

脊髄排便中枢を介する大腸運動の制御機構に関する研究

2016年

岐阜大学大学院連合獣医学研究科

(岐阜大学)

内藤 清惟

脊髄排便中枢を介する大腸運動の制御機構に関する研究

内藤 清惟

目 次

略語一覧	3
諸言	4
実験材料及び実験方法	7
第1章	13
脊髄排便中枢におけるグレリン感受性神経の性質の検討	
結果	
考察	
第2章	26
脊髄排便中枢におけるドパミンの大腸運動促進メカニズムの検討	
結果	
考察	
第3章	41
脊髄排便中枢における大腸運動制御へのノルアドレナリンの関与の検討	
結果	
考察	
第4章	55
カプサイシンによる大腸運動亢進への下行性疼痛抑制経路の関与の検討	
結果	
考察	
総合考察	67
結論	71
謝辞	73
文献	74

略語一覧

AICAR	aminoimidazole carboxamide ribonucleotide
GHSR1a	growth hormone secretagogue receptor 1a
IBS	irritable bowel syndrome (過敏性腸症候群)
IML	intermediolateral cell column (中間質外側部細胞柱)
i.L.	intraluminal injection (管腔内投与)
i.t.	intrathecal injection (脊髄内投与)
i.v.	intravenous injection (静脈内投与)
NPY	neuropeptide Y (ニューロペプチド Y)
SD	standard deviation (標準偏差)
TRPV1	transient receptor potential cation channel, subfamily V, member 1

諸 言

消化管にはよく発達した内在神経系が存在しており (14), 消化管の機能を直接支配している。内在神経系には管腔内の情報を受容する感覚神経, 受容した情報を統合する介在神経, 統合した情報を平滑筋に出力する運動神経が存在し, 消化管内容物の量や組成に合わせて消化管の運動を調節している。この内在神経系によって, 消化管は中枢神経系から切り離されても, 統合された運動性を保つことが可能である。例えば, 摘出した消化管標本の内腔から伸展刺激を加えると, 内容物を口側から肛門側へと輸送する蠕動運動を引き起こすことができる。このように, 内在神経系が消化管の運動性を統合的に調節できることから, 消化管の運動制御への中枢神経系の関与は少ないと考えられていた。そのため, これまで多くの興味内在神経系へと向けられ, 消化管の摘出標本を用いた内在神経系に関する研究が盛んに行われてきた。一方で, 中枢神経系による消化管運動の制御機構は, あまり研究が進んでおらず, 未だに不明な点が多い。

中枢神経系による消化管運動の制御機構は, これまであまり重要視されてこなかった。しかし, 近年ストレスによる排便障害が社会的な問題となっていることから, その重要性が再認識されている。例えば, 過敏性腸症候群 (IBS: irritable bowel syndrome) は, 10-20%の青年期以上の年齢で症状が見られ, QOL の低下や, 医療費の増大などが大きな問題となっている (35)。これまでに内在神経系を対象とした多くの研究が行われているが, IBS の病態の解明および治療法の確立に至っていない (20)。ストレスが症状の引き金や増悪因子となっていることから (3, 40), IBS の病態において中枢神経系が非常に重要な役割を果たすと考えられており, 中枢神経系がどのように病態形成に関わるのかを解明すること

が求められている。しかしながら、中枢神経系による排便制御機構は不明な点が多いため、病態の解明を進めるためには中枢神経系による排便制御機構の解明が不可欠である。

中枢神経系による大腸運動の制御は、脊髄の腰仙髄部にある脊髄排便中枢と、脳に存在する上脊髄排便中枢の二つの排便中枢によって行われていると考えられている (59)。直腸内容物による物理的および化学的な刺激によって、排便反射が誘起され大腸運動が亢進し、この反応は脊髄排便中枢よりも尾側の脊髄を切断すると消失する (10, 18)。また、脊髄排便中枢よりも頭側を切断しても消失はしないが、直腸刺激に対する排便反射の閾値が上昇する (36, 44)。これらのことから、排便反射は大腸と脊髄排便中枢からなる反射弓で成り立っており、上脊髄排便中枢がこの反射の閾値を調節することで、排便のタイミングを制御していると考えられる。このように、中枢神経系に二つの排便中枢が存在することは知られているが、これら二つの排便中枢による制御の詳しいメカニズムは未だ不明なままである。例えば、上脊髄排便中枢が脊髄排便中枢を調節する際、どのような神経回路や伝達物質を介しているかはほとんど明らかになっていない。特に脊髄排便中枢における制御メカニズムはほとんど分かっておらず、これまでに脊髄排便中枢に投与した摂食促進ペプチドのグレリンによって、大腸運動が促進することが報告されているのみである (23, 64)。そこで本研究では、脊髄排便中枢に着目して研究を行うことで、中枢神経系による大腸運動制御メカニズムの解明することを目的とした。

第 1 章では、これまでに報告されているグレリンの作用に着目し、脊髄排便中枢における大腸運動制御メカニズムの検討を行った。第 2, 3 章では、上脊髄排便中枢と脊髄排便中枢の連絡に着目し、脊髄排便中枢で作用する新規神経伝達物質の検討を行った。第 4 章では、第 2, 3 章の結果を受け、下行性疼痛

抑制経路に着目して、脊髄排便中枢および上脊髄排便中枢を介した、排便反射経路の検討を行った。本研究の結果から、下行性疼痛抑制経路を介した大腸運動制御メカニズムの存在が明らかになった。さらに、このメカニズムが IBS における病態形成に関連する可能性が示唆された。

実験材料及び実験方法

実験動物

実験には体重 300-450g の Sprague-Dawley 系統の雄ラット (Japan SLC, Inc., Shizuoka, Japan) を用いた。ラットは室温 23°C, 明期 12 時間, 暗期 12 時間の周期に設定された環境で飼育し, 餌は MF (Oriental Yeast Co., Ltd., Tokyo, Japan) を与えた。餌と水は自由に摂取できるようにした。

本研究における動物実験は全て, 岐阜大学応用生物科学部実験審査委員会で審査を受けた後に許可されたものであり, 岐阜大学動物実験取扱規程に従って実施した (承認番号: 12121, 13076, 14100)。

麻酔管理および血圧測定

ラットはケタミン塩酸塩 (50mg/kg, Daiichi Sankyo Co., Ltd., Tokyo, Japan) の筋肉内注射によって鎮静をかけたのち, α -クロラロース (60mg/kg, Nacalai Tesque, Inc., Kyoto, Japan) の尾静脈内投与によって麻酔を行った。十分な麻酔深度が得られたのちに, 大腿動脈にポリエチレン・チューブ (PE 50, Intramedic Clay Adams, Franklin Lakes, NJ, USA) を挿入, 固定した。挿入したカニューレを分岐して, 一方を圧トランスデューサー (MLT0699 Disposable BP Transducer, ADInstruments Pty. Ltd., NSW, Australia) に接続して観血的血圧測定を行った。分岐したもう一方は, 安定した麻酔深度を得るために, インフュージョン・ポンプ (YSP-201, 株式会社 YMC, Kyoto, Japan) につなぎ, 麻酔薬 (α -クロラロース 10-20 mg/kg/h, ケタミン塩酸塩 3-5 mg/kg/h) の持続投与を行った。

麻酔下ラットにおける大腸運動測定

大腸運動測定系の概要を Fig. 1 に示した。麻酔下のラットの腹部を正中切開し、膀胱の背側に位置する遠位結腸を露出して、結腸に対して垂直方向に小切開を行い、シリコン・チューブ (Laboran silicone tube 3×5, AS ONE Corporation., Osaka, Japan) を肛門方向に向かって挿入、固定し、閉腹した。結直腸内の糞塊を生理食塩水で洗い流した後、肛門にもガラス・チューブ (内径 3 mm, 外径 5 mm) を挿入、固定した。大腸内腔の圧力を一定に保つために、口側のチューブをマリオット・ボトルに接続し、37°Cに温めた生理食塩水で内腔を満たした。一方、肛門側のチューブは、シリコン・チューブ (Laboran silicone tube 4×6, AS ONE Corporation.) をつなげて分岐させ、一方を圧トランスデューサーに接続して大腸内腔圧の変動を記録した。もう一方は、一方向弁 (S-205, SUDO & COMPANY Inc., Aichi, Japan) を介したのちに排出口とした。この排出口から送り出されてきた内容液をシリンダーで受け止めて、アンプ (AC STRAIN AMPLIFIER AS1202, NEC Corporation., Tokyo, Japan) に接続した歪みトランスデューサー (T7-30-240, 株式会社エー・アンド・デイ, Tokyo, Japan) で重さを測り、大腸運動に伴う内容液の排出量を測定した。大腸の内腔圧はマリオット・ボトルと排出口の高さを調節し、3-5 mmHg となるように設定した。大腸運動に対する膀胱容量の変化の影響を排除するために、膀胱を小切開しポリエチレン細管 (Fr No. 8, Hibiki) を挿入、固定し排尿を行った。全ての手術が完了したのち、大腸運動および血圧が安定するまで約1時間ラットを静置した。

試薬の投与

試薬を脊髄排便中枢に投与するために、脊髄へのカニューレーションを行った。30 ゲージ注射針 (フローマックス, NIPRO Corporation, Osaka, Japan) にポリエチ

レン・チューブ (PE 10, Intramedic Clay Adams) を接続し、内腔が 4 μ L となるように脊髄内投与カニューレを作成した。カニューレに生理食塩水を満たし、脊髄排便中枢のある腰仙髄 L6-S1 領域に挿入し、シリコン (Kwik-sil, World Precision Instruments, FL, USA) または瞬間接着剤 (Aron Alpha Extra; Toagosei, Co., Ltd., Tokyo, Japan) で固定した。脊髄内投与 (i.t.) は、マイクロシリンジ (705 SNR 50 μ L SYR, HAMILTON, Nevada, USA) を用いて試薬 10 μ L を投与した後すぐに生理食塩水 10 μ L を追加投与して行った。

アトロピンの静脈内投与 (i.v.) のために、大腿静脈にポリエチレン・チューブ (PE 50) を挿入、固定した。持続投与を行う場合は、インフュージョン・ポンプに接続して行った。

大腸管腔内投与のために、大腸内にポリエチレン・チューブ (PE 10) を大腸のカニューレとともに遠位結腸側から挿入し、固定した。管腔内投与は、マイクロシリンジ (705 SNR 50 μ L SYR, HAMILTON, Nevada, USA) を用いて試薬 10 μ L を投与した後すぐに生理食塩水 40 μ L を追加投与して行った。

各種神経の切断

本研究では、神経経路の特定のために各種神経の切断実験を行った。脊髄の切断は大腸運動の記録を取りながら行った。ラット背側から椎弓切除術によって脊髄を露出し、マイクロ剪刀を用いて脊髄を切断した。骨盤神経の切断は結直腸のカニューレーションの前に行った。骨盤神経は骨盤神経節から中枢側に 2 mm の部分で両側切断した。

薬剤

α -クロラロースは、10% 2-hydroxypropyl-beta-cyclodextrin (Wako Pure Chemical

Industries, Ltd., Osaka, Japan) に溶解した。 α -クロラロース溶解液とケタミン塩酸塩は必要に応じて生理食塩水で希釈して用いた。

第1章では、グレリン、ニューロペプチド Y (NPY) (Peptide Institute, Osaka, Japan), テトロドトキシン (Sigma, St Louis, MO, USA), レプチン (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA), aminoimidazole carboxamide ribonucleotide (AICAR) (Calbiochem, La Jolla, CA, USA), BIBP3226 trifluoroacetate salt (Bachem, Bubendorf, Switzerland) を用いた。レプチン以外の全ての試薬は蒸留水で溶解した。レプチンはトリス緩衝液 (pH 8) で溶解した。

第2章ではドパミン塩酸塩, SCH23390, キンピロール, SKF38393, テトロドトキシン (Sigma), ハロペリドール (セレネース®, Sumitomo Dainippon Pharma Co., Ltd., Osaka, Japan) を用いた。全ての粉末状試薬は蒸留水で溶解した。

第3章では、ノルアドレナリン重酒石酸塩, フェニレフリン塩酸塩, キシラジン塩酸塩, イソプロテレノール塩酸塩, プラゾシン塩酸塩, アトロピン硫酸塩一水和物, テトロドトキシン (Sigma) を用いた。プラゾシン以外の全ての試薬は蒸留水で溶解した。プラゾシンは 20% dimethyl sulfoxide (Nacalai Tesque, Inc.) で溶解した。

第4章では、カプサイシン, カプサゼピン, プラゾシン塩酸 (Sigma), ハロペリドール (セレネース®) を用いた。カプサイシンとカプサゼピンは 100% エタノールで溶解したのち, 10% Tween 80 加生理食塩水で 10 倍に希釈して用いた。プラゾシンは 20% dimethyl sulfoxide で溶解した。

統計処理およびデータ表記

数値データは全て平均値 \pm SD (Standard deviation) で表記した。2 群間の検定は, 同一個体から得られたデータ群を比較する場合は対応のある t 検定を, 異なる

る個体から得られたデータ群を比較する場合は対応のない t 検定を用いた。P 値 < 0.05 の場合を統計学的に有意な差があるとした。

大腸運動の評価は、反応が始まってからの 5 分間のデータを用いて行った。反応が見られなかった場合は、試薬が十分に作用していると考えられる投与 5 分後からの 5 分間のデータを用いた。大腸内腔圧の変動は、基礎となる圧力から 2 mmHg 以上の上昇が見られた場合に、収縮として数えた。

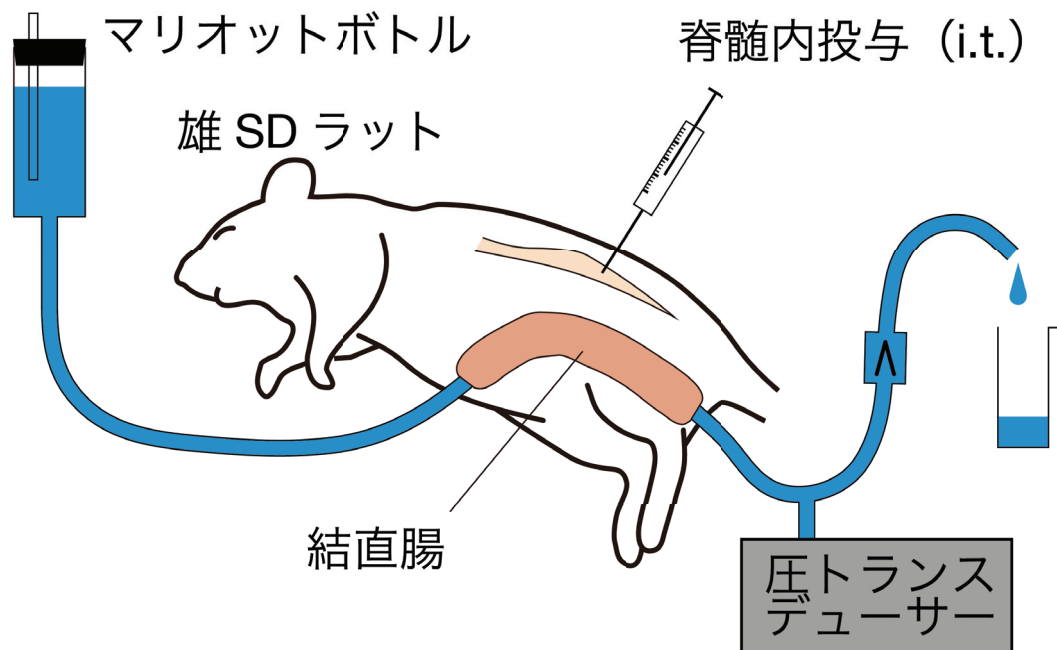


Figure. 1 麻酔下ラットにおける大腸運動測定法の概要

遠位結腸および肛門にチューブを挿入・固定し閉腹した。大腸内腔の圧力を一定に保つために、口側のチューブをマリオット・ボトルに接続した。肛門側のチューブは分岐させ、一方を圧トランスデューサーに接続して、もう一方は一方方向弁を介したのちに排出口とした。37°Cに温めた生理食塩水で内腔を満たした。圧トランスデューサーを介して大腸内腔圧の変動を、排出口から送り出されてきた排出液をシリンダーで集め、大腸運動に伴う排出量を測定した。大腸の内腔圧はマリオット・ボトルと排出口の高さを調節し、3-5 mmHg となるように設定した。

第 1 章

脊髓排便中枢におけるグレリン感受性神経の性質の検討

これまでの研究において、脊髓排便中枢に投与された摂食促進ペプチドのグレリンが、大腸運動促進作用をもつことが報告されている (23, 64)。摂食行動と消化管運動には密接な関連があることから、グレリンの消化管運動制御作用について、これまで多くの研究が行われてきた。その中で、末梢に投与されたグレリンは大腸運動に影響を与えないが (49, 73)、グレリンの機能的受容体である GHSR1a (growth hormone secretagogue receptor 1a) の合成アゴニストを末梢に投与すると、大腸運動が亢進することが報告された (64)。ペプチドのグレリンは血液-脳関門を通過できないが、合成アゴニストは通過できることから、この大腸運動促進作用は中枢神経系への作用であると考えられた。この作用は脳と脊髓排便中枢を連絡する胸髄を切断しても影響を受けないが、脊髓排便中枢と大腸を繋ぐ馬尾神経の切断によって消失することから、合成アゴニストは脊髓排便中枢に作用していることが示唆された。グレリンを脊髓排便中枢に直接投与したところ大腸運動が亢進したことから、グレリンが脊髓排便中枢において大腸運動促進作用を発揮することが明らかとなった (64)。しかしながら、脊髓排便中枢におけるグレリン感受性神経の詳細な性質はこれまでほとんど明らかにされていない。

脊髓排便中枢におけるグレリン感受性神経とは対照的に、摂食促進作用に関わるグレリン感受性神経では、その性質についてこれまでに多くの研究が行われている。グレリンの摂食促進作用は、視床下部弓状核に存在する NPY 含有神経に作用することで発揮されると考えられている。視床下部弓状核の NPY 含有

神経はグレリン受容体の GHSR1a を発現しており、この受容体を介してグレリンが AMP キナーゼを活性化し、NPY の合成および放出が促進されることで摂食が亢進する (1, 31, 46, 77)。このグレリンによる摂食亢進は、NPY Y1 受容体の拮抗薬によって阻害されることから、主に NPY Y1 受容体を介して作用していると考えられる (46, 65)。また、視床下部弓状核のグレリン感受性 NPY 含有神経は、摂食抑制ペプチドであるレプチンの受容体も発現しており、レプチンによってグレリン誘発性細胞内 Ca^{2+} の増加が抑制される (30, 52)。したがって、この NPY 含有神経は、グレリンとレプチンによって拮抗的な調節を受けていると考えられている。このように、視床下部弓状核におけるグレリン感受性神経の性質はよく分かっている。そこで、視床下部弓状核のグレリン感受性神経の性質と比較、検討することで、脊髓排便中枢のグレリン感受性神経の性質を明らかにしようと考えた。

中枢神経系による排便制御メカニズムはこれまでほとんど明らかになっておらず、特に脊髓排便中枢においてはグレリンに関するものしか分かっていない。本章では、この脊髓排便中枢におけるグレリンの大腸運動促進作用に着目し、視床下部弓状核のグレリン感受性神経の性質と比較することで、脊髓排便中枢のグレリン感受性神経の性質を検討し、脊髓排便中枢における排便制御メカニズムの解明を試みた。

