

実験的炎症性腸疾患における  
骨盤神経の侵害受容に関する研究

牧村 幸敏

## 目 次

第 1 章 序論	1
----------	---

- 1-1. 炎症性腸疾患の医学的、社会的背景
- 1-2. 炎症性腸疾患の研究の歴史ならびに現状
- 1-3. 内臓知覚の発現機構と IBD との関わり
- 1-4. 炎症性腸疾患のモデル動物
- 1-5. 本実験の目的

第 2 章 骨盤神経の化学的侵害刺激に対する応答	7
--------------------------	---

- 2-1. 目的
- 2-2. 材料および方法
  - 2-2-1. 供試動物および麻酔処置
  - 2-2-2. 骨盤神経求心性活動の記録方法
  - 2-2-3. 結腸内への化学的侵害刺激
  - 2-2-4. データ解析
- 2-3. 結果
  - 2-3-1. 酢酸投与による骨盤神経活動
  - 2-3-2. カプサイシン刺激時の骨盤神経活動
- 2-4. 考察
- 2-5. 小括

第 3 章 腸炎モデル動物における骨盤神経の化学的侵害受容	18
-------------------------------	----

- 3-1. 目的
- 3-2. 材料と方法

3-2-2. カプサイシン刺激による骨盤神経応答

3-2-2-1. 供試動物および麻酔処置

3-2-2-2. 神経活動記録方法および薬物の投与方法

3-2-2-3. 投与薬物の調整

3-2-3. データ解析

3-4. 結果

3-5. 考察

3-6. 小括

第 4 章 腸炎モデル動物における骨盤神経の化学的侵害受容における TRP チャネルの関与 . . . . . 29

4-1. 目的

4-2. 材料と方法

4-2-1. 供試動物

4-2-2. 神経活動記録方法および薬物の投与方法

4-2-3. データ解析

4-3. 結果

4-4. 考察

4-5. 小括

第 5 章 腸炎モデル動物における骨盤神経の機械的侵害受容 . . . . . 38

5-1. 緒言

5-2-1. 供試動物およびバルーンによる結腸伸展刺激の方法

5-2-2. 神経活動記録方法

5-2-3. データ解析

5-3. 結果

5-4. 考察

5-5. 小括

第 6 章 総合考察 . . . . . 50

文献 . . . . . 58

謝辞

## 第1章 序論

### 1-1. 炎症性腸疾患の医学的、社会的背景

近年、原因不明の潰瘍性大腸炎 (Ulcerative Colitis) とクローン病 (Crohn's Disease) が医療上の大きな問題となっており、これらの疾患は「炎症性腸疾患 Inflammatory Bowel Disease (IBD)」と総称されている。潰瘍性大腸炎 (UC) は、結腸を中心にして粘膜の炎症が広範に広がることを特徴とする疾患であり、病変部位は直腸から結腸全体まで及ぶことがある。クローン病 (CD) は、貫壁性に生じるまばらな炎症を特徴とし、口から肛門までのあらゆる部位に生じうる (Carter, M. J., et al., 2004)。

いずれも原因不明で若年～中年 (10-40 歳) 層で多く発症する。主な症状としては腹痛、下痢、発熱、肛門病変などであり、それらが緩解と再発を繰り返す慢性の経過を辿る。両疾患とも厚生労働省により特定疾患に指定されている。

IBD は厚生労働省「潰瘍性大腸炎調査研究班」の発足を契機にその研究が進められて以降、診断された患者数は急速に増え続けており、UC の患者数は 2007 年には 10 万人を超え、CD は 2006 年には約 25,700 人となっている。このことから IBD に対する社会的な関心が高まっている。IBD の発症率が高まった背景として、近年、動物性たんぱく質や脂肪を多く摂取するようになった日本人の食生活の変化も要因の一部として関与していると考えられている (Jantchou, P., 2010)。

### 1-2. 炎症性腸疾患の研究の歴史ならびに現状

IBD を構成する 2 種類の疾患のうち、UC は 1875 年に英国で初めて報告され、日本では 1928 年に東京大学の稲田龍吉博士によって始めて報告された。また CD については、1932 年にニューヨークのマウントサイナイ病院のクローン医師によって、限局性回腸炎として報告されたのが最初で、後に病名が改められている (Wilks, S. and Moxon, W. 2000)。

わが国の IBD 研究は難治性炎症性腸管障害調査研究班（厚生省、当時）の発足により実質的な研究が 1973 年に始まり、病態把握、疫学、診断技術、治療法に関する分野を中心に進められている（厚生労働省厚生労働科学研究成果データベース）。近年では遺伝子研究、免疫異常や腸内細菌叢の面から見た病因・病態解明により、病態にもとづいた新治療法の開発に向けた努力が続けられている。これらの研究を通じて、腸内細菌叢との関係や腸管免疫機構の関与など重要な知見が得られている。しかしながら、IBD の病態解析は免疫病理学分野を中心に明らかになってきているものの、炎症性腸疾患の病態発現をもたらす発症機序の本質的な解明にはまだ至っていないのが現状である。とくに、IBD の発症過程における腸管神経系の役割に関する知見は他の研究分野に比較して乏しい。

### 1-3. 内臓知覚の発現機構と IBD との関わり

消化管の神経系には、消化管神経叢（Enteric nerve system, ENS）という神経ネットワークが存在し、粘膜下組織に存在する粘膜下神経叢（マイスナー神経叢）および縦走筋と輪走筋との間に存在する筋層間神経叢（アウエルバハッハ神経叢）がある。粘膜下神経叢は主に吸収や分泌などの粘膜の機能を、筋層間神経叢は腸管の運動・知覚を制御していると言われている。

消化管は「第二の脳（セカンドブレイン）」と例えられるように、脳に匹敵するほどの多数の神経細胞が存在し、神経ネットワークが細部まで発達している。形態学的特徴あるいは電気生理学的特徴から、ENS の粘膜下神経叢と筋層間神経叢には知覚神経、上行性・下行性介在神経、興奮性・抑制性の運動神経などが同定されている。迷走神経求心性一次知覚神経は、筋層間神経叢内に細胞体を持ち、消化管粘膜と神経叢との間に分布し、交絡している。このように、消化管の知覚と運動は ENS の複雑な制御を受けていると考えられている。

結腸での内臓知覚発現には、脊髓性求心性一次知覚神経と内在性一次知覚神経の関与が高く、まず伸展刺激を始めとする様々な刺激に応答して粘膜下の肥満細胞やセロトニン貯蓄細胞(EC cell)に貯蓄されている神経伝達物質（サブスタンスP, セロトニンやヒスタミンなど）が放出され、これらが粘膜下知覚神経終末に作用して神経を興奮させる。この興奮は、筋層間神経叢に集約され、さらに骨盤神経を通して、脊髓に入力し、上位中枢に信号を伝え、初めて内臓知覚が生じるとされている。また、骨盤神経線維は、伝導速度の遅い無髄のC線維を約6割、伝達速度の速い有髄のA- $\delta$ 線維を約4割含んでおり、それらが大腸に作用する様々な化学的侵害刺激と伸展刺激に対して様々な閾値を持って受容している（De Schepper, H. U., 2008）。

腸炎における侵害受容に関する研究は、IBS（過敏性大腸炎症候群）の研究領域において比較的詳細に進められている。IBSの痛覚過敏には腸脳相関を含む内臓通痛覚過敏が関わっていることが示唆されている。

臨床においては、IBS患者の内臓痛知覚過敏にはIBS患者の腸粘膜下の肥満細胞数および脱顆粒量の増加が関与することが示唆されている（Spiller, et. al., 2000; Barbara, et al., 2004, 2007; Park, J. H. et.al 2006）。

また、近位結腸に中用量のTNBSを投与することで作成したIBSモデルラットにおいて、痛覚過敏が観察され、そのメカニズムとしては肥満細胞浸潤とその活性化による脱顆粒亢進が関与すること（大橋雅津代、「過敏性腸症候群モデル動物における内臓痛覚過敏に関する研究」、博士論文、東京大学、2008）またN型電位依存性カルシウムチャネルの $\alpha 2 \delta$ サブユニットがその痛覚過敏に関与していることなどが報告されている（Ohashi, et. al., 2008）。

一方、最近になって、IBDとこの消化管を支配する神経の生理学的変化との関わりを示唆する報告が増えてきている。2008年にはTNBS腸炎モデルラットで、骨盤神経C線維におけるTRPV1の発現が増加することや、伸展刺激に対する知覚過敏に**TRPV1**が関わ

っていることが示されており、下部消化管を支配する知覚神経の生理的な変化が、IBDの病態に深く関わっている可能性が指摘されている。

#### 1-4. 炎症性腸疾患のモデル動物

前節で述べたように、免疫学、分子生物学など様々な手法を用いて IBD の病態を解明するための研究がなされているが、その発症機序については未だに解明されていない。IBD の発現機序の解明には免疫系のみならず腸管神経系や脳の関与、遺伝をも視点に入れた総合的なアプローチが必要と思われる。そのため、ヒト患者および実験動物を用いた広範な研究が求められる。ヒト患者における研究は臨床研究には極めて有用であるが、発症機序の直接的な解明は容易ではない。一方、IBD と類似の病変を人為的に作成したモデル動物を用いた研究は病態発現機序の解明に有用と思われるが、自然発症の炎症性腸疾患と完全には同一視できない面がある。しかしながら、モデル動物を用いた研究はそれぞれのモデルの特徴を生かすことで病理学、免疫学、神経学、遺伝学、分子生物学といった様々な領域からの根源的な研究が可能であり、IBD の発症要因を基礎的な面から理解するうえで非常に有益な手段であると考えられる。モデル動物を用いた研究は治療薬や予防薬の開発における基盤研究や前臨床研究の分野に資する面が多いと考えられる。

IBD の基礎研究に用いられているモデル動物としては、1) トランスジェニックや遺伝子ノックアウトを作製した遺伝子改変動物、2) 起炎剤などを腸管内に注入あるいは経口摂取する動物、3) 自然発症動物、4) 免疫系細胞の移植、といったものが挙げられる。一般的には2) の起炎剤を作用させて腸炎を誘導したモデル動物が広く使われており、酢酸、インドメタシン、オキサザロン、TNBS (trinitrobenzenesulfonic acid) といったものを結腸内投与して作成するモデル動物や、DSS (dextran sulfate sodium) 水溶液を飲料水として与えるモデル動物が知られている。



酢酸を用いた IBD モデル動物は、4-5%の酢酸を浣腸、あるいは開腹術を用いて直腸から上行結腸に至るまで、15-30 秒間暴露することによって作成するものが主流である。炎症のピークは暴露後 1-3 日であり、その後ラットでは 2-3 週間炎症状態が持続する。炎症の重篤度が酢酸の濃度や暴露時間の長さに依存することが特徴である。酢酸によって惹起する病態は、有機酸に特有のものであり、塩酸を暴露しても腸炎は発症しない。

TNBS モデル動物は、エタノールに溶解した TNBS を浣腸を用いて直腸に暴露することで作成する。炎症のピークは暴露後 2-3 日であり、その後 8 週間炎症状態が持続する。このモデル動物ではアルコールが粘膜のバリアを破壊した後に、ハプテンに誘導された腸炎が発症する。このモデル動物では、酢酸モデルとは違い、肉芽腫性の慢性炎症が誘導されるのが特徴である。

一方、DSS モデルでは、DSS 水溶液をマウスやラットに飲料水として投与することで、血便や、体重の減少、腸管の長さの短縮、粘膜の潰瘍、および、好中球の浸潤が見られることが知られており、急性腸炎や慢性腸炎のモデル動物として繁用されている。DSS 水溶液の濃度は 3-5%で行う実験系が多く、炎症状態は投与後 1 週間で完成するとされる。本論文では、飲水としての経口投与が容易で機能的にも形態的にも典型的な IBD を惹起する DSS を用いて各種の実験を行った。

## 1-5. 本実験の目的

上述したように、IBD には C-fiber をはじめとした消化管を支配する知覚神経の興奮が大きな役割を果たしている可能性が考えられている。しかしながら、IBD の病態を理解する上で有益な知覚神経の興奮特性に主眼を置いた研究報告は少なく、病態発現機構の全容は未だ明らかにされていない。したがって、IBD における腸管支配知覚神経の興奮特性とその役割を電気生理学的手法や薬理学的手法を用いて明らかにすることは、IBD の病態発現機構の解明や治療・予防法の開発にとって極めて有意義なことと考えら

れる。

そこで、本論文においては、まず、消化管を支配する知覚神経の存在を確認するために起炎剤でもある酢酸を消化管内に投与したときの骨盤神経求心性線維の興奮性の変化を検討した。次に、下部消化管知覚神経の興奮特性を明らかにすることを目的として、DSS を自由飲水させることで作成した IBD のモデル動物を用い、その骨盤神経求心性線維の興奮性の変化をカプサイシンに対する応答性を比較しながら検討した。また、その興奮特性の変化の生理学的メカニズムを考察するために、C 線維を興奮させるカプサイシンの受容体 TRPV1 が含まれる TRP チャネルに着目し、その非選択的阻害薬であるルテニウムレッド(RR)を投与したときの興奮性の変化を検討した。

## 第2章 骨盤神経の化学的侵害刺激に対する応答

### 2-1. 目的

腸炎は、食中毒などによる急性腸炎と、腸管の炎症が慢性的に繰り返される炎症性腸疾患（IBD）などの慢性腸炎に分けられる。症状は、下痢、便秘、嘔吐、吐き気、発熱、腹痛、消化管出血など多岐にわたり、その原因は免疫系の異常、腸内細菌叢の異常、細菌やウィルスなどへの感染症、異物（毒素、毒物）の摂取、精神的ストレス、遺伝的要因などが考えられてきたが、いずれも決定的なものではなく、また急性腸炎の発症件数や IBD の患者数は増え続け、患者の QOL に影響することなどから依然として医学的に大きな関心もたれている。

一方消化管は自律神経の支配を受けており、その神経系には消化管神経叢とよばれる神経ネットワークが存在している。これには粘膜下組織に存在している粘膜下神経叢（マイスナー神経叢）、縦層筋と輪走筋の間に存在する筋層間神経叢（アウエルバッハ神経叢）がある。粘膜下神経叢は主に吸収や分泌などの粘膜の機能を、筋層間神経叢は腸管の運動・知覚を制御しているといわれている。最近になって腸炎の病態形成におけるこれらの神経系による神経原性炎症の関与を示唆する報告がなされてきた。

しかし、これまでの報告では腸炎発症時における知覚神経の興奮性の変化については詳しく調べられていない。そこで、消化管炎症の病態発現における知覚神経の関与を明らかにしたい。本研究ではこのような研究の第一段階として、下部消化管内への化学的刺激に対する知覚神経の応答性を電気生理学的手法を用いて評価することによって、下部消化管の知覚神経に存在するとされる侵害受容器の存在を確かめることを目的とした。

## 2-2. 材料および方法

### 2-2-1. 供試動物および麻酔処置

供試動物として、Wistar Kyoto 系ラット（雄、8-10 週齢、6 匹；フナバシファーム）を用いた。すべての実験はウレタン溶液（1.0g/kg）の腹腔内投与による全身麻酔下で行った。麻酔処置後のラットを仰臥位に保定して実験を行った。結腸内に、薬物（酢酸溶液、カプサイシン溶液あるいは対照溶液）を投与するために、ポリエチレンカテーテル（内径 1 mm、外径 2 mm）を肛門より約 10cm の結腸部位にその先端が位置するように挿入した。

### 2-2-2. 骨盤神経求心性活動の記録方法

骨盤神経を露出し、神経束周囲をパラフィンオイルで満たした後、骨盤神経を周囲の結合組織から剥離し、その中枢端を切断した。

骨盤神経求心性線維の細胞外電気活動を記録するために、神経標本を双極白金電極上にマウントした後、電気信号を高感度増幅器(Bioelectric Amplifier, MEG-1200)を介して、生体電気用増幅器に入力して増幅した。活動電位の出現状況はオシロスコープ(SS5215 SYNCHROSCOPE IWATSY)、およびスピーカーを用いて確認し、サーマルアイレコーダー(NIHON KOHDEN, Thermal Array Recorder)にてモニターを行い、同時にPowerlab(LML-870, ADInstrument PtyLTD, Australia)を用いてデータを保存した。

骨盤神経が結腸内に与えられた化学的侵襲刺激（酸刺激）に応答するか否かを明らかにするために、下記の腸管内酢酸刺激を行った。

### 2-2-3. 結腸内への化学的侵害刺激

5% (pH=2.1, n=6)、10% (pH=1.8, n=6) および 25 % (pH=1.4, n=6) の酢酸溶液（0.5 ml）を前述の直腸カテーテルを介して下部結腸内に 30 秒間かけて投与を行い、骨盤神経の求心性神経活動を薬物投与前 90 秒間（対照記録）と薬物投与後 10 分間にわたって

連続記録した。

酢酸刺激に応答した骨盤神経活動がカプサイシンによっても刺激を受けるか否かを明らかにするために、下記の実験を行った。

カプサイシン (Sigma) を Tween80 (1%) とエチルアルコール (10%) を溶媒に用いて懸濁し、最終的に生理食塩水で希釈して、1mg/ml になるようにカプサイシン原液を作成した。静脈内投与用にはその原液をさらに生理食塩水で希釈し、10.0  $\mu$ g/ml のカプサイシン溶液を作成した。このカプサイシン溶液を、投与量が 10.0  $\mu$ g/kg となるように静脈内投与を行った。薬物投与前 90 秒間の対照記録を行った後、30 秒間かけて投与を行い、その後の神経活動を 3 分連続記録した。

