日消外会誌　14（11）：1576～1582，1981年

ストレス実験潰瘍モデルに対するcimetidineの作用

岐阜大学医学部第2外科
大橋　広文　　土屋　十次　　日野　輝夫
伊藤　善朗　　坂田　一記

DIFFERENCE IN EFFECT OF CIMETIDINE IN TWO DIFFERENT EXPERIMENTAL MODELS OF STRESS ULCERATION

Hirofumi OHASHI, Juji TSUCHIYA, Teruo HINO, Yoshiaki ITO and Kazuki SAKATA
Second Department of Surgery, Gifu University School of Medicine

ストレッサーの種類が違う2つのラットストレス胃潰瘍モデル（1)総胆管結紮モデル，2)クモ膜下出血モデル）を作製した．発生せる相対潰瘍長は，1)のモデル20.25±5.45mm，2)のモデル22.33±1.74mmとほぼ同じ程度であった．

これに対してcimetidine 5mg/kg/hrを投与して阻害実験を行ったところ，抑制率は1)のモデル99%，2)のモデル87.5%と差がみられた．抑制率の低い2)のモデルにおいて，cimetidineの投与量を倍の10mg/kg/hrに増量してもほぼ同じ85.7%の抑制率しか得られなかった．2つのモデルの潰瘍発生機序を検討したところ，この抑制率の差はそれぞれのモデルの潰瘍発生機序にはたす胃酸の役割の差と考えられた．

索引用語：ストレス潰瘍，胃酸，cimetidine，クモ膜下出血，総胆管結紮

緒　言

Cimetidineは胃潰瘍，十二指腸潰瘍治療に大きな展望をもたらした[1)2)]．ストレス潰瘍治療におけるcimetidineの効果についての研究も報告されている[3)]．

ストレッサーの種類によって，cimetidineの作用効果に差があるかどうかは検討の価値があるものと考え，実験的検討を行った．

実験方法

a）ストレス潰瘍モデル作製法

Wistar系雄性ラット，体重200～250gを使用し，ストレス胃潰瘍モデル2種類を作製した．

1）総胆管結紮モデル

実験施行前12時間絶食とした．ただし水は自由に与えることとした．（以後，絶食と記す場合は水は自由に与えるものとす．）ether麻酔下に，上，中腹部正中切開を行い，総胆管をlarge pancreatic ductとgreat pancreatic ductの間で2重結紮後切断した．術後3週間，分離ケージに収容し，日本クレア製固型飼料（CE-2）を用い飼育した．

この総胆管結紮後3週間ラットに別に作製した総胆管非結紮Shay-rat[4)5)6)7)]より採取したpH1.49±0.05（M+S.E.）の胃液2mlを胃管を挿入し，one shotで胃内へ注入した．その直後より金網拘束5時間を負荷した．（以後1)のモデルと記す．）

2）クモ膜下出血モデル

ラットを前処置することなく，ether全麻下に，手術用顕微鏡を用い，環椎後頭靱帯を露出した．ここより先端を軽度屈曲した27ゲージ皮内針を刺入した．大槽内に同腹ラットの心穿刺により得た動脈血0.2mlを注入した．術後3日間分離ケージに収容，飼育した後，24時間絶食としてから，拘束水浸を負荷した．拘束ストレスケージは高木ら[8)]のものを参照して作製したものを用い，20℃の緩速循環流水中に胸骨上端まで浸し，3時間放置した．（以後2)のモデルと記す．）

この2つのストレス潰瘍モデルに対して，cimetidine（Smith, Kline and French Labs）5mg/kg/hr,

10mg/kg/hr を拘束負荷前30分に腹腔内へ注入し，阻害実験を行った．すなわち，1)のモデルに対しては5時間の拘束負荷であるので，25mg/kg 2)のモデルに対しては3時間の拘束負荷であるので15mg/kg，30mg/kgを投与した．

b) 潰瘍の検索およびその計測法

Prussian blue 生体染色法[9]を用いた．ストレスケージより解放直後，胃管を用いて1.5%塩化第二鉄溶液2mlを胃内に注入し，30分間放置した．その後，ether 全麻下に断頭屠殺し，直ちに開腹して胃を全摘出した．摘出した胃は大弯側にて切開，粘膜面を流水にてよく洗滌し，これを2%フェロシアン化カリウム溶液中に10分間浸漬した．

