

The Effect of Long Term Administration of Ammonia to Duodenal Mucosa

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/8486

アンモニア長期投与によるラット十二指腸粘膜に及ぼす影響

金沢大学医学部内科学第二講座 (主任: 竹田亮祐教授)

小市勝之

十二指腸潰瘍の発生に, *Helicobacter pylori* (Hp) が大きく関与することが知られているが, その因果関係は明らかではない。本研究では Hp の産生するアンモニアに注目し, アンモニアの十二指腸粘膜や粘膜防御機構に及ぼす影響をラットを用いて検討した。まず, 塩酸システアミン投与により実験的十二指腸潰瘍を作製し, 0.02% アンモニア 3ヶ月経口投与群と水道水投与群 (対照群) 間で比較した。システアミン 200mg/kg 投与にて, 対照群では十二指腸に肉眼的な病変を認めなかったが, アンモニア投与群では全例に円形の限局性潰瘍が認められた。また組織学的にはアンモニア投与群では対照群に比し非潰瘍部のブルネル腺の粘液産生能の低下が認められた。次いで, 0.02% アンモニア水を1ヶ月, 2ヶ月および3ヶ月, 経口投与したラットを用いて, アンモニアの十二指腸粘膜に及ぼす組織学的変化を経時的に観察した。投与1, 2ヶ月では著変なかったが, 投与3ヶ月で十二指腸粘膜の厚さの減少, 絨毛密度の低下, 絨毛の変形, 粘膜下血管の拡張およびブルネル腺の腺房面積の減少など, 十二指腸粘膜の萎縮性変化がみられた。特に粘膜の厚さの減少は, 増殖細胞やホルモン分泌細胞の存在するリーベルキューン陰窩の深さが減少したことが原因と考えられた。また近年, 十二指腸潰瘍発生には胃酸分泌の亢進のみならず, 近位十二指腸粘膜からの重炭酸塩分泌の低下が関与すると報告されている。そこで, ラット近位十二指腸灌流系を作製し重炭酸塩分泌を検討した。基礎分泌測定の後, 塩酸刺激およびプロスタグランジン (prostaglandin, PG) 刺激による反応も測定した。まず 0.01% または 0.02% アンモニア 3ヶ月投与群を用いて, アンモニア濃度変化による影響を検討した。アンモニア投与群では 0.01% および 0.02% のいずれの濃度も基礎分泌に有意な変化は及ぼさなかったが, 塩酸刺激による重炭酸塩分泌反応はいずれも有意に低下していた。また, 0.01% に比し 0.02% アンモニア投与群の方が重炭酸塩分泌反応は減少する傾向がみられた。また PG 刺激による重炭酸塩分泌反応でもアンモニア投与群は, 対照群に比し有意に低下していた。さらに, 0.02% アンモニア水を1ヶ月, 2ヶ月および3ヶ月, 経口投与したラットを用いて, 経時的変化を検討した。塩酸刺激による重炭酸塩分泌反応は, アンモニア投与1ヶ月で減少傾向を認め, 2ヶ月以降で有意な低下を認めた。以上よりアンモニア長期投与は近位十二指腸粘膜からの重炭酸塩分泌を障害し, 粘膜防御機構を低下させることが明らかとなった。また, この重炭酸塩分泌能の低下は組織の萎縮性変化に先行して認められた。これらの結果から, Hp 感染によって, 持続的に胃液中のアンモニア濃度が上昇することは, 十二指腸粘膜を萎縮させ, ブルネル腺をはじめとする粘液性防禦機構の障害と近位十二指腸粘膜からの重炭酸塩分泌障害をひきおこすことにより, 十二指腸潰瘍発生の重要な一因となり得ると考えられた。

Key words *Helicobacter pylori*, ammonia, mucosal atrophy, duodenal ulcer, bicarbonate secretion

十二指腸潰瘍は胃酸分泌機能の著しい亢進¹⁾と壁細胞のガストリンに対する高感受性^{2)~5)}が特徴的な病態であるとされているが, これらの攻撃因子の明確な異常は, 十二指腸潰瘍患者の約1/3にしか認められず⁶⁾, 十二指腸潰瘍の原因となる病態生理はいまだ完全には解明されていない。

近年, 胃炎や消化性潰瘍の原因の一つとして Warren らがヒトの胃粘膜から *Helicobacter pylori* (Hp) を分離培養することに成功した⁷⁾。Hp は, 長さ 2.5 μ m, 幅 0.5 μ m の好気性のらせん状グラム陰性桿菌で, 強いアルカリフォスファターゼ活性とウレアーゼ活性を持つのが特徴である^{8)~11)}。特に Hp のウレアーゼ活性は尿素を分解してアンモニアを産生するので, 胃酸を中和して, Hp はその殺菌作用から免れているばかりでなく, 胃粘膜破壊作用を有するとされている。十二指腸潰瘍患者では, 胃

粘膜より高率に Hp が検出される^{11)~14)}。しかし, Hp 陽性者のすべてに十二指腸潰瘍が発生するわけではなく, その作用機序に関しても, 十二指腸の胃上皮化生への Hp の感染に加え^{15)~19)}, Hp の産生するアンモニアによる十二指腸粘膜防御機構への障害が予想されているが, その因果関係は未だ充分に解明されていない。

また Isenberg ら²⁰⁾²¹⁾は十二指腸潰瘍患者において, 近位十二指腸粘膜からの重炭酸塩分泌が健常者に比較して明らかに低下していることを報告した。以来胃酸分泌の亢進のみならず近位十二指腸粘膜からの重炭酸塩分泌の低下が十二指腸潰瘍発生に大きく関与すると考えられるようになってきている。

そこで本研究では, Hp 産生するアンモニアが十二指腸粘膜や重炭酸塩分泌にどのような影響を与え, 十二指腸潰瘍の原因

平成5年11月4日受付, 平成5年11月30日受理

Abbreviations: H·E, hematoxylin-eosin; Hp, *Helicobacter pylori*; NSAIDs, nonsteroidal anti-inflammatory drugs; PAS, periodic acid-Schiff; PG, prostaglandin; VIP, vasoactive intestinal polypeptide

となり得るかをラットを用いて検討した。

対象および方法

I. 実験動物

生後5週、体重150gのDonryu系雄性ラット(三協ラボサービス、富山)を用いた。アンモニア投与群は飲料水として0.01% または 0.02% アンモニア水(和光、大阪)を3ヶ月間投与し、対照群には水道水を飲水させた同じ月令のラットを用いた。また経時間的変化の観察には0.02% アンモニア水を1ヶ月、2ヶ月、および3ヶ月飲水させた群を作製した。ラット一匹の飲水量は一日約50mlで、体重増加はアンモニア投与群と対照群の間に差はみられなかった。

II. 方法

1. 十二指腸潰瘍作製

既報に準じて²³⁾、0.02% アンモニア水を3ヶ月間投与したラットに塩酸システアミン(東京化成、東京)200mg/Kgまたは300mg/Kgを皮下注射した。注射後24時間絶食させウレタン(和光)1.25g/Kgの腹腔内注射による麻醉下に開腹して十二指腸を摘出し、腸間膜付着側で切開した。潰瘍は潰瘍面積(mm²)を測定して潰瘍計数(ulcer index)とし、アンモニア投与群と対照群と比較検討した。肉眼的観察の後10%ホルマリンにて固定し、ヘマトキシリン・エオジン(hematoxylin・eosin, H・E)染色および過ヨウ素酸-Schiff(periodic acid-Schiff, PAS)染色にて組織学的検討を行った。

2. アンモニア長期投与の十二指腸粘膜に及ぼす影響

0.02% アンモニア水を1ヶ月、2ヶ月、および3ヶ月投与したラットを用いて検討した。24時間絶食後、ウレタン麻醉下に開腹。十二指腸を摘出し、腸間膜付着側で切開した。肉眼的観察の後10%ホルマリン(和光)にて固定し、H・E染色をおこない以下の項目につき組織学的検討を行った。

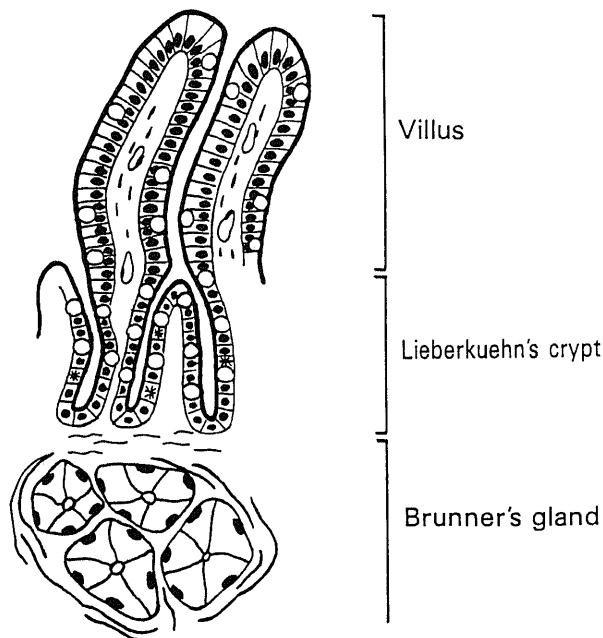


Fig. 1. Illustration of rat duodenal mucosa. Measurements of the mucosal thickness, the villus thickness, depth of Lieberkuehn's crypt and area of acinus in Brunner's gland is illustrated.

