



# 持続ストレス負荷状態における胃排出の変化とNOの関連性の検討

*Relative association between gastric emptying and nitric oxide under continuous stress in rats*

越智 正博<sup>\*1</sup>・富永 和作<sup>\*1</sup>・谷川 徹也<sup>\*1</sup>・斯波 将次<sup>\*1</sup>・渡辺 俊雄<sup>\*1</sup>  
(Masahiro Ochi) (Kazunari Tominaga) (Tetsuya Tanigawa) (Masatsugu Shiba) (Toshio Watanabe)

藤原 靖弘<sup>\*1</sup>・押谷 伸英<sup>\*1</sup>・樋口 和秀<sup>\*2</sup>・荒川 哲男<sup>\*1</sup>  
(Yasuhiro Fujiwara) (Nobuhide Oshitani) (Kazuhide Higuchi) (Tetsuo Arakawa)

大阪市立大学大学院医学研究科消化器内科学<sup>\*1</sup>  
大阪医科大学第二内科<sup>\*2</sup>



## 背景

機能性ディスぺプシア (functional dyspepsia ; FD) は心窩部領域に消化器症状を有するものの、明らかな器質的傷害を認めない症候群である。そのFDの病態生理には約40%に胃排出遅延や適応性弛緩不全などの消化管運動障害が関与していることが示唆されている<sup>1)</sup>。適応性弛緩反応や幽門部の弛緩反応には一酸化窒素 (nitric oxide ; NO) が重要な働きをしていることが知られており、また、NOの基質であるL-arginineを含有するTJ-43によりFD患者の症状改善効果を認めることから、FDの病態にNOの関与が示唆される。一方で、FD患者の多くは強いストレス状態であることが判明し、FDの病態生理にストレスの関与も示唆されている<sup>2)</sup>。「ストレスと胃排出能」という観点に注目しラットにおける過去の論文を検索したところ、寒冷ストレスにおいては、負荷後30分までの胃排出亢進とその後3時間までの胃排出遅延を認めること<sup>3)</sup>、拘束ストレスにおいては、負荷後60分後には中枢のcorticotropin-releasing factor (CRF) を介して胃排出遅延を認めること<sup>4)</sup>、また、水浸拘束ストレスでは、有意に胃排出が遅延すること<sup>5)</sup>などの報告がある。しかし、これらの検討

は短期的なもののみであり、慢性的で持続的なストレスの検討についてはいまだ明らかではない。そこで、この持続的なストレスという点に注目し胃排出能の変化についての検討を行い、その排出に影響を及ぼす介在因子を検討した。



## 方法

Wistar系雄性ラット8週齢を用いた。モデルは近年確立された疲労モデルラットを使用した<sup>6)</sup>。ゲージの底より2 cmまで水を張り、5日間継続的な水浸負荷を与えることにより作成した。負荷後4時間、8時間、1日、3日、5日後の時相で胃排出能および介在因子の検討を行った。胃排出能は既報のフェノールレッドを用いた液体法を使用した<sup>7)</sup>。体重変化と相対臓器重量の測定を行うとともに、血液中の介在因子の検討として、ストレスマーカーに血漿ACTH (ELISA法) や血漿コルチコステロン (RIA法)、交感神経活動に血漿カテコラミン3分画 (高速液体クロマトグラフィ)、摂食や胃運動<sup>8)</sup>との関与が示唆されている血漿アクティブグレリンと血漿デスアシルグレリン (ELISA法)、血清中NOxレベル (ELISA法) の測定を行った。また、胃組織中の検討として、胃体部のMPO (myeloperoxidase) 活性 (o-ジアニ

シジン法), iNOSmRNA, プレプログレリン mRNA (real-time RT-PCR)の測定を行った。加えて、胃体部におけるグレリン陽性細胞の局在を観察するため、免疫組織学的検討を行った。また、遮断薬による検討を行うため、交感神経活動の遮断薬としてguanethidine(100mg/kg, 皮下投与)を、nNOSの阻害薬としてL-NNA(10mg/kg, 経口投与)を、iNOSの阻害薬としてaminoguanidine(20mg/kg, 経口投与)を使用した。



