Experimental Stomach-ulcer on Pika

Yukio KODAMA, Takeo SAKAI, Katsushi NAITO*,
and Shigetomo HORIUCHI*

Department of Veterinary Hygiene, College of Agriculture and Veterinary
Medicine, Nihon University, Kameino, Fujisawa-shi, Kanagawa 252,
Japan, and *National Institute of Hygienic Sciences
Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158

(Received 7 April 1989/Accepted 1 August 1989)

Experimental gastric ulcer formation was performed in the pika and compared with that in the rat. Gastric ulcers were formed in pika that were subjected to water restraint for 4~5 days for 2 hours each day. Gastric ulcers were also formed under conditions of 1~4 days for 3 hours each day and 1~2 days for 5 hours each day. The severest (widest) ulcers were obtained under the condition of 5 hours' water restraint. Histopathologically, the ulcers were mostly erosions, but those formed under 5 hours' restraint reached the *tunica muscularis mucosae*. In addition, inflammatory changes were recognized. In contrast, while gastric ulcers in the rat formed within a short time, they were histopathologically less severe than those in the pika. Therefore, water restraint for 4 hours performed 4~5 times is suitable to obtain gastric ulcer formation in the pika and may result in more severe gastric ulcers than in the rat. Compared with the rat, the pika showed differences in the appearance and degree of gastric ulcers formed by the injection of serotonin and reserpine.

ナキウサギにおける実験的胃潰瘍の形成

児玉幸夫・酒井健夫
内藤克司*・堀内茂友*

日本大学農獣医学部獣医衛生学研究室
*国立衛生試験所安全性生物試験研究センター

ウサギ目ナキウサギ科ナキウサギ属に分類されるナキウサギ (*Pika*, *Ochotona rufescens rufescens*) は、1969年にケージ内での飼育・繁殖が成功 [1] した。その後、我が国に導入されて、実験動物中央研究所で維持・生産され [2]、新しい実験動物としての探索がなされてきた [3~5]。著者らも、ナキウサギの生物学的有用性を探る一環として、各種の動物実験のモデルについて検討してきた [18] が、サリドマイドによる催奇形性試験 [6] において、交配させた雌ナキウサギの早期死亡例に、胃に出血を生じ病理組織学的に粘膜筋板に達する胃潰瘍が発生している個体が散見された。そこでナキウサギが実験用動物として実験的胃潰瘍形成に使用で

きるか否かについてラットと比較した。

材料および方法

供試動物および飼育条件：供試動物は、実験動物中央研究所より分与された10~87週齢、体重135~323gのナキウサギ雄59匹、雌55匹と、静岡県実験動物農業協同組合より購入した13~20週齢、体重220~480gのS. D. 系ラット雌雄各100匹を用いた。ナキウサギはアルミ製ケージ (260×400×220mm; クレア) で個別に飼育し、ナキウサギ専用飼料 (CLEA 177; クレア) および水道水を自由に摂取させた。ラットは床敷 (ソフトチップ;

三協ラボ・サービス)を入れたPC ケージ (280×420×180mm ; クレア) を用いて1 ケージあたり4 匹の割合で飼育し、固形飼料 (F 2 ; 船橋農場) および水道水を自由に摂取させた。ナキウサギおよびラットともに、温度24±1℃、湿度55±5%、換気回数オールフレッシュ18回/hr、12時間自動照明の飼育条件で飼育した。

胃潰瘍の形成：

1. 水浸拘束ストレス負荷：ナキウサギおよびラットともに、高木らの方法に準じ [7, 19], 動物をラット

用金網製拘束ケージに入れ、23±1℃の水槽中に胸骨下縁まで、1日1回、1～5時間水浸させた。なお、対照動物は、同じ金網製拘束ケージを用い、水浸せずに5時間拘束のみを1～5日間行なった。

2. 薬物負荷：胃潰瘍形成のために、二種の薬物を用いた。セロトニン (セロトニン・クレアチン硫酸塩；和光純薬) は生理食塩水に溶解し、レセルピン (国立衛試 JMS 77-29) は1%アラビアゴム加生理食塩水に懸濁して投薬した。両薬物ともナキウサギおよびラットの背部

