

エタノールによるラット胃粘膜病変発生における エンドセリン-1の病因的役割

小川 亮 矢花 剛

札幌医科大学医学部内科学第1講座 (主任 谷内 昭 教授)

Pathogenetic Role of Endothelin-1 on Ethanol -induced Gastric Mucosal Lesion of the Rat

Akira OGAWA and Tsuyoshi YABANA
Department of Internal Medicine (Section 1)
Sapporo Medical University School of Medicine,
(Chief: Prof. A. YACHI)

ABSTRACT The pathogenetic role of endothelin-1 (ET-1), which is a potent vasoconstrictor peptide derived from vascular endothelial cells, was studied using a model of ethanol (EtOH)-induced gastric mucosal damage (GMD) in the rat.

Synthetic peptide ET-1 infusion into the left gastric artery caused mucosal alterations such as edema, erythema and erosion and, microscopically, marked dilatation and congestion of collecting venules in the lamina propria mucosae. Inasmuch as monastral blue B pigments, a vascular tracer, were deposited remarkably in the lamina propria mucosae, it was strongly suggested that ET-1 directly gave rise to mucosal vascular damage. ET-1 reduced gastric mucosal blood flow in a dose-dependent manner and significantly increased the lesion score of gastric mucosa.

After ingestion of 50% EtOH, immunohistological examination showed that endogenous ET-1 occurred in the vascular endothelial cells in the deep parts of fundic glands. In addition, it was confirmed using immunoblot analysis that monoclonal anti-ET-1 antibody reacted to the extracts of fundic mucosa from rats treated with 50% EtOH ingestion.

Infusion of anti-ET-1 serum (1:500) into the jugular vein significantly depressed the development of GMD induced by 50% EtOH ingestion, while pooled normal rabbit serum (1:500) infusion did not.

Low concentrations of EtOH stimulated immunoreactive ET-1 release from a cultured cell of human vascular endothelium, but did not release 6-keto-PGF_{1α}, a PGI₂ metabolic product.

These results strongly suggest that endogenous ET-1 is released from vascular endothelial cells in the fundic mucosa by EtOH ingestion and may have an important role in the pathogenesis of EtOH-induced GMD.

(Received September 30, 1993 and accepted November 2, 1993)

Key words: Endothelin-1, Ethanol, Gastric mucosal damage, Microcirculation, Pathogenesis

1 緒 言

内皮細胞由来の血管収縮ペプチド、エンドセリン (ET) は、Yanagisawa ら¹⁾ (1988) によって発見され、構造と生物活性の異なる3種類 (ET-1, ET-2 および

ET-3) からなるペプチドファミリーを形成している。また、ET は内皮細胞以外の組織においても産生され^{2,3)}、しかも血管収縮作用の他にも多彩な生理的作用が明らかにされている⁴⁾。これまでのETに関する知見の大部分は、心・血管系の生理学的・病態生理学的研

究⁵⁻¹⁰⁾に負うところが大きく、消化管粘膜の形態と機能、消化性潰瘍などの胃粘膜病変発生との関連性について検討した報告は少ない。

本研究では、まず①合成 ET-1 をラットに投与して胃粘膜および胃粘膜微小循環系に及ぼす影響を観察し、②胃粘膜に局在する内因性 ET-1 の病態生理学的役割を明らかにする目的で、ラットエタノール (EtOH) 潰瘍モデルにおける胃粘膜病変を免疫組織学的に検討し、③抗 ET-1 血清の投与により EtOH 誘発胃粘膜病変に影響がみられるか否かを観察した。さらに、④ヒト血管内皮培養細胞を用いて EtOH 添加による ET 分泌への影響を検討した。

2 対象および方法

2.1 実験動物および材料

Wistar 系雄性ラット (体重 220~250 g) を用いて ET-1 の胃粘膜における病態生理学的役割を検討した。ラットは水のみを自由に与え、24 時間絶食させた。麻酔を必要とする実験にはペントバルビタール麻酔 (5 mg/100 g, i. p.) を用い、屠殺に際してはすべて軽エーテル麻酔下で行った。

また、血管内皮細胞に対する EtOH の直接作用の検討には、正常ヒト臍帯血管内皮細胞 (HUVEC: クラボウ, 大阪) を用いた。

2.2 ET-1 左胃動脈内投与の胃粘膜に及ぼす影響

2.2.1 ET-1 の左胃動脈内投与法

ペントバルビタール麻酔下で腹部を正中切開し、直視下に胃を反転して、左胃動脈に 27 ゲージ翼状針を実体顕微鏡観察下で挿入・固定し、持続注入器 (Harvard Apparatus Pump 22, USA) を用いて、生理食塩水 (生食水) で調整した ET-1 (ペプチド研究所, 大阪) 2.5, 5.0 および 10 pmol/100 g/min を、それぞれの用量において 30 分および 60 分間持続動注 (25 μ l/min) した。なお、対照群には生食水を同様に持続動注した。また、経過をおって、胃粘膜血流量、胃粘膜病変および胃粘膜血管損傷の程度を観察した。

2.2.2 胃粘膜血流 (gastric mucosal blood flow: GMBF)

前胃より血流測定用プローブを挿入し、レーザー Doppler 血流計 (Periflux 3, Perimed 社, Sweden) を用いて、GMBF 量を ET-1 投与後 30 分後まで測定した。

2.2.3 胃粘膜スコア (lesion score: LS)

