

表 1. 嚢胞線維症診断基準

- 嚢胞線維症 (cystic fibrosis) は、全身の外分泌腺機能不全に基づく疾患であり、その特徴は、
- ① 膵と気道の粘液分泌腺に極めて粘稠な分泌液が産出され、膵管や気道を閉塞する、
  - ② 汗中へ過剰の電解質が失われる、ことにある。

以下の a.発汗試験の異常に加え、残り (b. c. d) の 3 項目中 2 項目以上を満たすものを嚢胞線維症と診断する。

#### a. 発汗試験の異常

ピロカルピンイオン導入法による汗試験で、60mEq/l 以上の汗中 Cl 濃度の高値が持続する。

#### b. 膵外分泌不全

大量頻回の悪臭を伴う脂肪便を伴うか、または PFD 試験 (BT - PABA 試験) における尿中 PABA 排泄率や便中キモトリプシン活性の低下がある。

#### c. 呼吸器症状

気道外分泌の異常のため、肺炎、気管支炎、無気肺を繰り返し、気管支拡張症、肺性心、趾端末端の肥大や樽状胸郭などが出現する。

#### d. その他

生後まもなく胎便性イレウスを起こすか、または嚢胞線維症の家族歴がある。

あり、正確な実態調査結果が得られることが期待される。

### 参 考 文 献

- 1) Durie PR. Cystic fibrosis. In: Feldman M, editor. Gastroenterology and hepatology. vol. 4: pediatric GI problems. Edinburgh: Churchill Livingstone, 1996: 444-63.
- 2) 旧代征記, 佐々木賢二. 本邦における嚢胞性線維症 (Cystic fibrosis) の遺伝子診断 - N1303K の変異解析 -. 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, 1994: 20-3.

表2. 調査個人票

囊胞線維症 調査個人票

No. [ ] - [ ] - [ ] - [ ] - [ ]

所在地:

施設名: \_\_\_\_\_ 記載者氏名: \_\_\_\_\_ 記載年月日: 2000年 月 日

この調査票は実態把握のためにのみ使用し、個人の秘密は厳守します。該当する番号を選択、またはご記入ください。

患者イニシャル (姓・名)	姓	名	性別	1. 男 2. 女	施設設 カルテ番号	
生年月日	(1. 昭和 2. 平成) 年 月 日		現在の年齢	歳 ヶ月		
患者現住所	都道府県・不明		血縁婚	1. なし 2. あり 3. 不明		
家系内発症	1. なし 2. あり [続柄: 1. 父 2. 母 3. 兄 4. 弟 5. 姉 6. 妹 7. その他( )] 3. 不明					
医療費の公費負担	1. なし 2. あり (a. 小児慢性特定疾患 b. その他: ) 3. 不明					
受療状況 (最近1年間)	1. 主に入院 2. 主に通院 3. 入院と通院 4. 転院(転院先: ) 5. 死亡 6. その他( ) 7. 不明					
入院回数	1. 施設( )回	2. 他施設( )回	3. 不明	推定発症年月	19( )年( )月・不明	
初診医療機関	1. 施設 2. 他施設 3. 不明			施設初診年月	19( )年( )月・不明	
診断した医療機関	1. 施設 2. 他施設 3. 不明			診断年月	19( )年( )月・不明	
診断基準を満たす項目	1. 発汗試験の異常 2. 尿外分泌不全 3. 呼吸器症状 4. 胎便性イレウス 5. 家族歴					
初発症状、徴候	1. 嘔吐 2. 腹部膨満 3. 直腸脱 4. 便秘 5. 脂肪便 6. 下痢 7. 発育障害 8. 黄疸 9. 上腹部痛 10. 腹部膨満触知 11. 肺炎 12. 糖尿病 13. 感冒症状 14. 呼吸器感染 15. 副鼻腔炎 16. 鼻ポリープ 17. 発汗過多 18. 脱水・ショック 19. 血液検査の異常 20. その他( ) 21. 不明					
症状・所見	胎便性イレウス	1. 胎便性イレウスあり 2. 胎便排泄遅延あり 3. なし 4. 不明				
	消化器症状・所見	1. 嘔吐 2. 腹部膨満 3. 直腸脱 4. 便秘 5. 脂肪便 6. 下痢 7. 黄疸 8. 上腹部痛 9. 腹部膨満触知 10. 腸閉塞 11. 肝臓病 12. 肺炎 13. 肺炎灰化 14. その他( )				
	呼吸器症状・所見	1. 感冒症状 2. 呼吸困難 3. 低酸素血症 4. 繰り返す呼吸器感染 5. 無気肺 6. 肺膿瘍 7. 肺炎腫 8. 気管支拡張症 9. 副鼻腔炎 10. 鼻ポリープ 11. パチ状指 12. その他( )				
その他	1. 低張性脱水 2. 発汗過多 3. 糖尿病 4. 発育不全 5. 不妊 6. 二次性徴の出現遅延 7. 心肥大 8. 樽状胸部 9. 骨関節症 10. 前頭洞の発育不全 11. けいれん 12. 血液検査の異常 13. その他( )					
検査	汗中電解質検査	1. 異常あり 2. 異常なし 3. 検査非施行 4. 不明 (検査施行例では方法、値をご記入ください。) 1. 方法 (a. ピロカルピンイオン導入法 b. 塩素電極法 c. Wescor社製発汗刺激装置および汗採取コイル法 d. 伝導法 e. ポリエチレンフィルム法 f. 人工温度室(サウナ)法 g. その他: ) 2. 施行時年齢: 歳 ヶ月 3. 結果①: Na mEq/L, Cl mEq/L 4. 結果②: Na mEq/L, Cl mEq/L				
	尿外分泌機能検査	1. 異常あり 2. 異常なし 3. 検査非施行 4. 不明 検査① 1. 方法 (a. セクレチン試験 b. バンクレオザイミンセクレチン(PS)試験 c. BT-PABA(PJD)試験 d. 便中キモトリプシン活性 e. 便中脂肪測定 f. 経口脂肪負荷試験 g. <sup>13</sup> C標識脂肪負荷試験 h. 血清酵素 i. その他: ) 2. 結果: 3. 施行時年齢: 歳 ヶ月				
	検査②	1. 方法 (a. セクレチン試験 b. バンクレオザイミンセクレチン(PS)試験 c. BT-PABA(PJD)試験 d. 便中キモトリプシン活性 e. 便中脂肪測定 f. 経口脂肪負荷試験 g. <sup>13</sup> C標識脂肪負荷試験 h. 血清酵素 i. その他: ) 2. 結果: 3. 施行時年齢: 歳 ヶ月				
	組織検査	1. 生検あり 2. 生検なし 3. 不明 生検ありの場合 1. 施行時年齢: 歳 ヶ月 2. 施行部位: a. 脾 b. 肝・胆道 c. 消化管 d. 気管支・肺 e. 唾液腺 f. 皮膚 g. その他( )				
所見	遺伝子診断	1. 施行あり 2. 施行なし 3. 不明				
	(検査施行例では方法、結果をご記入ください。)	1. 方法: 2. 施行時年齢: 歳 ヶ月 3. 結果: 本研究では囊胞線維症の遺伝子診断が可能です。本邦の囊胞線維症の実態を明らかにするためには遺伝子診断の実施が必要と考えられることから、遺伝子診断を計画しております。同診断についてご記入下さい。 1. 諸 2. 詳細について知りたい。 3. 否				
	喀痰培養	1. 施行あり 2. 施行なし 3. 不明 起炎菌: a. Staphylococcus aureus (MSSA) b. MRSA c. Pseudomonas aeruginosa d. Haemophilus influenzae e. Proteus vulgaris f. Candida albicans g. その他( )				
治療	1. 薬物療法:	a. 抗細菌薬 b. 抗真菌薬 c. 去痰薬 d. 気管支拡張薬 e. 酵素製剤 f. プロテアーゼインヒビター g. その他( )				
	2. 理学療法:	a. 入院中 b. 在宅療法				
	3. 薬物投与:	a. 入院中 b. 在宅療法 c. 脂溶性ビタミン d. 経腸栄養 e. 中心静脈栄養 f. その他( )				
	4. 栄養療法:	a. 入院中 b. 在宅療法 c. 脂溶性ビタミン d. 経腸栄養 e. 中心静脈栄養 f. その他( )				
	5. 手術:	方法: a. 胎便摘除術 b. 腸切除術 c. 腸造設術 d. 鼻ポリープ摘除術 e. その他: 施行時年齢: 歳 ヶ月				
	6. 遺伝子治療:	方法: ( )、施行時年齢( )歳 ヶ月				
	7. その他の特記すべき治療:	方法: ( )、施行時年齢( )歳 ヶ月				
	8. 不明					
症例報告の有無	1. 学会発表あり 2. 紙上发表あり 3. なし 4. 不明					
	ありの場合	a. 学会名: ( )年( )巻( )頁 b. 雑誌名: ( )年( )巻( )頁				
現在の状況 (最終診察時) ・診断時と比較	1. 治癒 2. 改善* 3. 不変* 4. 悪化* 5. 死亡			最終診察日: ( )年( )月		
	死亡の場合	1. 死亡年月日: ( )年( )月( )日 2. 死亡年齢: 歳 ヶ月 3. 前因: a. なし b. あり c. 不明 4. 死因: a. 多臓器不全 b. 呼吸不全 c. 心不全 d. 敗血症 e. ショック f. 胎便性イレウス g. その他( ) h. 不明				

