

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 15 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591953

研究課題名(和文) 胃内寒冷受容体刺激の結腸運動亢進・排便誘発効果を応用した経口排便誘発剤の開発

研究課題名(英文) Development of oral drug to induce defecation based on the effects that stimulation to intragastric cold receptors enhances colonic motility and induce defecations

研究代表者

柴田 近 (SHIBATA, Chikashi)

東北大学・医学(系)研究科(研究院)・非常勤講師

研究者番号：30270804

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：意識下成犬において寒冷受容体(TRPA1)刺激剤のallyl isothiocyanate(AITC)の結腸内投与は結腸運動を亢進させ排便を誘発した。このようなAITCの効果は、ムスカリン、ニコチン、5-HT<sub>3</sub>、TRPA1の各受容体拮抗薬の存在下で抑制され、TRPV1拮抗剤の存在下では影響を受けなかった。結腸壁を切離・吻合、または外来性神経を切離するとAITCの結腸運動亢進、排便誘発効果が減弱した。これらは、AITCが結腸知覚神経末端のTRPA1に作用し、アセチルコリン、5-HT<sub>3</sub>を介して結腸運動を亢進させ排便を誘発するが、その作用には外来性神経と壁在神経が重要なことを示唆していた。

研究成果の概要(英文)：Intracolonic TRPA1 agonist allyl isothiocyanate (AITC) increased colonic motility and induced defecations in 75% of experiments in neurally intact dogs. These effects of AITC were inhibited by muscarinic, nicotinic, serotonergic, or TRPA1 antagonists but unaltered by TRPV1 antagonist. In dogs with transection/re-anastomosis (T/R) between the proximal and middle colon, increase in colonic motility was inhibited in the middle-distal colon, while in dogs with extrinsic denervation, increase in colonic motility was inhibited in the distal colon. Frequency of defecations was decreased compared to neurally intact dogs in dogs with T/R and extrinsic denervation. These results indicate that intracolonic AITC stimulates colonic motility and defecation via cholinergic, serotonergic, and TRPA1 pathways. Continuity of colonic enteric neurons and extrinsic nerves play a role in intracolonic AITC-induced colonic motor response.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・消化器外科学

キーワード：寒冷受容体

## 1. 研究開始当初の背景

消化管運動は便秘・下痢などの病態に深く関与している他、消化管蠕動の消失を本態とする疾患も存在する。したがって、消化管運動の制御はこれら病態・疾患の改善治療のためには重要だと考えられる。消化管に分布する神経系は、交感・副交感神経系と腸管神経系に分類される。交感・副交感神経系は外来性神経とも呼ばれ、内因性もしくは壁在性神経とも呼ばれる腸管神経系と協調して消化管運動を制御している。

意識下でのイヌの結腸には2種類の収縮波が認められる。1つは基線の持続的な上昇に律動的な収縮が介在した colonic motor complexes(CMCs)と呼ばれる収縮波形で、比較的遅い伝播速度(4 cm/分)を持つ。もう1つの収縮は giant migrating contractions (GMCs)であり、伝播速度が極めて速く(1 cm/秒)、波高も高く GMCs が遠位結腸まで伝播したときに排便が起こるため、GMCs は排便と密接に関与していると考えられている。唐辛子の主成分である capsaicin をイヌの胃内または結腸内に投与すると GMCs が誘発されて結腸運動が亢進し、高頻度に排便が誘発される。この結腸運動亢進、排便誘発作用には外来性神経、腸管神経の双方が重要な役割を担っていると考えられる。

消化管に分布する知覚神経には種々の受容体が存在するが、transient receptor potential(以下:TRP)チャンネルと呼ばれる一連の受容体の中には温度に対して感受性のある subfamily が存在する。Capsaicin は TRP 受容体中の subfamily V member 1(以下:TRPV1)に結合し、TRPV1 は 43 以上の熱や酸によっても活性化される温熱受容体である。一方、寒冷刺激によって活性化される TRP チャンネルもあり、TRPM8、TRPA1 が知られている。

TRPA1 刺激剤である allyl isothiocyanate (以下:AITC)をイヌの胃内に投与すると結腸消化管運動は亢進するため、TRPA1 は結腸運動制御において役割を担っている可能性が示唆されるが、どのように関与しているかについての報告はほとんどない。また、AITC はワサビやマスタードの辛み成分として知られており、その消化管運動に対する効果と作用機序の解明は、消化管運動生理を解明し、臨床応用に貢献できる可能性があり、極めて有意義と考えられる。