ET-1 持続動注 30 分および 60 分群の胃粘膜変化の程度を、浮腫 1, 発赤 1, 点状出血 2, 小びらん 3 およ

び線状びらん 5 点として、加算して得られた総得点を LS とし、比較した。

2.2.4 胃粘膜血管損傷の観察

胃粘膜血管損傷の程度は、既報¹¹⁾に従って、vascular tracer として 3% monastral blue B (Sigma Chemical, USA) 色素法を用い、グリセリン透徹標本を作製して観察した。なお、組織学的観察には periodic acid and Schiff-alcian blue (PAS-ab, pH 2.5) 重染色法を用いた。

2.3 EtOH 誘発胃粘膜病変における内因性 ET-1 変化

2.3.1 組織標本の作成

ラット胃内に 50% EtOH (1.5 ml) を投与し、胃粘膜病変を惹起させた。EtOH 投与 30 分後に軽エーテル麻酔下で胃を摘出、大弯切開し、胃体部を periodate-lysine-paraformaldehyde (PLP) 固定した。次いで sucrose 加リン酸緩衝食塩液 (PBS, pH 7.4) で洗浄後、optimum cutting temperature (OCT) compound (Miles Laboratories Inc, USA) で包埋、凍結薄切切片を作製し、酵素抗体法による免疫染色に供した。

2.3.2 内因性 ET-1 の免疫染色

免疫染色には、アビジン・ビオチン・ペルオキシダーゼ複合体 (ABC) 法¹²⁾を用いた。簡単に述べると、薄切切片 (4~5 μ m) をまず内因性ペルオキシダーゼ活性を阻止し、PBS で洗浄後、一次抗体としてモノクローナル抗 ET-1 抗体 (ヤマサ醤油, 東京) と反応させた (4°C, 12 時間)。PBS で洗浄後、二次抗体としてビオチン化ウマ抗マウス IgG 抗体 (Vector 社, USA) と反応させた (室温, 30 分間) 後、PBS で洗浄、ABC 試薬 (Vectastain ABC キット, USA) と反応させた。次いで、diaminobenzidine (DAB)-H₂O₂ (片山化学, 東京) により発色、マイヤーのヘマトキシリンによる核染色を行った後、脱水・透徹・封入し、観察した。なお、本免疫染色の特異性を確認する目的で、反応開始 30 分前に一次抗体に ET-1 を 10 μ g/100 μ l 加え混和し、阻止試験を行った。

2.3.3 胃粘膜抽出物のイムノブロット解析

ラット胃内に 50% EtOH を投与し、30 分後軽エーテル麻酔下で屠殺して、胃体部粘膜を剝離した。ポリトロン (Kinematica, Switzerland) でホモゲネート (25,000 rpm, 10 秒間, 3 回) し、高速遠心分離 (7,000 \times g, 30 分間) し、その上清を PBS で 10 倍および 100 倍希釈した後、100 μ l を吸着固定装置を用いてニトロセルロース膜に吸着した。一次抗体として、モノクローナル抗 ET-1 抗体と 90 分間、二次抗体として、ペルオキシダーゼ標識家兎抗マウス IgG 抗体 (DAKO,

Denmark) と2時間反応させ、4-chloro-1-naphthol (Bio-Rad, USA) で10分間発色した。

2・4 EtOH 誘発胃粘膜病変に及ぼす抗 ET-1 血清投与の影響

ペントバルビタール麻酔下にラット頸静脈にカニューレーションし、生食水で500倍に希釈した家兎抗 ET-1 血清 (ペプチド研究所, 大阪) を $50 \mu\text{l}/\text{min}$ の速度で30分間持続静注し、その時点で50%EtOH 1.5 ml を胃内投与した (抗 ET-1 血清群)。さらに同抗 ET-1 血清を30分間継続投与後、胃を摘出して写真撮影し、胃粘膜病変の面積 (mm^2) をデジタイザ (KD-3200: Graphtec 社, 東京) を用いて計測し、本項の実験における潰瘍指数 (UI) とした。対照群には、正常家兎プール血清を生食水で500倍に希釈し、それを同量持続静注した。

2・5 ヒト血管内皮培養細胞を用いた検討

HUVEC を培養プレート (Nuclepore 3524, Costar 社, USA) を用いて培養し、confluent な状態 (各ウェル当り、約 10^5 個) で、ウシ胎仔血清を含まない Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) で1時間洗浄した後、0, 0.5 および1% の EtOH を含む DMEM で 37°C 、5% CO_2 インキュベーター内で1時間培養した。各ウェルの培養上清を採取し、ELISA 法によるエンドセリン測定キット (IBL, 藤岡) により、immuno-reactive ET-1 (irET-1) 濃度を測定した。また、RIA・

PEG 法¹³⁾ により、6-keto-PGF_{1 α} 濃度を測定した。

なお、本項の陽性対照群として、トロンビン (ミドリ十字, 大阪) $10 \text{ U}/\text{ml}$ を含む DMEM を用いて培養した際の培養上清を用いた。

2・6 推計学的検定

UI, 胃粘膜 LS および irET-1 の濃度は、すべて平均値 \pm 標準誤差で示し、それぞれの有意差検定は、対応のない場合の両側 *t* 検定により行った。