## 本邦の腭嚢胞性線維症における CFTR 遺伝子異常 — 文献報告例の集計 —

西 森 功

高知医科大学第一内科

田 代 征 記

徳島大学第一外科

衛 藤 義 勝

東京慈恵会医科大学小児科

山 城 雄 一 郎

順天堂大学小児科

吉 村 邦 彦

東京慈恵会医科大学 DNA 医学研究所

小 川 道 雄

熊本大学第二外科

**要約：**平成6年度の本研究班の全国調査による腭嚢胞性線維症の確診29例に、文献検索により新たに5症例の確診例を加え、これら症例のCFTR 遺伝子異常についてまとめた。平成6年度までの症例ではCFTR 遺伝子異常は同定されていない。遺伝子解析技術の進歩に伴い、新たに追加した5症例ではなんらかの遺伝子異常が検出されている。このうち  $\Delta F508/R347H+D979A$  の双子例では、 $\Delta F508$  はドイツ人の父親由来のものであり、他に同定された遺伝子異常は稀なものが多かった。以上より、本邦のCFTR 遺伝子異常は欧米のそれとは大きく異なり、より系統的および包括的なスクリーニングシステムの構築が必要と考えられた。

### はじめに

嚢胞性線維症 (cystic fibrosis ; CF) は白人に高頻度にみられる常染色体劣性の遺伝性疾患である<sup>1)</sup>。主として消化器と呼吸器に症状を呈し、85%の患者で腭機能不全がみられる。CF の疾患遺伝子は cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) と呼ばれる Cl イオンチャンネルであり、欧米の CF 患者では500以上の遺伝子変異が報告されている。この中で508番目の phenylalanine をコードする3塩基対の欠失 ( $\Delta F508$ ) は、地域差はあるものの、約70%の患者に認められる<sup>1)</sup>。

厚生省特定疾患—難治性腭疾患研究班では昭和57年より本邦における CF 症例の全国調査を行い、現在まで29例の確診例を報告した<sup>2)</sup>。同研究班では遺伝子サンプルの得られた症例において、上記の  $\Delta F508$  (exon 10) をはじめ、白人の CF 患者で頻度の高い G542X, G551D, R553X (exon 11) および N1303K (exon 21) の CFTR 遺伝子異常について検討した<sup>2,3)</sup>。さらに、CFTR 蛋白において機能的に重要である exon 10, 11, 20, 21 について polymerase chain reaction-single stranded conformational polymorphism (PCR-SSCP) 法を用いたスクリーニングを行った<sup>4)</sup>。しかし、現在まで遺伝子異常は同定されておらず、本邦の CF 症例における CFTR 遺伝子異常は白人と比較して大きく異なると考えられている。本研究では最近報告が散見されるようになった本邦の CF 症例の CFTR 遺伝子異常をまとめ、本研究班のこれまでの遺伝子解析結果と併せ検討した。

### 方法と結果

平成6年度の本研究班報告による本邦の CF 確診29例に、文献検索により新たに5症例の CF 確診例

を加え臨床像をまとめた<sup>5-8)</sup> (表1)。これらの症例のうち germ line の遺伝子異常の可能性が高いと考えられる「家族歴のある症例」は5家系8症例であった。

これら34症例の中で、CFTR 遺伝子異常の検索が行われた10症例について、その解析結果を表2にまとめた。解析方法は基本的に PCR-SSCP 法が用いられており、欧米の CF 症例で頻度の高い特定の遺伝子異常の検討には mismatched PCR-RE (restriction enzyme) 法、あるいは PCR-PAGE 法が用いられていた。

本研究班報告により集計された CF 確診29例のうち CFTR 遺伝子異常の解析が行われた5例では、機能的に重要であり、また欧米で遺伝子異常頻度の高い nucleotide binding fold 領域をコードする exon 10, 11, 20, 21 に遺伝子異常は確認されていない<sup>9)</sup>。また、これらの exon に存在し、遺伝子異常頻度の高い  $\Delta F508$  (exon 10), G542X, G551D, R553X (以上, exon 11), N1303K (exon 21) などの特定の遺伝子異常も認められていない<sup>2,3)</sup>。

一方、今回新たに文献検索により追加した4家系、5症例(うち1家系は双子例)においては表2に示したようななんらかの遺伝子異常が報告されている。症例31については、3'側で stop codon を生じる 1742Del10 (exon 11) が認められているが、同一症例で認められた intron 9 の 1525-18GtoA は正常遺伝子多型と考えられる<sup>9)</sup>。この症例では exon 10, 11 とその近傍 intron の解析のみであり、さらに領域を広めた検討が必要である。また、双子例である症例33, 34では、一方の allele の遺伝子異常である  $\Delta F508$  はドイツ人の父由来のものであり、母親である日本人に認められた遺伝子異常は R347H + D979A であった<sup>9)</sup>。

## 考 察

今回の文献的検討にて初めて CFTR 遺伝子異常を持つ日本人の CF 症例がみつかった。最近まで本邦では heterozygote を含め、CFTR の遺伝子異常はみつかっていなかった。今回検索し得た報告はいずれも1998年以降のものであり、これは PCR-SSCP 法をはじめとする検索方法の進歩に依るところが大きいものと考えられる。日本人でも CFTR 遺伝子異常がみつかったことは、我が国においても積極的に同遺伝子異常を検討する必要性を指し示すものである。

今回、まとめた遺伝子異常はいずれも欧米の CF 症例では稀な遺伝子異常であり、昨年度まで報告してきたように、本邦の CFTR 遺伝子異常は欧米のそれと比較して大きくなることが予想される。本研究班の全国調査により集計された29症例では、限られた Exon でのみ遺伝子検索が行われており、今後より包括的、系統的なスクリーニングシステムの構築が必要と考えられた。