#### 2-2-4. データ解析

骨盤神経求心性線維の記録から、放電頻度 (Imp./30s) を測定した。放電数はサーマルアイレコーダーの記録紙より目視により計測するか、必要に応じて前述した powerlab を用いて、解析を行った。

統計解析は有意差検定として、刺激前後の比較に、Wilcoxon' s signed rank sum test を用いた。危険率 5 %未満をもって有意差とみなした。

### 2-3. 結果

#### 2-3-1. 酢酸投与による骨盤神経活動

酢酸 (5, 10, 25%) 刺激時における骨盤神経求心性活動の記録例を Fig. 1 に、またその際の骨盤神経求心性活動放電頻度の 30 秒ごとの経時的変化を Fig. 2 に示す。5%、10%、25%いずれの濃度においても、酢酸投与直後から骨盤神経の求心性活動の増加が認められ、放電頻度の増加度は濃度依存性を示した。放電頻度の増加は投与後 10 分間にわたって認められたが、5%および 10%の酢酸では投与直後の 30 秒間で最大を示したのに対し、25%の酢酸では、投与直後から放電頻度が増加するとともに、投与後 120-180 秒

間にわたって最大反応が持続した。

Fig. 3 において酢酸投与後の骨盤神経求心性活動の最大反応時における放電頻度を、投与前の放電頻度と比較した。またその最大反応時と投与前の放電頻度の比を変化率として表し、これを各群間で比較した。5%酢酸投与時には投与前で 44.7imp./30s を示し、最大反応時で 59.8imp./30s (133.8%) を示した。また 10%酢酸投与時には投与前で 46.2imp./30s を示し、最大反応時で 74.3imp./30s を示した。さらに 25%酢酸投与時には投与前で 40.4imp./30s を示し、最大反応時に 115.8imp./30s を示した。いずれも有意 ( $p < 0.05$ ) に増加した。また、変化率は 5%酢酸投与群で 133.8%、10%酢酸投与群で 158.9%、25%酢酸投与群で 286.6%であった。

#### 2-3-2. カプサイシン刺激時の骨盤神経活動

上記の酢酸刺激の後に同一の神経標本から記録した  $10 \mu\text{g/kg}$  のカプサイシン静脈内投与に対する応答性を Fig4 に示す。5%酢酸を投与することで増加した放電と同程度の振幅（電位）をもつ神経放電頻度は、カプサイシンを投与することでさらに増加した。30 秒あたりの骨盤神経放電頻度はカプサイシン投与前 30 秒間の 19.8imp./sec から投与後 30 秒間の 91.0imp./sec へと著しく増加した。次の 30 秒間も 62.7imp./sec と高い値を保ち、その後放電頻度は投与前の水準まで減少した。

#### 2-4. 考察

酢酸溶液は急性の潰瘍性大腸炎を誘起することが知られており、腸炎の発生机序に関する基礎的研究に用いられている (Kim, H. S. and Berstad, A., 1992; Jurjus, A.R., 2004)。また、粘膜に分布する C 線維を刺激する疼痛モデルとしても用いられている (Yoshioka, K. et al.; Wang, Y.Y. et al., 2011)。本研究で酢酸を結腸内投与したところ、結腸の血管の黒色への変色が肉眼的に観察された。これは血栓の発生を示すものと考え

られる。酢酸によって発生する腸炎は潰瘍の発生を主徴とするが、その発生原因の一つには、この血栓形成による局所的虚血があることが知られている。本実験の酢酸の結腸内投与で、下部消化管に潰瘍ができたかどうかは定かではないが、この局所的な虚血状態によって、炎症細胞の動員による炎症反応、また粘膜の傷害が起きていた可能性は考えられる。

本実験では骨盤神経における化学的侵害受容の有無を明らかにするために、5、10、25 %の酢酸 0.5 ml の結腸内投与を行った。その結果、酢酸の下部消化管作用によって骨盤神経の興奮性が高まることがわかった。また、酢酸に応答した神経はカプサイシンによっても明瞭に刺激された。これらの成績から、化学的侵害刺激に応答する受容器（知覚神経）が骨盤神経中に含まれ、これらの知覚神経は下部消化管に対する化学的侵害刺激情報を中枢神経系や腸管内の神経叢に伝導するものと考えられた。本研究における骨盤神経は、酢酸によってもたらされるプロトンの増加によって刺激されたのか、あるいは酢酸のような短鎖脂肪酸による腸粘膜刺激の結果、二次的に骨盤神経が刺激を受けたのかは議論の余地がある。一次知覚神経などには陽イオンチャネルの一種である酸感受性イオンチャネル（ASICs）が存在することが知られている（Dubé, G. R., 2009）。ASICsを構成するイオンチャネルは様々な臓器で知られているものの、酸刺激のメカニズムはまだ十分にはわかっていない。プロトンは侵害受容器（C線維）のTRPV1チャネルなどTRPチャネルに対する刺激作用が存在することが知られている（Tominaga, M. and Tominaga, T., 2005; Dubé, G. R., 2009; Wang, Y.Y. et al., 2011; Rosenbaum, T., ; Caterina, M. J., 1997, 2001; Julius, D., 2001）。本研究では、酢酸刺激の直後から明瞭な応答が認められたことから、このようなTRPチャネルへの直接作用が主として関与しているものと思われる。一方、酢酸のような短鎖脂肪酸は腸粘膜上皮におけるカリウムなどのイオン輸送刺激作用があることや、また前述のような局所的な虚血状態によって動員された炎症細胞から放出されたプロスタグランジンなどの発痛物質による知覚

神経への刺激作用も考える。しかしながら、これらのメカニズムによる骨盤神経への影響は二次的なものであり酢酸刺激の直後には現れにくいものと推測される。

気道粘膜や皮膚に存在するカプサイシン応答知覚神経（侵害受容器）は無髄神経の C 線維であることが知られている。このような C 線維の興奮は、軸索反射機構を介して、局所の炎症性変化の発現に関与していることが明らかになっている。そのメカニズムとしては、各種炎症性メディエーターや浸透圧変化などの環境変化による影響を受けやすくなった（知覚過敏となった）知覚神経が、その興奮を中枢に伝えるとともに軸索側枝を介して逆行性に神経末端に伝わり、サブスタンス P、ニューロキニン A、CGRP といった種々の神経ペプチドを放出するというものであると考えられている。今回記録した骨盤神経中の C 線維がそのような軸索反射機構を有しているかどうかは明らかではないが、本実験における酢酸の結腸内投与によって、この機構が消化管においても生じており、その結果、神経ペプチドの放出によって炎症反応（疼痛、痛覚過敏、消化管粘膜の分泌、消化管運動機能の異常）の促進が起こっている可能性は否定できない。

なお、De Schepper H. U. らは、神経伝導速度の測定から、ラットの骨盤神経には約 60% の C 線維と約 40% の A $\delta$  線維が含まれていることを明らかにしている。この報告は本章において骨盤神経がカプサイシンによって明瞭に刺激された知見と矛盾しない。

## 2-5. 小括

本章においては、下部消化管の起炎剤としても用いられる酢酸をラット結腸内に投与したときの、下部消化管を支配する知覚神経である骨盤神経の応答性を検討した。本章の結果から、下部消化管には有機酸に応答する侵害受容器の存在が明らかになった。

起炎剤である酢酸に下部消化管を支配する知覚神経が応答するということは、下部消化管の炎症に知覚神経の興奮性が関与している可能性を示唆する知見である。骨盤神経による軸索反射を介して神経原性炎症を生じ、下部消化管炎症を起こしている可能性が



考えられる。

次章では、広く用いられている腸炎モデル動物を用い、下部消化管に対する侵害刺激に対する知覚神経の応答性を考察することで、下部消化管炎症の成立に、知覚神経の応答性の関与について検討する。

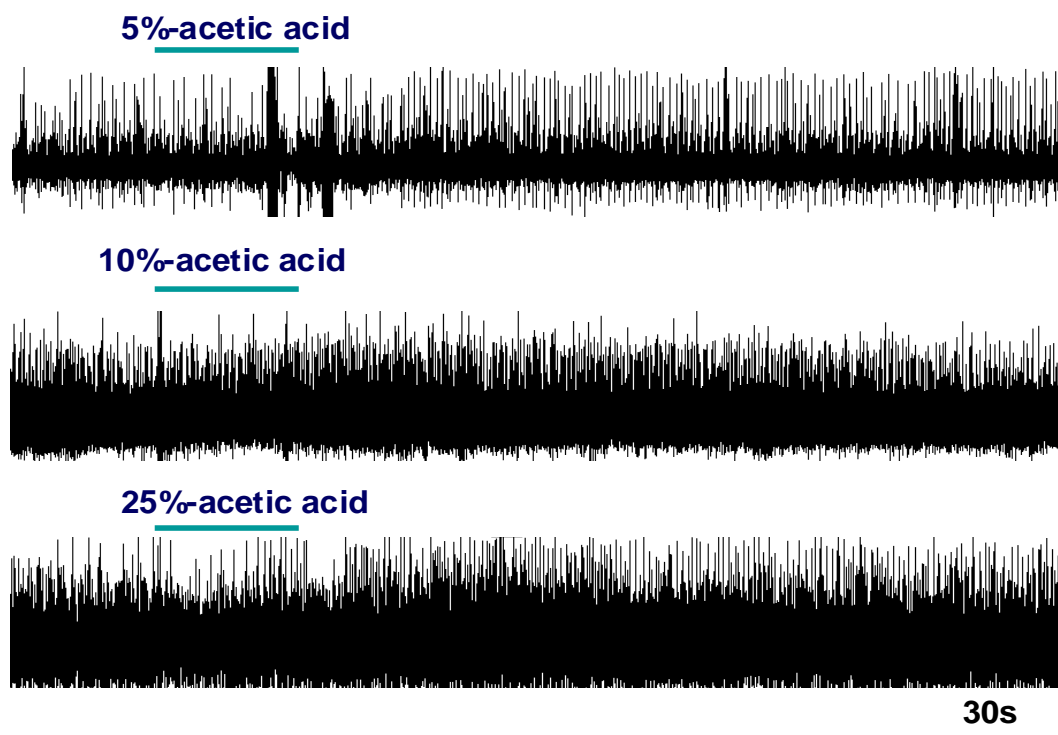


Fig. 1. Afferent activities of the pelvic nerve in response to the colonic instillation of acetic acid solution. The horizontal bar in each record shows the instillation of acetic acid.

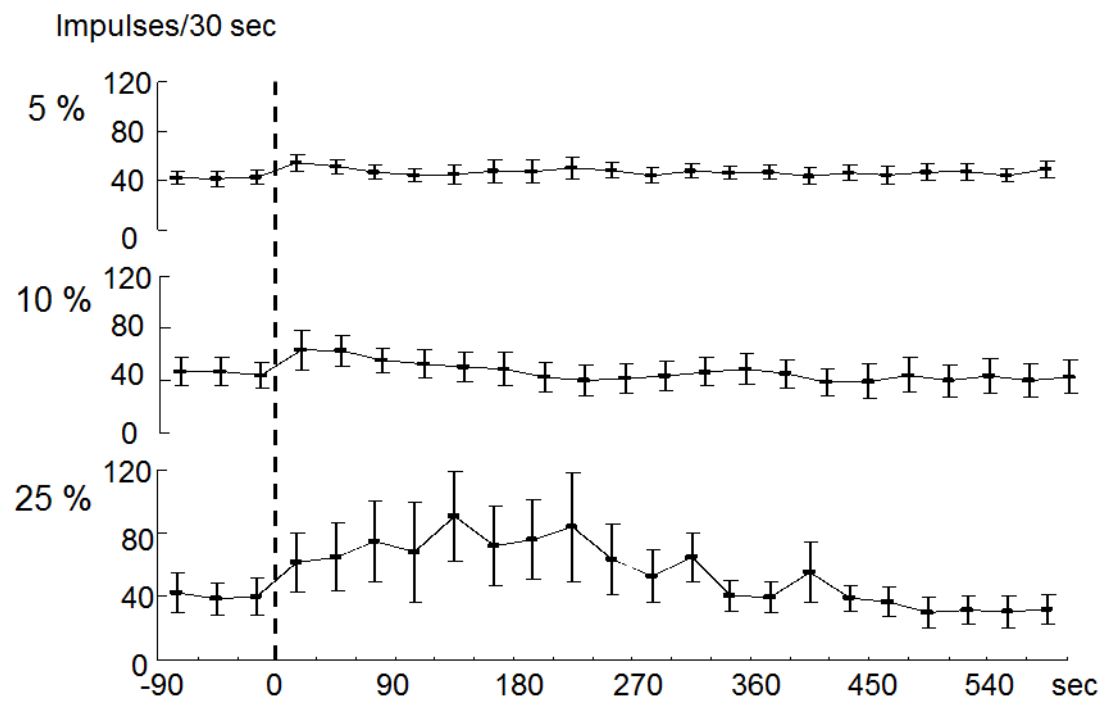


Fig.2. Time-course changes of afferent activities in the pelvic nerve before and after the colonic instillation of acetic acid solution. All plotting data are expressed as means  $\pm$  SE of 6 rats.

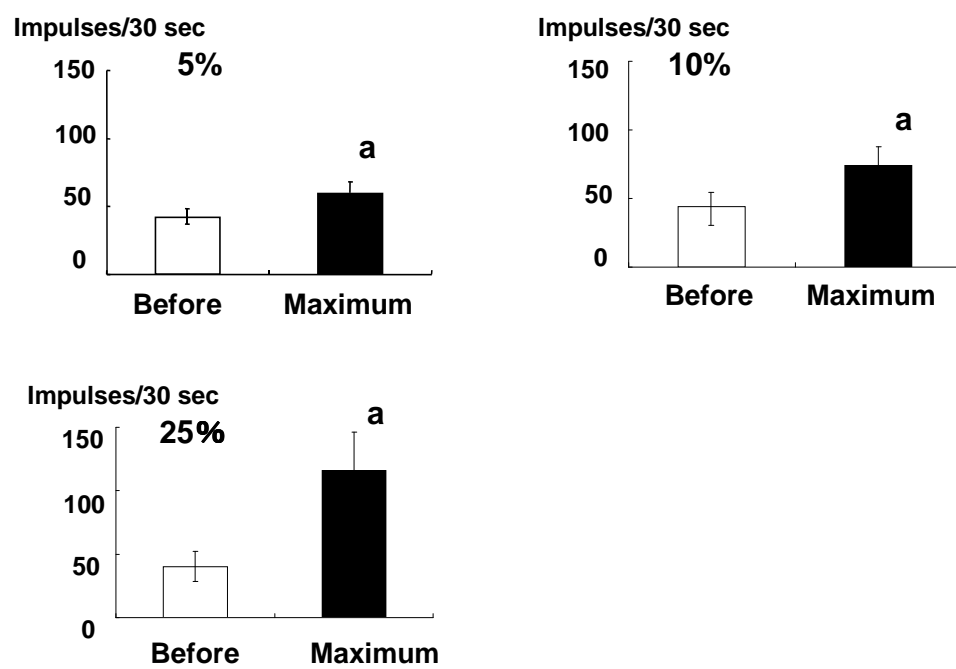


Fig. 3. Comparison of the maximum responses to 5 to 25 % acetic acid solution.

All data are expressed as means  $\pm$  SE of 6 rats. a:  $P < 0.05$  vs before instillation of acetic acid.

