

Title	腸管からのエンドトキシン吸収に及ぼすエタノール投与の影響に関する検討
Sub Title	
Author	玉井, 博修(Tamai, Hironao) 石井, 裕正(Ishii, Hiromasa)
Publisher	慶應医学会
Publication year	2003
Jtitle	慶應医学 (Journal of the Keio Medical Society). Vol.80, No.3 (2003. 9) ,p.T247- T256
JaLC DOI	
Abstract	
Notes	学位論文
Genre	Journal Article
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=AN00069296-20030901-0247

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the KeiO Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

学位論文

腸管からのエンドトキシン吸収に及ぼすエタノール投与の影響に関する検討

慶應義塾大学医学部内科学教室

(指導：石井裕正教授)

たま い ひろ なお
玉 井 博 修

(平成 14 年 12 月 26 日受付)

Key Word : endotoxin, alcohol, intestinal mucosal permeability, liver injury.

エンドトキシンはグラム陰性桿菌の細胞壁の構成成分の一つであり、生体では主に腸管内に存在する。腸管より吸収されたエンドトキシンは肝の Kupffer 細胞で処理され、その際 TNF α などのサイトカインが放出され肝障害の進展に関与すると考えられている^{1,2)}。四塩化炭素 (CCl₄) によるラットの薬物性肝障害モデルにおいても、腸管由来のエンドトキシンの関与が報告されている³⁾。

アルコール性肝障害においてエンドトキシンの関与の報告は多い。すなわち、アルコール性肝障害患者では、しばしばエンドトキシン血症が観察される^{4,5)}。動物実験においても、エタノール含有飼料の持続的胃管投与により作成されるアルコール性肝障害ラットモデルでは肝に炎症や線維化がみられ、その時に血中のエンドトキシン値が上昇すること⁶⁾、そして抗生物質の投与により血中のエンドトキシン値が低下し、肝障害が抑制されることが報告されている^{7,8)}。

重症アルコール性肝炎では肝不全の進行に加え、腎不全や脳症など劇症肝炎に類似した多臓器不全が認められ、多くは発症より 1 ヶ月以内に死亡する。この重症アルコール性肝炎の発生および進展にも腸管由来のエンドトキシンの関与が想定され⁹⁾、その治療手段としてエンドトキシン吸着療法がしばしば行われ、救命率をあげたとの報告もある。以上の事実により腸管由来のエンドトキシンが、アルコール性肝障害の発生機序に深く関与して

いることが示唆される。

アルコールとエンドトキシンの相互作用についての報告は多く、慢性エタノール投与がエンドトキシン惹起性肝障害を増悪させることが動物実験により明らかにされている。たとえば、慢性エタノール投与ラットでは、経静脈的なエンドトキシンの投与により肝類洞内に膠着する白血球数が増加し、血清 ALT 値が増悪する¹⁰⁾。そして、組織学的にも慢性エタノール投与群のラットでエンドトキシン惹起性肝障害が増強している¹¹⁾。さらに単独では肝微小循環障害を生じない程度の少量のエタノール投与でもエンドトキシン血症がある時には、肝微小循環障害を生じることが報告されている¹²⁾。これらのことから、エンドトキシンが、肝微小循環障害を介したアルコール性肝障害の進展に深く関与していることが想定される。

さらに、近年米国やヨーロッパでは非アルコール性脂肪肝炎 (non-alcoholic steatohepatitis : NASH) が注目され、その発生機序に腸管由来のエンドトキシンが関与する可能性が指摘されている^{13,14)}。NASH は飲酒がなくてもアルコール性肝障害と類似の病理所見を呈する肝病変であり、肥満や糖尿病の症例にみられることが多く、さらに肥満の治療のために腸管バイパス手術をした症例ではより高率に出現する。腸管バイパス手術をした症例では腸内細菌が増殖しエンドトキシン血症を生じやすいと考えられる。そしてそれらの症例に抗生物質を投与することにより肝障害が軽減したことが報告されている¹⁵⁾。

本論文は Tamai H, Kato S, Horie Y, Ohki E, Yokoyama H, Ishii H : Effect of acute ethanol administration on the intestinal absorption of endotoxin in rats. *Alcohol Clin Exp Res.* 24 (3) : 390-4, 2000 の一部および Tamai H, Horie Y, Kato S, Yokoyama H, Ishii H : Long-term ethanol feeding enhances susceptibility of the liver to orally administered lipopolysaccharides in rats. *Alcohol Clin Exp Res.* 26 (8 Suppl) : 75S-80S, 2002 の一部を含む。

この様に NASH とアルコール性肝炎とは脂肪肝とエンドトキシン血症という共通点を持ち類似の病変をきたす原因となっている可能性があり興味深い。

アルコール性肝障害患者においてエンドトキシン血症の出現をきたす機序として、アルコールによる網内系機能の低下にともなうエンドトキシン処理の遅延¹⁶⁻¹⁸⁾、アルコール摂取による腸管からのエンドトキシン吸収の亢進^{4,5)}などが報告されているが、後者の機序についてはまだ十分に解明されていないのが現状である。現在までの報告ではアルコールによる腸管の透過性の変化に関し、アルコール依存症患者での腸管透過性の亢進¹⁹⁾、さらに動物実験において急性および慢性のエタノール投与後の腸管の透過性の亢進が報告されている²⁰⁻²³⁾。エンドトキシンの腸管からの吸収については、*in vitro* の系でエタノール濃度依存性に小腸粘膜でのエンドトキシンの吸収が増加することが報告されているが²⁴⁾、エタノールによりエンドトキシン吸収が変化するか否かを *in vivo* の系で詳細に検討した報告はない。そこで本研究では、急性および慢性のエタノール投与が、腸管の透過性および腸管からのエンドトキシンの吸収にどのような影響をおよぼすかにつき、*in vivo* の系において実験動物により検討した。

