

ラット結腸運動に対する鍼通電刺激の影響

† 前原伸二郎

明治鍼灸大学大学院 鍼灸臨床医学

要旨：本研究は結腸運動に対する鍼通電刺激 (Electro Acupuncture:EA) の影響、及びその作用機序を明らかにする目的で行われた。まず、EAが結腸の電気活動に及ぼす影響を検討するために、3Hz、15Hz、および100Hzの後肢へのEA前後にラットの結腸に縫着した電極より電気活動を記録した。その結果、3Hz、15HzのEAでは結腸運動に影響がないが、100HzのEAによって結腸運動が亢進することが判った。次に、この100HzのEAによる結腸運動亢進反応に中枢のCCKが関与しているか否かを検討するために、CCK-A受容体拮抗薬 (CR-1505)、あるいはCCK-B受容体拮抗薬 (L365,260) の脳室内投与を行った後に100HzのEAを行い、生理食塩水投与群と比較した。その結果、L365,260の投与においては生理食塩水投与時と同様の亢進反応を示したが、CR-1505の投与では結腸運動亢進反応が全く観察されなかった。すなわち、CCK-A受容体拮抗薬によってEAの効果が拮抗され、EAの効果にはCCK-A受容体が関与していることが示唆された。最後に3Hzおよび100HzのEA後の脳脊髄液中のCCK濃度を検討した結果、100HzのEA30分後にCCK濃度が有意に増加することが確認された。

以上の結果より、100HzのEAにより脳脊髄液中に放出されたCCKが、中枢のCCK-A受容体を介して結腸運動を亢進させることが示唆された。

I. はじめに

従来より鍼灸療法は運動器疾患や疼痛疾患のみならず、消化器疾患に対しても効果があることが経験的に知られ、広く臨床応用されている。また、最近では代表的な消化器疾患である non-ulcer dyspepsia (NUD)、過敏性腸症候群 (irritable bowel syndrome:IBS) などに対する鍼灸療法の作用機序を解明する研究が数多く行われてきている^{1,2)}。我々の教室でも、これまでにイレウスや術後腸管麻痺などの腸管運動異常に対して鍼灸治療を行い、その臨床効果について評価する³⁾とともに、健常成人ボランティアの腸管運動に対して鍼刺激を行い、刺激後に腸管運動が促進される結果を得てきた⁴⁾。同時に、その作用機序を明らかにする目的でラットを用いた動物実験を行ってきた。ラット小腸にstrain gaugeを縫着し、小腸の空腹期運動に対する鍼通電刺激 (Electro Acupuncture:EA) の効果を検討した結果、EAが小腸運動を亢進させることを明らかにした⁵⁾。またラットの直腸を拡張させ、その時に発生する結腸運動抑制反応をEAが拮抗することを確認し

た⁶⁾。この直腸拡張刺激により引き起こされる結腸運動の抑制には、EAがコレシストキニン (CCK) を介して結腸運動に作用している可能性が示唆された。CCKは消化管ホルモンの一種で、腸管運動の亢進、胆嚢の収縮や摂食中枢に関与する脳腸ペプチドである。近年、視床などの中枢レベルにおけるCCKがEAによって増加すること⁷⁾や、EAが鎮痛系を賦活させる際に、CCKが関与することが報告されている^{8,9)}。これらのことよりEAが中枢レベルでCCKを増加させ、結腸運動に作用することが推測される。

そこで本研究では、ラット結腸に電極を縫着して、LSB (long spike bursts) と呼ばれる電気活動を記録し、このLSBを結腸運動の指標として実験を行った。まず実験1として結腸運動に対するEAの刺激頻度の違いについて検討した。次に実験2では、2種類のCCK受容体 (CCK-A, CCK-B受容体) の拮抗薬を脳室内に投与して、結腸運動に対するEAの効果にCCK受容体が関与しているか否かを検討した。最後に実験3として、EAによって中枢のCCKレベルが変動するかどうかを

平成14年10月31日受付、平成15年1月14日受理

Key Words：結腸運動 colonic motility, 鍼通電刺激 Electro Acupuncture, CCK cholecystokinin, LSB Long Spike Bursts, CCK-A 受容体 CCK-A receptor

† 連絡先：〒629-0392 京都府船井郡日吉町保野田ヒノ谷6 明治鍼灸大学 大学院 鍼灸臨床医学
Tel.0771-72-1181 Fax.0771-72-0394 E-mail: s_maehara@muom.meiji-u.ac.jp

確認するために、EA前後の脳脊髄液中のCCK濃度の定量を行った。

II. 実験材料および方法

実験動物は、Wistar系雄性ラット（体重250～350g）を用いた。ラットは個別にプラスチック製のケージ内で飼育し、一定の環境（室温：22±1℃，湿度：50±5%，明暗周期：AM7:00からPM7:00，PM7:00からAM7:00の12時間毎）で少なくとも一週間以上飼育した後に実験に供した。その間の飲水，および食事摂取（実験動物用固形飼料MF：オリエンタル酵母工業）は，自由に行えるようにした。なお，本実験は本学研究倫理委員会の承認を得て行った。