## 結 語

- (1) 文献的検索により、本邦 CF 症例における CFTR 遺伝子異常が初めて明らかとなり、本研究班での遺伝子異常検索結果と併せて報告した。
- (2) 本邦の CF 症例において CFTR の遺伝子異常が同定されたことは、積極的に同遺伝子異常を検討する必要性を示す。
- (3) 現在まで報告と同様、本邦の CF 症例における CFTR 遺伝子異常は欧米のそれと比較して大きく異なることが予想され、今後はより包括的、系統的な遺伝子検索が必要と考えられた。

表 1. 本邦における嚢胞性線維症確診例

症例	性	発症 (診断) 年齢	家族歴	消化器 症状	呼吸器 症状	汗Cl (mEq/L)	腺外分泌 機能
1	F	1日	-	+(ileus)	+	154.6	↓
2	F	1日	+	+(ileus)	+	90	↓
3	M	1日	-	+(ileus)	+	100	-
4	F	1日	-	+(ileus)	+	60	↓
5	F	1歳	-	+	+	60	↓
6	M	9歳	-	+	+	High level	-
7	M	1日	-	+(ileus)	+	60	-
8	F	2歳	-	+	+	88	→
9	F	6ヶ月	-	+	+	92	↓
10	F	1ヶ月	-	+	+	126	↓
11	F	3歳	-	+	+	100	→
12	F	4ヶ月	-	+	+	103	↓
13	M	4ヶ月	-	+	+	1102	↓
14	M	6ヶ月	+	+	+	88	↓
15	F	1ヶ月	+	+	+	126	↓
16	M	4ヶ月	+	+	+	131	↓
17	F	0歳	+	+(ileus)	+	144	-
18	M	1ヶ月	-	+	+	126	↓
19	M	15歳	?	+	+	99.1	↓
20	M	0歳	-	+(ileus)	+	96	↓
21	F	7ヶ月	?	+	+	117.2	↓
22	F	3ヶ月	+	+	+	131	↓
23	F	6ヶ月	-	+	+	123	↓
24	M	7ヶ月	-	+	+	120	-
25	M	1ヶ月	-	+	+	97.8	↓
26	M	3ヶ月	-	+	+	96	↓
27	M	2日	-	+	+	64	-
28	M	8ヶ月	-	+	+	126	-
29	F	16歳	-	+	+	72	↓
30	F	?	-	+(ileus)	+	126	↓
31	M	3日	-	+(ileus)	+	153	↓
32	F	1歳	-	+(ileus)	+	201	?
33	F	1歳	+	+(ileus)	+	96	↓
34	F	6歳	+	+	+	102	↓

表 2. 本邦の囊胞性線維症における CFTR 遺伝子異常の検索 (PCR-SSCP 法)

症例	Exon 4	Exon 7	Exon 10	Exon 11	Exon 16	Exon 17b	Exon 20	Exon 21	reference
4	-	-	wt <sup>1</sup>	wt <sup>2</sup>	-	-	wt	wt <sup>3</sup>	2-4
23	-	-	wt <sup>1</sup>	wt <sup>2</sup>	-	-	wt	wt <sup>3</sup>	2-4
27	-	-	wt <sup>1</sup>	wt <sup>2</sup>	-	-	wt	wt <sup>3</sup>	2-4
28	-	-	wt <sup>1</sup>	wt <sup>2</sup>	-	-	wt	wt <sup>3</sup>	2-4
29	-	-	wt <sup>1</sup>	wt <sup>2</sup>	-	-	wt	wt <sup>3</sup>	2-4
30	N152R	wt	1541del10	wt	wt	wt	wt	wt	5
31 <sup>4</sup>	-	-	wt <sup>5</sup>	1742delAC	-	-	-	-	6
32	wt	wt	wt	wt	wt	homozygous H1035R	wt	wt	7
33	wt	R347H	ΔF508 <sup>6</sup>	wt	D979A	wt	wt	wt	8
34	wt	R347H	ΔF508 <sup>6</sup>	wt	D979A	wt	wt	wt	8

- , not done; wt, wild type, <sup>1</sup>PCR-PAGE法によるΔF508検索を含む、<sup>2</sup>mismatched PCR-RE法によるG542X, G551D, R553X検索を含む、<sup>3</sup>mismatched PCR-RE法によるN1303K検索を含む、<sup>4</sup>一方のalleleにおける変異は不明、<sup>5</sup>PCR直接シーケンス、<sup>6</sup>ドイツ人の父親由来 N152R, R347H, D979A, H1035R: missense; 1541del10, appearance of premature stop codon; 1742delAC, frame shift; ΔF508, deletion

## 参 考 文 献

- 1) Durie PR. Cystic fibrosis. In: Feldman M, editor. Gastroenterology and hepatology volume 4 : Pediatric GI problems. Edinburgh: Churchill Livingstone PA, 1996 : 444-63.
- 2) 田代征記, 佐々木賢二. 本邦における肺嚢胞性線維症 (Cystic fibrosis) の遺伝子診断—N1303K の変異解析—. 厚生省特定疾患難治性肺疾患調査研究班平成 6 年度研究報告書, 1994 : 20-3.
- 3) 國友一史, 佐々木賢二. 本邦における肺嚢胞性線維症 (Cystic fibrosis) の遺伝子診断:  $\Delta F508$ , G542X, G551D, R553X の変異解析. 厚生省特定疾患難治性肺疾患調査研究班平成 5 年度研究報告書, 1993 : 39-42.
- 4) 田代征記, 佐々木賢二. 本邦における肺嚢胞性線維症 (Cystic fibrosis) の遺伝子診断. 厚生省特定疾患難治性肺疾患調査研究班平成 7 年度研究報告書, 1995 : 37-9.
- 5) Yoshimura K. Cystic fibrosis mutation data base ([www.genet.sickkids.on.ca/cftr](http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr)) 1999.
- 6) Seki K, Abo W, Yamamoto, Matsuura A. Identification of novel mutations of the CFTR gene in a Japanese patient with cystic fibrosis. *Tohoku J Exp Med* 1999 ; 188 : 323-8.
- 7) Yoshimura K. A Japanese patient homozygous for the H1085R mutation in the CFTR gene presents with a severe form of cystic fibrosis. *Clin Genet* 1999 ; 56 : 173-5.
- 6) Hojo S, Fujita J, Miyawaki H, Obayashi Y, Takahara J, Batholomew DW. Severe cystic fibrosis associated with a  $\Delta F508/R347H+D979A$  compound heterozygous genotype. *Clin Genet* 1998 ; 53 : 50-3.