材料と方法

1. 実験動物

本研究は慶應義塾大学医学部動物実験ガイドラインに沿って行なった。急性エタノール投与実験は、体重約 250 g の Wistar 系雄性ラットを用いた。また慢性エタノール投与実験では体重約 150 g の Wistar 系雄性ラットを Lieber²⁵⁾らの方法に従い、総カロリーの 35% のエタノールを含む液体飼料またはその等カロリーを炭水化物で置換した対照飼料で 4 週間 pair-feeding し、16 時間禁食後実験に供した。以下に述べる実験の手技はネブプター麻酔下 (30 mg/ml i.p) で行い、厳重な滅菌操作下に行なった。

2. 実験計画

1) 急性エタノール投与によるエンドトキシンの腸管からの吸収の変化

10 mg/kg 体重の lipopolysaccharides (LPS ; *Escherichia Coli* : 0111 : B4 ; Sigma, St.Louis, MO, USA) を 10 ml/kg 体重の蒸留水または 5% ないし 20% (w/v) エタノールに溶解して胃管より投与した。経口投与後 0, 30, 60, 120, 180, 240 分到大腿静脈

よりヘパリン採血し、分離した血清をマイクロプレート上でアルカリ処理²⁶⁾した後、エンドスペシー (生化学工業, 東京) でエンドトキシン値を測定した。エンドトキシンの吸収に及ぼす小腸粘膜の変化の影響を検討するため、採血終了後、近位小腸 (胃の肛側 1~4 cm) および遠位小腸 (回腸末端の口側 1~4 cm) を採取し 10% ホルマリンに固定後病理組織学的に検討した。

2) 急性エタノール投与のエンドトキシン処理能への影響

10 µg/kg 体重の LPS を経静脈的に投与したラットに、経口的に蒸留水または 20% エタノールを 10 ml/kg 体重投与し、投与後 0, 30, 60, 120, 180, 240 分到大腿静脈よりヘパリン採血し、上記と同様に血中エンドトキシン値を測定した。

3) 急性エタノール投与の腸管透過性におよぼす影響

ラットを開腹後、プラスチックチューブ (ATOM Intravenous Catheter For Cut-Down 3Fr, アトム社, 東京) を胃前庭部より穿刺し胃内に挿入した後、先端を十二指腸内に留置し、チューブより 2 g/kg 体重の 20% (w/v) エタノールまたは同量の蒸留水を注入し、30 分後にチューブ先端よりやや口側を結紮した。チューブより生食 10 ml にて腸管内を洗浄後、回腸末端を結紮し、FITC にて蛍光ラベルした分子量 4000 D および 20000 D のデキストラン (FD4, FD20) (Sigma, St. Louis, MO, USA) 125 mg を 5 ml の生食に溶解しチューブより腸管ループ内に投与した。FD4 および FD20 の腎臓からの排泄を防止するため両側腎動静脈を結紮した²⁷⁾。FD4 または FD20 投与後 0, 15, 30, 60 分まで大腿静脈より採血し、蛍光分光光度計 (RF-5300 PC 島津製作所, 京都) で測定した蛍光強度により血漿中の FD4 または FD20 濃度を推定した。

4) 慢性エタノール投与の腸管透過性におよぼす影響

4 週間慢性エタノール投与したラットまたはペア飼育したコントロールラットに、急性モデルと同様に十二指腸内に留置したプラスチックチューブより FD4 125 mg を 5 ml の生食に溶解し腸管ループ内に投与した。FD4 投与後 0, 15, 30, 60 分まで大腿静脈より採血し、血漿中の FD4 値を測定した。実験終了後、近位小腸 (胃の肛側 1~4 cm) 遠位小腸 (回腸末端の口側 1~4 cm) を採取した。小腸の一部は 10%ホルマリンにて固定後 Hematoxylin-Eosin (HE) 染色し顕微鏡にて観察した。さらに、小腸の一部は 2.5%グルタルアルデヒドで前固定し、カルノフスキー液で洗い、オスミウム酸液で後固定、エタノール脱水を行いエボン包埋した。超薄切片を酢酸ウラニルとクエン酸鉛で染色後、電顕によ

り小腸の組織学的変化を検討した。

5) 慢性エタノール投与によるエンドトキシンの腸管からの吸収の変化

4週間慢性エタノール投与したラットまたはペア飼育したコントロールラットに 20 mg/kg 体重の LPS 液 (1 mg/ml 蒸留水) を胃管より投与した。大腿静脈より 0, 30, 60, 120, 180, 240 分まで採血し、血清中のエンドトキシン値を上記の方法にて測定した。

