

9341 腸管での食塩吸収を調節する体液性因子ならびに腸管内環境に関する研究

助成研究者:M.R.フォトリ(香川医科大学 医学部)

共同研究者:細見 弘,西田 育弘(香川医科大学)

植村 信久,鈴木 俊示(香川医科大学)

村上 宏(香川医科大学)

【目的】 空腸での水とNaClの吸収に対するエンドセリン(ET1とET3)の影響を明らかにし、その作用機序の解明を目的とした。

【方法】 イヌをネンブータル麻酔下で開腹し、空腸ループを作成した。ループにRinger液(30ml)を注入し、15分後回収してその量とNaとCl濃度を測定した。注入液と回収液の液量とNaとCl濃度の差から水およびNaとClの吸収量を求めた。この吸収実験を、上腸間膜動脈に生理的食塩水、ET1あるいはET3(25ng/kg/min)などを注入しながら行った。

【結果と考察】 生理的食塩水注入時の結果と比較し、ET1によって吸収量は変化せず、ET3によって減少した。ET3による腸管吸収抑制が、腸循環動態の変化によるものか否かを調べるため、上腸間膜動脈圧と血流量、肝門脈圧を測定した。ET1とET3による腸循環動態の変化はほぼ同じであった。したがって、ET3による腸管吸収抑制は、腸循環動態の変化によるものではないと考えられた。これをさらに確認するため、フェニレフリン(PE)を用い、ET3と同程度の上腸管膜動脈血流量の低下をシミュレートし、この時の腸管吸収を調べた。PE注入は吸収量に影響しなかった。したがって、ET3の腸管吸収抑制作用は、腸循環動態の変化によるものではなく、腸粘膜に直接働いて水およびNaとClの吸収を抑制するものと考えられる。次に、ET3による腸管吸収抑制作用の機序を検討した。NO合成酵素阻害剤であるニトローL-アルギニンメチルエステルを用いて空腸ループを前処置したが、ET3による腸管吸収抑制作用は阻止できなかった。したがって、ET3による腸管吸収抑制作用はNOを介するものではない。また、cGMP合成阻害剤であるメチレンブルー(MB)がET3による腸管吸収抑制作用を阻止するかどうかを調べた。MBによってもET3の腸管吸収抑制作用を阻止できなかった。したがって、ET3による腸管吸収抑制作用はcGMPを介した作用でもない。

【結論】 ET3は、空腸での水ならびにNaとClイオンの吸収を抑制することで体液量調節に関与している。しかし、その作用機序は未だ不明である。

9341 腸管での食塩吸収を調節する体液性因子ならびに腸管内環境に関する研究

助成研究者:M. R. チョウトリ(香川医科大学 医学部)

共同研究者:細見 弘, 西田 育弘(香川医科大学)

植村 信久, 鈴木 俊示(香川医科大学)

村上 宏(香川医科大学)

研究目的

内皮由来の血管収縮物質として発見されたEndothelin¹⁾ファミリーは、ナトリウム利尿と利尿の促進²⁾、レニン分泌³⁾と腎臓でのNa⁺-K⁺-ATPaseの抑制⁴⁾をする。また、腸管にも分布⁵⁾するため、腸管での水と電解質の吸収と分泌の調節にも影響している可能性がある。Endothelinファミリーには、ET-1、ET-2とET-3があり、ET-3は、その構造⁶⁾、薬理作用⁶⁾、生体内分布がET-1やET-2とは異なっている⁷⁾ため、ET-1やET-2とは異なる生理作用を有してると考えられる。本研究では、空腸での水とNaとClの吸収に対するET-1とET-3の影響を明らかにすることを目的とした。

研究方法

実験には52頭の雑種成犬を用いた。ネンブータル麻酔下で、Treitzの靭帯より10cm肛門側より30cmの空腸ループを作成した⁷⁾。吸収実験は、Ringer氏液30mlを空腸ループ内に注入し、15分後に排出させ、注入液量と排出液量の差よりnet吸収量を求めた。また、注入液と排出液のNaとClの濃度を測定しそれぞれの吸収量を求めた。Naの濃度は炎光光度計で測定し、Clの濃度はClカウンターによって測定した。腸管循環に与える影響を調べるため、上腸管膜動脈に血流量測定用の超音波血流ドプラー血流プローブを装着し、動脈圧測定用ならびに薬物注入用のカテーテルを挿入した。また門脈には門脈圧測定用のカテーテルを挿入した。

Protocol-1:22頭のイヌにつき3回ずつの吸収実験を行った。第1回目は、生理的食塩水(0.01ml/kg/min)を上腸管膜動脈内に投与しながら吸収実験(コントロール実験)を行った。10分後に第2回目の実験を行った。第2回目は、ET-1(25ng/kg)、ET-3(25ng/kg)またはフェニレフリン(PE:2 μ g/kg/min)を上腸管膜動脈内に投与しながら

吸収実験を行った。30分後に第3回目の実験を行った。第3回目の吸収実験は、再度コントロール実験であった。Protocol-2:ET-3による吸収抑制作用の発現に腸管循環の変化が関与しているか否かを調べるため、18頭のイヌにProtocol-1の第2回目と同様の投与実験を行いながら、上腸管膜動脈圧、門脈圧、上腸管膜動脈血流を連続測定した。さらに、上腸管膜動脈の血管抵抗を求めた。Protocol-3:ET-3による吸収抑制作用の発現にNOが関与しているか否かを調べるため、6頭のイヌを用い、第1回目にコントロール実験、第2回目にET-3(25ng/kg)を上腸管膜動脈内に投与しながら吸収実験を行い、10分後にNO合成阻害薬nitro-L-arginine methyl ester(L-NAME)(20mg/kg)を静脈内投与し、さらに10分してET-3を上腸管膜動脈内に投与しながら吸収実験を行った。Protocol-4:ET-3による吸収抑制作用の発現にcGMPが関与しているか否かを調べるため、6頭のイヌを用い、第1回目にコントロール実験を行い、続いて3mg/kg/minの速度でmethylene blue (MB)を上腸管膜動脈内に投与しながら第2回目の吸収実験を行い、その後MBとET-3(25ng/kg)を上腸管膜動脈内に投与しながら第3回目の吸収実験を行った。