結 果

脊髄内投与したグレリンによる大腸運動の亢進

全ての個体において、手術終了後から約 30 分で、排出量の増加を伴わない自発性の大腸内腔圧の小さな上昇が記録された (Fig. 2A)。生理食塩水を脊髄内 (L6-S1 領域) に投与したところ、大腸の内腔圧および排出量に変化はみられなかった (Fig. 2A)。対照とするために、脊髄内投与後 5 分からの 5 分間のデータを定量した。収縮頻度は 3.4 ± 1.3 contractions/5 min (Fig. 3A), 排出量は 0.47 ± 0.09 mL/5 min (Fig. 3B) であった (n=5)。過去の報告 (23) において最大反応を引き起こすことが示されている, 0.3 nmol のグレリンを脊髄内投与したところ大腸運動が亢進した (Fig. 2B)。この反応を定量したところ, 収縮頻度は 12.6 ± 1.4 contractions/5 min (Fig. 3A), 排出量は 3.24 ± 0.40 mL/5 min (Fig. 3B) であった (n=5)。対照と比較して, 頻度, 排出量が有意に増加した (Fig. 3)。以上のことから, これまでの報告通りグレリンが脊髄排便中枢において大腸運動を促進する作用を持つことが確認された。

脊髄排便中枢における AMP キナーゼ賦活薬の大腸運動に対する影響

視床下部弓状核において, グレリンが NPY 含有神経の AMP キナーゼを活性化することが報告されている (31)。そこで, 脊髄排便中枢において AMP キナーゼを活性化することで, グレリンの大腸運動促進作用が再現されるかを検討した。AMP キナーゼ賦活薬の AICAR ($1.5 \mu\text{mol}$) を脊髄内投与したが, Fig. 4 に示すように, 大腸運動に変化はみられなかった。AICAR に続いて同じカニューレからグレリン (0.3 nmol, i.t.) を投与した場合には大腸運動が亢進したため (Fig. 4), AICAR は適切な位置に投与されていることが確認された。

脊髄排便中枢におけるグレリンとレプチンの相互作用

脊髄排便中枢のグレリン感受性神経において、視床下部弓状核のグレリン感受性神経と同様に、グレリンとレプチンの拮抗作用があるかを検討した。脊髄内に単独投与したレプチン (0.3 nmol) は大腸運動に影響を与えなかった (Fig. 5A)。また、前投与されたレプチン(0.3 nmol, i.t.)はグレリン (0.3 nmol, i.t.) の作用を抑制しなかった (Fig. 5B)。さらに、グレリン (0.3 nmol, i.t.) によって大腸運動が亢進した状態でレプチン (0.3 nmol, i.t.) を投与したが、大腸運動を抑制しなかった (Fig. 5C)。

脊髄排便中枢におけるグレリン作用への NPY の関与

脊髄排便中枢におけるグレリンの大腸運動促進作用に、NPY 含有神経が関与しているのかを調べるために、NPY Y1 受容体の拮抗薬によってグレリンの作用が阻害されるかを検討した。脊髄内投与された NPY Y1 受容体拮抗薬の BIBP3226 (0.2 μ mol) は、グレリン (0.3 nmol, i.t.) による大腸運動亢進に影響を与えなかった (Fig. 6A)。次に、NPY を脊髄内に投与することで、NPY がグレリンの大腸運動促進作用に関与していないかを確認した。脊髄内投与した NPY (2.4 nmol) によって大腸運動に変化はみられなかった (Fig. 6B)。さらに、NPY が末梢で作用する可能性を考えて、NPY (2.4 nmol) を静脈内投与したが、大腸運動に影響はみられなかった (Fig. 6C)。

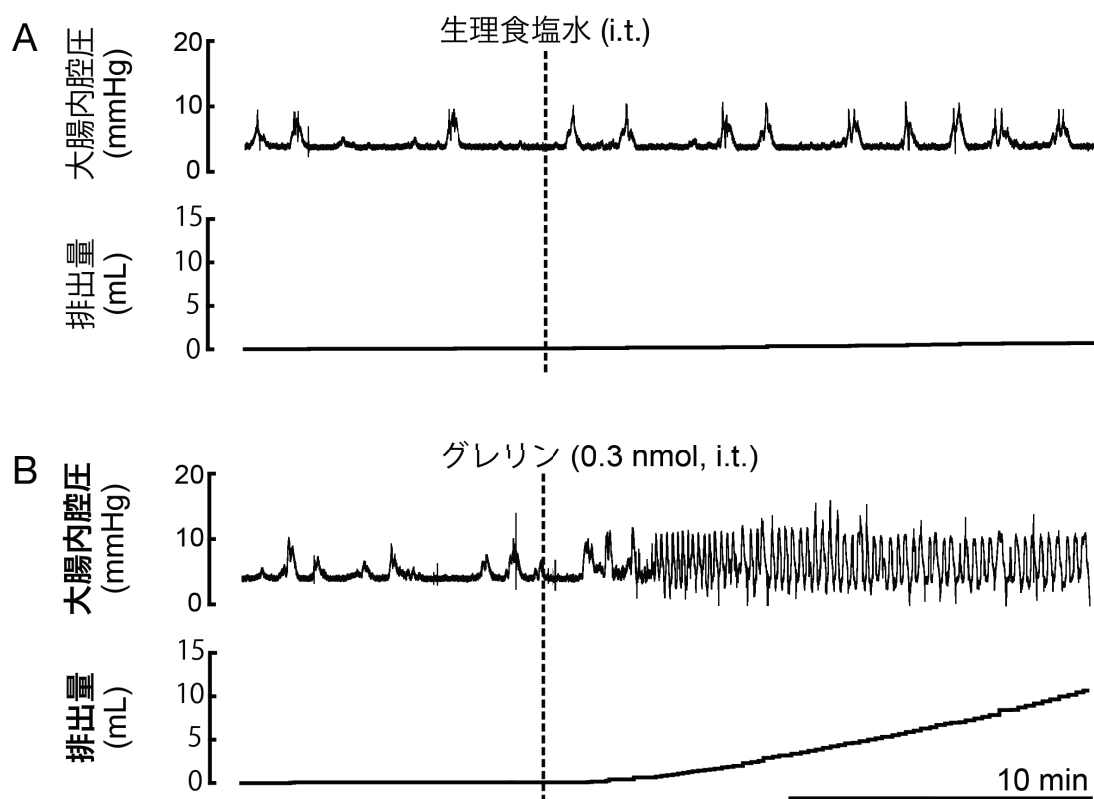


Figure. 2 グレリンの脊髄内投与による大腸運動の亢進

大腸の収縮による大腸内腔圧の変化（上段）と排出量（下段）の典型例を示す。脊髄腰仙髄部への（A）生理食塩水の投与前後、（B）グレリンの投与前後のデータを示している。生理食塩水の脊髄内投与では大腸運動に影響はみられなかった。一方、グレリン（0.3 nmol, i.t.）を投与したところ、大腸内腔圧の顕著な変動とそれに伴う排出量の増加がみられた。i.t.は脊髄内投与を示す。同様の結果が各群5匹のラットから再現性よく得られた。

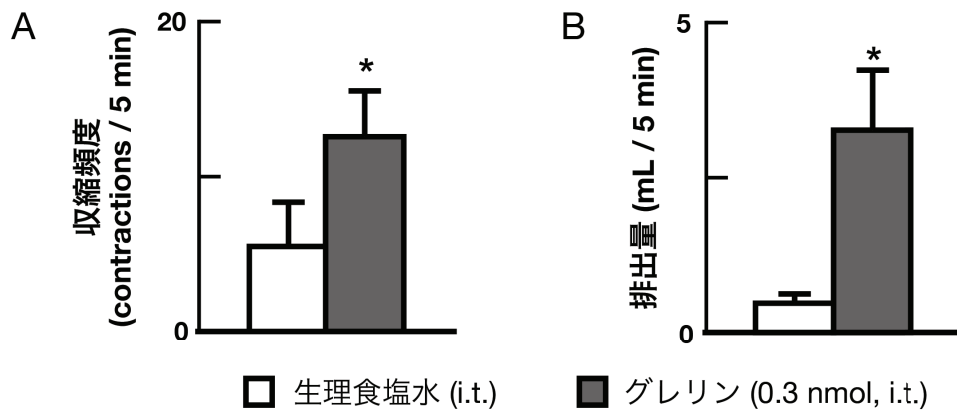


Figure. 3 グレリンの脊髄内投与による収縮頻度および排出量の変化

脊髄内に投与したグレリンの大腸運動促進作用を定量的に評価した。(A) 収縮頻度, (B) 排出量を示している。収縮頻度, 排出量ともにグレリン (0.3 nmol, i.t.) によって有意に増加した。i.t.は脊髄内投与を示す。各データは平均値 \pm SD で表している (n=5)。*は生理食塩水投与群と比較して, 統計的に有意であったことを表す ($P < 0.05$)。

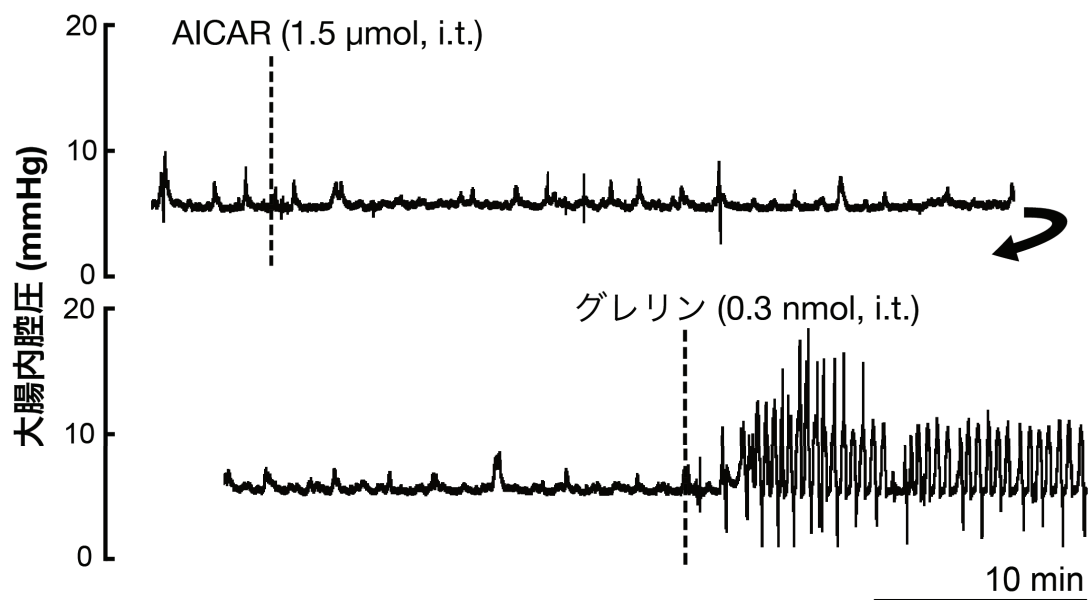


Figure. 4 AICAR の脊髄内投与による大腸運動への影響

大腸の収縮による大腸内腔圧の変化の典型例を示す。脊髄腰仙髄部への AICAR の投与前後, およびグレリンの投与前後のデータを示している。AICAR (1.5 μmol , i.t.) の脊髄内投与によって大腸運動に影響はみられなかった。一方, グレリン (0.3 nmol, i.t.) を投与したところ, 大腸内腔圧が激しく変動した。i.t.は脊髄内投与を示す。同様の結果が各群 5 匹のラットから再現性よく得られた。

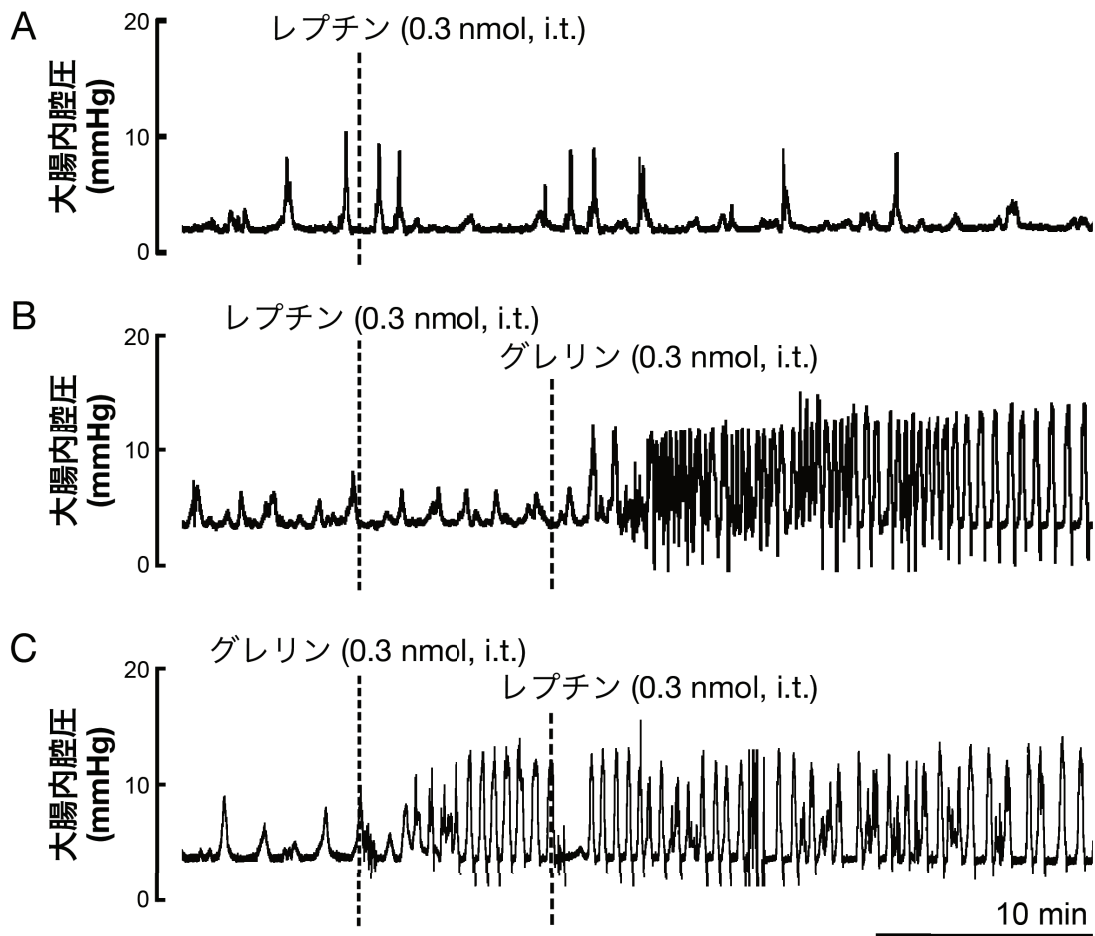


Figure. 5 脊髓排便中枢におけるグレリンとレプチンの拮抗作用の検討

大腸の収縮による大腸内腔圧の変化の典型例を示す。脊髓腰仙髄部への (A) レプチンの単独投与, (B) レプチン投与後にグレリンを投与, (C) グレリン投与後にレプチンを投与した場合のデータを示している。レプチン (0.3 nmol, i.t.) の脊髓内投与によって大腸運動に影響はみられなかった。また, レプチン (0.3 nmol, i.t.) の前投与および後投与では, グレリン (0.3 nmol, i.t.) による大腸運動促進作用への影響はみられなかった。i.t.は脊髓内投与を示す。同様の結果が各群 5 匹のラットから再現性よく得られた。

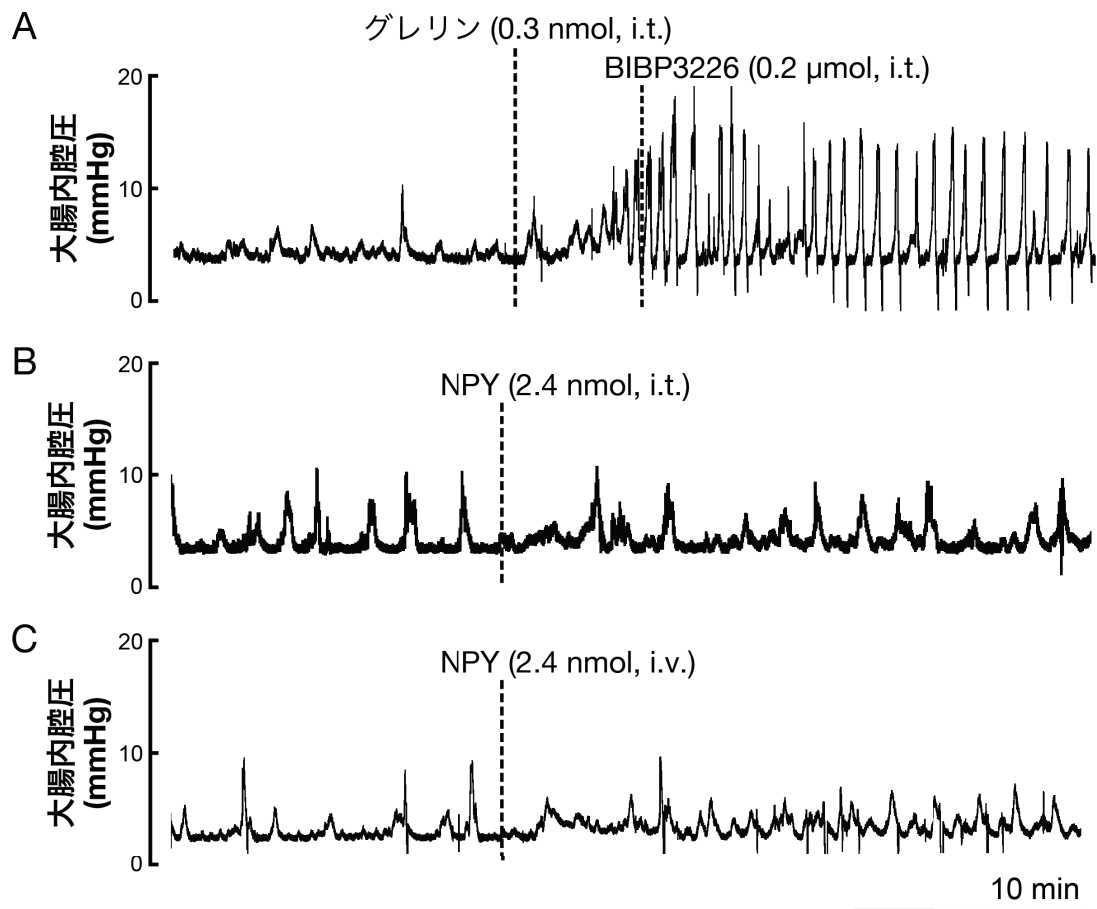


Figure. 6 グレリンの大腸運動促進作用における NPY の関与の検討

大腸の収縮による大腸内腔圧の変化の典型例を示す。脊髓腰仙髄部へ (A) グレリン投与後に NPY Y1 受容体拮抗薬を投与した場合, (B) NPY を投与した場合, (C) 静脈内に NPY を投与した場合のデータを示している。NPY Y1 受容体拮抗薬の BIBP3226 (0.2 μmol, i.t.) による, グレリン (0.3 nmol, i.t.) の大腸運動促進作用への影響はみられなかった。また, NPY (2.4 nmol, i.t.) の脊髓内投与による大腸運動の亢進はみられなかった。さらに, NPY (2.4 nmol, i.v.) による大腸運動の亢進はみられなかった。i.t.は脊髓内投与, i.v.は静脈内投与を示す。