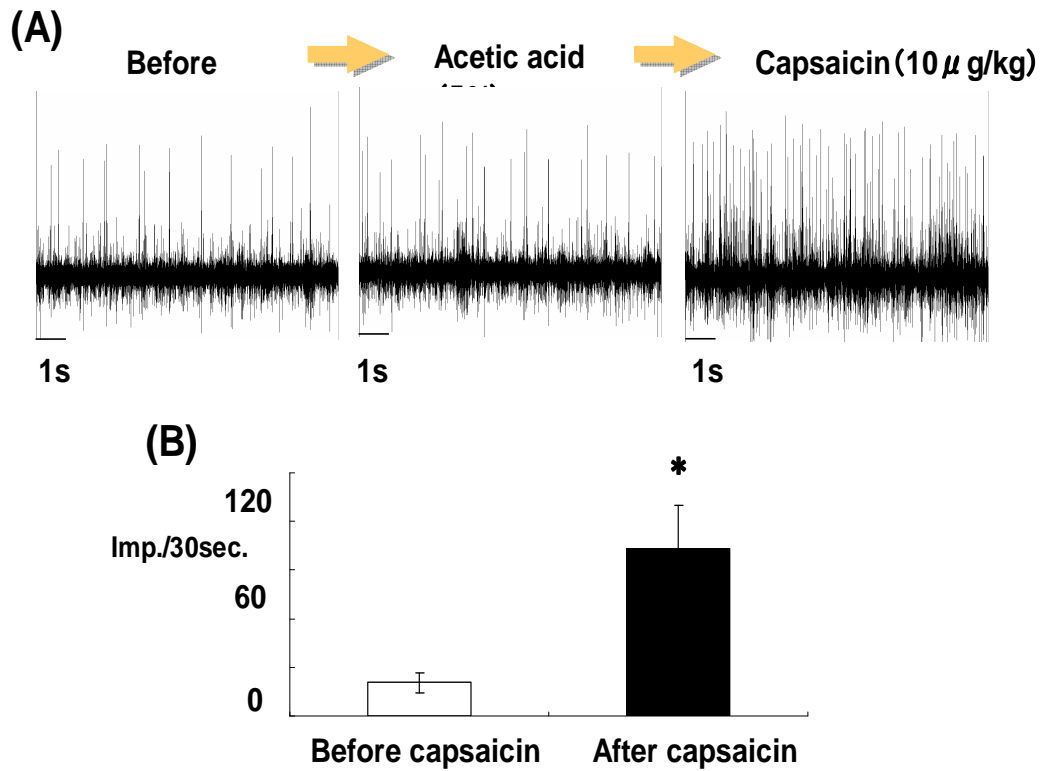


Fig.4 The pelvic nerve afferent activities in response to the intra-colon administration of acetic acid and to the intravenous administration of capsaicin

- (A) Recordings of the pelvic nerve activities. The same nerve preparation responding to acetic acid (5%) was markedly stimulated by capsaicin (10  $\mu$  g/kg)
- (B) Comparison of the pelvic nerve afferent activity immediately before and after the administration of capsaicin (10  $\mu$  g/kg)

## 第3章 腸炎モデル動物における骨盤神経の化学的侵害受容

### 3-1. 目的

前章においてラットの骨盤神経には化学的侵害刺激に対して明瞭に応答する知覚線維が含まれることが明らかになった。しかしながら、前章における化学的刺激は正常なラットを用いて極めて短時間の急性反応を観察したものであることから、より実際のIBDに近い条件下での骨盤神経の化学的侵害受容を調べる必要がある。そのため、本省では適切な腸炎モデル動物を作製して、そのようなモデル動物における応答性を観察することにした。

そこで本研究では、DSS 腸炎モデルラットに対する下部消化管（結腸、直腸）への侵害刺激に対する骨盤神経求心性線維の応答性を調べることを目的とした実験を行った。なお、DSS 腸炎モデルラットは潰瘍性大腸炎の代表的なモデル動物として広く用いられている。1%以上のDSS水溶液を5日以上与えると、典型的な腸炎が誘導され、体重減少、血便・下痢指数の上昇、腸管の肥厚・長さの短縮、大腸粘膜の潰瘍といった徴候を示すことが報告されている。

### 3-2. 材料および方法

#### 3-2-1. DSS 腸炎モデルラットの作出

DSS 腸炎モデルラットを作出するために、Wistar Kyoto 系ラット（8-10 週齢）に腸炎を引き起こすべく、DSS を水道水に溶かした 5% の DSS 水溶液を 1 日（DSS-1 群、N=6）または 8 日間（DSS-8 群、N=6）飲水として与えた。一方、DSS 投与期間中に対応する期間中に Wistar Kyoto 系ラット（8-10 週齢）に水道水のみを与え対照群（non-DSS 群、N=6）とした。DSS 腸炎モデルラットについては、血便、下痢の有無を肉眼で観察した。なお、最終日（骨盤神経記録の前日）に 24 時間の絶食を行った。

### 3-2-2. カプサイシン刺激による骨盤神経応答

#### 3-2-2-1. 供試動物および麻酔処置

実験は Wistar Kyoto 系のラット (8-10 週齢) を用いて行った。各個体をウレタン (1.0 g/kg) で全身麻酔を施した後、仰臥位に保定した。結腸内約 10 センチの部位に生理食塩水を充満させたポリエチレンカテーテルを挿入し、薬物の投与を可能とした。

次に、右側骨盤神経を露出し、神経束周囲をパラフィンオイルで満たした後、骨盤神経を周囲の結合組織から剥離し、その中枢端を切断した。

#### 3-2-2-2. 神経活動記録方法および薬物の投与方法

骨盤神経求心性線維の細胞外電気活動を記録するために、上記の切断部位より末梢側 (結腸側) から求心性神経活動を記録した。末梢側の神経標本 (神経束) を双極白金電極上にマウントした後、神経興奮に伴う電気信号 (活動電位) を低雑音前置増幅器 (Biomedical Amplifier, MEG-1200、日本光電) および生体電気用増幅器に入力して増幅した。活動電位の出現状況をオシロスコープ (SS-5215 Synchroscope, Iwatsu) およびサーマルアイレコーダー (Thermal Array Recorder、日本光電) を用いて観察するとともに、データ信号を A-D converter (PowerLab 8/30, ADInstruments Pty. Ltd, Japan) および digital tape recorder (PC208, SONY) に保存した。保存されたデータは実験終了後の神経放電数の測定に充てた。

DSS 群および non-DSS 群において、骨盤神経の神経活動を記録しながら薬物投与前 90 秒間の対照記録を行った後、30 秒間かけてカプサイシン溶液 ( $100 \mu\text{g/ml} \cdot 0.5 \text{ ml}$ ) を直腸カテーテルを介して下部結腸内への投与を行い、その後神経活動を 10 分間連続記録した。

#### 3-2-2-3. 投与薬物の調整

カプサイシン溶液は Tween80(1%) とエチルアルコール(10%) を溶媒に用い、最終的に

生理食塩水で希釈して、1 mg/ml になるように原液を作成した。静脈内投与用にはその原液をさらに生理食塩水で希釈し、100  $\mu$ g/ml のカプサイシン溶液を作成した。

### 3-2-3. データ解析

骨盤神経求心性線維の記録から、放電頻度を測定した。測定は上述の解析用ソフトウェア PowerLab を用いて、活動電位の高さに対して計測レベル（閾値）を一定に設定し、自動計測により行った。

統計解析は有意差検定として、刺激前後の比較には Wilcoxon's signed rank sum test を用い、また対照群と DSS 群との比較には Mann-Whitney's U-test を用いた。危険率 5 % 未満をもって有意差とみなした。

### 3-4. 結果

DSS-8 群ではすべての個体に下痢、血便が観察された。DSS-1 群ではすべての個体において、軟便が観察されたものの、下痢や血便は観察されなかった。non-DSS 群についてはすべての個体において便の性状は正常であった。

non-DSS 群、DSS-1 群および DSS-8 群におけるカプサイシン刺激時の骨盤神経求心性活動の記録例を Fig. 5 に、また 30 秒ごとの経時的変化(平均値、各群 6 匹)を Fig. 6 に示す。すべての群の個体においてカプサイシンを結腸内に投与した際の放電頻度は投与開始前に比べて明瞭な増加を示した。特に DSS-1 群では放電数の増加が他の群に比べて大きかった。

カプサイシン刺激による放電頻度の増加はすべての群で投与直後の 90 秒間で明瞭であり、さらに DSS-1 群では投与後 300 秒以降においても明瞭な増加が示された。投与直後の 90 秒間においては、non-DSS 群および DSS-1 群においては、カプサイシン刺激により、投与前に比べて有意に増加 (non-DSS 群 : 47.9 imp./30s v.s. 34.5 imp./30s,



DSS-1 群 : 55.7 imp./30s v.s. 39.7 imp./30s) ( $p<0.05$ )した。また、DSS-8 群においても増加する傾向 (43.8 imp./30s v.s. 36.0 imp./30s) が示された (Fig. 7)。non-DSS 群では投与後 300 秒以降で放電頻度が減少し、投与前のレベルにまで戻ったのに対して、DSS-1 群および DSS-8 群においては 300~600 秒後においても放電頻度の持続的な増加が観察された。すなわち、DSS-1 群で 54.9 imp./30s、DSS-8 群で 41.6 imp./30s の放電数が示された( $p<0.05$ ) (Fig. 7)。

カプサイシン投与前後における放電頻度の変化を最大応答時と投与前との間で比較して Fig. 8 に示す。non-DSS 群、DSS-1 群、DSS-8 群のすべての群において、100  $\mu$  g/ml のカプサイシン 0.5 ml の結腸内刺激によって、その最大応答時の 30 秒間において投与前に比べて有意な骨盤神経放電頻度の増加が見られた (non-DSS 群 : 58.1 imp./30s v.s. 34.5 imp./30s, DSS- 8 群 : 53.8 imp./30s v.s. 36.0 imp./30s , DSS-1 群 : 79.5 imp./30s v.s. 39.7 imp./30s) ( $p<0.05$ )。また、DSS-1 群は non-DSS 群および DSS-8 群に対して有意に高い放電頻度が示された( $p<0.05$ )。

### 3-5. 考察

本実験において、骨盤神経求心性線維より、カプサイシン応答性受容器の活動を記録しながら 100  $\mu$  g/ml のカプサイシンの結腸内投与を行った。DSS を投与した群では、水道水のみを投与した non-DSS 群に比べて侵害刺激による骨盤神経求心性活動の増加が持続する傾向が見られた。また DSS-1 群ではほかの群に比べて骨盤神経活動の増加の度合いが有意に高かった。さらに DSS を用いた腸炎誘導の早い段階から知覚神経の侵害受容性が高まった。

このように DSS 処置によってカプサイシンに対する応答性が変化したメカニズムには、DSS を用いた惹起された腸炎によって、腸内の酸化ストレスや、浸透圧の変化、炎症性サイトカインの増加などによる C-fiber の器質的、機能的な変化が起きているこ

とで、刺激に対する受容性が亢進していることが想定される。

本章の実験結果より、DSS 腸炎モデル動物では、骨盤神経中に含まれる C 線維 (C-fiber) の侵害受容性が高まっているものと思われる。C 線維が刺激を受けると、神経原性炎症 (neurogenic inflammation) が生じる可能性が考えられる。神経原性炎症は、C 線維に多く含まれる神経ペプチドが関与していることが知られている (Barnes P. J., 1986; Holzer, P., 1988)。活動電位伝導速度の測定結果などからラットの下部消化管を支配する骨盤神経知覚神経の約 60% は C 線維である (De Schepper, H. U., 2008) とされることから、C 線維が下部消化管の侵害受容を担っていることは十分に考えられる。

DSS 腸炎は DSS そのものが大腸粘膜を傷害すると考えられており、その作用機序としては、硫酸多糖類が多陰イオンの状態で大腸腔内に存在するため、これらの硫酸多糖類の強力な負の電気状態が、大腸機能の防御機構を妨げることにより潰瘍を形成すると報告されている (Watt, J. and Marcus, R., 1975)。このように DSS が直接的に大腸粘膜を傷害することで、その後の炎症細胞の動員が行われ、その結果、炎症性サイトカインの放出や炎症細胞の動態によるさまざまな炎症反応 (Abraham, R., 1974; Okayasu, I., 1990; 滝澤, 1992) や、好中球からの活性酸素の放出による酸化ストレスが発生する (近藤ら, 1991) こと、また腸内細菌叢の構成が変化する (大草, 1985; 1987) ことで大腸炎の病態が形成されることが考えられる。

今回の実験で用いたカプサイシンは TRPV1 (transient receptor potential vanilloid type 1 receptor) の作動薬である。TRPV1 は消化管知覚神経に発現が見られ、カプサイシンのほかにも、43°C 以上の熱や、酸 (プロトン)、脂質によっても活性化されることが知られている (Caterina, M. J., 1997; Davis, J. B. et al., 2000; Tominaga, M. et al., 1998)。その活性化が活動電位を惹起し、疼痛を惹起する。炎症時には、種々の炎症性メディエーターによる PKC および PKA を介したリン酸化を通して TRPV1 の活性が

増強され、疼痛の増大をもたらすとされている(沼崎と富, 2003; Dai, Y.,2004; Moriyama, T. et al., 2005)。

本研究では、DSS によって誘導された下部消化管炎症の初期から、このような炎症性メディエーターによる TRPV1 の活性化の増強がなされており、その状態が持続していることが考えられる。肺の知覚神経では、TNF- $\alpha$  の前投与によってカプサイシンによる細胞内 Ca 濃度のピーク値が増大することが報告されている(Hu, Y. et al., 2010)が、下部消化管の知覚神経でも同じようなメカニズムが起こっていることが想定される。一方、炎症状態が持続してこのように流入したカルシウムと結合したカルモデュリンが TRPV1 に結合してチャネルの不活化をもたらす、「細胞外カルシウム依存性の脱感作」がおこることで、侵害受容器の受容能が低下することが考えられる(Mohapatra, D. P. and Nau, C. , 2005; Numazaki, M. 2003)。一方、カプサイシンによる侵害刺激によって傷害部位や炎症細胞から放出される炎症性メディエーターの放出が増加することで、持続的な知覚神経の興奮が起こると考えられる。

一方、本章における実験結果では、DSS-8 群は DSS-1 群に比べて、カプサイシン投与後の最大応答が低下することが示された。腸炎モデル動物では、結腸内でサイトカインをはじめ様々な炎症性メディエーターの発現性が増大することが知られている (Islam, M. S et al., 2008 ; Ohama T. et al.,2007)。それらの炎症性物質の中でも重要な役割を担っている物質として TNF  $\alpha$  の存在が挙げられる。最近の研究では、TNF  $\alpha$  は 24 時間以内の比較的短時間の作用では侵害刺激 (TRPV1 刺激) に対する神経応答を増大させるが、それ以上の長時間に及ぶ作用では侵害刺激に対する神経応答の増大が減弱することが示されている (Hu, Y. et al., 2010)。DSS 誘発腸炎では、このような炎症性メディエーターによる侵害受容器への修飾作用が経時的に変化しているものと推測され、そのことが DSS-8 群が DSS-1 群に比べて弱いカプサイシン応答性を示す要因になった可能性が示唆される。

### 3-6. 小括

本章においては、DSS を 1 週間飲水に含ませて与えることで腸炎を誘導したラットを用いて実験を行い、腸炎と骨盤神経の興奮性(刺激物質に対する反応性)について考察した。本章の結果からは下部消化管の炎症による、骨盤神経の侵害受容性の亢進が認められた。このことから、DSS に誘導された下部消化管の炎症によって C 線維が機能的に変化し、侵害受容性の亢進をもたらすことで、下部消化管炎症の成立に関わっていることが示唆された。

下部消化管の C 線維の応答性が亢進しているということは消化管における酸や内容物などの刺激に反応した結果、軸索反射を介して神経原性炎症を生じ、下部消化管の炎症を呈しやすい状態が形成されていることが推測される。さらに、刺激に応答しやすいということは、通常なら反応しない程度の刺激であっても、骨盤神経の興奮を誘発し、下部消化管の知覚過敏状態にあるということも考えられる。

一方、炎症病態の形成された急性期においては、ごく初期に比べては、侵害刺激に対する応答性が抑制される結果となり、持続的な炎症による侵害刺激によって知覚神経の応答性が変化することがこの実験より明らかになった。

本章では、下部消化管炎症によってそこを支配する知覚神経の応答性が変化し、その病態の成立に関与していることを示唆する結果が得られた。知覚神経の応答性の亢進が下部消化管炎症の重要な原因のひとつであることが推察された。

次章では、下部消化管炎症によって知覚神経が興奮する生理的メカニズムを詳細に検討するべく、代表的な侵害受容レセプターである TRP チャネルを薬理的に遮断したときの、腸炎モデルラットにおける知覚神経応答性の変化を検討する。

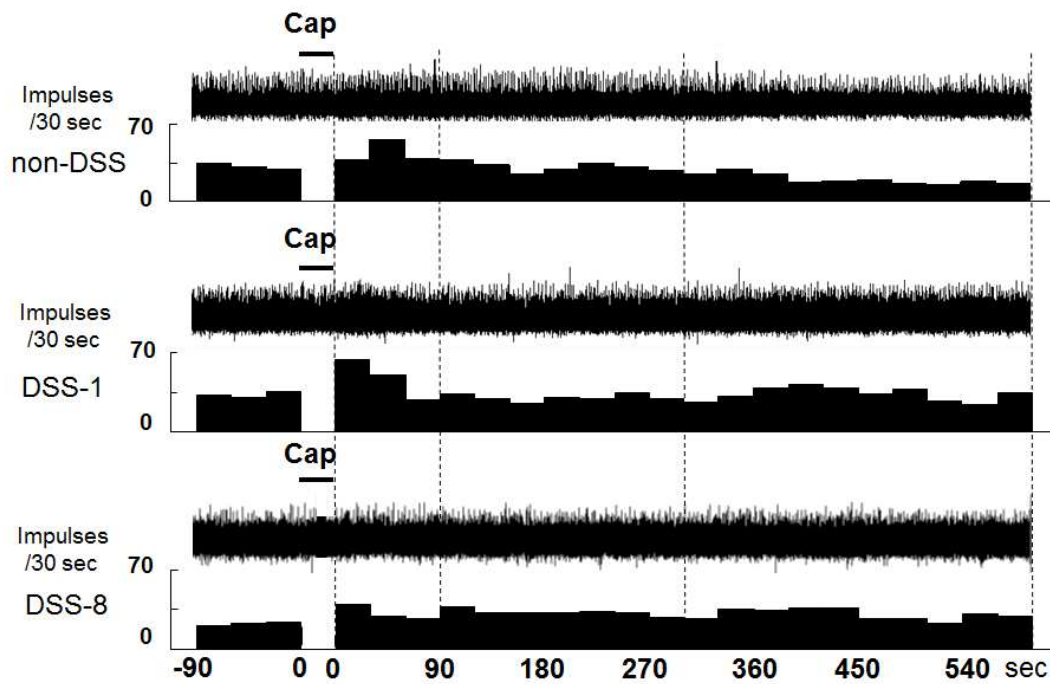


Fig. 5. Afferent activities of the pelvic nerve in response to the colonic instillation of capsaicin solution (100  $\mu\text{g/ml}$ , 0.5 ml) in rats. non-DSS: Recording from a normal rat in the non-DSS group. DSS-1: Recording from a rat in the DSS-group on one day after DSS administration. DSS-8: Recording from a rat in the DSS group on 8 day after DSS administration. The upper and lower graph in each panel for the groups shows the nerve recording and a histogram of the discharge frequency for every 30 seconds, respectively.

