

胃粘膜内フィブロネクチン関連物質に関する免疫組織学的研究

— ラット・エタノール胃潰瘍モデルについて —

陳 家 傲 矢 花 剛

札幌医科大学内科学第1講座 (主任 谷内 昭 教授)

Immunohistological Study on a Fibronectin-related Substance in the Gastric Fundic Mucosa

— On an Ethanol-induced Gastric Ulcer Model of the Rat —

Jia-ao CHEN and Tsuyoshi YABANA

Department of Internal Medicine (Section 1) Sapporo Medical College

(Chief: Prof. A. Yachi)

ABSTRACT The pathogenetic role of fibronectin-related substance (FNRS), which was immunohistologically identified mainly in the lower portion of the gastric fundic mucosa, was studied using an ethanol (EtOH)-induced gastric ulcer model of the rat.

Macroscopic and microscopic changes occurred in the gastric mucosa immediately (usually within 5 minutes) and developed time-dependently after the ingestion of 100% EtOH. The FNRS in the fundic mucosa decreased similarly and time-dependently and could be hardly detected 60 minutes after the ingestion of 100% EtOH. The ulcer index(UI) increased and inversely the FNRS score decreased time-dependently, showing a mirror-image manner.

20% EtOH did not cause visible mucosal alterations, but the FNRS decreased with time. The latter changes, however, were observed to a lesser degree than those in both 50% and 100% EtOH groups. These gastric mucosal lesions, which were adjudged from macroscopic and histological changes, developed in a concentration-dependent manner for EtOH. The changes in UI and FNRS score appeared to show a mirror image.

Pretreatment with either cimetidine (30 and 50 mg/kg, i. v.), 11(R), 16, 16-trimethyl prostaglandin E₂ (tmPGE₂; 10 and 50 µg/kg, p. o.) or sulfhydryl cysteamine (50 and 200 mg/kg, s. c. i.) significantly prevented macroscopic and microscopic changes in the gastric mucosa which were induced 60 minutes after the ingestion of 50% EtOH. These drugs significantly decreased the UI but increased the FNRS score, dose-dependently.

These results indicate that the FNRS located in the lower portion of the fundic mucosa, in which acid and pepsin are actively secreted, plays a protective role in the pathogenesis of the EtOH-induced gastric ulcer of the rat. It is also suggested that the FNRS may be mediated by H₂ receptor and/or endogenous PG.

(Received September 13, 1989 and accepted September 19, 1989)

Key Words: Fibronectin, Gastric mucosa, Ethanol-induced gastric ulcer, Prostaglandin E₂, Cysteamine

1 緒 言

ヒトの消化性潰瘍の発生機序に関する研究は、おの

ずと大きな制約を伴うため、教室では早くから各種実験潰瘍モデルを用いて病因に関わる諸因子の解析を進めてきた^{1,2)}。最近、教室では固有胃腺の間質や基底

膜に分布する従来の細胞性フィブロネクチン (FN) とは別に、免疫組織学的に細胞接着ペプチドを含む FN-C 端フラグメントが存在する可能性を明らかにし、それを FN 関連物質 (FNRS) と称した³⁾。

本研究では発生機序が比較的良好に解明されているラット・エタノール (EtOH) 潰瘍モデルを用いて、この FNRS の消長と胃粘膜の肉眼的・組織学的変化を対比観察し、胃体部粘膜深層における FNRS の局在意義と消化性潰瘍の病態との関連性について検討した。

2 対象および方法

2.1 対 象

水のみを自由に与え 24 時間絶食させた Wistar 系雄ラット (体重 250~280 g) を対象とし、5~7 匹を 1 群としてそれぞれ対照および実験群とした。

2.2 胃内 EtOH 投与と観察時間

エーテル麻酔下でビニール管 (外径 2 mm) を経口的に胃内に挿入し、生理食塩水 (生食水) で調整した各種濃度 (20, 50 および 100%, vol/vol) の EtOH を 1 ml 注入した。100% EtOH 胃内投与実験では、EtOH 胃内投与 5, 10, 30 および 60 分後にそれぞれエーテル麻酔下で断頭屠殺し、胃粘膜の経時的変化を観察した。また、胃粘膜に対する EtOH 濃度の影響を観察する目的で、EtOH 20%, 50% および 100% を胃内に投与し 60 分後に同様に屠殺した。なお、対照群には、生食水 1 ml を同様に胃内に投与した。

2.3 肉眼的・組織学的観察

各実験群共に、屠殺後速やかに胃・十二指腸を摘出し、大彎沿いに切開し氷冷生食水で軽く洗浄して、浮腫、出血、びらんなどの粘膜変化の有無とその程度を観察した。線状・帯状びらんの長径を測定し、その総和 (mm) を算出し、潰瘍指数 (UI) とした。次に、これを中性 10%ホルマリンで 24 時間固定し、レギュラー・パラフィンを用いて 4~5 μm 厚の連続切片を作製し、ヘマトキシリン-エオジン (H-E) および periodic acid Schiff-alcian blue (PAS-ab, pH 2.5) 重染色を行うと共に、切片の一部を免疫組織学的観察に供した。

2.4 免疫組織学的観察

本項の免疫組織学的観察にはアビディン・ビオチン・ペルオキシダーゼ複合体 (ABC) 法⁴⁾を用いたが、抄述すると以下のとおりである。

薄切切片 (4~5 μm) をまず内因性ペルオキシダーゼ活性を除く目的で、3%過酸化水素加メタノール (1:9 容) 液中で室温 30 分間反応させた後、リン酸緩衝液 (PBS, pH 7.4) で 3 回、15 分間洗浄した。二次抗体の非特異的吸着を阻止する目的で、PBS で 40 倍に稀釈した正常ヒツジ血清を滴下し切片を十分覆い、室温 20 分間反応させた後、PBS で 3 回、15 分間洗浄した。一次抗体として PBS で 200 倍に稀釈したポリクローナル家兎抗ヒト・FN 抗体 (DAKO, Denmark) と室温で 30 分間反応させた。次に PBS で 3 回、15 分間洗浄後、二次抗体としてビオチン化ヒツジ抗家兎 IgG 抗体 (Vector 社, USA) と室温で 30 分間反応させた。その後 PBS で 3 回、15 分間洗浄し、ABC 試薬 (Vectastain ABC キット, USA) と室温で 30 分間反応させ、次いで、Tris 緩衝液 (pH 7.4) で溶解した 3-3' diaminobenzidine tetrahydrochloride 溶液 (片山化学, 東京) により 1~2 分間発色させた後、型のごとく EtOH 系列で脱水し、キシロールで透徹した後、樹脂封入剤ビオライト (高研, 東京) で封入して、顕微鏡的観察に供した。

2.5 FNRS 分布のスコア化

未処置および EtOH 胃内投与群における胃体部粘膜の免疫組織切片の FNRS 陽性細胞の分布ならびにその染色強度を、Table 1 および Fig. 1 に示したように、4~0 の 5 段階に分類してスコア化し、本研究では FNRS スコアと称して各群の比較を試みた。