考 察

グレリンの受容体である GHSR1a は視床下部弓状核の NPY 含有神経に多く発現している (77)。GHSR1a は Gq と共役する G タンパク質共役型受容体であり、その細胞内シグナル伝達系は、ホスホリパーゼ C の活性化、イノシトール三リン酸産生および Ca^{2+} 動員である (24, 67)。視床下部弓状核の NPY 含有神経では、グレリンによって増加した細胞内 Ca^{2+} が Ca^{2+} /カルモジュリン依存性キナーゼキナーゼを活性化することで、AMP キナーゼをリン酸化し、摂食が亢進する (2)。脊髄排便中枢のグレリン感受性神経が、視床下部弓状核のグレリン感受性神経と同様に、細胞内シグナル伝達系として AMP キナーゼを利用しているのならば、AICAR の脊髄内投与によって大腸運動が亢進すると考えられる。しかしながら、脊髄内に投与した AICAR は大腸運動を亢進しなかったことから (Fig. 4)、AMP キナーゼは脊髄排便中枢のグレリン感受性神経の細胞内シグナル伝達経路には関与していないと考えられる。本実験で用いた投与量 (1.5 μmol , i.t.) よりも少量の AICAR (0.15 μmol) の脳室内投与によって、ラット視床下部弓状核の NPY 含有神経の AMP キナーゼが活性化し、摂食量の増加を引き起こしていることから (8)、本実験で用いた AICAR の投与量 (1.5 μmol) は反応を引き起こすには十分な量であったと考えられる。

過去の報告において、レプチンの腹腔内または脳室内投与によって、視床下部弓状核のグレリン感受性 NPY 含有神経が直接抑制され、摂食量が減少することが示されている (48, 63, 65)。レプチンとグレリンが視床下部弓状核において拮抗的な作用を發揮することから (30, 46)、脊髄排便中枢のグレリン感受性神経でもレプチンとグレリンが拮抗作用を示すのではないかと考え、レプチンによってグレリンの大腸運動促進作用が抑制されるかを検討した。しかしながら、

脊髄内に投与したレプチンではグレリンの大腸運動促進作用を抑制しなかったことから (Fig. 5), 脊髄排便中枢のグレリン感受性神経はレプチン受容体を発現しておらず, グレリンとレプチンの拮抗作用は存在しないと考えられる。ラットにおいて, 本実験で用いた容量よりも少量のレプチン (0.1 nmol) の脳室内投与によって, グレリンによる摂食促進作用が抑制されたことから (65), 本実験で用いたレプチンの投与量 (0.3 nmol) は十分な量であったと考えられる。

視床下部弓状核において NPY 含有神経がグレリン感受性神経であることから, 脊髄排便中枢のグレリン感受性神経も NPY 含有神経ではないかと考えた。グレリンの摂食促進作用が, NPY Y1 受容体の拮抗薬の BIBP3226 によって消失することから (46, 65), 脊髄排便中枢のグレリン感受性神経が NPY 含有神経なら, BIBP3226 によってグレリンの大腸運動促進作用が阻害されると考えた。しかしながら, BIBP3226 をグレリンと同じ経路から投与しても, グレリンの作用は阻害されなかった (Fig. 6A)。また, NPY Y1 受容体以外の関与を考え, NPY によってグレリンの作用が再現されるか検討したが, NPY を脊髄内に投与しても大腸運動は亢進しなかった (Fig. 6B)。さらに, GHSR1a を発現する軸索終末が, 脊髄排便中枢と大腸をつなぐ経路上の骨盤神経節に終始していることが報告されていることから (15), 脊髄排便中枢のグレリン感受性 NPY 含有神経が脊髄の外でシナプスを形成している可能性が考えられる。もし骨盤神経節でグレリン感受性 NPY 含有神経がシナプスを形成しているのであれば, NPY を血中に投与することで大腸運動促進作用が再現されると考えたが, 血中に投与した NPY (2.4 nmol, i.v.) は大腸運動を亢進しなかった (Fig. 6C)。以上の結果から, 脊髄排便中枢におけるグレリン感受性神経は NPY 含有神経ではない可能性が高い。過去の報告において, GHSR1a は, 仙髄から出る副交感神経の骨盤神経の節前線維に発現していることが *in situ* hybridization 法を用いて示されており (12, 13, 15),

コリン作動性神経が脊髄排便中枢におけるグレリン感受性神経の主体だと推察される。

本章の結果から、脊髄排便中枢におけるグレリン感受性神経は、これまでに知られていた視床下部弓状核のグレリン感受性神経とは大きく異なる性質を持つことが明らかになった。GHSR1a は中枢神経系に広く分布していることから、中枢神経系においてグレリンを産生する神経細胞の存在が示唆され、これまで多くの研究がその存在の証明を試みてきた (7, 19, 21)。しかしながら、免疫組織化学的手法およびレポーターマウスを用いた最近の研究から、中枢神経系にはグレリン産生細胞は存在せず、GHSR1a の内在性のリガンドは胃から分泌されるグレリンであると考えられている (16, 38, 58)。血液中のグレリンは、視床下部弓状核の GHSR1a に直接作用することができるが (61)、脊髄排便中枢の GHSR1a には作用できないことから (59, 64)、視床下部弓状核と脊髄排便中枢の GHSR1a では内在性リガンドが異なるか、脊髄排便中枢の GHSR1a には内在性リガンドが存在しないと考えられる。したがって、それぞれの受容体を活性化するシグナルは大きく異なり、受容体の存在意義も全く違うため、視床下部弓状核と脊髄排便中枢のグレリン感受性神経の性質が大きく異なると推察される。GHSR1a は、ドパミン受容体 D1 および D2 サブタイプ、ソマトスタチン受容体 5 サブタイプ、メラノコルチン受容体 3 サブタイプ、セロトニン受容体 2C サブタイプなど、様々な G タンパク質共役型受容体とヘテロ二量体を形成し、細胞内シグナル伝達を修飾することが知られている (28, 29, 51, 55, 62)。脊髄排便中枢に胃から放出されるグレリンが作用しないことを考えると、グレリンに対する受容体として働くよりも、むしろ、他の G タンパク質共役型受容体のシグナル伝達を調節している可能性が高いと考えられる。

本章では、脊髄排便中枢のグレリン感受性神経は、これまでに報告されてい

る視床下部弓状核のグレリン感受性神経とは、大きく異なる性質を持っていることが明らかになった。また、脊髄排便中枢の GHSR1a は、他の G タンパク質共役型受容体とヘテロ二量体を形成し、そのシグナル伝達を変化させている可能性が考えられた。

第 2 章

脊髄排便中枢におけるドパミンの大腸運動促進メカニズムの検討

前章では、中枢神経系による大腸運動制御システムのうち、脊髄排便中枢における制御メカニズムの解明を目的として実験を行った。その結果、脊髄排便中枢におけるグレリン感受性神経の性質は、視床下部弓状核のグレリン感受性神経とは大きく異なる性質を持っていることが明らかになった。このことから、視床下部弓状核と脊髄排便中枢の GHSR1a の働きが異なるのではないかと考え、脊髄排便中枢の GHSR1a は他の G タンパク質共役型受容体とヘテロ二量体を形成し、そのシグナル伝達経路を修飾している可能性が高いと考えた。

ドパミンは中枢神経系における重要なモノアミン系伝達物質で、痛み、報酬系、感情、認知の制御に関わっている (4, 6, 47, 78)。ドパミン受容体は、G タンパク質共役型受容体で、1 から 5 までのサブタイプが存在する。この 5 つのサブタイプは、共役する G タンパク質によって二つのファミリーに分けられており、Gs を介してアデニル酸シクラーゼを活性化する D1 様ドパミン受容体 (D1, D5 サブタイプ) と、Gi/o を介してアデニル酸シクラーゼを抑制する D2 様ドパミン受容体 (D2, D3, D4 サブタイプ) である (42, 43, 74)。Kern らによって、海馬または視床下部において、ドパミン受容体 D1 サブタイプまたは D2 サブタイプが、それぞれ GHSR1a とヘテロ二量体を形成し、これによってドパミンによるシグナル伝達が修飾されることが報告されている (28, 29)。本来、アデニル酸シクラーゼの活性を調節しているドパミンによるシグナル伝達は、ドパミン受容体が GHSR1a とヘテロ二量体を形成することで、ホスホリパーゼ C を活性化して Ca^{2+} 動員を引き起こすように修飾される (28, 29)。このように、GHSR1a

とドパミン受容体に密接な関連があることから、GHSR1a だけでなくドパミン受容体も脊髄排便中枢における大腸運動の制御に関与するのではないかと考えた。

脊髄排便中枢において大腸運動の制御に関わる生理活性因子は、これまでにグレリンだけしか知られていない。そこで、GHSR1a とドパミン受容体がヘテロ二量体を形成することに着目して、ドパミンも脊髄排便中枢において大腸運動制御に関わるのではないかと考え、脊髄排便中枢にドパミンを投与することで大腸運動が変化するか、さらにその作用メカニズムについて検討した。

結 果

脊髄内投与したドパミンの大腸運動に対する影響

試薬投与前の平衡状態において、排出量の増加を伴わない自発的な大腸内腔圧の小さな上昇が見られた (Fig. 7)。生理食塩水を脊髄腰仙髄部に投与しても、大腸運動に変化はみられなかった (頻度 2.6 ± 0.9 contractions/5 min; 排出量 0.08 ± 0.11 mL/5 min, Fig 7)。続いて、ドパミンを脊髄内に投与した。0.02 μ mol (頻度 5.0 ± 2.5 contractions/5 min, $P = 0.099$; 排出量 1.81 ± 1.41 mL/5 min, $P = 0.048$, $n=5$), 0.1 μ mol (頻度 7.6 ± 2.6 contractions/5 min, $P = 0.049$; 排出量 3.13 ± 2.50 mL/5 min, $P = 0.049$, $n=5$), 0.5 μ mol (頻度 12.4 ± 3.2 contractions/5 min, $P = 0.013$; 3.13 ± 0.17 mL/5 min, $P < 0.001$, $n=5$) の全ての濃度で、有意に大腸運動が亢進した (Fig. 7, 8)。このドパミンによる大腸運動促進作用は濃度依存的に増強した。これらの結果は、脊髄内に投与したドパミンが肛門側への内容液の輸送を伴った大腸運動を引き起こすことを示している。また、過去の報告と一致して (33), ドパミン (0.5 μ mol) によって血圧がわずかに低下した (Fig. 7)。

ドパミンによる大腸運動亢進に対するテトロドトキシンの影響

ドパミンの作用が神経性であるかを検討するために、神経遮断薬のテトロドトキシンをドパミンに先立って脊髄内に投与した。テトロドトキシン (0.15 nmol, i.t.) によって血圧は低下したが、大腸の自発性収縮はほとんど変化しなかった (図表省略)。脊髄腰仙髄部の神経がテトロドトキシンの局所投与によって不活性化された状況では、ドパミンによる大腸運動促進作用は認められなかった (Fig. 9)。

脊髓排便中枢におけるドパミンの作用部位の検討

ドパミンの作用に脊髓排便中枢よりも上位の中枢が必要かを検討するために、T8 領域の胸部脊髓を切断した状態で実験を行った。脊髓切断から約一時間後に、脊髓腰仙髄部にドパミン (0.5 μmol) を投与した。Fig. 10A で示しているように、脊髓切断前と同様に、ドパミンは大腸運動を促進した (c.f. Fig. 7)。一方、骨盤神経を切断した状態でドパミン (0.5 μmol) を脊髓内投与した場合は、大腸運動は亢進しなかった (Fig. 10B)。

ドパミンの作用を介在する受容体サブタイプの薬理的検討

脊髓排便中枢においてドパミンが作用するドパミン受容体のファミリーを明らかにするために、D1 様および D2 様ドパミン受容体の作動薬および拮抗薬を用いて薬理的検討を行った。D1 様ドパミン受容体の拮抗薬である SCH23390 (0.1 μmol , i.t.) の脊髓内投与では、ドパミン (0.3 μmol , i.t.) の大腸運動促進作用に影響はみられなかった (Fig. 11A)。一方、D2 様ドパミン受容体の拮抗薬であるハロペリドール (0.1 μmol , i.t.) の脊髓内投与は、ドパミン (0.3 μmol , i.t.) による大腸運動促進作用を完全に阻害した (Fig. 11B)。用いた試薬が競合的拮抗薬であるため、本実験では低用量のドパミン (0.3 μmol) を用いて実験を行った。これらの拮抗薬の投与は、大腸の自発性収縮には影響しなかった。

拮抗薬での結果に一致して、D1 様ドパミン受容体の作動薬である SKF38393 (0.3 μmol) の脊髓内投与では大腸運動に影響はみられなかった (Fig. 12A) が、D2 様ドパミン受容体の作動薬であるキンピロール (0.3 μmol , i.t.) ではドパミンの大腸運動促進作用が再現された (Fig. 12B)。これらの結果から、脊髓におけるドパミンの大腸運動促進作用は D2 様ドパミン受容体を介していることが明らかになった。

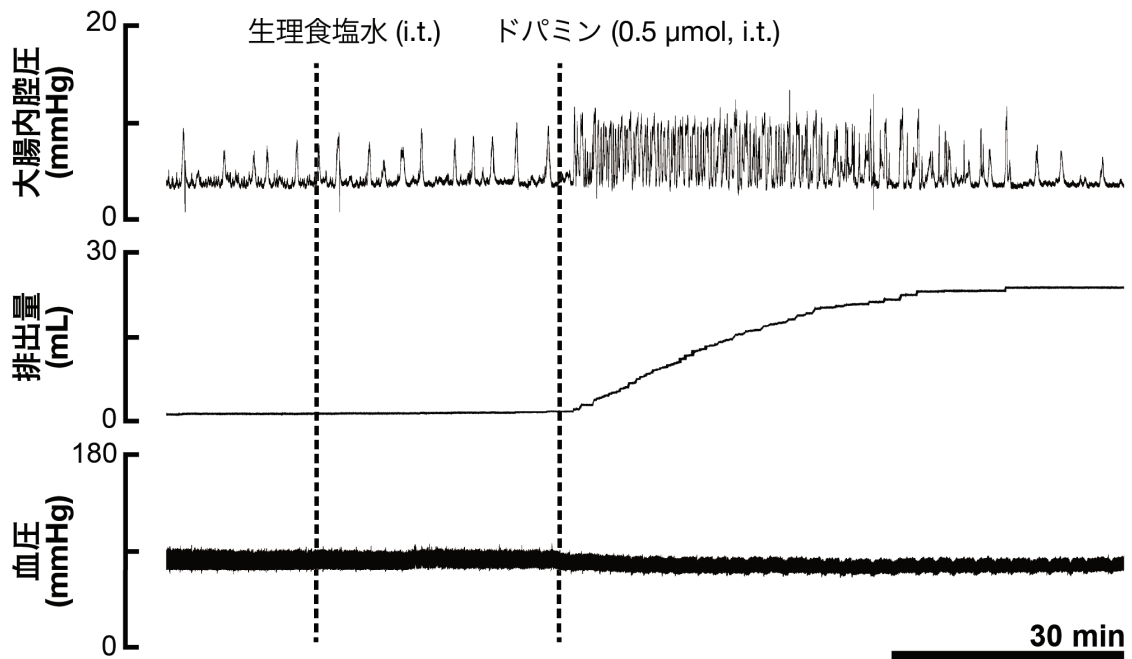


Figure. 7 脊髄内投与したドパミンの大腸運動促進作用

大腸の収縮による大腸内腔圧の変化（上段）と排出量（中段），および血圧（下段）の典型例を示す。脊髄腰仙髄部への生理食塩水を投与したところ大腸運動に影響はみられなかった。一方，ドパミン（0.5 μmol , i.t.）を投与したところ，大腸内腔圧が激しく変動し，それに伴い排出量が増加した。i.t.は脊髄内投与を示す。同様の結果が各群5匹のラットから再現性よく得られた。

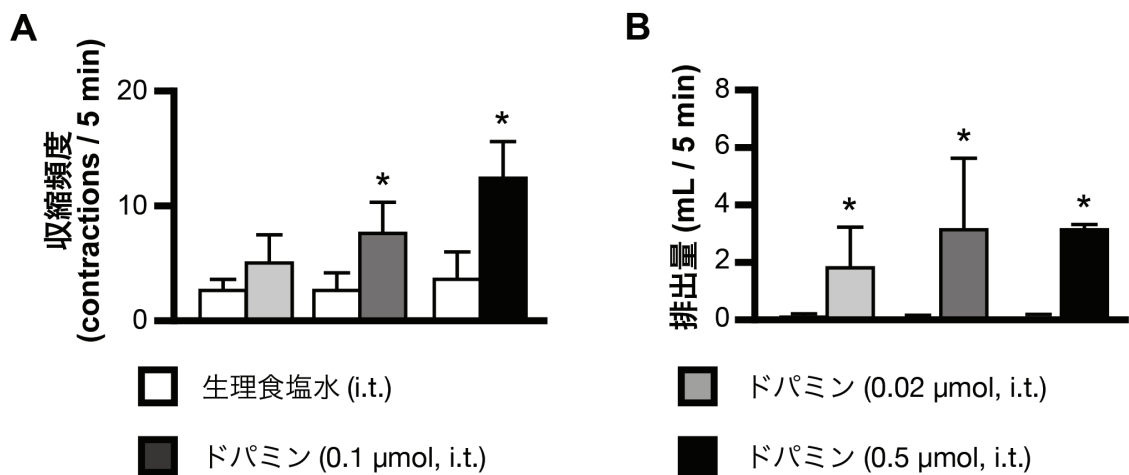


Figure. 8 ドパミンの脊髄内投与による収縮頻度および排出量の変化

脊髄内に投与したドパミンの大腸運動促進作用を定量的に評価した。(A) 収縮頻度, (B) 排出量を示している。収縮頻度, 排出量ともにドパミン (0.02, 0.1, 0.5 μmol, i.t.) によって濃度依存的に増加した。i.t.は脊髄内投与を示す。各データは平均値 ± SD で表している (n=5)。*は生理食塩水投与群と比較して, 統計的に有意であったことを表す (P < 0.05)。

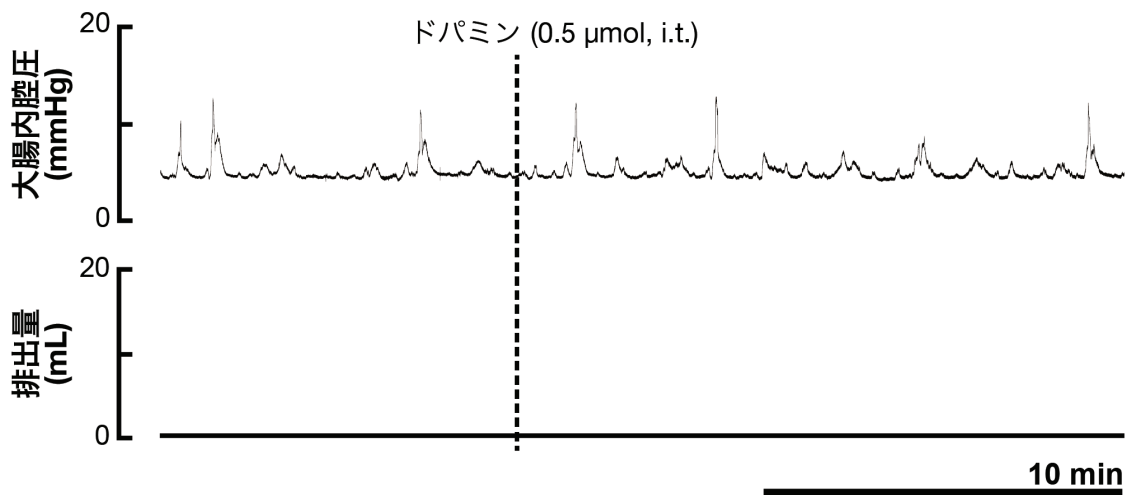


Figure. 9 ドパミンの大腸運動促進作用に対するテトロドトキシンの影響

大腸の収縮による大腸内腔圧の変化（上段）と排出量（下段）の典型例を示す。テトロドトキシ存在下でドパミンを脊髄内投与した場合のデータを示している。テトロドトキシ（0.15 nmol, i.t.）存在下では，脊髄腰仙髄部へ投与したドパミン（0.5 μ mol, i.t.）による大腸運動への影響はみられなかった。i.t.は脊髄内投与を示す。同様の結果が各群3匹のラットから再現性よく得られた。

