原 著

膵酵素および胆汁酸がラット食道上皮細胞機能に 及ぼす影響に関する電気生理学的検討

東北大学第1外科

岩附 昭広 佐々木 巖 神山 泰彦
内藤 広郎 舟山 裕士 松野 正紀

目的：胃全摘後逆流性食道炎の発生機序に関して，trypsin および胆汁酸の食道上皮細胞機能に及ぼす影響を電気生理学的に検討した。方法・成績：ラット食道粘膜を用い Ussing chamber 法にて食道上皮細胞機能を電気生理学的に検討した。食道経上皮電気抵抗は trypsin 10^{-4} M 投与にて抗与前と比べ有意な低下を，また食道経上皮電位および短絡電流量は trypsin 10^{-3} M 投与にて有意な高値を示した。また，trypsin 10^{-3} M 投与後にみられた短絡電流量の上昇は amiloride 投与で有為に抑制された。一方，胆汁酸であるタウロコール酸ナトリウム投与後はいずれも有意な変化は認めなかった。結論：非酸性環境下においては，膵酵素投与にて食道粘膜細胞における電気抵抗の低下と Na イオンを主とした電解質輸送能に変化がみられるが，胆汁酸による影響は少ない。胃全摘後の逆流性食道炎発生には胆汁に比べて膵液逆流の影響がより重要と考えられた。

Key words: alkaline reflux esophagitis, trypsin, bile acid, total gastrectomy

I. はじめに

胃全摘後に発生する逆流性食道炎の発生頻度は，再建術式により差を認めるがおおむね30%前後とする報告が多く¹⁾²⁾，重要な胃手術後遺症の1つである。本症の成因については，酸分泌領域が完全に切除される胃全摘後では，食道内への逆流液はアルカリ性の十二指腸あるいは空腸液であり，その構成成分である膵液，胆汁が食道粘膜に対し障害性を発揮するためと考えられる^{3)~5)}。

著者ら⁶⁾は，胃全摘ラットにおいて胆汁の存在下であつても膵液が食道に逆流しないモデルでは食道潰瘍は生じないことから，胃全摘後逆流性食道炎発生機序における膵液の重要性を指摘し，さらに protease inhibitor の経口投与がラット食道潰瘍発生を抑制すること，および胃切除後の臨床例でも逆流性食道炎の治療に有効であることを報告した。

一方，病態発生機序に関して膵液中の膵酵素 trypsin や胆汁中胆汁酸の食道上皮に及ぼす影響については，家兎を用いた電気生理学的な病態研究成績が報告され

ているが^{7)~9)}，前述した著者らの成績に相当するラット食道粘膜を用いて in vitro で電気生理学的に検討した報告は少なく，その詳細についてはなお不明な点が多い。

そこで本研究では，ラット胃全摘後逆流性食道炎発生において主な障害因子と考えられる膵酵素 trypsin および胆汁酸の1つであるタウロコール酸ナトリウム（以下，TCA）をそれぞれ単独で投与した場合のラット食道上皮細胞機能に及ぼす影響を，in vitro の実験系を用いて電気生理学的な面から明らかにすることを目的とした。

II. 対象と方法

実験動物として約60匹の体重250g 前後の Sprague-Dawley 系雄性ラット（船橋農場）を用いた。

1. ラット食道粘膜経上皮電位，短絡電流量および経上皮電気抵抗の測定

ラットを約24時間の絶食の後，pentobarbital 麻酔下に開腹し腹部食道を露出した。粘膜の剝離を容易にするため，粘膜下層に27G 針を用いて，後述する灌流液 1ml を注入した後，長径約1cm の腹部食道を摘出した。これを長軸方向に切開伸展し，粘膜を筋層より鈍的に剝離し，アクリル製の Ussing 型 chamber（容量14

<1998年2月12日受理>別刷請求先：佐々木 巖
〒980-8574 仙台市青葉区星陵町1-1 東北大学第1外科

ml, window; 0.15cm^2) に装着した (Fig. 1). 粘膜側および粘膜下層側 chamber を $95\%\text{O}_2$, $5\%\text{CO}_2$ で bubbling しつつ, 既報告¹⁰⁾と同様に改良 Krebs 液 (組成: Na^+ 139.6mM, K^+ 4.7mM, Ca^{2+} 2.6mM, Mg^{2+} 1.1mM, Cl^- 113.0mM, HCO_3^- 25.0mM, Glucose 2.8mM, Pyruvate 2.7mM, Fumarate 2.7mM, Glutamate 2.7mM, 273mOsm/kgH₂O, 37°C , pH 7.5) で灌流した。