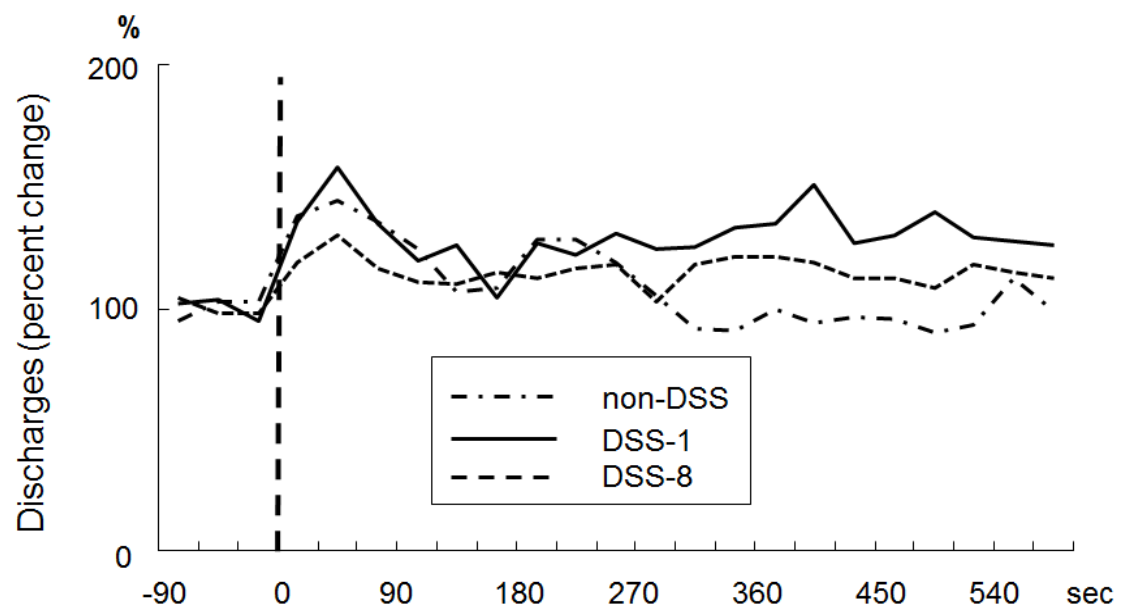


Fig. 6. Time-course changes of the pelvic nerve's afferent activity in response to the colonic instillation of capsaicin in the non-DSS, DSS-1 and DSS-8 groups. The vertical dashed line shows the instillation of capsaicin (100  $\mu$ g/ml, 0.5 ml).

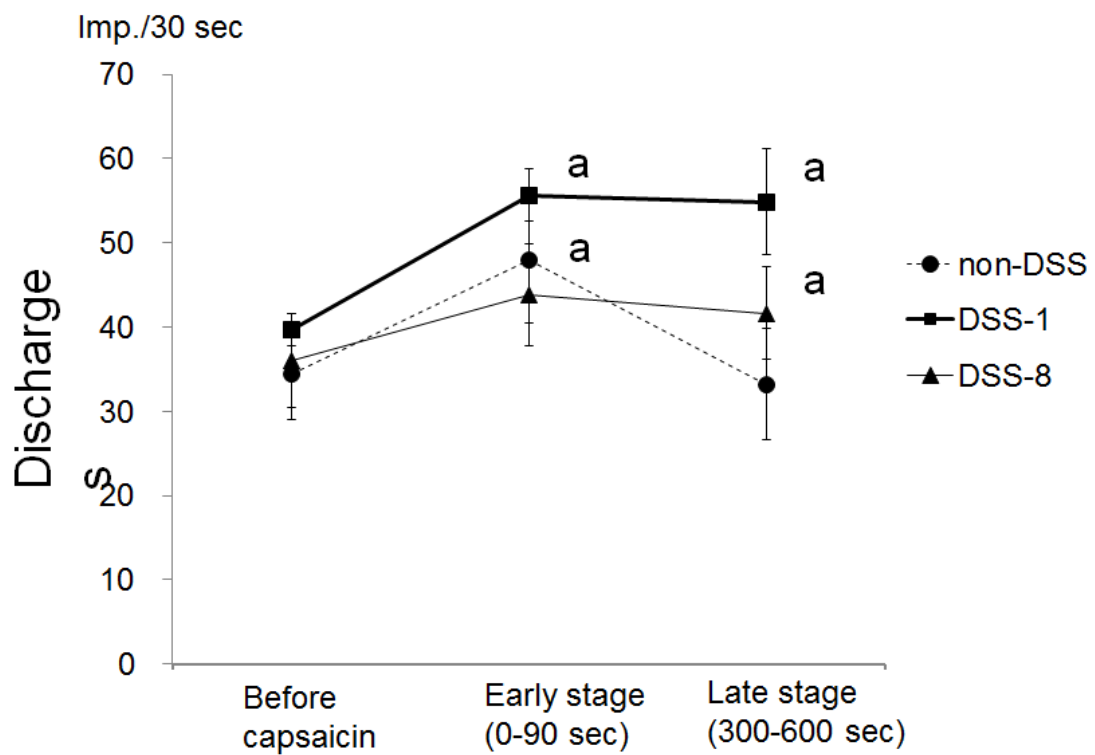


Fig. 7. Averaged changes in the pelvic nerve's afferent activity before and after the capsaicin instillation in the non-DSS, DSS-1 and DSS-8 groups. a:  $P < 0.05$  v.s. before capsaicin. All data are expressed as means  $\pm$  SE of 6 rats.

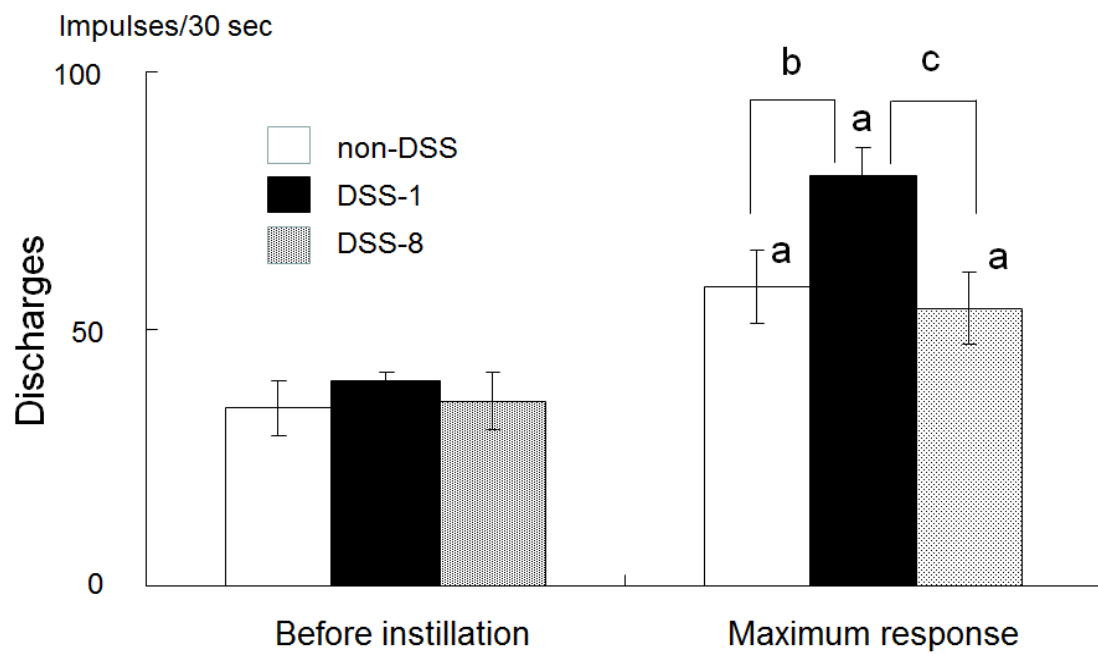


Fig. 8. Comparison of the maximum responses to colonic instillation of capsaicin.

a: Significant difference ( $P < 0.05$ ) compared with the before instillation. b: Significant difference ( $P < 0.05$ ) between the non-DSS and DSS-1 groups. c: Significant difference ( $P < 0.05$ ) between the DSS-1 and DSS-8 groups. All data are expressed as means  $\pm$  SE of 6 rats.



## 第4章 腸炎モデル動物における骨盤神経の化学的侵害受容 における TRP チャネルの関与

### 4-1. 目的

前章では、腸炎モデル動物において、下部消化管に存在する知覚神経の応答性が、腸炎誘導後に増強することを示し、その応答性の亢進が、腸炎の病態形成に関わっていることを示唆した。本章では、このような腸炎モデル動物における下部消化管の知覚過敏の生理的なメカニズムを検討することを目的とする。

そこで本章では、骨盤神経の侵害受容器(C 線維)が持っている分子受容器のうち代表的なものである TRP チャネルに焦点を当てた。このチャネルの非選択的阻害薬であるルテニウムレッド (ruthenium red) を用いて、DSS 腸炎モデルラットにおける骨盤神経活動の変化を観察した。

### 4-2. 材料と方法

#### 4-2-1. 供試動物

供試動物および骨盤神経からの記録方法は前章に準じて行った。すなわちラットを前章と同様に、non-DSS、DSS-1、DSS-8 の 3 群にわけた上で、さらにそれぞれの群においてルテニウムレッドの投与の有無によって 2 群に分けた(各群、n=6)。

#### 4-2-2. 神経活動記録方法および薬物の投与方法

最初に骨盤神経の神経活動を 90 秒間記録(対照記録)した。次いで、ルテニウムレッドを静脈内に投与して 2 分間の連続記録を行った後、前章と同様の方法でカプサイシン (100  $\mu$ g/ml、0.5 ml) の結腸内投与を行い、10 分間にわたって神経活動を連続的に記録した。

#### 4-2-3. データ解析

骨盤神経求心性線維の記録から、放電頻度を測定した。測定は上述の解析用ソフトウェア PowerLab を用いて、活動電位の高さに対して計測レベル（閾値）を一定に設定し、自動計測により行った。

統計解析は有意差検定として、刺激前後の比較には Wilcoxon' s signed rank sum test を用いた。また前章で測定した動物群をルテニウムレッドの前投与を行わなかった群として扱い、本章で測定したルテニウムレッドの前投与を行った実験群と比較した。それらの群間の比較には Mann-Whitney' s U-test を用いた。危険率 5%未満をもって有意差とみなした。

#### 4-3. 結果

non-DSS 群、DSS-1 群および DSS-8 群の 3 群において、ルテニウムレッド (RR) を前投与した群とルテニウムレッドを前投与していない群 (control) について、カプサイシン結腸内投与による骨盤神経応答の経時的変化を Fig. 9 に示す。

上記の 3 群においてカプサイシンの投与前 90 秒間の記録では RR を投与した群では、RR 群は control 群にくらべてやや少ない放電数を示したが、有意な変化ではなかった (Fig. 10)。RR の前投与がない control 群では、カプサイシンの結腸内投与によって骨盤神経求心性線維の放電頻度の増加が観察された (第 3 章)。一方、RR を前投与した群では、カプサイシン投与後の放電数の増加度が明らかに低かった (Fig. 9)。RR 前投与群では、カプサイシン投与直後の一過性の放電数の増加が観察されたが、その後は放電数の増加が抑制された。とくに DSS-1 群では control 群での高いカプサイシン応答性にくらべて RR 群の放電数は記録した全時間で低い状態で維持された。

RR 群と control 群における、骨盤神経のカプサイシンに対する最大応答時の放電数の比較を Fig. 11 に示す。DSS 群では、RR の前投与によって、カプサイシンの投与によ

る骨盤神経求心性線維の放電頻度の増加が抑制されたが (Fig. 11 B, C)、正常ラットの群では RR の前投与の有無に関わらず、カプサイシンの結腸内投与による骨盤神経放電頻度の増加が観察された (Fig. 11 A)。

RR 前投与の影響について、カプサイシン投与後 300-600 秒 (late stage) の骨盤神経求心性線維の放電頻度を、non-DSS 群、DSS-1 群、DSS-8 群の各群で比較した結果を Fig. 12 に示す。DSS-1 群 (Fig. 12, B) では、RR の前投与によって late stage の放電頻度の有意な減少 ( $P < 0.01$ ) が観察された。それに対し他の群では、late stage における放電頻度は、RR の前投与の有無による相違は認められなかった (Fig. 12, A, C)。

#### 4-4. 考察

本研究では、TRP チャンネルの非選択的阻害薬である RR の前投与の有無による、カプサイシン結腸内投与に対する骨盤神経求心性線維の活動の変化を評価した。その結果、DSS による腸炎を惹起した群、すなわち DSS-1 群と DSS-8 群においては、カプサイシン結腸内投与による骨盤神経求心性線維の放電頻度の増加が抑制されることが分かった。

この実験結果から DSS 腸炎モデルラットでは、カプサイシンによる侵害刺激に対する骨盤神経応答の増加には TRP チャンネルが関与していることが明らかになった。その機序としてはまず、カプサイシンによる TRPV1 の活性化→カルシウム濃度の上昇→活動電位の発生促進といった経路が考えられる。また、C 線維の興奮による CGRP や SP といった神経ペプチドの放出の増加も可能性としては考えられる。また、前章で述べたように  $\text{TNF}\alpha$  のようなサイトカインが神経興奮を促進する方向に作用している可能性も考えられる。いずれにしても、DSS 腸炎モデルラットでは、DSS 腸炎誘発の初期段階、すなわち 1 日目においてすでに TRP チャンネルを介した侵害受容機構が亢進していることが明らかになった。

TRP チャンネルに関する過去の研究では、2003 年に TRPA1 というサブタイプの存在が確

認された。TRPA1 は 17℃以下の侵害性冷刺激によって活性化される新たな温度感受性 TRP チャンネルとして報告されている (Story, G. M., 2003)。TRPA1 は主に感覚神経細胞である C 細胞の細胞体に発現し、TRPV1 との共発現が観察されたことから、このチャンネルも侵害刺激受容に関わっていると考えられている。TRPA1 はマスタードやシナモン、生ニンニクの成分である allylisothiocyanate (AITC) によって活性化されることが報告されている (Dhaka, A. et al., 2006; Talavera, K. et al., 2008)。そのため、TRPA1 はマスタードオイルなどによる炎症や熱性痛覚過敏の発症のメカニズムとして考えられている。また炎症関連メディエーターによって受容体活性化を介して感作ことも報告されており (Dai, Y., 2007)、炎症性疼痛の発生にも関わっているとされている。

このように感覚神経に共発現すると報告されている TRPV1 と TRPA1 は、知覚神経の興奮性に関して相互的に関与して感受性を亢進させることが知られている。たとえば呼吸器の知覚神経においては、TRPA1 と TRPV1 の相互作用によって、気道の化学的侵害刺激に対する知覚過敏や、慢性の咳、また気道反射を引き起こすことが報告されている (Bret, F. B. and Sven-Eric J., 2008)。このような TRP チャンネルの相互作用は下部消化管にも存在する可能性が考えられる。本実験で見られた TRP の非選択的アンタゴニストであるルテニウムレッドによる骨盤神経のカプサイシンに対する反応性の低下は、TRPV1 の直接的な阻害だけでなく、TRPA1 の阻害によっても生じている可能性が考えられる。すなわち、本実験の結果は DSS 誘発性腸炎によるカプサイシンに対する反応性の亢進には TRPV1 のみならず、TRPA1 と TRPV1 の相互作用も関与している可能性を示唆すると考えられる。

また DSS-1 群においては、カプサイシンの投与に対する骨盤神経求心性線維の応答性の増加が、他の群に比べてより長い時間にわたって観察されたが、この DSS-1 群におけるカプサイシンに対する骨盤神経の高い反応性も TRP チャンネルの活性化に由来していると考えられる。従って、本実験において DSS によって誘導された下部消化管炎症では、

その初期状態からすでに炎症性メディエーターによる TRP チャンネルの活性化による化学的侵害刺激に対する過敏状態が成立していることが示唆された。

#### 4-5. 小括

本章においては、DSS 水溶液を 1 週間自由飲水として与えることで作成した、下部消化管炎症モデル動物を用い、下部消化管における化学的な侵害刺激に対する応答性について検討した。その結果、DSS で下部消化管炎症を誘導した群においては、TRP の薬理的遮断によって、化学的侵害刺激に対する応答性が減弱することが明らかとなった。

下部消化管炎症の成立には多くの炎症細胞メディエーターが複雑に絡み合っていることはこれまでも多くの報告より示されてきた。前章と本章をあわせて考えると、下部消化管炎症の成立には、その中でも、知覚神経の応答性の増強が重要な役割を占めており、そのメカニズムは下部消化管の C-fiber に存在している TRP チャンネルの興奮によるものであることが推察された。それには TRPV1 の直接的な活性化のほかに、TRPA1 と TRPV1 の相互作用による知覚神経の興奮性の亢進があることが考えられた。