Table. 1. Gross and histopathological findings of stomach ulceration formed by water restraint in pika and rat

species		pika																		
hr. of stress		control			2 hr					3 hr				4 hr			5 hr			
periods of stress		1	3	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	1	2	3	1	2		
sex ^{a)}		M	F	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F	F		
No. of animals		1	1	1	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2	3	5	3
gross ^{b)} findings	—	1	1	1	1	1	1	1	1	2	2	1	1	2	1	1	2	1	1	1
	±											1	1			1		1	1	1
	+											1				1		1	1	1
	⦿											1				1		1	1	5
histopathological ^{c)} findings	I									1	2	2	1	1	2	1	2	2	3	1
	II																	1	2	2
	III																			
	IV																			
species		rat																		
hr. of stress		control			2 hr					3 hr				4 hr			5 hr			
periods of stress		1	3	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	1	2	3	1	2		
sex ^{a)}		M	F	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F	F		
No. of animals		2	2	2	2	2	2	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4		
gross ^{b)} findings	—	2	2	2	2	2	1	1										1		
	±						3	1	1	4	2	4	3	3	1	2				
	+						3	3	3	2	1	1	3	2	4	1	3	2		
	⦿																	1	3	2
histopathological ^{c)} findings	I					3	4	3	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4		
	II																			
	III																			
	IV																			

a) M : male F : female b) Gross findings of stomach mucous membrane : (—) no change (±) a few small ulcers (+) scattered small ulcers (+) congregated small ulcers or large ulcer c) Histopathological findings of stomach : (I) ulcer is limited to *tunica mucosa* (II) ulcer reaches *tera submucosa* (III) ulcer reaches *tunica muscularis* (IV) ulcer reaches *tera subserosa*

Table. 2. Gross and histopathological findings of stomach ulceration induced by S. C. injection in pika and rat

species	pika											
drugs	Saline (control)				Serotonin				Reserpine			
dose (mg/kg)	0	0	0	5	10	10	30	1	2	10		
No. of injections	1	5	8	5	1	5	1	8	5	1		
sex ^{a)}	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F
No. of animals	3	2	3	2	1	1	3	2	3	3	3	3
gross ^{b)} findings	—	3	2	3	1	1	1	3	1	3	3	3
+				1			1				2	3
‡										3		
IV										1		
histopathological ^{c)} findings	I			1			1				2	3
II											2	
III												
IV												

species	rat											
drugs	Saline (control)				Serotonin				Reserpine			
dose (mg/kg)	0	0	0	5	10	10	30	1	2	10		
No. of injections	1	5	8	5	1	5	1	8	5	1		
sex ^{a)}	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F
No. of animals	4	4	4	4	2	2	4	4	4	4	4	4
gross ^{b)} findings	—	4	4	4	4	2	2	4	4	1	1	2
+										2	2	2
‡										1	1	1
IV										1	1	1
histopathological ^{c)} findings	I						3	3	3	3	3	3
II										1		2
III											2	
IV												

a) M : male F : female b) Gross findings of stomach mucous membrane : (—) no change (±) a few small ulcers (+) scattered small ulcers (‡) congregated small ulcers or large ulcer c) Histopathological findings of stomach : (I) ulcer is limited to *tunica mucosa* (II) ulcer reaches *tera submucosa* (III) ulcer reaches *tunica muscularis* (IV) ulcer reaches *tera subserosa*

皮下に体重100 g 当たり 1ml の割合に調製して、1 日 1 回合計 1 ～ 8 回注射した。対照動物には生理食塩水を 1 日 1 回、1、5 および 8 回背部皮下に体重 100 g 当たり 1ml 注射した。

胃潰瘍形成の判定：

ナキウサギおよびラットは、ともに水浸拘束ストレス負荷では処置終了直後に、薬物負荷では最終投与18時間

後に、断頭により屠殺した。直ちに胃を摘出し、噴門側を結紮して、十二指腸側より生理食塩水を10ml 注入し、10%ホルマリン液中で約10分間固定した。固定した胃は、大彎側に沿って切開し実体顕微鏡下で観察した。

胃粘膜面の変化を肉眼的に(一)～(‡)に分類した。即ち、(一)は変化が見られない場合、(±)は小さい潰瘍が数個見られる場合、(+)は小さい潰瘍が散発して

いる場合、(++)は小さい潰瘍が密発または大きい潰瘍ないしは線状の潰瘍が見られる場合とした。その後、胃は常法に従ってパラフィン包埋して、連続切片を作製し、H-E染色を施し、病理組織学的に検索した。なお潰瘍の深達度を(I)~(IV)に分類した。即ち、(I)は潰瘍が粘膜に局限している場合、(II)は潰瘍が粘膜下組織におよぶ場合、(III)は筋層の一部にまで欠損が生じた場合、(IV)は筋層全層におよぶ場合とした。

