弾性により、外部からの圧がかからない限りバルーン内腔圧が 0 mm Hg になることを確認した。大腸バ

ルーンは、肛門から挿入し、バルーンの先端が肛門から 3 cm になるように設置、反対側を圧トランスデューサーに接続した。大腸運動に対する膀胱容量の変化の影響を排除するために、膀胱を小切開しポリエチレン細管を挿入、固定し排尿を行った。全ての手術が完了したのち、大腸運動および血圧が安定するまで約 1 時間ラットを静置した。

各種神経の切断

本研究では、神経経路の特定のために各種神経の切断実験を行った (48)。脊髓の切断は大腸運動の記録を取りながら行った。ラット背側から椎弓切除術によって脊髓を露出し、マイクロ剪刀を用いて脊髓を切断した。骨盤神経と結腸神経の切断は結直腸のカニューレシヨンの前に行った。骨盤神経は骨盤神経節から中枢側に 2 mm の部分で両側切断した。結腸神経は下大動脈から結直腸の間で切除した。

試薬の投与

試薬を脊髓排便中枢に投与するために、脊髓へのカニューレシヨンをを行った。30 ゲージ注射針にポリエチレン・チューブを接続し、内腔が 5 μ L となるように脊髓腔内投与カニューレを作成した。カニューレに生理食塩水を満たし、脊髓排便中枢のある腰仙髄 L6-S1 領域に挿入し、シリコン・エラストマー (Kwik-sil; World Precision Instruments, FL, USA) または瞬間接着剤 (Aron Alpha Extra; Toagosei, Co., Ltd., Tokyo, Japan) で固定した。脊髓腔内投与 (intrathecal injection; i.t.) は、マイクロシリンジを用いて試薬 10 μ L を投与した後すぐに生理食塩水 10 μ L を追加投与して行った。静脈内投与 (intravenous injection; i.v.) のために、大腿静脈にポリエチレン・チューブを挿入、固定し、持続投与を行う場合は、インフュージョン・ポンプに接続して行った。大腸管腔内投与 (intraluminal injection; i.L.) のために、大腸内にポリエチレン・チューブを大腸のカニューレとともに遠位結腸側から挿入し、固定した。管腔内投与は、マイクロシリンジを用いて試薬 10 μ L を投与した後すぐに生理食塩

水 40 μ L を追加投与して行った。

薬剤

第 1 章では、 α -クロラロース (Nacalai Tesque, Inc., Kyoto, Japan) , ケタミン (Daiichi Sankyo Co., Ltd., Tokyo, Japan) , セロトニン, ヒスタミン, シプロヘプタジン, ドラセトロン, GR 113808, α -メチルセロトニン, m-クロロフェニルピグアニド, ザコプリド, ヘキサメトニウム (Sigma, St Louis, MO, USA) , アトロピン (Mitsubishi Tanabe Pharma Co., Osaka, Japan) を用いた。

第 2 章では、 α -クロラロース (Nacalai Tesque, Inc.) , ケタミン (Daiichi Sankyo Co., Ltd.) , セロトニン, ノルアドレナリン, ドパミン, シプロヘプタジン, ドラセトロン, プラゾシン (Sigma) , ハロペリドール (セレネース®; Sumitomo Dainippon Pharma Co., Ltd., Osaka, Japan) を用いた。

第 3 章では、ウレタン (Tokyo Chemical Industry, Co., Ltd., Tokyo, Japan) , セロトニン, ビククリン, ケタンセリン, ドラセトロン, フルオキセチン (Sigma) を用いた。

第 4 章では、 α -クロラロース (Nacalai Tesque, Inc.) , ケタミン (Daiichi Sankyo Co., Ltd.) , カプサイシン, カプサゼピン, ケタンセリン, ドラセトロン (Sigma) を用いた。

α -クロラロースは、10% 2-ヒドロキシプロピル- β -シクロデキストリン (Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Osaka, Japan) に溶解した。 α -クロラロース溶解液とケタミンは必要に応じて生理食塩水で希釈して用いた。シプロヘプタジンは 10%エタノールで溶解した。GR 113808, プラゾシンおよびケタンセリンは 100%ジメチルスルホキシド (Nacalai Tesque, Inc.) に溶解後、ジメチルスルホキシドの最終濃度が GR 113808 とケタンセリンは 10%, プラゾシンは 20%になるように希釈した。カプサイシンとカプサゼピンは 100%エタノールで溶解した後、10% Tween 80 加生理食塩水で 10 倍に希釈して用いた。その他の粉末状試薬は蒸留水で希釈した。

電気刺激

ラットを脳定位固定装置 (SR-5R-HT; Narishige Scientific Laboratory, Tokyo, Japan) に固定後、同芯円電極 (直径 0.8 mm, IMB-9008; Inter Medical, Co., Ltd., Aichi, Japan) を延髄縫線核群 (-11.9 mm AP, ± 0.0 mm L, +9.4 から +10.8 mm DV) へ定位的に挿入した (図 2)。刺激電極の位置は、不確縫線核 (+9.4 mm DV)、大縫線核 (+10.4 mm DV)、淡蒼縫線核 (+10.8 mm DV) とした。延髄縫線核群への刺激条件は、刺激頻度 20 Hz、パルス幅 2 ms、刺激強度 100 μ A、刺激時間 2 min とした。実験終了後、刺激電極の位置を電気凝固法 (1 mA, 10 s) により印した。脳幹は 10%ホルマリンにより灌流固定し、厚さ 10 μ m の冠状切片を 100 μ m 間隔で作製し、ニッスル染色により染めた。定位固定アトラスを参考に (54)、電気凝固部位を同定した (図 3)。

統計処理およびデータ表記

数値データは全て平均値 \pm 標準偏差で表記した。2 群間の検定は、同一個体から得られたデータ群を比較する場合は対応のある *t* 検定を、異なる個体から得られたデータ群を比較する場合は対応のない *t* 検定を用いた。多群を比較する場合は、パラメトリック検定では一元配置分散分析法を、ノンパラメトリック検定ではクラスカル・ワーリス検定を用いた。*P* 値 < 0.05 の場合を統計学的に有意な差があるとした。

第 1 章では、大腸運動の評価は、反応が始まってからの 5 分間のデータを用いて行った。反応が見られなかった場合は、試薬が十分に作用していると考えられる投与 5 分後からの 5 分間のデータを用いた。大腸内腔圧の変動は、基礎となる圧力から 2 mm Hg 以上の上昇が見られた場合に、収縮として数えた。

第 3 章では、大腸運動の評価は、電気刺激をする直前の 2 分間と、電気刺激を行った 2 分間のデータを用いた。

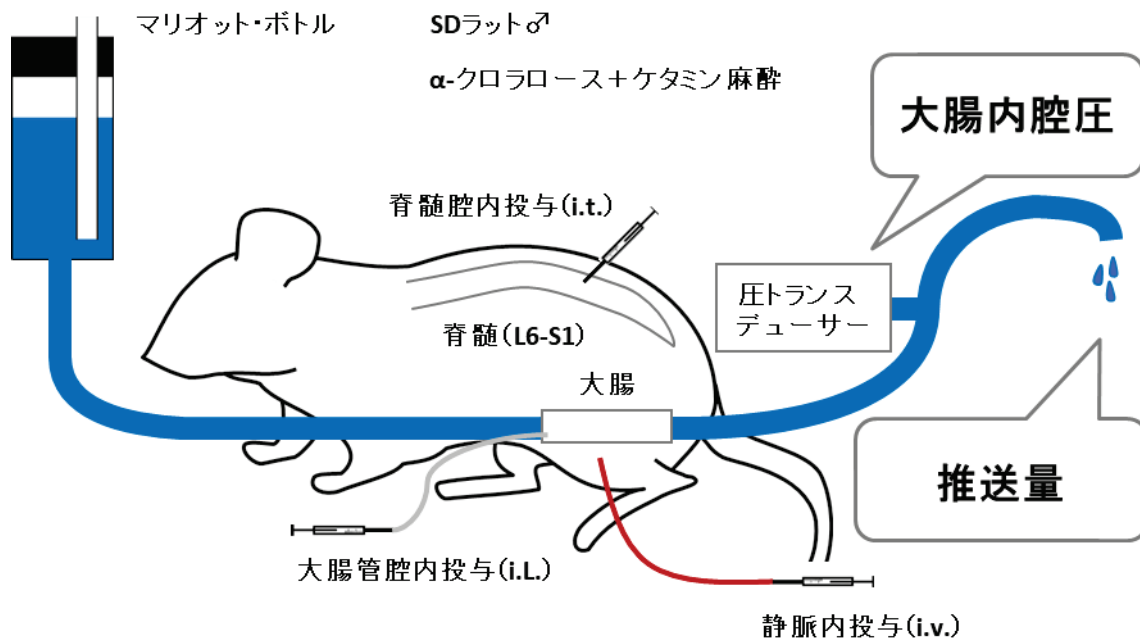


図1 マリオット・ボトルを使用した大腸の蠕動運動測定法の概要

遠位結腸および肛門にチューブを挿入，固定し閉腹した。大腸内腔圧の圧力を一定に保つために，口側のチューブをマリオット・ボトルに接続した。肛門側のチューブは分岐させ，一方を圧トランスデューサーに接続して，もう一方は逆流防止弁を介したのちに排出口とした。37°Cに温めた生理食塩水で内腔を満たした。圧トランスデューサーを介して大腸内腔圧の変動を測定し，排出口から送り出された排出液を回収し，推送量を測定した。大腸の内腔圧はマリオット・ボトルと排出口の高さを調節し，3-5 mm Hg となるように設定した。

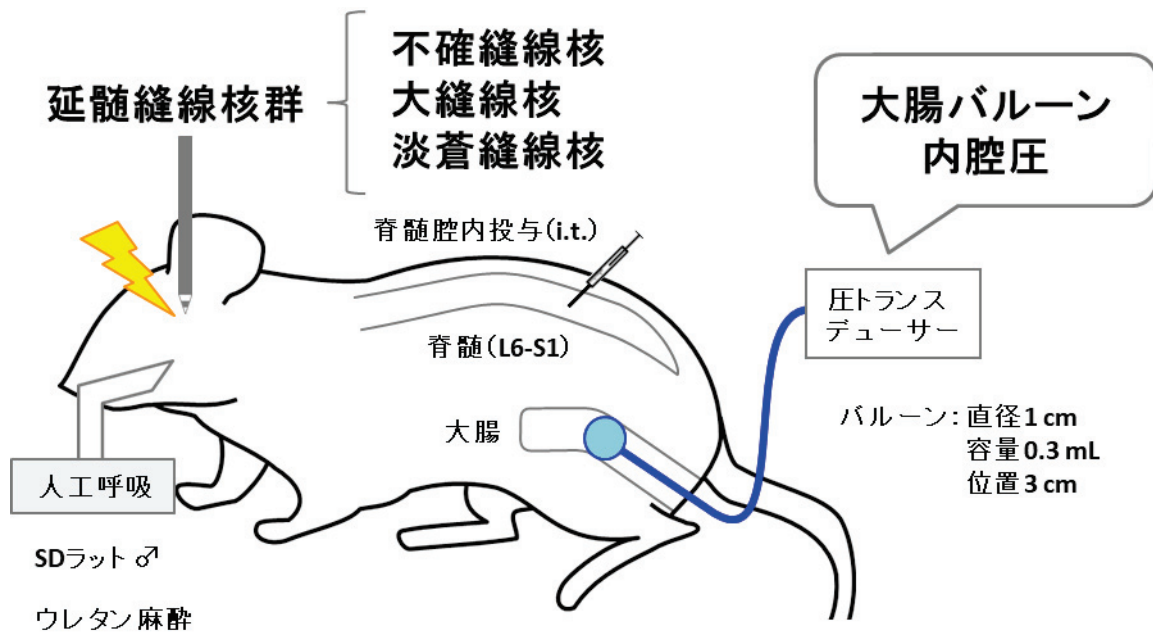


図2 大腸バルーンを使用した電気刺激時の大腸運動測定法の概要

糞塊の影響を排除するために、盲腸を小切開、ガラス・チューブを挿入し、結直腸内の糞塊を生理食塩水で洗い流した。その後、ガラス・チューブを外し、切開部位を縫合、閉腹した。ポリエチレン・チューブに取り付けた大腸バルーンは容量が蒸留水 0.3 mL のときに直径が 1 cm になるように作製した。大腸バルーンは、肛門から挿入し、バルーンの先端が肛門から 3 cm になるように設置、反対側を圧トランスデューサーに接続した。圧トランスデューサーを介して大腸バルーン内腔圧の変動を測定した。ラットを脳定位固定装置に固定後、同芯円電極を延髄縫線核群 (-11.9 mm AP, ±0.0 mm L, +9.4 から+10.8 mm DV) へ定位的に挿入した。延髄縫線核群への刺激条件は、刺激頻度 20 Hz, パルス幅 2 ms, 刺激強度 100 μ A, 刺激時間 2 min とした。

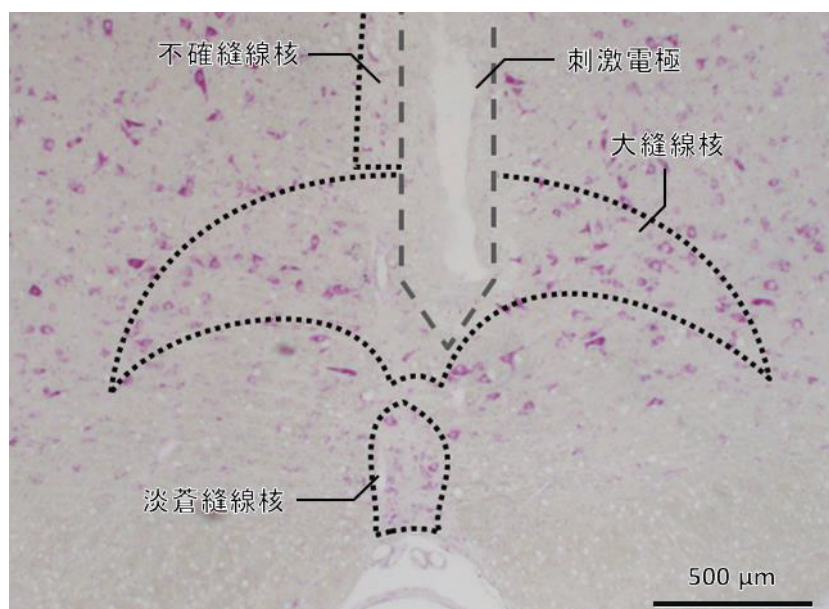


図3 刺激電極部位の確認

大縫線核を刺激した時の脳の組織像を示す。刺激電極の位置を電気凝固法（1 mA, 10 s）により印した。脳幹は10%ホルマリンにより灌流固定し、厚さ10 μmの冠状切片を100 μm間隔で作製し、ニッスル染色により染めた。定位固定アトラスを参考に、電気凝固部位を同定した。灰色の点線は刺激電極の位置を、黒色の点線は縫線核を示している。

第1章

脊髄排便中枢におけるセロトニンの役割

これまでの研究によって、脳から脊髄へ投射するモノアミン神経伝達物質であるドパミンやノルアドレナリンが、脊髄排便中枢に作用し、大腸運動を亢進させることが明らかとなっている(47, 48)。セロトニンも、脳から下行性に放出されるモノアミン類のひとつである。生体のセロトニンは90%以上が消化管に分布しており、末梢におけるセロトニンの消化管運動に対する研究は、盛んに行われている。末梢のセロトニンは、腸管壁に存在する腸クロム親和性細胞もしくは内在神経系から放出される。5-HT受容体の作動薬および拮抗薬、セロトニン前駆物質の投与実験の結果から、セロトニンは5-HT₃受容体と5-HT₄受容体を介して、大腸運動を促進させると考えられている(25, 32, 65, 78, 82)。一方、セロトニン合成酵素のノックアウトや、小胞モノアミン輸送体阻害薬の投与により、腸クロム親和性細胞および内在神経系のセロトニンを枯渇させても、大腸の運動性に影響はみられないことが証明されている(34, 67)。さらに、大腸のセロトニンを枯渇させた状態においても5-HT₃受容体と5-HT₄受容体の拮抗薬を投与することで大腸運動が抑制されたことから(68)、セロトニンの放出は大腸運動において不要であり、内在神経系の5-HT受容体の存在自体が重要なのではないかと、論議がなされている(69, 71)。このように、末梢のセロトニンによる大腸運動の制御については研究が進められているが、中枢におけるセロトニンの大腸運動制御メカニズムについては報告がない。

脊髄のセロトニンは、延髄の縫線核から投射される神経が放出しているといわれている(26, 35, 37)。脊髄腰仙髄部には5-HT受容体が分布していることが明らかとなっており(13)、中枢の5-HT受容体が大腸運動に寄与する可能性は十分にある。その根拠のひとつとして、末梢の5-HT₂受容体は大腸運動に対してあまり関与しないにもかかわらず、その拮抗薬であ

る抗うつ薬の副作用に便秘があることが挙げられる (9, 79)。そこで本章では、脊髄排便中枢を介した大腸運動制御におけるセロトニンの効果を検討した。

結 果

セロトニンの脊髄腔内投与による大腸運動の亢進

全ての個体において、手術終了後から約 30 分で、推送量の増加を伴わない自発性の大腸内腔圧の小さな上昇が記録された (図 4)。陰性対照として生理食塩水を脊髄腔内 (L6-S1 領域) に投与した場合は、大腸の内腔圧および推送量に変化はみられなかった (図 4)。セロトニンを脊髄腔内に 10 nmol 投与しても大腸運動に変化は現れなかったが、100 nmol または 1 μ mol の用量で脊髄腔内投与すると、大腸の収縮頻度と推送量が有意に増加した (図 4, 5)。なお、1 μ mol のセロトニンを脊髄腔内投与した 6 例中、2 例のラットで後肢の痙攣が確認された。

脊髄に投与したヒスタミンの大腸運動に対する効果

脊髄のセロトニンは大腸運動の促進作用をもつことが判明した。ノルアドレナリンやドパミンも同様な大腸運動の促進作用をもつため、この促進作用がモノアミン神経伝達物質による非特異的な反応である可能性がある。このことを検証するために、同じモノアミン類であるヒスタミン (100 nmol) を脊髄に投与したところ、大腸運動に影響はみられなかった (図 6)。

脊髄排便中枢における 5-HT 受容体サブタイプの薬理的検討

セロトニンによる大腸運動の亢進反応が、脊髄排便中枢においてどの受容体サブタイプを介しているのか検討するために、5-HT₂、5-HT₃、5-HT₄ 受容体に選択的な拮抗薬または作動薬を用いた実験を行った。拮抗薬はセロトニンを投与する 5-10 分前に前投与した。セロトニン (1 μ mol, i.t.) による亢進作用は、5-HT₂ 受容体拮抗薬であるシプロヘプタジン (100 nmol, i.t.) または 5-HT₃ 受容体拮抗薬であるドラセトロン (100 nmol, i.t.) の前投与によって、