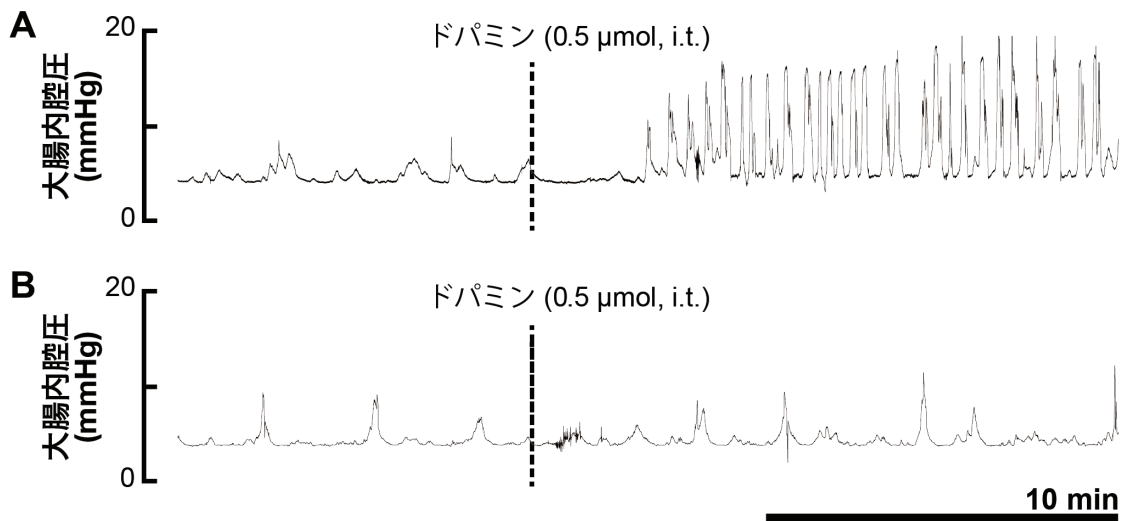


Figure. 10 ドパミンの作用に対する神経経路切断の影響

大腸の収縮による大腸内腔圧の変化の典型例を示す。(A) 胸部脊髄切断下, (B) 骨盤神経切断下でドパミン (0.5 μmol, i.t.) を投与した場合のデータを示している。胸部脊髄切断によって脳との連絡を絶った状態でドパミン (0.5 μmol, i.t.) を投与したところ, 大腸運動が亢進した。骨盤神経を切断した状態では, ドパミン (0.5 μmol, i.t.) を脊髄内に投与しても, 大腸運動への影響はみられなかった。i.t.は脊髄内投与を示す。同様の結果が各群3匹のラットから再現性よく得られた。

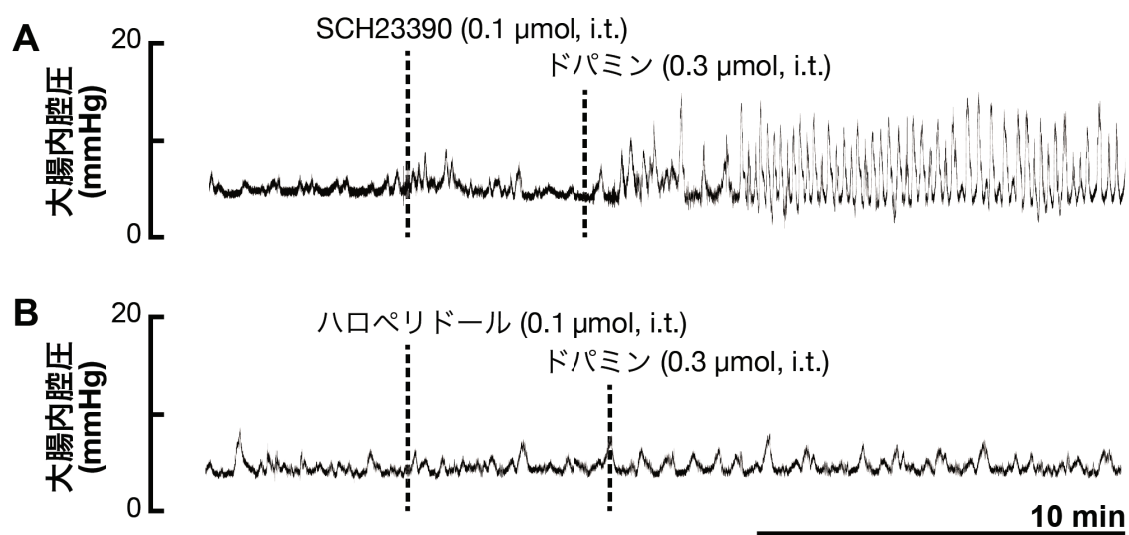


Figure. 11 拮抗薬を用いたドパミン受容体ファミリーの薬理的検討

大腸の収縮による大腸内腔圧の変化の典型例を示す。(A) SCH23390, (B) ハロペリドール投与後にドパミンを投与した場合のデータを示している。SCH23390 (0.1 μmol, i.t.) 投与後に、ドパミン (0.3 μmol, i.t.) を脊髄内に投与したところ、大腸運動が亢進した。一方、ハロペリドール (0.1 μmol, i.t.) を脊髄に前投与した場合、ドパミン (0.3 μmol, i.t.) による大腸運動への影響はみられなかった。i.t. は脊髄内投与を示す。同様の結果が各群 3 匹のラットから再現性よく得られた。

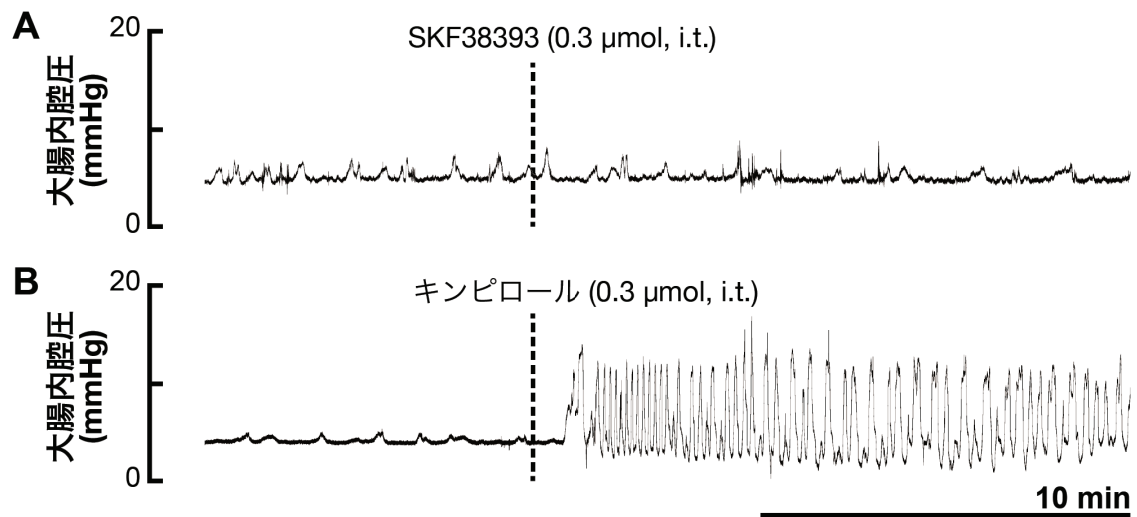


Figure. 12 受容体ファミリー選択的作動薬を用いた大腸運動促進作用の検討

大腸の収縮による大腸内腔圧の変化の典型例を示す。(A) SKF3893, (B) キンピロールを投与した場合のデータを示している。SKF3893 (0.3 μmol, i.t.) の脊髄内投与によって大腸運動への影響はみられなかった。一方、脊髄内に投与したキンピロール (0.3 μmol, i.t.) によって、大腸運動が亢進した。i.t.は脊髄内投与を示す。同様の結果が各群3匹のラットから再現性よく得られた。

考 察

これまで、脊髄排便中枢において大腸運動の制御に関わる生理活性因子は、グレリンが促進作用をもつことが知られているだけであった。グレリンの受容体である GHSR1a とドパミン受容体が中枢神経系において密接な関連があることから、脊髄排便中枢においてドパミンが大腸運動制御に関与しているのではないかと考え、検討を行った。脊髄排便中枢にドパミンを投与したところ大腸運動が亢進したことから (Fig. 7, 8), グレリンと同様にドパミンにも大腸運動を促進性に調節する作用があることが明らかになった。

脊髄排便中枢を不活性化するために神経遮断薬のテトロドトキシンを脊髄内 (L6-S1 領域) に投与したところ、血圧はわずかに低下したが呼吸障害はみられなかったことから (図表省略)、脊髄に投与したテトロドトキシンは呼吸中枢のある延髄まで拡散することなく、脊髄排便中枢およびその近傍の神経を局所的に不活性化していると考えられた。脊髄排便中枢の神経が不活性化されることでドパミンの作用が消失したことから (Fig. 9), ドパミンの作用には脊髄排便中枢の神経が重要な役割を果たしていると考えられる。しかし、この結果だけではドパミンが脊髄排便中枢の神経に直接作用しているのか、脳脊髄液によって拡散することで上脊髄排便中枢に作用し、間接的に脊髄排便中枢を活性化しているのかは判断できない。脊髄排便中枢に投与したドパミンが上脊髄排便中枢で作用し、そのシグナルが脊髄排便中枢を通ることで大腸運動を促進しているならば、上脊髄排便中枢と脊髄排便中枢をつなぐ胸髄の切断することでドパミンの作用は消失するはずである。しかしながら、胸髄を切断してもドパミンの反応が消失しなかったことから (Fig. 10A), ドパミンは脊髄排便中枢に直接作用して、大腸運動を促進していることが示された。

ドパミン受容体ファミリー選択的な作動薬および拮抗薬を用いた薬理的検討によって、脊髄排便中枢においてドパミンは D2 様ドパミン受容体を介して大腸運動を促進していることが示された (Fig. 11, 12)。D2 様ドパミン受容体は、Gi/o と共役してアデニル酸シクラーゼを抑制し、神経の活動を抑えることから (42, 43, 74)、ドパミンは脊髄排便中枢において大腸運動を抑制的に調節している神経に作用して、大腸にかかっている抑制を解除することで脱抑制によって大腸運動を促進していると考えられる。脊髄排便中枢からの抑制性シグナルは腰髄から出る交感神経系によって伝えられるため (69, 72)、ドパミンは交感神経の節前線維を直接抑制していると考えられたが、副交感神経の骨盤神経を切断することでドパミンの大腸運動促進作用が消失したことから (Fig. 10B)、ドパミンは交感神経系の抑制ではなく、副交感神経系の活性化によって大腸運動を促進していることが分かった。D2 様ドパミン受容体が Gi/o と共役することから、ドパミンは骨盤神経の節前線維を抑制している介在神経を抑制し、脱抑制によって骨盤神経を活性化していると考えられる。しかし、興味深いことに、ドパミン受容体 D2 サブタイプが骨盤神経の節前線維に直接発現していること、さらに D2 様ドパミン受容体の作動薬によって骨盤神経の節前線維が直接活性化することが明らかになっており (45)、脊髄排便中枢においてドパミンは骨盤神経の節前線維を直接活性化している可能性が高い。このことは一見大きな矛盾の様に感じるが、ドパミン受容体 D2 サブタイプが GHSR1a とヘテロ二量体を形成していると考えると説明できる。

脊髄腰仙髄部において、GHSR1a が骨盤神経の節前線維に発現しており (12, 13, 15, 16)、ドパミン受容体 D2 サブタイプも骨盤神経の節前線維に発現していることから (45)、骨盤神経の節前線維において GHSR1a とドパミン受容体 D2 サブタイプが共発現していると考えられる。したがって、脊髄排便中枢においても

視床下部と同様に (28), GHSR1a がドパミン受容体 D2 サブタイプとヘテロ二量体を形成し, 本来 Gi/o と共役しているドパミン受容体 D2 サブタイプの細胞内シグナル伝達経路を, ホスホリパーゼ C を介した Ca^{2+} 動員へと変更していると仮定すると, 脊髓排便中枢においてドパミンが D2 様ドパミン受容体を介して, 骨盤神経の節前線維を直接活性化することを説明できる。非常に興味深いことに, ドパミンは GHSR1a 存在下では神経を活性化するが, 非存在下では神経を抑制するというように, GHSR1a とのヘテロ二量体形成の有無によって, ドパミン受容体 D2 サブタイプの活性化による細胞の挙動が全く逆の方向性に変化する (28)。GHSR1a の発現の変化や脱感作によるインタナリゼーションなどによって, GHSR1a とドパミン受容体 D2 サブタイプのヘテロ二量体の形成が解除されると, 同じドパミンによって排便の促進と抑制の二通りの調節が可能になると考えられる。このことは, 上脊髓排便中枢からのシグナルを脊髓排便中枢が修飾する可能性を示唆しており, 脊髓排便中枢が単なる情報の通り道ではないことを推察させる。したがって, もし脊髓排便中枢に GHSR1 とドパミン受容体 D2 サブタイプのヘテロ二量体が存在するのならば, その生理的な意義は非常に大きいと考えられる。しかしながら, 本実験のデータからはこの仮説を証明することはできないため, 骨盤神経の節前線維において GHSR1a とドパミン受容体 D2 サブタイプがヘテロ二量体を形成しているのかは, 今後のより詳細な検討が必要である。

本章の結果は, ドパミンが脊髓排便中枢に作用して, 大腸運動を促進することを示した。脊髓にはドパミン作動性の神経細胞体はほとんど存在せず, 脊髓におけるドパミンはそのほとんどが間脳に存在する A11 領域のドパミン作動性神経に由来していることから (42), A11 領域が上脊髓排便中枢における重要な神経核の一つと推察される。ドパミン作動性神経特異的な神経毒である

6-hydroxydopamine をラット内側前脳束に微量投与すると、排出される糞塊が減少し、便秘になることが報告されており、さらにこの処置によって脊髓腰仙髄部の中間質外側部細胞柱 (IML: intermediolateral cell column) における c-Fos の発現が減少する (27)。IML は脊髓灰白質の中間質に位置し、大腸へ投射する骨盤神経の節前線維の細胞体が集まっている部分であることから、脳のドパミン作動性神経がなくなることで骨盤神経節前線維への促進性の調節がなくなり、大腸運動性が低下すると考えられる。実際に、中枢神経系においてドパミン作動性神経の変性がおこるパーキンソン病において、慢性の便秘が起こることが知られている (26, 57)。本章の結果と合わせて考えると、上脊髓排便中枢のドパミン作動性神経が大腸運動制御に重要な役割を持っており、上脊髓排便中枢が下行性ドパミン経路を介して脊髓排便中枢を促進性に調節していることが示唆される。

脊髓において、ドパミンは痛みの制御に関わることがよく知られている (42)。末梢で起こった侵害刺激は、一次求心性神経を介して脊髓に入力し、二次求心性神経を介して脳へと伝えられる。脳へ伝えられた侵害性シグナルは脳で痛みとして認知されるが、これとは別に、脳から再び脊髓へ下行性にシグナルが送られ、侵害性シグナルの脊髓への入力や脳への伝達を抑制している。この脊髓を下行する神経経路を下行性疼痛抑制経路と呼んでおり、ドパミンはこの下行性疼痛抑制経路の主な神経伝達物質の一つである。脊髓に投与したドパミンが大腸運動を促進することを考えると、この下行性疼痛抑制経路が、脊髓における侵害性シグナル伝達の制御だけでなく、脊髓排便中枢における大腸運動の制御にも関与している可能性が示唆される。このことから、大腸の過伸展や化学物質による侵害刺激によって、この下行性疼痛抑制経路が活性化し、脊髓排便中枢にドパミンが放出されることで、大腸の運動が促進されると推察される。

本章では、脊髄排便中枢に投与したドパミンが大腸運動を促進することを明らかにした。本章で得られた主な実験結果は、1) ドパミンの大腸運動促進作用はテトロドトキシンによる脊髄排便中枢の不活性化によって消失したこと、2) この作用は胸部脊髄切断では消失しないが、骨盤神経の両側切断によって消失したこと、3) この作用は D2 様ドパミン受容体の拮抗薬で完全に阻害され、作動薬でその作用が再現されたことである。これらの結果は、脊髄排便中枢においてドパミンが D2 様ドパミン受容体を介して骨盤神経の節前線維を活性化し、大腸運動を促進していることを示している。このことから、これまでにグレリンしか知られていなかった、脊髄排便中枢に作用する生理活性物質が新たに明らかになった。Gi/o と共役するドパミン受容体 D2 サブタイプが骨盤神経の節前線維を直接活性化することから、脊髄排便中枢においても GHSR1a とドパミン受容体 D2 サブタイプがヘテロ二量体を形成し、ドパミン受容体 D2 サブタイプのシグナル伝達を修飾している可能性が示唆された。また、ドパミンが脊髄において痛みの制御と深く関わることから、下行性疼痛抑制経路が脊髄における侵害性シグナル伝達の制御だけでなく、脊髄排便中枢における大腸運動の制御にも関与するという、新たな仮説を提唱した。

第 3 章

脊髄排便中枢における大腸運動制御へのノルアドレナリンの関与の検討

前章では、脊髄排便中枢における大腸運動制御へのドパミン受容体の関与に着目し、ドパミンが脊髄排便中枢に作用して大腸運動を促進することを示した。脊髄においてドパミンは脳から下行性に放出され、侵害性シグナルの伝達を抑制する下行性疼痛抑制経路の伝達物質として働いていることから、この下行性疼痛抑制経路が脊髄での侵害性シグナルの伝達だけでなく、脊髄排便中枢における大腸運動の制御にも関与しているという仮説を立てた。

下行性疼痛抑制経路は、末梢における侵害刺激によって活性化し、一次求心性神経である感覚神経から脊髄背側角の二次求心性神経への侵害性シグナルの伝達を抑制することで、脊髄および脳への侵害性シグナルの入力が長時間持続しないようにしている (42)。この下行性疼痛抑制経路において、ノルアドレナリンもその主要な神経伝達物質として知られている (53)。下行性疼痛抑制経路が、脊髄における侵害性シグナル伝達の制御だけでなく、大腸運動制御にも関わっているのならば、このノルアドレナリンもドパミンと同様に脊髄排便中枢における大腸運動制御に関わっていると推察される。そこで本章では、下行性疼痛抑制経路の主要な神経伝達物質の一つであるノルアドレナリンに着目して、脊髄排便中枢にノルアドレナリンを投与することで大腸運動が変化するか、さらにはその作用メカニズムについて検討を行った。

結 果

脊髄腰仙髄部へ投与したノルアドレナリンの作用

薬剤を投与する前の平衡状態では、排出量の増加を伴わない自発的な大腸内腔圧の小さな上昇が見られた (Fig. 13)。生理食塩水を脊髄腰仙髄部に投与しても、大腸運動に変化は見られなかった (頻度 2.3 ± 0.96 contractions/5 min; 排出量 0.1 ± 0.1 mL/5 min, Fig. 14)。生理食塩水投与から 30 分後に、同じ経路からノルアドレナリンを脊髄内投与したところ、0.5 nmol のノルアドレナリンでは大腸運動に変化はみられなかった (頻度 4.0 ± 1.8 contractions/5 min, $P = 0.141$; 排出量 1.3 ± 2.2 mL/5 min, $P = 0.286$) が、5 nmol (頻度 9.8 ± 2.5 contractions/5 min, $P = 0.022$; 排出量 3.8 ± 2.5 mL/5 min, $P = 0.055$) および 50 nmol (頻度 17 ± 1.8 contractions/5 min, $P = 0.016$; 排出量 4.6 ± 1.1 mL/5 min, $P = 0.025$) では、大腸運動が亢進した (Fig. 14)。頻度と振幅は濃度依存的に効果が増強した。静脈内投与したアトロピン (1 mg/kg を静脈内投与後、6 mg/kg/h i.v. で持続投与) は、この反応を完全に抑制したことから (図表省略)、この反応の最終的な伝達は内在神経系から放出されるアセチルコリン放出によるものだと考えられる。生理食塩水およびノルアドレナリンの脊髄内投与によって一過性の血圧の上昇が見られたが、ノルアドレナリンによる特異的な血圧への影響はみられなかった。(Fig. 13)

