Acid Secretion and Histamine Release from Totally Isolated, Vascularly Perfused Rat Stomach System

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/2297/8448

単離灌流ラット胃システムを用いた 胃酸分泌に関する実験的研究

金沢大学医学部外科学第二講座(主任:宮崎逸夫教授) 岩 佐 和 典

本研究では,これまでペンタガストリンおよびヒスタミンの単独刺激に対して,胃酸分泌量が不安定であった単離灌流 ラット胃システムを改良し,この改良システムを用いて,ペンタガストリンおよびヒスタミン刺激による胃酸分泌量,腸クロ ム親和性様細胞 (enterochromaffin-like cell, ECL) より放出された門脈血中のヒスタミン量,およびホスホジエステラーゼ (phosphodiesterase) の阻害剤イソブチルメチルキサンチン (isobutyl methylxanthine, IBMX)により上昇する cAMP 量とペン タガストリンとの関係について検討した. 本研究では,血管床灌流液の Ca²-濃度を 1.12mM に調整し,コロイドとして Ca²+ 結合能を持たないデキストラン T70 (dextran T70) を用いた. この結果, ペンタガストリンあるいはヒスタミン単独刺激 に対して, 胃酸分泌量は用量依存性に増加した. 0.52nM のペンタガストリン刺激では, 単独投与の場合と 50μM の IBMX を 併用した場合では,胃酸分泌量はそれぞれ 8.0 ± 1.8 , $74.2\pm2.0\mu mol/hr$ であり, 9倍に増加した.また $50\mu M$ のヒスタミン刺 激では,単独投与の場合と $50\mu\mathrm{M}$ の IBMX を併用した場合では,胃酸分泌量はそれぞれ 18.4 ± 3.8 , $13.4\times10^{1}\pm9.5\mu\mathrm{mol/hr}$ で あり、8倍に増加した. 5.2nM のペンタガストリンと 500μM のヒスタミンを,同時に投与して刺激を加えた場合の胃酸分泌 量は $20.9\pm8.8\mu\mathrm{mol/hr}$ であり, $500\mu\mathrm{M}$ のヒスタミン単独投与の場合の胃酸分泌量 $24.8\pm6.3\mu\mathrm{mol/hr}$ と同等であった.また 0.52nM のペンタガストリン刺激により ECL 細胞から門脈中に放出されたヒスタミン量は、ペンタガストリン単独投与の場合 46.6 ± 5.1 nmol/hr であり, $50\mu\mathrm{M}$ の IBMX を併用した場合の 47.9 ± 6.9 nmol/hr と同等であった.以上のごとく本研究では, ペンタガストリンおよびヒスタミンの単独刺激に対し、安定して胃酸分泌を起こす単離灌流ラット胃システムを確立できた。 このシステムにおいて、IBMX はペンタガストリン刺激による ECL 細胞からのヒスタミン分泌には影響を与えず、ペンタガ ストリン自身にもホスホジエステラーゼ阻害作用はないことが明らかになった.本システムは,ペンタガストリンやヒスタミ ンなどの消化管ペプチド研究な有用な,胃酸分泌を行うモデルとして確立された.またこれらの結果より,ペンタガストリン による胃酸分泌のメディエーターがヒスタミンであることが示唆された.

Key words 胃酸分泌, 単離灌流ラット胃システム, ペンタガストリン, ヒスタミン, ホスホジエステラーゼ

ガストリンは Edkins"によって命名された胃前庭部からの胃酸分泌刺激物質であり,食物の胃内貯留により,その分泌が促進されることが明らかになっている 240 . またヒスタミンも強力な胃酸分泌刺激物質であり。,胃壁細胞上のヒスタミン受容体がヒスタミン-2 (H_2) 亜型であることが解明されて以来 51 , その受容体阻害剤の開発により,消化性潰瘍の治療は飛躍的に変化した.さらにガストリンの胃酸分泌作用はヒスタミンを介するとする考えが有力である 51 . またヒスタミン含有細胞について,従来は肥満細胞であると考えられてきたが,ラットでは腸クロム親和性様細胞 (enterochromaffin-like cell, ECL) であるとれている $^{7-10}$. また種々の生物において,ECL 細胞がヒスタミンを合成することが明らかになっており 11112 , ヒトにおいても ECL 細胞がヒスタミンを介して胃酸分泌機構に重要な機能を果たしていると考えられている 1112 .

これまで胃酸分泌機構の解明のために,単離胃腺⁽³⁾や単離壁 細胞⁽⁴⁾⁽⁵⁾を用いた胃酸分泌モデルや,単離灌流胃システムが試 スられてきたが^{16~18)}、いずれのシステムにおいても分泌される 胃酸はわずかであり,胃酸分泌量について検討することは不可能であった.しかしホスホジエステラーゼ (phosphodiesterase) の阻害剤であるイソブチルメチルキサンチン (isobutyl methylxanthine, IBMX) をもちいることによって,胃酸分泌刺激に対する感受性は亢進し^{19/20)},ヒツジ赤血球を用いた単離灌流ラット胃システムでは²¹⁾,IBMX とペンタガストリン刺激により胃酸分泌を得ることに成功した.IBMX は壁細胞において細胞内の二次伝達物質である cAMP の分解を妨げ,壁細胞内信号伝達が継続して行われることによって,胃酸分泌が亢進すると考えられている.しかし IBMX を用いない場合は,胃酸分泌量は少量でありかつ不安定であるため²²⁾,これまで全く検討されておらず,IBMX を用いないシステムの開発が検討されてきた。

カルシウムイオン (Ca²+) は, ガストリン分泌刺激や胃酸分泌 刺激に用いられるなど, 胃酸分泌機構と深く関係していること

平成5年3月1日受付,平成5年5月10日受理

Abbreviations: ECL, enterochromaffin-like; H₂, histamine-2; HDC, histidinedecarboxylase; IBMX, isobutyl methylxanthine; PAP, peroxidase-anti-peroxidase; RIA, radioimmunoassay