成 績

1. 水浸拘束ストレス負荷：肉眼的にはナキウサギおよびラットともに、水浸せず5時間の拘束を1~5回行った対照群では、胃潰瘍は形成されなかった。

拘束して1日1回の割合で2時間水浸したナキウサギは、4日目に雌雄とも2例中各1例に潰瘍(++)がみられた。5日目に雌では2例中2例に潰瘍(+++)がみられ、そのうち1例は水浸終了直前に死亡した。3時間水浸したナキウサギでは、1日目に雄では2例中2例(±~+)、雌では2例中1例(±)に潰瘍がみられた。2日目に雌2例中1例(++)に潰瘍がみられた。3日目に雄では2例中2例(±~++)、雌では2例中1例(+)に潰瘍が形成された。4日目に雌雄とも2例中2例(±)に潰瘍が形成された。4時間水浸したナキウサギおよび5時間水浸したナキウサギでは、1回の負荷で重度の胃潰瘍が形成された。とくに5時間水浸したナキウサギでは胃潰瘍の程度は強く、雄では負荷1日目および2日目に、各3例が水浸終了直前に死亡した。一方ラットは、水浸2時間を1~5回および水浸3時間を、1~4回負荷した場合はいずれも胃潰瘍を認めたが、その程度は(±)から(+)であり、ナキウサギに比べ軽度であった。ラットを水浸4時間および5時間で1回ないし3回負荷した場合、ナキウサギと同様に重度の胃潰瘍が認められた。なおラットでは負荷期間中に死亡例は認められなかった。

病理組織学的には、肉眼的に(++)を認めた16例のナキウサギのうち、6例が粘膜筋板まで達する深達度(II)の潰瘍であり、その多くが5時間負荷であった。これらの症例では、筋層は軽度肥厚し、出血、細胞浸潤、線維素の析出も認められた。ラットでは全例に、表面粘膜上皮の脱落が見られるのみで、炎症性変化は認められなかった。

2. 薬物負荷：ナキウサギに生理食塩水を5回投与した対照群の雌2例中1例が、最終投与後に死亡した。肉眼的にはその個体の胃にごく軽度の潰瘍が認められた

が、生理食塩水を投与した対照群のうち他の群では雌雄とも胃潰瘍は認められなかった。ナキウサギにセロトニン5mg/kgを5回負荷した雌の2例中1例に胃潰瘍が形成された。しかし、セロトニンを10mg/kgおよび30mg/kg負荷したナキウサギでは、胃潰瘍は認められなかった。レセルピンを1mg/kgで8回負荷したナキウサギの雌では、3例中2例、2mg/kgで5回負荷した雄3例および雌2例は全例に胃潰瘍が形成され、そのうち雄2例、雌1例が最終投与後に死亡した。一方、ラットにセロトニンを10mg/kgで1回および5回負荷した場合および30mg/kgで1回負荷した場合、いずれも雌雄各4例中3例にそれぞれ胃潰瘍が形成された。ラットにおけるセロトニン負荷による胃潰瘍は、ナキウサギに比べて高率に形成された。ラットにレセルピンを1mg/kgで8回負荷すると雄で4例中1例、雌には無く、2mg/kgで5回では雄で4例中2例、雌には無く、10mg/kgで1回では雄で4例中3例、雌で4例中2例に胃潰瘍が形成された。レセルピン負荷による胃潰瘍の形成は、ナキウサギとほぼ同様な結果であった。

病理組織学的には、セロトニンおよびレセルピン負荷を通じて、ナキウサギおよびラットとも全て表面粘膜上皮のみが脱落しており胃潰瘍の深達度は(I)で、ナキウサギとラットに胃潰瘍の深達度に差はみられなかった。

考 察

胃潰瘍の発生は、Sunのバランス説[9]に示されるように、塩酸・ペプシンの分泌亢進に代表される攻撃因子と、胃粘膜の抵抗、粘膜血流、粘液産生能等の防御因子のバランスを失った時に生じ、その他調節因子が関与しているといわれている[10]。ヒトの胃潰瘍の疾病モデル動物としては古くから、ラットをはじめウサギ、イヌ等多くの動物が用いられているが、これらの動物では自然発生の胃潰瘍はほとんど認められない[13]。従って、以下のような実験処置ないし薬物投与などにより胃潰瘍モデルが作成されるが、それらモデルの特徴として、胃潰瘍の発生機序の研究に適するものと、治癒機転を調べるものと大別される[11]。発生機序研究のための胃潰瘍モデルの作成[12]には、幽門結紮法、水浸拘束ストレス法およびアスピリン、ヒスタミン、セロトニン、レセルピン等の薬物投与方法がある。これらは、抗潰瘍薬の効力検定試験によく用いられる。一方、治癒機転研究のための胃潰瘍モデルの作成には、創傷潰瘍として酢酸注入法および粘膜焼灼法等がある。いずれの方法も選択の基準は手技が容易で、安定した胃潰瘍が形成され、

