原 著

順天堂医学. 2006, 52
P. 566~572

実験犬を用いた正常および炎症小腸における 収縮運動の機序

坂 本 修 一*
SHUICHI SAKAMOTO

坂 本 一 博*
KAZUHIRO SAKAMOTO

鎌 野 俊 紀*
TOSHIKI KAMANO

目的：炎症腸管の収縮運動の機序を解明するために、フッ化ナトリウム（NaF）によるGTP結合蛋白質（G蛋白質）の活性化によっておこる、正常および炎症小腸の収縮運動について検討した。

対象と方法：実験は成犬を用い、神経遮断剤、NO阻害剤、シグナル伝達機構に関する薬物などを投与できるカテーテルを小腸辺縁動脈に挿入し、腸管運動の測定を施行した。またエタノールと酢酸を腸管内に注入し炎症腸管を作製した。

結果：NaFは正常および炎症小腸で濃度依存的に収縮運動を発生させたが、炎症小腸で有意に反応は抑制された（ $p < 0.05$ ）。ニコチン受容体、ニューロン伝達、ムスカリン受容体などに対する神経遮断剤によりNaFの収縮運動は正常および炎症小腸で抑制された。一方、NO阻害剤の投与で増大した。また平滑筋におけるシグナル伝達機構を検討するため事前に神経遮断剤とNO阻害剤を投与した。NaFの収縮運動は、カルシウムブロッカーとホスホリパーゼCの抑制剤で抑制され、正常小腸では炎症小腸よりいずれも低い傾向であった。

結論：小腸の収縮運動は炎症により抑制された。NaFは神経とNOの両者を活性化させ、直接小腸平滑筋を収縮させていると考えられた。炎症腸管における収縮運動はシグナル伝達機構よりも神経を介する機序により調節されていると考えられた。

キーワード：GTP結合蛋白質、平滑筋収縮、炎症

緒 言

消化管は胃、小腸、大腸と区分され小腸は日本人では全長5mから7mあり、消化吸收、消化管ホルモンの分泌、蠕動運動などに関わっている。そして腸管に炎症が加わると食欲不振、腹痛、嘔吐、下痢などのさまざまな消化器症状が惹起されると考えられている。なかでも腸管運動の変化が重要視され、炎症を呈した腸管では、肛門側へ伝

播する収縮運動migrating moter complexes（MMCs）¹⁾²⁾が正常腸管よりも減少し、振幅の大きい急速に伝播する収縮のgiant migrating contractions（GMCs）が多く観察され、そのGMCsが下痢および腹痛に関与していると報告されている^{5)~7)}。一般に正常腸管の収縮運動については、アセチルコリンやアドレナリンなどの神経伝達物質による自律神経や一酸化窒素nitric oxide（NO）による平滑筋への作用および平滑筋細胞膜上のグアノシン三リン酸Guanosine Tri Phosphate結合蛋白質（G蛋白質）の活性化からイノシトール代謝およびカルシウムを介する細胞内のシグナル伝達機構が調節していると言われている⁸⁾⁹⁾。しかしいまだ炎症腸管の収縮運動の機

* 順天堂大学医学部外科学教室消化器外科学講座（下部消化管外科学）

* Department of Coloproctological Surgery, Juntendo University School of Medicine, Tokyo, Japan
[Feb. 13, 2006 原稿受領][Apr. 13, 2006 掲載決定]

序については解明されていない。

今回、炎症腸管の平滑筋における収縮運動を解明するために、解剖学的に比較的にヒトに近いイヌ小腸に strain gauge force transducer^{19)~21)}を縫着後、収縮運動を観察するモデルを作成した。収縮運動の機序を解明するためフッ化ナトリウム (NaF) を投与することにより G 蛋白質を活性化することが分かっている⁴⁾ので NaF を投与する前に種々の神経遮断剤、NO 阻害剤を投与した。NaF によって刺激された正常および炎症小腸における収縮運動の病態と平滑筋細胞のイノシトール代謝やカルシウムを介するシグナル伝達機構との関連をあわせて検討した。