1. 結腸への電極の縫着

結腸の電気活動を記録するために結腸漿膜面に電極を縫着した。電極は，シリコンコーティングされたワイヤー電極（直径0.3mm，長さ20cm）を2本1組とし，それぞれの電極の先端のコーティング部分を約3cm剥離して使用した。縫着手術は18時間以上の絶食後に行った。diethyl ether（和光純薬工業）にて吸入麻酔後，pentobarbital sodium（ネンブタール：大日本製薬）30mg/kgを腹腔内投与して麻酔した。同時に消化管運動の抑制を目的にatropine sulfate（硫酸アトロピン注射液：田辺製薬）0.5mg/kgを腹腔内投与した。腹部を正中切開し，回盲接合部より肛門側へ3cmの結腸漿膜面に23Gの注射針（テルモ）を外套針として電極を通し，6-0のナイロン糸（ケイセイ医科）を用いて，Ruckebuschら⁹⁾の方法に従い，2本の電極間が2mmになるように固定した。電極を腹部皮下を通し，後頸部に導出し固定した後，腹部を縫合閉腹した。また，術後1日目は水分摂取のみとし，2日目より食事摂取を開始した。

2. 結腸のLSB (long spike bursts) 測定

結腸のLSB測定は電極縫着手術後5日目より行った。前日より糞食を防止するために底に金網を敷いたケージ内にラットを移し，18時間以上絶食した。pentobarbital sodium (15mg/kg) を腹腔内投与して麻酔し，結腸に縫着した電極からの電気信号をbioelectric amp（日本電気）に取り込み，A/D converterであるMacLab (AD instruments)

を介してコンピューターに取り込んだ。その取り込んだ電気信号を解析ソフト (mac chart ver3.6) にて解析した。なお，測定条件はtime constant 0.3sec, high cut filter 1kHzにて行った。

実験1. 結腸運動に対する鍼通電刺激の影響

実験1では結腸運動に鍼通電刺激が影響を与えるのかを，通電頻度を変えて検討した。実験動物を3Hz EA群 (n=8)，15Hz EA群 (n=10)，100Hz EA群 (n=10) の3群に分けた。

1. 刺激方法および刺激部位

鍼通電刺激は直径0.2mm，鍼体長40mmのステンレス製ディスポーザブル鍼（セイリン化成）を用い，ラット両側後肢の前脛骨筋部に約10mmまで刺入し，電気刺激装置（DSP-1300D：Dia medical system CO.）を用いて30分間行った。通電条件としては，脳脊髄液中のCCK濃度が鍼通電刺激によって増加したというZhouら¹⁰⁾の方法に従い，単方向矩形波でパルス幅は0.1msec，通電頻度は3，15，100Hzの3種類とし，刺激時間は30分間，刺激強度は10分間毎に1mAから3mAまで1mAずつ，漸次増加させた。

2. 実験行程

ラットを麻酔後，刺激前値としてLSBを30分間記録した。その直後に，EAを30分間行い，刺激終了後も同様に刺激後値として60分間測定した。なお，LSBの評価には，刺激前30分間，及び刺激後60分間のLSBの出現頻度を各々5分間毎にカウントした平均値を用いた。

3. 統計処理

統計処理には，SPSS for windows ver 11.0 (SPSS Japan) を用いて，3Hz通電群，15Hz通電群，100Hz通電群の3群の比較を，二元配置分散分析を行った後にpost-hoc比較としてtukey検定を行った。なお，すべてのデータは平均値±標準偏差 (MEAN±SD) で表した。有意水準は，すべて5%とした。

実験2. 結腸運動に対する鍼通電刺激効果へのCCK受容体拮抗薬の脳室内投与の影響

実験2では結腸運動に対する鍼通電刺激の効果

に、中枢のCCKが関与しているかを検討するためにCCK受容体拮抗薬を用い、生理食塩水投与と比較した。実験動物を、生理食塩水投与群 (n=10)、CCK-A受容体拮抗薬投与群 (n=10)、CCK-B受容体拮抗薬投与群 (n=8) の3群に分けた。

1. 脳室内投与用カニューレ (シングルチャンネル・カニューレシステム : Plastics one INC.) の埋め込み

ラットをpentobarbital sodium (50mg/kg)にて麻酔し、脳定位固定装置 (ナリシゲ) に固定した。頭部の皮膚を正中切開し、bregmaよりcaudal 0.8mm, lateral 1.3mm, ventral 2.5-3.5 mmの位置の頭蓋骨に、歯科用ドリル (カーポイントHP45) で穴をあけ、ガイドカニューレ (C313G : Plastics one INC.) を挿入した。アンカー用のネジを嗅球の上に1箇所、ラムダの前部に1箇所の計2箇所に埋め込み、デンタルセメント (ケタック : Espe) を用いてアンカー用のネジを覆うようにガイドカニューレを固定した後、皮膚を縫合した。ガイドカニューレは脳室内投与実験までダミーカニューレ (C313DC : Plastics one INC.) にて保護した。なお、埋め込み終了後の2日間は、動物用抗生物質 (オキシテラシン : デンカ製薬) を投与した。

2. 結腸への電極の縫着

結腸への電極の縫着は、脳室内投与用カニューレの埋め込み終了後一週間以上たってから行った。縫着方法は実験1と同様である。

3. CCK受容体拮抗薬

本実験では2種類のCCK受容体拮抗薬を使用した。CCK-A受容体拮抗薬としてCR-1505 (科研製薬より供与) を用いた。CR-1505をNaOH溶液 (和光純薬) にて溶解し、HCl溶液 (和光純薬) でpH8.0に戻した後に生理食塩水 (大塚製薬) にて適量を作成し、約2週間で全量使用した。また、CCK-B受容体拮抗薬としてL365,260 (塩野義製薬石原氏より供与) を用いた。L365,260をdimethyl sulfoxide (和光純薬) にて溶解した後に生理食塩水にて適量を作成し、約2週間で全量使用した。