が明らかになっている $^{2a-2n}$. 従って、単離灌流ラット胃システムにおいても、胃血管床灌流液中の Ca^{2+} 濃度を一定にする必要があると考えられる. これまで灌流液のコロイドとしてウシ血清アルブミンが用いられてきた. しかしウシ血清アルブミン 添加灌流液の Ca^{2+} 濃度には、かなりのばらつきがあることが報告されている 2n . これはアルブミンに Ca^{2+} 結合能があるためとされる. 本研究では、灌流液のコロイドとして Ca^{2+} 結合能を持たないデキストラン T70 (dextran T70) を用いることで灌流液内 Ca^{2+} 濃度の安定化をはかり、ペンタガストリン、ヒスタミンの単独刺激に対し有効な胃酸分泌を起こす単離灌流ラットアの単独刺激に対し有効な胃酸分泌を起こす単離灌流ラットアの単独刺激に対し有効な胃酸分泌を起こす単離灌流ラットアの単独刺激に対し有効な胃酸分泌を起こす単離灌流ラットアの単独刺激に対し有効な胃酸分泌を起こす単離灌流ラットアの単独刺激に対し有効な胃酸分泌を起こす単離灌流ラットである Cam と Cam と Cam が Ca が Ca

度に影響されるか否かを検討した。またこれらの結果から、ペンタガストリンによる胃酸分泌におけるヒスタミンの作用について検討した。

材料および方法

1. 実験動物と方法

ウィスター系雄性ラット 200-300g (平均 250g) を用い,後述する単離灌流胃システムを作製して検討を行った.以下の4種類の方法で単離灌流胃からの胃酸分泌量,およびヒスタミン分泌量の検討を行った.

1. ガストリン投与群

胃血管床灌流液に,ペンタガストリンを 0.26nM から 5.2nM の間の種々の濃度で添加した.

2. ヒスタミン投与群

Totally isolated, vascularly perfused rat stomach system.

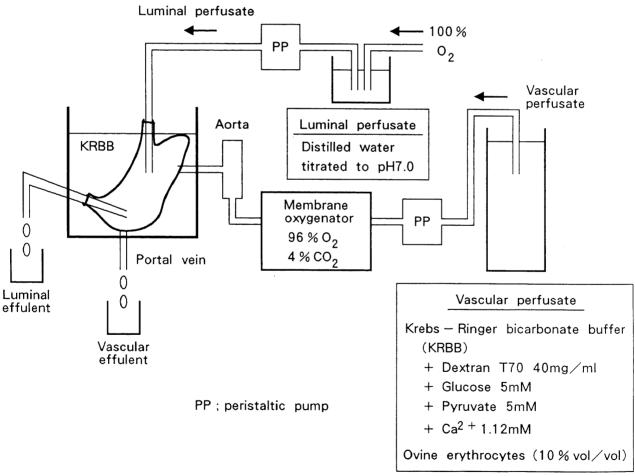


Fig. 1. Schematic view of the totally isolated, vascularly perfused rat stomach system. Stomach was isolated and transferred to an organ bath filled with Krebs-Ringer bicarbonate buffer (KRBB). The vascular bed was perfused through an arterial catheter from abdominal aorta and celiac axis with KRBB containing an ionized calcium concentration of 1.12 mM (at pH 7.25), 5 mM glucose, 5 mM pyruvate, 40 mg/ml dextran T70 as colloid, and 10% (vol/vol) fresh, washed ovine erythrocytes. The vascular bed was perfused at a rate of 2 ml/min by peristatic pump (PP), and vascular perfusate was gassed with O₂ (96%) and CO₂ (4%) using a membrane oxygenator. The gastric lumen was perfused at a rate of 1 ml/min with distilled water (pH 7.0) gassed with 100% O₂. All perfusate and the organ bath were kept at 37°C. The vascular effluent was collected in six 10-minute portions through a portal vein drainage tube, and centrifugated 2×10³rpm/min for 10 minute at 4°C. The supernatant were kept frosen-20°C until histamine analysis. The luminal effluent was collected in six 10-minute portions through a pyloric drinage tube, and acid output were determined by titration to pH 7.0 with 1 mM NaOH.

胃血管床灌流液に,ヒスタミンを $5\mu M$ から $500\mu M$ の間の 種々の濃度で添加した.

- 3. ヒスタミン 500μM 単独刺激, またはヒスタミン 500μM とペンタガストリン 5.2nM の併用刺激を行った.
- 4.~0.52 nM のペンタガストリンまたは $50 \mu M$ のヒスタミンに、 $50 \mu M$ の IBMX を併用した、

それぞれの薬物濃度に対して、6匹のラットを用いた.

Ⅱ. 単離灌流胃システムの作製

単離灌流胃システムの作製は以下のように行った. ラットは 24時間の絶食後, 0.75mg ずつのウレタン (urethane) を腹腔内 および皮下投与によって麻酔し開腹した. 胃の単離と灌流は Short ら²¹⁾, および Kleveland ら²²⁾²⁸⁾²⁹⁾ の方法に従った. すなわ ち腎下部大動脈よりカテーテルを挿入し, 横隔膜直下の大動脈 を結紮したのち, 腹腔動脈より胃を灌流した. 肝十二指腸靭帯を結紮した後, 門脈にカテーテルを挿入して灌流液を回収した. また胃内腔粘膜面の灌流には食道, および幽門輪直後の十二指腸にそれぞれカテーテルを挿入して行った. 門脈, 及び十二指腸のカテーテルより回収した 2 種類の灌流液は, 10分ごとの分画液をフラクションコレクターにより採取した(図1).

