

インで、主に造血器に作用し巨核球、血小板増殖作用を有するが<sup>5)</sup>、最近になって放射線/化学療法後の腸炎<sup>6)</sup>などの消化管疾患のみならず放射線性肺臓炎<sup>7)</sup>、敗血症性ショック<sup>8)</sup>に対して予防的に投与すると死亡率や臓器障害が改善することが報告され、IL-10と同様に抗炎症作用があると考えられるようになった。本研究では、IL-11前投与により血中糜酵素値の上昇が抑制され、組織学的にも浮腫、炎症細胞浸潤、出血が有意に抑制された。また、膵炎により血中TNF- $\alpha$ レベルおよび膵内TNF- $\alpha$  mRNA量が増加したが、IL-11投与により血中、膵組織中のTNF- $\alpha$ の増加が抑制された。以上の結果よりIL-11の前投与は膵炎の重症化の予防に有効であり、その機序として膵組織中のTNF- $\alpha$  mRNA発現の抑制が関与していることが示唆された。今後、IL-11の後投与による治療効果や他の膵炎モデルにおける効果について検討を続ける予定である。

### 参 考 文 献

- 1) Norman J, Fink G, Franz M. Acute pancreatitis induced intrapancreatic tumor necrosis factor gene expression. *Arch Surg* 1995; 130: 966-70.
- 2) Hughes CB, Gaber LW, El-Din ABM, et al. Inhibition of TNF $\alpha$  improves survival in an experimental model of acute pancreatitis. *Am Surgeon* 1996; 62: 8-13.
- 3) Norman J, Franz M, Messina J, et al. Interleukin-1 receptor antagonist decreases severity of experimental acute pancreatitis. *Surgery* 1995; 117: 648-55.
- 4) Denham W, Yang J, Fink G, et al. Gene targeting demonstrates additive detrimental effect of interleukin 1 and tumor necrosis factor during pancreatitis. *Gastroenterology* 1997; 113: 1741-8.
- 5) Paul SR, Bettett F, Calvetti JA, et al. Molecular cloning of cDNA encoding interleukin-11, a stromal cell-derived lymphopoietic cytokine. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 7512-6.
- 6) Du XX, Doerschuk CM, Orazi A, et al. A bone marrow stromal-derived growth factor, interleukin-11, stimulates recovery of small intestinal mucosal cells after cytoablative therapy. *Blood* 1994; 83: 33-7.
- 7) Redlich CA, Gao X, Rockwell S, et al. IL-11 enhances survival and decreases TNF production after radiation-induced thoracic injury. *J Immunol* 1996; 157: 1705-10.
- 8) Barton BE, Shortall J, Jackson JV. Interleukin 6 and 11 protect mice from mortality in a staphylococcal enterotoxin-induced toxic shock model. *Infect Immunol* 1996; 64: 714-8.
- 9) van Leatherm JL, Marchant A, Delvaux A, et al. Interleukin 10 prevents necrosis in murine experimental acute pancreatitis. *Gastroenterology* 1995; 108: 1917-22.
- 10) Rongione AJ, Kusske AM, Kwan K, et al. Interleukin 10 reduces the severity of acute pancreatitis in rats. *Gastroenterology* 1997; 112: 960-7.

# 急性膵炎重症化機序の検討 —肺障害における好中球浸潤と 血管内皮細胞接着分子発現の意義—

研究報告者 馬場 忠雄  
滋賀医科大学第二内科

共同研究者 新谷 寛 五月女 隆 男 中村 文 泰  
奥村 嘉章 丹波 淳也

**要旨：**重症急性膵炎の致命率を決定する要因に multiple organ failure (MOF) の存在がある。特に、肺障害 (adult respiratory distress syndrome, ARDS) においては好中球 (PMN) の組織浸潤が重要な障害因子と考えられる。我々は、ラット CDL 膵炎における肺実質内 PMN 浸潤に対する serine protease inhibitor (Ulinastatin : UT, Gabexate mesilate : GM) との効果, 及び血管内皮細胞 (ヒト臍帯静脈由来, HUVEC) に対する PMN の adhesion 及び transendothelial migration に対する UT, GM の効果を検討した。ラット CDL 膵炎モデルにおける肺 PMN 浸潤は UT, GM により抑制された。炎症性サイトカイン (IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , IL-8) 刺激下の HUVEC に対する PMN の adhesion (IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$  刺激) や transendothelial migration (IL-8 刺激) は UT, GM の存在下で抑制された。また, UT, GM はサイトカイン刺激下の細胞表面接着分子 (ICAM-1, ELAM-1) の発現を抑制した。UT, GM は血管内皮細胞の炎症刺激による接着分子発現抑制に関与し, PMN の血管内皮への接着や血管外遊走を抑制するものと考えられた。

## 目 的

重症急性膵炎の予後を決定する要因の一つに急性肺障害 (adult respiratory distress syndrome, ARDS) がある。これは炎症反応により活性化された好中球 (PMN) が血管外に遊走し, 浸潤した組織において障害を惹起することが原因の一つと考えられており, SIRS (systemic inflammatory response syndrome) に見られる全身的な血管内皮の活性化が引き金になっていることが示唆されている。一方, 現在重症急性膵炎の治療には protease inhibitor などの薬剤が使用され, その有効性が報告されているが, その機序は未だ明確でない。我々は, PMN 浸潤における serine protease inhibitors (Ulinastatin : UT, Gabexate mesilate : GM) の効果を血管内皮細胞 (ヒト臍帯静脈由来, HUVEC) に対する PMN の adhesion 及び transendothelial migration の点より検討し, ラット CDL 膵炎モデルでの in vivo での効果も検討した。

## 方 法

### 1. *In vivo* study

#### (1) 実験モデル急性膵炎の肺病変に対する serine protease inhibitor の効果

Wistar 雄性ラットを用い Urethane 麻酔下に closed duodenal loop (CDL, 1 cm) 膵炎を作成する。頸静脈に catheter を挿入し, CDL 作成 1 時間後より infusion pump により UT (25000U/kg/h), GM (10mg/kg/h) で注入した。5 時間後に sacrifice し, 肺を摘出し, 組織学的及び myeloperoxidase (MPO) 活性を測定した。

### 2. *In vitro* study

#### (1) HUVEC 培養

ヒト 臍帯静脈より collagenase digestion により isolation し, endothelial cell growth factor 添加 10%FCS-RPMI1640 で培養を行った。

#### (2) PMN isolation 及び $^{51}\text{Cr}$ -labeling

健康成人の末梢血より採取し, Gallin et al.の方法で  $^{51}\text{Cr}$ -labeled sodium chromate により標識した。PMN の viability は, MTT assay と trypan blue exclusion test で評価した。

#### (3) Adherence assay 及び cell ELISA による接着分子測定

PMN の adherence assay は, 96-well culture plate に confluent の状態の HUVEC に UT, GM, を  $37^{\circ}\text{C}$ , 60min 作用させ, その後に IL- $1\beta$  (100U/ml), TNF $\alpha$  (100U/ml) と UT, GM を 4 時間 incubation した。

$^{51}\text{Cr}$ -labeled PMN と  $37^{\circ}\text{C}$ , 30min 培養し洗浄後の adherent cell を  $\gamma$ -counter で計測した。また, 同様の条件で 96-well culture plate で培養した HUVEC を ICAM-1, ELAM-1 の monoclonal antibody を用いて ELISA 法により測定した。

#### (4) PMN transendothelial migration

HUVEC を reconstituted basement membrane 処理した double chamber に播種し, UT, GM とともに前述した用量で 1 h incubation した。Lower chamber に IL-8 (50ng/ml) を添加し, 60min 後の lower chamber に migration した  $^{51}\text{Cr}$ -labeled PMN を測定した。

## 結 果

### 1. *In vivo* study

CDL 膵炎ラットにおいて, serine protease inhibitor (UT, GM) 処置群と無処置群では血清アミラーゼを含む膵の炎症所見に有意な差は見られなかったが, 肺組織中 MPO 活性には有意な差が認められた (Table 1)。また組織所見においても UT, GM 処置群では肺胞隔壁肥厚の軽減と好中球浸潤の抑制が認められた (Fig. 1)。