2.6 前処置薬と投与量

50% EtOH 胃内投与による胃粘膜の肉眼的・組織学的変化ならびに胃体部粘膜内 FNRS の減少に対する 2, 3 の薬剤の前処置の影響を観察した。ヒスタミン H₂ 受容体拮抗薬のシメチジン (Cim: スミスクライン・藤沢, 大阪) は 10, 30 および 50 mg/kg (i. v.) を、プロスタグランディン E₂ (PGE₂) 誘導体の 11(R), 16, 16-

Table 1 Criteria of the fibronectin-related substance (FNRS) scores grading by the immunohistological staining intensity of the gastric fundic mucosa.

| Score | 4 | 3 | 2 | 1 | 0 |
|--------------------|--------------------------|-----------------------|---------------------|---------------------|--------------|
| Staining intensity | strongest positivity (卍) | strong positivity (卐) | mild positivity (卍) | weak positivity (卍) | negative (-) |

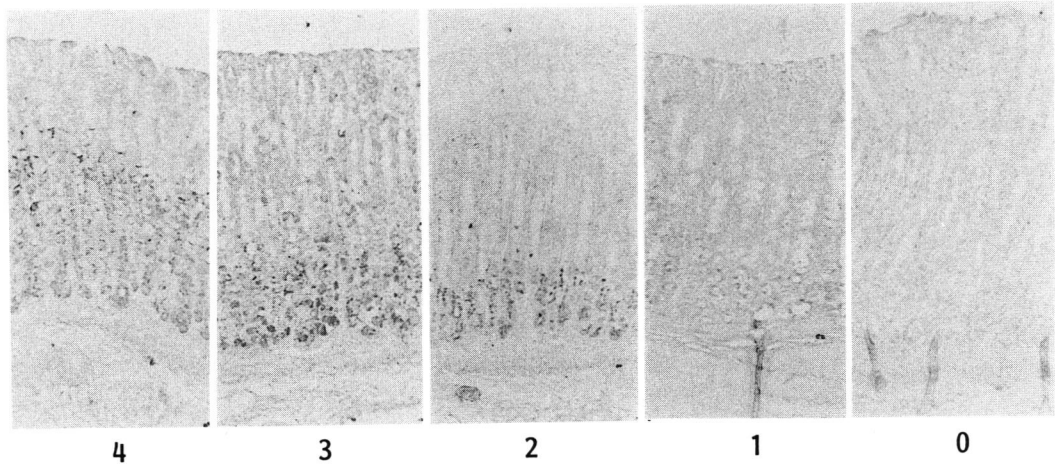


Fig. 1 Criteria of the fibronectin-related substance (FNRS) score grading the immunohistological staining of the rat gastric fundic mucosa by polyclonal rabbit anti-human fibronectin antibody (ABC method, $\times 280$)

trimethyl PGE₂ (tmPGE₂: 日本ロッシュ, 大阪) は 10 および 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (p. o.) を, SH 基剤のシステアミン (Cys: Sigma, USA) は 50 および 200 mg/kg (s. c. i.) を 50%EtOH 胃内投与 15 分前に投与した. 本項の研究における対照群には生食水を 1 ml , それぞれ経口, 筋肉内および皮下投与した. また, Cim (50 mg/kg , i.v.), tmPGE₂ (50 $\mu\text{g}/\text{kg}$, p. o.) および Cys (200 mg/kg , s. c. i.) 単独投与 60 分後の胃体部粘膜内 FNRS に対する影響についても観察した.

2・7 推計学的検定

UI および FNRS スコアの有意差検定は, 対応のない場合の t 検定, Welch の検定および Fisher の直接確率計算法により行った.

3 成績

3・1 無水 (100%) EtOH 胃内投与による経時的变化

3・1・1 肉眼的变化

100%EtOH 胃内投与 5 分後の時点より全例に, 胃粘膜の全域にわたって著明な浮腫と線状・帯状の著しい出血性びらんが形成され, その傷害程度は時間依存性に増強した (Fig. 2).

3・1・2 組織学的所見

各時点におけるびらん形成の比較的弱い部位を組織学的に観察すると, 100%EtOH 胃内投与 5 分後より粘膜固有層の浮腫様変化, 被蓋上皮細胞の変性・脱落, 固有胃腺の構造破壊, 深・浅二様の多発性びらん形成が出現し, 時間経過に伴って増強した. また, 100% EtOH 胃内投与 5 分後の粘膜下層には強い浮腫様変化の出現を認めた (Fig. 3 a~d).

3・1・3 免疫組織学的所見

各時点の連続切片の免疫染色所見を, Fig. 3 e~f に示した. 生食水 1 ml 胃内投与した対照群では, ポリクローナル家兎抗ヒト・FN 抗体は, 胃体部粘膜の固有胃腺の比較的深層の細胞と最も強く反応した. 100%

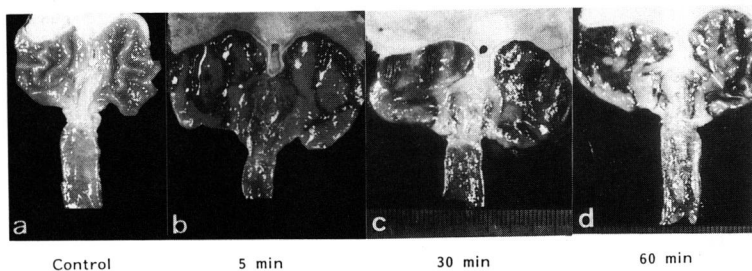


Fig. 2 Macroscopic findings of the gastric mucosa 5, 30 and 60 minutes after the ingestion of 100% ethanol (1 ml) in the rats. One ml of saline was ingested in the control group.

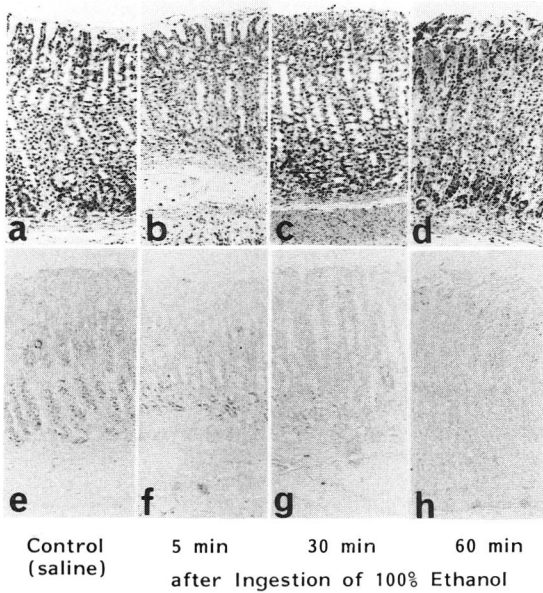


Fig. 3 Histological and immunohistological findings of the gastric fundic mucosa shown in Fig. 2. a-d : H-E stain ($\times 170$) and e-h : fibronectin-related substance (FNRS) (ABC method, $\times 170$).

