

原 著

水浸拘束下ラット急性胃粘膜病変の形成における Nitric Oxide の役割についての検討

東京女子医科大学 成人医学センター (所長: 山下克子教授)

ヤナギサワ アキコ
柳 沢 明子

(受付 平成13年4月16日)

Roles of Nitric Oxide in the Formation of Acute Gastric Mucosal Lesions Induced by Water-Immersion-Restraint Stress in Rats

Akiko YANAGISAWA

Institute of Geriatrics, Tokyo Women's Medical University

We examined the level of NOx and the expression of nitric oxide synthase (NOS) to determine the role of nitric oxide (NO) in the formation of acute gastric mucosal lesions induced by water-immersion-restraint stress (WIRS) in rats. Male Wistar rats were used. Group A was subjected to WIRS (0, 5, 30, 60, 180, 360 min, n=5 per group). Group B consisted of rats given an intraperitoneal injection of L-arginine (100 mg/kg) 30 min before WIRS, which was applied as described for group A. The ulcer index was determined. In addition, the level of NOx in gastric tissue (Griess method), and the expression of NOS (eNOS, nNOS and iNOS) messenger RNA (mRNA) in gastric tissue (RT-PCR) were measured. The localization of NOS was studied by immunostaining. In group A, the ulcer index increased with time after WIRS. There were a decrease in the level of NOx and no increase in the expression of eNOS mRNA. In group B, no lesion was formed after 30 or 60 min, and the level of NOx and the expression of eNOS mRNA increased. There was no expression of iNOS mRNA in either group. No correlation was found between the expression of nNOS mRNA and ulcer index. The localization of eNOS was found in endothelial cells on immunostaining. These results suggest that a decrease in NO level and no increase in the expression of eNOS mRNA are associated with the formation of acute gastric mucosal lesions. Treatment with L-arginine increases the NO level and the expression of eNOS mRNA and inhibits the formation of acute gastric mucosal lesions, suggesting that NO derived from eNOS plays an important part in mucosal protection.

緒 言

急性胃粘膜病変の発生には、胃粘膜微小循環障害が大きく関与し、血管拡張因子の内因性 prostaglandin (PGs) や収縮因子の endothelin (ET) 等の調節を受けている¹⁾。

1980年に Furchgott ら²⁾により、内皮細胞由来

血管拡張因子 (endothelium-derived relaxing factor; EDRF) の存在が報告され、その本体が nitric oxide (NO: 一酸化窒素) であり、NO の前駆物質が arginine であることが報告されている^{3)~5)}。

消化管において、NO は重要な情報伝達物質として存在することが報告され^{6)~9)}、微小循環血流

保持・酸分泌抑制, 粘液・重炭酸イオン分泌促進および粘膜保護作用を有することが報告されている¹⁰⁾¹¹⁾。一方, エンドトキシンなどにより大量のNOが生体内で遊離されると, 粘膜傷害作用を呈するとの報告もある¹²⁾。

胃粘膜病変とNOに関して, Akimotoら¹³⁾は, ヒト慢性胃潰瘍の治癒過程において, ETとNOの関係を検討し, NOは活動期にもっとも高値を示すことから, 潰瘍治癒過程の早期から血流調節や粘膜修復に関与し得ることを示唆している。またKonturekら¹⁴⁾は, 酢酸潰瘍実験で, NOS阻害剤の投与により潰瘍治癒が遅延することを報告している。このようにNOは胃粘膜病変の治癒過程にETなどの血管作動物質とともに関与していると考えられる。

NOはL-arginine (L-Arg) を基質として nitric oxide synthase (NOS: NO合成酵素) の作用により合成される。NOSには3種の isoform があり, constitutive type NOS (cNOS) として, neuronal NOS (nNOS), endothelial NOS (eNOS) と, inducible type NOS (iNOS) が同定されている。cNOS (nNOS, eNOS) により産生される少量のNOは, 組織にとって保護作用を有するが¹⁵⁾, iNOSにより産生される大量のNOは, 組織傷害性に働くと報告されており¹⁶⁾, 各々のNOSにより産生されるNOは生体に対する作用が異なる。急性胃粘膜病変においてもNOS活性の面より検討され, cNOSの保護作用が報告されている¹⁷⁾¹⁸⁾。

そこで本研究では, 水浸拘束ストレスラット急性胃粘膜病変の形成における, NOの役割を明らかにするため, NO_x および NOS mRNA の発現について検討を行い, さらに, NOの基質であるL-Argを投与した際の胃粘膜病変への影響を検討した。

対象および方法

1. 対象

体重約200gのWistar系雄性ラット (Japan Laboratory Animals Inc, 埼玉) を使用した。

2. 方法

1) 水浸拘束ストレス潰瘍作製法

高木-岡部の方法¹⁹⁾に準じて, 24時間絶食後スト

レスケージ内に拘束し, 23°C の水槽中に直立位で剣状突起まで沈めた。対照群 (A₀) と水浸拘束後5, 30, 60, 180, 360分 (A₅, A₃₀, A₆₀, A₁₈₀, A₃₆₀) の6群を作製しA群とした。ペントバルビタール (30mg/kg) 麻酔下で開腹し胃を摘出した。①NO_x と NOS mRNA 測定 (6群×各5匹=計30匹), ②潰瘍係数算定およびNOSの免疫組織学的染色 (同様に30匹) を行った。さらに, L-Arg (100mg/kg) を水浸拘束ストレス負荷30分前に腹腔内前投与したものをB群とし, 同様に6群 (B₀, B₅, B₃₀, B₆₀, B₁₈₀, B₃₆₀) を作製し測定を行った。

