

消化管および膀胱平滑筋に対する  
薬物の薬理学的研究

2009年

須藤 宏和

本学位論文は、以下の原著論文をもとに作成されたものである。

1. Mitemcinal (GM-611), an orally active motilin agonist, facilitates defecation in rabbits and dogs without causing loose stools. *Neurogastroenterol Motil.*, **19**: 318-26, 2007.
2. Oral administration of MA-2029, a novel selective and competitive motilin receptor antagonist, inhibits motilin-induced intestinal contractions and visceral pain in rabbits. *Eur J Pharmacol.*, **581**: 296-305, 2008.
3. Nicorandil, a potassium channel opener and nitric oxide donor, improves the frequent urination without changing the blood pressure in rats with partial bladder outlet obstruction. *Biol. Pharm. Bull.*, **31**: 2079-82, 2008.

## 目次

1. 第1部 モチリンアゴニスト mitemcinal のウサギ、イヌにおける排便促進効果.....	3
1.1. 要約.....	4
1.2. 序論.....	5
1.3. 実験材料および実験方法.....	6
1.4. 結果.....	9
1.5. 考察および結論.....	11
1.6. Figures and Tables.....	15
2. 第2部 新規選択的・競合的モチリン受容体アンタゴニスト MA-2029 のウサギ <i>in vitro</i> , <i>in vivo</i> 薬効評価系を用いた薬理学的研究.....	22
2.1. 要約.....	23
2.2. 序論.....	24
2.3. 実験材料および実験方法.....	26
2.4. 結果.....	31
2.5. 考察および結論.....	34
2.6. Figures and Tables.....	37
3. 第3部 $K_{ATP}$ チャンネル開口作用と NO 作用を有するニコランジルのラット尿道閉塞誘発頻尿に対する改善効果.....	49
3.1. 要約.....	50
3.2. 序論.....	51
3.3. 実験材料および実験方法.....	53
3.4. 結果.....	54
3.5. 考察および結論.....	55
3.6. Figures and Tables.....	57
4. 参考文献.....	61
謝辞.....	71

1. 第1部 モチリンアゴニスト **mitemcinal** のウサギ、イヌにおける排便促進効果

## 1.1. 要約

経口可能なモチリン受容体アゴニストであるエリスロマイシン誘導体 mitemcinal (GM-611)の排便促進効果をウサギおよびイヌを用いて検討した。正常ウサギで mitemcinal (2.5-10 mg/kg) は経口投与後 0-3 時間で下痢を示さずに用量依存的に排便量を増加させた。Sennoside もまた経口投与後 2-9 時間に排便を促進させたが、その糞便は下痢を示した。モルヒネ処置(1 mg/kg)により便秘を誘発したウサギで、mitemcinal (2.5-20 mg/kg)は糞中水分含有率を増加させずに、用量依存的に排便量を増加させた。正常イヌで mitemcinal (0.3-3 mg/kg)は下痢を起こさず、経口投与後から最初に排便するまでの時間を短縮させた。これらの結果は、mitemcinal が下痢を起こさずに排便を促進させていることを示している。Mitemcinal は sennoside に比べ、排便促進作用が経口投与後速やかに発現し、排便時間のコントロールがしやすい新しい便秘改善薬となる可能性が示唆された。

## 1.2. 序論

便秘は慢性的な消化管運動機能不全に最も共通する症状のひとつであり、QOL を著しく低下させる<sup>1,2</sup>。便秘の発生は過敏性腸症候群(irritable bowel syndrome ; IBS)のような機能的運動不全から疼痛緩和に用いるモルヒネのような薬物療法にまで及んでいる<sup>3,4</sup>。Sennoside などの下剤は便秘患者に広く処方されているが、それらのほとんどは作用発現が遅く、不意に便意を感じさせ排便時間のコントロールを難しくさせている<sup>5-7</sup>。また、これらの下剤は大腸からの水分分泌を増加させるため、下痢などの副作用を引き起こすことが多い<sup>5-7</sup>。それゆえ、便の形状を変えることなく生理的な排便を引き起こし、現在の緩下剤とは異なるメカニズムを有する、より作用発現の早い便秘改善薬が必要である。

モチリンは22個のアミノ酸からなるポリペプチドで、空腹期において上部消化管の伝播性収縮(MMC)を引き起こす消化管ホルモンである<sup>8</sup>。また、マクロライド系抗生物質のエリスロマイシン A(EMA)もモチリン受容体アゴニストとして知られており、ヒト、イヌにおいて微生物に影響しない低用量で MMC 様の収縮を引き起こすことが報告されている<sup>8-11</sup>。EMA はウサギ、イヌ、ヒトにおいて大腸運動を刺激し排便を促進させていることから、上部消化管と同様に下部消化管のモチリン受容体を介して作用していると考えられている<sup>11-16</sup>。このように、EMA の消化管運動刺激作用は上部消化管だけでなく、下部消化管の運動機能不全の治療に貢献すると思われる。しかし、EMA の抗菌活性は腸内細菌叢のバランスを崩し耐性菌を発現させる。この理由で、抗菌活性を消失させるとともに、強いモチリン様活性を有する化合物を見つけるため、多くの化合物が合成された<sup>8,17,18</sup>。しかし、ほとんどの EMA 誘導体は胃中の酸性下では速やかに分解することが報告されている<sup>19</sup>。

### Mitemcinal

[(2S,4R,5R,8R,9S,10S,11R,12R)-9-[(2,6-dideoxy-3-C-methyl-3-O-methyl- $\alpha$ -L-ribo-hexopyranosyl)oxy]-5-ethyl-4-methoxy-2,4,8,10,12,14-hexamethyl-11-[[3,4,6-trideoxy-3-(isopropylmethylamino)- $\beta$ -D-xylo-hexopyranosyl]oxy]-6,15-dioxabicyclo[10.2.1]pentadec-14(1)-ene-3,7-dione(E)-2-butenedioic acid salt (2:1), Code name: GM-611]

(Fig. 1)はEMA 誘導体で、酸性下でも安定するように改良し合成された化合物である。この新規誘導体では、12-O-メチル化をすることによって酸性下で起こるEMAの12-ヒドロキシ基のケト化を妨げ、酸性状態での安定性を向上させた。さらに、他方の側鎖を修飾することでモチリン活性を高め、経口投与可能な消化管運動促進剤である mitemcinal を合成した<sup>19,20</sup>。Mitemcinal は、ウサギ、イヌ、サルでモチリン受容体を介する強力な消化管運動促進作用を有することが示されている<sup>20</sup>。また、Mitemcinal を経口投与すると、特発性胃不全麻痺や糖尿病性胃不全麻痺の患者で見られる胃排出遅延を改善することが報告されている<sup>21,22</sup>。

本検討では、mitemcinal の排便に対する効果を明らかにするために、正常ウサギおよびイヌを用いて mitemcinal の排便に対する効果を検討した。また、モルヒネ誘発ウサギ便秘モデルに対する mitemcinal の効果についてもあわせて検討した。

### 1.3. 実験方法および実験材料

#### 1.3.1. 使用動物

ウサギ(Japanese-White rabbits、雄性、2-4 kg、北山ラベス(株))とイヌ(Beagle/CSK、雌雄、8-10 kg、中外医科学研究所)を使用した。本研究はすべて中外製薬株式会社「実験動物指針」にのっとり、倫理的配慮を持って遂行した。

モルヒネ誘発便秘モデルに使用したウサギは、10時から13時までの制限給餌を3週間以上行ってから実験に供した。ウサギの実験を開始する前には、経口投与によるストレスを回避するために、ゴム製のカテーテル(直径6.0 mm、イズモヘルス(株))を口から胃へ挿入し1日1回、5日間行った。

イヌでの検討では、経口投与によるストレスを回避するために、Silascon<sup>®</sup>メディカルチューブ (SH No. 1、カネカメディックス(株)) を外科的手術により胃に慢性的に留置した。手術後、メディカルチューブを保護するために、イヌにイヌ用の保護ジャケットを着用させた。イヌの実験は、手術2週間後より行った。

イヌは繰り返し、検討に使用され少なくとも 1 週間薬物の washout を経た後、次の実験に使用した。

### 1.3.2. 正常ウサギにおける排便作用

本実験は 8 時より開始した。実験中、水以外は餌を与えなかった。はじめの 1 時間の排便量(ベースラインの排便量)を測定した後、mitemcinal (1.25, 2.5, 5, 10 mg/kg)、sennoside (12, 24, 48 mg/kg)、それぞれの vehicle をカテーテルを使用して経口投与した。投与後 1 時間ごと 12 時間の排便量を測定した。糞の形状を以下の 4 つに分類した：(1) 正常便 (糞の形が保たれた便)、(2) 軟便(糞の形状は保たれているが、すべてあるいは一部分がやわらかい便)、(3) 泥状便(すべてあるいは一部分が糞の形状が明確でない便)、(4) 水様便(液状の便)。泥状便または水様便が観察されたときは、下痢とみなした。すべての実験の糞の形状観察は、投与薬物を知らされていない同一人物が評価した。採取した糞はドライオーブンで 120 °C、24 時間以上乾燥させ、乾燥重量を測定した。糞中の水分含量は、糞の湿重量と乾燥重量から算出した。

### 1.3.3. モルヒネ誘発ウサギ便秘モデルにおける排便作用

ウサギ便秘モデルを確立する前に、まず、摂餌後の正常なウサギの排便パターンを検証した。3 週間以上制限給餌(10:00 am-1:00 pm)したウサギに 30 分間(10:00-10:30 am)給餌し、糞湿重量を 30 分ごと 5 時間測定した。摂餌後、排便回数が増加し、摂餌後 2.5 時間で安定した排便パターンが観察された(結果参照)。次に、モルヒネを投与し、摂餌後 2.5 時間の排便に対するモルヒネの効果を検討した。モルヒネ(0.5, 1, 2 mg/kg)を皮下投与したところ、用量依存的に排便を抑制し、1 mg/kg で有意であった(結果参照)。それゆえ、モルヒネ誘発便秘モデルでの mitemcinal の検討では、モルヒネ 1 mg/kg 皮下投与し、その後 30 分間給餌させ、摂餌後 2.5 時間の糞量を測定した。このモルヒネ誘発便秘モデルに対する mitemcinal の効果の検討では、摂餌後すぐに(10:30 am)、mitemcinal (1.25, 2.5, 5, 10, 20 mg/kg)を本モデルに経口投与し、摂餌後 2.5 時間の糞を採取し、上述の方法と



同様に糞の形状と糞中水分含量を評価した。

#### 1.3.4. 正常イヌにおける排便作用

実験開始 17 日前より、本実験に使用するイヌの排便パターンを調査した。排便の 60%以上が摂餌後 1 時間以内におきることが認められた。摂餌直後の排便に対するバイアスを回避するために、9:00 am に給餌し、摂餌後 1 時間以内に排便したイヌに対し mitemcinal (0.3, 1, 3 mg/kg)を 10:00 am に経口投与した。予備検討で、mitemcinal 5 mg/kg を経口投与したところ、数匹嘔吐をした個体が認められたため、本実験では 3 mg/kg を最高用量とした。Mitemcinal 投与後、それぞれのイヌを観察し、最初に排便した時間(初回排便時間)を記録した。糞の形状、下痢の評価は上述の方法に従って行った。mitemcinal 投与後 7 時間以内に排便が観察されなかった場合、初回排便時間を 420 分とみなして記録した。

#### 1.3.5. 使用薬物

Mitemcinal は中外製薬(株) 化学研究所で合成されたものを用いた。ほかの試薬では sennoside (大正製薬工業(株))、塩酸モルヒネ(大日本製薬(株))を使用した。Mitemcinal は 3%アラビアゴム懸濁液で懸濁し、ウサギまたはイヌにそれぞれ 1 または 0.5 ml/kg で経口投与した。Sennoside は蒸留水で希釈し、ウサギに 1 または 2 ml/kg で経口投与した。モルヒネは生理食塩液で希釈し、ウサギに 0.1 または 0.2 ml/kg で皮下投与した。3%アラビアゴム懸濁液、蒸留水、生理食塩液をそれぞれ mitemcinal、sennoside、モルヒネの vehicle とした。

#### 1.3.6. 統計学的解析

下痢の発現率は chi-squared test で解析した。結果は mean  $\pm$  SEM で示した。用量依存性の検定には Jonckheere-Terpstra 検定を使用し、群間比較では Student の *t* 検定または Williams 検定を用いて評価し、 $P < 0.05$  を有意とした。統計学的解析には SAS Preclinical Package Version 5.00 (SAS Institute Japan Co., Ltd.)を使用した。

## 1.4. 結果

### 1.4.1. 正常ウサギにおける mitemcinal、sennoside の排便促進作用

Mitemcinal(2.5, 5, 10 mg/kg) は経口投与後 3 時間で排便を促進したが、1.25 mg/kg では糞湿重量の増加は認められなかった(Fig.2A)。Mitemcinal 投与後、排泄された糞の形状は正常便、あるいは軟便を示したが、高用量の mitemcinal 投与群で 1-2 匹のウサギで泥状便が認められた(Table 1)。

Sennoside では、経口投与後 3-9 時間で糞湿重量が増加し、mitemcinal 投与後で得られた糞湿重量のピークよりも多い糞湿重量を示した(Fig. 2B)。排泄されたほとんどの糞は泥状便あるいは水様便で、24 mg/kg 投与群で 15 匹中 6 匹が、48 mg/kg 投与群で 13 匹中 12 匹が下痢を示した。これらの投与群の下痢発生率は vehicle 投与群と比べ有意に高かった(Table 1)。

Mitemcinal と sennoside の排便に対する作用は異なっており、mitemcinal の排便促進作用は投与後 3 時間で終わるのに対し、sennoside は投与後 2 時間から排便促進作用が発現し、その作用は約 7 時間続いた(Fig. 2)。次に、mitemcinal と sennoside の排便に対する効果について、薬物投与後 0-3 時間と 2-9 時間の糞湿重量と糞中水分含有率で比較した。Fig. 3A に示すように、mitemcinal は糞中水分含有率を増加させることなく、用量依存的に糞湿重量を有意に増加させた。一方、sennoside は糞湿重量、糞中水分含有率ともに用量依存的に有意に増加させた。高用量の sennoside (48 mg/kg)によって排出された糞湿重量 (7 時間) は  $106.96 \pm 16.56$  g に対し、高用量の mitemcinal (10 mg/kg)で排出された糞湿重量(3 時間)は  $9.20 \pm 3.35$  g であり、sennoside は mitemcinal より糞湿重量を増加させた。しかし、高用量の sennoside の糞中水分含有率は  $84.3 \pm 2.6\%$  (n=13)であり、vehicle の  $64.7 \pm 0.8\%$  (n=13)と比較して有意に高かった(Fig. 3B)。

### 1.4.2. モルヒネ誘発ウサギ便秘モデルの確立

3 週間以上制限給餌(10:00 am-1:00 pm)させたウサギに、30 分間給餌させることによって排便頻度が増加した。この排便は給餌終了直後から 2.5 時間まで続き、安定した排便パターンが給餌終了後 2.5 時間観察された(Fig. 4A)。そこで、給餌

終了後 2.5 時間の排便に対するモルヒネの効果について検討した。給餌直前にモルヒネを皮下投与すると、モルヒネは摂餌によって誘発された排便を用量依存的に抑制した。モルヒネの排便抑制効果は、1 および 2 mg/kg で有意であった(Fig. 4B)。Vehicle、モルヒネ 0.5、1、2 mg/kg 皮下投与後 30 分間の摂餌量は、それぞれ  $40.4 \pm 1.74$ 、 $38.5 \pm 1.58$ 、 $39.5 \pm 2.44$ 、 $34.0 \pm 1.70$  g (n=7)であり、モルヒネは摂餌量に影響を与えなかった。これらの結果から、モルヒネ誘発便秘モデルでの検討では、モルヒネ 1 mg/kg を給餌直前に皮下投与し、その後 30 分間給餌させ、給餌終了後 2.5 時間の糞湿重量を測定した。

#### 1.4.3. モルヒネ誘発便秘に対する **mitemcinal** の効果

モルヒネ(1 mg/kg)は給餌終了後 2.5 時間の糞湿重量を有意に抑制した。糞中水分含量では、モルヒネは未処置群(normal)と有意な差は認められなかった(Fig. 5)。Mitemcinal は、5 mg/kg 経口投与より糞中水分含量に影響を与えることなく、モルヒネによる排便抑制を改善させた(Fig. 5)。Mitemcinal 投与群および vehicle 投与群の糞の形状は、正常便または軟便であり、mitemcinal 投与後下痢を示した個体は認められなかった。

#### 1.4.4. 正常イヌにおける **mitemcinal** の排便に対する効果

Mitemcinal 経口投与により、初回排便時間は mitemcinal の用量依存的に短縮した。高用量の mitemcinal (3 mg/kg)では、経口投与 5 時間以内にすべての個体が排便したのに対し、vehicle 投与群では排便した個体は観察されなかった(Fig. 6)。Mitemcinal 投与群の糞の形状は、正常便あるいは軟便であり、mitemcinal はイヌに対して下痢を誘発しなかった。

## 1.5. 考察および結論

正常ウサギにおける検討では、mitemcinal は経口投与後 2-3 時間以内に排便促進作用が認められた。対照的に、sennoside は経口投与後 2 時間までは高用量でさえも排便は観察されなかった。Sennoside による排便促進作用は投与後 2 時間から 7 時間続いたが、mitemcinal による排便促進作用は投与後 1 時間から観察され、4 時間後には排便を示さなかった。これらの結果は、mitemcinal は sennoside に比べ、薬効発現が早く、作用時間が短いため、排便時間をコントロールしやすくすることが示唆された。ウサギにおいて、モチリン受容体は上部消化管と同様に大腸平滑筋や腸内神経叢に発現し、モチリンおよび EMA はウサギ摘出大腸平滑筋を収縮させることが知られている<sup>23-26</sup>。また、EMA は *in vivo* 実験でウサギ大腸運動を刺激し、排便を促進させることが報告されている<sup>16</sup>。経口投与可能な EMA 誘導体の mitemcinal はモチリン受容体を介して、ウサギ十二指腸平滑筋を強力に収縮させた<sup>20</sup>。また、mitemcinal はウサギ大腸の神経および筋組織のモチリン受容体に結合することが確認されている<sup>26</sup>。Mitemcinal は上部消化管から吸収されてすぐに血中に移行し、モチリン受容体を介して大腸運動を刺激することにより排便を促進すると考えられる。予備検討で、mitemcinal (3 mg/kg) をウサギに経口投与すると、投与後 30 分には血中に移行し、Tmax および T<sub>1/2</sub> はそれぞれ投与後約 2 時間および 10 時間であった(unpublished data)。本検討で、mitemcinal による糞量の増加は、Tmax までの mitemcinal の血漿中濃度の経時的変化によく一致している。Sennoside は mitemcinal より遅い時間で排便を促進した。一般的に sennoside は大腸に到達してはじめて、大腸の腸内細菌により代謝を受け、緩下作用を示すと考えられている<sup>5-7</sup>。

本検討では、sennoside は mitemcinal よりも多く糞湿重量を増加させた。しかし、sennoside は正常ウサギで用量依存的かつ有意に糞中水分含量および下痢発生率を増加させた。高用量の sennoside では 13 匹中 12 匹に下痢が見られ、vehicle 投与群に比べ糞中水分含量が約 20%増加していた。Sennoside、bisacodyl、sodium picosulfate といった現在の緩下薬は大腸粘膜から水分泌を増加させることによって効果を発揮するので、ひどい下痢や脱水、電解質障害などを引き起こす傾