EtOH 胃内投与5分後よりFNRS分布量は減少し、60分後ではほとんど見出されなくなった。

3・1・4 UIおよびFNRSスコアの経時的変化

生食水のみを投与した対照群、100%EtOH投与5、10、30および60分後のUIは、それぞれ平均0、 85 ± 6.4 (SE)、 92 ± 7.9 、 132 ± 10.7 および 134 ± 13.1 (mm)と時間経過に伴って増加した。またEtOH投与5分以後の潰瘍出現率は、対照群に比較して有意に高かった(各時点でそれぞれ $p < 0.01$)。一方、各時点におけるFNRSスコアは、それぞれ平均 3.8 ± 0.2 、 1.4 ± 0.4 、 1.3 ± 0.4 、 1.2 ± 0.4 および 0.9 ± 0.3 と、UIの経時的変化と鏡像を呈するかのごとく有意に低下した(それぞれ $p < 0.01$) (Fig. 4)。

3・2 20%EtOH 胃内投与による経時的変化

20%EtOH胃内投与群についても、10、30および60分後の胃粘膜所見について検討したが、いずれの時点においても、組織学的に軽度の浮腫と鬱血が混在する程度で、著明な変化は認められなかった。一方、FNRSスコアは、20%EtOH投与10分後で減少傾向を認め、時間経過に伴ってさらに減少したが、前項で検討した100%EtOH胃内投与群に比較して、その減少は軽度であった (Fig. 5)。

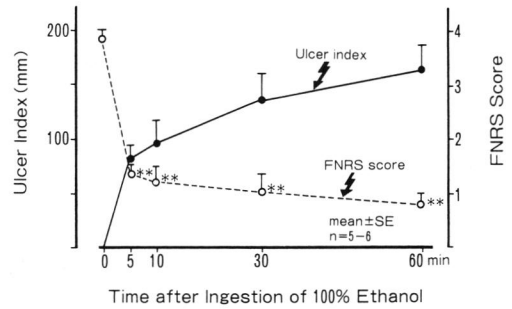


Fig. 4 Changes in the ulcer index and fibronectin-related substance (FNRS) score of the gastric mucosa 5, 10, 30 and 60 minutes after the ingestion of 100% ethanol (1 ml). Mean \pm SE is shown in each group. Difference is significant from the control group (** $p < 0.01$).

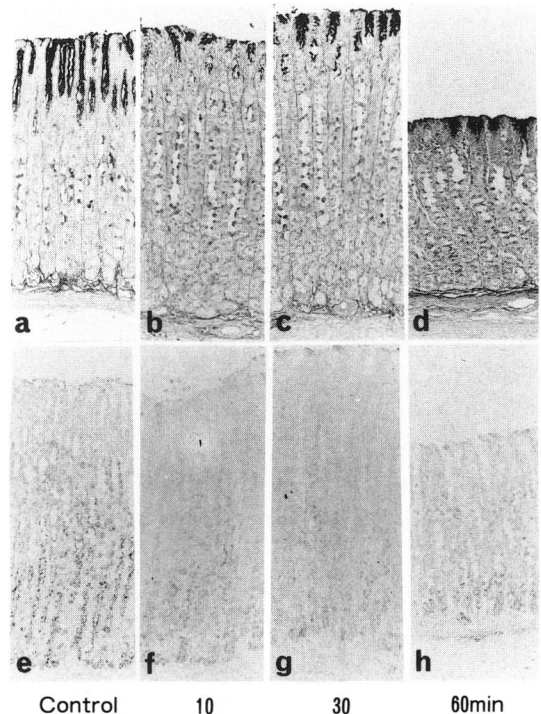


Fig. 5 Histological and immunohistological findings of the gastric fundic mucosa 10, 30 and 60 minutes after the ingestion of 20% ethanol (1 ml). a-d : PAS-alcian blue stain ($\times 160$) and e-h : fibronectin-related substance (FNRS) (ABC method, $\times 160$).

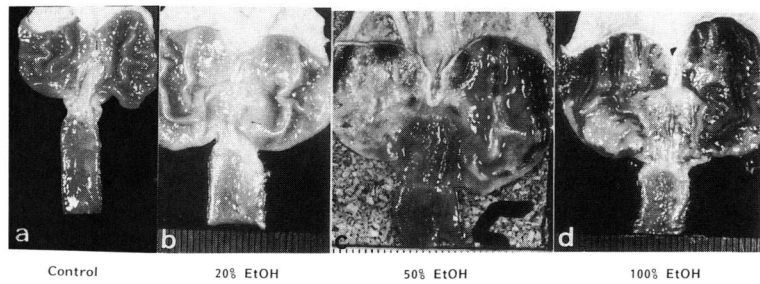


Fig. 6 Macroscopic findings of the gastric mucosa 60 minutes after the ingestion of 20, 50 and 100% ethanol (1 ml). One ml of saline was ingested in the control group.

20%EtOH 胃内投与 10, 30 および 60 分後の胃体部粘膜 FNRS スコアは、それぞれ平均 2.4 ± 0.5 , 2.3 ± 0.4 および 1.9 ± 0.5 と、未処置群 (3.8 ± 0.2) に比較して有意の低下がみられた (それぞれ $p < 0.05$).

3.3 各種濃度の EtOH 胃内投与による影響 (濃度依存性)

3.3.1 肉眼的変化

20%EtOH 胃内投与 60 分後の胃粘膜には、肉眼的変化はほとんど見られなかったが、50 および 100% EtOH 投与群では、全例に粘膜病変がみられ、しかも EtOH 濃度に依存するかのごとく線状・帯状の出血性びらんが増強した (Fig. 6).

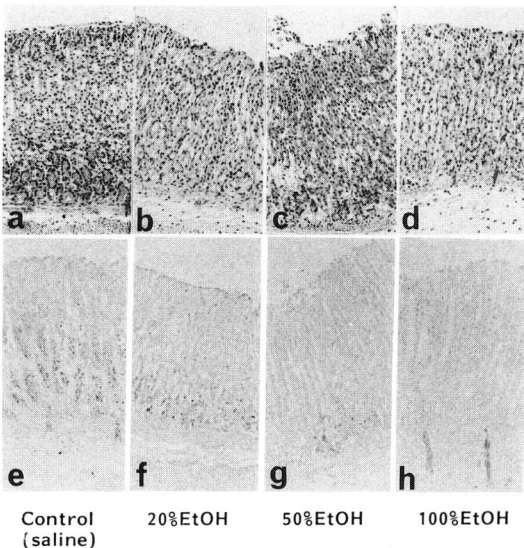


Fig. 7 Histological and immunohistological findings of the gastric fundic mucosa shown in Fig. 6. a-d : H-E stain ($\times 160$) and e-h : fibronectin-related substance (ABC method, $\times 160$).

3.3.2 組織学的・免疫組織学的所見

EtOH 濃度に依存して被蓋上皮細胞の変性と壊死・脱落、粘膜固有層の浮腫および固有胃腺の破壊が見出された (Fig. 7 a~d). 組織学的に強い変化があまり見られない 20%EtOH 投与群でも、胃体部粘膜の FNRS の減少とその染色強度の低下がみられた。これらの変化は EtOH 濃度に依存するかのように増強し、100%EtOH 投与群ではほとんど見られなくなった (Fig. 7 e~h).