対象および方法

1. 実験モデルの作製法

実験は成犬5頭を用いた。ペントバルビタールナトリウム (25mg/kg) の静脈麻酔下に気道チューブを挿入、レスピレーターを使用した。仰臥位にて腹部正中切開で開腹し、回腸末端より40cmの部位から口側200cmまでの小腸に、3ヶ所薬物を投与できるように小腸辺縁動脈を cut down し、シリコン製カテーテルを挿入、固定した。その支配領域の輪状筋の収縮運動を測定できるように小腸漿膜にストレインゲージトランスデューサー (SG) を腸管走行と平行に縫着した。カテーテルは腹壁から皮下を通した後頸部から体外へ引き出した。SGの導線は腹壁を通す stainless steel cannula へ集め、体外へと導いた¹⁰⁾。

次に炎症腸管モデルを作成するための薬剤としてエタノールと酢酸を用いるため、回腸末端から240cm口側の小腸にシリコン製カテーテル Intraluminal Catheter を挿入した。このカテーテルも血管カテーテルと同様に後頸部から体外へ導出した。また炎症を大腸までおよぼさないようにするため、腸管内容物を回腸より排出させる腸瘻 Collection Cannula を、回腸末端から40cmの回腸に stainless steel collection cannula を造設した (図-1)。術後の回復を待ち、1週後より腸管の

図-1 strain gauge force transducerを用いた実験モデル

辺縁動脈にカテーテルを挿入してその支配領域に腸管運動を測定できるように strain gauge force transducer を縫着した。炎症を誘導するカテーテル Intraluminal Catheter および結腸へと炎症誘導薬剤等が流れないように腸瘻 Collection Cannula を造設した。

収縮運動の測定を開始した。記録は12チャンネルのグラスレコーダー Grass Instruments およびコンピュータにて行った。測定は意識下の空腹期に施行した。

2. 炎症の誘導法

正常腸管の測定を施行した後、Jouët, Sarna ら⁴⁾による以下の方法で炎症を誘導した。第1日目に95%エタノール75mlをシリコン製カテーテルより6.25ml/minの速度で注入した。その際に腸瘻を開放とし大腸への流入を防いだ。第2日目に95%エタノール75mlを第1日と同様に注入し、注入終了1時間後に20%酢酸50mlを4.4ml/minの速度で注入した。注入終了10分後に中和剤として1Mの重炭酸塩50mlを4.4ml/minにて注入した。第3、4日目に炎症腸管として測定を行い、第5日目は第2日と同様の処置にて炎症を再誘導し、第6、7、8、9日目にこれも炎症腸管としての測定を施行した。

3. 各種薬剤による収縮運動の測定

薬剤はG蛋白質活性物質としてNaFを用いた。

神経遮断剤としてニコチン受容体遮断剤のヘキサメソニウム、ニューロン伝達遮断剤のテトロドトキシン (TTX)、ムスカリン受容体遮断剤のアトロピンを用いた。またNO阻害剤であるNG-nitro L-arginine methyl ester (L-NAME) を用いた^{14)~16)}。次にイノシトール代謝およびカルシウムのシグナル伝達機構に対する阻害剤のうちホスホリパーゼCの抑制剤であるネオマイシン¹²⁾¹³⁾およびL型Caチャンネルブロッカーのベラパミル¹¹⁾を用いた。(いずれもSIGMA社USA)

はじめにNaF5-80 $\mu\text{mol}/\text{分} \times 1\text{分}$ の投与による小腸平滑筋の収縮運動を測定した。次にヘキサメソニウム70 $\mu\text{mol}/\text{分} \times 1\text{分}$ 、TTX25nmol/ $\text{分} \times 1\text{分}$ 、アトロピン30 $\mu\text{mol}/\text{分} \times 1\text{分}$ およびL-NAME10 $\mu\text{mol}/\text{分} \times 1\text{分}$ をそれぞれ前投与し1分後あるいは薬剤投与による収縮運動が消失した後、NaF20 $\mu\text{mol}/\text{分} \times 1\text{分}$ および、60 $\mu\text{mol}/\text{分} \times 1\text{分}$ を投与し収縮運動を測定した。さらにシグナル伝達機構の抑制剤の同時投与におけるNaF60 $\mu\text{mol}/\text{分} \times 1\text{分}$ の収縮運動を測定した。これらいずれも正常小腸において測定した後に、炎症を誘導し測定を行った。収縮運動は曲線下と基線とで囲まれた面積としてコンピューターソフト(WINDAQ/EX program, DATAQ Instruments)を用い測定した。GMCsは通常の収縮よりも大きな振幅および持続時間の長い収縮でかつ急速に肛門側に伝播する波形として測定された³⁾¹³⁾。個々の検定はt検定で行い比較検定し、 $P < 0.05$ を有意差ありとした。