青染された潰瘍壊死部を胃の長軸方向に計測した．この際，0.5mm以下のものは潰瘍長に算入せず，0.5mm単位で計測した．相対潰瘍長は潰瘍長総和を当該実験群の全例数で除した値を用いた．組織学的検索として，H—E 染色を施こし，粘膜欠損部の組織像を調べた．

抑制率は次の式を用いて算出した．

$$抑制率(\%)=\frac{対照群潰瘍長-阻害実験潰瘍長}{対照群潰瘍長}\times 100$$

c) 胃酸分泌測定法

1)のモデルを使用し，胃酸分泌能を測定した．開腹操作により経十二指腸的にポリエチレンチューブを胃内に挿入されたラットを Ballman ケージに入れ拘束を負荷した．同時に PSP40μg/mlを加えた生理食塩水を試験液とし，試験液8mlを胃内へ注入し，3mlをsample として吸引し，5mlを胃内に留置し，1時間後に吸引採取し，PSP 濃度，acid output を測定した．この計測は各ラットにつき連続5回5時間行った．PSP濃度測定は日立製の Spectrophotometer により，acid output 測定は1/50N NaOH 溶液で滴定し算出した．cimetidine 25mg/kgは拘束開始30分前に腹腔内へ投与した．

2)のモデルを使用し，同様にポリエチレンチューブを胃内に挿入した．その後12時間絶飲食とし，gravity drainage により，拘束水浸開始時，開始後3，5，7時間後に胃液を採取，1/50N NaOH 溶液で滴定し酸度を測定した．cimetidine15mg/kgは拘束水浸開始30分前に腹腔内に投与した．

d) Colloidal carbon 注入法による胃粘膜内血液分布測定法

2)のモデルを使用した．拘束水浸終了直後の被検モデルラットを ether 麻酔下に開胸，開腹した．ポリエチレン製 V_1 ヴェニューラ（外径1.6mm，内径1.1mm）を腹部大動脈内に挿入し，130～140mmHg に加圧した colloidal carbon（Pelikan Werke-Günther Wagner 社製"C11/1431a"）を30秒間にわたり浸透させた．注入直後，黒色化した胃を摘出し，10%ホルマリン固定後，セロイジン包埋した．

腺胃部で横軸方向に厚さ100μ の切片を作製，無染色標本で，Arabehety ら[10]の方法に従い，腺胃部胃壁毛細血管に浸透，充満した colloidal carbon を吸光度測定することにより，胃粘膜内血液分布を検索した．

吸光度計を連結した顕微鏡下で，1000倍の倍率で拡大しつつ，腺胃部粘膜を表層，中層，深層の3層に分けて吸光度 m を測定した．

吸光度測定箇所は，marginal fold より，40倍の視野半径2.25mmの距離をへだてて，腺胃部粘膜の前，後壁に向って各々3ヶ所ずつ定点観測し，同時に直下の固有筋層部吸光度 M も計測した．吸光率は