1) 粘膜の厚さ

粘膜の厚さは、幽門輪から5ないし10mmの範囲で絨毛10個の平均から求めた。また粘膜の厚さを絨毛とリーベルキューン陰窩に分けて検討した(図1)。

2) 絨毛密度

絨毛密度は、幽門輪から5ないし10mmの範囲の単位長さ当たり(600 μ m)の絨毛数で表した。

3) ブルネル腺の腺房面積

腺房面積は円形房状腺の典型的な特徴を示す腺房10個の平均から求めた。

3. 十二指腸重炭酸塩分泌測定

1) 十二指腸灌流ループ作製法

ラットを24時間絶食させた後、ウレタン麻醉下に開腹した。まず、胃十二指腸を露出させ、前胃部に切開を加え外瘻を作製。胃液や胃内容物は外瘻部より排出させた。また同部より外径3mmのプラスチックチューブを挿入し、その先端が幽門輪を2mm越えた位置で幽門輪を結紮して固定した。これを口側カニューレとした。一方、肛門側カニューレは幽門輪から約1.5cm、膵胆管開口部より近位で十二指腸に横切開を加え、同径のプラスチックチューブを口側に向けて約2mm挿入し結紮した。このようにして作製した近位十二指腸ループは胃液と膵液、胆汁の影響を受けないことが証明されており²⁴⁾、以下の灌流実験をおこなった。

2) 十二指腸重炭酸塩分泌の定量的測定

膵液並びに胆汁の影響を除外した十二指腸ループから分泌されて、流入する酸を中和するアルカリの本態は重炭酸塩であることが知られている²⁵⁾。既報²⁴⁾の方法に準じて、十二指腸粘膜から灌流液中に分泌される重炭酸塩濃度を測定した。十二指腸の灌流液は100%酸素で飽和させ、pH7.0に調節した生理食塩水を使用し、0.7ml/minの速度で灌流した。ラットおよび灌流液は37 $^{\circ}$ Cに保温した。灌流液は自動滴定装置Comtite 900(平沼、茨城)を使用して、0.01N塩酸(和光)でpH7.0に滴定した。そして灌流液中に分泌される重炭酸塩の量は15分毎に滴定

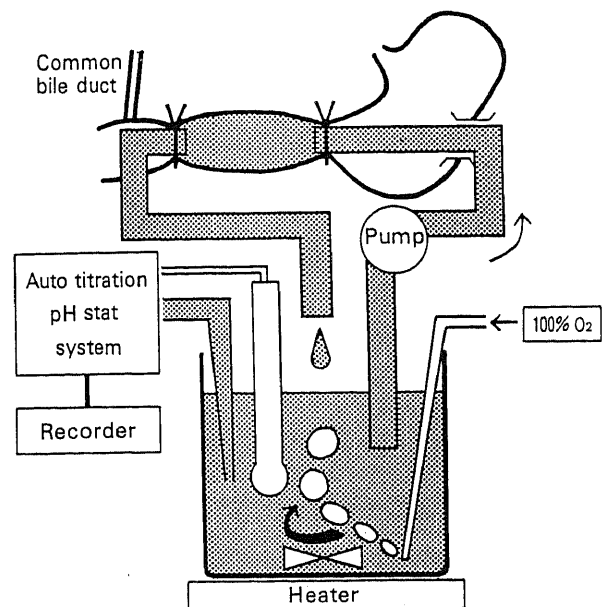


Fig. 2. Diagram of in vivo system for measuring duodenal bicarbonate secretion in rat.

に要した 0.01N 塩酸の量より計算した。1 時間基礎分泌を測定した後、重炭酸塩分泌を刺激するために塩酸またはプロスタグランジン (prostaglandin, PG) を投与した。塩酸刺激は十二指腸ループ内に 100mM HCl (54mM NaCl を加えて等張にした) を 10 分間注入した。そして充分管腔内を洗浄した後再灌流し、2 時間重炭酸塩分泌の反応を測定した。PG 刺激は 16, 16-ジメチル-PGE₂ (小野薬品, 大阪) 10 μ g/Kg を皮下注射し、その後 2 時間重炭酸塩分泌の反応を測定した。また、刺激前 1 時間における重炭酸塩分泌の総和を基礎総分泌量とし、塩酸または PG 刺激後 2 時間の重炭酸塩分泌の総和を刺激後の総分泌量とした。

0.01% または 0.02% アンモニア水を 3 ヶ月間投与したラットに対して塩酸および PG 刺激をおこなった。またアンモニア投与による重炭酸塩分泌への経時的影響をみるために 0.02% アンモニア水を 1 ヶ月, 2 ヶ月, および 3 ヶ月間の各期間投与したラットに塩酸刺激をおこなった (図 2)。

Ⅲ. 統計学的処理

成績は平均値±標準誤差で示した。得られたデータの 2 群間の有意差判定には対応のない t 検定を用い、p 値が 0.05 未満の場合に有意差ありと判定した。

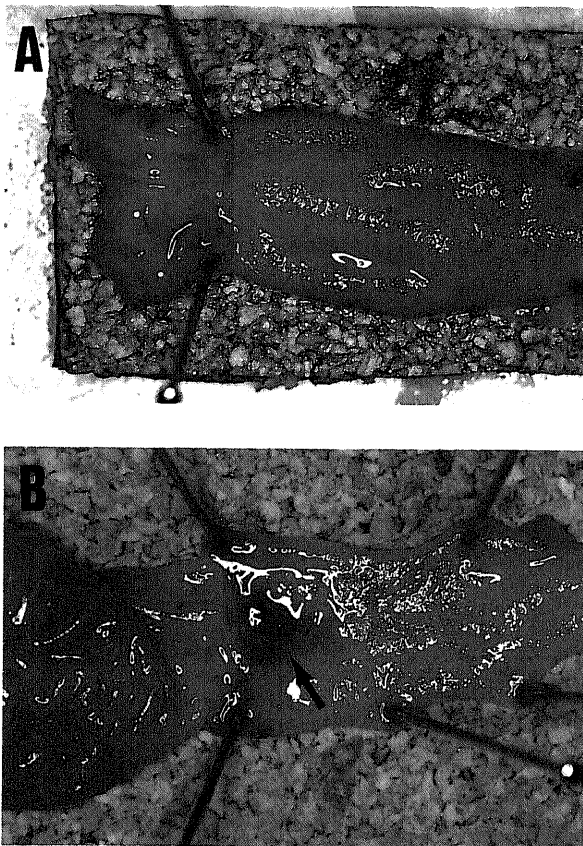


Fig. 3. Gross appearance of lesions in the proximal duodenum treated with cysteamine (200 mg/Kg S.C.). Image in (A) of the figure was taken from a control rat and image in (B) was taken from a rat administered 0.02% ammonia for three months (B). Note that no lesion is visible in control rat (A), but clear damage with ulcer is found in rat treated with 0.02% ammonia (B). Arrow indicates the lesion in duodenum.

成 績

Ⅰ. アンモニア長期投与の十二指腸潰瘍形成に及ぼす影響

0.02% アンモニアを 3 ヶ月間投与したラットの十二指腸粘膜には肉眼的に異常を認めなかった。

システアミン 200mg/Kg 投与にて、対照群では十二指腸に肉眼的な病変を認めなかったが (図3-A), アンモニア投与群では全例に腸間膜付着部対側で幽門輪に接して円形の限局性潰瘍が認められ (図3-B), 潰瘍計数は $5.8 \pm 1.0 \text{mm}^2$ であった (図 4)。またシステアミン 300mg/Kg 投与によって、アンモニア投与群では肉眼的に潰瘍は対照群に比べて増大傾向を示し、潰瘍計数はアンモニア投与群 $12.5 \pm 4.4 \text{mm}^2$, 対照群 $10.4 \pm 2.6 \text{mm}^2$ であった (図 4)。

組織学的検討では、潰瘍はブルネル腺の直上にみられ、絨毛層の壊死・脱落とフィブリン折出がみられる急性潰瘍の所見であった (図 5)。また、非潰瘍部のブルネル腺を対照群と比較すると、対照群 (図6-A) のブルネル腺は内腔が PAS 陽性粘液で充満し円形房状であるのに対して、アンモニア投与群 (図6-B) ではブルネル腺の腺房の数は減少し、粘液量も低下して管状に拡張し、血管も拡張蛇行していた。

Ⅱ. アンモニア長期投与の十二指腸粘膜に及ぼす影響

アンモニア飲水群と対照群ではアンモニア投与 3 ヶ月目において肉眼的に明らかな差は認められなかった。

1. 粘膜の厚さに及ぼす影響

対照群では粘膜の厚さは $826.0 \pm 20.1 \mu\text{m}$ で各期間に差は見られなかった。アンモニア投与群では投与期間の延長にともない粘膜の厚さは減少傾向を示し、3 ヶ月目で有意に減少した ($702.5 \pm 34.3 \mu\text{m}$, $p < 0.05$) (図7-A, B, 9-A)。また絨毛の高さはアンモニア投与群では $544.3 \pm 40.0 \mu\text{m}$ から $475 \pm 31.1 \mu\text{m}$ へと減少傾向を示したが 3 ヶ月間では有意な差はみられなかった (図 9-B)。しかし、リーベルキューン陰窩の深さはアンモニア投与群では 3 ヶ月で $285.8 \pm 10.6 \mu\text{m}$ から $227.5 \pm 4.7 \mu\text{m}$ へと有意に減少した ($p < 0.05$) (図9-C)。

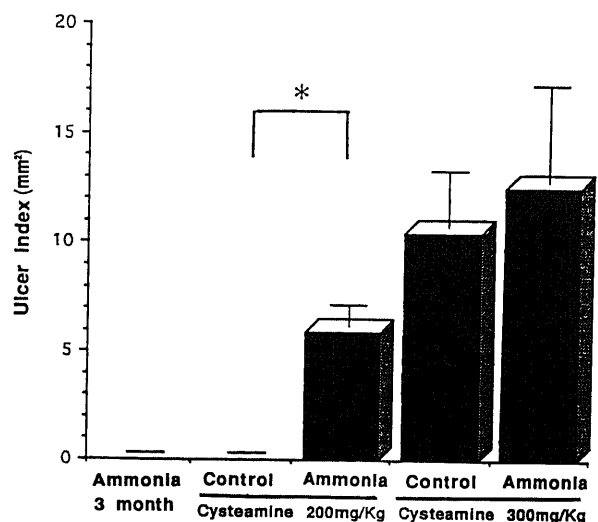


Fig. 4. Effect of the administration of 0.02% ammonia for three months on cysteamine in doses of 200 mg/Kg and 300 mg/Kg induced duodenal ulcer in rats. Data represents the mean \pm S.E.M. from 5 rats. * $p < 0.001$; significantly different from the control.

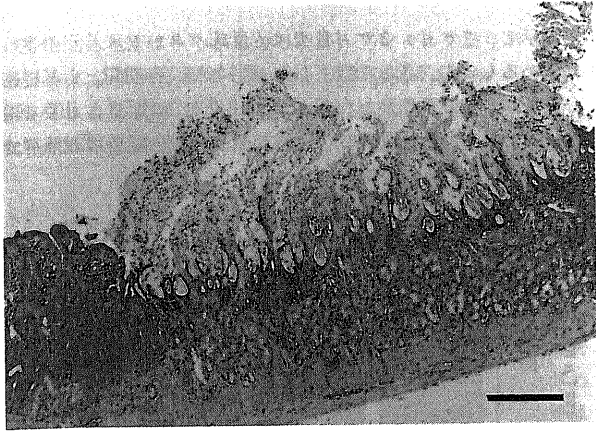


Fig. 5. Microscopic observation of a duodenal lesion induced by cysteamine (200 mg/Kg S. C.) in rat administered with 0.02% ammonia for three months. Bar indicates 200 μ m.