次の章では、消化管の物理的な運動に応答する知覚神経の働きと下部消化管炎症との関わりを明らかにするために、DSS によって誘導した下部消化管炎症モデル動物に、バルーンによる機械的な刺激を与えたときの下部消化管知覚神経の応答性を検討する。

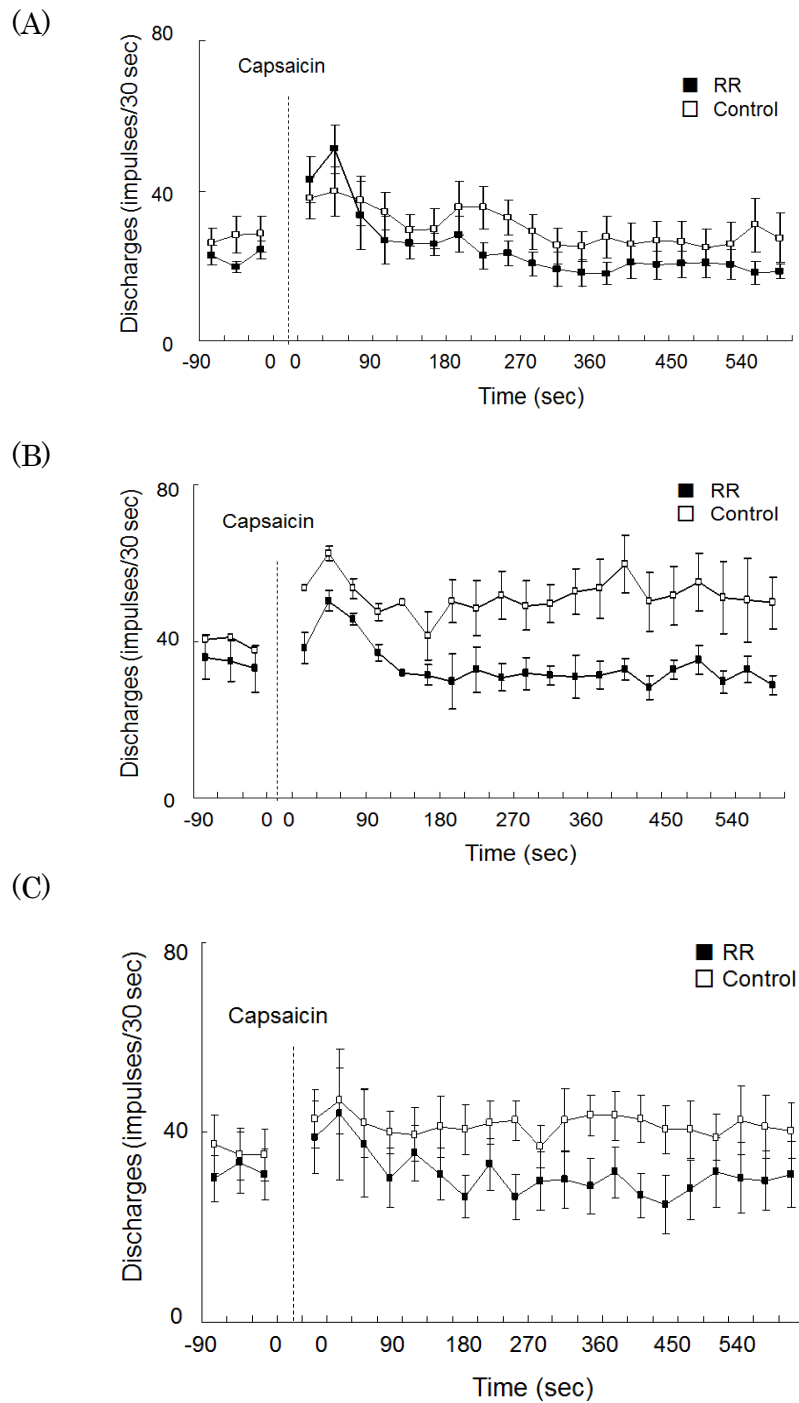


Fig. 9. Comparison of time-course changes in the pelvic nerve afferent activity before and after the intra-colon administration of capsaicin with pretreatment of ruthenium red in non-DSS(A), DSS-8(B),and DSS-1(C). The arrow indicates the administration of capsaicin. All plotting data are expressed as means  $\pm$  SE of 6 rats.

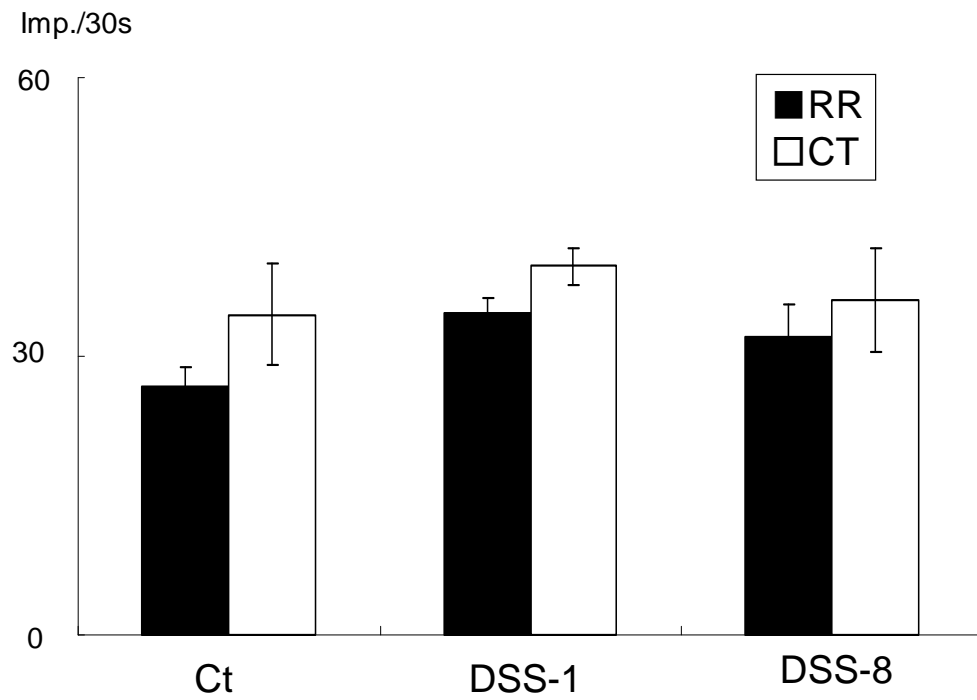


Fig.10. Comparison of the pelvic nerve afferent activity before and after the administration of ruthenium red in non-DSS(A), DSS-8(B) and DSS-1 group. Discharge frequency decreased significantly after administration of capsaicin with pretreatment of RR in non-DSS group.

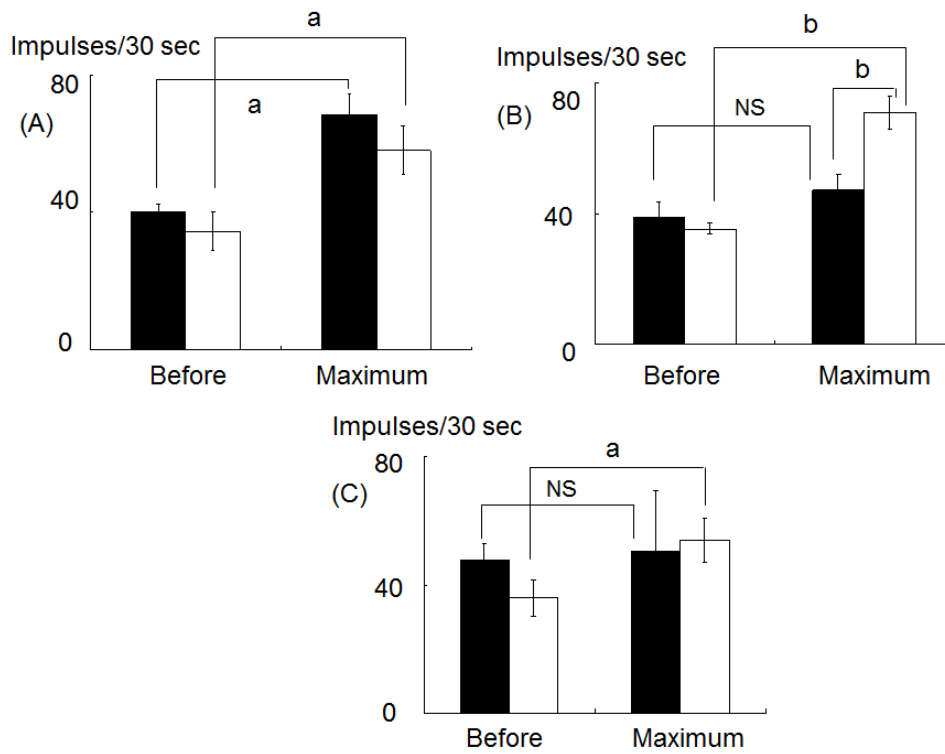


Fig. 11. Comparison of maximum responses to capsaicin between the RR and control groups in the non-DSS (A), DSS-1 (B) and DSS-8 (C) groups. ■: Ruthenium red group. □: Control group. Before: Before capsaicin instillation. Maximum: Maximum response after capsaicin instillation. a:  $P < 0.05$ . b:  $P < 0.01$ . NS: nonsignificant difference. All data are expressed as means  $\pm$  SE of 6 rats.



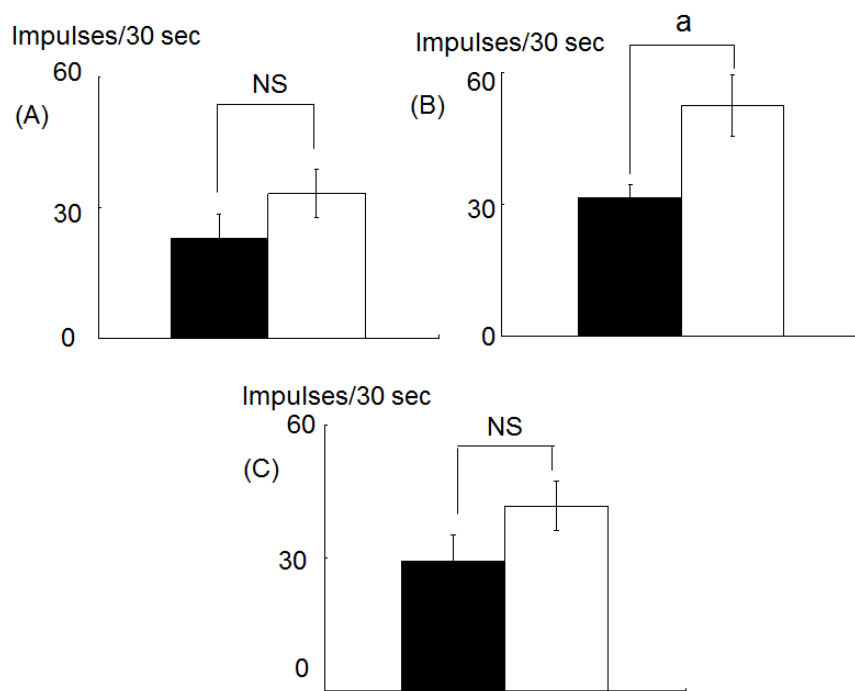


Fig. 12. Comparison of the pelvic nerve activity in the late stage at 300 to 600 seconds after colonic instillation of capsaicin in the non-DSS (A), DSS-1(B) and DSS-8(C) groups. a:  $P < 0.05$ , ■ : Ruthenium red group. □: Control group. NS: nonsignificant difference. All data are expressed as means  $\pm$  SE of 6 rats.

## 第5章 腸炎モデル動物における骨盤神経の機械的侵害受容

### 5-1. 緒言

第2章では、起炎剤である酢酸に対して応答する侵害受容器が下部消化管に存在することを明らかにした。第3章では、DSSを自由飲水に混ぜて下部消化管炎症を誘導したモデル動物において、C線維の刺激剤であるカプサイシンに対する応答性が亢進していることを明らかにした。また第4章では、このような下部消化管の知覚神経の化学的侵害刺激に対する応答性の亢進にはTRPチャネルが関与していることを明らかにした。

一方、下部消化管の知覚神経には、C線維のほかにA $\delta$ 線維も含まれることが知られていることから、消化管の運動や糞などの機械的刺激に対しても応答することが推測される。また機械的刺激に対する知覚神経の受容性が腸炎によってどのような影響を受けるかについては知見も乏しく関心が持たれる。

そこで本章では下部消化管にバルーンを用いて機械的な伸展刺激を与え、それに対する骨盤神経活動の応答性を、電気生理学的手法を用いて明らかにすることは意義深いものと思われる。なお、バルーンを下部消化管腔内に挿入して、結腸腸内壁の伸展刺激を行う方法(Colon rectal distention=CRD)は、消化管炎症や過敏性腸症候群様モデル動物における内臓痛覚を評価する指標として広く用いられている。本章では、内臓痛覚を評価する指標として広く用いられてきたCRDを用いて、DSSを自由飲水として与えることで、腸炎を誘導したモデル動物における下部消化管知覚神経の応答性を明らかにし、カプサイシンに対する応答性と比較することで、下部消化管炎症に知覚神経がどのように関与しているかを検討した。

### 5-2. 材料および方法

#### 5-2-1. 供試動物およびバルーンによる結腸伸展刺激の方法

第 3 章で述べた方法に従って DSS 水溶液を飲み水に混ぜて自由飲水させることで、Wistar kyoto 系ラットに腸炎を誘導し、麻酔を行った。

次に、第 2 章で述べた方法に従って、精密ピンセットを用い、骨盤神経の露出、分離を行った。

カテーテルに取り付けたラテックスバルーン（オカモト）を先端から 10 センチまで挿入し、鼻根部にテープで固定した。その後、30 秒毎に 30mmHg ずつ 0-90mmHg まで圧を段階的に負荷して下部結腸の伸展刺激を加え、その間の神経活動を連続的に記録した。

#### 5-2-2. 神経活動記録方法

第 2 章および 3 章で述べた方法に従って、骨盤神経求心性線維の細胞外電気活動を記録した。

#### 5-2-3. データ解析

骨盤神経求心性線維の神経活動の記録から、放電頻度を測定した。放電数は A-D 変換器を備えたコンピューター解析システム(PowerLab 8/30, ADInstruments Pty. Ltd, Japan)を用いて分析を行った。

統計解析は、有意差検定として、対照群と DSS 群間の比較には Mann-Whitney' s U-test を用い、刺激前後の比較には Wilcoxon' s signed rank test を用いた。P<0.05 で有意差とみなした。

#### 5-3. 結果

non-DSS 群および DSS 誘発腸炎群へのバルーンによる下部消化管壁伸展刺激前後における骨盤神経知覚神経活動の例を Fig. 13 および Fig. 14 に示す。伸展刺激によって non-DSS 群では、電位（振幅）の高い活動電位の増加が見られた。バルーン刺激後の放

電頻度の 30 秒ごとの経時的変化を Fig. 15~17 に示す。対照群では、30mmHg の圧の伸展刺激によって、放電頻度の増加傾向が見られ、60mmHg および 90mmHg の圧の伸展刺激によって、有意 ( $P<0.05$ ) に増加した。また放電頻度の増加は、圧の大きさに比例する傾向が観察された。一方、DSS-1 群および DSS-8 群ではバルーン刺激によって放電頻度の増加傾向がみられるものの、その増加度は有意ではなかった。それぞれの圧の伸展刺激による最大応答時の放電頻度を Fig. 18-21 に示す。ここでも対照群では全ての圧強度において、骨盤神経の放電頻度が有意に増加したが、DSS を与えた群では、放電頻度の増加は認められなかった。

#### 5-4. 考察

結腸にバルーンによる伸展刺激を加えた際の下部消化管知覚神経（骨盤神経）の求心性活動を記録した。今回の実験では、神経束（whole nerve）の状態では骨盤神経活動の記録を行ったので、記録された活動電位の中には C 線維も A $\delta$  線維も一定の割合で含まれていると推察される（Wistar ラットの場合、C 線維と A $\delta$  線維の割合は 3:2 であると報告されている）（De Schepper, H. U. et al., 2008）。しかし本実験では、電位の高いスパイクの増加が見られたことから、観察された放電頻度の増加には、A $\delta$  線維の応答性の増加の貢献が大きい可能性が考えられる。とはいえ、結腸の機械刺激には、C 線維が応答することも報告されている（De Schepper, H. U. et al., 2008）ので、その関与も完全には無視できない。この点を明らかにするためには、単一神経記録（Single-fiber recording）を行い、カプサイシン応答性や興奮伝導速度を測定するなど、さらに詳細な検討が必要であると考えられる。

今回の実験では、対照群の下部消化管を支配する 6 例の知覚神経記録はいずれもバルーンによる伸展刺激に対して高い応答性を示した。こうした事実から、今回の結果は偶然応答性の高い部位を記録したものではなく、対照群ではバルーンによる機械的伸展刺

激に対する応答性が常に備わっているものと考えられた。

一方、DSS-8 群ではバルーン刺激に対する応答性は有意に増加しなかった。このような下部消化管知覚神経のバルーンによる伸展刺激に対する応答性の低下はなぜ生じたのだろうか。一つには第 3 章で述べたような炎症状態の持続による、結腸を支配する知覚神経の生理的な変化によるものが考えられる。C 線維の生理的な変化については第 3 章で述べた。