$$吸光率(\%)=\frac{M-m}{M}\times 100$$

で算出した．

cimetidine15mg/kgは拘束水浸開始30分前に腹腔内に投与した．

なお一部の標本では H-E 染色を施し，血管構築と組織の関係を検討した．

得られた測定値は M+S.E.で表示し，有意差検定は Student's t test を使用した．

実験結果

a) モデル実験でみられる胃潰瘍の性状および cimetidine による阻害実験結果

Prussian blue 生体染色法[9]を用いて染色された潰瘍は腺胃部のみに発生し，胃の長軸方向に平行に，皺

図1 モデル1，Prussian blue 生体染色された胃内腔．潰瘍は腺胃部のみに発生．

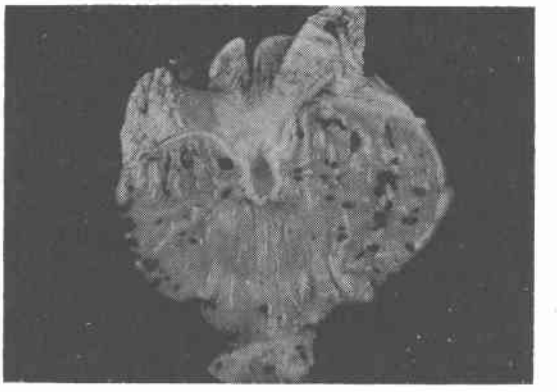
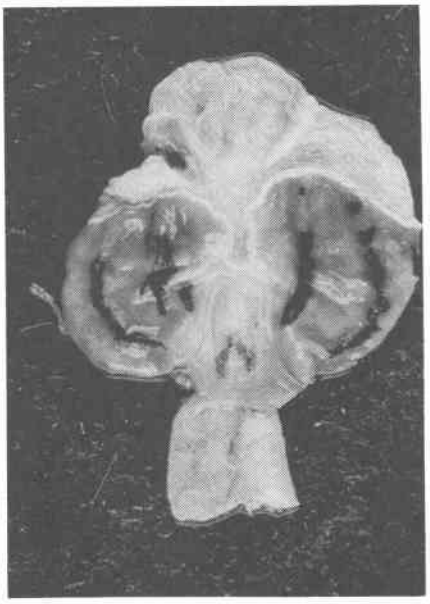


図2　モデル2，Prussian blue 生体染色された胃内腔．潰瘍は腺胃部のみに発生．



壁上を尾根を伝うように連なっているのがみられた．

2つのストレス潰瘍モデルにおける差異をしいて挙げるならば，1)のモデルにおいては，皺壁の尾根を点状に連なり，2)のモデルにおいては帯状に連なることが多かった．また2)のモデルにおいては，浮腫状の白斑部が先行し，その中心部より青染された潰瘍が発生してくる順序が明瞭に認められた．

組織学的には1)のモデル，2)のモデルとも，粘膜筋板までほとんど達しない Ul-1 の浅い潰瘍であった．

1)のモデルにおける血清総ビリルビン値は7.02±

図3　モデル1の腺胃部粘膜組織所見（×40）．UL-1の浅い潰瘍．

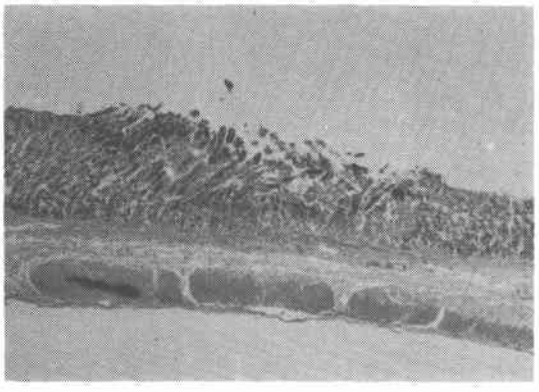
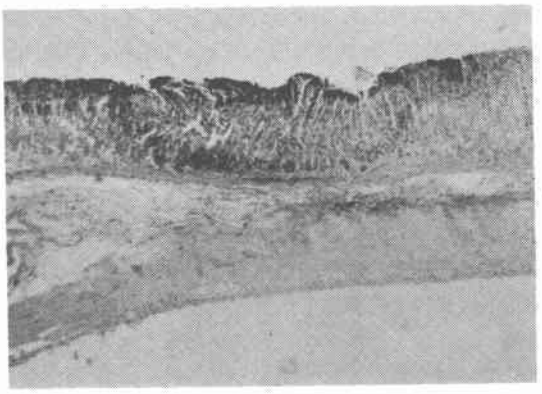