ヒトの胃潰瘍に近い病変像を呈し、しかも可逆的な変化を有するものであることが望まれている。上述したように、手技が容易なもののひとつとして水浸拘束ストレスをラットに負荷すると、高い発生率で胃潰瘍が形成される[8]。この水浸拘束ストレスは腺胃部の細胞動態が抑制される[14]ので、胃潰瘍の形成に有用な方法である。我々はナキウサギにおいて以前に行なった催奇形性試験の際、自然発生と思われる胃潰瘍を散見した経験より、ナキウサギにラットで用いられている水浸拘束ストレスを負荷して潰瘍形成をみたところ水浸拘束2時間・4回の負荷で、また水浸拘束3～5時間では1回の負荷でラットと同様な胃潰瘍が形成された。その上、水浸拘束5時間の負荷の場合、ラットでは浅い線状の潰瘍を生じたが、ナキウサギでは小さな点状出血が密に集簇して大きな斑状の潰瘍を形成し、その深達度は粘膜筋板にまで達していた。このことからナキウサギはラットに比し、より重度の潰瘍が形成されうるものと思われた。また、以前に経験した自然発生と思われる胃潰瘍と今回の水浸拘束法による胃潰瘍は、肉眼的・病理組織学的に違いは認められなかった。ただ、今回の実験でナキウサギでは5時間の水浸負荷により死亡する個体が認められ、死亡原因としては、低水温による体温低下も原因のひとつと考えられる。水浸したラットの体温は、180分後に25℃以下になるとの報告[15]があるので、水浸拘束ストレス法においては水温および負荷時間の設定が重要であろう。ナキウサギに水浸拘束ストレス法を用いる場合は、今回の結果から水温23±1℃の条件で潰瘍を形成するには負荷時間は2～4時間、負荷回数は1日1回の割合で4回ないし5回程度がナキウサギが死亡しない限度であると判断された。

セロトニン投与による胃潰瘍の形成は、ナキウサギではラットに比べ明らかに低かった。一般に、セロトニンの胃潰瘍形成作用は、動物種によって、また同じ動物でも個体によっても異なることが知られている[16]。レセルピン投与による胃潰瘍の形成では、両動物種で大きな差はないものと思われる。

今回の実験では、水浸ストレス法および薬物投与法ともに負荷を連続して加えるためナキウサギおよびラットを絶食しなかった。中川ら[17]によるとラットで、飢餓状態を保ったまま1日～6日まで5時間の水浸拘束を反復すると1日群でわずかに出血がみられるだけであるが、6日群では前胃および腺胃ともに広汎な出血と炎症性細胞の浸潤がみられ、潰瘍の深達度も粘膜筋板まで達したと報告している。我々の水浸拘束による実験結果からは、ラットは浅い潰瘍のみであるが、同様の処置でナ

キウサギは粘膜筋板に達する例がみられた点で特徴があった。ナキウサギがラットより潰瘍の深達度が深い原因のひとつとして、ナキウサギは皮膚の真皮乳頭層にMast Cellが多い[18]ことから、Mast Cell由来のヒスタミンが胃液分泌に関与していることも考えられた。

今回の実験に供試したナキウサギの例数はラットのそれと比較して少なく、またラットで示したような安定した傾向は少なかったが水浸拘束法においてナキウサギが胃潰瘍のモデル動物として使用できる可能性が示唆されたものと考えられる。

要 約

ナキウサギを用いて実験的潰瘍の形成についてラットと比較・検討した。ナキウサギに水浸拘束ストレスを1日当たり2時間負荷すると4から5日に胃潰瘍が形成された。3時間の負荷では1～4日、4時間の負荷では1～3日および5時間の負荷では1～2日に形成した。特に5時間負荷では広範な潰瘍が形成した。病理組織学的には多くは粘膜に局限していたが、5時間負荷では粘膜筋板に達しており、炎症性変化も認められた。一方、ラットは1日当たりのストレス負荷が短時間で胃潰瘍が形成したが、組織学的にはナキウサギに比べて軽度であった。従って、ナキウサギで胃潰瘍を形成するには、4時間4～5回程度が適しており、ラットより重篤な胃潰瘍が形成される可能性がある。ナキウサギにセロトニンおよびレセルピンを皮下投与した場合、胃潰瘍の出現と程度に差が認められ、この点ラットと異なった。

