

肝臓機能（生理および病態）に対する中枢性神経ペプチドの作用に関する研究
(課題番号07670554)

平成7年度～平成8年度科学研究費補助金（基盤研究(C)(2)）研究成果報告書



平成9年2月

研究代表者

米田 政志
(旭川医科大学医学部)

● は し が き

種々の神経ペプチドが広く中枢神経系に分布し、生体内の生理作用を中枢性にコントロールしている事が知られており、消化器分野においてもThyrotropin releasing hormoneなどの中枢性神経ペプチドが消化管病変や生理機能に対して重要な役割を果たしていることが明らかにされている。一方、肝臓も自律神経が密に分布しており、交感神経や副交感神経の電気刺激が胆汁分泌や肝血流に変化を及ぼすことが報告されている。そこで、本研究において肝生理機能および肝病態生理における中枢性神経ペプチドの作用および作用機序を追求し、それら神経ペプチドの臨床応用に対する可能性を検討することを目的とした。

● 研 究 組 織

研究代表者： 米 田 政 志 （旭川医科大学医学部助手）

● 研 究 経 費

平成7年度	900千円
平成8年度	1,300千円
計	2,200千円

● 研究発表

(1) 学会誌等

- Yoneda M, Tamasawa N, Takebe K, et al.
Central neuropeptide Y enhances biles secretion through vagal and muscarinic but nitric oxide pathways in rats.
Peptides 16巻4号、1995年4月。
- Itoh H, Yoneda M, Tamori K, et al.
Rapid gastric emptying and pathological changes of the vagus nerves in the spontaneously diabetic Chinese hamsters.
Diabetic Research and Clinical Practice 28巻2号、1995年5月。
- Yoneda M and Taché Y
Serotonin enhances gastric response to TRH analog in the dorsal vagal complex through 5HT2 receptor in rats.
American Journal of Physiology 269巻1号、1995年7月
- Yoneda M and Taché Y
Somatostatin analog in the hypothalamus inhibits and in the medulla stimulates gastric acid secretion.
British Journal of Pharmacology 116巻4号、1995年10月。
- Nakamura K, Yoneda M, Kimura A, et al.
Increase of sulfated ursodeoxycholic acid in the serum and urine of patients with chronic liver disease after ursodeoxycholic acid therapy.
Journal of Gastroenterology and Hepatology 11巻4号、1996年4月。
- Kato K, Yoneda M, Nakamura K, et al.
Enzymatic determination of serum 3 α -sulfated bile acids concentration with bile acid 3 α -sulfate sulfohydrolase.
Digestive Disease and Science 41巻8号、1996年8月。
- Yoneda M, Yokohama S, Tamori K, et al.
Neuropeptide Y in the dorsal vagal complex stimulates bicarbonate-dependent bile secretion in rats.
Gastroenterology (印刷中)。

(2) 口頭発表

- Yoneda M, Tamori K, Sato K, et al.
Central thyrotropin-releasing hormone stimulates hepatic proliferation through vagal,