Ⅲ.血管床灌流液の作製と灌流法

血管床灌流液は Sandvik ら 50 の方法に従い作製した. すなわち Krebs-Ringer 重炭酸緩衝液に 1.12mM の Ca^{2+} (pH 7.25), 5mM のブドウ糖, 5mM のピルビン酸塩, および 40mg/ml のデキストラン T70 を加えた後, pH7.4 に調整した. これに新鮮なヒツジ洗浄赤血球を酸素担体として10%加え,膜型酸素供給装置を用いて96% O_2 , 4% CO_2 を供給した. 粘膜灌流液には pH 7.0 に調整した蒸留水を用い、100% O_2 を送気した. 灌流液はペ

リスタポンプ (peristaltic pump, PP) を用いて,血管床は 2ml/min で,粘膜面は 1ml/min にてそれぞれ灌流した.胃は全 摘後,直ちに Krebs-Ringer 重炭酸緩衝液を満たした容器に懸垂した.灌流液,および懸垂容器は37℃に維持し,灌流液は再循環させず,1回のみ使用した.また,次のようなことが判明した場合には検討対象から除外した.すなわち,血管床灌流液中に空気が混入した場合,灌流液の中断が起こった場合,懸垂容器内や胃内腔に血管床灌流液の逸脱がみられた場合,および胃内腔に食物などが残存していた場合である.

Ⅳ. 胃酸分泌量の測定

採取した粘膜灌流液を, 常温下に 1mM の NaOH を用いて pH 7.0 まで滴定し, 胃酸分泌量を測定した.

V、ヒスタミンの測定

採取した血管床灌流液は、 $4 \, {\mathbb C} \, 2 \times 10^3 {\rm rpm/min}$ にて $10 \, {\rm 分間}$ 遠心後,上清を採取し,ヒスタミンラジオイムノアッセイ (radioimmuno-assay, RIA) に供するまで $-20 \, {\mathbb C}$ にて凍結保存した。ヒスタミン RIA キットは $0.1 {\rm nM}$ の感度を持ち,内部評価分析の分散は $25 {\rm nM}$ のヒスタミンを用いた場合, $6.1 {\mathbb W}$ であった。またヒスチジン,および ${\rm t-}$ メチルヒスタミンに対する交差反応は無視できるものであった ${\rm and}$

VI. 基礎分泌量の測定と胃酸分泌刺激法

基礎分泌量は外因性のペンタガストリン, およびヒスタミン 刺激のない状態, すなわち血管床灌流液のみの灌流で分泌され ている胃酸分泌量, およびヒスタミン量とした.

またペンタガストリンおよびヒスタミンよる胃酸分泌刺激は、40分間の洗浄時間 (wash out period) 後、60分間行った. IBMX を併用する場合は、20分間の洗浄時間後、実験終了まで

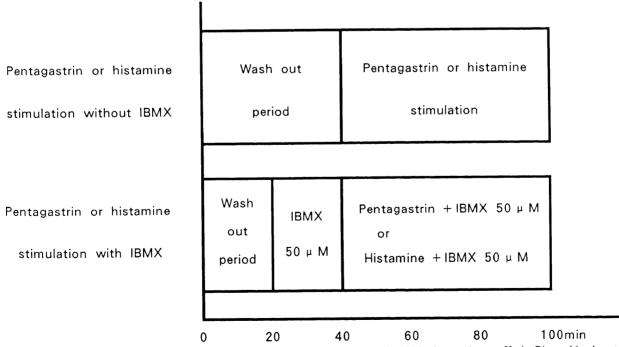


Fig. 2. Investigative procedure as a function time of perfusion period 0-100 min. In both experiments Krebs-Ringer bicarbonate buffer containing ovine erythrocytes was perfused continuously. In the first experiment (upper panel), rat stomach was stimulated with various concentration of pentagastrin or histamine alone for 60 minutes. In the second experiment (lower panal), 50 μ M isobutyl methylxanthine (IBMX) were added to the vascular perfusate for 20 minutes, and stomach was stimulated with pentagastrin or histamine concomitant with IBMX for 60 minutes.

佐

岩

の80分間 50µM の IBMX を加えて刺激を行った (図 2).

VII. 抗ヒスタミン抗体を用いた免疫組織学的検討

胃における組織中のヒスタミンの局在については、ペルオキンダーゼ抗ペルオキンダーゼ法 (peroxidase-antiperoxidase, PAP)³³ による組織化学染色を行い検討した.一次抗体として CHEMICON 社製ウサギ抗ヒスタミンポリクローナル抗体 (Temecula, CA, USA) を用い、diaminobenzidine (DAB) にて発色させた.

VII. 実験材料

ベンタガストリン (Peptavlon[®]) は ICI-Pharma 社製 (Macclesfield, UK), デキストラン T70 は Pharmacia AB 社製 (Uppsala, Sweden), IBMX 等その他の薬剤は Sigma chemicals Co. 社製 (St. Louis, Mo. USA) を用いた. ヒスタミン RIA キットは Immunotech 社 (Marseilles, France) の市販キットを, ペリスタポンプは Pharmacia 社製 (Uppsala, Sweden) を用いた.

IX. 統計学的検討

胃酸分泌量,およびヒスタミン分泌量は,平均土標準誤差 (mean±SEM) で表し,各測定値の検定にはウィルコクソンの順位和検定 (Wilcoxon rank-sum test) を用いて評価し,危険率 5 %以下を有意差ありと判定した.

