

学 位 論 文 の 要 旨

学位の種類	博 士	氏 名	宮 本 義 博
学 位 論 文 題 目 Gastric Neuropeptides and Gastric Motor Abnormality in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats (ストレプトゾトシン誘発糖尿病ラットの胃壁内神経ペプチド含有量と胃排出能について) 共著者名 米田政志、森川秋月、伊藤博史、牧野 勲 掲載学会誌名 Digestive Disease and Sciences Volume 46, Number 8, 1596 - 1603, 2001 ＜目的＞ 糖尿病患者はしばしば嘔気、嘔吐、便秘、下痢といった消化器症状を有し、自律神経障害が主要な原因であると考えられている。嘔気、嘔吐を起こす糖尿病性胃運動機能異常は固形・液体食の排出遅延である事が報告されてきたが、近年、胃排出亢進を示す糖尿病患者の存在が明らかとなってきた。しかし、その機序は未だ明らかとはなっていない。Calcitonin gene-related peptide (CGRP) は中枢神経系・末梢神経系に広く分布し、特定の部位ではSubstance Pと併存している。CGRP・Substance Pともに消化管運動機能に関与していることが知られている。そこで、今回我々はストレプトゾトシン(STZ)誘発糖尿病ラットにおける胃壁内神経ペプチド含有量と胃排出能の関連について検討した。 ＜材料と方法＞ 1. 動物 体重250-300gの雄性Wistarラットを対象とした。 2. 糖尿病発症 STZ 50mg/Kgを静注し、糖尿病を発症させ、インスリン治療群（HumalinN 4 u/day投与）、未治療群に分け、2週および4週間、同一環境下で飼育した。対照群、インスリン治療群、未治療群ともに14匹ずつ飼育した。			

3. 胃排出能

12時間絶食としたのちphenol red (50mg/100ml)を添加した1.5% methylcellulose溶液1.5 mlを経口的に投与し、15分後に噴門部・幽門部をクランプし、胃を摘出、0.1N NaOH溶液40mlにてホモジナイズした後、5mlを採取し、trichloroacetic acid(20%, wt/vol) 0.5mlを添加し、0.5N NaOH 4mlを加え、励起波長560nmにて分光光度計で残余色素量を測定し、胃排出能を算出した。

CGRPの関与を検討するため、未治療群にCGRP (50 μ g/kg)、CGRP antagonist (50 μ g/kg)を静注後の胃排出能も検討した。

4. CGRP・Substance P含有量

12時間絶食としたのち、胃を摘出し、前庭部と体部に分割。煮沸した、胃重量の10倍量の2N acetic acidにてホモジナイズし、4℃、3000rpm、20分遠心したのちRIA法にてCGRP・Substance P含有量を測定した。また、BCA法にて蛋白濃度を測定し、単位蛋白あたりの濃度として算出した。

5. 統計学的処理

実験群間の有意差検定は、2群間の検定においては、Student's t testを用い、3群間以上の検定においては、Fisher's least significant differenceを用いた。p < 0.05を有意とした。

<成績>

1. 胃排出能

胃排出能は、対照群 (50.0 $\pm$ 2.5%) に比して、STZ投与2週後の未治療群では有意に遅延 (31.6 $\pm$ 8.6%; 42%遅延: p < 0.05) し、STZ投与4週後の未治療群では有意に亢進 (72.9 $\pm$ 2.3%; 52%亢進: p < 0.01) していた。インスリン治療群は2週・4週後とも対照群と差を認めなかった。STZ投与2週後の未治療群にCGRP antagonistを静注すると対照群と差を認めなかった。STZ投与4週後の未治療群にCGRPを静注すると対照群と差を認めなかった。

2. 胃壁内CGRP・Substance P濃度 (pg/ μ g protein)