# 各個研究 I

## — 急性膝炎 —



## 実験急性膵炎における内分泌障害の機序

研究報告者 跡見 裕  
杏林大学第一外科

共同研究者 杉山 政則 中島 正暢 阿部 展次

**要旨：【目的】**ラットタウロコール酸膵炎モデルを用いて膵の内分泌細胞の機能変化を解析し、急性膵炎における内分泌動態を解明する。

**【対象と方法】**Wistar系ラットにおいてタウロコール酸（TC）を膵管内投与し膵炎を作製した。1% TC投与後1時間で膵を摘出、凍結切片を作製し GLUT2 モノクロナール抗体を用いて免疫組織学的検討を行い GLUT2 発現に関する検討を行った。内分泌細胞の機能変化を解析するための *in vitro* 実験系として、摘出した膵より islet を単離し、グルコース刺激によるインスリン分泌能を検討した。

**【結果】**1%TC 0.2ml膵管内投与により、膵は著明な浮腫をきたした。HE染色による病理組織学的検索では、急性浮腫性膵炎の所見であった。血液生化学的検査結果により、血清アミラーゼ、リパーゼ、血糖は有意に高値を示しており、急性浮腫性膵炎初期においても耐糖能障害が惹起されるものと考えられた。単離 islet におけるグルコース刺激によるインスリン分泌能をみると、3.3mmol/l の低濃度グルコース刺激では、コントロール群におけるインスリン濃度は $1.21 \pm 0.69 \text{ ng/islet/hour}$ であったのに対し、膵炎群は $0.46 \pm 0.14 \text{ ng/islet/hour}$ と有意に低下していた。また16.7mmol/l の高濃度グルコース刺激におけるインスリン濃度は、コントロール群 $3.08 \pm 1.41 \text{ ng/islet/hour}$ 、膵炎群 $1.3 \pm 0.43 \text{ ng/islet/hour}$ であり、膵炎群でインスリン濃度は有意に低下していた。islet における GLUT2 発現に関する検討では、コントロール群、膵炎群ともに GLUT2 は islet cell の細胞膜においてびまん性に発現を認め、両群間に差は認められなかった。

**【結語】**急性膵炎で認められる耐糖能低下はインスリン分泌能の機能異常が一つの原因として考えられ、インスリンシグナル伝達系に何らかの障害が生じている可能性が考えられた。

### はじめに

重症急性膵炎では耐糖能障害を併発し、高血糖に起因すると思われる様々な病態の把握や治療に難渋することがある。急性膵炎時にみられる耐糖能低下は、膵局所の問題として膵外分泌機能の変化とともに、インスリン分泌能をはじめとする内分泌機能変化が惹起されることがその原因のひとつとして考えられているが<sup>1)</sup>、この急性膵炎病態下における内分泌機能の変化に関する詳細な実験的検討の報告は極めて少ない。今回、急性膵炎における内分泌動態を解明することを目的とし、ラットタウロコール酸膵炎モデル<sup>2)</sup>を用いて内分泌細胞の機能変化を解析するとともに、インスリン分泌シグナル伝達過程においてグルコース刺激の認識に重要な役割を担っている glucose transporter protein (GLUT2)<sup>3)</sup>の発現を検討した。

## 対象と方法

体重200 g前後のWistar系ラットをpentobarbital (0.8ml/kg腹腔内投与) 麻酔下で開腹し、膵管にカニューレーション後、1%タウロコール酸 (TC) 0.2mlを膵管内投与し膵炎を作製した。1%TC投与後1時間で下大動脈より血液を採取、膵を摘出した。血液生化学的検査 (白血球数, 血清アミラーゼ, 血清リパーゼ, 血糖) およびHE染色による膵の病理組織学的検索を行った。また、凍結切片を作製し GLUT2 モノクロナール抗体 (Univ. of Texas, Dr. J. H. Johnson より供与) を用いて免疫組織科学的検討を行い<sup>4)</sup>, GLUT2 発現に関する検討を行った。内分泌細胞の機能変化を解析するための in vitro 実験系として, Nagamatsu らの方法<sup>5)</sup> に従い, 摘出した膵よりコラゲネースを用いて islet を単離し, グルコース刺激によるインスリン分泌能を検討した。インスリン濃度の測定はモルモットを免疫して得られた抗体を用いて radioimmunoassay 法により行った<sup>5)</sup>。統計処理は Mann-Whitney test を用いて  $p < 0.05$  を有意差ありとした。

## 結 果

1%TC 0.2ml膵管内投与により, 膵は著明な浮腫をきたした。HE染色による病理組織学的検索では, 膵組織に軽度の炎症細胞の浸潤を伴った間質浮腫を認めたが, 膵壊死や出血などの所見は認めず, 急性浮腫性膵炎の所見であった (図1, A, B)。

血液生化学的検査結果を表1にまとめた。白血球はコントロール群と比べ有意な上昇は認められなかったが, 血清アミラーゼ, 血清リパーゼ, 血糖は有意に高値を示しており, 急性浮腫性膵炎初期においても耐糖能障害が惹起されるものと考えられた。

単離 islet におけるグルコース刺激によるインスリン分泌能をみると, 3.3mmol/l の低濃度グルコース刺激では, コントロール群におけるインスリン濃度は  $1.21 \pm 0.69 \text{ ng/islet/hour}$  であったのに対し, 膵炎群は  $0.46 \pm 0.14 \text{ ng/islet/hour}$  と有意に低下していた。また 16.7mmol/l の高濃度グルコース刺激におけるインスリン濃度は, コントロール群  $3.08 \pm 1.41 \text{ ng/islet/hour}$ , 膵炎群  $1.3 \pm 0.43 \text{ ng/islet/hour}$  であり, 膵炎群でインスリン濃度は有意に低下していた。(図2)。

表1. 血液生化学検査

	WBC	Amylase	Lipase	Glucose (mg/dl)
control (n=8)	4437.5±728.9	4953.7±322.8	12.1±4	140.9±24.5
1%TC (n=8)	4400±624.5	8547.5±492.9	626±230.6	210.3±41.4
p	ns	0.0066	0.0066	0.01