成 4

1. 胃酸分泌量の検討

- 1. ペンタガストリン刺激に対する胃酸分泌反応は,基礎分泌量の $2.8\pm0.5\mu$ mol/hr から用量依存性に胃酸分泌量が増加し,1.04nM では $12.0\pm2.5\mu$ mol/hr の最大分泌量を示した. しかしそれ以上の濃度では胃酸分泌量は増加しなかった (図 3).
- 2. ヒスタミン刺激に対する反応は、基礎分泌量から用量依存性の反応を示し、500μM では最大分泌量 24.8±6.3μmol/hrを示した。しかしそれ以上の濃度では、ヒスタミンの血管透過性亢進作用による組織の浮腫のため、血管灌流液の胃内腔への逸脱が生じ、胃酸分泌量は測定不能となった(図4).
- 3.5.2nM のペンタガストリンと 500μ M のヒスタミンを同時に投与し、最大刺激を行った場合の胃酸分泌量は $20.9\pm8.8\mu$ mol/hr であり、ヒスタミン 500μ M を用いた場合とほぼ同

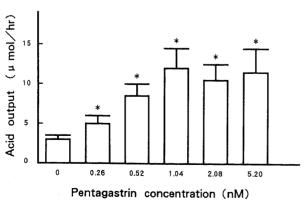


Fig. 3. The effect of pentagastrin on acid output in the totally isolated, vascularly perfused rat stomach. Increasing doses of pentagastrin were perfused vascularly. Results are expressed as mean±SEM, from six experiments at each concentration. Significance of differences from base line is indicated by * (p<0.05).

等 (24.8±6.3μmol/hr) で,有意差はみられなかった (図5).

4. IBMX を併用した場合の胃酸分泌量は、0.52nM のベッタガストリン刺激では $74.2\pm2.0\mu mol/hr$ と,併用しない場合 $(8.0\pm1.8\mu mol/hr)$ に比べ約 9 倍に増加した(図 6)。また $50\mu M$ のヒスタミン投与では,IBMX の併用によって $13.4\times10^{l}\pm9.5\mu mol/hr$ と,用いない場合 $(18.4\pm3.8\mu mol/hr)$ に比し約 8 倍に増加した(図 7)。

Ⅱ. 門脈血中ヒスタミン量の検討

門脈血中のヒスタミン量は、0.52nM のペンタガストリン単独刺激時には 46.6 ± 5.1 nmol/hr であり、0.52nM のペンタガストリンに、 50μ M の IBMX を併用した場合には 47.9 ± 6.9 nmol/hr であった。すなわち、IBMX の存在に関わらず門脈血中のヒスタミン分泌量は同等であった(図 8).

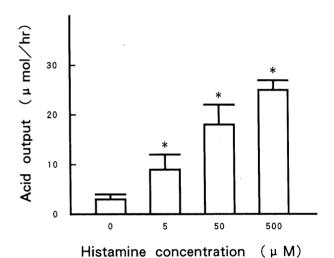


Fig. 4. The effect of histamine on acid output in the totally isolated, vascularly perfused rat stomach. Increasing doses of histamine were perfused vascularly. Results are presented as means ± SEM from six experiments at each concentration. Significance of differences from base line

is indicated by * (p<0.05).

N.S.

Video on the property of the property of

Fig. 5. The effect of pentagastrin on the histamine stimulation of acid output in the perfused rat stomach. 500 μM histamine was perfused alone (left) or in combination with 5.2 nM pentagastrin (right). Acid output is exhibited as mean±SEM from six experiments each.

Ⅲ. 組織学的検討

ラット胃におけるヒスタミンの局在を、PAP 法により示すが、ヒスタミンは ECL 細胞内に認められ、ECL 細胞内では細胞質内に局在していた(図9).

考 努

本研究では単離灌流ラット胃システムを作製し、ペンタガストリンの単独刺激による胃酸分泌量と、ホスホジエステラーゼの阻害剤である IBMX とペンタガストリンを併用した場合の胃酸分泌量について検討した。これまで(ペンター)ガストリン

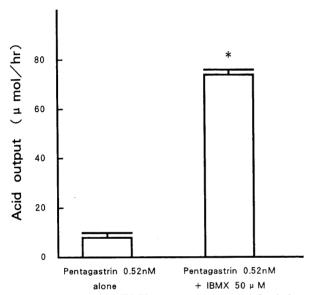


Fig. 6. The effect of IBMX on the pentagastrin stimulation of acid output in the perfused rat stomach. 0.52 nM pentagastrin was perfused alone (left) or in combination with 50 μ M IBMX (right). Acid output is exhibited as mean \pm SEM from six experiments each. Significance of difference is indicated by * (p<0.05).

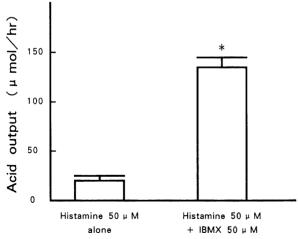


Fig. 7. The effect of IBMX on the histamine stimulation of acid output in the perfused rat stomach. 50 μ M histamine was perfused alone (left) or in combination with 50 μ M IBMX (right). Acid output is exhibited as mean \pm SEM from six experiments each. Significance of difference is indicated by * (p<0.05).

刺激のみで胃酸分泌を安定して行う胃灌流システムは報告されていない。これに対しIBMX に関して Kleveland らは^{22/28/28/3},同様のラット胃灌流システムにおいて IBMX が胃酸分泌能の感受性を良好にすることを示し、ペンタガストリン刺激による不安定な胃酸分泌量が,IBMX を用いることによって安定すると述べている。しかし IBMX を用いない場合は,胃酸分泌量が少量であり、かつ不安定であるため、これまで実験結果を検討することは困難であった。本研究では IBMX を用いることなくペンタガストリンのみの刺激を行うことによって、用量依存性の良好な胃酸分泌反応を得ることができた(図 3).