3 成績

3・1 ET-1 投与の胃粘膜に及ぼす影響

3・1・1 肉眼的変化

ET-1 ($2.5 \text{ pmol}/100 \text{ g}/\text{min}$) の選択的左胃動脈内投与 (動注) 5分後 (Fig. 1-b) より、胃粘膜全域に色調の変化 (蒼白化) がみられたが、30分後には胃体部を

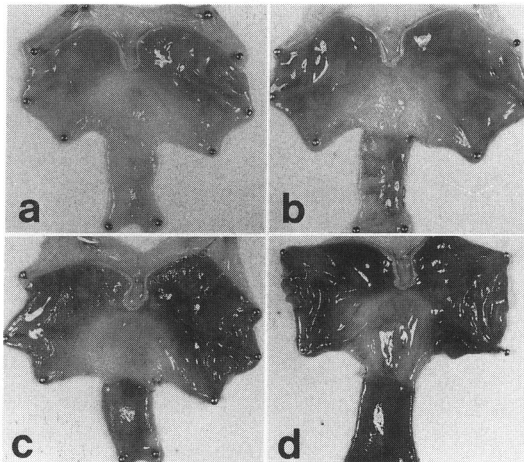


Fig. 1 Macroscopic findings of the fundic mucosa after synthetic peptide endothelin-1 (ET-1) with various concentrations was infused for 30 min into the left gastric artery of the rat. Mucosal changes (edema, erythema and erosion) by the ET-1 administration increased in dose-dependent manner. a) saline (control), b) ET-1: $2.5 \text{ pmol}/100 \text{ g}/\text{min}$, c) $5.0 \text{ pmol}/100 \text{ g}/\text{min}$ and d) $10.0 \text{ pmol}/100 \text{ g}/\text{min}$.

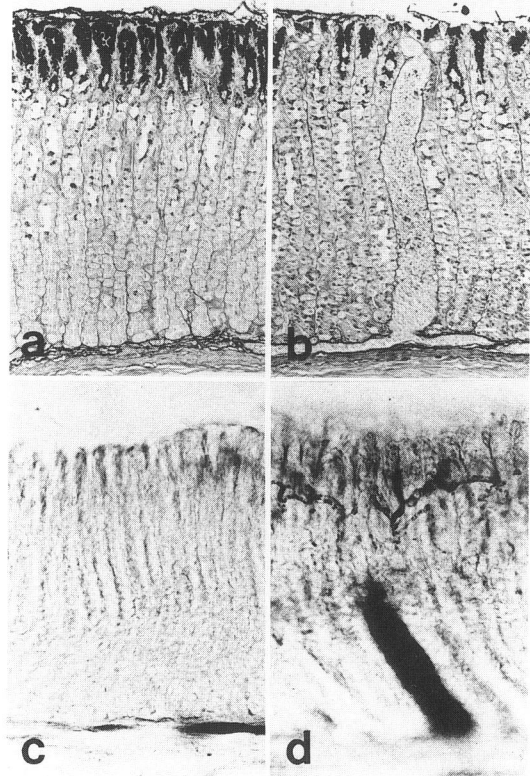


Fig. 2 Microscopic findings of the fundic mucosa after synthetic peptide endothelin-1 (ET-1: $2.5 \text{ pmol}/100 \text{ g}/\text{min}$) was infused for 30 min into the left gastric artery of the rat. a) saline (control; PAS-alcian blue, $\times 150$), b) the intraarterial infusion of ET-1 (PAS-alcian blue, $\times 150$), c) saline (glycerol cleared fundic mucosa, $\times 110$) and d) the intraarterial infusion of ET-1 (glycerol cleared fundic mucosa, $\times 110$).

中心に粘膜の充血と著明な浮腫がみられた。ET-1 5.0 および 10 pmol/100 g/min 動注群 (Fig. 1-c および d) では、小びらんおよび線状びらんが多数形成され、一部に出血も観察された。

なお、生食水動注 (対照) 群 (Fig. 1-a) では胃粘膜には明らかな変化は見い出されなかった。

3・1・2 組織学的所見

対照群における PAS-ab 重染色では固有胃腺や粘膜固有層に明らかな病変は認められなかった (Fig. 2-a) が、ET-1 2.5 pmol/100 g/min 投与群 (Fig. 2-b) では粘膜固有層の浮腫状変化、集合細静脈の著明な拡張・鬱血および表層の PAS 陽性粘液層の明らかな減少が観察された。血管損傷程度をグリセリン透徹標本で観察すると、対照群 (Fig. 2-c) に比較して、ET-1 2.5 pmol/100 g/min 投与群 (Fig. 2-d) では、monastral blue B 色素が粘膜固有層の中間層から表層付近にかけて多数 trap され、集合細静脈の著しい拡張も同時に観察された。

3・1・3 胃粘膜 LS

生食水で調整した各種濃度、0, 2.5, 5.0 および 10 pmol/100 g/min の ET-1 を、選択的に左胃動脈内投与した際の胃粘膜 LS は、投与 30 分後でそれぞれ 1.0 ± 0.5 , 5.8 ± 1.0 , 11.7 ± 1.8 および 13.3 ± 1.2 (それぞれ $n=5$) と濃度依存性に有意に増加した。また、ET-1

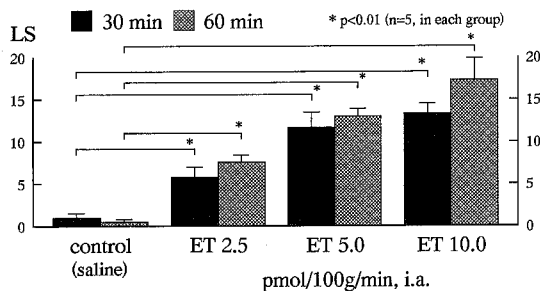


Fig. 3 Lesion scores (LS) of the fundic mucosa after synthetic peptide endothelin-1 (ET-1) with various concentrations was infused for 30 min (closed) or 60 min (hatched) into the left gastric artery of the rat.