食道粘膜経上皮電位 (transepithelial potential difference; 以下, PD) を 3% の寒天を添加した 3 MKCl 寒天塩橋およびカロメル電極を用いて導出し, 短絡電流量 (short circuit current; 以下, Isc) を組織短絡電流量測定装置 (NIHON KOHDEN; CEZ-9100, 東京) を用いて, PD を 0 にするように通電したときの電流量として測定した。PD および Isc は, 経時的にペン書き記録計 (GRAPHTEC SERVOCORDER; SR-6312, 東京) にて記録した。経上皮電気抵抗 (transepithelial resistance; 以下, R) は Ohm の法則より, PD を Isc で除した値として求めた。

2. 実験スケジュール

1) 正常ラット食道粘膜の PD, Isc, R

標本の viability をみるためラットの食道粘膜 ($n=8$) を chamber に装着し, PD, Isc が定常状態となった後, PD, Isc を約 3 時間にわたり測定した。

2) trypsin の PD, Isc, R, に及ぼす影響

食道粘膜 ($n=6$) を chamber に装着して PD, Isc が定常状態となった後に, 粘膜側 chamber に灌流液中の濃度が 10^{-4}M (pH 7.5) および 10^{-3}M (pH 7.5) となるように trypsin (和光純薬, Tokyo) を投与し同様に PD, Isc の測定をした。

3) trypsin による Isc の変化に対する amiloride 投与の影響

粘膜側の chamber に trypsin 10^{-3}M を投与した群 ($n=5$) と trypsin 10^{-3}M に Na channel blocker である amiloride (Sigma chemical, USA) 10^{-4}M を併せて投与した群 ($n=5$) とを用い, 食道粘膜を chamber に装着後 120 分まで PD, Isc の測定をした。

4) タウロコール酸ナトリウムの PD, Isc, R, に及ぼす影響

食道粘膜 ($n=5$) を chamber に装着して PD, Isc が定常状態となった後に, 粘膜側 chamber に灌流液中の濃度が 5mM (pH 7.8) および 10mM (pH 7.8) となるようにタウロコール酸ナトリウム (和光純薬, Tokyo; 以下, TCA) を投与し PD, Isc を測定した。

5) 組織所見の検討

各実験に用いた粘膜は, PD, Isc 測定終了後ただちに 10% ホルマリンに固定し, H-E 染色にて光学顕微鏡下に組織所見を比較検討した。

3. 統計処理

実測値は平均値 (Mean) $\pm$ 標準誤差 (SE) で表し, 有意差検定は Student's t-test を用い危険率 $p < 0.05$ をもって有意と判定した。

III. 成績

1. 正常ラット食道粘膜の PD, Isc, R

Ussing chamber 法にて測定した正常ラット食道粘膜 ($n=8$) の各パラメーターは測定開始後約 30 分で定常状態となり, 約 3 時間持続し, この測定時間内での標本の viability は十分であった。定常状態での各パラメーターの平均値についてみると, PD は $-0.83 \pm 0.11\text{mV}$, Isc は $0.89 \pm 0.04\mu\text{A}/\text{cm}^2$, R は 0.97 ± 0.16

Fig. 1 Schema of measuring system of Ussing chamber.

Kohm $\cdot$ cm 2 であった。

2. trypsin の PD, Isc, R に及ぼす影響

ラット食道粘膜 (n=6) の PD は trypsin 投与前値の -0.66 ± 0.13 mV から, trypsin 10^{-4} M 投与後 -1.13 ± 0.22 mV と上昇し, 10^{-3} M 投与では -2.87 ± 0.35 mV と投与前値に比べて有意に高値を示した (Fig. 2a)。

Isc は投与前値の 1.05 ± 0.20 μ A/cm 2 から, trypsin 10^{-4} M 投与後 2.43 ± 0.67 μ A/cm 2 と上昇し, 10^{-3} M で 6.07 ± 0.91 μ A/cm 2 と投与前値に比べて有意に高値を示した (Fig. 2b)。

R は投与前値の 0.71 ± 0.19 Kohm $\cdot$ cm 2 から, trypsin 10^{-4} M 投与後 0.60 ± 0.16 Kohm $\cdot$ cm 2 と投与前値に比べて有意に低値を示し, 10^{-3} M 投与後 0.54 ± 0.12 Kohm $\cdot$ cm 2 と低下傾向を示した (Fig. 2c)。

3. trypsin による Isc の変化に対する amiloride 投与の影響

trypsin 10^{-3} M 単独投与群と trypsin 10^{-3} M に amiloride 10^{-4} M を併せて投与した群との投与120分

