

## 論文の内容の要旨

論文題目：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

氏名：大橋 雅津代

過敏性腸症候群(Irritable Bowel Syndrome: IBS)は、機能的消化管障害の1つに分類され、便秘異常(便秘や下痢)と慢性的な腹痛(内臓知覚過敏)を伴う疾患である。臨床的にはIBSの発症原因を特定することは難しいが、社会ストレスあるいは腸管内の感染・炎症が引き金となり、自律神経系や腸管内神経系に支障を与え発症するのではないかと考えられている。IBSは症状により、便秘型、下痢型、交互型の3つに分類される。薬物治療は、患者が呈する消化管運動異常を緩和するのみで対症療法が主なものであり、満足度が極めて低い。

腸管には、知覚神経、介在神経、運動神経から構成される腸管壁内神経が細部まで発達している。腸管神経叢の知覚神経が興奮し、その信号を脊髄に伝えることで痛みが生じる。IBS患者では、腸管の炎症性や免疫系細胞の変化が報告され、肥満細胞が内臓の知覚異常に影響している可能性が指摘されている。

本研究では、腸炎を誘発するハプテンとして頻用される2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS)を用い、中用量で処置することによりIBS様症状を呈するモデル動物の作出を試みた。具体的には、IBSとしてのモデルの妥当性と新規内臓痛治療の開発における有用性について、以下の3点に着目して解析した。

- 1) 近位結腸のTNBS腸炎が遠位結腸の知覚に及ぼす影響
- 2) 近位結腸のTNBS腸炎が引き起こす遠位結腸の痛覚過敏における肥満細胞の関与
- 3) IBS治療薬の創出を目的としたターゲットバリデーションの実施

## 第一章 近位結腸の TNBS 腸炎が遠位結腸の知覚に及ぼす影響

### 【方法】

SD ラット近位結腸に中用量 (50 mg/kg) の TNBS を投与し、処置後 7 日目にバルーン伸展刺激を用いて遠位結腸の内臓痛閾値を測定した。また、microPET を用いてバルーン刺激時の脳活性を測定した。

### 【結果と考察】

近位結腸に中用量の TNBS を処置して腸炎を誘発させたのち、経時的に内臓痛閾値を測定すると、腸炎惹起後 5 日から 14 日目の遠位結腸において、伸展刺激に対する痛み感受性の有意な増大がみられた。この遠位結腸の痛覚過敏は、投与後 7 日目において最も顕著であり、全ての TNBS 処置ラットは 35 mmHg 以下の伸展刺激により特徴的な痛み行動 ( $\alpha$ -position) を示した。TNBS 処置ラット (7 日目) において、遠位結腸に 35 mmHg の伸展刺激を加えた際の脳活性を microPET で測定すると、視床および第一次体性感覚野に局在する有意な活性増加が認められた。一方、擬似オペ群では脳活性の有意な反応は認められなかった。さらに、この活性増加は中枢性鎮痛薬のモルヒネの投与により完全に消失し、このとき内臓痛閾値をも完全に回復させた。このことは、伸展刺激で誘発している特異的行動が“痛み反応”に基づく行動であることを示し、さらに TNBS 処置 7 日目のラットは内臓痛を呈していると考えられた。

次に、中用量の TNBS 処置後 7 日目の HE 染色および MPO 活性を測定したところ、TNBS に直接暴露された近位結腸には粘膜壊死と炎症性細胞浸潤が観察され、組織中 MPO の有意な上昇が認められた。一方、遠位結腸では粘膜壊死は観察されず、MPO 含有量の増加も認められなかったことから、TNBS 腸炎は近位結腸に限局していることが分かった。

以上のことから、近位結腸の TNBS 腸炎は、距離の離れた遠位結腸の痛覚過敏を誘導し、その結果、消化管管腔内壁伸展刺激に対して内臓痛閾値を低下させることが明らかになった。この痛覚過敏は、視床および第一次体性感覚野の脳活性増加を伴い、中枢性鎮痛薬のモルヒネにより消失した。従って、近位結腸の低濃度 TNBS 腸炎ラットは、IBS モデル動物として有用であると考えられた。

## 第2章 近位結腸の TNBS 腸炎が引き起こす遠位結腸の痛覚過敏における肥満細胞の関与

### 【方法】

実験には、SD ラット、肥満細胞欠損ラット (Ws/Ws) およびそのコントロールラット (W+/W+) を用いた。近位結腸に中用量の TNBS を処置し、遠位結腸で痛覚過敏を誘発した。薬物の作用および肥満細胞の変化は、痛覚過敏が最も顕著である TNBS 処置後 7 日目のラットを用いて測定した。

### 【結果と考察】

TNBS 処置ラット(7 日目)において、伸展刺激に対して痛み感受性が増大している遠位結腸では、トルイジンブルー染色陽性の粘膜型肥満細胞数(MMC)が有意に増加し、擬似オペ群と比べて単位面積(mm<sup>2</sup>)あたりの細胞数は 1.5 倍であった。さらに、遠位結腸組織を器官培養し、MMC の特異的マーカーの rat mast cell protease-2 (RMCP-2)の遊離量を測定したところ、腸管重量あたりの RMCP-2 遊離量は約 3 倍であった。これらの結果から、IBS モデルラットにおける遠位結腸粘膜組織では、肥満細胞の浸潤が有意に増加しているだけでなく、浸潤した肥満細胞が脱顆粒亢進を伴っており、遠位結腸での過敏症の発現に関与している可能性が示唆された。