- muscarinic and prostaglandin pathways in rats (リサーチフォーラム).
第97回アメリカ消化器病学会、1995年5月
- Nakamura K, Yoneda M, Tamori K, et al.
Effect of ursodeoxycholic acid (UDCA) on patients with type I autoimmune hepatitis (リサーチフォーラム).
第97回アメリカ消化器病学会、1995年5月
 - Tamori K, Yoneda M, Yokohama S, et al.
Central thyrotropin-releasing hormone (TRH) enhances the hepatic blood flow in rats.
第97回アメリカ消化器病学会、1995年5月
 - Kato T, Yoneda M, Nakamura K, et al.
Measurement of sulfated bile acids by newly developed enzymatic method.
第97回アメリカ消化器病学会、1995年5月
 - Yoneda M, Tamori K, Sato K, et al.
Central thyrotropin-releasing hormone stimulates hepatic proliferation through vagal, muscarinic and prostaglandin pathways in rats (シンポジウム).
International Symposium on Liver Innervation、1995年7月
 - Tamori K, Yoneda M, Yokohama S, et al.
Central thyrotropin-releasing hormone (TRH) enhances the hepatic blood flow in rats.
International Symposium on Liver Innervation、1995年7月
 - Yoneda M, Yokohama S, Tamori K, et al.
Neuropeptide Y (NPY) in the left dorsal vagal complex (DVC) stimulates bile secretion in rats.
第98回アメリカ消化器病学会、1996年5月
 - Hasegawa T, Yoneda M, Nakamura K, et al.
Beneficial effect of α -glucosidase inhibitor of late dumping syndrome in patients with non-insulin dependent diabetes mellitus.
第98回アメリカ消化器病学会、1996年5月
 - Tamori K, Yoneda M, Yokohama S, et al.
Involvement of calcitonin-gene related peptide (CGRP)-containing and capsaicin-sensitive afferent fibers in central thyrotropin-releasing hormone (TRH)-induced hepatic hyperthermia in rats.
第98回アメリカ消化器病学会、1996年5月
 - Yokohama S, Yoneda M, Tamori K, et al.

Central thyrotropin-releasing hormone (TRH) enhances hepatic cyclic AMP (c AMP) synthesis through vagal-muscarinic pathways in rats.

第98回アメリカ消化器病学会、1996年5月

- Sato Y, Yoneda M, Yokohama S, et al.
Protective effect of central thyrotropin-releasing hormone (TRH) on CCl4-induced liver damage in rats.
第98回アメリカ消化器病学会、1996年5月
- 米田 政志、田森 啓介
中枢性Neuropeptide Yの胆汁分泌に及ぼす影響（ワークショップ）
第31回日本胆道学会総会、平成7年5月11日
- 米田 政志、横浜 吏郎、田森 啓介、他
肝増殖に対する中枢性ペプチドによる制御
第31回日本肝臓学会総会、平成7年7月21日
- 田森 啓介、米田 政志、横浜 吏郎、他
中枢性 Thyrotropine-Releasing Hormone (TRH) の肝血流に対する効果
第31回日本肝臓学会総会、平成7年7月22日
- 米田 政志、横浜 吏郎、田森 啓介、他
迷走神経運動核 (DMN) における Neuropeptide Y による胆汁分泌制御作用について
第32回日本胆道学会総会、平成8年4月20日
- 横浜 吏郎、米田 政志、田森 啓介、他
中枢性 Thyrotropine-Releasing Hormone (TRH) の肝サイクリックAMP合成に及ぼす作用について
第32回日本肝臓学会総会、平成8年4月20日
- 田森 啓介、米田 政志、横浜 吏郎、他
中枢性 Thyrotropine-Releasing Hormone の肝血流増加作用における Calcitonin-gene related peptide及びCapsacin感受性神経の関与
第32回日本肝臓学会総会、平成8年4月20日
- 佐藤 洋一、米田 政志、横浜 吏郎、他
四塩化炭素肝障害に対する中枢性神経ペプチドによる効果と作用機序について
第32回日本肝臓学会総会、平成8年4月20日
- 米田政志、横浜吏郎、田森啓介、他
中枢性 ソマトスタチン誘発胃酸分泌調節機能における脳内作用部位の検討
第38回日本消化器病学会大会、平成8年9月23日

- 横浜吏郎、米田政志、田森啓介、他
四塩化炭素(CCl4)急性肝障害に対する中枢性Corticotropin-Releasing Factor(CRF)の作用
第38回日本消化器病学会大会、平成8年9月23日
- 米田 政志、横浜 吏郎、田森 啓介、他
脳内 Neuropeptide Y (NPY) の胆汁分泌に及ぼす影響
第49回日本自律神経学会総会、平成8年10月25日
- 田森 啓介、米田 政志、横浜 吏郎、他
中枢性 Thyrotropine-Releasing Hormone (TRH) の肝血流に及ぼす効果
第49回日本自律神経学会総会、平成8年10月25日
- 佐藤 洋一、米田 政志、横浜 吏郎、他
中枢性 Thyrotropine-Releasing Hormone のラット実験肝障害に対する作用
第49回日本自律神経学会総会、平成8年10月25日
- 横浜 吏郎、米田 政志、田森 啓介、他
中枢性Corticotropin-Releasing Factor (CRF) のラット実験肝障害に対する作用
第49回日本自律神経学会総会、平成8年10月25日