研究結果

ET-1の腸管循環に及ぼす影響を調べた (Fig.1)。ET-1の局所投与により、投与領域の血流が減少した。しかし、この投与量では体循環血圧は変化しなかった。一方、ET-1投与中の門脈血圧は上昇した。これらの値から求めた投与領域の血管抵抗は上昇した。また、大静脈圧は上昇しないと考えられるので、門脈から肝静脈に至る血管抵抗が上昇した。腸管での水とNaClの吸収に対して、ET-1は全く影響を及ぼしていなかった (Fig.2)。Fig.3は、ET-3の腸管循環に対する影響を調べたものである。ET-1と同様、血流量は減少し、動脈圧は変化せず、門脈圧はET-3の投与中のみ上昇した。したがって、投与領域の血管抵抗は上昇した。また、肝内血管抵抗は増大した。Fig.4は、ET-3の上腸管膜動脈内への投与によって、netの溶液とNaClの吸収は有意に抑制された。このET-3による抑制作用は、ET-3の投与中止後30分でほぼ元のレベルにまで回復した。Fig.5は、PEの上腸管膜動脈内投与時の腸管循環に対する影響を調べたものである。PE投与中のみ、上腸管膜動脈の血管抵抗が上昇し、血流が減少した。しかし、ET-1やET-3とは異なり、門脈血圧は上昇しなかった。したがって、ET-1やET-3で見られた肝内血管抵抗の上昇はみられなかった。Fig.6は、腸管での水とNaClの吸収に対するPEの影響を調べたものである。PEは、腸管での吸収には全く影響しなかった。したがって、血管抵抗の上昇、灌流血液量の減少などは吸収抑制の原因にはならない。ET-3による腸管吸収の抑制機序に、NOを介する情報伝達経路が関与しているか否かを明らかにするため、NO合成阻害薬 (L-NAME) で前処置し

た後吸収実験を行った。Fig.7に見られるように、L-NAMEによってET-3の作用は消失しなかった。したがって、ET-3の作用はNOを介してはいない。ET-3の作用機序にcGMPが関与しているか否かを調べるために、MBによって前処置したのちET-3投与下で吸収実験を行った。MBで前処置してもET-3の吸収抑制作用は残っていた。したがって、cGMPはET-3による吸収抑制作用の機序には関与していない。

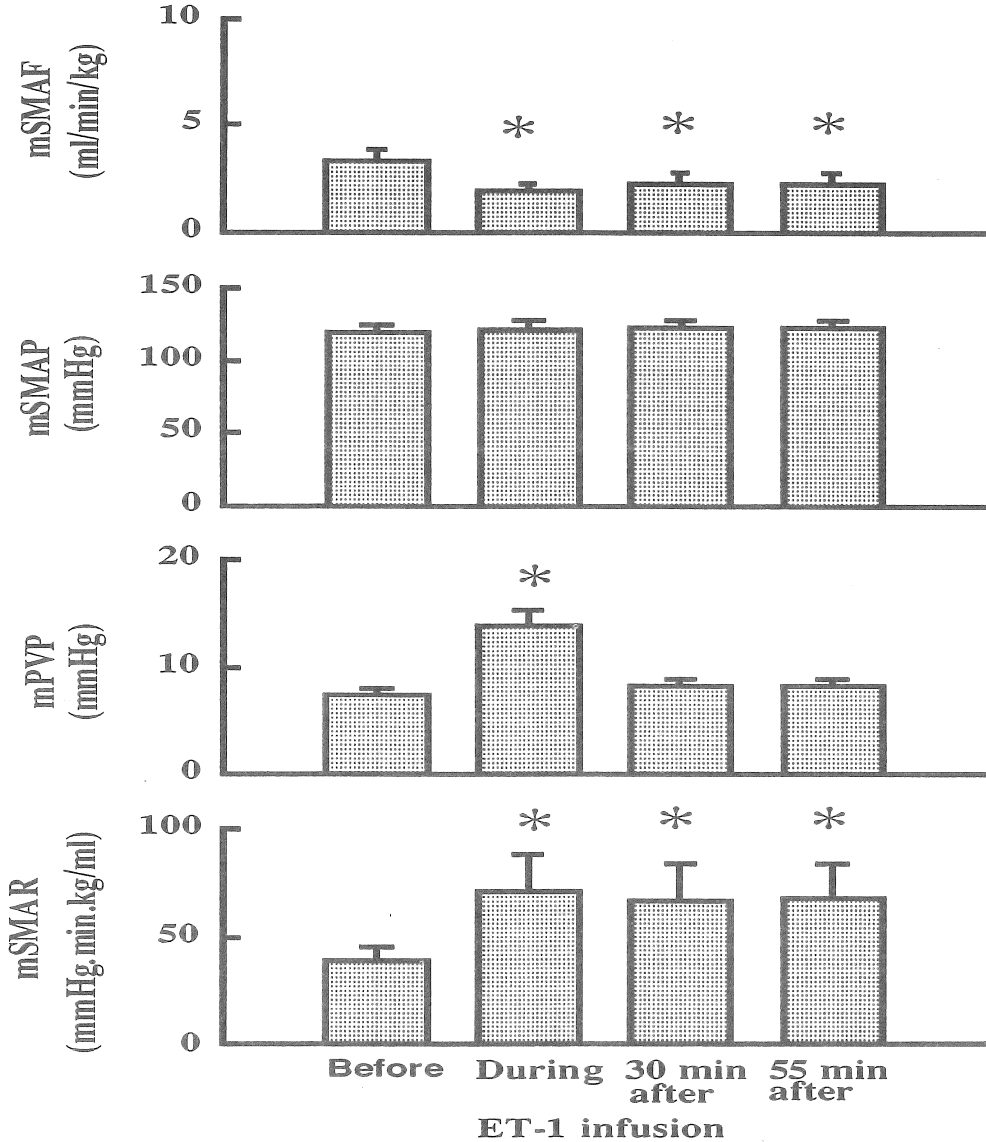


Fig 1 Effects of ET-1 on mesenteric hemodynamics.

*p<0.05 is significantly different from the saline infusion (Before). mSMAF: mean superior mesenteric arterial flow, mSMAP: mean superior mesenteric arterial pressure, mPVP: mean portal vein pressure, mSMAR: mean superior mesenteric arterial resistance.