### 2. *In vitro* study

IL- $1\beta$  と TNF $\alpha$  により誘導された PMN-HUVEC adhesion は UT, GM 処置により抑制された。Adhesion に対する最大抑制率は, control 群に比して TNF $\alpha$  刺激群では 20%, IL- $1\beta$  刺激群では 31% であった (Fig. 2a, b)。

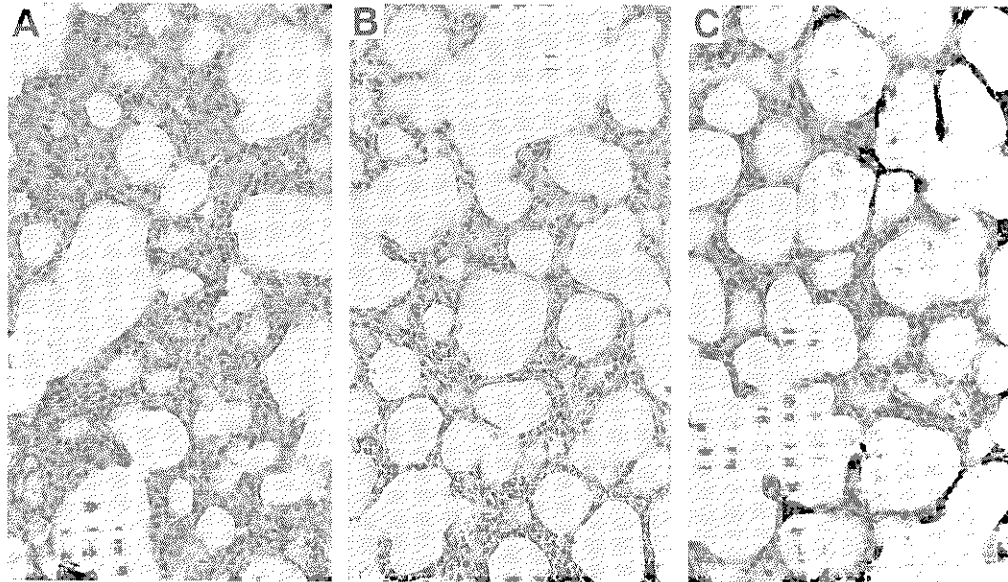
Cell ELISA 法による HUVEC 細胞表面の接着分子発現では, IL- $1\beta$  や TNF $\alpha$  による刺激で

**Table 1. Effects of ulinastatin and gadexate mesilate on CDL-induced pancreatitis**

	PWW (mg/100g BW)	LWW (mg/100g BW)	Serum amylase (IU/l)	MPO activity ( $\Delta A_{460}/\text{min}$ )
Simple laparotomy (sham-operated—no CDL; $n=4$ )	ND	ND	ND	$0.582 \pm 0.002$
Control ( $n=7$ )	$533.8 \pm 38.1$	$365.0 \pm 12.1$	$15945 \pm 2529$	$1.672 \pm 0.088^*$
Ulinastatin ( $n=9$ )	$513.5 \pm 32.8$	$340.2 \pm 8.7$	$16629 \pm 2818$	$1.060 \pm 0.042^{***}$
Gabexate mesilate ( $n=7$ )	$499.7 \pm 36.7$	$332.7 \pm 11.2$	$15260 \pm 1144$	$1.291 \pm 0.085^{**}$

Values are means  $\pm$  SEM. Stastical analys was carried out by one-way analysis of cariance (*ANOVA*) between groups for each parameter. Statistical significance was observed only for myeloperoxidase (*MPO*) activity ( $F=18.0$   $P<0.001$ ). Two-tailed student's t-test was performed to determine differences between two groups in MPO actively ( $*P<0.001$  compared with the simply laparotomized rats,  $**P<0.05$ ;  $***P<0.001$  compared with control rats)