## 結果

体重変化は水浸ストレス負荷後1日目より有意に体重増加の抑制を認め、負荷後2日目以降は著明な胸腺の萎縮を認めた。血漿ACTHは負荷後すべての時相で有意に高値を示し、血清コルチコステロンは高値の傾向を示した。

胃排出に関しては、水浸ストレス負荷24時間以内は遅延を認め、負荷後8時間では有意に遅延を認めた。しかし、負荷が長期になる3日目以降は、逆に胃排出は亢進に転じ、5日目では有意に亢進を認めた。

交感神経活動の関与を検討するため、血漿カテコラミン3分画の測定を行ったところ、アドレナリンレベルは負荷4時間後に有意に上昇を認め、その後はコントロールレベルまで低下した。ノルアドレナリンは負荷後24時間以内に有意な上昇を認め、その後低下した。水浸ストレス負荷24時間以内の胃排出遅延と交感神経系の関与を調べるため、その遮断薬であるguanethidineの前投薬を行ったところ、負荷8時間後の胃排出遅延は改善を認めた。

血漿総グレリンおよび血漿デアシルグレリンは、水浸ストレス負荷1日目に上昇し、その後の低下が認められ、3日目以降は血漿アクティブグレリンの有意な上昇を認めた。ストレスの長期化により、胃体部のグレリン陽性細胞数の増加を認め、同部位のプレプログレリンmRNA発現の増

加を認めた。

水浸ストレス負荷後、血清中のNO<sub>x</sub>レベルに有意な変化は認めなかったが、胃体部におけるMPO活性およびiNOSmRNAを測定したところ、ともに負荷後8時間に有意な上昇を認めた。そこで、水浸ストレス負荷8時間後に、胃排出に対するNOの関与を検討した。非負荷状態では過去の報告同様に、nNOSの阻害薬であるL-NNAは胃排出を有意に遅延させたが<sup>7)</sup>、iNOSの阻害薬であるaminoguanidineはそれ単独では胃排出遅延に影響を与えなかった。しかし、8時間の水浸ストレス負荷での胃排出遅延に対しては、L-NNAは影響を及ぼさなかったのに対し、アミノグアニジンはさらなる胃排出遅延をもたらした。



## 考察

今回の検討において、短期的なストレスは胃排出を遅延させるが、ストレスの長期化は胃排出を亢進させることがはじめて示された。また、その胃排出の変化に影響を及ぼす因子として、主に交感神経活動とアクティブグレリンの影響が示唆され、一方で、iNOS由来のNOは胃排出遅延を改善させる働きをしている可能性が示唆された。

本モデルは、ストレスマーカーである血漿ACTHの持続高値、血漿コルチコステロンの高値、胸腺の著明な萎縮を認めたことから、持続ストレス状態であったと考えられた。

本モデルにおいて、水浸ストレス負荷後24時間以内の短期的な時相では、胃排出は遅延を認めた。アドレナリンやノルアドレナリンは24時間以内の短期的な時相でのみ上昇を認めており、また、交感神経の遮断薬であるguanethidineの前投薬において負荷後8時間の胃排出遅延を改善させる効果が認められたことより、短い時相において交感神経活動が主に胃排出に影響を及ぼしているものと考えられた。一方、急性期の時相では、iNOSmRNAレベルに上昇を認めており、iNOSの