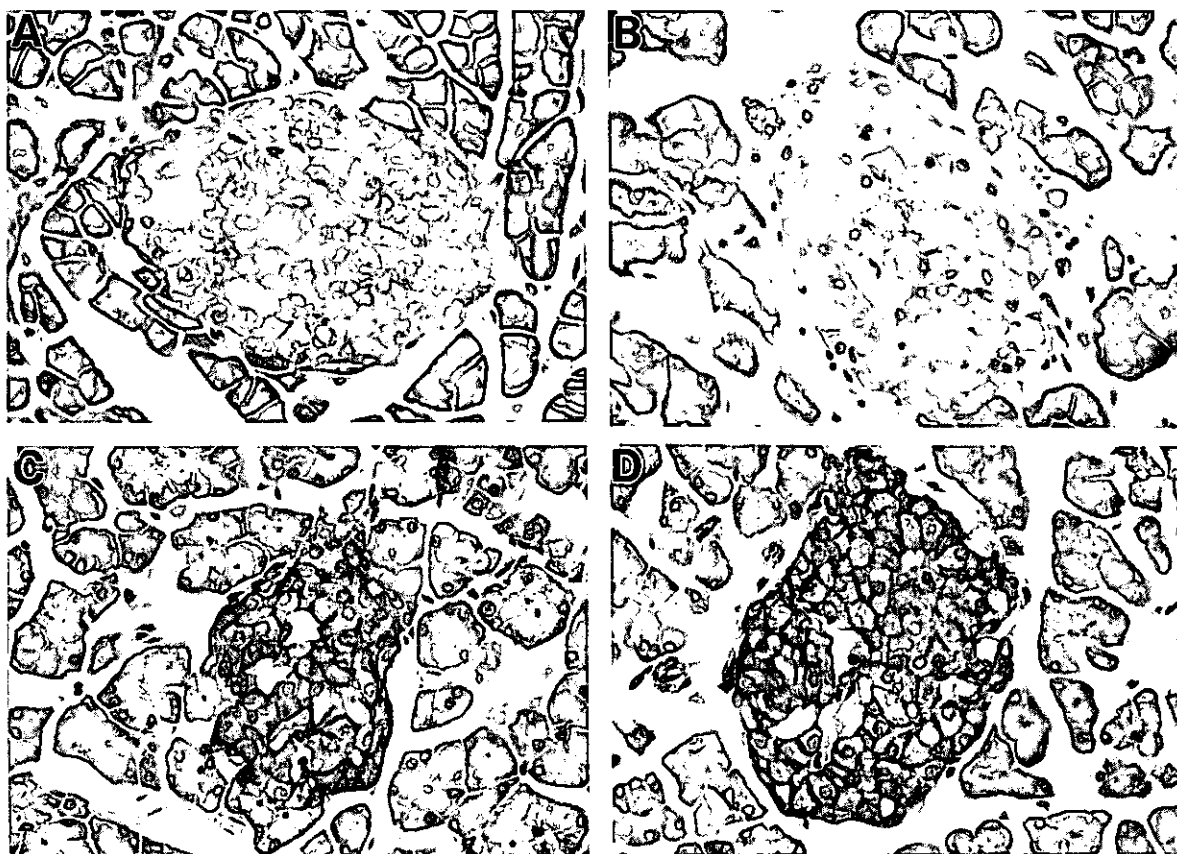


図1. 膵組織像。HE染色 (A, B) と GLUT2 の発現 (C, D)  
A, C, コントロール; B, D, 1%TC

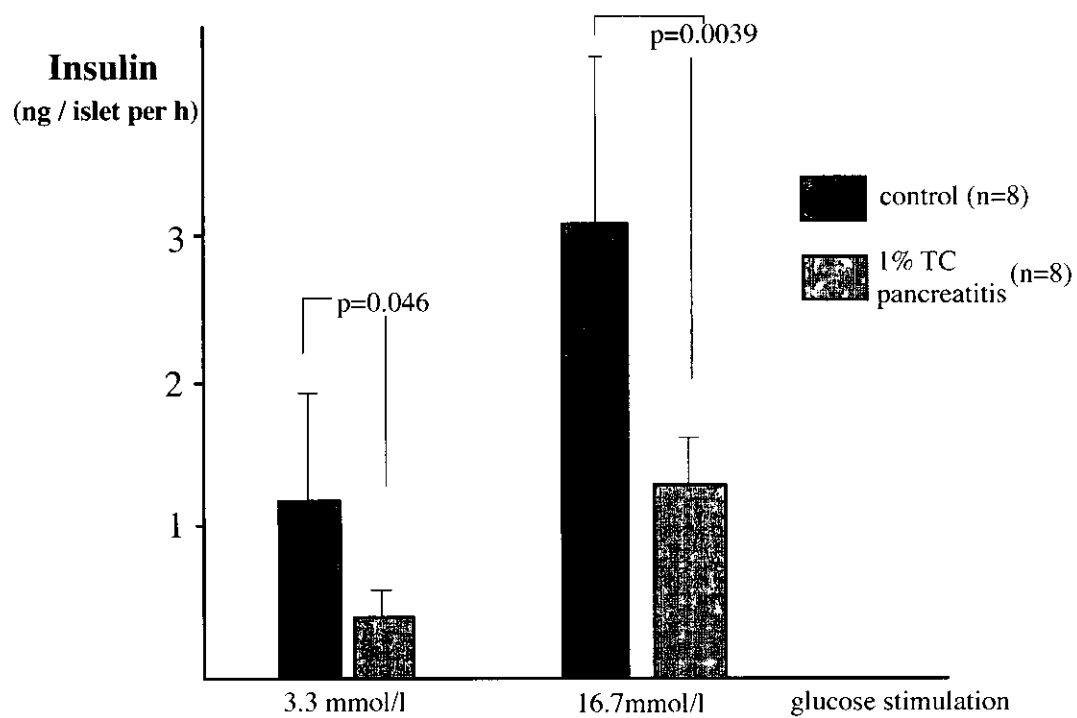


図2. グルコース刺激によるインスリン分泌能

免疫組織科学的に islet における GLUT2 発現に関する検討を行った。コントロール群において、GLUT2 は islet cell の細胞膜においてびまん性に発現を認め、膵炎群においても同様の所見であり、両群間に差は認められなかった (図 1, C, D)。

## 考 察

膵管結紮によるラットの急性浮腫性膵炎モデルにおける内分泌機能の変化を調べた過去の報告によれば、膵島の組織学的変化を認めないにもかかわらず、膵組織中のインスリンおよびグルカゴン濃度は有意に低下し、遊離膵島のインスリン分泌能は膵炎発生72時間後より有意に低下、またグルカゴン分泌能は早期より低下するとされる<sup>1)</sup>。一方、ラットを用いたタウロコール酸などの胆汁酸膵炎では、胆汁酸注入早期に膵組織に浮腫、出血、壊死が起こり、ヒトの重症急性膵炎モデルとして一般的に知られているが<sup>2)</sup>、このモデルにおける内分泌機能の変化を調べた報告はない。また、インスリン分泌シグナル伝達過程は、(1)刺激の認識、(2)細胞内での刺激情報伝達、(3) $\beta$  顆粒内容な細胞外への放出、に大きく分けられるが<sup>3)</sup>、急性膵炎の病態下でこれらのシステムがどのように変化しているのかは現在のところ明らかとなっていない。今回、急性膵炎における内分泌動態を解明することを目的とし、ラットタウロコール酸膵炎モデルを用い、内分泌細胞の機能変化を調べるとともに、インスリン分泌刺激伝達過程で重要な役割を担っている glucose transporter protein (GLUT2) の変化を検討した。今回我々が作製した膵炎モデルは、病理組織学的に出血や壊死を伴わない急性浮腫性膵炎であったが、タウロコール酸注入後1時間ですでに耐糖能障害を認めており、単離 islet におけるグルコース刺激インスリン分泌能は有意に低下していた。しかし組織学的には islet の形態は保たれており、かつ免疫組織科学的検討により GLUT2 の発現に変化は認めなかった。以上の結果より、急性膵炎で認められる耐糖能低下はインスリン分泌能の機能異常が一つの原因として考えられ、インスリンシグナル伝達系に何らかの障害が生じている可能性が考えられた。今後は、急性膵炎病態下でのインスリン分泌シグナル伝達過程における膵島細胞内  $Ca^{2+}$ 、cAMP<sup>7)</sup>、syntaxin 1<sup>8)</sup> の量的・機能的・形態的变化を解析していくことが必要であると考えられた。

## 参 考 文 献

- 1) Kinami Y, Mura T, Sugii M, Miyazaki I. Function of pancreatic endocrine cells in experimental acute pancreatitis. *World J Surg* 1982; 6: 471-7.
- 2) Aho HJ, Nevalainen TJ, Aho AJ. Experimental pancreatitis in the rat. *Eur Surg Res* 1983; 15: 28-36.
- 3) Andersen DK, Ruiz CL, Burant CF. Insulin regulation of hepatic glucose transporter protein is impaired in chronic pancreatitis. *Ann Surg* 1994; 6: 679-87.
- 4) Watanabe T, Nagamatsu S, Matsushima S, Kondo K, Motobu H, Hirotsawa K, Mabuchi K, Kirino T, Uchimura H. Developmental expression of GLUT2 in the rat retina. *Cell Tissue Res* 1999; 298: 217-23.
- 5) Nagamatsu S, Watanabe T, Nakamichi Y, Yamamura C, Tsuzuki K, Matsushima S.  $\alpha$ -soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein is expressed in pancreatic  $\beta$  cells and functions in insulin but not  $\gamma$ -aminobutyric acid secretion. *J Biol Chem* 1999; 274: 8053-60.
- 6) Nagamatsu S, Nakamichi Y, Katahira H. Syntaxin, but not soluble NSF attachment protein (SNAP), biosynthesis by rat pancreatic islets is regulated by glucose in parallel with proinsulin biosynthesis. *Diabetologia* 1997; 40: 1396-402.
- 7) Gabrys-Pomykala BF, Holian O, MacKenzie M, Nyhus LM, Bombeck CT. Adenyl cyclase and cyclic AMP

- (cAMP) in acute experimental pancreatitis. *Am J Surg* 1977 ; 133 : 156-62.
- 8) Nagamatsu S, Fujiwara T, Nakamichi Y, Watanabe T, Kitahira H, Sawa H, Akagawa K. Expression and functional role of syntaxin 1/HPC-1 in pancreatic  $\beta$  cells. *J Biol Chem* 1996 ; 271 : 1160-5.

