

Fig. 3 (ED1+, Gr-) 細胞数
(Mean±SEM, p<0.05 compared with normal rat)

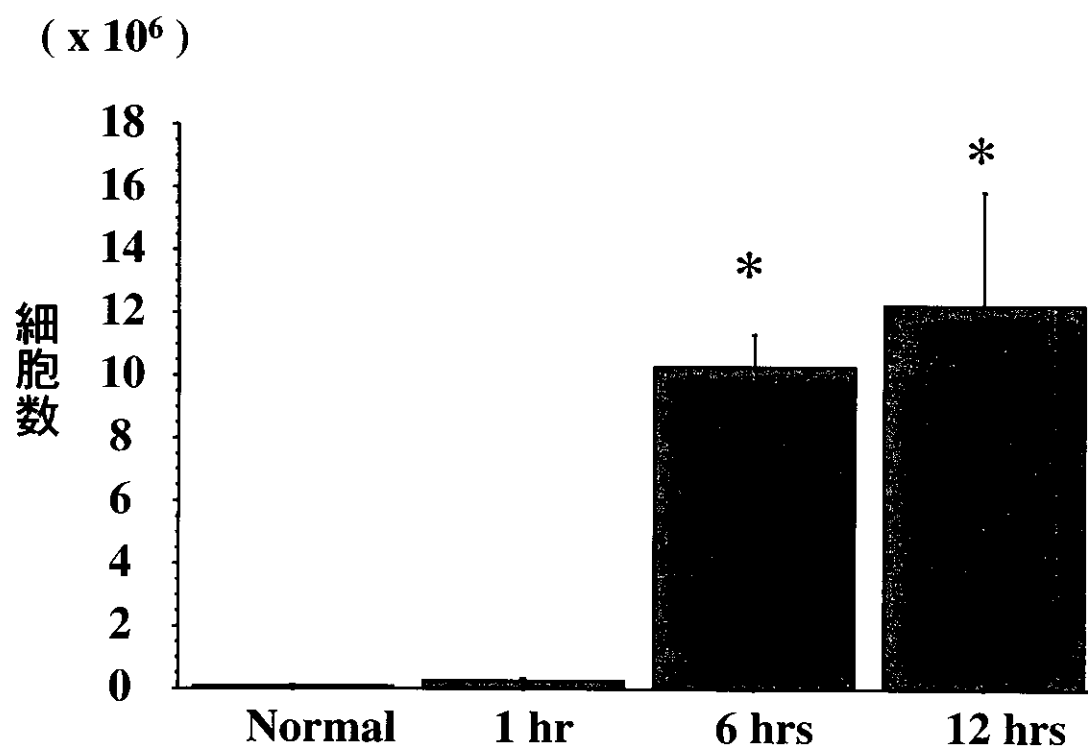


Fig. 4 (ED1-, Gr+) 細胞数
(Mean±SEM, p<0.05 compared with normal rat)

ジを多数認め、膵炎作成後1時間からマクロファージの減少と好中球の著明な増加を認めた (Fig. 5)。

急性膵炎作成6時間後のラット腹水培養は全て陰性であった。

(2) プレート吸着法を用いた腹腔内マクロファージの分離

正常ラットでは腹腔内細胞のうち22.2%の吸着細胞が回収可能であった。Flowcyrtometryによる解析では吸着細胞の約70%が (ED1+, Gr+) 分画に存在していた (Fig. 6)。塗沫標本による検鏡では約70%の細胞がマクロファージであった。急性膵炎作成1, 6時間後では吸着細胞の回収率が2.4%, 1.1%と著明に低下した (Table. 1)。

(3) 磁気細胞分離法を用いた腹腔内マクロファージの分離

磁気細胞分離法では陽性分画としての細胞回収率が正常ラットで1.8%, 6時間モデルで2.2%であった (Table. 2)。

(4) 各モデルにおける好中球分画の比較

腹腔内細胞数は、単開腹群, 単開腹+セルレイン膵炎群, Sham手術群, タウロコール酸膵炎群, Faecal peritonitis群の順に増加した (Fig. 7)。(ED1+, Gr+)細胞は単開腹群, 単開腹+Sham手術群, セルレイン膵炎群, Faecal peritonitis群ともにタウロコール酸膵炎群と同等に減少した (Fig. 8)。また, (ED1-, Gr+)細胞は単開腹群, セルレイン膵炎群, Sham手術群, 単開腹+セルレイン膵炎群, Faecal peritonitis群の順に細胞数が増加した (Fig. 9)。