投与 60 分後においても、それぞれ 0.5 ± 0.3 , 7.6 ± 0.9 , 13.0 ± 1.7 および 17.3 ± 2.6 (それぞれ $n=5$) と同様に有意な濃度依存性の増加がみられた (各時点でそれぞれ $p < 0.01$) (Fig. 3)。

3・1・4 GMBF 量の変化

各種濃度の ET-1 を選択的に左胃動脈内投与した際の GMBF 量は、血流曲線の変化が濃度に依存する傾向を示し (Fig. 4), ET-1 10 pmol/100 g/min 投与群で

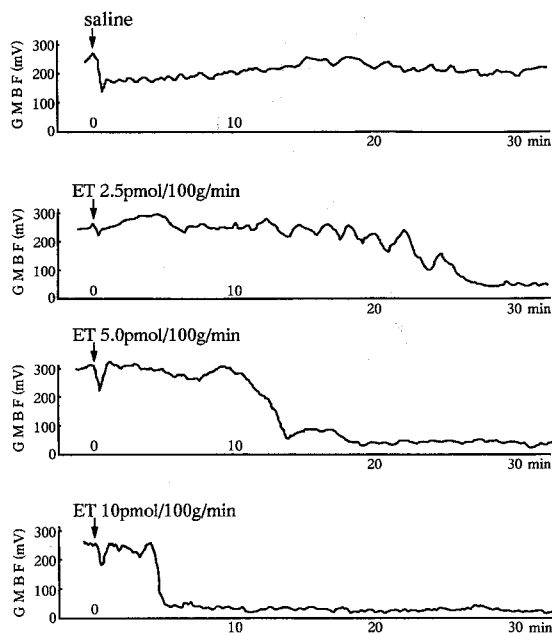


Fig. 4 Changes of gastric mucosal blood flow (GMBF) after infusion of synthetic peptide endothelin-1 (ET-1) with various concentrations into the left gastric artery. GMBF was determined by laser Doppler.

は、急激かつ持続性の著しい粘膜血流低下がみられた。

3・2 EtOH 誘発胃粘膜病変における内因性 ET-1 の変化

3・2・1 免疫組織学的所見

生食水胃内投与 (対照) 群 (Fig. 5-a) では、胃体部粘膜の主として腺底部付近の血管がモノクローナル抗 ET-1 抗体でごく軽度に染色された。一方、50%EtOH 胃内投与群 (Fig. 5-c) では、同部位の血管内皮が強く染色され、これらの抗 ET-1 抗体による反応は合成 ET-1 添加により消失した (Fig. 5-b および d)。

3・2・2 胃粘膜抽出物のイムノブロット解析

50%EtOH 胃内投与ラットの胃体部粘膜抽出物を、抗 ET-1 抗体によりイムノブロットを行うと、組織蛋白濃度 200 μ g および 20 μ g の胃体部粘膜抽出物との間に陽性反応を認めた。以上の反応は、陽性対照群と共に合成 ET-1 により吸収された (Fig. 6)。

3・3 EtOH 誘発胃粘膜病変に及ぼす抗 ET-1 血清投与の影響

50%EtOH 胃内投与による粘膜病変の UI をみると、抗 ET-1 血清群 (40.7 ± 5.5 mm², $n=4$) は、対照群 (65.4 ± 5.5 mm², $n=4$) に比較して、EtOH による病変発生が抑制された ($p < 0.05$) (Table 1)。

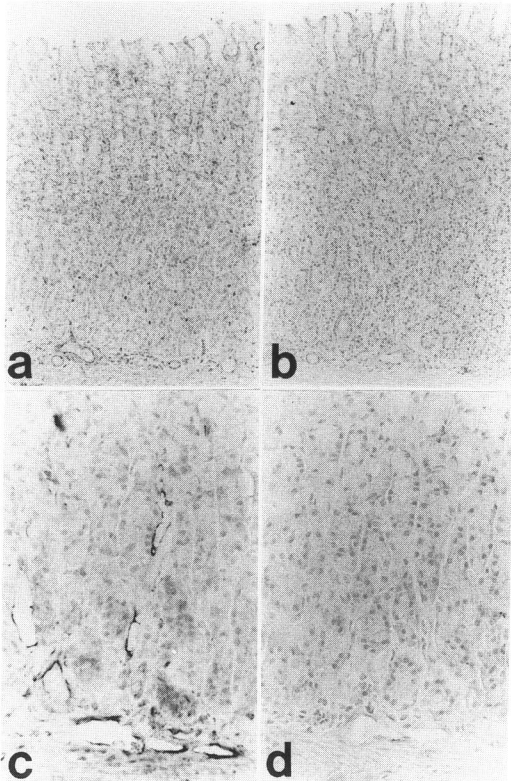
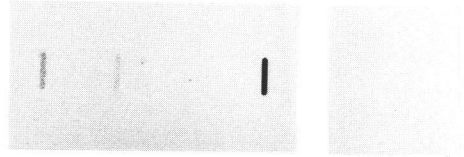