*PWW*, Pancreases wet weight, *LWW*, lung wet weight; *ND*, not done

**Fig. 1** Histological findings of the lung

A: Control B: Ulinastatin

C: Gabexate mesilate H.E.,  $\times 200$

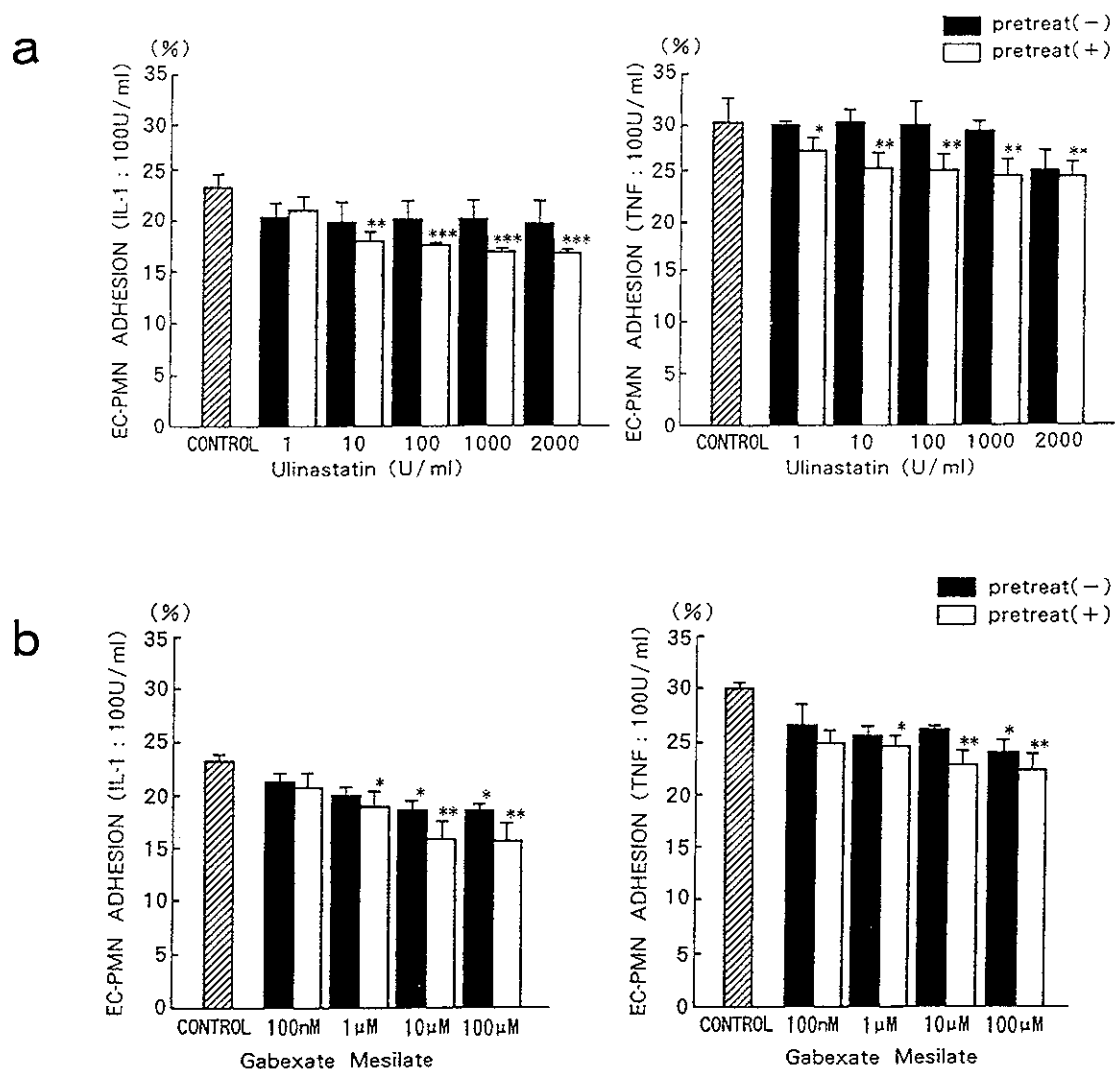


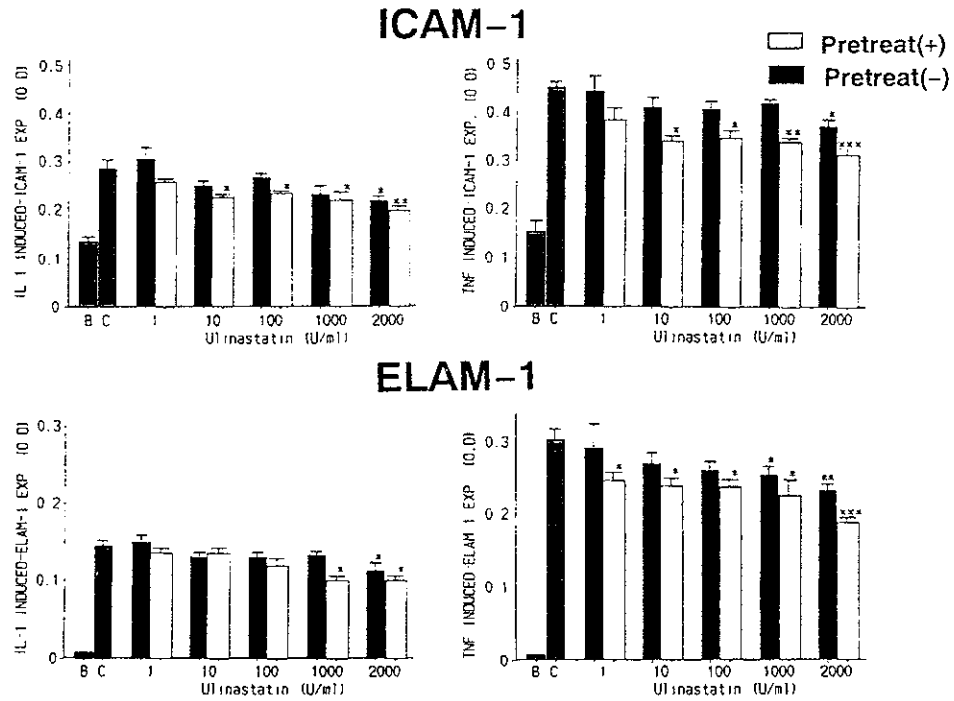
Fig. 2a, b Effect of serine protease inhibitors on PMN-HUVEC adhesion induced by IL-1 $\beta$  (left) and TNF $\alpha$  (right)

a: Ulinastatin (UT); b: Gabexate mesilate (GM). Pretreat (+), HUVEC preincubated with UT or GM, open columns; Pretreat (-), HUVEC preincubated without serine protease inhibitors, closed columns. Error bars represent mean  $\pm$  SEM (n = 4). All data were evaluated by two-tailed Student's t-test (\*P < 0.05, \*\*P < 0.01; \*\*\*P < 0.001 compared with control) following one-way ANOVA (P < 0.001 for each comparison)

HUVEC に誘導される ICAM-1, ELAM-1 は, control 群に比して有意に抑制され, 最大抑制率は30-40%であった (Fig. 3a, b)。

PMN の transendothelial migration の検討では, UT, GM の前処置により, IL-8 により誘導された PMN migration は抑制された。Control 群に対する最大抑制率は, UT 群で22%, GM 群で32%であった (Fig. 4a, b)。

a



b

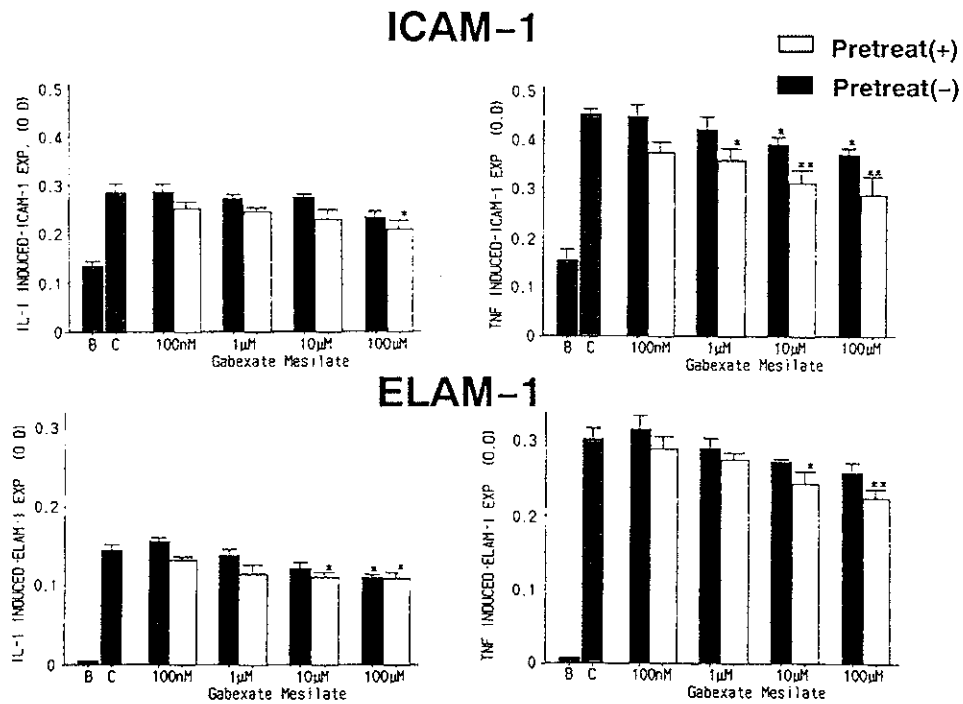


Fig. 3a, b Effects of serine protease inhibitors on the expression of ICAM-1 and ELAM-1 on HUVEC

a.Ulinastatin, UT; b.Gabexate mesilate, GM. B, basal expression; C, Control; Pretreat (+), HUVEC preincubated with UT or GM, open columns; Pretreat (-), HUVEC preincubated without serine protease inhibitors, closed columns. Error bars represent mean  $\pm$  SEM (n = 4). All data were evaluated by two-tailed Student's t-test (\*P < 0.05, \*\*P < 0.01; \*\*\*P < 0.001 compared with control) following one-way ANOVA (P < 0.001).

## 考 察

重症急性膵炎は、多臓器不全を合併する。中でも ARDS を含む肺障害は致命率を左右する重要な要因の一つである<sup>1)</sup>。重症急性膵炎に合併する肺障害では、肺組織中に血管外へ遊走した PMN の浸潤が認められる。MOF では Systemic inflammatory response syndrome (SIRS) に代表されるように全身的な血管内皮細胞の活性化と PMN 浸潤の関連が重要な因子となっている<sup>2)</sup>。これには、IL-1 $\beta$  や TNF $\alpha$  などの pro-inflammatory cytokines が重要な役割を担っているものと考えられている<sup>3,4)</sup>。

実験的重症膵炎であるラット CDL 膵炎では肺組織に著明な PMN 浸潤が認められた（肝や腎には認められない）。この肺組織への PMN 浸潤は GM や UT といった serine protease inhibitors によって抑制された。PMN の組織浸潤には血管内皮細胞への接着さらに血管外への遊走が必要である。*In vitro* の検討で、IL-1 $\beta$  や TNF $\alpha$  により刺激された血管内皮細胞 (HUVEC) において有意に PMN の adhesion が増強し、IL-8 刺激下での transendothelial migration が誘導されたが、serine protease inhibitor の作用によりこれらの効果は抑制された。この様な PMN 浸潤における抑制効果機序の一つとして ICAM-1, ELAM-1 という細胞接着分子の HUVEC の細胞表面での発現抑制であることが我々の検討で示された。血液中には  $\alpha$ 1-protease inhibitor や  $\alpha$ 2-macroglobulin などの内因性 protease inhibitors が存在するが、これらは PMN からの elastase や MPO により不活性化され、UT や GM 等