上記知見を基に、TRPA1刺激剤を意識下のイヌの胃内または結腸内に投与すると、結腸運動が亢進して排便が誘発されると仮説を立てた。また、

capsaicinでの研究結果から、その作用機序は神経系を介しており、外来性神経および壁在性神経が関与しているのではないかと考えた。消化管運動に関与しているコリン作動性ニューロン、セロトニン3 (5-hydroxytryptamine-3: 5-HT<sub>3</sub>) 受容体 の拮抗薬を用いて、作用機序を検討することとした。

研究に先立ち、胃内にAITCを投与したところ高頻度で嘔吐を誘発し、臨床応用上は極めて不利なため、胃内投与をあきらめて以後の研究は結腸内投与の効果について検討した。

## 2. 研究の目的

TRPA1 の刺激剤を結腸内に投与して、その結腸運動亢進、排便誘発効果とその作用機序を検討し、排便誘発剤開発における基礎的データを得ること。

## 3. 研究の方法

### (1)対象

体重 10~13 kgのビーグル犬 15 頭を用いた。また、すべての実験は東北大学動物実験指針に準拠して行われた。

### (2)動物モデルの作成

すべての手術は全身麻酔下に無菌的に行った。イヌは正常対照群(N=5)、結腸壁切離・再吻合群(N=5)、除神経群(N=5)の3群に分けた。以下の操作は全てのイヌに同様に行った。全身麻酔は thiopental(ラボナール<sup>®</sup>、田辺製薬、大阪)20 mg/kgの静脈麻酔で導入し、sevoflurane(セボフレン<sup>®</sup>、Abbott Japan、大阪)と酸素の混合ガスで維持した。麻酔後は開腹操作に先立ち、右外頸静脈よりシリコンチューブ(SH No.2、内径2mm、外径3mm、クリエイトメディック株式会社、横浜)を上大静脈に留置し、術後の点滴および薬物投与に用いた。消化管運動の測定は、strain gauge force transducer(F121S、スターメディカル、東京、以下 transducer)を輪状筋収縮が測定できるように結腸3か所に縫着・固定して行った。Transducerを縫着した部位は、1番目を回盲弁から5cm肛門側の近位結腸とし、3番目を腹膜翻転部より10cm口側の結腸に縫着、2番目の transducer はその中間部位に縫着した。結腸の運動測定部位を口側から順に C1(近位結腸)、C2(中部結腸)、C3(遠位結腸)とした。シリコンチューブを盲腸より挿入し、先端が C1 の transducer の部位の結腸内腔に位置するように留置し、正常対照群とした。切離再吻合群は以上の操作に加え、C1 と C2 の間で結腸壁を切離し、すぐに再吻合を行った。除

神経群では、結腸に分布する動静脈以外の結合組織を腸間膜も含めて切除し、結腸に分布する外来性神経を遮断した。全ての実験犬において導線とシリコンチューブは皮下トンネルを通して肩甲骨間の背部より体外に誘導し、小コネクタに接続した。導線・コネクタの損傷を防ぐ目的でイヌの上半身を布製のジャケットで覆った。

手術後は術後 2 日間を絶食とした。術後 3 日目より食餌投与を開始し、固形食約 200g (CD-55a、日本クレア®、東京) を一定時刻に投与した。

### (3) 結腸運動の測定

術後 14 日間の回復期間の後にイヌの小コネクタをアンプ (MS-08、スターメディカル、東京)、コンピューターに接続し、無拘束、意識下で結腸運動の測定を行った。消化管運動波形は解析専用プログラム (Chart, AD Instrument, Victoria, オーストラリア) を用いて取り込み、解析を行った。

### (4) 実験方法

全ての実験は約 16 時間の絶食後、空腹期に行った。正常対照群、切離再吻合群、除神経群とも 2-3 日に 1 回行った。

#### AITC の結腸運動に対する効果

正常対照群において、空腹期で結腸運動が認められない時期に、AITC 5、10mg を溶媒 (dimethyl sulphoxide、以下 DMSO) に溶解し計 2ml とし、それをさらに生理食塩水 8ml と混合し、シリコンチューブより結腸内にワンショットで投与した。Placebo control として、DMSO 2ml と生理食塩水 8ml の混合液を用いた。

