



ラット慢性酸型逆流性食道炎モデルにおける 自発運動とタイトジャンクション

Decreased voluntary movement as a measure of chronic visceral pain using a rat chronic acid reflux esophagitis model

大島 忠之^{*1}・小瀬木順一^{*3}・田中 淳二^{*1}・林 千鶴子^{*1}・森田 毅^{*1}
(Tadayuki Oshima) (Junichi Koseki) (Junji Tanaka) (Chizuko Hayashi) (Tsuyoshi Morita)

富田 寿彦^{*1}・山本 憲康^{*1}・堀 和敏^{*1}・松本 譽之^{*2}・三輪 洋人^{*1}
(Toshihiko Tomita) (Noriyasu Yamamoto) (Kazutoshi Hori) (Takayuki Matsumoto) (Hiroto Miwa)

兵庫医科大学内科学(上部消化管科)^{*1}
兵庫医科大学内科学(下部消化管科)^{*2}
ツムラ研究所^{*3}



背景と目的

胃食道逆流症(gastro-esophageal reflux disease ; GERD)は近年欧米をはじめ日本においても急速に増加している疾患で¹⁾, 患者の生活の質(QOL)に大きく影響している。胸やけ, 逆流感はGERDの定型症状といわれているが, これらの症状は直接的にQOLと関連するとされており, 症状をコントロールすることはGERD治療の主体である。しかし, GERD症状は必ずしも酸の逆流程度や, 食道粘膜障害の程度と関連するとは限らず, その発現メカニズムには不明な点も多い。その原因として, 症状発現メカニズムがきわめて複雑であり, 実験的なアプローチが困難であることが挙げられる。内臓痛は鈍く漠然とした持続する感覚であり, これまで内臓痛を評価した研究はなく, これらを評価するにあたりこれまで実験的な手法での指標がないのが現状である。

そこで今回われわれは, ラットの自発運動量が, 実験的慢性酸型逆流性食道炎によって引き起こされる内臓症状を評価するための指標となりうるかどうかを検討することとした。また症状の発現とタイトジャンクションの関連を検討した。



方法

8週齢の雄性Wistarラットを用いて慢性酸型逆流性食道炎モデルを作製した²⁾。作製後, 自発運動量を, 赤外線センサーと解析システムを用いて測定した。オメプラゾール(3, 10mg/kg/日, 皮下投与)および六君子湯(TJ43)(0.3, 0.6w/v%)を, 作製後翌日から10日目まで連日投与した。

食道びらん面積は, 食道粘膜損傷部位を任意に抽出し, その形状面積を測定した。食道組織は, ラット慢性酸型逆流性食道炎モデルの作製後, 7日目, 10日目および14日目に非びらん部位から採取し, 透過型電子顕微鏡で観察した。

食道粘膜は, 可溶性画分と非可溶性画分に分離し, タイトジャンクション蛋白の発現をclaudin-1, claudin-3, claudin-4特異抗体を用いて検出を行った。



結果

Sham手術群, 慢性酸型逆流性食道炎群の経時的なラットの自発運動量変化を測定したところ, Sham手術ラットの自発運動量は, 2~10日目に

において、それぞれ一定であった。これに対して慢性酸型逆流性食道炎ラットの自発運動量は、2～10日目において有意に減少した。

Sham手術ラットでは食道粘膜のびらんや肥厚はみられないが、vehicle(生理食塩水)投与ラット(術後10日)では食道の中部から下部にかけて、びらんあるいは粘膜の肥厚が認められた。一方、オメプラゾールの投与は用量依存的にびらん形成を抑制した。TJ43投与では、びらん形成を抑制しなかった。

Sham手術ラットの自発運動量は、術後10日で慢性酸型逆流性食道炎ラットに比し有意に減少した。一方、オメプラゾールの投与によって自発運動量は、用量依存的に増加した。TJ43の投与によっても、術後10日の慢性酸型逆流性食道炎ラットの自発運動量は有意に増加した。

食道のびらんの大きさと術後2～10日までの総自発運動量との相関を検討したところ、びらんの大きさと自発運動量に有意な相関は認めなかった。

透過型電子顕微鏡を用いた検討では、Sham手術ラットでは、食道上皮細胞間隙の拡大は認めなかったのに対し、慢性酸型逆流性食道炎ラットでは食道上皮細胞間隙の著しい拡大が観察された。この拡大はTJ43の0.6w/v%投与あるいはオメプラゾール3mg/kg投与で有意に抑制された。