図4　モデル2の腺胃部粘膜組織所見（×40）．UL-1の浅い潰瘍．



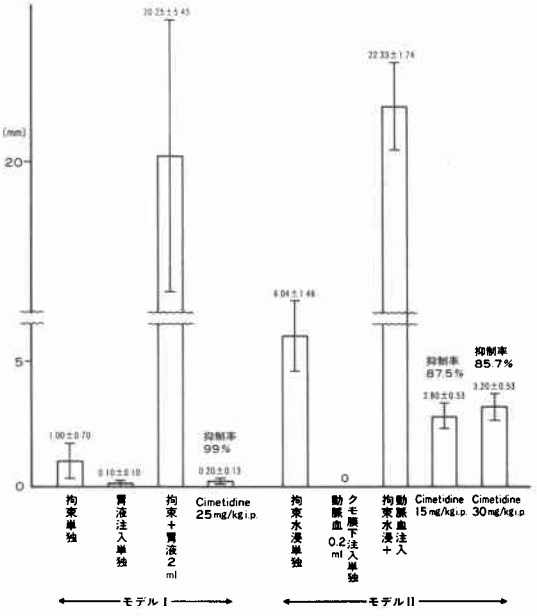
0.49mg/dlで，総胆管は嚢腫状に著明に拡張していた．

総胆管結紮後3週ラットに金網拘束5時間のみ加えた場合の相対潰瘍長は1.00±0.70mm，Shay-rat[4)5)6)7)]の胃液2mlのみ加えた場合のそれは0.10±0.10mmとほとんど腺胃部潰瘍は出来ない状態であった．

しかし，この2つの負荷を加算した1)のモデルの相対潰瘍長は20.25±5.45mmであった．

正常ラットを24時間絶食としたのち，3時間の拘束水浸を負荷すると，相対潰瘍長は，6.04±1.46mmであった．クモ膜下出血単独では潰瘍はできなかった．

図5　相対潰瘍長（M±S.E.）と Cimetidine による阻害実験



しかし，この２つの負荷を加算した2)のモデルの相対潰瘍長は22.33±1.74mmであった．

ストレッサーの種類が違うと考えられる２つの実験モデルにおいて，発生せる相対潰瘍長は20.25±5.45mm，22.33±1.74mmとほぼ同じ程度であったが，cimetidine 5 mg/kg/hr に対する抑制率は99%，87.5%と差がみられた．抑制率の悪い2)のモデルにおいて，cimetidine の投与量を倍の10mg/kg/hr に増量しても，ほぼ同じ85.7%の抑制率しかみられなかった．

図６　拘束ストレス下の酸分泌能

（M±S.E.）

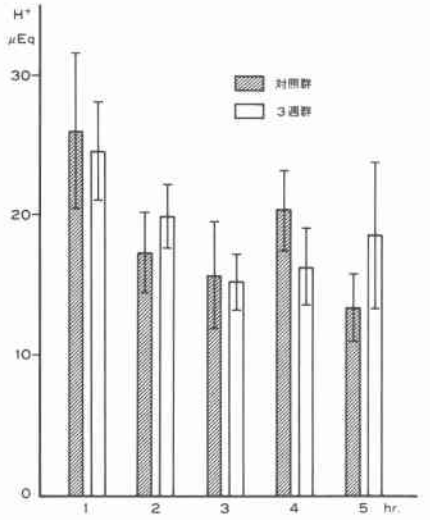
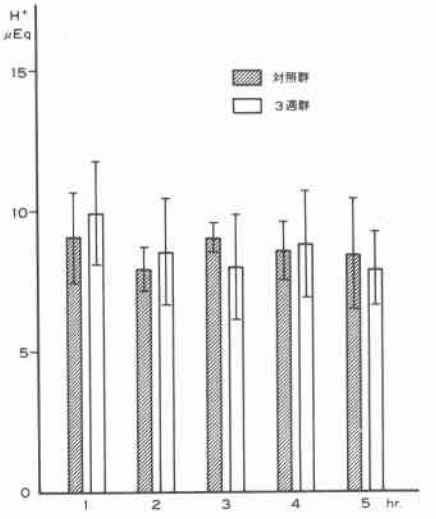


図７　拘束ストレス下の酸分泌能
（Climetidine 投与）　　（M±S.E.）



b）　胃酸分泌測定結果

1)のモデルにおける胃酸分泌能は，拘束開始１時間で，無処置対照群は26.01±5.59μEq/hr．モデル群は24.57±3.56μEq/hr であり，拘束開始５時間では，それぞれ，13.48±2.47μEq/hr，18.65±5.28μEq/hr であった．対照群とモデル群の間に著明な差はなく，総胆管結紮ラットにおける胃酸分泌能異常は認められなかった．