4. 脳室内投与方法

脳室内投与実験は埋め込み手術終了一週間後より行った。実験前に生理食塩水5 μ lにCCK-A受容体拮抗薬、およびCCK-B受容体拮抗薬を5 μ g溶解した。次に投与薬品を注入したマイクロシリンジ (1701RN : Hamilton) とインターナルカニューレ (C313I : Plastics one INC.) をコネクタチューブ (C313C : Plastics one INC.) にて接続し、インターナルカニューレをラット頭部に固定されているガイドカニューレ内に挿入し、シリンジポンプ (MODEL11 : Harvard) を用いて5 μ l/10minの速度にて投与した。なお、CCK受容体拮抗薬の投与量、及び投与速度はMembrillaら¹¹⁾の方法に従った。また実験終了後、ガイドカニューレが側脳室に留置されていることを脳切片を作成して確認した。

5. 実験行程

ラットを麻酔後、刺激前値として30分間のLSBを測定し、その直後に生理食塩水または、CCK受容体拮抗薬の脳室内投与を10分間かけて行い、15分間放置した。次いで30分間の鍼通電刺激を行い、刺激後も60分間のLSBを記録した。なお、刺激部位、及び刺激方法は実験1と同様であるが、通電頻度は100Hzのみとした。

6. 統計処理

統計処理には、SPSS for windows ver 11.0 (SPSS Japan) を用いて、生理食塩水投与群、CCK-A受容体拮抗薬投与群、CCK-B受容体拮抗薬投与群の3群の比較を、二元配置分散分析を行った後に、post-hoc比較としてtukey検定を行った。なお、すべてのデータは平均値 \pm 標準偏差 (MEAN \pm SD) で表した。有意水準はすべて5%とした。

実験3. 脳脊髄液中のCCK濃度の定量

実験3では脳脊髄液中のCCK濃度に鍼通電刺激が影響を与えるのかを、通電頻度を変えて検討した。実験動物をコントロール群 (n=4)、EA30分後群 (n=4)、EA60分後群 (n=4) の3群に分けた。

1. 脊髄液の採取方法

ラットをpentobarbital sodium (50mg/kg)にて麻酔し、頭部を固定した。体温維持装置

(MK-900：室町機械)にて体温を37.5℃に保ちながら後頸部を切開し、頭骨と第一頸椎の間の髄液腔を露出させた。その部位にポリエチレンチューブ (PE10：日本ベクトン・ディッキンソン) を挿入し脳脊髄液を採取した。なお、採取した脳脊髄液は直ちに-20℃で凍結保存した。

2. CCK濃度の測定方法

測定にはラットのCCKとの交叉性を有するヒトCCK測定RIAキット (RB 302：Euro-diagnostica) を使用した。この測定キットは2抗体法を用いているので、その行程として以下の手順で測定を行った。まず、採取した脳脊髄液サンプル (200 μ l) にその第1抗体となる一定量のCCK-8抗体 (500 μ l) を添加し、サンプル中のCCKとこの第1抗体を反応させるために、2-8℃で、2日間 (44-50時間) インキュベートした。その後、サンプル中の過剰のCCK抗体と¹²⁵Iを結合させた一定量のCCK-8 (500 μ l) を結合させるために、2-8℃で、更に4日間 (92-100時間) インキュベートした。最後に抗体が結合したCCKが固相化し、沈殿させるためにセルロースが結合したCCK-8抗体に対する抗体 (第2抗体：100 μ l) を加えて、2-8℃で30-60分間、インキュベートした後に4℃、1700g、15分間冷却遠心し、上澄みを分離した。その後、沈殿物の放射能を γ カウンター (ARC-605：Aloka) にて計測した。CCK濃度定量には、キットに付属している標準試料の希釈系列によって解析された標準曲線を作成し、これを用いて沈殿物中の放射

能よりサンプル中のCCK量を算出した。なお、全てのサンプル測定はデュプリケートにて行った。

3. 実験行程

非通電群は麻酔後に脳脊髄液を採取した。EA 30分後群は実験1と同様の方法にてEAの30分後に脳脊髄液を採取し、EA60分後群はEAの60分後に脳脊髄液を採取した。なお、刺激部位および刺激方法は実験1と同様であるが、通電頻度は3Hz、及び100Hzとした。

4. 統計処理

統計処理には、SPSS for windows ver 11.0 (SPSS Japan) を用いて、一元配置分散分析を行った後、post-hoc比較としてscheffe検定を行い、コントロール値との対比を行った。なお、すべてのデータは平均値 \pm 標準偏差 (MEAN \pm SD) で表した。有意水準は、すべて5%とした。

Ⅲ. 結果

実験1. 結腸運動に対する鍼通電刺激の影響 —通電頻度の違いによるの検討—

図1はEA前後におけるLSBの原波形を示し、通電頻度の違いの影響を比較したものである。EA前には5分間に約3~4回のLSBが周期的に観察された。EA後には100Hz鍼通電刺激によって5分間に約5~6回とLSB頻度が増加したが、3Hz、15Hzでは変化がなかった。また、波形の振幅をみるといずれも刺激前後では変化がみられなかった。