向がある<sup>6,7</sup>。対照的に *mitemcinal* の経口投与は、正常ウサギでは有意ではないがわずかに下痢を発生させたが、糞中水分含量は増加させなかった。これら両化合物の薬効発現時間、持続時間、糞中水分含量に対する効果の違いは、これらの化合物の作用メカニズムの違いによるものと思われる。本実験結果から、*mitemcinal* は *sennoside* のような緩下薬と異なる作用機序で作用するので、激しい下痢を起こさない生理的な排便を誘発する薬剤として有用であることが示唆された。

本検討では、 $\mu$ -opioid アゴニストであるモルヒネを使用してウサギ便秘モデルを確立した。モルヒネは消化管運動と腸内分泌を抑制することによって便秘を引き起こすことが報告されている<sup>27-30</sup>。モルヒネはがん患者の疼痛緩和に使用されることが広く知られており、実際、便秘を引き起こし、時には重症な便秘を伴うことが臨床で問題となっている<sup>31,32</sup>。本実験の便秘モデルでは、モルヒネ 1 mg/kg は水分含量を増加させずに摂餌刺激による糞量増加を抑制し、モルヒネがヒトやほかの動物と同じように、ウサギに便秘を引き起こすことを確認した。モルヒネは大腸で間欠性の強収縮を誘発し、蠕動運動を抑制することによって便秘を起こすことが報告されている<sup>28,29</sup>。本実験で確立されたモデルでは、主な便秘の要因は腸内分泌の減少より蠕動運動の抑制であると考えられる。本実験では、*mitemcinal* はモルヒネ誘発ウサギ便秘モデルにおいてモルヒネによる便秘を改善し、正常ウサギに対する薬効とほぼ同じように作用した。これらの結果は、モチリンアゴニストの消化管運動活性が攣縮性の収縮による蠕動運動の低下を改善したことを示した。大腸運動におけるモルヒネと *mitemcinal* の効果には更なる検討が必要であるが、*mitemcinal* は疼痛緩和に使用されるモルヒネによる便秘に対して有効であることが示唆され、さらに、便秘型の IBS のような便秘に対しても改善する可能性が示唆された。

Depoortere らの報告<sup>23</sup>によれば、ウサギ消化管におけるモチリン受容体は胃や小腸に存在し、それらの密度は肛門側ほど減少している。モチリンの特異的結合は盲腸では認められないが、大腸で再び認められ、大腸のモチリン受容体の密度は十二指腸の約 4 倍である<sup>23</sup>。大腸および十二指腸では、モチリンで誘発し

た最大収縮が アセチルコリンによる最大収縮と同じなので、モチリン受容体に対するモチリンの親和性が上部および下部消化管のすべての領域で比較できる<sup>23,33</sup>。ヒトでは、小腸のモチリン受容体は肛門側ほどその密度は減少し、大腸でまたモチリン受容体が発現していることは Peeters らによって確認されている<sup>25,34</sup>。しかし、ヒト大腸標本では、モチリンに対する反応性は弱く、モチリンの最大収縮はアセチルコリンの約 20-30%である<sup>25</sup>。大腸のモチリン受容体の密度に関しては、ウサギとヒトの解剖学的な違いなのかもしれない。

一方、イヌでのモチリンに対する反応性はヒトと類似していることが一般的に受け入れられている。たとえば、血漿中モチリン濃度の上昇が胃や十二指腸の MMC と同時に見られる<sup>8</sup>。多くの研究者が外因的なモチリン投与や EMA 投与によってヒトやイヌの胃、十二指腸に MMC 様の収縮を引き起こすことを報告している。また、これらの収縮が回腸に向かって伝播性に続くことが報告されている<sup>8-11</sup>。モチリンアゴニストはヒトと同様にイヌでも大腸では収縮活性は小さいが、モチリンや EMA もまた、ヒトやイヌにおいて大腸運動を亢進させることが示されている<sup>11-15,25</sup>。本検討では、mitemcinal は下痢を示すことなく正常イヌの初回排便時間を短縮させた。イヌでの最小有効用量(3 mg/kg)は正常ウサギ(2.5 mg/kg)やウサギ便秘モデル(5 mg/kg)での最小有効用量とほぼ同等であった。Mitemcinal はウサギだけでなくイヌにおいても激しい下痢を示すことなく排便を促進させた。以前に報告した我々の研究では<sup>35</sup>、イヌの胃や大腸に対する mitemcinal の収縮活性は、選択的モチリン受容体アンタゴニストである GM-109 によって抑制され<sup>33</sup>、イヌにおける mitemcinal の作用はモチリン受容体を介していることが示された。それゆえ、イヌにおける大腸運動促進作用もまた、モチリン受容体を介した作用と考えられる。

本検討で、mitemcinal は大腸運動機能障害による便秘の新しい治療薬としての臨床的価値が示唆された。しかし、ほかのモチリンアゴニストは健常人や患者の消化管運動に対して対照的な結果を与えている。マクロライド誘導体の ABT-229 は機能性胃腸症患者 (functional dyspepsia) の症状を緩和させる効果が認められなかった<sup>36</sup>。これは受容体の脱感受性によるものかもしれないと報告さ

れている<sup>37</sup>。また、新規モチリンアゴニスト atilmotin が健常人に対して大腸の輸送に影響を与えることなく胃排出を促進することが報告された<sup>38</sup>。さらに、EMA は健常人や便秘患者で大腸運動に対し有効でなかったことが報告されている<sup>39,40</sup>。一方、モチリン、EMA が健常人や便秘患者に対し大腸運動を刺激し、排便回数を増加させたと報告されている<sup>11-13</sup>。これらの EMA に関する結果は、少なくとも腸内細菌叢に対し EMA の抗菌活性によるものか、モチリンアゴニストとして弱い EMA だからか、あるいは過剰量によるものであると推察される。それゆえ、抗菌活性のない強力なモチリンアゴニスト活性の新規 EMA 誘導体の開発が望まれている。

結論として、mitemcinal は sennoside と異なり、激しい下痢を起こさずに、薬効発現が早く、排便時間をコントロールしやすい薬剤であることが示された。また、mitemcinal は大腸運動機能障害による便秘に対して新たな治療薬となる可能性が示唆された。

## 1.6. Figures and Tables

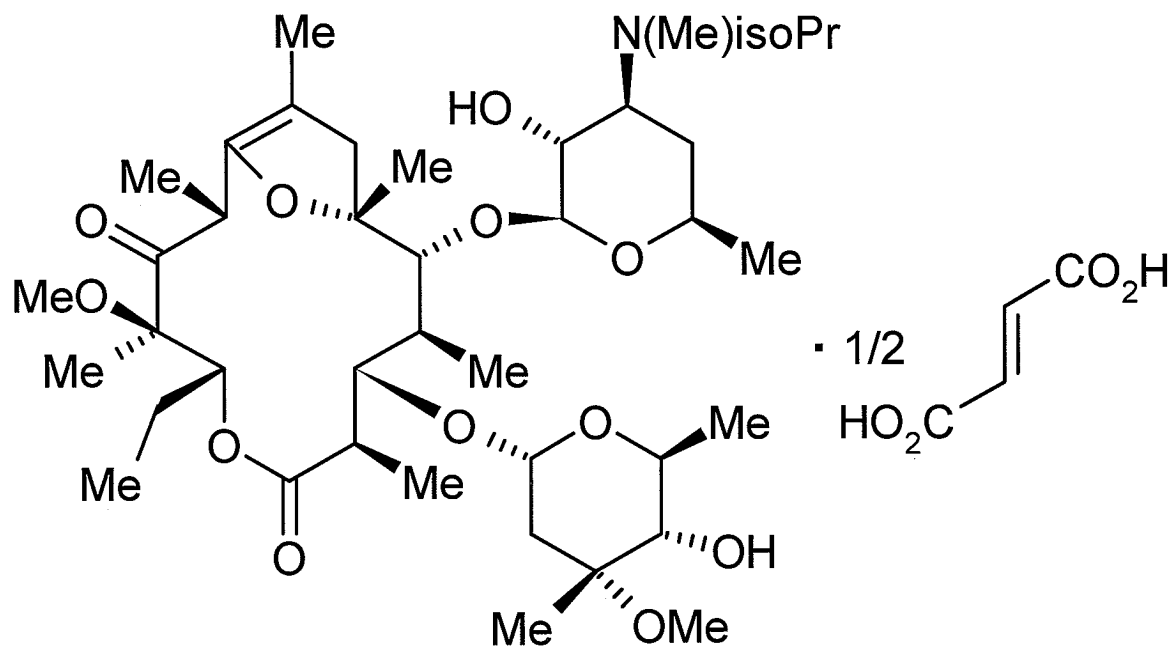
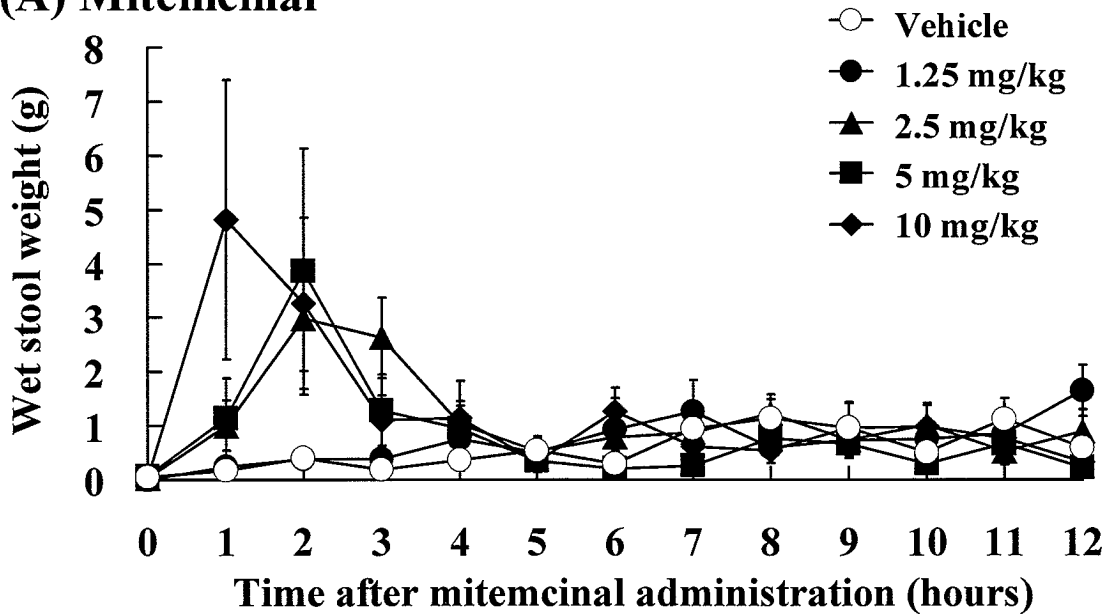


Figure 1. Chemical structure of mitemcinal (GM-611). Molecular weight: 814.02.



### (A) Mitemincinal



### (B) Sennoside

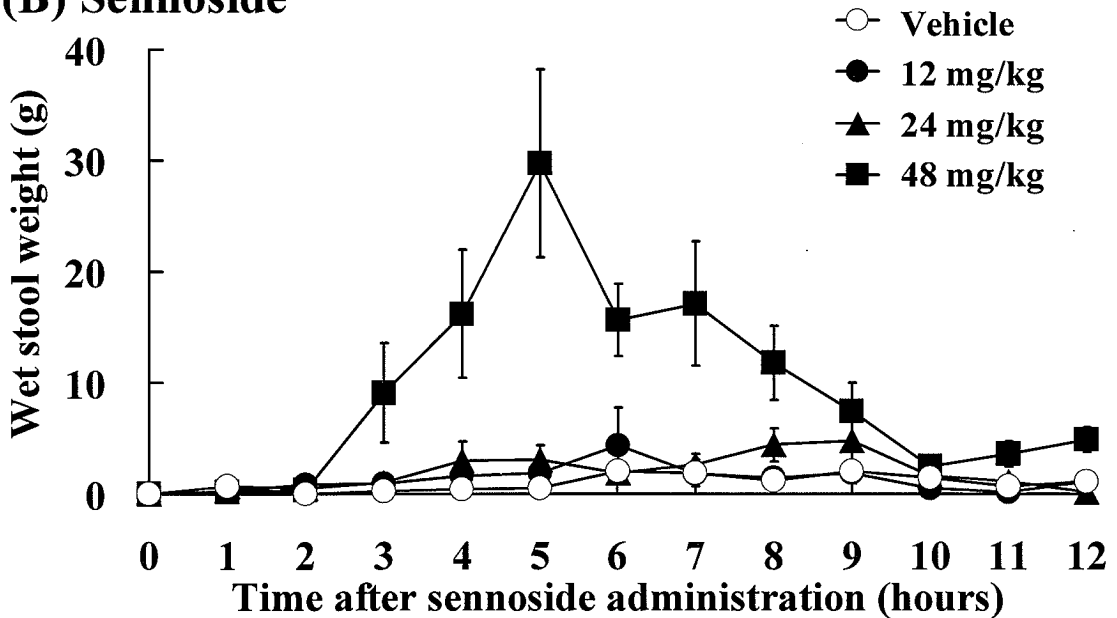


Figure 2. Time course of the wet stool weight induced by mitemincinal (A) and sennoside (B) in normal rabbits. Mitemincinal (1.25-10 mg/kg), sennoside (12-48 mg/kg), or the corresponding vehicle of each drug was administered orally, and wet stool weight was measured for 12 hours after administration. Each point and bar represents the mean  $\pm$  SEM of 13-15 animals.

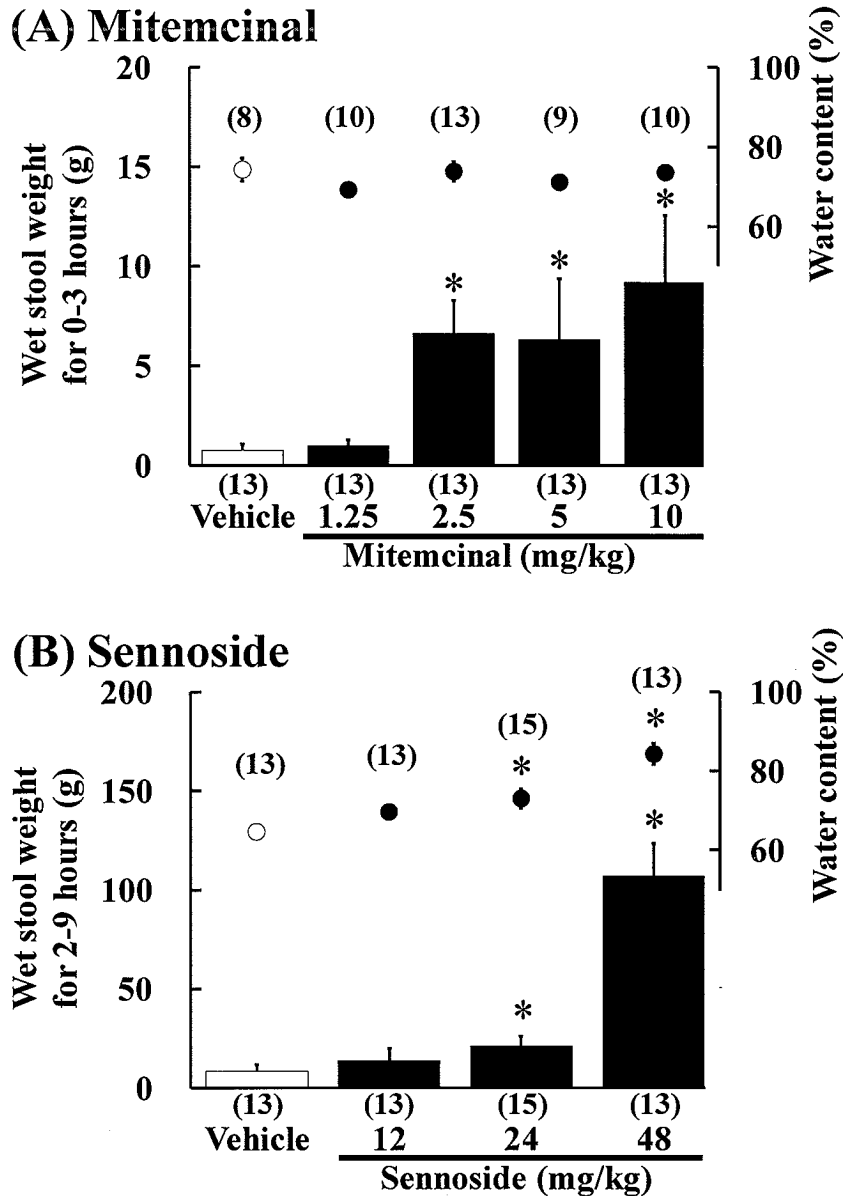


Figure 3. Effects of mitemcinal (A) and sennoside (B) on stool wet weight and water content in normal rabbits. Mitemcinal (1.25-10 mg/kg), sennoside (12-48 mg/kg), or the corresponding vehicle of each drug was administered orally, and stools were accumulated for 0-3 and 2-9 hours after dosing. Stool water content was calculated from the difference between the wet and dry weight of the stools. Each point and bar represents the mean  $\pm$  SEM. Numbers in parentheses indicate the number of animals used for calculation (if no stools were produced during the accumulation period, the wet weight was entered as 0 g, and the water content was not determined). Statistical significance of dose-response was confirmed by the Jonckheere-Terpstra test and evaluated by the Williams test (\*  $P < 0.05$ ).