3.3.3 UI および FNRS スコアの EtOH 濃度依存性

20, 50 および 100%EtOH 胃内投与群の UI は、それぞれ平均 0 , 81 ± 7.4 および 116 ± 13.1 (mm) と、50%以上の濃度で明らかな増加が見られた (Fig. 8). また 50 および 100%EtOH 投与群の潰瘍出現率は、対照群に比較して有意に高かった (それぞれ $p < 0.01$).

一方、FNRS スコアは同図に示したように、それぞ

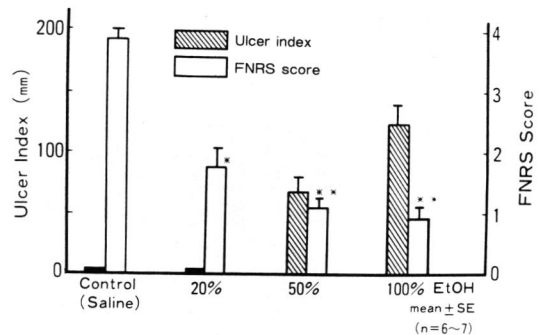


Fig. 8 Ulcer index and fibronectin-related substance (FNRS) score of the gastric mucosa 60 minutes after the ingestion of 20, 50 and 100% ethanol (EtOH). One ml of saline was ingested in the control group. Mean \pm SE is shown in each group. Differences are significant from the control group (* $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$).

れ平均 1.9 ± 0.5 , 1.2 ± 0.4 および 0.9 ± 0.3 と, 生食水を胃内投与した対照群 (3.8 ± 0.2) に比較して, 濃度依存性に有意な減少が認められた (20, 50 および 100%EtOH 群で, それぞれ $p < 0.05$, $p < 0.01$ および $p < 0.01$).

3・4 EtOH 胃内投与による胃粘膜変化に対する各種薬剤前処置の影響

3・4・1 Cim 前処置の影響

3・4・1・1 肉眼的・組織学的・免疫組織学的所見

50%EtOH 胃内投与による胃粘膜の肉眼的変化は, Cim 投与量に依存して軽減されたが, 50 mg/kg 投与によっても完全に防止するまでには至らなかった (Fig. 9). 肉眼的病変が比較的軽度な部位の PAS-ab 重染色像を Fig. 10 に示した. 生食水を用いて前処置した対照群では, 粘膜表層の PAS 陽性粘液は消失し, 被蓋上皮細胞層の壊死・脱落が顕著となり, 粘膜固有層の浮腫, 炎症性細胞浸潤がみられ, 固有胃腺の構造破壊も著しかった (Fig. 10 a).

Cim 10 mg/kg の前処置群でも, Fig. 10 b のごとく, 粘膜表層の PAS 陽性粘液の著明な減少, 被蓋上皮細胞の変性・脱落がみられ, 十分な抑制効果は認められなかった. 30 および 50 mg/kg 前処置群では, これらの諸変化は明らかに軽減された (Fig. 10 c および d).

FNRS は, 対照群ではほぼ完全に消失したが, Cim 10 mg/kg 前処置群では軽度残存し, 30 および 50 mg/kg 前処置群では用量に依存するかのごとく腺底部に多く分布していた.

なお, Cim (50 mg/kg, i. v.) 単独投与群における胃粘膜の肉眼的・組織学的・免疫組織学的所見は, 未処置群に比較して明らかな差は見い出されなかった.

3・4・1・2 UI および FNRS スコアからみた影響

Cim 前処置の影響を, UI および FNRS スコアの上で見ると, 30 および 50 mg/kg 前処置群ではいずれも対照群に比較して EtOH 胃内投与の影響が有意に抑制された (それぞれ $p < 0.05$ および $p < 0.01$) (Table 2).

3・4・2 tmPGE₂ および Cys 前処置の影響

3・4・2・1 肉眼的・組織学的・免疫組織学的所見

tmPGE₂ 前処置群では, 用量に依存して肉眼的・組織学的変化が抑制され (Fig. 11), PAS 陽性粘液の減少も明らかに防止された. FNRS も同様にその減少が抑制され, tmPGE₂ 50 mg 前処置群では未処置群に匹敵する程度に染色性が保たれていた (Fig. 12). また, Cys 200 mg/kg (s. c. i.) 前処置群では, 同様に EtOH 胃内投与による PAS 陽性粘液の減少と FNRS の減少が防止された (Fig. 13).

なお, tmPGE₂ (50 μ g/kg, p. o.) および Cys (200 mg/kg, s. c. i.) 単独投与群における肉眼所見および免疫組織学的所見は, 対照群との間に明らかな差異は見い出されなかったが, PAS-ab 重染色像では表層および被蓋上皮細胞の PAS 陽性粘液の増加傾向がうかがわれた.

3・4・2・2 UI および FNRS スコアからみた影響

tmPGE₂ 前処置群では 10 および 50 μ g/kg (p. o.) 前処置によって UI は著明に抑制され (それぞれ $p < 0.01$), FNRS スコアも対照群に比較して明らかに高値を示した (それぞれ $p < 0.01$). 一方, Cys 前処置群では 50 mg/kg 前処置によって UI は有意に減少 ($p < 0.05$) したが, 前述の Cim 前処置群ほどには著明でなかった. しかし, Cys 200 mg 前処置群では UI は明らかに抑制 ($p < 0.01$) され, FNRS スコアも有意に増加した ($p <$

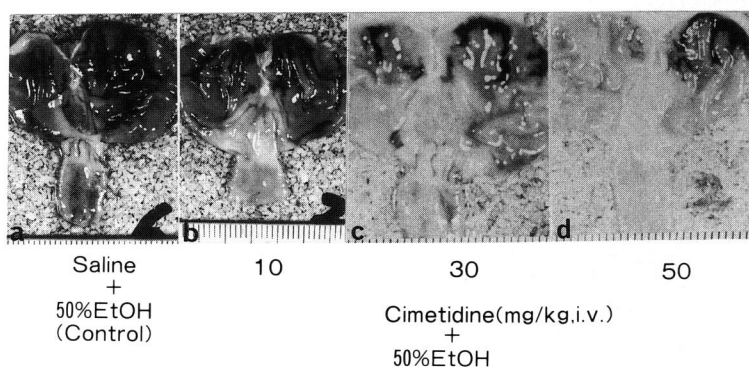


Fig. 9 Effect of pretreatment with cimetidine (10, 30 and 50 mg/kg, i. v.) on the macroscopic findings of the gastric mucosa 60 minutes after the ingestion of 50% ethanol (EtOH). Pretreatment was done 15 minutes before the ingestion of EtOH. One ml of saline was pretreated in the control group.