ノルアドレナリンによる大腸運動亢進に対するテトロドトキシンの影響

ノルアドレナリンの作用が神経性であるかを検討するために、神経遮断薬のテトロドトキシンをノルアドレナリンに先立って脊髄内に投与した。テトロドトキシン (0.15 nmol, i.t.) は、血圧は低下させたが、大腸の自発性収縮にはほと

んど影響しなかった（図表省略）。脊髓腰仙髄部の神経が不活性化された状況でノルアドレナリンを脊髓内に投与したが、大腸運動の亢進はみられなかった（Fig. 15）。

脊髓内投与されたノルアドレナリンの作用部位の検討

ノルアドレナリンの作用に脊髓排便中枢よりも上位の中枢が必要かを検討するために、T8 領域の胸部脊髓を切断した状態で実験を行った。脊髓切断から約一時間後に、脊髓腰仙髄部にノルアドレナリン（50 nmol）を投与した。Fig. 16A で示しているように、ノルアドレナリンは脊髓切断前と同様に大腸運動を促進した（c.f. Fig. 13）。一方、骨盤神経を切断した状態では、ノルアドレナリンによる大腸運動の変化はみられなかった（Fig. 16B）。

ノルアドレナリンの作用を介在する受容体サブタイプの薬理的検討

脊髓排便中枢においてノルアドレナリンが作用する受容体サブタイプを薬理的に検討した。 α_1 アドレナリン受容体の作動薬であるフェニレフリン（50 nmol, i.t.）を脊髓腰仙髄部に投与したところ、ノルアドレナリンの大腸運動促進作用が再現された（Fig. 17A）。これに対して、 α_2 アドレナリン受容体の作動薬であるキシラジン（50 nmol, i.t.）、または β アドレナリン受容体の作動薬であるイソプロテレノール（50 nmol, i.t.）は大腸運動に影響を示さなかった（Fig. 17B, C）。さらに、拮抗薬を用いてノルアドレナリンの作用が阻害されるかを検討した。 α_1 アドレナリン受容体の拮抗薬であるプラゾシンが競合的拮抗薬であるため、本実験では低用量のノルアドレナリン（5 nmol）を用いて実験を行った。溶媒のみを脊髓に投与した後、ノルアドレナリン（5 nmol, i.t.）を投与したところ大腸運動が十分に亢進した（Fig. 18A）。続いて、プラゾシン（25 nmol）を脊髓内

に投与した後、ノルアドレナリン (5 nmol, i.t.) を投与したが、大腸運動促進作用はみられなかった (Fig. 18B)。定量的解析では、プラゾシンによって頻度、排出量がともに有意に減少した (頻度 1.5 ± 0.6 contractions/5 min, $P = 0.015$; 排出量 0.03 ± 0.05 mL/5 min, $P = 0.032$) (Fig. 19A, B)。

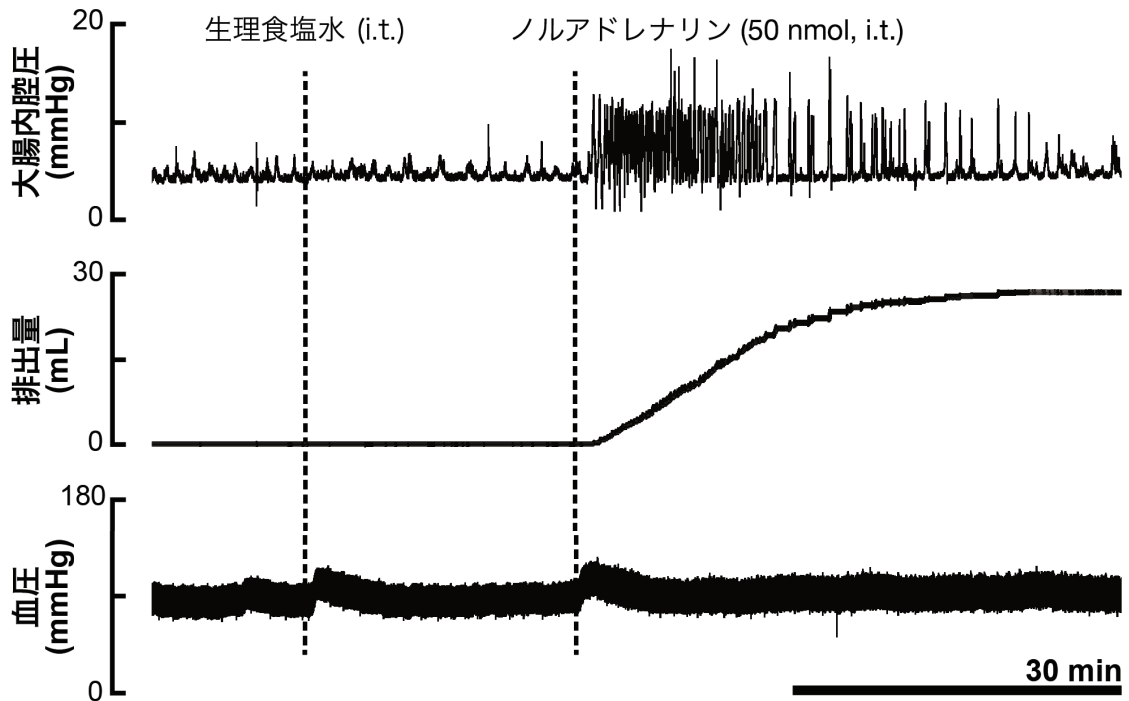


Figure. 13 脊髄内投与したノルアドレナリンの大腸運動促進作用

大腸の収縮による大腸内腔圧の変化（上段）と排出量（中段），および血圧（下段）の典型例を示す。脊髄腰仙髄部に生理食塩水を投与したところ，血圧は一過性に小さく上昇したが，大腸運動に影響はみられなかった。一方，ノルアドレナリン（50 nmol, i.t.）を投与した場合，血圧の一過性上昇と，大腸内腔圧の激しく変動とそれに伴う排出量の増加がみられた。i.t.は脊髄内投与を示す。同様の結果が各群4匹のラットから再現性よく得られた。

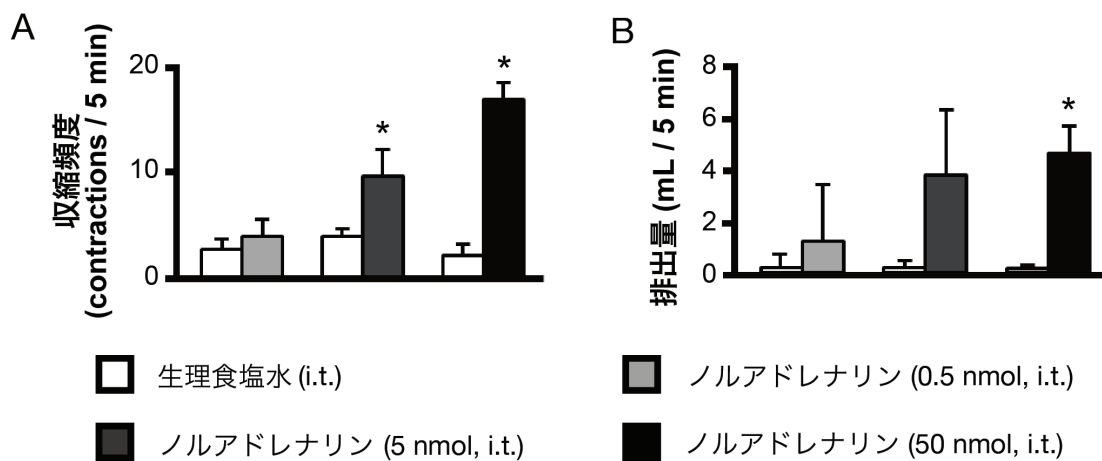


Figure. 14 ノルアドレナリンによる収縮頻度および排出量の変化

脊髄内に投与したノルアドレナリンの大腸運動促進作用を定量的に評価した。

(A) 収縮頻度, (B) 排出量を示している。収縮頻度, 排出量ともにノルアドレナリン (0.5, 5, 50 nmol, i.t.) によって濃度依存的に増加した。i.t.は脊髄内投与を示す。各データは平均値 \pm SD で表している (n=4)。*は生理食塩水投与群と比較して, 統計的に有意であったことを表す ($P < 0.05$)。

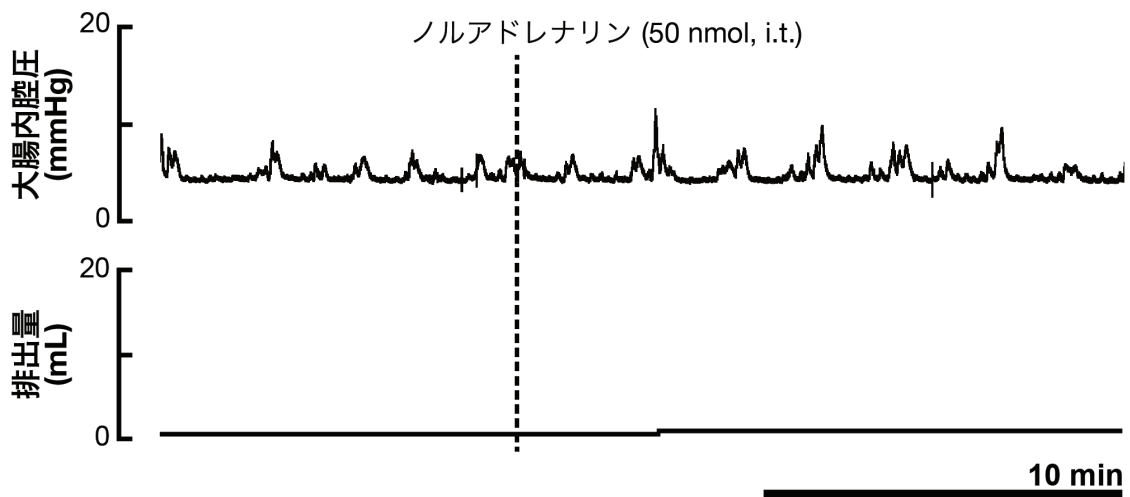


Figure. 15 テトロドトキシンによる腰仙髄部神経不活化の影響

大腸の収縮による大腸内腔圧の変化（上段）と排出量（下段）の典型例を示す。テトロドトキシン存在下でノルアドレナリンを脊髄内投与した場合のデータを示している。テトロドトキシン（0.15 nmol, i.t.）存在下では，脊髄腰仙髄部へ投与したノルアドレナリン（50 nmol, i.t.）による大腸運動への影響はみられなかった。i.t.は脊髄内投与を示す。同様の結果が各群3匹のラットから再現性よく得られた。

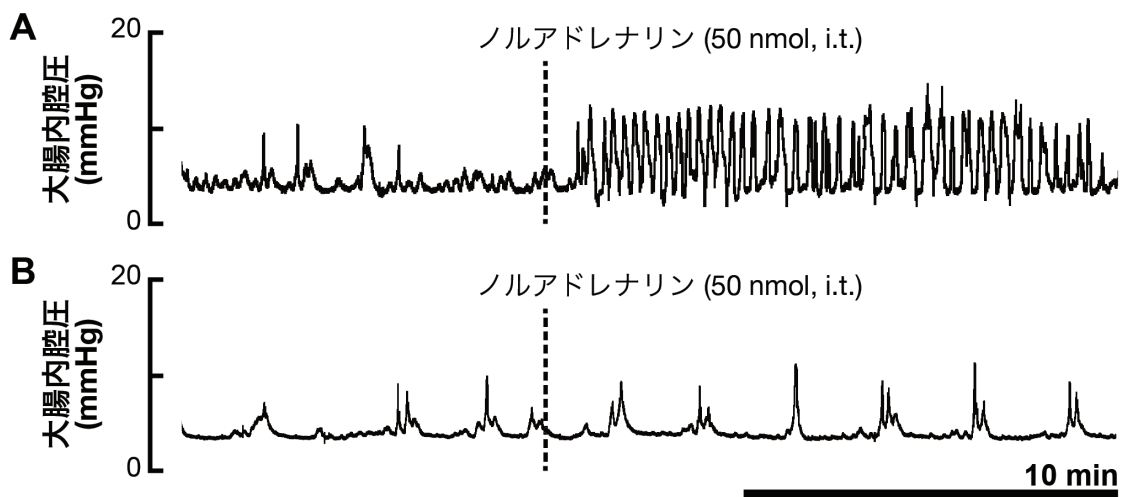


Figure. 16 ノルアドレナリンの作用に対する神経切断の影響

ノルアドレナリン投与前後の大腸内腔圧の変化の典型例を示す。(A) 胸部脊髄切断下、(B) 骨盤神経切断下でノルアドレナリン (50 nmol, i.t.) を投与した場合のデータを示している。胸部脊髄切断によって脳との連絡を断った状態でノルアドレナリン (50 nmol, i.t.) を投与したところ、大腸運動が亢進した。骨盤神経を切断した状態では、ノルアドレナリン (50 nmol, i.t.) を脊髄内に投与しても、大腸運動への影響はみられなかった。i.t.は脊髄内投与を示す。同様の結果が各群3匹のラットから再現性よく得られた。

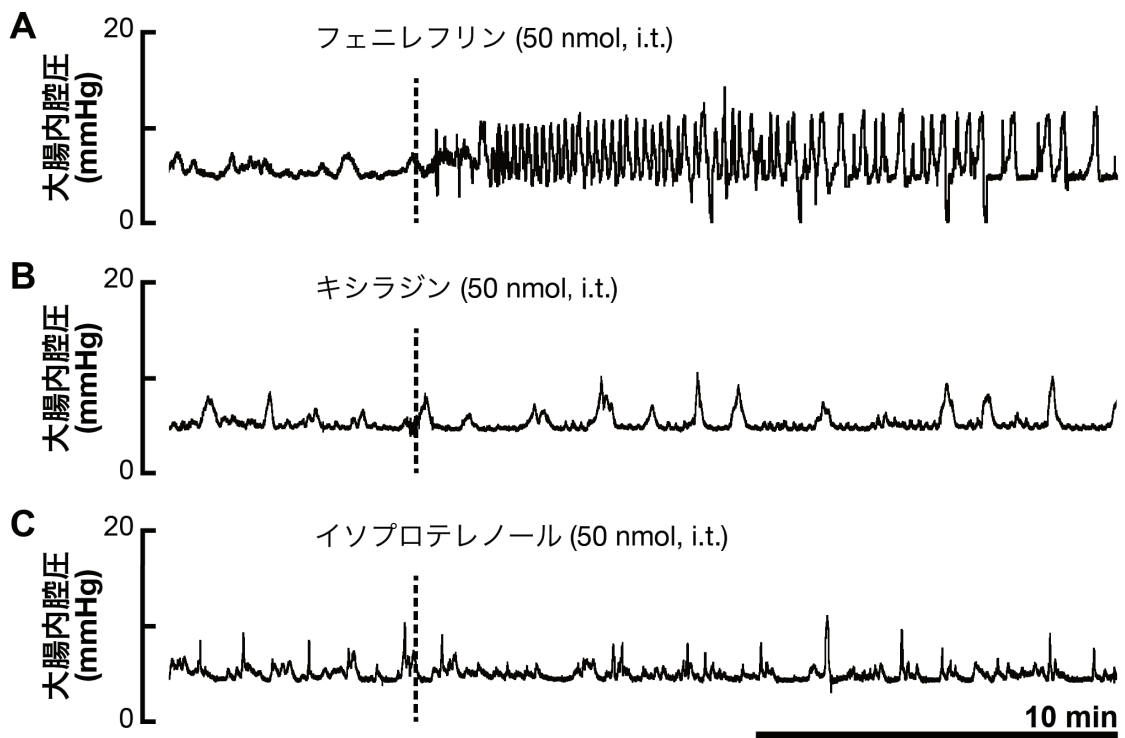


Figure. 17 受容体サブタイプ選択的作動薬を用いた薬理的検討

作動薬投与前後の大腸内腔圧の変化の典型例を示す。脊髄腰仙髄部へ (A) フェニレフリン, (B) キシラジン, (C) イソプロテレノールを投与した場合のデータを示している。フェニレフリン (50 nmol, i.t.) の脊髄内投与によって大腸運動が亢進した。一方, 脊髄内に投与したキシラジン (50 nmol, i.t.) とイソプロテレノール (50 nmol, i.t.) では, 大腸運動に影響はみられなかった。i.t.は脊髄内投与を示す。同様の結果が各群3匹のラットから再現性よく得られた。

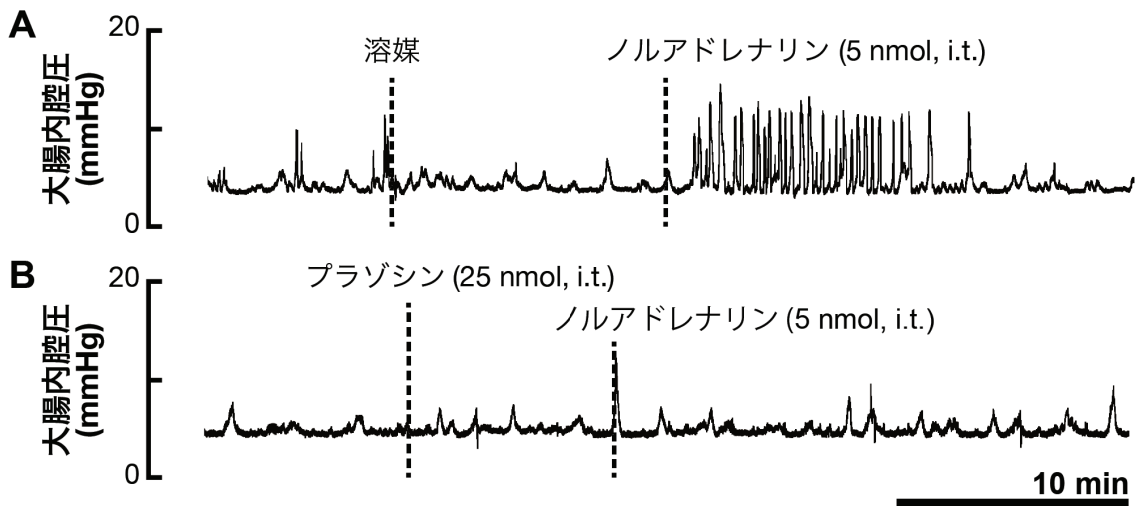


Fig. 18 α_1 アドレナリン受容体サブタイプ選択的拮抗薬を用いた薬理的検討

大腸内腔圧の変化の典型例を示す。(A) 溶媒, (B) プラゾシン投与後にノルアドレナリンを投与した場合のデータを示している。溶媒投与後にノルアドレナリン (5 nmol, i.t.) を投与したところ, 大腸運動が亢進した。一方, プラゾシン (25 nmol, i.t.) を脊髄に前投与した場合, ノルアドレナリンによる大腸運動への影響はみられなかった。i.t.は脊髄内投与を示す。同様の結果が各群4匹のラットから再現性よく得られた。