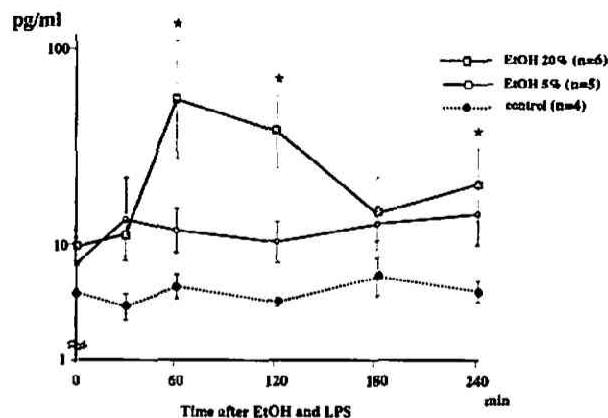
3. 統計処理

すべての数値は平均値±標準誤差をもって表示した。群間の平均値の比較は ANOVA を用いた。p 値が 0.05 未満を有意差があるとした。

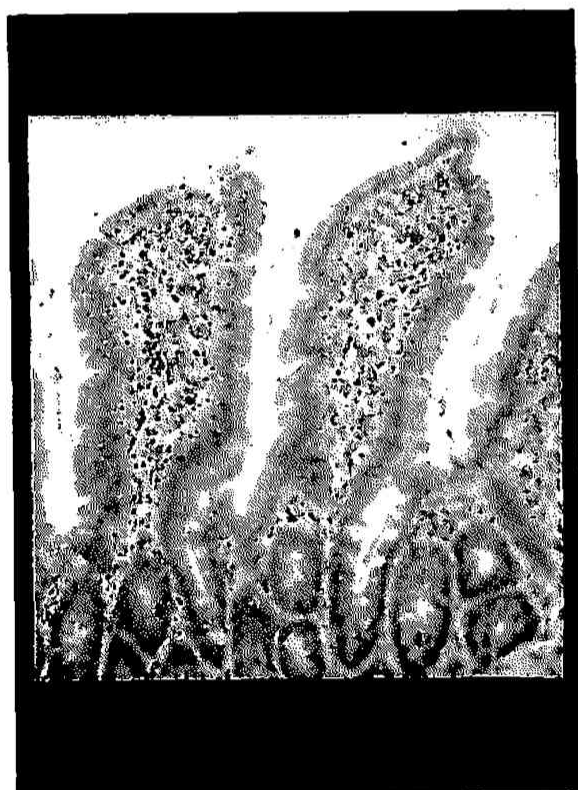
結 果

1. 急性エタノール投与によるエンドトキシンの腸管からの吸収の変化

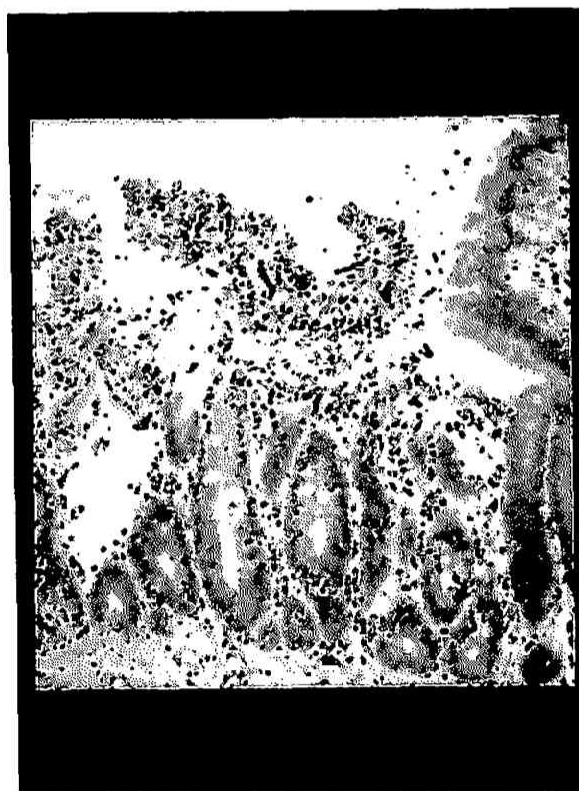
コントロール群では LPS 経口投与後、血清エンド



第1図 ラットに LPS (10 mg/kg 体重) を胃管より投与した後の血清中のエンドトキシン値の経時的变化。コントロール群ではエンドトキシン濃度の上昇は認めなかったが、20%エタノール投与群では60分をピークとする有意なエンドトキシン濃度の上昇を認めた。* $p < 0.05$ vs. control (Tamai H et al: Alcohol Clin Exp Res. 24 (3): 390-4, 2000 の Fig. 1 より許可を得て転載)

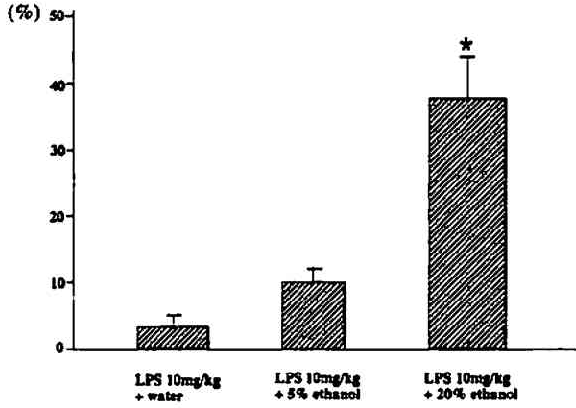


LPS10mg/kg + water

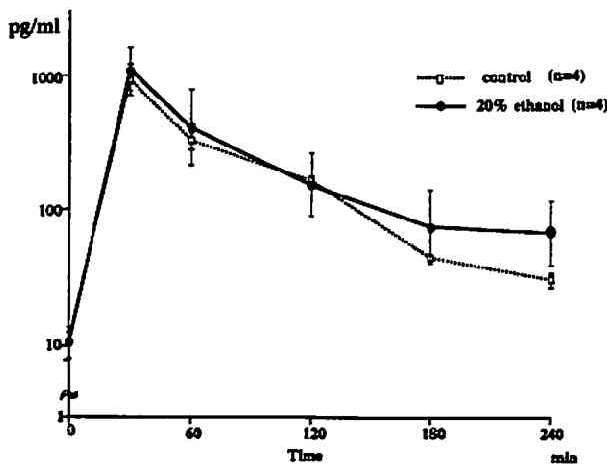


LPS10mg/kg + 20% ethanol

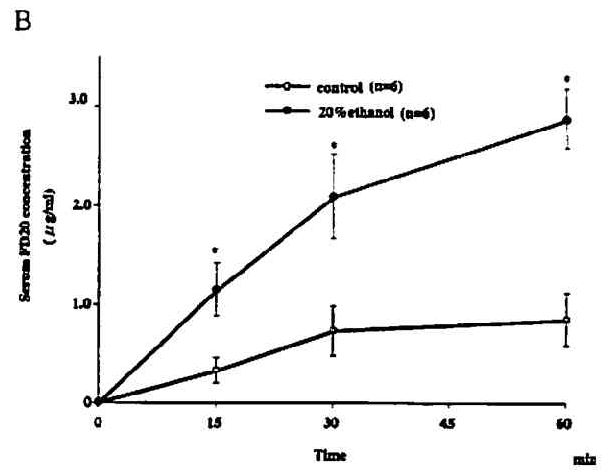
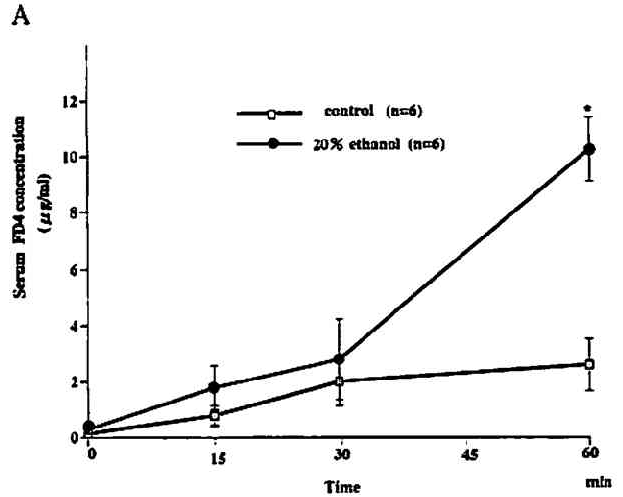
第2図 ラットに蒸留水または20%エタノールに溶解した LPS (10 mg/kg 体重) を胃管より投与後240分の時点での近位小腸の光顕像 (HE 染色×200)。20%エタノールを投与した群では小腸上皮の脱落を伴う出血性びらんを高頻度に認めた。* $p < 0.05$ vs. control (Tamai H et al: Alcohol Clin Exp Res. 24(3): 390-4, 2000 の Fig. 2 より許可を得て転載)