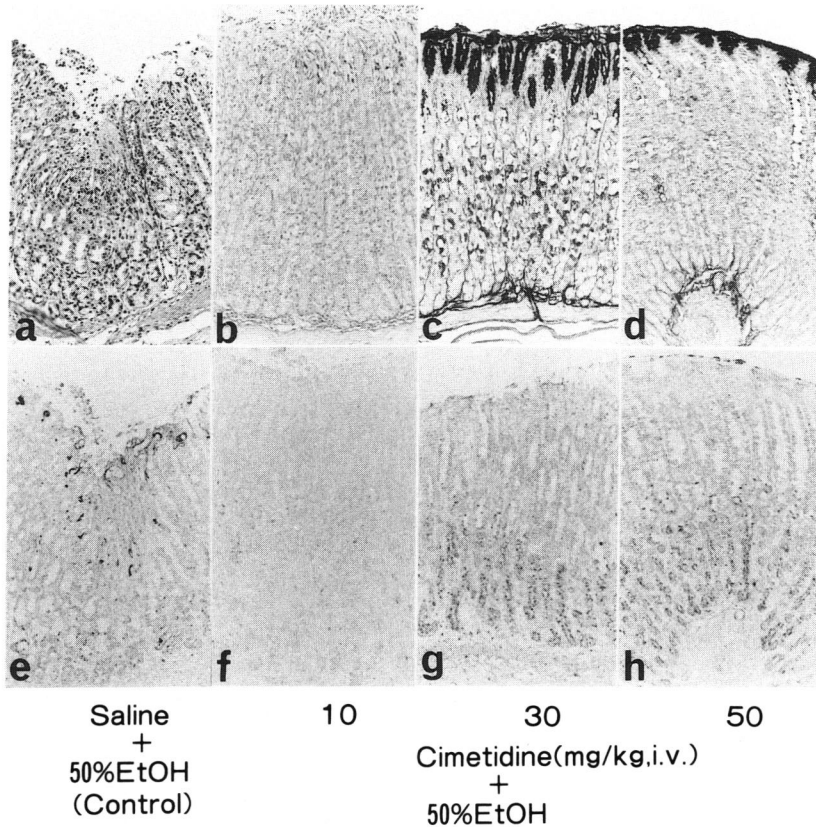


Fig. 10 The histological and immunohistological findings of the gastric fundic mucosa shown in Fig. 9. a-d : PAS-alcian blue stain ($\times 200$) and e-h : fibronectin-related substance (ABC method, $\times 200$).

Table 2 Effect of pretreatment with cimetidine (10, 30 and 50 mg/kg, i. v.) on the ulcer index and fibronectin-related substance (FNRS) score 60 minutes after the ingestion of 50% ethanol.

| | Control (saline) | Pretreatment with cimetidine (mg/kg, i.v.) | | | Non-treatment group |
|------------------|---------------------|---|-----------------|-----------------|------------------------|
| | | 10 | 30 | 50 | |
| (n) | (5) | (5) | (5) | (5) | (5) |
| Ulcer index (mm) | 99 \pm 31.8 | 81 \pm 19.0 | 39 \pm 16.6** | 31 \pm 11.4** | 0 |
| FNRS score | 1.2 \pm 0.3 | 1.4 \pm 0.3 | 2.6 \pm 0.5* | 3.0 \pm 0.7** | 3.8 \pm 0.2 |

Pretreatment was done 15 minutes before 50% ethanol ingestion.

Mean \pm SE is shown in each group. Significant differences are seen between the control group and the groups pretreated with cimetidine (* $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$).

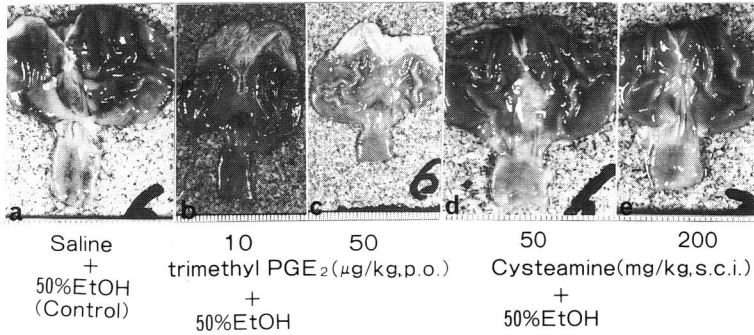


Fig. 11 Effect of pretreatment with either 11(R), 16, 16-trimethyl prostaglandin E₂ (10 and 50 µg/kg, p. o.) or cysteamine (50 and 200 mg/kg, s. c. i.) on the macroscopic findings of the gastric mucosa 60 minutes after the ingestion of 50% ethanol (EtOH, 1 ml). Pretreatment was done 15 minutes before the ingestion of EtOH. One ml of saline was pretreated in the control group.

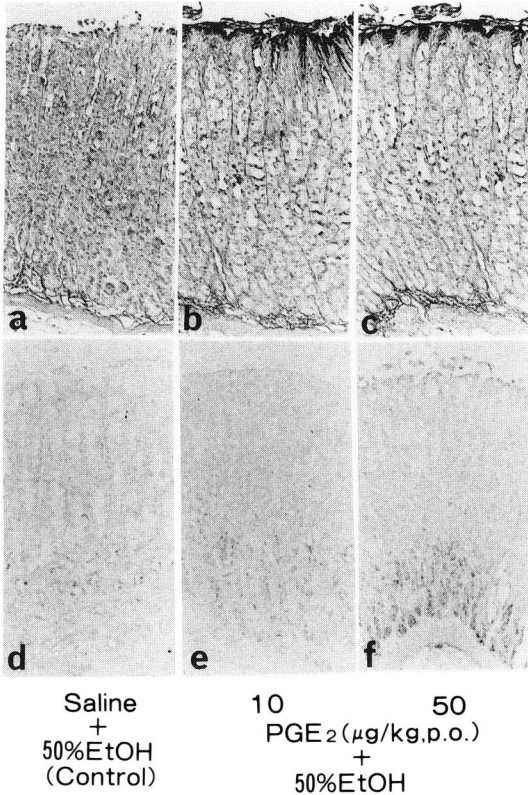


Fig. 12 The histological and immunohistological findings of the gastric fundic mucosa shown in Fig. 11-b and c. a-c : PAS-alcian blue stain (× 220) and d-f : fibronectin related substance (ABC method, × 220).

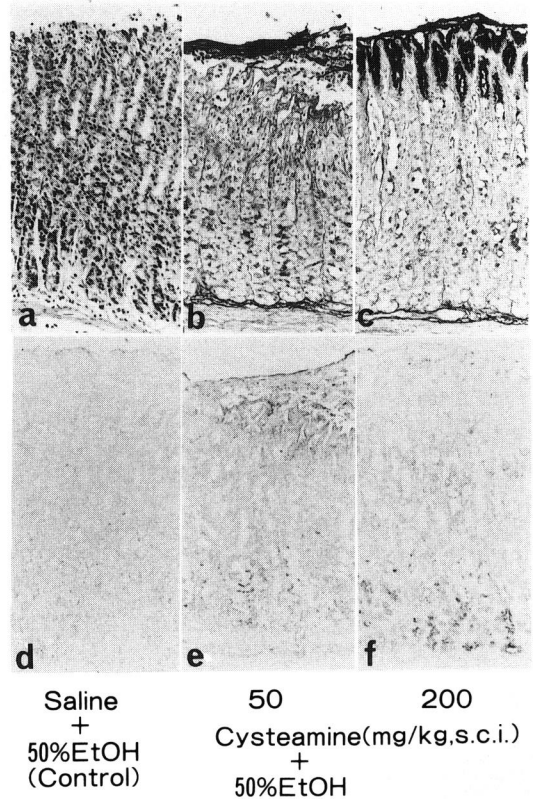


Fig. 13 The microscopic and immunohistological findings of the gastric fundic mucosa shown in Fig. 11-d and e. a-c : PAS-alcian blue stain (× 230) and d-f : fibronectin-related substance (ABC method, × 230)