本研究は東京女子医科大学動物実験委員会規定を遵守した (承認番号00-131)。

2) 潰瘍係数の算定

摘出胃を大彎に沿って切開し, 10%ホルマリン液で30分間固定後, 腺胃部に発生した潰瘍の長径 (mm) を測定し, その総和で表した²⁰⁾。

3) NOの測定

NOの測定はGriess法に基づきNOの代謝産物であるNO_x (NO₂ + NO₃) を測定した。摘出胃の腺胃大彎側の組織をアセトンヘキサノードライアイス法により即時凍結し, 組織をホモジネート (氷上でSPEED3.5, 約20秒×3, PHYSCOTRON) して, 遠心分離 (4°C 3000rpm 30分) の後に上清を採取した。採取した検体を補酵素, 還元酵素と反応 (20~30°C 3時間) させた後, Griess試薬と反応 (20~30°C 10分) させ (Nitrate/Nitrite Assay Kit, Cayman CHEMICAL, California) 変換されたアゾ色素を吸光法 (OD540nm) で測定した。

4) NOS mRNA 測定

RT-PCR法で解析を行った。eNOS, nNOS, iNOSについてはKawata and Mikuni-Takagiの方法に準じ²¹⁾, β-actinについてはTaKaRaオリジナルプライマーを用いた。

サンプル調整方法は, 摘出胃の腺胃大彎側の組織を即時凍結し, TRIZOL試薬 (Life Technologies Inc, Rockville, MD, USA) を用いてtotal RNAを抽出し, OD260nmで測定しこの値をもとにRNA濃度を算出した。0.1μg total RNA (TaKaRa RNA PCR Kit (AMV) Ver. 2.1, TaKaRa

SHUZO Co, 滋賀) を用い, TaKaRa PCR Thermal Cycler MP で解析を行った. Negative control として, DEPC 処理水を使用した. RT 反応条件は, 25 mM MgCl₂ 2 μ l, 10 \times RNA PCR buffer 1 μ l, 10mM dNTPs 1 μ l, 40U/ μ l RNase inhibitor 0.25 μ l, AMV RTase 0.5 μ l, 50 μ M random 9 mers 0.5 μ l, 抽出 RNA 1 μ l (OD260nm により算出した値をもとに, 0.1 μ g total RNA/ μ l に希釈したサンプルを 1 μ l 添加), DEPC-H₂O 計 10 μ l とし, 30 $^{\circ}$ C 10 分, 45 $^{\circ}$ C 20 分, 99 $^{\circ}$ C 5 分, 4 $^{\circ}$ C 5 分で反応させた.

プライマーは, eNOS (324bp) sense (R-eNOS-F): 5'-GGG CCA GGG TGA TGA GCT CTG-3', anti sense (R-eNOS-R2): 5'-CCC TCC TGG CTT CCA GTG TCC-3', nNOS (383bp) sense (R-nNOS-F): 5'-AAT GGA GAC CCC CCT GAG AAC-3', anti sense (Rn NOS-R2): 5'-TCC AGG AGG GTG TCC ACC GC-3', iNOS (217bp) sense (R-iNOS-F3): 5'-GAG ATC AAT GCA GCT GTG-3', anti sense (R-iNOS-R4): 5'-AGA ATG GAG ATA GGA CGT-3' を用いた. β -actin については, TaKaRa オリジナルプライマー β -actin (264bp) sense: 5'-AGG CAC CAA GGT GTG ATG GT-3', anti sense: 5'-GGT CTC AAA CAT GAT CTG GG-3' を用いた.

PCR 反応条件は, RT 反応液 10 μ l, 25mM MgCl₂ 3 μ l, 10 \times RNA PCR buffer 4 μ l, 5U/ μ l Takara Taq. 0.25 μ l, センスプライマー (20 pmol/ μ l) 0.5 μ l, アンチセンスプライマー (20 pmol/ μ l) 0.5 μ l, d-H₂O 計 50 μ l とした. β -actin は 94 $^{\circ}$ C 15 秒, 68 $^{\circ}$ C 30 秒で 35cycles, eNOS, nNOS は 94 $^{\circ}$ C 3 分の後, 94 $^{\circ}$ C 30 秒, 60 $^{\circ}$ C 30 秒, 72 $^{\circ}$ C 60 秒で 35 cycles 行い, iNOS は 40 cycles で行った.

PCR 反応液 5 μ l を 3% Nusieve 3 : 1 agarose gel で電気泳動を行い, エチジウムブロマイド染色後, 写真撮影を行った. 蛍光イメージアナライザー FMBIO II MULTI-View (TaKaRa, 滋賀) による画像化および増幅バンドの蛍光強度 (IOD 値) を測定し, 各ターゲットの蛍光強度を β -actin の蛍光強度で補正して発現量を算出し, A 群の対象群 (A₀) を基準として各相対発現量を算出した.