下部消化管の炎症では炎症細胞の浸潤によって下部消化管における微小循環障害が起こることが報告されている (Garrelds, I. M. et al., 2002)。また、有髄である A $\delta$  線維は循環障害の影響を受けやすいことが知られている。これらのことから、本実験で行ったバルーン伸展による機械的刺激に対する感受性の減少には、このような腸炎誘導による循環障害によって起こった A $\delta$  線維の機能低下が関与している可能性が考えられる。また、機械刺激感受性のカチオンチャネルとして TRP ファミリーに属する TRPV2 が A $\delta$  線維において発現すること報告されている (Lewinter, R. D. et al., 2004)。本研究におけるバルーン伸展による機械的侵害刺激に対する感受性の低下には、この TRPV2 の感受性の低下や発現の減少といったチャネル機能の低下が考えられる。しかし、このチャネルについてはまだ未解明の点が多く、今後の研究が期待される。

下部消化管炎症の重篤化によって起こった消化管の組織学的な障害によって、そこを支配する末梢の知覚神経も障害を受け、感覚神経の鈍麻が起こっている可能性も考えられる。特に有髄の A $\delta$  線維はその髄鞘が傷害を受ける、いわば脱髄の状態を呈している可能性もあわせて考えられる。

炎症時の末梢の抗侵害刺激受容経路として、白血球由来の鎮痛ペプチドであるエンドモルフィンや  $\beta$ -エンドルフィンのオピオイド受容体作用を介した炎症性疼痛の緩和作用を示唆する報告がなされている (Labuz, D. et al., 2006)。本研究において、バルーンによる伸展刺激によって、粘膜下に浸潤していると考えられる白血球からこのよう

な鎮痛ペプチドが放出されることで、刺激に対する感受性が鈍麻した可能性が考えられる。また NF- $\kappa$ B の活性化を介した Gal1-R の受容体の増加が上皮細胞に見られる (Marrero, J. A., 2000) こと、およびカプサイシンの後肢足蹠皮内投与による痛み行動が Gal1-R アゴニストの共投与によって減少したこと (Jimenez-Andrade, J. M. et al., 2006) が報告されている。これらのことから、本実験で用いた DSS 誘導腸炎モデル動物の骨盤神経においても、NF- $\kappa$ B を介した経路を経て Gal1-R の受容体が増加しその結果、バルーンによる侵害刺激に対する感受性が抑制されていることも併せて考えられる。

本実験においては、IBS モデル動物で得られている結果とは異なり、バルーンによる機械的伸展刺激に対する感受性の低下が観察された。IBS モデルラットでは、バルーンによる伸展刺激に対する痛み感受性が有意に増大することが報告されており (大橋雅津代、「過敏性腸症候群モデル動物における内臓痛覚過敏に関する研究」、博士論文、東京大学、2008)、本研究で得られた結果とは対照的である。

本研究におけるバルーン伸展刺激に対する感受性の低下はこれまでの報告とは異なることから、そのような相違が生じた原因について考察する必要がある。本研究結果を IBS モデルラットの伸展刺激に対する感受性と比較検討するには、動物種、系統、腸炎誘発の方法、炎症の程度、腸炎誘発からの時間的経過などの緒要因を考慮する必要があると考えられる。

一方、本実験で誘導した DSS による腸炎モデルラットでは、IBS モデル動物とは異なり、炎症細胞の浸潤や腸管の形態学的な組織損傷が起こっていることが考えられる。また、肥満細胞からの脱顆粒による知覚神経興奮の促進にくらべて、炎症細胞から放出される鎮痛ペプチドの作用や神経傷害による神経自体の機能低下が大きくなることが、バルーン伸展による機械的侵害刺激に対する応答性の低下を招いている可能性が考えられる。

このように、本章の結果からは、下部消化管炎症モデル動物における物理的な侵害刺

激の感受性に対する低下を示す結果が得られたが、そのメカニズムの解明については、今後の更なる研究が期待される。

#### 5-5. 小括

本章においては下部消化管炎症誘導後の知覚神経の興奮性に着目して、その活動を記録した。その結果下部消化管に存在する C-fiber 及び A $\delta$  fiber の応答性が、下部消化管炎症の急性期においては、興奮性を抑制する経路が存在する可能性が示唆された。

このような下部消化管の知覚神経の応答性の抑制は何故起こったのかについては、TRPV1 の脱感作のほかに A $\delta$  fiber が炎症状態の持続による損傷を受けたことによる TRPV2 の感受性の低下や、オピオイド作動性の T-cell メディエーターの存在や、ガラニンによる抗侵害刺激受容経路の存在などが考えられ、今後の更なる研究が期待される。

またこの結果から、消化管炎症時には、物理的侵害刺激の伝達を抑制することで、そのような刺激に対して保護的に働く機構が存在することも考えられる。

本章では、下部消化管炎症誘導によって知覚神経の応答性が変化し、炎症病態成立後の下部消化管の保護作用に関与していることを示唆する結果が得られた。知覚神経の応答性が炎症の病態に関与することを示す重要な知見の一つであると考えられる。

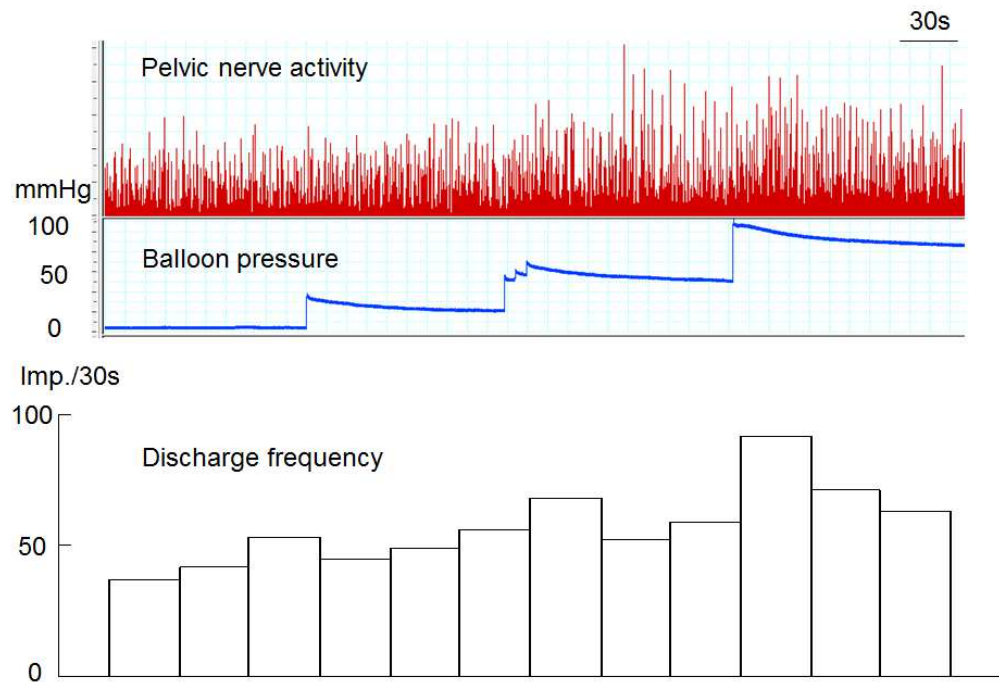


Fig. 13. Pelvic nerve afferent activity in response to colonic distention by a balloon catheter in a rat of non-DSS group.

The colonic distention was given in a step-wise manner every 30 seconds.

Note the increased discharge frequency at initial stage during pressure application with 60 and 90 mmHg.



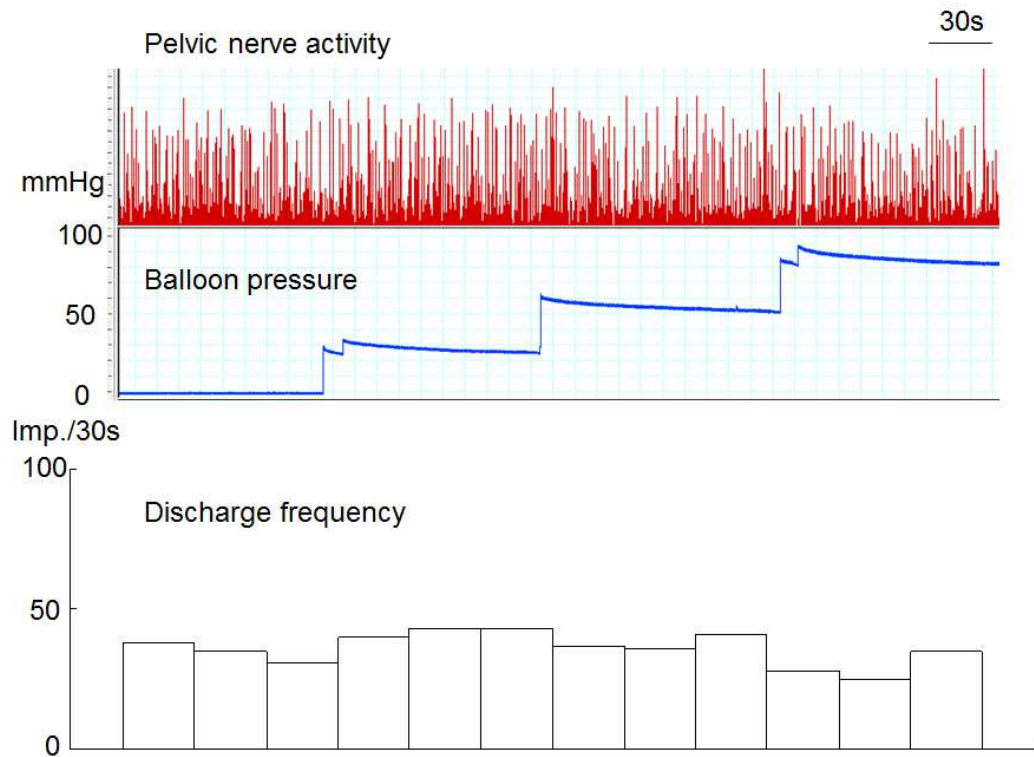


Fig. 14. Pelvic nerve afferent activity in response to colonic distention by a balloon catheter in a rat of DSS-8 group.

The colonic distention was given in a step-wise manner every 30 seconds.

Note the increased discharge frequency during pressure application.

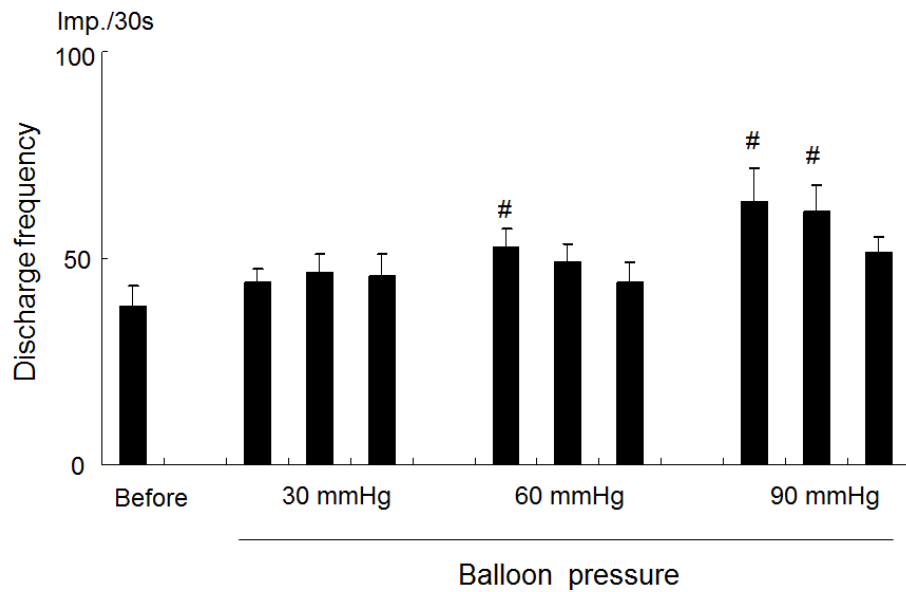


Fig. 15. Changes in discharge frequency by colonic distention in non-DSS group  
 Each column shows discharge frequency during 30 seconds.  
 Data are expressed as means  $\pm$  SE (n= 6).

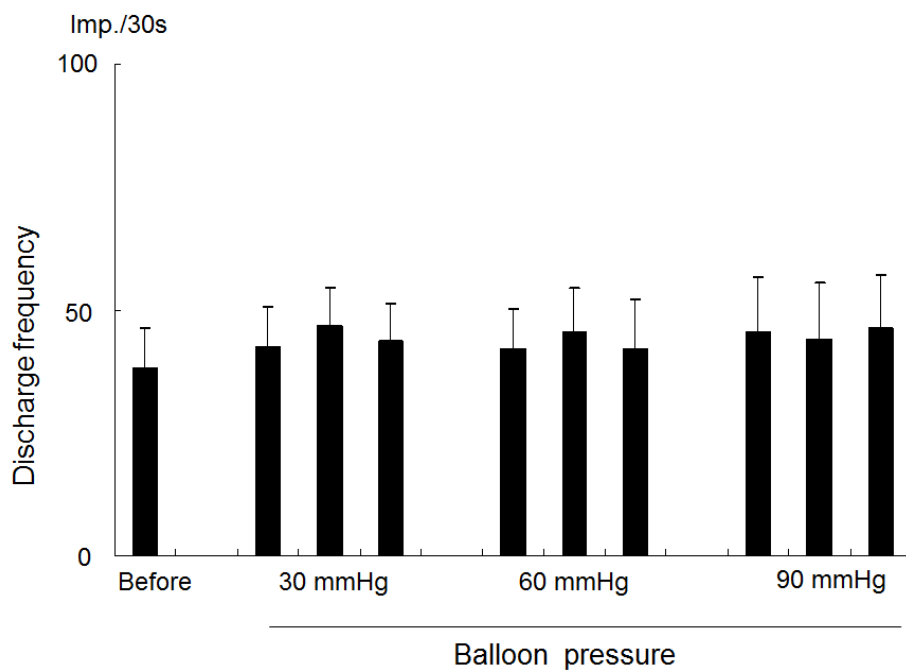


Fig. 16. Changes in discharge frequency by colonic distention in DSS-8 group  
 Each column shows discharge frequency during 30 seconds.  
 Data are expressed as means  $\pm$  SE (n=6).

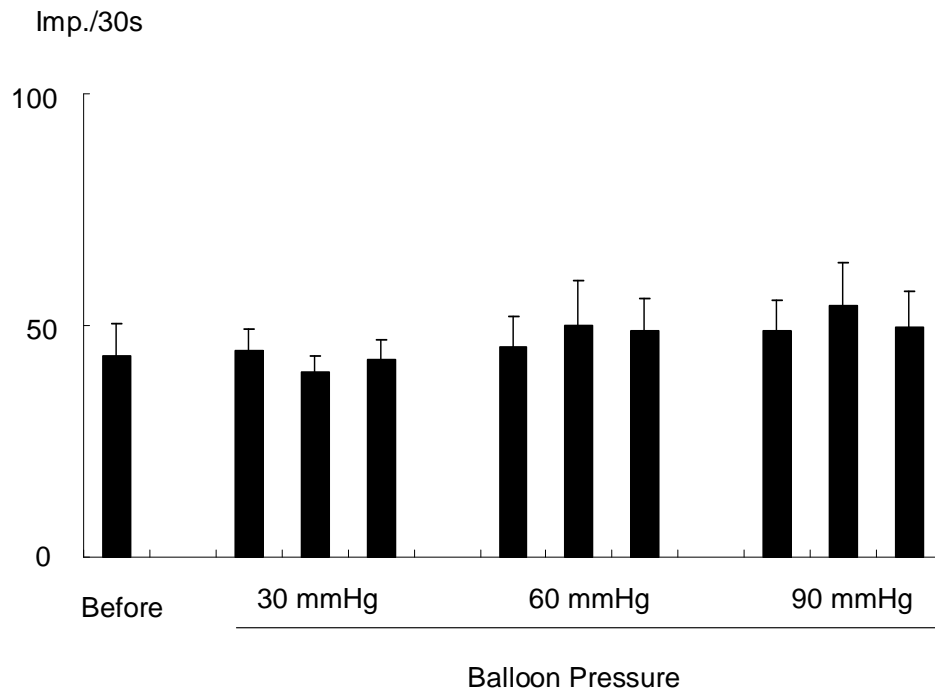


Fig. 17. Changes in discharge frequency by colonic distention in DSS-1 group  
Each column shows discharge frequency during 30 seconds.  
Data are expressed as means  $\pm$  SE (n=5).

