

断続的なREM断眠ストレス負荷誘発性マウス腸管輸送能の亢進

新島富紀枝, 下田 将司, 吉田 文, 中川西 修, 丹野 孝一, 只野 武

Accelerated Gastrointestinal Transit Induced by Intermittent Rapid Eye Movement (REM) Sleep Deprivation Treatment in Mice

Fukie NIJIMA, Masakazu SHIMODA, Aya YOSHIDA, Osamu NAKAGAWASAI,
Koichi TAN-NO, and Takeshi TADANO

(Received November 21, 2006)

Clinical reports have shown that irritable bowel syndrome (IBS) is comorbid with anxiety and stress-related events. The treatment of rapid eye movement (REM) sleep deprivation (REMSD) is a potent stressor in animals. Stress in humans commonly results in gastrointestinal dysfunction, which is characterized by its symptomatology because the etiology is completely unknown. In the present study, we found that intermittent REMSD treatment (20 h/day) for 3 days markedly increased gastrointestinal transit of charcoal meal in mice. The accelerated gastrointestinal transit was significantly inhibited by both diazepam (1 and 2 mg/kg, p.o.) and by a peripheral μ -opioid receptor agonist loperamide (3 and 10 mg/kg, p.o.), which are clinically used to treat diarrhea-predominant IBS. The ID_{50} values of loperamide in cage-control (CC) mice and intermittent REM sleep deprived mice were 18.14 mg/kg and 6.78 mg/kg, respectively. These results indicate that intermittent REMSD treatment increases gastrointestinal transit; this model may be useful for evaluating the effects of drugs on diarrhea-predominant IBS, and the supersensitivity of peripheral μ -opioid receptor may be involved in the accelerated gastrointestinal transit.

Key words — REM sleep deprivation; gastrointestinal transit; irritable bowel syndrome; stress; diazepam; loperamide

緒 言

ストレスは個体に対して, 精神, 神経, 内分泌系などの様々な失調を引き起こす原因となり, 身体諸臓器に影響を及ぼす. その中でも, 消化器はストレスによる影響を強く受ける臓器であり, ヒトおよび実験動物に対するストレスの負荷が腸管運動の変化, 排便頻度の増加あるいは下痢を引き起こすことが報告されている.¹⁻⁴⁾

これまでにストレスと腸管運動の関連性を探るため, 拘束ストレスや水回避ストレスが動物モデルとして使用されている.^{5, 6)} 拘束ストレスは装置

が簡便であり個体に傷害をもたらさないため, 最も使用頻度が高い方法である一方, 水回避ストレスは実験スペースを必要とするが身体的拘束を伴わない精神的なストレスを動物に与える. 一般に, ヒトにおいてもストレスは精神的な要因によって引き起こされ, 健常者および過敏性腸症候群 (irritable bowel syndrome: IBS) 患者の両者に対して腸管運動の変化を示す.⁷⁻¹⁰⁾

IBSとは, 排便と関連する腹部不快感あるいは腹痛と便通異常を呈する症候群で, 機能的腸疾患のひとつとされる.¹¹⁾ その病態の形成には, 消化管運動異常, 消化管知覚異常, 心理社会的要因が

関わる事が知られてきており,^{12, 13)} 脳腸相関や多様な受容体の存在を考慮すると, ひとつの薬剤で治療しえるとは考えがたい疾患である. 実際, 腹痛, 下痢あるいは便秘といった消化器症状に対して抗コリン薬, 止瀉薬, 緩下薬がそれぞれ投与されており, 必要に応じて抗うつ薬や抗不安薬が用いられている.^{14, 15)}

IBSに対する新たな治療方法を開発するためには, 病気の要因と同様の状態にあるモデル動物を用いて治療薬の効果を検討しなければならない. 現在, IBSの明確な病態生理は解明されていないが, ストレスがIBS患者の症状を悪化させ, その悪化は抗不安薬の投与によって改善されることから, IBSの病態生理にストレスが深く関係していることが示唆されている.^{16, 17)}

近年, 当研究室において, マウスに20時間のレム (rapid eye movement: REM) 断眠負荷と4時間の休憩をもって1日とする方法を用いて, 断続的にREM断眠ストレスを負荷することにより誘発される異常行動について検討を行っている.¹⁸⁾ この断続的なREM断眠ストレス負荷は, マウスに休憩を与えることにより長期間のREM断眠ストレス負荷の影響を検討することが可能である.