第3図 エタノールとLPSのおよぼす近位小腸粘膜への影響。ラットに蒸留水または5%または20%エタノールに溶解したLPS(10mg/kg体重)を胃管より投与後240分の時点での近位小腸のびらんを伴う小腸粘膜の割合を示す。近位小腸のびらんの面積はエタノールの濃度により増加した。* $p < 0.05$ vs. control (Tamai H et al: Alcohol Clin Exp Res. 24 (3): 390-4, 2000のFig. 3より許可を得て転載)



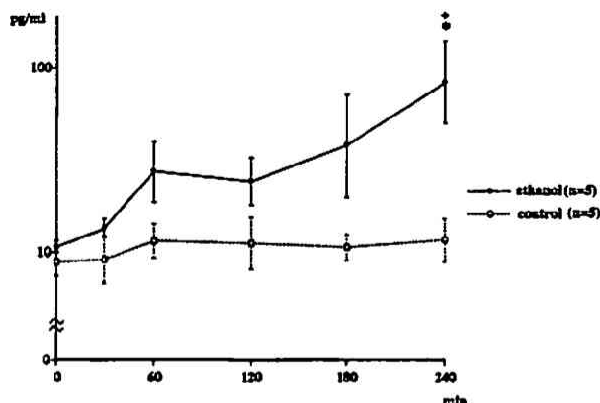
第4図 血中エンドトキシン濃度のクリアランスにおよぼす経口エタノール投与の影響。急性エタノール投与ラットおよびコントロールラットに10 μ g/kg体重のLPSを経静脈的に投与した後の血中エンドトキシン値の経時変化を示す。エタノール投与群とコントロール群でエンドトキシンの血中からの消失には有意な差を認めず、急性エタノール投与時のエンドトキシンの上昇は、エンドトキシンの処理系の遅延によるものでないこと示唆された。* $p < 0.05$ vs. control (Tamai H et al: Alcohol Clin Exp Res. 24 (3): 390-4, 2000のFig. 4より許可を得て転載)



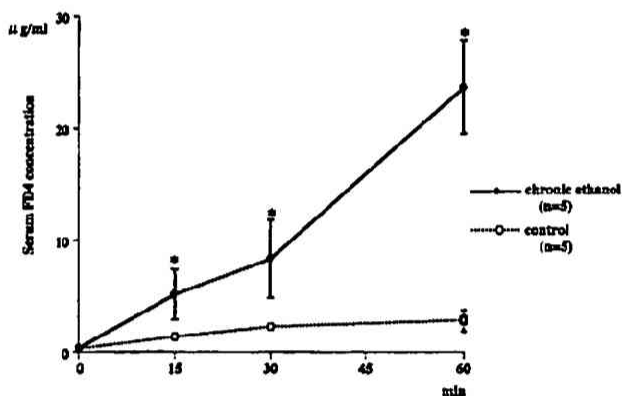
第5図 急性エタノール投与によるラット小腸の非特異的腸管透過性の変化。急性エタノール投与ラットではFD4およびFD20に対する腸管の透過性がコントロールラットに比べ有意に上昇した。* $p < 0.05$ vs. control (Tamai H et al: Alcohol Clin Exp Res. 24 (3): 390-4, 2000のFig. 5 Fig. 6より許可を得て転載)

キシンの濃度の増加は全例で認めなかった。5%エタノール投与群では群間では平均値に有意差は認めないが、エンドトキシン濃度の増加を認める例が5例中1例あり、20%エタノール投与群では60分をピークとするエンドトキシン濃度の有意な増加を認めた(第1図)。

LPS投与後60分ではコントロール群、20%エタノール投与群ともに光顕的には変化はみられなかった。投与後240分で小腸の粘膜は、コントロール群ではほとんど変化はみられなかったが、20%エタノール投与群では近位小腸に出血、びらん等の変化がみられた(第2図)。近位小腸のびらんの面積は高濃度(20%)エタノール投与により有意に増加した(第3図)。



第6図 慢性エタノール投与による消化管からのエンドトキシン吸収の変化。慢性エタノール投与ラットではコントロールラットに比べて20 mg/kg 体重のLPSを胃管より投与後240分後の血清エンドトキシン値は有意に上昇した。 $*p < 0.05$ vs. control (Tamai H et al: Alcohol Clin Exp Res. 26 (8 Suppl): 75S-80S, 2002のFig. 2より許可を得て転載)



第7図 慢性エタノール投与によるFD4に対するラット小腸の腸管透過性の変化。慢性エタノール投与ラットではFD4に対する腸管の透過性がコントロールラットに比べて有意に上昇した。 $*p < 0.05$ vs. control (Tamai H et al: Alcohol Clin Exp Res. 26 (8 Suppl): 75S-80S, 2002のFig. 3より許可を得て転載)

2. 急性エタノール投与の血中エンドトキシン消失速度に及ぼす影響

経静脈的なLPSの投与後の血中エンドトキシン濃度は30分後にピークに達し以後漸減していったが、その消失速度はエタノールを投与した群とコントロール群で有意な差を認めなかった(第4図)。