部分的に阻害された (図 7A, B)。また, これらの拮抗薬を併用することで完全に阻害された (図 7C)。セロトニンの作用時間は, それぞれの拮抗薬単独での前投与でも有意に短縮されたが, 反応開始から 5 分間における大腸内腔圧の曲線下面積は, 2 種類の拮抗薬を併用した時のみ有意に減少した (図 8)。一方, 5-HT₄ 受容体の拮抗薬である GR 113808 (100 nmol, i.t.) には, セロトニン (1 μmol, i.t.) の大腸運動亢進反応に対する抑制作用はなかった (図 7D)。なお, これらの拮抗薬を脊髄腰仙髄部に投与しただけでは, 大腸運動に変化は現れなかった。

次に, 5-HT₂, 5-HT₃, 5-HT₄ 受容体作動薬がセロトニンと同等の反応を引き起こせるのかどうかを検討した。5-HT₂ 受容体作動薬である α-メチルセロトニン (300 nmol) の脊髄腔内投与により, セロトニンの大腸運動促進作用が再現された (図 9A)。同様に, 5-HT₃ 受容体作動薬である m-クロロフェニルビグアニド (300 nmol, i.t.) も亢進反応を引き起こすことができた (図 9B)。一方, 5-HT₄ 受容体作動薬のザコプリド (300 nmol, i.t.) は無効であった (図 9C)。

脊髄排便中枢におけるセロトニンの作用経路の検討

セロトニンの作用に脊髄排便中枢よりも上位の中枢が必要かを検討するために, T8 領域の胸部脊髄を切断した状態で実験を行った。脊髄切断から約 1 時間後に, 脊髄腰仙髄部にセロトニン (1 μmol) を投与した。図 10A で示しているように, 脊髄切断前と同様に, セロトニンは大腸運動を促進した (図 4 参照)。

脊髄から大腸への投射経路を検討するため, 骨盤神経を切断した。骨盤神経を切断した状態でセロトニン (1 μmol) を脊髄内投与した場合は, 大腸運動は亢進しなかった (図 10B)。

セロトニンの作用に内在神経系が関与しているかを調べるために, アセチルコリン受容体阻害薬を静脈内投与した。ニコチン性アセチルコリン受容体阻害薬であるヘキサメトニウム (10 mg/kg を静脈内投与後, 4 mg/kg/h で持続投与) の存在下では, 脊髄にセロトニン

(1 μmol) を投与しても、大腸の収縮頻度に変化は現れなかった (図 11A)。同じように、ムスカリン性アセチルコリン受容体阻害薬であるアトロピン (1 mg/kg を静脈内投与後、6 mg/kg/h で持続投与) により、セロトニン (1 μmol) の大腸運動亢進反応は表出されなくなった (図 11B)。

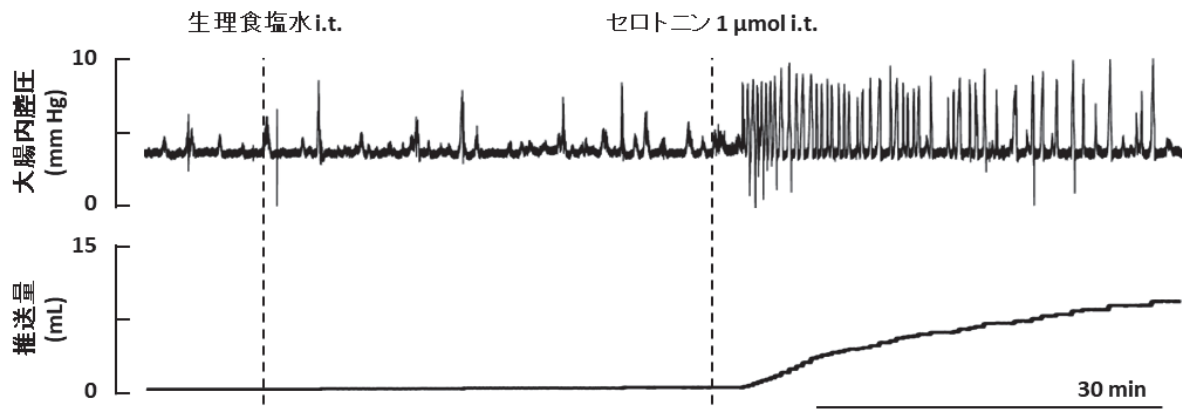


図4 セロトニンの脊髄腔内投与による大腸運動の亢進

大腸の収縮による大腸内腔圧の変化（上段）と推送量の変化（下段）の典型例を示す。脊髄腰仙髄部への生理食塩水およびセロトニンの投与前後のデータを示している。生理食塩水の脊髄腔内投与では大腸運動に影響はみられなかった。一方、セロトニン（1 μmol）を脊髄腔内投与したところ、大腸内腔圧の顕著な変動とそれに伴う推送量の増加がみられた。i.t.は脊髄腔内投与を示す。同様の結果が6匹のラットから再現よく得られた。

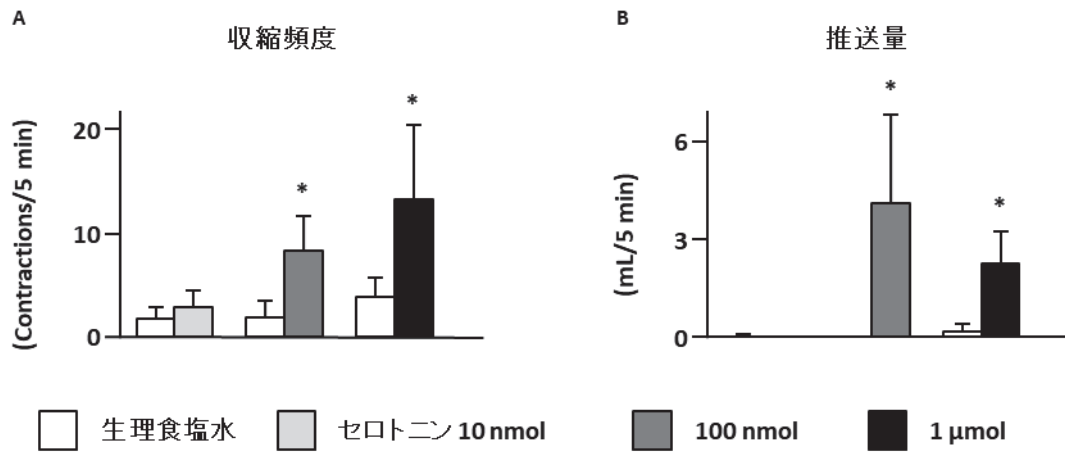


図5 セロトニンの脊髄腔内投与による収縮頻度および推送量の変化

脊髄腔内に投与したセロトニンの大腸運動促進作用を定量的に評価した。(A) 収縮頻度, (B) 推送量を示している。収縮頻度, 推送量ともにセロトニン (100 nmol, 1 μmol) の脊髄腔内投与によって増加した。各データは平均値±標準偏差で表している (n = 4-6)。*は生理食塩水と比較して, 統計的に有意であったことを表す ($P < 0.05$)。

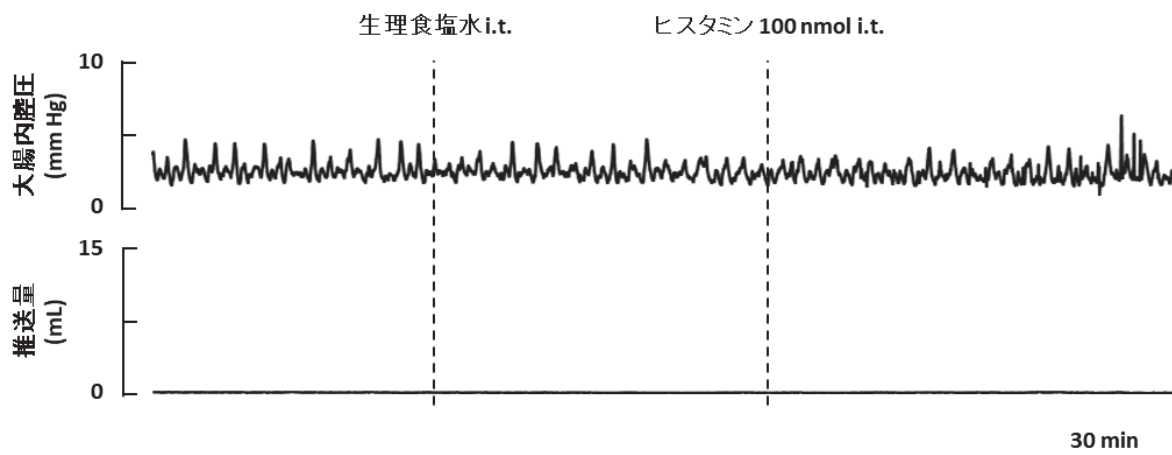


図6 ヒスタミンの脊髄腔内投与による大腸運動への影響

大腸の収縮による大腸内腔圧の変化（上段）と推送量の変化（下段）の典型例を示す。脊髄腰仙髄部への生理食塩水およびヒスタミンの投与前後のデータを示している。生理食塩水またはヒスタミン（100 nmol）の脊髄腔内投与では大腸運動に影響はみられなかった。i.t.は脊髄腔内投与を示す。同様の結果が4匹のラットから再現よく得られた。

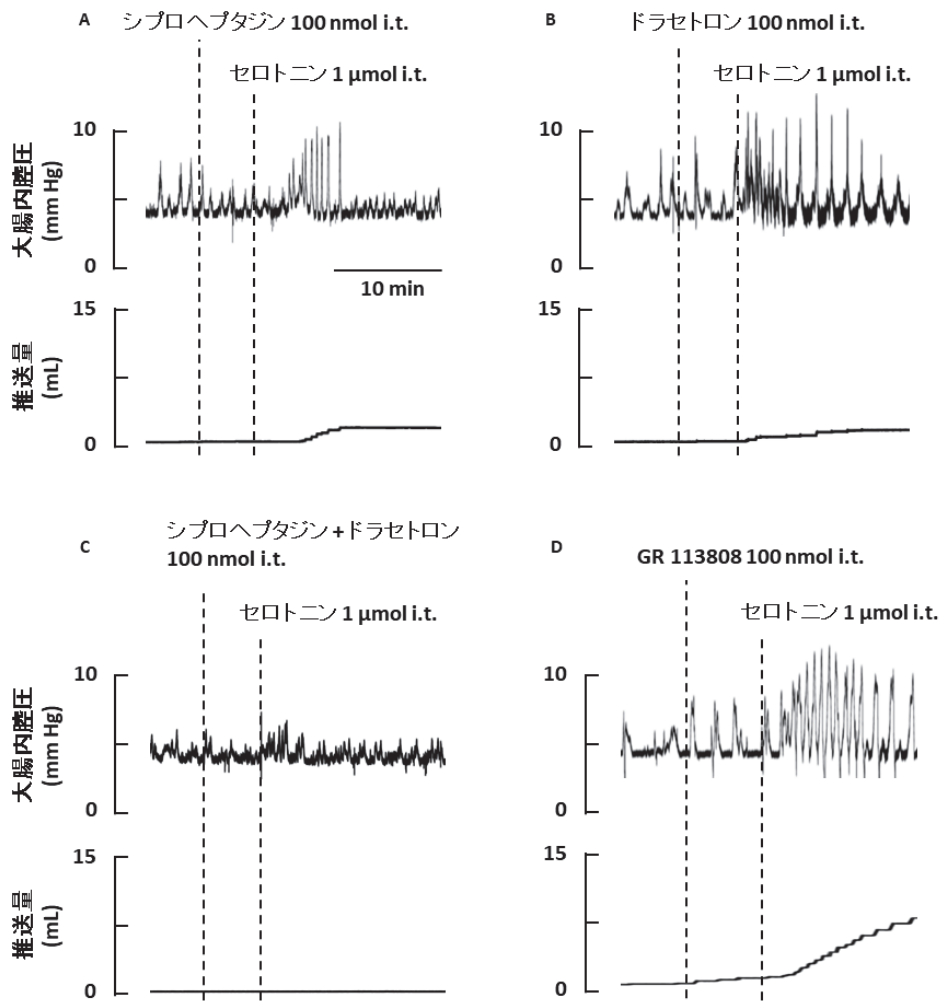


図7 拮抗薬を用いた5-HT受容体ファミリーの薬理的検討

大腸の収縮による大腸内腔圧の変化（上段）と推送量の変化（下段）の典型例を示す。（A）シプロヘプタジン，（B）ドラセトロン，（C）シプロヘプタジンとドラセトロン，（D）GR 113808 投与後に、セロトニンを投与した場合のデータを示している。シプロヘプタジン（100 nmol, i.t.）投与後およびドラセトロン（100 nmol, i.t.）投与後に、セロトニン（1 μmol）を脊髄腔内に投与したところ、大腸運動はわずかに亢進した。一方、シプロヘプタジン（100 nmol, i.t.）とドラセトロン（100 nmol, i.t.）を併用した場合、セロトニン（1 μmol, i.t.）による影響はみられなかった。GR 113808（100 nmol, i.t.）投与後に、セロトニン（1 μmol）を脊髄腔内に投与したところ、大腸運動が亢進した。i.t.は脊髄腔内投与を示す。同様の結果が各群3-6匹のラットから再現よく得られた。

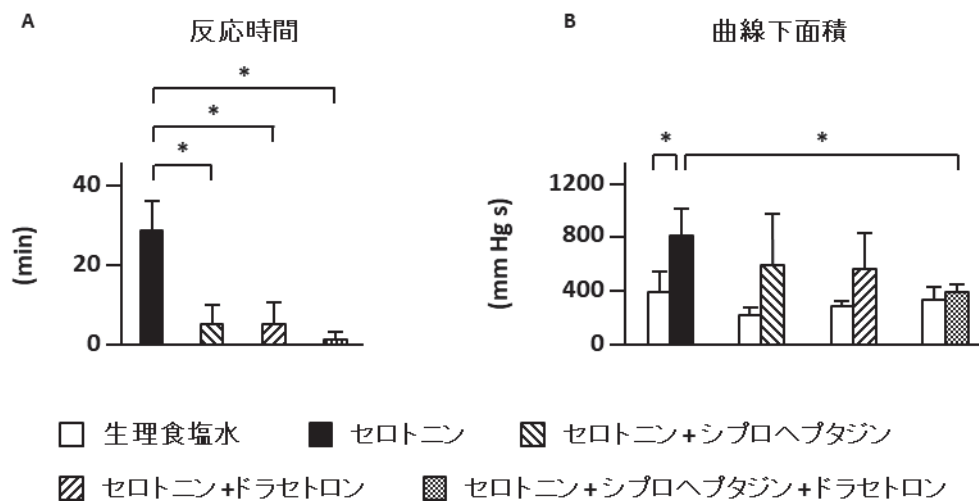


図8 5-HT 受容体拮抗薬による反応時間および曲線下面積の変化

脊髄に前投与した 5-HT 受容体拮抗薬による、セロトニンの大腸運動促進作用への影響を定量的に評価した。(A) 反応時間、(B) 曲線下面積を示している。シプロヘプタジンおよびドラセトロンの単独投与により、反応時間は有意に減少したが、曲線下面積に有意な差は認められなかった。シプロヘプタジンとドラセトロンを併用すると、反応時間、曲線下面積ともに有意に減少した。各データは平均値±標準偏差で表している (n = 3-6)。*は統計的に有意な組み合わせを表す (P < 0.05)。

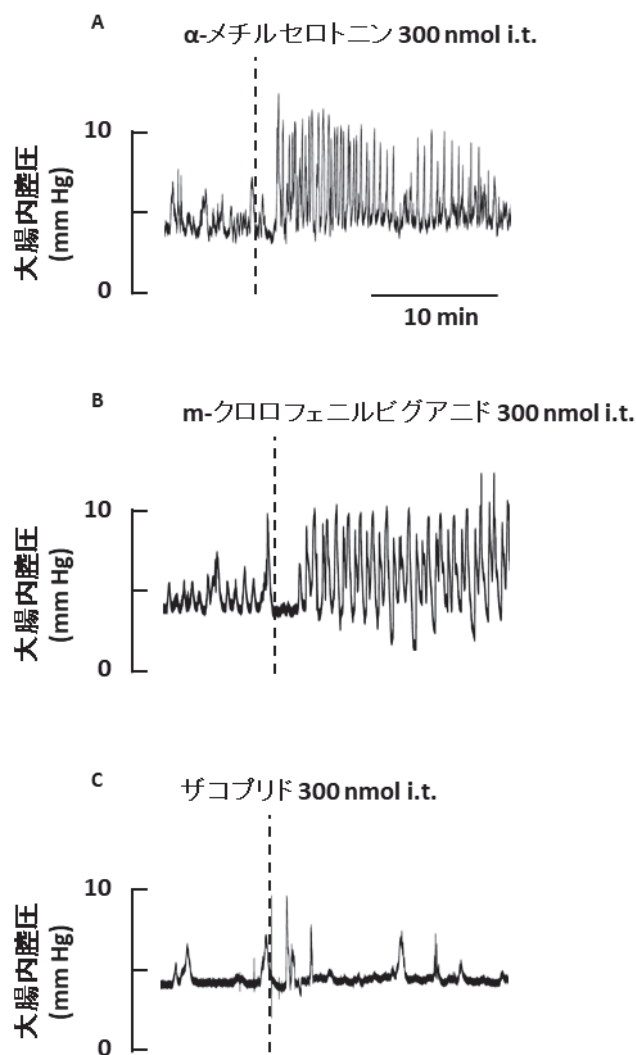


図9 5-HT 受容体サブタイプ選択的作動薬を用いた大腸運動促進作用の検討

大腸の収縮による大腸内腔圧の変化の典型例を示す。(A) α-メチルセロトニン、(B) m-クロロフェニルビグアニド、(C) ザコプリドを投与した場合のデータを示している。脊髄腔内に投与した α-メチルセロトニン (300 nmol, i.t.) および m-クロロフェニルビグアニド (300 nmol, i.t.) によって、大腸運動が亢進した。一方、ザコプリド (300 nmol) の脊髄腔内投与では、大腸への影響はみられなかった。i.t.は脊髄腔内投与を示す。同様の結果が各群 3 匹のラットから再現よく得られた。