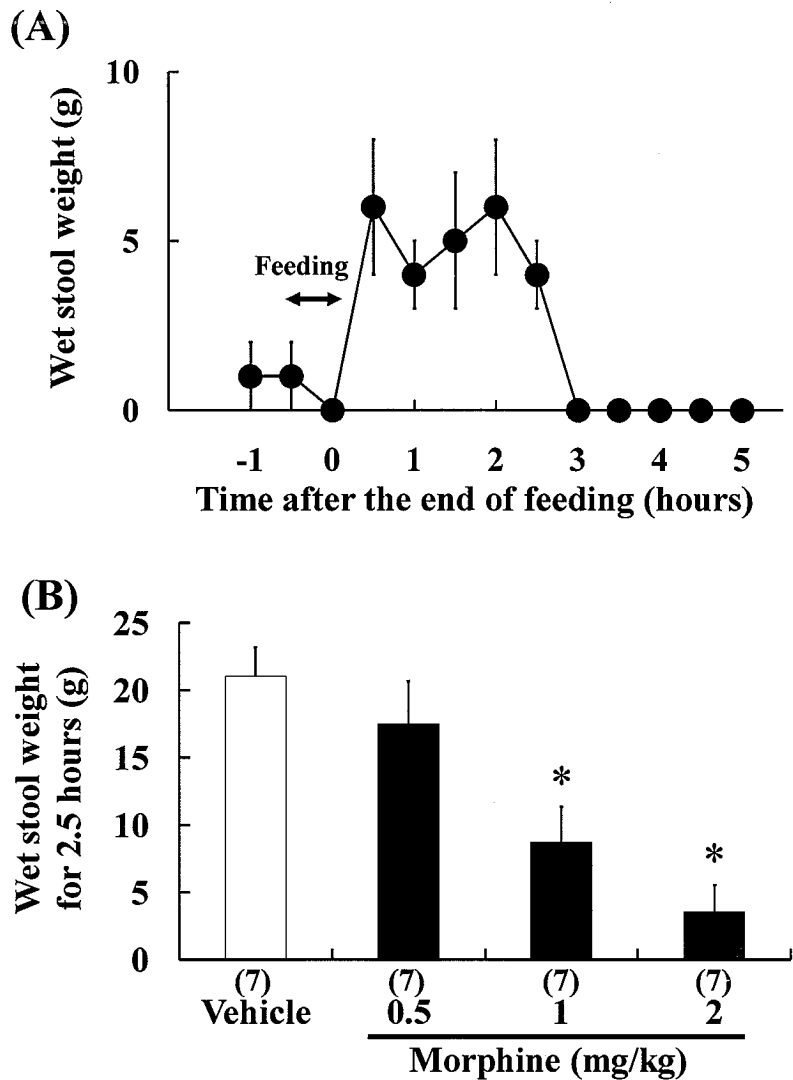


Figure 4. (A) Time course of the wet stool weight induced by food intake in rabbits that had been on a limited feeding regime (10:00 am-1:00 pm) for at least 3 weeks. After the rabbits were given free access to the food for 30 min (10:00-10:30 am), the stools from each animal were collected and weighed every 30 min. Each point and bar represents the mean  $\pm$  SEM of 15 animals. (B) Inhibitory effect of morphine on wet stool weight in rabbits. Morphine (0.5-2 mg/kg) was administered subcutaneously immediately before feeding (10:00 am) and the rabbits were allowed to feed for 30 min. After feeding (10:30 am), the stools from each animal were collected for 2.5 hours and weighed. Numbers in parentheses indicate the number of animals in each group. Each column and bar represents the mean  $\pm$  SEM of 7 animals. Statistical significance of dose-response was confirmed by the Jonckheere-Terpstra test and evaluated by the Williams test (\*  $P < 0.05$ ).

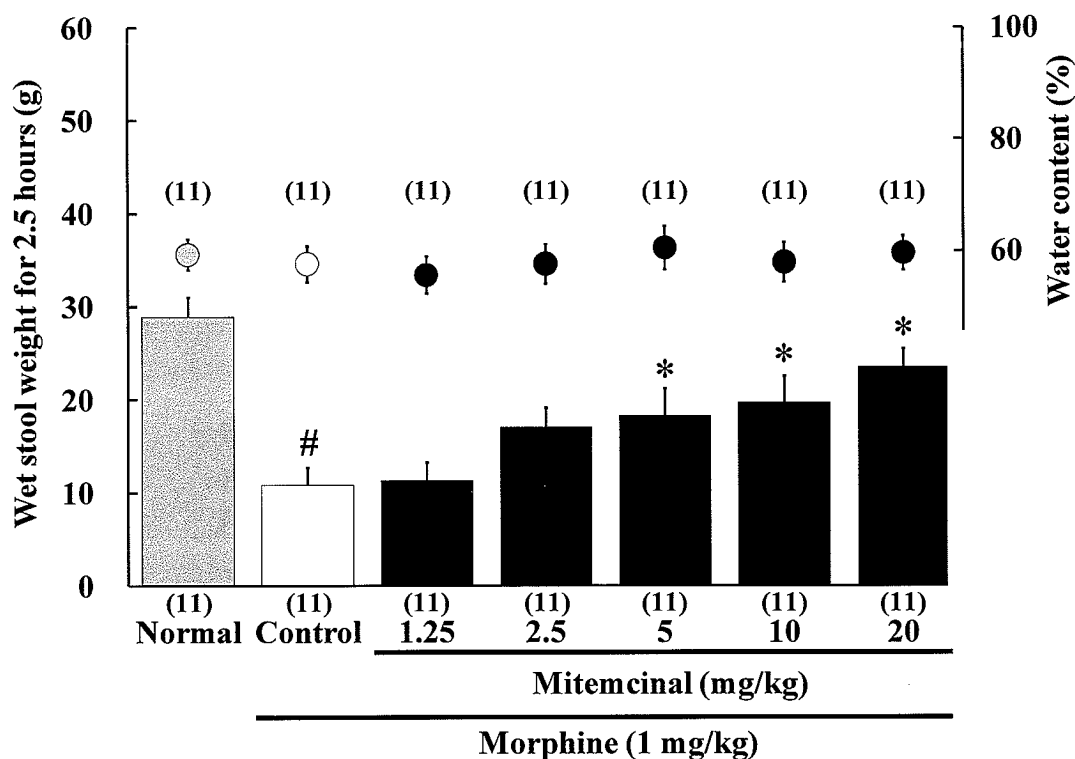


Figure 5. The effects of mitemcinal on the wet weight and the water content of stools in morphine-induced constipated rabbits. Morphine (1 mg/kg) was subcutaneously administered at 10:00 am and rabbits were fed for 30 min. Immediately after feeding (10:30 am), mitemcinal (1.25-20 mg/kg) or corresponding vehicle was administered orally and stools were accumulated for 2.5 hours after administration. The water content of stools was calculated from the difference between the wet and dry weights of the stools. Numbers in parentheses indicate the number of animals in each group. Each point and bar represents the mean  $\pm$  SEM. Statistical significance of dose-response was confirmed by the Jonckheere-Terpstra test and evaluated by the Williams test ( $*P < 0.05$ ). <sup>#</sup>  $P < 0.05$  for comparison between the untreated animals (normal) and the morphine-treated animals (control) by the Student's *t* test.

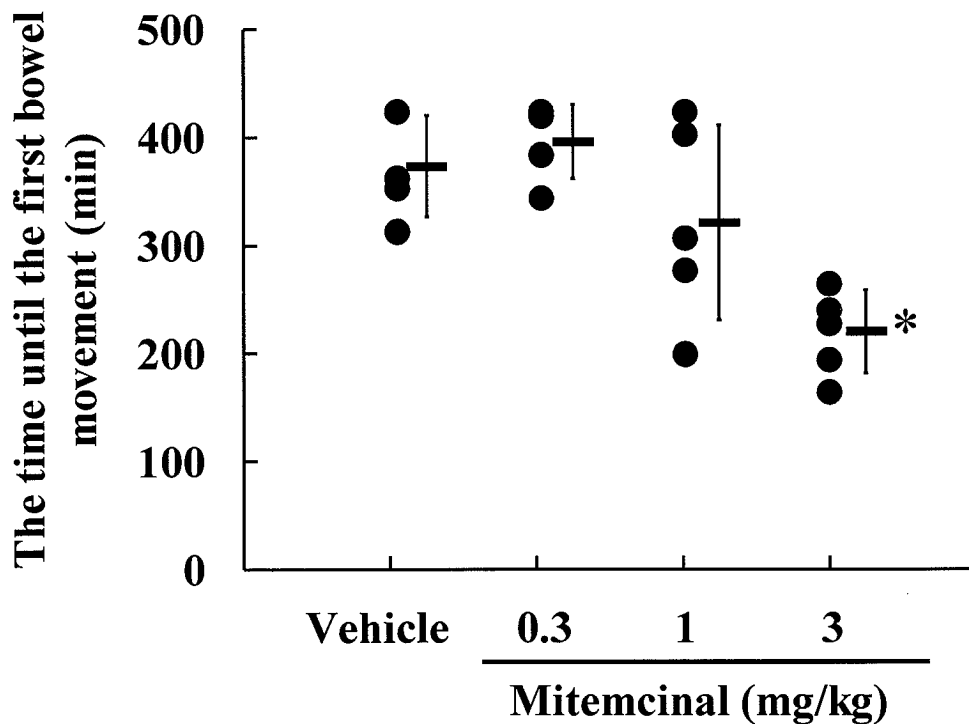


Figure 6. Effects of mitemcinal on time to first bowel movement after administration in dogs. Mitemcinal (0.3-3 mg/kg) or the corresponding vehicle was administered orally 1 hour after feeding, each dog was then monitored for bowel movements, and the time to first bowel movement after administration was recorded. Each point represents the time to first bowel movement after administration of mitemcinal for each dog, and each bar represents the mean  $\pm$  SEM from the 5 dogs. Statistical significance of dose-response was confirmed by the Jonckheere-Terpstra test and evaluated by the Williams test (\* $P < 0.05$ ).

Table 1. Incidence of diarrhea after oral administration of mitemcinal or sennoside in normal rabbits

Drug	Dose (mg/kg)	Total No. of rabbits (n)	No. of rabbits with diarrhea (n)	Incidence of diarrhea (%)	<i>P</i> value
Vehicle <sup>a</sup>	–	13	0	0	–
Mitemcinal	1.25	13	0	0	P=1.000
Mitemcinal	2.5	13	2	15.4	P=0.141
Mitemcinal	5	13	1	7.7	P=0.308
Mitemcinal	10	13	2	15.4	P=0.141
Vehicle <sup>b</sup>	–	13	1	7.7	–
Sennoside	12	13	1	7.7	P=1.000
Sennoside	24	15	6	40.0	P=0.049
Sennoside	48	13	12	92.3	P<0.0001

a: Three percent gum arabic solution was administered orally as the corresponding vehicle for mitemcinal.

b: Distilled water was administered orally as the corresponding vehicle for sennoside.

The *P* value of each group was estimated by comparison with the corresponding vehicle group using the chi-squared test.

2. 第2部 新規選択的・競合的モチリン受容体アン  
タゴニスト MA-2029 のウサギ *in vitro*, *in vivo* 薬効  
評価系を用いた薬理学的研究

## 2.1. 要約

新規モチリン受容体アンタゴニスト MA-2029 の薬理的検討を行った。*In vitro* 実験では、MA-2029 (1-30 nM)はウサギ摘出十二指腸標本でモチリンによる収縮を競合的に阻害した( $pA_2$ :  $9.17 \pm 0.01$  (n=5))。しかし、アセチルコリン(ACh)またはサブスタンス P(SP)誘発収縮に対して、MA-2029 は1  $\mu$ M でも影響を与えなかった。MA-2029 は、放射性同位体を用いたモチリン受容体結合試験で、ウサギ大腸平滑筋およびヒトモチリン受容体を発現している HEK 293 cells の細胞膜分画のモチリン受容体に対して、濃度依存的に $[^{125}I]$ モチリンの結合を抑制した。MA-2029 の  $pK_i$  は  $8.58 \pm 0.04$ (rabbit colon (n=4))、 $8.39$ (HEK 293 cells (n=2))であった。*In vivo* 実験では、意識下ウサギにおいて、MA-2029 (3-30 mg/kg)経口投与はモチリン(3  $\mu$ g/kg, i.v.)誘発大腸収縮を用量依存的に抑制した。その抑制は投与後 30 分ですべての用量で観察され、10 mg/kg 以上で投与後 4 時間、その抑制作用が持続した。MA-2029 の血漿中濃度はその抑制作用と相関した。さらに、意識下ウサギにおいて、MA-2029 (0.3-3 mg/kg)経口投与は、モチリン(3  $\mu$ g/kg/h)静脈内持続投与+大腸拡張刺激によって誘発された腹筋の収縮(腹痛の指標)を抑制した。これらの結果は、MA-2029 が経口投与可能な選択的・競合的モチリン受容体アンタゴニストであることを示した。MA-2029 は過敏性腸症候群のような消化管運動機能障害に対して有用である可能性が示唆された。



## 2.2. 序論

モチリンは22個のアミノ酸からなるポリペプチドで、ヒトなど多くの種の消化管粘膜の内分泌細胞に存在する<sup>41,42</sup>。モチリンを投与すると、*in vivo* 実験では空腹期伝播性収縮で見られる強収縮(phase III 収縮)と同じような強収縮が起こり、*in vitro* 実験では消化管平滑筋が収縮する<sup>43</sup>。ヒトや動物では、内因性モチリンの血漿中濃度は、空腹期において胃と十二指腸の phase III 収縮と同期してピークに達することから、モチリンはモチリン受容体を介して消化管の収縮を調節していると考えられる<sup>43</sup>。これらの知見は、多くの研究者に消化管運動機能障害に関連する疾患の治療薬として、モチリン受容体アゴニストおよびアンタゴニストの開発研究を動機づけさせた。

モチリン受容体アゴニストの探索研究で、*in vivo*、*in vitro* 実験でエリスロマイシンがモチリン受容体を介し消化管に対してモチリン様作用を引き起こすことがわかった<sup>43,44</sup>。しかし、エリスロマイシンは抗菌活性があるため、運動機能障害、特に糖尿病性胃不全麻痺や逆流性食道炎のような消化管運動機能低下に対する治療薬の探索では、抗菌活性のないモチリン活性の強い新規エリスロマイシン誘導体が開発された。たとえば、EM-574、ABT-229、mitemcinal (GM-611) があげられる<sup>45-47</sup>。ABT-229の臨床研究では、ABT-229は健常人では胃排出を促進したものの、消化管機能障害の患者では症状を改善させなかった<sup>48,49</sup>。対照的に、mitemcinalの臨床研究では、mitemcinalは胃排出遅延を改善するだけでなく、糖尿病性胃不全麻痺患者の症状も改善させた<sup>50,51</sup>。今後、消化管運動機能障害の治療薬としてのモチリン受容体アゴニストのさらなる臨床研究が期待されている。

一方、モチリン受容体アンタゴニストの治療薬としての可能性は、消化管運動機能障害の病態生理に対するモチリンの役割に依存している。そのモチリンの役割は完全には解明されていないが、血漿中モチリン濃度の上昇が腹痛を伴う便秘・下痢を呈する過敏性腸症候群(IBS)の原因である可能性を示唆した報告がある<sup>52</sup>。また、過敏性腸症候群患者では血中モチリン濃度が高く、過敏性腸症候群患者に心理的ストレスを加えると血中モチリン濃度が高くなると報告され

ている<sup>53-55</sup>。このように、過敏性腸症候群の症状が血中モチリンレベルの上昇に関連しているので、経口投与可能なモチリンアンタゴニストが有用な治療薬となると期待されている。

モチリンアンタゴニストには有望な利点があるにも関わらず、モチリン受容体アンタゴニストの開発研究はほとんど進んでいない。ペプチドのモチリンアンタゴニストは数多く報告されているが<sup>56-60</sup>、これらすべてモチリン由来のペプチドのため経口投与での活性は期待できない。唯一、非ペプチド型のモチリンアンタゴニストとしてRWJ-68023が報告されているが、経口投与での活性は報告されていない<sup>61,62</sup>。我々はトリペプチド骨格を修飾した経口投与で活性のあるモチリン受容体アンタゴニスト MA-2029

((S)-N-[(S)-2-(3-tert-Butyl-4-hydroxy-phenyl)-1-ethylcarbamoyl-ethyl]-3-methyl-2-[methyl-((S)-2-methylamino-3-phenyl-propionyl)-amino]-butyramide hydrochloride (Fig. 7))を開発した。本検討では、*in vitro*、*in vivo* 実験を行い、この化合物の薬理的性質を報告する。

## 2.3. 実験材料および実験方法

### 2.3.1. 実験材料

MA-2029 は中外製薬株式会社富士御殿場研究所にて合成された。そのほかの試薬には、porcine motilin(モチリン)、サブスタンス P (Peptide Institute Inc.)、acetylcholine chloride (アセチルコリン ; Sigma Chemical Co.)、 $[^{125}\text{I}]$ porcine motilin (Peninsula Laboratories Inc.)を使用した。*In vitro* 実験では、MA-2029 を dimethyl sulfoxide (DMSO)で溶解し、生理食塩液であるいは蒸留水で希釈した。*In vivo* 試験では、MA-2029 を 3%アラビアゴム懸濁液で懸濁した。ほかの薬物は生理食塩液あるいは蒸留水で溶解した。

### 2.3.2. 使用動物

雄性 JW ウサギ(約 2-3 kg、北山ラベス(株))を使用した。本研究はすべて中外製薬株式会社「実験動物指針」にのっとり、倫理的配慮をもって遂行した。

### 2.3.3. 摘出十二指腸標本での収縮実験

ウサギをチオペンタール(ラボナール<sup>®</sup>; 田辺製薬)麻酔下放血させ安楽死後、十二指腸を摘出し、氷冷下 Krebs 緩衝液(composition in mM: NaCl 120.0, KCl 4.7, CaCl<sub>2</sub> 2.4, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.0, MgSO<sub>4</sub> 1.2, NaHCO<sub>3</sub> 24.5, glucose 5.6 (pH 7.4))にて洗浄し、縦 10 mm x 横 3 mm の縦走筋切片を作製した。その切片をマグヌス装置に取り付け、過度な自発運動を抑制するために 28°C の 95% O<sub>2</sub> -5% CO<sub>2</sub> 含 Krebs 緩衝液 10 mL に浸し、1 g の張力を付加した<sup>63</sup>。実験開始前に、その切片を 100 μM アセチルコリンで再現性のある収縮が得られるまで繰り返し刺激した。収縮活性は isotonic transducer (ME-4012; Medical Electronics Co.) にて測定し、ペンレコーダー(Type 3066; 横河電気(株))で記録した。アゴニストはモチリン(0.1-1000 nM)、アセチルコリン(0.01-100 μM)またはサブスタンス P (0.1-300 nM)を使用し累積投与によって収縮させた。次に、各アゴニスト投与 15 分前に MA-2029 を投与し、各アゴニストの収縮活性を測定した。MA-2029 の濃度は、モチリンの収縮活性

では 1-30 nM を、アセチルコリン、サブスタンス P の収縮活性では 1  $\mu$ M を使用した。すべての薬物濃度はマグヌス中の最終濃度で表示している。

収縮活性はアセチルコリン 100  $\mu$ M による収縮に対する % で示した。また、各アゴニストの MA-2029 存在/非存在下での  $pD_2$  ( $pD_2 = -\log[\text{agonist } EC_{50}]$ ,  $EC_{50}$ : agonist conc. for half-maximal contraction)、モチリンに対する MA-2029 の競合的アンタゴニスト活性 ( $pA_2 = -\log[\text{antagonist conc. that doubles } EC_{50}]$ ) を算出した。

#### 2.3.4. ウサギ大腸におけるモチリン受容体結合実験

モチリン受容体結合実験は Depoortere らの方法<sup>64</sup> を改変して行った。チオペンタール麻酔下放血後、約 50 cm の遠位結腸を摘出し、氷冷下生理食塩液で洗浄した。結合組織と粘膜を取り除いた平滑筋組織を細かく切り刻み、50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4, Trizma<sup>®</sup>; Sigma-Aldrich Japan) を加え、0°C、30 秒間、2000 rpm で tapered tissue grinder (Wheaton Science Products) を使用してホモジナイズした。その後、ホモジネートを遠心処理した(TMP-22; 日立工機(株); 1500  $\times$  g for 5 min)。沈殿物を 50 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0, containing 10 mM  $MgCl_2$ , 1.5% bovine serum albumin)50 mL で懸濁し、結合実験の大腸平滑筋標本として使用した。その標本の一部(約 1.0 mg protein/assay)を 25°C で 25 pM [<sup>125</sup>I]モチリン (final sample volume: 1 ml) とともに 2 時間インキュベートし、2 ml の氷冷緩衝液を加えて反応を停止させた。結合したリガンドとフリーリガンドを分けるために、遠心処理(1500  $\times$  g for 5 min)を行った。氷冷緩衝液で洗浄後、放射活性を gamma counter (COBRA II 5005; Packard Instrument Co.)を用いて測定した。