考察

本研究では、ET-1とET-3の空腸におけるnetの水とNaClの吸収に対する影響ならびに腸管循環に対する影響を調べた。その結果、以下の4つの結論を得た。1)ET-3は空腸におけるnetの水とNaClの吸収を抑制するが、ET-1は抑制しない。2)ET-1とET-3は共に門脈圧を上昇させる。3)ET-1とET-3は共に上腸管膜動脈血流量を減少させる。4)ET-3による腸管でのnetの水とNaClの吸収抑制はNOやcGMPを介した反応ではない。

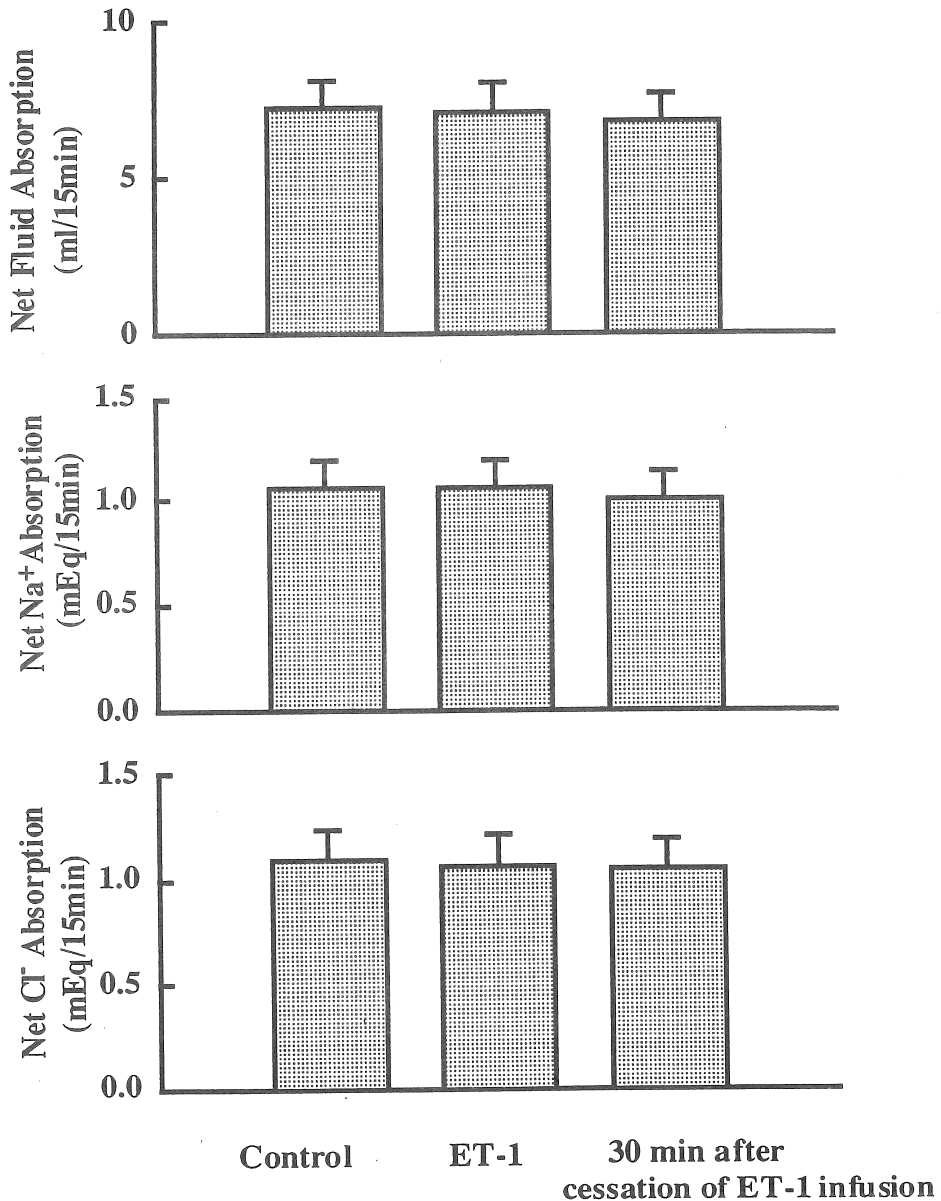


Fig. 2 Effects of ET-1 on fluid and NaCl absorption.

ET-3の空腸領域への経動脈的投与によって空腸からの水とNaClの吸収が抑制されるという報告はなく、また摘出した空腸や培養細胞に対する影響を調べた報告もない。BrownとSmith⁸⁾は、ET-3を摘出回腸の漿膜側に投与すると short-circuit current (Isc) が増加すること、すなわちNaClの移動が減少すること、を報告した。さらに、このET-3の作用がプロスタグランジンE2 (PGE2)、トロンボキサンA2、またはプ