## 新しいラット膵セリンプロテアーゼの分子生物学的検討

研究報告者 加 嶋 敬

京都府立医科大学第三内科

共同研究者 片 岡 慶 正 阪 上 順 一 中 林 亜 美

光 吉 蘭 子 十 亀 義 生 白 井 憲 子

**要旨:** 今回我々がクローニングしたラットのセリンプロテアーゼは近年報告された human chymotrypsin-like enzyme-1 (hBSSP-1) の homologue であり, hCTRL-1 と同様に膵臓に多く発現していた。CTRL-1 はラット脳内にも発現しているとされるが, その発現レベルは低く膵への特異性が高い。ラットをモデルとして CTRL-1 が膵疾患の有用なマーカーとなるか, 今後検討を加えたい。

### 目 的

セリンプロテアーゼに共通する活性部位に対するプライマーを作成し, マウス脳よりクローニングした新規のセリンプロテアーゼの内, brain specific serine protease-5 (BSSP-5) は膵臓に発現していることが指摘されている(未報)。今回我々はラットにおける BSSP-5 の発現を検討するため, クローニングを試みた。

### 方 法

Wistar 系ラット(200 g)をペントバルビタール麻酔下に開腹, 膵を摘出後直ちに AGPC 法にて total RNA を, ついで Oligo (dT)セルロースにて polyA+RNA を抽出した。逆転写後, マウス BSSP-5 の open reading frame (ORF) に対し, アミノ酸配列に相応する mix primer を用いて polymerase chain reaction (PCR) を施行, PCR 産物を plasmid vector にサブクローニングした。配列は dideoxy 法により決定した。またラット BSSP-5 の組織発現を検討するため, Northern blot analysis, in situ hybridization を行なった。Northern blot analysis で用いた DNA Probe はセリンプロテアーゼの consensus 配列を含まず,  $^{32}\text{P}$ dCTP にて標識した。in situ hybridization では, 還流固定した膵組織に対し digoxigenin にてラベルした consensus 配列を含まない cRNA probe を hybridization させ ALP 標識した抗 digoxigenin 抗体, NBT/BCIP にて検出した。

### 結 果

ラット BSSP-5 の ORF の配列を示す(図 1)。全長798bp からなり, 264のアミノ酸残基からなる。アミノ酸配列上セリンプロテアーゼでよく保存されている配列 AAHC, DSGGP 配列(図 1 太字), また 3つの活性残基 His (75), Asp (121), Ser (214)(図 1 斜太字)が確認できる。

既知のセリンプロテアーゼの中では, ヒト膵セリンプロテアーゼである hCTRL-1 と85.1%の相同性

```

1  ACgATGtTaCTGCTCAGCCTAACCCCTTAGCCTGGTCCTTCTTGGCTCCTCCTGGGGCTGT
    M L L L S L T L S L V L L G S S W G C
61  GGTGTTCCCGCCATCACACCTGCACTGAGCTACAACCAGAGGATTGTCAACGGGGAGAAT
    G V P A I T P A L S Y N Q R I V N G E N
121 GCAGTGCCAGGCTCCTGGCCCTGGCAAGTGTCTCTGCAGGATAACACCGGCTTCCACTTC
    A V P G S W P W Q V S L Q D N T G F H F
181 TGTGGTGGTTCTCTCATTGCCCAAACCTGGGTGGTCACGGCTGCCACTGCAAAGTCACG
    C G G S L I A P N W V V T A A H C K V T
241 CCTGGACGCCACTTTGTCATTTTAGGAGAATATGACCGATCTTCCAATGCTGAGCCTATA
    P G R H F V I L G E Y D R S S N A E P I
301 CAGGTGCTCTCCATCTCGAAGGCGATCACACACCCTAGCTGGAACCCCAACACTATGAAC
    Q V L S I S K A I T H P S W N P N T M N
361 AATGACCTGACTCTTCTGAAGCTTGCCTCACCAGCCCGGTACACAGCACAAGTCTCACCA
    N D L T L L K L A S P A R Y T A Q V S P
421 GTCTGCCTGGCTTCCCTCAAATGAGGCACCTCCTGCAGGCCTCACATGCGTCACCCTGGC
    V C L A S S N E A L P A G L T C V T T G
481 TGGGGCCGCATCAGTGGTGTGGCAACGTGACACCAGCACGTCTGCAGCAAGTAGTTCTA
    W G R I S G V G N V T P A R L Q Q V V L
541 CCCCTGGTCACTGTGAATCAGTGTCCGACAGTATTGGGGTTCACGCATTACTGACTCCATG
    P L V T V N Q C R Q Y W G S R I T D S M
601 ATATGTGCAGGTGGCGCAGGTGCCTCCTCATGTGAGGGTCACTCAGGAGGCCCTCTTGTC
    I C A G G A G A S S C Q G D S G G P L V
661 TGCCAGAAGGGAAACACCTGGGTGCTTATTGGTATTGTCTCCTGGGGCACTGAGAAGTGC
    C Q K G N T W V L I G I V S W G T E N C
721 AATGTACAAGCACCGGCCATGTACACTCGGGTCAGCAAGTTCAACACCTGGATCAACCAA
    N V Q A P A M Y T R V S K F N T W I N Q
781 GTCATAGCCTACAATAA
    V I A Y N

```

図1. Nucleotide sequence of the cDNA and deduced primary structure of rat BSSP-5

を示している。一方ラットでは chymotrypsin B が最も相同性が高いが、アミノ酸配列で54.5%にすぎなかった。ただこれらは、AAHC, DSGGP といった配列や活性残基の triad は一致し、また cysteine の位置も同等である (図2)。なお予想される分子量は28kDa、等電点は8.56である。

Northern blot analysis では膵臓に約1.3kb に強いバンドを認める。膵への特異性が高く、他臓器では膵に認められた大きさと同じバンドを認めない (図3)。さらに膵臓内での局在を in situ hybridization でみると、シグナルは腺房細胞に認められ、ラ氏島には認められなかった (図4)。また sense probe を用いた場合ではシグナルを認めなかった。