5) 免疫組織学的染色

一次抗体は抗ウサギポリクローナル抗体として, eNOS は NOS3 (C-20): cat#sc-654 を, nNOS は NOS1 (R-20): cat#sc-648 (Santa Cruz Biotechnology, California) を各々希釈倍率 1 : 10 で用いた. 腺胃部のホルマリン固定標本を用い, 切片を脱パラフィン後, 内因性ペルオキシダーゼ活性を 0.3% 過酸化水素/メタノールで 4 $^{\circ}$ C 30 分間処理した. 次に, 10% ヤギ血清で 10 分間非特異的反応をブロックした後, 1% bovine serum albumin (BSA) で希釈した一次抗体を滴下し, 4 $^{\circ}$ C で 10 時間反応させた後, PBS で充分洗浄した. 間接法で行うため, ペルオキシダーゼ標識二次抗体はヤギ抗ウサギ免疫グロブリン Fab (200 倍, 医学生物学研究所製, 大阪) を 1% BSA で希釈したものをを用い, 室温で 1 時間反応させた後, PBS で充分洗浄した. その上で, 0.05% (w/v) 3,3'-ジアミノベンジン四塩酸塩を溶解した 0.05M トリス塩酸緩衝液 (pH 7.5) に 0.003% 過酸化水素を加えた発色液で発色した. ヘマトキシリン核染色を行い, 脱水, 封入を行った. なお, 陰性コントロールとして一次抗体の代わりにウサギ正常血清と PBS を用いた.

6) 統計学的処理法

各測定法はすべて平均値 \pm 標準誤差 (mean \pm SE) で示し, 有意差検定は Step 4 Excel 統計ソフトで一元配置分散分析 (Fisher's PLSD 法) を用い, 5% 以下の危険率をもって有意差ありと判定した.

結 果

1. 潰瘍係数

A 群では, 水浸拘束 5 分 (A₅) までは粘膜面に変化を認めないが, 30 分 (A₃₀) 以降腺胃に点状の小びらんを認め, 180 分 (A₁₈₀) より出血性びらんの散在を認め, 時間経過とともに潰瘍係数の増加を認めた. B 群では, 60 分 (B₆₀) までは病変の出現を認めず, 180 分 (B₁₈₀) より出血性びらんを認めた (図 1). A 群と比較し B 群では, 30, 60 分において病変形成の抑制が認められた.

2. NO_x の測定

A 群では, 経時的に個々の群では有意な差は認められなかったが減少傾向を認めた. 対照群 (A₀) と水浸拘束後 (A₅~A₃₆₀) の群では有意 ($p < 0.05$)

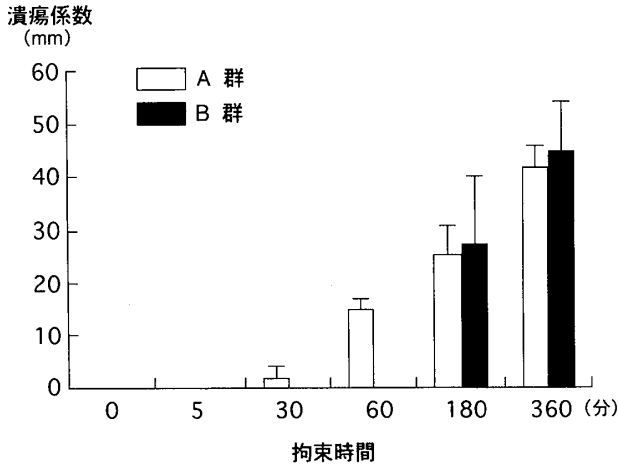


図1 ラット水浸拘束下急性胃粘膜病変における潰瘍係数の推移
A 群：L-Arg 非投与群, B 群：L-Arg 投与群, mean \pm SE (n=5).

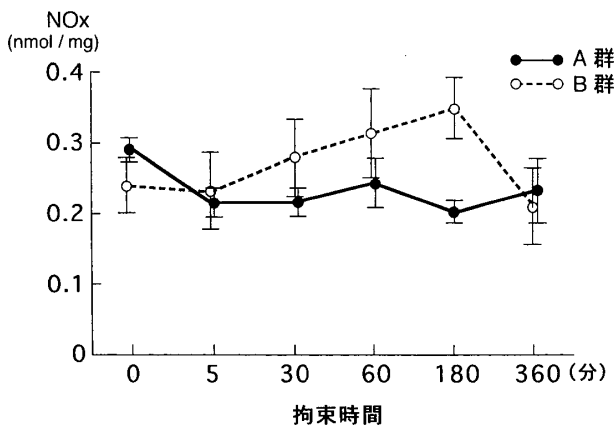


図2 ラット水浸拘束下急性胃粘膜病変におけるNOxの経時的変化
A 群：L-Arg 非投与群, B 群：L-Arg 投与群, mean \pm SE (n=5).

