

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 20 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25861170

研究課題名(和文) CGRPを介した全く新しい機序の緩下剤開発に向けての基礎的検討

研究課題名(英文) The role of CGRP in regulation of colonic motility and defecation

研究代表者

長尾 宗紀 (Nagao, Munenori)

東北大学・大学病院・助教

研究者番号：60451564

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：イヌにおけるCGRP(カルシトニン遺伝子関連ペプチド)静脈内投与の結腸運動と排便に対する効果を検討するため、CGRPを経静脈的に投与し結腸運動を測定した。CGRPの各濃度において結腸運動が誘発され、濃度依存性にその頻度は増加した。排便も誘発された。以上より、CGRPの経静脈的投与が結腸運動を誘発し、排便を誘発する可能性が示唆された。この研究成果により、副作用が少なく経静脈的投与が可能な下剤の開発につながる可能性があるものと思われた。

研究成果の概要(英文)：We measured colonic motility to analyze the effect of intravenous administration of CGRP(calcitonin gene-related peptide) in conscious dogs. Intravenous administration of CGRP induced giant migrating contraction and defecation in colon. The frequency of the contractions increased dose-dependently. The results suggest that intravenous administration of CGRP may induce the colonic motility and defecation. Besides, the result may contribute to the development of the new laxative which has less side effects and can be administered intravenously.

研究分野：消化器外科学

キーワード：GMC CGRP 排便

1. 研究開始当初の背景

腹部手術における術後合併症としては様々なものがあるが、中でも消化器手術後比較的早期に認められる postoperative ileus (POI)は比較的頻度の高い術後合併症の一つである。POIの発症には手術や麻酔の侵襲に伴う腸管運動機能低下(腸管麻痺)が関与していると考えられている。治療法としては絶食、減圧チューブ挿入等があるが、大変な苦痛やQOL (quality of life)の低下が問題となる。

また、高齢化社会の進行に伴い、長期臥床となった上に便秘症を伴っている高齢者も少なくなく、本人のみならず、介護者の負担も大きな問題となっている。通常、長期臥床となった高齢者は自力でトイレに移動しての排泄は困難であるため、通常オムツが使用される。しかし、排便のタイミングは不規則であり、一日の中で日中・夜間を問わずオムツへの排便が行われ、それを長時間放置することは衛生上、また、倫理上も問題があることから、オムツへの排便後は介護者による速やかな処置が必要とされ、このことが介護者の疲弊を招いている一因となっていることが十分に考えられる。

これらに対し現在使用されている緩下剤は、内服しても効果が不確実であったり、内服後に実際に排便があるまで時間を要したりするという問題点があり、即効性にはまだまだ改善の余地が残されている。浣腸等においては比較的即効性は認めるものの、やはり介護者の手間を要するため、簡便性という点ではまだ改善の余地が残されている。そこで、経静脈的に投与可能で比較的短時間に十分な効果の得られる緩下剤が存在すれば、決められた時間にすぐに排便が誘発でき、医療施設や介護施設等で日中の人手が多い時に排便を管理でき、いわゆる「計画排便」が可能となる。

イヌの意識下の結腸運動としては2種類の波形が知られている。一つはCMC (colonic motor complex)であり、もう一つはGMC (giant migrating contraction)である。CMCは低振幅で比較的ゆっくり伝搬する(4cm/分)波形であり、GMCはCMCの2.8倍以上の高振幅で速やかに伝搬する(60cm/分)。排便はGMCが遠位結腸まで伝搬した際に引き起こされることが知られており排便はGMCと関連している。

生体内には calcitonin-gene related peptide (CGRP)というペプチドが存在し、中枢神経や末梢知覚神経終末に存在する。腸管神経系にもその受容体が存在することが報告されており、2nd messenger (cAMP)を介して血管を拡張させ、その結果腸管粘膜の血