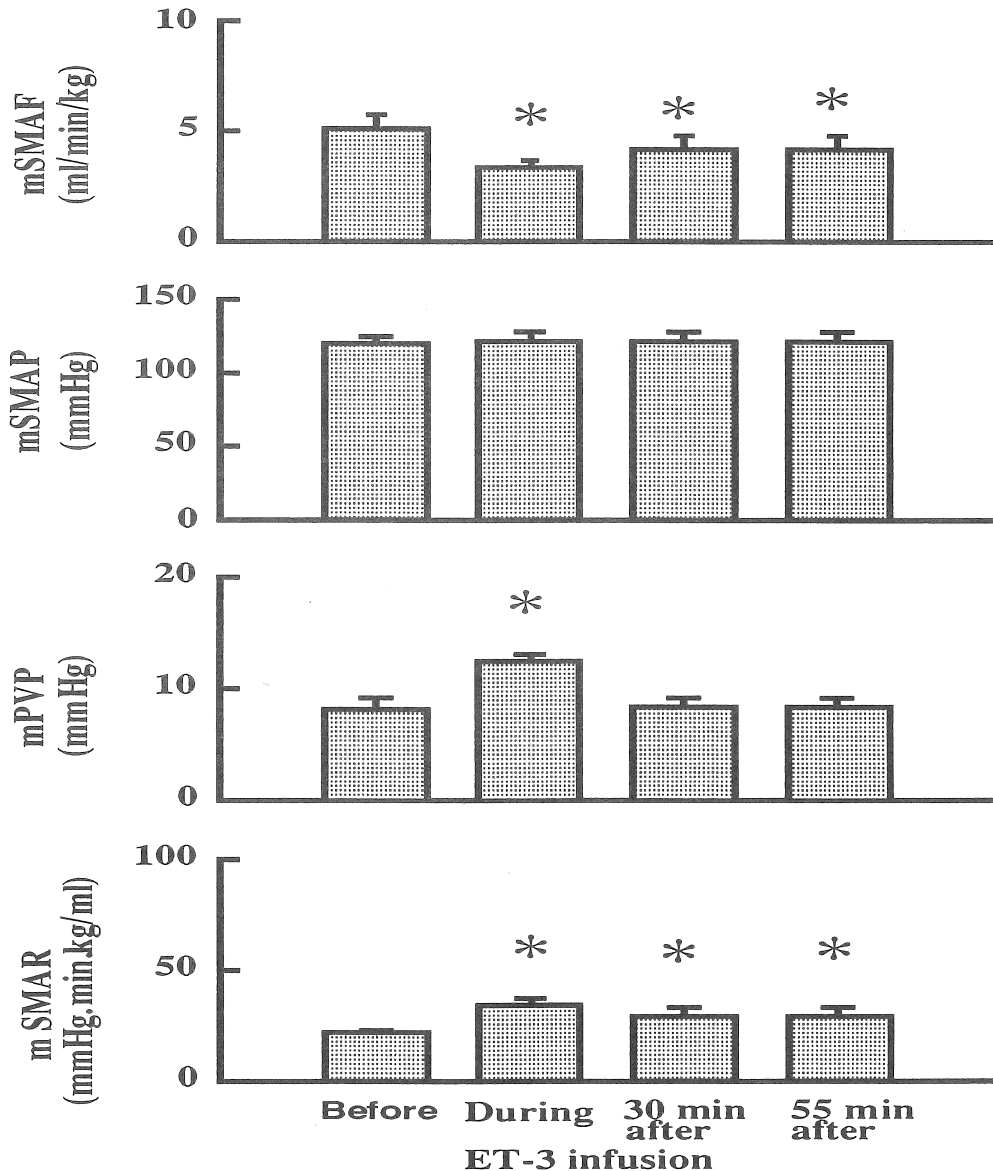


Fig 3 Effects of ET-3 on mesenteric hemodynamics.

The abbreviations are same as used in Fig. 1.

* $p < 0.05$ is significantly different from the saline infusion (Before).

ロスタサイクリンを介するものではないことを示した。ET-3には血管弛緩作用があることが知られているので、我々はET-3が受容体を介して直接あるいは内皮由来の弛緩物質NOを介して間接的にcGMPを増加させて吸収抑制をしている可能性を考えた。これを調べるため、NOの合成阻害薬 (L-NAME) を投与した後、ET-3の吸収抑制効果を調べた。L-NAMEは、効果がなかった。したがって、NOを介した反応ではないことが判明した。さらに、ET-3が直接cGMPの合成を刺激しているか否かを調べるため、cGMPの合成阻害薬 (MB) にて前処置した後、ET-3の作用を調べた。

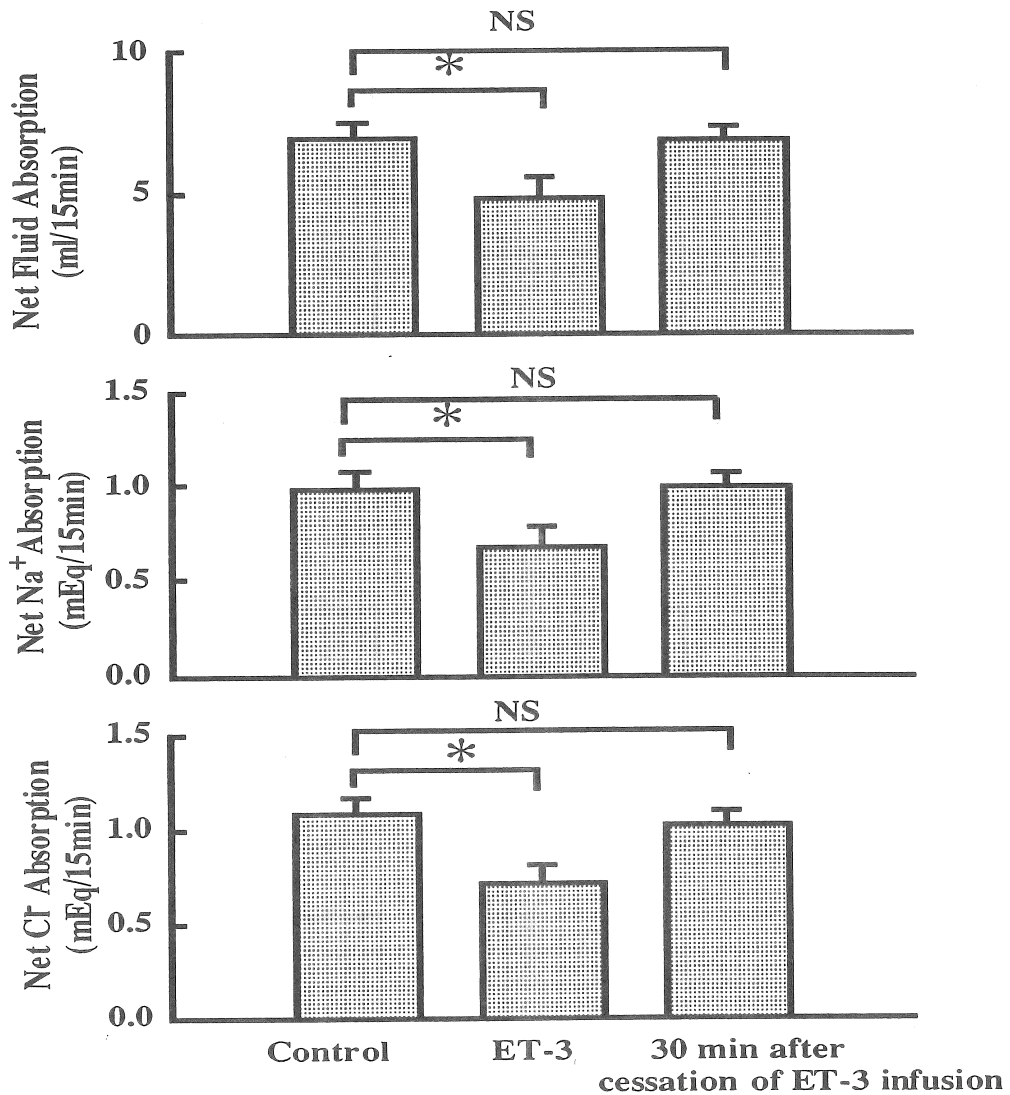


Fig. 4 Effects of ET-3 on fluid and NaCl absorption.

*p<0.05 is significantly different from the saline infusion (Control).