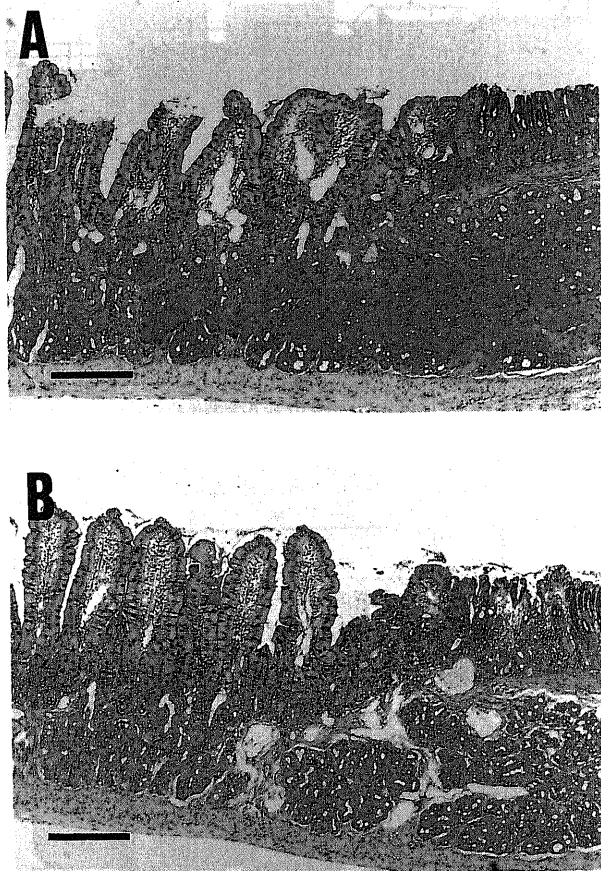


Fig. 6. Representative photomicrographs of Brunner's gland in the proximal duodenum treated with cysteamine (200 mg/Kg S. C.). Image in (A) of the figure was taken from a control rat and image in (B) was taken from a rat administered 0.02% ammonia for three months stained by PAS. A: Secretory cells are tall, cylindrical, containing large amounts of mucus. B: Secretory cells are cuboidal, depleted of mucus. The lumen of the secretory units are dilated. Bar indicates 200 μ m.

2. 絨毛密度に及ぼす影響

対照群では絨毛密度は $14.4 \pm 0.3/600 \mu\text{m}$ で各期間に差は見られなかった。アンモニア投与群では投与2ヶ月目で絨毛密度の有意な低下がみられた ($13.0 \pm 0.6/600 \mu\text{m}$, $p < 0.05$) (図7-A, B, 10)。

3. ブルネル腺の腺房面積に及ぼす影響

対照群ではブルネル腺の腺房面積は $1065.5 \pm 38.2 \mu\text{m}^2$ で各期間に差は見られなかった。アンモニア投与群では投与期間の延長とともに腺房面積は減少傾向を示し、3ヶ月目で有意に減少した ($805.4 \pm 53.1 \mu\text{m}^2$, $p < 0.01$) (図8, 11)。

アンモニア投与群は以上の粘膜の厚さの減少、絨毛密度の低下、ブルネル腺腺房面積の減少の他に、絨毛の太さも不均一なものがみられ、粘膜下の血管の拡張蛇行も認められた (図7-B)。

Ⅲ. アンモニア長期投与による十二指腸重碳酸塩分泌に及ぼす影響

各群いずれのラットも麻酔下の近位十二指腸粘膜における重碳酸塩の基礎分泌は $0.4 - 1.2 \mu\text{Eq}/15\text{min}$ であった (図12, 13, 14)。

1. 塩酸刺激による重碳酸塩分泌反応

菅腔内に 100mM HCl を投与することにより、対照群では速

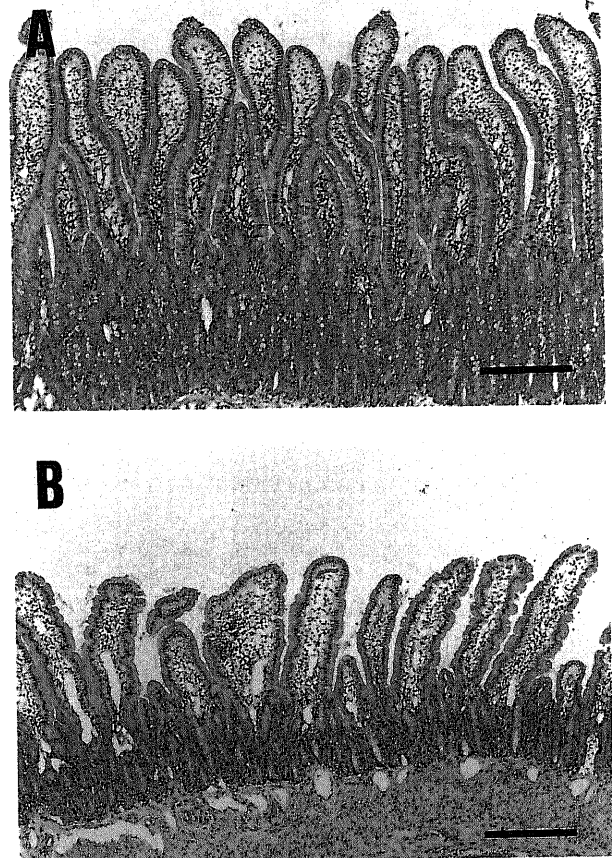


Fig. 7. Representative photomicrographs of duodenal mucosa after three months of the administration of 0.02% ammonia. Image in (A) of the figure was taken from a control rat and image in (B) was taken from a rat administered 0.02% ammonia. The duodenal mucosa treated with 0.02% ammonia showed a remarkable atrophy compared to the control. Bar indicates 200 μ m.

やかに重炭酸塩分泌の上昇がみられた。しかし 0.01% および 0.02% アンモニア 3ヶ月投与群では塩酸刺激による重炭酸塩分泌は対照群に比べ有意に低下していた (図12-A)。基礎総分泌量は対照群 ($1.9 \pm 0.2 \mu\text{Eq/hr}$) に比べて 0.02% アンモニア投与群 ($2.9 \pm 0.6 \mu\text{Eq/hr}$) では上昇傾向を認めたが有意差は見られなかった (図12-B)。塩酸刺激後の重炭酸塩総分泌量は対照群 ($15.7 \pm 0.8 \mu\text{Eq/2hr}$) に比べアンモニア投与群で有意に低下し ($p < 0.01$)、さらに 0.01% アンモニア投与群 ($13.3 \pm 0.5 \mu\text{Eq/2hr}$) と、0.02% アンモニア投与群 ($10.5 \pm 1.5 \mu\text{Eq/2hr}$) ではアンモニア濃度が上昇するのに伴い低下傾向を示した (図12-C)。

2. PG による重炭酸塩分泌の反応

PG 刺激によって、対照群では速やかに重炭酸塩分泌の上昇がみられた。しかしアンモニア投与群では対照群に比べて低反応であった (図13-A)。基礎総分泌量は各群間で差はなかったが (図13-B)、PG 刺激後の重炭酸塩総分泌量は対照群 ($36.5 \pm 2.8 \mu\text{Eq/2hr}$) に比べ 0.01% および 0.02% アンモニア投与群でそれぞれ $23.2 \pm 2.0 \mu\text{Eq/2hr}$, $22.1 \pm 1.6 \mu\text{Eq/2hr}$ と有意に低下していた ($p < 0.01$)。しかし、アンモニア濃度 0.01% と 0.02% の間に差は認めなかった (図13-C)。

3. 重炭酸塩分泌に対するアンモニア投与期間による検討

塩酸刺激において、1ヶ月目ですでに対照群に比べて低下傾

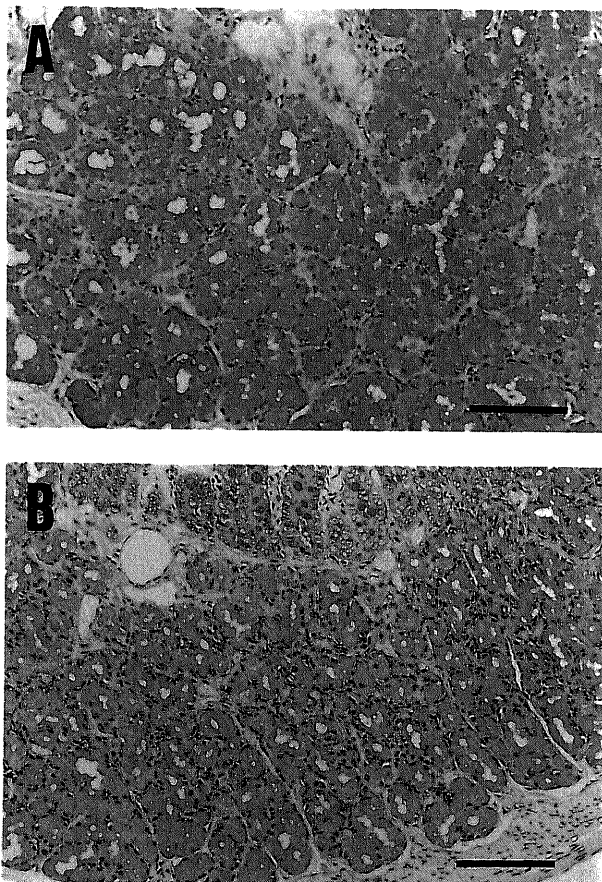


Fig. 8. Representative photomicrographs of Brunner's gland after three months of the administration of 0.02% ammonia. Image in (A) of the figure was taken from a control rat and the (B) was taken from a rat the administered 0.02% ammonia. Area of acinus in Brunner's gland treated with 0.02% ammonia is diminished compared to the control. Bar indicates $100 \mu\text{m}$.