結 果

1. NaF単独投与による収縮運動

NaF (5-80 $\mu\text{mol}/\text{分} \times 1\text{分}$) は正常および炎症小腸で濃度依存的に収縮運動を発生させた。炎症小腸で有意に反応は抑制された ($n=3$, $p < 0.05$) (図-2)。NaF 20 $\mu\text{mol}/\text{分} \times 1\text{分}$ では通常の収縮運動のみであったが、60 $\mu\text{mol}/\text{分} \times 1\text{分}$ ではGMCsを正常小腸で19.3 $\pm$ 7.1%に、炎症小腸で38.6 $\pm$ 20.7%に認めた。

2. 各種遮断剤の前投与後の収縮運動

正常小腸、炎症小腸ともにNaF単独投与による収縮運動を100%とした。

1) ヘキサメソニウム

NaFの収縮運動は、ヘキサメソニウム70 μmol によって正常小腸はNaF 20 $\mu\text{mol}/\text{分} \times 1\text{分}$ で7.1 $\pm$ 7.1%, 60 $\mu\text{mol}/\text{分} \times 1\text{分}$ にても36.2 $\pm$ 11.3%と有意に抑制された。炎症小腸ではNaF 20 $\mu\text{mol}/\text{分} \times 1\text{分}$ および、60 $\mu\text{mol}/\text{分} \times 1\text{分}$ にてもそれぞれ抑制されたが有意差を認めなかった(図-3)。

2) テトロドトキシン (TTX)

TTX25nmolも同様にNaF20 $\mu\text{mol}/\text{分} \times 1\text{分}$ による収縮運動は正常小腸で14.3 $\pm$ 14.3%, 炎症小腸で15.9 $\pm$ 8.0%に抑制された。NaF 60 $\mu\text{mol}/\text{分} \times 1\text{分}$ でも正常小腸48.2 $\pm$ 5.6%, 炎症小腸26.2 $\pm$ 7.4%に抑制され、いずれも有意差を認めた(図-4)。

図-2 正常および炎症時のフッ化ナトリウム (NaF) の濃度曲線

図-3 ヘキサメソニウム70 μmol 投与時のフッ化ナトリウム (NaF) による収縮

3) アトロピン

アトロピン $30 \mu\text{mol}$ も $\text{NaF} 20 \mu\text{mol}/\text{分} \times 1\text{分}$ による収縮運動は、正常小腸で $0.0 \pm 0.0\%$ と完全に抑制され、炎症小腸でも $33.7 \pm 18.8\%$ と抑制された。 $\text{NaF} 60 \mu\text{mol}/\text{分} \times 1\text{分}$ では正常小腸が $37.3 \pm 14.2\%$ と有意に抑制されたが炎症小腸では $47.6 \pm 17.6\%$ であり有意差は認められなかった (図-5)。

4) L-NAME

$\text{NaF} 20 \mu\text{mol}/\text{分} \times 1\text{分}$ による収縮運動は NO 阻害剤の L-NAME $10 \mu\text{mol}$ の投与により正常小腸で $317.9 \pm 74.2\%$ 、炎症小腸で $217.4 \pm 42.2\%$ と収縮が有意に増大し、 $\text{NaF} 60 \mu\text{mol}/\text{分} \times 1\text{分}$ でも正常小腸 $243.5 \pm 59.8\%$ 、炎症小腸 $172.8 \pm 34.9\%$ の収縮の増大を認めたが有意差は認められなかった (図-6)。