カルシウムイオン (Ca²+) が胃酸分泌機構に重要な役割を果たしていることは以前より知られている²²-²ň. ガストリン刺激によるヒスタミンの放出と胃酸分泌量は、細胞外 Ca²+ 濃度に依存しているのに対し、ヒスタミン刺激による胃酸分泌量は Ca²+ 濃度の影響をうけないことから³⁴-¾6, Ca²+ がヒスタミンの放出に深く関係していると考えられる. さらに壁細胞における胃酸分泌機構において、Ca²+ はふたつの主要経路において重要な役割を果たしていると考えられている³ň. ひとつは Ca²+ 依存

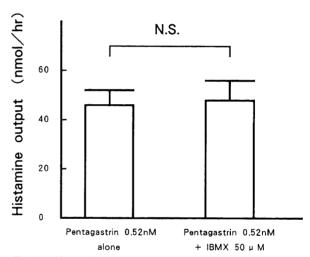


Fig. 8. Histamine output in the portal vein after stimulation with 0.52 nM pentagastrin alone (left) or in combination with 50 μ M IBMX (right). The results are exhibited as mean \pm SEM from six experiments each.

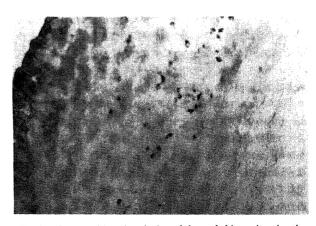


Fig. 9. Immunohistochemical staining of histamine in the rat stomach, showing the strong staining in the ECL cells. (magnification, $\times 100$)

性の (H^+, K^+) ATP 加水分解酵素. すなわちプロトンポンプに 関連した経路であり、もうひとつは cAMP や Ca²⁺ 依存性の蛋 白リン酸化酵素による膜輸送システムの活性化に関連した経路 である. Sandvik らは単離灌流ラット胃システムにおいて,灌 流液のコロイドとしてウシ血清アルブミンを用いると, 灌流液 の Ca²+ 濃度にばらつきが見られることを報告しており²⁷⁾, 本研 究ではウシ血清アルブミンの代わりに、Ca2+結合能を持たない デキストラン T70 を使用した. また胃酸の基礎分泌量は. Ca2+ の濃度には影響されず、ペンタガストリン刺激による胃酸 分泌量は細胞外 Ca²+ 濃度が低いほど多量であったと報告して いる²⁰. さらに ECL 細胞から放出されるヒスタミン量は, 細胞 外 Ca²⁺ 濃度が 1.12mM で最大であったことから²⁷, 本研究では 血管床灌流液の Ca^{2+} 濃度は 1.12 mM とした。これまでガスト リン刺激単独で胃酸分泌を行うシステムは報告されていなかっ たが,本研究では灌流液中コロイドとしてデキストラン T70 を使用し、Ca²⁺ 濃度を 1.12mM に調整したことにより、ペンタ ガストリン単独刺激で初めて安定した胃酸分泌を行うシステム を確立できた. これはコロイドとしてデキストラン T70 を使 用し、灌流液中の Ca2+ 濃度を 1.12mM に調整したことによる 効果であると考えられた.

また本研究では、ペンタガストリンの刺激によって胃から分泌されたと考えられるヒスタミン量の検討を行った.胃灌流システムでは門脈血中のヒスタミン量の変化が、胃におけるヒスタミン分泌量の指標になると考えられているため³³0、本研究でもヒスタミンを含む血管床灌流液を用いて検討した.IBMXを併用して得られた 0.52nM のペンタガストリン刺激による門脈血中のヒスタミン量は、IBMXを使用しなかった場合と同量であった(図 8).このためホスホジエステラーゼ阻害剤であるIBMXは、ラット胃からのヒスタミン分泌に影響を及ぼさないことが示された.このことからラット胃におけるヒスタミン含有細胞、すなわち ECL 細胞は、ペンタガストリン刺激における細胞内二次伝達物質として cAMP を利用しないと推察された.また IBMX を用いた場合には、胃酸分泌量は 8 倍に増加することから、壁細胞におけるヒスタミンの二次伝達物質は cAMP であることが確認された.

この研究におけるもうひとつの重要な課題は、ペンタガスト リンによる胃酸分泌作用が、ペンタガストリン自身のホスホジ エステラーゼ阻害による cAMP の蓄積によるものかどうかと いう点である. ヒスタミンによる胃酸分泌は壁細胞内の cAMP を介して行われるため、IBMX を併用するとペンタガス トリン自身にホスホジエステラーゼ阻害作用があっても、その 作用は確認できないことになる. これまでの研究によって本シ ステムでは、IBMX を使用することにより基礎胃酸分泌量が増 加することが明らかになっている®り、さらに IBMX とペンタガ ストリン, および H2受容体阻害剤であるラニチジン (Ranitidine) を用いた研究では、 $2\mu mol/l$ のラニチジンは基礎胃酸分泌 量には影響しないが、ペンタガストリン刺激による胃酸分泌量 をほぼ完全に抑制することが証明されている30. 今回の研究で は,5.2nM のペンタガストリンと 500μM のヒスタミンとを併 用して刺激した場合と,500μM のヒスタミン単独で刺激した 場合を比較して検討したが、両者間には胃酸分泌量の差は認め られなかった (図5). 従って、ペンタガストリンにはホスホジ エステラーゼ阻害によって cAMP を上昇させる作用はないこ とが示された. また壁細胞には(ペンター)ガストリン受容体は 存在しないと推察された.以上より、ヒスタミンは (ペンター) ガストリンによる胃酸分泌刺激のメディエーターであると考えられた.

これまで胃酸分泌刺激の壁細胞への伝達経路について二つの仮設が提唱され、現在に至るまで議論が続いている。すなわち Kahlson ら⁵ や Code による、胃酸分泌は最終的にすべてヒスタミンを介して伝達されるとするヒスタミン共通最終メディエーター説 (histamine common final mediator theory) と³⁹, Grossman らによる、壁細胞にはガストリン、ヒスタミンおよびアセチルコリンの三種類の受容体が存在とする多受容体説 (multiple receptor theory) である⁴⁰. しかし H_2 受容体阻害剤の投与により、すべての胃酸分泌刺激が阻害されること⁴¹, またアセチルコリン、およびガストリンの胃酸分泌作用がヒスタミンを介することが証明されたことより³²⁴⁽²⁾⁴³⁾, ヒスタミンが胃酸分泌の主なメディエーターであると考えられるようになっており、本研究の結果と一致している.