流を増加させる作用がある。これまでに、CGRPの小腸運動に対する作用としてCGRPを経腸間膜動脈投与したところ、小腸にGMC (giant migrating contraction)が誘発されたとの報告はあるが、CGRPの結腸運動に対する効果や作用機序についての報告は存在していない。しかし、ラットにおいてCGRP陽性ニューロンが結腸腸管神経系(筋管神経叢)に存在することは報告されており、CGRPが小腸のみならず、結腸運動に対しても作用を有し、排便を引き起こすことが示唆されるが、過去にCGRPの投与が結腸運動にどのように影響するかという点について詳細に検討した報告は認められない。そこで、生体内に存在するペプチドであるCGRPの投与が結腸運動にどのように作用(特に運動亢進)するかを検討し、将来の経静脈的投与による排便誘発を行うための緩下剤開発のための基礎的データを得るために検討を行った。

2. 研究の目的

CGRPを静脈内投与し、その結腸運動亢進効果、排便誘発効果を確認し、さらにその作用機序を検討する事で、経静脈投与可能な緩下剤開発の基礎的研究を行うこと。

3. 研究の方法

(1)対象

体重10~13kgのビーグル犬5頭を用い、東北大学動物実験指針に準拠して全ての実験を施行した。

(2)モデル作成

全ての手術は全身麻酔下に施行した。全身麻酔の導入は thiopental (ラボナール®、田辺製薬、大阪) 20mg/kg で行い、麻酔維持は sevoflurane (セボフルレン®、Abbott Japan、大阪) と酸素の混合ガスで行った。開腹操作に先立ち、右外頸静脈よりシリコンチューブ (SHNo.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た。このシリコンチューブより輸液、薬剤投与を行うこととした。消化管運動の測定は strain gauge force transducer (F12IS、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消化管4箇所縫着固定して施行した。Transducerを縫着した部位は回盲弁から5cm口側の回腸(ile) \ 回盲弁から5cm肛門側の近位結腸(C1) \ 腹膜翻転部より10cm口側の遠位結腸(C3) \ C1とC3の中央に中部結腸(C2)とした。導線とシリコンチューブは皮下トンネルを経由して肩甲骨間の背部より体外に誘導し、コネクタに接続した。平服後にイヌ上半身をジャケットで覆い、損傷予防のため、導線、コネクタをジャケット内のポケットに収納した。

術後1日目は絶飲食とし、術後2日目より飲水開始、術後3日目より食事開始とした。また、術後2日間は補液を1日1000mlと抗生剤投与も施行した。以後の食事は固形食を午後の一定時刻に投与した。

上記は正常対照群のモデル作成であるが、CGRPの作用における結腸壁在性神経の役割を検討するために、結腸の切離再吻合モデルを作成した。全身麻酔下にシリコンチューブの留置、開腹下にtransducerを縫着するまでは対照群と同様だが、切離再吻合モデルはさらにC1とC2の間で一旦結腸を切離し、端端吻合にて消化管を再建した。術後の処置、食事投与のタイミングは正常対照群と同様に行った。

(3) 結腸運動の測定

術後14日間の回復期間の後、イヌのコネクタをアンプ(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、意識下で薬剤を経静脈投与し、結腸運動の測定を施行した。消化管運動波形はアンプより専用コンピューター(MacLab、AD Instrument、Victoria、オーストラリア)に取り込み、さらに解析専用プログラム(Chart、AD Instrument)を用いて解析した。

(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。

CGRPの結腸運動に対する効果

実験は全て午前中に行うこととした。CGRP(ペプチド研究所、大阪)0.01、0.02、0.04mg(溶媒として蒸留水に溶解し、生理食塩水を加え計10mlとする)controlとして生理食塩水10mlをそれぞれシリコンチューブより経静脈的に投与し、結腸運動を測定した。