STZ投与2週後の未治療群では、対照群に比して、胃前庭部・体部のCGRP含有量は増加していた(前庭部; 対照群 0.18 $\pm$ 0.01, 未治療群 0.27 $\pm$ 0.02, p < 0.01; 体部; 対照群 0.16 $\pm$ 0.02, 未治療群 0.25 $\pm$ 0.05, p < 0.05)。インスリン治療群は対照群と差を認めなかった。未治療群のsubstance P含有量は対照群と差を認めなかった。STZ投与4週後の未治療群では、対照群に比して胃前庭部・体部のCGRP含有量は減少していた(前庭部; 対照群 0.19 $\pm$ 0.01, 未治療群 0.15 $\pm$ 0.00, p < 0.05;

体部；対照群 0.24 ± 0.02 , 未治療群 0.18 ± 0.02 , $p < 0.05$)。インスリン治療群は対照群と差を認めなかった。未治療群の substance P 含有量は対照群と差を認めなかった。

＜考案＞

胃排出能は STZ 投与 4 週後の未治療群にて亢進していた。この現象は、これまでも報告されているが、今回我々はさらに、STZ 投与 2 週後の未治療群にて胃排出能が遅延していることを示した。これは、STZ 誘発 5-7 日の糖尿病ラットの胃排出能遅延を示した Chang らの近年の報告と一致している。胃排出能遅延・亢進が、インスリン治療により正常化したことより、これら変化の原因が、STZ の毒性によるものとは考えにくく、高血糖によるものであると考えられる。

胃壁内 CGRP 含有量は未治療群にて、STZ 投与 2 週後においては増加しており、STZ 投与 4 週後においては減少していた。これらは、胃排出能と同様に、インスリン治療により正常化し、STZ の毒性によるものとは考えにくい。CGRP は胃運動機能を抑制し、胃排出を遅延することが知られている。また、STZ 誘発糖尿病ラットにおいて CGRP 免疫反応陽性神経が減少していることも報告されている。今回の検討では、未治療群において、2 週後・4 週後とも、胃壁内 CGRP 含有量と胃排出能が逆相関しており、これらはインスリン治療により正常化した。同一ラットにて CGRP 含有量と胃排出能を評価する事は不可能であったため、CGRP 含有量と胃運動機能異常との直接的な関係は示せなかったが、(1) 未治療群における CGRP 含有量の変化が、胃排出能の変化と同時期に起こり、インスリン治療により正常化した、(2) STZ 投与 2 週後の胃排出能遅延が CGRP antagonist の投与により正常化し、STZ 投与 4 週後の胃排出能亢進が CGRP の投与により正常化したことより、胃壁内 CGRP 含有量が、糖尿病ラットにおける胃運動機能を調節している一要因であることが想定される。

糖尿病における胃運動機能異常は、広く認識されているが、その機序に関しては多種の要因が指摘されている。糖尿病性自律神経障害が糖尿病性胃運動機能低下の原因として指摘されており、迷走神経が胃運動に重要な役割を果たしている。しかしながら、迷走神経障害を有さず胃運動機能低下を有する患者が報告されており、他の要因が存在する事が想定される。胃平滑筋のシグナル伝達の障害、高血糖による直接作用が原因と考えられることも報告されている。

STZ 誘発 4 週後の糖尿病ラットにおいて、迷走神経に組織学的変化がないことが報告されている。今回の検討における STZ 誘発 2 週後では、迷走神経障害が存在しないと考えられ、高血糖が迷走神経に直接的あるいは間接的に作用し胃排出遅延が起こったと考えられる。このことより、STZ 誘発 2 週

後では、高血糖によってCGRP放出が促され、放出されたCGRPによって胃運動機能が抑制されたと考えられる。

STZ誘発4週後の糖尿病ラットにおいて胃排出能亢進と胃壁内CGRP含有量の減少が認められた。迷走神経求心性C線維を破壊するカプサイシン投与により求心性神経のCGRPが枯渇し、胃排出能が亢進することが報告されている。STZ投与4週後においては、STZ投与2週後とは逆に、胃壁内求心性神経のCGRPの枯渇により胃排出能が亢進したと考えられる。