(3) 出版物

- Yoneda M, Tamori K, Sato Y, et al.
Central regulation of hepatic function by neuropeptides. In Liver Innervation, John Libbey Co., 1996年
- 米田政志、牧野 勲
グリココール酸 (CG)、広範囲 血液・尿化学検査 (下巻)、日本臨床社、平成7年

● 研究 成 果

1) 中枢性神経ペプチドの肝増殖機能に及ぼす効果の研究

古典的神経伝達物質であるアセチルコリンやアドレナリンに加え、近年、新しい神経伝達物質あるいは神経修飾物質として、神経ペプチドが注目されており、種々の神経ペプチドが、脳内において神経伝達物質として作用し、自律神経系経路で呼吸・循環系および消化管における生理機能の調節や病態に重要な役割を果たしていることが明らかにされている。なかでも、内分泌ホルモンとして視床下部で同定されたThyrotropine Releasing Hormone (TRH)は、延髄の迷走神経運動核にて神経伝達物質として働き、胃生理機能に対して促進的に作用することが明らかにされている。一方、肝臓も自律神経が密に分布しているが、神経ペプチドによる肝生理機能の中枢性作用については、何も明らかにされていない。そこで、中枢性TRHの肝増殖に対する作用について検討した。ウイスター系雄性ラットをエーテル麻酔下で定位脳手術装置に固定の上、TRH安定型アナログのRX77368およびコントロールとして生理食塩水を脳槽内に投与し、6 - 72時間後に³H-thymidine (20 μ Ci/100 g)を腹腔内投与して、更に2時間後に屠殺して肝臓を取り出した。肝をホモジュネートした後、³H-thymidine肝DNAへの取り込みをSchneiderの方法に従って検討した。TRH (10 ng) の脳槽内投与により、24時間にピークを持つ³H-thymidineの肝DNAへの取り込みが認められた(図1)。中枢性TRHの肝増殖刺激作用は、1 - 10 ngで用量依存性であった(図2)。中枢性TRHの肝増殖刺激作用は、アトロピン、インドメサシンおよび迷走神経切断術により消失したが、L-NAMEは影響を及ぼさなかった。

2) 中枢性ペプチドの肝血流量に及ぼす効果とそのメカニズムの研究

中枢性神経ペプチドの肝生理機能に及ぼす役割について検討するために、TRHの中枢内投与の肝微小循環に対する効果を検討している。ウイスター系雄性ラットを18時間の絶食の後、ウレタン麻酔下で定位脳手術装置に固定のうえ開腹し、肝左外側葉に白金電極を刺入、腹腔内に不関電極を固定した。60分間の安定化状態の後、肝血流量の基礎値を2回測定しTRHの安定型アナログであるRX77368およびコントロールとして生理食塩水を脳槽内に投与した。肝血流量は、TRHの投与後90分まで観察した。TRHアナログ(10 ng)の脳槽内投与により、15分後より有意な肝血流量の増加が観察され、30分にて頂値をとり、60分には基礎値に復した(図3、Mean \pm SE; 基礎値に対する変化率:(%) 15分 136 ± 7 ; 30分 142 ± 6 ; 45分 117 ± 11 ; 60分 106 ± 18 ; 75分 115 ± 14 ; 90分 101 ± 15)。中枢性TRHの肝血流増加作用は、10~100 ngの間で容量依存性であった(図4、Mean \pm SE; 最大増加率(%); 生理食塩水 104 ± 12 ; 5 ng 117 ± 7 ; 10 ng 147 ± 2 ; 100 ng 174 ± 24 ; 500 ng 155 ± 12)。中枢性TRHの肝血流増加作用は、アトロピン、インドメサシン、L-NAMEの前投与及び迷走神経切断術により消失した。TRHの静脈内投与では、肝血流に何ら影響を及ぼさなかった。