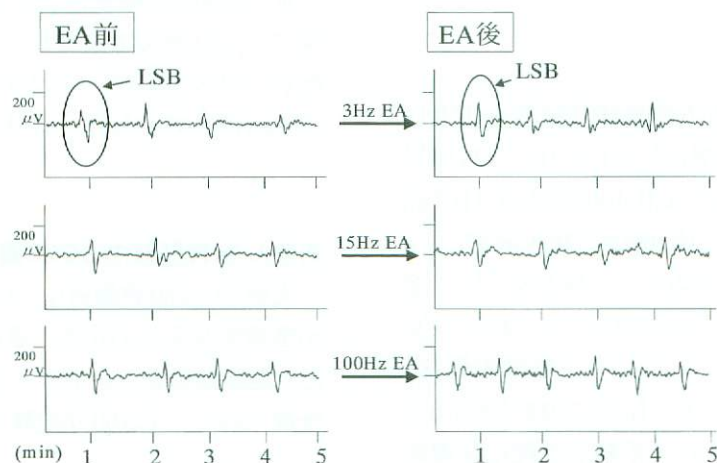


図1 EA前後における結腸LSB波の原波形

上段が3Hz EA, 中段が15Hz EA, 下段が100Hz EAの前後変化を示す。Time Intervalは、1分間とした。

図2は5分間のLSB出現頻度の平均値をEA後60分にわたり経時的に示したものであり、通電頻度の違いによる影響を比較したものである。EA前にはいずれも5分間のLSB出現頻度は約3~4回で経過していた。しかし、EA後には100Hz EA群において約5回前後に増加したが、3Hz、15Hz EA群では変化が認められなかった。

表1は5分間のLSB出現頻度の平均値をEA前後で30分間毎にまとめて示したものである。3Hz EA群ではEA前が平均3.6±1.1回/5min、EA後でも平均3.7±1.1回/5min、3.8±1.3回/5minと変化がみられなかった。同様に15Hz EA群ではEA前が平均3.9±0.8回/5min、EA後でも平均4.3±1.2回/5min、4.3±1.3回/5minと変化がみられなかつ

た。しかし、100Hz EA群ではEA前が平均3.6±0.9回/5minであったのに対し、EA後では平均4.8±1.1回/5min、5.0±0.9回/5minと有意な増加を認めた (P<0.05)。

以上の結果より、100HzのEAによって LSBは増加するが、3Hz、15HzではLSBの増加傾向を示すが有意ではなかった。

実験2. 結腸運動に対する鍼通電刺激効果への CCK受容体拮抗薬の脳室内投与の影響

図3は図2と同様に100HzEA時の5分間のLSB出現頻度の平均値を経時的に示したもので、EA前に脳室内に生理食塩水、CCK受容体拮抗薬であるCR-1505 (CCK-A受容体拮抗薬) あるいは、L36

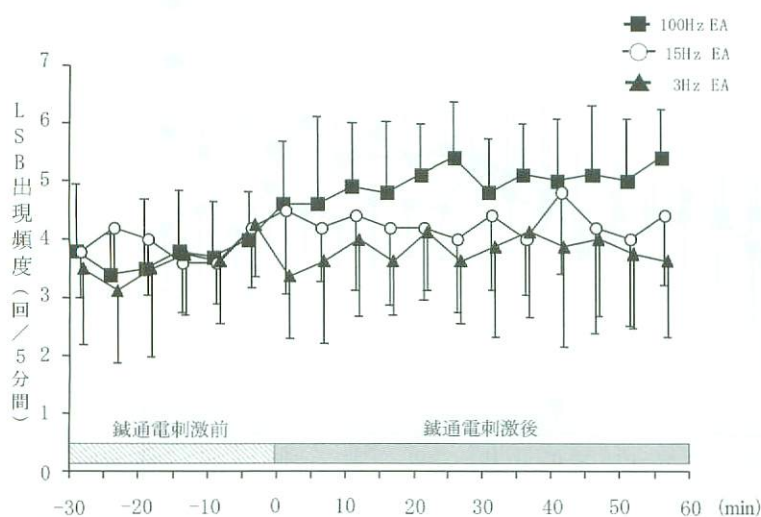


図2 通電頻度の違いによる5分間のLSB出現頻度のEA前後90分間の経時変化

■の折れ線グラフが100Hz EA群のもの、○の折れ線グラフが15Hz EA群のもの、また▲の折れ線グラフが3Hz EA群のものである。値はすべて平均値±標準偏差で示す。

表1 3Hz EA、15Hz EAおよび100HzのLSB出現頻度

上段からEA前、EA30分後、EA60分後のものを示す。値はすべて平均値±標準偏差で示す。

	3Hz EA (n=8)	15Hz EA (n=10)	100Hz EA (n=10)
EA前 30分間	3.6±1.1	3.9±0.8	3.6±0.9
EA後 0-30分間	3.7±1.1	4.3±1.2	4.8±1.1 †
EA後30-60分間	3.8±1.3	4.3±1.3	5.0±0.9 †

† vs 100Hz EA前30分間 [† P<0.05]

(LSBの出現頻度/5分間)

5,260 (CCK-B受容体拮抗薬) をそれぞれ投与した効果を比較したものである。生理食塩水及びCCK-B受容体拮抗薬であるL365,260を投与した場合は、100Hzの鍼通電刺激によってLSBの出現頻度が増加した。しかし、CCK-A受容体拮抗薬であるCR-1505を投与した場合にはLSBの増加は、ほとんど認められなかった。

表2は表1と同様に5分間のLSB出現頻度の平均値をEA前後で30分間毎にまとめて示したものである。生理食塩水投与群ではEA前が平均4.3±0.8回/5minであったのに対し、EA後には6.2±1.5回/5min、6.5±1.2回/5minと明らかな増加を示した(P<0.05)。また、CCK-B受容体拮抗薬であるL365,260を投与した場合はEA前が平均4.7±0.9回/

5minであったのに対し、EA後には6.0±1.0回/5min、6.4±0.6回/5minと生理食塩水投与時と同様に明らかな増加を示した(P<0.05)。しかし、CCK-A受容体拮抗薬であるCR-1505を投与した場合には、EA前が4.7±1.5回/5min、EA後も5.2±0.9回/5min、4.7±1.1回/5minと有意な変化がみられなかった。