Table 3 Effect of pretreatment with either 11(R), 16, 16-trimethyl prostaglandin E₂ (10 and 50 µg/kg, p.o.) or cysteamine (50 and 200 mg/kg, s.c.i.) on the ulcer index and fibronectin-related substance (FNRS) score 60 minutes after the ingestion of 50% ethanol.

| | Control (saline) | Pretreatment with trimethyl PGE ₂ (µg/kg, p.o.) | | Pretreatment with cysteamine (mg/kg, s.c.i.) | | Non-treatment group |
|------------------|------------------|--|-----------|--|-----------|---------------------|
| | | 10 | 50 | 50 | 200 | |
| (n) | (5) | (5) | (5) | (5) | (5) | (5) |
| Ulcer index (mm) | 59 ±10.2 | 13 ±3.4** | 14 ±3.4** | 40 ±5.1* | 15 ±4.6** | 0 |
| FNRS score | 1.2±0.3 | 3.4±0.2** | 3.6±0.2** | 1.4±0.5 | 2.6±0.5 | 3.8±0.2 |

Pretreatment was done 15 minutes before 50% ethanol ingestion.

Mean±SE is shown in each group. Significant differences are seen between the control group and the groups pretreated with trimethyl PGE₂ or cysteamine (*p<0.05 and **p<0.01).

0.05) (Table 3).

4 考 察

FN は糖を5%含む高分子糖蛋白⁵⁾で、血漿FNと細胞性FNに大別されている⁶⁾。細胞性FNは、細胞接着、組織修復、細胞分化など多彩な生物活性⁷⁾を有し、細胞の癌化との関係⁸⁾でも注目されている。

免疫組織学的には肝や消化管粘膜の間質や血管壁にも証明されている⁹⁾が、教室の前田ら³⁾は、固有胃腺の間質や基底膜に分布する従来の細胞性FNの他に、胃底腺領域の深層の細胞にポリクローナル抗FN抗体に反応するFN様物質が存在することを明らかにした。また、ウェスタンブロット法により、この物質はおおよそ70 kdで、免疫組織学的に細胞接着ペプチドを含むFN-C端フラグメントである可能性が濃厚であり、この物質をFN関連物質(FNRS)と称してその基礎的検討を重ねてきた。

本研究においても、ラット胃体部粘膜深層に、このFNRSが濃密に分布していることが確認されたので、その局在意義を追究する目的で、その発症機序が比較的良好に解明されているEtOH潰瘍モデル^{10,11)}を用いて、肉眼的・組織学的所見とFNRS分布の対比観察を行った。

100%EtOH胃内投与群の胃粘膜の肉眼的・組織学的変化は諸家^{10,11,12)}の報告にも見られるように、時間経過に伴って増強した。一方、胃体部粘膜FNRSは、EtOH胃内投与5分後の早い時期から急速に減少することを明らかにしえた。それぞれの基準に基づいて算出されたUIとFNRSスコアの間には、あたかも鏡像を呈するかのような関係が見い出された。また、以上の胃粘膜の肉眼的・組織学的変化は、EtOHの濃度にも

依存して増強し、これに並行してFNRSが減少することが、UIおよびFNRSスコアの上からも確認された。以上の成績から、胃体部粘膜の深層に分布するFNRSが、EtOHの胃粘膜傷害作用に反応して減少している可能性が示唆される。

一般に100%EtOH、HCl、NaOH等の強力な粘膜壊死誘発物質の胃内投与による粘膜傷害の発生機序には、1~2分の短時間内に発生する粘膜表層の毛細血管の鬱血・循環不全がまず先行し、次いでおよそ3分後に最大となる粘膜下層および胃壁細動脈の拡張が主な役割を演じるものと推定されている^{13,14)}。今回の観察においても、100%EtOH胃内投与5分後に、著明な粘膜浮腫と出血、線状びらんが形成され、組織学的にも被蓋上皮細胞の壊死・脱落、粘膜固有層の浮腫、固有胃腺の破壊など多彩な変化がみられた。以上の諸変化は時間経過に伴って増強し、広範囲にみられたが、その進展機序は主として前述の粘膜微小循環障害が深く関与しているものと思われる。この点については教室において平行して研究しているので別に報告したい。

肉眼的・組織学的に軽度の浮腫と鬱血が混在する程度で、粘膜表層のPAS陽性粘液が比較的良好に保存されている20%EtOH胃内投与群で、10分後の早期の段階からFNRSが既に減少傾向を示していた点は興味深い。つまり、高濃度のEtOHばかりでなく、比較的低濃度のEtOHに対しても敏感に反応し、粘膜の肉眼的・組織学的変化に先行して胃体部粘膜深層に分布するFNRSが減少する可能性が推測される。

100%EtOHによる胃粘膜傷害では、1~2分後にびまん性にみられる激しい毛細血管壁の超微構造レベルの変化と内皮細胞傷害が明らかにされ¹⁴⁾、関連して最近で

は、肥満細胞より放出されるヒスタミン、ロイコトリエン C_4 (LTC_4)、セロトニン等の血管作用性物質の関与^{15,16)}が推測されており、今後はこれらの活性因子の FNRS 分布への影響を検討する必要がある。

ところで、細胞性 FN は、235 kd の A 鎖と 225 kd の B 鎖のサブユニットがそれぞれ C 端近傍でジスルフィド (S-S) 結合している 2 量体以上の多量体からなること、各種フラグメントの構造・機能解析から、機能的ドメインの存在が明らかにされている^{5,6)}。塩酸・ペプシン分泌の場である胃体部粘膜の深層に同定される FNRS は、70 kd の FN フラグメントである可能性が大きく、しかも細胞結合ドメインとも呼ばれるドメイン 4 (およそ 75 kd)、あるいはヘパリン、フィブリン結合および細胞接着機能を有するドメイン 5 (35 kd) とドメイン 6 (30 kd) の両ドメインに該当する可能性がある。いずれのドメインも細胞接着、細胞伸展、細胞移動、細胞増殖・分化に対する促進的な作用^{5,7)}を有する。この FNRS が細胞結合ペプチド (Arg-Gly-Asp)¹⁷⁾ や C 端フラグメントに対するモノクローナル抗体とも反応することが明らかにされている。酸・ペプシン分泌を活発に営み、一方では H^+ 逆拡散を介して絶えずその侵襲を受けることが予想される胃体部粘膜では、この FNRS が胃体部粘膜細胞の形態の保持や機能の発現に何らかの役割を演じている可能性がある。低濃度の EtOH でも酸・ペプシン分泌を促進¹⁸⁾し、胃底腺粘膜を傷害¹⁹⁾して、 H^+ 逆拡散をより一層増強する機序が推測されていることから、この機能的ドメインを含むと思われる FNRS の局在意義が極めて大きいと考えられる。