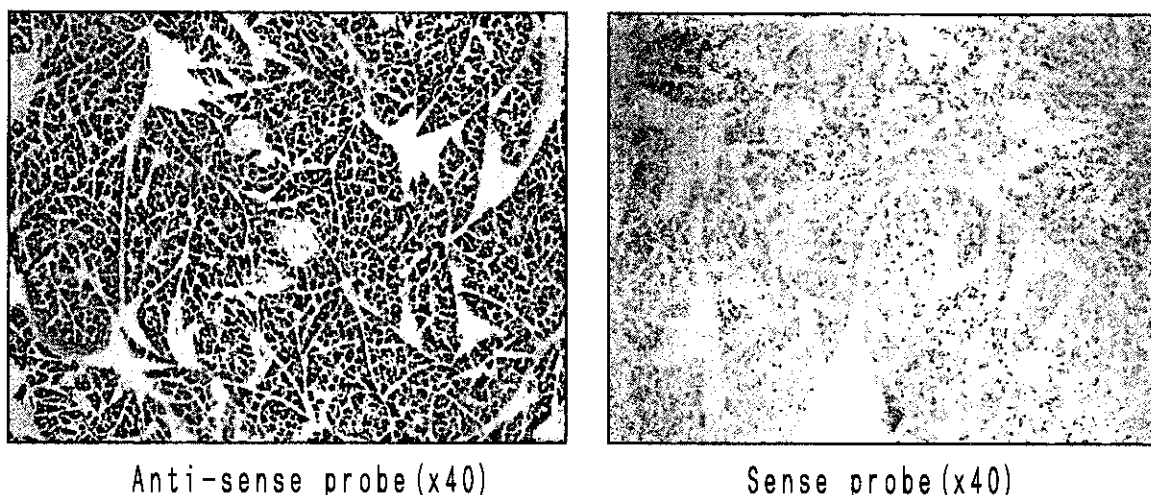


図4. *In situ* hybridization with digoxigenin labeled RNA probes

## 考 察

CTRL-1 は1997年にヒトにおける新規の膵消化酵素として報告されている<sup>1)</sup>。今回我々がクローニングしたセリンプロテアーゼは hCTRL-1 との高い相同性、膵臓への特異性が高く腺房細胞に局在していることからラットにおける hCTRL-1 homologue と考えられ、やはり消化酵素の一つと予想される。hCTRL-1 は膵臓に特異性が高く、他臓器での発現は Northern blotting analysis 上認められていない<sup>2)</sup>。今回クローニングしたラット BSSP-5 (CTRL-1 homologue) も同様の結果であった。しかしラットでは発現レベルは低いものの脳内でも認められるとされ<sup>3)</sup>、我々も RT-PCR 法にて脳などでの発現を確認しており、消化酵素以外にも何らかの機能を担っていると考えられる。ヒトにおける膵外発現の報告はないが、Trypsin では脾臓など膵外諸臓器での発現が報告されており<sup>3)</sup>、hCTRL-1 もまた膵臓、脳以外で発現している可能性を否定できない。

今回我々はラット BSSP-5 (CTRL-1 homologue) をクローニングした。ラット CTRL-1 は膵外にも発現しているが、その発現レベルは低く膵臓への特異性が高い。この点 CTRL-1 は膵傷害に対する有用性の高いマーカーとなる可能性がある。また CTRL-1 の膵外分布、その機能についてはさらなる研究が望まれる。

## 参 考 文 献

- 1) Janne ER, Frank L, Jorum S, et al. A novel human chymotrypsin-like digestive enzyme. *J Biol Chem* 1997; 272: 8099-104.
- 2) Ben JD, Benjamin SP, Muriel S, et al. Serine proteases in rodent hippocampus. *J Biol Chem* 1998; 273: 23004-11.
- 3) Koshikawa N, Hasegawa S, Nagashima Y, et al. Expression of trypsin by epithelial cells of various tissue, leukocytes, and neurons, in human and mouse. *Am J Pathol* 1998; 153: 937-44.

## 重症急性膵炎に対するサイトカイン制御 (ラット実験急性膵炎時における腹腔内マクロファージ 数の測定と機能解析を中心に)

研究報告者 松野正紀  
東北大学第一外科

共同研究者 三上幸夫 武田和憲 砂村眞琴  
渋谷和彦

**要旨：**Wistar系雄性ラットの胆膵管に5%TCAを注入して、急性膵炎作成後、経時的に腹腔細胞を採取し、flowcytometryを用いて腹腔内マクロファージ数を算定した。また、機能解析のために、腹腔内細胞からプレート吸着法、磁気細胞分離法を用いてマクロファージの分離を試みた。ラット腹腔内細胞数は6時間後から著明に増加したが、(ED1+, Gr+)細胞数は1時間後から減少した。腹腔内マクロファージは選択的に分離可能であったが、回収率は1時間後から著明に低下した。腹腔内細胞数の著明な増加は主に(ED1-, Gr+)細胞によるものであった。以上より、膵炎作成後1時間から好中球の腹腔内への誘導がみられたが、腹腔内マクロファージは膵炎作成後1時間から減少し、機能も低下することが示唆された。

### はじめに

急性膵炎の重症化機序は未だ不明な点が多いが、近年、サイトカインの関与が指摘され、新しい治療法が模索されている。このサイトカインの上昇には腹腔内マクロファージの活性化が関与していると考えられており、腹腔内マクロファージを対象とした治療法も検討されている。しかし、実際に急性膵炎時における腹腔内マクロファージの経時的な増減や機能について解析した報告はない。そこで今回、ラット実験的急性膵炎モデルを作成して、経時的に腹腔内マクロファージ数を算定し、機能解析のために腹腔内細胞からマクロファージの分離を試みた。

### 対象と方法

#### タウロコール酸膵炎 (TCA-AP) の作成

Wistar系雄性ラット(200~250g)を約12時間の絶食後にエーテル麻酔した。ラット腹部の体毛を剃毛し、無菌的に上腹部を約1cm開腹した。十二指腸を体外に引き出し、胆膵管を同定後、肝門部総胆管を脳外科用ヘモクリップでクリッピングした。22G注射針で十二指腸乳頭部を穿刺し、十二指腸壁を貫通させた。2号テフロン糸を主膵管内に挿入し、これをガイドワイヤーとして25G注射針を主膵管内に挿入した。テフロン糸を抜去し、25G注射針を3-0 Silkで主膵管に固定した。5% sodium taurocholate (1 ml/kg)を主膵管内に1分間で逆行性に注入した。注射針を抜去後、穿刺部を接着剤で塞

ぎ、腹壁を2層に縫合閉鎖した。

#### 腹腔内細胞数の計測と腹水の培養

ラットタウロコール酸膀胱炎モデルを作成後0, 1, 6, 12時間後にラットを屠殺し, 4°C RPMI 液30 mlで腹腔内を洗浄し, 腹腔内細胞を採取した。また, 腹腔内の感染の有無を調べるために, 膀胱炎作成6時間後に腹水を採取し, 細菌培養を行った。腹腔内細胞数を計測後, ビオチン標識マウス由来抗ED1抗体, PE標識ストレプトアビジン, FITC標識マウス由来抗顆粒球(Gr)抗体による染色を行った。この際, 標本の一部を塗抹標本とし, ライトギムザ染色を行って検鏡した。次いで, flowcytometry (FACS Calibur) を用いて染色された腹腔内細胞を解析し (2 color technique), 各分画 (ED1+, Gr+) (ED1-, Gr+) の割合を求めた。各分画の実数は各分画の割合に総細胞数を乗じて算出した。

#### プレート吸着法を用いた腹腔内マクロファージの分離

ラットタウロコール酸膀胱炎モデルを作成後, 0, 1, 6時間後にラットを屠殺し, 腹腔内細胞を採取した。腹腔内細胞数を計測後, 細胞をプラスチックシャーレに散布して, マクロファージをシャーレに吸着させた。37°C, 約2時間のincubation後, 上清を吸引した。吸着細胞をcell scraperで完全に回収し, 吸着細胞数を計測した。回収細胞の一部は塗抹標本とし, ライトギムザ染色を行って検鏡した。また, 一部は同様に染色を行い, flowcytometryを用いて解析した。

#### 磁気細胞分離法を用いた腹腔内マクロファージの分離

ラットタウロコール酸膀胱炎モデルを作成後, 0, 1, 6時間後にラットを屠殺し, 腹腔内細胞を採取した。細胞数を計測後, ビオチン標識マウス由来抗ED1抗体 (IgG1) を添加, 次いで二次抗体としてMicro Beads標識マウス由来抗ラットIgG1抗体を加えた。サンプルを磁気細胞分離システム (Mini MACS) の磁場内に設置した分離カラムに注入し, 透過液を陰性分画として回収した。分離カラムを磁石から取り外し, 保持されている細胞を陽性分画として押し出し, 回収細胞数を計測した。回収細胞の一部は塗抹標本とし, ライトギムザ染色を行って検鏡した。