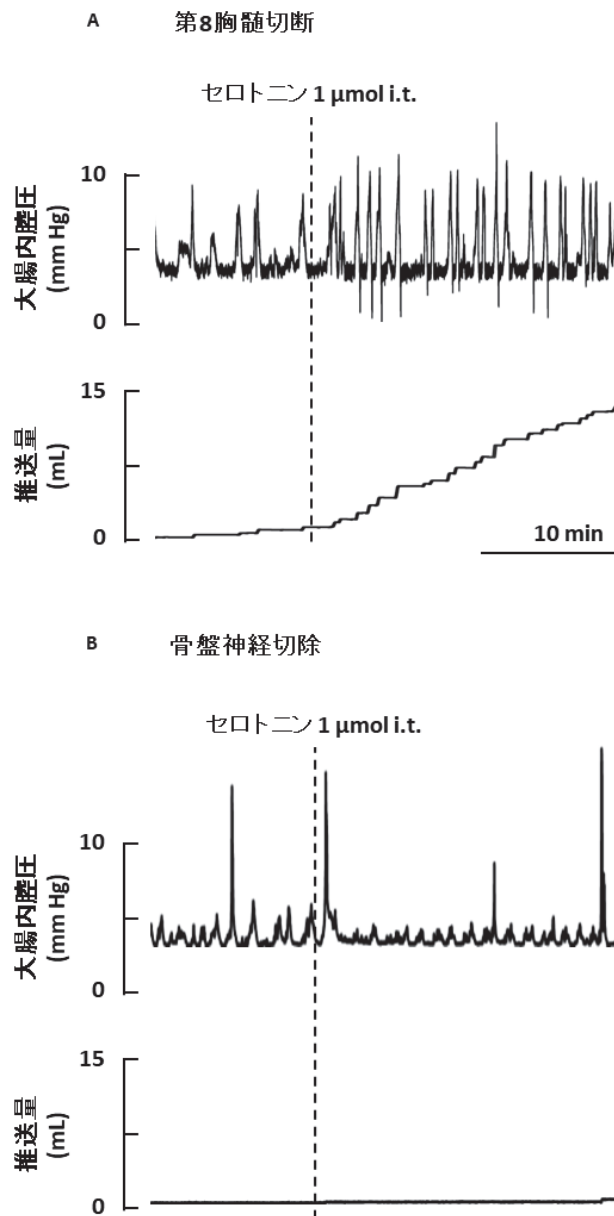


図 10 セロトニンの作用に対する神経経路切断の影響

大腸の収縮による大腸内腔圧の変化（上段）と推進量の変化（下段）の典型例を示す。（A）第 8 胸髄切断下，（B）骨盤神経切除下でセロトニンを投与した場合のデータを示している。第 8 胸髄切断によって脳との連絡を絶った状態でセロトニン（1 μmol , i.t.）を投与したところ，大腸運動が亢進した。骨盤神経を切除した状態では，セロトニン（1 μmol ）を脊髄腔内に投与しても，大腸への影響はみられなかった。i.t.は脊髄腔内投与を示す。同様の結果が各群 3 匹のラットから再現よく得られた。

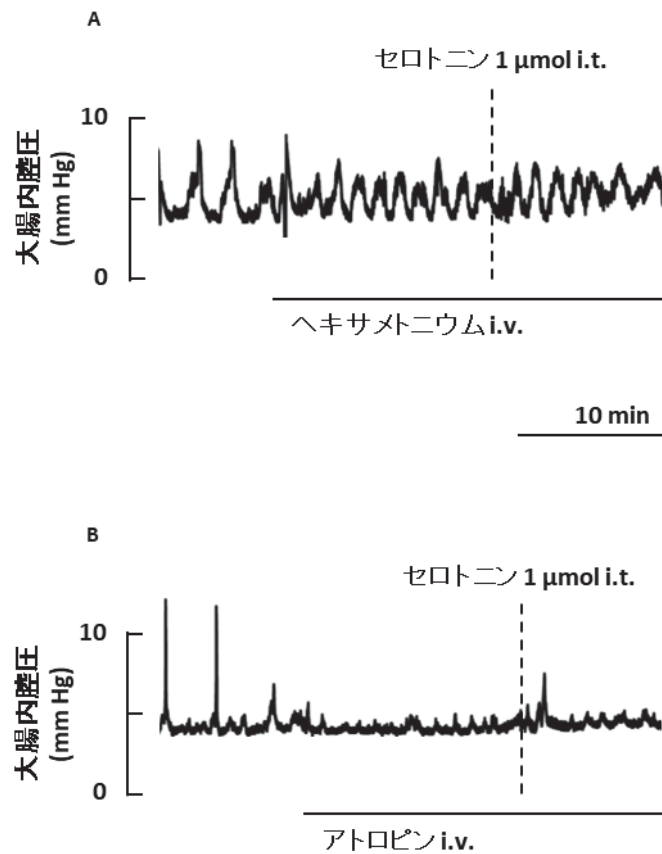


図 11 セロトニンの作用に対するアセチルコリン受容体拮抗薬の影響

大腸の収縮による大腸内腔圧の変化の典型例を示す。(A) ヘキサメトニウム存在下, (B) アトロピン存在下でセロトニンを投与した場合のデータを示している。ヘキサメトニウム (10 mg/kg を静脈内投与後, 4 mg/kg/h で持続投与) およびアトロピン (1 mg/kg を静脈内投与後, 6 mg/kg/h で持続投与) 存在下では, 脊髄腔内投与したセロトニン (1 μmol) による大腸運動への影響はみられなかった。i.t.は脊髄腔内投与を, i.v.は静脈内投与を示す。同様の結果が各群 3 匹のラットから再現よく得られた。

考 察

ノルアドレナリンとドパミンが脊髄排便中枢を活性化させ、大腸運動を亢進させるというこれまでの報告から (47, 48), 下行性のモノアミン経路が、排便を制御しているのではないかと考えた。本章の結果では、下行性に脊髄へ放出されることが知られているセロトニンを腰仙髄部の脊髄腔内に投与すると、大腸運動が亢進することが明らかとなった (図 4, 5)。過去の報告と同じように痙攣が確認されたこと (11), 脊髄腰部のセロトニンは歩行運動に関与することから (27), 脊髄腔内への投与は適切であったといえる。また、ヒスタミンでは大腸運動の亢進作用は認められなかったため (図 6), モノアミンによる非特異的な反応ではないことが確認された。これらの結果から、セロトニンが脊髄排便中枢において大腸運動を制御していることが示された。

薬理的な実験により、セロトニンによる大腸運動の促進作用は、5-HT₂受容体と 5-HT₃受容体により引き起こされることが明らかとなった (図 7-9)。5-HT₂受容体が活性化されると、G タンパク質およびプロテインキナーゼ C を介して 5-HT₃受容体の機能を促進させることが、三叉神経において知られている (20)。この 5-HT₂受容体による 5-HT₃受容体機能の促進作用は、アフリカツメガエル卵母細胞やマウス神経芽細胞腫由来の N1E-115 においても示されていることから (73), 脊髄排便中枢の神経においても 5-HT₂受容体と 5-HT₃受容体の相互作用が存在する可能性がある。このことを支持するように、セロトニンの作用は、5-HT₂受容体もしくは 5-HT₃受容体の拮抗薬により部分的に抑制された (図 7, 8)。一方、選択的な作動薬により 5-HT₂または 5-HT₃受容体のどちらか一方を活性化させることで、セロトニンの最大反応に匹敵する効果が得られたことから (図 9), 最大の亢進反応の惹起には、必ずしも 2 つの受容体の活性化が必要ではなかった。本実験で使用した作動薬に比べて、セロトニンの 5-HT₂および 5-HT₃受容体に対する親和性は、低いわけではないが (3, 19, 31, 44), 脊髄に豊富に存在するセロトニン輸送体の再取り込みにより、セロトニ

ンは不活化される (15, 74)。したがって、選択的作動薬とは異なり、1 μmol のセロトニン濃度では、一方の受容体を完全に活性化させることはできないのだと思われる。脊髄におけるセロトニンは主に拡散伝達という様式で放出されることから (17)、この時の 5-HT 受容体付近におけるセロトニン濃度は、本実験よりも低いと予想される。よって、生理的な状況では 5-HT₂ 受容体と 5-HT₃ 受容体は協力的に働き、大腸運動を制御していると考えられる。

第 8 胸髄切断ラットを使用した実験結果により (図 10A)、脊髄のセロトニンの作用に上位中枢の存在は必要がないことが示された。このことから、セロトニンが脊髄後角の 5-HT 受容体に作用し (13)、上行性のシグナル伝達が脳を活性化させることで大腸運動が亢進するという作用経路は否定された。一方、副交感神経系の骨盤神経を切断することでセロトニンの反応は消失したことから (図 10B)、脊髄腔内に投与したセロトニンは副交感神経節の節前線維を活性化していることが示唆された。大腸に注入された逆行性トレーサーによって、骨盤神経は脊髄腰仙髄部の中間帯外側細胞柱から軸索を伸ばしていることが証明されており (47, 81)、この中間帯外側細胞柱に 5-HT₂ 受容体と 5-HT₃ 受容体は分布している (13)。また、セロトニンは、主に延髄の縫線核から脊髄へシナプス放出もしくは拡散放出される (17, 35)。したがって、骨盤神経は縫線核からのセロトニンによって直接活性化されると考えられる。しかしながら、脊髄排便中枢における骨盤神経へのセロトニンの伝達が、セロトニン感受性の介在神経やグリア細胞によって媒介されている可能性は否定できない (62)。セロトニンの亢進反応は、ヘキサメトニウムやアトロピンの静脈内投与によって阻害された (図 11)。内在神経の節後線維にはニコチン性アセチルコリン受容体が発現しており、ムスカリン性アセチルコリン受容体は平滑筋に発現している。セロトニンの作用はどちらの受容体を遮断しても消失したため、内在神経系を介して間接的に平滑筋を活性化させることで、大腸を収縮させていることが明らかとなった。以上のことから、セロトニンは骨盤神経、内在神経系、平滑筋を順番に活性化させ、大腸運動を亢進させる

ことが明らかとなった。

本章では、セロトニンが脊髄排便中枢を活性化させ、大腸運動を促進することを明らかにした。本章で得られた主な実験結果は、1) セロトニンの大腸運動促進作用は、5-HT₂ または 5-HT₃ 受容体の拮抗薬を、単独で前投与することで部分的に抑制され、併用することで完全に阻害されたこと、2) セロトニンの作用は 5-HT₂ もしくは 5-HT₃ 受容体作動薬により再現されたこと、3) セロトニンの作用は胸部脊髄切断では影響を受けず、骨盤神経の切除により消失したことである。これらの結果は、セロトニンが脊髄排便中枢の 5-HT₂ と 5-HT₃ 受容体に作用し、骨盤神経を介して大腸運動を促進していることを示している。脳から脊髄に投射するモノアミン類であるノルアドレナリンやドパミンに続き、セロトニンも脊髄排便中枢を促進性に調節することが明らかとなった。本章の結果は、これらのモノアミン類の起始核が脊髄排便中枢を介した大腸運動制御に関与することを示唆している。

第2章

脊髄排便中枢のモノアミン類による相互作用の検討

これまでの研究により、脊髄排便中枢におけるノルアドレナリンとドパミンは、骨盤神経を介して大腸運動を亢進させることが明らかとなっている(47, 48)。第1章の結果から、セロトニンも同じように、脊髄排便中枢の5-HT₂受容体と5-HT₃受容体を活性化させ、骨盤神経を介して大腸運動を亢進させることが明らかとなった。5-HT₂受容体はG_{q/11}タンパク質と関連しているGタンパク質共役型受容体であり、セロトニンが結合すると細胞内Ca²⁺を上昇させ細胞を脱分極させる。5-HT₃受容体は非選択的に陽イオンを透過させるイオンチャネル内蔵型受容体であり、生理的条件下におけるチャネルの平衡電位は0 mV近くであるため、セロトニンの結合によりチャネルが開くと細胞は脱分極する。つまり、脊髄排便中枢の5-HT受容体は、機序は異なりながらもセロトニンにより細胞を活性化させる働きがある。ノルアドレナリンの大腸運動亢進作用を媒介するα1アドレナリン受容体は、5-HT₂受容体と同様に、G_{q/11}タンパク質と共役するGタンパク質共役型受容体である。一方、脊髄排便中枢におけるドパミンの作用は、G_{i/o}タンパク質と関連するD2様ドパミン受容体によって発揮され、ドパミンが結合するとアデニル酸シクラーゼを抑制し、細胞を過分極させる。このことから、ドパミンは介在神経を脱抑制することで骨盤神経を間接的に活性化させるように一見思われる。しかし、ドパミン受容体D2サブタイプが骨盤神経の節前線維に発現していること、さらにD2様ドパミン受容体の作動薬によって骨盤神経の節前線維が直接活性化することが明らかになっており(47)、脊髄排便中枢においてドパミンは介在神経を介さずに骨盤神経の節前線維を活性化している可能性が高い。本章では、セロトニンの作用によって、ドパミンの作用が細胞興奮性に転じたのではないかと考え、脊髄排便中枢におけるモノアミン神経伝達物質の相互作用について検討した。また、5-HT₂受容体とα1ア

ドレナリン受容体はどちらも細胞内 Ca^{2+} を上昇させ細胞を活性化させるので、セロトニンとノルアドレナリンの相互作用の有無についても確認した。

結 果

モノアミン同時投与による相互作用の検討

モノアミン類の相互作用を検討するために、単独では無効量となるセロトニン、ノルアドレナリン、ドパミンを同時に投与することで、大腸運動の亢進反応を引き起こされないか試した。それぞれのモノアミン類の用量を減らした結果、セロトニンは 10 nmol、ノルアドレナリンは 0.5 nmol、ドパミンは 5 nmol で無効となった (図 12)。この単独では無効の用量で 3 つのモノアミンを同時に脊髄腔内投与したところ、全ての個体で収縮頻度の増加が認められた (図 13, 14A)。また、7 例中 4 例で推送量が上昇したが、3 例では推送量の上昇はみられなかった (図 14B)。

拮抗薬入れ替えによる相互作用の検討

さらなる相互作用の検討のために、それぞれの拮抗薬の入れ替え実験を行った。5-HT 受容体拮抗薬 (シプロヘプタジン, 100 nmol とドラセトロン, 100 nmol, i.t.) を前投与すると、ノルアドレナリン (5 nmol, i.t.) とドパミン (300 nmol, i.t.) の大腸運動亢進反応は両方とも消失した (図 15)。さらに、セロトニン (1 μ mol, i.t.) の亢進反応は、 α 1 アドレナリン受容体拮抗薬 (プラゾシン, 25 nmol, i.t.) では抑制されなかったが、D2 様ドパミン受容体拮抗薬 (ハロペリドール, 100 nmol, i.t.) により減弱した (図 16)。なお、ノルアドレナリンの受容体拮抗薬 (プラゾシン, 25 nmol, i.t.) を前投与した時のドパミンの反応およびドパミンの受容体拮抗薬 (ハロペリドール, 100 nmol, i.t.) を前投与した時のノルアドレナリンの反応は、どちらの場合でも消失した (図 17)。

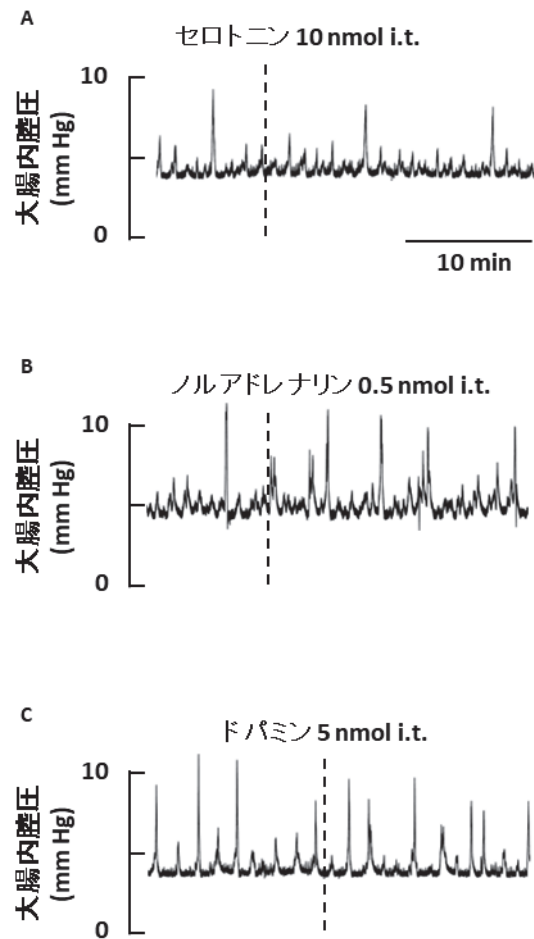


図 12 低用量のモノアミン類の脊髄腔内投与による大腸運動への影響

大腸の収縮による大腸内腔圧の変化の典型例を示す。(A) セロトニン, (B) ノルアドレナリン, (C) ドパミンを低用量で投与した場合のデータを示している。セロトニン (10 nmol), ノルアドレナリン (0.5 nmol) およびドパミン (5 nmol) の脊髄腔内投与では, 大腸への影響はみられなかった。i.t.は脊髄腔内投与を示す。同様の結果が各群 4 匹のラットから再現よく得られた。

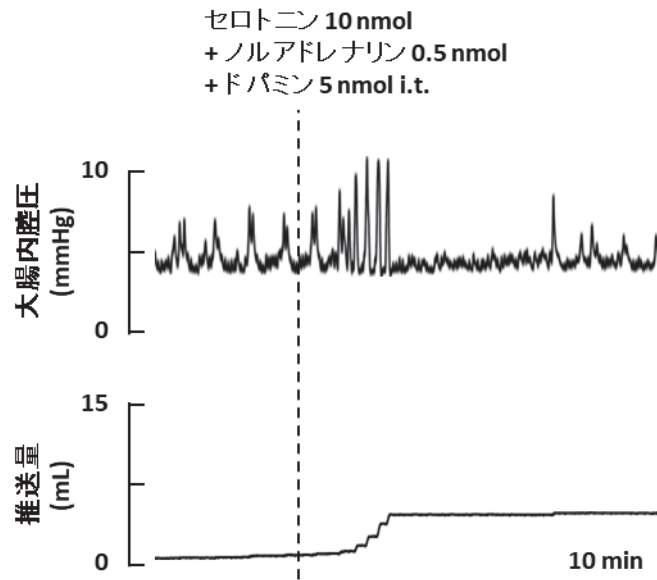


図 13 脊髄腔内への低用量モノアミン類の同時投与による大腸運動の亢進

大腸の収縮による大腸内腔圧の変化（上段）と推送量の変化（下段）の典型例を示す。無効量のセロトニン，ノルアドレナリン，ドパミンを同時に脊髄腔内投与した場合のデータを示している。セロトニン(10 nmol)，ノルアドレナリン(0.5 nmol)およびドパミン(5 nmol)を同時に脊髄腔内投与したところ，大腸内腔圧の顕著な変動とそれに伴う推送量の増加がみられた。i.t.は脊髄腔内投与を示す。7匹中4匹のラットから同様の結果が得られた。

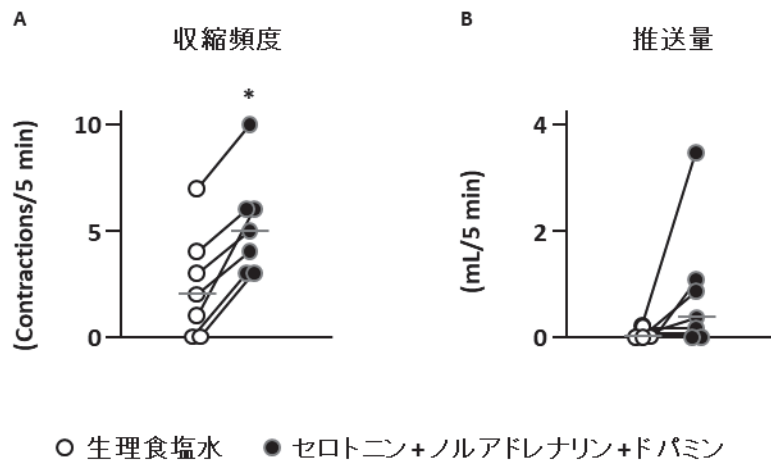


図 14 脊髄腔内への低用量モノアミン類の同時投与による収縮頻度および推送量の変化

脊髄腔内に投与した低用量のモノアミン類の大腸運動促進作用を定量的に評価した。(A) 収縮頻度, (B) 推送量を示している。セロトニン (10 nmol, i.t.), ノルアドレナリン (0.5 nmol, i.t.), ドパミン (5 nmol, i.t.) の同時投与によって, 収縮頻度は全例で増加し, 推送量は 7 匹中 4 例で増加した。各データの平行線は中央値を表している (n = 7)。*は生理食塩水と比較して, 統計的に有意であったことを表す (P < 0.05)。