MBは、効果がなかった。したがって、cGMPを介する経路でもないことが判明した。以上より、ET-3の作用機序は明らかにはならなかった。ET-3が、全く新しい受容体を介して腸管の吸収を調節している可能性も残されている。ET-3の作用機序に関しては、解決されなければならない問題である。

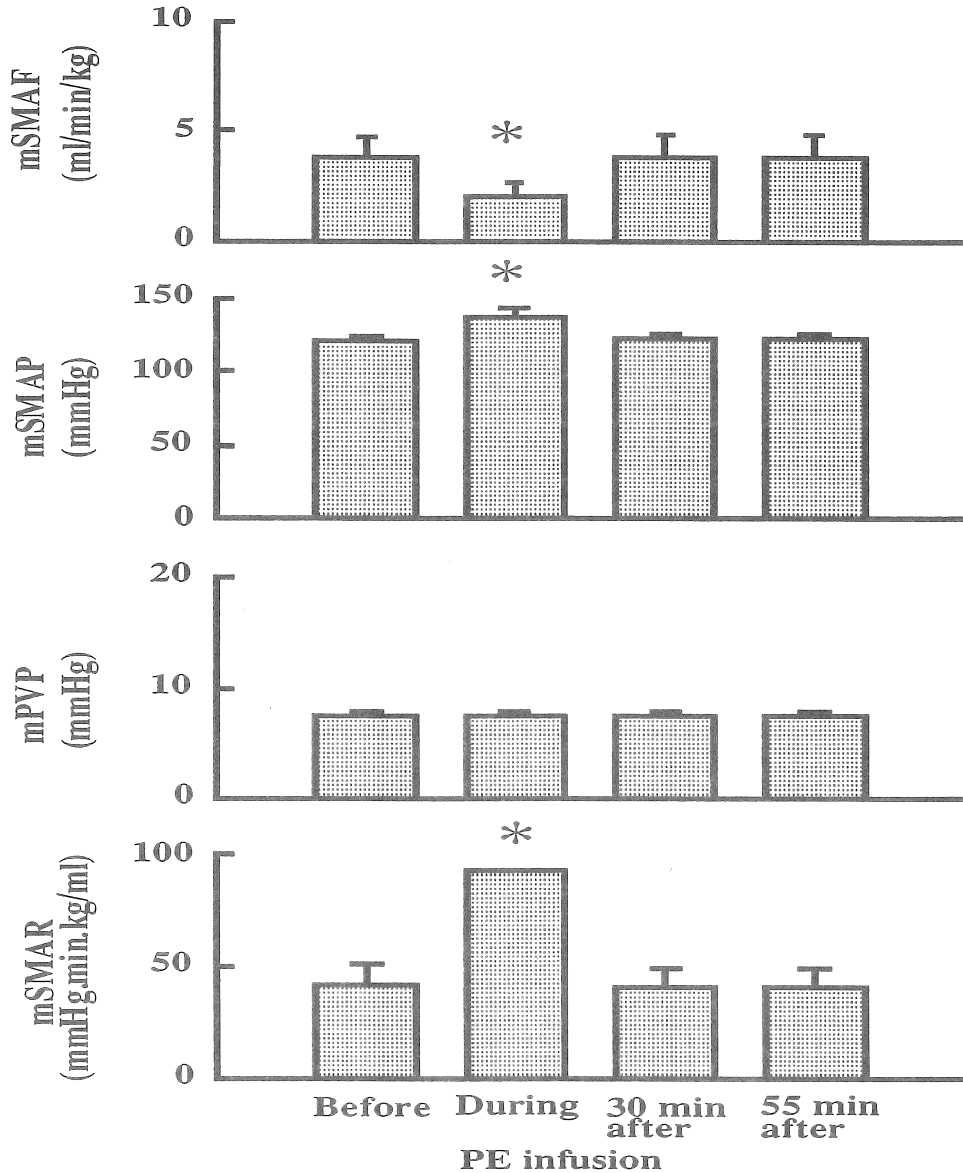


Fig 5 Effects of PE on mesenteric hemodynamics.

The abbreviations are same as used in Fig. 1.

*p<0.05 is significantly different from the saline infusion (Before).

ET-3のファミリーであるET-1については、いくつかの報告があるが、その結果は一定したものではない。Moumamiら⁹⁾は、摘出したラットの下行結腸ではCl分泌の促進を報告した。また、Rodenら¹⁰⁾は、ウサギの摘出下行結腸でClとKの分泌促進を認め、Naの移動には影響しないと報告した。さらに、ラットのepididimis (Wongら¹¹⁾) やイヌの気管 (Tamaokiら¹²⁾) 上皮の培養細胞ではCl分泌の促進を認めている。我々は、イヌの空腸に経動脈的にET-1を投与し吸収に対する影響を調べたが、全く