3. 急性エタノール投与による腸管透過性の変化

FD4投与後60分の時点で急性エタノール投与ラット(10.2±1.1 µg/ml)ではコントロールラット(2.6±0.9 µg/ml)に比べ有意に血中FD4濃度が高値であり、さらに、急性エタノール投与ラットではFD20投与後15分、30分、60分のいずれの時点においてもコントロールラットに比べ有意に血中FD20濃度が高値であった。(第5図)。急性エタノール投与ラット、コントロールラットとも小腸のびらん、出血等の変化は光顕上みられなかった。

4. 慢性エタノール投与によるエンドトキシン吸収の変化

LPS投与前の血清エンドトキシン値はコントロールラット、慢性エタノール投与ラットの間で有意差を認めなかった。コントロールラットでは20 mg/kg 体重のLPSを胃管より投与240分後まで血清エンドトキシン値は上昇しなかったが、慢性エタノール投与ラットでは投与前に比べてLPS投与60分後より血清エンドトキシン値の上昇傾向を認め、240分後には有意な上昇を認めた。さらに、慢性エタノール投与ラットではLPS投与240分後の血清エンドトキシン値がコントロールラットに比べて有意に高かった(第6図)。

5. 慢性エタノール投与ラットにおける腸管透過性の変化

FD4投与後15分、30分、60分のいずれの時点においても、慢性エタノール投与ラットではコントロールラットに比べ有意に血中FD4濃度は上昇した。(第7図)。慢性エタノール投与ラットの腸管の組織学的検討では遠位小腸の微絨毛の高さがコントロールラットに比べて低く、また小腸上皮細胞における小胞体の変性を認めた(第8図)。

(a)



(b)



第8図 コントロールラット (8-a) および慢性エタノール投与ラット (8-b) の小腸上皮組織の電顕像 (×10000). 慢性エタノール投与ラットではコントロールラットにくらべ遠位小腸の微絨毛の高さの減少が見られ, 小胞体の変性も認めた. * $p < 0.05$ vs. control (Tamai H et al: Alcohol Clin Exp Res. 26 (8 Suppl): 75S-80S, 2002 の Fig. 4 より許可を得て転載)

考 察

本研究では, 急性にエタノール投与したラットにおいて LPS 経口投与後に血中のエンドトキシン値が有意に上昇することを明らかにした. さらに, 急性エタノール投与は経静脈的に投与したエンドトキシンの血液中からの消失, すなわち処理能には影響を及ぼしていないことが示唆され, 急性エタノール投与による血中エンドトキシン上昇には, 網内機能の低下よりもむしろ腸管からのエンドトキシン吸収の亢進が強く関与していることが示唆された. また, 慢性エタノール投与ラットにおいてもコントロールラットに比べ腸管透過性が亢進しており, LPS 投与後の血清エンドトキシン値がコントロールラットに比べ有意に上昇することが明らかとなった.

急性エタノール投与後の小腸の組織学的変化では, 投与後 240 分の時点では, 高濃度 (20% v/w) のエタノールを投与したラットでは近位小腸の出血性びらんの有意味な増加を観察したが, これは Baraona ら²⁸の報告に一致するものである. エタノールによる小腸の形態学的変化の機序として, Baraona らは, エタノールと等浸透圧に調整した尿素の投与でも小腸粘膜に障害が生じることを観察し, エタノールによる浸透圧の変化が小腸の形態学的変化の一因であると報告している. 一方, Dinda^{29,30}らはエタノールにより放出されるヒスタミンやロイコトリエンに注目し, これらが小腸粘膜で微小循環障害を惹起し, 粘膜障害を生じると報告している. これらのエタノールによる直接的, 間接的作用が小腸にびらんを生じさせたものと考えられる. Gardiner³¹らは

炎症性腸疾患患者において腸上皮の傷害と血中のエンドトキシン値に正の相関がみられることを報告している。したがって、急性エタノール投与により生じる出血性びらんが腸管からのエンドトキシン吸収の亢進に関与している可能性がある。

しかし、本研究で得られた結果の注目すべき点として、小腸にまだ出血性びらんが認められないエタノール投与後 60 分の時点で、血中エンドトキシンが上昇していたことがあげられる。このことよりびらん等の肉眼的に小腸組織が破壊される以前に小腸粘膜の透過性が亢進し、エンドトキシンの吸収が亢進していることが示唆される。実際、FD 4、FD20 に対する透過性はエタノール投与後 30 分の時点から亢進し³²⁾、非特異的な小腸粘膜の透過性の亢進が急性エタノール投与後にみられ、エンドトキシンの吸収の亢進に関与していると考えられる。

Drazer³³⁾らは horseradish peroxidase (分子量 40,000 D) を用いた実験で、horseradish peroxidase がコントロールラットでは全く吸収されないが、12.5% のエタノールを同時投与したラットでは投与後 1 時間以内に吸収がみられることを報告している。その際エタノール投与ラットの腸管上皮の電顕での観察で、十二指腸上皮の細胞間隙に peroxidase 活性を認めており、急性エタノール投与により通常では吸収されない物質がこの細胞間隙を通過し流入する可能性を指摘している。本研究で観察された急性エタノール投与による非特異的な小腸の透過性の亢進にはこの機序が関与している可能性がある。

慢性エタノール投与ラットの実験では³⁴⁾、LPS およびデキストランに対する腸管透過性が亢進していることが明らかとなり、慢性エタノール投与時の腸管の非特異的な透過性亢進の関与が示唆された。慢性エタノール投与では小腸の光顕上、びらんや上皮の脱落といった所見は認めなかった。慢性エタノール投与時のエタノール濃度は 5% (w/v) に調製しており、急性エタノール投与の実験では小腸の光顕上の変化はほとんどみられなかった濃度である。慢性エタノール投与による小腸の組織学的変化は光顕上は乏しいが^{35,36)}、Rubin らは電顕的に小腸上皮細胞のミトコンドリアの形態異常や小胞体やゴルジ体の拡大がみられることを報告している³⁷⁾。また Bode らはアルコール依存症患者の小腸組織では絨毛の高さと粘膜面積の減少がみられることを報告している³⁸⁾。今回のラットにおける検討でも遠位小腸微絨毛の高さの減少と小胞体の変性を認め、これらの報告とほぼ一致する。今回の慢性エタノール投与ラット小腸組織の検討で注目すべき点として近位小腸よりも遠位小腸でより傷害