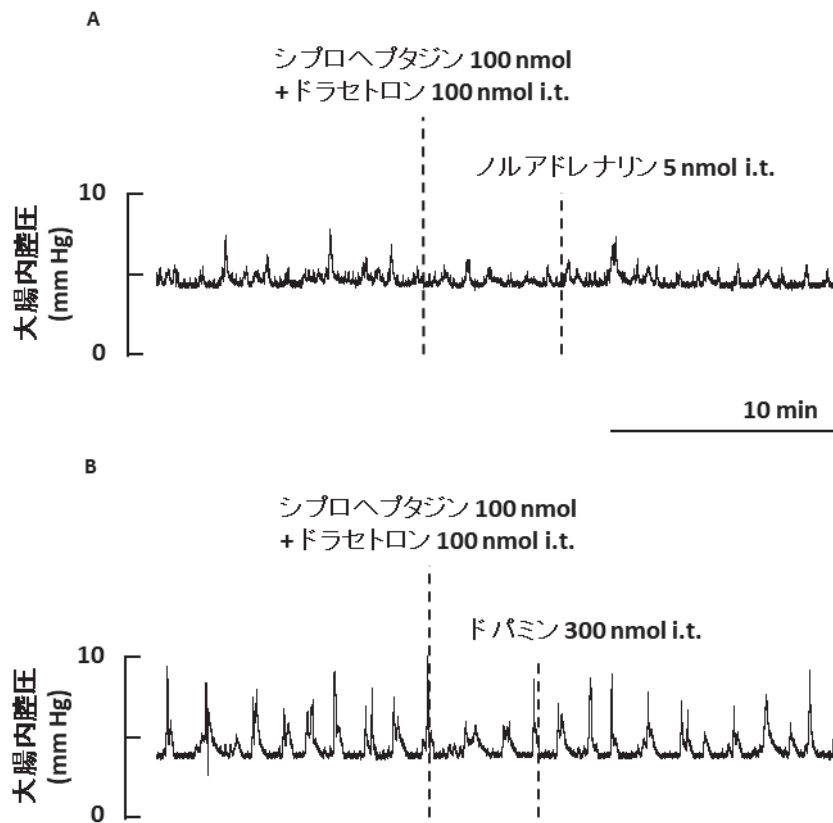


図 15 ノルアドレナリンおよびドパミンの作用に対する 5-HT 受容体拮抗薬の影響

大腸の収縮による大腸内腔圧の変化の典型例を示す。シプロヘプタジンとドラセトロン投与後に、(A) ノルアドレナリン、(B) ドパミンを投与した場合のデータを示している。シプロヘプタジン (100 nmol) とドラセトロン (100 nmol) を脊髄腔内投与したところ、ノルアドレナリン (5 nmol, i.t.) およびドパミン (300 nmol, i.t.) による影響はみられなかった。i.t.は脊髄腔内投与を示す。同様の結果が各群 4 匹のラットから再現よく得られた。

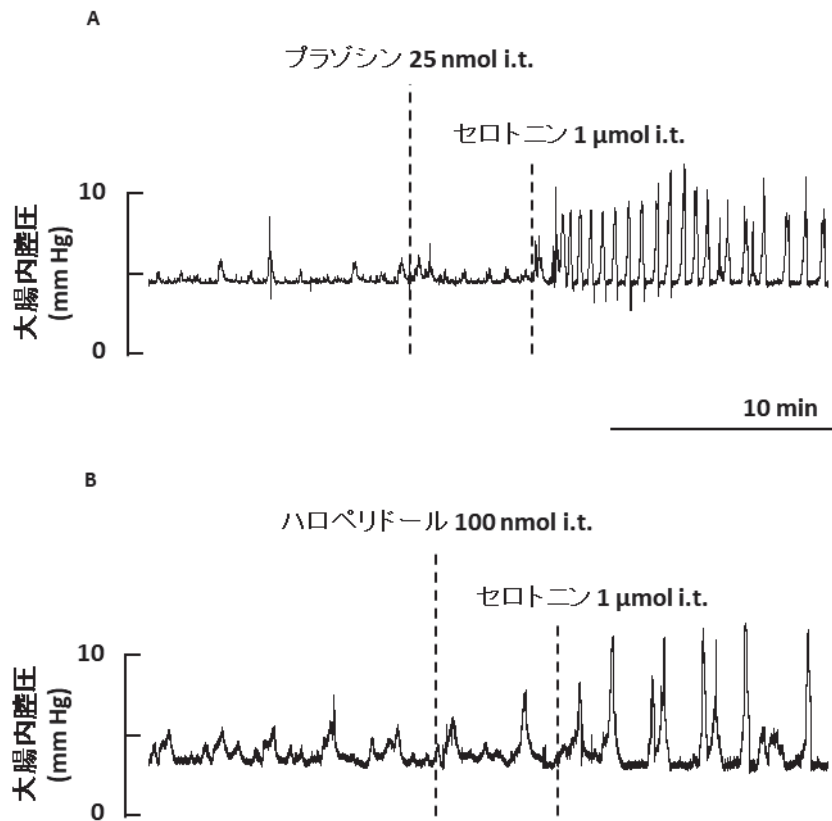


図 16 セロトニンの作用に対する

α_1 アドレナリン受容体拮抗薬および D2 様ドパミン受容体拮抗薬の影響

大腸の収縮による大腸内腔圧の変化の典型例を示す。(A) プラゾシン, (B) ハロペリドール投与後に, セロトニンを投与した場合のデータを示している。プラゾシン (25 nmol, i.t.) 投与後に, セロトニン (1 μmol) を脊髄腔内投与したところ, 大腸運動が亢進した。一方, ハロペリドール (100 nmol, i.t.) を前投与した場合, セロトニン (1 μmol, i.t.) を投与しても, 顕著な亢進反応はみられなかった。i.t.は脊髄腔内投与を示す。同様の結果が各群 4 匹のラットから再現よく得られた。

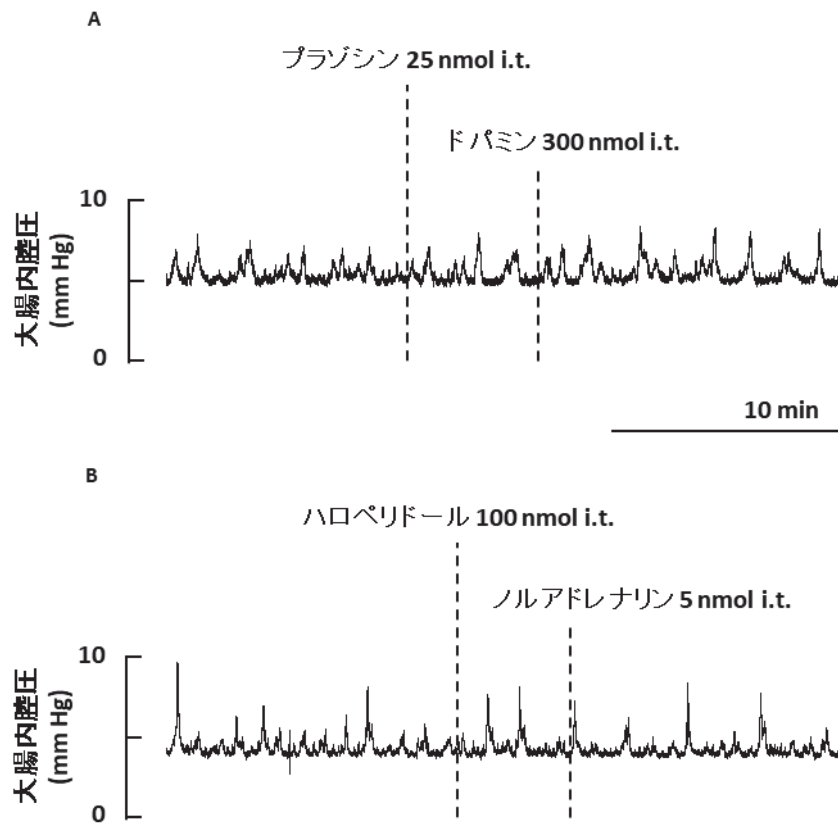


図 17 ノルアドレナリンとドパミンの作用に対する拮抗薬入れ替えの影響

大腸の収縮による大腸内腔圧の変化の典型例を示す。(A) プラゾシン投与後に、ドパミンを投与した場合のデータと (B) ハロペリドール投与後に、ノルアドレナリンを投与した場合のデータを示している。プラゾシン (25 nmol, i.t.) を前投与した場合、ドパミン (300 nmol, i.t.) による影響はみられなかった。同様に、ハロペリドール (100 nmol, i.t.) を前投与した場合、ノルアドレナリン (5 nmol, i.t.) による影響はみられなかった。i.t.は脊髄腔内投与を示す。同様の結果が各群 4 匹のラットから再現よく得られた。

考 察

本章では、脊髄で作用し大腸運動を亢進させる神経伝達物質の脊髄排便中枢における相互作用について検討した。大腸の収縮活動はセロトニン ($1 \mu\text{mol, i.t.}$) の効果によりプラトーに達していると考えられる。この場合、たとえ脊髄排便中枢において相互作用が存在したとしても、その効果を評価する大腸運動の活動性は、頭打ちとなり、変化しない可能性が高い。そこで、相互作用の有無を検出する方法として、単独では無効となる用量のモノアミン類を 3 つ同時に投与する実験と、拮抗薬を入れ替える実験を行った。無効量のモノアミン類を同時に投与すると、大腸運動の亢進反応が引き起こされた (図 13, 14)。7 例中 3 例で推送量の増加がみられなかったが (図 14B)、それぞれのモノアミン伝達物質は単独では無効なことから (図 12)、相互作用が働いたとしてもわずかに骨盤神経が活性化されるだけであり、推送量の増加に至らない場合もあると考えられる。そのような状況にもかかわらず、全例で収縮頻度の増加がみられた (図 14A)。よって、脊髄排便中枢では、作用の度合に違いがあるとしても、相互作用はあると判断できる。拮抗薬を入れ替える実験では、 $\alpha 1$ アドレナリン受容体拮抗薬はセロトニンの反応に影響を及ぼさなかったが、それ以外の組み合わせではそれぞれの亢進反応が抑制された (図 15-17)。それぞれの受容体の活性化が、脊髄排便中枢の活性化に必要なことから、これらの受容体は同じ神経回路に発現して相互作用を発揮している可能性がある。排便には、様々な条件 (大腸における糞便の貯留、覚醒、排便に適した環境など) の成立が必要なため、それぞれの条件で放出される伝達物質があり、それらの相互作用によって大腸運動が亢進すると考えられる。

$G_{i/o}$ タンパク質を介するはずのドパミンの反応は、 $G_{q/11}$ タンパク質の作用を阻害する 5-HT 受容体拮抗薬および $\alpha 1$ アドレナリン受容体拮抗薬により阻害された (図 15B, 17A)。このことから、D2 様ドパミン受容体は相互作用により $G_{q/11}$ タンパク質様の作用を発揮する可能性が示唆された。この可能性を支持するものとして、ドパミン受容体 D2 サブタイプは 5-HT₂

受容体もしくは GHSR1a (growth hormone secretagogue receptor 1a) とヘテロ二量体を形成するという 2 つの報告がある (5, 29)。5-HT₂ 受容体と D2 様ドパミン受容体がヘテロ二量体を形成している場合、5-HT₂ 受容体は D2 様ドパミン受容体の G_{i/o} の作用を減弱させ、D2 様ドパミン受容体は 5-HT₂ 受容体の G_{q/11} の作用を増強させる (5)。これにより、ドパミン受容体 D2 サブタイプ自身に G_{q/11} タンパク質の作用がなくとも、細胞内 Ca²⁺ レベルの上昇に寄与することが可能である。一方、視床下部ではグレリンの機能的受容体である GHSR1a がドパミン受容体 D2 サブタイプとヘテロ二量体を形成し、ホスホリパーゼ C を活性化して Ca²⁺ 動員を引き起こすように修飾させるという報告がある (29)。また、GHSR1a 受容体は骨盤神経の節前線維に発現しており、グレリンが作用すると大腸運動が亢進することも知られているため (14, 18, 66)、脊髄排便中枢においても、ドパミン受容体 D2 サブタイプと GHSR1a がヘテロ二量体を形成し、細胞内の Ca²⁺ レベルを上昇させる G_{q/11} タンパク質のような作用があると考えられる (59)。脊髄排便中枢におけるセロトニン、ノルアドレナリンおよびドパミンの相互作用が、G_{q/11} タンパク質様の機序により発揮されているのかは、さらなる検討が必要である。

5-HT 受容体を阻害した場合はノルアドレナリンとドパミンの反応が消失したにも関わらず、セロトニンの反応は α1 アドレナリン受容体や D2 様ドパミン受容体を遮断しても、完全には反応が消失しなかった (図 15, 16)。このひとつの理由として、セロトニンの作用がイオンチャネル内蔵型受容体である 5-HT₃ 受容体によっても引き起こされることが挙げられる。5-HT₃ 受容体単独の活性化でも大腸運動の亢進反応が起こることは薬理的な検討により証明した (図 9B)。つまり、セロトニンの反応が消失しなかったことは、Ca²⁺ 動員以外の方法でもセロトニンが排便中枢を活性化できることによると考えられる。

セロトニンとノルアドレナリン、ドパミンが相互に脊髄排便中枢に作用していることを考えると、いずれかひとつのモノアミン神経伝達物質が機能不全になった場合、たとえ他のモノアミンが正常であったとしても、排便障害になると思われる。例えば、パーキンソ

ン病の患者で便秘が頻発することにも説明がつく (28, 63)。これは、脳のドパミン作動性神経の変性により、脊髄腰仙髄部に入力されるドパミンのシグナルが減少することで脊髄排便中枢の相互作用が弱まり、排便機能の低下による便秘が引き起こされると考えられる。

本章の結果は、セロトニンがノルアドレナリンやドパミンと相互に脊髄排便中枢を活性化させることを明らかにした。本章で得られた主な実験結果は、1) 単独では無効量のセロトニンとノルアドレナリン、ドパミンを同時に脊髄腔内投与すると、大腸運動の亢進反応が引き起こされること、2) モノアミン類の受容体拮抗薬を入れ替えても、それぞれの脊髄排便中枢への作用を阻害することである。このことから、大腸運動の制御に関与するモノアミン神経伝達物質は相互に作用することが示され、5-HT₂受容体もしくはGHSR1a受容体が、D₂様ドパミン受容体とヘテロ二量体を形成している可能性が示唆された。相互作用についての詳しい機序はいまだ不明ではあるが、本章の結果は、脊髄排便中枢の大腸運動制御メカニズム解明へのきっかけとなると期待される。

第3章

脊髓排便中枢にセロトニンを放出する起始核の検討

第1章の結果から、脊髓のセロトニンは大腸運動の制御に関わることが明らかとなった。脊髓にはセロトニン作動性神経の細胞体はほとんどなく、脊髓に放出されるセロトニンは脳から投射される神経由来といわれている。このことは、セロトニン作動性神経を豊富に含有している縫線核が、大腸運動の制御に関与している可能性を示唆している。脊髓にセロトニンを放出する神経核は、主に延髄縫線核群と呼ばれる大縫線核、不確縫線核、淡蒼縫線核の3つの神経核であり、これらの神経核は副交感神経核に軸索を伸ばしている(35)。大縫線核に至っては、脊髓後根からの拡散伝達によっても、脊髓排便中枢にセロトニンを供給することが可能である(17)。しかしながら、延髄縫線核群が活性化することで、脊髓排便中枢にセロトニンが放出され、大腸運動を亢進させるのかどうかは明らかとなっていない。縫線核が排便に関与するかどうか調べられていない理由として、脳の切断実験により橋に排便を制御している中枢があるといわれており(45, 76)、延髄の排便反射への関与が無視されていることが挙げられる。また、脳を刺激した時の反応のほとんどが抑制性の反応であることが(76)、脳の排便中枢の解明を困難としている。本章では、脊髓排便中枢にセロトニンが関与するという結果をきっかけに、延髄縫線核群に重点を置いた検討を行った。本実験は、脳定位固定装置を使用するため、大腸バルーンを使用して実験を行った。

結 果

バルーン実験系におけるセロトニンの大腸運動亢進作用

本章で使用する実験系においても、大腸運動の亢進反応を評価できるかどうかを確認するために、脊髄にセロトニンを投与した。全ての個体において、手術終了後から約 30 分で、大腸の自発運動が認められ、セロトニン (1 μmol) を脊髄に投与することで、バルーン内腔圧が上昇する大腸運動の亢進反応を確認することができた (図 18)。

延髄縫線核群刺激の大腸運動に対する効果

大腸運動が安定した状態で延髄縫線核群 (大縫線核, 不確縫線核, 淡蒼縫線核) を電気刺激したところ、血圧は上昇したが、大腸運動に変化は認められなかった (図 19)。延髄縫線核群はセロトニン以外にも、 γ -アミノ酪酸 (γ -aminobutyric acid; GABA) やグリシン, アセチルコリン, ソマトスタチンといった様々な神経伝達物質の作動性神経を含んでいるため (7, 41), 抑制性の伝達物質による効果がセロトニンの促進作用をマスクしている可能性がある。そこで、興奮性の反応を表出させるために、GABA_A受容体の拮抗薬を前投与した後に、縫線核の刺激を行った。GABA_A受容体拮抗薬であるビククリン (1 nmol) を脊髄腔内に前投与したところ、延髄縫線核群を電気刺激することで、大腸運動の亢進反応が引き起こされた (図 20)。この反応は、刺激前の 2 分間と比較して、バルーン内圧における大腸の最大収縮力および曲線下面積が、ともに有意に増加した (図 21)。以降からの全ての実験において、刺激前にビククリン (1 nmol, i.t.) を投与することとした。

縫線核の作用に対する脊髄排便中枢のセロトニンの関与

延髄縫線核群による大腸運動の亢進反応に脊髄排便中枢のセロトニンが関わるのかどうかを調べるために、セロトニンに関連する試薬を使用した実験を行った。脊髄排便中枢に

おけるセロトニンの効果は、5-HT₂受容体と5-HT₃受容体に選択的な拮抗薬により阻害されるため、縫線核を刺激する前にこれらの拮抗薬を脊髄に投与した。縫線核を刺激することで引き起こされた亢進反応は、5-HT₂受容体拮抗薬のケタンセリン（100 nmol, i.t.）と5-HT₃受容体拮抗薬のドラセトロン（100 nmol, i.t.）により抑制された（図 22）。バルーン内腔圧における収縮力の最大値や曲線下面積も、拮抗薬投与前の反応に比べ、有意に減少した（図 23）。次に、選択的セロトニン再取込阻害薬によってセロトニン輸送体の機能を阻害することで、放出されたセロトニンの不活化を防ぎ、受容体に作用するセロトニンの量を増加させた条件下で実験を行った。選択的セロトニン再取込阻害薬であるフルオキシセチン（3 nmol）を脊髄腔内に投与すると、縫線核による亢進反応がわずかに増強された（図 24）。解析の結果、投与前と比べて曲線下面積については有意な増加は認められなかったが、収縮力は有意に増加した（図 25）。