H^+ 逆拡散に対して粘膜表層では粘液・ HCO_3^- バリアー²⁰⁾と、疎水性リン脂質バリアー²¹⁾が共同して対応し、粘膜深層ではこの部位に局在する FNRS が H^+ の粘膜深層への逆拡散による細胞傷害に抵抗しているのかもしれない。

Sanders ら²²⁾ はイヌの主細胞 monolayer culture を用いて、電気生理学的に主細胞が H^+ 逆拡散に対して抵抗性を示す可能性を明らかにしている。胃体部粘膜の深層で主として主細胞より構成される腺底部に細胞接着ペプチドを含む FN フラグメントと思われる物質の FNRS が局在している可能性から推測して、同部位の細胞組織の形態・機能を保持する上で、この FNRS が大きな役割を有している可能性が一層明確にされたものと考えられる。

本研究ではこの FNRS の局在意義を明らかにする目的で、強力な酸分泌抑制作用を有するシメチジン、粘

膜・細胞保護作用 (cytoprotection) を有する $tmPGE_2$ 、SH 基剤のひとつである Cys を用い、その前処置の効果についても検討した。

Cim の EtOH 潰瘍に対する抑制効果は、ストレス潰瘍、インドメタシンあるいはアスピリン潰瘍に比較して弱いとされている¹¹⁾。今回の検討でも高用量の 50 mg/kg 前処置で粘膜傷害程度はかなり軽減されたが、完全に防止するまでには至らなかった。Cim の強力な抗潰瘍作用には、酸・ペプシン分泌抑制を介した機序の他に、粘膜・細胞保護作用も関与している可能性が報告されている。Cim がショック時の胃粘膜血流低下を阻止し²³⁾、アスピリン・HCl 胃内投与による胃粘膜バリアー破壊を防止し²⁴⁾、ストレスや EtOH による粘膜血管透過性亢進および粘膜血管損傷作用に対する抑制効果^{1,25)}が認められているが、このような粘膜・細胞保護作用に関する詳細な機序は必ずしも明確でない。この点、EtOH 胃内投与によって減少した FNRS が、Cim 前処置によって用量依存的に回復する現象は、Cim の抗潰瘍機序の側面を示唆している。

PG は粘液・ HCO_3^- 分泌促進²⁶⁾、粘膜血流増加²⁷⁾、内皮細胞の機能保持¹⁴⁾、粘膜 LT 産生抑制²⁸⁾ など多彩な生物学的作用を介して、粘膜壊死誘発物質による粘膜傷害作用を防止する。本研究でも $tmPGE_2$ の胃内投与が 50%EtOH による胃粘膜変化を抑制し、減少した PAS 陽性粘液と、FNRS スコアを用量依存的に回復させた。最近、Tarnawski ら²⁹⁾ は 100%EtOH 胃内投与による胃粘膜表層の肉眼的変化が、16, 16 dimethyl PGE_2 ($dmPGE_2$) 胃内投与で防止されるが、これを超微構造的に観察すると、依然として粘膜上皮の構造破壊はそのまま残されており、むしろ粘膜表層より深い部位の増殖細胞帯付近に見い出される壊死性変化 (deep necrotic lesion) が軽減・防止され、これが PG の粘膜・細胞保護作用の本態である可能性を推測している。さらにごく最近、Cherner ら³⁰⁾ がモルモット単離主細胞を用い、低濃度の 10%EtOH の直接的な細胞傷害作用を明らかにする一方、弱いながらも血管系、バラクリンおよび神経系を介しない $dmPGE_2$ の主細胞に対する直接的な細胞保護作用を証明している。本研究の成績からは、 $tmPGE_2$ が胃体部粘膜の深層に濃密に分布する主細胞に直接作用して、EtOH による FNRS スコアの減少を抑制し、ひいては胃粘膜防御機構の減弱・破壊を防止している可能性も十分考えられる。この点、Cys は局所においては内因性 PG 産生を刺激して³¹⁾、粘液分泌を促進する³²⁾ばかりでなく、胃粘膜血管透過性亢進と粘膜血管損傷に対しても抑制的に作用するが、

tmPG 前処置の場合と同様に, Cys が EtOH による胃粘膜の肉眼的・組織学的変化を明らかに防止し, しかも FNRS を用量依存性に回復したことは, 極めて重要な知見と考えられる。

以上の成績から胃体部粘膜の深層に分布する FNRS は, H₂ 受容体あるいは内因性 PG を介して影響を受け調節されている可能性が否定できず, 増殖細胞帯から深層にかけて, H⁺ 逆拡散の侵襲に対して防御的な機能を一部担当している可能性が推測された。

5 結 論

胃体部粘膜深層に分布する FNRS の局在意義と消化性潰瘍の病態との関わりを追究する目的で, ラット EtOH 潰瘍モデルを用いて, 胃粘膜の肉眼的・組織学的変化と, 抗 FN 抗体を用いて免疫組織学的に同定される FNRS の分布を対比観察し, 以下の成績を得た。

1. ラット胃体部粘膜の比較的深層の固有胃腺にポリクローナル家兎抗ヒト・FN 抗体と強く反応する FNRS が局在することが確認された。
2. 100%EtOH 胃内投与 5 分後より肉眼的・組織学的な胃粘膜変化が出現し, 時間経過に伴って増強した。FNRS は 5 分後より減少し, 60 分後ではほとんど検出されなくなった。UI は時間経過に伴って増加し, 一方 FNRS スコアはこれと鏡像を呈するかのように減少した。
3. 20%EtOH 投与群の胃粘膜には明らかな肉眼的・組織学的変化は認められなかったが, FNRS スコアは 10 分後より有意に減少し, 時間経過に伴ってさらに減少した。しかし, その減少の程度は 100%EtOH 投与群に比較して軽度であった。

このような肉眼的・組織学的胃粘膜変化は EtOH 濃度に依存して増強し, FNRS スコアは逆に低下した。

4. 50%EtOH 投与による肉眼的・組織学的胃粘膜変化および FNRS の減少は, Cim により用量依存性に抑制された。
5. tmPGE₂ は, 50%EtOH による胃粘膜変化を用量依存性に抑制し, PAS 陽性粘液および FNRS の減少を明らかに防止した。また, Cys も同様に EtOH 胃内投与による粘膜変化と FNRS の減少を防止した。

以上より, 酸・ペプシン分泌を活発に営み, H⁺ 逆拡散を介して絶えずその侵襲をうける胃体部粘膜では, 粘膜深層に局在する FNRS が防御的役割を演じると共に, この FNRS が H₂ 受容体あるいは内因性 PG を介して調節されている可能性が推測された。

謝 辞

稿を終るにあたり御指導, 御校閲をいただいた内科学第 1 講座谷内 昭教授, 御教示いただいた医療法人啓和会黒澤病院長前田修一博士ならびに御協力いただいた諸先生に深謝致します。