CGRPの結腸運動に対する作用機序

CGRPの結腸運動に対する作用機序を明らかにするために、各種拮抗薬の存在下にCGRPを投与し、その効果を検討した。ムスカリン受容体拮抗薬のatropine(0.1mg/kg + 0.1mg/kg/hを30分)、ニコチン受容体拮抗薬のhexamethonium(5.0mg/kg + 5.0mg/kg/hを30分)、5-HT₃受容体拮抗薬のondansetron(0.5mg/kg + 0.5mg/kg/hを30分)の3種類をそれぞれ静脈内投与し、その5分後よりCGRP 0.04mgを静脈内投与して結腸運動を測定した。

(5) データ解析

データ解析対象はいずれもCGRP静脈投与後30分間とし、運動測定評価項目として、GMCの発現の有無、GMC発現頻度、排便の有無を測定した。また、波形下面積を計算し、motility index(MI)として定量化し検討した。全ての実験は2回ずつ施行し、その平均をイヌの代表値として計測した。MIの計算にはソフトウェア(Chart、AD Instrument)を

使用した。全てのデータは平均値±標準誤差で示し、MIの統計学的解析にはStudent t検定を用い、頻度に関してはFisherの正確検定を用いた。P<0.05を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CGRPの効果

controlでは結腸にGMCや排便をほぼ認めなかったが、CGRP静脈投与ではGMCと排便が誘発された(図1)。

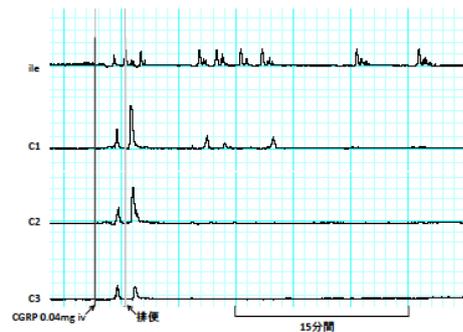


図1: CGRP 0.04mg 静脈内投与の効果

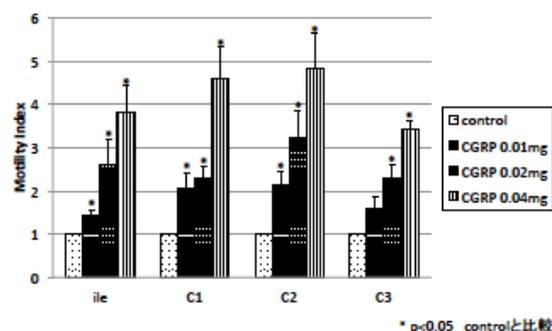
GMC発現回数はCGRP 0.01mg投与では10回中7回、CGRP 0.02mgでは10回中10回、CGRP 0.04mgでは10回中10回であった。また薬剤投与後30分におけるGMC発現頻度の平均はCGRP 0.01mgで1.2回、CGRP 0.02mgで2.0回、CGRP 0.04mgで5.8回であった。また排便に関してはCGRP 0.01mgで10回中4回、CGRP 0.02mgでは10回中2回、CGRP 0.04mgでは10回中7回認めた(表1)。

	GMC発現	GMC回数(/30分)	排便
control	1/9	0.1	0/9
CGRP 0.01mg	7/10*	1.2*	4/10
CGRP 0.02mg	10/10*	2.0*	2/10
CGRP 0.04mg	10/10*	5.8*	7/10*

* p<0.05 controlと比較

表1: CGRP 静脈投与におけるGMC発現と排便誘発効果

MIについては、controlと比較して、CGRP 0.01mgのC2、CGRP 0.02mgのC1,2,3、CGRP 0.04mg全項目で有意に高値であった(図2)。



* p<0.05 controlと比較

図 2 : CGRP 投与における Motility Index

(2)CGRP の結腸運動に対する作用機序

atropine 投与下では GMC 発現、排便は認めず(図 3)、hexamethonium 投与下では CGRP 0.04mg 単独投与と比較し有意差はつかなかったものの GMC 発現頻度、排便回数は減少していた。Ondansetron 投与下では 5 回中 4 回に GMC 発現を認め、2 回排便を認めた(表 2)。

