

氏名(本籍)	すずき ひでお 鈴木 英 雄 (神奈川県)
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	博 甲 第 2693 号
学位授与年月日	平成13年3月23日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
審査研究科	医学研究科
学位論文題目	Luminal ammonia retards restitution of guinea pig injured gastric mucosa in vitro (粘膜側アンモニアはモルモット傷害胃粘膜の粘膜再構築現象を遅延させる)
主査	筑波大学教授 医学博士 三輪 正直
副査	筑波大学教授 医学博士 山口 巖
副査	筑波大学教授 医学博士 野口 雅之

論文の内容の要旨

(目的)

胃粘膜に感染する *Helicobacter pylori* (HP) は、胃内腔側(胃粘液層内)に棲息し、胃炎、消化性潰瘍、及び、胃癌と深い関連性を有する。HPは強力なウレアーゼ活性を有し、胃液中の尿素を基質として高濃度のアンモニアを産生するが、HPによる胃粘膜傷害の発生に果たすアンモニアの役割については不明の点が多い。我々はこれまでに、アンモニアを胃粘膜の粘膜側よりも漿膜側に投与すると、上皮細胞に著名な空胞形成を惹起し、胃酸分泌能及びCl⁻輸送能を強力に抑制することを報告した。以上より、胃粘膜上皮細胞の漿膜側は粘膜側よりもアンモニアに対して脆弱であることが推察される。一方、消化管粘膜が傷害を受け、一部の上皮細胞が基底膜から脱落すると、近傍に残存した上皮細胞が基底膜を足場にして遊走し、数分~数時間で脱落部位を被覆してしまう。この現象はrestitution(粘膜再構築現象)と呼ばれ、傷害が軽微なうちに粘膜を被覆し、広汎な組織傷害(=潰瘍)の発生を未然に防ぐ役割を果たしている。本研究では、HP感染胃粘膜において、胃内腔(粘膜側)に産生されたアンモニアが傷害部位を通して漿膜側へ移行し、漿膜側から上皮細胞に作用してrestitutionを抑制する可能性を想定し、以下の検討を行った。

(対象と方法)

In vitro モルモット胃粘膜をUssing Chamberにmountし、粘膜側と漿膜側をHEPES Ringer液(pH 7.4)/100%O₂にて灌流し、電気生理学的な粘膜健全性の指標として、粘膜間電位差(PD)及び電気学的粘膜抵抗(R)を測定した。

・アンモニアの健常胃粘膜に及ぼす影響

胃粘膜上皮細胞のアンモニアに対する感受性を、粘膜側細胞膜と漿膜側細胞膜とで比較するために、塩化アンモニウム(NH₄Cl)を粘膜側あるいは漿膜側に投与し、胃粘膜の変化を電気生理学的、及び形態学的に検討した。イオンチャネルの関与を検討するために漿膜側にK⁺ channel blockerであるBaCl₂を投与し、アンモニアに対する電気生理学的検討も行った。

・アンモニアの傷害胃粘膜 restitution に及ぼす影響

Triton X-100を粘膜側に5分間投与し粘膜表層の傷害を作製し、PD、Rが急激に低下することを確認した後、Triton X-100を除去し、HEPES Ringer液(pH 7.4)にて2~3時間灌流しながら胃粘膜restitutionを検討した。Res-

titution の定量的評価法は、既報に準じて、1) 電気生理学的方法：経時的な PD, R の回復率, 及び 2) 粘膜透過性：粘膜側から漿膜側への [³H] mannitol flux (MF) の変化率を算出することにより行った。また、光顕標本を用いて粘膜被覆の程度を検討することにより形態学的に restitution を評価した。Restitution に及ぼす K⁺ channel の影響を調べるために K⁺ channel blocker である BaCl₂ を漿膜側に投与し、経時的に R の回復率を検討した。

(結果)

1. アンモニアの健常胃粘膜に及ぼす影響

塩化アンモニウム (30mM NH₄Cl) を健常胃粘膜の粘膜側あるいは漿膜側に投与すると、PD, R は有意に低下し、上皮細胞に空胞形成が認められた。PD, R の低下、及び空胞化の程度は、粘膜側投与時より漿膜側投与時において著名であった。またアンモニアによる PD, R の低下は、BaCl₂ の漿膜側投与により濃度依存症性に有意に抑制された。

2. アンモニアの傷害胃粘膜 restitution に及ぼす影響

NH₄Cl 非投与群では、傷害作製後、徐々に PD, R の増大、及び MF の低下が認められ、形態学的に上皮細胞による基底膜の良好な被覆化がみられたが、NH₄Cl 投与群では粘膜側投与時、漿膜側投与時ともに同程度に、PD, R, MF の回復、及び形態学的な被覆化は著明に抑制された。また NH₄Cl 非投与群で認められた restitution は漿膜側 BaCl₂ 存在下で有意に抑制された。また、傷害胃粘膜では粘膜側から漿膜側へのアンモニアの流れ (ammonia flux) は健常胃粘膜よりも著明に抗進していた。

(考察)

本研究において、第 1 に、健常胃粘膜における胃粘膜上皮細胞の漿膜側は粘膜側に比べ、アンモニアに対して脆弱であることが電気生理学的、ならびに形態学的に示唆された。この理由として、胃粘膜上皮細胞では、アンモニウムイオン (NH₄⁺) が漿膜側細胞膜にのみ存在する K⁺ channel を通過して細胞内に入り易いことにより生じる可能性が示唆された。第 2 に、傷害胃粘膜では、粘膜側に投与したアンモニアは漿膜側投与時と同程度に強力に restitution を抑制した。これらの成績から、実際の HP 感染胃粘膜では HP により胃内腔に産生されたアンモニアは傷害部位を通じて粘膜側から漿膜側へ移行し、漿膜側から上皮細胞の機能を低下させ、restitution を抑制する可能性が強く示唆された。アンモニアによる restitution の詳細な抑制機序は不明であるが、本研究において 1) NH₄⁺ が漿膜側の K⁺ channel を通して細胞機能を傷害したこと、2) アンモニア非存在下での restitution が K⁺ channel blocker により抑制されたことから、アンモニアは一つの機序として、胃粘膜上皮細胞の漿膜側における K⁺ channel を抑制することにより restitution を抑制する可能性が示唆された。

審 査 の 結 果 の 要 旨

Helicobacter pylori は近年、消化性潰瘍のみならず、胃癌の発症因子としても注目されている。筆者らは *Helicobacter pylori* が胃内に産生するアンモニアに着目し、アンモニアが胃粘膜傷害に及ぼす機序について新しい知見を発表している。すなわち粘膜側からは傷害を与えない低濃度のアンモニアでも漿膜側へ作用させるとより強い細胞傷害作用と restitution 抑制作用を示すことを新たに見出した。さらに筆者らは、この機序として、NH₄⁺ が胃粘膜上皮細胞傷害部位を通して漿膜側に移行し、漿膜側にのみ存在する K⁺ channel を通して細胞内に侵入し restitution を抑制するという仮説を立て、実証している。実際の生体内ではアンモニアの他にさまざまな傷害因子が関与している可能性が高く、今後、それら諸因子についてもさらなる検討が期待される。なおこの研究成果は American journal of physiology 279 : G107 - G117, 2000 に掲載された。

よって、著者は博士 (医学) の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。