延髄縫線核群による大腸運動促進作用における作用経路の検討

延髄縫線核群を刺激した時の反応も、脊髄のセロトニンの作用と同じように、骨盤神経を介しているのか調べた。副交感神経である骨盤神経を切除すると、縫線核刺激による作用は消失した（図 26A）。一方、交感神経の結腸神経を切除しても、縫線核による大腸運動亢進作用は影響を受けなかった（図 26B）。

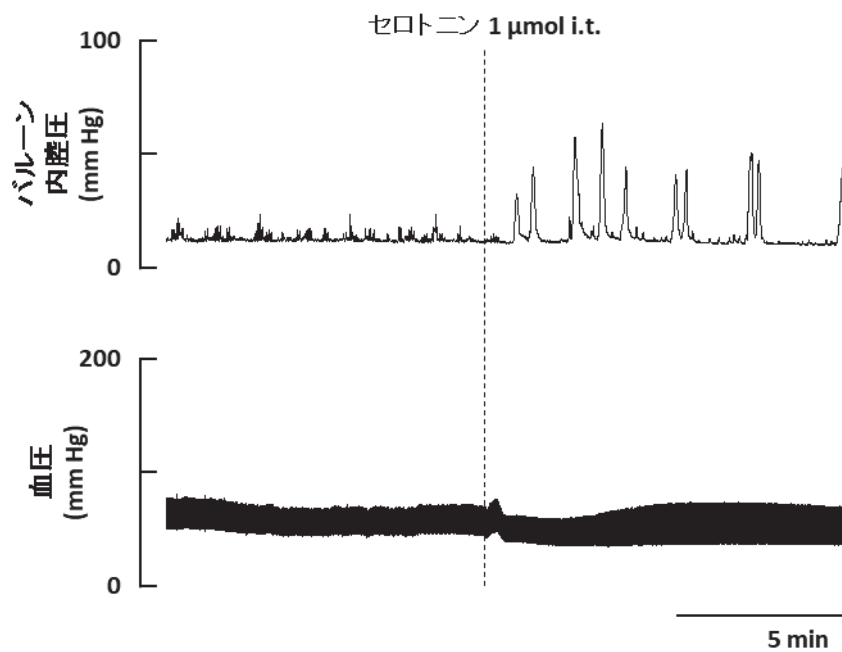


図 18 大腸バルーンの実験系におけるセロトニンの作用

大腸の収縮によるバルーン内腔圧の変化（上段）と血圧（下段）の典型例を示す。脊髓腰仙髄部へセロトニン（1 μmol ）を投与したところ、大腸運動は亢進し、血圧は一過性に低下した。i.t.は脊髓腔内投与を示す。同様の結果が5匹のラットから再現よく得られた。

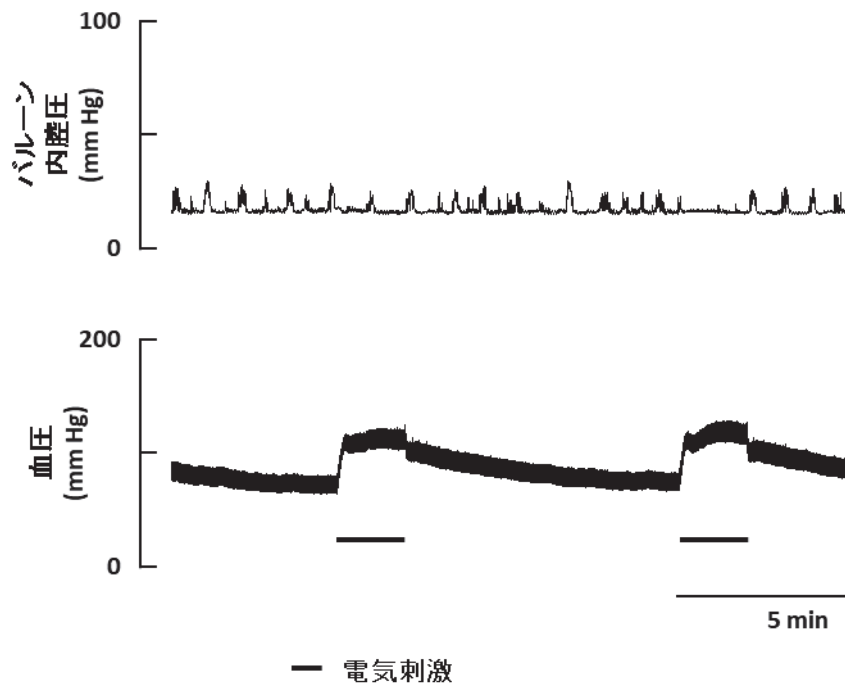


図 19 延髄縫線核群の電気刺激による大腸運動への影響

大腸の収縮によるバルーン内腔圧の変化（上段）と血圧（下段）の典型例を示す。大縫線核を電気刺激したところ、大腸運動の亢進反応はみられなかった。電気刺激の間、血圧は上昇した。平行線は 2 分間の電気刺激を示す。同様の結果が 5 匹のラットから再現よく得られた。

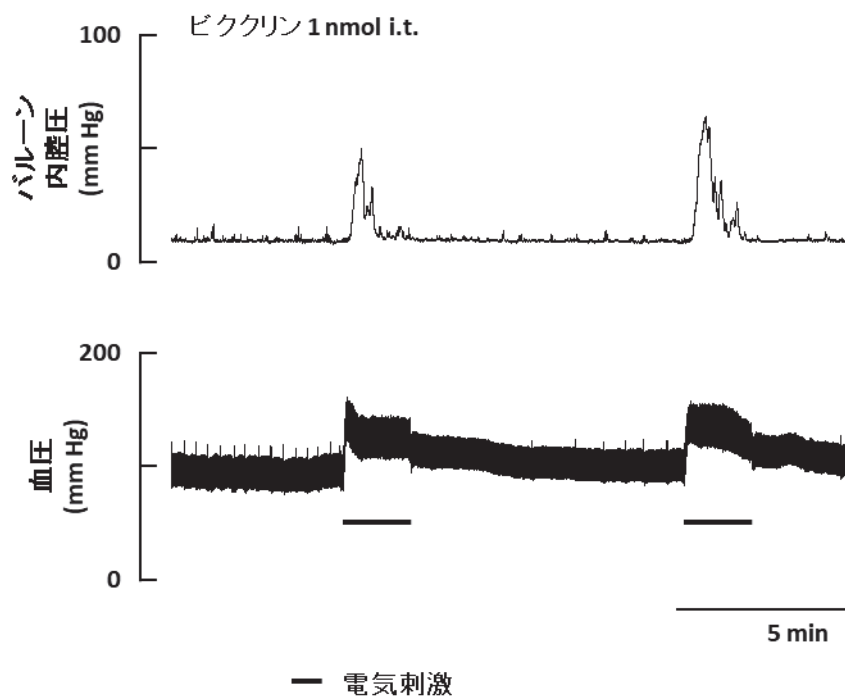


図 20 GABA_A受容体拮抗薬を脊髓腔内投与した時の
延髄縫線核群の電気刺激による大腸運動への影響

大腸の収縮によるバルーン内腔圧の変化（上段）と血圧（下段）の典型例を示す。ビククリン（1 nmol）を脊髓腰仙髄部へ前投与した後に、大縫線核を電気刺激したところ、大腸運動は亢進した。電気刺激の間、血圧は上昇した。平行線は 2 分間の電気刺激を、i.t.は脊髓腔内投与を示す。同様の結果が 10 匹のラットから再現よく得られた。

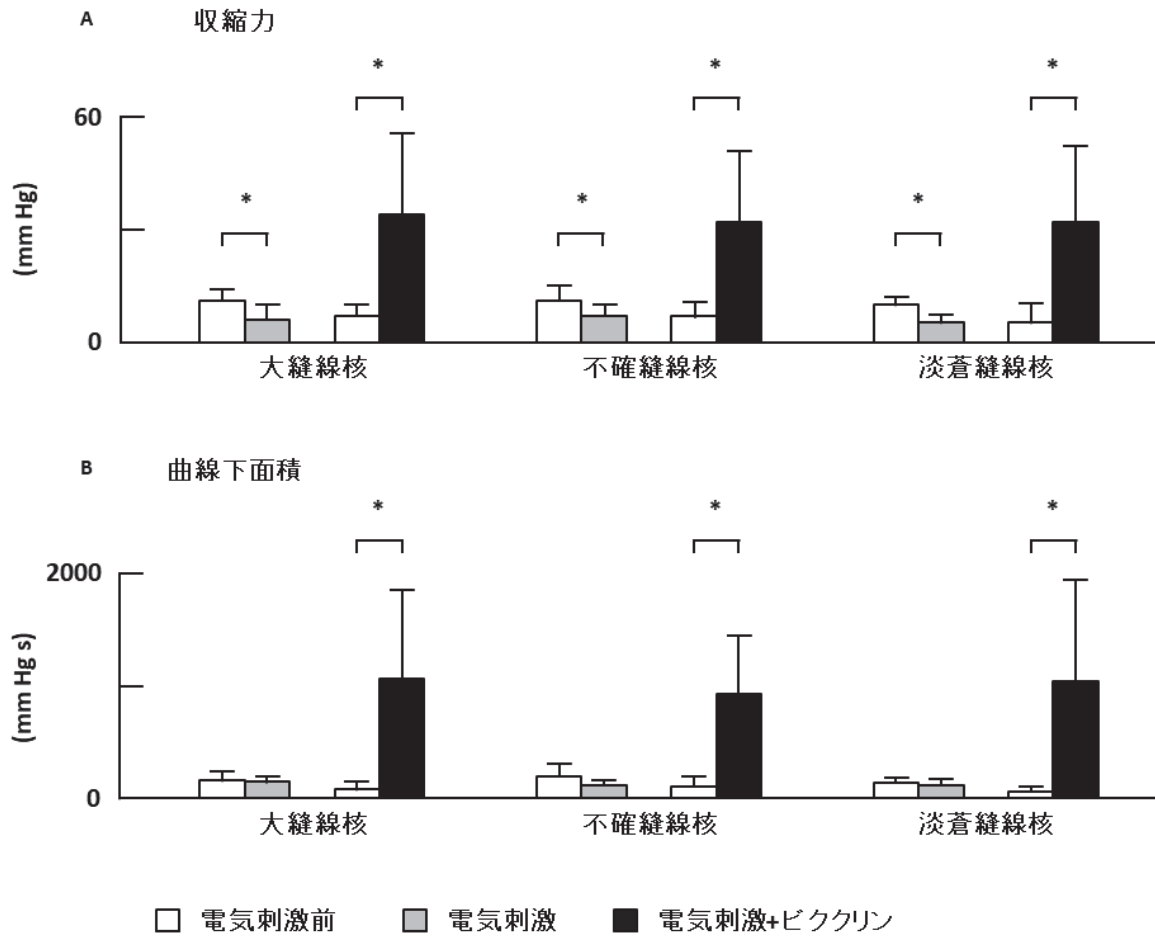


図 21 延髄縫線核群の電気刺激による収縮力および曲線下面積の変化

延髄縫線核群の大腸運動促進作用を定量的に評価した。(A) 収縮力, (B) 曲線下面積を示している。ピククリン非投与時において, 延髄縫線核群の電気刺激により, 収縮力は有意に減少し, 曲線下面積に有意な差は認められなかった。ピククリンを前投与すると, 延髄縫線核群の電気刺激により, 収縮力, 曲線下面積ともに有意に増加した。各データは平均値±標準偏差で表している (n = 5-10)。*は統計的に有意な組み合わせを表す (P < 0.05)。

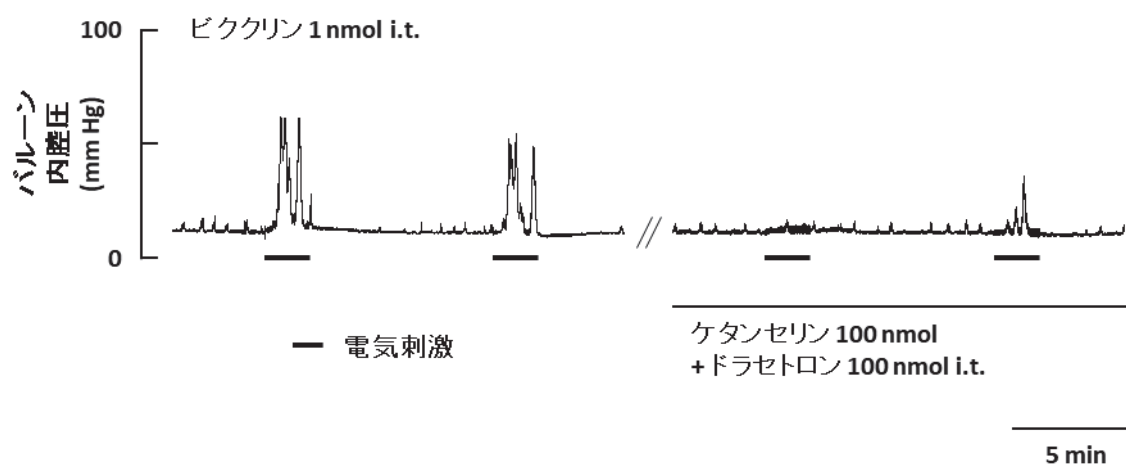


図 22 延髄縫線核群の作用に対する 5-HT 受容体拮抗薬の影響

大腸の収縮によるバルーン内腔圧の変化の典型例を示す。ピククリン (1 nmol) を脊髓腰仙髄部へ前投与した後に、延髄縫線核群を電気刺激したところ、大腸運動は亢進した。その後、ケタンセリン (100 nmol) とドラセトロン (100 nmol) を脊髓腔内に投与したところ、延髄縫線核群の大腸運動亢進反応は抑制された。平行線は 2 分間の電気刺激を、i.t.は脊髓腔内投与を示す。同様の結果が 9 匹のラットから再現よく得られた。

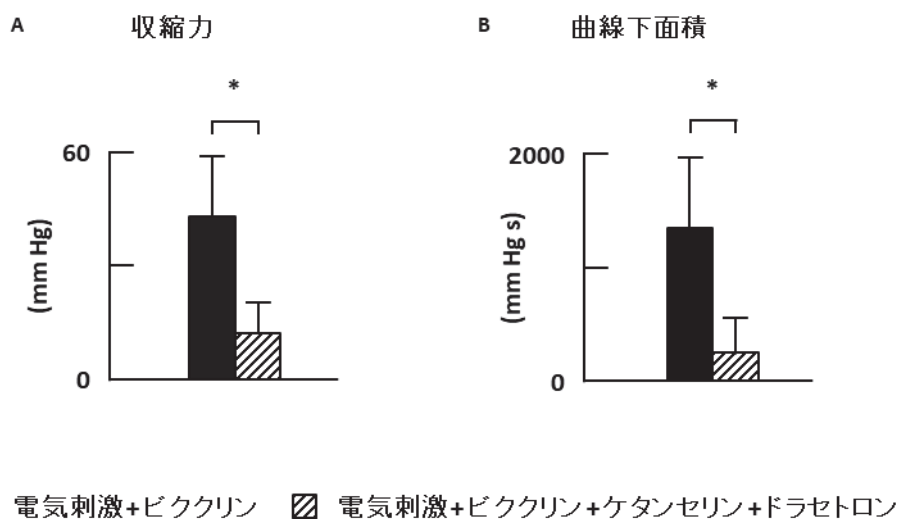


図 23 5-HT 受容体拮抗薬による収縮力および曲線下面積の変化

脊髄に前投与した 5-HT 受容体拮抗薬による、延髄縫線核の大腸運動促進作用への影響を定量的に評価した。(A) 収縮力, (B) 曲線下面積を示している。ケタンセリンとドラセトロン脊髄腔内投与により、収縮力、曲線下面積ともに有意に減少した。各データは平均値±標準偏差で表している (n=9)。*は統計的に有意な組み合わせを表す (P<0.05)。

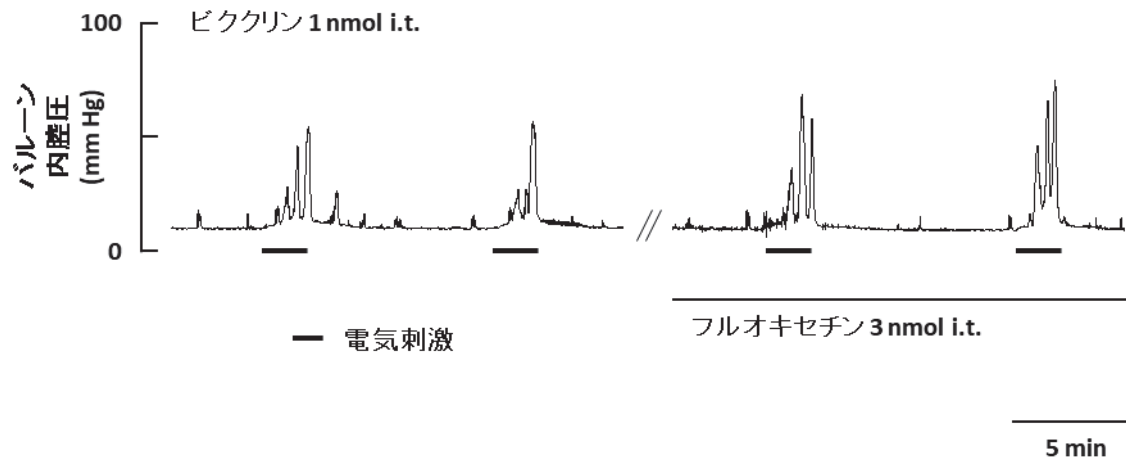


図 24 延髄縫線核群の作用に対する選択的セロトニン再取込阻害薬の影響

大腸の収縮によるバルーン内腔圧の変化の典型例を示す。ビククリン (1 nmol) を脊髓腰仙髄部へ前投与した後に、延髄縫線核群を電気刺激したところ、大腸運動は亢進した。その後、フルオキセチン (3 nmol) を脊髓腔内に投与したところ、延髄縫線核群の大腸運動亢進反応は増強された。平行線は 2 分間の電気刺激を、i.t.は脊髓腔内投与を示す。同様の結果が 6 匹のラットから再現よく得られた。