胃酸分泌に関与するヒスタミンの含有細胞について、従来は 肥満細胞であると考えられてきた、しかしラットでは、胃腺の 底部に分布する APUD 系 (amine precursor uptake and decarboxylation, APUD) の細胞である ECL 細胞が、ヒスタミ ンを合成することが 明らかになっており、ヒトにおいても ECL 細胞がヒスタミンを介して胃酸分泌機構に重要な機能を 果たしていると考えられているマーロン.本研究においてもラット 胃の PAP 染色では、ヒスタミンは主として ECL 細胞の細胞 質内に存在していた.またガストリンは,ECL 細胞においてヒ スタミンの主要な生合成経路である,ヒスチジン脱炭酸酵素 (histidine decarboxylase, HDC) の合成を亢進させ, 長期的には HDC 含有細胞である ECL 細胞の増殖を促すとされてい る4~40. このことから, ECL 細胞にはガストリン受容体が存在 すると考えられている.さらに H₂ アゴニストであるインプロ ミジン (impromidine) を用いた研究により36, ECL 細胞上には 自己抑制的 H₂受容体 (auto regulatory H₂ receptor) が存在する と考えられている.これに対し壁細胞には、機能的にはガスト リン受容体は必要ないと考えられ, 本研究でも壁細胞における のガストリン受容体の存在は否定的であった.

結 論

ウィスター系雄性ラットを用いて単離灌流胃システムを作製し、種々の濃度のペンタガストリン、およびヒスタミン刺激により得られる胃酸分泌量と、ペンタガストリン刺激により ECL 細胞より放出される門脈血中のヒスタミン量を検討した。またホスホジエステラーゼ阻害剤イソブチルメチルキサンチン (IBMX) を併用した場合を比較検討し、次の結論を得た.

- 1. 本研究ではデキストラン T70 を用いたこと,および細胞外 Ca^{2+} 濃度を 1.12mM に調整したことにより,ペンタガストリンおよびヒスタミンの単独刺激に対し,初めて用量依存性の胃酸分泌を安定して行う単離灌流胃システムを確立することができた.
- 2.0.52nM のペンタガストリン単独刺激の場合,および 50μ M の IBMX 存在下における 0.52nM のペンタガストリン刺激の場合では、門脈中に分泌されたヒスタミン量は同量であった。これによって、ECL 細胞における細胞内二次伝達物質はcAMP ではないことが証明された。
 - 3.500μM のヒスタミン単独刺激の場合, および 5.2nM の

ペンタガストリンと 500 μM のヒスタミン併用刺激の場合では、胃酸分泌量は同量であった。このためペンタガストリンはホスホジェステラーゼ活性に影響を及ぼさないことが証明された。また壁細胞上には (ペンター) ガストリン受容体は存在しない レ考えられた。

- 4. IBMX は、ECL 細胞のヒスタミン分泌に影響することなくペンタガストリン刺激に対する壁細胞の胃酸分泌作用を9倍に増幅し、ヒスタミン刺激による壁細胞からの胃酸分泌量を8倍に増幅した。したがって、壁細胞の細胞内二次伝達物質はc-AMPであることが確認された。
- 5. 抗ヒスタミン抗体を用いたラット胃の免疫組織学的検索では、ヒスタミンは主として胃底部に存在する ECL 細胞の細胞質内に認められた.

謝 辞

稿を終えるにあたり,御指導,御校閲を賜りました恩師宮崎逸夫教授に深甚なる謝意を表します.また直接御指導,御助言頂きました金沢大学医学部第二外科泉良平講師,ならびに御教示を仰ぎました本学生理学第一講座永坂鉄夫教授,紫藤治助教授に深謝いたします.さらにNorway 留学中直接御指導頂きました Trondheim 大学胃腸科 Helge L. Waldum 教授,研究にご協力いただいた同研究室の各位,および本学麻酔科蘇生科岩佐智子先生に感謝いたします.本研究の一部は Norwegian Reserch Council for Science and the Humanities および Scandinavia-Japan Sasakawa Foundation の助成金を受けたことを付記し,謝意を表します.

尚,本論文の要旨は, Symposium of "New Perspectivies in Histamine Reserch" (Netherland, 1989), および第77回日本消化器病学会総会(東京, 1990) において発表した.

文 靚

- 1) Edkins, J. S.: On the chemical mechanisms of gastric secretion. Proc. Soc. Med. (B), 76, 376 (1905).
- 2) Nisson, G., Simon, J., Yalow, R. S. & Berson, S. A.: Plasma gastrin and gastric acid responses to sham feeding and feeding in dogs. Gastroenterology, 63, 51-59 (1972).
- 3) Blair, A. J. III, Richardson, G. T., Walsh, J. H. & Feldman, M.: Variable contribution of gastrin to gastric acid secretion after a meal in humans. Gastroenterology, 66, 944-949 (1987).
- 4) **Popielski, l.**: β -imidazolylathylamin und die Organextrakte. I. β -imidazolylathylamin als machtiger Erreger der Magendrusen. Pflugers Arch., 178, 214-236 (1920).
- 5) Black, J. W., Duncan, A. M., Durant, C. J., Ganellin, C. R. & Parsons, E. M.: Definition and antagonism of histamine H₂-receptors. Nature, 236, 385-390 (1972).
- 6) Kahlson, G., Rosengsen, E., Svahn, D. & Thunderg, R.: Mobilization and formation of histamine in the gastric mucosa as related to acid secretion. J. Physiol. (London), 174, 400-416 (1964).
- 7) Håkanson, R., Owman, C., Sjoberg, N. O. & Sporrong, B.: Amine Mechanism in Enterochromaffine and Enterochromaffine-like Cells of Gastric Mucosa in Various Mammals. Histochemie, 21, 189-220 (1970).
- 8) Håkanson, R.: New aspects for the formation and function of histamine, 5-hydroxytryptamine and dopamine in