阻害薬であるaminoguanidineの前投薬では、負荷後8時間の胃排出のさらなる遅延をもたらした。また、nNOSの阻害薬であるL-NNAの前投薬は負荷後8時間の胃排出遅延に影響を及ぼさなかった。生理的な状態の消化管では、nNOS由来のNOは腸管平滑筋の弛緩・蠕動に重要な役割を担っていることが報告されている<sup>9)</sup>。また、胃運動においても、NOは適応性弛緩反応<sup>10)</sup>や幽門部の弛緩<sup>11)</sup>に重要な働きをしていることが知られており、nNOSの阻害薬の投与は胃排出を遅延させることも報告されており<sup>7)</sup>、nNOS由来のNOは胃排出に関しては亢進させる働きがあるものと考えられる。しかし、今回の結果からは、急性期のストレス負荷に伴う胃排出遅延状態時では、nNOSは活性化されず、その代償機転の一部としてiNOS由来のNOが増加し、胃排出遅延を部分的にも回復させている可能性が推察された。

また、長期ストレス負荷は胃排出を亢進させることが今回はじめて示された。この時相においては、血漿アクティブグレリンの上昇を認め、長期的ストレス時の胃排出亢進に作用していることが示唆された。また、胃体部のグレリン陽性細胞数の増加やプレプログレリンmRNA発現の上昇もそれを支持する結果と考えられた。このグレリン上昇は、ストレス負荷に伴って起こる体重減少に対し、食欲増進を指示するアラームサインとして起こっていることが推察されるが、その一方で代謝亢進との矛盾点も考えられ、摂食・代謝などさまざまな観点からの総合的なさらなる評価が今後必要と思われる。



## 結 論

疲労ストレス負荷は、短期的には胃排出を遅延させ、その長期化は胃排出能を亢進させることが示された。ストレス負荷に伴う胃運動機能の変化には、短期的にはカテコラミン、iNOS由来のNOが、長期的にはアシルグレリンが相互的に関

与する可能性が示唆された。

## 文 献

- 1) Tack J, Caenepeel P, Fischler B, et al : Symptoms associated with hypersensitivity to gastric distention in functional dyspepsia. *Gastroenterology* **121** : 526-535, 2001
- 2) Cheng C, Hui WM, Lam SK : Coping style of individuals with functional dyspepsia. *Psychosom Med* **61** : 789-795, 1999
- 3) Koo MW, Ogle CW, Cho CH : The effect of cold-restraint stress on gastric emptying in rats. *Pharmacol Biochem Behav* **23** : 969-972, 1985
- 4) Lenz HJ, Raedler A, Greten H, et al : Stress-induced gastrointestinal secretory and motor responses in rats are mediated by endogenous corticotrophin-releasing factor. *Gastroenterology* **95** : 1510-1517, 1988
- 5) Enck P, Merlin V, Erckenbrecht JF, et al : Stress effects on gastrointestinal transit in the rat. *Gut* **30** : 455-459, 1989
- 6) Tanaka M, Nakamura F, Mizokawa S, et al : Establishment and assessment of a rat model of fatigue. *Neurosci Lett* **352** : 159-162, 2003
- 7) Kido T, Nakai Y, Kase Y, et al : Effects of rikkunshi-to, a traditional Japanese Medicine, on the delay of gastric emptying induced by N<sup>G</sup>-nitro-L-arginine. *J Pharmacol Sci* **98** : 161-167, 2005
- 8) Asakawa A, Inui A, Kaga T, et al : Ghrelin is an appetite-stimulatory signal from stomach with structural resemblance to motilin. *Gastroenterology* **120** : 337-345, 2001
- 9) Sanders KM, Ward SM : Nitric oxide as a mediator of nonadrenergic noncholinergic neurotransmission. *Am J Physiol* **262** : G379-392, 1992
- 10) Uno H, Arakawa T, Fukuda T, et al : Involvement of capsaicin-sensitive sensory nerves in gastric adaptive relaxation in isolated guinea-pig stomachs. *Digestion* **58** : 232-239, 1997
- 11) Allescher HD, Tougas G, Vergara P, et al : Nitric oxide as a putative nonadrenergic noncholinergic inhibitory transmitter in the canine pylorus *in vivo*. *Am J Physiol* **262** : G695-702, 1992