特異的結合は非特異的結合(1  $\mu$ M モチリン添加後測定)と全結合の差から算出した。MA-2029 およびモチリンの結合置換曲線を作成し、MA-2029、モチリン (それぞれ 0.1-1000 nM) の [<sup>125</sup>I]モチリンの特異的結合を 50% 減少させる濃度( $IC_{50}$ ) を算出し、モチリンの解離定数( $K_d$ )と MA-2029 の阻害定数( $K_i$ )を算出した。また、MA-2029 の協同性を検証するために Hill 係数を求めた。

### 2.3.5. ヒトモチリン受容体結合実験

MA-2029 のヒトモチリン受容体に対する親和性を検討するために、HEK 293 cells を使用し、Cerep (Celle L'Evescault, France) にて radioligand binding assay によって測定した<sup>65</sup>。HEK 293 cells の細胞膜に対する [<sup>125</sup>I]モチリンの特異的結合を測定し、MA-2029 (0.1-300 nM)の置換曲線を作成し、IC<sub>50</sub> および pKi を算出した。

### 2.3.6. MA-2029 の受容体およびイオンチャネルに対する親和性実験

MA-2029 の他の受容体およびイオンチャネルへの親和性を Cerep にて radioligand binding assay によって測定した。Table 2 に各受容体およびイオンチャネルに対する MA-2029 (1 μM) の阻害率を示す。

### 2.3.7. MA-2029 の大腸運動に対する作用

MA-2029 の経口活性を明らかにするために、モチリン誘発大腸運動に対する抑制効果を意識下ウサギを用いて行った。イソフルラン麻酔下 (Forane<sup>®</sup>; Abbott Labs)、開腹し force-transducer (F-8IS; Star Medical) を大腸(肛門から 10 cm 上部)に輪状筋方向に縫着した。モチリン投与用および採血用にシリコンチューブ (Silascon<sup>®</sup> Medical Tube, SH No. 1; Kaneka Medix) を頸静脈に留置した。シリコンチューブ、force-transducer のリード線の他端を皮下を通し肩甲骨から取り出し、術後ジャケットを着用させ、シリコンチューブ、リード線を保護した。実験は1週間回復後行った。

Force-transducer のリード線を implantable telemetry system (IMT-400; Star Medical) に接続し、ウサギをケージ中、自由に動けるようにした。大腸運動は消化管運動測定システム(Eight Star; Star Medical)にて測定した。MA-2029 のモチリン誘発大腸運動抑制効果とその持続性を評価するために、MA-2029 投与 30 分後および 4 時間後のモチリン誘発大腸運動を測定した。予備検討において、MA-2029 (10 mg/kg) をウサギに経口投与したとき、MA-2029 の T<sub>max</sub> および T<sub>1/2</sub>

がそれぞれ約 30 分および 2 時間であり、投与後 4 時間でも血漿中に検出されたため(n=5)、経口投与後 30 分および 4 時間で評価した。

24 時間絶食後、ベースラインの大腸運動を 1 時間測定し、モチリン 3  $\mu\text{g}/\text{kg}$  を静脈内投与した(First motilin injection)。この実験で用いたモチリンの用量は Kitazawa らの報告<sup>66</sup>および予備検討で最大下用量を示した 3  $\mu\text{g}/\text{kg}$  を使用した。First motilin injection の 2.5 時間後に MA-2029 (3, 10, 30  $\text{mg}/\text{kg}$ )または vehicle を経口投与し、その 30 分後にモチリン(3  $\mu\text{g}/\text{kg}$ )を静脈投与した(second motilin injection)。1 週間後、同様な実験を行い、second motilin injection で MA-2029 経口投与 4 時間後のモチリン誘発大腸運動の測定を行った。大腸収縮活性の定量解析は収縮波とベースラインの面積から motility index を算出し、first motilin injection によって誘発された大腸の motility index を 100%として、MA-2029 または vehicle 存在下における second motilin injection による motility index の変化率(%)を求めた。

Second motilin injection 直前の血液を採取し、血漿中 MA-2029 濃度を LC/MS/MS(electrospray ionisation, positive mode)で測定した。

### 2.3.8. MA-2029 の腹痛に対する作用

MA-2029 経口投与による腹痛に対する効果を明らかにするために、Okano らの方法<sup>67</sup>を改変し、バルーン大腸拡張におけるモチリン静脈内持続投与誘発腹筋収縮に対する MA-2029 の効果を評価した。バルーンによる大腸拡張刺激は腹痛を評価する一般的な実験モデルである。大腸拡張による侵害性内臓刺激は腹筋収縮のような反射的な反応を示し、その反応は大腸拡張の強度と相関し、定量可能である<sup>68</sup>。

48 時間絶食後、腹筋収縮回数を測定するために、電極(Vitrode F; 日本光電(株))を腹斜筋を覆う皮膚上に貼りつけ、ウサギをアクリルケージ (縦 46  $\text{cm}$  × 横 15.5  $\text{cm}$  × 高さ 11  $\text{cm}$ ) に固定した。アクリルケージに慣れさせた後、チューブの先端に付けた 5  $\text{cm}$  長さのバルーンを肛門から挿入し、肛門から 10  $\text{cm}$  の直腸付近で固定した。バルーンを空気で 35  $\text{mm Hg}$  になるよう膨張させ、この圧力で 35

分間維持させた。この拡張圧は、Okano et al. (2002) の報告<sup>67</sup> および予備検討で使用した拡張圧であり、この圧力では腹筋の収縮を起こさないことを確認している。大腸拡張 5 分後、モチリンまたは生理食塩液を 30 分間静脈内持続投与した。電極を LEG-1000 Biomedical Research System (日本光電) に接続し筋電図を記録し、30 分間持続投与中の腹筋収縮による筋電図のバースト回数を測定した。モチリンの最適用量を設定するために、モチリン 1、3 および 10  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{h}$  による腹筋収縮回数を上述の方法で測定した。モチリンは用量依存的に腹筋収縮回数を増加させ、最小有効用量は 3  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{h}$  であり(結果の項参照)、この用量を MA-2029 の薬効評価に用いた。モチリン誘発腹筋収縮に対する MA-2029 の効果は大腸拡張する 30 分前に MA-2029 (0.3, 1, 3  $\text{mg}/\text{kg}$ ) または vehicle を経口投与し、上述の方法で測定した。

### 2.3.9. 統計学的解析

データは平均値  $\pm$  標準誤差で示した。統計解析は Student の  $t$  検定または Dunnett 多重比較検定を用いた。用量または濃度依存性の検定は Jonckheere-Terpstra 検定を用いた。大腸の motility index と log 血漿中 MA-2029 濃度の相関は Pearson の相関解析を行った。 $P < 0.05$  を統計学的に有意とした。

## 2.4. 結果

### 2.4.1. 摘出十二指腸標本における収縮実験

アゴニストを暴露する前のウサギ摘出十二指腸縦走筋標本は、律動的な自発性収縮を示した。モチリンは濃度依存的に収縮したが (Figs. 8A and 9A)、vehicle (DMSO, final conc.: 0.1% v/v) は変化しなかった (Figs. 8A and 8C)。MA-2029 存在下では、モチリンの収縮-反応曲線は最大収縮を低下させずに右に平行移動した (Figs. 8B and 9A)。MA-2029 のモチリンに対する競合的阻害活性( $pA_2$ )は、 $9.17 \pm 0.01$  (n=5) で Schild-plot の傾きは  $1.04 \pm 0.08$  (n=5) (Fig. 9B) であった。高濃度の MA-2029 (1  $\mu$ M) はベースの運動あるいは自発収縮に対し影響を与えず (Fig. 8D)、またアセチルコリンまたはサブスタンス P の収縮を抑制しなかった (Fig. 8D and Table 3)。

### 2.4.2. ウサギ大腸モチリン受容体に対する親和性

モチリン受容体に対する MA-2029 の親和性を放射性リガンドを用いた受容体結合実験で検討した。ウサギ大腸平滑筋標本で、 $[^{125}I]$ モチリンの受容体への結合は、MA-2029 またはモチリンによって濃度依存的に置換し、それぞれの  $IC_{50}$  は  $2.74 \pm 0.24$  および  $1.29 \pm 0.13$  nM (n=4) であった。MA-2029 の  $pK_i$  は  $8.58 \pm 0.04$  (n=4)、モチリンの  $pK_d$  は  $9.03 \pm 0.05$  (n=4) であった。また、MA-2029 の Hill 係数は  $0.91 \pm 0.04$  であった。

### 2.4.3. ヒトモチリン受容体に対する親和性

Fig. 10 に示すように、MA-2029 はヒトモチリン受容体を発現している HEK 293 cells の細胞膜分画において、結合する  $[^{125}I]$ モチリンを濃度依存的に置換した。MA-2029 の  $IC_{50}$ 、 $pK_i$  はそれぞれ 4.9 nM、8.39 (mean of duplicate experiments) であった。

### 2.4.4. 他の受容体およびイオンチャネルに対する親和性

MA-2029 (1  $\mu$ M) の他の受容体およびイオンチャネルにおける阻害活性(percent



inhibition)をTable 2に示す。ウサギ大腸平滑筋モチリン受容体に対するMA-2029の $K_i$ の約300倍である1  $\mu$ Mの濃度でさえも24種類の受容体、7種類のイオンチャンネルで非常に低い親和性あるいはほとんど阻害活性は見られなかった (Table 2).

#### 2.4.5. 大腸運動に対する作用

24時間絶食後の意識下ウサギの大腸運動は、自発的で不規則な低振幅性の大腸収縮であった。ベースライン測定後(1時間)、モチリン(3  $\mu$ g/kg)静脈内投与すると20-30分間、高振幅性の大腸収縮が観察された (Fig. 11)。MA-2029 (3, 10, 30 mg/kg)または vehicle は大腸のトーンや自発運動に対し影響を与えなかったが、MA-2029経口投与後30分または4時間後に投与したモチリンの収縮を用量依存的に抑制した。その抑制は投与30分後では3 mg/kg以上で、投与4時間後では10 mg/kg以上で有意であった (Fig. 12)。したがって、MA-2029は10 mg/kg以上では、投与後30分以内から少なくとも4時間まではその抑制効果を持続していることが明らかとなった。

投与後30分後および4時間後の血漿中MA-2029濃度をTable 4に示す。血漿中MA-2029濃度は各時間で用量依存的であった。しかし、3 mg/kg投与30分後の血漿中濃度よりも10 mg/kg投与4時間後の値のほうが低かった (Table 4)。モチリン3  $\mu$ g/kg誘発大腸運動と血漿中MA-2029濃度の相関関係をプロットしたところ (Fig. 13)、有意な負の相関を示した( $r = -0.650$ ,  $P < 0.0001$ , Pearson's correlation test)。モチリン誘発大腸運動を50%抑制するのに必要な血漿中MA-2029濃度は10.5 ng/ml (17.7 nM)であった。

#### 2.4.6. 腹痛に対する効果

Fig. 14Aに示すように、意識下ウサギでの大腸拡張 (35 mmHg) 時において、モチリン3および10  $\mu$ g/kg/hの静脈内持続投与は、有意に腹筋収縮回数を増加させた。そこで、モチリン3  $\mu$ g/kg/hをMA-2029の薬効評価に使用した。MA-2029

(0.3, 1, 3 mg/kg)経口投与は、用量依存的に腹筋収縮回数を抑制し 3 mg/kg で有意であった (Fig. 14B)。

## 2.5. 考察および結論

ウサギ十二指腸平滑筋標本において、MA-2029 は濃度依存的で競合的にモチリン受容体アンタゴニスト活性を示し、アンタゴニスト活性の指標である  $pA_2$  は 9.17 であり、Schild-plot の傾きは 1.04 であった。MA-2029 は高濃度でもベースの自発性収縮に影響を与えなかったためアゴニスト活性を有さず、むしろ高濃度でもアセチルコリンやサブスタンス P による収縮を抑制しなかったため、モチリン受容体選択的なアンタゴニスト活性を有することが示された。さらに、radioligand binding assay で、MA-2029 は 24 種類の受容体および 7 種類のイオンチャンネルに対しての親和性が低いもしくはなかったため、モチリン受容体への選択性が高いことが明らかとなった。

ウサギ大腸平滑筋で、MA-2029 は非ラベル体のモチリンと同様に [ $^{125}$ I]モチリンを置換し、競合的なモチリン受容体アンタゴニスト活性を示した。さらに、MA-2029 はヒトモチリン受容体を発現している HEK 293 cells の細胞膜に結合する [ $^{125}$ I]モチリンを濃度依存的に置換した。この結果は、MA-2029 がヒトモチリン受容体に対し親和性を有することを示している。

*in vitro* 実験で、MA-2029 のアンタゴニスト活性の強さは、非ペプチドモチリン受容体アンタゴニストとして報告されている RWJ-68023 の 10 倍であった。MA-2029 はウサギ十二指腸平滑筋標本で  $pA_2$  は 9.17 であり、一方、RWJ-68023 は 6.96 であった。また、ウサギ大腸モチリン受容体に対する  $pKi$  および HEK-293 cells におけるヒトモチリン受容体に対する  $pKi$  は、それぞれ MA-2029 では 8.54 および 8.39、RWJ-68023 では 7.74 および 6.95 であった<sup>61</sup>。

意識下ウサギにおいて、MA-2029 経口投与はモチリン誘発大腸運動に対して、有意かつ用量依存的に抑制した。この抑制効果は血漿中 MA-2029 濃度とよく関連したため、MA-2029 の抑制効果は代謝物ではなく主に未変化体によって引き起こされたと考えられた。MA-2029 経口投与 4 時間後の血漿中濃度は、経口投与 30 分後の血漿中濃度の 6-15% であったため、MA-2029 は上部消化管から速やかに血中に移行し代謝されることが明らかとなった。

モチリン誘発大腸運動を 50%抑制するために必要なフリーの血漿中 MA-2029 濃度は、予備検討で MA-2029 の 90%が血清中のタンパクと結合するため、17.7 nM より低い値と考えられる。それゆえ、モチリンによる大腸運動を 50%抑制するために要するフリーの血漿中 MA-2029 濃度は、大腸平滑筋受容体でのモチリンに対する置換曲線から得られた MA-2029 の IC<sub>50</sub> (2.74 nM)とほぼ同等であることが示唆された。

意識下ウサギにおいて、大腸拡張時のモチリンの静脈内持続投与は、用量依存的に腹痛の指標である腹筋の収縮を増加させた。意識下ウサギにおいて、モチリンは大腸運動を亢進し大腸の緊張を高めることから、これらのモチリンの作用によって大腸拡張刺激の腹痛を増悪させたと考えられた。MA-2029 経口投与は用量依存的にモチリンによる腹筋収縮を抑制し、最小有効量は 3 mg/kg であった。慢性的な腹痛または不快感は過敏性腸症候群患者の最も共通の症状であるので<sup>69</sup>、この結果から、MA-2029 は過敏性腸症候群の治療薬としての可能性が期待できる。さらに、Mertz らは過敏性腸症候群のほとんどの患者が、侵害受容の閾値が低く、大腸拡張に対して過敏であることを報告している<sup>70</sup>。モチリン誘発大腸運動の実験で、MA-2029 は腹筋収縮を抑制した同用量の 3 mg/kg 投与後 30 分でモチリン誘発大腸運動を有意に抑制したことから、MA-2029 はモチリンによる収縮を抑制して腹痛を緩和したと考えられる。

過敏性腸症候群患者の血中モチリン濃度の報告では、いくつか矛盾が見られる。ある試験では、過敏性腸症候群患者の血中モチリン濃度は増加している報告もあれば<sup>53,71</sup>、変化が見られないまたは低いとの報告もある<sup>72-74</sup>。また、過敏性症候群患者に心理的ストレスを与えることにより、血中モチリン濃度が増加したとの報告もある<sup>55</sup>。これらの報告の矛盾の理由として、血中モチリン濃度と伝播性収縮の収縮相の関係が考えられる。血中モチリン濃度によって伝播性収縮の収縮相(phase)は制御されている<sup>43</sup>。上述の報告は伝播性収縮を調べていない。しかし、最近、Simrén らは、過敏性腸症候群患者では伝播性収縮のすべての収縮相で血中モチリン濃度が増加し、食後でもその増加が観察されたことを報告した<sup>54</sup>。それゆえ、過敏性腸症候群患者の症状起因の一つとして、血中モチリン

濃度の増加が消化管運動の過亢進、侵害受容の悪化の要因であることが示唆された<sup>53,54</sup>。

モチリンは、健常人において機能性胃腸症のような食後弛緩（胃受容性）障害や食後不快感を引き起こすので、血中モチリン濃度の増加は機能性胃腸症の病因であると考えられている<sup>75-77</sup>。それゆえ、モチリンアンタゴニストは機能性胃腸症患者に対して有用である可能性が示唆された。Kamerling らの報告によれば、健常人に RWJ-68023 を静脈内持続投与したところ(total dose, 3.62 mg/kg)、近位胃のベースの体積に影響を与えなかったが、モチリン静脈内持続投与により近位胃の収縮を 60%まで減少させた<sup>62</sup>。近位胃における RWJ-68023 のモチリンアンタゴニスト作用は部分的ではあるが、この結果は機能性胃腸症の治療にモチリンアンタゴニストが貢献できる可能性を示唆した。本実験では、MA-2029 は経口投与可能な選択的なモチリンアンタゴニストであり、また RWJ-68023 よりも約 10 倍強いアンタゴニスト活性を有するので、過敏性腸症候群や機能性胃腸症のような消化管運動機能障害の患者での MA-2029 の経口投与での効果を検討する臨床試験が望まれる。

結論として、ウサギを用いた *in vitro* および *in vivo* 実験において、MA-2029 はモチリン受容体アゴニスト活性がなく、経口投与可能な選択的・競合的なモチリン受容体アンタゴニストであることを確認した。また、MA-2029 はヒトモチリン受容体に濃度依存的に結合活性を示した。MA-2029 は過敏性腸症候群および機能性胃腸症のような消化管運動機能障害の患者や血中モチリン濃度の増加が病因となる機能障害の患者に対する治療に有用である可能性が示唆された。

## 2.6. Figures and Tables

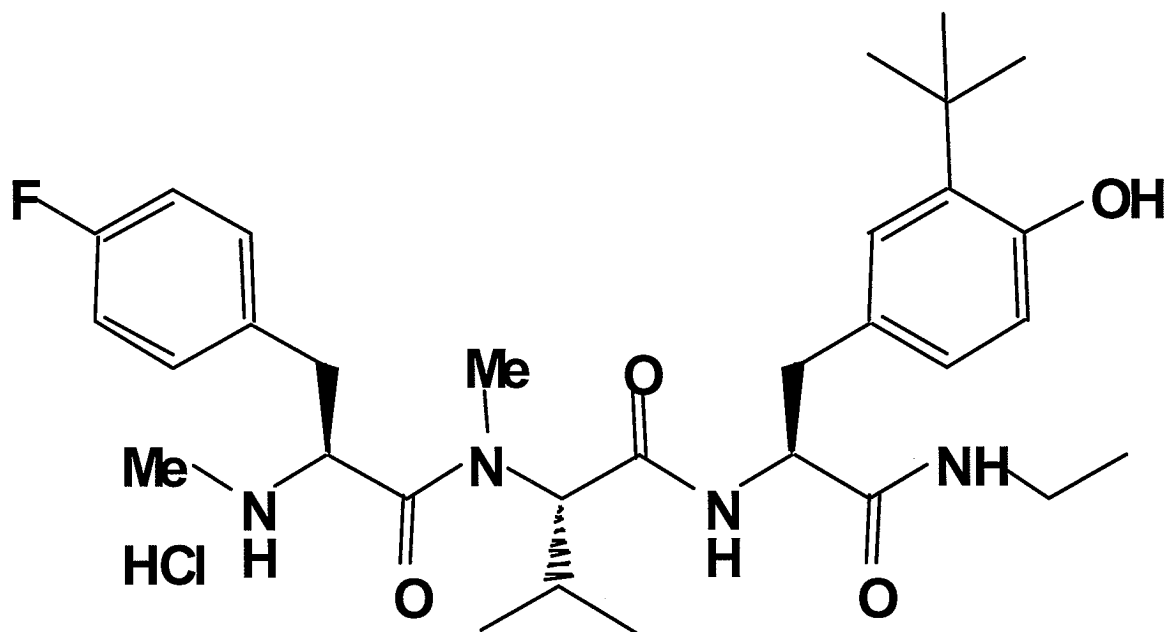


Figure 7. Chemical structure of MA-2029. (Molecular weight = 593.17)