Fig. 5 Immunostaining of the fundic mucosa using monoclonal anti-endothelin-1 (ET-1) antibody (ABC method). a) saline ingestion ($\times 110$), b) immunoadsorption with synthetic peptide endothelin-1 (ET-1) in a ($\times 110$), c) 50% ethanol ingestion ($\times 220$) and d) immunoadsorption with synthetic peptide ET-1 in c ($\times 220$).



antigen	200 μ g tissue	20 μ g	1%BSA	ET-1	200 μ g	ET-1
antibody	anti ET-1				anti ET-1 + synthetic ET-1	

Fig. 6 Immunoblot analysis. Monoclonal anti-endothelin-1 (ET-1) antibody strongly reacted to the extract of fundic mucosa obtained from 50% ethanol ingested rats, but did not to 1% bovine serum albumin (BSA). This immunological reaction disappeared completely after immunoadsorption with synthetic peptide ET-1.

3.4 ヒト血管内皮培養細胞を用いた検討

1%EtOH およびトロンピンを含む培養液で培養した際の irET-1 濃度は、それぞれ 1.66 ± 0.35 および 3.21 ± 0.48 pg/ 10^5 cells ($n=5$) で、EtOH を含まない対照群 (0.27 ± 0.12 pg/ 10^5 cells, $n=5$) に比較して、有意な増加がみられた(それぞれ $p < 0.05$) (Fig. 7-a).

EtOH 0, 0.5 および 1% 含有培養液およびトロンピンを含む培養液で培養した際の 6-keto-PGF $_{1\alpha}$ は、それぞれ 176, 168, 164 および 220 pg/ 10^5 cells で、明らかな差はみられなかった (Fig. 7-b).

4 考 察

ET はアミノ酸 21 残基からなるきわめて強力な血管

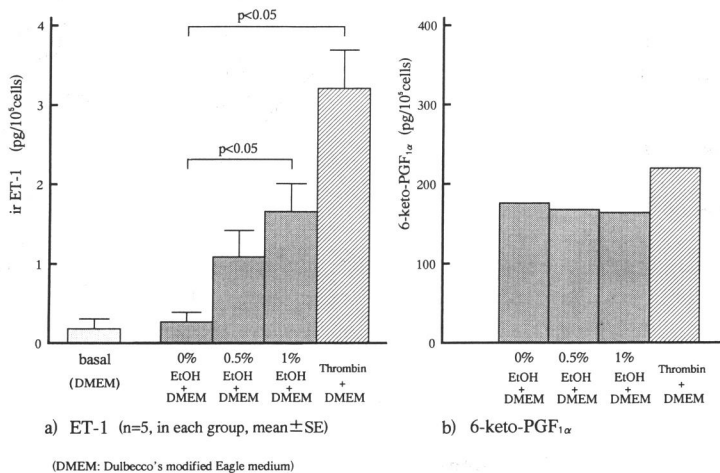


Fig. 7 Effect of low concentration of ethanol (0.1% and 0.5%) on the cultured endothelial cells. a) immunoreactive endothelin-1 (irET-1) concentrations in the cultured medium and b) 6-keto-PGF $_{1\alpha}$ concentrations in the cultured medium.

Table 1 Effect of rabbit anti-ET-1 antiserum infusion on the gastric mucosal damage caused by 50% ethanol ingestion. Groups received antiserum infusion via jugular vein.

	n	Area of GMD (mm ²)	%GMD of glandular stomach
Anti-ET-1 serum (1:500)	4	40.7±5.5*	3.4±0.4
Normal rabbit serum (1:500) (Control)	4	65.4±5.5	5.7±0.5

* p<0.05 vs control

GMD: Gastric mucosal damage

収縮作用性ペプチドで、3種類のETのうちET-1のみが血管内皮細胞より産生され、その血管収縮作用はET-3の数10倍から100倍である⁹⁾。このET-1はさまざまな血管外組織の細胞にも見い出され^{2,3)}、Takahashiら³⁾はnorthern blot法により、ラット胃および腸粘膜におけるET-1 mRNAの発現を報告している。

消化性潰瘍、急性胃粘膜病変(AGML)の成因には、酸・ペプシンに代表される攻撃因子の役割ばかりでなく、粘膜防御因子の量的・質的变化がむしろ大きく関与していると考えられつつある¹⁴⁾。これまで防御因子として粘液・HCO₃⁻分泌、細胞回転、プロスタグランジン(PG)、粘膜微小循環(粘膜血流)などが主要なものと考えられてきた¹⁵⁾。最近では粘膜の形態・機能を維持する上で重要な粘膜微小循環系に関連する局所性因子の病因的役割に関心が向けられ¹⁶⁾、ロイコトリエンや血小板活性化因子(PAF)などのケミカルメディエーターなどの役割¹⁷⁾についての解析が進んでいる。しかし、消化管内皮細胞由来のETや血管弛緩因子(EDRF: NO)に関する生理学的・病態生理学的研究は少ない。

そこで、本研究ではラットEtOH潰瘍モデルを用いて、ET-1の胃粘膜微小循環調節因子としての意義ならびにその病因論的役割について検討した。

4・1 ET投与による胃粘膜障害

ET投与による(外因性ETによる)強力な潰瘍誘発については、WhittleとEsplugues¹⁸⁾によって初めて報告された。彼らはラット左胃動脈より選択的にET(4~100 pmol/kg/min, 10 min)を投与し、濃度依存性に胃粘膜に出血性病変や壊死を認めた。Wallaceら¹⁹⁾もラットで類似の胃粘膜病変を報告しているが、いずれもET投与に伴う胃粘膜微小循環(粘膜血流)動態面についての検討を行っていない。