な減少を認めた。B 群では、30 分 (B₃₀) より増加し始め 180 分 (B₁₈₀) まで増加しその後低下を認めた。A 群と比較して B 群では 30, 60, 180 分で高値を示した (図 2)。

3. NOS mRNA の発現

各々 mRNA は、A₀ の発現量を 1 とし相対発現量を算出した。

eNOS mRNA は、A 群では水浸拘束の時間経過とともに、わずかに減少する傾向を認めるものの、増加は認められなかった。B 群では病変形成の抑

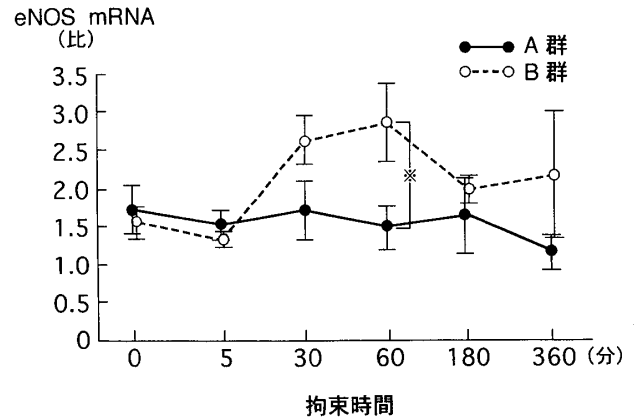


図3 ラット水浸拘束下急性胃粘膜病変における RT-PCR による eNOS mRNA 発現量の推移
A 群：L-Arg 非投与群, B 群：L-Arg 投与群. A₀ の結果を 1.0 として表現, mean \pm SE (n=5), *p<0.05.

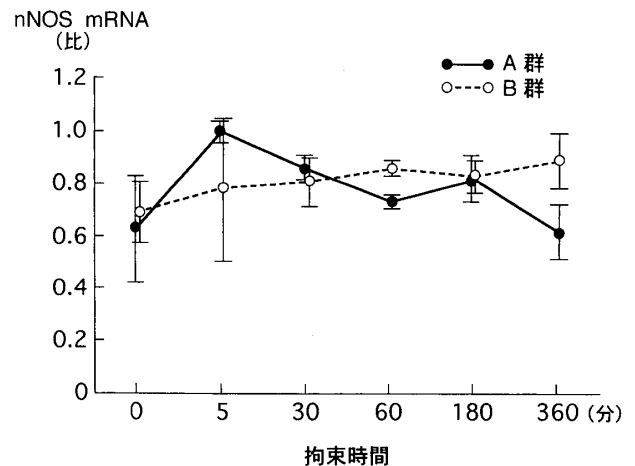


図4 ラット水浸拘束下急性胃粘膜病変における RT-PCR による nNOS mRNA 発現量の推移
A 群：L-Arg 非投与群, B 群：L-Arg 投与群. A₀ の結果を 1.0 として表現, mean \pm SE (n=5).

制された 30 分 (B₃₀) から増加し始め 60 分 (B₆₀) をピークとし、その後 180, 360 分 (B₁₈₀, B₃₆₀) で低下を認めた。A 群と比較して B 群では病変形成の抑制された 30, 60 分で高値であり、60 分では有意 (p<0.05) に高値であった (図 3)。

nNOS mRNA は、A 群では水浸拘束直後に増加し、その後時間経過とともに低下し、360 分 (A₃₆₀) では対照群 (A₀) とほぼ同値となった。B 群では、水浸拘束後時間経過とともにわずかに増加を認めた (図 4)。病変形成の抑制された 30, 60 分で A