#### 結腸運動亢進効果の作用機序の検討

AITC が結腸運動を亢進させる機序を明らかにするため、ムスカリン受容体拮抗剤の atropine (0.1 mg/kg)、ニコチン受容体拮抗剤の hexamethonium (5 mg/kg)、5-HT<sub>3</sub> 受容体拮抗剤の ondansetron (0.5 mg/kg) を AITC 10mg を投与する 5 分前に静脈内投与した。さらに、TRPA1 の特異的な拮抗剤である HC-030031、4mg、TRPV1 の拮抗剤である capsazepine、5mg を DMSO 2ml に溶解し、生理食塩水 8 ml と混合した上で AITC 10mg 投与の 5 分前にシリコンチューブより結腸内に投与した。

#### 外来性神経、腸管神経系の役割の検討

切離・再吻合群および除神経群は AITC 10mg をシリコンチューブより結腸内に投与し、その効果を正常対照群と比較した。

### (5) データの解析

薬剤投与後の 30 分間を解析の対象とし、その波形下面積を計測し、Motility Index (MI) として定

量化に用いた。波形下面積の計算にはソフトウェア (Chart, AD Instrument) を使用した。また、薬剤投与後 30 分以内の GMCs と排便の出現頻度を検討した。GMCs の定義は以前の報告に基づき、波高が CMCs の 2.8 倍以上で、伝播速度が 1 cm/sec の収縮波とし、これに合致した収縮が最低 2 か所の部位で認められた場合を GMCs の発現ありと定義し、それぞれの群で発現頻度を比較した。拮抗剤を用いた実験は 1 頭につき 1 回のみ行ったが、それ以外の実験は全て 1 頭につき 2 回行い、MI については 2 回の実験の平均値をそのイヌの代表値とした。全てのデータは平均値 ± 標準誤差で示した。MI の統計学的解析には Student-t 検定を用い、GMCs と排便の出現頻度は全ての実験回数のうち何回認められたかを検討し、検定には Fisher's exact test を用いた。危険率  $p < 0.05$  をもって有意差ありと判定した。

## 4. 研究成果

### (1) 正常対照群における AITC の効果

Placebo control では結腸に収縮は起こらず、GMCs や排便も誘発されなかったが、AITC の投与では薬剤投与直後に GMCs が連発し、排便が誘発された (Fig. 1)。

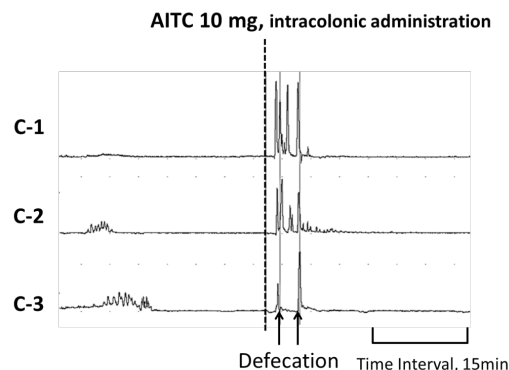


Fig. 1: 結腸運動に対する AITC 10 mg の効果  
AITC 5mg 投与で全 10 回中 7 回 GMCs が出現し、6 回 GMCs を伴う排便を認めた。AITC 10 mg 投与では全実験で GMCs が出現し、10 回中 9 回で GMCs を伴った排便を認めた (Table 1)。

	GMCs頻度	排便頻度
Placebo control	0/10	0/10
AITC 5 mg	7/10*	6/10*
AITC 10 mg	10/10*	9/10*

\*:  $P < 0.05$  compared to placebo control

Table 1: AITC 投与による GMCs と排便誘発効果

AITC 投与後に GMCs が認められなかった場合でも CMCs の出現を認めた。MI では、Placebo control に対して、AITC 5 mg 投与では C1 および C3 で有意に MI が増加し、AITC 10 mg 群ではすべての部位で有意に MI が増加した (Fig. 2)。

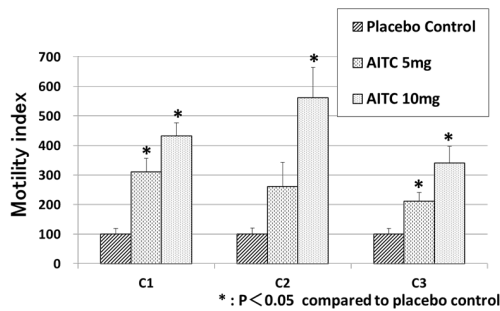


Fig. 2: Motility index に対する AITC の効果

(2) 正常対照群における AITC の効果に対する各種拮抗剤の効果

Atropine, hexamethonium, ondansetron の投与下では AITC 誘発性収縮、GMCs および CMCs は認められず、波形はほぼ平坦であった。排便は atropine 投与時、hexamethonium 投与時に、5 回の実験中それぞれ 1 回認められたが、GMCs を伴うものは見られなかった。これら 3 種類の拮抗剤により、MI は AITC 単独群に比べて著明に低下した (Fig. 3)。

