

エブセレンの胃粘膜損傷抑制作用機作と  
胃粘膜上皮粘液細胞株の樹立

田渕圭章



①

エブセレンの胃粘膜損傷抑制作用機作と胃粘膜上皮粘液細胞株の樹立

田 渕 圭 章

目次

序論----- 1

第一部 エブセレンのラット胃液分泌および各種ラットまたは  
マウス胃粘膜損傷に対する作用----- 3

第二部 エブセレンのブタ胃  $H^+, K^+$ -ATPase 阻害作用機序の検討-----16

第三部 オンコジーン導入トランスジェニックマウスからの胃粘  
膜上皮粘液細胞株 (GSM06 および GSM10) の樹立および  
GSM06 細胞のエタノール障害に対するエブセレンの効果-----26

結論-----50

謝辞-----52

引用文献-----53



Fig. 1. Chemical structure of *N*-phenyl-3-indolylpropanamide (GSM06)



グルタチオンペルオキシダーゼ (EC 1.11.1.9.) はグルタチオンと過酸化水素または脂質過酸化物を基質にし, 哺乳動物の組織, 特に赤血球に多量に存在する抗酸化作用に携わる酵素である<sup>17, 31)</sup>. 分子量は約 90 kDa で, 1 分子あたり 4 個のセレン原子を含む. その活性中心は芳香環近傍のセレンスルフィド (Se-S) と考えられており, 低分子量化合物であってもこれに類似した構造を有していればグルタチオンペルオキシダーゼ様活性を持つ可能性が考えられる. エブセレン (ebselen; 2-phenyl-1,2-benzisoselenazol-3(2H)-one, Fig. 1) はこの様な考えに基づいて開発された低分子セレン有機化合物で, *in vitro* においてグルタチオンペルオキシダーゼ様作用に加えて, 5-リボキシゲナーゼおよびサイクロオキシゲナーゼ阻害作用等を有する<sup>46, 47, 76, 77, 89, 91, 105, 136)</sup>. 本薬は, 種々の実験的病態モデルにも有効で, ガラクトサミン惹起肝障害<sup>137)</sup>, 虚血性脳浮腫<sup>40, 129)</sup>, 糖尿病<sup>23)</sup>, 急性膵障害<sup>80)</sup>, 腎虚血再還流障害モデル<sup>25)</sup> 等を抑制することが報告されている. 日本では現在, エブセレンは臨床においてクモ膜下出血に対してフェイズIII試験を実施中で, 脳梗塞急性期に対してはフェイズII b 試験が終了している. 一方, 消化器疾患への適応も考慮されている.

胃粘膜損傷は胃酸, ペプシン等の攻撃因子と胃粘液, 胃粘膜血流等の防御因子のアンバランスによって起こると考えられている<sup>18, 111, 121)</sup>. 脂質過酸化<sup>69, 70, 88, 95, 120)</sup>, フリーラジカル<sup>36, 95, 122)</sup>, ペプチドロイコトリエン (pLT)<sup>27, 41, 45, 81, 93, 114, 125)</sup> 等も胃粘膜損傷形成に関与することが示唆されている. また近年, Beil ら<sup>7)</sup> によりエブセレンは胃酸分泌の最終段階に関与する  $H^+, K^+$ -ATPase<sup>24, 103, 104, 116)</sup> を阻害することが示された. これらの知見から, エブセレンは胃液分泌および胃粘膜損傷抑制作用を有する可能性が推察されるが, *in*

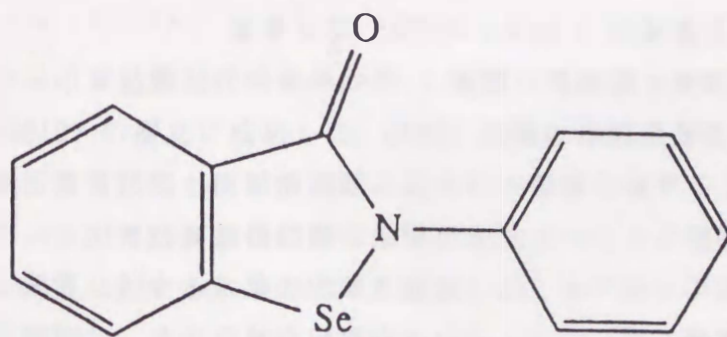


Fig. 1. Chemical structure of ebselen (2-phenyl-1,2-benzisoselenazol-3(2H)-one, molecular weight: 274.18).



vivo 実験モデルにおいてそれらを明確に示した報告はない。そこで、幽門結紮ラットを用いてエブセレンの胃液分泌抑制活性の検出を試みた。また、本薬の胃粘膜損傷抑制作用を損傷発現に胃酸の関与が大きいとされるラット水浸拘束ストレスおよびアスピリン胃粘膜損傷モデルおよび、ガストロプロテクションの検出モデルであるラット塩酸、ラット塩酸-エタノールおよびマウスエタノール胃粘膜損傷モデルで検討した。その結果、エブセレンは胃液分泌および胃粘膜損傷抑制作用を有すること、および本薬の胃粘膜損傷抑制作用機序の少なくとも一部に脂質過酸化および pLT 産生の抑制が関与することが示された。

$H^+, K^+$ -ATPase は酵素反応サイクルの中でリン酸化中間体を形成する P 型 ATPase で<sup>116, 117, 134, 135</sup>), これまでに種々の作用機作に基づくモノクローナル抗体<sup>3)</sup> や阻害剤<sup>4, 6, 54)</sup> が開発されている。先にも記述したが、エブセレンは  $H^+, K^+$ -ATPase を抑制し、その作用部位は  $H^+, K^+$ -ATPase 阻害剤オメブラゾール<sup>19, 54, 71, 72)</sup> と同様に酵素のスルヒドリル基であることが明らかにされている<sup>7)</sup>。しかし、酵素反応サイクルの部分反応に対する作用は検討されていない。今回、ブタ胃体部粘膜より  $H^+, K^+$ -ATPase を含む胃ベシクルを調製し、 $H^+, K^+$ -ATPase の部分反応 (リン酸化, 脱リン酸化および  $E_1$  から  $E_2K$  へのコンフォメーション変化<sup>37)</sup>) に対するエブセレンの効果を検討した。その結果、本薬は酵素のスルヒドリル基に作用し、主に脱リン酸化過程を抑制して酵素を阻害することが判明した。

胃粘膜上皮粘液細胞は種々の防御因子を産生し、攻撃因子から胃粘膜を保護している<sup>9, 43, 65, 66)</sup>。この細胞を含む胃粘膜上皮細胞の培養系は未だ確立されたものがなく、また機能を有した細胞株樹立の報告もない。近年、特異的機能を保持した不死化細胞樹立のために simian virus 40 large T (SV40 large T) 抗原遺伝子が用いられている<sup>60, 92, 139)</sup>。さらに、温度感受性突然変異株 tsSV40 large T 抗原遺伝子を導入したトランスジェニックマウスから種々の細胞株が確立されている<sup>14, 138, 141, 142)</sup>。著者らは tsSV40 large T 抗原遺伝子導入トランスジェニックマウスの胃粘膜初代培養系から 2 種類の胃粘膜上皮粘液細胞株 (GSM06 および GSM10) の樹立に成功した。GSM06 細胞は温度感受性の細胞増殖を示し、また種々の正常胃粘膜上皮粘液細胞に見られる機能を有することが明らかとなった。エブセレンの胃粘膜損傷抑制作用機序を明らかにする目的で、GSM06 細胞のエタノール障害に対する本薬の効果を検討した。エブセレンはエタノール細胞障害を有意に抑制し、その抑制作用機序の少なくとも一部に脂質過酸化の阻害が関与することが示された。

以下、これらについて三部に分けて記述する。



## 第一部

### エブセレンのラット胃液分泌および各種ラットまたはマウス 胃粘膜損傷に対する作用

#### 1. 序

胃粘膜損傷は胃酸、ペプシン等の攻撃因子と胃粘液、胃粘膜血流等の防御因子のアンバランスによって起こると考えられている<sup>18,111,121)</sup>。近年、脂質過酸化<sup>69,70,88,95,120)</sup>、フリーラジカル<sup>36,95,122)</sup>、pLT<sup>27,41,45,81,93,114,125)</sup>等が胃粘膜損傷形成に関与すると報告されている。一方、セレン有機化合物エブセレンは抗酸化作用、グルタチオンペルオキシダーゼ様活性、5-リポキシゲナーゼ阻害作用を有するので<sup>46,47,76,77,89,91,105,136)</sup>、本薬に胃粘膜損傷抑制作用がある可能性が推察される。In vitro 実験系において、エブセレンは胃酸分泌の最終段階に関与する  $H^+,K^+$ -ATPase を抑制することが示された<sup>7)</sup>。しかしながら、in vivo 実験系において本薬が胃液分泌および胃粘膜損傷抑制作用を有するか否かは明らかでない。それゆえ、第一部ではエブセレンの抗胃液分泌作用を幽門結紮ラットで検討した。さらに、胃粘膜損傷抑制作用を損傷発現に胃酸の関与が大きいラット水浸拘束ストレスおよびアスピリン胃粘膜損傷および、ガストロプロテクションの検出モデルであるラット塩酸、ラット塩酸-エタノールおよびマウスエタノール胃粘膜損傷モデルで検証した。また、マウスエタノールモデルにおいて、エブセレンの胃粘膜損傷抑制作用における脂質過酸化および pLT の役割を調べた。

#### 2. 実験材料および方法

##### 1) 実験動物

雄性 Sprague-Dawley (SD) 系ラット (体重 170~200g, 日本 SLC, 静岡), 雄性 Donryu 系ラット (体重 160~300g, 日本チャールスリバー, 神奈川) および雄性 C57BL/6 マウス (体重 15~25g, 日本チャールスリバー) を使用した。飼育は温度 ( $23 \pm 2^\circ\text{C}$ ) および湿度 ( $55 \pm 15\%$ ) がコントロールされた動物室で行い、市販の固形飼料 (F-2, 船橋農場, 千葉) および上水道水を自由に摂取させた。

##### 2) 実験材料

エブセレン (Fig. 1) は A. Nattermann & Cie. GmbH 社 (Cologne, Germany) より得た。アスピリンはエビス製薬 (大阪), Tween 80 はナカライテスク社 (京



都), インドメタシンおよびウシ血清アルブミン (BSA) は Sigma 社 (St. Louis, MO, USA), Daigo's T 培地 (Hepes およびフェノールレッド含まず) は和光純薬 (大阪) より各々購入した。

### 3) 薬物の投与

エブセレンは 0.5% カルボキシメチルセルロース (CMC) 水溶液に懸濁し, 5 ml/kg の割合で投与した。胃粘膜損傷の実験では, エブセレンは損傷惹起の 30 分前に経口投与 (p.o.) し, 胃液分泌の実験では幽門結紮直後に十二指腸内投与 (i.d.) した。

### 4) 幽門結紮ラットにおける胃液分泌の測定

幽門結紮ラットにおける胃液分泌は概ね Shay らの方法<sup>110)</sup> に従って行なった。すなわち, Donryu 系ラット (体重 130~160 g) を一晩絶食後, 軽いエーテル麻酔下に腹部を正中線に沿って切開し, 幽門を結紮後, 切開部を縫合した。動物を覚醒下で 4 時間飼育後, 過剰のエーテルで屠殺した。胃を摘出し, 胃内容物を集め, 遠心 (3,000 rpm, 20 min) により胃液を分離後, その容積を測定し, 体重 100 g あたりに換算して表示した (ml/100 g b.w.)。胃液の酸度は自動滴定機 (HSM-10A, 東亜電気, 東京) を用いて 0.1N NaOH で pH 7 まで滴定して求め, mEq/l で表示した。胃液量と酸度の積を酸排出量とし,  $\mu\text{Eq}/100\text{ g b.w.}$  で表わした<sup>124)</sup>。

### 5) ラット水浸拘束ストレス胃粘膜損傷の惹起

水浸拘束ストレス胃粘膜損傷は以前の方法に準じて行なった<sup>124, 126)</sup>。即ち, 非絶食 Donryu 系ラット (体重 270~300g) を水浸拘束ストレスケージに入れ, 垂直にして剣状突起レベルまで水に浸かるようにし, 21°C で 7 時間水浸拘束負荷を施した。エーテル麻酔下にラット腹部を正中線に沿って切開し, 胃を摘出後, 胃内に 2% ホルマリン緩衝液 10 ml を注入し, さらに同ホルマリン緩衝液中で, 20 分間軽度固定した (25°C)。それから, 固定された胃を大弯に沿って切開し, 胃粘膜損傷の程度を評価した。個々の動物の損傷 (黒色壊死病変) の長さをノギスで計測し, 合計したものを損傷指数 (ulcer index) とした。

### 6) ラットアスピリン胃粘膜損傷の惹起

Donryu 系ラット (体重 160~200g) を一晩絶食後実験に供した。ラットにアスピリン (300 mg/kg) を経口投与し, 5 時間後に上記水浸拘束ストレスモデルと同様にして胃粘膜損傷の程度を評価した<sup>124)</sup>。



#### 7) ラット塩酸および塩酸-エタノール胃粘膜損傷の惹起

SD 系ラットを一晩絶食後実験に用いた。動物に塩酸 (0.6 N) または塩酸-エタノール (60% ethanol in 0.15 N HCl) を経口投与し (1 ml/rat), 60 分後に上記水浸拘束ストレスモデルと同様にして胃粘膜損傷の程度を評価した<sup>68, 101, 125</sup>。内因性プロスタグランジン (PG) の影響を調べる実験では, 胃粘膜損傷惹起の 60 分前に 0.2% Tween 80 を含む生理食塩水に溶解したインドメタシン (5 mg/kg) をラットに投与し損傷を惹起した<sup>125</sup>。胃粘膜組織標本を作成するとき, 胃体部組織を 10% ホルマリン緩衝液で固定し, 常法に従って periodic acid Schiff (PAS)-aurantia 染色した<sup>48</sup>。

#### 8) マウスエタノール胃粘膜損傷の惹起および胃粘膜過酸化脂質および pLT の測定

マウスを一晩絶食後実験に用いた。動物にエタノールを経口投与し (50  $\mu$ l/mouse), 30 分後, エーテル麻酔下に腹部を正中線に沿って切開した。胃を摘出後, 胃内に 2% ホルマリン緩衝液 0.5 ml を注入し, 上記水浸拘束ストレスモデルと同様にして胃粘膜損傷の程度を評価した。

胃粘膜過酸化脂質および pLT 量を測定するとき, 上記のごとくエタノール胃粘膜損傷を作製後, ピンセットを用いて胃体部から粘膜層を剥離し, その粘膜を氷冷生理食塩水で 2 回洗浄した。過酸化脂質を測定する場合, 粘膜サンプルに生理食塩水を添加し, テフロンホモジナイザーでホモジナイズした。サンプル中の過酸化脂質量は Ohkawa らの方法<sup>82</sup> に従いチオバルビツール酸反応物質質量とした。pLT を測定するとき, 粘膜を Daigo's T 培地中で 15 分間盪湯培養した (37°C)。次に, 培養上清を回収し (1,400 x g, 10 min), 上清中に遊離した pLT 量を pLT エンザイムイムノアッセイ (EIA) キット (Amersham Japan 社, 東京) で測定した。本キットは LTC<sub>4</sub>, LTD<sub>4</sub> および LTE<sub>4</sub> と各々 100, 100 および 70% 反応する。サンプルのタンパク濃度は BSA を標準とし Lowry らの方法<sup>55</sup> に従って測定した。

#### 9) 統計処理

結果は平均  $\pm$  標準誤差 (S.E.M.) で示した (N=6~8)。統計学的解析は Dunnett の多重比較法を用いて行い, P 値が 0.05 以下を有意差有りと判定した。



### 3. 実験結果

#### 1) 幽門結紮ラット胃液分泌に対する作用

幽門結紮の4時間後, ラット100gあたり $4.5 \pm 0.4$  mlの胃液が採取され, その酸度および酸排出量は各々 $123.3 \pm 2.1$  (mEq/l) および $564.6 \pm 49.4$  ( $\mu$ Eq/100 g b.w.)であった. エブセレン(10~300 mg/kg, i.d.)投与ラットにおいて, 胃液および酸排出量は30 mg/kg, 酸度は100 mg/kgから用量依存的かつ有意に抑制され, 300 mg/kg投与ではほぼ完全な抑制作用が観察された (Table 1).

#### 2) ラット水浸拘束ストレスおよびアスピリン胃粘膜損傷に対する作用

水浸拘束ストレス負荷(21°C, 7h)によりラット胃体部粘膜には線状の出血性黒色胃粘膜壊死が惹起された. エブセレンの100および300 mg/kgの経口投与は本胃粘膜損傷を有意に抑制し, 各々の抑制率は47および67%であった (Fig. 2).

また, アスピリン(300 mg/kg)経口投与の5時間後, 胃体部粘膜には水浸拘

Table 1. Effect of ebselen on gastric acid secretion in pylorus-ligated rats.

Dose (mg/kg)	Volume (ml/100 g b.w.)	Acidity (mEq/l)	Acid output ( $\mu$ Eq/100 g b.w.)
Vehicle	$4.5 \pm 0.4$	$123.3 \pm 2.1$	$564.6 \pm 49.4$
10	$4.8 \pm 0.4$ (-7)	$121.6 \pm 3.1$ (1)	$585.0 \pm 52.3$ (-4)
30	$3.1 \pm 0.3^a$ (31)	$125.3 \pm 3.4$ (-2)	$388.0 \pm 45.8^a$ (31)
100	$1.1 \pm 0.2^a$ (76)	$82.9 \pm 6.0^a$ (33)	$93.9 \pm 17.6^a$ (83)
300	$0.5 \pm 0.1^a$ (89)	$56.6 \pm 5.2^a$ (54)	$25.9 \pm 4.3^a$ (95)

Ebselen was administered intraduodenally immediately after pylorus ligation. The injection volume was constant at 5 ml/kg b.w., and an equal volume of vehicle was given to the control group. Gastric juice was collected for 4 h after ligation and analyzed for acidity with an automatic titrator (HSM-10A, Toa Electronics, Tokyo). Acid output was calculated as the production of acidity multiplied by the volume and expressed in terms of  $\mu$ Eq/100 g b.w. All data indicate means  $\pm$  S.E.M. (N=10). Figures in the parentheses indicate the percent inhibition.  $^aP < 0.01$  vs. vehicle control group (Dunnett's multiple comparison).



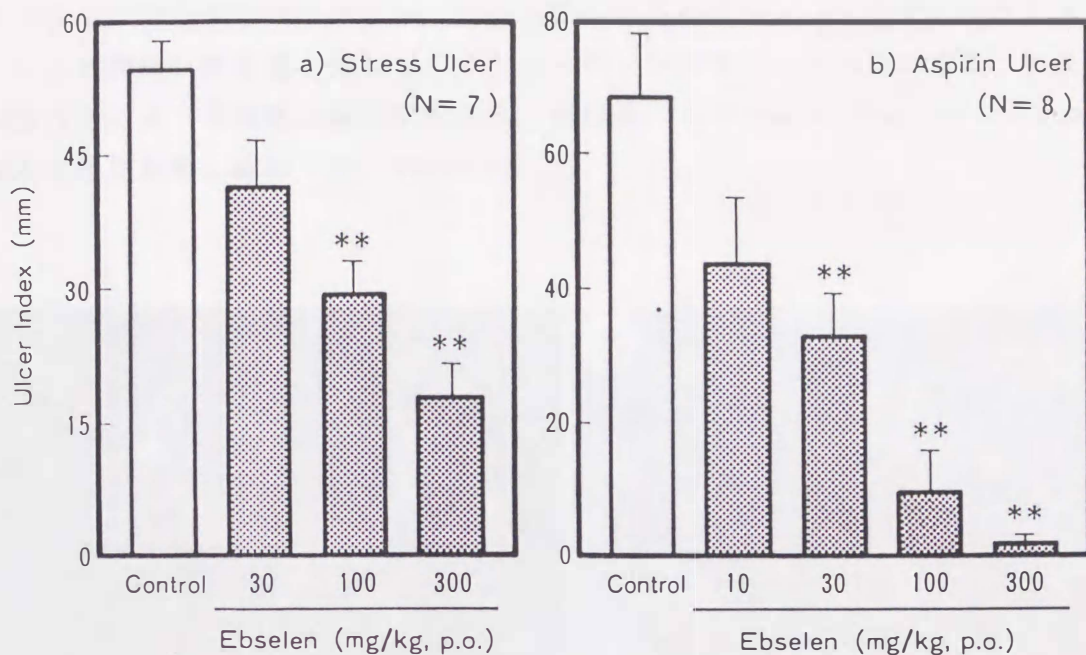


Fig. 2. Effects of ebselen on water-immersion restraint stress- (left, a) and aspirin-induced (right, b) gastric ulceration in rats. Ebselen was administered orally 30 min before exposure to stress or aspirin administration. The injection volume was maintained at 5 ml/kg, and an equal volume of vehicle was given to the control group. Each column and vertical bar represent the mean  $\pm$  S.E.M. (N=7 or 8). \*\*P<0.01 vs. vehicle control group (Dunnett's multiple comparison).

束ストレスモデルの病変と類似した線状の出血性黒色胃粘膜壊死が形成され、エブセレンの 30, 100 および 300 mg/kg (p.o.) はこの胃粘膜損傷を用量依存的かつ有意に抑制し、各々の用量における抑制率は 49, 82 および 97% を示した (Fig. 2).

### 3) ラット塩酸および塩酸-エタノール胃粘膜損傷に対する作用

塩酸または塩酸-エタノールの経口投与は、肉眼的にラット胃体部粘膜に広範な線状出血性黒色胃粘膜壊死を惹起した (Fig. 3)。また、組織学的には上皮細胞の脱落、微小循環障害および胃粘膜下層浮腫を伴う胃粘膜壊死が観察された (結果示さず)。エブセレンの 10, 30 および 100 mg/kg の経口投与は塩酸または塩酸-エタノールによる胃粘膜損傷を用量依存的かつ有意に抑制した (Table 2 および 3, Fig. 3)。また、組織学的にも本薬の高用量 (100 mg/kg, p.o.) は上皮



細胞の脱落を一部抑制し、その他の損傷をほぼ完全に阻害した（結果示さず）。

エブセレンの塩酸および塩酸-エタノール胃粘膜損傷抑制効果に内因性 PG が関与するか否かを調べるために、ラットにインドメタシン（サイクロオキシゲナーゼ阻害剤）前処置を施した。インドメタシン投与ラットにおいても、起炎性物質投与により胃粘膜損傷が惹起され、高用量のエブセレン（100 mg/kg, p.o.）は本損傷を有意に抑制した（Table 4）。

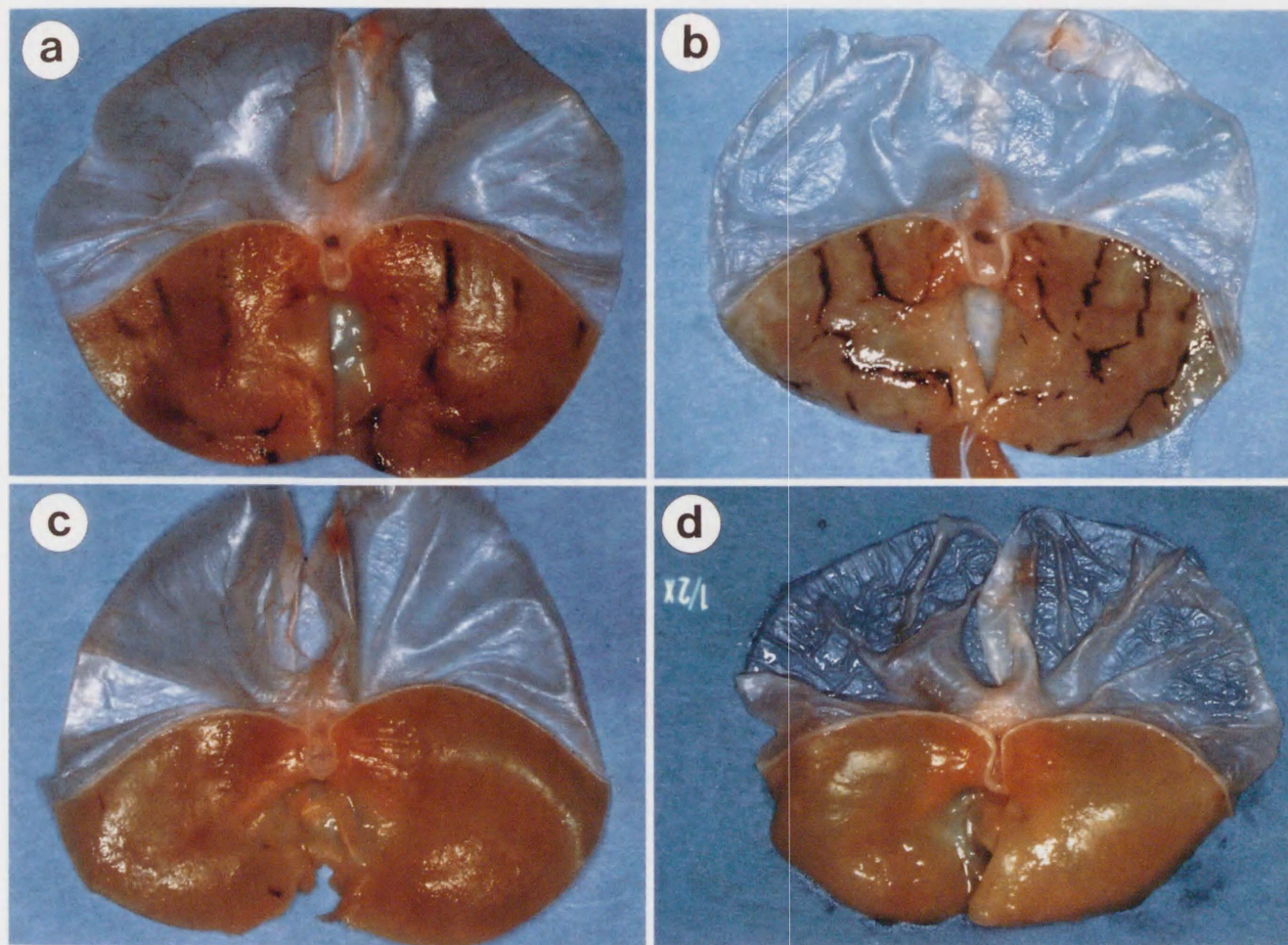


Fig. 3. Gross findings of gastric mucosal lesions produced by oral administration of HCl-ethanol (a) and 0.6 N HCl (b) in rats. Pretreatment with ebselen prevented almost completely the necrotic lesion formation induced by either HCl-ethanol (c) or 0.6 N HCl (d). Ebselen was given at 100 mg/kg p.o. at 30 min before the administration of the necrotizing agents.