#### 各モデルにおける好中球分画の比較

(ED1+, Gr+) 細胞と (ED1-, Gr+) 細胞の増減を比較するため, 単開腹, 単開腹+Sham手術モデル, セルレイン膀胱炎モデル (CE-AP), faecal peritonitisモデルを作成した。単開腹モデルは上腹部に約1cmの切開を行った後, 2層に縫合閉鎖した。Sham手術モデルはタウロコール酸膀胱炎 (TCA 膀胱炎) の作成と同様に行ったが, 胆尿管内に生理的食塩水を投与した。単開腹+セルレイン膀胱炎モデルは単開腹後, 50 $\mu$ g/kgをラット腹腔内に1時間毎に4回投与して作成した。Faecal peritonitisモデルは正常ラットの回盲部を切開し, 内容物採取後, 内容物と生理的食塩水を1:2の割合で混合して1mlを腹腔内に投与した。全モデルとも, 初回6時間後にラットを屠殺し, flowcytometryによる解析を行った。

## 結 果

### (1) 腹腔内細胞数の計測と腹水の培養

腹腔内細胞数は膀胱炎作成6, 12時間後に著明に増加した (Fig. 1)。Flowcytometryによる解析では正常ラットで約35%の (ED1+, Gr+) 分画を認めた。膀胱炎作成後1時間では (ED1+, Gr+) 分画の減少と (ED1-, Gr+) 分画の出現を認めた。6, 12時間後では (ED1-, Gr+) 分画がさらに著明に増大し, 12時間後では80%に達した (Figs. 2-4)。塗抹標本による検鏡では正常ラットでマクロファ-

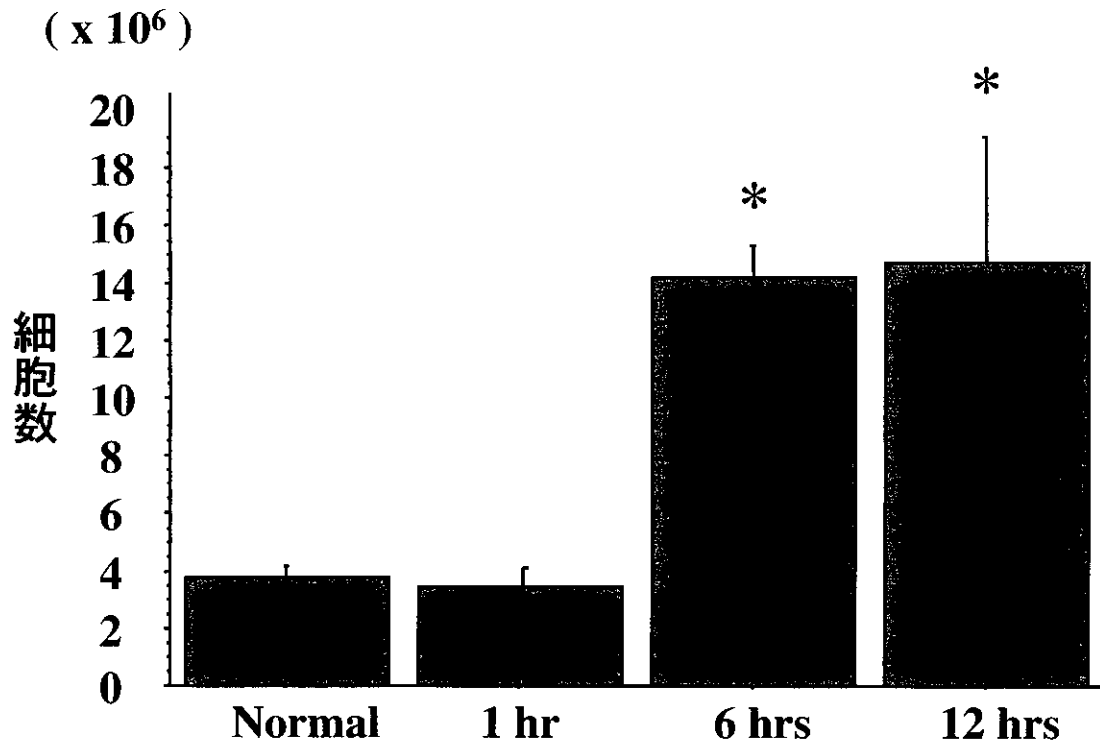


Fig. 1 腹腔内細胞総数  
(Mean  $\pm$  SEM,  $p < 0.05$  compared with normal rat)

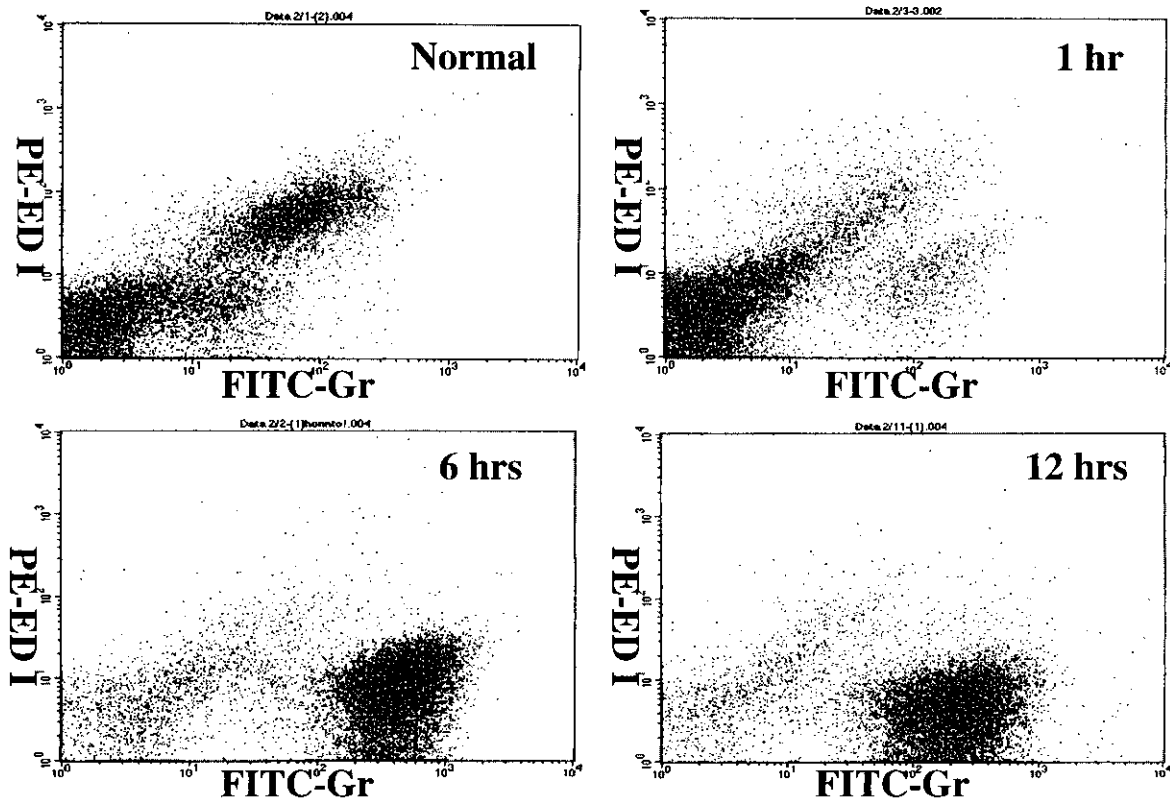


Fig. 2 腹腔内細胞の Flowcytometry による解析