3. GMCs の出現

GMCs の出現はヘキサメソニウム、TTX、ア

図-4 TTX25nmol投与時のフッ化ナトリウム (NaF) による収縮

図-5 アトロピン $30 \mu\text{mol}$ 投与時のフッ化ナトリウム (NaF) による収縮

トロピンによって完全に抑制された。

4. シグナル伝達機構 (前投与後の収縮運動)

神経遮断剤のアトロピンおよび NO 阻害剤の L-NAME を事前に投与した。投与1分後に L 型 Ca ブロッカーのベラパミル $0.5\text{-}20\text{nmol}/\text{分}$ の濃度、5分間の投与を開始し、その2分後のベラパミル投与中に $\text{NaF} 60 \mu\text{mol}/\text{分}$ の濃度、1分間を同時に投与した。NaF による平滑筋の収縮は、ベラパミル各濃度でほぼ抑制された。炎症小腸では 0.9nmol と小さい傾向であった (図-7)。シグナル伝達機構のうちホスホリパーゼ C の抑制剤であるネオマイシンもベラパミル同様アトロピンと L-NAME を事前に投与で、ネオマイシン投与中に $\text{NaF} 60 \mu\text{mol}/\text{分} \times 1\text{分}$ を投与した。NaF による平滑筋の収縮は、ネオマイシン $1.0\text{-}12 \mu\text{mol}/\text{分}$ の濃度で10分間の投与でも抑制された (図-8)。

図-6 N^G -nitro L-arginine methyl ester (L-NAME) $10 \mu\text{mol}$ 投与時のフッ化ナトリウム (NaF) による収縮

図-7 正常および炎症時のアトロピン、 N^G -nitro L-arginine methyl ester (L-NAME) 投与後のベラパミル投与中のフッ化ナトリウム (NaF) による収縮

図-8 正常および炎症時のアトロピン、 N^G -nitro L-arginine methyl ester (L-NAME) 投与後のネオマイシン投与中のフッ化ナトリウム (NaF) による収縮

考 察

炎症性腸疾患において主たる臨床症状は食思不振、腹痛、下痢、下血などである。下血は腸粘膜の脱落、欠損等による粘膜面からの出血と考えられるが、腹痛および下痢に関しては腸管の収縮運動の関与が指摘されている。Sarnaらは比較的人消化管に類似した犬の正常腸管に strain gauge force transducer を縫着し腸管運動を測定すると、空腹期の正常な小腸では主に肛門側へと伝播する MMCs がみられ、GMCs はほとんど発生しないと報告されている³⁾¹³⁾。しかし Jouët, Sarna らによるアルコールおよび酢酸によって犬小腸粘膜に炎症を誘導したモデルでは、MMCs の減少あるいは消失が認められ、GMCs の発生が増加しており、GMCs が発生した際、犬は体動が多くなり時に鼻を鳴らしたりするなどおそらく腹痛による不快を感じているように見えるという。また小腸で発生した GMCs が大腸へと伝播し、排便(下痢)を起こすことも観察されている。これらのことから腸管の収縮運動の異常により臨床症状として出現していると考えられる。

今回、正常小腸および炎症小腸における収縮運動の機序を検討するため、小腸平滑筋細胞の G 蛋白質を活性化させる NaF を用い小腸の収縮運動を測定した。

NaF は正常、炎症小腸ともに濃度依存性に収縮運動を起こしたが、炎症小腸では有意に低下して

いた。

NaF が直接平滑筋に作用していることを確認するため、神経遮断剤のヘキサメソニウム、TTX、アトロピンをそれぞれ前投与し、NaF を投与した。その際 GMCs を発生させなかった低濃度 ($20 \mu\text{mol}/\text{分} \times 1 \text{分}$) および GMCs を発生させる可能性のある高濃度 ($60 \mu\text{mol}/\text{分} \times 1 \text{分}$) の NaF を用いた。正常、炎症小腸のいずれも NaF $20 \mu\text{mol}/\text{分} \times 1 \text{分}$ ではほぼ有意に抑制された。一方 NaF $60 \mu\text{mol}/\text{分} \times 1 \text{分}$ では炎症小腸の収縮運動が抑制される傾向を認めるも TTX 以外では有意差が見られなかった。各種遮断剤の効果は炎症小腸よりも正常小腸のほうが抑制効果の強い傾向にあると思われた。この実験モデルでは粘膜のみ炎症を呈していると報告されているが¹⁾、抑制的に働く作用が障害されるなどの神経系に何らかの影響があったのではないかと考えられた。