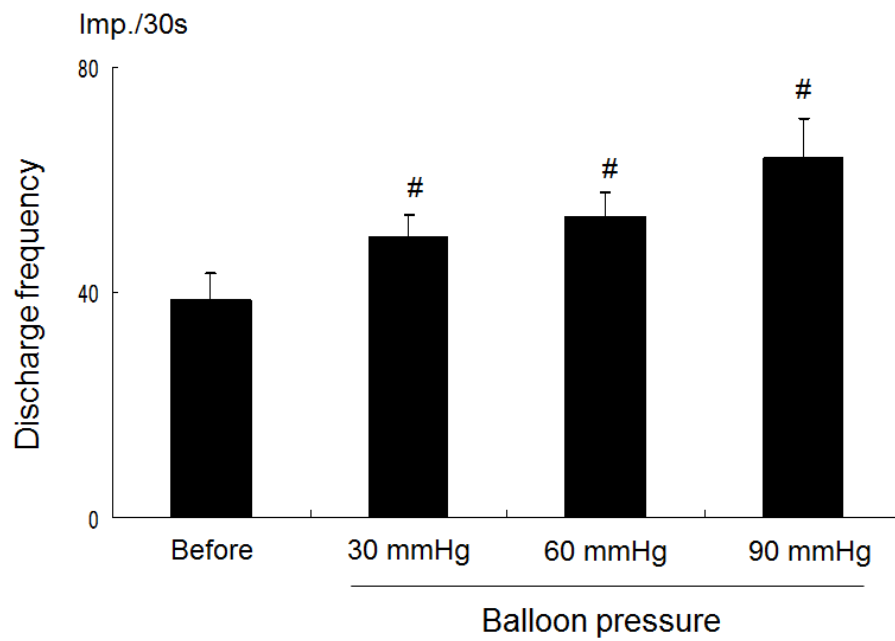


Fig. 18. Maximum responses to colonic distention by a balloon catheter in non-DSS group  
Data are expressed as means  $\pm$  SE (n= 6). #: P<0.05 v.s. Before distention

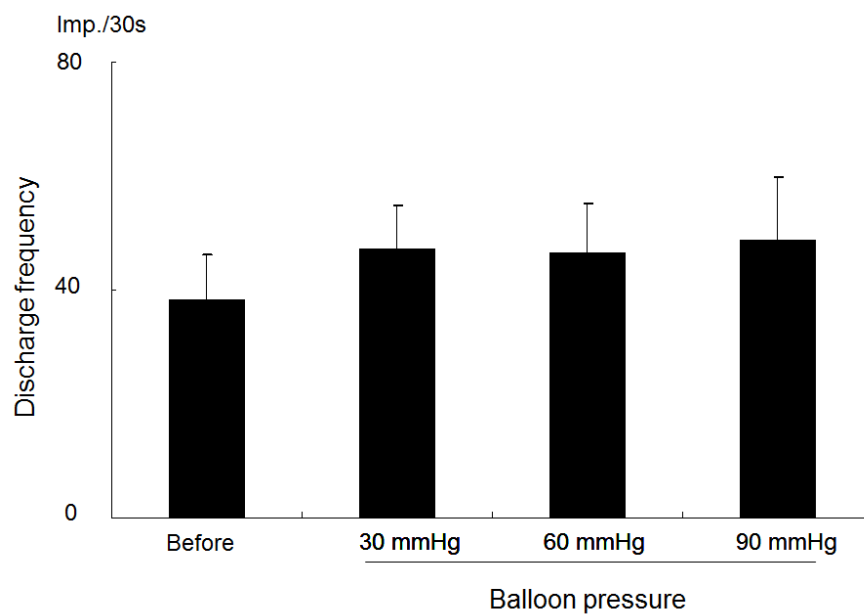


Fig. 19. Maximum responses to colonic distention by a balloon catheter in non-DSS group  
Data are expressed as means  $\pm$  SE (n= 6).

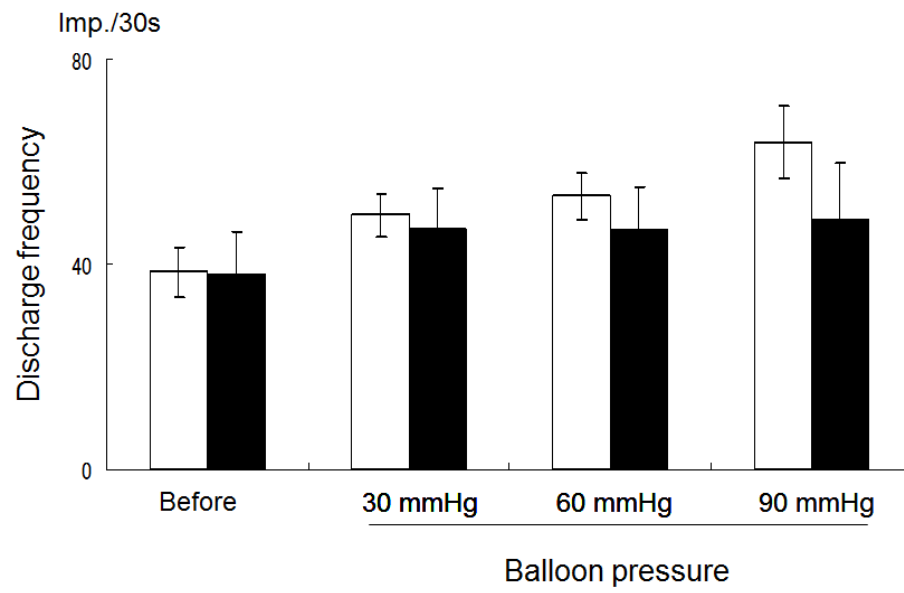


Fig. 20. Comparison of maximum responses to colonic distention by a balloon catheter in non-DSS and DSS-8 groups  
Data are expressed as means  $\pm$  SE (n= 6).

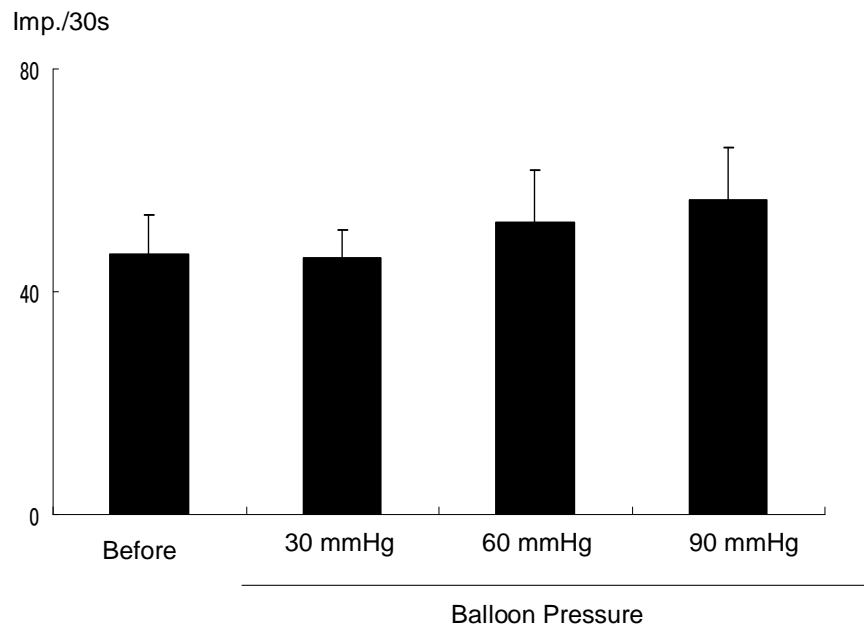


Fig. 21. Maximum responses to colonic distention by a balloon catheter in DSS-1 group  
Data are expressed as means  $\pm$  SE (n= 5).

## 第 6 章 総合考察

本研究では、下部消化管を支配する知覚神経である骨盤神経が、酢酸やカプサイシンの結腸投与によって興奮性が亢進することを明らかにした。このことから、下部消化管には、侵害刺激を受容する受容器が存在することが示唆された。そのような受容体としては、酸感受性イオンチャンネル(ASICs)や、TRPV1 チャンネルなどを含む TRP チャンネルスーパーファミリーなどが考えられる。本研究では特に TRPV1 チャンネルを中心とした TRP チャンネルスーパーファミリーに着目して検討した。

このような下部消化管の侵害刺激に対する侵害受容器の応答は、神経原性炎症の経路を介して下部消化管炎症の病態成立に関与している可能性が考えられる。そのような侵害受容器の実体として、知覚神経中の無髄 C-fiber に分布する TRPV-1 受容体の存在が報告されている。TRPV-1 受容体は、酸や 43°C 以上の熱に感受性を持つとされており、アゴニストとしてはカプサイシンの存在が報告されている。ラットの骨盤神経には 3:2 の割合で C-fiber と有髄の A $\delta$  fiber が含まれている。これらの線維は、下部消化管の化学的および機械的な侵害刺激を伝達すると考えられている。したがって、下部消化管炎症病態における知覚神経の関与を検討するためには、骨盤神経の興奮性の変化を記録することが重要であると考えられる。

DSS は消化管炎症を誘導することで知られ、これを用いて作成された動物は、潰瘍性大腸炎のモデル動物として広く用いられる。具体的には、自由飲水に 1 週間投与することで、上皮損傷、潰瘍、結腸の長さの短縮を主徴とする下部消化管炎症が誘導される。この DSS を用いた腸炎モデル動物は、DSS そのものが大腸粘膜を傷害すると考えられており、その結果、炎症性細胞の刺激、動員に起因する炎症性サイトカインの産生増加や放出が行われることで、炎症反応が亢進することが報告されている。そのような炎症性サイトカインとして TNF- $\alpha$ 、IL-8、MPO、COX-2、NF- $\kappa$ B といった物質が挙げら

れる。本研究では、DSS によって誘導された消化管炎症モデル動物群では、カプサイシンに対する反応が、健常動物の群に比べて大きいことが分かった。とくに、DSS 投与 1 日群では、他の群に比べて骨盤神経の放電頻度が有意に高い結果となった。従って本研究で用いた下部消化管炎症モデル動物においては、炎症誘導のごく初期の段階で知覚神経の応答性が亢進していることが明らかになった。

このような炎症による知覚神経の応答性の変化はどのようなメカニズムによるものであろうか。前述したとおり、DSS による腸炎誘導を行ったモデル動物においては様々な炎症性サイトカインが産生されるが、それらの中でもとくに  $\text{TNF-}\alpha$  は基本的に重要な役割を担う可能性が高い。肺の知覚神経では、 $\text{TNF-}\alpha$  の投与後 24 時間以内においては、カプサイシンによって刺激される細胞内カルシウム濃度のピークが上昇するが、投与後 48 時間の状態ではカプサイシンによるそのようなピーク上昇は観察されないという報告 (Hu, Y. et al., 2010) がある。また、DSS による腸炎誘導を行った動物においては、その投与 1 日後において、 $\text{TNF-}\alpha$  mRNA の発現が対照動物の 80 倍に増えるのに対し、3-8 日後では 40-50 倍に低下することが報告されている (Dharmani P., 2011)。以上のことから、本研究における知覚神経の興奮性の変化にもこのような炎症初期の  $\text{TNF-}\alpha$  の発現によるカプサイシン感受性の亢進が起こっているのではないかと推察される。

一方、炎症時には様々な炎症性メディエーターによる PKC および PKA を介したリン酸化を通して、TRPV1 の活性が増強され、その結果、疼痛の増大をもたらすとされている (沼崎他, 2003; Dai, Y., J Neurosci., 2004; Moriyama, T. et al., 2005)。

本研究で見られた TRPV1 の活性化でもこのようなリン酸化が起きており、その結果、カプサイシンに対する感受性の亢進が起こっている可能性も考えられる。また、そのようにして流入したカルシウムイオン(Ca)がカルモデュリン(CaM)と結合してできた Ca/CaM 複合体が、TRPV1 に結合することによってチャネルの不活化をもたらす、い

いわゆる「細胞外カルシウム依存性の脱感作」が DSS-8 群、すなわち DSS によって誘導された下部消化管炎症の急性期に生じる可能性も考えられる。その場合、DSS 誘発腸炎では、炎症の初期段階におけるカプサイシン応答性の亢進の後に、時間が経過するにつれて次第に応答性が減弱するといった現象に結びつく可能性が考えられる。

本実験では、TRP の非選択的阻害薬であるルテニウムレッドを用い、前投与を行ったときのカプサイシンに対する下部知覚神経応答の変化を検討した。DSS によって腸炎を誘導した動物群、すなわち、DSS-1、DSS-8 群においては、カプサイシン結腸内投与による骨盤神経の応答性の増加が抑制された。このことから、DSS によって誘導された腸炎における知覚神経の興奮性の亢進は、TRP チャネルを介した経路で起こっていることが考えられる。また、DSS-1 群および DSS-8 群では、カプサイシンによる知覚神経の応答性の亢進の 10 分以上の持続が見られたが、これも RR の前投与によって消失した。したがって、このような持続も TRP チャネルを介して起こったものであると考えられる。

このような TRP チャネルを介した感受性亢進の経路については以下のようなことが考えられる。まず一つ目としては、前述したような TRPV1 の活性化の経路である。炎症性メディエーターなどによる TRPV1 のリン酸化による活性化と C 線維細胞内のカルシウム濃度の上昇による活動電位発生閾値の低下が興奮を生じやすくする一方で、C 線維から放出される CGRP やサブスタンス P といった神経ペプチドが C 線維自体をさらに興奮させやすくする可能性が考えられる。本研究の DSS による下部消化管炎症誘導モデルラットでは DSS を与えてから一日目の、炎症のごく初期の段階でこのような知覚神経を活性化させる経路が働いている可能性が考えられる。

一方、2003 年に TRPA1 チャネルの存在が確認された (Story, G. M., 2003)。このチャネルは 17°C 以下の侵害性冷刺激によって活性化される新たな温度感受性 TRP チャネルとして報告された。このチャネルは主に C 線維の細胞体に発現し、TRPV1 と共発



現することが報告されている。このチャネルは炎症関連メディエーターによって活性化されることが知られており、炎症性疼痛の発生にも関わっているとされている。このことから本実験における腸炎モデル動物の骨盤神経におけるカプサイシンに対する感受性の亢進には TRPV1 単独によるもののみならず、TRPA1 と TRPV1 の相互作用も関与している可能性も否定できない。

本実験における DSS-8 群の化学刺激に対する知覚神経の応答性は、DSS-1 に比べて減弱し、また、バルーン伸展による機械的刺激に対する応答性は DSS-8 群では対照群に比べて低かった。これは、DSS によって誘導された腸炎の急性期（約 1 週間目）では、侵害受容を減弱ないし抑制する経路が存在することを示唆する結果であるといえる。そのような機序としては、前述したように化学的侵害受容に関しては、TRPV1 の  $\text{TNF}\alpha$  に対する反応性の低下や  $\text{Ca}/\text{CaM}$  複合体による TRPV1 チャネルの不活化などの機能的な変化が考えられる一方、機械的侵害受容に関しては炎症状態が持続することによる知覚神経の形態的、器質的な変化による影響も考えられる。

本実験で誘導した下部消化管炎症時には、DSS による直接的な組織傷害のほかに下部消化管の微小循環障害による二次的な傷害が起こっている可能性が考えられるが、軸索径が C 線維よりも大きな A $\delta$  線維はそのような変化の影響を受けやすいことが推測される。その場合、A- $\delta$  線維は、そのミエリン鞘が傷害を受け脱髄の状態を呈することで興奮発生、伝導機能が低下している可能性が考えられる。DSS 腸炎モデル動物においてもこのような原因で機械的な侵害刺激に対する感受性が低下することが考えられる。

また、受容体レベルでは A- $\delta$  線維に含まれるとされる機械的刺激を受容する TRPV2 の感受性の低下や発現そのものの減少といったチャネル機能の低下が起きていることも考えられるが、腸炎時の TRPV2 の変化に関する詳細な研究は乏しいため、不明な点が多く残されている。

さらに、腸炎モデル動物では、上記の要因とは別に、抗炎症性物質あるいは抗侵害性物質による侵害受容への修飾の変化も考えられる。すなわち、炎症時には末梢の抗侵害刺激受容経路が存在することが知られており、白血球由来の鎮痛ペプチドであるエンドルフィンや $\beta$ -エンドルフィンがオピオイド作用を介して炎症性疼痛を緩和することが報告されている (Labuz, D. et al., 2006)。本研究において、腸粘膜下などに存在すると考えられる炎症細胞から放出されるこれらのような鎮痛ペプチドが伸展刺激などの機械的刺激に対する応答性を減弱させた可能性が考えられる。また  $\text{NF-}\kappa\text{B}$  の活性化を介したガラニン受容体サブタイプ 1 (Gal1-R) が上皮細胞に見られ、またそれとは別に Gal1-R はそれ自体が抗侵害刺激作用を持つことも知られている (Marrero, J. A. et al., 2000; Jimenez-Andrade, J. M., 2006)。このような  $\text{NF-}\kappa\text{B}$  の活性化を介した Gal1-R の増強によって、バルーン伸展による機械的侵害刺激に対する応答性が抑制されていることも考えられた。