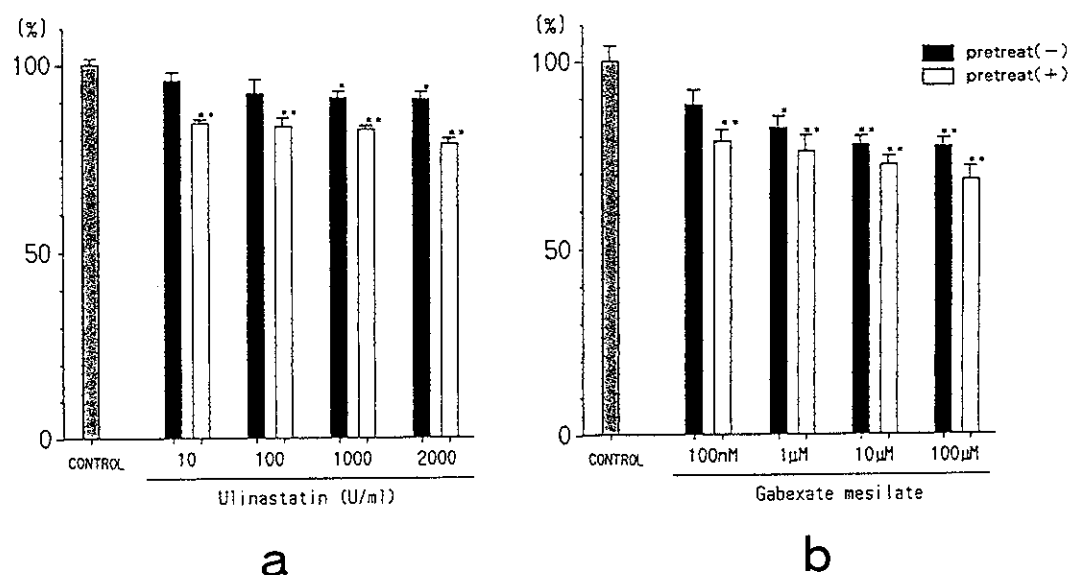


Fig. 4a, b Effects of serine protease inhibitors on transendothelial migration of PMN induced by IL-8

a.Ulinastatin, UT; b.Gabexate mesilate, GM. Pretreat (+), PMN preincubated with UT or GM, open columns; Pretreat (-), PMN preincubated without serine protease inhibitors, closed columns. Error bars represent mean  $\pm$  SEM (n = 4). All data were evaluated by two-tailed Student's t-test (\* P < 0.05, \*\*P < 0.01 compared with control) following one-way ANOVA (P < 0.001 for each comparison).

のように外因性に投与された serine protease inhibitors は不活化されないことが示されている<sup>5,6)</sup>。今回の結果より、重症肺炎における肺障害に対し serine protease inhibitors は有効であり、その機序の一つとして血管内皮細胞表面の接着分子発現抑制による PMN 接着、遊走抑制が関与していることが示唆された。重症急性肺炎における serine protease inhibitors の投与は、肺障害への進展抑制に効果が期待されるものと考えられる。

## 結 語

重症急性肺炎における肺障害の進展機序には、好中球と血管内皮細胞の interaction が関与しており、内皮細胞表面に表出される細胞接着因子が重要な役割を担っていることが示唆された。

## 参 考 文 献

- 1) Renner IG, Savage WT, Pantoja JL, et al. Death due to acute pancreatitis: a retrospective analysis of 405 autopsy case. *Dig Dis Sci* 1985; 30: 1005-18.
- 2) Donnelly SC, Hastlett C. Cellular mechanism of acute lung injury; implications for future treatment in the adult respiratory distress syndrome. *Thorax* 1992; 47: 260-3.
- 3) Gamble JR, Harlan JM, Klebanoff SJ, et al. Stimulation of adherence of neutrophils to umbilical vein endothelium by human recombinant tumor necrosis factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985; 82: 8667-71.
- 4) Goldbum SE, Choen DA, Gillespie MN, et al. Interleukin-1-induced granulocytopenia and pulmonary leukostasis in rabbits. *J Appl Physiol* 1987; 162: 122-8.
- 5) Weiss SJ, Curnutte JT, Regiani S. Neutrophil-mediated solubilization of the subendothelial matrix: oxidative and non-oxidative mechanisms of proteolysis used by normal and chronic granulomatous disease phagocytes. *J Immunol* 1986; 136: 636-41.
- 6) Horiuchi K, Kanayama N. Human urinary trypsin inhibitor exposed to oxidants produced by myeloperoxidase-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-chloride inhibits human neutrophil elastase. *Jpn J Pharmacol Ther* 1998; 16: 2007-12.



## 膵障害と炎症性サイトカイン

研究報告者 真 辺 忠 夫

名古屋市立大学第一外科

共同研究者 長谷川 正 光 竹 山 廣 光 高 山 宗 之

**要旨：**我々は、膵炎惹起のモデルとして膵液と血液を混和し、トリプシノーゲン活性化や、サイトカインの上昇への影響を検討し、併せて臨床検体でのサイトカイン値を測定した。血液を0.5% (V/V) 混和した膵液は直後より著明なトリプシン基質の分解亢進がみられたが、血液を0.5% (V/V) 混和した生食では分解を認めず、血漿0.5% (V/V) 混和した膵液でも活性の亢進は認めなかった。また膵液：血液を3：1に混和したものでは180分インキュベート後に炎症性サイトカインの産生が認められた。膵頭十二指腸切除後患者11例のうち MOF を起こした1例は早期より膵液中の炎症性サイトカインが高値であり、膵尾部切除後6カ月目に生じた膵仮性嚢胞液中のサイトカイン値も高値であった。

以上より膵局所の炎症性サイトカインは、膵障害の発生機序に早期より関与しているだけでなく、障害の持続に深く関与していることが考えられた。

### はじめに

膵炎の発生にはトリプシノーゲンの活性化が必須である。また膵炎の進展には炎症性サイトカインが重要な意味を持っている。しかしながら膵炎の発生に伴うトリプシノーゲンの活性化と炎症性サイトカイン上昇のメカニズムについては不明な点が多い。我々は、膵液と血液を混和し、トリプシノーゲン活性化や、サイトカインの上昇への影響を検討し、併せて臨床検体でのサイトカイン値を測定した。

### 研究方法

**実験材料：**膵液は術後1週間以上経過し、炎症症状を認めない状態の膵頭十二指腸切除患者より経膵管チューブにて採取した。血液は健常者より EDTA 採血した。

**臨床例の検討：**1995年5月より1996年7月まで当科で膵頭十二指腸切除術（幽門輪温存術式を含む）を受けた11例より経日的に採取された膵液を用いた。このうち1例は術後5日目までは SIRS の診断基準を満たしておらず順調な経過をたどっていたと考えられたが、術後9日目出血傾向を認め、術後10日目腹腔内膿瘍のため、再開腹し膵空腸再吻合を施行した MOF を発症した症例である。また1997年6月11日 mucinous cystadenoma にて膵体尾部切除後膵仮性嚢胞となった66歳男性患者に対して、同年12月17日および翌年1月8日の2回のドレナージ術施行時に得られた膵仮性嚢胞内容液を用いた。

### 測定方法

(a)トリプシン活性

200 $\mu$ l の膵液を用い0.5% (V/V) に血液を混合しトリプシン基質 Chromozym0.1%溶液50 $\mu$ l を加え

て、器質の分解によって生じた4-ニトロアニリンの吸光度の変化を405nmで測定した。

(b) サイトカイン

血液と膵液を1:3でインキュベート後、上清を分離し検体とした。膵液、囊胞液は、3000rpm、5分間遠心分離した上清を測定まで $-78^{\circ}\text{C}$ にて保存し検体とした。検体のIL-6、IL-8は東レ社製キットをIL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ はMEDGENIX社製キットを用いELISA法にて測定した。

## 結 果

### 実験的検討

- ①血液を0.5% (V/V) 混和した膵液は直後より著明なトリプシン基質の分解亢進がみられた。膵液単独ではきわめて低く、血液を0.5% (V/V) 混和した生食では分解を認めなかった。(Fig. 1)。
- ②血液に代えて血漿0.5% (V/V) 混和した膵液では活性の亢進は認めなかった (Fig. 2)。
- ③180分インキュベート後には測定したすべての炎症性サイトカインの産生が認められた (Fig. 3)。