高濃度の NaF では正常、炎症小腸ともに GMCs を生じることがあるが、有意差は見られなかったものの炎症小腸により高い傾向を認めた。また炎症時には自然に発生する GMCs が有意に増加すること、さらに神経遮断剤を前投与した時の NaF による収縮で GMCs は発生しなかったことから GMCs は神経を介する経路で調節されている可能性が示唆された。

小腸平滑筋にはこれらの神経系のほか、NO の合成阻害剤の L-NAME を前投与した後の NaF の収縮運動も測定した。前投与により収縮が増大するのは NO による筋弛緩作用を阻害するためと思われた。正常、炎症小腸ともに低濃度の NaF で有意に収縮運動の増加をみた。高濃度でも増加の傾向を示した。

そこで NaF の G 蛋白質への直接作用と考えられているシグナル伝達機構が正常と炎症小腸での相違を調べるため神経系の遮断剤としてアトロピンを、NO の合成阻害剤として L-NAME を同時に前投与し、イノシトール代謝を介するシグナル伝達機構のホスホリパーゼ C の抑制剤であるネオマイシンおよびカルシウムブロッカーであるベラパミルを投与中に、高濃度の NaF を加え収縮運

動を測定した。本来ならアトロピンでなく正常、炎症すべて有意に差のあるTTXを投与すべきかもしれないが¹⁷⁾¹⁸⁾、犬にかなりの負担になると思われ、アトロピンでもほぼ有意差があるので(高濃度NaFの炎症小腸でp値は0.058であった)、アトロピンを遮断剤として使用した。ベラパミル、ネオマイシンともに炎症小腸での収縮運動が抑制される傾向を認めたが有意差はなく、炎症はイノシトール代謝やカルシウムを介するシグナル伝達機構よりも神経系を介し、腸管の収縮運動に影響を与えていると考えられた。

結 論

炎症腸管ではG蛋白質の活性化物質のNaFによる小腸の収縮運動は抑制された。その機序として、小腸平滑筋のシグナル伝達機構よりも神経を介する影響が強いということが示唆された。

謝 辞

稿を終えるにあたり、消化器外科学講座下部消化管外科学教室員の皆様に厚く御礼申し上げます。

文 献

- 1) Kellow JE, Borody TJ, Phillips SF, *et al*: Human interdigestive motility: variations in patterns from esophagus to colon. *Gastroenterology*, 1986; **91**: 386~395.
- 2) Sarna SK, Donahue K, Cherif YE: Computer analysis of gastrointestinal motor activity (Abstract). *Gastroenterology*, 1986; **91**: 1066.
- 3) Kahn RA: Fluoride is not an activator of the smaller (20-25 kDa) GTP-binding proteins. *J Biol Chem*, 1991; **266**: 15595~15597.
- 4) Jouët P, Sarna SK, Singaram C, *et al*: Immunocytes and abnormal gastrointestinal motor activity during ileitis in dogs. *Am J Physiol*, 1995; **269**: G913~924.
- 5) Kellow JE, Phillips SF: Altered small bowel motility in irritable bowel syndrome is correlated with symptoms. *Gastroenterology*, 1987; **92**: 1885~1893.
- 6) Sarna SK, Karaus M, Hogan WJ, *et al*: Motor correlates of idiopathic abdominal pain (Abstract). *Gastroenterology*, 1993; **104**: A576.
- 7) Karaus M, Sarna SK: Giant migrating contractions during defecation in the dog colon. *Gastroenterology*, 1987; **9**: 925~933.
- 8) Murthy KS, Makhlof GM: Fluoride Activates G protein-dependent and independent Pathway in dispersed intestinal smooth muscle cells. *Biochim Biophys Res Commun*, 1994; **202**: 1681~1687.
- 9) Hillemeier C, Bitar NB, Sohn U, *et al*: Protein kinase C mediates spontaneous tone in the cat lower esophageal sphincter. *J pharmacol Exp Ther*, 1996; **277**: 144~149.
- 10) Sarna SK: *In vivo* myenteric activity: methods, analysis, and interpretation. In: *Handbook of Physiology. Gastrointestinal System. Motility and Circulation*. Bethesda, MD: Am Physiol Soc, 1989, sect. 6, vol. I, part 1, chapt. 21, 817~863.
- 11) Nakahata N, Nakanishi H, Suzuki T: Difference between the inhibitory actions of Prostaglandin E₁ and verapamil in canine small intestine. *Eur J. pharmacol*, 1980; **63**: 340~355.
- 12) Murthy K, Kuemmerle J, Makhlof G: Agonist-mediated activation of PLA₂ initiates Ca²⁺ mobilization in intestinal longitudinal smooth muscle. *Am J Physiol*, 1995; **269**: G93~102.
- 13) Sarna SK: Giant migrating contractions and their myenteric correlates in the small intestine. *Am J Physiol*, 1987; **253**: G697~705.
- 14) Ward SM, Dalziel HH, Thonbury KD, *et al*: Nonadrenergic, noncholinergic inhibition and rebound excitation in canine colon depend on