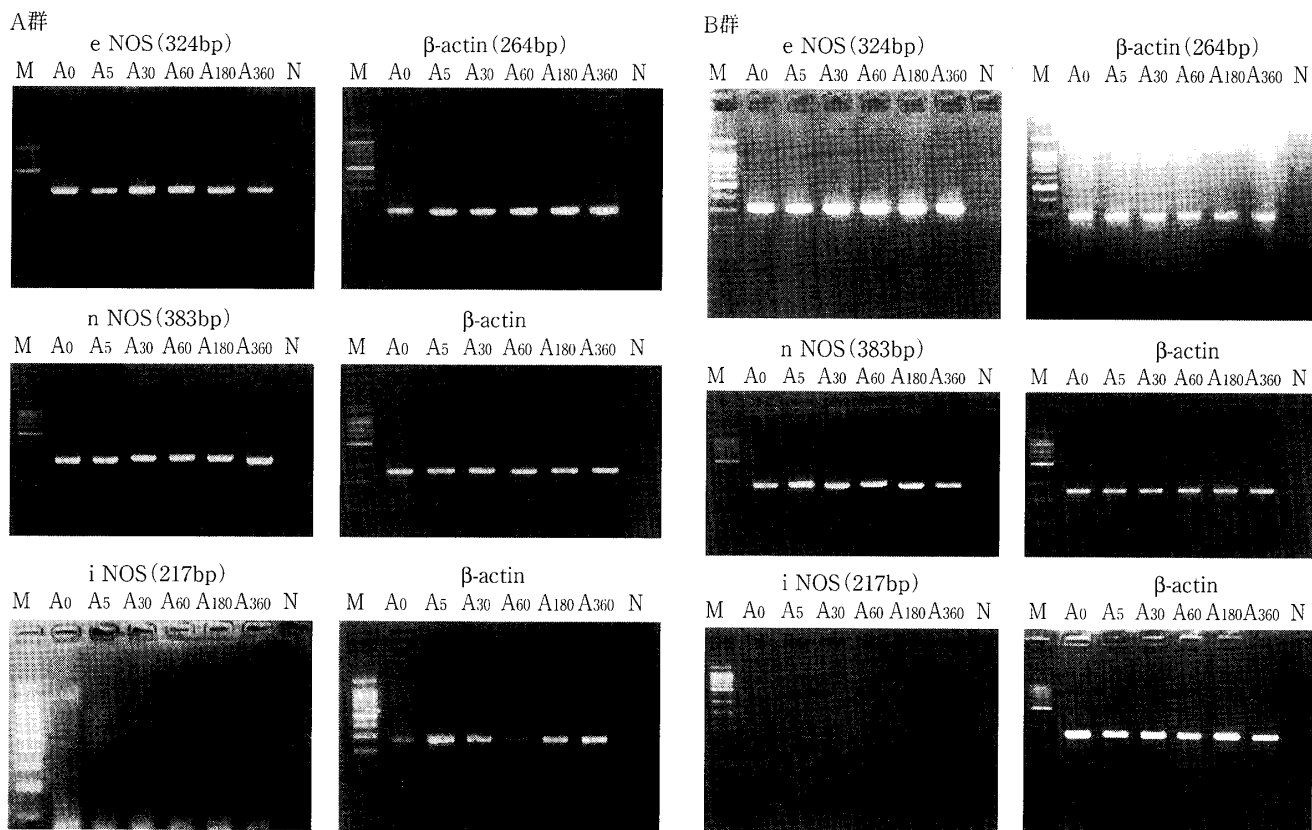


図5 eNOS, nNOS, iNOS mRNA 発現の RT-PCR による解析
A 群: L-Arg 非投与群, B 群: L-Arg 投与群, M: marker, N: DEPC 処理水.

群と B 群に有意差は認められなかった。

A 群, B 群とも, 対照群および水浸拘束 5~360 分までに iNOS mRNA の発現は認められなかった (図 5)。

4. 免疫組織学的染色

eNOS は, 粘膜下層, 漿膜下層の動静脈の血管内皮細胞に局在を認めた (図 6 左)。nNOS は神経線維および Meissner's 神経叢, Auerbach's 神経叢に局在を認めた (図 6 右)。

考 察

本研究において, L-Arg を負荷していない A 群では, 水浸拘束により経時的に潰瘍係数は増加, NO_x は減少を示し, eNOS mRNA 発現の増加は認められなかった。これは, ストレス負荷により胃粘膜血流障害が起こり, 粘膜血流低下に基づく低酸素状態の持続が, NOS mRNA の発現を低下させる²²⁾ことや, ET などにより NOS が活性化された²³⁾ことにより NO が消費されたものと考えられた。このように, NO の減少や eNOS mRNA

発現が増加できないことが, 胃粘膜病変の形成に関わる可能性があると考えられた。

L-Arg を体外から加えると, 内因性 NOS 阻害物質が増加し, 外因性の L-Arg が効果的に利用され NO の合成が促進すると報告されてる²⁴⁾。L-Arg を腹腔内前投与した B 群では A 群と比較して, 30, 60 分で潰瘍係数は抑制され, NO_x, eNOS mRNA は高値であった。このことから, NO の増加により胃粘膜傷害が抑制され, そして, 30, 60 分で NO_x の増加とともに eNOS mRNA が有意に増加し, そして iNOS mRNA の発現を認めず, nNOS mRNA 発現と胃粘膜病変の形成に相関性が得られなかったことから, eNOS mRNA の発現により合成された NO の増加が, 胃粘膜病変の抑制に重要であると示唆された。

水浸拘束ストレス下で外因性 L-Arg を投与すると, 水浸拘束ストレスに対する生体防御の反応として, 外因性 L-Arg を効果的に利用し, 保護的に作用する NO を合成するために eNOS mRNA