後までの Isc の上昇を比較すると, trypsin 10^{-3} M 単独投与群では, 5.77 ± 1.03 μ A/cm 2 (n=5) 上昇したのに比べ trypsin 10^{-3} M に amiloride 10^{-4} M を併せて投与した群では, 2.10 ± 0.10 μ A/cm 2 (n=5) の上昇にとどまり, 有意に抑制された (Fig. 3)。

4. TCA の PD, Isc, R に及ぼす影響

PD は TCA 投与前値が -1.37 ± 0.81 mV (n=5), TCA 5mM 投与後 -1.00 ± 0.57 mV (n=5), 10mM 投与後 -1.25 ± 0.59 mV (n=5) であり, いずれの場合も投与前値と比べて有意差は認められなかった (Fig. 4a)。

Isc は投与前値が 2.00 ± 0.68 μ A/cm 2 (n=5), TCA 5mM 投与後 2.23 ± 1.49 μ A/cm 2 (n=5), 10mM 投与後 3.95 ± 2.16 μ A/cm 2 (n=5) であった (Fig. 4b)。いずれの場合も, 投与前値と比べて有意差は認められなかった。

R は投与前値が 0.90 ± 0.49 Kohm $\cdot$ cm 2 (n=5), TCA 5mM 投与後 1.04 ± 0.59 Kohm $\cdot$ cm 2 (n=5), 10mM 投与後 0.88 ± 0.46 Kohm $\cdot$ cm 2 (n=5) であった (Fig. 4c)。いずれの場合も, 投与前値と比べて有意差は認められなかった。

5. 組織所見の検討

灌流液単独群, trypsin 投与群, および TCA 投与群ともに, 一部にわずかに角質層表層の剥離と粘膜および粘膜下層の浮腫が認められたが, 各群間の所見に明らかな差は認められなかった。

IV. 考 察

膵液中の膵酵素 trypsin や胆汁中胆汁酸の食道上皮に及ぼす影響に関する電気生理学的研究については家兎を用いた成績が報告されているが^{7)~9)}, ラット食道潰瘍発生モデルに対応するラット食道粘膜を用いた in vitro での電気生理学的研究報告は少ない。その理

Fig. 2 Effect of trypsin on PD, Isc, R of isolated rat esophageal mucosa.

(a) Transepithelial potential difference (mV).
(b) Short-circuit current (μ A/cm 2). (c) Electrical resistance (Kohm $\cdot$ cm 2).

Fig. 3 Effect of amiloride on Isc during treatment of trypsin.

Fig. 4 Effect of taurocholate on PD, Isc, R of isolated rat esophageal mucosa.
 (a) Transepithelial potential difference (mV).
 (b) Short-circuit current ($\mu\text{A}/\text{cm}^2$). (c) Electrical resistance ($\text{Kohm}\cdot\text{cm}^2$).

由の1つとして、Ussing chamber 法による in vitro の電気生理学的検討を行う場合には、window に装着する食道粘膜標本が家兎食道に比べてラット食道では十分な大きさが得難いためと考えられる。今回の実験では、window の大きさに関する基礎的実験結果をもとに、ラット食道粘膜の電気生理学的検討を Ussing chamber 法を用いて行った。

胆汁酸および trypsin の食道粘膜に及ぼす影響を電気生理学的に検討した報告についてみると、Salo ら³⁴⁾は、家兎の食道をコール酸 (以下, CA), デオキシコール酸 (以下, DCA), ケノデオキシコール酸 (以下, CDCA), TCA などの各種胆汁酸および trypsin で灌流して、in vivo での PD の低下と組織障害を報告している。また、井上ら¹¹⁾も同様に家兎食道を TCA, タウロウルソデオキシコール酸 (以下, TUDCA) で180分灌流し、in vivo での PD が低下を認め、PD の低下を粘膜障害の指標として報告している。しかし、PD の変化については電気生理学的に in vivo では測定が困難な経上皮電気抵抗や短絡電流量などの因子が関与するため、上皮細胞の機能的変化をより詳細に検討するた

めには in vitro での検討が必要とされる。

今回の実験ではラット食道粘膜に及ぼす胆汁酸と trypsin の影響を知るため Ussing chamber を用いた in vitro での検討を行ったが、trypsin 投与後 PD, Isc は投与前に比べていずれも有意に上昇し、R は低下する傾向を示した。特に PD の上昇は、Salo ら³⁴⁾および井上ら¹¹⁾の家兎食道粘膜を用いた in vivo での灌流実験成績とは異なる結果であった。Orlando ら⁷⁾は、家兎の食道を塩酸および対照として PBS (Phosphate-buffered saline; pH=7.4) で灌流したときの in vivo での PD の値と、Ussing chamber で測定した in vitro での R の値が、強い正の相関を示したとしている。本実験において trypsin 投与により PD および Isc の上昇が認められた機序については以下に述べるごとく不明な点が多いが、R の低下傾向が認められたことは、先の Salo および井上らの報告による灌流実験での in vivo での PD の低下に相当する結果であると考えられる。