Table 2. Effect of orally administrated ebselen on 0.6 N HCl-induced gastric mucosal lesions in rats.

Treatment	Lesion index (mm)	Inhibition (%)
Control	86.7 ± 15.9	
Ebselen		
10 mg/kg	35.3 ± 11.8 <sup>a</sup>	59
30 mg/kg	11.3 ± 3.4 <sup>a</sup>	87
100 mg/kg	3.5 ± 2.1 <sup>a</sup>	96

Ebselen was given at 30 min before the administration of 0.6 N HCl. The data represent the means ± S.E.M. for 6 animals. <sup>a</sup>P < 0.01 vs. control (Dunnett's multiple comparison).

Table 3. Effect of orally administrated ebselen on HCl-ethanol-induced gastric mucosal lesions in rats.

Treatment	Lesion index (mm)	Inhibition (%)
Control	75.1 ± 10.4	
Ebselen		
10 mg/kg	35.4 ± 11.0 <sup>a</sup>	53
30 mg/kg	8.0 ± 2.4 <sup>a</sup>	89
100 mg/kg	4.7 ± 3.0 <sup>a</sup>	94

Ebselen was given at 30 min before the administration of HCl-ethanol. The data represent the means ± S.E.M. for 6 animals. <sup>a</sup>P < 0.01 vs. control (Dunnett's multiple comparison).

Table 4. Effect of orally administrated ebselen on 0.6 N HCl- and HCl-ethanol-induced gastric mucosal lesions in indomethacin-pretreated rats.

Treatment	Lesion index (mm)	Inhibition (%)
0.6 N HCl model control	93.2 ± 8.8	
Ebselen	6.8 ± 5.8 <sup>a</sup>	93
HCl-ethanol model control	112.5 ± 8.8	
Ebselen	18.2 ± 8.4 <sup>a</sup>	85

Indomethacin was given at 5 mg/kg s.c. at 1 h before the administration of ebselen at 100 mg/kg p.o. The data represent the means ± S.E.M. for 6 animals. <sup>a</sup>P < 0.01 vs. control (Dunnett's multiple comparison).



4) マウスエタノール胃粘膜損傷および過酸化脂質量または pLT レベルに対する作用

エタノールの経口投与により肉眼的にはマウス胃体部粘膜に重篤な出血性壊死病変が認められ、微視的には上皮細胞の脱落および壊死、および胃粘膜下層浮腫が観察された (Fig. 4). エブセレン (10, 30 および 100 mg/kg) の経口前処置は 30 mg/kg の用量から出血性胃粘膜壊死を抑制し、30 および 100 mg/kg の抑制率は各々 83 および 92% であった (Fig. 5). 微視的にも、本薬の 30 mg/kg は上皮細胞の脱落および胃粘膜下層浮腫を抑制する傾向を示し (結果示さず)、また高用量 (100 mg/kg) では上皮細胞の脱落および胃粘膜下層浮腫を抑制し、上皮細胞の壊死も一部抑制した (Fig. 4).

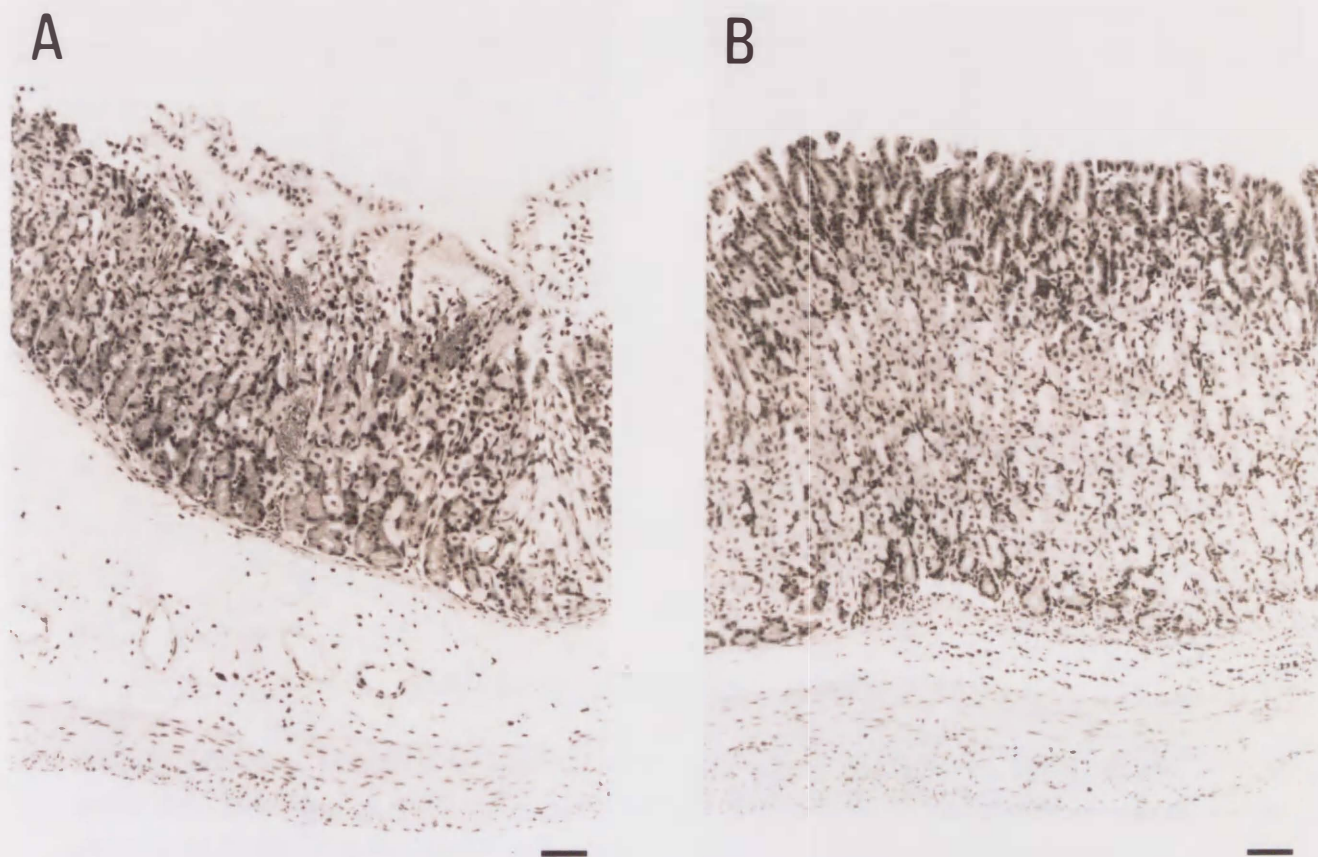


Fig. 4. Microscopic findings of gastroprotection by ebselen against ethanol-induced gastric injury. Ebselen (100 mg/kg) was administered orally 30 min before a single oral treatment with absolute ethanol (50  $\mu$ l/mouse). Thirty min later, gastric mucosa was fixed with 10% buffered formaldehyde. A, ethanol alone-treated gastric mucosa: Note desquamation and disruption in the surface mucous cells, edema in the gastric fundic mucosa and deep necrotic lesions. B, ebselen plus ethanol-treated gastric mucosa: Note protection against changes induced by ethanol. Bar=50  $\mu$ m.



エタノールの経口投与は過酸化脂質量 ( $50.0 \pm 3.4$  nmol/100 mg protein) および pLT レベル ( $248 \pm 19$  pg/mg protein/15 min) を有意に増加させ、両値は各々の溶媒処置群に比べて約 1.5 および 1.8 倍高い値を示した。エブセレン (10, 30 および 100 mg/kg) の経口投与はエタノールによる過酸化脂質量の上昇を 10 mg/kg から、pLT レベルの上昇を 30 mg/kg から用量依存的かつ有意に抑制した (Table 5)。

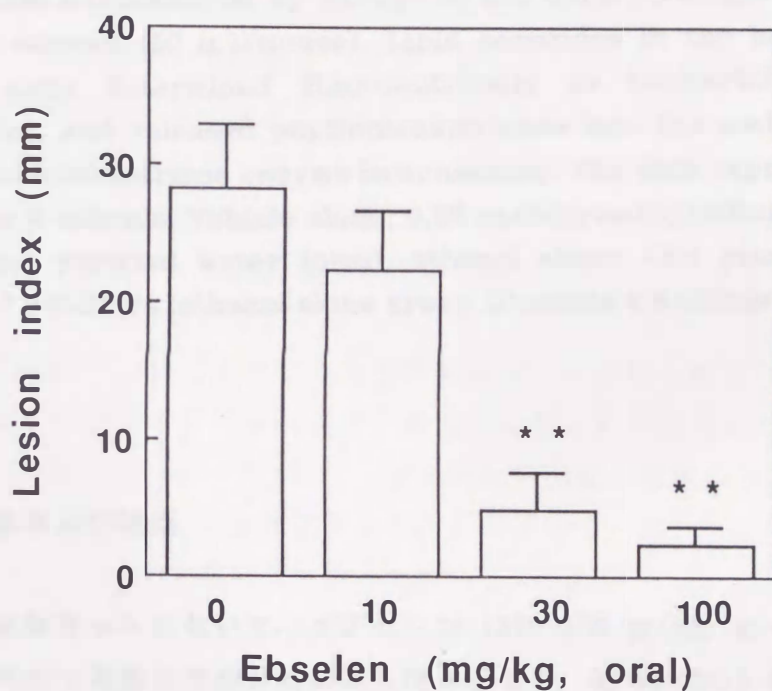


Fig. 5. Effect of ebselen on gastric mucosal lesions induced by ethanol in mice. Ebselen was administered by gavage 30 min before an oral treatment with absolute ethanol ( $50 \mu$  l/ml). Thirty min later, gastric lesions were visually examined. Each column and vertical bar represents the means  $\pm$  S.E.M. for 6 animals. \*\*:  $P < 0.01$  vs. zero-dose group (vehicle plus ethanol) (Dunnett's multiple comparison test).



Table 5. Effect of ebselen on lipid peroxides and peptidoleukotrienes in the gastric mucosa of mice treated with absolute ethanol.

Treatment	Dose (mg/kg)	Lipid peroxides (nmol/100 mg protein)	Peptidoleukotrienes (pg/mg protein/15 min)
Vehicle alone		33.7 ± 2.0 <sup>b</sup>	137 ± 9.2 <sup>b</sup>
Ethanol alone		50.0 ± 3.4	248 ± 19
+ ebselen	10	39.4 ± 2.0 <sup>a</sup>	205 ± 9.7
+ ebselen	30	37.5 ± 2.1 <sup>b</sup>	158 ± 6.8 <sup>b</sup>
+ ebselen	100	29.6 ± 1.3 <sup>b</sup>	154 ± 15 <sup>b</sup>

Ebselen was administered by gavage 30 min before a single oral treatment with absolute ethanol (50  $\mu$  l/mouse). Lipid peroxides in the homogenated gastric mucosa were determined fluorometrically as thiobarbituric acid-reactive substances, and released peptidoleukotrienes into the medium were measured by a peptidoleukotriene enzyme immunoassay. The data represents the means  $\pm$  S.E.M. for 6 animals. Vehicle alone: 0.5% carboxymethylcellulose sodium solution (CSS) plus purified water (oral), ethanol alone: CSS plus absolute ethanol. <sup>a</sup> $P < 0.05$ , <sup>b</sup> $P < 0.01$  vs. ethanol alone group (Dunnett's multiple comparison test).

#### 4. 考察および総括

幽門結紮ラットにおいて、エブセレン (30~300 mg/kg) の十二指腸内投与は用量依存的かつ有意な胃液分泌抑制活性を示した。近年、Beil ら<sup>7)</sup> はエブセレンがブタ胃ベシクルの  $K^+$  依存性 ATPase ( $K^+$ -ATPase) 活性 ( $IC_{50} = 0.15 \mu M$ ) および  $H^+, K^+$ -ATPase による胃ベシクル内へのプロトン取り込み ( $IC_{50} = 0.7 \mu M$ ) を阻害し、さらに単離モルモット壁細胞においてヒスタミン ( $IC_{50} = 13 \mu M$ ) およびジブチリル cAMP ( $IC_{50} = 12 \mu M$ ) 刺激によるアミノピリン蓄積亢進反応も抑制することを示した。これらの結果から、*in vitro* においてエブセレンは胃のプロトンポンプ  $H^+, K^+$ -ATPase を阻害し、胃酸分泌反応を抑制することが明らかにされた。我々もブタ胃ベシクルを用いた *in vitro* 実験系において、本薬の  $H^+, K^+$ -ATPase 抑制作用を確認するとともにその阻害様式の詳細を調べた (第二部参照)。既存のプロトンポンプ阻害剤オメブラゾールの  $K^+$ -ATPase 活性阻害の  $IC_{50}$  値は 0.47~7.8  $\mu M$  と報告されており<sup>54, 73)</sup>、エブセレンの作用 ( $ED_{50} = 0.06 \sim 0.15 \mu M$ ) よりも弱い。しかし、オメブラゾールのラット胃液分泌抑制作用の  $ED_{50}$  値



は 3.5 mg/kg であり<sup>59)</sup>, エブセレンの作用 ( $ED_{50}$  = 約 50 mg/kg) よりも強力であった。一方, エブセレンの胃液分泌抑制活性はコブラ毒素で誘導したラット浮腫モデルにおける本薬の抗炎症活性 ( $ED_{50}$  = 56 mg/kg, p.o.) とほぼ等しかった<sup>90)</sup>。

今回用いたラット水浸拘束ストレスおよびアスピリン胃粘膜損傷は, その損傷発現に胃酸の寄与が大きいモデルである。従って, これらの胃粘膜損傷はヒスタミン  $H_2$  レセプター拮抗剤, プロトンポンプ阻害剤等の酸分泌抑制剤により顕著に抑制される<sup>59, 83, 84, 121)</sup>。エブセレンによるこれらのモデルでの抑制効果は, その大部分が胃液分泌抑制作用に基づくと考えられた。エブセレンの酸分泌抑制用量 (30~300 mg/kg) における胃損傷抑制は, ストレスモデルよりもアスピリンモデルでより効果的であった。また, 本薬の胃液分泌非抑制用量 (10mg/kg) の投与はアスピリンモデルを抑制する傾向を示した。他方, これらのモデルにおいて胃損傷発生機序の一部に脂質過酸化<sup>95)</sup>, フリーラジカル<sup>95)</sup>, pLT<sup>45, 114)</sup> 等が関与することが示唆されている。エブセレンは抗酸化作用および 5-リポキシゲナーゼ阻害活性を有しており (Table 5), これらの作用が本薬のラット水浸拘束ストレスおよびアスピリン胃粘膜損傷抑制効果発現に寄与しているかもしれない。また, エブセレンがジクロフェナック (サイクロオキシゲナーゼ阻害剤)<sup>53)</sup> および虚血一再還流<sup>133)</sup> によるラット急性胃粘膜損傷を抑制することが明らかにされた。

PG およびそのアナログはエタノールをはじめとする種々の起炎症物質惹起胃粘膜損傷を抑制する<sup>50, 65, 100, 121)</sup>。この抑制作用は, 胃酸分泌抑制を介した効果ではなく, "ガストロプロテクション" と称されている<sup>100, 101)</sup>。PG の胃粘膜サイトプロテクション作用が発見された当初, この作用は PG 類にのみ限られると考えられていたが, その後の研究で構造的に PG と類似しない化合物にもこの様な作用があることが示された<sup>130)</sup>。本研究において, エブセレンは塩酸および塩酸-エタノール惹起ラット胃粘膜損傷およびエタノール惹起マウス胃粘膜損傷を顕著に抑制し, ガストロプロテクション作用を有することが明らかとなった。一方, 低濃度のエタノールまたは塩酸などの弱い刺激物は強力な起炎物質による胃粘膜損傷に対してガストロプロテクション作用を示し<sup>16, 102)</sup>, この作用は"アダプティブガストロプロテクション" と称されている。アダプティブガストロプロテクションは内因性の PG を介した作用で, この作用はインドメタシン等のサイクロオキシゲナーゼ阻害剤処置により消失する。エブセレンのガストロプロテクション作用はインドメタシン前処置 (5 mg/kg) により影響を受けなかった。従って, 本薬のガストロプロテクション効果はアダプティブガストロプロテクション作用ではなく, エブセレン自体の薬理作用に基づく効果であることが示唆された。

ガストロプロテクション作用機序について幾つかの説がある<sup>1, 57, 68, 70, 88,</sup>



106, 120). Boyd ら<sup>11)</sup> は胃粘膜組織中には高濃度の還元型グルタチオンが存在し、それが過酸化物質やフリーラジカルによる組織障害抑制に密接に関係していると報告した。エタノールの経口投与により胃粘膜の脂質過酸化レベルが上昇し、反対にスルヒドリル基レベルが減少した<sup>68, 70, 120)</sup>。ガストロプロテクション作用を発揮する 16,16-ジメチル PGE<sub>2</sub> は胃粘膜脂質過酸化を予防した<sup>69)</sup>。我々のマウスの実験においても、エタノールは胃粘膜過酸化脂質レベルを有意に上昇させた。5-リポキシゲナーゼにより産生される pLT 類もまた起炎性物質による胃粘膜損傷発生に関与することが知られている。Peskar ら<sup>93)</sup> および Peskar<sup>94)</sup> は、ラットにおいてエタノールの胃内投与により胃粘膜損傷の発生に比例して胃粘膜から LTC<sub>4</sub> が遊離されることを示した。我々のマウスを用いた実験でも、エタノール処置により胃体部粘膜から pLT 類の有意な遊離増加が観察された。これらの事実から、エタノール惹起マウス胃粘膜損傷発現の少なくとも一部に脂質過酸化および pLT 類が関与する可能性が示された。エブセレンの酸分泌抑制作用以外の作用点を fig. 6 に示す。

以上、エブセレンは胃液分泌および胃粘膜損傷抑制作用を有することが明らかとなった。



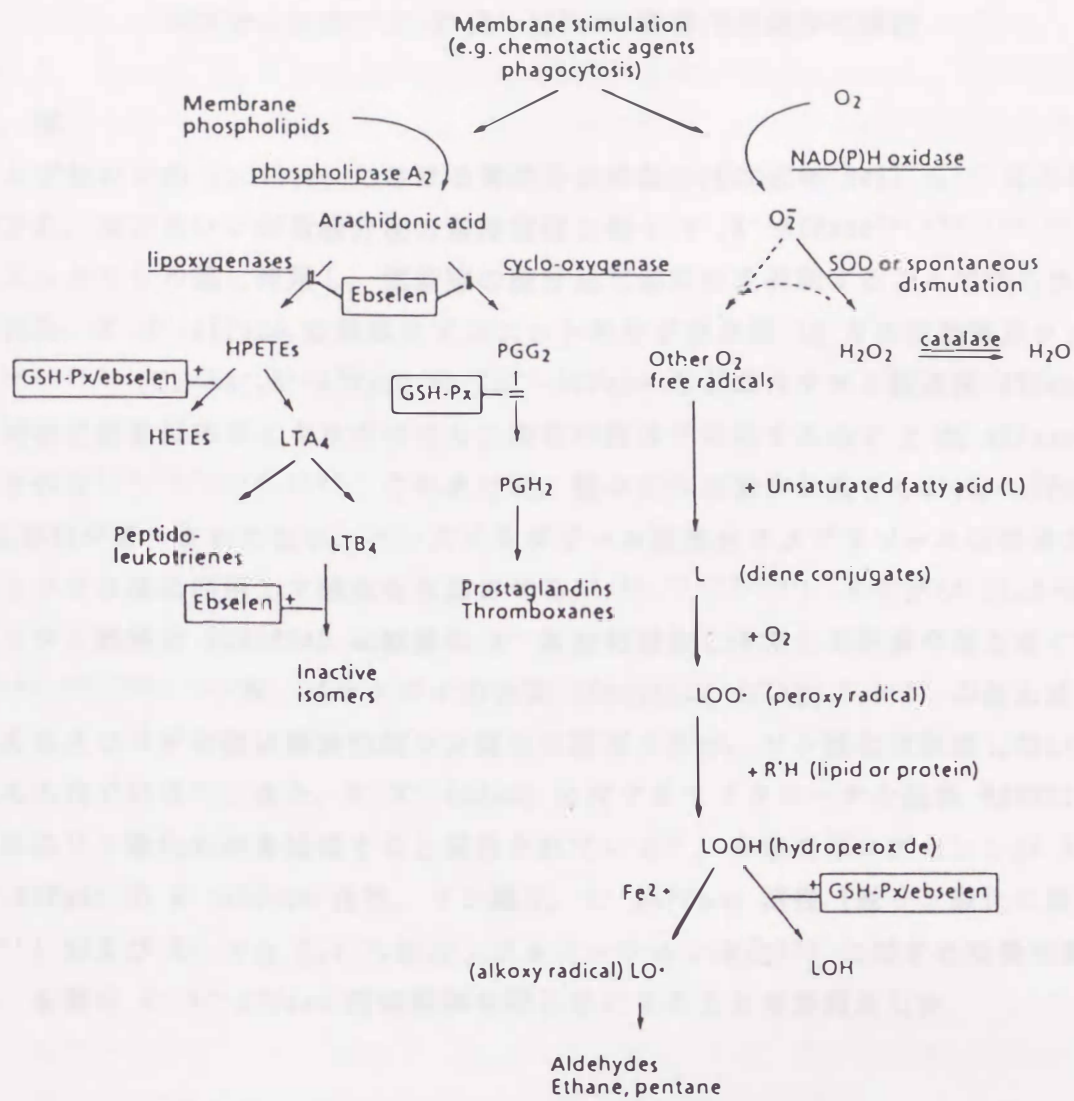


Fig. 6. Formation of hydroperoxides and their breakdown produced by leukocytes and sites of action of glutathione peroxidase (GSH-Px) and ebisen proposed by Parnham and Graf (reference 91).