向を示し、2ヶ月、3ヶ月目では、反応パターンに若干の違いは認めるものの、さらに低下した (図14-A)。各期間とも基礎総分泌量に有意差は無かったが ($2.2 \pm 0.6 \mu\text{Eq/2hr}$)、3ヶ月目で増加傾向が見られた (図14-B)。塩酸刺激後の総分泌量は対照群で

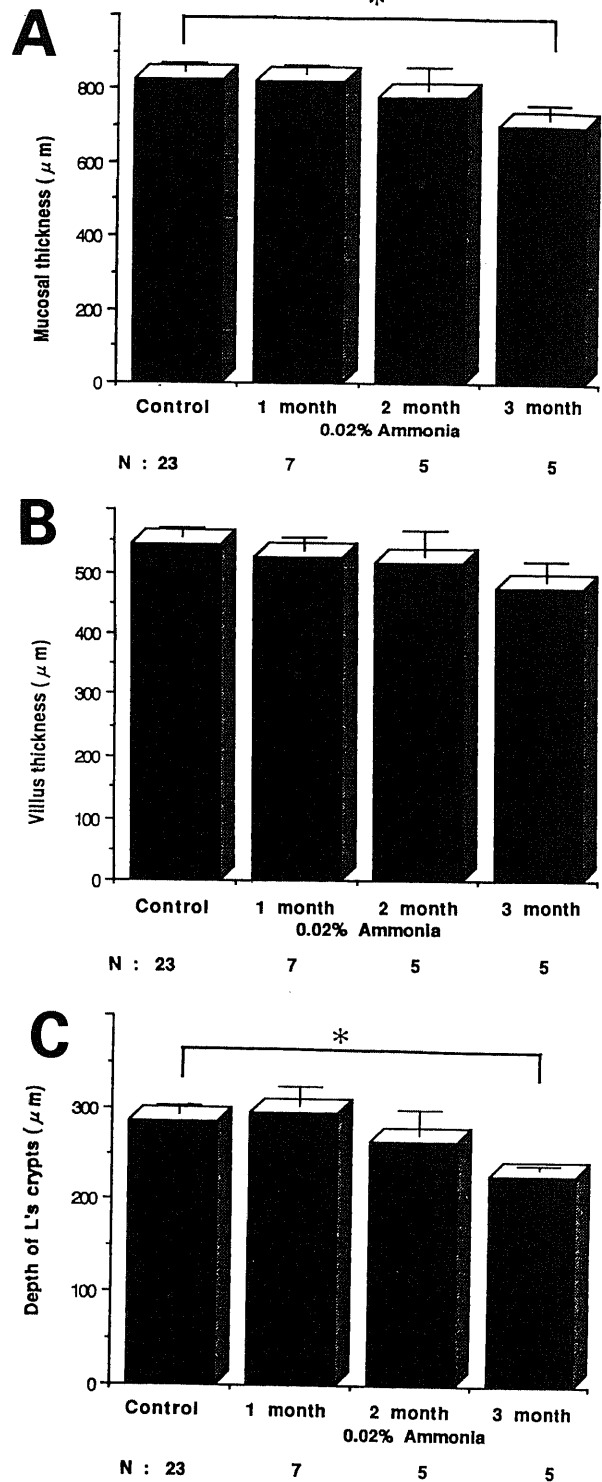


Fig. 9. A-C. Effect of 0.02% ammonia administration for three months on duodenal mucosa in rat. A: Changes in mucosal thickness. B: Changes in villus thickness. C: Changes in depth of Lieberkuehn's crypts. Data represents the mean \pm S.E.M.. * $p < 0.05$; significantly different from the control.

は各期間とも差はみられなかったが、アンモニア投与群では2ヶ月および3ヶ月目でそれぞれ $10.0 \pm 0.3 \mu\text{Eq}/2\text{hr}$, $10.5 \pm 1.5 \mu\text{Eq}/2\text{hr}$ と対照群 ($15.7 \pm 0.8 \mu\text{Eq}/2\text{hr}$) に比し有意に低下していた ($p < 0.01$) (図14-C)。

考 察

Hp の感染率は、健常人においては年齢と共に増加する傾向にあり、40歳を越えるとほぼ80%前後でプラトーに達することが知られている²⁵⁾。それに対して、消化性潰瘍患者における陽性率はどの年代でも90%を越えており、対照者に比べて明らかに高くなっている。なかでも十二指腸潰瘍のそれがとりわけ高く、ほぼ100%近いことが示めされている^{11)~14)}。十二指腸潰瘍は高率に再発を繰り返す慢性疾患であるが、Hpの除菌によって十二指腸潰瘍の再発は明らかに抑制され、消化性潰瘍の自然史を変える可能性も示唆されている^{26)~29)}。その粘膜障害機

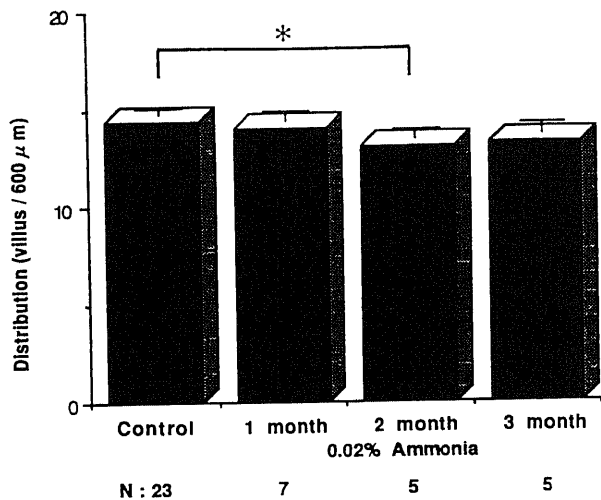


Fig. 10. Effect of 0.02% ammonia administration for three months on duodenal mucosa in rat. Changes in villus distributions. Data represents the mean \pm S.E.M.. * $p < 0.05$; significantly different from the control.

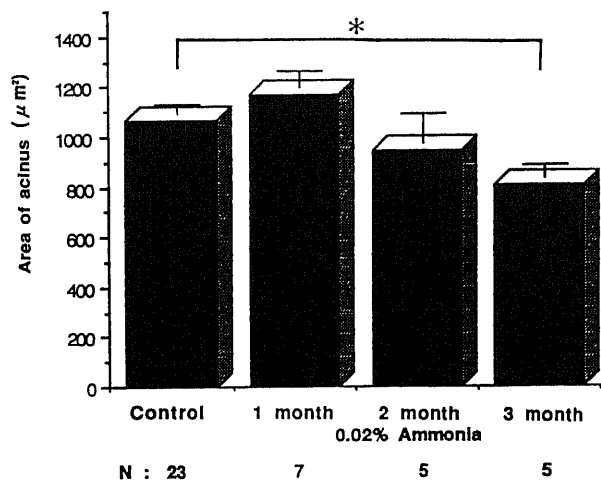


Fig. 11. Effect of 0.02% ammonia administration for three months on duodenal mucosa in rat. Changes in area of acinus in Brunner's gland. Data represent the mean \pm S.E.M.. * $p < 0.01$; significantly different from the control.

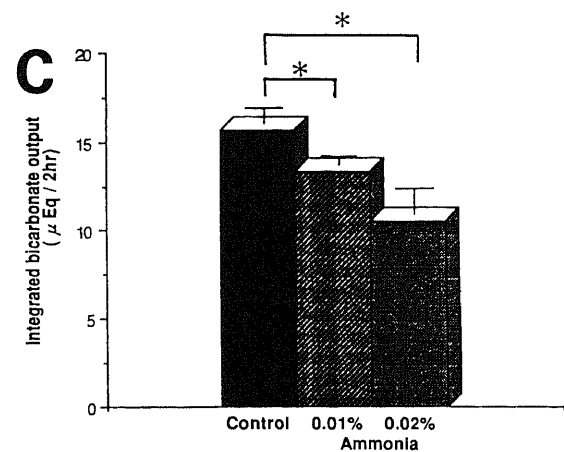
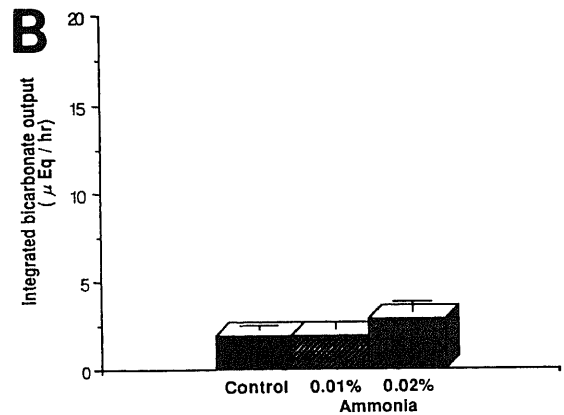
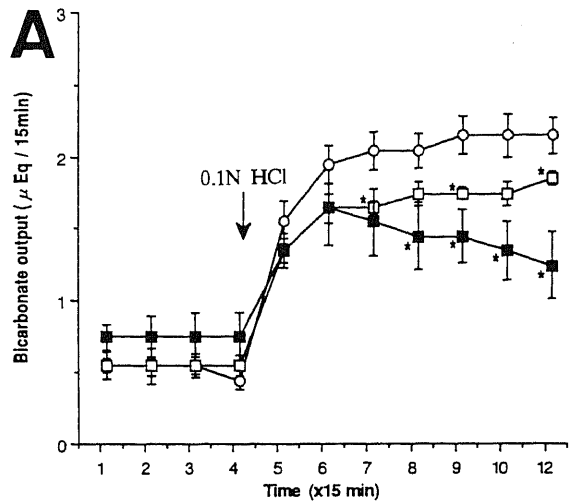


Fig. 12. A-C. A: Effect of luminal HCl on bicarbonate secretion from proximal duodenum in three groups (○, control; □, 0.01% ammonia for three months; ■, 0.02% ammonia for three months). The duodenal loop is perfused for 10 min with 100 mM HCl solution. Data are presented as the mean \pm S.E.M. of values read every 15 min. Number of rats of each group is six. * $p < 0.01$; significantly different from the control. B: Results in this figure are 1-hour integrated values on basal bicarbonate secretion and expressed as the mean \pm S.E.M.. C: Results in this figure are 2-hour integrated values on HCl-stimulated bicarbonate secretion and expressed as the mean \pm S.E.M.. * $p < 0.01$; significantly different from the control.