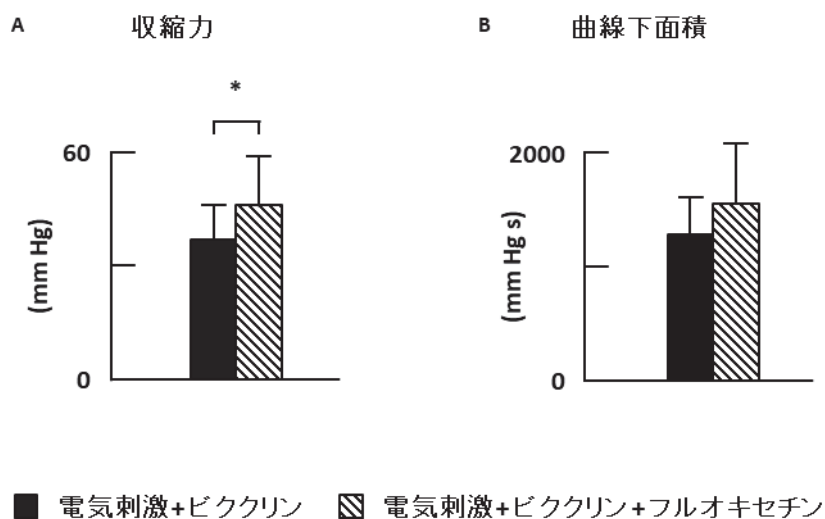


図 25 選択的セロトニン再取込阻害薬による収縮力および曲線下面積の変化

脊髄に前投与した選択的セロトニン再取込阻害薬による，延髄縫線核の大腸運動促進作用への影響を定量的に評価した。(A) 収縮力，(B) 曲線下面積を示している。フルオキセチンの脊髄腔内投与により，収縮力は有意に増加した。曲線下面積に有意な増加はみられなかった。各データは平均値±標準偏差で表している (n=6)。*は統計的に有意な組み合わせを表す ($P < 0.05$)。

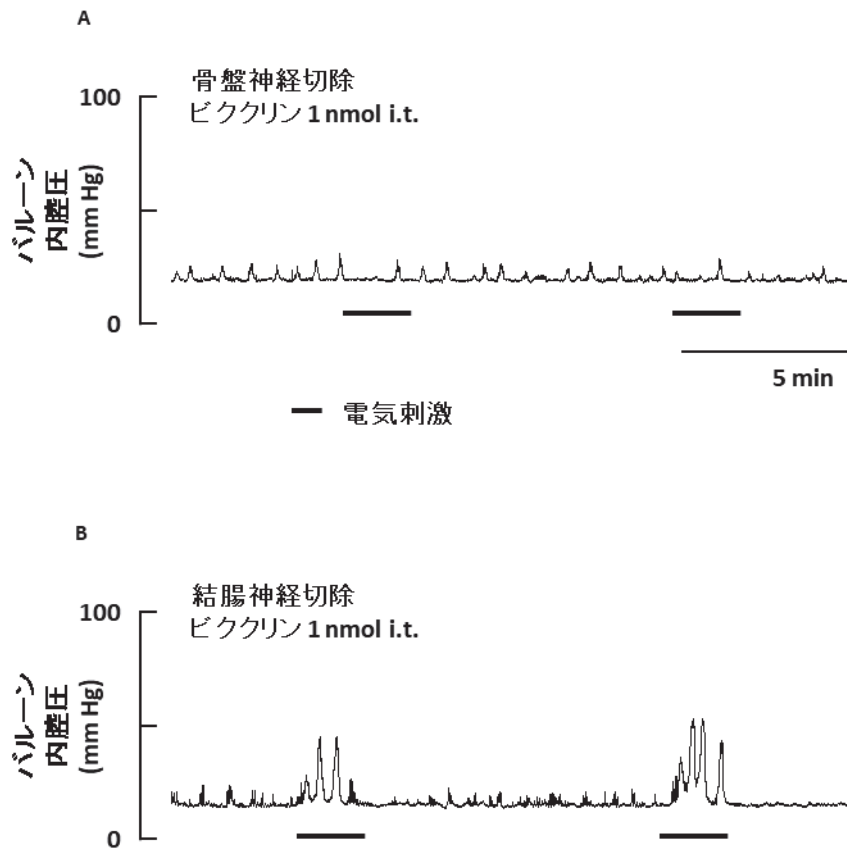


図 26 延髄縫線核群の作用に対する神経経路切除の影響

大腸の収縮によるバルーン内腔圧の変化の典型例を示す。(A) 骨盤神経切除下、(B) 結腸神経切除下で、ビククリン (1 nmol) を脊髄腰仙髄部へ前投与した後に、延髄縫線核群を電気刺激したデータを示している。骨盤神経を切除した状態では、延髄縫線核群を電気刺激しても、大腸への影響はみられなかった。結腸神経を切除した状態では、延髄縫線核群の電気刺激により、大腸運動は亢進した。平行線は 2 分間の電気刺激を、i.t.は脊髄腔内投与を示す。同様の結果が各群 5 匹のラットから再現よく得られた。

考 察

第 1 章の結果から、脊髄にセロトニン作動性神経を投射している延髄縫線核群が大腸運動を制御している可能性が示唆されたため、本章では縫線核刺激による大腸運動の影響を検討した。単に延髄縫線核群を電気刺激しても、大腸運動の亢進反応は現れず、むしろ抑制性の反応が認められた（図 19, 21）。この結果は、過去に脳幹を電気刺激して得られた、ほとんどの脳の部位が抑制の反応を示すという報告と一致しているが（76）、期待した結果とは異なるものであった。電極は延髄縫線核群に挿入されていること（図 3）、過去の報告通り血圧は上昇したことから（2）、刺激部位および刺激条件は適切であると考えられる。そのため、大腸運動の亢進が引き起こらなかった理由として、縫線核から脊髄へ投射している神経のうち、約半数がセロトニン作動性神経でないことが原因と考えられた（26）。すなわち、電気刺激によって意図せず活性化されてしまった非セロトニン作動性神経の脊髄排便中枢を抑制する作用により、セロトニンの効果がマスクされてしまった可能性がある。そこで、抑制性の神経伝達物質である GABA に着目し、脊髄排便中枢における GABA の作用を遮断した状態で延髄縫線核群を電気刺激した結果、大腸運動の亢進反応を得ることができた（図 20, 21）。延髄縫線核群において 80%以上のセロトニン作動性神経が GABA を共存伝達物質としていないため（7）、生理的な条件では、セロトニンと GABA は脊髄排便中枢に対して同時に作用する可能性は低く、セロトニンは GABA の影響を受けずに作用を発揮できるものと考えられる。よって、今回得られた結果から、延髄縫線核群は大腸運動を制御していることが示された。

大縫線核と不確縫線核、淡蒼縫線核からなる延髄縫線核群の電気刺激は大腸運動の亢進反応を引き起こした（図 20, 21）。これら 3 つの縫線核はセロトニン作動性神経を含んであり、なおかつ脊髄に軸索を投射していることが知られている（26, 35）。また、脊髄腰仙髄部に投与した 5-HT 受容体拮抗薬は縫線核の作用を減弱させ、選択的セロトニン再取込阻害

薬は作用を増強させた（図 22-25）。このことから、縫線核への電気刺激による大腸運動の亢進反応は、脊髓排便中枢にセロトニンが作用した結果、引き起こされたことが明らかとなった。これを支持するように、セロトニンが脊髓排便中枢に作用した際に活性化される骨盤神経を切除すると、縫線核の作用は消失した（図 26A）。これまで、切断実験の結果から、上脊髓排便中枢は橋にあるとみなされていた（45, 76）。実際、脊髓腰仙髄部の神経を介して大腸運動を制御しているバリントン核は、橋に存在する神経核である（53）。しかしながら、本章で刺激した縫線核は延髄に存在する。このような矛盾が生じた理由のひとつは、橋の切断により脊髓の排便中枢における相互作用が消失したことではないかと考えられる。脊髓におけるノルアドレナリンおよびドパミンの供給源は、それぞれ青斑核を含めた A₅ から A₇ 領域および A₁₁ 領域といわれており、いずれも橋よりも上位の中枢に存在する（41）。これらの連絡が途絶えたことにより、相互作用が発揮されず、排便反射が消失したと考えられる。もちろん、切断実験で行われた大腸の膨満刺激に対して縫線核が関与しない可能性もあるが、大腸膨満刺激に対して縫線核のセロトニン作動性神経は活性化されることが報告されているため（6）、この可能性は低いと思われる。以上のことから、排便反射は橋だけでなく延髄の縫線核によっても制御されていることが明らかとなった。

5-HT 受容体拮抗薬を前投与した実験では縫線核の作用を有意に抑制したが、完全には遮断しなかった（図 22, 23）。このことから、縫線核から放出される他の伝達物質も、わずかではあるが大腸運動の制御に関与する可能性がある。その候補としては、脊髓に投与すると大腸運動の亢進を引き起こすソマトスタチンが挙げられる（49）。また、GABA_A 受容体を遮断しない状況では亢進反応がみられなかったことから、縫線核から脊髓に放出される GABA は脊髓排便中枢を抑制する作用があると考えられる（図 19, 21）。したがって、延髄縫線核群は、興奮性と抑制性の様々な神経伝達物質によって、脊髓排便中枢を調節していることが示唆された。

本章では、ラットを脳定位固定装置に固定するため、マリオット・ボトルを使用した実

験系ではなく大腸バルーンを用いた実験系で行った。その他の変更点は、固定時に誤嚥を防ぐ唾液の吸引ができないため人工呼吸器を取り付けたこと、亢進反応を顕著に表出させるために大腸運動が抑えられるウレタンによる麻酔を行ったことである。この実験条件においても、セロトニンを脊髄腔内に投与することで、大腸運動の亢進反応が起こることから、大腸運動に対する中枢神経系の影響を十分評価できることが確認できた（図 18）。大腸バルーンによる実験では、大腸が収縮したとしても蠕動運動なのかどうかは判断できないが、第 1 章の結果から、脊髄のセロトニンによって大腸運動が亢進した場合は、蠕動運動であるとみなすことができる（図 4）。そのため、縫線核による脊髄排便中枢のセロトニンを介した大腸への作用も、蠕動運動であるといえる。

本章では、延髄縫線核群の電気刺激により大腸運動が亢進することを明らかにした。本章で得られた主な実験結果は、1) 縫線核の作用は、脊髄に投与した 5-HT 受容体の拮抗薬により抑制され、選択的セロトニン再取込阻害薬の脊髄腔内投与により増強されたこと、2) 縫線核の作用は、結腸神経を切断しても影響を受けず、骨盤神経の切断により消失したことである。これらの結果は、延髄縫線核群が脊髄排便中枢のセロトニン感受性神経を活性化させ、大腸運動を制御していることを示し、上脊髄排便中枢の一端を解明することに寄与することとなった。

第4章

カプサイシンによる大腸運動促進作用へのセロトニンの関与の検討

第1章では、セロトニンが脊髄排便中枢において大腸運動促進作用をもつことを示し、第2章では、セロトニンがノルアドレナリンおよびドパミンと相互に作用することが明らかとなった。このように、セロトニンの作用はノルアドレナリンやドパミンの作用と密接な関係にあるため、同じような機序で働く可能性が高い。脊髄排便中枢のドパミンが内在的に機能する反応のひとつに、カプサイシンの大腸管腔内投与による大腸運動の亢進反応がある(46)。このカプサイシンの反応は、大腸と脊髄排便中枢を繋いでいる骨盤神経の切除、および脊髄排便中枢と脳の連絡路である胸部脊髄の切断により、消失する。さらに、D2様ドパミン受容体拮抗薬を脊髄に前投与すると、カプサイシンの反応は抑制される。ドパミン作動性神経は脊髄にほとんどなく、主に脳から投射されたシナプスから放出されることを考慮すると(41)、カプサイシンの反応には下行性のドパミン作動性神経が関与していると考えられる。第3章では、延髄縫線核群を電気刺激すると、脊髄の5-HT受容体を介して大腸運動の亢進反応が引き起こされることを明らかにした。しかしながら、大腸運動制御に関与する縫線核の神経が、どのような刺激に対して機能するかは不明である。そこで本章では、カプサイシンによる大腸運動の亢進反応に下行性のセロトニン作動性神経が関与しているかどうかを検討した。

結 果

カプサイシンの大腸管腔内投与による大腸運動の亢進

推送を伴わない自発性の大腸内腔圧のわずかな上昇がみられる平衡状態において、陰性対照として生理食塩水を大腸管腔内に投与した場合は、大腸内腔圧および推送量に変化はみられなかった（図 27A）。続いて、100 nmol のカプサイシンを大腸管腔内に投与したところ、大腸内腔圧の変動とそれに伴う推送量の増加という大腸運動の亢進反応がみられた（図 27B）。

カプサイシンによる大腸運動促進作用へのセロトニン作動性下行性経路の関与

カプサイシンによる大腸運動の亢進に、脊髄のセロトニンが関与しているかを検討するために、脊髄腰仙髄部へ 5-HT₂ および 5-HT₃ 受容体の拮抗薬を前投与し反応が抑制されるか検討した。5-HT₂ 受容体拮抗薬のケタンセリン（100 nmol）と 5-HT₃ 受容体拮抗薬のドラセトロン（100 nmol）を脊髄腔内に前投与したところ、大腸管腔内に投与したカプサイシン（100 nmol）の亢進反応はみられなくなった（図 28A）。次に、このカプサイシンの反応には 5-HT₂ と 5-HT₃ の受容体のどちらが関与しているのかを調べるために、それぞれの拮抗薬を単独で前投与した。その結果、どちらの拮抗薬（ケタンセリン, 100 nmol もしくはドラセトロン, 100 nmol i.t.）も単独でカプサイシン（100 nmol, i.L.）の反応を抑制した（図 28B, C）。

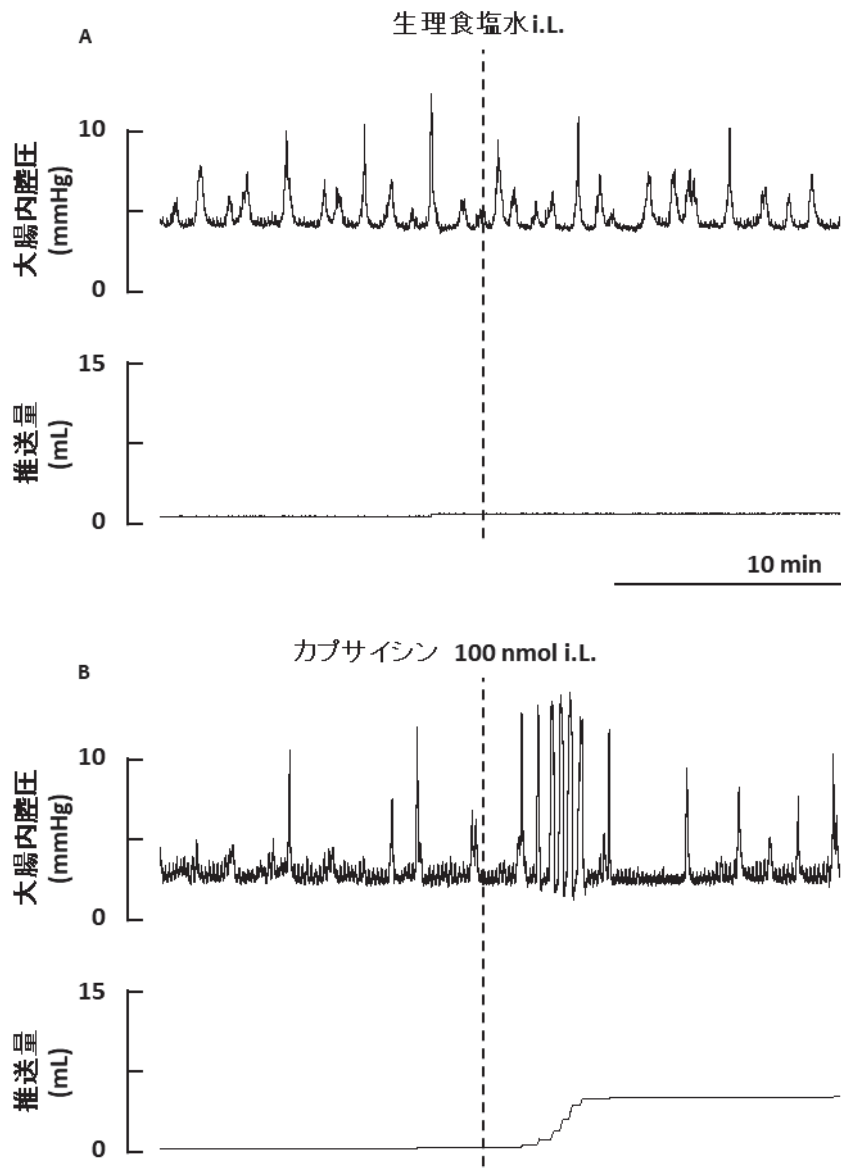


図 27 カプサイシンの大腸管腔内投与による大腸運動の促進作用

大腸の収縮による大腸内腔圧の変化（上段）と推送量の変化（下段）の典型例を示す。大腸管腔内への（A）生理食塩水，（B）カプサイシンを投与した場合のデータを示している。生理食塩水の管腔内投与では大腸運動に影響はみられなかった。一方，カプサイシン（100 nmol）を管腔内に投与したところ，大腸運動が亢進した。i.L.は大腸管腔内投与を示す。同様の結果が各群 5 匹のラットから再現よく得られた。

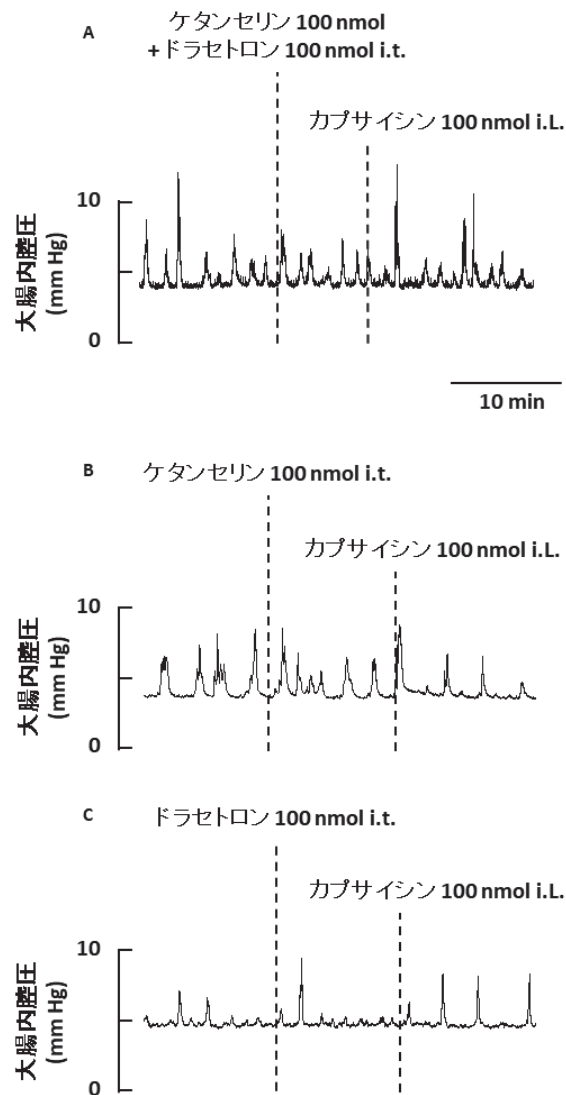


図 28 カプサイシンの作用に対する脊髓排便中枢におけるセロトニンの関与
 大腸の収縮による大腸内腔圧の変化の典型例を示す。(A) ケタンセリンとドラセトロン、
 (B) ケタンセリン、(C) ドラセトロンを脊髓腔内に投与した後に、カプサイシンを大腸
 管腔内に投与した場合のデータを示している。ケタンセリン(100 nmol)とドラセトロン(100
 nmol)を併用して、もしくはケタンセリン(100 nmol)、ドラセトロン(100 nmol)を単独
 で脊髓腔内投与した後、カプサイシン(100 nmol)を大腸管腔内に投与したところ、大腸運
 動に変化はみられなかった。i.t.は脊髓腔内投与、i.L.は大腸管腔内投与を示す。同様の結果
 が各群 5 匹のラットから再現よく得られた。