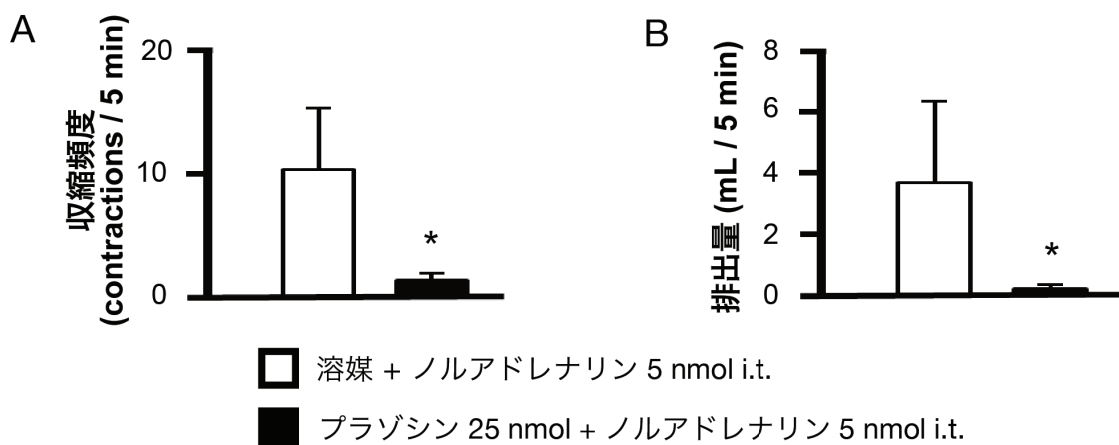


Figure. 19 プラゾシンによる収縮頻度および排出量の変化

脊髄内に前投与したプラゾシンによる、ノルアドレナリンの大腸運動促進作用への影響を定量的に評価した。(A) 収縮頻度、(B) 排出量を示している。収縮頻度、排出量ともにプラゾシン (25 nmol, i.t.) によって有意に減少した。i.t.は脊髄内投与を示す。各データは平均値 \pm SD で表している (n=4)。*は溶媒投与群と比較して、統計的に有意であったことを表す ($P < 0.05$)。

考 察

前章の結果から、下行性疼痛抑制経路が、脊髄における侵害性シグナル伝達の制御だけでなく、脊髄排便中枢における大腸運動制御にも関わるという仮説を立てた。そこで、下行性疼痛抑制経路の主要な神経伝達物質であるノルアドレナリンにも、脊髄排便中枢において大腸運動を調節する作用があるのではないかと考え、実験を行った。その結果、脊髄排便中枢に投与したノルアドレナリンが大腸運動を促進することが示された。

神経遮断薬のテトロドトキシンを脊髄排便中枢に投与したところ、前章の結果と同様に呼吸障害がみられなかったことから、テトロドトキシンは脊髄排便中枢およびその近傍の神経を局所的に不活性化していると考えられる。したがって、テトロドトキシン投与によってノルアドレナリンの大腸運動促進作用が消失したことから (Fig. 15)、ノルアドレナリンの作用には脊髄排便中枢の神経が重要な役割を果たしていることが分かる。しかしながら、この結果からノルアドレナリンが脊髄排便中枢に直接作用しているのか、上脊髄排便中枢を介して間接的に作用しているのかは判断できない。脊髄排便中枢に投与したノルアドレナリンが拡散によって上脊髄排便中枢で作用し、そのシグナルが脊髄排便中枢を介して大腸運動を促進しているのならば、上脊髄排便中枢と脊髄排便中枢をつなぐ胸髄の切断によってノルアドレナリンの作用は消失するはずである。しかしながら、胸髄を切断してもノルアドレナリンの反応は消失しなかったことから (Fig. 16A)、脊髄内投与したノルアドレナリンは脊髄排便中枢に直接作用して大腸運動を促進していることが示された。

サブタイプ選択的作動薬および拮抗薬を用いた薬理的検討の結果、ノルアドレナリンは α_1 アドレナリン受容体を介して、大腸運動を促進することが示さ

れた。 $\alpha 1$ アドレナリン受容体は G_q と共役する G タンパク質共役型受容体で、ノルアドレナリンが結合すると細胞内 Ca^{2+} 動員によって細胞が活性化する。したがって、ノルアドレナリンが大腸運動を促進性に制御する神経を活性化することで、大腸運動が亢進すると考えられる。in situ hybridization を用いた $\alpha 1$ アドレナリン受容体 mRNA の分布を調べた研究では、ヒトおよびラットの脊髓腰仙髄部において、 $\alpha 1$ アドレナリン受容体が運動神経と IML に多く発現していることが報告されている (9, 68)。IML は脊髓灰白質の中間質に位置し、自律神経の細胞体が集まっている部分である。脊髓排便中枢から出る自律神経のうち、大腸運動を促進性に調節している神経は、仙髄から出る副交感神経の骨盤神経であるため、ノルアドレナリンが骨盤神経の節前線維を直接活性化するのではないかと考えた。もしこの仮説が正しければ、骨盤神経を切断した状態ではノルアドレナリンによる大腸運動亢進はみられないはずである。実際に、骨盤神経を切断したところ、ノルアドレナリンの作用がみられなくなったことから (Fig. 16B)，ノルアドレナリンが骨盤神経を直接活性化して大腸運動を促進していると考えられる。

本章の結果から、脊髓排便中枢において、ノルアドレナリンが大腸運動を促進することが示された。脊髓におけるノルアドレナリンは、そのほとんどが橋に存在する A5, 6, 7 領域のノルアドレナリン作動性神経に由来していることから (25, 53)，これらの領域が上脊髓排便中枢における重要な神経核であり、脊髓排便中枢を促進性に調節するノルアドレナリンの供給源であることが推察される。実際に、橋は上脊髓排便中枢において重要な役割を果たしていると考えられており、モルモットにおいて、橋の電気刺激によって大腸運動が亢進することも報告されている (36, 44, 70)。

本章では、ノルアドレナリンが脊髓排便中枢に作用して大腸運動を促進する

ことを明らかにした。本章で得られた主な実験結果は、1) ノルアドレナリンの大腸運動促進作用はテトロドトキシンによる脊髄排便中枢の不活性化によって消失したこと、2) この作用は胸部脊髄切断では消失せず、骨盤神経の両側切断によって消失したこと、3) この作用は α_1 アドレナリン受容体の作動薬でその作用が再現され、拮抗薬で完全に阻害されたことである。これらの結果は、脊髄排便中枢においてノルアドレナリンが α_1 アドレナリン受容体を介して骨盤神経の節前線維を活性化し、大腸運動を促進していることを示している。このことから、グレリンとドパミンに続き、ノルアドレナリンも脊髄排便中枢を促進性に調節する生理活性物質であることが明らかになった。また、ノルアドレナリンが下行性疼痛抑制経路の主要な神経伝達物質であることから (53)、本章の結果は下行性疼痛抑制経路が脊髄排便中枢における大腸運動の制御に関与するという仮説を支持する。

第 4 章

カプサイシンによる大腸運動亢進への下行性疼痛抑制経路の関与の検討

第 2, 3 章において, ドパミンおよびノルアドレナリンが, 脊髓排便中枢において大腸運動促進作用をもつことが示された。ドパミンおよびノルアドレナリンは, 脊髓において侵害性シグナルの伝達を抑制する下行性疼痛抑制経路の主要な神経伝達物質であることから (42, 53), 下行性疼痛抑制経路が, 脊髓における侵害性シグナルの伝達を制御するだけでなく, 脊髓排便中枢における大腸運動制御にも関与するという仮説を立てた。本章ではこの仮説を検証するために, 実験を行った。下行性疼痛抑制経路は脳から脊髓へ下行性に投射する経路であるため, まずこの経路を活性化する刺激を特定する必要がある。過去の報告において末梢における様々な侵害刺激によって, 脊髓におけるドパミンおよびノルアドレナリンの濃度が増加することから, (17, 50, 60, 76), 大腸に侵害刺激を与えることで下行性疼痛抑制経路が活性化するのではないかと考えた。

カプサイシンは唐辛子の辛味成分であり, 侵害性の温度や pH などの情報を感知する TRPV1 (transient receptor potential cation channel, subfamily V, member 1) の作動薬である。TRPV1 は感覚神経の C 線維に多く発現しており (5, 71), 侵害刺激を感知する受容体の一つだと考えられている。結直腸においても, この TRPV1 が感覚神経に多く発現することが報告されていることから (39), 大腸においてもカプサイシンが TRPV1 を活性化し, 侵害刺激になると考えられる。そこで, カプサイシンを用いて大腸に侵害刺激を与えることで, 下行性疼痛抑制経路が活性化し, 大腸運動が亢進するかを検討した。

結 果

カプサイシンの大腸管腔内投与による大腸運動の亢進

薬剤投与前の平衡状態において、排出量の増加を伴わない振幅の小さな自発性の内腔圧の上昇がみられた (Fig. 20)。溶媒を大腸管腔内に投与しても、大腸運動に変化はみられなかった (Fig 20A, n=3)。続いて、0.1 μmol のカプサイシンを大腸管腔内に投与したところ、大腸運動が亢進した (Fig. 20B, n=5)。TRPV1の選択的拮抗薬であるカプサゼピン (0.7 μmol) をカプサイシン (0.1 μmol) と同時に大腸管腔内に投与したところ、カプサイシンによる大腸運動促進作用はみられなかった (Fig. 20C, n=3)。

カプサイシンによる大腸運動促進作用への脊髓排便中枢の関与

カプサイシンの大腸管腔内投与による大腸運動促進作用に、脊髓排便中枢が関与しているかを検討するために、大腸と脊髓排便中枢を連絡する骨盤神経を切断した状態で実験を行った。骨盤神経を切断した状態でカプサイシン (0.1 μmol) を大腸管腔内に投与したが、大腸運動の亢進はみられなかった (Fig. 21A, n=3)。

カプサイシンによる大腸運動促進作用への上脊髓排便中枢の関与

カプサイシンの大腸管腔内投与による大腸運動促進作用に、上脊髓排便中枢が関与しているかを検討するために、脊髓排便中枢と上脊髓排便中枢を連絡する胸髄を T8 領域で切断した状態で実験を行った。胸髄を切断した状態でカプサイシン (0.1 μmol) を大腸管腔内に投与したが、大腸運動の亢進はみられなかった (Fig. 21B, n=4)。

カプサイシンによる大腸運動促進作用への下行性疼痛抑制経路の関与

カプサイシンによる大腸運動の亢進に、下行性疼痛抑制経路が関与しているかを検討するために、脊髄排便中枢へ D2 様ドパミン受容体の拮抗薬であるハロペリドールまたは $\alpha 1$ アドレナリン受容体の拮抗薬であるプラゾシンを前投与して実験を行った。ハロペリドール (0.1 μmol) を脊髄内投与した状態でカプサイシン (0.1 μmol) を大腸管腔内に投与したところ、大腸運動の亢進はみられなくなった (Fig. 22A, n=4)。一方、プラゾシン (25 nmol) を脊髄内投与した状態で、カプサイシン (0.1 μmol) を大腸管腔内に投与したところ、大腸運動はプラゾシンの影響を受けることなく亢進した (Fig. 22B, n=4)。

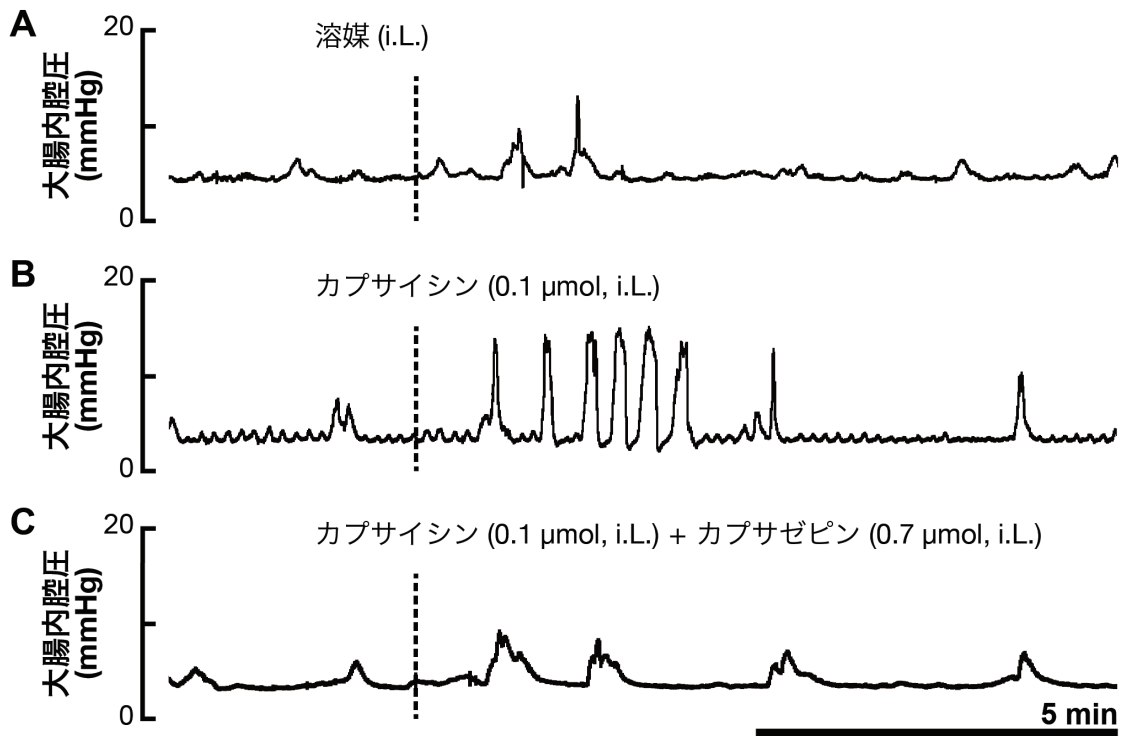


Fig. 20 カプサイシンの大腸管腔内投与による大腸運動促進作用

薬剤の投与前後の大腸内腔圧の変化の典型例を示す。結直腸管腔内への (A) 溶媒の投与, (B) カプサイシンの投与, (C) カプサイシンとカプサゼピンの同時投与した場合のデータを示している。溶媒の管腔内投与では大腸運動に影響はみられなかった (n=3)。一方, カプサイシン (0.1 μmol) を管腔内に投与したところ, 大腸運動が亢進した (n=5)。TRPV1 拮抗薬のカプサゼピン (0.7 μmol) をカプサイシン (0.1 μmol) と同時に管腔内に投与したところ, 大腸運動に変化はみられなかった (n=3)。i.L.は結直腸管腔内投与を示す。

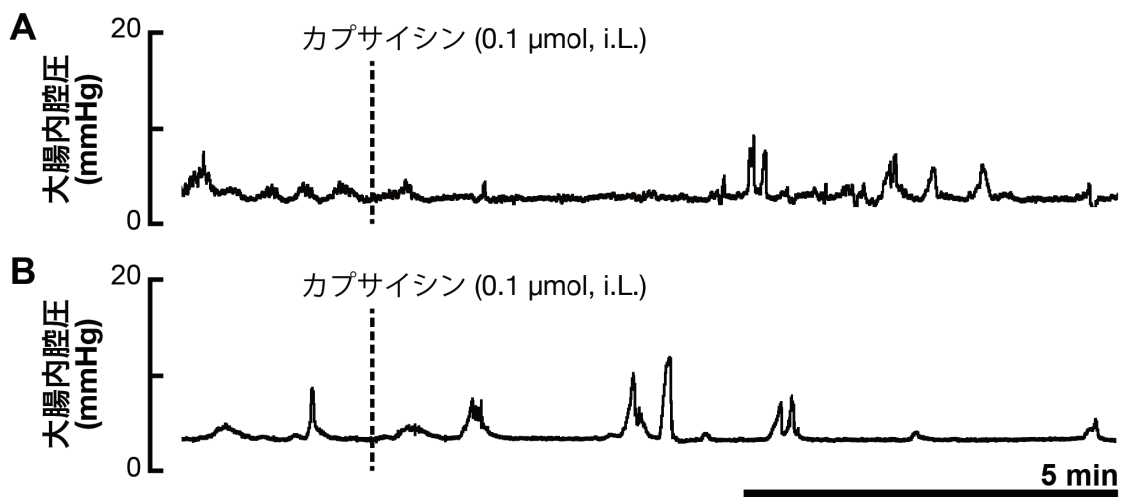


Fig. 21 カプサイシンの作用に対する神経経路切断の影響

カプサイシン投与前後の大腸内腔圧の変化の典型例を示す。(A) 骨盤神経切断下、(B) 胸部脊髄切断下でカプサイシン (0.1 μmol) を結直腸管腔内に投与した場合のデータを示している。骨盤神経または胸部脊髄を切断した状態では、カプサイシン (0.1 μmol) を管腔内に投与しても、大腸運動への影響はみられなかった。i.L.は結直腸管腔内投与を示す。

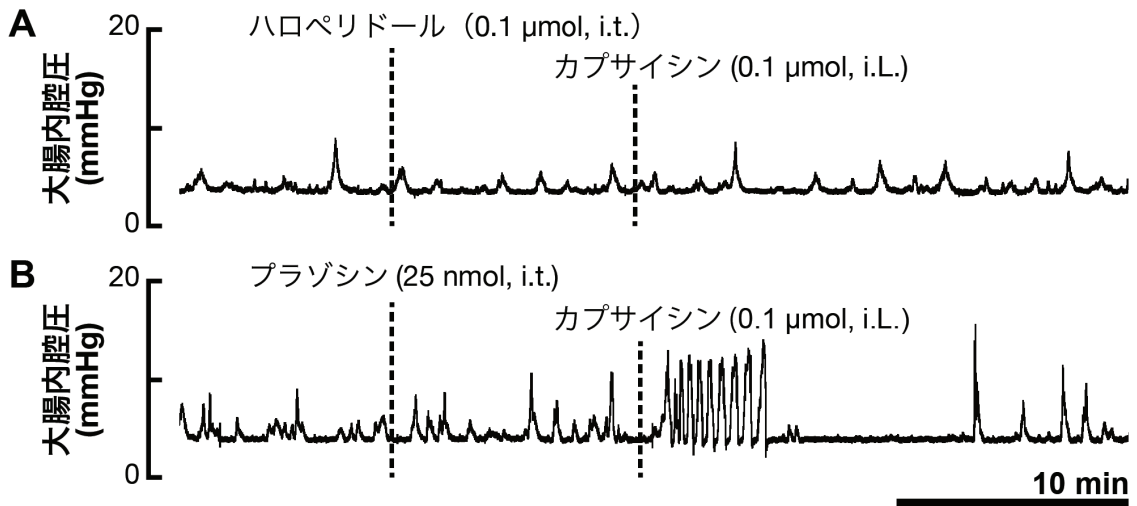


Fig. 22 カプサイシンの作用に対する脊髓排便中枢における
ドパミンおよびノルアドレナリンの関与

薬剤の投与前後の大腸内腔圧の変化の典型例を示す。(A) ハロペリドール、(B) プラゾシンを脊髓排便中枢に投与した後に、カプサイシンを大腸管腔内に投与した場合のデータを示している。D2様ドパミン受容体拮抗薬のハロペリドール (0.1 μmol) を脊髓排便中枢に投与後、カプサイシン (0.1 μmol) を結直腸管腔内に投与したところ、大腸運動に変化はみられなかった (n=4)。一方、プラゾシン (25 nmol) を脊髓排便中枢に前投与した場合、カプサイシン (0.1 μmol) によって大腸運動が亢進した (n=4)。i.t.は脊髓内投与、i.L.は結直腸管腔内投与を示す。