以上より、胃壁内CGRP含有量の変化が糖尿病における胃運動機能異常の重要な要素の一つであることが示された。

<結論>

今回、我々は、STZ誘発2週後および4週後の糖尿病ラットにおいて胃壁内CGRP含有量と胃排出能が逆相関する事、および、これらの変化がインスリン治療により正常化する事を認めた。このことは、糖尿病における胃運動機能異常に胃壁内CGRP含有量が関与している可能性を示唆するものと考えられる。

<引用文献>

1. Ewing DJ, Clark BF: Diabetic autonomic neuropathy: A clinical view point. In Diabetic Neuropathy. PJ Dyck, PK Thomas, AK Asbury, AK Winegard, D Porte (eds). Philadelphia, WB Saunders, 1987, pp 66-88
2. Raybould H: Inhibitory effects of calcitonin gene-related peptide on gastrointestinal motility Ann NY Acad Sci 657: 248-257, 1992
3. Chang FY, Lee SD, Yeh GH, Wahg PS: Influence of blood glucose levels on rat liquid gastric emptying. Dig Dis Sci 41: 528-532, 1996

<参考文献>

1. 糖尿病性末梢神経障害に対する Ibudilast の効果: Progress in Medicine 14 (6), 1700 -1704, 1994
2. Rapid Gastric Emptying and Pathological Changes of Vagus Nerve in The Spontaneously Diabetic Chinese Hamsters: Diabetes. Res. Clin. Pract. 28 (2), 89 - 95, 1995

学位論文の審査結果の要旨

報 告 番 号	第 号		
学位の種類	博士（医学）	氏 名	宮 本 義 博
審査委員長 坂 本 尚 志 ㊤ 審査委員 菊 池 健次郎 ㊤ 審査委員 牧 野 勲 ㊤			
学 位 論 文 題 目 Gastric neuropeptides and gastric motor abnormality in streptozotocin-induced diabetic rats. (ストレプトゾトシン誘発糖尿病ラットの胃壁内神経ペプチド含有量と胃排出能について)			
糖尿病患者では自律神経障害に基づく胃運動機能異常として、従来固形・液体食の排出遅延が報告されてきた。しかし、近年、胃排出亢進を呈する糖尿病患者の存在が明らかにされている。一方、糖尿病においては、消化管壁内に存在する神経ペプチド含有量の変化が報告されている。本研究は、糖尿病の進行による胃排泄能の変化が胃壁内神経ペプチドの含有量の推移と関連することを明らかにしようと試みた研究である。 実験モデルにはストレプトゾトシン誘発早期糖尿病ラットモデルを用いて、発症後2週間および4週間後の、胃壁内神経ペプチドの含有量と、胃排泄能の関連を解析している。			

得られた結果は明確で、2週間後では、胃壁内神経ペプチド含有量は増大し、胃排泄能は抑制されていたが、4週間後では、胃壁内神経ペプチド含有量は減少し、胃排泄能は亢進していた。このことは、胃壁内神経ペプチド含有量と胃排泄能の間に負の相関関係があり、それが糖尿病の進行により変化することを明確に示すものである。

またこのような関係は、神経ペプチドの拮抗薬の前投与により消失したことから、胃壁内神経ペプチド含有量が、糖尿病における胃排泄能を支配していることは明らかであった。

また、論文提出者は、参考論文において、4週間後までは自律神経末端に変化が起こっていないことを既に証明しており、胃壁内神経ペプチド含有量の増加は糖尿病に伴う高血糖によることを推測している。本研究においてもインシュリン治療により、胃壁内神経ペプチド含有量の増加が抑制されることを明らかとしている。

以上の結果は、早期糖尿病患者に出現する消化器症状のメカニズムの一端を明らかにしたものであり、この領域の研究の進歩に大きく貢献すると考えられた。

なお、論文提出者に対する本論文の内容、関連領域に関する試問に対し、適切な回答が得られ、学力も十分と考えられた。以上より、本論文は博士の学位論文に値すると判定された。