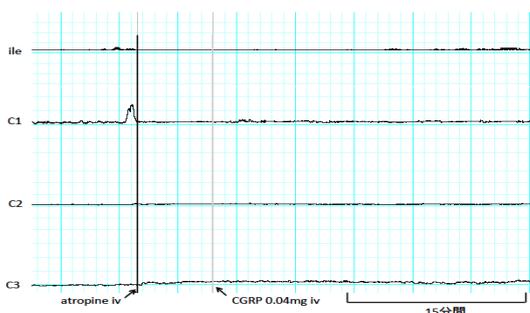


図 3 : CGRP 誘発結腸運動に対する atropine の効果

	GMC発現	GMC回数(/30分)	排便
CGRP 0.04mg	6/6	5.7回	4/6
atropine + CGRP 0.04mg	0/5*	0.0回*	0/5
hexamethonium + CGRP 0.04mg	2/5	1.2回*	2/5
ondansetron + CGRP 0.04mg	4/5	3.0回	2/5

*p<0.05 controlと比較

表 2 : CGRP 誘発結腸運動に対する各種拮抗薬の効果

MI については、CGRP 0.04mg 単独投与と比較して、atropine 投与下では全項目で有意に低下し、hexamethonium 投与下では C3 を除く項目で低下していた。Ondansetron 投与下では C1 と C3 は有意に低下していたが、ile と C2 では有意差を認めなかった(図 4)。

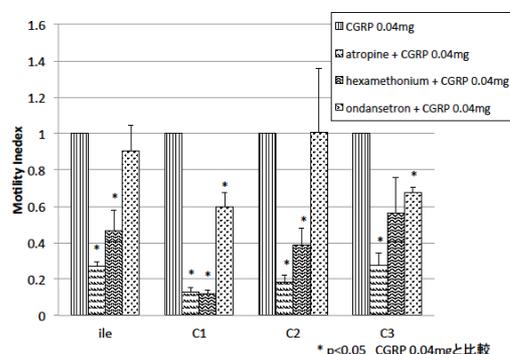


図 4 : 各種拮抗薬併用時の Motility Index

(3)CGRP の結腸運動亢進効果における壁在性神経の役割

結腸切離再吻合モデルにおいて、対照群と

同様に CGRP 0.04mg を投与したところ 4 回中 2 回に GMC は出現し 2 回の排便を認めたが、C1 から C2 へは(すなわち、切離吻合部を越えては)GMC は伝播しなかった。

(4)結果のまとめ

上記結果より、生体内に存在するペプチドである CGRP の経静脈投与により GMC を出現させ、排便を誘発するという結腸運動亢進効果があることが示された。その効果には用量依存性を認めた。ムスカリン受容体拮抗剤の atropine 存在下では GMC・排便は認められず、ニコチン受容体拮抗剤の hexamethonium 存在下では GMC の発現頻度・排便回数が減少していたことから、CGRP の作用にはアセチルコリン(コリン作動性神経)を介することが示唆された。また、結腸壁在性神経を切離したモデルにおいては、CGRP の効果によって発現した GMC は切離部を越えて伝播しなかったことから、CGRP による GMC の伝播には壁在性神経の存在が重要であることが示唆された。

しかし、今回の検討では CGRP の効果に対する外来性神経の関与についての確認ができなかった。具体的には、結腸に分布する外来性神経を外科的に切離した除神経モデルを作成し CGRP の効果を検討することであったが、このデータが得られればさらに詳細な機序の検討が可能になると思われた。

以上の知見は、経静脈的投与が可能な、排便を促進する今までと全く異なる機序の緩下剤開発に向けての重要な基礎的データとなり得ると考えられた。

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)

該当なし

6 . 研究組織

(1)研究代表者

長尾 宗紀 (NAGAO, Munenori)
 東北大学・大学病院・胃腸外科 助教
 研究者番号 : 60451564

(2)研究分担者

()

研究者番号 :

(3)連携研究者

()

研究者番号 :

(4)研究協力者

小野 智之 (ONO, Tomoyuki)

渋谷 恵美子 (SHIBUYA, Emiko)