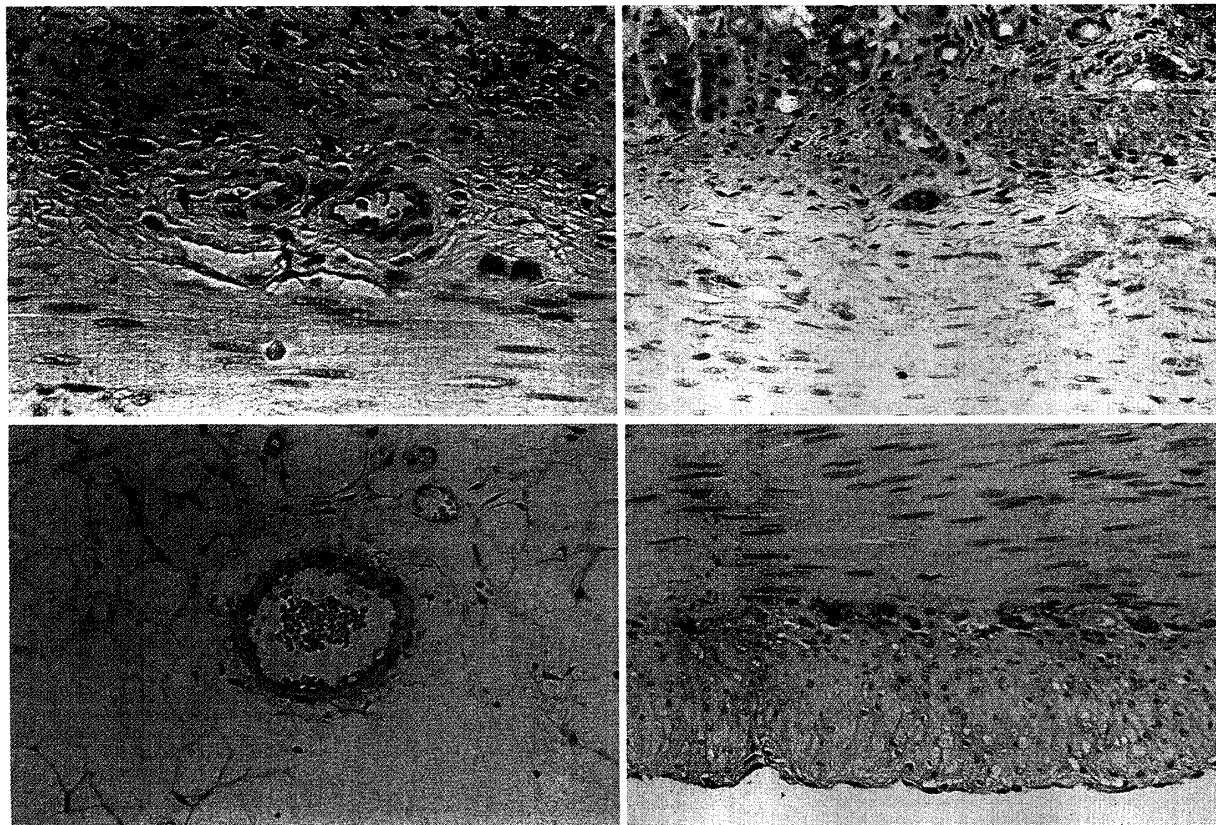


図6 免疫組織学的染色所見

左：eNOS 粘膜下層（上），漿膜下層（下）の動静脈の血管内皮細胞にeNOSの局在を認めた。

右：nNOS 神経線維およびMeissner's神経叢（上），Auerbach's神経叢（下）にnNOSの局在を認めた。

の発現が増強したと推測され、eNOS由来のNOの増加が、急性胃粘膜病変において保護的に働いていると考えられた。また、B群で水浸拘束が180, 360分と長くなるにつれて、潰瘍係数は時間経過とともに増加するにもかかわらず、eNOS mRNAはB₁₈₀、NO_xはB₃₆₀で低下しており、180, 360分のこの期間はNOの作用よりもPGなどの防御因子の低下やETやfree radical等の他因子による病変形成に対する影響が大きいと思われた。

NOと胃粘膜防御因子との関連において、Salveminiら²⁵⁾は、NOがCOXを介してPG産生を促進すると報告しており、また、Brownら¹⁰⁾やTakeuchiら¹¹⁾は、NOは酸分泌抑制および粘液・重炭酸イオン分泌を促進し、粘膜保護に働いていると報告している。Furukawaら²⁶⁾は、NOはcGMP

に依存し、PGを介して重炭酸分泌を増加させると報告している。このようにNOは防御因子を増強することで、胃粘膜傷害に対し保護的に働いていると考えられる。

血管作動性物質であるETとNOの関係では、Slomianyら²⁷⁾は、ETの増加とcNOS低下による両者のバランスのくずれが、急性胃粘膜病変の形成に関与すると報告している。胃粘膜血流との関係では、松本ら²⁸⁾は、NOS阻害剤の投与により胃粘膜血流低下を認め、胃粘膜微小循環の血流増加にNOが関与していると報告している。消化管粘膜傷害に重要とされる好中球浸潤過程においては、Davenpeckら²⁹⁾は、好中球と血管内皮細胞の接着が、NOS阻害剤を投与することにより増加すると報告している。このようにNOは、粘膜血流の調節、粘膜防御因子・接着因子などに作用し、

胃粘膜の恒常性を維持し、保護的に作用していると考えられ、本研究において、A群でNOxの減少やeNOS mRNA発現の増加がないことは、胃粘膜の恒常性の維持や保護作用の低下に関わると考えられ、B群での胃粘膜病変の抑制はNOの保護作用の増加と考えられた。

nNOS由来のNOが非アドレナリン性非コリン作動性神経抑制性神経伝達物質として、消化管末梢神経系における消化管運動調節作用が報告され³⁰⁾、アカラシアなどの病態との関連も報告されている³¹⁾。水浸拘束ストレス胃粘膜病変の発生経路の1つとして、自律神経の関与が従来より報告されているが³²⁾³³⁾、本研究ではnNOS mRNAの発現ではA群、B群で発現量に差を認めず、潰瘍係数との相関性が認められなかったことから、水浸拘束下急性胃粘膜病変の形成にはnNOS由来のNOの関与は少ないと考えられた。