## 第二部

### エブセレンのブタ $H^+, K^+$ -ATPase 阻害作用機序の検討

#### 1. 序

エブセレンの *in vitro* における胃酸分泌抑制作用は近年 Beil ら<sup>7)</sup> により確認され、エブセレンが胃酸分泌の最終段階に働く  $H^+, K^+$ -ATPase<sup>24, 103, 104, 116)</sup> のスルヒドリル基に作用し、壁細胞の酸分泌亢進反応を抑制することが明らかにされた。 $H^+, K^+$ -ATPase は触媒サブユニットの分子量が約 10 万の能動輸送タンパク<sup>103, 112)</sup> で、 $Na^+, K^+$ -ATPase や  $Ca^{2+}$ -ATPase などのカチオン輸送性 ATPase と同様に酵素反応サイクルの中でリン酸化中間体を形成するので P 型 ATPase と称される<sup>116, 117, 134, 135)</sup>。これまでに、種々の作用機作に基づく  $H^+, K^+$ -ATPase 阻害剤が報告されており、ベンズイミダゾール誘導体オメプラゾールは酵素のスルヒドリル基に作用して酵素を失活させる<sup>19, 54, 71, 72, 74)</sup>。イミダゾ [1,2- $\alpha$ ]ピリジン誘導体 SCH28080 は酵素の  $K^+$  高親和部位に作用して阻害作用を導く<sup>6, 12, 54, 63, 109)</sup>。一方、バラグアイの生薬 (*Scoparia dulcis* L.)<sup>28)</sup> の抽出成分であるスコパダル酸は酵素の脱リン酸化は阻害するが、リン酸化は阻害しないと考えられている<sup>4)</sup>。また、 $H^+, K^+$ -ATPase に対するモノクローナル抗体 HK4001 は酵素のリン酸化のみを阻害すると報告されている<sup>3)</sup>。本章ではエブセレンの  $H^+, K^+$ -ATPase の  $K^+$ -ATPase 活性、リン酸化、 $K^+$ -pNPPase 活性 (脱リン酸化に相当<sup>116)</sup>) および  $E_1$  から  $E_2K$  へのコンフォメーション変化<sup>37)</sup> に対する効果を検討し、本薬の  $H^+, K^+$ -ATPase 阻害機序を明らかにすることを目的とした。

#### 2. 実験材料および方法

##### 1) 実験材料

ジチオスレイトール (DTT), p-ニトロフェニルフォスフェイト (pNPP) およびフルオレセインイソチオシアネイト (FITC) は和光純薬, ATP (トリス塩) は Sigma 社, [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP は第一化学薬品 (東京) より各々購入した。

##### 2) 胃ベシクルの調製

$H^+, K^+$ -ATPase を含むブタ胃ベシクルは以前の報告<sup>3, 127)</sup> に従って調製した。即ち、ブタ胃粘膜を 250 mM スクロースおよび 1 mM EGTA を含むトリス-塩酸緩衝液 (pH 7.4; スクロース緩衝液) 中でホモジナイズし、ホモジネイトを 20,000 x g で 30 分間遠心後 (4°C), 上清をさらに 78,000 x g で 30 分間遠心



した (4°C). 沈澱をスクロース緩衝液に懸濁し, Ficoll の非連続密度勾配 [7% Ficoll (w/v) 含有スクロース緩衝液上にスクロース緩衝液を重層] に載せ, 132,000 x g で 60 分間遠心後 (4°C), 界面に形成されるタンパクバンドを回収し, これを胃ベシクル標品とした. 胃ベシクル標品はベシクル膜の塩透過性を上昇させるために凍結乾燥し, 使用するまで -80°C で保存した. タンパク濃度は Lowry らの方法<sup>55)</sup> に従って測定した.

### 3) 胃ベシクルとエブセレンのインキュベーション

エブセレン (0.01~3 μM) は蛍光プローブを用いる実験ではエタノールに溶解したが, その他の実験ではジメチルスルホキシド (DMSO) に溶解して使用した. 以下記載するすべての実験において, エブセレンは胃ベシクルと 37°C で 10 分間 (蛍光プローブを用いる実験では 3 分間) プレインキュベイトし, 続いて測定を胃ベシクルおよびエブセレン共存下で実施した. コントロール群は各々の溶媒投与群とした. エブセレンの酵素失活作用に対する DTT (2 mM) の保護作用および回復作用を検討する実験では, DTT を各々エブセレン処置の直前および 10 分後に添加した. 結果は溶媒投与群に対する割合で表示し, 3 または 4 の異なる標品の平均 ± 標準誤差 (S.E.M.) を示した.

### 4) K<sup>+</sup>-ATPase 活性の測定

K<sup>+</sup>-ATPase 活性の測定は, 15 mM KCl の存在または非存在下において 5 μg/ml 胃ベシクル, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 3 mM ATP および 40 mM トリシュー塩酸 (pH 7.4) を含む溶液で行なった. 10 分間のインキュベイト後 (37°C), 氷冷 5% トリクロロ酢酸 (TCA) の添加により反応を停止した<sup>140)</sup>. 反応溶液中の無機リン酸濃度は, Fiske および Subbarow 法<sup>22)</sup> に従って行なった. K<sup>+</sup>-ATPase 活性値は 15 mM KCl の存在と非存在下の活性値の差から算出した.

### 5) H<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase のリン酸化中間体形成実験

H<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase のリン酸化中間体形成は以前の報告<sup>3, 113)</sup> に準じて行なった. 実験は, 10 μg 胃ベシクル, 5 μM ATP, 1.25 μCi [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP, 3 mM MgCl<sub>2</sub> および 40 mM トリシュー塩酸 (pH 7.4) を含む溶液 (全量 200 μl) で行なった. 反応は ATP の添加後氷上で 10 秒間行い, 1 ml の 10 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> を含む 10% TCA (反応停止溶液) の添加により停止した. 酵素をニトロセルロース膜フィルター (0.45 μm, アドバンテック東洋, 東京) 上に回収し, 反応停止溶液で 3 回洗浄後, フィルターの放射活性を液体シンチレーションカウンターで測定した.



#### 6) $K^+$ -pNPPase 活性の測定

$K^+$ -pNPPase 活性は 15 mM KCl の存在または非存在下において  $5 \mu\text{g/ml}$  胃ベシクル, 6 mM  $\text{MgCl}_2$ , 6 mM pNPP および 40 mM トリス-塩酸 (pH 7.4) を含む溶液中で行なった。10 分間のインキュベート後 (37°C), 0.5 N NaOH の添加により反応を停止し, 反応溶液中の p-ニトロフェノール濃度を 410 nm の吸光度で測定した。 $K^+$ -pNPPase 活性値は 15 mM KCl の存在と非存在下の活性値の差より算出した<sup>3)</sup>。

#### 7) $H^+, K^+$ -ATPase の FITC ラベリングおよび蛍光強度測定

胃ベシクル ( $750 \mu\text{g/ml}$ ) を  $5 \mu\text{M}$  FITC および 2 mM EDTA を含む 100 mM トリス-塩酸緩衝液 (pH 9.2) 中で 30 分間インキュベートし (25°C), 非結合 FITC を 40 mM トリス-塩酸 (pH 7.4) で平衡化した Sephadex G-50 カラムで取り除いた<sup>3)</sup>。FITC ラベル胃ベシクルを 40 mM トリス-塩酸緩衝液 (pH 7.4) 中で 3 分間インキュベート後 (37°C), 反応溶液に 5 mM  $\text{MgCl}_2$  を添加し, 続いて 15 mM KCl を加えた。FITC の蛍光強度は 517 nm で測定し (励起波長: 495 nm),  $\text{MgCl}_2$  添加時の蛍光強度に対する割合で表示した。

### 3. 実験結果

#### 1) $K^+$ -ATPase 活性に対する効果

$H^+, K^+$ -ATPase の  $K^+$ -ATPase 活性に対するエブセレンの効果を検討した。溶媒処置群は  $120 \pm 4.3 \mu\text{mol Pi/mg/h}$  の活性値を示し, エブセレンは濃度依存的に  $K^+$ -ATPase 活性を抑制した ( $\text{IC}_{50} = 0.06 \mu\text{M}$ ; Fig. 7)。また, DTT (2 mM) の前処置はエブセレン ( $0.1 \mu\text{M}$ ) による酵素阻害を完全に抑制し, 同濃度の DTT の後処置はその酵素活性失活をほぼ完全に回復させた (Table 6)。

#### 2) $H^+, K^+$ -ATPase のリン酸化中間体形成に対する効果

$H^+, K^+$ -ATPase のリン酸化中間体形成に対するエブセレンの効果を検討した。溶媒添加群は  $200 \pm 32 \text{ pmol EP/mg}$  の値を示し, エブセレンは濃度依存的に  $H^+, K^+$ -ATPase のリン酸化中間体形成を抑制した ( $\text{IC}_{50} = 0.25 \mu\text{M}$ ; Fig. 8)。エブセレン ( $0.3 \mu\text{M}$ ) のリン酸化中間体形成抑制は DTT (2 mM) の前処置によりほぼ完全に阻害された (Table 7)。



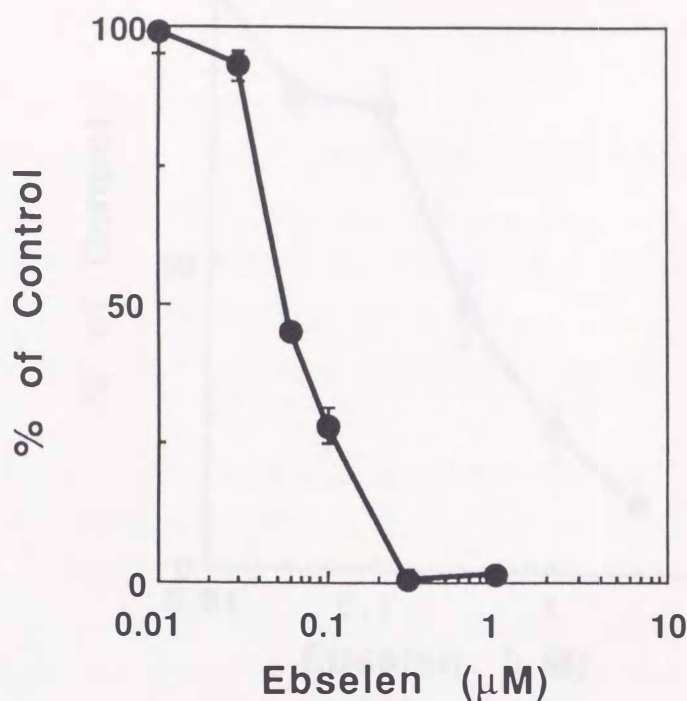


Fig. 7. Effect of ebselen on  $K^+$ -dependent ATPase activity in hog leaky gastric vesicles. Ebselen was preincubated with vesicles at  $37^\circ\text{C}$  for 10 min. Specific activity of  $K^+$ -dependent ATPase in vehicle alone was  $120 \pm 4.3 \mu\text{mol Pi/mg/h}$ , expressed as 100%. Each point and vertical bar represents the mean  $\pm$  S.E.M. for 3 different preparations.  $IC_{50}=0.06 \mu\text{M}$ .

Table 6. Protective and reactivating effects of dithiothreitol (DTT) on  $K^+$ -dependent ATPase activity inhibited by ebselen in hog leaky gastric vesicles.

Treatment	Activity (% of control)
Ebselen	$29 \pm 0.74$
Ebselen, pretreatment with DTT	$99 \pm 2.4$
Ebselen, posttreatment with DTT	$89 \pm 3.8$

DTT (2 mM) was added immediately prior to (pretreatment) and 10 min after (posttreatment) ebselen treatment ( $0.1 \mu\text{M}$ ). The vehicle-treated group served as controls. Values represent the mean  $\pm$  S.E.M. for 4 different preparations.



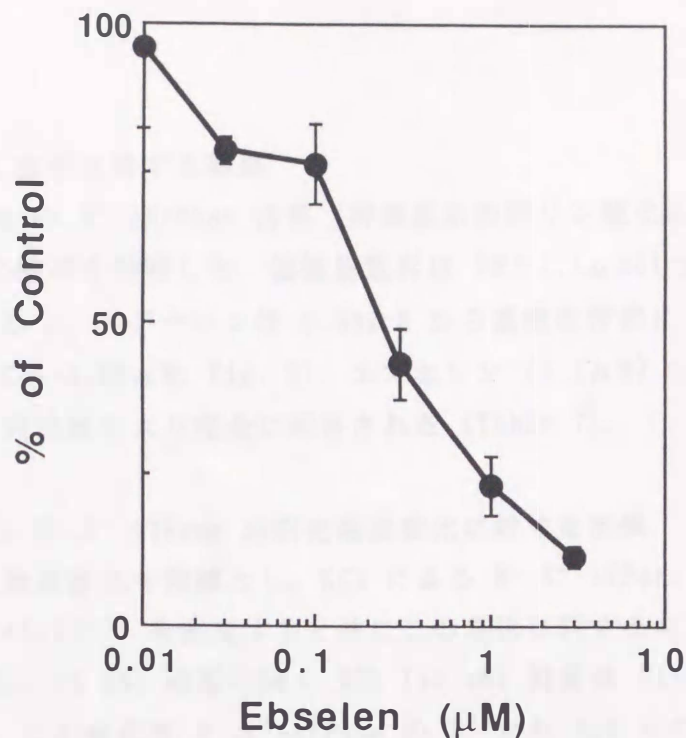


Fig. 8. Effect of ebselen on phosphoenzyme (EP) formation in hog leaky gastric vesicles. Ebselen was preincubated with vesicles at 37°C for 10 min. Formation of EP treated with vehicle alone was  $200 \pm 32$  pmol EP/mg, expressed as 100%. Each point and vertical bar represents the mean  $\pm$  S.E.M. for 3 different preparations.  $IC_{50}=0.25 \mu M$ .

Table 7. Protective effect of dithiothreitol (DTT) against inhibition by ebselen of phosphoenzyme formation,  $K^+$ -dependent p-nitrophenylphosphatase (pNPPase) activity, and changes in fluorescence intensity of FITC-labeled  $H^+, K^+$ -ATPase in hog leaky gastric vesicles.

Treatment	Activity (% of control)
Phosphoenzyme formation	
Ebselen (0.3 $\mu M$ ) alone	$38 \pm 8.5$
Ebselen (0.3 $\mu M$ ), pretreatment with DTT	$94 \pm 5.9$
$K^+$ -pNPPase activity	
Ebselen (0.1 $\mu M$ ) alone	$41 \pm 0.62$
Ebselen (0.1 $\mu M$ ), pretreatment with DTT	$100 \pm 0.52$
Changes in fluorescence intensity of FITC	
Ebselen (0.6 $\mu M$ ) alone	$0 \pm 0$
Ebselen (0.6 $\mu M$ ), pretreatment with DTT	$88 \pm 6.0$

DTT (2 mM) was added immediately prior to ebselen treatment. The vehicle-treated group served as controls. Values represent the mean  $\pm$  S.E.M. for 3 or 4 different preparations.



### 3) $K^+$ -pNPPase 活性に対する効果

$H^+, K^+$ -ATPase の  $K^+$ -pNPPase 活性 (酵素反応の脱リン酸化に相当<sup>114)</sup>) に対するエブセレンの効果を検討した. 溶媒処置群は  $78 \pm 1.1 \mu\text{mol p-nitrophenol/mg/h}$  の活性値を示し, エブセレンは  $0.03 \mu\text{M}$  から濃度依存的に  $K^+$ -pNPPase 活性を抑制した ( $IC_{50} = 0.09 \mu\text{M}$ ; Fig. 9). エブセレン ( $0.1 \mu\text{M}$ ) の酵素活性抑制は DTT ( $2 \text{ mM}$ ) の前処置により完全に阻害された (Table 7).

### 4) FITC ラベル $H^+, K^+$ -ATPase の蛍光強度変化に対する効果

FITC の蛍光強度変化を指標とし, KCl による  $H^+, K^+$ -ATPase のコンフォメーション変化 ( $E_1 \rightarrow E_2K$ )<sup>37)</sup> を測定すると共にこの変化に対するエブセレンの効果を検討した.  $MgCl_2$  ( $5 \text{ mM}$ ) 添加に続く KCl ( $15 \text{ mM}$ ) 処置は FITC 蛍光強度を 9~10% 減少させ, この変化を  $H^+, K^+$ -ATPase の  $E_1$  から  $E_2K$  へのコンフォメーション変化とした. エブセレンは  $0.3 \mu\text{M}$  から濃度依存的にこの変化を抑制した ( $IC_{50} = 0.33 \mu\text{M}$ ; Fig. 10). エブセレン ( $0.6 \mu\text{M}$ ) のコンフォメーション変化阻害は DTT ( $2 \text{ mM}$ ) 前処置によりほぼ完全に抑制された (Table 7).

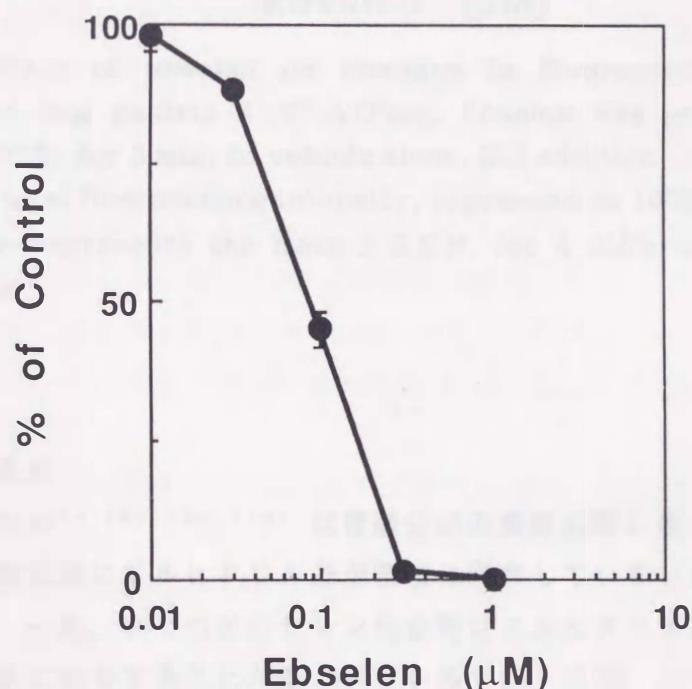


Fig. 9. Effect of ebselen on  $K^+$ -dependent p-nitrophenylphosphatase (pNPPase) activity in hog leaky gastric vesicles. Ebselen was pre-incubated with vesicles at  $37^\circ\text{C}$  for 10 min. Specific activity of  $K^+$ -dependent pNPPase in vehicle alone was  $78 \pm 1.1 \mu\text{mol p-nitrophenol/mg/h}$  which was expressed as 100%. Each point and vertical bar represents the mean  $\pm$  S.E.M. for 4 different preparations.  $IC_{50} = 0.09 \mu\text{M}$ .

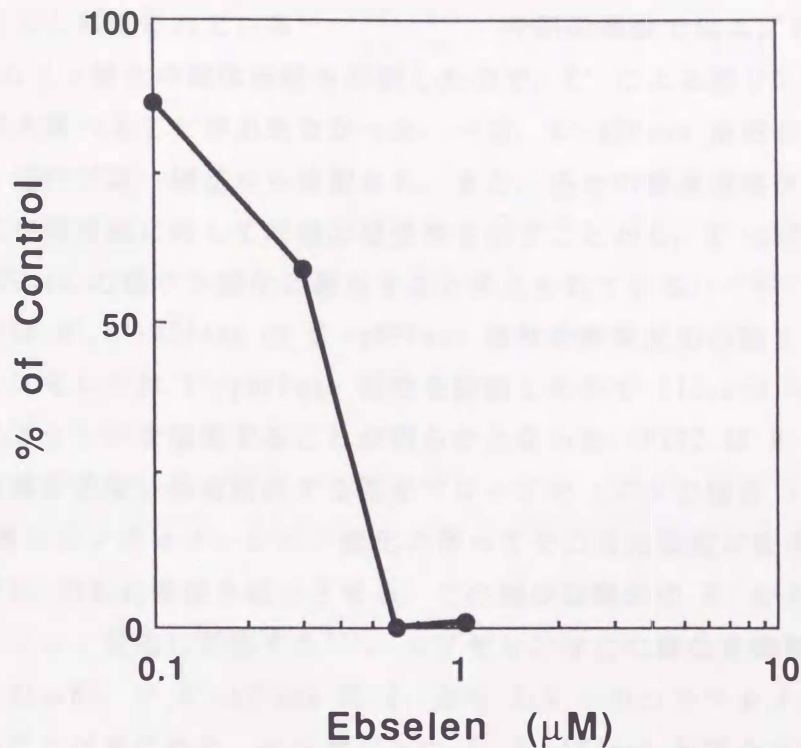


Fig. 10. Effect of ebselen on changes in fluorescence intensity of FITC-labeled hog gastric  $H^+,K^+$ -ATPase. Ebselen was preincubated with vesicles at  $37^\circ C$  for 3 min. In vehicle alone, KCl addition (15 mM) decreased to 9–10% of total fluorescence intensity, expressed as 100%. Each point and vertical bar represents the mean  $\pm$  S.E.M. for 4 different preparations.  $IC_{50}=0.33 \mu M$ .

#### 4. 考察と総括

$H^+,K^+$ -ATPase<sup>24,103,104,116)</sup> は胃酸分泌の最終段階に働く酵素であり、またその酵素機能発現にスルヒドリル基が密接に関与していることが示されている<sup>51,98,108)</sup>。一方、いくつかのセレン化合物はスルヒドリル基を酸化し、またスルヒドリル基に結合することが知られている<sup>143)</sup>。近年、セレン有機化合物エブセレンが  $H^+,K^+$ -ATPase のスルヒドリル基に作用して酵素活性を失活させることが報告された<sup>7)</sup>。

本実験において、エブセレンは  $K^+$ -ATPase 活性を濃度依存的に抑制し ( $IC_{50}=0.06 \mu M$ )、この抑制作用はスルヒドリル基保護剤 DTT の前および後処置により消失した。次に、本薬の  $H^+,K^+$ -ATPase 阻害機構を明らかにする目的で、酵素の部分反応に対する効果を検討した。 $H^+,K^+$ -ATPase は酵素反応サイクルの中でリン酸



化中間体を形成し、 $K^+$  非存在下において酸耐性のリン酸化中間体を形成する<sup>116, 117, 134, 135</sup>。エブセレンは  $H^+, K^+$ -ATPase のリン酸化中間体形成を阻害したので ( $IC_{50}=0.25\mu M$ )、酵素のリン酸化ステップを抑制することが示唆された。 $H^+, K^+$ -ATPase のリン酸化中間体レベルは  $K^+$  の添加による脱リン酸化により急激に低下すると報告されている<sup>56, 134, 135</sup>。今回の実験ではエブセレンが  $H^+, K^+$ -ATPase のリン酸化中間体形成を抑制したので、 $K^+$  による脱リン酸化過程への本薬の影響を調べることが出来なかった。一方、 $K^+$ -ATPase 活性および  $K^+$ -pNPPase 活性が同一標品から精製され、また、各々の酵素活性がいくつかのカチオンおよび阻害剤に対して同様の感受性を示すことから、 $K^+$ -pNPPase 活性は  $H^+, K^+$ -ATPase の脱リン酸化に相当すると考えられている<sup>15, 103, 116</sup>。従って、本研究では  $H^+, K^+$ -ATPase の  $K^+$ -pNPPase 活性を酵素反応の脱リン酸化の指標とした。エブセレンは  $K^+$ -pNPPase 活性を抑制したので ( $IC_{50}=0.09\mu M$ )、酵素の脱リン酸化ステップを阻害することが明らかとなった。FITC は  $H^+, K^+$ -ATPase の ATP 結合部位近傍に共有結合する蛍光プローブで (ブタの場合 518 番のリジン残基)、酵素のコンフォメーション変化に伴ってその蛍光強度が変化する。また、 $K^+$  は FITC の蛍光強度を減少させる。この減少は酵素の  $E_1$  から  $E_2K$  へのコンフォメーション変化に対応する<sup>37</sup>。エブセレンはこの変化を抑制したので ( $IC_{50}=0.33\mu M$ )、 $H^+, K^+$ -ATPase の  $E_1$  から  $E_2K$  へのコンフォメーション変化を阻害することが示された。エブセレンの  $H^+, K^+$ -ATPase 各部分反応阻害はすべてほぼ完全に DTT の前処置で抑制され、これらの阻害作用もスルヒドリル基が関与していることが示された。我々の実験成績から、本薬の各酵素反応に対する抑制の順序は以下のようなになった。 $K^+$ -pNPPase ( $IC_{50}=0.09\mu M$ ) > リン酸化中間体形成 ( $IC_{50}=0.25\mu M$ )  $\geq$  コンフォメーション変化 ( $E_1 \rightarrow E_2K$ ;  $IC_{50}=0.33\mu M$ )。これらの結果から、エブセレンは主に酵素の脱リン酸化ステップを抑制して酵素を阻害することが明らかとなった (Fig. 11)。しかしながら、その阻害特異性はスコパダル酸 (脱リン酸化のみを抑制)<sup>28</sup> および HK4001 (リン酸化のみを抑制)<sup>3</sup> には及ばなかった。

エブセレンは生体内酸性化領域 (例えば胃腺の管腔) で構造変化を受けないが、容易にペプチドやタンパクのスルヒドリル基と反応する<sup>20, 21</sup>。即ち、化学構造中のイソセレナゾロン環が還元作用により開環し、セレノースルフィドが形成される (Fig. 12)<sup>20, 21</sup>。エブセレンはベシクル内に  $H^+$  が蓄積されないリーキー胃ベシクルを用いた実験 (pH 7.4) で  $K^+$  依存性 ATPase 活性を抑制し、この抑制は DTT で阻害された。以上の成績から、エブセレンは中性 pH で  $H^+, K^+$ -ATPase のスルヒドリル基に反応することが示された。オメブラゾールは生体内の酸性化領域でプロトン化され、活性体のスルフェナミドに変化後、 $H^+, K^+$ -ATPase

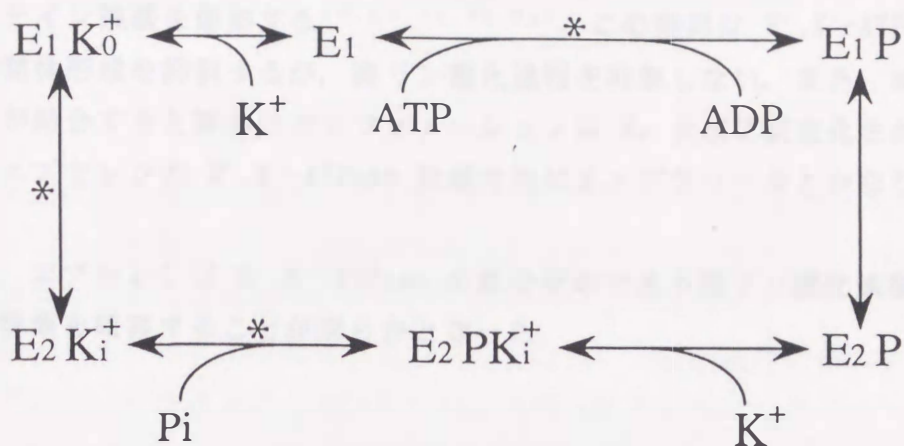


Fig. 11. Proposed inhibition points of ebselen (\*) in the reaction cycles of H<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase. Proton was omitted in the reaction cycle for simplicity.