著者らは、ETのパラクリン作用²⁰⁾を念頭におき、ETの全身的影響を極力排除したWhittleら¹⁸⁾の方法に準じ、ラット左胃動脈に選択的にカニューレションを行った。各種濃度のET-1を持続投与すると胃粘膜病変の

程度はET-1の濃度に依存して増強した。興味深いことに、ET-1投与30分後の組織学的所見で、粘膜固有層をほぼ垂直に下行する集合細静脈の著しい拡張・鬱血と、あたかも粘膜筋板の貫通部において血流を阻止されているかのごとく、粘膜筋板上を横走する著しく拡張した細静脈が観察された。ET-1は末梢の比較的細い細動脈を強力に、かつ持続的に収縮させる^{7,21)}が、内皮細胞にも作用してEDRFやPGI₂を遊離して、間接的に一時的な血管拡張を引き起こす⁸⁾。前述の集合細静脈および細静脈系の著しい拡張・鬱血には、EDRFやPGI₂遊離も一役かっている可能性は否定できない。Tsuchiyaら¹⁶⁾は、I¹²⁵標識ET-1が粘膜筋板上にも結合しうることを報告しており、パラクリンを介して血管平滑筋細胞に直接的に作用するばかりでなく、粘膜筋板の平滑筋細胞に対しても強力な収縮作用を有し、その結果集合細静脈および細静脈をその貫通部で締め付けている可能性が推測される。

ET-1の強力な細動脈収縮作用が血管内皮細胞損傷を誘発している可能性は、monastral blue B色素が粘膜固有層の中間層から表層付近にかけて多数trapされていることから推測される。

そこでレーザードップラー法によるGMBF動態をみると、低濃度のET-1持続投与下ではおよそ20分後よりGMBFは漸減し、用量依存性に急激な且つ持続的なGMBF低下がみられた。このような知見は、ET-1による著しい持続的GMBF低下が、局所的低酸素状態を招き、粘膜の好気性代謝の変化²²⁾、ひいては組織学的に浮腫、充血、びらんなどの変化を誘発することを示唆しており、潰瘍あるいはAGMLの病因として大きな役割を演じている可能性がある。

ET-1の末梢血濃度は0.5~1.5 pg/ml²³⁾といわれ、本研究で使用したET-1の左胃動脈内投与量は、生理的濃度に比較してかなり高濃度である。しかし、血管内皮細胞と血管平滑筋細胞間の細胞間隙のET濃度については全く不明で、ETのパラクリン作用²⁰⁾を考慮す

ると細胞間隙でのET濃度はかなり高くなりうることも予想される。血管内皮細胞からのET放出とEDRF遊離との間にも相互の調節機構⁹⁾が存在し、その平衡失調がもたらす局所性変化が、潰瘍、AGMLの発生に深い関連性を有するものと推測される。いずれにしても、本研究において、高濃度のET-1投与条件下ではあるが、ET-1の胃粘膜血流障害に起因する胃粘膜病変の発生を明らかにし得た意義は大きいと思われる。

4.2 内因性ET-1の免疫組織学的検討

胃粘膜における内因性ETの産生については、Takahashiら⁹⁾の報告があるが、血管内皮細胞は合成・連続分泌様式でETを分泌するため、細胞内部に貯蔵のための顆粒を有しないことから、免疫組織学的同定は通常は困難であるとされている。本研究においても、確かに正常対照ラットの胃底腺領域の腺底部付近の血管にモノクローナル抗ET-1抗体と特異的に反応する内因性ET-1が極く微量に検出される程度で、必ずしも明瞭なものではなかった。そこで50%EtOH胃内投与による内因性ET-1の局在とその推移を免疫組織学的に検討した。正常対照群に比較して高濃度EtOHの胃内投与条件下では染色程度はより明瞭になり、胃粘膜血管内皮細胞のET-1の産生が亢進していることが示唆された。この点、抗ET-1抗体を用いた免疫ブロット解析でも、胃粘膜抽出物中にET-1を認めた。また免疫組織学的反応と免疫ブロット反応は、いずれも阻止試験により特異的と考えられた。

4.3 EtOH胃内投与による胃粘膜病変に対する抗ET-1血清投与の影響

抗ET-1抗体がラットの実験的心筋梗塞の症状を緩解させたり⁹⁾、抗ET-1血清が虚血後の腎動脈収縮や急性腎不全症状を抑制する¹⁰⁾ことから、本研究においても、抗ET-1血清投与の影響をラットEtOH潰瘍モデルを用いて検討した。50%EtOH胃内投与による胃粘膜病変が胃体部に強く認められるのは、酸・ペプシン分泌を営む壁細胞と主細胞が胃体部に高密度に分布し、しかも、胃前庭部に比較して細い細動脈が豊富で、粘膜微小循環障害が惹起されやすい²⁴⁾ためと考えられる。このような病変が抗ET-1血清で抑制されたことから、ET-1が潰瘍形成に深い関わりを有していることが強く示唆された。本稿では示していないが、EtOHによるGMBF低下が抗ET-1血清の左胃動脈内投与でも抑制される成績を得ており、抗ET-1血清の病変抑制効果には胃粘膜微小循環障害の改善が関与しているものと考えられた。