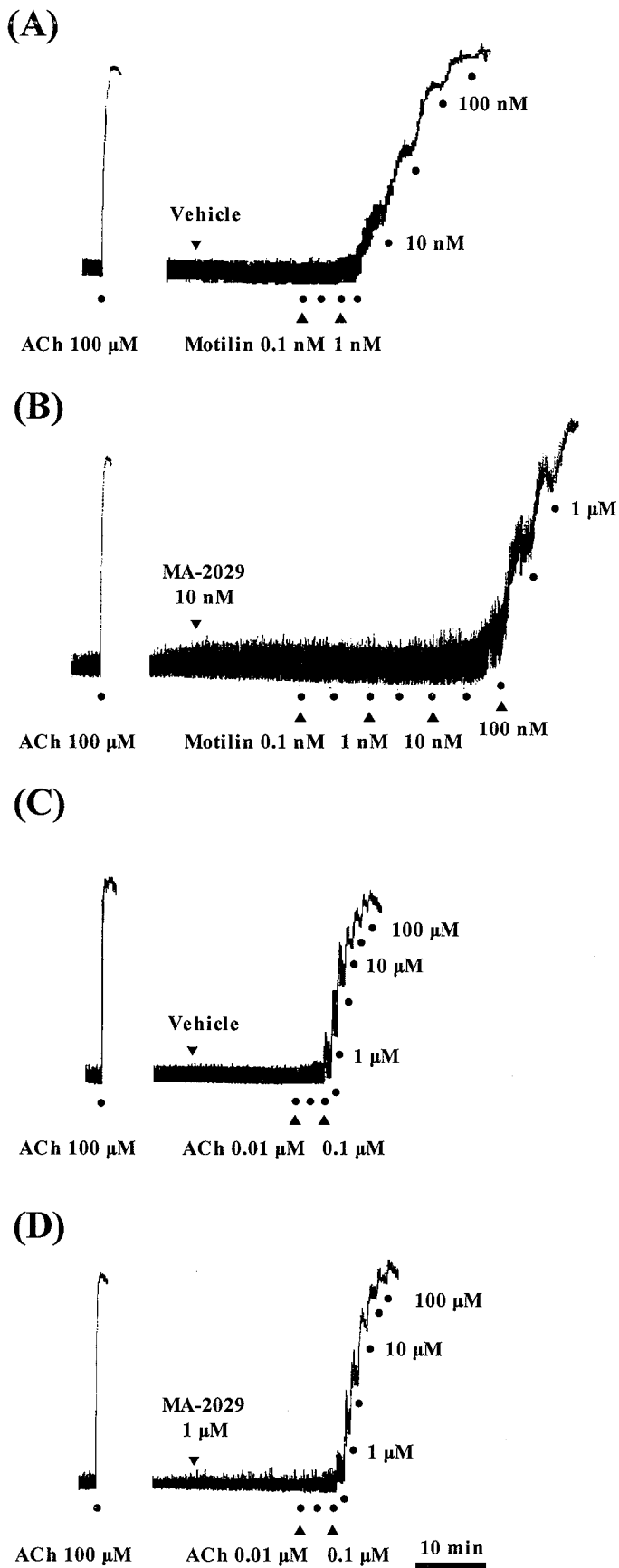
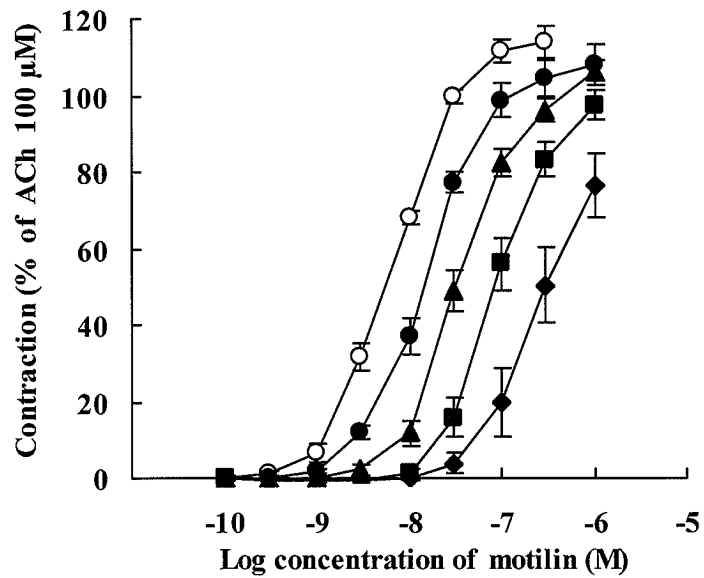


Figure 8. Typical tracings of contractions of isolated strips of rabbit duodenum induced by cumulative application of motilin in the absence (A) or presence (B) of MA-2029 or induced by cumulative application of acetylcholine (ACh) in the absence (C) or presence (D) of MA-2029. MA-2029 was added to the bath 15 min before application of motilin or ACh. The concentrations shown are concentrations in the organ bath. For comparison, response to 100  $\mu$ M ACh is shown at the left of each part.

(A)



(B)

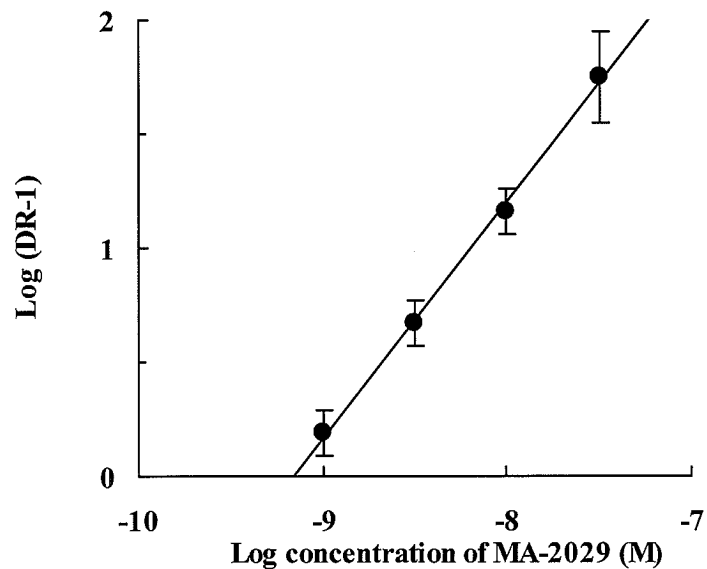


Figure 9. Inhibitory effects of MA-2029 on the induction of contraction of isolated strips of rabbit duodenum by motilin. (A) Cumulative motilin-induced concentration-contraction curves in the presence of  $\circ$  0 nM,  $\bullet$  1 nM,  $\blacktriangle$  3 nM,  $\blacksquare$  10 nM or  $\blacklozenge$  30 nM MA-2029. Contraction is shown as percentage of that induced by 100  $\mu$ M acetylcholine (ACh). Points and bars represent means  $\pm$  S.E.M. of 5 strips from 5 animals. (B) Schild plot analysis. Points and bars represent means  $\pm$  S.E.M. of 5 strips from 5 animals.  $pA_2 = 9.17 \pm 0.01$ , slope =  $1.04 \pm 0.08$ .



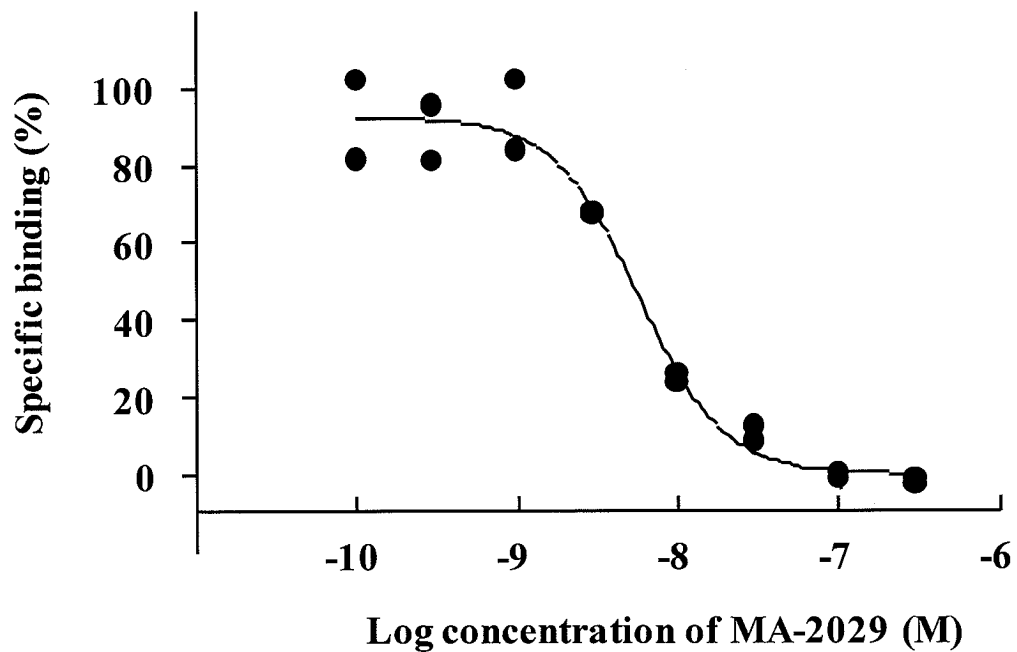


Figure 10. Displacement of [ $^{125}$ I]motilin binding to cell membranes from HEK 293 cells by MA-2029. Each point represents the result from duplicate experiments. Binding data were analyzed by a nonlinear curve-fitting program (Prism; GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

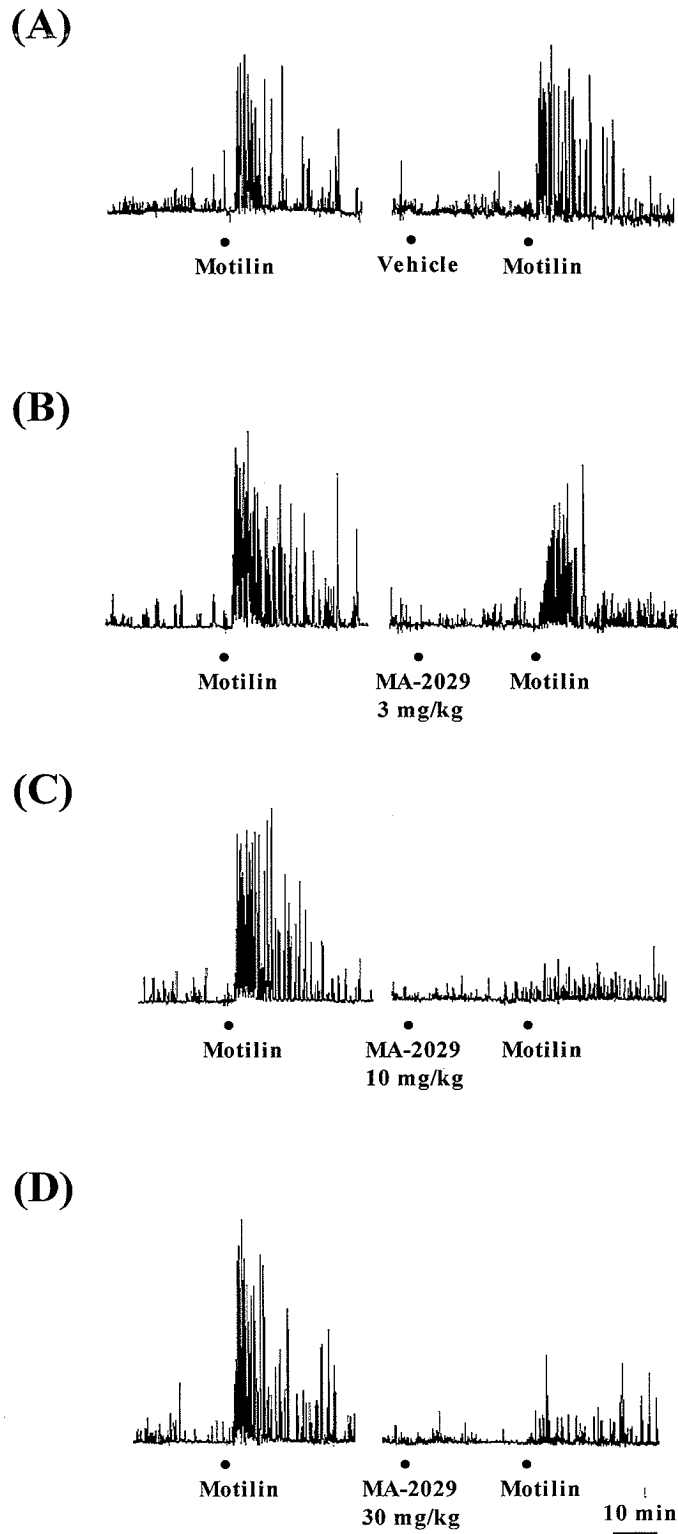


Figure 11. Typical tracings of colonic contractile activity induced by intravenous injection of motilin ( $3 \mu\text{g}/\text{kg}$ ) in conscious rabbits without (left, the first injection of motilin) or with (right, the second injection of motilin) prior oral administration of MA-2029 (B-D) or vehicle (A).

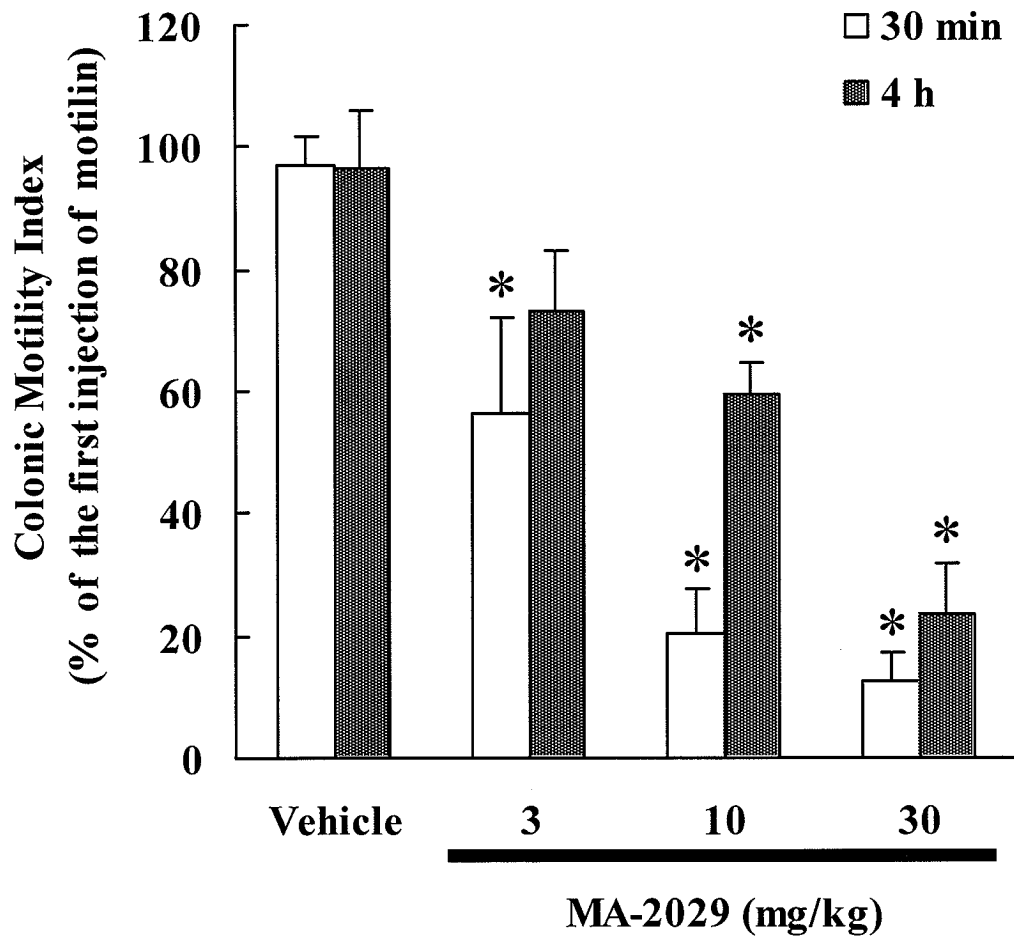


Figure 12. Colonic motility index induced by the second injection of motilin (3  $\mu$ g/kg, i.v.) in conscious rabbits either 30 min or 4 h after oral administration of MA-2029 or vehicle (relative to that induced by the first injection of motilin). Columns and bars represent means  $\pm$  S.E.M. of 6 rabbits. \* $P$ <0.05 vs. vehicle by Dunnett's multiple comparison test.