以上より、100Hz EAによるLSB頻度の増加反応はCCK-B受容体拮抗薬では影響されなかったが、CCK-A受容体拮抗薬であるCR-1505投与により拮抗されることがわかった。すなわち結腸運動に対する鍼通電刺激の効果には、中枢に存在するCCK-A受容体が関与している事が示唆された。

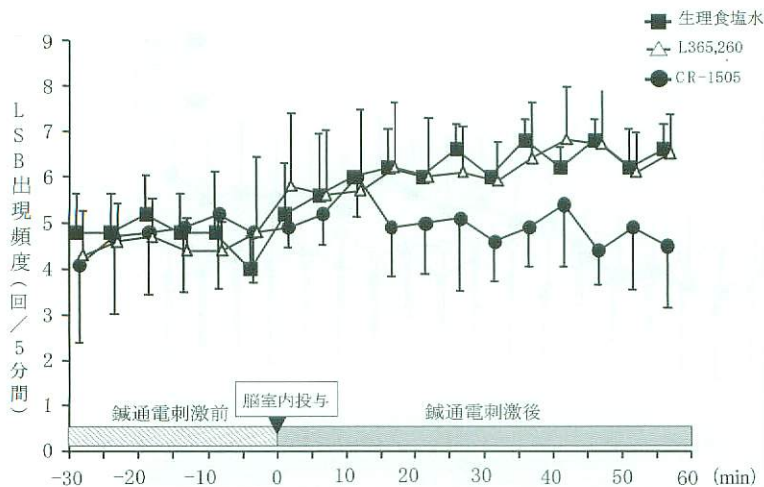


図3 生理食塩水とCCK受容体拮抗薬の脳室内投与後のEAに対するLSB出現頻度

●の折れ線グラフがCR-1505投与群のもの、△の折れ線グラフがL-365,260投与群のもの、また■の折れ線グラフが生理食塩水投与群のものである。値はすべて平均値±標準偏差で示す。

表2 生理食塩水あるいはCCK受容体拮抗薬を脳室内投与の100Hz EAに対する出現上段からEA前、EA30分後、EA60分後のものを示す。値はすべて平均値±標準偏差で示す

	生理食塩水 (n=10)	CCK受容体拮抗薬	
		CR-1505 (n=10)	L365,260 (n=8)
EA前 30分間	4.3±0.8	4.7±1.5	4.7±0.9
EA後 0-30分間	6.2±1.5 †	5.2±0.9	6.0±1.0 ††
EA後 30-60分間	6.5±1.2 †	4.7±1.1	6.4±0.6 ††

† vs EA前30分間 (生理食塩水) [† P<0.05] (LSBの出現頻度/5分間)

†† vs EA前30分間 (L365,260) [†† P<0.05]

表3は、3Hzおよび100HzのEAによる脳脊髄液中のCCK濃度変化
上段から非通電群、EA30分後、EA60分後のものを示す。値はすべて平均値±標準偏差で示す

	3Hz EA	100Hz EA
非通電群	1.31±0.2 (n=6)	1.52±0.3 (n=4)
EA30分後群	1.33±0.1 (n=4)	2.17±0.3 † (n=4)
EA60分後群	1.31±0.2 (n=6)	1.37±0.1 (n=4)

† vs 非通電群 (100Hz EA) [† P<0.05] (pmol/l)

実験3. 脳脊髄液中のCCK濃度の定量

表3は3Hzおよび100HzのEAによる脳脊髄液中のCCK濃度変化を非通電群と比較したものである。100HzのEAを行った群では、非通電群の平均値は1.5pmol/lであったのに対し、EA30分後群では2.1pmol/lと有意な増加を示した (P<0.05)。しかし、EA60分後群では1.3pmol/lとほとんど増加は認められなかった。一方、3HzのEAを行った群では、非通電群の平均値は1.3pmol/lであったのに対し、EA30分後群でも1.3pmol/lと増加を示さず、またEA60分後群でも1.3pmol/lと全く増加は認められなかった。

以上より、100HzのEAは明らかに脳脊髄液中のCCK濃度を増加させるが、3HzのEAでは全く増加しないことがわかった。また、100HzのEAによるCCK濃度の増加は、EA30分後には持続しているがEA60分後には消失していることもわかった。

IV. 考 察

近年、消化管運動、特にその調節機構やメカニズムに関する研究が急速に進歩してきている。これまでの多くの研究は自律神経に関するものであり、消化管運動が副交感神経により亢進的に、交感神経により抑制的に調節されていることは周知の事実である。しかし、この副交感神経の伝達物質であるアセチルコリンの受容体の選択的拮抗薬を投与しても消化管運動を完全に抑制できない¹²⁾ということなどから、消化管運動の調節機構に自律神経のみならず、何らかの液性因子が関与していることが考えられてきた。最近、その液性因子は脳や腸にも存在が確認され、脳腸相関性がある

脳腸ペプチドが関与しているとされる¹³⁻¹⁶⁾が、詳細についてはいまだ不明な点が多い。今後、消化管運動の調節機構に関する研究は、この脳腸ペプチドの作用機序の解明が中心になると思われる。一方、消化管運動に関する鍼灸の研究でも、従来の研究では、その作用機序に対して自律神経の関与を検討しているものが多く、液性因子について検討されているものはほとんどない。

そこで本研究では、結腸運動に対する鍼通電刺激の効果、およびその作用機序について脳腸ペプチドの代表的物質であるコレシストキニン (CCK) に着目し、種々の実験を行った。