### 臨床的検討

膵液中サイトカインの変化をMOF症例および膵囊胞穿刺液についてみると膵液中IL-6は術後1日

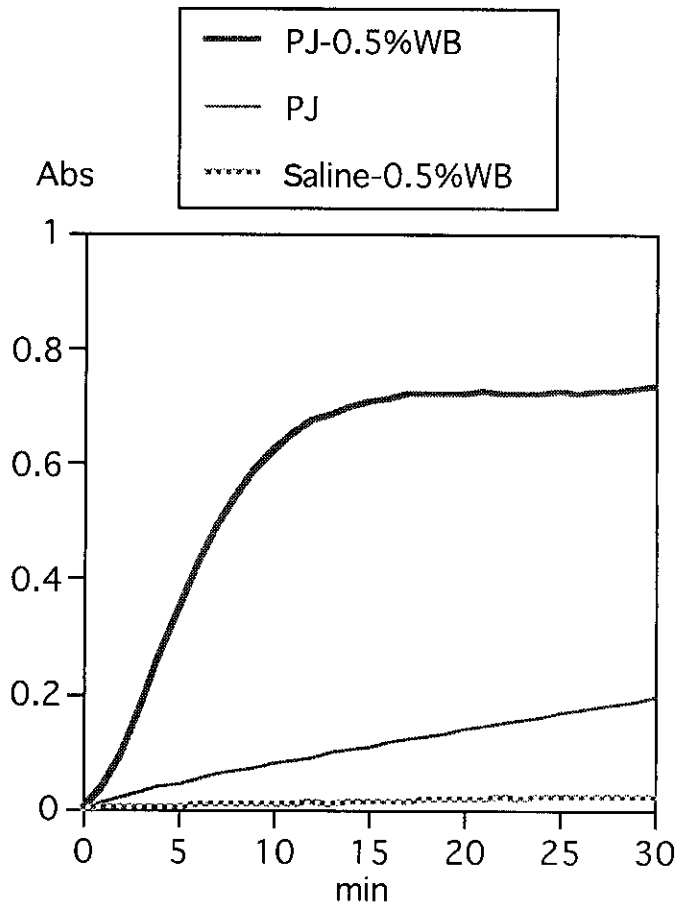


Fig. 1. Absorption change of trypsin substrate (1)  
 PJ-0.5% WB: pancreatic juice with (0.5%V/V) whole blood  
 PJ: pancreatic juice  
 Saine-0.5% WB: saline with (0.5%V/V) whole blood

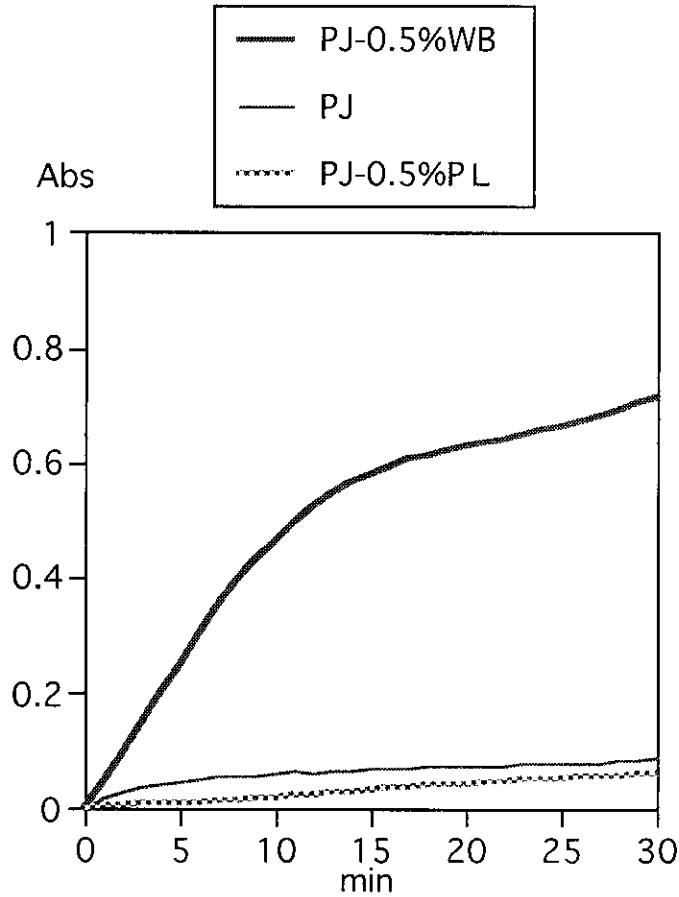


Fig. 2. Absorption change of trypsin substrate (2)  
 PJ-0.5% WB : pancreatic juice with (0.5%V/V) whole blood  
 PJ : pancreatic juice  
 PJ-0.5% PL : pancreatic juice with (0.5%V/V) plasma

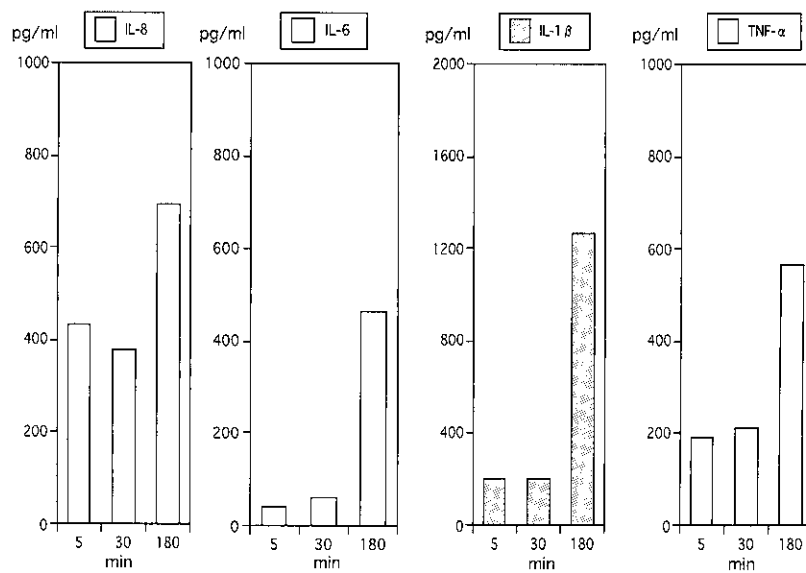


Fig. 3. Cytokine production after mixing of pancreatic juice with whole blood (25%V/V)

目に280pg/mlと他の平均9.8pg/mlに比し高値を示し漸減した。膵嚢胞液中では466pg/mlと420pg/mlであった(Fig. 4)。膵液中 IL-8 は術後1日目に3600pg/mlと他の平均600pg/mlに比し高値を示し漸減した。膵嚢胞液中では1920pg/mlと3860pg/mlであった(Fig. 5)。膵液中 TNF- $\alpha$  は術後1日目62pg/mlと他の平均6.2pg/mlに比しすでに高値を示し、術後5日目440pg/mlまで上昇を続け、以後減少した。膵嚢胞液中では24.6pg/mlと29.2pg/mlであった(Fig. 6)。膵液中 IL-1 $\beta$  は術後1日目に120pg/mlと他の平均4.2pg/mlに比し高値を示し漸減した。膵嚢胞液中では83.2pg/mlと0であった(Fig. 7)。

## 考 察

実験的検討から、膵液と血液が混和すると、(1)血球成分に依存してトリプシノーゲンが活性化され、(2)サイトカインが産生されることが明らかになった。

膵液中のサイトカインについては原田<sup>1)</sup>らが間欠期の慢性膵炎患者から内視鏡的純粋膵液採取法により採取した膵液中でIL-6が高値を示し、血液中IL-6との間に有意の相関をみたと報告している。彼らの報告によると膵液中IL-6は20pg/mlまでである。我々のMOF症例では術後1日目に280pg/mlと他症例の平均9.8pg/mlに比し高値を示していたが、慢性膵炎膵液に比しても非常に高値であると考えられた。また全身性疾患としての急性膵炎の重篤度を示す因子として、血中IL-6の有用性がLeser<sup>2)</sup>小川<sup>3)</sup>稲垣<sup>4)</sup>らによって示されている。我々のMOF症例においても血中IL-6は第1病日に117pg/mlを