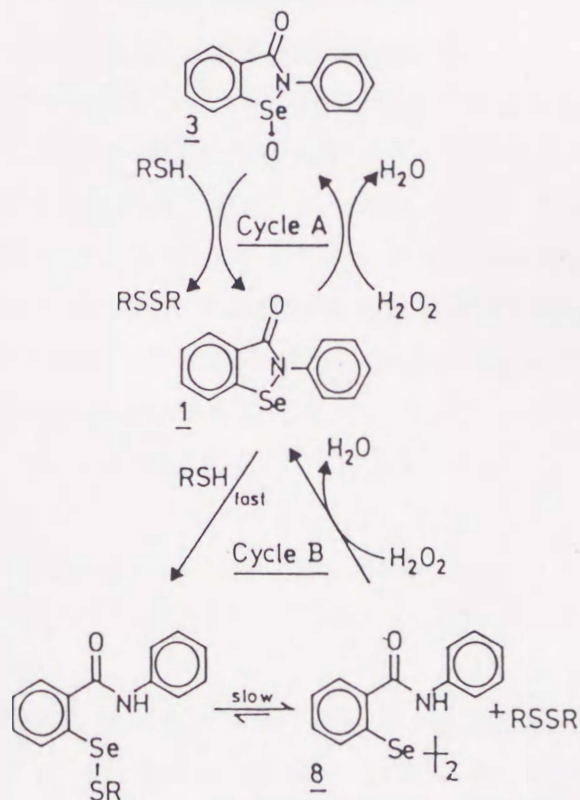


Fig. 12. The reduction and oxidation of ebselen proposed by Fischer and Dereu (reference 20).



のシステイン残基を修飾する<sup>19, 54, 71, 72, 74</sup>). この薬剤は  $H^+, K^+$ -ATPase のリン酸化中間体形成を抑制するが, 脱リン酸化過程を抑制しない. また, オメブラゾールが結合すると酵素のコンフォメーションは  $E_2$  状態に安定化される<sup>74</sup>). 従って, エブセレンの  $H^+, K^+$ -ATPase 抑制作用はオメブラゾールとかなり異なっていた.

以上, エブセレンは  $H^+, K^+$ -ATPase の部分反応である脱リン酸化過程を主に抑制して酵素を阻害することが明らかとなった.

### 第三部

#### オンコジーン導入トランスジェニックマウスからの胃粘膜上皮粘液細胞株 (GSM06 および GSM10) の樹立および GSM06 細胞のエタノール障害に対するエブセレンの効果

##### 1. 序

胃粘膜上皮粘液細胞は糖タンパク質, PG 類, 重曹等の防御因子を産生し, 胃酸やペプシン等の攻撃因子から胃粘膜を保護している<sup>9, 43, 58, 65, 66)</sup>. In vitro の胃粘膜細胞培養系は細胞機能の解析に有用なモデルとなりうる. しかし, 特異的機能を保持した胃粘膜上皮粘液細胞およびその他の胃粘膜細胞の細胞株樹立の報告は未だない. 正常胃粘膜細胞の初代培養は種々報告されている<sup>10, 58, 64, 85, 86, 131, 132)</sup>. しかし, これらの培養系は数種類の細胞で構成された混合培養系であり, それらの細胞の増殖性および特異的機能は数週間も維持されない. 一方, 胃癌組織等から増殖能を持つ癌化細胞株は多数確立されているが, 正常細胞と同等の機能を有するとは考えられない<sup>5, 32, 34, 49, 75, 87)</sup>.

近年, 特異的機能を保持した不死化細胞株樹立のために SV40 large T 抗原遺伝子が用いられている<sup>60, 92, 139)</sup>. さらに, 温度感受性突然変異株 tsSV40 large T 抗原遺伝子を導入したトランスジェニックマウスを用いて, 種々の細胞株樹立が報告されている. 以前, Yanai ら<sup>141, 142)</sup> は pSVtsA58 導入トランスジェニックマウスから肝および腎の細胞株を確立した. また, H-2K<sup>b</sup>-tsA58 導入トランスジェニックマウスを用いて, Whitehead ら<sup>138)</sup> は小腸および大腸の細胞株を, Chambers ら<sup>14)</sup> は破骨細胞の細胞株を樹立した. 本研究では, 生理学および薬理学的研究に有用な胃粘膜上皮の in vitro モデルを確立する目的で実験を行い, pSVtsA58 導入トランスジェニックマウスから正常機能を保持した 2 種類 (GSM06 および GSM10) の不死化胃粘膜上皮粘液細胞株の樹立に成功した. さらに, エブセレンの胃粘膜損傷抑制作用機序を明らかにする目的で, GSM06 細胞のエタノール障害に対する本薬の効果を検討した.

##### 2. 実験材料および方法

###### 1) 実験材料

プロナーゼ E は科研製薬 (東京), ディスパーゼは日本ベクトン・デッキンソン社 (東京), トリプシンは Difco 社 (Ann Arbor, MI, USA), DME/F12 培地, ペニシリンおよびストレプトマイシンは Gibco 社 (Grand Island, NY, USA), アン



ホテリシン B, コンカナバリン A (Con A), ITES (2 mg/L インシュリン, 2 mg/L トランスフェリン, 0.122 mg/L エタノールアミンおよび 9.14  $\mu$ g/L 亜セレン酸ナトリウム), 6-カルボキシフルオレセインジアセトキシメチルエステル (BCECF-AM) およびマウス上皮成長因子 (EGF) は和光純薬から各々購入した. SV40 large T 抗原遺伝子に対するモノクローナル抗体 (Ab-1) は Oncogene Science 社 (Uniondale, NY, USA), コラーゲンタイプIVは Nitta Gelatin 社 (大阪), FITC ラベルヤギ抗マウス IgG は Cappel 社 (Durham, NC, USA), ホースラディッシュペルオキシダーゼ (HRP) は東洋紡 (大阪) より各々得た. CHO-K1 細胞は大日本製薬 (大阪) より入手した. 胎児牛血清 (FBS, Gibco 社) は使用前に不活化した (56°C, 30 min). 胃  $H^+, K^+$ -ATPase に対するモノクローナル抗体 HK4001<sup>3, 123, 128</sup>) は竹口教授 (富山医科薬科大学, 薬学部, 富山) より恵与された.

## 2) 温度感受性 SV40 large T 抗原遺伝子導入トランスジェニックマウスの作製

オンコジーン導入トランスジェニックマウスは tsSV40 large T 抗原遺伝子 DNA (pSVtsA58) の BamHI DNA フラグメントを C57BL/6 マウス (日本チャールスリバー) の受精卵の前核に注入して作製した<sup>119, 141)</sup>. 得られたトランスジェニックマウスは生後約 4 週間は正常に発育するが, その後四肢の麻痺および水頭症等を発症し, それらが原因でおよそ 12 週齢で死亡する<sup>119)</sup>. 本トランスジェニックマウスの系を維持するために, 雄のトランスジェニックマウスから精子を採取し, ワイルドタイプのマウス卵子と体外受精を行なった. トランスジェニックマウスは, 約 4 週間後, 発病に基づく行動低下で確認した.

## 3) 胃体部粘膜細胞の単離

マウス胃体部粘膜細胞の単離は Schepp ら<sup>107)</sup> が以前ラットで行なった方法を改良して実施した. 即ち, トランスジェニックマウス (8~12 週齢) をエーテル麻酔下に頸椎脱臼致死させ, 胃を摘出後, 胃内を生理食塩水で洗浄した. 胃より幽門部を切除し, 胃の内側が外側に向くように反転後, その内側に約 0.5 ml の溶液 A [0.5 mM  $NaH_2PO_4$ , 1 mM  $Na_2HPO_4$ , 20 mM  $NaHCO_3$ , 70 mM  $NaCl$ , 5 mM  $KCl$ , 11 mM glucose, 2 mM  $Na_2EDTA$ , 20 mM BSA and 50 mM Hepes- $NaOH$  (pH 7.4)] を注入し, 反転胃を作製した. 反転胃を溶液 A 中で 30 分間混合ガス (95%  $O_2$ -5%  $CO_2$ ) 通気下に盪湯培養し (37°C), 溶液を交換して再度同じ操作を行なった. 次に, 0.2% プロナーゼを含む溶液 B (溶液 A の  $Na_2EDTA$  の代わりに 1 mM  $CaCl_2$  および 1.5 mM  $MgCl_2$  を添加した) 中で 15 分間混合ガス通気下に盪湯培養し (37°C), 溶液を交換してこの操作を更に 2 回繰り返した. 単離細胞を

溶液 C (BSA 濃度を 1 mg/ml にする以外は溶液 A と同じ組成) で 3 回洗浄し (50 x g, 5 min), 消化酵素を取り除いた. 5 匹のマウスから  $10^7$  個以上の胃粘膜細胞が得られ, その細胞分画の生存率は 90% 以上であった (トリパンプルー排除試験).

#### 4) 細胞培養および細胞株の樹立

単離胃粘膜細胞を 2% FBS, 1% ITES, 10 ng/ml EGF, 100 units/ml ペニシリン, 100  $\mu$ g/ml ストレプトマイシンおよび 25  $\mu$ g/ml アンホテリシン B 含有 DME/F12 培地に懸濁し, コラーゲン処理ディッシュ (Corning 社, NY, USA) に蒔き, 加湿 5% 炭酸ガス培養器中で 24 時間培養し (37 °C), その後, 温度を 33 °C に下げて同様の条件下で培養した. 細胞が増殖してコンフルエントになったとき, 細胞を 0.25% トリプシンおよび 0.02%  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  を含む 0.1 M リン酸緩衝生理食塩液 (トリプシン-EDTA) 処置 (37°C) で継代した. 培養細胞中に混在した繊維芽細胞を除去するために, ディスパーゼ (25 U/ml) を 24 時間培地中に添加した<sup>58)</sup>. 次に, 繊維芽細胞を取り除いた細胞をコロニー形成法によりクローニングした<sup>96)</sup>. 即ち, 40 個の細胞を直径 6 cm のディッシュで培養し, 1 個の細胞から増殖したコロニーをステンレス製のシリンダー (長さ: 10 mm, 内径: 6 mm) を用いて分離した. このクローニングを 2 回行い, 細胞株を樹立した. 樹立細胞は, 10% FBS, 1% ITES および 10 ng/ml EGF 含有 DME/F12 培地に懸濁し, 加湿 5% 炭酸ガス培養器中で培養した (33, 37 または 39°C). 糖タンパク質の染色, ペプシン活性および  $\text{H}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase 検出実験では, 細胞をコンフルエントになるまで上記培地中で培養し (33°C), そしてさらに 39°C で 3 日間培養した.

#### 5) 細胞増殖実験

細胞 ( $4 \times 10^4$  個) をコラーゲンジェン処理直径 6 cm のディッシュに蒔き, トリプシン-EDTA 処置で細胞を回収し, 細胞数を血球計算盤で測定した.

#### 6) 糖タンパク質の組織化学

胃体部粘膜には上皮粘液細胞および副細胞の 2 種類の糖タンパク質産生細胞が存在する<sup>42)</sup>. 我々は 3 種類の異なる糖タンパク質染色法を用いた. PAS および I 型 Con A-HRP 染色は上皮粘液細胞および副細胞が産生する糖タンパク質を認識する<sup>42)</sup>. 一方, III 型 Con-HRP 法は副細胞産生糖タンパク質のみを染色する<sup>42)</sup>. 評価に先立ち, 同系統の正常マウス胃粘膜組織でこれら 3 種類の染色法の特異性を確認した. PAS 染色において, 細胞を 1-チャンバースライドガラス (Nunc 社, Naperville, Denmark) で培養し, 10% ホルマリンで 3 時間固定後 (4°C),



常法に従って PAS 染色した<sup>6,1)</sup>。Con A-HRP 染色は以前の方法<sup>4,2)</sup>に従って実施した。即ち、細胞を 1-チャンバースライドグラスで培養し、カルノイ液 (エタノール:クロロホルム:酢酸=6:3:1) で一晩固定した (4°C)。I 型 Con A-HRP 法において、固定された細胞を上水道水で 3 回洗浄し、0.1% Con A 液 [0.1 M リン酸緩衝生理食塩液 (PBS) に溶解] で 30 分間インキュベートした (25°C)。次に、細胞を PBS で洗浄し、PBS に溶解した 0.0005% HRP で 30 分間インキュベートした (25°C)。PBS で 3 回洗浄後、細胞を 0.03% 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride および 0.015% 過酸化水素を含む 50 mM Tris-塩酸緩衝液 (pH 7.4) で 2 分間処理し (25°C)、上水道水で洗浄した。III 型 Con A-HRP 法において、固定された細胞を 1% 過ヨウ素酸で 60 分間酸化し (25°C)、上水道水で洗浄後、1% Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> に溶解した 0.2% 水素化ホウ素ナトリウムで還元し (25°C, 2 min)、引き続き I 型 Con A-HRP 染色と同様の操作を行なった。

#### 7) ペプシン活性の測定

細胞 (1 × 10<sup>7</sup> 個) を 3 ml の PBS に懸濁し、Waring 型ブレンダー (Phycotron, 日音医理科器械製作所, 千葉) で 1 分間ホモジナイズした。細胞ホモジネイトのペプシン活性は Anson ら<sup>2)</sup> の方法に準じて測定した。

#### 8) 胃 H<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase の免疫組織化学

細胞を 1-チャンバースライドグラスで培養し、エタノールで 15 秒間固定後 (25°C)、胃 H<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase に対するモノクローナル抗体 HK4001 を用いて免疫染色した<sup>1,2,8)</sup>。

#### 9) large T 抗原の免疫組織化学

細胞を 1-チャンバースライドグラスで 3 日間培養し (33 または 39°C)、酸性化エタノール溶液 (エタノール:酢酸=95:5) で 20 分間固定後 (-20°C)、1% BSA 含有 PBS と室温で 60 分間インキュベートした。PBS (1% BSA 含有) に溶解した抗 large T 抗原抗体 (0.2 μg/ml) と細胞を 24 時間インキュベートした (4°C)。さらに、1% BSA 含有 PBS に溶解した FITC ラベル抗体 (10 μg/ml) と細胞を 24 時間インキュベートした (4°C)。各操作の間で細胞を PBS で 5 回洗浄した。FITC の蛍光は蛍光顕微鏡 (BH-2, オリンパス, 東京) で観察した。

#### 10) GSM06 細胞の培養条件

GSM06 細胞 (1.6 × 10<sup>5</sup> cells/cm<sup>2</sup>) は、特に示さない限り、1% ITES, 10 ng/ml EGF および 10% FBS 添加 Daigo's T 培地に懸濁し、加湿 5% 炭酸ガス培養器

中コラーゲン処置容器で 1, 3 または 9 日間培養した (33°C). 培地は 1 日おきに交換した. 軟寒天培地における細胞培養の場合, GSM06 または CHO-K1 細胞 ( $5 \times 10^5$  cells/cm<sup>3</sup>) を軟寒天培地 (0.3% agar, 1% ITES, 10 ng/ml EGF および 10% FBS を含む DME/F12 培地) に懸濁し, 軟寒天培地の寒天濃度を 0.5% にした半固形フィーダー層上に蒔き, 加湿 5% 炭酸ガス培養器中で各々 33 または 37°C で培養した. 3 週間後, コロニー数を顕微鏡下に測定した.

#### 11) 染色体数の計測

GSM06 細胞 ( $1.6 \times 10^5$  cells/cm<sup>2</sup>) を 1% ITES, 10 ng/ml EGF および 10% FBS を含む DME/F12 培地に懸濁し, コラーゲン処置 25 cm<sup>2</sup> ディッシュ中で 2 日間培養した (33°C). 正常マウス (C57BL/6) およびオンコジーン導入トランスジェニックマウス<sup>119, 141)</sup> 由来の胃粘膜初代培養細胞は上記の方法に従って調製した. 単離細胞 ( $1.6 \times 10^5$  cells/cm<sup>2</sup>) を 1% ITES, 10 ng/ml EGF, 10% FBS, 100 units/ml ペニシリン, 100 μg/ml ストレプトマイシンおよび 25 μg/ml アンホテリシン B を含む DME/F12 培地に懸濁し, コラーゲン処置ディッシュ中で 2 日間培養した (33°C; 正常マウスの細胞の場合は 37°C). その後, 細胞を風乾し, ギムザ染色 (Merck 社, Darmstadt, Germany) 後, 染色体数を顕微鏡下に測定した.

#### 12) GSM06 細胞の形態学的観察

走査または透過電子顕微鏡を用いた微視的観察において, GSM06 細胞を各々コラーゲン処置走査電子顕微鏡用ガラスプレート (直径: 13 mm, Nisshin EM 社, 東京) または 2-チャンバースライドガラス (Nunc 社) で培養した. 細胞を PBS に溶解した 2.5% グルタルアルデヒドで固定後 (4°C, 2 h), PBS で 3 回洗浄し (4°C), 1% オスミウム酸で 30 分間処置した (4°C). 各々のサンプルは走査電子顕微鏡 (S-2460N, 日立, 東京; 加速電圧: 20 kV) または透過電子顕微鏡 (H-800, 日立; 加速電圧: 75 kV) で観察した. 細胞の PAS 染色は, 上記方法に従って実施した.

#### 13) GSM06 細胞の上皮膜電気抵抗の測定

GSM06 細胞を 6 穴培養プレート (FALCON<sup>®</sup>, Becton Dickinson 社, Lincoln Park, NJ, USA) 中コラーゲンタイプ IV 処置細胞培養インサート (Cyclopore<sup>®</sup> membrane, 直径: 25 mm, ポアサイズ: 3.0 μm, FALCON<sup>®</sup>; Fig. 13) で培養した. 種々の培養期間後, インサートを Daigo's T 培地で 1 回洗浄し, 6 穴培養プレートに装着後, 基底外側 (インサートの外側) に 2 ml Daigo's T 培地および



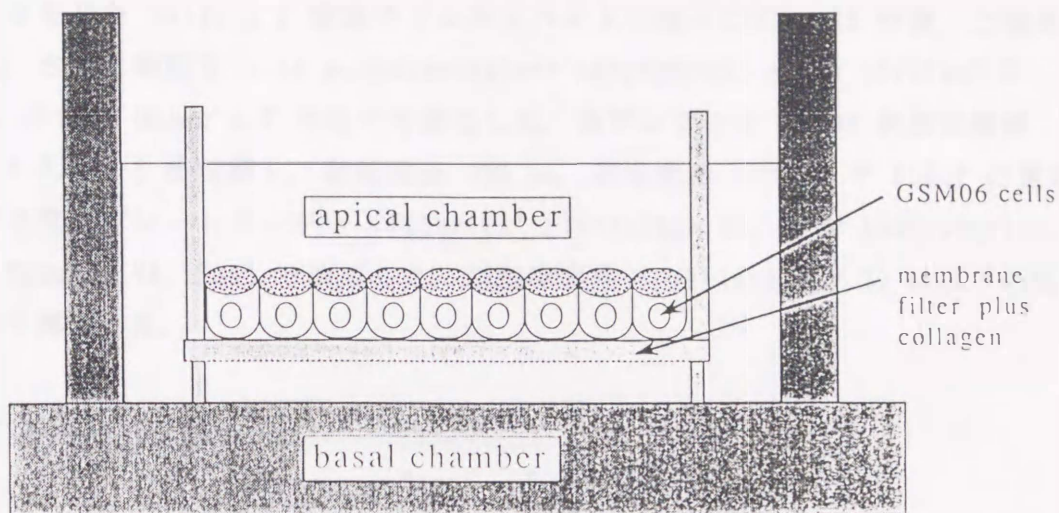


Fig. 13. Schematic illustration of culture of GSM06 cells in cell-culture-insert.

管腔側（インサートの内側）に 1 ml の同培地を添加した。基底外側および管腔側の上皮膜電気抵抗は Millicell 電気抵抗システム（Millipore 社，Bedford, MA, USA）を用いて測定した。

#### 14) GSM06 細胞の PGE<sub>2</sub> および 6-keto PGF<sub>1α</sub> の測定

細胞を 25 cm<sup>2</sup> ボトルで培養後，Daigo's T 培地で 2 回洗浄した。細胞を Daigo's T 培地中で盪湯培養後（37°C，30 min），遠心（7,000 x g，3 min）により上清を回収した。上清中の PGE<sub>2</sub> および 6-keto-PGF<sub>1α</sub> は各々 PGE<sub>2</sub> および 6-keto-PGF<sub>1α</sub> EIA キット（Cayman Chemical 社，Ann Arbor, MI, USA）で測定した。PGE<sub>2</sub> キットは 6-keto-PGF<sub>1α</sub> とく 0.01%，6-keto-PGF<sub>1α</sub> キットは PGE<sub>2</sub> と 0.92% の交差反応性を示す。

#### 15) GSM06 細胞のエタノール障害の測定およびエタノール細胞障害，過酸化脂質量または pLT レベルに対するエブセレンの作用

エタノールによる細胞障害性は蛍光色素 2',7'-bis(carboxyethyl) carboxy-fluorescein (BCECF) を用いて行なった<sup>44, 118)</sup>。細胞内に BCECF を取り込ませるために，細胞膜透過能を有する BCECF-AM（非蛍光物質）を用いた。BCECF-AM は細胞内で酵素により BCECF（非透過性蛍光物質）に加水分解される。GSM06 細胞はコラーゲン処置 96 穴培養プレート（Corning）で培養し，Daigo's T 培地で 1 回洗浄後，10 μM BCECF-AM を含む Daigo's T 培地で 40 分間培養した（37°C）。ラベルされた細胞を Daigo's T 培地で 3 回洗浄し，7.5~17.5% エタ

ノールを含む Daigo's T 培地でインキュベートした (37°C). 15 分後, 上清を回収し, さらに細胞を 0.5% polyoxyethylene octylphenyl ether (Triton<sup>®</sup> X-100) を含む Daigo's T 培地で可溶化した. 各サンプルを 50 mM 炭酸緩衝液 (pH 9.0) で 5 倍希釈し, 励起波長 485 nm, 蛍光波長 538 nm で BCECF の蛍光強度を蛍光プレートリーダー (Titertek<sup>®</sup> Fluoroskan II, Flow Laboratories 社, McLean, VA, USA) で測定した. 細胞障害性 (cytotoxicity %) は以下の式に従って算出した.

$$\text{Cytotoxicity (\%)} = \frac{F_{\text{super}} - F_{\text{spoon}}}{F_{\text{super}} + F_{\text{cell}} - F_{\text{spoon}}} \times 100$$

$F_{\text{super}}$ : 上清の蛍光強度,  $F_{\text{spoon}}$ : 無処置群 (Daigo's T 培地のみ) 上清の蛍光強度,  $F_{\text{cell}}$ : 細胞中の蛍光強度.