本研究において著者らは, ストレスを反映させたIBSの動物モデルを作製することを目的として, 断続的なREM断眠ストレスがマウス腸管輸送能に及ぼす影響について検討を行い, さらに, 作製したモデルの有効性を評価するため, IBS治療薬として使用されている抗不安薬のジアゼパムおよび止瀉薬のロペラミドの効果について検討を行った.

実験材料および方法

使用動物

実験開始時の体重が19~21gのddY系雄性マウスを使用し, 実験に供するまで室温 $22 \pm 2^\circ\text{C}$, 湿度 $55 \pm 10\%$, 明暗12時間サイクル (8:00~20:00) の一定条件下で, 固形飼料および水道水を自由に摂取させた.

使用薬物

塩酸ロペラミド (Sigma) およびジアゼパム (Sigma) を用いた. 両薬物は0.5% Tween 80に懸濁し, 0.1 mL/10 gの割合で経口投与 (p.o.) した.

塩酸ロペラミドおよびジアゼパムはチャコールミール投与の30分前, すなわち最終REM断眠ストレス負荷解除の直後にそれぞれ投与を行った.

断続的なREM断眠ストレス負荷

Nijimaら¹⁸⁾の方法に従って行った. すなわち, 透明なプラスチックケージ (縦17.3 cm×横24.3 cm×高さ12.7 cm) に円柱 (直径2 cm, 高さ4.8 cm) を固定し, 4 cmの高さまで水を満たし, 個別にマウスを20時間その円柱上に乗せた. その後4時間, 個々の飼育時のケージに戻した. REM断眠ストレス負荷20時間および休憩4時間で1日とし, このように飼育した群を, REM sleep deprivation群 (REMSD群) とし, グループで飼育したマウスをCage-control群 (CC群) とした.

なお, REMSD群に用いた水槽ケージには, 飼料箱と給水瓶を取り付け, CC群および休憩に用いた個々の飼育ケージにも飼料と給水瓶を取り付け, 摂食および摂飲を自由にさせた.

炭末輸送の測定

Nijimaら¹⁹⁾の方法に準じて行った. チャコールミールとして5%炭末を10%アラビアゴム液に懸濁した.

チャコールミールを0.1 mL/10 gの割合で経口投与 (p.o.) し, 20分後, 頸椎脱臼により動物を殺した. 十二指腸開始部から盲腸までを注意深く取り出し, 取り出した腸の全長に対する輸送された炭末の先端まで長さを, 移動率とした.

なお, 動物はチャコールミール投与の20時間前から絶食および自由飲水とした.

統計処理

実験結果は平均値および標準誤差 (mean \pm s.e.) で示した. 有意差検定は分散分析 post hoc test 処理後, Fisher's PLSDの検定に従った. 危険率5%以下を有意差有りと判定した. なお, この検定にはStat view-J 5.0 for Macintoshを用いた.

用量-反応曲線は, 曲線解析プログラム

(GraphPad Prism software: Version 4.0) を用いて解析し, 50% 抑制用量 (50% inhibitory dose: ID_{50}) とその95% 信頼限界を算出した。

結 果

1. 断続的なREM断眠ストレス負荷のマウス腸管輸送に及ぼす影響

断続的なREM断眠ストレス負荷1日目および3日目における負荷解除後のマウス腸管輸送能について, CC群をコントロールとし検討を行った。その結果, ストレス負荷3日目のREMSD群の腸管輸送能がCC群と比較し著しく亢進していた。一方, 1日目のREMSD群とCC群との間に有意な差は認められなかった (Fig. 1)。