胃病変とiNOSに関しては、*Helicobacter pylori*感染胃粘膜病変でのiNOSの発現増加が報告されている³⁴⁾³⁵⁾。Nishidaら³⁶⁾は、ラット水浸拘束下ストレス実験においてcNOS活性の低下による保護作用の低下とiNOS活性の増加における傷害作用を報告しているが、本研究では、病変形成に従いiNOS mRNAの発現は認められなかった。iNOS由来のNOは、炎症性cytokineなどにより誘導され、好中球、macrophageなどから多量に産生されると組織傷害性に働くと報告されている¹²⁾。本研究における水浸拘束による急性期の胃粘膜病変では、炎症細胞の関わりは少なくiNOS由来のNOの関与は少ないと思われた。

免疫組織学的染色では、胃粘膜下層、漿膜下層の動静脈の血管内皮細胞にeNOSの局在を認め、これについては、Fischerら³⁷⁾も、eNOSが血管内皮細胞に局在することを報告している。血管内皮細胞のストレスに対する反応が保たれ、内皮細胞の機能の1つとしてeNOS mRNAを発現することが、急性胃粘膜病変形成の抑制に重要であると考えられた。

結 論

1. ラット水浸拘束実験において、拘束時間経過とともに胃粘膜病変の増加を認めた。L-Argを腹

腔内前投与すると、30, 60分で急性胃粘膜病変の形成が抑制された。

2. 水浸拘束で、NOxは減少し、eNOS mRNAの増加を認めなかったが、L-Argを腹腔内前投与すると、30, 60分でNOx, eNOS mRNA発現量の増加を認めた。nNOS mRNAは水浸拘束に伴う変化を認めず、iNOS mRNAの発現は認めなかった。

3. 免疫組織学的染色は、胃粘膜下層、漿膜下層の動静脈の血管内皮細胞にeNOSの局在を認めた。

以上より、NOの減少やeNOS mRNA発現が増加しないことが、胃粘膜病変の形成に関わる可能性が示唆され、これは、L-Arg投与により、NO, eNOS mRNAの発現が増加し急性胃粘膜病変が抑制されたことから、eNOS由来のNOが重要であり、NOが保護的に作用している可能性が考えられた。

本稿を終えるにあたり、御指導、御校閲を賜りました林 直諒教授に深謝するとともに、御指導いただいた山下克子教授、重本六男教授、橋本 洋講師、秋本真寿美講師をはじめ成人医学センター、青山病院の諸先生方に深く感謝致します。

文 献

- 1) 秋本真寿美：水浸拘束ストレス潰瘍発生における血中および胃組織中エンドセリンの検討。日消病会誌 87 (6)：1364-1370, 1990
- 2) Furchgott RF, Zawadzki JV: The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 288: 373-376, 1980
- 3) Palmer RMJ, Ferrige AG, Moncada S: Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 327: 524-526, 1987
- 4) Moncada S, Palmwe RMJ, Higgs EA: Nitric oxide. *Physiology and pharmacology*. *Pharmacol Rev* 43: 109-142, 1991
- 5) Moncada S, Higgs EA: The L-arginine nitric oxide pathway. *N Engl J Med* 329: 2002-2012, 1993
- 6) Whittle BJR: Nitric oxide and the gastrointestinal tract. *In Immunopharmacology of the Gastrointestinal Tract*. pp155-167. Academic Press, London (1993)