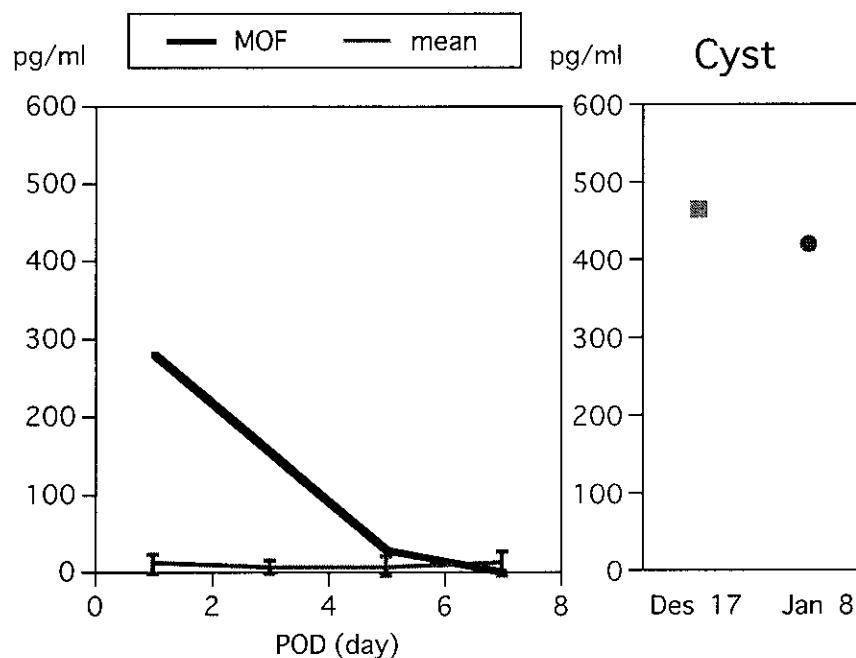


Fig. 4. Change of interleukin-6  
 comp.: complication case  
 mean: mean of other case  
 Dec 17 and Jan 8 mean intra cystic fluid

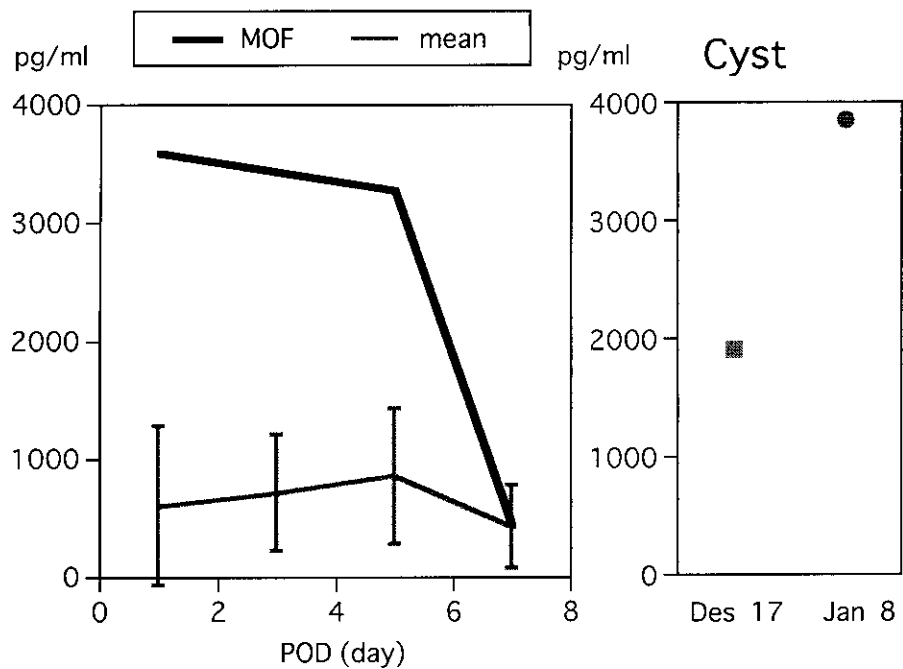


Fig. 5. Change of interleukin-8  
 comp.: complication case  
 mean: mean of other case  
 Dec 17 and Jan 8 mean intra cystic fluid

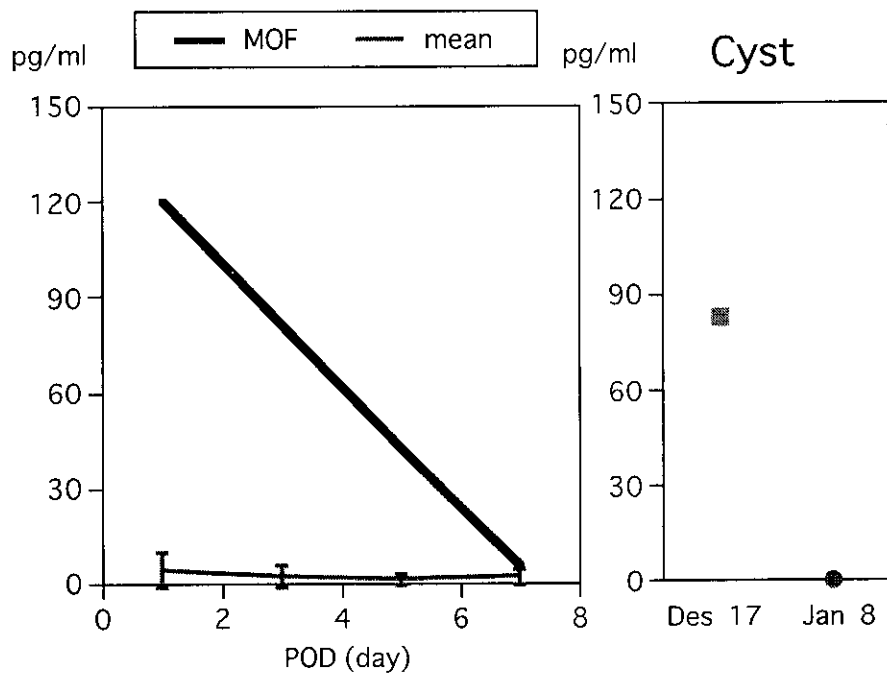


Fig. 6. Change of interleukin-1 $\beta$   
 comp.: complication case  
 mean: mean of other case  
 Dec 17 and Jan 8 mean intra cystic fluid

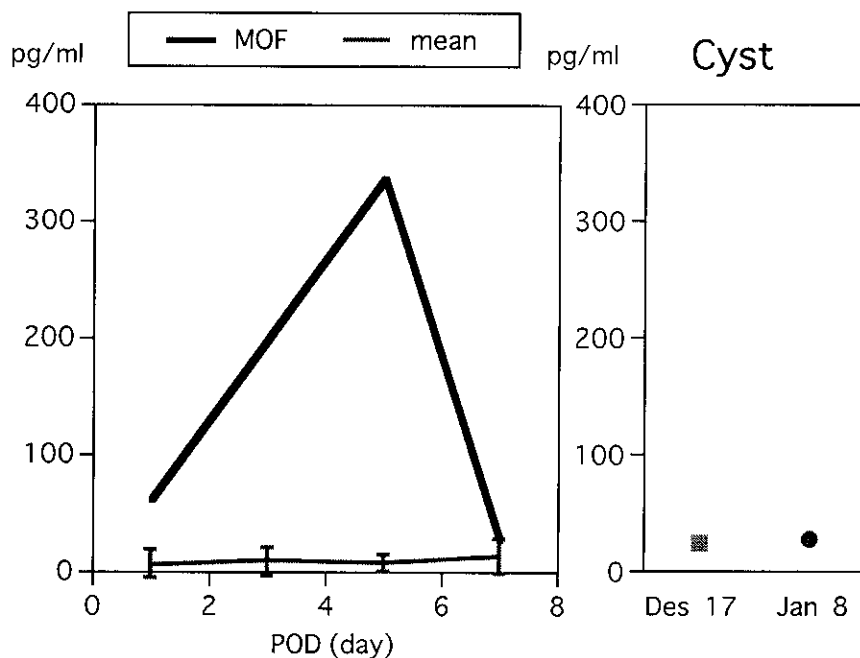


Fig. 7. Change of tumor necrosis factor- $\alpha$   
 comp.: complication case  
 mean: mean of other case  
 Dec 17 and Jan 8 mean intra cystic fluid