2. 断続的なREM断眠ストレス負荷誘発性マウス腸管輸送亢進に対するジアゼパムの効果

断続的なREM断眠ストレス負荷3日目のマウス腸管輸送能の亢進に対するジアゼパムの効果について検討を行った。その結果, ストレス負荷3日目に認められた腸管輸送能の亢進は, ジアゼパム1および2 mg/kgにおいて有意な抑制が観察された。一方, CC群ではいずれの投与量においても有意な差は認められなかった。(Fig. 2)。

3. 断続的なREM断眠ストレス負荷誘発性マウス腸管輸送亢進に対する塩酸ロペラミドの効果

断続的なREM断眠ストレス負荷3日目のREMSD群並びにCC群の腸管輸送能に対する塩酸ロペラミドの効果について検討を行った。塩酸ロペラミドはREMSD群およびCC群の腸管輸送能

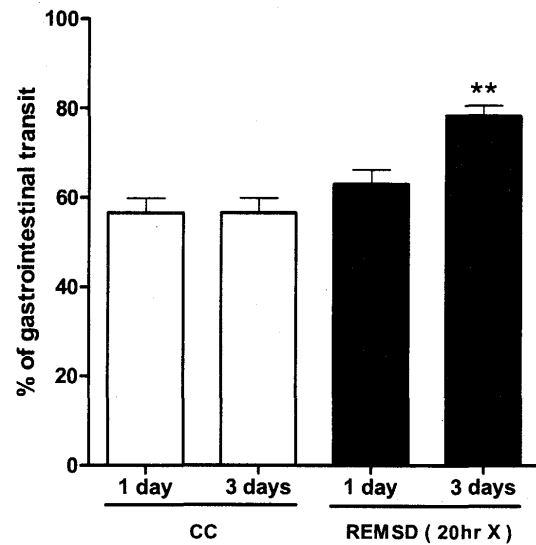


Fig. 1 Influence of intermittent REM sleep deprivation treatment for 1 day and 3 days on gastrointestinal transit in mice. The data are given the mean \pm S.E.M. for groups of 10 mice. ** $P < 0.01$ when compared to CC.

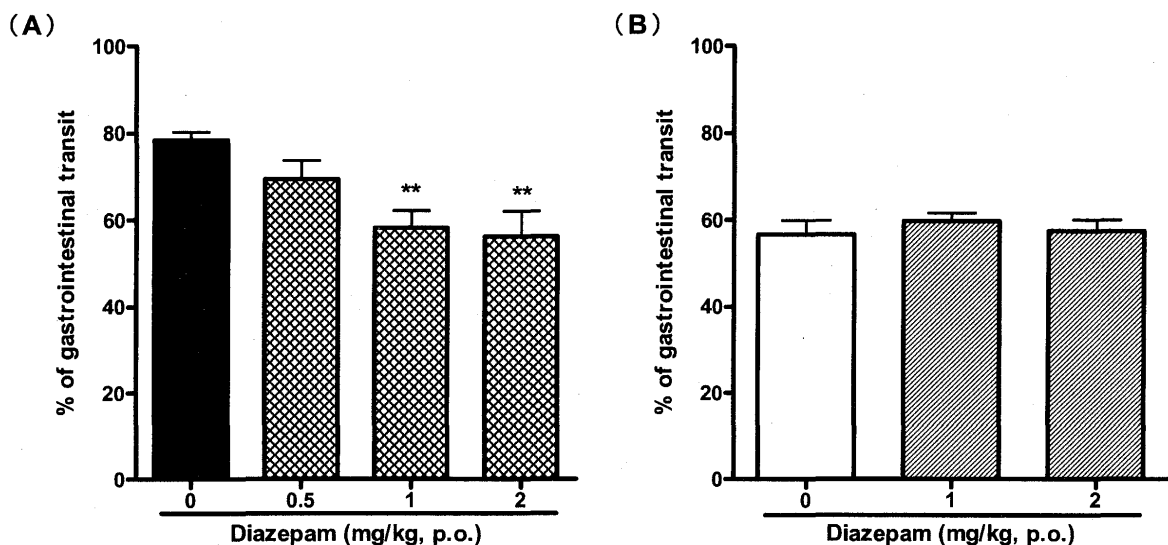


Fig. 2 Effect of diazepam on the gastrointestinal transit in REMSD (A) and CC (B) mice. The data are given as the mean \pm S.E.M. for groups of 12 mice. ** $P < 0.01$ when compared to vehicle-injected mice.