一方、Calcitonin-gene related peptide (CGRP) 及びCapsacin感受性神経が、消化管において粘膜血流に重要な役割を果たしており、肝臓にもCGRP染色性神経が多数分布していることが明らかにされている。そこで、中枢性TRHの肝血流増加作用におけるCGRP及びCapsacin感受性神経の関与を検討した。

ウレタン麻酔下のウイスター系雄性ラットにCGRPのアンタゴニストであるhCGRP8-37 (15 μ g/kg+ 3 μ g/kg/h)を投与して、中枢性TRHによる肝血流増加作用に対する作用を検討した。その結果、hCGRP8-37非投与ラットではTRHの脳槽内投与により投与後15分を頂値に60分まで有意な肝血流増加作用が認められたがhCGRP8-37投与ラットではTRHの脳槽内投与による肝血流増加作用は認められなかった。

つぎに、Capsacin (125 mg/kg, sc) にてラットを前処置し、14日後に求心性神経が脱神経されたことを確認した上で、実験1と同様な方法でTRHの脳槽内投与における肝血流の変化を観察した。Capsacin非処置ラットでは、TRHの脳槽内投与により肝血流の有意な増加作用が認められたが、Capsacin処置ラットにおいては肝血流増加作用は認められなかった。

3) 中枢性神経ペプチドの実験肝障害に対する効果の研究

中枢性TRHの四塩化炭素誘発急性肝障害に対する効果と作用機序について検討した。ウィスター系雄性ラットをエーテル麻酔下で定位脳手術装置に固定し、TRHアナログのRX77368及びコントロールとして生理食塩水を脳槽内に投与し、60分後に四塩化炭素 2.0 ml/kg を皮下注、24時間後に屠殺、肝病理組織の検討とともに肝逸脱酵素活性を測定した。コントロールラット群では、四塩化炭素投与24時間後のALTが、 325 ± 17 IU/l まで上昇したのに対し、TRHアナログ1 ng, 3 ng, 5 ng, 10 ng の脳槽内投与により 293 ± 17 IU/l, 152 ± 19 IU/l, 130 ± 30 IU/l, 134 ± 31 IU/l と用量依存性にALTの上昇を抑制した。また、この中枢性TRHの四塩化炭素誘発肝障害に対する防御作用は、アトロピン・インドメサシン・迷走神経切断術前処置によって消失したが、L-NAME・6-OHDAの前処置では影響を及ぼさなかった。

つぎに、中枢性神経ペプチドの一つとして知られているCRFが、実験肝障害に与える影響について検討した。ウィスター系雄性ラットを12時間絶食とした後エーテル麻酔下で肝障害作成の為に四塩化炭素2.0 ml/kg を皮下注射した。四塩化炭素投与直後及び6時間後にラットを定位脳手術装置に固定の上、CRF及びコントロールとして生理食塩水を脳槽内に投与した。24時間後にラットを屠殺し、心腔穿刺による採血及び肝組織を採取、肝障害の程度を血中逸脱酵素活性と肝組織にて検討した。その結果、生理食塩水脳槽内投与ラットでは四塩化炭素皮下注射による24時間後のALT値は、 26 ± 6 IU/l と軽度上昇にとどまったが、CRF 0.5 μ g、1 μ g、3 μ g、5 μ g、10 μ g、20 μ g の脳槽内投与によりALT値は、それぞれ 38 ± 12 IU/l、 56 ± 15 IU/l、 92 ± 34 IU/l、 120 ± 32 IU/l、 139 ± 39 IU/l、 135 ± 56 IU/l と上昇した。