結腸運動に対する鍼通電刺激の影響
-通電頻度の違いによる検討-

ラット結腸に埋め込んだ電極より、LSB (long spike bursts) と呼ばれる結腸の収縮に前駆して発生する電気活動を記録し、このLSBを指標に結腸運動に対する鍼通電刺激 (EA) の影響について検討した。これまでも消化管運動に対するEAの効果に関する研究が行われており、山口ら¹⁷⁾は胃運動に対するEAの効果を検討し、後肢への20HzのEAが胃運動を促進することを報告している。また、岩ら¹⁷⁾は小腸運動に対するEAの効果を検討し、後肢への100HzのEAが小腸運動を促進することを報告している。しかし、これらの報告は通電頻度を1種類だけに限定して行なわれており、EAの通電頻度の違いによる効果を検討した報告はこれまでにない。そこで通電頻度の違いによる効果をみる目的で、通電部位を後肢のみとし、通電頻度を3Hz、15Hz、100Hzの3種類に設定して実験を行った。刺激前値として30分間のL

SBを測定したがこの時の5分間に発生するLSBの出現頻度は平均約4回であった。この値はFioramontiら¹⁹⁾の10分間に発生するLSBが平均9.7回であったという報告とほぼ一致する。そして、3Hzおよび15HzのEA後ではLSBが増加しなかったが、100HzのEAでは明らかな増加反応が観察された。このことより、結腸運動には、低・中頻度のEAでは影響を及ぼさないが、高頻度では促進するという刺激頻度の違いによる差異が確認された。

鍼通電頻度の違いにより生じる効果の差異に関する研究は、鍼鎮痛の分野においても行われている。Zhouら¹⁰⁾はラットの後肢に2Hz、15Hzおよび100HzのEAを行うといずれも鍼鎮痛が生じるが、100HzのEAで生じた鍼鎮痛効果がCCK受容体拮抗薬の投与により増強することや、100HzのEAにより脳脊髄液中のCCK濃度も増加したが、2HzのEAでは脳脊髄液中のCCK濃度は増加しなかったと報告している。また一方、消化管運動に対するCCKの関与を検討した研究では、脳室内にCCKを投与すると空腸運動が亢進したというMonnikerら²⁰⁾の報告やCCKをラットの腹内側核に投与すると結腸運動が亢進したというLibergerら²¹⁾の報告がある。

これらの報告を考え合わせると、今回行った100Hzの高頻度のEAによって脳脊髄液中に放出されたCCKが、末梢を介さず、直接、中枢に作用して結腸運動を亢進させたのではないかと考えられる。また一方、3Hz、15Hzの低、中頻度のEAでは脳脊髄液中にCCKが放出されなかったために、結腸運動が亢進しなかったのではないかと考えられる。そこで次に、100HzのEAによるLSBの増加反応に中枢のCCKが関与していることを確認するために、CCK受容体拮抗薬の脳室内投与実験を行った。

結腸運動に対する鍼通電刺激効果へのCCK受容体拮抗薬の脳室内投与の影響

CCKの受容体には、CCK-A受容体とCCK-B受容体の2種類存在することが確認されている。これまでCCK-A受容体は胆嚢、膵臓、求心性迷走神経などの末梢に分布し、CCK-B受容体は脳内に偏在し、特に視床下部、辺縁系などの中枢に分布しているとされていた。しかし、近年の免疫組織化学の進歩によって中枢にもCCK-A受容体が存在することが確認された。そこで本実験では結腸

運動に対する後肢への100HzEA刺激効果に中枢のCCKが関与しているか否かを検討するだけでなく、いずれの受容体を介して作用しているかを検討するために2種類のCCK受容体拮抗薬を用いて、拮抗薬を脳室内投与した群と対照群として生理食塩水を脳室内投与した群とを比較検討した。EA前30分間中の5分間に発生するLSBは平均約5回であったが、生理食塩水を投与した後に100HzのEAを行った群ではEA後60分間中の5分間に発生するLSBの出現頻度が平均約7回と明らかな増加を示した。また、CCK-B受容体拮抗薬であるL365,260を投与してEAを行った群でも、生理食塩水を投与した群と同様にEA後に発生するLSBの出現頻度に明らかな増加が認められた。しかし、CCK-A受容体拮抗薬であるCR-1505を投与してEAを行った群では、EA後のLSBの出現頻度に全く影響を及ぼさなかった。以上のことより、100HzのEAによる結腸LSBの増加反応にはCCKが関与していること、さらにそのCCKは、これまで中枢に多く存在するといわれていたCCK-B受容体ではなく、中枢のCCK-A受容体を介した作用であることが示唆された。このことはCCK投与によって増加したラット小腸の空腹期強収縮運動 (Interdigestive myoelectric complex : IMC) がCCK-A受容体拮抗薬の脳室内投与によって抑制されたというMembrillaら²²⁾の報告とも一致すると思われる。そこで最後にEAによって中枢のCCKが増加しているか否かを確認するために、脳脊髄液中のCCK濃度を定量した。

脳脊髄液中のCCK濃度の定量

100HzのEAによる脳脊髄液中のCCK濃度の変化を検討した結果、非通電群と比較してEA30分後群ではCCK濃度が有意に増加したが、EA60分後群では増加が観察されなかった。また同様に3HzのEAによる変化を検討した結果、非通電群と比較してEA30分後群、EA60分後群ともに増加が観察されなかった。この結果より、100HzのEAによって脳脊髄液中のCCK濃度はEA後で明らかに増加しているが、3HzのEAでは増加しないことがわかった。すなわち、100HzのEAによる結腸運動の亢進反応に脳脊髄液中のCCKが明らかに関与していることがわかった。しかし、この結果には一つの疑問が生じる。それは100HzのEAによ