エブセレン (エタノールに溶解; 終濃度 0.5%) はエタノール暴露の 10 分前に培地に添加し, 37°C でインキュベートした.

過酸化脂質量または pLT レベルの測定実験において, GSM06 細胞をコラーゲン処置ボトル (25 cm<sup>2</sup>) で培養し, 15% エタノールを含む Daigo's T 培地中で 15 分間インキュベート後 (37°C), 水冷生理食塩水で 2 回洗浄した. 過酸化脂質を測定する場合, 各々のサンプルに生理食塩水を添加し, テフロンホモジナイザーでホモジナイズした. サンプル中の過酸化脂質量は Ohkawa らの方法<sup>82)</sup> に従って測定した. pLT を測定するとき, エタノール処置を施した各々のサンプルを Daigo's T 培地中で 15 分間盪湯培養した (37°C). 次に, 培養上清を回収し (1,400 x g, 10 min), 上清中に遊離した pLT 量を pLT EIA キット (Amersham Japan 社) で測定した. サンプルのタンパク濃度は Lowry らの方法<sup>55)</sup> に準じて測定した.

#### 16) 血清中のエブセレン濃度の測定

In vitro の実験で用いるエブセレン濃度を算出する目的で, 本薬投与マウスにおける血清中レベルを測定した. 0.5% CMC 水溶液に懸濁したエブセレン (10, 30 または 100 mg/kg) をマウスに経口投与し, 30, 45, 60 または 120 分後腹部大静脈から採血した. 血液から血清を分離後, 血清中のセレン有機物濃度を原子吸光度計で測定し, エブセレン濃度とした<sup>52)</sup>.

#### 17) 統計処理

結果は平均 ± 標準誤差 (S.E.M.) で示した. 統計学的解析は Dunnett の多重比



較法を用いて行い、P 値が 0.05 以下を有意差有りとして判定した。

### 3. 結果

#### 1) トランスジェニックマウスからの胃粘膜上皮粘液細胞株の樹立

トランスジェニックマウスの胃体部粘膜をプロナーゼ E で消化し、得られた単離細胞をコラーゲン処置ディッシュで培養した。24 時間の培養後 (37°C)、一部の細胞はディッシュ表面に接着し、コロニーを形成した。この時点で非接着性の細胞は廃棄した。接着性の細胞は高い増殖性を示し、2~3 日中にコンフルエントモノレイヤーを形成した。しかしながら、その後細胞は増殖しなかったが、約 6 週間後細胞は再び増殖性を示し、コンフルエントモノレイヤーを形成するまで増殖した。培養細胞中の繊維芽細胞の混在はディスパーゼ処置により完全に除去され、残った細胞を 6~8 週間かけてコロニー形成法で 2 回クローニングした。3 回の実験を実施し、2 種類の細胞株 (GSM06 および GSM10) を樹立した。これらの細胞はディッシュ面に接着して増殖し、隣接細胞と密着しながら、コンフルエントモノレイヤーを形成するまで増殖した (Fig. 14)。また、GSM06 および GSM10 細胞はトリプシンを用いた通常の継代培養で 1 年以上維持でき、この間細胞の形態および機能は変化しなかった。

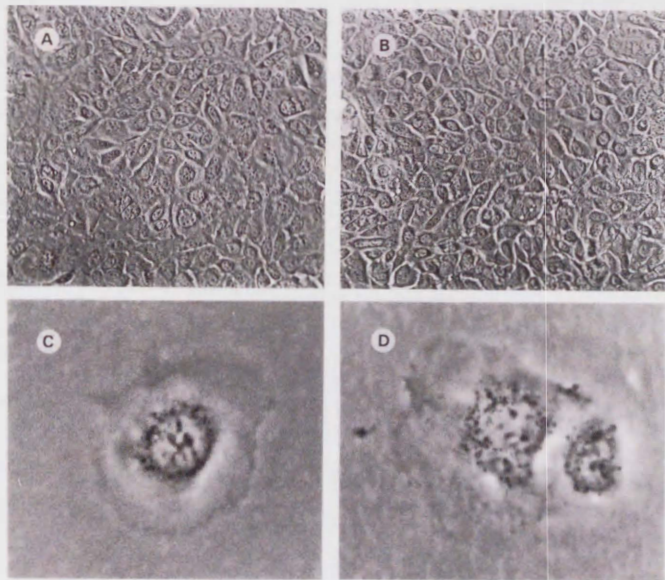


Fig. 14. Photomicrographs of two established gastric mucosal surface mucous cell lines. Culture of GSM06 cells in a collagen-coated dish on day 3 (A: x100, C: x500). Culture of GSM10 cells in a collagen-coated dish on day 3 (B: x100, D: x500). The cells proliferated while attached to the collagen-coated dish and grew until confluent monolayers were formed.



## 2) GSM06 および GSM10 細胞の同定

GSM06 および GSM10 細胞は 33°C でコンフルエントモノレイヤーを形成するまで培養し、さらに 39°C で 3 日間培養した。両細胞は細胞表面に粘液層を形成し、それらに含まれる糖タンパク質は PAS および I 型 Con A-HRP 染色陽性であったが、III 型 Con A-HRP 染色には陰性であった (Fig.15)。一方、33°C においてコンフルエントモノレイヤーが形成される前は、細胞内に PAS 陽性顆粒は観察されたが、細胞表面に粘液層は形成されなかった (結果示さず)。また、これらの細胞はペプシン活性を有さず、 $H^+, K^+$ -ATPase の発現も認められなかった (結果示さず)。以上の成績から得られた GSM06 および GSM10 細胞は胃粘膜表層粘液細胞由来であり副細胞、主細胞または壁細胞由来ではないことが明らかとなった。

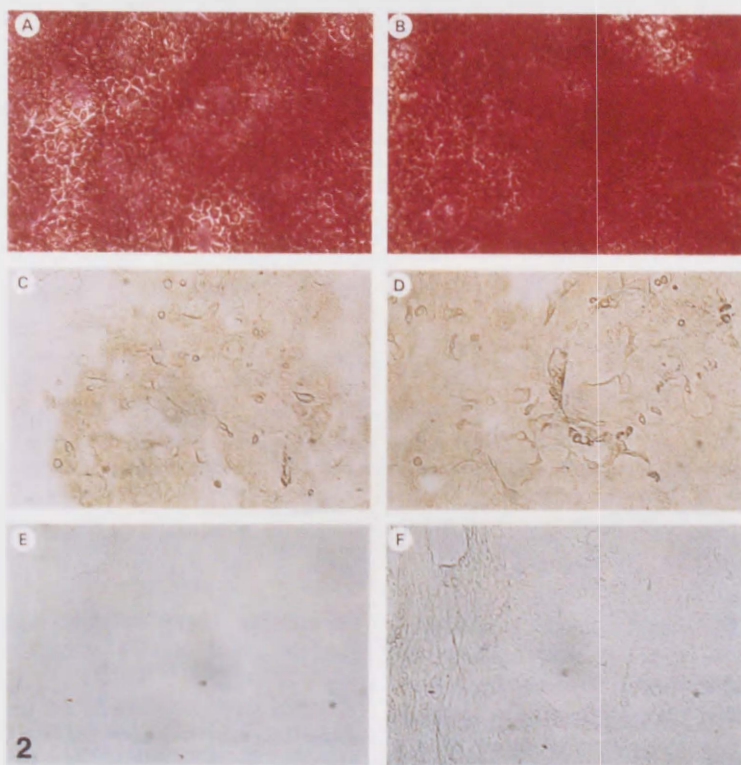


Fig. 15. Staining of GSM06 and GSM10 cells by PAS (periodic acid-Schiff) and concanavalin A (Con A)-horseradish peroxidase (HRP). The cells were cultured on a 1-chamber slide at 33 °C until confluent monolayers were made, and this was followed by culture at 39°C for 3 days. PAS staining of GSM06 (A, x30) and GSM10 cells (B, x30). The mucous sheets on the cell surface are stained red. Class I Con A-HRP staining of GSM06 (C, x30) and GSM10 cells (D, x30). The mucous sheets on the cell surface are stained light brown. Class III Con A-HRP staining of GSM06 (E, x30) and GSM10 cells (F, x30). The mucous sheets on the cell surface were not stained.



### 3) 細胞の増殖性および large T 抗原の発現

GSM06 および GSM10 細胞の増殖性を 33 (許容温度), 37 (中間温度) および 39°C (非許容温度) で調べた。GSM06 細胞は 33 および 37°C で増殖し、倍化時間は約 29 時間であった。一方、39°C において GSM06 細胞は増殖性を示さなかったが、培養温度を再び 33°C に下げると増殖性は予想どおり回復した (Fig. 16)。この結果から、GSM06 細胞の温度感受性増殖は可逆性であることが示唆された。GSM06 細胞の large T 抗原は 33°C において核中に認められたが、39°C では消失した (Fig. 17)。これは恐らく T 抗原タンパク質の変性のためと考えられる。従って、この細胞の温度依存性増殖は tsSV40 large T 抗原の作用に基づいている。一方、GSM10 細胞は全ての温度条件下で増殖し、細胞倍化時間は約 39 時間であった (Fig. 16)。GSM10 細胞の場合、T 抗原は 33 および 39°C で発現した (Fig. 17)。GSM10 細胞がなぜ非許容温度で増殖するか明らかでないが、細胞の不死化は T 抗原の作用によると考えられる。

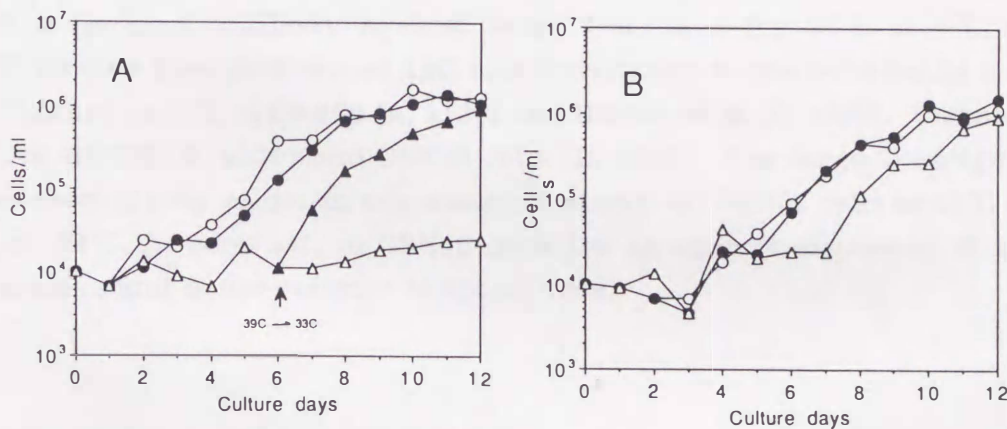


Fig. 16. Cell growth of GSM06 (A) and GSM10 (B) under different temperature conditions. The cells ( $4 \times 10^4$ ) were cultured in a 6 cm collagen-coated plastic culture dish at 33, 37 or 39 °C, harvested by trypsin-EDTA treatment and the number of cells was counted using a hemacytometer. Open circles: at 33 °C, closed circles: at 37 °C, open triangles: at 39 °C. Closed triangle with an arrow: the temperature was lowered from 39 °C to 33 °C on day 6. The data represents the mean of results from two dishes.



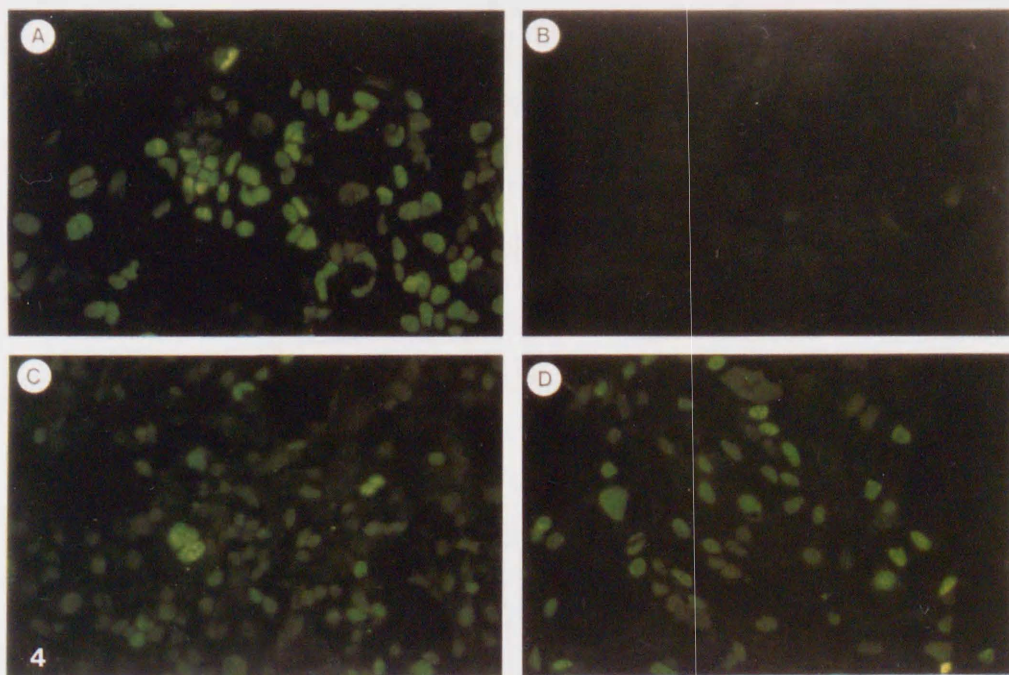


Fig. 17. Large T-antigen expression at the permissive and nonpermissive temperatures in GSM06 and GSM10. The cells were cultured on a 1-chamber slide at 33 or 39°C for 3 days. The fixed cells were incubated with monoclonal antibody against large T-antigen for 24 h at 4°C, and FITC-labeled goat anti-mouse IgG was introduced to the cells for 24 h at 4°C. Culture at 33°C in GSM06 (A, x120) and GSM10 cells (C, x120). Culture at 39°C in GSM06 (B, x120) and GSM10 cells (D, x120). The large T-antigen is expressed (green color) in the nuclei of almost all GSM06 cells at 33°C but not at 39°C. In contrast, in GSM10 cells the antigen is expressed at both permissive and nonpermissive temperatures.

#### 4) GSM06 細胞の発癌性および染色体解析

CHO-K1 (陽性コントロール) および GSM06 細胞を軟寒天培地中で培養したとき、CHO-K1 細胞はコロニー形成活性を示したが、GSM06 細胞はその活性を示さなかった (結果示さず)。

正常マウスおよびトランスジェニックマウス由来の胃粘膜初代培養細胞の染色体数は  $2n=38-43$  で、正常の染色体数 (マウスの場合  $2n=40$ ) を示したが、GSM06 細胞の染色体数は一定でなく、幅広く分布し、正常の性質を示さなかった (Fig. 18)。

#### 5) GSM06 の細胞増殖性

GSM06 細胞 ( $1.6 \times 10^5$  cells/cm<sup>2</sup>) を Daigo's T 培地中で 1, 3 または 9 日



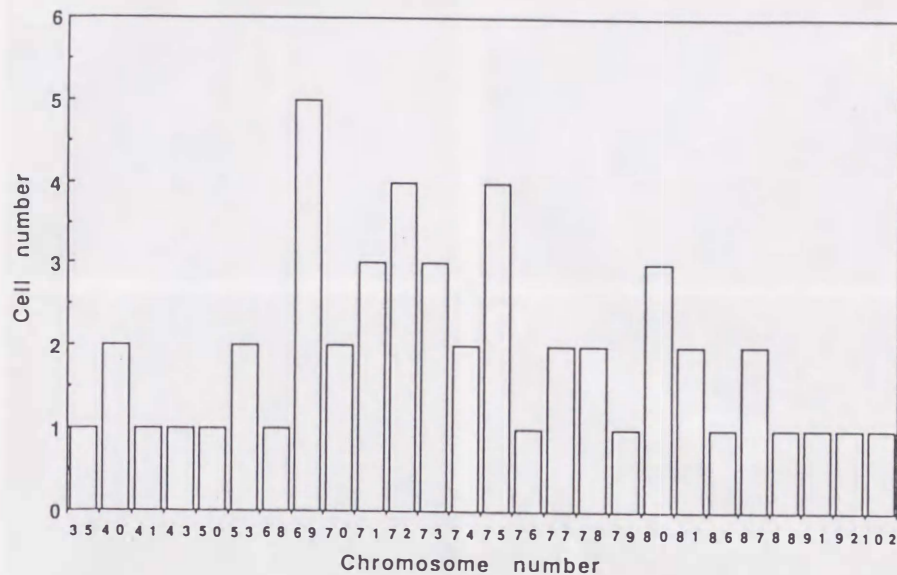


Fig. 18. Distribution of chromosome numbers in GSM06 cells. GSM06 cells ( $1.6 \times 10^5$  cells/cm<sup>2</sup>) were cultured in a collagen-coated 50-cm<sup>2</sup> culture dish at 33°C for 24 h, and each chromosome number of the cell (total cell number: 50) was observed.

間培養したときの細胞数は、各々  $1.33 \pm 0.04$ ,  $1.38 \pm 0.06$  および  $2.76 \pm 0.19 \times 10^5$  cells/cm<sup>2</sup> であった。培養 9 日目の細胞数は 1 日目の約 2 倍に増加した (Table 8)。この細胞は培養 9 日目でコンフルエントに達し、それ以降細胞数の増加は観察されなかった (結果示さず)。

#### 6) GSM06 細胞の形態学的観察

走査電子顕微鏡を用いて GSM06 細胞の細胞表面の変化を経時的に観察した。培養 1 日目、細胞間細隙は存在し、細胞表面に微絨毛様突起が疎らに認められた。培養 3 および 9 日目、細胞間細隙は消失し細胞間接着はタイトになり、細胞表面に微絨毛様突起が密に観察された (Fig. 19)。また、培養 9 日目における細胞の透過電子顕微鏡による観察を行った。細胞間には密着結合および中隔接着斑の存在が確認され、細胞質には核、ミトコンドリア、ゴルジ装置に加えて電子密度の高い粘液顆粒が認められた (Fig. 20)。また、走査電子顕微鏡での観察と同じ実験条件において、細胞表面に PAS 陽性糖タンパク質が培養時間時間に依存して増加した (Fig. 21)。これらの成績から、細胞表面に観察される微絨毛様突起には糖タンパク質が含まれる可能性が示唆された。



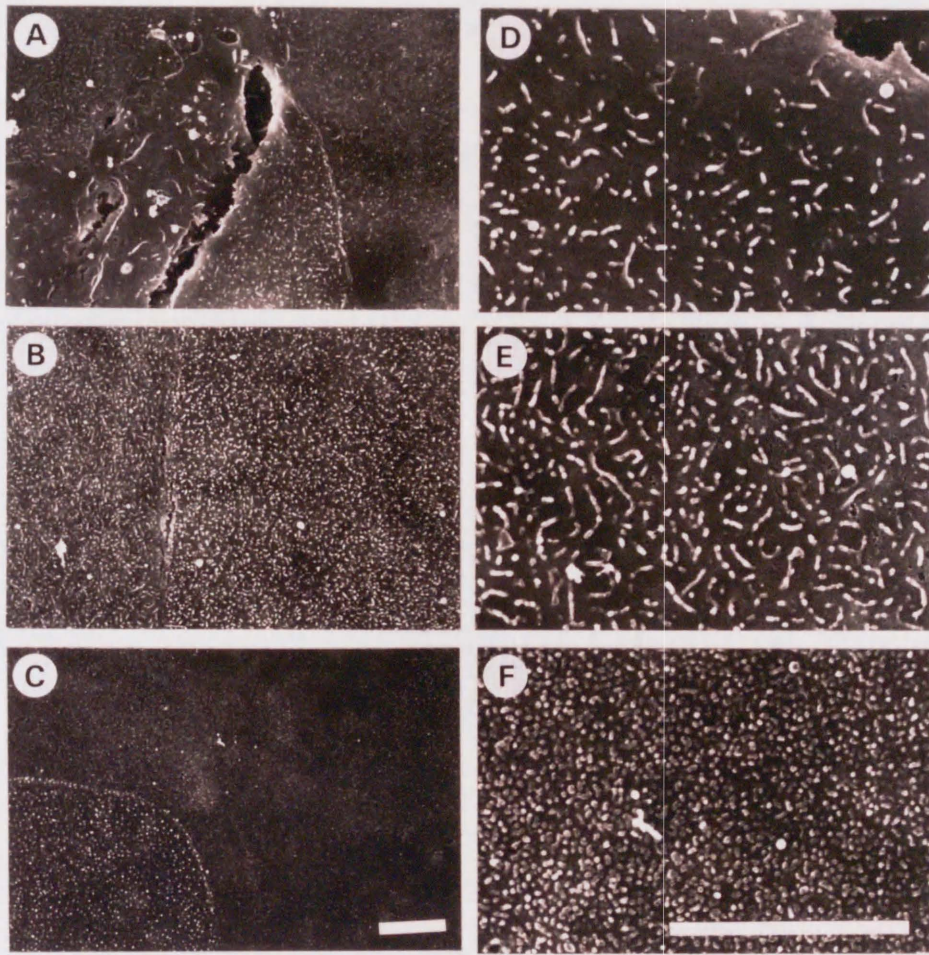


Fig. 19. Scanning electron microscopy of GSM06 cell surface. GSM06 cells ( $1.6 \times 10^5$  cells/cm<sup>2</sup>) were cultured in a collagen type IV precoated scanning electron microscope glass plate in a 21-cm<sup>2</sup> dish at 33°C for 1, 3, or 9 days. The cells were fixed in 2.5% glutaraldehyde buffered in 0.1 M phosphate at 4°C, and treated with SEM standard method. (A-C) Low magnification: on day 1 (A), day 3 (B), or day 9 (C). (D-F) High magnification on day 1 (D), day 3 (E), or day 9 (F). On day 1, interstices among the cells still remained and the cells formed the scattered distribution of microvillus-like components on the cell surface. On days 3 and 9, all cells were almost tightly adhesive and the cells formed the diffused distribution of microvillus-like components. Bar=5  $\mu$  m.



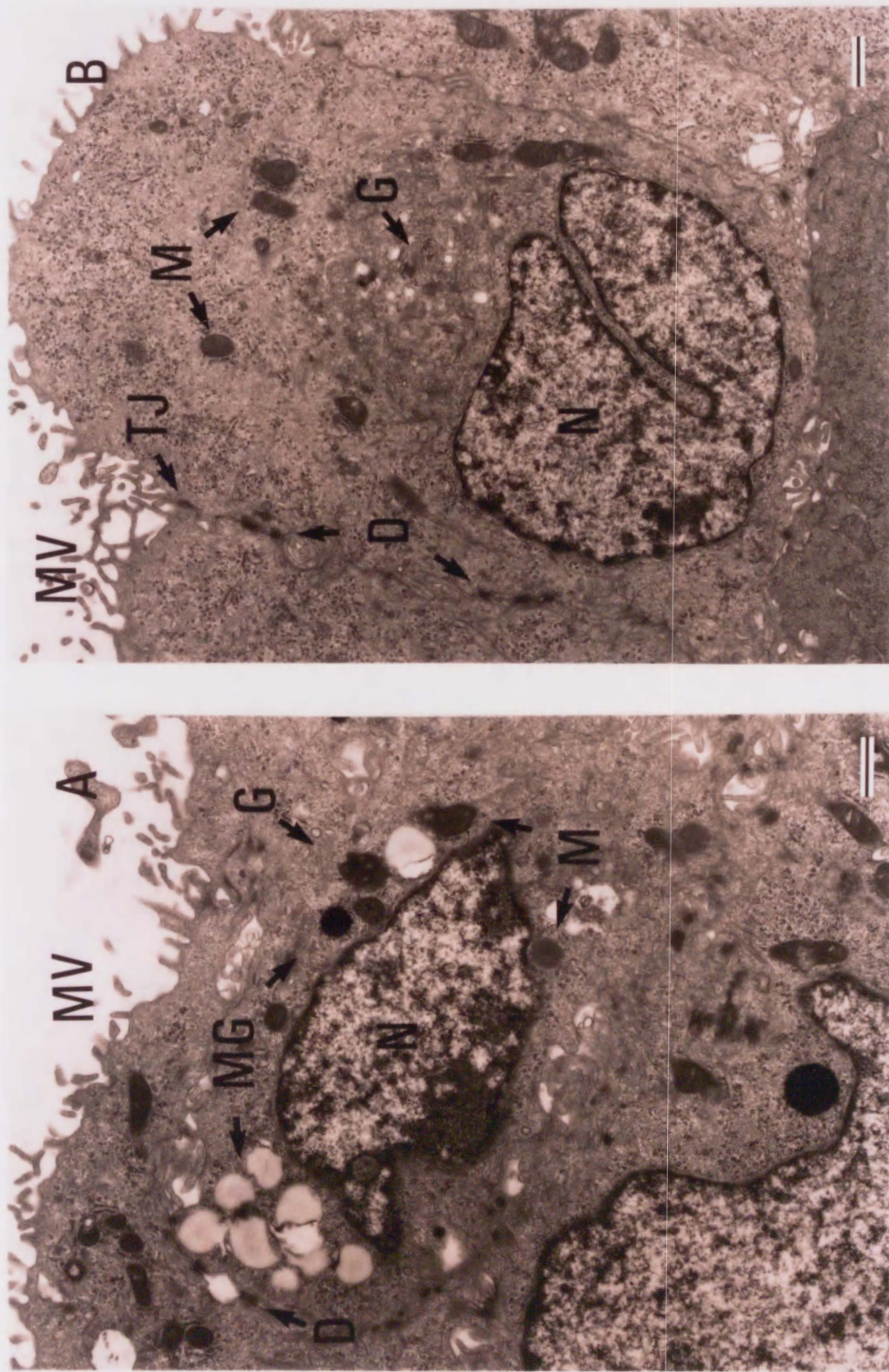


Fig. 20. Transmission electron microscopy of GSM06 cells. GSM06 cells ( $1.6 \times 10^5$  cells/cm<sup>2</sup>) were inoculated onto a two-chamber slide at 33°C for 9 days. A, GSM06 cells showing mucous granules; B, GSM06 cells showing junctional complexes. D, desmosome; G, Golgi complex; M, mitochondria; MG, mucous granule; MV, microvilli; N, nucleus; TJ, tight junction. Bar=1  $\mu$ m.