また本研究は文部省科学研究費補助金一般研究 C (矢花) No. 01570406, 一部同一般研究 B (谷内) No. 01480227 の補助による。

文 献

1. Yabana, T., Kondo, Y., Fujii, K., Yachi, A. and Szabo, S.: Role of increased mucosal vascular permeability and vascular injury in pathogenesis of peptic ulcer. In: Kasuya, Y., Tsuchiya, M., Nagao, F. and Matsuo, Y.: Gastrointestinal function-regulation and disturbances. Vol. 3 (International Congress Series 704), Excerpta Medica, Amsterdam-Princeton-Geneva-Tokyo (1985).
2. Yabana, T. and Yachi, A.: Stress-induced vascular damage and ulcer. *Dig. Dis. Sci.* **33**, 751-761 (1988).
3. 前田修一, 藤井 謙, 近藤吉宏, 寺島弘史, 小林壮光, 矢花 剛, 谷内 昭: 胃粘膜上皮におけるフィブロネクチン関連物質の局在. *Ther. Res.* **8**, 105-112 (1988).
4. 堤 寛: その他の光顕的免疫組織化学, 渡辺慶一, 中根一穂編集: 酵素抗体法(改訂版), 102-121, 学際企画, 東京 (1988).
5. Hynes, R. O. and Yamada, K. M.: Fibronectins: Multifunctional modular glycoproteins. *J. Cell Biol.* **95**, 369-377 (1982).
6. Yamada, K. M. and Olden, K.: Fibronectin-adhesive glycoproteins of cell surface and blood. *Nature* **275**, 179-184 (1978).
7. 赤間高雄, 林 正男: フィブロネクチンの構造と機能. *代謝* **23**, 955-962 (1986).
8. Gahmberg, C. G. and Hakomori, S.: Altered growth behavior of malignant cells associated with changes in externally labeled glycoprotein and glycolipid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **70**, 3329-3333 (1973).
9. Ruoslahti, E., Engvall, E. and Hayman, E. G.: Fibronectin-Current concept of its structure and functions. *Coll. Res.* **1**, 95-128 (1981).
10. Lacy, E. R. and Ito, S.: Microscopic analysis of ethanol damage to rat gastric mucosa after treatment with a prostaglandin. *Gastroenterology* **83**, 619-625 (1982).

11. Oates, P. and Hakkinen, J. P.: Studies on the mechanism of ethanol-induced gastric damage in rats. **Gastroenterology** 94, 10-22 (1988).
12. Robert, A., Nezamis, J. E., Lancaster, C. and Hanchar, A. J.: Cytoprotection by prostaglandins in rats. Prevention of gastric necrosis produced by alcohol, HCl, NaOH, hypertonic NaCl, and thermal injury. **Gastroenterology** 77, 433-443 (1979).
13. Pihan, G., Majzoubi, D., Haudenschild, C., Trier, J. S. and Szabo, S.: Early microcirculatory stasis in acute gastric mucosal injury in the rats and prevention by 16, 16-dimethyl prostaglandin E₂ or sodium thiosulfate. **Gastroenterology** 91, 1415-1426 (1986).
14. Trier, J. S., Szabo, S. and Allan, C. H.: Ethanol-induced damage to mucosal capillaries of rat stomach. **Gastroenterology** 92, 13-22 (1987).
15. Pihan, G., Rogers, G. and Szabo, S.: Vascular injury in acute gastric mucosal damage. Mediator role of leukotrienes. **Dig. Dis. Sci.** 33, 625-632 (1988).
16. Peskar, B. M., Lange, K., Hoppe, U. and Peskar, B. A.: Ethanol stimulates formation of leukotriene C₄ in rat gastric mucosa. **Prostaglandins** 31, 283-293 (1986).
17. Pierschbacher, M. D. and Ruosalahti, E.: Cell attachment activity of fibronectin can be duplicated by small synthetic fragment of the molecule. **Nature** 309, 30-33 (1984).
18. Bunce, K. T. and Parsons, M. E.: Ethanol-stimulated acid secretion in the isolated whole stomach of the rat. **J. Pharmacol.** 32, 45-48 (1980).
19. Davenport, H. W.: Ethanol damage to canine oxyntic glandular mucosa. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.** 126, 657-662 (1967).
20. Garner, A., Flemström, G., Allen, A., Heylings, J. R. and McQueen, S.: Gastric mucosal protective mechanisms: roles of epithelial bicarbonate and mucus secretions. **Scand. J. Gastroenterol.** 19(Suppl. 101), 79-86 (1984).
21. Butler, B. D., Lichtenberger, L. M. and Hills, B. A.: Distribution of surfactants in the canine gastrointestinal tract and their ability to lubricate. **Am. J. Physiol.** 244, G 645-G 651 (1983).
22. Sanders, M. J., Ayalon, A., Roll, M. and Soll, A. H.: The apical surface of canine chief cell monolayers resists H⁺ back diffusion. **Nature** 313, 52-54 (1985).
23. Levine, B. A., Schwesinger, W. H., Sirinek, K. R., Jones, D. and Pruitt, B. A.: Cimetidine prevents reduction in gastric mucosal blood flow during shock. **Surgery** 84, 113-119 (1978).
24. Bommelaer, G. and Guth, P. H.: Protection by histamine receptor antagonists and prostaglandin against gastric mucosal barrier disruption in the rat. **Gastroenterology** 77, 303-308 (1979).
25. Szabo, S., Trier, J. S., Brown, A. and Schnoor, J.: Early vascular injury and increased vascular permeability in gastric mucosal injury caused by ethanol in the rat. **Gastroenterology** 88, 228-236 (1985).
26. Rees, W. D. W. and Turnberg, L. A.: Mechanisms of gastric mucosal protection: a role for the 'mucus-bicarbonate' barrier. **Clin. Sci.** 62, 343-348 (1982).
27. Guth, P. H., Paulsen, G. and Nagata, H.: Histologic and microcirculatory changes in alcohol-induced gastric lesions in the rat: effect of prostaglandin cytoprotection. **Gastroenterology** 87, 1083-1090 (1984).
28. Boughton-Smith, N. K. and Whittle, B. J. R.: Prostaglandin inhibition of ethanol-induced release of gastric mucosal leukotrienes(abst). **Gastroenterology** 92, 1325 (1987).
29. Tarnawski, A., Hollander, D., Stachura, J., Krause, W. J. and Gergery, H.: Prostaglandin protection of the gastric mucosa against alcohol injury—a dynamic time-related process. **Gastroenterology** 88, 334-352 (1985).
30. Cherner, J. A., Naik, L., Tarnawski, A., Brzozowski, T., Stachura, J. and Singh, G.: Ability of prostaglandin to reduce ethanol injury to dispersed chief cells from guinea pig stomach. **Am. J. Physiol.** 256, G 704-714 (1989).
31. Konturek, S. J., Brzozowski, T., Piastucki, I., Radeki, T. and Szabo, S.: Gastric cytoprotection by agents altering gastric mucosal sulfhydryl compounds: Role of endogenous prostaglandins. In: Samuelsson, B., Paoletti, R. and Ramwell, P. W.: Advances in Prostaglandin, Thromboxane, and Leukotriene Research, Vol. 12, 411-416, Ravan Press, New York (1983).
32. Lamont, J. H., Ventola, A. S., Maull, E. A. and Szabo, S.: Cysteamine and prostaglandin F_{2β} stimulate rat gastric mucin release. **Gastroenterology** 84, 306-313 (1983).

別刷請求先:

(〒060) 札幌市中央区南1条西16丁目

札幌医科大学内科学第1講座 矢花剛