次に、TNBS 腸炎と肥満細胞の関係について検討した。Ws/Ws ラットおよび W+/W+ラットの結腸組織を HE 染色すると、TNBS に直接暴露された近位結腸では粘膜壊死と炎症性細胞浸潤が認められたが、肥満細胞欠損の有無による違いは観察されなかった。さらに、近位および遠位結腸の組織内 MPO 量を測定したところ、両ラットの近位結腸で同程度の MPO の有意な上昇が認められ、遠位結腸での MPO の増加は認められなかった。これら結果から、中用量で惹起した TNBS 腸炎の炎症反応には、腸管肥満細胞の有無は影響しないことが推察できる。また、無処置の W+/W+ラットと Ws/Ws ラットの内臓痛閾値は、いずれのラットも正常値の範囲内(40-60 mmHg)であったことから、肥満細胞欠損の有無は正常時の知覚には影響を与えないと考えられた。

次に、Ws/Ws ラットと W+/W+ラットを用いて、肥満細胞の痛覚過敏への関与を検討した。近位結腸に中用量の TNBS を処置し、7 日目に遠位結腸での内臓痛閾値を測定した。W+/W+ラットでは、擬似オペ群と比べて有意に内臓痛閾値が低下し、遠位結腸で痛覚過敏が観察された。一方、Ws/Ws ラットでは、擬似オペ群と比べて有意な内臓痛閾値の変化が見られず、伸展刺激に対する痛覚過敏は発症しなかった。この結果は、TNBS 腸炎による遠位結腸の痛覚過敏には肥満細胞の存在が必須であることを示唆している。

以上の成績から、中用量の TNBS により誘発した近位結腸の腸炎は、何ら損傷を受けていない遠位結腸で痛覚過敏を引き起こし、この過敏症には肥満細胞浸潤および脱顆粒亢進が関与することが示唆された。これらの変化は、臨床で報告されている Post Infectious・Inflammatory IBS (PI-IBS) 患者の形態学的変化と類似しており、本 IBS 動物モデルは PI-IBS 様病態モデルになり得ると考えられた。

### 第三章 IBS 治療薬の創出を目的としたターゲットバリデーション

#### 【方法】

SD ラットの近位結腸に中用量の TNBS を投与し、7 日目に遠位結腸の痛覚過敏に対する各種薬物の作用を検討した。

#### 【結果と考察】

IBS の内臓痛知覚異常は、腸管の知覚神経が興奮することにより生じるが、第二章においてそ

の知覚異常に肥満細胞が関与することを明らかにした。また、ヒトは多くのストレス負荷により IBS 症状を呈することが実証されている。これらの要因を考慮し、本項目では本研究で樹立した PI-IBS モデルラットを用いて、IBS の内臓痛治療薬開発を想定したいくつかの薬剤を用いて、ターゲットバリデーションを行った。

知覚神経終末に発現する TRPV-1 受容体の拮抗薬(BCTC)、肥満細胞膜安定化剤(doxanzantrazole)、抗不安薬(amitriptyline)、神経因性疼痛治療薬の神経型 N 型  $Ca^{2+}$ チャンネル阻害薬(pregabalin)、消化管運動亢進作用を持つ  $5HT_4$  受容体作用薬(CJ-33446)および消化管運動抑制効果を持つ  $5HT_3$  受容体拮抗薬(alosetron)を投与し、PI-IBS モデルラットの痛覚過敏に対する作用を解析した。その結果、得られた効果に優劣はあるものの、 $5HT_4$  受容体作用薬を除く全ての薬剤は、本 IBS モデルラットで有意に内臓痛抑制効果を示した。

これらの知見は、臨床における IBS 内臓痛治療の効果を予測することを可能にし、新規治療薬のターゲットバリデーションに極めて有用であると考えられた。

#### 【まとめ】

本研究により、近位結腸に投与した中用量の TNBS は、それより下流に位置する炎症を惹起していない遠位結腸で痛覚過敏を引き起こすこと、そしてこの過敏症には肥満細胞が重要な役割を果たすことが明らかとなった。すなわち、近位結腸の免疫系が活性化して種々の炎症性サイトカインが産生され炎症が生じると、何らかの経路でこの変化が遠位結腸に伝搬し、その結果肥満細胞の浸潤と活性化を惹起し、その結果として痛覚過敏が生じると考えられた。今回報告した腸管肥満細胞の変化は、形態学的あるいは組織学的に IBS 患者で観察される変化に酷似しており、IBS 患者においても同様のメカニズムで痛覚過敏が形成されている可能性が考えられた。

以上、本研究により樹立した IBS モデル動物を用いた病態解析は、IBS 病態生理の解明に役立つとともに、新規 IBS 治療薬の創出と検証に役立てられると考えられた。