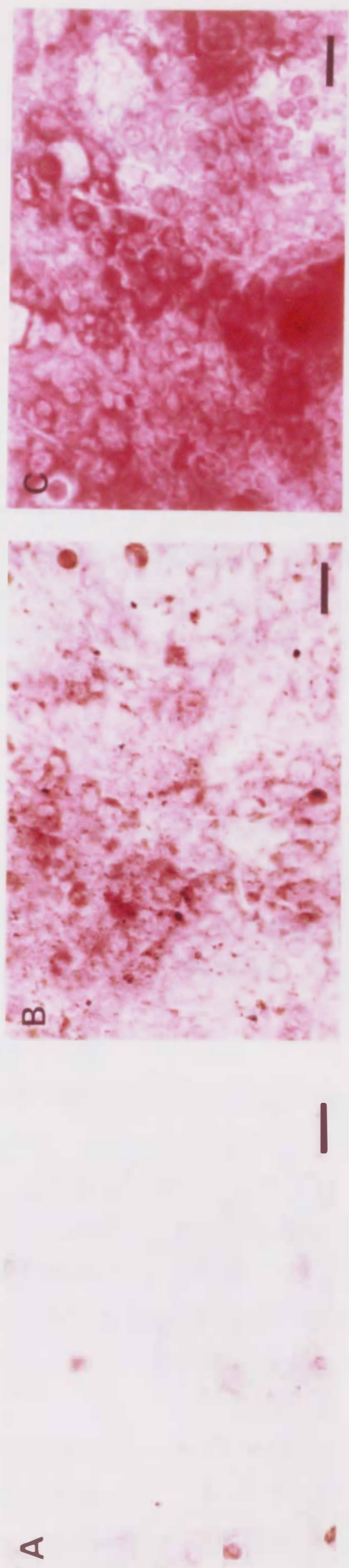


Fig. 21. Periodic acid-Schiff (PAS)-staining of GSM06 cells. GSM06 cells were cultured on a two-chamber slide at 33°C for 1, 3, or 9 days, and fixed in 10% formaldehyde and stained with PAS using standard procedure. (A-C) On day 1 (A), day 3 (B), or day 9 (C). No PAS-positive components were observed on the cell surface on day 1. PAS-positive components covered cell surface moderately increased on day 3, and then markedly increased on day 9. Bar=30  $\mu$ m.



Table 8. Effects of culture periods on the cell growth and transepithelial resistance (TER) in GSM06 cells.

Culture periods (days)	Cell number ( $\times 10^5$ cells/cm <sup>2</sup> )	TER ( $\Omega$ /cm <sup>2</sup> )
1	1.33 $\pm$ 0.04	21 $\pm$ 4.6
3	1.38 $\pm$ 0.06	88 $\pm$ 12 *
9	2.76 $\pm$ 0.19 *	794 $\pm$ 37 *

The cells ( $1.6 \times 10^5$  cells/cm<sup>2</sup>) were cultured in a collagen-coated culture bottle or cell culture insert at 33°C for 1, 3 or 9 days. The cell number was counted using a hemacytometer. The transepithelial resistance between apical and basolateral side was measured by using Millicell electrical resistance system. Values represent the means  $\pm$  S.E.M. of 6 experiments. \*,  $P < 0.01$  vs. day 1 (Dunnett's multiple comparison test).

#### 7) GSM06 細胞の上皮膜電気抵抗の測定

GSM06 細胞を細胞培養インサートで培養したとき、上皮膜電気抵抗は時間依存的に増加し、培養 1, 3 および 9 日目で各々  $21 \pm 4.6$ ,  $88 \pm 12$  および  $794 \pm 37$   $\Omega$ /cm<sup>2</sup> であった (Table 8).

#### 8) GSM06 細胞の PG 産生

GSM06 細胞の PGE<sub>2</sub> 遊離量は培養 1, 3 および 9 日目で各々  $546 \pm 114$ ,  $255 \pm 29$  および  $261 \pm 32$  ng/10<sup>5</sup> cells/30 min であった。GSM06 細胞の 6-keto PGF<sub>1 $\alpha$</sub>  遊離量は培養 1, 3 および 9 日目で各々  $15.9 \pm 0.95$ ,  $16.5 \pm 1.1$  および  $28.6 \pm 2.1$  ng/10<sup>5</sup> cells/30 min を示した (Table 9)。PGE<sub>2</sub> レベルは培養 1 日目に対して培養 3 および 9 日目では有意に減少したが、6-keto PGF<sub>1 $\alpha$</sub>  レベルは 1 日目に対して培養 9 日目に有意に増加した。また、PGE<sub>2</sub> レベルは 6-keto PGF<sub>1 $\alpha$</sub>  レベルより常に高かった。

#### 9) GSM06 細胞のエタノールによる細胞障害

培養 1 日目において、7.5~17.5% のエタノールは濃度依存的に細胞障害を惹起した。一方、培養 3 および 9 日目ではエタノールによる細胞障害が有意に減弱した (Fig. 22).

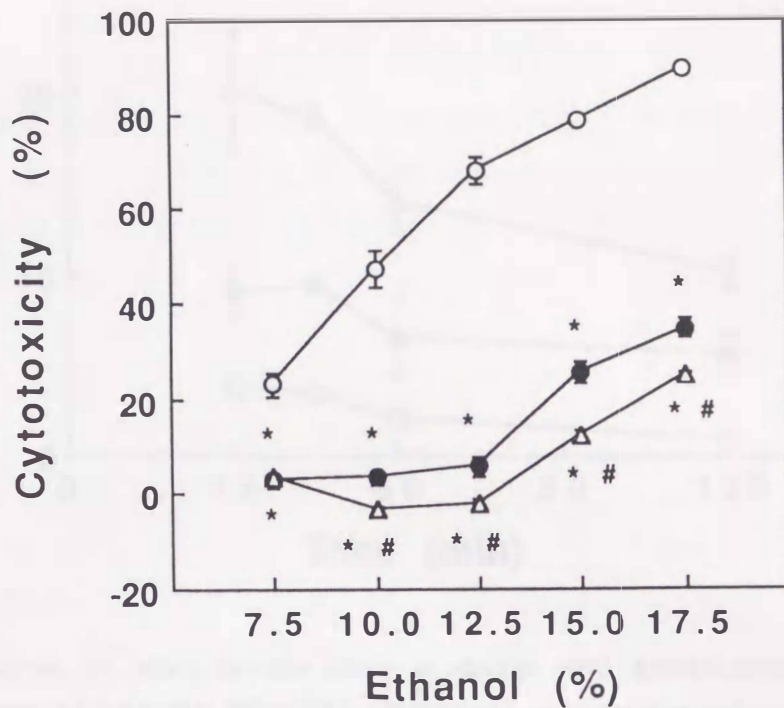


Fig. 22. Effects of culture periods on the cytotoxicity induced by ethanol in GSM06 cells. The cells were cultured on a 96-well culture plate at 33 °C for 1, 3, or 9 days, and incubated with 10  $\mu$  M of 6-carboxyfluorescein diacetoxymethyl ester (BCECF-AM) at 37 °C for 40 min. Thereafter, ethanol solutions (7.5% to 17.5%) were added to the culture medium and incubated at 37 °C for 15 min. The fluorescence intensity of 2',7'-bis(carboxyethyl) carboxyfluorescein (BCECF) was measured (EX: 485 nm, EM: 538 nm). The cytotoxicity (%) was calculated as described in "MATERIALS AND METHODS." Open circles, day 1; closed circles, day 3; open triangles, day 9. Each figure represents the mean  $\pm$  S.E.M. for 10 wells. \*: P<0.01 vs. day 1; #: P<0.01 vs. day 3 (Dunnett's multiple comparison test).



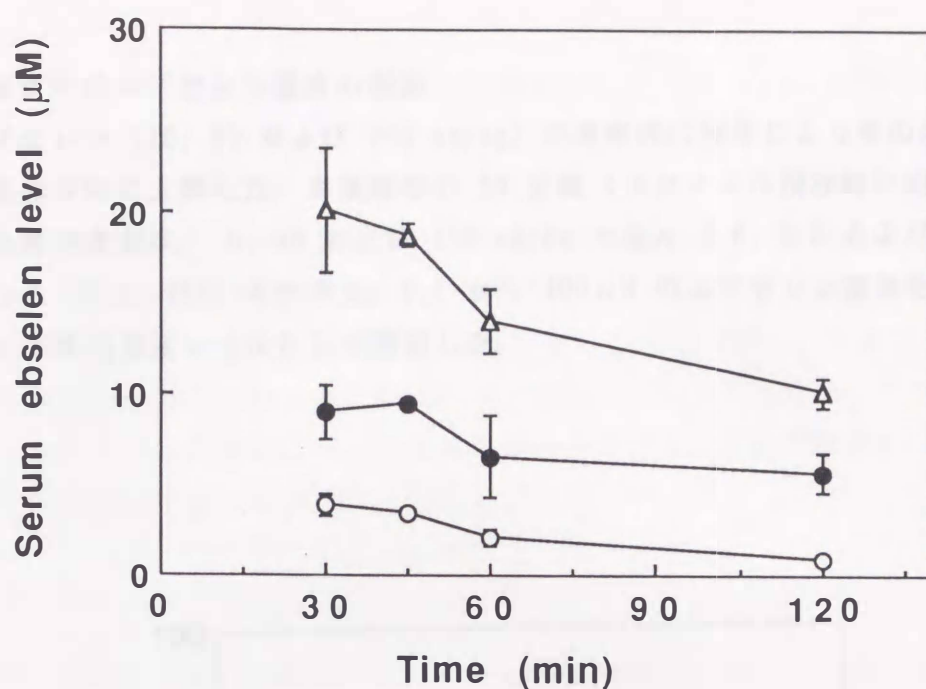


Fig. 23. Serum ebselen levels after a single oral administration. Blood samples were withdrawn from the abdominal vein under ether anesthesia 30, 45, 60 and 120 min after oral treatment with ebselen at a dose of 10 (○), 30 (●) or 100 (△) mg/kg.

Table 9. Effects of culture periods on production of prostaglandins in GSM06 cells.

Culture periods (days)	Prostaglandin (ng/10 <sup>5</sup> cells/30 min)	
	PGE <sub>2</sub>	6-keto PGF <sub>1α</sub>
1	546 ± 114	15.9 ± 0.95
3	255 ± 29*	16.5 ± 1.1
9	261 ± 32*	28.6 ± 2.1*

The cells (1.6 x 10<sup>5</sup> cells/cm<sup>2</sup>) were cultured in a collagen-coated culture bottle at 33 °C for 1, 3 or 9 days. The cells were incubated with a gentle shaking at 37 °C for 30 min. The amount of PGE<sub>2</sub> or 6-keto PGF<sub>1α</sub> in the fluid obtained was measured with a PGE<sub>2</sub> or 6-keto PGF<sub>1α</sub> enzyme immuno assay kit, respectively. Values represent the means ± S.E.M. of 6 experiments. \*, P<0.01 vs. day 1 (Dunnett's multiple comparison test).

#### 10) 血清中のエブセレン濃度の測定

エブセレン (10, 30 および 100 mg/kg) の単回経口投与によりその血清中濃度が用量依存的に上昇した. 本薬投与の 30 分後 (エタノール投与時に相当) における血清中濃度は, 10, 30 および 100 mg/kg で各々 3.8, 9.0 および 20.1  $\mu\text{M}$  であった (Fig. 23). それゆえ, 0.1 から 100  $\mu\text{M}$  のエブセレン濃度を *in vitro* 実験の濃度レベルとして選択した.

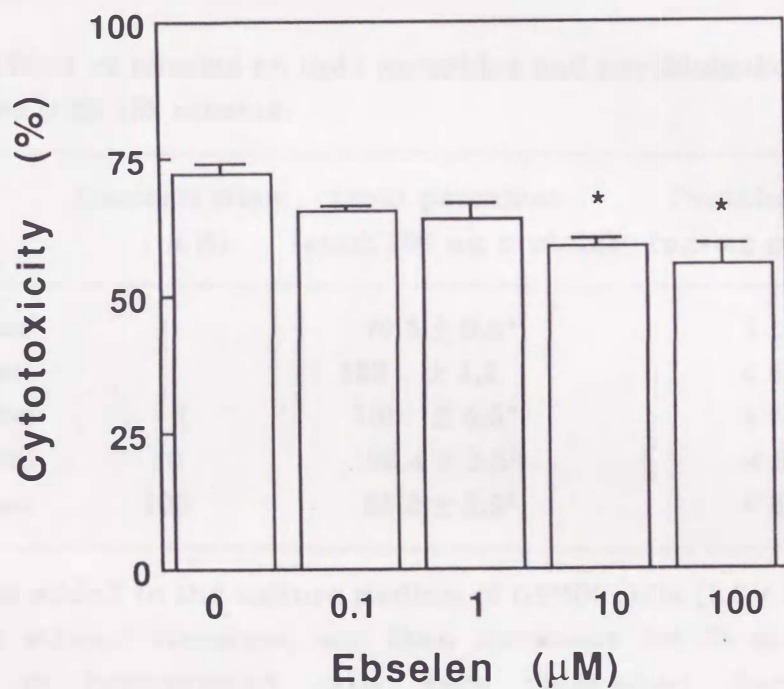


Fig. 24. Effect of ebselen on the cytotoxicity of GSM06 cells induced by 15% ethanol. Experiment was made by the same procedure as described in fig. 22. Ebselen was added to 2',7'-bis(carboxyethyl) carboxyfluorescein (BCECF)-labeled cells 10 min before ethanol (15%) exposure. Each figure and vertical bar represents the means  $\pm$  S.E.M. for 10 wells. \*:  $P < 0.05$  vs. zero-dose group (vehicle plus ethanol) (Dunnett's multiple comparison test).



11) エタノール惹起細胞障害, 過酸化脂質量または pLT レベルに対するエブセレンの作用

エブセレン (10 および 100  $\mu$ M) の前処置はエタノール (15%) による細胞障害を有意に抑制し, 各々の抑制率は 18 および 23% を示した (Fig. 24). また, 15% エタノールの暴露は溶媒処置群に比べて約 1.7 倍の過酸化脂質レベル ( $122 \pm 1.1$  nmol/100 mg protein) の上昇を惹起した. しかしながら, 本系では pLT レベルは常に検出限界 (5 pg/mg protein/15 min) 以下であった. エブセレン (0.1~100  $\mu$ M) の前処置は 1  $\mu$ M からエタノールによる過酸化脂質レベル上昇を用量依存的かつ有意に抑制した (Table 10).

Table 10. Effect of ebselen on lipid peroxides and peptidoleukotrienes in GSM06 cells treated with 15% ethanol.

Treatment	Concentration ( $\mu$ M)	Lipid peroxides (nmol/100 mg protein)	Peptidoleukotrienes (pg/mg protein/15 min)
Vehicle alone		$70.3 \pm 0.6^{\circ}$	< 5.0
Ethanol alone		$122 \pm 1.1$	< 5.0
+ ebselen	1	$105 \pm 4.6^{\circ}$	< 5.0
+ ebselen	10	$95.4 \pm 3.5^{\circ}$	< 5.0
+ ebselen	100	$66.2 \pm 2.9^{\circ}$	< 5.0

Ebselen was added to the culture medium of GSM06 cells ( $1.6 \times 10^5$  cells/cm<sup>2</sup>) 10 min before ethanol exposure, and then incubated for 15 min at 37 °C. Lipid peroxides in homogenated cells were determined fluorometrically as thiobarbituric acid-reactive substances, and released peptidoleukotrienes into the medium were measured by a peptidoleukotriene enzyme immunoassay. The data represents the means  $\pm$  S.E.M. for 6 bottles. Vehicle alone: 0.5% ethanol plus Daigo's T medium, Ethanol alone: 0.5% ethanol plus 15% ethanol in Daigo's T medium.  $^{\circ}P < 0.01$  vs. ethanol alone group (Dunnett's multiple comparison test).

#### 4. 考察と総括

SV40 ウイルスによる哺乳動物細胞の不死化は、ある程度その細胞に特異的な機能を発現させる<sup>92, 144)</sup>。近年、温度感受性突然変異株 *tsSV40 large T* 抗原遺伝子による細胞の不死化が行なわれ、その遺伝子産物は許容温度 (33°C) では活性を有するが正常のマウスの体温 (39~40°C) では急激に失活すると報告されている (Fig. 25)<sup>14, 38, 39, 60, 138, 141, 142)</sup>。以前, Yanai ら<sup>141, 142)</sup> は今回用いたもの同一の pSVtsA58 導入トランスジェニックマウスから肝および腎の細胞株を確立した。また, H-2K<sup>b</sup>-tsA58 導入トランスジェニックマウスを用いて, 小腸, 大腸および破骨細胞の細胞株樹立が報告されている<sup>14, 138)</sup>。即ち, *tsSV40 large T* 抗原遺伝子導入トランスジェニックマウスは *in vitro* で培養するのが難しい細胞の樹立に有用な動物である。

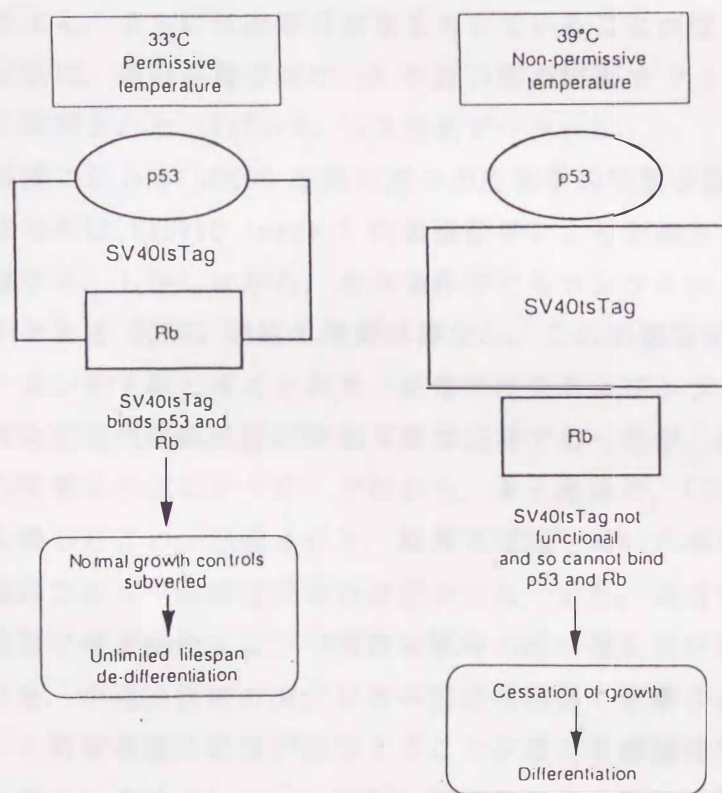


Fig. 25. Model of action of *tsSV40 large T-antigen gene* (SV40tsTag). At the permissive temperature (33 °C), SV40tsTag is correctly folded and can bind both p53 and Retinoblastoma (Rb). However, at the non-permissive temperature, the protein becomes misfolded and can no longer sequester Rb and p53, allowing them to function normally (reference 60).