示したが、その後緩徐に減少し、第7病日に193pg/mlと再上昇した。このことは血中IL-6が変化する以前に膵液中のIL-6が大きく変動していたことを意味すると考えられる。また有症状の膵仮性嚢胞液中の炎症性サイトカインは我々のMOF症例と同程度で正常膵液に比して高値であった。Sacerdote<sup>5)</sup>は慢性関節リュウマチの関節液のIL-1, IL-6が、高崎<sup>6)</sup>は髄膜炎の脳脊髄液のIL-8が炎症の程度に応じて高値をとることを報告しており、炎症により膵仮性嚢胞液中の炎症性サイトカインが高値をとったと考えられた。

以上より膵局所の炎症性サイトカインは、膵障害に早期より関与しているだけでなく、障害の持続に深く関与していることが考えられた。

#### 参 考 文 献

- 1) 原田英雄, 越智浩二, 妹尾敏伸ほか. 慢性膵炎の病態と血中・膵液中サイトカイン. 厚生省特定疾患難治性膵疾患調査研究班平成6年度研究報告書. 1995: 158-61.
- 2) Leser HG, Gross V, Scheibenbogen C, et al. Elevation of serum interleukin-6 concentration precedes acute phase response and reflects severity in acute pancreatitis. *Gastroenterology* 1991; 101: 782.
- 3) 小川道雄. 急性膵炎の病態と重症化機序. *外科診療* 1994; 36: 1209-15.
- 4) Inagaki T, Hoshino M, Hayakawa T, et al. Interleukin-6 is a useful marker for early prediction of the severity of acute pancreatitis. *Pancreas* 1997; 14: 1-8.
- 5) Sacerdote P, Carrabba M, Galante A, Pisati R, Manfred B, Panerai AE. Plasma and synovial fluid interleukin-1, interleukin-6 and substance P concentrations in rheumatoid arthritis patients. *Inflamm Res* 1995; 44: 486-90.

- 6) 高崎二郎, 渡辺理砂, 板倉敬乃, 小川雄之亮. 髄液中インターロイキン8の測定. 小児感染免疫 1995;7: 223-5.

# 急性膵炎における Bacterial Translocation と腸管免疫能について

研究報告者 山本 正博

神戸大学第一外科

共同研究者 竹山 宜典 上田 隆 堀 裕一

**要旨：**重症急性膵炎における腸管免疫に着目し、急性膵炎時の bacterial translocation, エンドトキシン血症と腸管免疫の状態を解析した。ラット壊死性膵炎作成24時間後には、腸間膜リンパ節に全例に好気性菌の感染を認め、嫌気性菌の感染も高率に認めた。膵にも高率に感染を認め、bacterial translocation と考えられた。一方、腸管粘膜固有層のマクロファージは sham op. 群に比較して約35%まで減少していた。さらに、CD8 陽性細胞数と CD4 陽性細胞数はそれぞれ約70%、42%にまで減少していた。このことは bacterial translocation への腸管免疫の低下の関与を示唆する結果であり、今後この現象の急性膵炎における感染成立への意義と分子機構につき、更に解析を加える予定である。

## 背景と目的

重症急性膵炎の死因の多くが膵および膵周囲の壊死巣の感染に起因する後期の敗血症であり、本疾患における治療上の課題の一つに感染の制御があげられる。感染制御の対策として抗生物質の全身投与や膵局所への動注療法など抗生物質の予防的投与や、いわゆる bacterial translocation 対策としての selective digestive decontamination 等があげられる。一方、急性膵炎時には末梢リンパ球が減少することが報告されており<sup>1)</sup>、本疾患では細胞性免疫抑制状態にあることが示唆されている。

一方、腸管の固有粘膜層には T-リンパ球やマクロファージ等の免疫担当細胞が常在し、腸内細菌の腸管内腔からの侵入を防御していると考えられている。急性膵炎時にも bacterial translocation に対する防御機構として、腸管粘膜固有層の免疫担当細胞が機能している可能性がある。そこで本研究では、腸管免疫に着目し、急性膵炎時の bacterial translocation, エンドトキシン血症と腸管免疫の状態を解析した。

## 方法

### 1) 実験モデル

実験はすべて Wistar 系雄性ラット (250-300 g) を用い、胆膵管に 5% デオシコール酸を逆行性に注入して壊死性膵炎モデルを作成した。sham op. 群として単開腹群を作成し、膵炎作成24時間後に採血すると共に組織を採取して以下の解析に供した。

### 2) エンドトキシン血症と bacterial translocation の解析

膵炎作成24時間後の末梢血中のエンドトキシンを測定すると共に、腸間膜リンパ節と膵を無菌的に採取して、それぞれ好気性菌培養、嫌気性菌培養を行った。



### 3) 腸管粘膜固有層の免疫担当細胞の解析

膵炎作成24時間後に幽門輪から15cmの小腸を採取し、厚さ5  $\mu\text{m}$  の凍結切片を作成し、抗CD4抗体、抗CD8抗体、抗ED2抗体を用いてそれぞれ粘膜固有層のCD4陽性リンパ球、CD8陽性リンパ球、マクロファージを染色した。染色された各細胞の単位面積当たりの細胞数を計測し、膵炎群とsham op. 群を比較検討した。

## 結 果

Bacterial translocationの解析結果を図1に示す。単開腹を行ったsham op. 群では、24時間後にも腸間膜リンパ節、膵ともに感染は検出されなかった。一方、急性膵炎作成24時間後には、腸間膜リンパ節に全例に好気性菌の感染を認め、さらに嫌気性菌の感染も高率に認めた。また、膵炎群では24時間後にはすでに膵にも高率に感染を認める結果であった。この時期にはすでにエンドトキシン血症も認められ、図2に示すように膵炎群ではsham op. 群に比較して有意の末梢血中のエンドトキシンの上昇を認めた。

一方、腸管粘膜固有層のマクロファージはsham op. 群に比較して約35%まで減少していた。さらに、CD8陽性細胞数とCD4陽性細胞数はそれぞれ約70%、42%にまで減少しており、急性膵炎における腸管細胞性免疫の低下を示唆する結果であった。