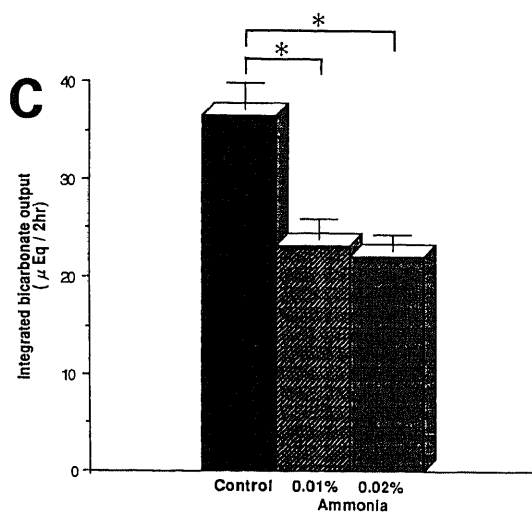
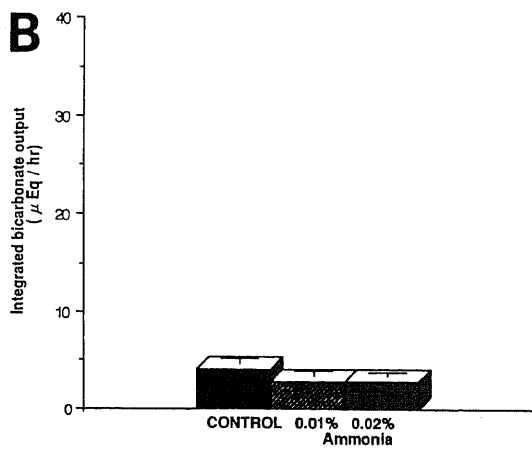
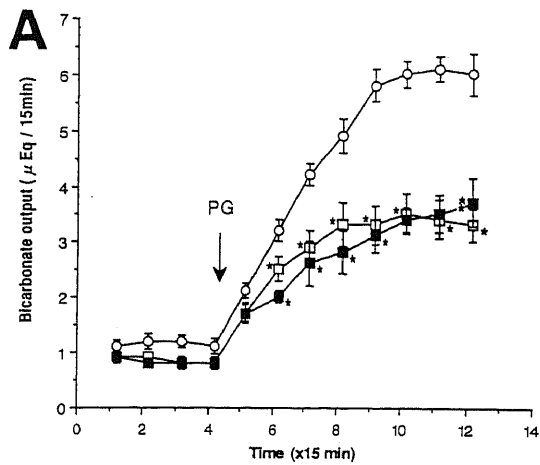


Fig. 13. A-C. A: Effect of 16, 16-Dimethyl-PGE₂ (10 μ g/Kg) given subcutaneously on bicarbonate secretion from proximal duodenum in three groups (○, control; □, 0.01 % ammonia for three months; ■, 0.02% ammonia for three months). Data are presented as the mean \pm S.E.M. of values read every 15 min. Number of rats of each group is six. *p<0.01; significantly different from the control. B: Results in this figure are 1-hour integrated values on basal bicarbonate secretion and expressed as the mean \pm S.E.M.. C: Results in this figure are 2-hour integrated values on 16, 16-Dimethyl-PGE₂-stimulated bicarbonate secretion and expressed as the mean \pm S.E.M.. *p<0.01; significantly different from the control.

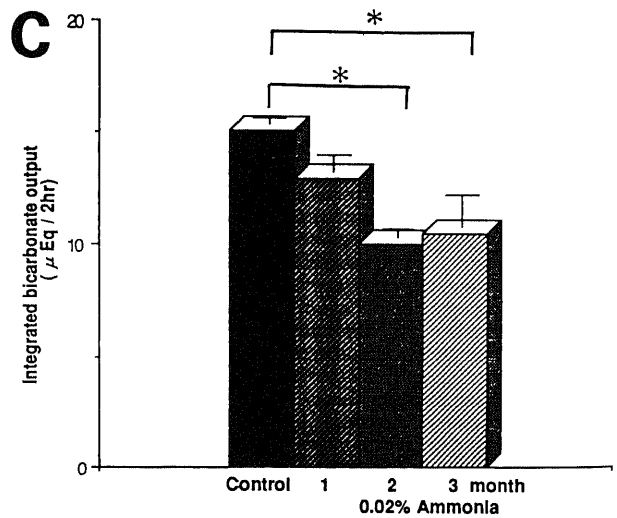
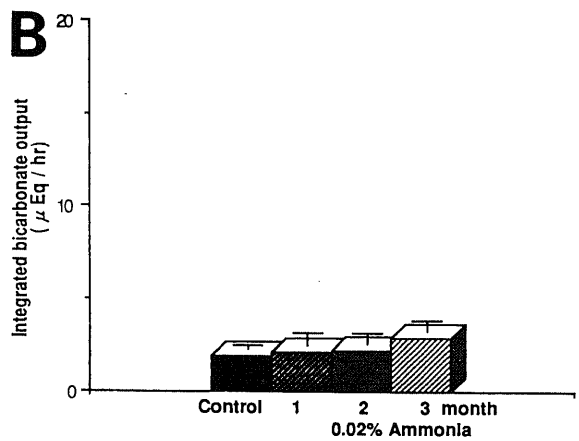
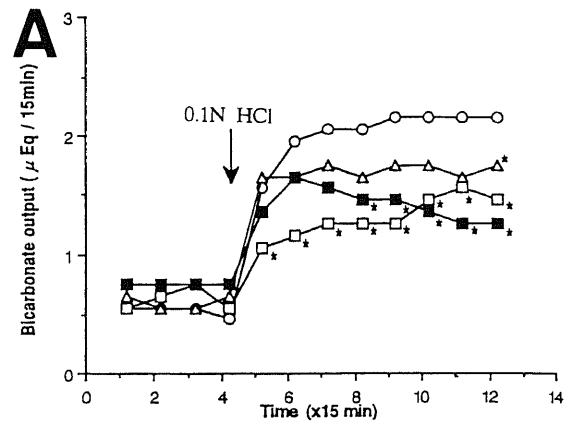


Fig. 14. A-C. A: Effect of luminal HCl on bicarbonate secretion from proximal duodenum in three groups (○, control; △, 0.02% ammonia for one month; □, 0.02% ammonia for two months; ■, 0.02% ammonia for three months). The duodenal loop is perfused for 10 min with 100 mM HCl solution. Data are presented as the mean of values read every 15 min. Number of rats of each group is six. *p<0.01; significantly different from the control. B: Results in this figure are 1-hour integrated values on basal bicarbonate secretion and expressed as the mean \pm S.E.M.. C: Results in this figure are 2-hour integrated values on HCl-stimulated bicarbonate secretion and expressed as the mean \pm S.E.M.. *p<0.01; significantly different from the control.

序の解明は十分とはいえないが、これまでの研究結果から、菌の保有する豊富なウレアーゼにより胃粘膜表層で産生される大量のアンモニア^{8)~11)}、さらに好中球が産生する HOCI と結合して生成されるモノクロラミン³⁰⁾³¹⁾、菌の保有するプロテアーゼ・フォスホリパーゼ A 等の酵素³²⁾³³⁾、サイトトキシンの産生³⁴⁾、細菌接着による粘液細胞機能の低下³⁵⁾、炎症細胞浸潤³⁶⁾³⁷⁾・免疫反応³⁸⁾などによって粘液層の破壊や細胞障害が引き起こされると推測されている。

Hp が粘膜に直接作用して十二指腸に障害を引き起こすのであれば十二指腸潰瘍近傍における菌の存在が前提条件となる。ところが Hp は胃粘膜に親和性が強く、正常な十二指腸粘膜や腸上皮化生部にはほとんど存在しない³⁹⁾⁴⁰⁾。しかし、十二指腸潰瘍患者の球部粘膜には、胃上皮化生が高率に存在することが示され¹⁶⁾¹⁹⁾、この組織学的変化は、高酸への暴露により障害された十二指腸粘膜の修復過程で生じることが動物実験で確認された⁴¹⁾⁴²⁾。Johnston ら⁴³⁾はこの様な胃上皮化生の存在部位に極めて高率に Hp が感染していることを証明した。さらに菌の存在に一致して、組織学的に強い炎症所見と粘液量の減少が認められることも明らかにされている¹⁹⁾。この様な事実から Goodwin は⁴⁴⁾ Hp の感染をうけた胃上皮化生部位の障害が十二指腸潰瘍の発生や再発の原因となっていると考えるリーキンググループ説を提唱した。

一方、Levi ら⁴⁵⁾はこれらの機序の説明として胃前庭部に感染した Hp によりアンモニアが産生され、局所の pH が上昇し、G細胞のネガティブフィードバックが欠如することによりガストリンが持続高値となり、酸分泌および胃排出能が亢進し潰瘍が発生するとされるガストリンリンク説を提唱した。

従来の報告では、この2つの概念により十二指腸潰瘍と Hp の関連が説明されていた。しかしリーキンググループ説に対しては、十二指腸潰瘍患者において、胃上皮化生を認めない症例もみられており¹⁹⁾、胃上皮化生への感染を前提とするリーキンググループ説のみでは Hp により十二指腸潰瘍の発生機序をすべて説明することはできない。また、ガストリンリンク説に対しては、Hp 陽性と陰性の間で血清ガストリンの基礎値に差はないとする報告⁴⁶⁾や、Hp 陽性者においては胃内のアンモニア濃度にかかわらず、血中ガストリンに差が無いとする報告があり^{47)~49)}、更に胃内 pH を下げると Hp 陽性者も陰性者と同じようにガストリン分泌が抑制されるといった報告など⁵⁰⁾、アンモニアが pH 環境を変えて高ガストリン血症をきたすことに対する否定的な報告が、近年多くなってきた。また、Hp 感染者における血中ガストリン濃度と胃酸分泌の変化が一致しない報告もあり^{51)~55)}、ガストリンリンク説に対して否定的な見解が多くなっている。それに加え、これまで十二指腸潰瘍の特徴的病態と考えられていた胃酸分泌能の亢進は患者の約 1/3 にしか認められず⁶⁾、ラットによる実験でも、胃酸分泌を亢進させただけでは十二指腸潰瘍は発生しないことが証明されている⁵⁶⁾。以上より、これまでの概念だけでは Hp による十二指腸潰瘍発生機序の解明は未だ不十分と言わざるをえない。

前述のごとく、十二指腸潰瘍患者では Hp 陽性率は健常群に比べて明らかに高く、Hp 陽性者の胃液内アンモニア濃度は 0.005~0.03% で陰性者に比べて有意に高い⁵⁷⁾。さらに培養細胞を用いた実験で、アンモニアにはそれ自身に細胞障害性を有することが認められている⁵⁸⁾。そこで、本研究では、Hp の産生するアンモニアが十二指腸粘膜の防御機構を低下させ、十二指腸

潰瘍の発生の一因になっているとの予想のもとに、Hp 陽性者の胃液内アンモニア濃度と同じ濃度のアンモニアをラットに長期投与して、アンモニアが実際に十二指腸潰瘍の発生に影響を及ぼすかどうかを検討した。

ラットに実験的十二指腸潰瘍を作る優れた方法として、塩酸システアミンの投与が用いられている⁵⁹⁾。塩酸システアミンの投与により近位十二指腸に穿孔性の円形潰瘍が誘発される。システアミン潰瘍の病態の特徴は、胃酸分泌能および胃排出能の亢進、ガストリンの高値、近位十二指腸粘膜のアルカリ分泌の減少、十二指腸粘膜ソマトスタチンの減少など、ヒトの十二指腸潰瘍と共通する点が多い⁵⁹⁾。塩酸システアミンの投与量は 300mg/Kg が70%のラットに穿孔性十二指腸潰瘍を作り得るとされている⁶⁰⁾。