文 献

- [1] Puget, A. (1973). The Afgan pika (*Ochotona rufescens rufescens*): a new laboratory animal. *Lab. Animal Sci.*, **23**, 248-251.
- [2] 松崎哲也・斉藤宗雄・山中聖敬・江崎孝三郎・野村達次 (1980). 実験動物としてのナキウサギ (*Ochotona rufescens rufescens*) の室内飼育および繁殖. 実験動物, **29**, 165-170.
- [3] Yokota, M., Suzuki, H., Hata, T., Sakamoto, K., and Takeda, U. (1983). Morphological studies on ocular and auditory character of *Ochotona Rufescens*. *Exp. Anim.*, **32**, 159-165.
- [4] Yamanaka, M., Matsuzaki, T., and Saito, M. (1983). Length and weight of gastrointestinal tracts of pikas, suncus, millardias, mice and rats. *Exp. Anim.*, **32**, 47-49.
- [5] Suzuki, S., Ago, A., Nishinakagawa, H., and Otsuka, T. (1985). Fine structure of the mandibular gland in pika (*Ochotona rufescens rufescens*). *Exp. Anim.*, **34**, 267-276.
- [6] Nishimura, H., Shiota, K., Uwabe, C., and Nomura, T. (1986). Joint study on the teratogenic sensitivity

- of the pika (*Ochotona rufescens rufescens*) to selected drugs. *Exp. Anim.*, **35**, 387-408.
- [7] Takagi, K. (1964). Studies on the drugs for peptic ulcer in rats. A reliable method for producing stress ulcer in rats. *Chem Pharm Bull.*, **12**, 465.
- [8] 西崎弘之(1969). 実験的胃十二指腸潰瘍. 東邦医学会誌, **16**, 200-208.
- [9] Sun, D. C. H. (1974). Etiology and pathology of peptic ulcer. In *Gastroenterology*, Vol. 1, pp. 579 Bockus H. L. (edit.), Saunders Co.
- [10] 三宅健夫 (1981). 粘膜防御機構と内視鏡, *Gastroent. Endosc.*, **23**, 1460-1461.
- [11] 松尾裕・関敦子(1985). 消化性潰瘍, 動物モデル利用集成, pp 247-254, 伊藤隆太, 高橋良, 本田西男編 R & D プランニング, 東京.
- [12] 山村雄一・林秀雄(1976). 臓器炎とその疾患モデル, 炎症学叢書, pp.136-160, 医学書院, 東京.
- [13] 岡部進(1984). 消化性潰瘍の実験モデル, 日本臨床, **42**, 43-47.
- [14] 桑山肇・鈴木明・池田裕子・竹内勝啓・田代義教・富野佳朗・小橋恵津・阿部政直・松尾裕・本田利夫 (1983). 水浸拘束ストレスラットの胃粘膜細胞動態, 医学のあゆみ, **126**, 79-81.
- [15] 村上元庸・関真理・斎田宏・稲田雅美・三宅健夫・藤本直規 (1984). 水浸拘束ストレス潰瘍における血流粘度, 胃粘膜血流の検討, 日消誌, **80**, 2520-2524.
- [16] グッドマン・ギルマン (1980). 薬物治療の基礎と臨床, pp. 725-774, 広川書店, 東京.
- [17] 中川公彦・高木洋治・岡田正(1983). ラット急性胃粘膜病変の実験モデル, 医学のあゆみ, **126**, 33-34.
- [18] Sakai, T., Yamada, S., Taniguti, Y., Kodama, Y., Horiuti, S., and Nomura, T. (1987). Biological features of the skin of the pika, *Ochotona rufescens rufescens*: Histological structure and enzymatic histochemical reactivity. *Exp. Anim.*, **36**, 125-133.
- [19] Takagi, K. and Okabe, S. (1968). The effects of drugs on the production and recovery progresses of the stress ulcer. *Jap. J. Pharmac.*, **18**, 9-18.

Explanation of Figures

Fig. 1. Various sized ulcers are scattered in the stomach of a male pika subjected to water restraint for 2 days, 5 hr each day

Fig. 2. The severest stomach ulcer in a male pika subjected to water restraint for 2 days, 5 hr each day

Fig. 3. Ulceration, hemorrhage and cell infiltration in the mucosa of the stomach of a male pika subjected to water restraint for 2 days, 5 hr each day (H-E stain, $\times 40$)

Fig. 4. Erosion in the mucosa of the stomach of a male pika subjected to water restraint for 2 days, 5 hr each day (H-E stain $\times 40$)