- gastric mucosa. Acta Physiol. Scand., 340 (Suppl), 1-134 (1970).
- 9) Håkanson, R., Lilja, B. & Owman, C.: Properties of a new system of amine-storing cells in the gastric mucosa of the rat. Eur. J. Pharmacol., 1, 188-199 (1967).
- 10) Thunberg, R.: Localization of cells containing and forming histamine in gastric mucosa of the rat. Exp. Cell Res., 47, 108-115 (1967).
- 11) Håkanson, R., Bottcher, G., Ekblad, E., Panula P., Simonsson M., Dohlsten M., Hallberg, T. & Sundler, F.: Histamine in endocrine cells in the stomach. Histochemistry, 86, 5-17 (1986).
- 12) Lonroth, H., Håkanson, R., Lundell, L. & Sundler, F.: Histamine containing endocrine cells in the human stomach. Gut, 31, 383-388 (1990).
- 13) Berglindh, T. & Obrink, K. J.: A method for preparing isolated glands from the rabbit gastric mucosa. Acta Physiol. Scand., 96, 150-159 (1976).
- 14) Soll, A. H.: The actions of secretagogues on oxygen uptake by isolated mammalian parietal cells. J. Clin. Invest., 61, 370-380 (1978).
- 15) Soll, A. H.: Secretagogue stimulation of $^{\rm H}$ C-aminopyrine accumulation in isolated canine parietal cells. Am. J. Physiol., 238, G366-375 (1980).
- 16) Kowalewski, K. & Scharf, R.: Secretion of hydrochloric acid by ex vivo isolated canine stomach. Scand. J. Gastroenterol., 6, 675-681 (1971).
- 17) Odaibo, S. K., Kae, Yol., Lee, FRCS. & Chey. W. Y.: Developement of isolated perfused whole stomach for motility studies in the rat and cat. Dig. Dis. Sci., 29, 417-421 (1984).
- 18) Suffouri, B., Weir, G. C., Bittar, K. W. & Makhlouf, G. M.: Gastrin and somatostatin secretion by the perfused rat stomach. Functional linkage of antral peptides. Am. J. Physiol., 238, G495-501 (1980).
- 19) Chew, C. S. & Hersely, S. J.: Gastrin stimulation of isolated gastric glands. Am. J. Physiol., 242, G504-512 (1984).
- **20**) **Berglindh T.:** Gastric secretion and the use of cellular and subcellular systems in gastric reserch. Front. Gastroint. Res., **6**, 20-34 (1980).
- 21) Short, G. M., Wolfe, M. M. & McGuigan, J. E.: Pentagastrin-stimulated gastric acid secretion by the isolated perfused rat stomach. Life Sci., 34, 2515-2523 (1984).
- 22) Kleveland, P. M., Haugen, S. E., Sandvik, A. K. & Waldum, H. L.: The effect of pentagastrin on the gastric secretion by the totally isolated vasculaly perfused rat stomach. Scand. J. Gastroenterol., 21, 379-384 (1986).
- 23) Szelenyi, I.: Calcium, histamine and pentagastrin: Speculations about the regulation of gastric acid secretion at cellular level. Agents Actions., 10, 187-190 (1980).
- 24) Christiansen, J., Rehfeld, J. F.: Interaction of calcium and magnesium on gastric acid secretion and serum gartrin concentrations in man. Gastroenterology, 68, 1140-1143 (1975).

佐

- 25) Harty, R. F., Maico, D. G. & McGuigan, J. E.: Role of calcium in antral gastrin release. Gastroenterology, 80, 491-497 (1981).
- 26) Chew, C. S.: Cholecystokinin, carbachol, gastrin, histamine and forskolin increase (Ca²⁺) in gastric glands. Am. J. Physiol., 250, G814-823 (1986).
- 27) Sandvik, A. K., Kofstad, J., Holst, J. J. & Waldum, H. L.: Ionized calcium influences gastrin-stimulated histamine release and secretion, but not histamine-stimulated acid output in the totally isolated, vascularly perfused rat stomach. Acta Physiol. Scand., 134, 443-448 (1988).
- 28) Kleveland, P. M., Haugen, S. E. & Waldum, H. L.: Effect of pentagastrin on gastric acid secretion in the totally isolated, vascularly perfused rat stomach stimulated with the phosphodiesterase inhibitor isobutyl methylxanthine. Scand. I. Gastroenterol., 21, 577-584 (1986).
- 29) Kleveland, P. M., Waldum, H. L. & Larsson, H.: Gastric acid secretion in the totally isolated, vascularly perfused rat stomach. A selective muscarinic-1 agent does, whereas gastrin does not, augment maximal histamine-stimulated acid secretion. Scand. J. Gastroenterol., 22, 705-713 (1987).
- 30) Sandvik, A. K., Waldum. H. L., Kleveland, P. M. & Schulze Sögnen. B.: Gastrin produces an immediate and dose-dependent histamine release preceding acid secretion in the totally isolated, vascularly perfused rat stomach. Scand. J. Gastroenterol., 22, 803-808 (1987).
- 31) Morel, A. M. & Delaage, M. A.: Immunoanalysis of histamine through a novel chemical derivatization. J. Allerg. Clin. Immunol., 82, 646-654 (1988).
- 32) Waldum, H. L., Brenna, E., Sandvik, A. K., Kleveland, P. M., Petersen, H. & Sögnen, B.: Histamine and gastrin in plasma of patients with upper gastrointestinal diseases. Digestion, 42, 121-127(1989).
- 33) Sternberger, L. A., Haardy, P. H., Curculis, J. J. & Meyer H. G.: The unlabelled antibody enzyme method of immuno-histochemistry. Preparation and properties of soluble antigen-antibody complex (horseradish peroxidase-antihorse-radish peroxidase) and its use in identification of spirochetes. J. Histochem. Cytochem., 18, 315-333 (1970).
- 34) Chiba, T., Fisher, S. F., Park, J., Seguin, E. B., Agranoff, B. W. & Yamada, T.: Carbamoylcholine and gastrin induce inositol lipid turnover in canine gastric parietal cells. Am. J. Physiol., 255, G99-105 (1988).