本研究では、アンモニア投与のみでは十二指腸潰瘍は誘発されなかった。また、塩酸システアミン 200mg/Kg でも対照群ではまったく潰瘍はみられなかったが、アンモニア投与群では全例に潰瘍が認められた。組織学的にも、十二指腸にはブルネル腺という固有の粘液分泌腺がみられるが、対照群ではブルネル腺の内腔は PAS 陽性粘液が充満していたのに対し、アンモニア投与群ではブルネル腺内の粘液量は著名に減少し、腺の萎縮性変化と共に粘膜防御機転に関与する粘液産生の低下が考えられた。この結果より胃内のアンモニア濃度の上昇が十二指腸潰瘍発生の一因となり得ることが確認された。

また、アンモニアの胃粘膜におよぼす変化を検討した報告では⁶¹⁾⁶²⁾、ラットに 0.01% アンモニアを経口投与した場合、2週で胃幽門部粘液細胞内 PAS 陽性物質の減少がみられ、4週で幽門部粘膜の萎縮が出現する。また3ヶ月で胃体部の粘膜血流の減少と粘膜電位差の低下がみられ、6ヶ月で胃体部まで萎縮が広がることが確認されている。本研究においてもアンモニア投与により、投与3ヶ月で十二指腸粘膜の厚さの減少、絨毛密度の低下、絨毛の変形、粘膜下血管の拡張およびブルネル腺の腺房面積の減少など、十二指腸粘膜の萎縮性変化がみられた。

特に粘膜の厚さの減少は、増殖細胞やホルモン分泌細胞の存在するリーベルキューン陰窩の深さが減少したことが原因と考えられた。一方、Hp 陽性胃炎では胃粘膜の表層を被う被上皮細胞の細胞回転は亢進しているといわれている⁶³⁾。さらにアンモニアをラットに慢性投与すると、胃粘膜の萎縮の進展に従って上皮細胞の増殖と細胞回転が促進されることが知られている⁶⁴⁾。この現象は細胞障害性のため上皮細胞の脱落が亢進することによる二次的結果と考えられるが、このような細胞回転の亢進は細胞が十分成熟せず、粘液産生の減少など粘膜の脆弱化の一因となると考えられている。以上より、本研究によってアンモニア長期投与が胃粘膜のみならず十二指腸粘膜の増殖能にも影響を及ぼしている可能性が推測された。

アンモニア投与の重碳酸塩分泌に及ぼす影響では、塩酸刺激による重碳酸塩分泌反応は、アンモニア投与1ヶ月で減少しはじめ、2ヶ月以降で有意に低下し、さらにアンモニア濃度依存的に減少する傾向がみられた。また PG 刺激でも著明に重碳酸塩分泌は抑制された。以上によりアンモニア長期投与は近位十二指腸粘膜からの重碳酸塩分泌を障害し、粘膜防御機構を低下させることが明らかとなった。そして、これらの重碳酸塩分泌能の低下は組織の萎縮性変化に先行して認められた。

また、アンモニア長期投与のみでは十二指腸潰瘍はみられず、通常では障害を及ぼさない程度の塩酸システアミン負荷に

において、容易に潰瘍が認められた。このことは十二指腸がアンモニアに長期暴露されることにより粘膜の防御機構が低下し、そこに塩酸システアミンによって胃酸分泌の亢進などの要因が加わったためと考えられた。これまでの報告では、非ステロイド性抗炎症剤 (nonsteroidal anti-inflammatory drugs, NSAIDs) などによって引き起こされる十二指腸自体の酸中和能力の欠損は十二指腸病変を誘発せず、さらに酸分泌過多が加わることが病変発生の必要条件であることが示唆されているが⁵⁶⁾、本研究の結果も同様の機序によるものと推測された。

十二指腸潰瘍発生の重要な因子として、十二指腸粘膜の酸の除去能力が指摘されている^{20,21)}。十二指腸は消化管の中で極めて高い耐酸性を有するが、十二指腸潰瘍患者と健常者では胆汁および膵液中の重炭酸塩分泌量に差はなく、この能力のほとんどが十二指腸表皮から分泌される重炭酸塩の中和によっていることが証明されている⁶⁵⁾。さらに十二指腸潰瘍患者における、空腹時および酸による刺激後の重炭酸塩分泌についての検討では、遠位十二指腸では対照群と差はみられないが、十二指腸球部では空腹時および酸刺激後のいずれの重炭酸塩分泌も低下していることが明らかにされ、この分泌障害が十二指腸潰瘍発生機序の一部に重要な関わりを持つことが示唆されている^{20,21)}。また十二指腸潰瘍の発生が年齢とともに高くなる原因の一部には、重炭酸塩分泌の減少が関与することを示す成績も報告されている⁶⁶⁾。

重炭酸塩分泌には細胞膜を介する能動的分泌と細胞間隙を通過する受動的分泌があるが、膜を介する輸送形式については、Flemstrom ら⁶⁷⁾によって PGs で刺激される経路と、グルカゴンなどの消化管ホルモンで刺激される経路の2つの機序が提唱されている。また Simson らの報告によれば十二指腸の重炭酸塩分泌は Na-K-ATP 分解酵素活性に依存的な電気的メカニズムであるとされる⁶⁸⁻⁷⁰⁾。Na-K-ATP 分解酵素は主に細胞膜の基底膜側に存在し⁷¹⁾、細胞内外の Na, K 濃度勾配の維持や電解質の吸収、分泌に重要な役割をはたしている。そしてラットにおける近位十二指腸灌流実験において、Na-K-ATP 分解酵素活性阻害剤であるウアバインの投与は、十二指腸の重炭酸塩の基礎分泌には影響を及ぼさないが、酸刺激による重炭酸塩分泌反応を抑制する事が示されている⁷²⁾。このことより十二指腸の重炭酸塩の基礎分泌は Na-K-ATP 分解酵素活性に非依存的であると考えられる。本研究の結果、アンモニア投与群では、酸刺激および PG 刺激後の重炭酸塩分泌は抑制されたが、粘膜の萎縮がみられるにも関わらず重炭酸塩の基礎分泌が対照群と同程度か僅かに増加傾向を示す結果が得られた。十二指腸の重炭酸塩分泌機序の詳細は充分解明されていないが、アンモニアは重炭酸塩の基礎分泌に対しては影響せず、Na-K-ATP 分解酵素を介する機序を障害することによって酸および PG 刺激後の反応を抑制すると考えられた。

この重炭酸塩分泌に関与する機序は多因子的であり、塩酸、PG、血管作動性腸管ペプチド (vasoactive intestinal polypeptide, VIP) により促進され、NSAIDs、抗コリン剤、ウアバインにより抑制されることが知られている⁷³⁾。そして、この中で E 群の PG が十二指腸重炭酸塩分泌の最も有効な作動物質とされている⁷⁴⁾。ラット等の様々な種において、十二指腸の酸性化は内因性 PG-E の放出を増加させ⁷⁵⁾、また NSAIDs の存在下では酸による重炭酸塩分泌の増加は消失することが示されている⁶⁶⁾。そのため酸による重炭酸塩分泌は内因性 PGs の局所産生を介

して起こると考えられている⁷⁶⁾。酸による十二指腸重炭酸塩分泌のメカニズムの欠如が十二指腸潰瘍の病因に関係があるとすれば、酸の分泌過多に加えて内因性 PGs の欠如は十二指腸潰瘍の発生を促す事になる。一方、PGs と Hp 感染に関しての報告では、Hp に感染した胃粘膜の PGs 含量は低下傾向にあるものの有意差はなく⁷⁷⁾、また PG の産生に対しても、Hp は影響を及ぼさないとされている⁷⁸⁾。本研究によって、アンモニア投与群では塩酸刺激のみならず PG 刺激においても重炭酸塩分泌反応が抑制される結果が得られた。以上より、アンモニアによる重炭酸塩分泌障害の機序は、NSAIDs がアラキドン酸から PG を生成するシクロオキシゲナーゼ経路を阻害するのに対して⁷⁹⁾、アンモニアは PG 合成経路を阻害するのではなく、PG 受容体以降の反応を阻害していると推測された。

以上の結果より胃酸分泌能の亢進している患者に Hp が感染した場合は、容易に十二指腸潰瘍の再発を繰り返すことが考えられる。これまで治療に関しては、酸分泌抑制剤が用いられ効果を上げているが、高率に再発を認めるのも事実である。アンモニアは胃内の塩酸と反応して塩化アンモニウムに変化し、塩化アンモニウムは粘膜障害性が低いことが知られている⁸⁰⁾。治療により酸分泌は減少し潰瘍は治るが、逆にアンモニアから塩化アンモニウムへの反応が低下し、十二指腸に達するアンモニアが増加する。そのため粘膜障害性は逆に高くなっていると考えられる。このような場合、酸分泌抑制剤は注意深く投与すべきで、さらに Hp の除菌を考慮すべきと考えられる。

結 論

Hp の産生するアンモニアが実際に十二指腸潰瘍の原因となり得るか。またアンモニアが十二指腸粘膜や重炭酸塩分泌にどのような影響を与えるかをラットを用いて経時的に観察し以下の結果を得た。

1. アンモニア投与のみでは十二指腸潰瘍は誘発されなかった。
2. 塩酸システアミン 200mg/Kg 投与にて対照群ではまったく潰瘍はみられなかったが、アンモニア投与群では全例に潰瘍が認められた。
3. アンモニア投与群では十二指腸粘膜に萎縮性変化が認められた。特に増殖細胞やホルモン分泌細胞の存在するリーベルキューン陰窩への影響が認められた。
4. 近位十二指腸粘膜における重炭酸塩分泌は、アンモニア投与群において、基礎分泌には影響を及ぼさなかったが、塩酸刺激および PG 刺激による反応が著明に抑制された。そしてこの重炭酸塩分泌の低下は組織の萎縮性変化に先行して認められた。

以上より、Hp 感染により、持続的に胃内アンモニア濃度が上昇することは、十二指腸潰瘍発生の重要な一因となり得ると考えられた。

謝 辞

稿を終えるに臨み、御指導と御校閲を賜りました恩師竹田亮祐教授に深甚なる謝意を表します。また、本研究の遂行にあたり直接御指導と御助言を頂きました第二内科竹田康男助手、増永高晴助手に深謝の意を表します。さらに、終始御協力と御援助を頂きました金沢大学医学部第二内科第五研究室の諸先生に深謝致します。最後に重炭酸分泌について貴重な御助言を頂きました京都薬科大学応用薬理学教室岡部進教授および竹内孝治博士に厚く御礼申し上げます。