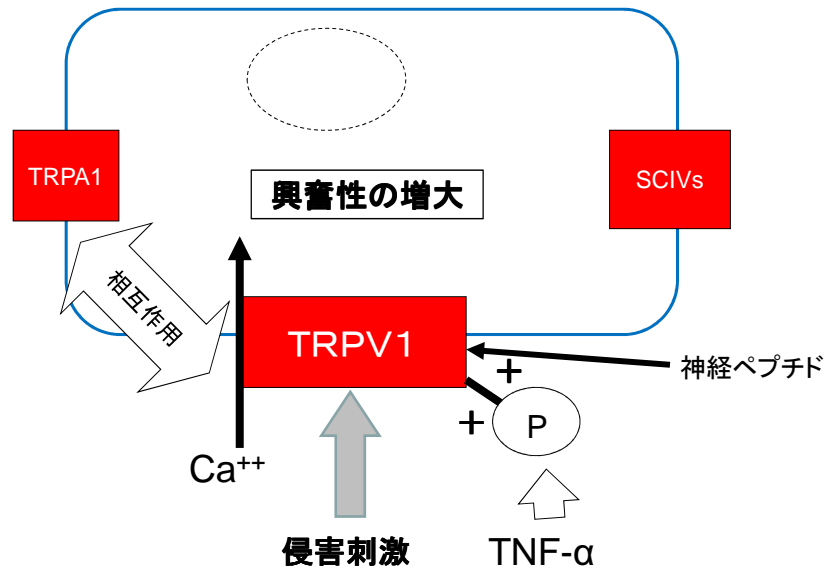
また、IBS モデルとバルーンによる機械的な伸展刺激に対する応答性が異なっていたことも本研究で初めて明らかになった知見であり、明記する必要がある。このメカニズムについては今後諸要因を検討する必要があるが、炎症細胞由来の抗侵害受容経路や、消化管の形態学的な損傷による神経機能の低下による知覚神経機能の抑制が、肥満細胞を介したその亢進よりも強く働いている可能性が考えられる。

既述したように、本研究では下部消化管炎症のごく初期の消化管粘膜炎症による損傷が現れる前の段階において知覚神経の機能的変化が観察された。このような炎症初期時における TRP を介した C 線維の侵害受容性の亢進が、軸索反射などの神経原性炎症のメカニズムを介して、下部消化管炎症の病態発現において重要な役割を果たしているものと推察された。またその一方で、炎症がピーク近くに達して重篤化すると、炎症病態の発現のほかに、脱感作や神経細胞そのものの障害、あるいは侵害刺激の伝導抑制といった経路によって、知覚神経の感受性がかえって抑制される現象も観察された。このよ

うな現象は過剰な神経応答に伴う痛みや炎症の増強から生体を保護する意義があるものと思われた。

以上のように下部消化管を支配する知覚神経に着目することで、実験的に誘導した炎症性腸疾患の病態の一端を明らかにすることができた。今回の実験を通して類推される腸炎の病態形成のメカニズムを Fig. 22 に示す。本研究で用いた腸炎モデル動物が実際のヒトにおける炎症性腸疾患の状態と完全に同じであるかどうかは分からないものの、下部消化管を支配する知覚神経の化学的、機械的侵害刺激に対する応答性の変化を明らかにすることができたことは、これまでの多くの免疫学的研究成果や病理学的研究成果に加えて、消化管炎症の病態形成における知覚神経が果たす役割の可能性に関して新たな視点からの提唱ができたものと思われる。

腸炎の初期(1日目)における侵害受容の機構(仮説)



腸炎のピーク時(8日目)における侵害受容の機構(仮説)

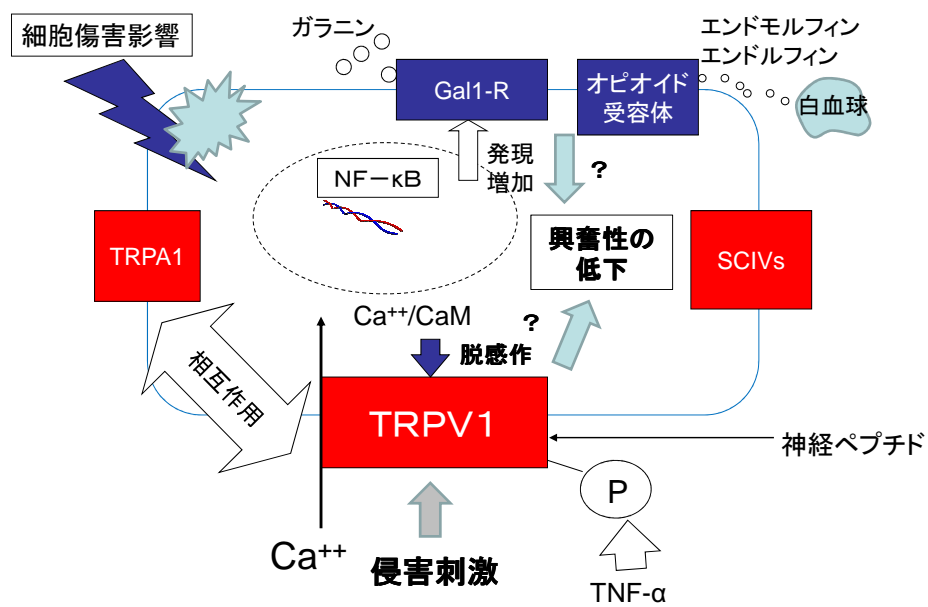


Fig. 22. Possible factors influencing excitability of nociceptors in DSS-induced colitis.



## 文 献

Abraham R, Fabian RJ, Golberg L, Coulston F. 1974. Role of lysosomes in carrageenan-induced cecal ulceration. *Gastroenterology*. 67(6): 1169-1181.

Aufses AH Jr. 2000. The history of surgery for Crohn's disease at The Mount Sinai Hospital. *Mt Sinai J Med*. 67(3):198-203.

Barbara G, Stanghellini V, De Giorgio R, Cremon C, Cottrell GS, Santini D, Pasquinelli G, Morselli-Labate AM, Grady EF, Bunnett NW, Collins SM, Corinaldesi R. 2004. Activated mast cells in proximity to colonic nerves correlate with abdominal pain in irritable bowel syndrome. *Gastroenterology*. 126(3):693-702.

Barbara G, Wang B, Stanghellini V, de Giorgio R, Cremon C, Di Nardo G, Trevisani M, Campi B, Geppetti P, Tonini M, Bunnett NW, Grundy D, Corinaldesi R. 2007. Mast cell-dependent excitation of visceral-nociceptive sensory neurons in irritable bowel syndrome. *Gastroenterology*. 132(1):26-37.

Barnes PJ. 1986. Asthma as an axon reflex. *Lancet*. 1 : 242-245.

Bret F. Bessac and Sven-Eric Jordt. 2008. Breathtaking TRP Channels: TRPA1 and TRPV1 in Airway Chemosensation and Reflex Control. *Physiology*, 23( 6), 360-370.

Carter MJ, Lobo AJ, Travis SP; IBD Section, British Society of Gastroenterology. Guidelines for the management of inflammatory bowel disease in adults. 2004. *Gut*. 53 Suppl 5: V1-16.

Caterina MJ, Schumacher MA, Tominaga M, Rosen TA, Levine JD, Julius D. 1997. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature*. 23: 389(6653):816-824.

Caterina MJ, Julius D. 2001. The vanilloid receptor: a molecular gateway to the pain pathway. *Annu. Rev. Neurosci*. 24: 487-517.

Dai Y, Moriyama T, Higashi T, Togashi K, Kobayashi K, Yamanaka H, Tominaga M, Noguchi K. 2004. Proteinase-activated receptor 2-mediated potentiation of transient receptor potential vanilloid subfamily 1 activity reveals a mechanism for

proteinase-induced inflammatory pain. *J. Neurosci.* 5: 24(18):4293-4299.

Dai Y, Wang S, Tominaga M, Yamamoto S, Fukuoka T, Higashi T, Kobayashi K, Obata K, Yamanaka H, Noguchi K. 2007. Sensitization of TRPA1 by PAR2 contributes to the sensation of inflammatory pain. *J. Clin. Invest.* 117(7):1979-1987.

Dharmani P, Leung P, Chadee K. 2011. Tumor necrosis factor- $\alpha$  and Muc2 mucin play major roles in disease onset and progression in dextran sodium sulphate-induced colitis. *PLoS One.* 6(9):e25058. Epub.

Davis JB, Gray J, Gunthorpe MJ, Hatcher JP, Davey PT, Overend P, Harries MH, Latcham J, Clapham C, Atkinson K, Hughes SA, Rance K, Grau E, Harper AJ, Pugh PL, Rogers DC, Bingham S, Randall A, Sheardown SA. 2000. Vanilloid receptor-1 is essential for inflammatory thermal hyperalgesia. *Nature.* 405(6783): 183-187.

De Schepper HU, De Winter BY, Van Nassauw L, Timmermans JP, Herman AG, Pelckmans PA, De Man JG. 2008: TRPV1 receptors on unmyelinated C-fibres mediate colitis-induced sensitization of pelvic afferent nerve fibres in rats. *J Physiol.* 586(21): 5247-5258.

Dhaka A, Viswanath V, Patapoutian A. 2009. Trp ion channels and temperature sensation. *Annu. Rev. Neurosci.* 29:135-161.

Dubé GR, Elagoz A, Mangat H. 2009. Acid sensing ion channels and acid nociception. *Curr. Pharm. Des.* 15(15):1750-1766.

Garrelds IM, Heiligers JP, Van Meeteren ME, Duncker DJ, Saxena PR, Meijssen MA, Zijlstra FJ. 2002: Intestinal blood flow in murine colitis induced with dextran sulfate sodium. *Dig. Dis. Sci.* 47(10):2231-2236.

Holzer P, Local effector functions of capsaicin-sensitive sensory nerve endings: involvement of tachykinins, calcitonin gene-related peptide and other neuropeptides. 1988. *Neuroscience.* 24(3) : 739-768.

Hu Y, Gu Q, Lin RL, Kryscio R, Lee LY. 2010. Calcium transient evoked by TRPV1 activators is enhanced by tumor necrosis factor- $\alpha$  in rat pulmonary sensory

neurons. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 299(4):L483-92. Epub.

Inada R. 2000. Study of colitis gravis. *Jpn J Gastroenterology* 27: 625

Islam MS, Murata T, Fujisawa M, Nagasaka R, Ushio H, Bari AM, Hori M, Ozaki H. 2008. Anti-inflammatory effects of phytosteryl ferulates in colitis induced by dextran sulphate sodium in mice. *Br. J. Pharmacol.* 2008 154(4):812-824. Epub.

Jantchou P, Morois S, Clavel-Chapelon F, Boutron-Ruault MC, Carbonnel F. 2010. Animal protein intake and risk of inflammatory bowel disease: The E3N prospective study. *Am. J. Gastroenterol.* 105(10):2195-2201. Epub.

Jimenez-Andrade JM, Lundström L, Sollenberg UE, Langel U, Castañeda-Hernandez G, Carlton SM.2006. Activation of peripheral galanin receptors: differential effects on nociception. *Pharmacol Biochem Behav.* 85(1):273-280. Epub.

Jurjus AR, Khoury NN, Reimund JM. Animal models of inflammatory bowel disease. 2004. *J Pharmacol Toxicol Methods.* 50(2): 81-92.

Kim HS, Berstad A. 1992. Experimental colitis in animal models. *Scand. J . Gastroenterol.* 27(7): 529-537.

厚生労働省：厚生労働省厚生労働科学研究成果データベース。  
<http://mhlw-grants.niph.go.jp/>

近藤祐一郎，石川秀雅，坂充ほか．1991．実験的大腸炎モデルに対する recombinant-human-SOD の影響—第 2. 報—．日消誌 88：1902．

Labuz D, Berger S, Mousa SA, Zöllner C, Rittner HL, Shaqura MA, Segovia-Silvestre T, Przewlocka B, Stein C, Machelska H.2006. Peripheral antinociceptive effects of exogenous and immune cell-derived endomorphins in prolonged inflammatory pain. *J. Neurosci.* 19: 26(16):4350-4358.

Lewinter RD, Skinner K, Julius D, Basbaum AI. 2004. Immunoreactive TRPV-2 (VRL-1), a capsaicin receptor homolog, in the spinal cord of the rat. *J. Comp.*



*Neurosci* 15;470(4):400-408.

Marrero JA, Matkowskyj KA, Yung K, Hecht G, Benya RV. 2000. Dextran sulfate sodium-induced murine colitis activates NF-kappaB and increases galanin-1 receptor expression. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 278(5):G797-804.

Mohapatra DP, Nau C. 2005. Regulation of Ca<sup>2+</sup>-dependent desensitization in the vanilloid receptor TRPV1 by calcineurin and cAMP-dependent protein kinase. *J. Biol. Chem.* 280(14):13424-13432. Epub.

Moriyama T, Higashi T, Togashi K, Iida T, Segi E, Sugimoto Y, Tominaga T, Narumiya S & Tominaga M. 2005. Sensitization of TRPV1 by EP1 and IP reveals peripheral nociceptive mechanism of prostaglandins. *Mol Pain*, 1:3-12.

Numazaki M, Tominaga T, Takeuchi K, Murayama N, Toyooka H, Tominaga M. 2003. Structural determinant of TRPV1 desensitization interacts with calmodulin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100(13):8002-8006.

沼崎満子、富永真琴. 2003. 痛み受容・温度受容の分子機構：カプサイシン受容体とのホモログの構造・発現と機能. *生化学*. 75: 359-371.

Ohama T, Hori M, Momotani E, Iwakura Y, Guo F, Kishi H, Kobayashi S, Ozaki H. 2007. Intestinal inflammation downregulates smooth muscle CPI-17 through induction of TNF-alpha and causes motility disorders. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 292(5):G1429-1438. Epub.

Ohashi K, Kawai M, Ninomiya N, Taylor C, Kurebayashi Y. 2008. Effect of a new alpha 2 delta ligand PD-217014 on visceral hypersensitivity induced by 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid in rats. *Pharmacology*. 81(2):144-150.

大橋雅津代（2008）．過敏性腸症候群モデル動物における内臓痛覚過敏に関する研究，博士論文，東京大学．

大草敏史ほか.1985: デキストラン硫酸投与による実験的潰瘍性大腸炎に対す Metronidazole の予防的治療効果. *日消誌*. 84(10) : 2337-2346.

大草敏史. 1985. デキストラン硫酸投与による実験的潰瘍性大腸炎の作成と腸内細菌の変動に関する研究. *日消誌* 82(5), 1327-1336.

Okayasu I, Hatakeyama S, Yamada M, Ohkusa T, Inagaki Y, Nakaya R. 1990. A novel method in the induction of reliable experimental acute and chronic ulcerative colitis in mice. *Gastroenterology*. 98(3): 694-702.

Park JH, Rhee PL, Kim HS, Lee JH, Kim YH, Kim JJ, Rhee JC. 2006. Mucosal mast cell counts correlate with visceral hypersensitivity in patients with diarrhea predominant irritable bowel syndrome. *J gastroenterol Hepatol*. 21;71-78

Rosenbaum T, Simon SA. TRPV1 Receptors and Signal Transduction. 2007. In *TRP Ion Channel Function in Sensory Transduction and Cellular Signaling Cascades*. Liedtke WB, Heller S, editors. Boca Raton (FL): CRC Press. Chapter 5.

Spiller RC, Jenkins D, Thornley JP, Hebden JM, Wright T, Skinner M, Neal KR. 2000. Increased rectal mucosal enteroendocrine cells, T lymphocytes, and increased gut permeability following acute Campylobacter enteritis and in post-dysenteric irritable bowel syndrome. *Gut*. 47(6):804-811.

Story GM, Peier AM, Reeve AJ, Eid SR, Mosbacher J, Hricik TR, Earley TJ, Hergarden AC, Andersson DA, Hwang SW, McIntyre P, Jegla T, Bevan S, Patapoutian A. 2003. ANKTM1, a TRP-like channel expressed in nociceptive neurons, is activated by cold temperatures. *Cell*. 12(6): 819-829.

滝澤英昭. 1992. ラット高分子デキストラン硫酸大腸炎における大腸粘膜免疫担当細胞の動態. *消化管と免疫* 26: 59-62.

Talavera K, Nilius B, Voets T. 2008. Neuronal TRP channels: thermometers, pathfinders and life-savers. *Trends Neurosci*. 31(6):287-295.

Tominaga M, Caterina MJ, Malmberg AB, Rosen TA, Gilbert H, Skinner K, Raumann BE, Basbaum AI, Julius D. 1998. The cloned capsaicin receptor integrates multiple pain-producing stimuli. *Neuron*. 21(3): 531-543.

Tominaga M, Tominaga T. Structure and function of TRPV1. 2005. *Pflügers Arch.* 451: 143–150.

Wang YY, Chang RB, Allgood SD, Silver WL, Liman ER. 2011. A TRPA1-dependent mechanism for the pungent sensation of weak acids. *J. Gen. Physiol.* 137(6): 493-505

Watt J, Marcus R. 1975. Experimental ulcerative disease of the colon. *Methods Achiev Exp Pathol.* 7: 56-71.

Wilks, S. and Moxon, W. : Lectures on pathological anatomy. Philadelphia; Lindsay and Blakiston, 1875 ;2nd ed;408-9/ Inada R: study of colitis gravis. *Jpn. J . Gastroenterology* 27; 625, 1928/ Mt Sinai J Med. 2000 May;67(3):198-203.

Yoshioka K, Tanahashi M, Uchida W. 2010. Behavioral and urological evaluation of a testicular pain model. *Urology.* 75(4): 943-948.

## 謝 辞

本論文をまとめるにあたり、東京大学大学院農学生命科学研究科獣医学専攻比較病態生理学教室の局 博一教授をはじめ、桑原正貴准教授、伊藤公一助教の各先生方に長年にわたってご指導を賜りましたことに深甚なる謝意を表します。また、日頃から私を支えて頂きました研究室の先輩、後輩の皆様方に心より御礼を申し上げます。さらに、本研究の遂行にあたって重要な方法論である腸炎モデル動物の作製に際して貴重なご助言を賜りました東京大学大学院農学生命科学研究科獣医学専攻獣医薬理学教室の先生方に厚く御礼を申し上げます。