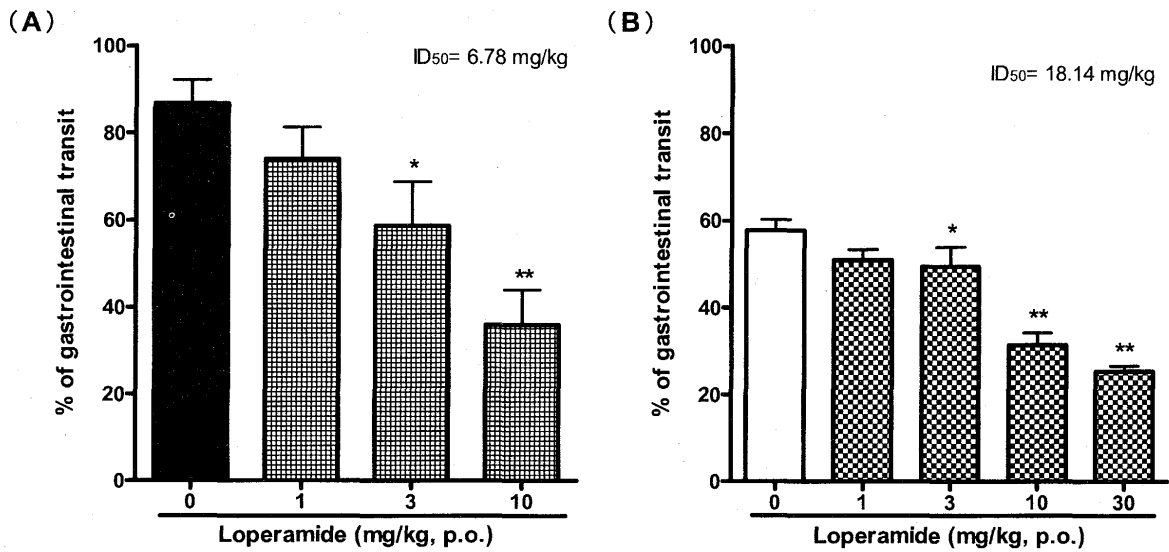


Fig. 3 Effects of loperamide on the gastrointestinal transit in REMSD (A) and CC (B) mice. The data are given as the mean \pm S.E.M. for groups of 10 mice. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ when compared to vehicle-injected mice.

をそれぞれ3 - 10 mg/kgおよび3 - 30 mg/kgの用量において用量依存的かつ有意に抑制し, そのID₅₀値はそれぞれ6.78 mg/kgおよび18.14 mg/kgであった。

考 察

本研究の結果から, 断続的なREM断眠ストレス負荷はマウス腸管輸送能を著しく亢進させることが判明した (Fig. 1). また, REMSD群における腸管輸送能の亢進は負荷日数に応じて増加することが明らかとなった. 本実験ではREM断眠ストレスの負荷方法としてプラットホーム法を用い検討を行った. この方法は, 1964年にJouvetら²⁰⁾が提唱した方法で, 水を張った水槽の中央に小さなプラットホームを設置し, その上に動物を置くことにより動物がREM睡眠時に筋弛緩状態になると水中に落下し覚醒状態となることでREM睡眠をとらせない方法であり, 動物にREM断眠を負荷する方法として広く使用されている. また, 動物から睡眠を奪う以外に長時間姿勢を維持するために肉体的疲労が生じ, 仲間からの孤立や限定された行動範囲, 水中に落下するかもしれないという恐怖感, さらに落下し体がぬれてしまうこと, 並