文 献

- 1) Baron, J. H.: The clinical application of gastric secretion measurements. *Clin. Gastroenterol.*, 2, 293-314 (1973).
- 2) Cox, A. J.: Stomach size and its relation to chronic peptic ulcer. *Arch. Pathol.*, 54, 407-422 (1952).
- 3) Isenberg, J. I., Grossman, M. I., Maxwell, V. & Walsh, J. H.: Increased sensitivity to stimulation of acid secretion by pentagastrin in duodenal ulcer. *J. Clin. Invest.*, 55, 330-337 (1975).
- 4) Hirschowitz, B. I.: Apparent and intrinsic sensitivity to pentagastrin of acid and pepsin secretion in peptic ulcer. *Gastroenterology*, 86, 843-851 (1984).
- 5) 井上正規, 山下善寛, 末永敏彰, 峠千衣, 梶山梧朗, 横矢仁: Pentagastrin 漸増投与法による十二指腸潰瘍患者の胃酸分泌の評価. *日消誌.*, 88, 2733-2740 (1991).
- 6) Soll, A. H.: Duodenal ulcer and drug therapy. In M. H. Sleisenger & J. S. Fordtran (eds.), *Gastrointestinal Disease: Pathophysiology, Diagnosis, and Management*, 4rd ed., p814-879, WB Saunders, Philadelphia, 1989.
- 7) Warren, J. R. & Marshall, B. J.: Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis. *Lancet*, 1, 1273-1275 (1983).
- 8) Hazell, S. L. & Lee, A.: *Campylobacter pyloridis*, urease, hydrogen ion back diffusion, and gastric ulcers. *Lancet*, 2, 15-17 (1986).
- 9) Thomsen, L., Tasman-Jones, C. & Morris, A.: Ammonia produced by *campylobacter pylori* neutralizes H⁺ moving through gastric mucus. *Scand. J. Gastroenterol.*, 24, 761-768 (1989).
- 10) 河内山高史: *Campylobacter pylori* の胃疾患における臨床的検討. *Gastroenterol Endosc.*, 31, 3-31 (1989).
- 11) Langenberg, M. L., Tytgat, G. N. J. & Schipper, M. E. I.: *Campylobacter*-like organisms in the stomach of patients and healthy individuals. *Lancet*, 1, 1384 (1984).
- 12) Marshall, B. J. & Warren, J. R.: Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. *Lancet*, 1, 1311-1315 (1984).
- 13) McNulty, C. A. M. & Watson, D. M.: Spiral bacteria of the gastric antrum. *Lancet*, 1, 1068-1069 (1984).
- 14) Shirai, T., Harasawa, S. & Miwa, T.: the detection of *campylobacter pylori* (Cp) in gastro-duodenal disease. The efficacy of the rapid urease (RU) test and relationship between endoscopic findings, histological gastritis and presense of Cp. *Dig. Endosc.*, 2, 13-18 (1990).
- 15) Nicholson, G. W.: Heteromorphoses (metaplasia) of the alimentary tract. *J. Path. Bact.*, 26, 399-417 (1923).
- 16) 浦上慶仁: 十二指腸粘膜における胃上皮化生の内視鏡的, 病理学的研究. *日消誌.*, 72, 221-231 (1975).
- 17) Taylor, A. L.: The epithelial heterotopias of the alimentary tract. *J. Path. Bact.*, 30, 415-449 (1927).
- 18) James, A. H.: Gastric epithelium in the duodenum. *Gut*, 5, 258-294 (1964).
- 19) 白石孝之: 十二指腸潰瘍における胃上皮化生と *Helicobacter pylori* の意義. *Gastroenterol Endosc.*, 33, 2177-2182 (1991).
- 20) Isenberg, J. I., Hogan, D. L., Koss, M. A. & Selling, J. A.: Human duodenal mucosal bicarbonate secretion: evidence for basal secretion and stimulation by hydrochloric acid and asynthetic prostaglandin E₁ analogue. *Gastroenterology*, 91, 370-378 (1986).
- 21) Isenberg, J. I., Selling, J. A., Hogan, D. L. & Koss, M. A.: Impaired proximal duodenal mucosal bicarbonate secretion in patients with duodenal ulcer. *N. Engl. J. Med.*, 316, 374-379 (1987).
- 22) Kirkgaard, H., Poulsen, S. S., Loud, F. B., Halse, C. & Christiansen, J.: Cysteamine-induced duodenal ulcer and acid secretion in the rat. *Scand. J. Gastroenterol.*, 15, 621-624 (1980).
- 23) 大江慶治, 三浦良史, 八木田真光, 永松悠二, 田岡賢雄: Cysteamine による十二指腸粘膜重碳酸塩分泌障害に及ぼす secretin の影響. *日消誌.*, 83, 635-644 (1986).
- 24) Takeuchi, K., Tanaka, H., Furukawa, O. & Okabe, S.: Gastroduodenal HCO₃⁻ secretion in anesthetized rats: effects of 16, 16-dimethyl PGE₂, typical acid and acetazolamide. *Jpn. J. Pharmacol.*, 41, 87-99 (1986).
- 25) Asaka, M., Kimura, T., Kudo, M., Takeda, H., Mitani, S., Miyazaki, T., Miki, K. & Graham, D. J.: Relationship of *Helicobacter pylori* to serum pepsinogens in an asymptomatic Japanese population. *Gastroenterology*, 102, 760-766 (1992).
- 26) Marshall, B. J., Goodwin, C. S., Warren, J. R., Murray, R., Blincow, E. D. & Blackbourn, S. J.: Prospective double-blind trial of duodenal ulcer relapse after eradication of *Campylobacter pylori*. *Lancet*, 2, 1437-1442 (1988).
- 27) Rauws, E. A. & Tytgat, G. N.: Cure of duodenal ulcer associated with eradication of *Helicobacter pylori*. *Lancet*, 335, 1233-1235 (1990).
- 28) George, L. L., Borody, T. J., Andrews, P., Devine, M., Moore-Jones, D., Walton, M. & Brandl, S.: Cure of duodenal ulcer after eradication of *Helicobacter pylori*. *Med. J. Aust.*, 153, 145-149 (1990).
- 29) Graham, D. Y., Lew, G. M., Klein, P. D., Evans, D. G., Evans, Jr. D. J., Saeed, Z. A. & Malaty, H. M.: Effect of treatment of *Helicobacter pylori* infection on the long-term recurrence of gastric or duodenal ulcer. *Ann. Intern. Med.*, 116, 705-708 (1992).
- 30) Grisham, M. B., Jefferson, M. M., Melton, D. F. & Thomas, E. L.: Chlorination of endogenous amines by isolated neutrophils: ammonia-dependent bactericidal, cytotoxic, and cytolytic activities of the chloramines. *J. Biol. Chem.*, 259, 10404-10413 (1984).
- 31) Wallace, J. L.: Possible mechanisms and mediators of gastritis associated with *Helicobacter pylori* infection. *Scand. J. Gastroenterol.*, 26 (suppl. 187), 65-70 (1991).
- 32) Slomiany, B. L., Bilski, J., Sarosiek, J., Murty, V.

- L. N., Dworkin, B. & Vanhorn, K.: *Campylobacter pylori* degrades mucin and undermines gastric mucosal integrity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **144**, 307-314 (1987).
- 33) Sarosiek, J., Bilski, J., Murty, V. L. N., Slomiany, A. & Slomiany, B. L.: Colloidal bismuth subcitrate (De-Nol) inhibits degradation of gastric mucus by *Campylobacter pylori* protease. *Am. J. Gastroenterol.*, **84**, 506-510 (1989).
- 34) Leunk, R. D., Johnson, P. T., David, B. C., Kraft, W. G. & Morgan, D. R.: Cytotoxic activity in broth-culture filtrates of *Campylobacter pylori*. *J. Med. Microbiol.*, **26**, 93-99 (1988).
- 35) Blaser, M. J.: Hypothesis on the pathogenesis and natural history of *Helicobacter pylori*-induced inflammation. *Gastroenterology*, **102**, 720-727 (1992).
- 36) Syzuki, M., Miura, S., Suematsu, M., Fukumura, D., Kurose, I. & Suzuki, H.: *Helicobacter pylori*-associated ammonia production enhances neutrophil-dependent gastric mucosal cell injury. *Am. J. Physiol.*, **263**, G719-G725 (1992).
- 37) Nash, S., Stafford, J. & Madara, J. L.: Effects of polymorphonuclear leukocyte transmigration on the barrier function of cultured intestinal epithelial monolayers. *J. Clin. Invest.*, **80**, 1104-1113 (1987).
- 38) Sugiyama, T., Furuyama, S., Awakawa, T., Kobayashi, T., Yabana, T., & Yachi, A.: Local immune response in gastric mucosa to *Helicobacter pylori* infection with and without intestinal metaplasia. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.*, **5** (suppl. 1), S119-S122 (1993).
- 39) Steer, H. W.: Surface morphology of the gastroduodenal mucosa in duodenal ulceration. *Gut*, **1984**, **25**, 1203-1210 (1984).
- 40) Phillips, A. D., Hine, K. R., Holmes, G. K. T. & Woodings, D. F.: Gastric spiral bacteria. *Lancet*, **2**, 100-101 (1984).
- 41) Gregory, M. A., Moshal, M. G. & Spitaes, M. J.: Changes in the morphology of villar epithelial cells adjacent to duodenal ulcers during the process of healing. *Scand. J. Gastroenterol.*, **17**, 441-448 (1982).
- 42) Tatsuta, M., Iishi, H., Yamamura, H., Yamamoto, R. & Taniguchi, H.: Enhancement by tetragastrin of experimental induction of gastric epithelium in the duodenum. *Gut*, **30**, 311-315 (1989).
- 43) Johnston, B. J., Reed, P. I. & Ali, M. H.: *Campylobacter* like organism in duodenal and antral endoscopic biopsies. relationship to inflammation. *Gut*, **27**, 1132-1137 (1986).
- 44) Goodwin, C. S.: Duodenal ulcer, *Campylobacter pylori*, and the "leaking roof" concept. *Lancet*, **2**, 1467-1469 (1988).
- 45) Levi, S., Beardshall, K., Haddad, G., Playford, R., Ghosh, P. & Calam, J.: *Campylobacter pylori* and duodenal ulcers: The gastrin link. *Lancet*, **1**, 1167-1168 (1989).
- 46) Graham, D. Y. & Klein, P. D.: *Campylobacter pyloridis* gastritis: The Past, the present, and speculations about the future. *Am. J. Gastroenterol.*, **82**, 283-286 (1987).
- 47) Chittauallu, R. S., Neithercut, W. D., MacDonald, A. M. I. & McColl, K. E. L.: Effect of increasing *Helicobacter pylori* ammonia production by urea infusion on plasma gastrin concentrations. *Gut*, **32**, 21-24 (1990).
- 48) Graham, D. Y., Opekun, A., Lew, G. I., Klein, P. D. & Walsh, J. H.: *Helicobacter pylori*-associated exaggerated gastrin release in duodenal ulcer patients: The effect of bombesin infusion and urea ingestion. *Gastroenterology*, **100**, 1571-1575 (1991).
- 49) Nujumi, A. M. El, Dorrian, C. A., Chittajallu, R. S., Neithercut, W. D. & McColl, K. E. L.: Effect of inhibition of *Helicobacter pylori* urease activity by acetohydroxamic acid on serum gastrin in duodenal ulcer subjects. *Gut*, **32**, 866-870 (1991).
- 50) Karnes, W. E., Ohning, G. V., Sytnik, B., Kim, S. W. & Walsh, J. H.: Elevation of meal-stimulated gastrin release in subjects with *Helicobacter pylori* infection: Reversal by low intragastric pH. *Rev. Infect. Dis.*, **13** (suppl. 8), S665-S670 (1991).
- 51) MacColl, K. E. L., Fullarton, G. M., Nujumi, A. M. El, MacDonald, A. M., Brown, I. L. & Hilditch, T. E.: Lowered gastrin and gastric acidity after eradication of *Campylobacter pylori* in duodenal ulcer. *Lancet*, **2**, 499-500 (1989).
- 52) Levi, S., Beardshall, K., Swift, I., Foulkes, W., Playford, R., Ghosh, P. & Calam, J.: Antral *Helicobacter pylori* hypergastrinaemia and duodenal ulcer: effect of eradicating the organism. *Br. Med. J.*, **299**, 1504-1505 (1989).
- 53) Graham, D. Y., Opekun, A., Lew, G. M., Evans, D. J., Klein, P. D. & Evans, D. G.: Ablation of exaggerated meal-stimulated gastrin release in duodenal ulcer patients after clearance of *Helicobacter (Campylobacter) pylori* infection. *Am. J. Gastroenterol.*, **85**, 394-398 (1990).
- 54) Smith, J. T. L., Pounder, R. E., Nwokolo, C. U., Lanzon-Miller, S., Evans, D. G., Graham, D. J. & Evans, D. J.: Inappropriate hypergastrinaemia in asymptomatic healthy subjects infected with *Helicobacter pylori*. *Gut*, **31**, 522-525 (1990).
- 55) Goldschmiedt, M., Barnett, C. C., Schwarz, B. E., Karnes, W. E., Redfern, J. S. & Feldman, M.: Effect of age on gastric acid secretion and serum gastrin concentrations in healthy men and women. *Gastroenterology*, **101**, 977-990 (1991).
- 56) Takeuchi, K., Furukawa, O., Tanaka, H. & Okabe, S.: A new model of duodenal ulcers induced in rats by indomethacin plus histamine. *Gastroenterology*, **90**, 636-645 (1986).
- 57) Kochiyama, T.: Clinical study of *Campylobacter pylori* in stomach disease. *Gastroenterol. Endosc.*, **31**, 3-13 (1989).
- 58) Barer, M. R., Elliott, T. S., Berkeiey, D., Thomas,