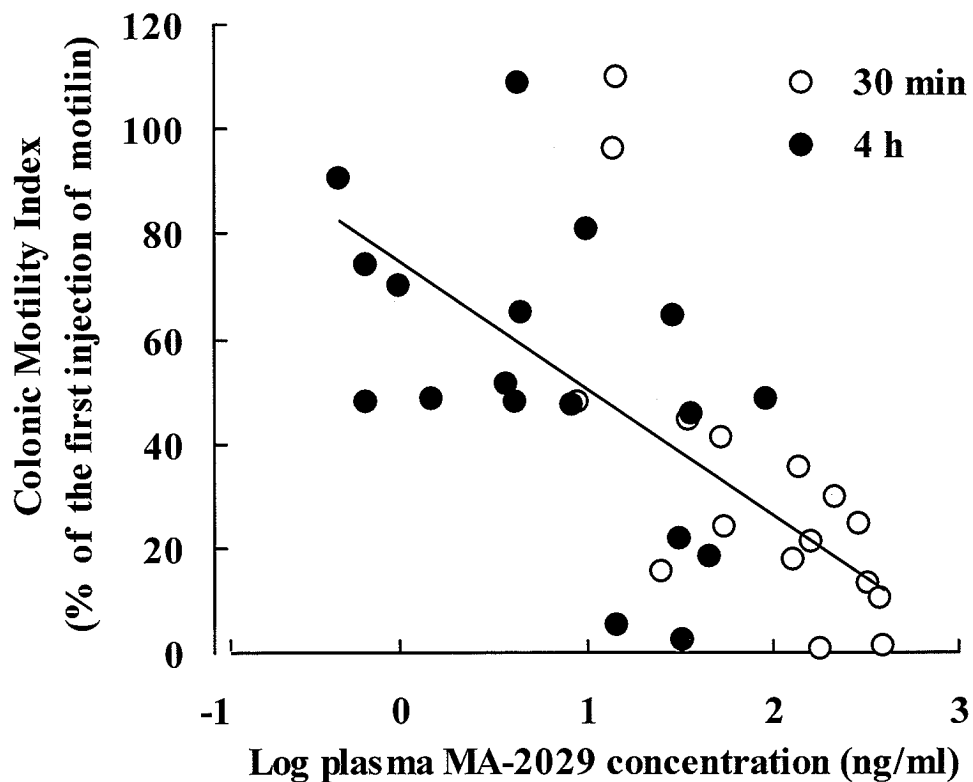
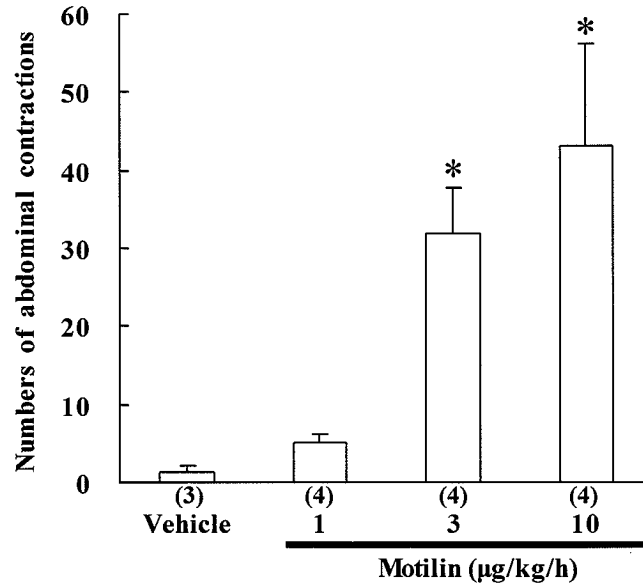


Figure 13. Correlation between the log plasma MA-2029 concentration and the colonic motility index induced in conscious rabbits by motilin (3  $\mu\text{g}/\text{kg}$  i.v.) administered at 30 min (○) or 4 h (●) after oral administration of MA-2029 (3 to 30 mg/kg). The correlation was  $-0.650$  ( $P < 0.0001$ , Pearson correlation test). The regression line is shown.

(A)



(B)

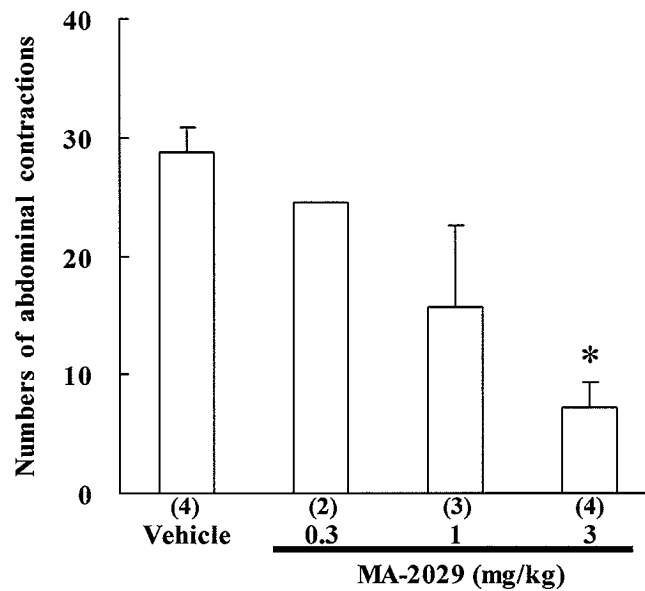


Figure 14. (A) Effects of continuous intravenous infusion of motilin (1-3  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{h}$ ) on abdominal muscle contractions (an index of visceral pain) in conscious rabbits during colorectal distension (35 mmHg). (B) Inhibitory effects of prior administration of MA-2029 on abdominal muscle contractions induced by intravenous infusion of motilin (3  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{h}$ ). Numbers of animals are shown in parentheses, columns and bars represent means  $\pm$  S.E.M. \* $P < 0.05$  vs. vehicle by Dunnett's multiple comparison test.

Table 2. Effects of 1  $\mu$ M MA-2029 on specific radioligand binding to receptors and ion channels.

Receptor	Ligand	Source	Inhibition <sup>a</sup> (%)
Adrenergic $\alpha_2$ , non-selective	[ <sup>3</sup> H]RX 821002	rat cerebral cortex	-8.6
Adrenergic $\beta_3$	[ <sup>125</sup> I]Cyanopindolol	SK-N-MC cells	-1.5
Benzodiazepine, central	[ <sup>3</sup> H]flunitrazepam	rat cerebral cortex	-1.5
Calcitonin gene-related peptide	[ <sup>125</sup> I]hCGRP $\alpha$	SK-N-MC cells	-11.8
Cholecystokinin CCK <sub>A</sub>	[ <sup>3</sup> H]Devazepide	human recombinant	-11.0
Dopamine D <sub>1</sub>	[ <sup>3</sup> H]SCH 23390	human recombinant	-8.2
Dopamine D <sub>2</sub>	[ <sup>3</sup> H]Spiperone	human recombinant	-1.3
GABA <sub>B</sub>	[ <sup>3</sup> H]GABA	rat cerebral cortex	-20.9
Muscarinic M <sub>1</sub>	[ <sup>3</sup> H]pirenzepine	human recombinant	6.2
Muscarinic M <sub>2</sub>	[ <sup>3</sup> H]AF-DX 384	human recombinant	0.7
Muscarinic M <sub>3</sub>	[ <sup>3</sup> H]4-DAMP	human recombinant	3.0
Nicotinic, neuronal	[ <sup>3</sup> H]Cytisine	rat cerebral cortex	-11.0
Tachykinin NK <sub>1</sub>	[Sar <sup>9</sup> ,Met(O <sub>2</sub> ) <sup>11</sup> ]-SP	U-373MG cells	3.8
Tachykinin NK <sub>2</sub>	[ <sup>125</sup> I]NKA	human recombinant	24.5
Neurotensin NT <sub>1</sub>	[ <sup>125</sup> I]Tyr <sup>3</sup> -neurotensin	human recombinant	4.3
Opioid $\delta$	[ <sup>3</sup> H]DPDPE	human recombinant	-0.3
Opioid $\kappa$	[ <sup>3</sup> H]U 69593	human recombinant	-14.8
Opioid $\mu$	[ <sup>3</sup> H]DAMGO	human recombinant	20.3
Serotonin 5-HT <sub>1A</sub>	[ <sup>3</sup> H]8-OH-DPAT	human recombinant	0.5
Serotonin 5-HT <sub>3</sub>	[ <sup>3</sup> H]BRL 43694	human recombinant	-4.2
Serotonin 5-HT <sub>4</sub>	[ <sup>3</sup> H]GR 113808	guinea pig striatum	-10.8
Serotonin 5-HT <sub>7</sub>	[ <sup>3</sup> H]LSD	human recombinant	6.6
Somatostatin, non-selective	[ <sup>125</sup> I]Tyr <sup>11</sup> -somatostatin	AtT-20 cells	-3.2
Vasoactive intestinal peptide	[ <sup>125</sup> I]VIP	HT-29 cells	-6.7

<b>Ion channel</b>	<b>Ligand</b>	<b>Source</b>	<b>Inhibition<sup>a</sup> (%)</b>
Ca channel L, DHP site	[ <sup>3</sup> H]PN 200-110	rat cerebral cortex	-4.6
Ca channel L diltiazem site	[ <sup>3</sup> H]diltiazem	rat cerebral cortex	3.8
Ca channel L verapamil site	[ <sup>3</sup> H]D 888	rat cerebral cortex	-6.0
Ca channel N type	[ <sup>125</sup> I]ω-conotoxin GVIA	rat cerebral cortex	5.3
K channel ATP sensitive	[ <sup>3</sup> H]glibenclamide	rat cerebral cortex	1.1
K channel Voltage dependent	[ <sup>125</sup> I]dendrotoxin	rat cerebral cortex	-5.6
K channel Ca dependent	[ <sup>125</sup> I]apamin	rat cerebral cortex	11.1

<sup>a</sup> Percent inhibition of control specific binding (means, n=2).

Table 3. Effects of MA-2029 (1  $\mu$ M) on pD<sub>2</sub> values and maximal contraction induced by acetylcholine and substance P in isolated rabbit duodenal longitudinal muscle strips.

Agonist	pD <sub>2</sub> value		Maximal contraction (% of response to 100 $\mu$ M ACh)	
	Control	With MA-2029	Control	With MA-2029
ACh	6.03 $\pm$ 0.12	5.96 $\pm$ 0.16	104.9 $\pm$ 2.2	102.6 $\pm$ 1.4
Substance P	8.22 $\pm$ 0.09	8.12 $\pm$ 0.07	83.9 $\pm$ 4.3	90.5 $\pm$ 4.5

Means  $\pm$  S.E.M. (n=5 strips from 5 animals). Differences from control were not significant (Student's *t* test). Acetylcholine: ACh.



Table 4. Plasma MA-2029 concentration 30 min and 4 h after oral administration of MA-2029.

MA-2029 dose (mg/kg)	Plasma concentration (ng/ml)	
	30 min	4 h
3	25.8 ± 7.1	1.5 ± 0.6
10	147.2 ± 39.9	10.1 ± 4.0
30	280.1 ± 43.0	43.2 ± 11.1

Means ± S.E.M., n=5

**3. 第3部  $K_{ATP}$  チャンネル開口作用と NO 作用を有するニコランジルのラット尿道閉塞誘発頻尿に対する改善効果**

### 3.1. 要約

ラット部分的尿道閉塞(BOO)モデルを用いて、ニコランジルの頻尿改善効果を明らかにするとともに、血圧に対する影響についても検討した。ラットに部分的尿道閉塞術を施し、6-8日回復後、薬物とともに30 ml/kgの水を経口投与し排尿行動を観察した。また、意識下BOOラットに薬物経口投与後、tail cuff法を用いて血圧を測定した。BOOラットは正常ラットに比べ、排尿回数が増加し、1回排尿量が減少した。ニコランジル(1 mg/kg)、クロマカリム(0.1 mg/kg)およびisosorbide dinitrate (ISDN; 1000 mg/kg)はBOOラットで排尿回数を有意に減少させた。また、ニコランジルは1回排尿量も有意に増加させた。クロマカリム、ISDNは排尿回数を減少させた用量で血圧を低下させたが、ニコランジルは血圧に影響を与えなかった。結論として、ニコランジルは血圧を下げることなく頻尿改善効果を示した。これらの結果から、ニコランジルは膀胱選択性の高い過活動膀胱の治療薬として有用である可能性が示唆された。

### 3.2. 序論

高齢社会の進行に伴い、下部尿路機能障害を有する患者数が増加している。これらの症状は蓄尿障害(頻尿、夜間頻尿、失禁)と排出障害(不完全な排出、尿閉)に分けられる。頻尿は過活動膀胱(OAB)や前立腺肥大症(BPH)による尿道閉塞によって起こる重大な泌尿器症状のひとつである。抗コリン薬は多くの頻尿患者の症状を緩和し、治療の第一選択薬である<sup>78</sup>。しかし、抗コリン薬に治療抵抗性を示す患者や口渇、便秘、かすみ目、尿閉などの副作用によって使用が限られ、必ずしも治療満足度は得られていない。それゆえ、新規メカニズム、または抗コリン薬より効果のある薬剤の開発が求められている。現在、膀胱選択性の高い抗コリン薬、 $\beta$ アゴニスト、 $\alpha$ アンタゴニスト、Kチャネル開口薬など様々なメカニズムを有する薬剤の開発が進められているが、その中でもATP感受性Kチャネル開口薬(KCO)とnitric oxide(NO)ドナーが新規メカニズムを有する有望な候補薬剤とされている。膀胱平滑筋でのKチャネルの開口は膜の過分極を起こし、電位依存的Caチャネルを介しCaの流入を抑制し膀胱平滑筋を弛緩させる。ATP感受性Kチャネルはヒトやラットなどの膀胱で確認されている<sup>79</sup>。ピナシジル、クロマカリムのようなKCOはヒトを含む数種の動物種で摘出膀胱の収縮を抑制することが報告されている<sup>80-82</sup>。クロマカリムはラットにおいて排尿間隔を増加させるが、血圧も同時に低下させる<sup>83</sup>。排尿にNOが重要な役割を果たすことは広く知られている<sup>79</sup>。Masudaらは、内因性および外因性のNOがカプサイシン誘発膀胱過活動モデルで膀胱の求心性神経からの伝達物質の放出、または求心性神経の興奮を抑制することによって反射性の膀胱活動を抑制することを報告している<sup>84</sup>。このように、我々はKCO作用に加えNO作用を有する薬剤がKCO作用のみを有する薬剤より、頻尿の治療により有用であるのではないかと考えた。

ニコランジル(2-nicotinamidoethyl-nitrate ester)はKCO作用とNO作用を併せ持つ狭心症、急性心不全治療薬である。ニコランジルはヒトで血圧を低下させずに冠血流を改善させることが知られている<sup>85</sup>。最近、ニコランジルの頻尿に対する薬理学的作用が3種の異なるOABモデルで報告された<sup>86</sup>。本検討では、BOO

ラットモデルを用いて、ニコランジルが血圧を変化させずに頻尿を改善することを明らかにし、純粋な KCO であるクロマカリムおよび NO ドナーである isosorbide dinitrate (ISDN) と比較した。

### 3.3. 実験材料および実験方法

本研究はすべて中外製薬株式会社「実験動物指針」にのっとり、倫理的配慮を持って遂行した。

実験には雌性 SD ラット(140-200 g、日本 SLC(株))を用いた。BOO モデルの作製は Malmgren らの方法を参考にして行った<sup>87</sup>。雌性 SD ラットをイソフルランで麻酔し、開腹して膀胱、尿道を露出した。直径 1.2 mm のステンレス棒とともに尿道を結紮した後ステンレス棒を取り除き閉腹した。実験を始める前に、尿失禁を示した(尿道口周辺部が濡れている)個体は本実験から除外した。

術後 6-8 日後の排尿行動を Hashimoto らの方法を改変して測定した<sup>88</sup>。排尿量の測定は代謝ケージにて、尿量測定システム(Ver. 1.02、室町機械(株))を用いて行った。ラットを代謝ケージに入れ 30 分間馴化させた後、水 30 ml/kg をラットに経口投与し、3 時間排尿行動を測定した(pre-drug session)。頻尿を示した個体に薬物を 30 ml/kg で経口投与し 3 時間排尿行動を測定した(drug treatment session)。Drug treatment session 終了後すぐに、ペントバルビタール(100 mg/kg, ip)で麻酔し、膀胱に残っている尿(残尿)を採取し、その量を測定した。また、尿道狭窄の程度を確認するため、膀胱を摘出し重量を測定した。

血圧および心拍数の測定は、意識下 BOO ラットを用いて非観血式血圧測定装置(UR-5000、室町機械(株))で行い、薬物投与前および薬物投与後 30 分の値を測定した。

ニコランジルおよびクロマカリムは中外製薬(株)富士御殿場研究所にて合成されたものを用いた。ISDN は Sigma-Aldrich より購入した。ニコランジルは蒸留水で溶解させ、クロマカリムおよび ISDN は 3%アラビアゴムで懸濁し、30 ml/kg で動物に経口投与した。

結果は平均値 ± 標準誤差で示した。統計解析は、排尿行動評価では Student の *t* 検定または Dunnett 多重比較検定、血行動態評価では対応のある *t* 検定を行った。 $P < 0.05$  を有意差ありと判断した。統計解析は SAS 8.02 (SAS Institute, Cary NC USA)を用いて行った。

### 3.4. 結果

薬物投与前の水負荷試験(pre-drug session)で、ラットに尿道狭窄を施すことによって、排尿回数が増加し( $3.4 \pm 0.3$  to  $18.6 \pm 1.4$  n/3h)、1回排尿量が減少した( $1.15 \pm 0.12$  to  $0.13 \pm 0.01$  ml/void)。尿道狭窄群において、排尿回数、1回排尿量ともに群間での有意差は認められなかった。実験終了後に摘出したBOOラットの膀胱重量はnon-BOOラットの膀胱重量の約3倍であり( $83.2 \pm 6.0$  vs  $234.4 \pm 18.2$  mg)、尿道狭窄群での群間差は見られなかった。Vehicleを投与した尿道狭窄群(control群)の排尿パラメーターは、pre-drug sessionとdrug treatment sessionで特に変化は見られなかった。

ニコランジルは、1 mg/kgで有意に排尿回数を減少させ、1回排尿量を増加させた(Fig.15)。また、ニコランジルはcontrol群に比べ、残尿量を有意に減少させた(Table 5)。クロマカリムは0.1 mg/kgで有意に排尿回数を減少させ(Fig. 16A)、1回排尿量を増加させる傾向を示した(Fig. 16B)。ISDN (1000 mg/kg)は排尿回数を有意に減少させ、1回排尿量を増加させ、残尿量を減少させる傾向を示した(Fig. 16, Table 5)。

ニコランジル、クロマカリムおよびISDNの血圧、心拍数に対する影響をTable 6に示す。ニコランジルはBOOラットで頻尿を改善させた用量の1 mg/kgで血圧および心拍数に対して影響を与えなかった。一方、クロマカリムおよびISDNは、それぞれ頻尿を改善させた用量の0.1 mg/kg、1000 mg/kgで、有意な血圧の低下および心拍数の増加を示した。

### 3.5. 考察および結論

本検討では、ニコランジル経口投与により、血圧に影響を与えずに排尿回数および残尿量を有意に減少させ、1回排尿量を有意に増加させた。これに対し、クロマカリムおよびISDNは排尿回数を減少させたが、同時に血圧も低下させた。ニコランジルによって活性化されるATP感受性Kチャネル(SUR2B/Kir6.2)は、膀胱および血管平滑筋に存在することが報告されているが<sup>89,90</sup>、BOOラットにおいてニコランジルは血管よりも膀胱選択的に作用することが実証された。このようなニコランジルの膀胱選択性のメカニズムは、ニコランジルがKCO作用とNO作用を有するハイブリッド化合物であるがゆえに、純粋なKCOまたは純粋なNOドナーに比べ、強力な効果を有する可能性が考えられた。ニコランジルはKCO作用によって膀胱平滑筋を弛緩させ、蓄尿期の膀胱容量を増大させる<sup>79,86</sup>。また、ニコランジルはKCO作用およびNO作用によって尿道平滑筋を弛緩させることが知られている<sup>91</sup>。これらの知見から、ニコランジルのKCO作用およびNO作用の相乗的なメカニズムにより、1回排尿量の増加および残尿量の減少を引き起こし、尿道閉塞モデルにおいて排尿回数を減少させていると考えられる。ニコランジルと同様なKCO作用とNO作用を有するKRN2391は、膀胱過活動を強力に抑制することが報告されている<sup>86,92</sup>。さらに、ニコランジルは冠動脈選択的に血管拡張作用を有することが知られているが、その有効量では血圧に影響を与えないことが報告されている<sup>85,93</sup>。高用量のニコランジルでは、経口投与後30分に血圧低下作用を示すが(unpublished observation)、本検討で用いたニコランジル(1 mg/kg)では血圧に対して影響を示さなかった。