が強かったことがあげられる。その機序は不明だが、一因として腸管内の細菌の影響が考えられる。大量飲酒者では胃酸の PH の低下などから小腸での細菌の増殖が報告されているが³⁹⁾、これらの細菌の多くにはアルコール脱水素酵素が存在し、腸管内のエタノールの酸化により大量のアセトアルデヒドが産生される⁴⁰⁾。このアルデヒドが慢性エタノール投与ラット小腸の組織変化の一因となりうることが報告されているが⁴¹⁾、大腸に近く細菌がより多く存在すると考えられる遠位小腸ではより大量のアセトアルデヒドが産生されるため近位小腸より傷害が強かった可能性が考えられる。

Nano ら⁴²⁾はラット胎児より分離した腸上皮細胞を用い、*in vitro* の実験より、エタノールがラット小腸上皮細胞の生育を抑制するであろうと推察している。これらのことから、慢性エタノール投与では腺窩上皮の再生能が障害され、絨毛細胞の減少が持続して絨毛の萎縮が亢進し、結果として腸管透過性が亢進すると考えられる。このような慢性エタノール投与による小腸の変化が非特異的な透過性亢進を惹起し、デキストランやエンドトキシンといった通常では小腸からほとんど吸収されないと考えられる物質が門脈血に流入する原因となっている可能性が考えられる。

しかしながら、腸管由来のエンドトキシンの透過、吸収経路についてはなお不明の点が多い。Nolan ら⁴³⁾は *in vitro* の実験系でエンドトキシンが能動輸送により吸収されると推測しているが、一般的にはエンドトキシンの透過、吸収は受動拡散により行われると考えられている。エンドトキシンの分子量は 4000 以上であるとされ、その分子量の大きさからは細胞間隙を通る経路 (paracellular pathway) が想定されるが、近年野口ら⁴⁴⁾は様々な病態下に経腸的に LPS を投与した後の大腸、小腸上皮の電顕による観察により、大腸上皮細胞内にエンドトキシンが見い出されることを報告した。野口ら⁴⁵⁾は分子量の大きなエンドトキシンがどのような経路で細胞内に侵入するかについては不明であるとしながらも、細胞内を通る経路 (transcellular pathway) の存在を報告しているが、小腸上皮細胞内にはエンドトキシンはほとんど見い出されなかったと報告している。この結果より彼らは、元来多くの細菌が存在する大腸の上皮細胞にはエンドトキシンを処理する機能が備わっているのに対して、大腸に比べてはるかに細菌数の少ない小腸ではその様な機能が少ないためではないかと推察している。エンドトキシンの詳細な侵入経路については今後の研究が待たれる。

一方、慢性エタノール投与による腸管透過性亢進の機

序についての報告は多い。Bjarnason²⁰⁾らは常習飲酒者で⁵¹Cr-EDTAの透過性が亢進していることを報告し、⁵¹Cr-EDTAが細胞外に存在することから⁵¹Cr-EDTAが腸上皮の細胞間隙を選択的に通ると推察している。一方、Keshavarzian²²⁾らは分子量の大きさより考えて細胞間隙を選択的に通ると推察されるラクチュロースの吸収が、大酒家においても非飲酒者に比べて差がないことを報告している。KeshavarzianらはBjarnasonらとの結果の相違の原因として、⁵¹Cr-EDTAとラクチュロースの透過部位の解剖学的な違い、透過機序の違い、さらには断酒後の期間の違いを挙げている。両報告ともに胃、十二指腸の組織の検討で光顕、電顕上変化がないことを報告しているが⁵¹Cr-EDTAやラクチュロースの解剖学的透過部位については特定できていない。本研究ではpermeabilityのマーカーとしてFITCにてラベルした分子量4000Dのデキストラン(FD4)を使用した。これは⁵¹Cr-EDTAやラクチュロース(ともに約340D)にくらべ分子量が大きく、よりエンドトキシンの分子量に近い特性をもつ。今回、慢性エタノール投与によりFD4の透過性が亢進することが明らかとなったが、これは分子量の大きいエンドトキシンが細胞間隙を通過しうる可能性を示唆するものと考えられた。

近年Ma TY⁴⁵⁾らは*in vitro*の実験で低濃度(<10%)のエタノールにおいてもtight junctionの機能が破壊するがその変化は可逆性であることを報告している。このことから、tight junctionの破壊は構造的、不可逆的なものではなく、機能的、可逆的なものである可能性があると思われる。本研究において慢性エタノール投与ラットでは小腸上皮細胞のtight junctionの破壊は観察されなかった。しかし、この結果はtight junctionの機能的な傷害を否定するものではなく、慢性エタノール投与ラットにおけるデキストランやエンドトキシンの詳細な侵入経路については今後の研究が必要である。

本研究において、慢性エタノール投与ラットではコントロールラットに比べLPS(20 mg/kg体重)投与後の血清エンドトキシン値の有意な上昇が観察された。最近Mathurinら⁴⁶⁾は、慢性エタノール投与ラットでは経腸的なエンドトキシン投与により投与2時間後の門脈および全身血中のエンドトキシン値が上昇するのに対し、コントロールラットでは上昇が見られないことを報告したが、それはわれわれが得た結果を支持するものである。

以上の結果より慢性エタノール投与は腸管からのエンドトキシンの吸収を亢進させ、エンドトキシンによる肝障害の発現を誘発すると考えられる。実際慢性エタノール投与に加え、一週間LPSを経口投与したラットで