びに室内温度は一定に保たれているものの水面に近い場合体温が奪われてしまうことなどから, 複合的なストレスモデルとして考えられている.²¹⁻²³⁾先に著者らは, これまで検討されてきた72~96時間という長時間かつ連続的なREM断眠負荷では動物へのダメージが大きすぎるために, 負荷中, 動物が死亡してしまうといった問題点があることから, ヒトの生活様式に近い病態モデル動物を作製するため, 20時間毎に4時間の休憩を与えるといった断続的なREM断眠ストレス負荷を行い, 3日間あるいは5日間の断続的なREM断眠ストレス負荷がマウスに与える影響について報告を行っている. すなわち, 断続的なREM断眠ストレス負荷は負荷日数に依存した著しい跳躍行動を引き起こすことを明らかとし, その跳躍行動が注意欠陥/多動性障害 (attention-deficit/hyperactivity disorder; ADHD) の治療薬であるメチルフェニデートおよびアトモキセチンによって抑制されることから, ADHDの動物モデルとなりうる可能性を示唆している. さらに, それらの薬物の作用機序並びに過去の知見を考慮し, 断続的なREM断眠ストレス負荷誘発性ジャンプ行動の発現には, 青斑核の持続的な興奮やカテコールアミン作動性神経系の調節障害が関与する可能性を示唆している.¹⁸⁾

IBSの病態生理にストレスが深く関係していることが示唆されており,^{16,17)} 拘束ストレスなどの急性ストレスによって発現するIBS症状は、ジアゼパムのストレス負荷前の処置により抑制されることが明らかにされている。⁵⁾ しかしながら、これらのストレスは短時間のストレスであり、一方、本研究において検討を行った断続的なREM断眠ストレスは慢性かつ長期間のストレスであることから、ジアゼパムの投与をストレス負荷前に行い、その効果を検討するには問題があると推測された。また、臨床においてこれらの薬が適用される場合を考慮すると、予防的に用いられることもあるが、すでに発現している症状を抑えることも目的とされている。そこで、すでにストレス負荷による変化、すなわち、断続的なREM断眠負荷誘発性マウス腸管輸送能の亢進が認められるストレス負荷解除の直後にジアゼパムを投与しその効果について検討を行った。その結果、ジアゼパムはCC群の腸管輸送に影響を与えない用量で、REMSD群の腸管輸送能の亢進状態を有意に改善させることが明らかとなった (Fig. 2)。一般に、ストレスは視床下部-下垂体-副腎軸 (hypothalamic-pituitary-adrenal cortex axis: HPA-axis) を活性化させることが知られており、動物にストレスを負荷した際に引き起こされる消化器運動障害と脳室内へコルチコトロピン放出因子 (corticotropin-releasing factor; CRF) を投与したときの作用が酷似していることが判明している。²⁴⁻²⁷⁾ Sucheckiら²⁸⁾ はラットを用いた実験において、4日間のREM断眠ストレス負荷がACTHおよびコルチコステロンを増加させることを明らかにしている。一方、ノルアドレナリン神経の細胞体が存在している青斑核の興奮は、REM睡眠中にのみその興奮が抑制されることから、REM断眠ストレス負荷中には青斑核-ノルアドレナリン神経系の過剰興奮が認められている。²⁹⁻³¹⁾ また、青斑核の興奮は間接的に、室傍核におけるコルチコトロピン放出因子 (corticotropin-releasing factor; CRF) の産生・分泌を刺激しHPA-axisを賦活化する。³²⁾ 室傍核にGABA_A受容体が存在^{33,34)} していることを考え合わせると、断続的なREM断眠ストレス負荷誘発性マウス腸管輸送能の亢進をジアゼパムが抑制した機序とし