次に、実験に用いた trypsin の投与量についてみると、Kivilaakso ら⁸⁾は、家兎食道粘膜で Ussing chamber を用いた電気生理学的検討より、trypsin 10,000 IU/ml (約 10^{-4}M) 投与後 PD の変化は上昇、横ばい、低下とまちまちで有意な変化は認められなかったが、R は投与前に比べて有意に低下したとし、R についてはラット食道粘膜を用いた著者らの成績とほぼ同様のことを報告している。なお、本研究での trypsin 投与量は Kivilaakso ら⁸⁾の場合とほぼ同量に相当する 10^{-4}M ~ 10^{-3}M を用いたが、上安ら¹²⁾は正常ラット腸液中の trypsin 濃度を0.23mg/ml (約 10^{-5}M)、Choi ら¹³⁾はヒト十二指腸内 trypsin 濃度を0.4mg/ml と報告しており、今回用いた trypsin 投与量は生理的消化管内濃度よりやや多い量と考えられる。

今回の成績では trypsin 投与後の PD および Isc の上昇が認められたが、この機序について amiloride 感受性 Na channel の関与について検討した。その結果、Isc の上昇は amiloride 10^{-4}M の粘膜側投与により有意に抑制が認められた。amiloride は利尿剤の一種でもあり、上皮細胞の apical membrane に存在する Na channel を block することにより、水分および Na 吸収を抑制すると考えられている¹⁴⁾。したがって、本研究での trypsin 投与後の PD, Isc の変化は、amiloride 感受性 Na channel を介する Na 吸収の増大による機序の関与が考えられる。すなわち、酢酵素投与にて食道粘膜細胞における Na イオンを主とした何らかの電解

質輸送能の異常が発生していることが示唆される。

一方、胆汁酸の食道粘膜に及ぼす影響についてみると、Goldstein ら⁹⁾は家兎食道粘膜を用いた *in vitro* の電気生理学的検討で、TCA (5mM, 10mM) の投与では PD, Isc, R の変化は認めなかったとしており、今回の著者らの成績と一致する。胆汁酸の作用については、一般的にその detergent 作用により H イオン透過性が亢進するためによると考えられている⁸⁾¹⁵⁾。したがって、酸の存在しない環境下では胆汁酸単独の食道粘膜に対する障害作用は少ないことが推察される。Kivilaakso ら⁸⁾は、家兎食道粘膜に TCA (5mM, 20 mM) を投与した灌流実験において、pH 3.5では PD の一過性上昇とその後の低下および R の低下を認めたが、pH 5.0では有意な変化はみられなかったとし、胆汁酸の障害性には酸の関与が大きいことを報告している。著者らは本研究に先立ち、予備実験として、正常ラット十二指腸液中の胆汁酸分画を、高速液体クロマトグラフィーにて測定した。その結果、総胆汁酸中の57.1%、平均501.8 μ M/l が TCA であり、脱抱合型胆汁酸である DCA, CDCA はいずれも1.0 μ M/l (0.1%)と微量であったため、胆汁酸投与実験として、TCA を用いることが妥当であると判断した。本実験結果では、TCA 投与では trypsin 投与の場合と異なり、いずれの投与量でも PD, Isc, R とも有意な変化は認められなかった。Kivilaakso ら⁸⁾の成績と今回の著者らの成績を考慮すると、十二指腸液中の胆汁酸がアルカリ環境下における食道粘膜の電気生理学的機能に及ぼす影響は少ないものと考えられた。

組織学的な検討に関しては、Salo ら¹⁶⁾は、家兎食道を trypsin (1mg/min) で3.5時間灌流した後の食道粘膜の電顕所見では、表層細胞の分離、細胞内の空胞化と細胞間腔の拡大を認めている。本研究における Ussing chamber での実験に用いたラット食道粘膜の光学的な組織学的検討において、灌流液単独群、trypsin 投与群および TCA 投与群の各群間の所見に明らかな差が認められなかったことは、本実験で得られた各種障害物質投与時の電気生理学的指標の変化は食道粘膜障害における初期機能変化を反映していることを示唆するものと考えられた。