は³⁰⁾、コントロールラットにLPSを経口投与した群にくらべ血中ALP、ALT値の有意な上昇がみられており、腸管由来のエンドトキシンがアルコール性肝障害の発生機序に関与していることが示唆される。エタノールとLPSを経口投与することによりアルコール性肝障害の簡便なラットモデルが作成できる可能性があり、今後さらなる研究を続けていく必要がある。

臨床例においては、慢性的なエタノール摂取の上にさらに連続飲酒発作が加わり、急性に高濃度で大量のエタノールが腸管に加わるため、腸管からのLPSの流入が亢進し肝障害の進展に関与している可能性が考えられる。

総 括

急性および慢性エタノール投与が腸管からのエンドトキシン吸収におよぼす影響につきラットにおいて*in vivo*の系で検討した。

1. 急性エタノール投与は腸管からのエンドトキシン吸収を亢進させた。急性エタノール投与による近位小腸の出血性びらんおよび小腸における非特異的な透過性の亢進が腸管からのエンドトキシン吸収の亢進の原因と考えられた。

2. 慢性エタノール投与は小腸の非特異的な透過性を亢進させ、腸管からのエンドトキシン吸収を亢進させた。これには慢性エタノール投与による遠位小腸における微絨毛の高さの減少や細胞内小器官の変性が関与していると考えられた。臨床的なアルコール性肝障害では、このような慢性的な変化と急性の変化が組み合わさってエンドトキシン血症をきたし、肝障害の進展機序に関与していることが考えられた。

稿を終えるにあたり、御指導、御校閲を賜りました慶應義塾大学医学部内科学教室石井裕正教授に深謝いたします。また本研究の遂行に当たり直接御指導、御鞭撻をいただきました慶應義塾大学医学部消化器内科加藤眞三講師、堀江義則講師に深甚なる感謝の意を表します。

本研究の一部は第33回日本肝臓学会(1997年、名古屋)、第9回ISBRA(International Society for Biomedical Research on Alcoholism)(1999年、Copenhagen, Denmark)第101回アメリカ消化器病学会(2001年、Atlanta, USA)において発表した。

文 献

- 1) McClain C, Hill D, Schmidt J, Diehl AM: Cytokines and alcoholic liver disease. *Semin Liver Dis* 13: 170-

- 82, 1993
- 2) Chitturi S, Farrell GC : Etiopathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis. *Semin Liver Dis* 21 : 27-41, 2001
 - 3) Nolan JP, Leibowitz AI : Endotoxin and the liver. Modification of acute carbon tetrachloride injury by polymyxin B-an antiendotoxin. *Gastroenterology* 75 : 445-449, 1978
 - 4) Bode C, Kugler V, Bode JC : Endotoxemia in patients with alcoholic and non-alcoholic cirrhosis and in subjects with no evidence of chronic liver disease following acute alcohol excess. *J Hepatol* 4 : 8-14, 1987
 - 5) Fukui H, Brouner B, Bode JC, Bode C : Plasma endotoxin concentration in patients with alcoholic and non-alcoholic liver disease : reevaluation with an improved chromogenic assay. *J Hepatol* 12 : 162-169, 1991
 - 6) Nanji AA, Khettry U, Sadrzadeh SM, Yamanaka T : Severity of liver injury in experimental alcoholic liver disease Correlation with plasma endotoxin, prostagrandin E2, leukotriene B4, and thromboxane B2. *Am J Pathol* 142 : 367-373, 1993
 - 7) Adachi Y, Moore LE, Bradford BU, Gao W, Thurman RG : Antibiotics prevent liver injury in rats following long-term exposure to ethanol. *Gastroenterology* 108 : 218-224, 1995
 - 8) Nanji AA, Khettry U, Sadrzadeh SMH : Lactobacillus feeding reduces endotoxemia and severity of experimental alcoholic liver disease. *Proc Soc Exp Bio Med* 205 : 243-247, 1994
 - 9) Ishii K, Furudera S, Kumashiro R, Koga Y, Hamada T, Sata M, Abe H, Tanikawa K : Clinical and pathological features, and the mechanism of development in severe alcoholic hepatitis, especially in comparison with acute type fulminant hepatitis. *Alcohol Alcohol (Suppl)* : 97B-103B, 1993
 - 10) Ohki E, Kato S, Horie Y, Mizukami T, Tamai H, Yokoyama H, Ito D, Fukuda M, Suzuki H, Kurose I, Ishii H : Chronic ethanol consumption enhances endotoxin induced hepatic sinusoidal leukocyte adhesion. *Alcohol Clin Exp Res*. 20 (Suppl) 9 : 350A-355A, 1996
 - 11) Arai M, Nakano S, Okuno F, Hirano Y, Sujita K, Kobayashi T, Ishii H, Tsuchiya M : Endotoxin induced hypercoagulability : a possible aggravating factor of alcoholic liver disease. *Hepatology* 9 846-851, 1989
 - 12) Horie Y, Kato S, Ohki E, Tamai H, Yamagishi Y, Ishii H : Hepatic microvascular dysfunction in endotoxemic rats after acute ethanol administration. *Alcohol Clin Exp Res* 24 : 691-698, 2000
 - 13) Tilg H, Diehl AM : Cytokines in alcoholic and nonalcoholic steatohepatitis. *N Engl J Med* 343 : 1467-1476, 2000
 - 14) Yang SQ, Lin HZ, Lane MD, Clemens M, Diehl AM : Obesity increases sensitivity to endotoxin liver injury : implications for the pathogenesis of steatohepatitis. *Proc Natl Acad Sci* 94 : 2557-2562, 1997
 - 15) Chitturi S, Farrell GC : Etiopathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis. *Semin Liver Dis* 21 : 27-41, 2001
 - 16) Shiratori Y, Teraoka H, Matano S, Matsumoto K, Kamii K, Tanaka M : Kupffer cell function in chronic ethanol-fed rats. *Liver* 9 : 351-359, 1989
 - 17) Liu YK : Phagocytic capacity of reticuloendothelial function system in alcoholics. *J Reticuloendothelial Soc* 25 : 605-613, 1979
 - 18) Ali MV : Alcohol induced depression of reticuloendothelial function in the rat. *J Lab Clin Med* 20 : 184-189, 1969
 - 19) Bjarnason I, Ward K, Peters TJ : The leaky gut of alcoholism : possible route of entry for toxic compounds. *Lancet* 1 : 179-182, 1984
 - 20) Worthington BS, Meserole L, Syrotuck JA : Effect of daily ethanol ingestion on intestinal permeability to macromolecules. *Am J Dig Dis* 23 : 23-32, 1978
 - 21) Robinson GM, Orrego H, Israel Y, Devenyi P, Kapur BM : Low molecular-weight polyethylene glycol as a probe of gastrointestinal permeability after alcohol ingestion. *Dig Dis Sci* 26 : 971-977, 1981
 - 22) Keshavarzian A, Fields JZ, Vaeth J, Holmes EW : The differing effect of acute and chronic alcohol on gastric and intestinal permeability. *Am J Gastro* 89 : 2205-2211, 1994
 - 23) Bode C, Vollmer E, Hug J, Bode JC : Increased permeability of the gut to polyethylene glycol and dextran in rats fed alcohol. *Annals New York Academy of Sciences* 837-840, 1991
 - 24) Arai M, Okuno F, Hirano Y, Kobayashi T, Ishii H, Tsuchiya M : Effect of ethanol on intestinal uptake of endotoxin *Jpn J Gastroenterol* 83 : 1060, 1986
 - 25) Lieber CS, DeCarli LM : Animal models of ethanol dependence and liver injury in rats and baboons. *Fed Proc* 35 : 1232-1236, 1976
 - 26) Tamura H, Tanaka S, Obayashi T, Yoshida M, Kawai T : A new sensitive microplate assay of plasma endotoxin. *J Clin Lab Anal* 6 : 232-238, 1992
 - 27) Unno N, Wang H, Menconi MJ, Tytgat SH, Larkin V, Smith M, Morin MJ, Chavez A, Hodin RA, Fink MP : Inhibition of inducible nitric oxide synthase ameliorates endotoxin-induced gut mucosal barrier dysfunction in rats. *Gastroenterology* 113 : 1246-1257, 1997
 - 28) Baraona E, Pirola RC, Lieber CS : Small intestinal damage and changes in cell population produced by ethanol ingestion in the rat. *Gastroenterology* 66 : 226-234, 1974
 - 29) Dinda PK, Holitzner CA, Morris GP, Beck IT : Ethanol-induced jejunal microvascular injury in relation to histamine release in rabbits. *Gastroenterology* 104 : 361-368, 1993
 - 30) Dinda PK, Wasan S, Beck IT, Kossev P : Adaptive