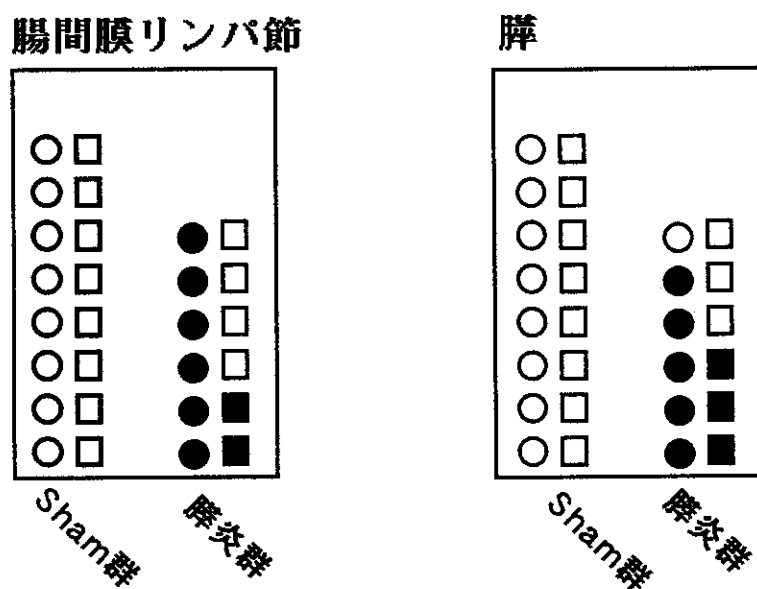


図1. 実験急性膵炎における24時間後の細菌感染

○；好気性菌陰性，●；好気性菌陽性  
□；嫌気性菌陰性，■；嫌気性菌陽性

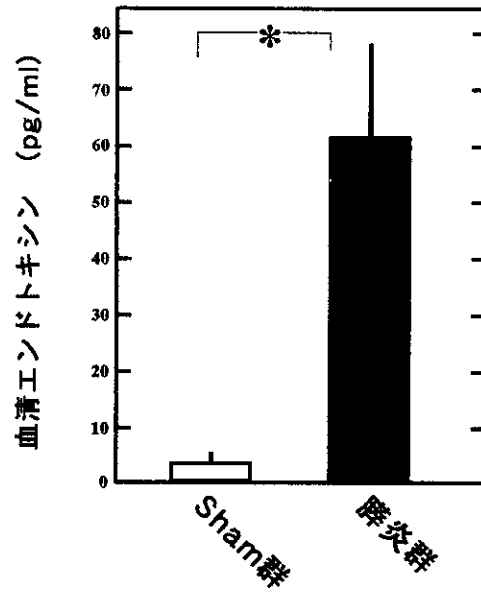


図2. 実験急性肺炎発症24時間後の血清エンドトキシン値  
Mean±SE. \* : p<0.01

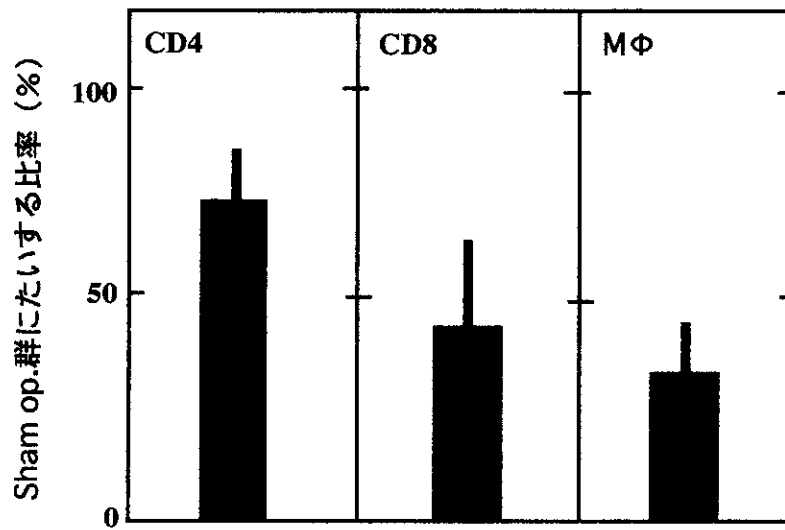


図3. 実験急性肺炎における空腸粘膜固有層の免疫担当の細胞の動態

## 考 察

重症急性膵炎では、発症早期の多臓器不全を乗り切っても発症後2週間以上経過して、膵または膵周囲後腹膜組織の壊死部分に感染を併発し、敗血症をきたして死に至る症例が少なくない。特に膵の壊死組織に感染をきたす、いわゆる感染性膵壊死は、壊死部切除を行っても極めて予後不良であり、重症急性膵炎の治療戦略においては感染をおこさせないことが最も肝要と考えられる。

急性膵炎では、感染源として bacterial translocation が想定される。bacterial translocation の発生機序としては、腸内細菌が併存する麻痺性イレウスのため異常繁殖すること、炎症の波及で腸管自体の透過性が亢進することなどが考えられるが、免疫抑制現象、特に細胞性免疫の低下の関与が想定される。実際、臨床例では重症度と末梢リンパ球の減少度が比例することが報告されており<sup>2)</sup>、急性膵炎時には細胞性免疫がリンパ球の数的減少という形で捕えられている。われわれも、重症急性膵炎モデルでは発症極早期から胸腺細胞のアポトーシスを介した胸腺萎縮が見られることを報告しており<sup>3)</sup>、重症急性膵炎では全身の免疫担当細胞に重大な変化がおこっていることが予想される。

今回の検討に使用した急性膵炎モデルでは、発症24時間後に高率に膵壊死部への感染を認めており、極めて重症度の高い感染性膵壊死のモデルと考えられる。同時に腸間膜リンパ節にはほぼ全例に感染が成立していることから、感染源は腸内細菌と考えられ、本モデルでは bacterial translocation が成立している。このような条件下で、小腸粘膜固有層の免疫担当細胞は全て減少をきたしており、特にマクロファージ、CD8 陽性 T リンパ球の減少が顕著であった。このことは、bacterial translocation への腸管免疫の低下の関与を示唆する結果であり、今後この現象の意義と分子機構につき、更に解析を加える予定である。

## 参 考 文 献

- 1) Antal L, Kawai M, Szabo G, et al. Immunological investigations in acute and chronic human pancreatitis. *Digestion* 1980; 20: 100-105.
- 2) Christophi C, McDermott F, Hughes ES. Prognostic significance of the absolute lymphocyte count in acute pancreatitis. *Am J Surg* 1985; 150: 295-6.
- 3) Takeyama Y, Nishikawa J, Ueda T, et al. Thymic atrophy caused by thymocyte apoptosis in experimental severe acute pancreatitis. *J Surg Res* 1998; 78: 97-102.

## II型 PLA<sub>2</sub>ノックアウトマウスにおける 急性膵炎重症化機序の検討

研究報告者 大 槻 眞  
産業医科大学第三内科

共同研究者 木 原 康 之 中 村 早 人 山 口 泰 三  
吉 川 裕 之

**要旨：**急性膵炎の重症化にII型ホスホリパーゼ A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) が関与していると考えられている。本研究では自然発症的にII型 PLA<sub>2</sub>がノックアウトされている C57BL/6J マウスに壊死性急性膵炎を作製し、急性膵炎の重症化に及ぼすII型 PLA<sub>2</sub>の関与を検討した。C57BL/6J マウスでは膵炎作製後早期の血清アミラーゼ活性が対照に比し有意に低値であったし、中期以後の膵腺房細胞の壊死脱落、空胞形成、炎症細胞浸潤が対照に比し軽度であった。さらに、C57BL/6J マウスの肺胞壁厚および肺胞洗浄液中の細胞数が対照に比し有意に低値であった。本研究の結果からII型 PLA<sub>2</sub>が急性膵炎の進展・増悪および遠隔臓器への炎症の波及に関与していると考えられた。

### 目 的

急性膵炎は良性疾患であるが、一度重症化すると膵周囲臓器だけではなく、遠隔主要臓器も障害され、呼吸不全、循環不全、腎不全や重症感染症、出血傾向など、様々な合併症をきたし多臓器不全の末、死の転帰をとることがあることから、救命率を高めるためには急性膵炎の重症化機序を解明しなければならない。敗血症あるいは多臓器不全患者のII型 PLA<sub>2</sub>活性が高値であることが知られている<sup>1)</sup>、壊死性急性膵炎患者ではII型 PLA<sub>2</sub>高値が持続<sup>2)</sup>、急性膵炎に呼吸不全あるいは腎不全を合併した場合にはII型 PLA<sub>2</sub>濃度が高値となることから<sup>3)</sup>、II型 PLA<sub>2</sub>は急性膵炎の重症化に重要な役割を果していると考えられる。

C57BL/6J マウスでは小腸粘膜にII型 PLA<sub>2</sub> mRNA の発現は認められないし、小腸内 PLA<sub>2</sub>活性が著明に低値であることから、C57BL/6J マウスはII型 PLA<sub>2</sub>が自然発症的にノックアウトされたマウスであると考えられている<sup>4)</sup>。本研究では急性膵炎の重症化におけるII型 PLA<sub>2</sub>の関与を明らかにするために、C57BL/6J マウスに実験的に壊死性急性膵炎を作製し、膵および肺の生化学的、組織学的変化を検討した。

### 方 法

雄性 C57BL/6J マウス (体重20-22g) にセルレイン (Cn) 50μg/kg体重を1時間毎に計7回腹腔内投与し、Cn 初回投与から6時間目に lipopolysaccharide (LPS) 30mg/kg体重を腹腔内投与して急性膵炎を作製した (Cn+LPS 膵炎)。対照としてII型 PLA<sub>2</sub>がノックアウトされていないことが確認され