考 察

第2, 3章の結果から, 下行性疼痛抑制経路が脊髄における侵害性シグナル伝達の制御だけでなく, 脊髄排便中枢における排便制御にも関わるという仮説を立てた。そこで, 侵害刺激物質のカプサイシンを用いて大腸に侵害刺激を与えることで, 下行性疼痛抑制経路が活性化して大腸運動が亢進するのではないかと考え, 実験を行った。カプサイシンを大腸管腔内に投与すると大腸運動が亢進し (Fig. 20B), TRPV1 選択的拮抗薬のカプサゼピンによってカプサイシンの大腸運動促進作用が阻害されたことから (Fig. 20C), 大腸管腔内に投与したカプサイシンは TRPV1 に作用して大腸運動を促進することが明らかになった。

摘出標本を用いたこれまでの研究から, TRPV1 を介したカプサイシンの大腸運動促進作用は感覚神経の軸索反射によるものだと考えられており (11), 本研究におけるカプサイシンの作用も脊髄排便中枢を介さない軸索反射による可能性が考えられた。そこで, 骨盤神経を切断することで, 軸索反射は残っているが, 大腸と脊髄排便中枢との連絡を断った状態で実験を行い, カプサイシンによる大腸運動亢進に脊髄排便中枢が必要かを検討した。骨盤神経を切断すると, カプサイシンによる大腸運動亢進がみられなくなったことから (Fig. 21A), この作用は軸索反射ではなく, 脊髄排便中枢を介した反応であることが示された。この結果は, 意識下の犬を用いた過去の報告と一致している (22)。カプサイシンを意識下の犬の大腸管腔内に投与すると, 大腸運動が亢進し排便が引き起こされる。さらに, 大腸に投射している外来神経を全て切断すると, カプサイシンによる大腸運動促進作用が消失する。これらのことから, *in vivo* において, 大腸管腔内に投与したカプサイシンによる反応は軸索反射によるものではないと考えられる。しかしながらこの結果は, 摘出標本を用いた過去の報告とは異

なっている。*in vivo* における管腔内投与では、カプサイシンは粘膜面からのみ作用するが、摘出標本を用いた実験ではカプサイシンは粘膜面だけでなく漿膜面からも作用する。したがって、摘出標本を用いた過去の研究でみられた軸索反射による反応は、漿膜面側から作用したカプサイシンによるものであり、カプサイシンの管腔内投与では軸索反射による反応はみられなかったのは、カプサイシンの到達部位の違いによるものだと考えられる。

カプサイシンによる大腸運動促進作用には、骨盤神経を介した脊髓排便中枢との連絡が必要であることが分かった。もしこの反応が脊髓排便中枢だけを介した排便反射ならば、脊髓排便中枢と脳との連絡を断ったとしても反応は消失しないはずである。そこで、胸髄を切断したところ、カプサイシンの作用が消失したことから (Fig. 21B)、カプサイシンの作用は脊髓排便中枢だけでなく、脳を介する必要があることが示された。これらのことから、大腸管腔内に投与したカプサイシンは感覚神経の TRPV1 を活性化し、侵害性シグナルが骨盤神経を經由して脊髓排便中枢、そして脳まで伝えられ、再び脊髓排便中枢および骨盤神経を介して大腸運動を促進すると考えられる (Fig. 23)。

カプサイシンによる大腸運動亢進が、TRPV1 を介した侵害刺激によって引き起こされ、脊髓排便中枢および脳を介する反応であることが示されたが、この反応に下行性疼痛抑制経路が関与しているかは、これまでの結果からは判断できない。もしこの反応に下行性疼痛抑制経路が関与しているのであれば、下行性疼痛抑制経路の主要な神経伝達物質であるドパミンおよびノルアドレナリンの受容体の拮抗薬を脊髓排便中枢に投与することによって、カプサイシンの大腸運動促進作用が阻害されるはずである。第2、3章より、ドパミンおよびノルアドレナリンが、それぞれ D2 様ドパミン受容体および $\alpha 1$ アドレナリン受容体を介して大腸運動を促進することから、これらの受容体の選択的拮抗薬を脊

髄排便中枢にそれぞれ前投与したところ、D2 様ドパミン受容体拮抗薬によってカプサイシンの作用が阻害された (Fig. 22A, B)。このことから、大腸への侵害刺激によって、脊髄排便中枢に放出されたドパミンが大腸運動を促進していることが明らかになった。脊髄におけるドパミンは、そのほとんどが脳に由来することから (42)、大腸への侵害刺激によって脊髄排便中枢に放出されたドパミンは、脳からの下行性経路によって放出されたものだと考えられる。ドパミンが下行性疼痛抑制経路の主要な伝達物質であること、さらに大腸への侵害刺激によって活性化することを考慮に入れると、本研究の結果は、カプサイシンによる大腸への侵害刺激によって、ドパミン作動性の下行性疼痛抑制経路が活性化され、大腸運動が亢進することを示している。したがって、下行性疼痛抑制経路が侵害性シグナルの伝達の制御だけでなく、脊髄排便中枢における排便反射の制御にも関与していることが明らかになった。このことは、中枢神経系による排便制御メカニズムの解明において、新たな知見をもたらす非常に重要な発見であり、これまで明らかになっていない排便障害の病態や、その新たな治療法の確立につながると考えられる。

興味深いことに、同じ下行性疼痛抑制経路の伝達物質であるノルアドレナリンは、カプサイシンによる大腸運動促進作用には関与していないことが分かった。このことから、同じ下行性疼痛抑制経路であっても、ノルアドレナリンとドパミンの経路は、それぞれ異なる刺激によって活性化し、異なる生理的役割をもっていると考えられる。脊髄は脳幹部の A5, 6, 7 領域のノルアドレナリン作動性神経から非常に多くの投射を受けており、これらの神経領域が脊髄のノルアドレナリンの主な供給源だと考えられている (25, 42, 53)。バルーンを用いた結直腸の伸展刺激によって A6 領域の神経の活動が増加することが電気生理学的に示されており (32, 34)、このことからノルアドレナリン作動性の下行性

経路は、TRPV1 を介した化学的な侵害刺激ではなく、結直腸の伸展による物理的な侵害刺激によって活性化される可能性が考えられる。しかしながら、下行性のノルアドレナリン経路が実際にどのような刺激で活性化するのか、またその生理的意義を結論付けるにはさらなる研究が必要である。

本章の結果から、結直腸への侵害刺激が大腸運動を引き起こすことが分かった。大腸における侵害刺激は、結直腸での糞塊の蓄積による消化管壁の過伸展や、生体にとって有害な物質による化学的な刺激によって起こると考えられる。結直腸は、糞塊の排出だけでなく、糞塊の貯留という相反する二つの機能をもっており、これによって排便頻度の軽減や適切なタイミングでの排便を可能としている。糞塊の有無のモニターだけでは、結直腸に糞塊がくるたびに排便が起こってしまうので、結直腸における糞塊の蓄積量をモニターする必要があると考えられる。消化管壁の接触や伸展によって糞塊の有無をモニターし、大腸運動を抑制することで糞塊を貯留する。糞塊が十分に蓄積されると、消化管壁の過伸展によって侵害刺激が起こり、排便が誘起される。このように大腸における侵害刺激を排便の契機とすることで、糞塊の貯留と排泄を両立していることが推察される。また、化学的な侵害刺激によって大腸運動を促進させることで、大腸に送られてきた有害な物質を即座に体外に排出することができると考えられる。このように、大腸運動制御メカニズムに侵害刺激が関与することは、排便の生理的な制御にとって非常に重要な役割を果たしていると考えられる。

本章では、カプサイシンが大腸の TRPV1 に作用し、脊髓および脳を介して、大腸運動を促進することを示した。そして、この作用が脊髓排便中枢へ前投与した D2 様ドパミン受容体拮抗薬によって阻害されたことから、大腸管腔内に投与したカプサイシンによってドパミン作動性の下行性経路が活性化し、大腸運動を促進することが明らかになった。本章の結果から、下行性疼痛抑制経路が、

脊髄における侵害性シグナルの伝達の制御だけでなく、脊髄排便中枢における大腸運動の制御にも関与すると考えられる。このことは、これまで不明であった中枢神経系による大腸運動制御メカニズムにおける非常に重要な知見であり、中枢神経系の異常による排便障害の病態の解明に大きな進歩をもたらすものである。

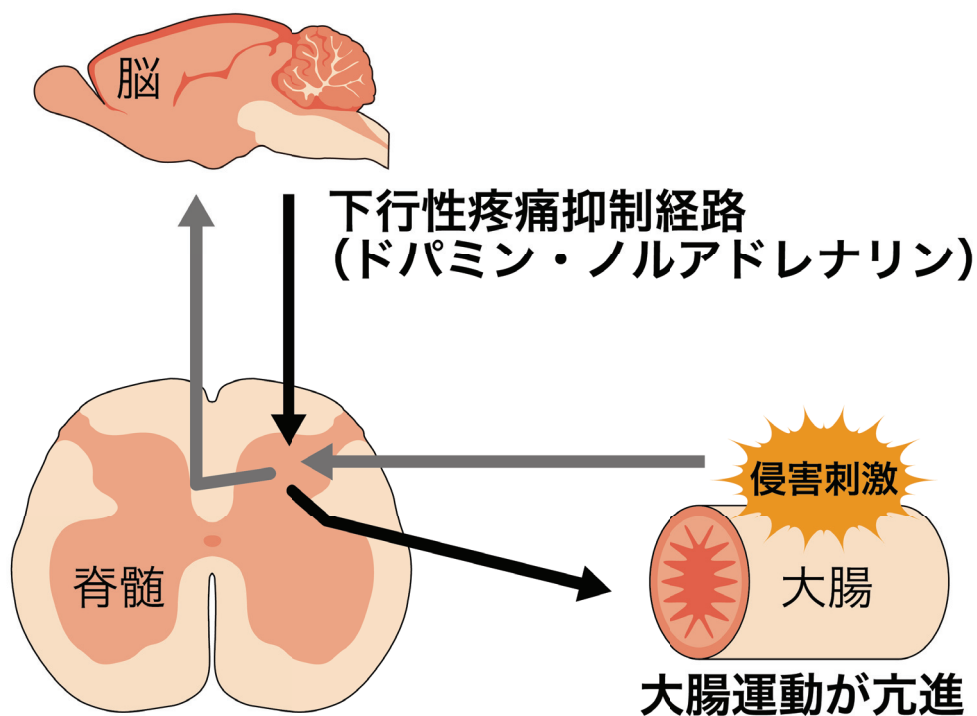


Figure. 23 下行性疼痛抑制経路による大腸運動の制御メカニズム

末梢における痛み刺激が感覚神経の一次求心性神経を活性化することで、脊髄に痛みの情報が入力する。脊髄に入力したシグナルは、二次求心性神経に乗り換えて脳まで上行し、脳の各種神経核に情報を伝える。脳へ入力したシグナルはさらに神経を乗り換えて大脳に情報を伝えることで、痛みとして認知される。これとは別に、脳に上行したシグナルは脳幹部のモノアミン神経を興奮させ、脊髄を下行する軸索を介して、脊髄におけるドパミンおよびノルアドレナリンを分泌する。本研究の結果から、この脊髄で分泌されたドパミンおよびノルアドレナリンが痛みの伝達を抑制するだけでなく、その原因を排除する作用を持っている可能性が示唆された。

総合考察

本研究は、中枢神経系による大腸運動制御メカニズムを解明するために、脊髄排便中枢に着目して、これまで不明であった排便制御に関与する神経伝達物質や神経回路の特定を行った。第1章ではこれまでに報告のあったグレリンの作用について検討し、第2、3章では新たにドパミンおよびノルアドレナリンが脊髄排便中枢で作用する生理活性物質であることを明らかにした。これらの実験では、生理活性物質を脊髄排便中枢に直接投与することで大腸の運動が変化するかをみており、この結果から分かることは脊髄排便中枢に薬理的な作用点が存在することである。したがって、第1章から第3章までの実験では、グレリン、ドパミンそしてノルアドレナリンが、実際に脊髄排便中枢に放出され、生理的に機能しているのかは不明なままである。これらの生理活性物質が生理的な機能をもっているかを調べるためには、これらの物質を利用している経路を活性化し、その機能を検討する必要がある。そこで、下行性疼痛抑制経路の主要な伝達物質であるドパミンおよびノルアドレナリンが、脊髄における侵害性シグナル伝達の調節に深く関わっていることから、大腸への侵害刺激によってこれらの物質を利用する経路を活性化できないかと考え、侵害刺激物質のカプサイシンを大腸管腔内に投与した。カプサイシンによる侵害刺激によって大腸運動が亢進し、この反応にドパミン作動性の下行性経路が関わっていることが分かった。したがって、これまでに報告されていたグレリン (GHSR1a) と今回明らかになったドパミンおよびノルアドレナリンのうち、少なくともドパミンは脊髄排便中枢において生理的に機能していると考えられる。本研究から、これまで不明であった脊髄排便中枢で作用する神経伝達物質として、新たにドパミンおよびノルアドレナリンが明らかとなり、さらにドパミン作動性の下行

性疼痛抑制経路が中枢神経系における排便制御に重要な経路であることを提唱した。

過去の報告において、脊髄深部背側角神経において、グレリンが GABA またはグリシン作動性の抑制性神経伝達を促進することが報告されており、この神経は脊髄における侵害シグナルの伝達に関わると考えられている (75)。実際に末梢および中枢に投与されたグレリンが炎症性の痛みを抑制することが報告されている (66)。これらのことから、脊髄における GHSR1a を介した大腸運動促進経路も、疼痛制御機構および下行性疼痛抑制経路による大腸運動制御メカニズムと関連している可能性が示唆される。脊髄排便中枢でのグレリン (GHSR1a) による大腸運動促進作用の生理的意義の解明には、今後のさらなる研究が必要である。

中枢神経系による大腸運動制御において、上脊髄排便中枢が脊髄排便中枢を促進性および抑制性に調節していると考えられているが、これまでそこに関わる神経伝達物質や経路は明らかにされていなかった。本研究の結果、脊髄排便中枢においてドパミンおよびノルアドレナリンが大腸運動を促進性に調節することが新たに明らかになった。脊髄におけるドパミンおよびノルアドレナリンは、そのほとんどが脳の A11, 5, 6, 7 領域からの軸索に由来すると考えられていることから (42, 53)、これらの領域が上脊髄排便中枢における重要な神経核であり、脊髄排便中枢の促進性調節に関与すると推察される。さらに、侵害刺激による大腸運動亢進が D2 様ドパミン受容体拮抗薬の脊髄内投与によって阻害されたことから、下行性ドパミン経路が生理的に機能しており、侵害刺激によって活性化される下行性疼痛抑制経路が上脊髄排便中枢と脊髄排便中枢をつなぐ神経経路の一つであることが新たに明らかになった。この経路を基にして、中枢神経系による排便制御に重要な神経回路の特定を行うことで、排便の中枢

性制御メカニズムのさらなる解明、そして中枢神経系の異常による排便障害の病態の解明や治療標的の発見につながると考えられる。

慢性的な腹部の痛みまたは不快感は、様々な機能性消化管障害において主要な症状として知られている。IBSにおいても、下痢や便秘といった機能障害と共に、腹部の痛みまたは不快感が診断基準の一つとなっている。IBSにおける腹部の痛みに関して多くの研究が行われており、消化管の感覚過敏によって起こる症状だと考えられている。事実、IBSの患者において、結直腸における伸展刺激に対する痛みの閾値の低下が知られている(56)。興味深いことに、IBS患者において腹部の痛みと消化管運動の異常が同時に出現することが報告されており(35, 54)、IBSにおける痛みと排便障害の間に病因論的な関係があることが推察される。しかしながら、IBSにおける大腸の感覚過敏と、運動障害の関連性はこれまで明らかになっていなかった。本研究において、大腸への侵害刺激がドパミン作動性の下行性疼痛抑制経路を活性化し、脊髓排便中枢を促進的に調節することで、大腸運動が亢進することが示された。本来、下行性疼痛抑制経路は痛みの制御に関わっていることを考えると、本研究の結果からIBSにおける痛みと排便障害の関連性を説明することが可能である。IBSの患者では感覚過敏によって侵害刺激に対する閾値が低下しており(41, 56)、これによって中枢神経系へ伝えられる侵害性シグナルが増強されていると考えられる。増強された侵害性シグナルによって、下行性疼痛抑制経路が過剰に賦活化され、脊髓排便中枢におけるドパミン放出が過剰となり、大腸運動が異常に亢進してしまうと考えられる。このように考えると、IBSにおいて痛みと排便障害が同時に現れる理由を説明できる。しかし、この説明ではIBSにおいて下痢が起こることは説明できるが、便秘が引き起こされる理由は説明できない。

IBSにおける排便障害には種類があり、下痢優勢型、便秘優勢型、混合型の三

つに分類することができる (35)。しかしながら、なぜこのような違いが現れるのか、その原因はこれまで明らかにされていない。この IBS における病型の多様性も、下行性疼痛抑制経路の活性化/不活性化状態の変化を考えることで説明できる。例えば、便秘優勢型では、何らかの理由によって下行性疼痛抑制経路が崩壊し、上脊髄排便中枢から脊髄排便中枢への促進性調節が消失することで、大腸の運動性の低下につながると考えられる。事実、IBS 患者において脊髄レベルでの感覚過敏が報告されており、これは下行性疼痛抑制経路の崩壊による表現型だと考えられている (37, 41)。また、混合型においては下痢と便秘を交互に繰り返すことから、下行性疼痛抑制経路の脱感作が起きているのではないかと考えられる。つまり、感覚過敏によって過剰に活性化した下行性疼痛抑制経路によって下痢が起こるが、脊髄におけるドパミン濃度の持続的な増加によって、その受容体が脱感作を起こしてしまい便秘になると考えられる。この考えは、慢性の侵害刺激によって脊髄におけるドパミンの濃度が持続的に増加するというこれまでの報告によって支持される (60)。さらに、ドパミン受容体 D2 サブタイプと GHSR1a がヘテロ二量体を形成している可能性を考えると、何らかの理由によって GHSR1a とヘテロ二量体が形成できなくなることで、ドパミン受容体のシグナル伝達の結果が逆転して便秘型、またはヘテロ二量体の形成と解離を繰り返すことで混合型の病型を示すとも考えられる。以上のように、本研究の結果から IBS 病態の新たな仮説が考えられた。このようなメカニズムが IBS の病態モデル動物で再現されるのか、さらに実際に IBS の患者で起きているのかを今後検討していく必要がある。

結 論

第1章では、脊髄排便中枢のグレリン感受性神経は、これまでに報告されている視床下部弓状核のグレリン感受性神経とは、大きく異なる性質をもっていることが示された。脊髄排便中枢の GHSR1a に内在性リガンドが存在しない可能性が高いことから、他の G タンパク質共役型受容体とヘテロ二量体を形成してシグナル伝達を修飾している可能性が考えられた。

第2章では、ドパミンが D2 様ドパミン受容体を介して、骨盤神経の節前線維を活性化し、大腸運動を促進していることが示された。このことから脊髄排便中枢においても、ドパミン受容体 D2 サブタイプと GHSR1a がヘテロ二量体を形成している可能性が考えられた。また、脊髄におけるドパミンの生理的作用から、下行性疼痛抑制経路が脊髄排便中枢を促進性に調節しているという仮説を立てた。

第3章では、ノルアドレナリンが $\alpha 1$ アドレナリン受容体を介して、骨盤神経の節前線維を活性化し、大腸運動を促進していることが明らかになった。脊髄のノルアドレナリンが橋の A5, 6, 7 領域の神経に由来することから、これらの領域が中枢神経系による大腸運動制御における重要な役割をもつ可能性が示唆された。また、本章の結果から、下行性疼痛抑制経路が脊髄排便中枢を調節しているという仮説が支持された。