従来EtOHによる胃粘膜病変の機序には、EtOHの

直接的作用の他に、肥満細胞脱顆粒、マクロファージの活性化(LTC₄)²⁵⁾を介した間接的作用も想定されているが、本研究において初めて明らかにされた局所的なET-1産生分泌も一つの障害因子となり得るものと考えられる。

4.4 血管内皮細胞培養系に対する低濃度EtOHの影響

Kawanoら²⁶⁾は、胃内EtOH投与下における門脈血中ET-1濃度上昇を明らかにしている。本研究においてもEtOH胃内投与下で胃体部粘膜腺底部にET-1が局在し、さらに免疫ブロット解析によっても検出されたことから、EtOHが直接的・間接的に血管内皮細胞におけるET-1合成・分泌を促進している可能性が推測される。この点を証明すべく、ヒト血管内皮培養細胞に低濃度EtOHを添加すると、その培養液中のET-1濃度の明らかな増加がみられた。LandolfiとSteiner²⁷⁾は、低濃度EtOHが内皮細胞に直接作用してシクロオキシゲナーゼ活性を高め、PGI₂産生を促進すると報告している。今回の検討では、血管内皮細胞で産生されるPGI₂の代謝産物である6-keto-PGF_{1α}は、低濃度EtOH添加で明らかな増加がみられなかった。著者らの成績は、EtOHにより血管内皮細胞が破壊されて培養液にET-1が非特異的に放出されたのではなく、血管内皮細胞に直接作用して選択的にET-1の分泌が促進されている可能性を推測させる。

Kvietysら²⁸⁾は、血管内皮細胞および好中球の培養系において、1.0~4.0%濃度のEtOHが好中球の内皮細胞接着を促し、好中球を介した内皮細胞障害を増強させると報告している。本研究では、好中球を介する機序については検討し得なかったが、好中球の有するフリーラジカル(活性酸素)の血管内皮細胞に対する障害作用は無視できないと考えられる。今後は、内皮細胞由来のETとEDRF(NO)をはじめとする各種ケミカルメディエーターとの相互作用を明らかにすることが、消化性潰瘍あるいはAGMLの病態解明に重要であると思われる。

5 結 論

1. ET-1のラット左胃動脈内投与により、肉眼的に粘膜の充血・浮腫、びらん、組織学的に粘膜固有層の集合細静脈の著明な拡張・鬱血所見が観察された。Monastral blue B色素法により、粘膜固有層に明らかな色素沈着が観察され、ET-1により粘膜血管損傷が生じているものと推測された。また、GMBF量は用量依存性に減少し、胃粘膜のLSは

これと対称的に有意に増加した。

2. 内因性 ET-1 は免疫組織学的に、50%EtOH 胃内投与により、主として胃底腺領域の腺底部付近の血管内皮に陽性反応が現れた。また、胃粘膜抽出物のイムノブロット解析によっても ET-1 が確認された。
3. 抗 ET 血清を静注した群は、対照群に比較して、50%EtOH 胃内投与による粘膜病変発生は抑制された。
4. ヒト血管内皮細胞に低濃度 EtOH を添加し培養すると、ET-1 分泌を促進したが、PGI₂ 代謝産物である 6-keto-PGF_{1α} 分泌はみられなかった。

以上より、ラットにおける EtOH 胃内投与による胃粘膜障害の発生機序には、EtOH の血管内皮細胞に対する直接作用によって分泌される ET-1 も役割を演じているものと推測される。

謝 辞

稿を終るにあたり御指導、御校閲いただいた内科学第 1 講座谷内 昭教授、研究に際して御指導いただいた本講座杉山敏郎講師ならびに御協力いただいた諸先生に深謝致します。