る脊髄液中のCCK濃度の増加がEA60分後には消失しているにもかかわらず、結腸運動がEA60分後にも亢進している点である。このことはEA60分後の結腸運動の亢進に中枢のCCK濃度の増加が関与していないことを示している。中枢でのCCK濃度の増加がトリガーとなり、結腸運動の亢進を誘発し、その後の結腸運動亢進には何らかの別の因子が関与しているのではないかと考えられる。結腸運動に対してCCKが亢進的に作用することは明らかであるが、その亢進作用にセロトニンやサブスタンスPなどが複雑に関与しているという報告²¹⁾や直腸拡張刺激による結腸運動抑制反応に対するCCKの亢進的作用にオピオイドの μ 受容体が関与しているという報告²⁴⁾などがあることより、100HzのEA中に増加したCCKがこれらの液性因子を介して結腸運動に作用している可能性を示唆される。また、EA中の30分間に脳脊髄液中のCCK濃度が最も顕著に増加し、EA30分後には増加は見られるものの徐々に減少傾向にあったというZhouらの報告¹⁰⁾などもあることから、今後EA中の脳脊髄液も定量する必要があると思われる。

以上のすべての結果を考え合わせると100HzのEAによって脳・脊髄レベルの中枢にCCKが放出され、このCCKが中枢に存在するCCK-A受容体に結合することによりLSBの増加反応が引き起こされることがわかった。また、LSBは結腸の収縮に前駆して出現することもわかっており、LSBの出現頻度が増加すれば結腸運動も亢進することになる。すなわち、本研究から鍼通電刺激によって脳脊髄液中に放出されたCCKが中枢のCCK-A受容体を介して結腸運動を亢進させることが示唆された。しかし、これら中枢レベルで放出されたCCKの消化管運動の調節機構メカニズムの詳細については、まだ不明な点が多く今後のさらなる研究課題である。

V. 結 語

本研究は結腸運動に対する鍼通電刺激の効果、およびその作用機序についてコレシストキニン(CCK)に着目し、種々の実験を行い、以下の事が示唆された。

1. 100Hzの鍼通電刺激により結腸運動が亢進したが、3Hz、15Hzの鍼通電刺激では結腸運動の亢進が観察されなかった。

2. 100Hzの鍼通電刺激による結腸運動の亢進反応に中枢内CCKの放出増加が関与していることが証明された。また、この反応に対するCCKの受容体は中枢のCCK-A受容体である。
3. 100Hzの鍼通電刺激により、刺激30分後に脊髄液中のCCK濃度が有意に増加することが証明された。
4. 100Hzの鍼通電刺激による結腸運動の亢進反応には、CCKのみならず内因性オピオイド・ペプチドなど他の液性因子が関与している可能性が考えられる。その点に関しては今後の検討課題である。

謝 辞

稿を終えるにあたり本研究の遂行に際し、終始御指導と御校閲を賜りました恩師明治鍼灸大学外科学教室咲田雅一教授に深甚なる謝意を表します。そして適切なる御教示を頂いた同健康鍼灸医学教室岩昌宏講師、同第三生理学教室川喜田健司教授に心から感謝の意を表します。

【引用文献】

- 1) Chan J, FRCS, Carr I, et al : The role of acupuncture in the treatment of irritable bowel syndrome: a pilot study. *Hepato-Gastroenterology*, 44 : 1328-1330, 1997.
- 2) Claus niederau, Stefan faber, Michael karasus : Cholecystokinin's role in regulation of colonic motility in health and irritable bowel syndrome. *Gastroenterology*, 102 : 1889-1898, 1992.
- 3) 岩 昌宏, 工藤大作, 渡辺勝之ら : イレウス患者に対する鍼灸治療. *明治鍼灸大学*, 5 : 89-94, 1989.
- 4) 岩 昌宏, 石丸圭荘, 篠原昭二ら : ヒト腸蠕動に及ぼす鍼灸刺激の効果 (第2報). *明治鍼灸大学*, 8 : 35-41, 1991.
- 5) 岩 昌宏 : 腸管運動に対する鍼・灸刺激の影響に関する実験的研究. *明治鍼灸大学*, 24 : 33-43, 1999.
- 6) 前原伸二郎, 岩 昌宏, 咲田雅一 : 直腸拡張刺激によるラットの結腸運動抑制に対する鍼通電刺激の影響. *明治鍼灸大学*, 26 : 23-32, 2000.
- 7) Xu M, Aiuchi T, Nakaya K : Effect of low-frequency electric stimulation on in vivo release of cholecystokinin-like immunoreactivity in medial thalamus of conscious rat. *Neurosci Lett*, 118(2) : 205-7, 1990.
- 8) Zhang LX, Li XL, Wang L, Han JS : Rats with decreased brain cholecystokinin levels show increased responsiveness to peripheral electrical stimulation-induced analgesia.