考 察

第 3 章の結果から、下行性のセロトニン作動性神経が豊富に存在する延髄縫線核群を活性化させると、脊髄にセロトニンが放出され、大腸運動が亢進することが明らかになった。本章では、この下行性神経を活性化させる状態を作出できるかどうか検討した。大腸管腔内に投与したカプサイシンによる大腸運動促進作用は、脳と脊髄を介していることがわかっている (46)。そこで、このカプサイシンの作用とセロトニンの下行路の関連を調べた。脊髄のセロトニンの機能を阻害すると、カプサイシンの作用は認められなくなった (図 28)。脊髄では 5-HT 受容体の存在は確認されているが、セロトニン作動性神経の細胞体はほとんどないといわれており (41)、脊髄に放出されるセロトニンは、主に延髄縫線核群の神経由来であることが知られている (26, 35)。延髄縫線核群は、副交感神経核に軸索を伸ばしており (35)、脊髄排便中枢にセロトニンを作用させることが可能である。これらのことから、カプサイシンによる大腸運動の亢進反応は、セロトニン作動性の下行性経路が駆動することで、脊髄腔内にセロトニンが放出され、脊髄排便中枢を活性化された結果によるものと思われる。大縫線核のセロトニン作動性神経は、大腸の膨満によっても活性化するため (6)、化学的な刺激だけでなく、物理的な刺激によっても働く経路であると推察される。

カプサイシンの反応は脊髄に適用した 5-HT 受容体拮抗薬により認められなくなった (図 28)。この結果だけに注目すると、脊髄ではセロトニンのみが関与しているように思われる。しかしながら、ドパミンの受容体拮抗薬の脊髄腔内投与によっても、カプサイシンの反応は消失することが報告されている (46)。この矛盾についてのひとつの解釈としては、第 2 章で示したセロトニンとノルアドレナリン、ドパミンが脊髄排便中枢において相互作用を有していることが関係していると考えられる。つまり、カプサイシンにより脊髄へ 3 つのモノアミンが放出されるが、それぞれの量は少なく、ドパミンもしくはセロトニンの

受容体が不活化されると相互作用が働くことができないため、亢進反応が引き起こされなかったということである。この場合、 $\alpha 1$ アドレナリン受容体拮抗薬がカプサイシンの作用を遮断しなかったことは (46) , ノルアドレナリンが脊髄に放出されないことが原因ではなく、 $\alpha 1$ アドレナリン受容体拮抗薬が他の拮抗薬に比べてセロトニンの作用を阻害する効果が少なかったことに起因し (図 16A) , 十分に相互作用を阻害できなかった可能性がある。

第 1 章において、脊髄腔内に投与したセロトニンの作用が 5-HT₂ もしくは 5-HT₃ 受容体拮抗薬の前投与により阻害されたことから、脊髄排便中枢における 5-HT₂ と 5-HT₃ の受容体に協同的な作用があるのではないかと示唆された (図 7A, B, 8) 。このことと一致して、カプサイシンの反応も、5-HT₂ 受容体もしくは 5-HT₃ 受容体を遮断するだけで阻害された (図 28B, C) 。一方の 5-HT 受容体拮抗薬により完全に反応が消失したことから、1 μmol のセロトニンを脊髄腔内投与した時と比べ、内因的に働くセロトニンの濃度は低いと考えられる。

本章では、カプサイシンによる大腸運動の亢進作用にセロトニン作動性の下行性経路が関与することを明らかにした。本章で得られた主な実験結果は、5-HT₂ もしくは 5-HT₃ 受容体拮抗薬の単独投与によりカプサイシンの作用を阻害したことである。この結果から、脊髄排便中枢におけるセロトニンが内在的に機能することが示された。

総合考察

本研究は、セロトニンによる中枢性の大腸制御メカニズムについて検討した。第 1 章では、セロトニンが脊髄排便中枢に作用することを見出し、その詳細な作用経路を明らかにした。第 2 章では、脊髄排便中枢におけるモノアミン神経伝達物質に相互作用があることを証明し、脊髄排便中枢の調節メカニズムを明らかにした。第 3 章では、セロトニン作動性の神経核である延髄縫線核群が大腸運動を制御していることを明らかにした。第 4 章では、大腸に投与したカプサイシンによる大腸運動の亢進作用に、セロトニンが関与することを示し、内在的にセロトニンが機能することを明らかにした。本研究によって、脊髄排便中枢で作用する神経伝達物質として、新たにセロトニンが明らかとなり、さらにセロトニン作動性の上脊髄排便中枢が延髄縫線核群であることが示された。このメカニズムが駆動する順序は、1) 大腸で受容された刺激により縫線核が活性化、2) 下行性経路から脊髄腰仙髄部にセロトニンが放出、3) セロトニンが脊髄排便中枢の 5-HT₂ と 5-HT₃ 受容体に作用、4) 骨盤神経を介して大腸運動が亢進、という流れであることが示唆され、大腸内容物を排出する生理的な機能のひとつと考えられる。

延髄縫線核群を刺激し内在的なセロトニンを放出させると、大腸運動は亢進した (図 20, 21)。また、カプサイシンの大腸管腔内投与による大腸運動亢進作用が、5-HT 受容体拮抗薬で消失することから (図 28)、内因性のセロトニンは排便反射に重要な役割を担っていることが明らかとなった。このことを支持するように、5-HT₂ 受容体への拮抗作用をもつ抗精神病薬を服用している統合失調症患者には、便秘が頻発している (9, 79)。脊髄に 5-HT 受容体拮抗薬を投与しても大腸の自発運動に影響を与えなかったことから (図 7)、セロトニンの制御系は排便時に働くと考えられる。

本研究により、延髄縫線核群から脊髄へ放出されるセロトニンが大腸運動に寄与していることが明らかとなった。これまで、脊髄のセロトニンは、痛みの抑制や心拍および血圧

の上昇、排尿反射の抑制に関与していることが報告されている (1, 2, 24, 60)。これらのセロトニンによる制御は、排便時にも機能しているのではないかと考えられる。大腸における侵害受容器は、通常、糞便の貯留によって刺激され、その痛みの情報は脳へ伝えられる。しかしながら、大腸の侵害受容器は筋層よりも内側に存在するため、排便時の筋収縮によっても侵害受容器に圧がかかり、刺激されると思われる。この時、侵害受容器からの入力痛みとして脳へと伝わらないように、セロトニンが排便を制御するとともに、痛みのシグナルを脊髄レベルで抑制しているのではないかと考えられる。また、脊髄のセロトニンは、排便失神の防止にも寄与している可能性がある (16, 51)。排便時は、いきみによる胸腔内圧の上昇が引き金となり、一過性の血圧上昇後の血圧低下（バルサルバ様効果）が起こる。この血圧低下に対して代償性に頻脈となり血圧が維持されるが、この代償性の反応が不十分である時に、失神が起こる。縫線核から放出されるセロトニンによる血圧の上昇は、代償性の反応に寄与し、血圧低下による失神を予防する働きがある可能性がある。また、セロトニンによる排尿活動の抑制は、排便と排尿が同時に起こらないことで腹圧が分散されないようにし、過度ないきみを防ぎ、一過性の血圧上昇を最小限に抑えていると考えられる。高齢者で排便失神が多い理由のひとつは、年齢とともに脊髄に放出されるセロトニンが減少し、脊髄のセロトニンによる制御がうまく働いていないからではないかと予想される (61)。このように、縫線核から脊髄へ放出されるセロトニンが、排便や他の機構も同時に制御していることは、合理的である。

本研究から、脳から脊髄に投射するセロトニン作動性神経が脊髄排便中枢を活性化させ、大腸運動を亢進させることが明らかとなった。大腸運動の異常が起こる IBS では、腹痛を伴うことが知られている (36)。脊髄におけるセロトニンは、痛みを制御する下行性疼痛抑制系の重要な神経伝達物質でもある (1, 41)。また、セロトニン作動性神経を豊富に含む大縫線核は、刺激することで抗侵害受容の効果を得られることから (41, 52)、セロトニンの下行性疼痛抑制経路の起始核であると考えられている。この大縫線核を電気刺激する

と大腸運動が亢進すること（図 20, 21），IBS において大腸運動の異常と同時に腹痛が起こることを考慮すると，下行性疼痛抑制系が痛みの制御だけではなく，脊髓排便中枢にも影響し，大腸運動を制御しているのではないかと仮説を立てた。これを支持するように，侵害物質であるカプサイシンを大腸管腔内に投与すると，下行性のセロトニン神経を介して大腸運動が亢進することが示された（図 27, 28）。さらに，ノルアドレナリンやドパミンも，下行性疼痛抑制系に関与することが知られており（41），脊髓排便中枢に作用し大腸運動を亢進させることが明らかとなっている（47, 48）。一方，ヒスタミンでは大腸運動の亢進作用は認められなかった（図 6）。脊髓のヒスタミンもセロトニンと同じように脳から投射される神経によって放出されるが，脊髓におけるヒスタミンは痛みの抑制よりも痛みの促進に関与している（41, 43, 64）。これらの結果から，下行性経路のうち疼痛の抑制系が脊髓排便中枢において排便を亢進させるといえる。このように本研究から，下行性疼痛抑制系と脊髓排便中枢の連関が示された。しかしながら，この仮説の問題点は，体性感覚への痛み刺激でも排便が起きてしまうことである。実際，そのような状況で排便は誘発されず，矛盾が生じているが，本研究で縫線核が大腸運動に関与していることと，カプサイシンの大腸運動亢進作用にセロトニンが関与することから，さらに発展した仮説が導き出された。すなわち，体性感覚ではなく内臓感覚に対する下行性疼痛抑制系が存在するのではないかと仮説である。大縫線核を含めた吻側延髄腹内側部は下行性疼痛抑制系の起始部であり，セロトニン作動性神経を含んでいる（26, 35, 41）。この部位の神経は，尾部への熱刺激によって活動が上昇する神経を **On-cell**，減少する神経を **Off-cell**，変化しない神経を **Neutral-cell** と分類されるが，セロトニン作動性神経は全て **Neutral-cell** に分類される（38, 58）。つまり，体性の痛みに対してセロトニン作動性神経は反応しないということである。刺激を加える部位によって，**Neutral-cell** も発火するようになることが知られており（30），注目すべきは，大腸への侵害刺激によって **Neutral-cell** であるセロトニン作動性神経が発火することである（6）。このような事実から，セロトニン作動性の下行性疼痛抑制経路は，体

性感覚ではなく内臓感覚に関与するのではないかをいう仮説に至った。この仮説を証明するには、本研究だけでは不十分であるが、さらなる研究により仮説が証明できることを期待している。

IBS といった機能性消化管障害では、末梢および中枢での内臓求心性神経が感作された結果、内臓知覚過敏になることが特徴である (33)。この知覚過敏により、痛みの感受性が増加し、健常では痛みと感ずることのない刺激であっても、痛みと感ずることがある。この知覚過敏は、下行性疼痛抑制系の過活動を引き起こすと予想される。実際に、IBS の患者では、脊髄での抗侵害受容の伝達による痛みの抑制が変化しているという報告がある (8, 23, 57, 83)。さらに、IBS の危険因子である慢性ストレスや炎症により、下行性疼痛抑制経路の起始核である吻側延髄腹内側部 (大縫線核を含む) でのセロトニン合成量が増加するといわれている (21, 22)。知覚過敏の報告とあわせて考えると、セロトニンの合成量増加により脊髄排便中枢で大量のセロトニンが放出されていることとなる。大腸の過剰な蠕動運動は下痢の原因となることから、下行性経路からのセロトニン放出量の増加は、下痢型 IBS の病因になると思われる。反対に、侵害受容の増加による下行性経路の過活動は、セロトニンの枯渇を引き起こす可能性があり、これが便秘型 IBS の原因になりうる。このことを支持するように、選択的セロトニン再取込阻害薬の処置が便秘型 IBS の患者に有効であるといわれている (80)。セロトニンの枯渇に加えて、高濃度のセロトニンにさらされたことによる 5-HT 受容体の発現低下も便秘の原因と考えられる。このことに関連して、下痢と便秘の混合型 IBS は、枯渇や発現低下による脊髄排便中枢の非活動状態とそれが回復した時の過活動状態の繰り返しであると説明がつく。ここで重要なことは、非活動状態でも過活動状態においても、知覚過敏による下行性疼痛抑制経路の過剰な活性化により引き起こされていることである。このように、延髄縫線核群におけるセロトニンの下行性経路の異常に注目すると、様々な IBS の病態が説明可能となる。そのため、中枢のセロトニンによる大腸運動制御について研究することは、IBS の病態解明において重要と考えられる。

延髄縫線核群が排便反射を制御しているという本研究の結果は、便秘型 IBS と過活動膀胱の併発に対して理由付けが可能である (39)。縫線核は排尿反射も制御しており、脊髄の 5-HT 受容体を介して膀胱活動を抑制している (24, 40, 60, 72)。大腸の膨満により脊髄を介して膀胱の収縮は抑制され (抑制性直腸-膀胱反射) (42, 55, 56), それに伴い大腸運動は亢進すること (直腸-直腸反射) から (75, 77), 大腸の膨満で活動する縫線核はこれらの反射を調節していると思われる。したがって、延髄縫線核群の障害は、大腸運動の抑制と膀胱活動の脱抑制を引き起こし、結果として便秘型 IBS と過活動膀胱の併発になると説明できる。以上のことから、IBS や過活動膀胱といったストレス性の疾患に対する、下行性経路のセロトニンに注目した新規医薬品が開発されることが期待される。

結 論

第 1 章では、セロトニンが 5-HT₂ と 5-HT₃ の受容体を介して、骨盤神経を活性化し、大腸運動を促進していることが示された。本章の結果から、延髄縫線核群が大腸運動に関わるのではないかと予想された。

第 2 章では、脊髓排便中枢においてセロトニンとノルアドレナリン、ドパミンが相互に作用することが示された。本章の結果は、5-HT₂ 受容体もしくは GHSR1a 受容体が、D2 様ドパミン受容体とヘテロ二量体を形成している可能性を示唆しており、脊髓排便中枢の大腸運動制御メカニズム解明へのきっかけとなると期待される。

第 3 章では、延髄縫線核群が脊髓排便中枢のセロトニン感受性神経を活性化させ、大腸運動を制御していることが示された。本章の結果は、上脊髓排便中枢による排便調節機構の一端を解明することに寄与することとなった。

第 4 章では、大腸管腔内に投与したカプサイシンによって、セロトニン作動性下行性経路が活性化し、大腸運動が亢進することが示された。本章の結果は、脊髓排便中枢におけるセロトニンが内在的に機能することを示唆している。

本研究により明らかとなったセロトニンの下行性経路による排便制御は、これまで不明であった IBS の排便障害における病態の説明を可能にすると考えられる。また、内臓感覚に特有の下行性疼痛抑制系が存在するのではないかとという仮説を新たに提唱するに至った。このことから、本研究の成果は、大腸運動の制御のみならず、痛みの制御に対する研究にも寄与することが期待される。

謝 辞

本論文の作成にあたり，終始ご懇篤なるご指導とご鞭撻を賜りました，岐阜大学応用生物科学部教授 志水泰武博士，同准教授 椎名貴彦博士に深く感謝を申し上げます。

本論文の草稿をご校閲下さいました，岐阜大学応用生物科学部教授 海野年弘博士，帯広畜産大学原虫病研究センター教授 河津信一郎博士，岩手大学農学部教授 木崎景一郎博士，東京農工大学農学部教授 渡辺元博士に謹んで感謝申し上げます。

本研究の遂行にあたり，ご指導とご協力をいただきました，岐阜大学名誉教授 武脇義博士，同准教授 酒井洋樹博士，兵庫医科大学教授 古江秀昌博士，同学生 山田彬博様，奈良県立医科大学名誉教授 高木都博士，鹿児島大学准教授 内藤清惟博士に深く感謝いたします。

また，研究に際して多大なご協力を下さいました岐阜大学獣医生理学研究室の学生の皆様に心より御礼申し上げます。

文 献

- 1) Bardin, L., Lavarenne, J. and Eschalier, A. (2000). Serotonin receptor subtypes involved in the spinal antinociceptive effect of 5-HT in rats. *Pain*. 86, 11~18.
- 2) Blessing, W. W. and Nalivaiko, E. (2001). Raphe magnus/pallidus neurons regulate tail but not mesenteric arterial blood flow in rats. *Neuroscience*. 105, 923~929.
- 3) Boess, F. G., Sepúlveda, M. I., Lummis, S. C. and Martin, I. L. (1992). 5-HT₃ receptors in NG108-15 neuroblastoma x glioma cells: effect of the novel agonist 1-(m-chlorophenyl)-biguanide. *Neuropharmacology*. 31, 561~564.
- 4) Bornstein, J. C., Costa, M. and Grider, J. R. (2004). Enteric motor and interneuronal circuits controlling motility. *Neurogastroenterol. Motil.* 16, 34~38.
- 5) Borroto-Escuela, D. O., Romero-Fernandez, W., Tarakanov, A. O., Marcellino, D., Ciruela, F., Agnati, L. F. and Fuxe, K. (2010). Dopamine D₂ and 5-hydroxytryptamine 5-HT_{2A} receptors assemble into functionally interacting heteromers. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 401, 605~610.
- 6) Brink, T. S. and Mason, P. (2003). Raphe magnus neurons respond to noxious colorectal distension. *J. Neurophysiol.* 89, 2506~2515.
- 7) Chen, T., Wang, X. L., Qu, J., Wang, W., Zhang, T., Yanagawa, Y., Wu, S. X. and Li, Y. Q. (2013). Neurokinin-1 receptor-expressing neurons that contain serotonin and gamma-aminobutyric acid in the rat rostroventromedial medulla are involved in pain processing. *J. Pain*. 14, 778~792.
- 8) Coffin, B., Bouhassira, D., Sabaté, J. M., Barbe, L. and Jian, R. (2004). Alteration of the spinal modulation of nociceptive processing in patients with irritable bowel syndrome. *Gut*. 53, 1465~1470.