文 献

1. Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, Tomobe Y, Kobayashi M, Mitsui Y, Yazaki Y, Goto K, Masaki T. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature* 1988, 332: 411-415.
2. Sakurai T, Yanagisawa M, Inoue A, Ryan US, Kimura S, Mitsui Y, Goto K, Masaki T. cDNA cloning, sequence analysis and tissue distribution of rat preproendothelin-1 mRNA. *Biochem Biophys Res Commun* 1991, 175: 44-47.
3. Takahashi K, Jones PM, Kanse SM, Lam H-C, Spokes RA, Ghatei MA, Bloom SR. Endothelin in the gastrointestinal tract. Presence of endothelinlike immunoreactivity, endothelin-1 messenger RNA, endothelin receptors, and pharmacological effect. *Gastroenterology* 1990, 99: 1660-1667.
4. Lee M-E, de la Monte SM, Ng S-C, Bloch KD, Quertermous T. Expression of the potent vasoconstrictor endothelin in the human central nervous system. *J Clin Invest* 1990, 86: 141-147.
5. Yanagisawa M, Masaki T. Endothelin, a novel endothelium-derived peptide. Pharmacological activities, regulation and possible roles in cardiovascular control. *Biochem Pharmacol* 1989, 38: 1877-1883.
6. Inoue A, Yanagisawa M, Kimura S, Kasuya Y, Miyauchi T, Goto K, Masaki T. The human endothelin family: Three structurally and pharmacologically distinct isopeptides predicted by three separate genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989, 86: 2863-2867.
7. Joshua IG. Endothelin-induced vasoconstriction of small resistance vessels in the microcirculation of the rat cremaster muscle. *Microvas Res* 1990, 40: 191-198.
8. De Nucci G, Thomas R, D'Orleans-Juste P, Antunes E, Waldar C, Warner TD, Vane JR. Pressor effects of circulating endothelin are limited by its removal in the pulmonary circulation and by the release of prostacyclin and endothelium-derived relaxing factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988, 85: 9797-9800.
9. Watanabe T, Suzuki N, Shimamoto N, Fujino M, Imada A. Endothelin in myocardial infarction. *Nature* 1990, 344: 114.
10. Kon V, Yoshioka T, Fogo A, Ichikawa I. Glomerular actions of endothelin in vivo. *J Clin Invest* 1989, 83: 1762-1767.
11. Yabana T, Kondo Y, Fujii K, Yachi A, Szabo S. Role of increased mucosal vascular permeability and vascular injury in pathogenesis of peptic ulcer. In: Kasuya Y, Tsuchiya M, Nagao F, Matsuo Y, editors. *International Congress Series 704: Gastrointestinal Function-Regulation and Disturbances. Vol. 3, Amsterdam-Princeton-Geneva-Tokyo, Excerpta Medica*, 1985, 113-126.
12. Hsu SM, Raine L, Fanger H. Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: A comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *J Histochem Cytochem* 1981, 29: 577-580.
13. Powell WS. Rapid extraction of oxygenated metabolites of arachidonic acid from biological samples using octadecylsilyl silica. *Prostaglandins* 1980, 20: 947-957.
14. 竹本忠良, 岡 紳爾. 胃粘膜防御機構—その歴史と現状—, 岡部治弥, 竹本忠良, 西元寺克禮編. 消化性潰瘍と防御因子増強剤, 東京, 南山堂, 1991, 1-11.
15. 矢花 剛, 小林壯光, 藤田伸男, 谷内 昭. 胃粘膜防御機構の新展開. *内科* 1992, 69: 423-429.
16. Tsuchiya M, Nakamura M, Oda M. Cellular membrane: A key to disease processes. In:

- Ohnishi T, Ohnishi T, editors. Microcirculatory disturbances and autonomic nervous receptors in acute gastric mucosal lesion. Boca Raton, CRC press, 1993, 95-122.
17. Pihan G, Rogers C, Szabo S. Vascular injury in acute gastric mucosal damage. Mediator role of leukotrienes. *Dig Dis Sci* 1988, 33: 625-632.
 18. Whittle BJR, Esplugues JV. Induction of rat gastric damage by the endothelium-derived peptide, endothelin. *Br J Pharmacol* 1988, 95: 1011-1013.
 19. Wallace JL, Cirino G, De Nucci G, McKnight W, MacNaughton WK. Endothelin has potent ulcerogenic and vasoconstrictor actions in the stomach. *Am J Physiol* 1989, 256: G661-G666.
 20. 村松郁延. 血管における神経調節と受容体. *最新医学* 1992, 47: 10-16.
 21. Kurose I, Miura S, Fukumura D, Suematsu M, Sekizuka E, Tashiro H, Serizawa H, Tsuchiya M. Intravital observation on the endothelin-induced hemodynamic changes in rat intestinal microvascular beds. *J Vasc Med Biol* 1991, 3: 55-60.
 22. Menguy R, Desbaillets L, Masters YF. Mechanism of stress ulcer: Influence of hypovolemic shock on energy metabolism in the gastric mucosa. *Gastroenterology* 1974, 66: 46-55.
 23. Ando K, Hirata Y, Shichiri M, Emori T, Marumo F. Presence of immunoreactive endothelin in human plasma. *FEBS lett* 1989, 245: 164-166.
 24. Sakaguchi Y, Nakamura N, Nagasu T, Tamura S, Koyama A, Hara S, Ono T, Yamamoto H, Aoki Y, Nagata T, Kijima M, Toriumi T, Nagao F, Iriyama K, Iwamoto T, Yoshiura M, Ozaki Y. Gastric mucosal blood flow in the onset of stress-induced ulcers—Gastric mucosal blood flow, gastric wall microvascular structure and norepinephrine in the gastric wall. In: Kasuya Y, Tsuchiya M, Nagao F, Matsuo Y, editors. *Gastrointestinal Function-Regulation and Disturbances. Vol. 1, Amsterdam-Princeton-Geneva-Tokyo, Excerpta Medica*, 1983, 121-138.
 25. Szabo S. Mechanisms of mucosal injury in the stomach and duodenum: Time-sequence analysis of morphologic, functional, biochemical and histochemical studies. *Scand J Gastroenterol* 1987, 22(suppl 127): 21-28.
 26. Kawano S, Masuda E, Tsuji S, Nagano K, Fusamoto H, Kamada T. Ethanol causes vasoconstriction due to endothelin-1 release in rabbit gastric vessels. *Microvasc Res* 1991, 41: 408-410.
 27. Landolfi R, Steiner M. Ethanol raises prostacyclin in vivo and in vitro. *Blood* 1984, 64: 679-682.
 28. Kvietys PR, Twohig B, Danzell J, Specian RD. Ethanol-induced injury to the rat gastric mucosa. Role of neutrophils and xanthine oxidase-derived radicals. *Gastroenterology* 1990, 98: 909-920.

別刷請求先:

(〒060) 札幌市中央区南1条西16丁目

札幌医科大学医学部内科学第1講座 小川 亮