- Brain Res, 745(1-2): 158-64, 1997.
- 9) Chen XH, Geller EB, Adler MW : CCK(B) receptors in the periaqueductal grey are involved in electroacupuncture antinociception in the rat cold water tail-flick test. *Neuropharmacology*, 37(6) : 751-7, 1998.
 - 9) Ruckebusch Y : The electrical activity of the digestive tract of the sheep as an indication of the mechanical events in various regions. *Journal of Physiology*, 210 : 857-882, 1970.
 - 10) Zhou Y, Sun Y-H, Shen J-M, et al : Increased release of immunoreactive CCK-8 by electroacupuncture and enhancement of electroacupuncture analgesia by CCK-B antagonist in rat spinal cord. *Neuropeptides*, 4 : 139-144, 1993.
 - 11) A Rodriguez-Membrilla, Vergara P : Endogenous CCK disrupts the MMC pattern via capsaicin-sensitive vagal afferent fibers in the rat. *Am J Physiol*, 272 : G100-G105, 1997.
 - 12) Hellstrom PM: Atropine and naloxone block the colonic contraction elicited by cholecystokinin and pentagastrin. *Acta Physiol Scand*, 124(1) : 25-33, 1985.
 - 13) Tache Y, Garrick T, Raybould H : Central nervous system action of peptides to influence gastrointestinal motor function. *Gastroenterology*, 98 : 517-528, 1990.
 - 14) Benouali-Pellissier S, Roger T, Roche M : A possible interaction between serotonin and cholecystokinin-8 in the ileo-colonic moter responses to feeding in rats. *Scand J Gastroenterol* , 29 : 138-143, 1994.
 - 15) Lewis LD, Williams JA : Regulation of cholecystokinin secretion by food, hormones, and neural pathways in the rat. *Am J Physiol*, 258 (4 Pt 1) : G512-8, 1990.
 - 16) Mangel AW : Potentiation of colonic contractility to cholecystokinin and other peptides. *Eur J Pharmacol*, 100 (3-4) : 285-9, 1984.
 - 17) 山口真二郎, 岡田 薫, 大沢秀雄ら : 麻酔ラットの胃運動に及ぼす鍼通電刺激の効果. *自律神経*, 33 : 39-45, 1996.
 - 18) 岩 昌宏, 今井賢治, 石丸圭荘ら : Strain Gauge Force Transducer 法を用いた意識下ラットの腸管運動に対する体性刺激の効果. *自律神経*, 36 : 422-429, 1999.
 - 19) Jean Fioramonti, Marie-Jose Fargeas, Viviane Bertrand, et al : Induction of postprandial intestinal motility and release of cholecystokinin by polyamines in rats. *Am J Physiol*. 267 : G960-G965, 1994.
 - 20) H Monnikes, J Tebbe, C Grote, et al : Involvement of CCK in the paraventricular nucleus of the hypothalamus in the CNS regulation of colonic motility. *Digestion* : 62,178-184, 2000
 - 21) Liberge M, Arruebo MP, Bueno L: Role of hypothalamic cholecystokinin octapeptide in the colonic motor response to a meal in rats. *Gastroenterology*, 100(2): 441-449, 1991.
 - 22) A.Rodriguez-Membrilla, Vergara P : Peripheral and central cholecystokinin receptors regulate postprandial intestinal motility in rat. *J pharmacol.exp ther*, 272 : 486-493, 1995.
 - 23) Wiley J, Owyang C : Participation of serotonin and substance P in the action of cholecystokinin on colonic motility. *Am J Physiol*, 252 (3 Pt 1) : G431-5, 1987.
 - 24) Gue Michele, Chantal Del Rio, Jean Louis Junien, et al : Interaction between CCK and opioids in the modulation of the rectocolonic inhibitory reflex in rats. *American Physiological Society*, 269 : G240-G245, 1995.

Effects of electroacupuncture on the colonic motility

†MAEHARA Shinjiro

Department of Surgery, Graduate School of Acupuncture and

Moxibustion, Meiji University of Oriental Medicine

Abstract

[Purpose]

To study the effects of the Electro Acupuncture (EA) on colonic motility in rats and the role of cholecystokinin (CCK) in regulating them, the participation of the central CCK receptors and the changes of CCK-immunoreactivities (ir) in cerebrospinal fluid (CSF) were investigated.

[Materials and Methods]

Male Wistar rats weighting between 250g and 350g were used. The rats were continuously fitted with electrodes implanted into the serosal surface of the proximal colon (3cm distal from the ileocolonic junction). Five days after electrode implantation, colonic motility was continuously recorded under physiological conditions. Two stainless steel needles were inserted into the muscle tibialis anterior of the bilateral hind limbs, and EA was applied for 30 minutes at a frequency of 3, 15 or 100Hz. During the first series of experiments, the effects of EA at different frequencies on the acceleration of colonic motility were examined. In the second series of experiments, to elucidate the subtype of CCK receptors involved in the regulation of colonic motility induced by EA, receptor antagonists (CCK-A : CR-1505, CCK-B : L-365,260) were administered by intracerebroventricular (i.c.v.) injection via a catheter implanted in the lateral ventricle. As the third series of experiments, the changes of CCK-ir in CSF in response to EA at 3 or 100Hz were analyzed by RIA.

[Result and Discussion]

In the first series of experiments, the long spike bursts (LSB) associated with colonic motility were recorded using myoelectrography. It was confirmed that the increase in the number of LSB was most marked in the response to EA at 100Hz, but there was no change in the response to EA at 3 or 15Hz. In the second series of experiments, it was found that the i.c.v. infusion of CR1505, a CCK-A receptor antagonist, blocked the EA at 100Hz-induced increase of LSB, whereas the i.c.v. infusion of vehicle or L365,260, a CCK-B receptor antagonist, did not block the response. In the third series of experiments, it was observed that the EA at 100Hz markedly increased CCK-ir in CSF, whereas EA at 3Hz did not induce such a response.

These findings strongly suggest that the application of EA at 100Hz induces a significant release of CCK in CSF, which accelerate the colonic motility through the activation of central CCK-A receptors.

Received on October 31, 2002 ; Accepted on January 14, 2003

†To whom correspondence should be addressed.

Meiji University of Oriental Medicine, Hiyoshi-cho, Funaigun, Kyoto 629-0392, Japan