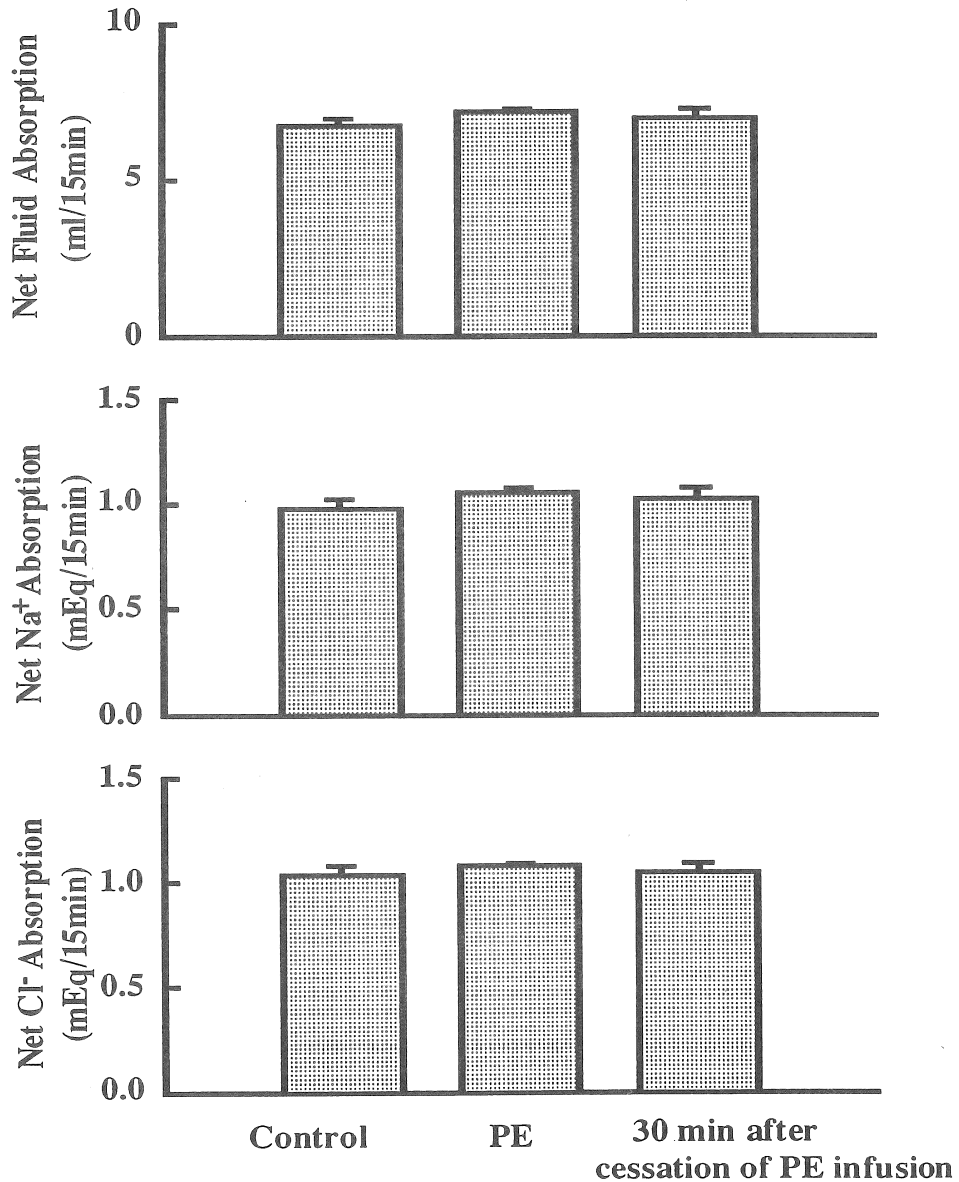


Fig. 6 Effects of PE on fluid and NaCl absorption.

影響は見られなかった。これらの差は、1)動物の種差、2)腸管の部位差、3)in vivoと in vitroの差などが考えられる。この問題も将来解決されるべき問題である。

ET-3の吸収抑制作用が、ET-3による腸管の血行動態の変化（血管抵抗の上昇、血流の減少）に依存している可能性を検討した。ET-3による血行動態の変化と同様の变化はET-1でも見られた。しかし、ET-3が腸管吸収を抑制するのに対し、ET-1は全

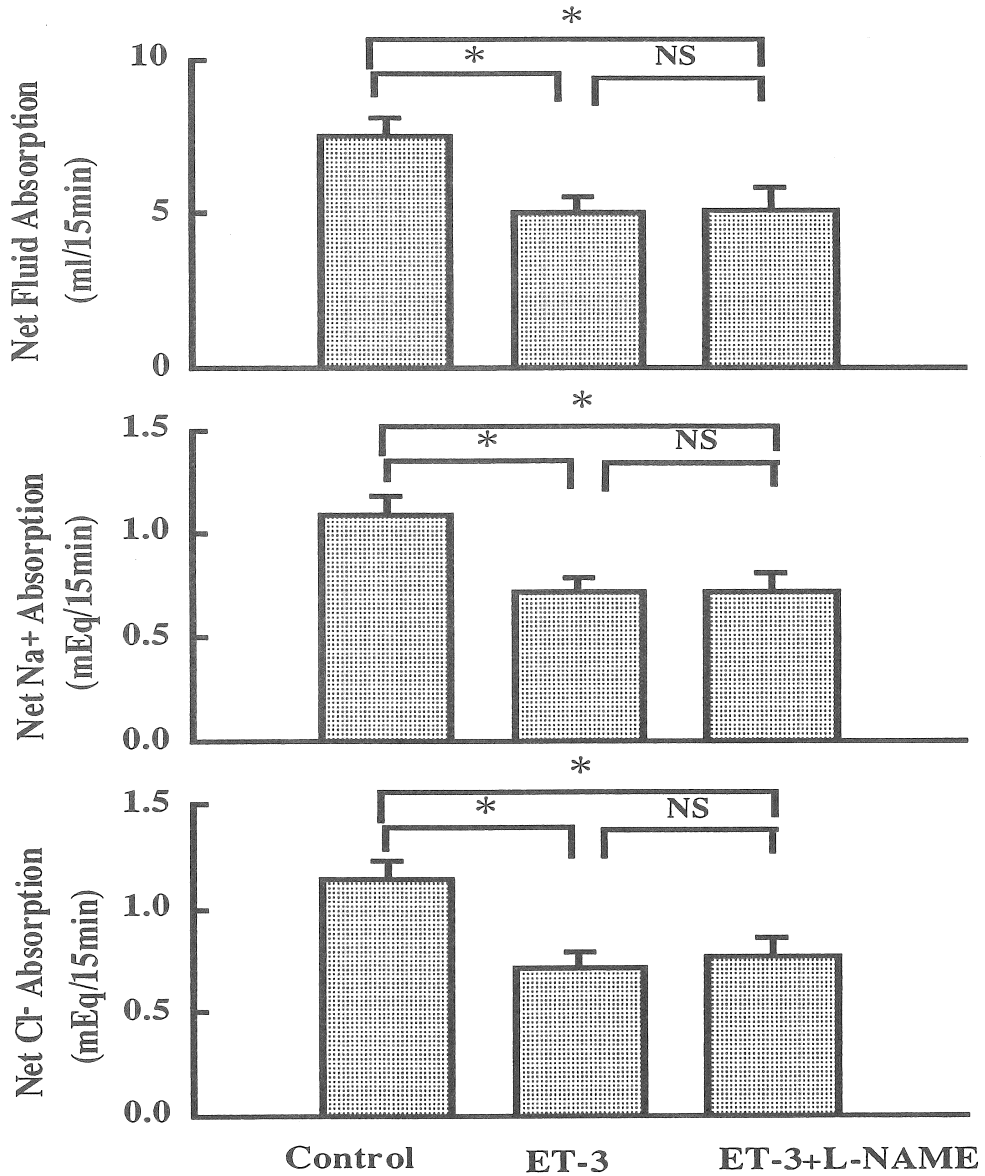


Fig. 7 Effects of L-NAME on decreased net fluid and NaCl absorption induced by ET-3.

*p<0.05 is significantly different from the saline infusion (Control).