- nitric oxide. *Am J Physiol*, 1992; **262**: G237 ~ 243.
- 15) Toda N, Baba H, Okamura T: Role of nitric oxide in non-adrenergic, non-cholinergic nerve-mediated relaxation in dog duodenal longitudinal muscle strips. *Jpn J Pharmacol*, 1990; **53**: 527 ~ 534.
- 16) Takahashi A, Tomomasa T, Kaneko H, *et al*: *In vivo* recording of colonic motility in conscious rats with deficiency of interstitial cells of Cajal, with special reference to the effects of nitric oxide on colonic motility. *J Gastroenterol*, 2005; **40**: 1043 ~ 1048.
- 17) Huizinga JD, Tomlinson J, Pintin-Quezada J, Involvement of nitric oxide in nerve-mediated inhibition and action of vasoactive intestinal peptide in colonic smooth muscle. *J Pharmacol Exp Ther*, 1992; **260**: 803 ~ 808.
- 18) Tsukamoto M, Sarna SK: A novel motility effect of tachykinins in normal and inflamed colon. *Am J Physiol*, 1997; **272**: G1607 ~ 1614.
- 19) Code CF, Merlett JA: The interdigestive myoelectric complex of the stomach and small bowel of dog. *J Physiol*, 1975; **246**: 289 ~ 309.
- 20) 伊藤 漸: Extraluminal strain gage force transducerの作製と慢性植込. *日本平滑筋誌*, 1976; **13**: 33 ~ 43.
- 21) 康 謙三: Strain gage force transducer (SG) 法による覚醒犬消化管運動についての実験的研究. *日本平滑筋誌*, 1989; **25**: 97 ~ 111.

Summary

Mechanism of the contractions in normal and inflamed canine ileum.

Objective : Our aim was to investigate the contractions activated by Sodium Fluoride (NaF), a GTP-binding protein activator, in normal and inflamed ileum.

Materials and methods : The experiments were performed on conscious dogs by close-intraarterial infusions of test substances or inhibitors of neuron, NO and signal transduction pathway. Inflammation was induced by mucosal exposure to ethanol and acetic acid.

Results : NaF stimulated phasic contractions dose-dependently in normal and inflamed ileum. The contraction in inflamed ileum was significantly suppressed ($p < 0.05$). Phasic contractions by NaF were inhibited by nicotinic receptor blockade, blockade of neuronal conduction and muscarinic receptors in the normal and inflamed ileum. By contrast, the response to NaF was enhanced after blockade of NO. The smooth muscle signal transduction pathways utilized by NaF were investigated after cholinergic and nitronergic blockade. The smooth muscle response to NaF was inhibited dose-dependently by Calcium antagonist and inhibitor of phospholipase C. The response in the inflamed ileum was smaller than those in the normal ileum.

Conclusions : NaF activates the cholinergic and nitronergic neurons and may also act directly on ileal circular smooth muscle cells to stimulate phasic contractions. Contractions in inflamed ileum may be regulated by neurons more than by the signal transduction pathway in smooth muscle.

Key words : GTP-binding proteins, smooth muscle contractions, inflammation