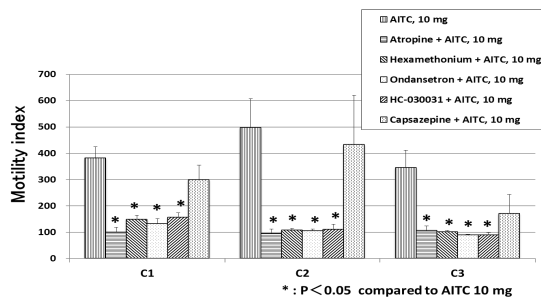


Fig. 3: AITC による結腸運動亢進効果に対する各種拮抗剤の効果

また、TRPA1 拮抗薬である HC-030031 を前投与した場合、5 頭中 1 頭のみで GMCs を認められたが、他 4 頭では明らかな反応を認めなかった (Fig. 4)。また、GMCs を認めた際にも排便は認めず、MI も AITC 単独群に比べて全ての部位で減少した (Fig. 3)。

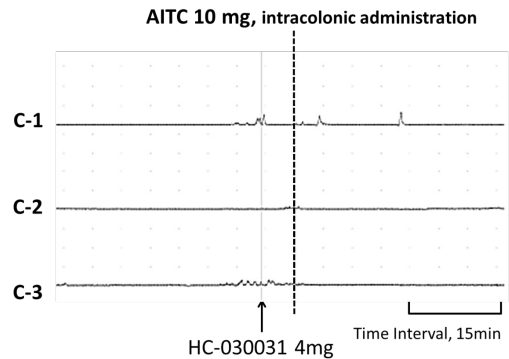


Fig. 4: AITC 誘発性結腸収縮に対する HC-030031 の効果

一方、capsazepine を前投与した場合、GMCs は全 5 回中 3 回見られ、その内 2 回は排便を伴っていた。GMCs の誘発頻度は AITC 単独群と有意差を認めなかったが、排便頻度は有意に抑制された。GMCs が起こらなかった場合にも CMCs を認めた。AITC 単独群と比較してすべての部位で抑制効果は認められなかった。

(3) 切離・再吻合群、除神経群における AITC の効果

切離・再吻合群では、AITC10mg を投与した場合、GMCs は 10 回中 2 回認められ、正常対照群に比べて有意に低下していた (Table 2)。また、GMCs が認められない場合、CMCs が 10 回中 4 回認められた。それ以外では、GMCs の定義を満たさない波高の収縮 (Fig. 5)、もしくは結腸の 1 か所のみで生じた単発性収縮が認められた。GMCs の定義を満たさない波高の収縮は C1 で多発していた。2 回の実験で認められた GMCs は、2 回とも C2 に初発し、C3 に伝播して、排便を引き起こした。それ以外に GMCs を伴わない排便を 1 回認められたため、排便は 10 回中 3 回認められ、正常対照群よりも有意に減少していた (Table 2)。MI を AITC10mg 群と比較すると、C1 では有意差は認められなかったが、C2 および C3 では有意に低下していた (Fig. 6)。