cimetidine 投与群では，拘束開始１時間で，対照群9.07±1.62μEq/hr，モデル群9.91±1.85μEq/hr であ

図８　拘束水浸下胃液酸度

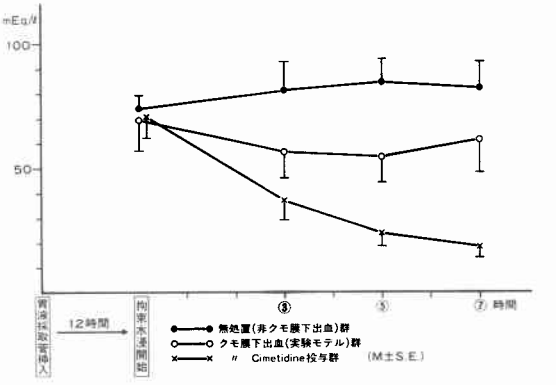
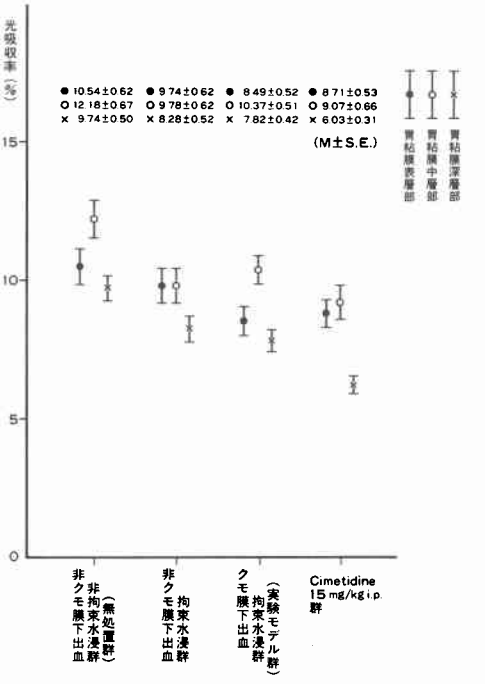


図９　胃粘膜内血液分布



り，拘束開始5時間では，それぞれ8.46±1.97μEq/hr，7.96±1.33μEq/hrであった．

cimetidine投与による著明な減酸効果を認めたが，対照群とモデル群との間に有意の差を認めなかった．

2)のモデルを使用しての拘束水浸下胃液酸度測定では，無処置群は全経過中，70～80mEq/ℓの高酸状態を維持した．実験モデル群では60mEq/ℓ程度で，無処置群に比し軽度減酸がみられた．cimetidine投与群では，拘束水浸開始後3時間37.72±8.32mEq/ℓ，5時間23.15±5.79mEq/ℓ，7時間18.93±4.91mEq/ℓと時間の経過とともに著明に減酸した．

c)　胃粘膜内血液分布測定結果

無処置群，2)のモデル群の粘膜表層部における吸光率は，各々10.54±0.62%，8.49±0.52%で両者の間に有意の差を認めた（$p<0.025$）．しかし2)のモデル群と，これにcimetidine 15mg/kgを投与した阻害実験群との間に有意の差を認めなかった．

図10　モデル2のcolloidal carbon注入による潰瘍周囲の血管構築像（×400）．

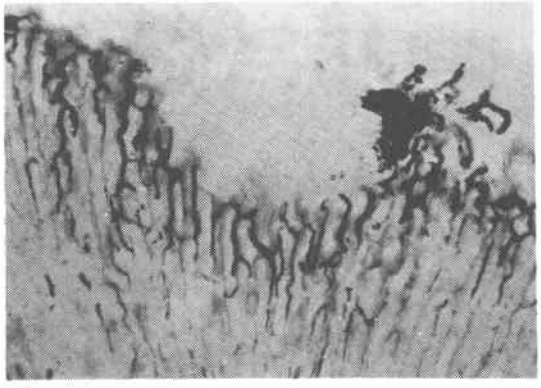
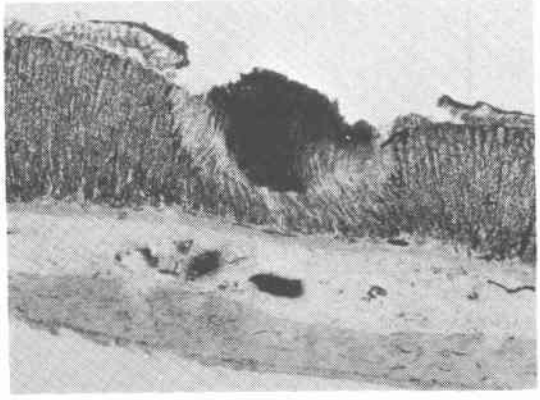