ラットにおいて、クロマカリムは膀胱過活動を抑制するが、同時に血圧も低下させることが報告されている<sup>83</sup>。クロマカリムのような第一世代KCOは膀胱平滑筋に選択的でなかったために、臨床での使用が断念された。実際、臨床研究において、クロマカリムはOAB患者の症状を改善したが、副作用として血圧低下作用を示したために、OAB治療薬としての開発は中止となった<sup>94</sup>。最近、ZD0947、ZD6169、ZM226600、WAY-133537、A-251179といった膀胱選択性を有する第二世代のKCOが開発され、前臨床試験が行われている<sup>79,95-97</sup>。これらの



化合物は、血圧低下作用を示さずに低用量で膀胱過活動を改善することが報告されている。このように、これらの薬剤は OAB や BPH に見られる頻尿の治療薬として期待され、臨床研究の結果が待たれる。

NO は血管機能と同様に、下部尿路機能の重要な調節因子のひとつである。神経解剖学的に、ラットの尿道は NO 神経によって支配され、NO 合成酵素が多く存在し、膀胱ではそれらの分布が少ないことが報告されている<sup>79,98,99</sup>。NO ドナーを投与すると尿道平滑筋が弛緩し、尿道内圧が低下する<sup>92,100</sup>。ヒトに ISDN を舌下投与したところ、尿道抵抗を低下させた<sup>101,102</sup>。さらに、内因性および外因性の NO は、シクロホスファミドまたはカプサイシンで過敏にさせたラット膀胱の求心性知覚神経の興奮を抑制した<sup>84,103</sup>。これらの知見は、NO が膀胱・尿道機能に生理学的・病態生理学的な役割を果たしていることを支持し、NO は排尿期に尿道、尿道括約筋を弛緩させることにより、尿道抵抗を減少させるだけでなく、膀胱の求心性神経機能の抑制に関わっていることを示唆している。

頻尿におけるニコランジルの膀胱選択的な作用メカニズムの解明には、さらなる検討が必要であるが、少なくともニコランジルの KCO 作用と NO 作用のハイブリッド効果が、純粋な KCO あるいは純粋な NO ドナーよりも膀胱選択的で優れていると考えられ、OAB、BPH で見られる頻尿に対して新たな作用メカニズムを有する治療薬候補のひとつとして期待される。

結論として、KCO 作用と NO 作用を併せ持つニコランジルの BOO ラットにおいて血圧を低下させずに頻尿を改善することが示された。

### 3.6. Figures and Tables

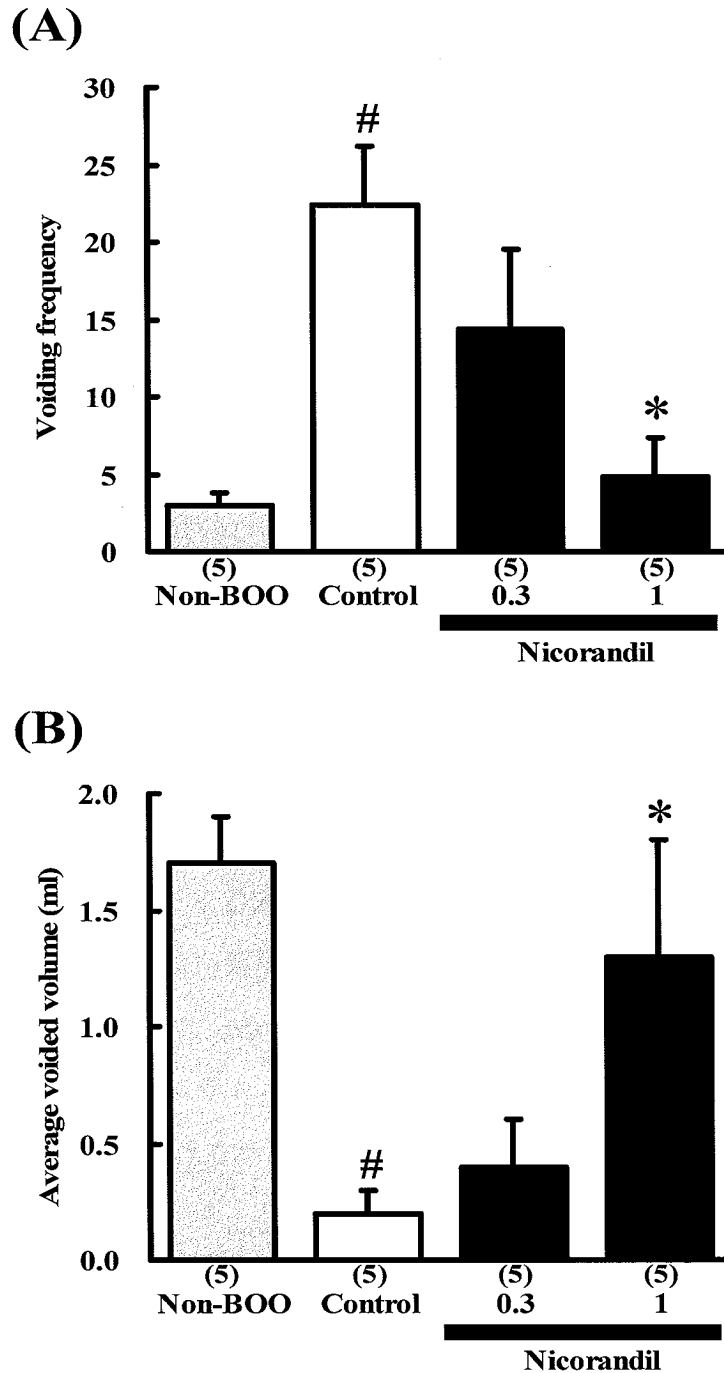


Figure 15. Effects of nicorandil on voiding behavior in rats with BOO. (A) voiding frequency, (B) average voided volume. Nicorandil (0.3-1 mg/kg) or vehicle was administered orally and each characteristic of voiding behavior was measured. Numbers in parentheses indicate the number of animals in each group. Each bar represents the mean  $\pm$  SEM of 5 rats. Statistical significance was evaluated by Dunnett's test (\*;  $P < 0.05$ ). <sup>#</sup> $P < 0.05$  between the non-BOO rats treated with vehicle (Non-BOO) and the BOO rats treated with vehicle (control) by Student's *t* test.

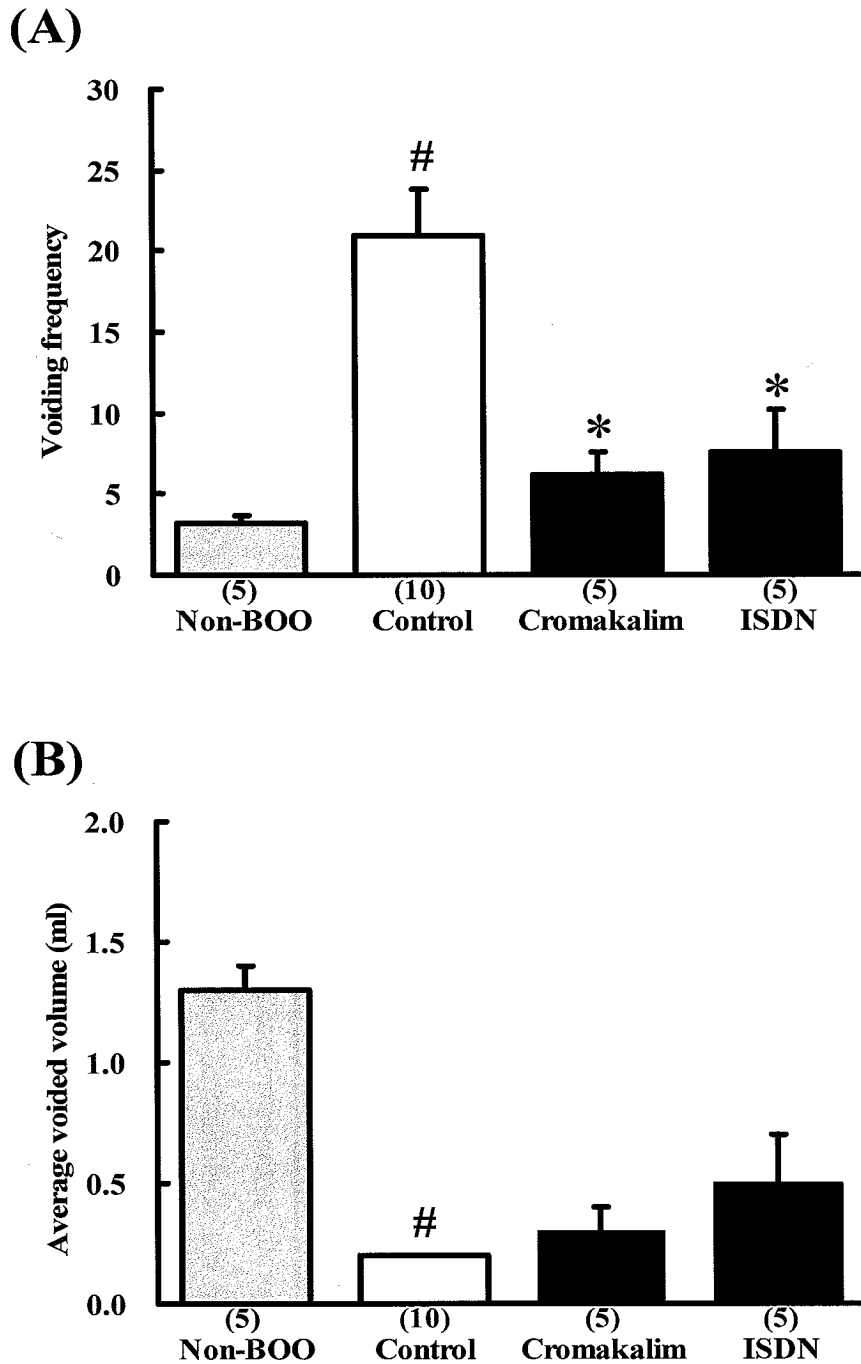


Figure 16. Effects of cromakalim and ISDN on voiding behavior in rats with BOO. (A) voiding frequency, (B) average voided volume. Cromakalim (0.1 mg/kg), ISDN (1000 mg/kg) or vehicle was administered orally and each parameter of voiding behavior was measured. Numbers in parentheses indicate the number of animals in each group. Each bar represents the mean  $\pm$  SEM of 5-10 rats. Statistical significance was evaluated by Dunnett's test (\*;  $P < 0.05$ ). # $P < 0.05$  between the non-BOO rats treated with vehicle (Non-BOO) and the BOO rats treated with vehicle (control) by Student's *t* test.

Table 5. Effects of nicorandil, cromakalim and ISDN on residual urine volume in rats.

Treatment	Dose (mg/kg)	Number	Residual urine volume (ml)
Non-BOO <sup>a</sup>	–	5	1.2 ± 0.4
Control <sup>a</sup>	–	5	4.0 ± 0.5 <sup>#</sup>
Nicorandil	0.3	5	2.8 ± 0.5
Nicorandil	1	5	2.2 ± 0.2 <sup>*</sup>
Non-BOO <sup>b</sup>	–	5	0.9 ± 0.2
Control <sup>b</sup>	–	10	4.0 ± 0.6 <sup>#</sup>
Cromakalim	0.1	5	3.9 ± 0.8
ISDN	1000	5	2.4 ± 0.5

a: Distilled water was administered orally as the corresponding vehicle for nicorandil.

b: Three percent gum arabic solution was administered orally as the corresponding vehicle for cromakalim and ISDN.

Data represent mean ± SEM from 5-10 rats. <sup>#</sup>*P*<0.05 between the non-BOO rats treated with vehicle (Non-BOO) and the BOO rats treated with the corresponding vehicle (control) by Student's *t* test. <sup>\*</sup>*P*<0.05 between control and treatment group by Dunnett's test.

Table 6. Effects of nicorandil, cromakalim and ISDN on blood pressure and heart rate in BOO rats.

Treatment	Dose (mg/kg)	Number	Systolic blood pressure (mmHg)		Heart rate (beat/min)	
			Before	After	Before	After
Vehicle	–	5	150 ± 4	154 ± 4	411 ± 22	412 ± 32
Nicorandil	1	5	158 ± 4	154 ± 5	407 ± 13	437 ± 10
Cromakalim	0.1	5	147 ± 5	118 ± 5 *	423 ± 15	519 ± 9 *
ISDN	1000	5	157 ± 4	126 ± 3 *	419 ± 18	513 ± 15 *

Data represent mean ± SEM from 5 rats. Systolic blood pressure and heart rate were measured before and 30 min after oral drug administration. \* $P < 0.05$  by paired  $t$  test.

#### 4. 参考文献

- 1 Perdue C. Managing constipation in advanced cancer care. *Nurs Times* 2005; **101**: 36-40.
- 2 Bleser S, Brunton S, Carmichael B, Olden K, Rasch R, Steege J. Management of chronic constipation: Recommendations from a consensus panel. *J Fam Pract* 2005; **54**: 691-8.
- 3 Koch TR. Constipation. In: Haubrich WS, Schaffner F (Eds.), *Bockus Gastroenterology*, 5th edition. Vol. I. WB Saunders, Philadelphia, pp.102-12, 1995.
- 4 Longstreth GF, Thompson WG, Chey WD, Houghton LA, Mearin F, Spiller RC. Functional bowel disorders. *Gastroenterology* 2006; **130**: 1480-91.
- 5 Sasaki K, Yamauchi K, Kuwano S. Metabolic activation of sennoside A in mice. *Planta Med* 1979; **37**: 370-8.
- 6 Corazziari E, Materia E, Bausano G, Torsoli A, Badiali D, Fanucci A, Fraracci L, Morini S, Capurso L, Montesi A.. Laxative consumption in chronic nonorganic constipation. *J Clin Gastroenterol* 1987; **9**: 427-30.
- 7 Duncan A, Morris AJ, Cameron A, Stewart MJ, Brydon WG, Russell RI. Laxative induced diarrhoea — A neglected diagnosis. *J R Soc Med* 1992; **85**: 203-5.
- 8 Itoh Z. Motilin and clinical application. *Peptides* 1997; **18**: 593-608.
- 9 Itoh Z, Nakaya M, Suzuki T, Arai H, Wakabayashi K. Erythromycin mimics exogenous motilin in gastrointestinal contractile activity in the dog. *Am J Physiol* 1984; **247**: G688-94.
- 10 Tomomasa T, Kuroume T, Arai H, Wakabayashi K, Itoh Z. Erythromycin induces migrating motor complex in human gastrointestinal tract. *Dig Dis Sci* 1986; **31**: 157-61.
- 11 Peeters TL. Erythromycin and other macrolides as prokinetic agents. *Gastroenterology* 1993; **105**: 1886-99.
- 12 Bradette M, Poitras P, Boivin M. Effect of motilin and erythromycin on the motor activity of the human colon. *J Gastrointest Mot* 1993; **5**: 247-51.

- 13 Sharma SS, Bhargava N, Mathur SC. Effect of oral erythromycin on colonic transit in patients with idiopathic constipation: A pilot study. *Dig Dis Sci* 1995; **40**: 2446-9.
- 14 Shibata C, Sasaki I, Naito H. et al. Effect of motilin on colonic motor activity in the interdigestive state in conscious dogs. *Tohoku J Exp Med* 1995; **176**: 53-60.
- 15 Chiba T, Thomforde GM, Kost LJ, Allen RG, Phillips SF. Motilides accelerate regional gastrointestinal transit in the dog. *Aliment Pharmacol Ther* 2000; **14**: 955-60.
- 16 Costa A, De Ponti F, Gibelli G, Crema F, D'Angelo L. In vivo characterization of the colonic prokinetic effect of erythromycin in the rabbit. *Pharmacology* 1997; **54**: 64-75.
- 17 Faghieh R, Nellans HN, Plattner JJ. Motilides and motilactides: Design and development of motilin receptor agonists as a new class of gastrointestinal prokinetic drugs. *Drugs Fut* 1998; **23**: 861-72.
- 18 Ōmura S, Tsuzuki K, Sunazuka T, Marui S, Toyoda H, Inatomi N, Itoh Z. Macrolides with gastrointestinal motor stimulating activity. *J Med Chem* 1987; **30**: 1941-3.
- 19 Koga H, Sato T, Tsuzuki K, Onoda H, Kuboniwa H, Takanashi H. Potent, acid-stable and orally active macrolide-type motilin receptor agonists, GM-611 and the derivatives. *Bioorg Med Chem Lett* 1994; **4**:1347-1352.
- 20 Koga H, Takanashi H, Itoh Z, Ōmura S. Design, SAR and pharmacology of GM-611, the first acid-stable nonpeptide motilin receptor agonist. *Drugs Fut* 2002; **27**: 255-272.
- 21 Fang J, McCallum R, DiBase J, Schmitt CM, Kipnes MK. Effects of mitemincinal fumarate (GM-611) on gastric emptying inpatients with idiopathic or diabetic gastroparesis. *Gastroenterology* 2004; **126**: A483.
- 22 Kipnes MS, Schmitt CM, DiBaise JK, Fang JC, Sarosiek I. Safety of mitemincinal fumarate (GM-611) in patients with symptomatic gastroparesis. *Diabetes* 2004; **53**: A132.
- 23 Depoortere I, Peeters TL, Vantrappen G. Motilin receptors of the rabbit colon. *Peptides* 1991; **12**: 89-94.

- 24 Hasler WL, Heldsinger A, Owyang C. Erythromycin contracts rabbit colon myocytes via occupation of motilin receptors. *Am J Physiol* 1992; **262**: G50-5.
- 25 Van Assche G, Depoortere I, Thijs T. et al. Contractile effects and intracellular Ca<sup>2+</sup> signalling induced by motilin and erythromycin in the circular smooth muscle of human colon. *Neurogastroenterol Motil* 2001; **13**: 27-35.
- 26 Miller P, Trudel L, St-Pierre S, Takanashi H, Poitras P. Neural and muscular receptors for motilin in the rabbit colon. *Peptides* 2000; **21**: 283-7.
- 27 Schang JC, Hemond M, Hebert M, Pilote M. How does morphine work on colonic motility? An electromyographic study in the human left and sigmoid colon. *Life Sci* 1986; **38**: 671-6.
- 28 Ferraz AA, Cowles VE, Condon RE, Schulte WJ. Opioid and nonopioid analgesic drug effects on colon contractions in monkeys. *Dig Dis Sci* 1995; **40**: 1417-9.
- 29 Ito H, Kiso T, Yuki H, Naitoh Y, Miyata K, Iwaoka K, Yamaguchi T. Investigation of the effects of YM-31636, a novel 5-HT<sub>3</sub> receptor agonist, on defecation in normal and constipated ferrets. *Eur J Pharmacol* 2001; **424**: 151-7.
- 30 McKay JS, Linaker BD, Higgs NB and Turnberg LA. Studies of the antisecretory activity of morphine in rabbit ileum in vitro. *Gastroenterology* 1982; **82**: 243-7.
- 31 Walsh TD. Oral morphine in chronic cancer pain. *Pain* 1984; **18**: 1-11.
- 32 Glare P, Lickiss JN. Unrecognized constipation in patients with advanced cancer: A recipe for therapeutic disaster. *J Pain Symptom Manage* 1992; **7**: 369-71.
- 33 Takanashi H, Yogo K, Ozaki K, Ikuta M, Akima M, Koga H, Nabata H. GM-109: A novel, selective motilin receptor antagonist in the smooth muscle of the rabbit small intestine. *J Pharmacol Exp Ther* 1995; **273**: 624-8.
- 34 Peeters TL, Bormans V, Vantrappen G. Regional and temporal variations of motilin receptor density in the human and rabbit gastrointestinal tract. *Dig Dis Sci* 1985; **30**: 787.
- 35 Ozaki K, Sudo H, Muramatsu H, Yogo K, Kamei K, Koga H, Itoh Z, Omura S, Takanashi H. Mitemcinal (GM-611), an orally active motilin receptor agonist,



accelerates colonic motility and bowel movement in conscious dogs. *Inflammopharmacology* 2007; **15**: 36-42.