- J. E. & Eastham, E. J.: Cytopathic effects of *Campylobacter pylori* urease. *J. Clin. Pathol.*, **41**, 597 (1988).
- 59) Szabo, S.: Biology of disease, Pathogenesis of duodenal ulcer disease. *Lab. Invest.* **51**, 121-147 (1984).
- 60) Ohe, K., Okada, Y., Sanuki, Y., Fujiwara, T., Fukushima, T., Inoue, M. & Miyoshi, A.: Cysteamine-induced inhibition of acid neutralization and the increase in hydrogen ion back-diffusion in duodenal mucosa. *Digest. Dis. Sci.*, **27**, 250-256 (1982).
- 61) Kawano, S., Tujii, M., Fusamoto, H., Sato, N. & Kamada, T.: Chronic effect of intragastric ammonia on gastric mucosal structures in rats. *Dig. Dis. Sci.*, **36**, 33-38 (1991).
- 62) Hirota, K., Tada, M., Shigeeda, M., Yanai, H., Karita, M., Murakami, A., Kochiyama, T., Zhu, X. L., Okazaki, Y. & Takemoto, T.: The effect of administration of ammonia in long term to gastric mucosa in rat. *Campylobacter pylori* and Gastroduodenal diseases, **2**, 136-143 (1989).
- 63) Tsujii, M., Kawano, S., Ito, T., Sasaki, Y., Tsuji, S., Nagano, K., Oshita, M., Masunaga, T., Hayashi, N., Fusamoto, H. & Kamada, T.: Ammonia increases cell proliferation with Progress of atrophic change in rat gastric mucosa. *Gastroenterology*, **100**, A177 (1991).
- 64) Tsujii, M., Kawano, S., Tuji, S., Ito, T., Nagano, K., Sasaki, Y., Hayashi, N., Fusamoto, H. & Kamada, T.: Cell kinetics of mucosal atrophy in rat stomach induced by long-term administration of ammonia. *Gastroenterology*, **104**, 796-801 (1993).
- 65) Isenberg, J. I., Gano, R. & Bloom, S. R.: Effect of graded amounts of acid instilled into the duodenum on pancreatic bicarbonate secretion and plasma secretin in duodenal ulcer patients and normal subjects. *Gastroenterology*, **72**, 6-8 (1977).
- 66) Kim, S. W., Parekh, D., Townsend, C. M. & Thompson, J. C.: Effects of aging on duodenal bicarbonate secretion. *Ann. Surg.*, **212**, 332-338 (1990).
- 67) Flemstrom, G. & Garner, A.: Gastric duodenal HCO₃⁻ transport; characteristics and proposed role in acidity regulation and mucosal protection. *Am. J. Physiol.*, **242**, G182-G193 (1982).
- 68) Simson, J. N. L., Merhav, A. & Silen, W.: Alkaline secretion by amphibian duodenum. I. General characteristics. *Am. J. Physiol.*, **240**, G401-408 (1981).
- 69) Simson, J. N. L., Merhav, A. & Silen, W.: Alkaline secretion by amphibian duodenum. II. Short-circuit current and Na⁺ and Cl⁻ fluxes. *Am. J. Physiol.*, **240**, G472-479 (1981).
- 70) Simson, J. N. L., Merhav, A. & Silen, W.: Alkaline secretion by amphibian duodenum. III. Effects of DBcAMP, theophylline, and prostaglandins. *Am. J. Physiol.*, **241**, G528-536 (1981).
- 71) Hoyumpa, A. M., Nichols, S. G., Wilson, F. A. & Schenker, S.: Effect of ethanol on intestinal (Na, K) ATPase and intestinal thiamine transport in rats. *J. Lab. Med.*, **90**, 1086-1095 (1977).
- 72) Furukawa, O., Nishiwaki, H., Takeuchi, K. & Okabe, S.: Effect of prostaglandin biosynthesis inhibitors and ouabain on duodenal mucosa and HCO₃⁻ secretion in rats. *Japan. J. Pharmacol.*, **43**, 449-453 (1987).
- 73) Isenberg, J. I. & Hogan, D. H.: Human duodenal mucosal bicarbonate secretion-physiological and clinical aspects. *J. Int. Med.*, **228** (suppl. 1), 113-117 (1990).
- 74) Konturek, S. J., Tasler, J., Bilski, J. & Kania, J.: Prostaglandins and alkaline secretion from oxyntic, antral, and duodenal mucosa of the dog. *Am. J. Physiol.*, **245**, G539-G546 (1983).
- 75) Aly, A., Selling, J. A., Hogan, D. L., Isenberg, J. I., Koss, M. A. & Johansson, C.: Gastric and duodenal prostaglandin E₂ (PGE₂) in humans: effect of luminal acidification (H⁺) and indomethacin (I). *Gastroenterology*, **88**, 1305 (1985).
- 76) Isenberg, J. I., Smedfors, B. & Johansson, C.: Effect of graded doses of intraluminal H⁺, prostaglandin E₂ and inhibition of endogenous prostaglandin synthesis on proximal duodenal bicarbonate secretion in unanesthetized rat. *Gastroenterology*, **88**, 303-307 (1985).
- 77) Treiber, G.: *Campylobacter pylori* and acid secretion. *Lancet*, **2**, 212-213 (1989).
- 78) Preclik, G., Abedin, G. & Stange, E. F.: Gastritis, *Campylobacter*, and endogenous prostaglandin synthesis. *Klin. Wochenschr* (suppl. 18), 54-55 (1989).
- 79) Whittle, B. J. R., Higgs, G. A., Eakins, K. E., Moncada, S. & Vane, J. R.: Selective inhibition of prostaglandin production in inflammatory exudates and gastric mucosa. *Nature*, **284**, 271-273 (1980).
- 80) Tsujii, M., Kawano, S., Tsuji, S., Fusamoto, H., Kamada, T. & Sato, N.: Mechanism of gastric mucosal damage induced by ammonia. *Gastroenterology*, **102**, 1881-1888 (1992).

The Effect of Long Term Administration of Ammonia to Duodenal Mucosa Katsuyuki Koichi, Department of Internal Medicine (II), School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920—J. Juzen Med Soc., **102**, 796—808 (1993)

Key words *Helicobacter pylori*, ammonia, mucosal atrophy, duodenal ulcer, bicarbonate secretion

Abstract

Helicobacter pylori (Hp) has been reported to be associated with the genesis of the duodenal ulcer, since Hp produces abundant amounts of ammonia. To clarify the role of Hp in the etiology of the duodenal ulcer, the effect of ammonia on the duodenal mucosal structure and bicarbonate secretion was assessed in rats. Cysteamine (200 mg/Kg s.c.) did not induce duodenal ulcers in the control group but in the ammonia administered group it did without exception. Histologically, a decrease of the mucous production of Brunner's glands in the intact mucosa was observed in the latter group. Long term administration of ammonia at 0.02% caused no histological change until 2 months later. However, atrophic change of the duodenal mucosa was observed 3 months later. The examination of duodenal bicarbonate secretion, the administration of ammonia at 0.01% and 0.02% for 3 months significantly reduced the adaptive increase in bicarbonate secretion caused by acid in the duodenum or prostaglandin given subcutaneously. It was indicated that acid-stimulated bicarbonate secretion reduced in a dose- and time-dependent manner with ammonia administration. Thus, long term administration of ammonia in rats led to changes in duodenal mucosal structures and function. These results suggest that a chronically high concentration of the intragastric ammonia produced by Hp induces mucosal atrophy and damage to the bicarbonate secretion of the duodenum, and, at least in part, plays an etiologic role in duodenal ulcer.