図11　モデル2のcolloidial carbon注入腺胃部粘膜組織所見（×40）．



粘膜深層部では，無処置群に比し，拘束水浸単独群，実験モデル群，cimetidine投与群で吸光率減少を示した．

図10は2)のモデルにおける潰瘍部周辺のcolloidal carbon注入の標本の写真である．潰瘍周囲のprespastic dilatation部の吸光率は17.46±1.05%で，非潰瘍部の8.89±0.48%の間に有意の差を認めた（$p<0.001$）．

図11に示す様にH-E染色を施すと，潰瘍周囲にドーナツ状に血管構築のみられない部分を認めた．これは潰瘍周囲の浮腫と考えられた．

考　察

1)のモデルにおける拘束負荷5時間後のcimetidine 5mg/kg/hrの酸分泌能抑制率は57.32%，2)のモデルにおける3時間のそれは33.64%であった．しかし，2)のモデルにおいて，潰瘍形成の著しい実験モデルの方が無処置群より低酸を示したのは，Davenport[11]が指摘する様に水素イオンの逆拡散によるものと考えられた．それで，無処置群と比較した抑制率を算出すると53.44%と1)のモデルのそれとほぼ同じ値を得た．

このことからストレッサーの違う2つのストレス実験潰瘍モデルにおいて，cimetidineの胃酸分泌に対する作用は同じであると考えられた．

しかし，ほぼ同じ相対潰瘍長が発生する2つのストレス実験潰瘍モデルにおいて，cimetidine5mg/kg/hrによる腺胃部潰瘍発生抑制率は1)のモデル99%，2)のモデル87.5%と差がみられた．抑制率の悪い2)のモデルにおいて，cimetidineの投与量を倍の10mg/kg/hrに増量しても，ほぼ同じ85.7%の抑制率しかみられなかった．Levineら[3]はラットに4℃で3時間の拘束負荷を課し，ストレス潰瘍を作製しているが，拘束前30分にcimetidine20mg/kgを腹腔内に投与すると，著明な抑制の起ることを報告した．報告されている潰瘍長から計算すると抑制率は85.7%であった．

以上のことにより，2つのストレス実験潰瘍モデルにおいて，潰瘍発生機序における胃酸の役割が若干異なることが想定された．

2)のモデルについての検討は当教室の土屋ら[12]により報告されているが，実験結果のところで記載した如く，1)のモデルに比し，潰瘍周囲の浮腫が目立つ様であった．このことは2)のモデルのみに行ったcolloidal carbon注入による腺胃部粘膜内血液分布の結果により裏付られている．

Arabehety ら[10]がはじめ，その後数多くの研究者[13)14)15)]が追試しているこの方法は粘膜内血流量を動的にとらえるものでないが，血流の変化を測定するには適した方法と考えられる．

2)のモデルにおいて，相対潰瘍長22.33±1.74mmを発生させる因子として，腺胃部粘膜表層部の虚血性の重要性が指摘され，また cimetidine は血流の変化に影響を及ぼさないことが示された．

1962年 Brodie[16]がラットにおけるストレス潰瘍形成に血管変化が重要な役割を演じることを指摘した．Guth ら[17]，Dai ら[15]は胃粘膜内血管の拡張．Goldman ら[18]は胃粘膜内虚血を主張した．

著者らの実験において，潰瘍周囲の prespastic dilatation 部の吸光率は17.46±1.05%，非潰瘍部のそれは8.89±0.48%であった．このことは潰瘍発生に伴ない，虚血から血管怒張へ変わりうることを示す．Guth ら[17]，Dai ら[15]と Goldman ら[18]の指摘が一見矛盾するようにみえるが，それぞれの指摘が胃粘膜内血流動態の一断面をとらえていることに思いをいたすとき，矛盾はないものと考える．