	GMCs 頻度	排便頻度
正常対照群	10/10	9/10
切離・再吻合群	2/10*	3/10*
除神経群	4/10*	9/10

\*: P < 0.05 vs. 正常対照群

Table 2: 各モデルにおける結腸内 AITC 投与の GMCs と排便の頻度に対する効果

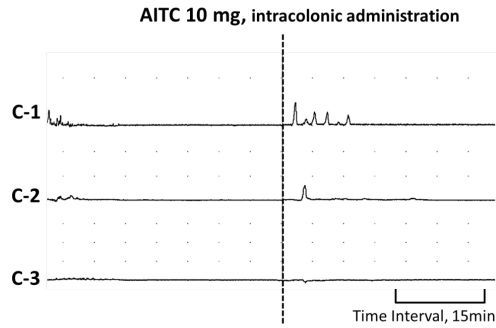


Fig. 5: 切離・再吻合群での AITC の効果

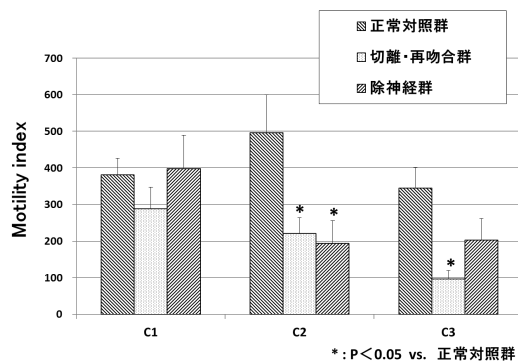


Fig. 6: 各モデルにおける結腸内 AITC 投与の結腸運動に対する効果

除神経群では、AITC 10 mg を投与した場合、GMCs は 10 回中 4 回に認められ、正常対照群より少なかった (Table 2)。それ以外では CMCs が 4 回 (Fig. 7)、GMCs の定義を満たさない波高の収縮を 2 回認めた。CMCs は全部位で認められたが、GMCs の定義を満たさない波高の波形の場合、C1 および C3 で波高の高い収縮を認めた。排便は 10 回中 9 回認められたが、そのうち 5 回は GMCs を伴わない排便であった。GMCs 頻度は正常対照群より低下していたが、排便の頻度は有意差を認めなかった (Table 2)。MI を正常対照群と比較すると、C1 では有意差を認めず、C2 では有意に低下しており、C3 では AITC に比べて MI が約 60% 程度に低下していたものの有意差は認められなかった (Fig. 6)。

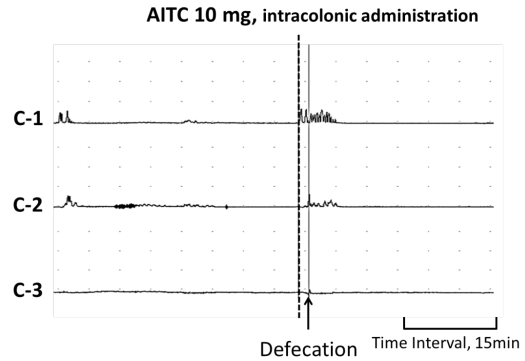


Fig. 7: 除神経群での AITC の効果

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 4 件)

染谷崇徳、長尾宗紀、菊地大介、宮地智洋、佐々木宏之、田中直樹、羽根田祥、大沼 忍、工藤克昌、神山篤史、森川孝則、吉田 寛、元井冬彦、内藤 剛、片寄 友、松田泰史、柴田近、江川新一、海野倫明、結腸内 TRPA1 agonist 投与による結腸運動亢進・排便誘発作用の検討、第 55 回日本平滑筋学会総会、2013 年 8 月 7 日、北海道

染谷崇徳、柴田近、長尾宗紀、田中直樹、佐々木宏之、宮地智洋、菊地大介、吉田 寛、鹿郷昌之、元井冬彦、内藤 剛、三浦 康、片寄 友、江川新一、海野倫明、結腸内 TRPA1 agonist 投与による結腸運動亢進・排便誘発作用の検討、第 68 回日本消化器外科学会総会、2013 年 7 月 19 日、宮崎

染谷崇徳、長尾宗紀、田中直樹、佐々木宏之、小川 仁、内藤 剛、三浦 康、柴田近、江川新一、海野倫明、結腸内寒冷受容体刺激による結腸運動亢進・排便誘発作用の検討、第 113 回日本外科学会定期学術集会、2013 年 4 月 13 日、福岡

染谷崇徳、柴田近、長尾宗紀、田中直樹、佐々木宏之、松田泰史、宮地智洋、菊地大介、井本博文、海野倫明、結腸内寒冷受容体刺激による結腸運動亢進・排便誘発作用の検討、第 54 回日本平滑筋学会総会、2012 年 8 月 2 日、東京

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

柴田 近(SHIBATA CHIKASHI)

東北大学・大学院医学系研究科・非常勤講師

研究者番号：30270804

### (2) 研究分担者

鹿郷 昌之(KAKYO MASAYUKI)

東北大学・大学院医学系研究科・非常勤講師

研究者番号：30455779

田中 直樹(TANAKA NAOKI)

東北大学・大学病院・助教

研究者番号：60547404

### (3) 連携研究者

なし