- 35) Berglindh, T., Sachs, G. & Takeguti, N.: Ca²⁺-dependent secretagogue stimulation in the isolated rabbit gastric glands. Am. J. Physiol., 239, G90-G94 (1980).
- 36) Mårdh, S., Song, Y. H., Carlsson, C. & Bjorkman, T.: Mechanisms of stimulation of acid production in parietal cells isolated from the pig gastric mucosa. Acta Physiol. Scand., 131, 589-598 (1987).
- 37) Lewin, M. J. M. & Bado, A.: Receptors regulating acid secretion. Scand. J. Gastroenterol., 26 (Suppl. 180), 53-57 (1991).
- 38) Sandvik, A. K., Lewin, M. J. M. & Waldum, H. L.: Histamine release in the isolated perfused stomach of the rat: regulation by autoreceptors. Br. J. Pharmacol., 96, 557-562 (1989).
- 39) Code, C. F.: Histamine and gastric secretion. A later look, 1955-1965. Fed. Proc., 24, 1311-1321 (1965).
- 40) Grossman, M. I. & Konturek, S. J.: Inhibition of acid secretion in dog by metiamide, a histamine antagonist acting on H₂-receptors. Gastroenterology, 66, 517-521 (1974).
- 41) Ekblad, E. B. M.: Histamine and c-AMP as possible mediators of acethylcholine-induced acid secretion. Am. J. Physiol., 239, G255-260 (1980).
- 42) Black, J. W. & Shankley N. P.: How does gastrin act to stimulate oxyntic cell secretion? Trends Pharmacol. Sci., 8, 486-490 (1987).
- 43) Kleveland, P. M., Waldum, H. L., Bjerve, K. S. & Fjosne, H. E.: Bioassay of gastrin, using the totally isolated, vascularly perfused rat stomach. Scand. J. Gastroenterol., 21, 945-950 (1986).
- 44) Rubin, W. & Schwalts, B.: An electron microscopic radio-autographic identification of the "enterochromaffin-like" APUD cells in murin oxyntic glands. Demonstration of a metabolic difference between rat and mouse gastric A-like cells. Gastroenterology, 76, 437-449 (1979).
- 45) Rubin, W. & Schwalts, B.: Electron Microscopic radio-autographic identification of the ECL cell as the histamine-synthesizing endocrine cell in the rat stomach. Gastroenterology, 77, 458-467 (1979).
- 46) Kubota, H., Taguchi, Y., Tohyama, M., Matsuura, N., Shiosaka, S., Ishifara, T., Watanabe, T., Shiotani, Y. & Wada, H.: Electron Microscopic identification of histidine decarboxylase-containing endocrine cells of the rat gastric mucosa. Gastroenterology, 87, 496-502 (1984).

Acid Secretion and Histamine Release from Totally Isolated, Vascularly Perfused Rat Stomach System Kazunori Iwasa, Department of Surgery (II), School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920—J. Juzen Med Soc., 102, 367—375 (1993)

Key words gastric acid secretion, totally isolated vasucularly perfused rat stomach, pentagastrin, histamine, phosphodiesterase

Abstract

This study was performed to examine the gastric acid output levels stimulated by pentagastrin or by histamine in the improved system of the totally isolated, vascularly perfused rat stomach. It also examined the effect of cAMP levels on histamine release from enterochromaffin-like cells (ECL cells) stimulated by pentagastrin alone or concomitant with a phosphodiesterase inhibitor, isobutyl methylxanthine (IBMX). In this system, Ca2+ concentration of vascular perfusate was adjusted to 1.12 mM, and dextran T70 was used as a colloid. Infusion of various concentrations of pentagastrin or histamine in the vascular perfusate increased gastric acid output dose dependently. Pentagastrin (0.52 nM)-induced gastric acid output was 8.0±1.8 μmol/hr, and 9-fold increment of gastric acid output (74.2±2.0 μmol/hr) was obtained from concomitant stimulation of pentagastrin (0.52 nM) with IBMX (50 μ M). Histamine (50 μ M)-induced gastric acid output was 18.4±3.8 μ mol/hr, and 8-fold increment of gastric acid output (13.4 \times 10¹ ±9.5 μ mol/hr) was obtained from concomitant stimulation of histamine (50 μ M) with IBMX (50 μ M). Histamine (500 μ M)-induced gastric acid output was 24.8±6.3 μ mol/hr, and gastric acid produced by combined stimulation of pentagastrin (5.2 nM) with histamine (500 μ M) was 20.9 \pm 8.8 μ mol/hr, which did not increase in response to the added pentagastrin. Pentagastrin (0.52 nM)-induced histamine release into the portal vein was 46.6±5.1 nmol/hr. However, concomitant stimulation of pentagastrin (0.52 nM) with IBMX (50 μM) was 47.9±6.9 nmol/hr, which was unaffected by phosphodiesterase inhibition. The results indicate that IBMX did not affect the histamine release from ECL cells stimulated by pentagastrin, and pentagastrin itself had no phosphodiesterase inhibitor-like effect. Thus, these results demonstrate the capacity of the totally isolated, vascularly perfused rat stomach system to produce gastric acid and provide a model for studying interactions of gastrointestinal peptides, such as pentagastrin or histamine. And the results support previous observations showing that histamine is likely to be the mediator of the acid secretagogue effect of pentagastrin.