- 7) **Boughton-Smith NK, Deakin AM, Whittle BJR:** Actions of nitric oxide on the acute gastrointestinal damage induced by PAF in the rat. *Agents Actions* **35**: C3-C9, 1992
- 8) **Salter M, Knowles RG, Moncada S:** Widespread tissue distribution, species distribution and changes in activity of Ca-dependent and Ca-independent nitric oxide synthases. *FEBS Lett* **291**: 145-149, 1991
- 9) **Whittle BJR, Berry S, Lopez-Belmonte J et al:** Detection of the synthase enzyme that forms the endogenous vasodilator, nitric oxide in the rat gastric mucosa. *Gastroenterology* **100**: A184, 1991
- 10) **Brown JF, Keates AC, Hanson PJ et al:** Nitric oxide generators and cGMP stimulate mucus secretion by rat gastric mucosal cell. *Am J Physiol* **265**: G418-G422, 1993
- 11) **Takeuchi K, Ouchi T, Okabe S:** Endogenous nitric oxide in gastric alkaline response in the rat stomach after damage. *Gastroenterology* **106**: 367-374, 1994
- 12) **Middleton SJ, Shorthouse M, Hunter JO:** Increased nitric oxide synthesis in ulcerative colitis. *Lancet* **341**: 465-466, 1993
- 13) **Akimoto M, Hashimoto H, Shigemoto M:** Change of nitric oxide and growth factors during gastric ulcer healing. *J Cardiovasc Pharmacol* **36**: S282-S285, 2000
- 14) **Konturek SJ, Konturek PC:** Role of nitric oxide in the digestive system. *Digestion* **56**: 1-13, 1995
- 15) **Lopez-Belmonte J, Whittle BJR, Moncada S:** The actions of nitric oxide donors in the prevention or induction of injury to the rat gastric mucosa. *Br J Pharmacol* **108**: 73-78, 1993
- 16) **Wright CE, Rees DD, Moncada S:** Protective and pathological roles of nitric oxide in endotoxin shock. *Cardiovasc Res* **26**: 48-57, 1992
- 17) **Nishida K, Ohta Y, Ishiguro I:** Contribution of NO synthases to neutrophil infiltration in the gastric mucosal lesions in rats with water immersion restraint stress. *FEBS Lett* **27** (425-2): 243-248, 1998
- 18) **Nishida K, Ohta Y, Ishiguro I:** Relationship between constitutive nitric oxide synthase activity and mucus level in the gastric mucosa of rats with water immersion restraint. *Pharmacol Res* **38**: 393-400, 1998
- 19) **Takagi K, Kasuya Y, Watanabe K:** Studies on the drugs for peptic ulcer. A reliable method for producing stress ulcer in rats. *Chem Pharm Bull* **12**: 465-472, 1964
- 20) **岡部 進, 竹内孝治, 西脇秀幸:** ラットの各種実験潰瘍発生における系統差について. *Ther Res* **6**: 928-934, 1986
- 21) **Kawata A, Mikuni-Takagi Y:** Mechanotransduction in stretched osteocytes-temporal expression of immediate early and other genes. *Biochem Biophys Res Commun* **246**: 404-408, 1998
- 22) **McQuillan LP, Leung GK, Marsden PA et al:** Hypoxia inhibits expression of eNOS via transcriptional and posttranscriptional mechanisms. *Am J Physiol* **267**: H1921-H1927, 1994
- 23) **Chun TH, Itoh H, Ogawa Y et al:** Shear stress augments expression of C-type natriuretic peptide and adrenomedullin. *Hypertension* **29**: 1296-1302, 1997
- 24) **Tsikas D, Boger HR, Sandmann J et al:** Endogenous nitric oxide synthase inhibitors are responsible for the L-arginine paradox. *FEBS Lett* **478**: 1-3, 2000
- 25) **Salvemini D, Misko TP, Masferrer JL et al:** Nitric oxide activates cyclooxygenase enzymes. *Proc Natl Acad Sci USA* **90**: 7240-7244, 1993
- 26) **Furukawa O, Kitamura M, Sugamoto S et al:** Stimulatory effect of nitric oxide on bicarbonate secretin in bullfrog duodenum in vitro. *Digestion* **60**: 324-331, 1999
- 27) **Slomiany BL, Piotrowski J, Slomiany A:** Role of endothelin-1 and constitutive nitric oxide synthase in gastric mucosal resistance to indomethacin injury: effect of antiulcer agents. *Scand J Gastroenterol* **5**: 459-470, 1999
- 28) **松本太一三, 浅田修二, 稲垣英次:** 防御因子増強剤の胃粘膜血流, 胃粘液増加作用におけるNOの関与について. *Ulcer Res* **25**(2): 115-118, 1998
- 29) **Davenpeck KL, Gauthier TW, Lefer AL:** Inhibition of endothelial-derived nitric oxide promotes P-secretin expression and actions in the rat microcirculation. *Gastroenterology* **107**: 1050-1058, 1994
- 30) **Rodriguez-Membrilla A, Martinez V, Jimenez M et al:** Is nitric oxide the final mediator regulating the migrating myoelectric complex cycle? *Am J Physiol* **286**: G207-G214, 1995
- 31) **森下あつ子:** 食道自律神経支配の検討—健常例およびアカラシア症例の対比—. *慶応医* **70**: 761-776, 1993
- 32) **原田一道, 並木正義:** ストレスと急性胃粘膜病変. *臨消内* **3**: 1419-1424, 1988
- 33) **佐藤信紘, 萩原達雄:** 上部消化管微少循環. *最新医* **46**: 1820-1828, 1991
- 34) **Sakaguchi AA, Miura S, Takeuchi T et al:** Increased expression of inducible nitric oxide synthase and peroxynitrite in *Helicobacter pylori*

- gastric ulcer. *Free Radic Biol Med* **27** (7 · 8): 781–789, 1999
- 35) **Bravo LE, Mannick EE, Zhang X-J et al** : H. pylori infection is associated with inducible nitric oxide synthase expression, nitrotyrosine and DNA damage. *Gastroenterology* **108**: A63, 1995
- 36) **Nishida K, Ohta Y, Ishiguro I** : Role of gastric mucosal constitutive and inducible nitric oxide synthases in development of stress-induced gastric mucosal lesion in rats. *Biochem Biophys Res Commun* **236**: 275–279, 1997
- 37) **Fischer H, Becker JC, Boknic P et al**: Expression of constitutive nitric oxide synthase in rat and human gastrointestinal tract. *Biochim Biophys Acta* **1450** (3): 414–422, 1999
-