て、ジアゼパムはGABA_A受容体機能を亢進させることにより室傍核を抑制し、ストレス負荷により賦活化されたHPA-axisを抑制した可能性が示唆される。これらのことから、今回、マウスに断続的なREM断眠ストレスを負荷することで誘発された腸管輸送能の亢進状態は、ストレスを反映させたIBSモデルとなりうるということが示唆される。

IBSは下痢優勢型、便秘優勢型およびそれらの混合型に分類され、特に下痢優勢型IBSの治療薬に止瀉薬のロペラミドが使用される。ロペラミドは末梢性 μ オピオイド受容体アゴニストであり、腸管の μ オピオイド受容体に作用する。腸管 μ オピオイド受容体の活性化は、コリン作動性神経終末からアセチルコリンの遊離を阻害することにより腸管運動を抑制し、その結果、腸内容物の移動時間が遅延するために腸組織への水分や電解質の吸収が促進され止瀉作用を示すことが知られている。³⁵⁻³⁷⁾ 本研究において、断続的なREM断眠ストレス負荷誘発性マウス腸管輸送能の亢進に対するロペラミドの効果を検討したところ、ロペラミドはCC群およびREMSD群の腸管輸送能に対して用量依存的かつ有意な抑制作用を示すことが明らかとなった。それらの抑制作用についてID₅₀値を算出し比較したところ、REMSD群の方がCC群よりも約2.7倍作用が増強していることから、REMSD群ではロペラミドに対する感受性がCC群よりも増大していることが判明した (Fig. 3)。一方、Lemboら³⁸⁾ はIBS患者において μ オピオイド受容体アゴニストであるフェンタニルの作用が健常者よりも強く発現することから、内因性オピオイドの放出量が減少している可能性を示唆している。これらのことから、断続的なREM断眠ストレス負荷解除後には、腸において μ オピオイド受容体感受性の増加あるいはコリン作動性神経系の機能亢進が引き起こされている可能性が示唆された。

以上、著者らは断続的なREM断眠ストレス負荷がマウス腸管輸送能を亢進させることを明らかにした。さらに断続的なREM断眠ストレス負荷誘発性マウス腸管輸送能の亢進がジアゼパムおよびロペラミドにより有意に抑制されたことから、このマウス腸管輸送能の亢進はIBS下痢優勢型モデルとして有用となる可能性が示唆された。