1)のモデルにおいては，自己の分泌する胃酸の他に Shay-rat[4)5)6)7)]より採取した pH1.49±0.05の胃液 2 mlを one shot で胃内へ注入しているので，この胃酸負荷が潰瘍発生の決定的要因と思われる．この1)のモデルを追求している当教室の日野らによると，人工胃液（第 9 局方[19]による pepsin を含まない pH1.2の希塩酸液） 2 mlを注入した場合の相対潰瘍長は2.45±1.16 mm，同人工胃液に pepsin500U/mlを含むもの 2 mlを注入した場合の相対潰瘍長は1.65±1.07mmとほとんど潰瘍は発生しなかった．

又 atropine sulfate（皮下注）を使用しての1)のモデルでの阻害実験の抑制率は50μg/kg投与で92.1%．大量投与の 8 mg/kgで98%であつた．

Levine ら[3]は先に触れた cimetidine を投与されたストレス潰瘍モデルラットに，拘束開始時，0.1N HCl 3 mlを nasogastric tube を通じて胃内へ注入すると，対照群に匹敵する腺胃部潰瘍発生をみたと報告している．

Dai ら[20]は Shay-rat[4)5)6)7)]を 4 ℃で 2 時間拘束負荷を課するストレス潰瘍モデルを作り，metiamide 4×10^{-4}mol/kg，atropine sulfate 0.8mg/kgを用いて阻害実験を行った．その抑制率はそれぞれ50%，43.8%であった．

著者らが1)のモデルに注入した Shay-rat[4)5)6)7)]胃液内 gastrin 含有量は528.68±84.98pg/ml（未発表データ，大塚アッセイ研究所へ依頼し，radioimmunoassay 法により測定した．）と高値を示した．

gastrin が胃液内に多量に分泌されることは認められた事実である[21)~25)]が，胃液内の gastrin が胃酸分泌に対して生理作用を有するとするもの[26)~28)]と，有しないとするもの[25)29)]があり，未だ決定をみていない．

1)のモデルにおいて，Shay-rat[4)5)6)7)]より得た胃液注入群にのみ潰瘍発生をみた機序は現段階ではわからない．Shay-rat[4)5)6)7)]胃液の方が viscosity 等の点からして，胃内に滞溜する時間が長く，腺胃部粘膜に胃酸が作用する時間が長いためでないかとも推論されうる．

総胆管結紮ラットにおける胃酸分泌能異常は認められず，cimetidine 投与による著明な減酸効果も，モデル群と対照群との間に有意の差を認めなかった．

著者らの 2 つのストレス潰瘍モデルにおいて，その潰瘍発生機序に各モデルラットの胃から分泌される胃酸が重要な役割をはたしていた．Mersereau ら[30]も胃酸がなければけっして腺胃部潰瘍が発生しないことを gastric chamber technique を用いて示した．

2 つのモデルの阻害実験における cimetidine の作用は胃酸分泌を抑制する薬理作用によるものと考えられた．cimetidine 5 mg/kg/hr 投与に対する抑制率が1)のモデル99%，2)のモデル87.5%と差がみられたのは，潰瘍発生機序にはたす胃酸の役割が，ストレッサーの違う 2 つのモデルで差があるためと結論した．

結　語

ほぼ同じ相対潰瘍長が得られる，ストレッサーの種類が違う 2 つのラットストレス潰瘍モデルを作製した．これに対して cimetidine 5 mg/kg/hr を投与して阻害実験を行ったところ，抑制率は99%，87.5%と差がみられた．抑制率の低いモデルにおいて，cimetidine の投与量を倍の10mg/kg/hr に増量してもほぼ同じ85.7%の抑制率しか得られなかった．2 つのモデルの潰瘍発生機序を検討したところ、この差はそれぞれのモデルの潰瘍発生機序にはたす胃酸の役割の差と考えられた．

本論文の要旨は，第67回日本消化器病学会総会（東京，1981年）で報告した．

文　献

1) Freston, J.W.: Cimetidine in the treatment of gastric ulcer. Review and commentary. Gastroenterology, 74: 426--430, 1978.