4) 中枢性ペプチドの肝内メディエーターに対する効果の研究

中枢性ペプチドが肝臓内のmediator (特にサイクリックAMP) に及ぼす効果の検討を直接測定により試みた。ウィスター系雄性ラットをエーテル麻酔下で定位脳手術装置に固定の上、TRH安定型アナログのRX77368およびコントロールとして生理食塩水を脳槽内に投与し、1-72時間後に屠殺、肝組織を取り出し、homogenateして各種肝臓内サイクリックAMPをRIA法で測定した。TRHアナログ 100 ng 脳槽内投与により、投与後12時間をピークとして肝臓内cAMP含有量の増加が観察された(図5)。

図1 TRHの肝増殖能に及ぼす効果（時間経過）

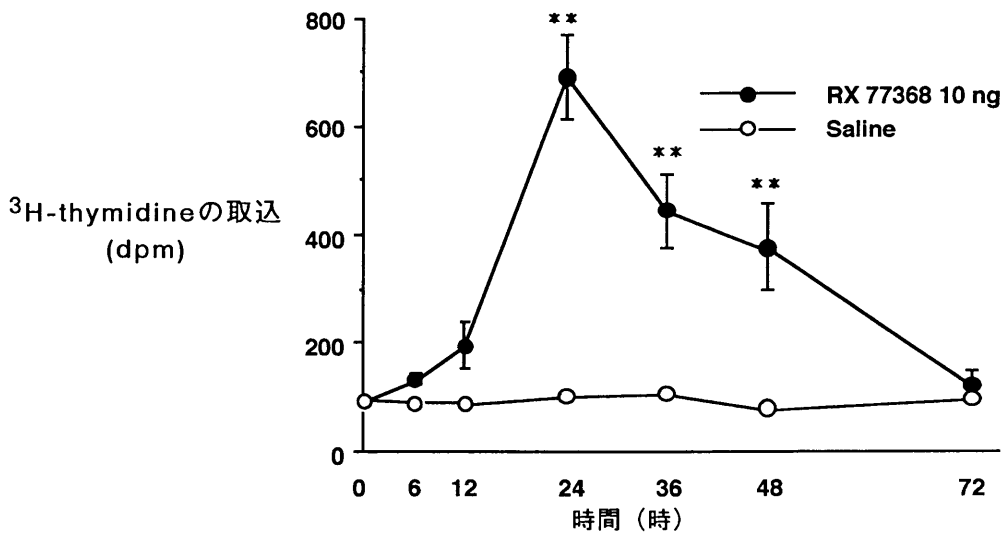


図2 TRHの肝増殖能に及ぼす効果（用量依存性）

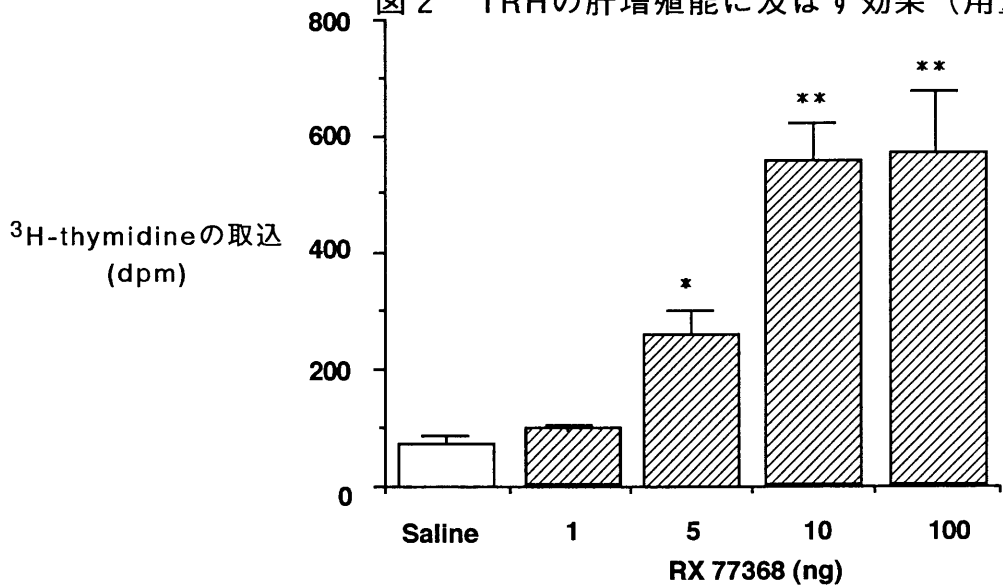


図3 TRHの肝血流に及ぼす効果（時間経過）

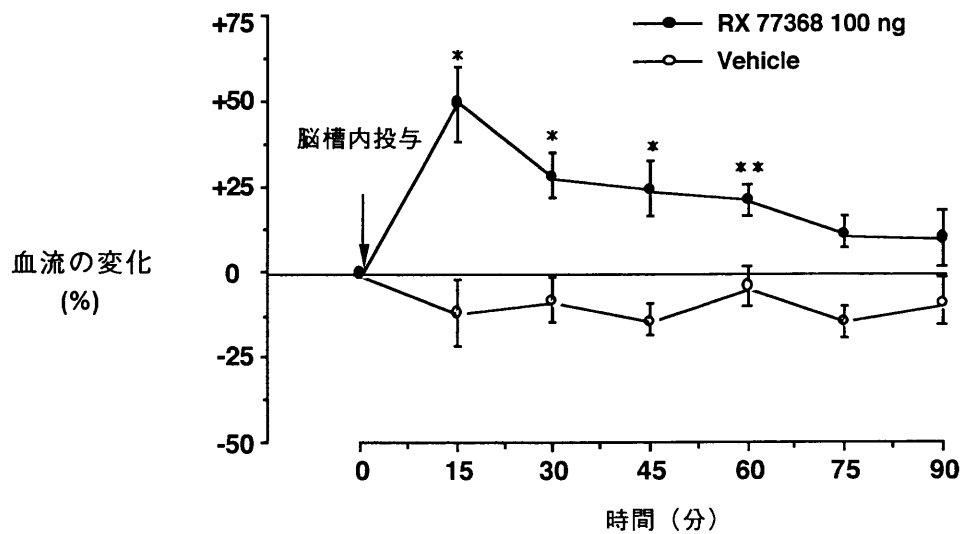


図4 TRHの肝血流に及ぼす効果（用量依存性）

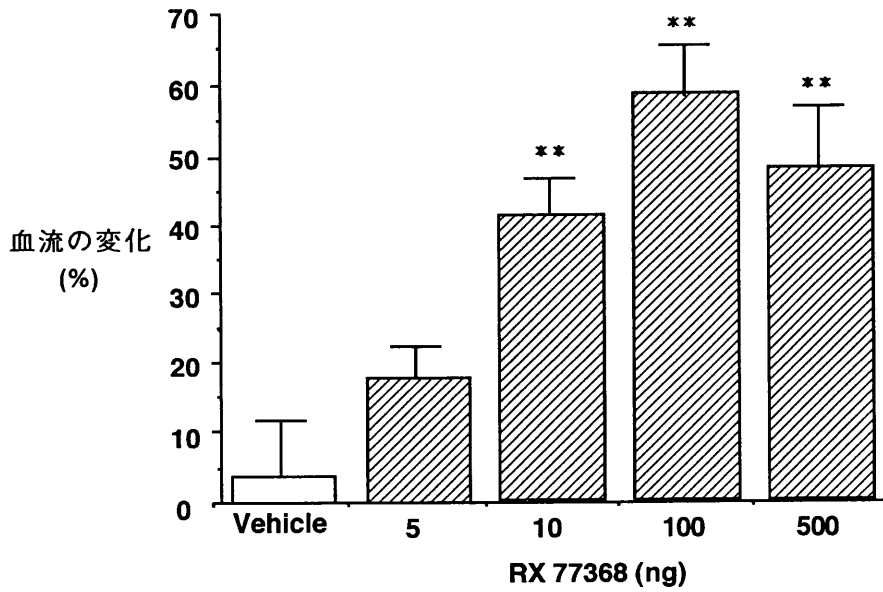


図5 TRHの肝cAMP合成に及ぼす効果（時間経過）