第4章では、大腸管腔内に投与したカプサイシンによって、ドパミン作動性下行性経路が活性化し、大腸運動が亢進することが示された。このことから、

下行性疼痛抑制経路が脊髄排便中枢を促進性に調節していると考えられた。

本研究から示唆された下行性疼痛抑制経路による排便制御メカニズムは、これまで不明であった、IBS の排便障害における病態の説明を可能にすると考えられる。本研究は IBS の病態における新たな仮説を提唱し、消化管運動障害における新たな治療標的を示唆するものである。

謝 辞

本論文の作成にあたり、終始ご懇篤なるご指導とご鞭撻を賜りました、岐阜大学応用生物科学部教授 志水泰武博士、准教授 椎名貴彦博士に深く感謝を申し上げます。

本論文の草稿をご校閲くださいました、岐阜大学応用生物科学部教授 海野年弘博士、帯広畜産大学原虫病研究センター教授 河津信一郎博士、岩手大学農学部教授 山本欣郎博士、東京農工大学農学部教授 渡辺元博士に謹んで感謝申し上げます。

本研究の遂行にあたりご指導を賜りました、岐阜大学名誉教授 武脇義博士、小森成一博士、奈良県立医科大学名誉教授 高木都博士、Melbourne 大学名誉教授 John B. Furness 博士に深く感謝いたします。

また、研究に際して多大なご協力をくださいました岐阜大学獣医生理学教室の学生の皆様に心より御礼申し上げます。

文 献

1. Andersson U, Filipsson K, Abbott CR, Woods A, Smith K, Bloom SR, Carling D, Small CJ. (2004) AMP-activated protein kinase plays a role in the control of food intake. *J Biol Chem.* 279:12005-12008.
2. Andrews ZB. (2011) Central mechanisms involved in the orexigenic actions of ghrelin. *Peptides.* 32:2248-2255.
3. Blanchard EB, Lackner JM, Jaccard J, Rowell D, Carosella AM, Powell C, Sanders K, Krasner S, Kuhn E. (2008) The role of stress in symptom exacerbation among IBS patients. *J Psychosom Res.* 64:119-128.
4. Carlino E, Benedetti F. (2016) Different contexts, different pains, different experiences. *Neuroscience.* doi: 10.1016/j.neuroscience.2016.01.053.
5. 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.* 389:816-824.
6. Chinta SJ, Andersen JK. (2005) Dopaminergic neurons. *Int J Biochem Cell Biol.* 37:942-946.
7. Cowley MA, Smith RG, Diano S, Tschöp M, Pronchuk N, Grove KL, Strasburger CJ, Bidlingmaier M, Esterman M, Heiman ML, Garcia-Segura LM, Nillni EA, Mendez P, Low MJ, Sotonyi P, Friedman JM, Liu H, Pinto S, Colmers WF, Cone RD, Horvath TL. (2003) The distribution and mechanism of action of ghrelin in the CNS demonstrates a novel hypothalamic circuit regulating energy homeostasis. *Neuron.* 37:649-661.
8. Coyral-Castel S, Tosca L, Ferreira G, Jeanpierre E, Rame C, Lomet D, Caraty A,

- Monget P, Chabrolle C, Dupont J. (2008) The effect of AMP-activated kinase activation on gonadotrophin-releasing hormone secretion in GT1-7 cells and its potential role in hypothalamic regulation of the oestrous cyclicity in rats. *J Neuroendocrinol.* 20:335-346.
9. Day, HEW, Campeau S, Watson SJ Jr., Akil H. (1997) Distribution of alpha 1a-, alpha 1b- and alpha 1d-adrenergic receptor mRNA in the rat brain and spinal cord. *J. Chem. Neuroanat.* 13:115–139.
10. De Groat WC, Krier J. (1978) The sacral parasympathetic reflex pathway regulating colonic motility and defaecation in the cat. *J Physiol.* 276:481-500.
11. de Man JG, Boeckx S, Anguille S, de Winter BY, de Schepper HU, Herman AG, Pelckmans PA. (2008) Functional study on TRPV1-mediated signalling in the mouse small intestine: involvement of tachykinin receptors. *Neurogastroenterol Motil.* 20:546-556.
12. Ferens DM, Yin L, Bron R, Hunne B, Ohashi-Doi K, Kitchener PD, Sanger GJ, Witherington J, Shimizu Y, Furness JB. (2010) Functional and in situ hybridization evidence that preganglionic sympathetic vasoconstrictor neurons express ghrelin receptors. *Neuroscience.* 166:671-679.
13. Ferens DM, Yin L, Ohashi-Doi K, Habgood M, Bron R, Brock JA, Gale JD, Furness JB. (2010) Evidence for functional ghrelin receptors on parasympathetic preganglionic neurons of micturition control pathways in the rat. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 37:926-932.
14. Furness JB. (2006) *The Enteric Nervous System.* Blackwell, Oxford.
15. Furness JB, Cho HJ, Hunne B, Hirayama H, Callaghan BP, Lomax AE, Brock JA. (2012) Identification of neurons that express ghrelin receptors in autonomic

- pathways originating from the spinal cord. *Cell Tissue Res.* 348:397-405.
16. Furness JB, Hunne B, Matsuda N, Yin L, Russo D, Kato I, Fujimiya M, Patterson M, McLeod J, Andrews ZB, Bron R. (2011) Investigation of the presence of ghrelin in the central nervous system of the rat and mouse. *Neuroscience.* 193:1-9.
 17. Gao X, Zhang YQ, Zhang LM, Wu GC. (2001) Effects of intraplantar injection of carrageenan on central dopamine release. *Brain Res Bull* 54:391-394.
 18. Gonella J, Bouvier M, Blanquet F. (1987) Extrinsic nervous control of motility of small and large intestines and related sphincters. *Physiol Rev.* 67:902-961.
 19. Grouselle D, Chaillou E, Caraty A, Bluet-Pajot MT, Zizzari P, Tillet Y, Epelbaum J. (2008) Pulsatile cerebrospinal fluid and plasma ghrelin in relation to growth hormone secretion and food intake in the sheep. *J Neuroendocrinol.* 20:1138-1146.
 20. Grundy D, Al-Chaer ED, Aziz Q, Collins SM, Ke M, Taché Y, Wood JD. (2006) Fundamentals of neurogastroenterology: basic science. *Gastroenterology.* 130:1391-1411.
 21. Guan XM, Yu H, Palyha OC, McKee KK, Feighner SD, Sirinathsinghji DJ, Smith RG, Van der Ploeg LH, Howard AD. (1997) Distribution of mRNA encoding the growth hormone secretagogue receptor in brain and peripheral tissues. *Brain Res Mol Brain Res.* 48:23-29.
 22. Hayashi K, Shibata C, Nagao M, Sato M, Kakyo M, Kinouchi M, Saijo F, Miura K, Ogawa H, Sasaki I. (2010) Intracolonic capsaicin stimulates colonic motility and defecation in conscious dogs. *Surgery.* 147:789-797.
 23. Hirayama H, Shiina T, Shima T, Kuramoto H, Takewaki T, B Furness J, Shimizu Y. (2010) Contrasting effects of ghrelin and des-acyl ghrelin on the lumbo-sacral defecation center and regulation of colorectal motility in rats. *Neurogastroenterol*

- Motil. 22:1124-1131.
24. Holst B, Cygankiewicz A, Jensen TH, Ankersen M, Schwartz TW. (2003) High constitutive signaling of the ghrelin receptor--identification of a potent inverse agonist. *Mol Endocrinol.* 17:2201-2210.
 25. Howorth PH, Teschemacher AG, Pickering AE. (2009) Retrograde adenoviral vector targeting of nociceptive pontospinal noradrenergic neurons in the rat in vivo. *J. Comp. Neurol.* 512:141-157.
 26. Jost WH. (2010) Gastrointestinal dysfunction in Parkinson's disease. *J Neurol Sci.* 289:69-73.
 27. Karasawa H, Pietra C, Giuliano C, Garcia-Rubio S, Xu X, Yakabi S, Taché Y, Wang L. (2014) New ghrelin agonist, HM01 alleviates constipation and L-dopa-delayed gastric emptying in 6-hydroxydopamine rat model of Parkinson's disease. *Neurogastroenterol Motil.* 26:1771-1782.
 28. Kern A, Albarran-Zeckler R, Walsh HE, Smith RG. (2012) Apo-ghrelin receptor forms heteromers with DRD2 in hypothalamic neurons and is essential for anorexigenic effects of DRD2 agonism. *Neuron.* 73:317-332.
 29. Kern A, Mavrikaki M, Ullrich C, Albarran-Zeckler R, Brantley AF, Smith RG. (2015) Hippocampal Dopamine/DRD1 Signaling Dependent on the Ghrelin Receptor. *Cell.* 163:1176-1190.
 30. Kohno D, Nakata M, Maekawa F, Fujiwara K, Maejima Y, Kuramochi M, Shimazaki T, Okano H, Onaka T, Yada T. (2007) Leptin suppresses ghrelin-induced activation of neuropeptide Y neurons in the arcuate nucleus via phosphatidylinositol 3-kinase- and phosphodiesterase 3-mediated pathway. *Endocrinology.* 148:2251-2263.

31. Kohno D, Sone H, Minokoshi Y, Yada T. (2008) Ghrelin raises $[Ca^{2+}]_i$ via AMPK in hypothalamic arcuate nucleus NPY neurons. *Biochem Biophys Res Commun.* 366:388-392.
32. Kosoyan HP, Grigoriadis DE, Taché Y. (2005) The CRF1 receptor antagonist, NBI-35965, abolished the activation of locus coeruleus neurons induced by colorectal distension and intracisternal CRF in rats. *Brain Res.* 1056:85-96.
33. Lahlou S (1998). Involvement of spinal dopamine receptors in mediation of the hypotensive and bradycardic effects of systemic quinpirole in anaesthetised rats. *Eur J Pharmacol.* 353:227–237.
34. Lechner SM, Curtis AL, Brons R, Valentino RJ. (1997) Locus coeruleus activation by colon distention: role of corticotropin-releasing factor and excitatory amino acids. *Brain Res.* 756:114-124.
35. Longstreth GF, Thompson WG, Chey WD, Houghton LA, Mearin F, Spiller RC. (2006) Functional bowel disorders. *Gastroenterology.* 2006 Apr;130(5):1480-91. Review. Erratum in: *Gastroenterology.* 130:1480-1491.
36. Maggi CA, Giuliani S, Santicioli P, Patacchini R, Meli A. (1988) Neural pathways and pharmacological modulation of defecation reflex in rats. *General Pharmacol.* 19:517-523.
37. Malcolm A, Phillips SF, Kellow JE, Cousins MJ. (2001) Direct clinical evidence for spinal hyperalgesia in a patient with irritable bowel syndrome. *Am. J. Gastroenterol.* 96:2427-2431.
38. Mason BL, Wang Q, Zigman JM. (2014) The central nervous system sites mediating the orexigenic actions of ghrelin. *Annu Rev Physiol.* 76:519-533.
39. Matsumoto K, Kurosawa E, Terui H, Hosoya T, Tashima K, Murayama T, Priestley

- JV, Horie S. (2009) Localization of TRPV1 and contractile effect of capsaicin in mouse large intestine: high abundance and sensitivity in rectum and distal colon. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 297:G348-360.
40. Mayer EA, Naliboff BD, Chang L, Coutinho SV. (2001) V. Stress and irritable bowel syndrome. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 280:G519-524.
41. Mertz, H. (2003) Review article: visceral hypersensitivity. *Aliment Pharmacol Ther* 17:623–633.
42. Millan MJ. (2002) Descending control of pain. *Prog Neurobiol.* 66:355-474.
43. Missale C, Nash SR, Robinson SW, Jaber M, Caron MG. (1998) Dopamine receptors: from structure to function. *Physiol Rev.* 78:189-225.
44. Nagano M, Ishimizu Y, Saitoh S, Okada H, Fukuda H. (2004) The defecation reflex in rats: fundamental properties and the reflex centre. *Autonom Neurosci.* 111:48-56.
45. Naitou K, Nakamori H, Shiina T, Ikeda A, Nozue Y, Sano Y, Yokoyama T, Yamamoto Y, Yamada A, Akimoto N, Furue H, Shimizu Y. (2016) Stimulation of dopamine D2-like receptors in the lumbosacral defecation centre causes propulsive colorectal contractions in rats. *J Physiol.* In press. doi: 10.1113/JP272073.
46. Nakazato M, Murakami N, Date Y, Kojima M, Matsuo H, Kangawa K, Matsukura S. (2001) A role for ghrelin in the central regulation of feeding. *Nature.* 409: 194-198.
47. Nieoullon A. (2002) Dopamine and the regulation of cognition and attention. *Prog Neurobiol.* 67:53-83.
48. Niimi M, Sato M, Yokote R, Tada S, Takahara J. (2001) Effects of central and peripheral injection of leptin on food intake and on brain Fos expression in the Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty rat with hyperleptinaemia. *J Neuroendocrinol.* 11:605-611.

49. Ohno T, Kamiyama Y, Aihara R, Nakabayashi T, Mochiki E, Asao T, Kuwano H. (2006) Ghrelin does not stimulate gastrointestinal motility and gastric emptying: an experimental study of conscious dogs. *Neurogastroenterol Motil.* 18:129-135.
50. Omote K, Kawamata T, Kawamata M, Namiki A. (1998) Formalin-induced nociception activates a monoaminergic descending inhibitory system. *Brain Res.* 814:194-198.
51. Park S, Jiang H, Zhang H, Smith RG. (2012) Modification of ghrelin receptor signaling by somatostatin receptor-5 regulates insulin release. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 109:19003-19008.
52. Perello M, Scott MM, Sakata I, Lee CE, Chuang JC, Osborne-Lawrence S, Rovinsky SA, Elmquist JK, Zigman JM. (2012) Functional implications of limited leptin receptor and ghrelin receptor coexpression in the brain. *J Comp Neurol.* 520:281-294.
53. Pertovaara A. (2006) Noradrenergic pain modulation. *Prog Neurobiol.* 80: 53-83.
54. Posserud I, Syrous A, Lindström L, Tack J, Abrahamsson H, Simrén M. (2007) Altered rectal perception in irritable bowel syndrome is associated with symptom severity. *Gastroenterology.* 133:1113-23.
55. Rediger A, Piechowski CL, Yi CX, Tarnow P, Strotmann R, Grüters A, Krude H, Schöneberg T, Tschöp MH, Kleinau G, Biebermann H. (2011) Mutually opposite signal modulation by hypothalamic heterodimerization of ghrelin and melanocortin-3 receptors. *J Biol Chem.* 286:39623-39631.
56. Ritchie, J. (1973) Pain from distension of the pelvic colon by inflating a balloon in the irritable colon syndrome. *Gut* 14:125–132.
57. Sakakibara R, Kishi M, Ogawa E, Tateno F, Uchiyama T, Yamamoto T, Yamanishi

- T. (2011). Bladder, bowel, and sexual dysfunction in Parkinson's disease. *Parkinsons Dis.* 924605. doi: 10.4061/2011/924605.
58. Sakata I, Nakano Y, Osborne-Lawrence S, Rovinsky SA, Lee CE, Perello M, Anderson JG, Coppari R, Xiao G, Lowell BB, Elmquist JK, Zigman JM. (2009) Characterization of a novel ghrelin cell reporter mouse. *Regul Pept.* 155:91-98.
59. Sanger GJ, Furness JB. (2016) Ghrelin and motilin receptors as drug targets for gastrointestinal disorders. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 13:38-48.
60. Satoh O, Omote K. (1996) Roles of monoaminergic, glycinergic and GABAergic inhibitory systems in the spinal cord in rats with peripheral mononeuropathy. *Brain Res.* 728:27-36.
61. Schaeffer M, Langlet F, Lafont C, Molino F, Hodson DJ, Roux T, Lamarque L, Verdié P, Bourrier E, Dehouck B, Banères JL, Martinez J, Méry PF, Marie J, Trinquet E, Fehrentz JA, Prévot V, Mollard P. (2013) Rapid sensing of circulating ghrelin by hypothalamic appetite-modifying neurons. *Proc Natl Acad Sci USA.* 110:1512-1517.
62. Schellekens H, van Oeffelen WE, Dinan TG, Cryan JF. (2013) Promiscuous dimerization of the growth hormone secretagogue receptor (GHS-R1a) attenuates ghrelin-mediated signaling. *J Biol Chem.* 288:181-191.
63. Schwartz MW, Seeley RJ, Campfield LA, Burn P, Baskin DG. (1996) Identification of targets of leptin action in rat hypothalamus. *J Clin Invest.* 98:1101-1106.
64. Shimizu Y, Chang EC, Shafton AD, Ferens DM, Sanger GJ, Witherington J, Furness JB. (2006) Evidence that stimulation of ghrelin receptors in the spinal cord initiates propulsive activity in the colon of the rat. *J Physiol.* 576:329-338.
65. Shintani M, Ogawa Y, Ebihara K, Aizawa-Abe M, Miyanaga F, Takaya K, Hayashi

- T, Inoue G, Hosoda K, Kojima M, Kangawa K, Nakao K. (2001) Ghrelin, an endogenous growth hormone secretagogue, is a novel orexigenic peptide that antagonizes leptin action through the activation of hypothalamic neuropeptide Y/Y1 receptor pathway. *Diabetes*. 50:227-232.
66. Sibilina V, Lattuada N, Rapetti D, Pagani F, Vincenza D, Bulgarelli I, Locatelli V, Guidobono F, Netti C. (2006) Ghrelin inhibits inflammatory pain in rats: involvement of the opioid system. *Neuropharmacology*. 51:497-505.
67. Sivertsen B, Holliday N, Madsen AN, Holst B. (2013) Functionally biased signalling properties of 7TM receptors - opportunities for drug development for the ghrelin receptor. *Br J Pharmacol*. 170:1349-1362.
68. Smith MS, Schambra UB, Wilson KH, Page SO, Schwinn DA. (1999) Alpha1-adrenergic receptors in human spinal cord: specific localized expression of mRNA encoding alpha1-adrenergic receptor subtypes at four distinct levels. *Brain Res Mol Brain Res*. 63:254-261.
69. Takaki M, Neya T, Nakayama S. (1980) Sympathetic activity in the recto-rectal reflex of the guinea pig. *Pflugers Arch*. 388:45-52.
70. Takaki M, Neya T, Nakayama S. (1983) Role and localization of a region in the pons which has a descending inhibitory influence on sympathetically mediated inhibition of the recto-rectal reflex of guinea pigs. *Pflugers Arch*. 398:120-125.
71. 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*. 21:531-543.
72. Tong WD, Ridolfi TJ, Kosinski L, Ludwig K, Takahashi T. (2010) Effects of autonomic nerve stimulation on colorectal motility in rats. *Neurogastroenterol Motil*.

22:688-693.

73. Trudel L, Tomasetto C, Rio MC, Bouin M, Plourde V, Eberling P, Poitras P. (2002) Ghrelin/motilin-related peptide is a potent prokinetic to reverse gastric postoperative ileus in rat. *Am J Physiol.* 282:G948-952.
74. Vallone D, Picetti R, Borrelli E. (2000). Structure and function of dopamine receptors. *Neurosci Biobehav Rev.* 24:125-132.
75. Vergnano AM, Ferrini F, Salio C, Lossi L, Baratta M, Merighi A. (2008) The gastrointestinal hormone ghrelin modulates inhibitory neurotransmission in deep laminae of mouse spinal cord dorsal horn. *Endocrinology.* 49:2306-2312.
76. Weil-Fugazza J, Godefroy F. (1993) Dorsal and ventral dopaminergic innervation of the spinal cord: functional implications. *Brain Res Bull.* 30:319-324.
77. Willesen MG, Kristensen P, Rømer J. (1999) Co-localization of growth hormone secretagogue receptor and NPY mRNA in the arcuate nucleus of the rat. *Neuroendocrinology.* 70: 306-316.
78. Wise RA. (2004). Dopamine, learning and motivation. *Nat Rev Neurosci.* 5:483-494.