我々は、pSVtsA58 導入トランスジェニックマウスから 2 種類の胃粘膜上皮粘液細胞株の樹立に成功した。この細胞の細胞株樹立の報告は未だなく、今回の報告が初めてである。トランスジェニックマウスから分離した胃粘膜初代培養細胞は、数日間は高い細胞増殖性を示し、これは正常の胃粘膜初代培養細胞と同様であった<sup>58, 64, 131</sup>。しかしながら、その後許容温度において細胞は増殖性を示さなかった。しかし、約 6 週間後増殖性が回復し、細胞はコンフルエントモノレイヤーが形成されるまで増殖した。これと同様の細胞増殖パターンが我々と同じトランスジェニックマウス由来の肝および腎細胞株でも示されている<sup>141, 142</sup>。樹立した胃粘膜上皮粘液細胞株 (GSM06 および GSM10) は隣接細胞と密着した形態を保持しつつ、コンフルエントモノレイヤーが形成されるまで増殖した。これらの細胞の形態は正常胃粘膜初代培養細胞<sup>58, 64, 131</sup> のそれと類似していた。これらの細胞は胃粘膜上皮粘液細胞と同様に PAS および I 型 Con A-HRP 染色陽性の糖タンパク質を産生し、さらには重曹分泌能を有していることが明らかとなった。細胞の重曹分泌能は、細胞培養溶液の pH が数日間の培養で 7.2 から 7.6 に上昇することから確認された (Tabuchi ら未発表データ)。

次に、許容温度において GSM06 細胞の種々の生物学的特徴を調べた。GSM06 細胞の温度感受性増殖は tsSV40 large T 抗原遺伝子により制御され、細胞は許容温度でのみ増殖する。しかしながら、その条件下でもコンフルエントモノレイヤーが形成されたとき GSM06 細胞の増殖は停止し、この細胞増殖の停止はコンタクトインヒビションのためと考えられた。正常マウスおよびトランスジェニックマウス由来の胃粘膜初代培養細胞の染色体数は正常であったが、GSM06 細胞の染色体数は正常の性質を示さなかった。すなわち、ある意味で、GSM06 細胞は細胞培養中に形質転換したことが示唆された。軟寒天培地を用いた癌原性試験において、GSM06 細胞はコロニー形成活性を示さなかった。また、透過電子顕微鏡による観察から細胞間に密着結合および中隔接着斑等の結合複合体が形成されることが明らかとなった。中隔接着斑の減少はある種の癌細胞で観察され<sup>62</sup>、また中隔接着斑数の減少と形質転換の程度が相関することが様々な癌原性を有する細胞株において観察されている<sup>26, 99, 115</sup>。GSM06 細胞の染色体数は正常の性質を示さないが、細胞増殖性および結合複合体の性質は癌細胞のそれらとは異なると推察される<sup>26, 62, 99, 115</sup>。

興味深いことに、コンタクトインヒビションにより細胞増殖が抑制されたとき PAS 陽性の糖タンパク質が細胞表面に観察され、その後培養 9 日目では胃粘膜上皮に認められるような厚い PAS 陽性の粘液層が細胞表面に形成された。In vitro 細胞培養系において細胞表面に粘液層が形成されたという報告は未だない。ウサギ胎児胃由来の初代培養細胞は細胞内に PAS 陽性の粘液顆粒を有する<sup>58</sup>。



同様にラット胃粘膜の初代培養細胞は PAS 陽性の粘液顆粒を保有し、さらには粘液糖タンパク質の合成および分泌を行なうことが報告されている<sup>131)</sup>。しかしながら、これらの細胞の細胞増殖性および機能は数週間維持するのが限度である

58,131)

細胞培養インサートを用いた GSM06 細胞の単層培養において、管腔および基底外側の間に形成される上皮膜電気抵抗は培養時間の増加に比例して上昇し、培養 9 日目では比較的大きな電気抵抗値 (約 800  $\Omega/\text{cm}^2$ ) を示した。これは、細胞間に結合複合体が形成されたためと考えられた。これまでに様々な単層培養細胞の上皮膜電気抵抗値の報告がなされている。イヌ腎臓由来 MDCK 細胞<sup>13,67)</sup>、腸上皮癌由来 Caco-2 細胞<sup>29)</sup>、ウサギ腎皮質集合管由来 RCCT-28A 細胞<sup>8)</sup>、ブタ腎由来 LLC-PK<sub>1</sub> 細胞<sup>35)</sup> およびマウス腎内側髄質集合管末端由来 mIMCD-3 細胞<sup>97)</sup> の上皮膜抵抗値は各々 80-100, 170, 250, 400 および 1,400  $\Omega/\text{cm}^2$  と報告されている。従って、GSM06 細胞の上皮膜電気抵抗値は LLC-PK<sub>1</sub> および mIMCD-3 細胞のそれに匹敵すると考えられた。培養胃粘膜上皮細胞に PGE<sub>2</sub> および 6-keto PGF<sub>1 $\alpha$</sub>  等の PG 類産生能が存在することが報告されている<sup>30,58)</sup>。GSM06 細胞も以前の報告<sup>30,58)</sup> と同様に PGE<sub>2</sub> および 6-keto PGF<sub>1 $\alpha$</sub>  を産生することが判明した。さらに、PG のプレカーサーであるアラキドン酸 ( $10^{-6} \sim 10^{-5}$  M) の培地中への添加は GSM06 細胞からの PG 遊離レベルを顕著に増大させた (Tabuchi ら未発表データ)。これらの知見から、胃粘膜上皮粘液細胞は胃粘膜における PG の主要な源である可能性が示唆された。さらに、GSM06 細胞はリン脂質および小麦胚アグルチニンレクチンに結合する糖タンパクを産生し、これらの産生量は培養時間に依存して増大することが示された (Dohi ら未発表データ)。

GSM06 細胞のエタノール細胞障害に対する培養時間の影響を検討した。培養 1 日目、7.5-17.5% エタノールは細胞障害を濃度依存的に惹起し、この成績はラット胃粘膜細胞の初代培養系を用いた結果とほぼ一致した<sup>78,79)</sup>。一方、GSM06 細胞が粘液層および上皮膜電気抵抗を形成する培養 3 および 9 日目ではその細胞障害は時間に依存して減弱した。従って、エタノール細胞障害の抑制に粘液および上皮膜電気抵抗形成が少なくとも一部関与していると推察される。外因性の PGE<sub>2</sub> および 16,16-ジメチル PGE<sub>2</sub> は胃において強力なガストロプロテクション作用を発揮する<sup>101)</sup>。また、胃粘膜における PG 量の増加は起炎性物質による粘膜障害を有意に抑制する<sup>102)</sup>。残念ながら、現在のところ GSM06 細胞が産生する PG 類が本障害モデルにおいてガストロプロテクション作用を発揮しているか否かは不明である。

これらの成績から、GSM06 細胞は正常胃粘膜上皮粘液細胞が有する機能を種々保持しているので、薬理的および生理学的に有用な胃粘膜上皮の *in vitro* モ



デルになると考えられる。さらには、この細胞を利用した実験系がこれまで種々の実験動物で行なわれてきた薬物の毒性評価の有用な代替法となり得るかもしれない。

第一部では *in vivo* の系において、エブセレンがマウスエタノール胃粘膜損傷をほぼ完全に抑制し、またその抑制機序に脂質過酸化および pLT 産生抑制作用が関与することを示した。ここでは GSM06 細胞を用いて、エタノールによる細胞障害に対するエブセレンの効果を *in vitro* で検討した。エブセレンの 10 および 100  $\mu\text{M}$  はエタノール細胞障害を有意に抑制した。しかしながら、その抑制率は高濃度 (100  $\mu\text{M}$ ) でも僅か 20% であった。In vivo および *in vitro* におけるエブセレンの抑制作用に差が認められた。これは実験条件およびエタノールによる損傷の程度の差に起因するかもしれない。エタノール投与によりマウス胃粘膜の脂質過酸化量および pLT レベルが有意に上昇することを明らかにしている (第一部参照)。GSM06 細胞において、エタノール処置は重篤な細胞障害を誘導し、同時に過酸化脂質レベルを上昇させた。Mutoh ら<sup>78)</sup> はラット胃粘膜初代培養系においてエタノールの暴露は酸素ラジカル種産生を誘導し、またラジカル産生と細胞障害の間に相関性があることを明らかにした。従って、GSM06 細胞におけるエタノールによる過酸化脂質レベルの上昇は、酸素ラジカル種産生の結果誘導された可能性が考えられる。エブセレンの過酸化脂質レベルの抑制は 1  $\mu\text{M}$  以上の濃度で認められ、高濃度 (100  $\mu\text{M}$ ) ではほぼ完全な抑制であった。一方、エタノール細胞障害に対して本薬の 100  $\mu\text{M}$  は僅か 20% の抑制しか示さなかった。これらのギャップを合理的に説明することは出来ないが、我々が用いた *in vitro* の限られた条件下において、細胞障害発生には脂質の過酸化に加えてその他の因子が関与すると推察される。また、エブセレンによる細胞障害抑制作用の少なくとも一部に本薬の脂質過酸化抑制作用が関連している可能性が考えられる。GSM06 細胞の pLT レベルは、エタノール暴露の有無に関わらず検出限界 (5 pg/mg protein /15 min) 以下であった。この結果は、胃粘膜表層粘液細胞が胃粘膜の pLT 類の主要な源でないことを示している。また、近年、Huber ら<sup>33)</sup> は粘液産生細胞ではなくクロモグラニン A に感受性のある神経内分泌細胞がラット胃粘膜における LTB<sub>4</sub> および LTC<sub>4</sub> の主な貯蔵細胞であることを報告している。

以上の成績から、エブセレンは *in vivo* に加えて *in vitro* においてもエタノールによるマウス胃粘膜細胞障害を抑制し、その抑制作用の少なくとも一部に脂質過酸化の抑制作用が関与することが示された。



## 結論

セレン有機化合物エブセレンの胃粘膜損傷抑制作用機作の解析と胃粘膜上皮粘液細胞株の樹立を目的として研究を行い、以下の知見を得た。

① エブセレンの胃液分泌および胃粘膜損傷抑制作用を各種ラットまたはマウスモデルを用いて検討した。エブセレン投与 (30~300 mg/kg) は幽門結紮ラット胃液分泌、およびラット水浸拘束ストレスおよびアスピリン胃粘膜損傷を抑制した。本薬 (10~100 mg/kg) はラット塩酸、ラット塩酸-エタノールおよびマウスエタノール胃粘膜損傷も抑制した。また、マウスモデルにおいて、本薬の抑制作用機序の少なくとも一部に脂質過酸化および pLT 産生の抑制が関与することが示された。これらの知見から、エブセレンは胃液分泌および胃粘膜損傷抑制作用を有することが判明した。

② エブセレンの胃  $H^+, K^+$ -ATPase 抑制機序を解明する目的で、酵素反応サイクルの種々の反応に対する作用を検討した。エブセレンは  $K^+$ -ATPase 活性 ( $IC_{50}=0.06 \mu M$ )、リン酸化中間体形成 ( $IC_{50}=0.25 \mu M$ )、 $K^+$ -pNPPase 活性 (脱リン酸化に相当;  $IC_{50}=0.09 \mu M$ ) および  $E_1$  から  $E_2K$  へのコンホメーション変化 ( $IC_{50}=0.33 \mu M$ ) を抑制した。本薬によるこれらの抑制作用は DTT 処置でほぼ完全に阻害された。エブセレンは胃  $H^+, K^+$ -ATPase のスルヒドリル基に作用し、酵素の脱リン酸化過程を主に抑制することにより活性を阻害することが明らかとなった。

③ 温度感受性突然変異株 tsSV40 large T 抗原遺伝子導入トランスジェニックマウスから機能を保持した胃粘膜上皮粘液細胞株 (GSM06 および GSM10) の樹立に成功した。また、GSM06 細胞を用いたエタノール細胞障害モデルに対するエブセレンの効果を検討した。GSM06 および GSM10 細胞は細胞表面に PAS 陽性粘液層を形成する胃粘膜上皮粘液細胞株と同定された。GSM06 細胞は温度感受性、GSM10 細胞は温度非感受性の細胞増殖性を示した。GSM06 細胞の染色体数は正常の性質を示さなかったが、細胞の増殖性は癌細胞のそれとは異なった。GSM06 細胞は培養時間に依存して細胞表面に微絨毛状突起および PAS 陽性粘液層を形成した。細胞間には密着結合および中隔接着斑が存在した。GSM06 細胞は  $PGE_2$  および 6-keto- $PGF_1$  を産生した。本細胞のエタノールによる細胞障害性は培養時間に依存して軽減された。これらの結果より、樹立された胃粘膜上皮粘液細胞株は種々の機能を有した細胞であり、in vitro における胃粘膜上皮の機能を解析する有用なモデルになると考えられた。エブセレンは in vitro においてもエタノール



ルによる細胞障害を抑制し、その抑制作用機序の少なくとも一部に脂質過酸化の抑制が関与することが示された。

以上、第一部から三部までの研究から次の結論を得た。エブセレンは各種実験モデルにおいて胃粘膜損傷を抑制した。また、胃粘膜上皮粘液細胞株を樹立した。エブセレンの胃粘膜損傷抑制作用機作に抗酸化作用および 5-リボキシゲナーゼ阻害作用に加えて  $H^+, K^+$ -ATPase 阻害に基づく胃液分泌抑制作用があることを明らかにした。

## 謝辞

本論文の御校閲をいただき、発表の機会を与えてくださいました富山医科薬科大学薬学部教授竹口紀晃博士に謹んで感謝の意を表わします。

本研究の実施と発表の機会を与えていただきました第一製薬株式会社探索第三研究所奥田順三所長に感謝致します。

本研究を実施するにあたり、終始適切な御指導および御協力をいただきました第一製薬探索第三研究所古濱和久博士，分子生物研究室室長古沢満博士，杉山則文研究員，堀内正博士，国際開発部赤崎盛明博士，元第一製薬探索第三研究所榎林陽一博士，東北大学加齢医学研究所教授帯刀益男博士，矢内信昭博士，熊本大学医学部助教授鈴木操博士，および国立国際医療センター研究所室長大島美恵子博士，土肥多恵子博士に厚く御礼申し上げます。

実験に御協力いただきました第一製薬探索第三研究所小笠原共実，瓦林桂子，井芹美紀，試験センター篠原康孝研究員，石橋光太郎研究員，白井加奈栄，井上実研究員，安全性研究センター島田信研究員，服部千春の諸氏に深く感謝致します。



引用文献

1. Allen, A., and Garner, A. (1980) Mucus and bicarbonate secretion in the stomach and their possible role in mucosal protection. *Gut* 21, 249-262.
2. Anson, M.L., and Mirsky, A.E. (1933) The estimation of pepsin with hemoglobin. *J. Gen. Physiol.* 16, 59-63.
3. Asano, S., Tabuchi, Y., and Takeguchi, N. (1989) Monoclonal antibody HK4001 completely inhibits  $K^+$ -dependent ATP hydrolysis and  $H^+$  transport of hog gastric  $H^+,K^+$ -ATPase. *J. Biochem. (Tokyo)* 106, 1074-1079.
4. Asano, S., Mizutani, M., Hayashi, T., Morita, N., and Takeguchi, N. (1990) Reversible inhibition of gastric  $H^+,K^+$ -ATPase by scopolamine and diacetyl scopolamine. New biochemical tools of  $H^+,K^+$ -ATPase. *J. Biol. Chem.* 265, 22167-22173.
5. Barranco, S.C., Townsend, C.M., Jr., Casartelli, C., Macik, B.G., Burger, W.R., Boerwinkle, W.R., and Gourley, W.K. (1983) Establishment and characterization of an in vitro model system for human adenocarcinoma of the stomach. *Cancer Res.* 43, 1703-1709.
6. Beil, W., Hackbarth, I., and Sewing, K.-Fr. (1986) Mechanism of gastric antisecretory effect of SCH 28080. *Br. J. Pharmacol.* 88, 19-23.
7. Beil, W., Staar, U., and Sewing, K.-Fr. (1990) Interaction of the anti-inflammatory seleno-organic compound ebselen with acid secretion in isolated parietal cells and gastric  $H^+/K^+$ -ATPase. *Biochem. Pharmacol.* 40, 1997-2003.
8. Bello-Reuss, D.E. (1993) Characterization of acid-base transport mechanisms in the kidney cell line RCCT-28A. *Kidney Int.* 43, 173-181.
9. Bickel, M., and Kauffman, G.L., Jr. (1981) Gastric gel mucus thickness: effect of distention, 16,16-dimethyl prostaglandin  $E_2$ , and carbenoxolone. *Gastroenterology* 80, 770-775.
10. Boland, C.R., Kraus, E.R., Scheiman, J.M., Black, C., Deshmukh, G. D., and Dobbins, W.O. (1990) Characterization of mucous cell synthetic functions in a new primary canine gastric mucous cell culture system. *Am. J. Physiol.* 258, G774-G787.
11. Boyd, S.C., Sasame, H.A., and Boyd, M.R. (1981) Gastric glutathione depletion and acute ulcerogenesis by dimethylmaleate given subcutaneously to rats. *Life Sci.* 28, 2987-2992.
12. Briving, C., Andersson, B.M., Nordberg, P., and Wallmark, B. (1988) Inhibition of gastric  $H^+/K^+$ -ATPase by substituted imidazo[1,2-a]pyridines. *Biochim. Biophys. Acta* 946, 185-192.
13. Cerejido, M., Ehrenfeld, J., Meza, I., and M.-Palomo, A. (1980) Structural and functional membrane polarity in cultured monolayers of MDCK cells. *J.*



*Membr. Biol.* 52, 147-159.

14. Chambers, T.J., Owens, J.M., Hattersley, G., Jat, P.S., and Noble, M.D. (1993) Generation of osteoclast-inductive and osteoclastogenic cell lines from the *H-2K<sup>b</sup> tsA58* transgenic mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 5578-5582.
15. Chang, H., Saccomani, G., Rabon, E., Schackmann, R., and Sachs, G. (1977) Proton transport by gastric membrane vesicles. *Biochim. Biophys. Acta* 464, 313-327.
16. Chaudhury, T.K., and Robert, A. (1980) Prevention by mild irritants of gastric necrosis produced in rats by sodium taurocholate. *Dig. Dis. Sci.* 25, 830-836.
17. Chaudiere, J., and Tappel, A.L. (1983) Purification and characterization of selenium-glutathione peroxidase from hamster liver. *Arch. Biochem. Biophys.* 226, 448-457.
18. Cho, C.H., Koo, M.W.L., Garg, G.P., and Ogle, C.W. (1992) Stress-induced gastric ulceration: Its aetiology and clinical implications. *Scand. J. Gastroenterol.* 27, 257-262.
19. Clissold, S.P., and C.-Richards, D.M. (1986) Omeprazole. A preliminary review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties and therapeutic potential in peptic ulcer disease and Zollinger-Ellison syndrome. *Drugs* 32, 15-47.
20. Fischer, H., and Dereu, N. (1987) Mechanism of the catalytic reduction of hydroperoxides by ebselen: A selenium-77 NMR study. *Bull. Soc. Chim. Belg.* 96, 757-768.
21. Fischer, H., Terlinden, R., Lohr, J.P., and Romer, A. (1988) A novel biologically active selenoorganic compound. VIII. Biotransformation of ebselen. *Xenobiotica* 18, 1347-1359.
22. Fiske, C.H., and Subbarow, Y. (1925) The colorimetric determination of phosphorus. *J. Biol. Chem.* 66, 375-400.
23. Flechner, I., Maruta, K., Burkart, V., Kawai, K., Kolb, H., and Kiesel, U. (1990) Effect of radical scavengers on the development of experimental diabetes. *Diabetes Res.* 13, 67-73.
24. Ganser, A.L., and Forte, J.G. (1973) K<sup>+</sup>-stimulated ATPase in purified microsomes of bullfrog oxyntic cells. *Biochim. Biophys. Acta* 307, 169-180.
25. Gower, J.D., Lane, N.J., Goddard, G., Manek, S., Ambrose, I.J., and Green, C.J. (1992) Ebselen. Antioxidant capacity in renal preservation. *Biochem. Pharmacol.* 43, 2341-2348.
26. Green, K.J., Stappenbeck, T.S., Noguchi, S., Oyasu, R., and Nilles, L.A. (1991) Desmoplakin expression and distribution in cultured rat bladder epithelial cells of varying tumorigenic potential. *Exp. Cell Res.* 193, 134-143.
27. Guslandi, M. (1987) Gastric effects of leukotrienes. *Prost. Leuk. Med.* 26,



28. Hayashi, T., Kishi, M., Kawasaki, M., Arisawa, M., Shimizu, M., Suzuki, S., Yoshizaki, M., Morita, N., Tezuka, Y., Kikuchi, T., Berganza, L.H., Ferro, E., and Basualdo, I. (1987) Scopadulcic acid-A and -B, new diterpenoids with a novel skeleton, from a Paraguayan crude drug "Typycha Kuratu" (*Scoparia Dulcis* L.). *Tetrahedron Lett.* 28, 3693-3696.
29. Hidalgo, I.J., Raub, T.J., and Borchardt, R.T. (1989) Characterization of the human colon carcinoma cell line (Caco-2) as a model system for intestinal epithelial permeability. *Gastroenterology* 96, 736-749.
30. Hiraishi, H., Terano, A., Ota, S., Shiga, J., Kobayashi, T., Harada, H., Ishii, M., Ivey, K.J., and Sugimoto, T. (1986) Prostaglandin production in cultured gastric mucosal cells: Role of cAMP on its modulation. *Prostaglandins* 32, 259-273.
31. Ho, Y.S., and Howard, A.J. (1992) Cloning and characterization of the rat glutathione peroxidase gene. *FEBS Lett.* 301, 5-9.
32. Hojo, H. (1977) Establishment of cultured cell lines of human stomach cancer-origin and their morphological characteristics. *Niigata Igakukai Zasshi* 91, 737-752.
33. Huber, W., Trautmann, M., Becker, I., Schenck, U., Peskar, B.M., and Schepp, W. (1993) Leukotriene B<sub>4</sub> and C<sub>4</sub> production in isolated rat gastric mucosal cells. *Am. J. Physiol.* 265, G1021-G1028.
34. Huh, N., Takaoka, T., and Katsuta, H. (1977) Establishment of epithelial cell lines from rat glandular stomachs. *Japan. J. Exp. Med.* 47, 413-424.
35. Hull, R.N., Cherry, W.R., and Weaver, G.W. (1976) The origin and characteristics of a pig Kidney cell strain, LLC-PK. *In Vitro* 12, 670-677.
36. Itoh, M., and Guth, P.H. (1985) Role of oxygen-derived free radicals in hemorrhagic shock-induced gastric lesions in the rat. *Gastroenterology* 88, 1162-1167.
37. Jackson, R.J., Mendlein, J., and Sachs, G. (1983) Interaction of fluorescein isothiocyanate with the (H<sup>+</sup> + K<sup>+</sup>)-ATPase. *Biochim. Biophys. Acta* 731, 9-15.
38. Jat, P.S., and Sharp, P.A. (1989) Cell lines established by a temperature-sensitive simian virus 40 large T-antigen gene are growth restricted at the nonpermissive temperature. *Mol. Cell. Biol.* 9, 1672-1681.
39. Jat, P.S., Noble, M.D., Ataliotis, P., Tanaka, Y., Yannoutsos, N., Larsen, L., and Kioussis, D. (1991) Direct derivation of conditionally immortal cell lines from an H-2K<sup>b</sup>-tsA58 transgenic mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 5096-5100.
40. Johshita, H., Sasaki, T., Matsui, T., Hanamura, T., Masayasu, H., and Asano, T. (1990) Effects of ebselen (PZ51) on ischemic brain edema after local ischemia in cats. *Acta Neurochir.* 51 (Suppl.), 239-241.



41. Karmeli, F., Eliakim, R., Okon, E., and Rachmilewitz, R. (1991) Gastric mucosal damage by ethanol is mediated by substance P and prevented by ketotifen, a mast cell stabilizer. *Gastroenterology* 100, 1206-1216.
42. Katsuyama, T., and Spicer, S.S. (1978) Histochemical differentiation of complex carbohydrates with variants of the concanavalin A-horseradish peroxidase method. *J. Histochem. Cytochem.* 26, 233-250.
43. Knapp, H.R., Oelz, O., Sweetman, B.J., and Oates, J.A. (1978) Synthesis and metabolism of prostaglandins E<sub>2</sub>, F<sub>2a</sub> and D<sub>2</sub> by the rat gastrointestinal tract stimulation by a hypertonic environment in vitro. *Prostaglandins* 15, 751-757.
44. Kolber, M.A., Quinones, R.R., Gress, R.E., and Henkart, P.A. (1988) Measurement of cytotoxicity by target cell release and retention of the fluorescent dye bis-carboxyethyl-carboxyfluorescein (BCECF). *J. Immunol. Methods* 108, 255-264.
45. Konturek, S.J., Brzozowski, T., Drozdowicz, D., and Beck, G. (1988) Role of leukotrienes in acute gastric lesions induced by ethanol, taurocholate, aspirin, platelet-activating factor and stress in rats. *Dig. Dis. Sci.* 33, 806-813.
46. Kuhl, P., Borbe, H.O., Romer, A., Fischer, H., and Parnham, M.J. (1985) Selective inhibition of leukotriene B<sub>4</sub> formation by ebselen: A novel approach to antiinflammatory therapy. *Agents Actions* 17, 366-367.
47. Kuhl, P., Borbe, H.O., Fischer, H., Romer, A., and Safayhi, H. (1986) Ebselen reduced the formation of LTB<sub>4</sub> in human and porcine leukocytes by isomerisation to its 5S,12R-6-trans-isomer. *Prostaglandins* 31, 1029-1048.
48. Kurebayashi, Y., Ikeda, T., and Osada, Y. (1988) Cytoprotective action of cetraxate against HCl-Ethanol-induced gastric lesion in rats. *Japan. J. Pharmacol.* 46, 17-25.
49. Laboisie, C.L., Augeron, C., C.-Turpin, M.-H., Gespach, C., Cheret, A.-M., and Potet, F. (1982) Characterization of a newly established human gastric cancer cell line HGT-1 bearing histamine H<sub>2</sub>-receptors. *Cancer Res.* 42, 1541-1548.
50. Lacy, E.R., and Ito, S. (1982) Microscopic analysis of ethanol damage to rat gastric mucosa after treatment with a prostaglandin. *Gastroenterology* 83, 619-625.
51. Lee, H.-C., Breitart, H., Berman, M., and Forte, J.G. (1979) Potassium-stimulated ATPase activity and hydrogen transport in gastric microsomal vesicles. *Biochim. Biophys. Acta* 553, 107-131.
52. Lewis, S.A., Hadison, N.W., and Veillon, C. (1986) Comparison of isotope dilution mass spectrometry and praphite furnace atomic absorption spectrometry with Zeeman background correction for determination of



- plasma selenium. *Anal. Chem.* 58, 1272-1273.
53. Leyck, S., and Parnham, M.J. (1990) Acute antiinflammatory and gastric effects of the seleno-organic compound ebselen. *Agents Actions* 30, 426-431.
  54. Lorentzon, P., Eklundh, B., Bradstrom, A., and Wallmark, B. (1985) The mechanism for inhibition of gastric ( $H^+ + K^+$ )-ATPase by omeprazole. *Biochim. Biophys. Acta* 817, 25-32.
  55. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., and Randall, R.J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265-275.
  56. Maeda, M., Tagaya, M., and Futai, M. (1988) Modification of gastric ( $H^+ + K^+$ )-ATPase with pyridoxal 5'-phosphate. *J. Biol. Chem.* 263, 3652-3656.
  57. Main, I.M.H., and Whittle, B.J.R. (1973) The effects of E and A prostaglandins on gastric mucosal blood flow and acid secretion in the rat. *Br. J. Pharmacol.* 49, 428-436.
  58. Matuoka, K., Tanaka, M., Mitsui, Y., and Murota, S. (1983) Cultured rabbit gastric epithelial cells producing prostaglandin  $I_2$ . *Gastroenterology* 84, 498-505.
  59. Mattsson, H., Andersson, K., and Larsson, H. (1983) Omeprazole provides protection against experimentally induced gastric mucosal lesions. *Eur. J. Pharmacol.* 91, 111-114.
  60. McLean, J.S. (1993) Improved techniques for immortalizing animal cells. *TIBTECH* 11, 232-238.
  61. McManus, J.F.A. (1948) Histological and histochemical uses of periodic acid. *Stain Tech.* 23, 99-108.
  62. McNutt, N.S., Hershberg, R.A., and Weinstein, R.S. (1971) Further observations on the occurrence of nexuses in benign and malignant human cervical epithelium. *J. Cell Biol.* 51, 805-825.
  63. Mendlein, J., and Sachs, G. (1990) Interaction of a  $K^+$ -competitive inhibitor, a substituted imidazo[1,2a]pyridine, with the phospho- and dephospho-enzyme forms of  $H^+, K^+$ -ATPase. *J. Biol. Chem.* 265, 5030-5036.
  64. Miller, L.R., Jacobson, E.D., and Johnson, L.R. (1973) Effect of pentagastrin on gastric mucosal cells grown in tissue culture. *Gastroenterology* 64, 254-267.
  65. Miller, T.A. (1983) Protective effects of prostaglandins against gastric mucosal damage: current knowledge and proposed mechanisms. *Am. J. Physiol.* 245, G601-G623.
  66. Miller, T.A. (1988) Gastroduodenal mucosal defense: factors responsible for the ability of the stomach and duodenum to resist injury. *Surgery* 103, 389-397.
  67. Misfeldt, D.S., Hamamoto, S.T., and Pitelka, D.R. (1976) Transepithelial transport in cell culture. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 73, 1212-1216.