く抑制しなかった。また、フェニレフリン (PE) で腸管膜動脈の血管抵抗を上昇させたが、腸管での吸収には全く影響しなかった。このPEの結果は、Yeoら¹³⁾の結果とも一致した。また、Carpenterら¹⁴⁾は、イヌでコレラ毒によって誘発された水の分泌促進は上腸管膜動脈の狭窄による腸管血流の減少の影響を受けないと報告した。さらに、Varroら¹⁵⁾は、腸管血流を約半分にしても腸管での吸収は変化しなかったと

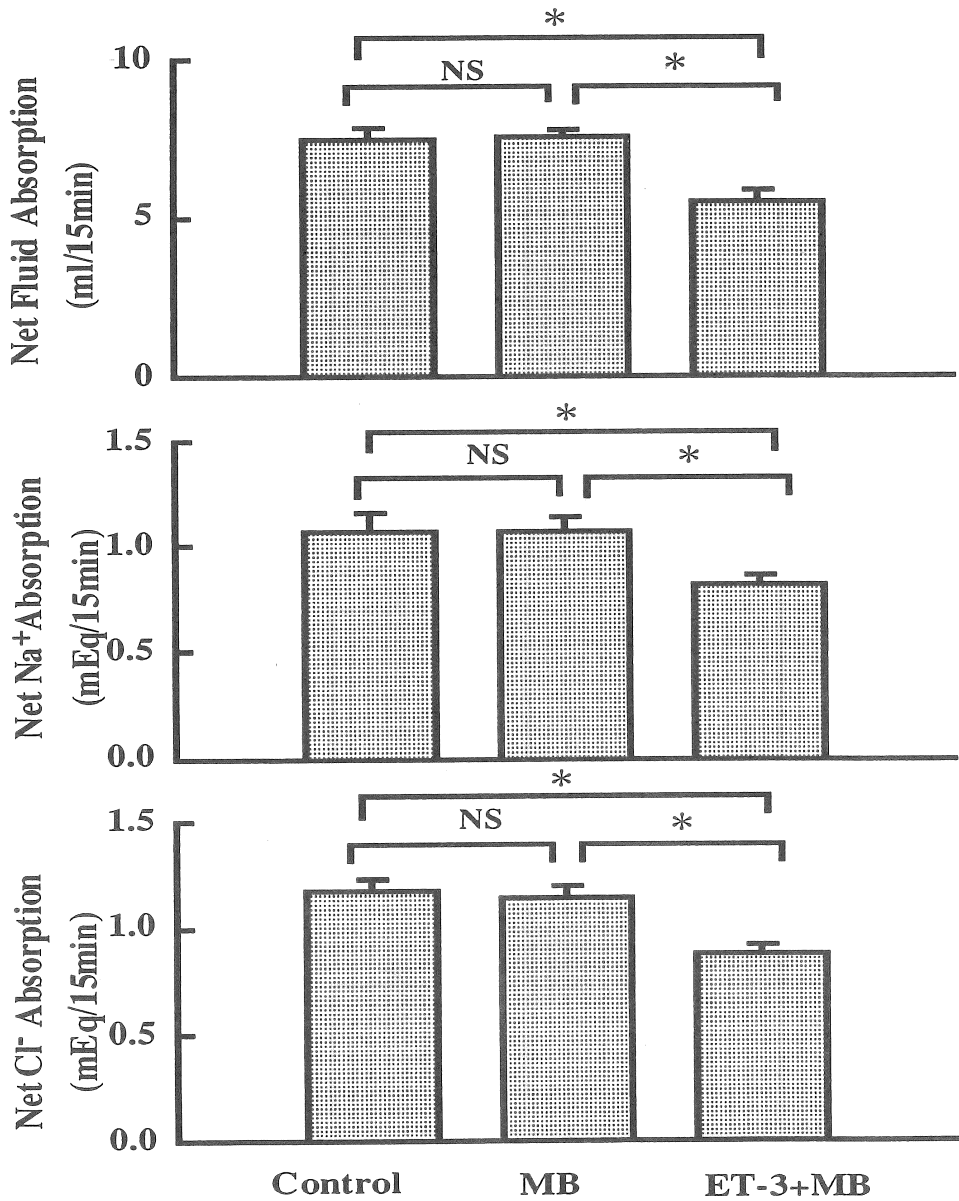


Fig.8 Effects of MB on decreased net fluid and NaCl absorption induced by ET-3.

*p<0.05 is significantly different from the saline infusion (Control).

報告した。したがって、ET-3の腸管吸収抑制作用は、腸管膜動脈の血行動態の変化によって引き起こされたものではない。

ET-3は、門脈圧を上昇させた。同様な門脈圧の上昇は、ET-1によっても引き起こされた。しかし、ET-1は吸収には影響しなかったので、門脈圧の上昇は吸収抑制の原因ではない。

上述したように、ET-1とET-3の作用の差は、受容体の差である可能性がある。ETには、ETA¹⁶⁾とETB¹⁷⁾受容体の2種類が発見されている。ETA受容体はET-3よりもET-1により強く結合し、他方ETB受容体はET-1とET-3に同様の親和性を示すことが判明している。ETA受容体は主として血管収縮作用を発揮し、ETB受容体はプロスタサイクリンあるいはNOを介して血管拡張作用を発揮する。ET-3の吸収抑制作用がETA受容体を介する作用であるならば、ET-1によっても吸収抑制作用が見られるはずであるので、ETA受容体を介する作用ではない。また、ETB受容体の可能性のうち、プロスタサイクリンの経路についてはBrownとSmith⁸⁾の研究によって否定された。また、NOを介する経路については、今回の我々の研究で否定された。したがって、全く新しい受容体の存在が予想される。

ET-3の腸管での吸収抑制作用は、我々のグループのMatsusitaら¹⁸⁾やKagawaら¹⁹⁾が報告したANP、BNP、CNPの腸管吸収抑制作用と類似している。したがって、生理活性物質で腎機能に作用する物質は、腸管の吸収・分泌作用にも関与している可能性がある。このように、腎臓と腸管は体液のホメオスタシスに重要な役割を演じていることが明らかになった。

今後の課題

本研究によって、以下の研究課題が提案された。

1. Endothelin-1とEndothelin-3の作用機序の差の解明
2. Endothelin-3による空腸での吸収抑制作用の受容体の決定
3. Endothelin-3による空腸での吸収抑制作用の細胞内情報伝達機構の決定
4. Endothelin-3の交感神経系に対する影響
5. 回腸での食塩吸収機序に対するEndothelin-3の影響
6. 回腸での食塩吸収を調節する機構の解明
7. 回腸での食塩吸収を調節する機構とEndothelin-3の機能相関
8. 大腸での食塩吸収機序に対するEndothelin-3の影響
9. 大腸での食塩吸収を調節する機構の解明
10. 大腸での食塩吸収を調節する機構とEndothelin-3の機能相関
11. Endothelin-3の行動性体内総NaCl量調節機構に対する影響