2) Winship, D.H.: Cimetidine in the treatment of duodenal ulcer. Review and commentary. Gastroenterology, 74: 402—406, 1978.
3) Levine, B.A., et al: The role of cimetidine in the prevention of stress induced gastric mucosal injury, Surg. Gynecol. & Obstet., 148: 399—402, 1979.
4) Shay, H., et al: A Simple method for the uniform production of gastric ulceration in the rat. Gastroenterology, 5: 43—61, 1945.
5) Shay, H., et al: A quantitative method for measuring spontaneous gastric secretion in the rat. Gastroenterology, 26: 906—913, 1954.
6) Ohashi, H.: Change of gastric function following massive resection of the small intestine in the rat. Jpn. J. Surg., 2: 156—165, 1972.
7) Ohashi, H.: Effect of secretin on gastric function in the enterectomized rat. Acta Scholae Medicinalis Universitatis in Gifu, 27: 570—580, 1979.
8) Takagi, K., et al: The effects of drugs on the production and recovery processes of the stress ulcer. Jap. J. Pharmac., 18: 9—18, 1968.
9) Robert, A., et al: Histopathology of steroid-induced ulcer. Arch, Path., 77: 407—423, 1964.
10) Arabehety, J.T., et al: Sympathetic influence on circulation of the gastric mucosa of the rat. Amer. J. Physiol., 197: 915—922, 1959.
11) Davenport, H.W.: Gastric mucosal injury by fatty and acetylsalicylic acids. Gastroenterology, 46: 245—253, 1964.
12) 土屋十次ほか：実験的クモ膜下出血と弱い拘束水浸の組合せによるストレス潰瘍について．自律神経，17：201—208，1980.
13) Nicoloff, D.M., et al: Effect of catecholamines on gastric secretion and blood flow. Ann. Surg., 159: 32—36, 1964.
14) Guth, P.H., et al: Microcirculatory and mast cell changes in restraint-induced gastric ulcer. Gastroenterology, 50: 562—570, 1966.
15) Dai, S., et al: Effects of stress and of autonomic blockers on gastric mucosal microcirculation in rats. Eurpopean J Pharmacol., 30: 86—92, 1975.
16) Brodie, D.A.: Ulceration of the stomach produced by restraint in rats. Gastroenterology, 42: 107—109, 1962.
17) Guth, P.H.: Gastric blood flow in restraint stress. Amer. J. Digest. Diseases, 17: 807—813, 1972.
18) Goldman, H., et al: Pathogenesis of acute gastric stress ulcers. Amer. J. Pathol., 52: 227—244, 1968.
19) 日本公定書協会：第9改正日本薬局方，B-224，広川書店，東京，1976.
20) Dai, S., et al: The effect of metiamide on gastric secretion and stress ulceration in rats. European J. Pharmacol., 33: 277—282, 1975.
21) Sircus, W.: Evidence for a gastric secretagogue in the circulation and gastric juice of patients with Zollinger-Ellison syndrome. Lancet, 2: 671—672, 1964.
22) Jordan, P.H., et al: The presence of gastrin in fasting and stimulated gastric juice of man. Surgery, 72: 352—356, 1972.
23) Jordan, P.H., et al: Origin of gastrin in gastric juice. Am. J. Surg., 128: 336—339, 1974.
24) Uvnäs-Wallensten, K.: Occurrence of gastrin in gastric juice, in antral perfusate of cats. Gastroenterology, 73: 487—491, 1977.
25) Hengels, K.J., et al: Evidence for the existence of gastric juice gastrin in man and its relevance to acid secretion. Scand. J. Gastroenterol. 13 (Suppl 49): 88, 1978.
26) Morrell, M.T., et al: Absorption of pentagastrin from gastrointestinal tract in man. Lancet, 2: 712, 1975.
27) Hedenbro, J.L., et al: Binding of luminal gastrin to canine parietal mucosa in vitro. Gastroenterology, 74: 1045, 1978.
28) Fiddian-Green, R.G,., et al: A physiological role for luminal gastrin?. Surgey, 83: 663—668, 1978.
29) Ayalon, A., et al: Does luminal gastrin stimulate gastric acid secretion?, Am. J. Surg., 141: 94—97, 1981.
30) Mersereau, W.A., et al: Effect of gastric acidity on gastric ulceration induced by hemorrhage in the rat, utilizing a gastric chamber technique. Gastroenterology, 64: 1130—1135, 1973.