68. Mizui, T., and Doteuchi, M. (1983) Effect of polyamines on acidified ethanol-induced gastric lesions in rats. *Japan. J. Pharmacol.* 33, 939-945.
69. Mizui, T., and Doteuchi, M. (1986) Lipid peroxidation: A possible role in gastric damage induced by ethanol in rats. *Life Sci.* 38, 2163-2167.
70. Mizui, T., Shimono, N., and Doteuchi, M. (1987) A possible mechanism of protection by polyamines against gastric damage induced by acidified ethanol in rats: Polyamine protection may depend on its antioxidative properties. *Japan. J. Pharmacol.* 44, 43-50.
71. Morii, M., Takata, H., and Takeguchi, N. (1989) Acid activation of omeprazole in isolated gastric vesicles, oxyntic cells, and gastric glands. *Gastroenterology* 96, 1453-1461.
72. Morii, M., Takata, H., and Takeguchi, N. (1990) Binding site of omeprazole in hog gastric H<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 167, 754-760.
73. Morii, M., Takata, H., Fujisaki, H., and Takeguchi, N. (1990) The potency of substituted benzimidazoles such as E3810, omeprazole, Ro 18-5364 to inhibit gastric H<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase is correlated with the rate of acid-activation of the inhibitor. *Biochem. Pharmacol.* 39, 661-667.
74. Morii, M., and Takeguchi, N. (1993) Different biochemical modes of action of two irreversible H<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase inhibitors, omeprazole and E3810. *J. Biol. Chem.* 268, 21533-21559.
75. Motoyama, T., Hojo, H., and Watanabe, H., (1986) Comparison of seven cell lines derived from human gastric carcinomas. *Acta Pathol. Jpn.* 36, 65-83.
76. Muller, A., Cadenas, E., Graf, P., and Sies, H. (1984) A novel biologically active seleno-organic compound- I : Glutathione peroxidase-like activity in vitro and antioxidant capacity of PZ 51 (ebselen). *Biochem. Pharmacol.* 33, 3235-3239.
77. Muller, A., Gabriel, H., and Sies, H. (1985) A novel biologically active seleno-organic compound- IV : Protective glutathione-dependent effect of PZ 51 (ebselen) against ADP-Fe induced lipid peroxidation in isolated hepatocytes. *Biochem. Pharmacol.* 34, 1185-1189.
78. Mutoh, H., Hiraishi, H., Ota, S., Ivey, K.J., Terano, A., and Sugimoto, T. (1990) Role of oxygen radicals in ethanol-induced damage to cultured gastric mucosal cells. *Am. J. Physiol.* 258, G603-G609.
79. Mutoh, H., Hiraishi, H., Ota, S., Yoshida, H., Ivey, K.J., Terano, A., and Sugimoto, T. (1990) Protective role of intracellular glutathione against ethanol-induced damage in cultured rat gastric mucosal cells. *Gastroenterology* 98, 1452-1459.
80. Niederau, C., Ude, K., Niederau, M., Luthen, R., Strohmeyer, G., Ferrell, L.D., and Grendell, J.H. (1991) Effects of the seleno organic substance ebselen in two different models of acute pancreatitis. *Pancreas* 6, 282-290.



81. Oates, P.J., and Hakkinen, J.P. (1988) Studies on the mechanism of ethanol-induced gastric damage in rats. *Gastroenterology* 94, 10-21.
82. Ohkawa, H., Ohnishi, N., and Yagi, K. (1979) Assay for lipid peroxide in animal tissue by thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem.* 95, 351-358.
83. Okabe, S., Takeuchi, K., Murota, T., and Takagi, K. (1977) Effects of cimetidine and atropine sulfate on gastric secretion and healing of gastric and duodenal ulcers in rats. *Eur. J. Pharmacol.* 41, 205-208.
84. Okabe, S., Takeuchi, K., Urushidani, T., and Takagi, K. (1977) Effects of cimetidine, a histamine H<sub>2</sub>-receptor antagonist, on various experimental gastric and duodenal ulcers. *Am. J. Dig. Dis.* 22, 677-684.
85. Ota, S., Razandi, M., Sekhon, S., Krause, W.J., Terano, A., Hiraishi, H., and Ivey, K.J. (1988) Salicylate effects on a monolayer culture of gastric mucous cells from adult rats. *Gut* 29, 1705-1714.
86. Ota, S., Terano, A., Hiraishi, H., Mutoh, H., Nakada, R., Hata, Y., Shiga, J., and Sugimoto, T. (1990) A monolayer culture of gastric mucous cells from adult rabbits. *Gastroenterol. Jpn.* 25, 1-7.
87. Park, J.G., Frucht, H., LaRocca, R.V., Bliss, D.P., Jr., Kurita, Y., Chen, T.R., Henslee, J.G., Trepel, J.B., Jensen, R.T., Johnson, B.E., Bang, Y.J., Kim, J.P., and Gazdar, A.F. (1990) Characteristics of cell lines established from human gastric carcinoma. *Cancer Res.* 50, 2773-2780.
88. Parmar, N.S., and Ghosh, M.N. (1981) Gastric anti-ulcer activity of (+)-cyanidanol-3, a histidine decarboxylase inhibitor. *Eur. J. Pharmacol.* 69, 25-32.
89. Parnham, M.J., and Kindt, S. (1984) A novel biologically active seleno-organic compound- III : Effects of PZ 51 (ebselen) on glutathione peroxidase and secretory activities of mouse macrophages. *Biochem. Pharmacol.* 33, 3247-3250.
90. Parnham, M.J., Leyck, S., Dereu, N., Winkelmann, J., and Graf, E. (1985) Ebselen (PZ-51) a GSH-peroxidase-like organoselenium compound with anti-inflammatory activity. *Adv. Inflamm. Res.* 10, 397-400.
91. Parnham, M.J., and Graf, E. (1987) Seleno-organic compounds and the therapy of hydroperoxide-linked pathological conditions. *Biochem. Pharmacol.* 36, 3095-3102.
92. Paul, D., Hohne, M., Pinkert, C., Piasecki, A., Ummelmann, E., and Brinster, R.L. (1988) Immortalized differentiated hepatocyte lines derived from transgenic mice harboring SV40 T-antigen genes. *Exp. Cell Res.* 175, 354-362.
93. Peskar, B.M., Lange, K., Hoppe, U., and Peskar, B.A. (1986) Ethanol stimulates formation of leukotriene C<sub>4</sub> in rat gastric mucosa. *Prostaglandins* 31, 283-293.



94. Peskar, B.M. (1991) Role of leukotriene C<sub>4</sub> in mucosal damage caused by necrotizing agents and indomethacin in the rat stomach. *Gastroenterology* 100, 619-626.
95. Pihan, G., Regillo, C., and Szabo, S. (1987) Free radicals and lipid peroxidation in ethanol- or aspirin-induced gastric mucosal injury. *Dig. Dis. Sci.* 32, 1395-1401.
96. Puck, T.T., and Marcus, P.I. (1955) A rapid method for viable cell titration and clone production with HeLa cells in tissue culture: The use of X-irradiated cells to supply conditioning factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 41, 432-437.
97. Rauchman, M.I., Nigam, S.K., Delpire, E., and Gullans, S.R. (1993) An osmotically tolerant inner medullary collecting duct cell line from an SV40 transgenic mouse. *Am. J. Physiol.* 256, F416-F424.
98. Ray, T.K., and Forte, J.G. (1976) Studies on the phosphorylated intermediates of a K<sup>+</sup>-stimulated ATPase from rabbit gastric mucosa. *Biochim. Biophys. Acta* 443, 451-467.
99. Ren, J., Hamada, J., Takeichi, N., Fujikawa, S., and Kobayashi, H. (1990) Ultrastructural differences in junctional intercellular communication between highly and weakly metastatic clones derived from rat mammary carcinoma. *Cancer Res.* 50, 358-362.
100. Robert, A. (1976) Antisecretory, antiulcer, cytoprotective and diarrheogenic properties of prostaglandins. *Adv. Prostaglandin Thromboxane Res.* 2, 507-520.
101. Robert, A. (1979) Cytoprotection by prostaglandins. *Gastroenterology* 77, 761-767.
102. Robert, A., Nezamis, J.E., Lancaster, C., Davis, J.P., Field, S.O., and Hancher, A.J. (1983) Mild irritants prevent gastric necrosis through "adaptive cytoprotection" mediated by prostaglandins. *Am. J. Physiol.* 245, G113-G121.
103. Saccomani, G., Stewart, H.B., Shaw, D., Lewin, M., and Sachs, G. (1977) Characterization of gastric mucosal membranes IX. Fractionation and purification of K<sup>+</sup>-ATPase-containing vesicles by zonal centrifugation and free-flow electrophoresis technique. *Biochim. Biophys. Acta* 465, 311-330.
104. Sachs, G., Chang, H.H., Rabon, E., Schackmann, R., Lewin, M., and Saccomani, G. (1976) A nonelectrogenic H<sup>+</sup> pump in plasma membranes of hog stomach. *J. Biol. Chem.* 251, 7690-7698.
105. Safayhi, H., Tiegs, G., and Wendel, A. (1985) A novel biologically active seleno-organic compound-V : Inhibition by ebselen (PZ 51) of rat peritoneal neutrophil lipoxigenase. *Biochem. Pharmacol.* 34, 2691-2694.
106. Sakai, H., and Takeguchi, N. (1994) A GTP-binding protein inhibits a



- gastric housekeeping chloride channel via intracellular production of superoxide. *J. Biol. Chem.* 269, 23426-23430.
107. Schepp, W., Kath, D., Tatge, C., Zimmerhackl, B., Schusdziarra, V., and Classen, M. (1989) Leukotrienes C<sub>4</sub> and D<sub>4</sub> potentiate acid production by isolated rat parietal cells. *Gastroenterology* 97, 1420-1429.
  108. Schrijen, J.J., Van G.-Luyben, W.A.H.M., and De Pont, J.J.H.H.M. (1981) Studies on (K<sup>+</sup> + H<sup>+</sup>)-ATPase. II. Role of sulfhydryl groups in its reaction mechanism. *Biochim. Biophys. Acta* 640, 473-486.
  109. Scott, C.K., Sundell, E., and Castrovilly, L. (1987) Studies on the mechanism of action of the gastric microsomal (H<sup>+</sup> + K<sup>+</sup>)-ATPase inhibitors SCH 32651 and SCH 28080. *Biochem. Pharmacol.* 36, 97-104.
  110. Shay, H., Komorav, S.A., Fels, S.S., Meranze, D., Gruenstein, M., and Siple, H. (1945) A simple method for the uniform production of gastric ulceration in the rat. *Gastroenterology* 5, 43-61.
  111. Shay, H. (1961) Etiology of peptic ulcer. *Am. J. Dig. Dis.* 6, 29-49.
  112. Shull, G.E., and Lingrel, J.B. (1985) Molecular cloning of the rat stomach (H<sup>+</sup> + K<sup>+</sup>)-ATPase. *J. Biol. Chem.* 261, 16788-16791.
  113. Soumarmon, A., Pierrang, F., Robert, J.C., Benkouka, F., and Lewin, M.J.M. (1986) Thiophosphorylation of hog gastric (H<sup>+</sup> + K<sup>+</sup>)-ATPase membranes by endogenous protein kinases. *Biochim. Biophys. Acta* 863, 82-90.
  114. Stein, T.A., Keegan, L.M., Auguste, L.-J., Bailey, B., and Wise, L. (1991) Stress-induced gastric lesions and the synthesis of prostaglandins and leukotrienes. *J. Sur. Res.* 51, 368-371.
  115. Stein, L.S., Stein, D.W.J., Echols, J., and Burghardt, R.C. (1993) Concomitant alteration of desmosomes, adhesiveness, and diffusion through gap junction channels in a rat ovarian transformation model system. *Exp. Cell Res.* 207, 19-32.
  116. Stekhoven, F.S., and Bonting, S.L. (1981) Transport adenosine triphosphatase: properties and functions. *Physiol. Rev.* 61, 1-76.
  117. Stewart, B., Wallmark, B., and Sachs, G. (1981) The interaction of H<sup>+</sup> and K<sup>+</sup> with the partial reactions of gastric (H<sup>+</sup> + K<sup>+</sup>)-ATPase. *J. Biol. Chem.* 256, 2682-2690.
  118. Suzuki, M., Miura, S., Suematsu, M., Fukumura, D., Kurose, I., Suzuki, H., Kai, A., Kudoh, I., Ohashi, M., and Tsuchiya, M. (1992) Helicobacter pylori-associated ammonia production enhances neutrophil-dependent gastric mucosal cell injury. *Am. J. Physiol.* 263, G719-G725.
  119. Suzuki, M. (1993) Production and maintenance of transgenic mouse harboring temperature-sensitive SV40 large T-antigen gene. *J. Toxicological. Sci.* 18, 325-326.
  120. Szabo, S., Trier, J.S., and Frankel, P.W. (1981) Sulfhydryl compounds may

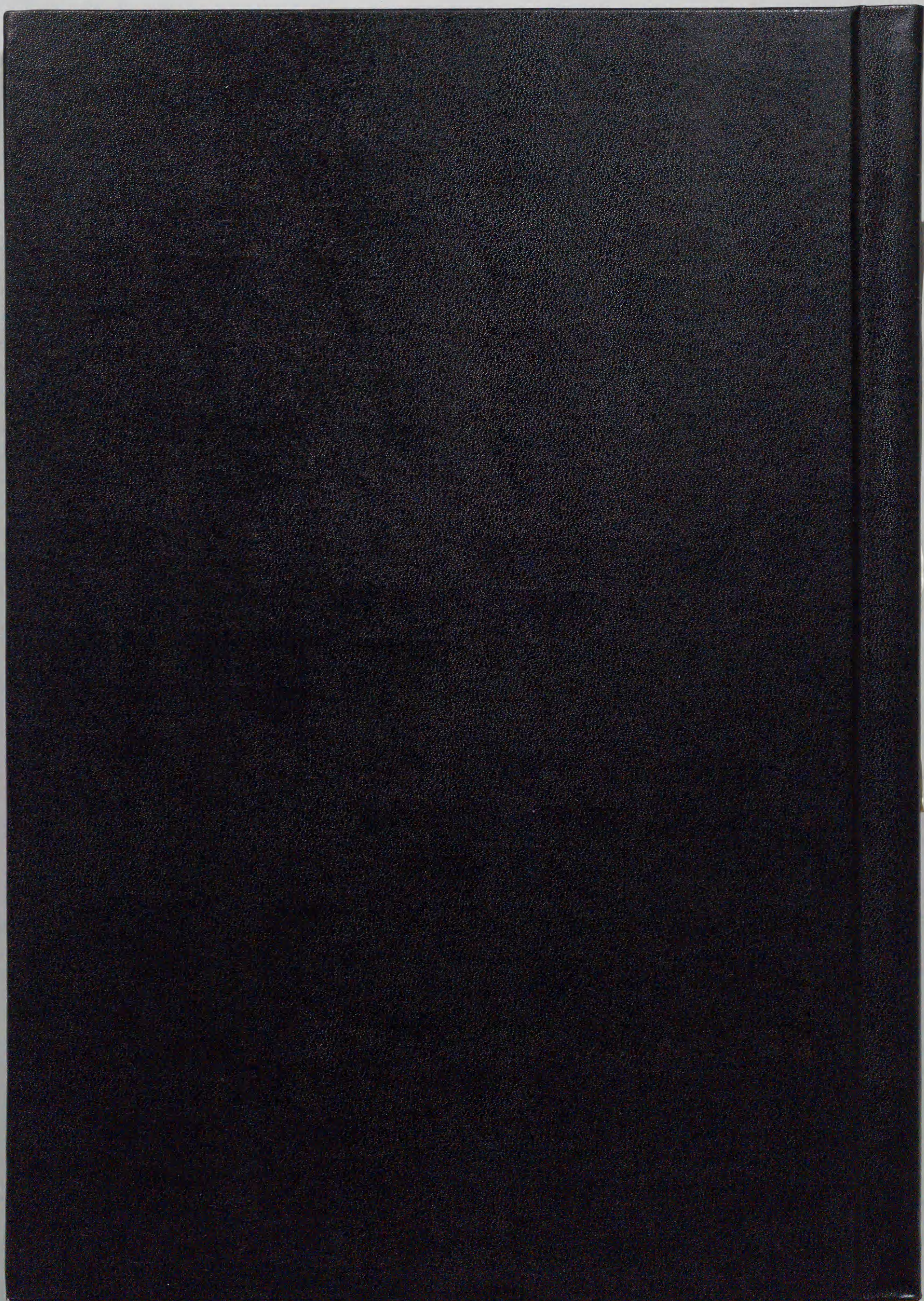


- mediate gastric cytoprotection. *Science* 214, 200-202.
121. Szabo, S., and Goldberg, I. (1990) Experimental pathogenesis: Drug and chemical lesions in the gastric mucosa. *Scand. J. Gastroenterol.* 25 (suppl. 174), 1-8.
  122. Szelenyi, I., and Brune, K. (1988) Possible role of oxygen free radicals in ethanol-induced gastric mucosal damage in rats. *Dig. Dis. Sci.* 33, 865-871.
  123. Tabuchi, Y., Takeguchi, M., Asano, S., and Takeguchi, N. (1992) Ouabain-insensitive, vanadate-sensitive  $K^+$ -ATPase of rat distal colon is partly similar to gastric  $H^+, K^+$ -ATPase. *Japan. J. Physiol.* 42, 577-589.
  124. Tabuchi, Y., and Kurebayashi, Y. (1992) Effect of DS-4574, a novel peptido-leukotriene antagonist with mast cell stabilizing action, on acute gastric lesions and gastric secretion in rats. *Japan. J. Pharmacol.* 60, 335-340.
  125. Tabuchi, Y., Kawarabayashi, K., Komada, T., and Furuhashi, K. (1993) Protective effect of DS-4574 on gastric mucosal injury induced by acidified ethanol in rats. *Eur. J. Pharmacol.* 250, 197-199.
  126. Takagi, K., and Okabe, S. (1968) The effects of drugs on the production and recovery processes of the stress ulcer. *Japan. J. Pharmacol.* 18, 9-18.
  127. Takeguchi, N., Joshima, R., Inoue, Y., Kashiwagura, T., and Morii, M. (1983) Effects of  $Cu^{2+}$ -o-phenanthroline on gastric ( $H^+ + K^+$ )-ATPase. Evidence for opening of a closed anion conductance by S-S cross-linkings. *J. Biol. Chem.* 258, 3094-3098.
  128. Takeguchi, M., Asano, S., Tabuchi, Y., and Takeguchi, N. (1990) The presence of  $H^+, K^+$ -ATPase in the crypt of rabbit distal colon demonstrated with monoclonal antibodies against gastric  $H^+, K^+$ -ATPase. *Gastroenterology* 99, 1339-1346.
  129. Tanaka, J., and Yamada, F. (1989) Ebselen (PZ51) inhibits the formation of ischemic brain edema. In: Wendel, A., ed. *Selenium in biology and medicine*. Heidelberg: Springer-Verlag, 173-176.
  130. Tarnawski, A. (1985) Prevention and treatment of gastrointestinal mucosal injury with cytoprotective agents. *Med. J. Aust.* 142, S13-S17.
  131. Terano, A., Ivey, K.J., Stachura, J., Sekhon, S., Hosojima, H., McKenzie, W.N., Jr., Krause, W.J., and Wyche, J.H. (1982) Cell culture of rat gastric fundic mucosa. *Gastroenterology* 83, 1280-1291.
  132. Terano, A., Mach, T., Stachura, J., Sekhon, S., Tarnawski, A., and Ivey, K.J. (1983) A monolayer culture of human gastric epithelial cells. *Dig. Dis. Sci.* 28, 595-603.
  133. Ueda, S., Yoshikawa, T., Takahashi, S., Naito, T., Oyamada, H., Takemura, T., Morita, Y., Tanigawa, T., Sugino, S., and Kondo, M. (1990) Protection by seleno-organic compound, ebselen, against acute gastric mucosal injury induced by ischemia-reperfusion in rats. *Adv. Exp. Med. Biol.* 1264, 187-190.



134. Wallmark, B., and Mardh, S. (1979) Phosphorylation and dephosphorylation kinetics of potassium-stimulated ATP phosphohydrolase from hog gastric mucosa. *J. Biol. Chem.* 254, 11899-11902.
135. Wallmark, B., Stewart, H.B., Rabon, E., Saccomani, G., and Sachs, G. (1980) The catalytic cycle of gastric ( $H^+ + K^+$ )-ATPase. *J. Biol. Chem.* 255, 5313-5319.
136. Wendel, A., Fausel, M., Safayhi, H., Tiegs, G., and Otter, R. (1984) A novel biologically active seleno-organic compound- II : Activity of PZ 51 in relation to glutathione peroxidase. *Biochem. Pharmacol.* 33, 3241-3245.
137. Wendel, A., and Tiegs, G. (1986) A novel biologically active seleno-organic compound- VI. Protection by ebselen (PZ51) against galactosamine/ endotoxin-induced hepatitis in mice. *Biochem. Pharmacol.* 35, 2115-2118.
138. Whitehead, R.H., VanEeden, P.E., Noble, M.D., Ataliotis, P., and Jat, P.S. (1993) Establishment of conditionally immortalized epithelial cell lines from both colon and small intestine of adult  $H-2K^b$ -tsA58 transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 587-591.
139. Williams, D.A., Rosenblatt, M.F., Beier, D.R., and Cone, R.D. (1988) Generation of murine stromal cell lines supporting hematopoietic stem cell proliferation by use of recombinant retrovirus vectors encoding simian virus 40 large T antigen. *Mol. Cell. Biol.* 8, 3864-3871.
140. Yamashika, Y., Tabuchi, Y., and Kokue, E. (1994) Antisecretory effect of DS-4574, a mast cell stabilizer with peptidoleukotriene antagonism, on gastric acid secretion in the pig. *Agents Actions* 41, 17-20.
141. Yanai, N., Suzuki, M., and Obinata, M. (1991) Hepatocyte cell lines established from transgenic mice harboring temperature-sensitive simian virus 40 large T-antigen gene. *Exp. Cell Res.* 197, 50-56.
142. Yanai, N., Satoh, T., Kyo, S., Abe, K., Suzuki, M., and Obinata, M. (1991) A tubule cell line established from transgenic mice harboring temperature-sensitive simian virus 40 large T-antigen gene. *Jpn. J. Cancer Res.* 82, 1344-1348.
143. Yasuda, K., Watanabe, H., and Yamazaki, S. (1980) Glutathione peroxidase activity of D,L-selenocystine and selenocystamine. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 96, 243-249.
144. Zaret, K.S., DiPersio, C.M., Jackson, D.A., Montigny, W.J., and Weinstat, D.L. (1988) Conditional enhancement of liver-specific gene transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 9076-9080.







Inches 1 2 3 4 5 6 7 8  
cm 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19

# Kodak Color Control Patches

© Kodak, 2007 TM: Kodak



# Kodak Gray Scale



© Kodak, 2007 TM: Kodak