36 Talley NJ, Verlinden M, Snape W, Beker JA, Ducrotte P, Dettmer A, Brinkhoff H, Eaker E, Ohning G, Miner PB, Mathias JR, Fumagalli I, Staessen D, Mack RJ. Failure of a motilin agonist (ABT-229) to relieve the symptoms of functional dyspepsia in patients with and without delayed gastric emptying: a randomized double-blind placebo-controlled trial. *Aliment Pharmacol Ther* 2000; **14**: 1653-61.

37 Thielemans L, Depoortere I, Perret J, Robberecht P, Liu Y, Thijs T, Carreras C, Burgeon E, Peeters TL. Desensitization of the human motilin receptor by motilides. *J Pharmacol Exp Ther* 2004; **30**: 1397-405.

38 Park MI, Ferber I, Camilleri M, Allenby K, Trillo R, Burton D, Zinsmeister AR. Effect of atilmozitin on gastrointestinal transit in healthy subjects: a randomized, placebo-controlled study. *Neurogastroenterol Motil* 2006; **18**: 28-36.

39 Jameson JS, Rogers J, Misiewicz JJ, Raimundo AH, Henry MM. Oral or intravenous erythromycin has no effect on human distal colonic motility. *Aliment Pharmacol Ther* 1992; **6**: 589-95.

40 Bassotti G, Chiarioni G, Vantini I, Morelli A, Whitehead WE. Effect of different doses of erythromycin on colonic motility in patients with slow transit constipation. *Z Gastroenterol* 1998; **36**: 209-13.

41 Brown JC, Mutt V, Dryburgh JR. The further purification of motilin, a gastric motor activity stimulating polypeptide from the mucosa of the small intestine of hogs. *Can J Physiol Pharmacol* 1971; **49**: 399-405.

42 McIntosh CH, Brown JC. Purification and chemical structure of porcine and canine motilins and evidence of motilin in other species. In: Motilin, Z., Itoh (Eds), Academic Press, San Diego, CA, 1990; pp. 13-30.

43 Itoh Z. Motilin and clinical application. *Peptides* 1997; **18**: 593-608.

44 Peeters TL. Erythromycin and other macrolides as prokinetic agents. *Gastroenterology* 1993; **105**: 1886-99.

45 Faghieh R, Nellans HN, Plattner JJ. Motilides and motilactides: design and development of motilin receptor agonists as a new class of gastrointestinal prokinetic drugs. *Drugs Fut* 1998; **23**: 861-72.

- 46 Koga H, Takanashi H, Itoh Z, Ōmura S. Design, SAR and pharmacology of GM-611, the first acid-stable nonpeptide motilin receptor agonist. *Drugs Fut* 2002; **27**: 255-72.
- 47 Ōmura S, Tsuzuki K, Sunazuka T, Marui S, Toyoda H, Inatomi N, Itoh Z. Macrolides with gastrointestinal motor stimulating activity. *J Med Chem* 1987; **30**: 1941-3.
- 48 Talley NJ, Verlinden M, Snape W, Beker JA, Ducrotte P, Dettmer A, Brinkhoff H, Eaker E, Ohning G, Miner PB, Mathias JR, Fumagalli I, Staessen D, Mack RJ. Failure of a motilin receptor agonist (ABT-229) to relieve the symptoms of functional dyspepsia in patients with and without delayed gastric emptying: a randomized double-blind placebo-controlled trial. *Aliment Pharmacol Ther* 2000; **14**: 1653-61.
- 49 Talley NJ, Verlinden M, Geenen DJ, Hogan RB, Riff D, McCallum RW, Mack RJ. Effects of a motilin receptor agonist (ABT-229) on upper gastrointestinal symptoms in type 1 diabetes mellitus: a randomised, double blind, placebo controlled trial. *Gut* 2001; **49**: 395-401.
- 50 McCallum RW, Cynshi O, US Investigative Team. Efficacy of mitemincal, a motilin agonist, on gastrointestinal symptoms in patients with symptoms suggesting diabetic gastropathy: a randomized multi-center placebo-controlled trial. *Aliment Pharmacol Ther* 2007; **26**: 107-16.
- 51 McCallum RW, Cynshi O, US Investigative Team. Clinical trial: effect of mitemincal (a motilin agonist) on gastric emptying in patients with gastroparesis – a randomized, multicentre, placebo-controlled study. *Aliment Pharmacol Ther* 2007; **26**: 1121-30.
- 52 Longstreth GF, Thompson WG, Chey WD, Houghton LA, Mearin F, Spiller RC. Functional bowel disorders. *Gastroenterology* 2006; **130**: 1480-91.
- 53 Simrén M, Abrahamsson H, Bjornsson ES. An exaggerated sensory component of the gastrocolonic response in patients with irritable bowel syndrome. *Gut* 2001; **48**: 20-7.
- 54 Simrén M, Bjornsson ES, Abrahamsson H. High interdigestive and postprandial motilin levels in patients with the irritable bowel syndrome. *Neurogastroenterol Motil* 2005; **17**: 51-7.

- 55 Fukudo S, Suzuki J. Colonic motility, autonomic function, and gastrointestinal hormones under psychological stress on irritable bowel syndrome. *Tohoku J Exp Med* 1987; **151**: 373-85.
- 56 Haramura M, Okamachi A, Tsuzuki K, Yogo K, Ikuta M, Kozono T, Takanashi H, Murayama E. Design and synthesis of N-terminal cyclic motilin partial peptides: a novel pure motilin antagonist. *Chem Pharm Bull* (Tokyo) 2001; **49**: 40-3.
- 57 Marsault E, Hoveyda HR, Peterson ML, Saint-Louis C, Landry A, Vézina M, Ouellet L, Wang Z, Ramaseshan M, Beaubien S, Benakli K, Beauchemin S, Déziel R, Peeters TL, Fraser GL. Discovery of a new class of macrocyclic antagonists to the human motilin receptor. *J Med Chem* 2006; **49**: 7190-7.
- 58 Peeters TL, Depoortere I, Macielag MJ, Dharanipragada R, Marvin MS, Florance JR, Galdes A. The motilin antagonist ANQ-11125 blocks motilide-induced contractions in vitro in the rabbit. *Biochem Biophys Res Commun* 1994; **198**: 411-6.
- 59 Poitras P, Miller P, Gagnon D, St-Pierre S. Motilin synthetic analogues and motilin receptor antagonists. *Biochem Biophys Res Commun* 1994; **205**: 449-54.
- 60 Takanashi H, Yogo K, Ozaki K, Ikuta M, Akima M, Koga H, Nabata H. GM-109: A novel, selective motilin receptor antagonist in the smooth muscle of the rabbit small intestine. *J Pharmacol Exp Ther* 1995; **273**: 624-28.
- 61 Beavers MP, Gunnet JW, Hageman W, Miller W, Moore JB, Zhou L, Chen RHK, Xiang A, Urbanski M, Combs DW, Mayo KH, Demarest KT. Discovery of the first non-peptide antagonist of the motilin receptor. *Drug Des Discov* 2001; **17**: 243-51.
- 62 Kamerling IMC, van Haarst AD, Burggraaf J, Schoemaker RC, De Kam ML, Heinzerling H, Cohen AF, Masclee AA. Effects of a nonpeptide motilin receptor antagonist on proximal gastric motor function. *Br J Clin Pharmacol* 2004; **57**: 393-401.
- 63 Adachi H, Toda N, Hayashi S, Noguchi M, Suzuki T, Torizuka K, Yajima H, Koyama K. Mechanism of the excitatory action of motilin on isolated rabbit intestine. *Gastroenterology* 1981; **80**: 783-8.
- 64 Depoortere I, Peeters TL, Vantrappen G. Motilin receptors of the rabbit colon. *Peptides* 1991; **12**: 89-94.
- 65 Feighner SD, Tan CP, McKee KK, Palyha OC, Hreniuk DL, Pong SS, Austin CP, Figueroa D, MacNeil D, Cascieri MA, Nargund R, Bakshi R, Abramovitz M, Stocco R,

Kargman S, O'Neill G, Van Der Ploeg LHT, Evans J, Patchett AA, Smith RG, Howard AD. Receptor for motilin identified in the human gastrointestinal system. *Science* 1999; **284**: 2184-8.

66 Kitazawa T, Ichikawa S, Yokoyama T, Ishii A, Shuto K. Stimulating action of KW-5139 (Leu13-motilin) on gastrointestinal motility in the rabbit. *Br J Pharmacol* 1994; **111**: 288-94.

67 Okano S, Ikeura Y, Inatomi N. Effects of tachykinin NK1 receptor antagonists on the viscerosensory response caused by colorectal distension in rabbits. *J Pharmacol Exp Ther* 2002; **300**: 925-31.

68 Ness TJ, Gebhart GF. Visceral pain: a review of experimental studies. *Pain* 1990; **41**: 167-234.

69 Naliboff BD, Munakata J, Fullerton S, Gracely RH, Kodner A, Harraf F, Mayer EA. Evidence for two distinct perceptual alterations in irritable bowel syndrome. *Gut* 1997; **41**: 505-12.

70 Mertz H, Naliboff B, Munakata J, Niazi N, Mayer EA. Altered rectal perception is a biological marker of patients with irritable bowel syndrome. *Gastroenterology* 1995; **109**: 40-52.

71 Ohe K, Sumii K, Sano K, Kishimoto S, Miyoshi A. Serum motilin in gastrointestinal disease. *Endocrinol Japon* 1980; **27 (Suppl 1)**: 167-72.

72 Besterman HS, Sarson DL, Rambaud JC, Stewart JS, Guerin S, Bloom SR. Gut hormone responses in the irritable bowel syndrome. *Digestion* 1981; **21**: 219-24.

73 Preston DM, Adrian TE, Christofides ND, Lennard-Jones JE, Bloom SR. Positive correlation between symptoms and circulating motilin, pancreatic polypeptide and gastrin concentrations in functional bowel disorders. *Gut* 1985; **26**: 1059-64.

74 Sjölund K, Ekman R, Lindgren S, Rehfeld JF. Disturbed motilin and cholecystokinin release in the irritable bowel syndrome. *Scand J Gastroenterol* 1996; **31**: 1110-4.

75 Tack J, Piessevaux H, Coulie B, Caenepeel P, Janssens J. Role of impaired gastric accommodation to a meal in functional dyspepsia. *Gastroenterology* 1998; **115**: 1346-52.

76 Kamerling IMC, Van Haarst AD, Burggraaf J, De Kam M, Biemond I, Jones R, Cohen AF, Masclee AA. Exogenous motilin affects postprandial proximal gastric motor function and visceral sensation. *Dig Dis Sci* 2002; **47**: 1732-6.

77 Kamerling IMC, Van Haarst AD, Burggraaf J, Schoemaker RC, Biemond I, Heinzerling H, Jones R, Cohen AF, Masclee AA. Motilin effects on the proximal stomach in patients with functional dyspepsia and healthy volunteers. *Am J Physiol* 2003; **284**: G776-81.

78 Andersson KE. LUTS treatment: future treatment options. *Neurol Urodyn* 2007; **26**: 934-47.

79 Andersson KE, Wein AJ. Pharmacology of the lower urinary tract: basis for current and future treatments of urinary incontinence. *Pharmacol Rev* 2004; **56**: 581-631.

80 Malmgren A, Andersson KE, Sjögren C, Andersson PO. Effects of pinacidil and cromakalim (BRL 34915) on bladder function in rats with detrusor instability. *J Urol* 1989; **142**: 1134-8.

81 Fovaeus M, Andersson KE, Hedlund H. The action of pinacidil in the isolated human bladder. *J Urol* 1989; **141**: 637-40.

82 Foster CD, Speakman MJ, Fujii K, Brading AF. The effects of cromakalim on the detrusor muscle of human and pig urinary bladder. *Br J Urol* 1989; **63**: 284-94.

83 Howe BB, Halterman TJ, Yochim CL, Do ML, Pettinger SJ, Stow RB, Ohnmacht CJ, Russell K, Empfield JR, Trainor DA. ZENECA ZD6169: a novel K<sub>ATP</sub> channel opener with in vivo selectivity for urinary bladder. *J Pharmacol Exp Ther* 1995; **274**: 884-90.

84 Masuda H, Kim JH, Kihara K, Chancellor MB, de Groat WC, Yoshimura N. Inhibitory roles of peripheral nitrenergic mechanisms in capsaicin-induced detrusor overactivity in the rat. *BJU Int* 2007; **100**: 912-8.

85 Okamura A, Rakugi H, Ohishi M, Yanagitani Y, Shimizu M, Nishii T, Taniyama Y, Asai T, Takiuchi S, Moriguchi K, Ohkuro M, Komai N, Yamada K, Inamoto N, Otsuka A, Higaki J, Ogihara T. Additive effects of nicorandil on coronary blood flow during continuous administration of nitroglycerin. *J Am Coll Cardiol* 2001; **37**: 719-25.

86 Kamiyama Y, Muto S, Masuda H, Ide H, Ishizuka N, Saito K, Horie S.

Inhibitory effects of nicorandil, a  $K_{ATP}$  channel opener and a nitric oxide donor, on overactive bladder in animal models. *BJU Int* 2008; **101**: 360-5.

87 Malmgren A, Sjögren C, Uvelius B, Mattiasson A, Andersson KE, Andersson PO. Cystometrical evaluation of bladder instability in rats with infravesical outflow obstruction. *J Urol* 1987; **137**: 1291-4.

88 Hashimoto T, Nagabukuro H, Doi T. Effects of the selective acetylcholinesterase inhibitor TAK-802 on the voiding behavior and bladder mass increase in rats with partial bladder outlet obstruction. *J Urol* 2005; **174**: 1137-41.

89 Shindo T, Yamada M, Isomoto S, Horio Y, Kurachi Y. SUR2 subtype (A and B)-dependent differential activation of the cloned ATP-sensitive  $K^+$  channels by pinacidil and nicorandil. *Br J Pharmacol* 1998; **124**: 985-91.

90 Seino S, Miki T. Physiological and pathophysiological roles of ATP-sensitive  $K^+$  channels. *Prog Biophys Mol Biol* 2003; **81**: 133-76.

91 Teramoto N, Brading AF. Nicorandil activates glibenclamide-sensitive  $K^+$  channels in smooth muscle cells of pig proximal urethra. *J Pharmacol Exp Ther* 1997; **280**: 483-91.

92 Kontani H, Jinkawa M, Shiraoya C, Nagashima A. Effect of  $K^+$  channel openers, KRN2391 and Ki1769, and nitroglycerin on the urinary tract of rats in vivo. *Jpn J Pharmacol* 1999; **80**: 143-53.

93 Vegh A, Györgyi K, Papp JG, Sakai K, Parratt JR. Nicorandil suppressed ventricular arrhythmias in a canine model of myocardial ischaemia. *Eur J Pharmacol* 1996; **305**: 163-8 .

94 Andersson KE, Appell R, Cardozo LD, Chapple C, Drutz HP, Finkbeiner AE, Haab F, Vela Navarrete R. The pharmacological treatment of urinary incontinence. *BJU Int* 1999; **84**: 923-47.

95 Pinna C, Sanvito P, Bolego C, Cignarella A, Puglisi L. Effect of the ATP-sensitive potassium channel opener ZM226600 on cystometric parameters in rats with ligature-intact, partial urethral obstruction. *Eur J Pharmacol* 2005; **516**: 71-7.

96 Wojdan A, Freeden C, Woods M, Oshiro G, Spinelli W, Colatsky TJ, Sheldon JH, Norton NW, Warga D, Antane MM, Antane SA, Butera JA, Argentieri TM. Comparison of the potassium channel openers, WAY-133537, ZD6169, and celikalim on isolated

bladder tissue and In vivo bladder instability in rat. *J Pharmacol Exp Ther* 1999; **289**: 1410-8.

97 Shieh CC, Brune ME, Buckner SA, Whiteaker KL, Molinari EJ, Milicic IA, Fabiyi AC, Daza A, Brioni JD, Carroll WA, Matsushita K, Yamada M, Kurachi Y, Gopalakrishnan M. Characterization of a novel ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel opener, A-251179, on urinary bladder relaxation and cystometric parameters. *Br J Pharmacol* 2007; **151**: 467-75.

98 Mamas MA, Reynard JM, Brading AF. Nitric oxide and the lower urinary tract: current concepts, future prospects. *Urology* 2003; **61**: 1079-85.

99 Persson K, Igawa Y, Mattiasson A, Andersson KE. Effects of inhibition of the L-arginine/nitric oxide pathway in the rat lower urinary tract in vivo and in vitro. *Br J Pharmacol* 1992; **107**: 178-84.

100 García-Pascual A, Costa G, Labadía A, Jimenez E, Triguero D. Differential mechanisms of urethral smooth muscle relaxation by several NO donors and nitric oxide. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 1999; **360**: 80-91.

101 Reitz A, Knapp PA, Müntener M, Schurch B. Oral nitric oxide donors: a new pharmacological approach to detrusor-sphincter dyssynergia in spinal cord injured patients? *Eur Urol* 2004; **45**: 516-20.

102 Müntener M, Schurch B, Wefer B, Reitz A. Systemic nitric oxide augmentation leads to a rapid decrease of the bladder outlet resistance in healthy men. *Eur Urol* 2006; **50**: 112-7.

103 Ozawa H, Chancellor MB, Jung SY, Yokoyama T, Fraser MO, Yu Y, de Groat WC, Yoshimura N. Effect of intravesical nitric oxide therapy on cyclophosphamide-induced cystitis. *J Urol* 1999; **162**: 2211-6.

## 謝辞

本研究に際し、終始御懇篤なるご指導、ご鞭撻を賜りました広島大学大学院医歯薬学総合研究科 大塚英昭 教授に甚大なる謝辞を表します。

本論文の作成及び審査にあたり、幾多の有益なご助言、ご指導を賜りました広島大学大学院医歯薬学総合研究科 小澤孝一郎 教授、仲田義啓 教授、井上敦子 准教授、細井徹 講師、松浪勝義 講師に厚く御礼申し上げます。

本研究に際し、ご指導、ご鞭撻を賜りました群馬大学 伊藤漸 名誉教授、北里研究所 大村智博士、Leuven 大学 Theo L. Peeters 教授、帝京大学 堀江重郎 教授に心より感謝いたします。

本研究に際し、終始懇切なるご指導、激励をいただきました中外製薬株式会社 高梨契典博士、與語健二博士、尾崎賢一博士、進士修博士、亀井研志博士、小野間美都博士、古賀弘博士、川邊良樹博士、黒丸修博士、石塚宣彦博士、斉藤敬司博士、吉田昌信研究員、村松弘康研究員に深く感謝いたします。

本研究の遂行にあたり、苦楽をともにしご協力いただきました中外製薬株式会社 富士御殿場研究所の方々に心よりお礼申し上げます。

最後に、常にそばで支え励ましてくれた家族に心から深謝いたします。