REFERENCES

- 1) Plourde V., *Can. J. Gastroenterol.*, **13** Suppl, 26A-31A (1999).
- 2) Williams C. L., Villar R. G., Peterson J. M., Burks T.F., *Gastroenterology*, **94**, 611-621 (1988).
- 3) Barone F. C., Deegan J.F., Price W. J., Fowler P. J., Fondacaro J. D., Ormsbee H.S. 3rd., *Am. J. Physiol.*, **258**, G329-337 (1990).
- 4) Monnikes H., Raybould H. E., Schmidt B., Tache Y., *Peptides*, **14**, 743-747 (1993).
- 5) Miyata K., Ito H., Yamano M., Hidaka K., Kamato T., Nishida A., Yuki H., *Eur. J. Pharmacol.*, **250**, 303-310 (1993).
- 6) Martinez V., Rivier J., Wang L., Tache Y., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **280**, 754-760 (1997).
- 7) Yamamoto O., Niida H., Tajima K., Shirouchi Y., Kyotani Y., Ueda F., Kise M., Kimura K., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **287**, 691-696 (1998).
- 8) Kobayashi S., Ikeda K., Suzuki M., Yamada T., Miyata K., *Jpn. J. Pharmacol.*, **86**, 281-288 (2001).
- 9) Narducci F., Snape W. J. Jr., Battle W.M., London R.L., Cohen S., *Dig. Dis. Sci.*, **30**, 40-44 (1985).
- 10) Fukudo S., Nomura T., Muranaka M., Taguchi F., *J. Clin. Gastroenterol.*, **17**, 133-141 (1993).
- 11) Longstreth G. F., Thompson W. G., Chey W. D., Houghton L. A., Mearin F., Spiller R. C., *Gastroenterology*, **130**, 1480-1491 (2006).
- 12) Camilleri M., Choi M. G., *Aliment. Pharmacol. Ther.*, **11**, 3-15 (1997).
- 13) Camilleri M., *Gastroenterology*, **120**, 652-668 (2001).
- 14) Mach T., *Med. Sci. Monit.*, **10**, 125-131 (2004).
- 15) Mulak A., Bonaz B., *Med. Sci. Monit.*, **10**, 55-62 (2004).
- 16) Bennett E. J., Tennant C. C., Piesse C., Badcock C. A., Kellow J. E., *Gut*, **43**, 256-261 (1998).
- 17) Drossman D. A., Ringel Y., Vogt B. A., Leserman J., Lin W., Smith J. K., Whitehead W., *Gastroenterology*, **124**, 754-761 (2003).
- 18) Nijjima F., Nakagawasai O., Tan-No K., Tadano T., *Biogenic Amines* (in press).
- 19) Nijjima F., Tan-No K., Esashi A., Nakagawasai O., Tadano T., Takahashi N., Yonezawa A., Sakurada S., Kisara K., *Peptides*, **21**, 295-299 (2000).
- 20) Jouvet D., Vimont P., Delorme F., Jouvet M., *C. R. Seances. Soc. Biol. Fil.*, **158**, 756-759 (1964).
- 21) Rechtschaffen A., Bergmann B. M., Everson C. A., Kushida C. A., Gilliland M. A., *Sleep*, **25**, 68-87 (2002).
- 22) Suchecki D., Lobo L. L., Hipolide D. C., Tufik S., *J. Sleep. Res.*, **7**, 276-281 (1998).
- 23) Kovalzon V. M., Tsubulsky V. L., *Behav. Brain Res.*, **14**, 235-245 (1984).
- 24) Lenz H. J., Raedler A., Greten H., Vale W. W., Rivier J. E., *Gastroenterology*, **95**, 1510-1517 (1988).
- 25) Gue M., Junien J. L., Bueno L., *Gastroenterology*, **100**, 964-970 (1991).
- 26) Monnikes H., Schmidt B. G., Tache Y., *Gastroenterology*, **104**, 716-723 (1993).
- 27) Williams C. L., Peterson J. M., Villar R. G., Burks T. F., *Am. J. Physiol.* **253**, G582-586 (1987).
- 28) Suchecki D., Lobo L. L., Hipolide D. C., Tufik S., *J. Sleep Res.*, **7**, 276-281 (1998).
- 29) Porkka-Heiskanen T., Smith S. E., Taira T., Urban J. H., Levine J. E., Turek F. W., Stenberg D., *Am. J. Physiol.*, **268**, R1456-1463 (1995).
- 30) Mark j., Heiner L., Mandel P., Godin Y., *Life Sci.*, **8**, 1085-1093 (1969).
- 31) Pujol J. F., Mouret J., Jouvet M., Glowinski J., *Science*, **159**, 112-114 (1968).
- 32) Dunn A. J., Swiergiel A. H., Palamarchouk V., *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **1018**, 25-34 (2004).
- 33) Decavel C., Dubourg P., Leon-Henri B., Geffard M., Calas A., *Cell Tissue Res.*, **255**, 77-80 (1989).
- 34) Decavel C., van den pol A. N., *J. Comp. Neurol.*, **316**, 104-116 (1992).
- 35) Nakayama S., Taniyama K., Matsuyama S., Ohgushi N., Tsunekawa K., Tanaka C., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **254**, 792-798 (1990).
- 36) Kojima Y., Takahashi T., Fujina M., Owyang C., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **268**, 965-970 (1994).
- 37) Taniyama K., Sano I., Nakayama S., Matsuyama S.,

-
- Takeda K., Yoshihara C., Tanaka C.,
Gastroenterology, **101**, 1579-1587 (1991).
- Parker R. A., Gracely R. H., Mayer E. A., *Pain*, **87**,
137-147 (2000).
- 38) Lembo T., Naliboff B. D., Matin K., Munakata J.,