- cytoprotection against ethanol-induced small intestinal mucosal injury. *Can J Physiol* 74 : 598-602, 1996
- 31) Gardiner KR, Halliday MI, Barclay GR, Milne L, Brown D, Stephens S, Maxwell RJ, Rowlands BJ : Significance of systemic endotoxaemia in inflammatory bowel disease *Gut* 36 : 897-901, 1995
- 32) Tamai H, Kato S, Horie Y, Ohki E, Yokoyama H, Ishii H : Effect of acute ethanol administration on the intestinal absorption of endotoxin in rats. *Alcohol Clin Exp Res* 24 : 390-394, 2000
- 33) Draper LR, Gyure LA, Hall JG, Robertson D : Effect of alcohol on the integrity of the intestinal epithelium. *Gut* 24 : 399-404, 1983
- 34) Tamai H, Horie Y, Kato S, Yokoyama H, Ishii H : Long-term ethanol feeding enhances susceptibility of the liver to orally administered lipopolysaccharides in rats. *Alcohol Clin Exp Res*. 26(8 Suppl) : 75S-80S, 2002
- 35) Lansdown AB, Dayan AD : Alterations in crypt cell populations in the small intestine as an early toxic response to sub-acute ethanol administration. *Arch Toxicol* 59 : 448-452, 1987
- 36) Zarling EJ, Mobarhan S, Donahue PE : Effect of moderate prolonged ethanol ingestion on intestinal disaccharidase activity and histology. *J Lab Clin Med* 108 : 7-10, 1986
- 37) Rubin E, Rybak BJ, Lindenbaum J, Gerson CD, Walker G, Lieber CS : Ultrastructural changes in the small intestine induced by ethanol. *Gastroenterology* 63 : 801-814, 1972
- 38) Bode JC, Knuppel H, Schwerk W, Lorenz-Meyer H, Durr HK : Quantitative histomorphometric study of the jejunal mucosa in chronic alcoholics. *Digestion* 23 : 265-270, 1982
- 39) Bode JC, Bode C, Heidelbach R, Durr HK, Martini GA : Jejunal microflora in patients with chronic alcohol abuse. *Hepatogastroenterology* 31 : 30-34, 1984
- 40) Seitz HK, Poschl G : The role of gastrointestinal factors in alcohol metabolism. *Alcohol Alcohol* 32 : 543-549, 1997
- 41) Persson J : Alcohol and the small intestine *Scand J Gastroenterol* 26 : 3-15, 1991
- 42) Nano JL, Cefai D, Rampal P : Effects of ethanol on an intestinal epithelial cell line. *Alcohol Clin Exp Res* 14 : 32-37, 1990
- 43) Nolan JP, Hare DK, McDevitt JJ, Ali MV : In vitro studies of intestinal endotoxin absorption. I. Kinetics of absorption in the isolated everted gut sac. *Gastroenterology* 72 : 434-439, 1977
- 44) 野口和典, 居石哲治, 笹富くるみ, 谷川久一 : 腸管での吸収の機序と肝病変における変化 肝胆膵, 35 : 295-302, 1997
- 45) Ma TY, Nguyen D, Bui V, Nguyen H, Hoa N : Ethanol modulation of intestinal epithelial tight junction barrier. *Am J Physiol* 276 : G965-G974, 1999
- 46) Mathurin P, Deng QG, Keshavarzian A, Choudhary S, Holmes EW, Tsukamoto H : Exacerbation of alcoholic liver injury by enteral endotoxin in rats. *Hepatology* 32 : 1008-1017, 2000