- 9) De Hert, M., Dockx, L., Bernagie, C., Peuskens, B., Sweers, K., Leucht, S., Tack, J., Van de Straete, S., Wampers, M. and Peuskens, J. (2011). Prevalence and severity of antipsychotic related constipation in patients with schizophrenia: a retrospective descriptive study. *BMC Gastroenterol.* 11, 17.
- 10) Enck, P., Aziz, Q., Barbara, G., Farmer, A. D., Fukudo, S., Mayer, E. A., Niesler, B., Quigley, E. M., Rajilić-Stojanović, M., Schemann, M., Schwille-Kiuntke, J., Simren, M., Zipfel, S. and Spiller, R. C. (2016). Irritable bowel syndrome. *Nat. Rev. Dis. Primers.* 2, 16014.
- 11) Espey, M. J. and Downie, J. W. (1995). Serotonergic modulation of cat bladder function before and after spinal transection. *Eur. J. Pharmacol.* 287, 173~177.
- 12) Fields, H. L., Bry, J., Hentall, I. and Zorman, G. (1983). The activity of neurons in the rostral medulla of the rat during withdrawal from noxious heat. *J. Neurosci.* 3, 2545~2552.
- 13) Fonseca, M. I., Ni, Y. G., Dunning, D. D. and Miledi, R. (2001). Distribution of serotonin 2A, 2C and 3 receptor mRNA in spinal cord and medulla oblongata. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 89, 11~19.
- 14) Furness, J. B., Cho, H. J., Hunne, B., Hirayama, H., Callaghan, B. P., Lomax, A. E. and Brock, J. A. (2012). Identification of neurons that express ghrelin receptors in autonomic pathways originating from the spinal cord. *Cell Tissue Res.* 348, 397~405.
- 15) Hains, B. C., Everhart, A. W., Fullwood, S. D. and Hulsebosch, C. E. (2002). Changes in serotonin, serotonin transporter expression and serotonin denervation supersensitivity: involvement in chronic central pain after spinal hemisection in the rat. *Exp. Neurol.* 175, 347~362.
- 16) Hainsworth, R. (2004). Pathophysiology of syncope. *Clin. Auton. Res.* 14, 18~24.
- 17) Hentall, I. D., Pinzon, A. and Noga, B. R. (2006). Spatial and temporal patterns of serotonin release in the rat's lumbar spinal cord following electrical stimulation of the nucleus raphe

- magnus. *Neuroscience*. 142, 893~903.
- 18) Hirayama, H., Shiina, T., Shima, T., Kuramoto, H., Takewaki, T., B. Furness, J. and Shimizu, Y. (2010). Contrasting effects of ghrelin and des-acyl ghrelin on the lumbo-sacral defecation center and regulation of colorectal motility in rats. *Neurogastroenterol. Motil.* 22, 1124~1131.
 - 19) Hosford, P. S., Mifflin, S. W. and Ramage, A. G. (2014). 5-hydroxytryptamine-mediated neurotransmission modulates spontaneous and vagal-evoked glutamate release in the nucleus of the solitary tract effect of uptake blockade. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 349, 288~296.
 - 20) Hu, W. P., Guan, B. C., Ru, L. Q., Chen, J. G. and Li, Z. W. (2004). Potentiation of 5-HT₃ receptor function by the activation of coexistent 5-HT₂ receptors in trigeminal ganglion neurons of rats. *Neuropharmacology*. 47, 833~840.
 - 21) Imbe, H., Murakami, S., Okamoto, K., Iwai-Liao, Y. and Senba, E. (2004). The effects of acute and chronic restraint stress on activation of ERK in the rostral ventromedial medulla and locus coeruleus. *Pain*. 112, 361~371.
 - 22) Imbe, H., Okamoto, K., Okamura, T., Kumabe, S., Nakatsuka, M., Aikawa, F., Iwai-Liao, Y. and Senba, E. (2005). Effects of peripheral inflammation on activation of ERK in the rostral ventromedial medulla. *Brain Res.* 1063, 151~158.
 - 23) Iovino, P., Tremolaterra, F., Consalvo, D., Sabbatini, F., Mazzacca, G. and Ciacci, C. (2006). Perception of electrocutaneous stimuli in irritable bowel syndrome. *Am. J. Gastroenterol.* 101, 596~603.
 - 24) Ito, T., Sakakibara, R., Nakazawa, K., Uchiyama, T., Yamamoto, T., Liu, Z., Shimizu, E. and Hattori, T. (2006). Effects of electrical stimulation of the raphe area on the micturition reflex in cats. *Neuroscience*. 142, 1273~1280.
 - 25) Jin, J. G., Foxx-Orenstein, A. E. and Grider, J. R. (1999). Propulsion in guinea pig colon induced by 5-hydroxytryptamine (HT) via 5-HT₄ and 5-HT₃ receptors. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*

288, 93~97.

- 26) Jones, S. L. and Light, A. R. (1992). Serotonergic medullary raphespinal projection to the lumbar spinal cord in the rat: a retrograde immunohistochemical study. *J. Comp. Neurol.* 322, 599~610.
- 27) Jordan, L. M., Liu, J., Hedlund, P. B., Akay, T. and Pearson, K. G. (2008). Descending command systems for the initiation of locomotion in mammals. *Brain Res. Rev.* 57, 183~191.
- 28) Jost, W. H. (2010). Gastrointestinal dysfunction in Parkinson's Disease. *J. Neurol. Sci.* 289, 69~73.
- 29) Kern, A., Mavrikaki, M., Ullrich, C., Albarran-Zeckler, R., Brantley, A. F. and Smith, R. G. (2015). Hippocampal Dopamine/DRD1 Signaling Dependent on the Ghrelin Receptor. *Cell.* 163, 1176~1190.
- 30) Khasabov, S. G., Malecha, P., Noack, J., Tabakov, J., Okamoto, K., Bereiter, D. A. and Simone, D. A. (2015). Activation of rostral ventromedial medulla neurons by noxious stimulation of cutaneous and deep craniofacial tissues. *J. Neurophysiol.* 113, 14~22.
- 31) Kilpatrick, G. J., Jones, B. J. and Tyers, M. B. (1989). Binding of the 5-HT₃ ligand, [³H]GR65630, to rat area postrema, vagus nerve and the brains of several species. *Eur. J. Pharmacol.* 159, 157~164.
- 32) Kiso, T., Ito, H., Miyata, K., Kamato, T., Naitoh, Y., Iwaoka, K. and Yamaguchi, T. (2001). A novel 5-HT₃ receptor agonist, YM-31636, increases gastrointestinal motility without increasing abdominal pain. *Eur. J. Pharmacol.* 431, 35~41.
- 33) Larauche, M., Mulak, A. and Taché, Y. (2012). Stress and visceral pain: from animal models to clinical therapies. *Exp. Neurol.* 233, 49~67.
- 34) Li, Z., Chalazonitis, A., Huang, Y. Y., Mann, J. J., Margolis, K. G., Yang, Q. M., Kim, D. O., Côté, F., Mallet, J. and Gershon, M. D. (2011). Essential roles of enteric neuronal serotonin in

- gastrointestinal motility and the development/survival of enteric dopaminergic neurons. *J. Neurosci.* 31, 8998~9009.
- 35) Liang, H., Wang, S., Francis, R., Whan, R., Watson, C. and Paxinos, G. (2015). Distribution of raphespinal fibers in the mouse spinal cord. *Mol. Pain.* 11, 42.
- 36) Longstreth, G. F., Thompson, W. G., Chey, W. D., Houghton, L. A., Mearin, F. and Spiller, R. C. (2006). Functional bowel disorders. *Gastroenterology.* 130, 1480~1491.
- 37) Marlier, L., Sandillon, F., Poulat, P., Rajaofetra, N., Geffard, M. and Privat, A. (1991). Serotonergic innervation of the dorsal horn of rat spinal cord: light and electron microscopic immunocytochemical study. *J. Neurocytol.* 20, 310~322.
- 38) Mason, P. (1997). Physiological identification of pontomedullary serotonergic neurons in the rat. *J. Neurophysiol.* 77, 1087~1098.
- 39) Matsuzaki, J., Suzuki, H., Fukushima, Y., Hirata, K., Fukuhara, S., Okada, S. and Hibi, T. (2012). High frequency of overlap between functional dyspepsia and overactive bladder. *Neurogastroenterol. Motil.* 24, 821~827.
- 40) Mbaki, Y. and Ramage, A. G. (2008). Investigation of the role of 5-HT₂ receptor subtypes in the control of the bladder and the urethra in the anaesthetized female rat. *Br. J. Pharmacol.* 155, 343~356.
- 41) Millan, M. J. (2002). Descending control of pain. *Prog. Neurobiol.* 66, 355~474.
- 42) Miyazato, M., Sugaya, K., Nishijima, S., Morozumi, M., Ohyama, C. and Ogawa, Y. (2005). Rectal distention inhibits the spinal micturition reflex via glycinergic or GABAergic mechanisms in rats with spinal cord injury. *Urol. Int.* 74, 160~165.
- 43) Mizoguchi, H., Komatsu, T., Iwata, Y., Watanabe, C., Watanabe, H., Orito, T., Katsuyama, S., Yonezawa, A., Onodera, K., Sakurada, T. and Sakurada, S. (2011). Involvement of glial cells in the nociceptive behaviors induced by a high-dose of histamine administered intrathecally. *Eur. J.*

- Pharmacol. 653, 21~25.
- 44) Murray, K. C., Stephens, M. J., Ballou, E. W., Heckman, C. J. and Bennett, D. J. (2011). Motoneuron excitability and muscle spasms are regulated by 5-HT_{2B} and 5-HT_{2C} receptor activity. *J. Neurophysiol.* 105, 731~748.
- 45) Nagano, M., Ishimizu, Y., Saitoh, S., Okada, H. and Fukuda, H. (2004). The defecation reflex in rats: fundamental properties and the reflex center. *Auton. Neurosci.* 111, 48~56.
- 46) 内藤清惟. (2016). 脊髓排便中枢を介する大腸運動の制御機構に関する研究. 博士論文. 岐阜大学.
- 47) Naitou, K., Nakamori, H., Shiina, T., Ikeda, A., Nozue, Y., Sano, Y., Yokoyama, T., Yamamoto, Y., Yamada, A., Akimoto, N., Furue, H. and Shimizu, Y. (2016). Stimulation of dopamine D₂-like receptors in the lumbosacral defaecation centre causes propulsive colorectal contractions in rats. *J. Physiol.* 594, 4339~4350.
- 48) Naitou, K., Shiina, T., Kato, K., Nakamori, H., Sano, Y. and Shimizu, Y. (2015). Colokinetic effect of noradrenaline in the spinal defecation center: implication for motility disorders. *Sci. Rep.* 5, 12623.
- 49) Naitou, K., Shiina, T., Nakamori, H., Sano, Y., Shimaoka, H. and Shimizu, Y. (2017). Colokinetic effect of somatostatin in the spinal defecation center in rats. *J. Physiol. Sci.* in press, doi: 10.1007/s12576-017-0524-1.
- 50) Naitou, K., Shiina, T., Sugita, R., Nakamori, H. and Shimizu, Y. (2015). Characterization of ghrelin-sensitive neurons in the lumbosacral defecation center in rats. *Neurogastroenterol. Motil.* 27, 147~155.
- 51) Pathy, M. S. (1978). Defaecation syncope. *Age Ageing.* 7, 233~236.
- 52) Paul, D. and Phillips, A. G. (1986). Selective effects of pirenperone on analgesia produced by morphine or electrical stimulation at sites in the nucleus raphe magnus and periaqueductal gray.

- Psychopharmacology (Berl.). 88, 172~176.
- 53) Pavcovich, L. A., Yang, M., Miselis, R. R. and Valentino, R. J. (1998). Novel role for the pontine micturition center, Barrington's nucleus: evidence for coordination of colonic and forebrain activity. *Brain Res.* 784, 355~361.
- 54) Paxinos, G. and Watson, C. (2007). *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. 6th ed. Academic Press, San diego.
- 55) Persyn, S., De Wachter, S., Wyndaele, M., Birder, L. and Wyndaele, J. J. (2014). Mechanisms of pelvic organ cross-talk: impact of urethral ligation on the inhibitory rectovesical reflex. *J. Urol.* 192, 1574~1579.
- 56) Pezzone, M. A., Liang, R. and Fraser, M. O. (2005). A model of neural cross-talk and irritation in the pelvis: implications for the overlap of chronic pelvic pain disorders. *Gastroenterology.* 128, 1953~1964.
- 57) Piché, M., Bouin, M., Arsenault, M., Poitras, P. and Rainville, P. (2011). Decreased pain inhibition in irritable bowel syndrome depends on altered descending modulation and higher-order brain processes. *Neuroscience.* 195, 166~175.
- 58) Potrebic, S. B., Fields, H. L. and Mason, P. (1994). Serotonin immunoreactivity is contained in one physiological cell class in the rat rostral ventromedial medulla. *J. Neurosci.* 14, 1655~1665.
- 59) Pustovit, R. V., Callaghan, B., Ringuet, M. T., Kerr, N. F., Hunne, B., Smyth, I. M., Pietra, C. and Furness, J. B. (2017). Evidence that central pathways that mediate defecation utilize ghrelin receptors but do not require endogenous ghrelin. *Physiol. Rep.* 5, e13385.
- 60) Ramage, A. G. (2006). The role of central 5-hydroxytryptamine (5-HT, serotonin) receptors in the control of micturition. *Br. J. Pharmacol.* 147, S120~S131.
- 61) Ranson, R. N., Dodds, A. L., Smith, M. J., Santer, R. M. and Watson, A. H. (2003). Age-associated changes in the monoaminergic innervation of rat lumbosacral spinal cord. *Brain*

Res. 972, 149~158.

- 62) Ranson, R. N., Santer, R. M. and Watson, A. H. (2006). The relationship between serotonin, dopamine beta hydroxylase and GABA immunoreactive inputs and spinal preganglionic neurones projecting to the major pelvic ganglion of Wistar rats. *Neuroscience*. 141, 1935~1949.
- 63) Sakakibara, R., Kishi, M., Ogawa, E., Tateno, F., Uchiyama, T., Yamamoto, T. and Yamanishi, T. (2011). Bladder, bowel, and sexual dysfunction in Parkinson's disease. *Parkinsons Dis*. 2011, 924605.
- 64) Sakurada, S., Orito, T., Sakurada, C., Sato, T., Hayashi, T., Mobarakeh, J. I., Yanai, K., Onodera, K., Watanabe, T. and Sakurada, T. (2002). Possible involvement of tachykinin NK(1) and NMDA receptors in histamine-induced hyperalgesia in mice. *Eur. J. Pharmacol.* 434, 29~34.
- 65) Shimatani, H., Kojima, Y., Kadowaki, M., Nakagawa, T., Fujii, H., Nakajima, Y. and Takaki, M. (2003). A 5-HT₄ agonist mosapride enhances rectorectal and rectoanal reflexes in guinea pigs. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 285, G389~G395.
- 66) Shimizu, Y., Chang, E. C., Shafton, A. D., Ferens, D. M., Sanger, G. J., Witherington, J. and Furness, J. B. (2006). Evidence that stimulation of ghrelin receptors in the spinal cord initiates propulsive activity in the colon of the rat. *J. Physiol.* 576, 329~338.
- 67) Sia, T. C., Flack, N., Robinson, L., Kyloh, M., Nicholas, S. J., Brookes, S. J., Wattoo, D. A., Dinning, P., Oliver, J. and Spencer, N. J. (2013). Is serotonin in enteric nerves required for distension-evoked peristalsis and propulsion of content in guinea-pig distal colon? *Neuroscience*. 240, 325~335.
- 68) Sia, T. C., Whiting, M., Kyloh, M., Nicholas, S. J., Oliver, J., Brookes, S. J., Dinning, P. G., Wattoo, D. A. and Spencer, N. J. (2013). 5-HT₃ and 5-HT₄ antagonists inhibit peristaltic contractions in guinea-pig distal colon by mechanisms independent of endogenous 5-HT. *Front.*

- Neurosci. 7, 136.
- 69) Smith, T. K. and Gershon, M. D. (2015). CrossTalk proposal: 5-HT is necessary for peristalsis. *J. Physiol.* 593, 3225~3227.
- 70) Smith, T. K. and Koh, S. D. (2017). A model of the enteric neural circuitry underlying the generation of rhythmic motor patterns in the colon: the role of serotonin. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 312, G1~G14.
- 71) Spencer, N. J., Sia, T. C., Brookes, S. J., Costa, M. and Keating, D. J. (2015). Rebuttal from Nick J. Spencer, Tiong Cheng Sia, Simon J Brookes, Marcello Costa and Damien J. Keating. *J. Physiol.* 593, 3235.
- 72) Sugaya, K., Ogawa, Y., Hatano, T., Koyama, Y., Miyazato, T. and Oda, M. (1998). Evidence for involvement of the subcoeruleus nucleus and nucleus raphe magnus in urine storage and penile erection in decerebrate rats. *J. Urol.* 159, 2172~2176.
- 73) Sun, H., Hu, X. Q., Moradel, E. M., Weight, F. F. and Zhang, L. (2003). Modulation of 5-HT₃ receptor-mediated response and trafficking by activation of protein kinase C. *J. Biol. Chem.* 278, 34150~34157.
- 74) Sur, C., Betz, H. and Schloss, P. (1996). Localization of the serotonin transporter in rat spinal cord. *Eur. J. Neurosci.* 8, 2753~2757.
- 75) Takaki, M., Neya, T. and Nakayama, S. (1980). Sympathetic activity in the recto-rectal reflex of the guinea pig. *Pflugers Arch.* 388, 45~52.
- 76) Takaki, M., Neya, T. and Nakayama, S. (1983). Role and localization of a region in the pons which has a descending inhibitory influence on sympathetically mediated inhibition of the recto-rectal reflex of guinea pigs. *Pflugers Arch.* 398, 120~125.
- 77) Takaki, M., Neya, T. and Nakayama, S. (1985). Pelvic afferent reflex control of rectal motility and lumbar colonic efferent discharge mediated by the pontine sympatho-inhibitory region in

- guinea pigs. *Pflugers Arch.* 403, 164~169.
- 78) Tsukamoto, K., Ariga, H., Mantyh, C., Pappas, T. N., Yanagi, H., Yamamura, T. and Takahashi, T. (2007). Luminally released serotonin stimulates colonic motility and accelerates colonic transit in rats. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 293, R64~R69.
- 79) Uchida, S., Kato, Y., Hirano, K., Kagawa, Y. and Yamada, S. (2007). Brain neurotransmitter receptor-binding characteristics in rats after oral administration of haloperidol, risperidone and olanzapine. *Life Sci.* 80, 1635~1640.
- 80) Vahedi, H., Merat, S., Rashidioon, A., Ghoddoosi, A. and Malekzadeh, R. (2005). The effect of fluoxetine in patients with pain and constipation-predominant irritable bowel syndrome: a double-blind randomized-controlled study. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 22, 381~385.
- 81) Vizzard, M. A., Brisson, M. and de Groat, W. C. (2000). Transneuronal labeling of neurons in the adult rat central nervous system following inoculation of pseudorabies virus into the colon. *Cell Tissue Res.* 299, 9~26.
- 82) Wang, L., Martínez, V., Kimura, H. and Taché, Y. (2007). 5-Hydroxytryptophan activates colonic myenteric neurons and propulsive motor function through 5-HT₄ receptors in conscious mice. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 292, G419~G428.
- 83) Wilder-Smith, C. H., Schindler, D., Lovblad, K., Redmond, S. M. and NirKKo, A. (2004). Brain functional magnetic resonance imaging of rectal pain and activation of endogenous inhibitory mechanisms in irritable bowel syndrome patient subgroups and healthy controls. *Gut.* 53, 1595~1601.
- 84) Yamanouchi, M., Shimatani, H., Kadowaki, M., Yoneda, S., Nakagawa, T., Fujii, H. and Takaki, M. (2002). Integrative control of rectoanal reflex in guinea pigs through lumbar colonic nerves. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 283, G148~G156.