慢性酸型逆流性食道炎ラットでは食道非可溶性画分においてclaudin-3の有意な減少がみられた。一方claudin-1, claudin-4の非可溶性画分の有意な減少は認めなかった。



考 察

慢性酸型逆流性食道炎ラットの自発運動量を赤外線モニター装置を用いて計測したところ、有意に低下していることが明らかとなった。オメプラゾールの投与は低下したラット自発運動量を増加させたことから、自発運動量低下は食道内酸逆流

と関連していると考えられた。しかしながら、オメプラゾールは食道びらんも顕著に抑制したことから、本実験でラット自発運動量低下が慢性酸型逆流性食道炎の重症度(食道粘膜障害の大きさ)を反映しているのか、あるいは症状の強さを反映しているのかは明らかではない。そこで食道びらんのサイズとラット自発運動量との相関性を検討したが、両者に有意な相関性を認めなかった。このことはラット自発運動量低下が慢性酸型逆流性食道炎の重症度を反映しているのではないことを意味している。GERD患者においても逆流症状の程度は食道粘膜障害の程度と相関しないことが知られており、われわれの結果は臨床的観察とよく一致する。

これまで食道粘膜細胞間隙拡大が逆流症状の発現と関連していることが報告されている³⁾。非びらん性胃食道逆流症(non-erosive reflux disease; NERD)患者では食道粘膜細胞間隙の拡大が報告されているが、これは酸の病的逆流の有無に関連せず症状と関連するとされている³⁾⁴⁾。透過型電子顕微鏡を用いて観察した結果、慢性酸型逆流性食道炎ラットにおいては食道粘膜細胞間隙は著明に拡大していたが、オメプラゾールの投与で拡大は抑制された。ここで興味深いことに、TJ43は慢性酸型逆流性食道炎ラットにおける食道粘膜細胞間隙の拡大を抑制し自発運動量を増加させた。TJ43は胃酸分泌抑制作用を有さないため、今回の結果は胃酸を介してのものではないと推測される。TJ43によって食道びらんのサイズの縮小が認められなかったことは、この薬剤の自発運動量の増加効果は食道粘膜細胞間隙拡大の抑制と関連している可能性がある。

タイトジャンクション蛋白は、消化管上皮や血管内皮細胞間のシーリングによる間隙を介したイオンや親水性物質の透過性を制御するバリア機能、そして細胞極性を決定するフェンス機能を有している。これまでにわれわれは、慢性酸型逆流性食道炎ラットにおいてclaudin-3の発現低下がみ

られることを報告している²⁾。今回の検討では、タイトジャンクションで機能を有するタイトジャンクション蛋白は、非イオン性界面活性剤に不溶⁵⁾であることから、その可溶性画分と非可溶性画分に分けて検討を行った。このタイトジャンクション蛋白の非可溶性画分の減少はその機能低下を示唆し、食道粘膜上皮細胞間隙の拡大に関与している可能性がある。さらに食道粘膜細胞間隙の拡大が逆流症状と関連しているとの臨床的観察は慢性酸型逆流性食道炎ラットの自発運動量低下が内臓症状を反映し、慢性腹部症状の指標となる可能性を示している。

文 献

- 1) Dimenas E, Glise H, Hallerback B, et al : Well-being and gastrointestinal symptoms among patients referred to endoscopy owing to suspected duodenal ulcer. *Scand J Gastroenterol* **30** : 1046-1052, 1995
- 2) Asaoka D, Miwa H, Hirai S, et al : Altered localization and expression of tight-junction proteins in a rat model with chronic acid reflux esophagitis. *J Gastroenterol* **40** : 781-790, 2005
- 3) Tobey NA, Carson JL, Alkief RA, et al : Dilated intercellular spaces ; A morphological feature of acid reflux--damaged human esophageal epithelium. *Gastroenterology* **111** : 1200-1205, 1996
- 4) Tobey NA, Hosseini SS, Argote CM, et al : Dilated intercellular spaces and shunt permeability in nonerosive acid-damaged esophageal epithelium. *Am J Gastroenterol* **99** : 13-22, 2004
- 5) Yoo J, Nichols A, Mammen J, et al : Bryostatin-1 enhances barrier function in T84 epithelia through PKC-dependent regulation of tight junction proteins. *Am J Physiol Cell Physiol* **285** : C300-309, 2003