文献

1. Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, Tomobe Y, Kobayashi M, Mitsui Y, Yazaki Y, Goto K, and Masaki T: A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature* 332: 411-415, 1988.
2. Garcia R, Lachance D, and Thibault G: Positive inotropic action, natriuresis and atrial natriuretic factor release induced by endothelin in the conscious rat. *J Hypertens* 8: 725-73, 1990.
3. Rakugi H, Nakamura M, Saito H, Higaki J, and Ogihara T: Endothelin inhibits renin release from isolated rat glomeruli. *Biochem Biophys Res Commun* 155: 1244-1247, 1988.
4. Zeidel ML, Brady HR, Kone BC, Gullans SR, and Brenner BM: Endothelin, a peptide inhibitor of Na⁺-K⁺-ATPase in intact renal tubular epithelial cells. *Am J Physiol* 257: C1101-C1107, 1989.
5. Matsumoto H, Suzuki N, Onda H, and Fujino M: Abundance of Endothelin-3 in rat intestine, pituitary gland and brain. *Biochem Biophys Res Commun* 164: 74-80, 1989.
6. Inoue A, Yanagisawa M, Kimura S, Kasuya Y, Miyauchi T, Goto K, and Masaki T: The human endothelin family: Three structurally and pharmacologically distinct isopeptides predicted by three separate genes. *Pro Natl Acad Sci U S A* 86: 2863-2867, 1989.
7. Suzuki S, Khan Chowdhury MR, Uemura N, Morita H, and Hosomi H: Renojejunal reflex controlling jejunal absorption of fluid and NaCl. *J Auton Nerv Syst* 39: 219-228, 1992.
8. Brown MA and Smith PL: Endothelin: a potent stimulator of intestinal ion secretion in vitro. *Regul Pept* 36: 1-19, 1991.
9. Moumami C, Xie Y, Kachur JF, and Gaginella TS: Endothelin-1 stimulates contraction and ion transport in the rat colon: different mechanisms of action. *J Pharmacol Exp Ther* 262: 409-414, 1992.
10. Roden M, Plass H, Vierhapper H, and Turnheim K: Endothelin-1 stimulates chloride and potassium secretion in rabbit descending colon. *Pflugers Arch* 421: 163-167, 1992.
11. Wong PYD, Fu WO, and Huang SJ: Endothelin stimulates short-circuit current in a cultured epithelium. *Br J Pharmacol* 98: 1191-1196, 1989.
12. Tamaoki J, Kanemura T, Sakai N, Isono K, Kobayashi K, and Takizawa T: Endothelin stimulates ciliary beat frequency and chloride secretion in canine cultured tracheal epithelium. *Am J Respir Cell Mol Biol* 4: 426-431, 1991.
13. Yeo CJ, Couse NF, and Zinner MJ: Discrimination between α 1- and α 2 -adrenergic receptors in the isolated perfused ileum. *Surgery* 104: 130-136, 1988.
14. Carpenter CCJ, Greenough III WB, and Sack RB: The relationship of superior mesenteric

artery blood flow to gut electrolyte loss in experimental cholera. *J Infect Dis* 119: 182-193, 1969.

15. Varro V, Blaho G, Csernay L, Jung I, and Szarvas F: Effect of decreased local circulation on the absorptive capacity of a small-intestine loop in the dog. *Am J Dig Dis* 2: 170-177, 1965.

16. Arai H, Hori s, Aramori I, Ohkubo H, and Nakanishi S: Cloning and expression of a cDNA encoding an endothelin receptor. *Nature* 348: 730-732, 1990.

17. Sakurai T, Yanagisawa M, Takuwa Y, Miyazaki H, Kimura S, Goto K, and Masaki T: Cloning of a cDNA encoding a non-isopeptide-selective subtype of the endothelin receptor. *Nature* 348: 732-735, 1990.

18. Matsushita K, Nishida Y, Hosomi H, and Tanaka S: Effects of atrial natriuretic peptide on water and NaCl absorption across the intestine. *Am J Physiol* 260: R6-R12, 1991.

19. Kagawa K, Suzuki S, Matsusita K, Uemura N, Morita H, Hosomi H: Relationship between suppressive actions on intestinal absorption and cGMP producing actions for natriuretic peptide family in dogs. *J Clin Exp Pharmacol and Physiol*, (in press).

Study on humoral factor and intraluminal circumstances influencing salt absorption across the intestine

Mahfuzur Rahman Khan Chowdhury, Hiroshi Hosomi, Yasuhiro Nishida,
Nobuhisa Uemura, Shunji Suzuki, Hiroshi Murakami
Department of Physiology, Kagawa Medical School

Summary

The aim of this study was to investigate the effects of endothelins on net fluid and NaCl absorption across the jejunum. The jejunal fluid and NaCl absorption and mesenteric hemodynamics in jejunal loops were measured during infusion of saline, endothelin-1 or endothelin-3 into the superior mesenteric artery in dogs. The dogs were anesthetized with pentobarbital sodium (30 mg/kg i.v.). Polyethylene catheters were placed in the superior mesenteric arteries and portal vein for infusions and measuring arterial and portal venous pressure. Superior mesenteric arterial blood flow was continuously measured with an ultrasonic flow probe. A 30 cm long jejunal loop was made which was 10 cm from the duodenal fossa. Infusion of saline, endothelin-1, endothelin-3 or phenylephrine was initiated 10 min before pouring the test solution into the jejunal loop and lasted for 25 min. The net fluid (7.2 ± 0.9 ml, mean \pm SE, n=8), Na^+ (1.1 ± 0.1 meq), and Cl^- (1.1 ± 0.2 meq) absorption during saline infusion were not significantly different from those (7.0 ± 1.0 ml, 1.1 ± 0.1 and 1.1 ± 0.2 meq) during endothelin-1 infusion but significantly decreased to 4.8 ± 0.6 ml, 0.7 ± 0.1 and 0.7 ± 0.1 meq by endothelin-3 infusion. Infusion of endothelin-3 decreased the net fluid, Na^+ and Cl^- absorption; however, saline and endothelin-1 had no effect. Increases in portal venous pressure and vascular resistance and decrease in blood flow caused by endothelins infusion had no effects on the net jejunal absorption. To investigate the role of nitric oxide and soluble guanylate cyclase activation in the mechanisms underlying endothelin-3 induced decrease in the net fluid and electrolyte absorption, measurements were obtained in the presence of the nitric oxide synthesis inhibitor, nitro-L-arginine methyl ester or the soluble guanylate cyclase inhibitor, methylene blue. The endothelin-3 induced decrease in the net absorption was not influenced by the pretreatment with inhibitors. These results suggest that the endothelin-3 response was not mediated by nitric oxide or soluble guanylate cyclase.