以上のごとく、ラット食道粘膜を用いた今回の *in vitro* の成績からは、非酸性環境下においては食道上皮に対する影響は、胆汁酸では少なく酢酸 trypsin の影響が大きいと考えられた。

文 献

- 1) 橋本 勇, 小玉正智, 柴田純祐: 胃全摘後の逆流性食道炎と対策. 消外 3: 1681—1688, 1980
- 2) 遠藤光夫, 河野辰幸, 山崎 繁ほか: 逆流性食道炎および食道アカラシア. 消病セミナー 35: 109—120, 1989
- 3) Salo JA, Kivilaakso E: Role of bile salts and trypsin in the pathogenesis of experimental alkaline esophagitis. Surgery 93: 525—532, 1983
- 4) Salo JA, Kivilaakso E: Contribution of trypsin and cholate to the pathogenesis of experimental alkaline reflux esophagitis. Scand J Gastroenterol 19: 875—881, 1984
- 5) Lillemoe KD, Johnson LF, Harmon JW et al: Taurodeoxycholate modulates the effects of pepsin and trypsin in experimental esophagitis. Surgery 97: 662—667, 1985
- 6) Sasaki I, Suzuki Y, Naito H et al: Effect of Camostat in the treatment of reflux esophagitis after gastrectomy: An experimental study in rats and pilot clinical study. Biomed Res 10(Suppl): 167—173, 1989
- 7) Orlando RC, Powell DW, Carney CN: Pathophysiology of acute acid injury in rabbit esophageal epithelium. J Clin Invest 68: 286—293, 1981
- 8) Kivilaakso E, Fromm D, Silen W: Effect of bile salts and related compounds on isolated esophageal mucosa. Surgery 87: 280—285, 1980
- 9) Goldstein JL, Schmidt LN, Al-Bazzaz FJ et al: Effects of taurine-conjugated bile salts on ionic transport of the rabbit esophageal mucosa. Am J Physiol 251: 688—694, 1986
- 10) 神山泰彦, 佐々木巖, 成井英夫ほか: 閉塞性黄疸および胆汁酸の胃粘膜防御・攻撃因子におよぼす影響—特に、胃粘膜細胞での電解質輸送機能と胃酸分泌について. 日外会誌 91: 464—471, 1990
- 11) 井上正規, 中村雅之, 梶山梧朗: 胆汁酸と逆流性食道炎. Tokyo Tanabe Q (増): 17—23, 1988
- 12) 上安功明, 井尻省悟, 大廻長茂ほか: FOY-305 の術後逆流性食道炎に対する作用(第2報). 日薬理誌 97: 251—257, 1991
- 13) Choi HJ, Goldstein F, Wirts CW et al: Normal duodenal trypsin values in response to secretin-pancreozymin stimulation with preliminary data in patients with pancreatitis disease. Gastroenterology 53: 397, 1967
- 14) Goldstein JL, Schmidt LN, Al-Bazzaz FJ et al: Effects of taurine-conjugated bile salts on ionic transport of the rabbit esophageal mucosa. Am J Physiol 251: 688—694, 1986

- 15) Johnson LF, Harmon JW: Experimental esophagitis in a rabbit model. J Clin Gastroenterol 8(Suppl): 26-44, 1986
- 16) Salo JA, Lehto V-P, Myllarniemi HS et al: Morphological alterations in tryptic esophagitis: An experimental light microscopic and scanning and transmission electron microscopic study in rabbits. J Surg Res 49: 14-17, 1990

Effect of Trypsin and Taurocholate on Electrophysiological Characteristics of Isolated Rat Esophageal Mucosa

Akihiro Iwatsuki, Iwao Sasaki, Yasuhiko Kamiyama, Hiroo Naito,
Yuji Funayama and Seiki Matsuno

First Department of Surgery, Tohoku University School of Medicine

Using Sprague-Dawley rats, the effect of trypsin and taurocholate on the electrophysiological characteristics of isolated esophageal mucosa was studied. After administration of trypsin, both the esophageal transepithelial potential difference (PD) and short circuit current (Isc) were increased and the esophageal transepithelial resistance (Rt) was significantly reduced. On the otherhand, there were no changes in these parameters after administration of taurocholate (TCA). Increased Isc after administration of trypsin was significantly reduced by amiloride administration. These results suggest that active ion transport in the esophageal mucosal cells is impaired by trypsin, but not bile acid in alkaline state. Compared to bile, pancreatic juice has more important role in the pathogenesis of reflux esophagitis after total gastrectomy.

Reprint requests: Iwao Sasaki First Department of Surgery, Tohoku University School of Medicine
1-1 Seiryochō, Aobaku, Sendai, 980-8574 JAPAN