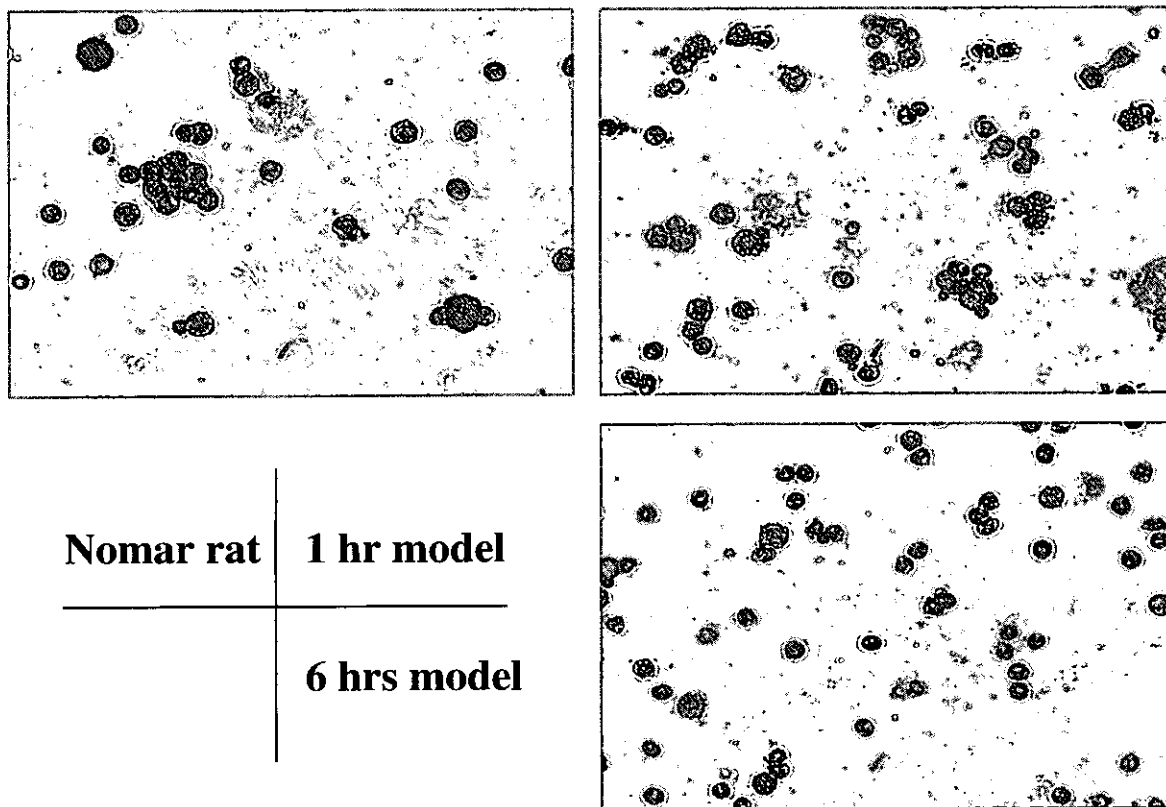


Fig. 5 塗沫標本検鏡所見 (Wright-Giemsa 染色)

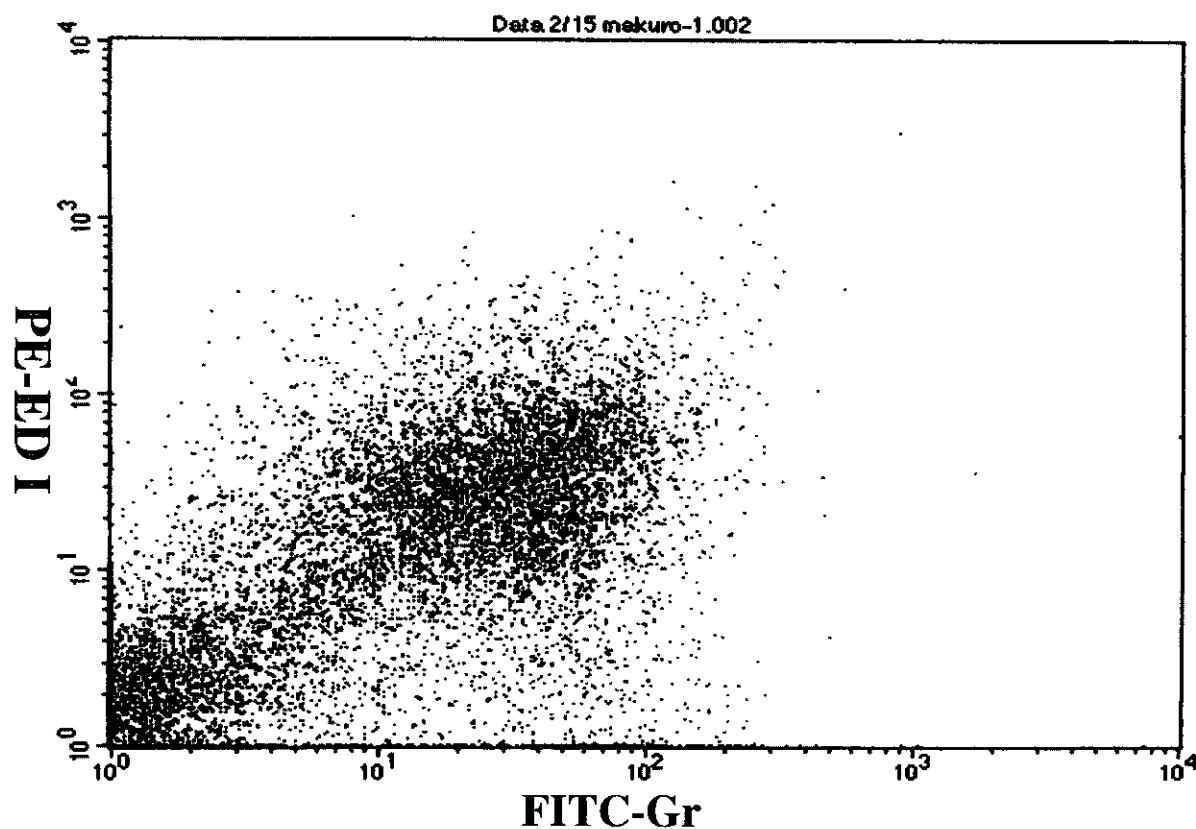


Fig. 6 プレート吸着法を用いた分離細胞の flowcytometry による解析

Table. 1 プレート吸着法を用いた分離細胞の回収率

	Normal	1 hr	6 hr
総細胞数	6.7 x10⁶	4.2 x10⁶	16.0 x10⁶
吸着後 細胞数	1.5 x10⁶	0.10 x10⁶	0.17 x10⁶
回収率	22.4 %	2.4 %	1.1 %

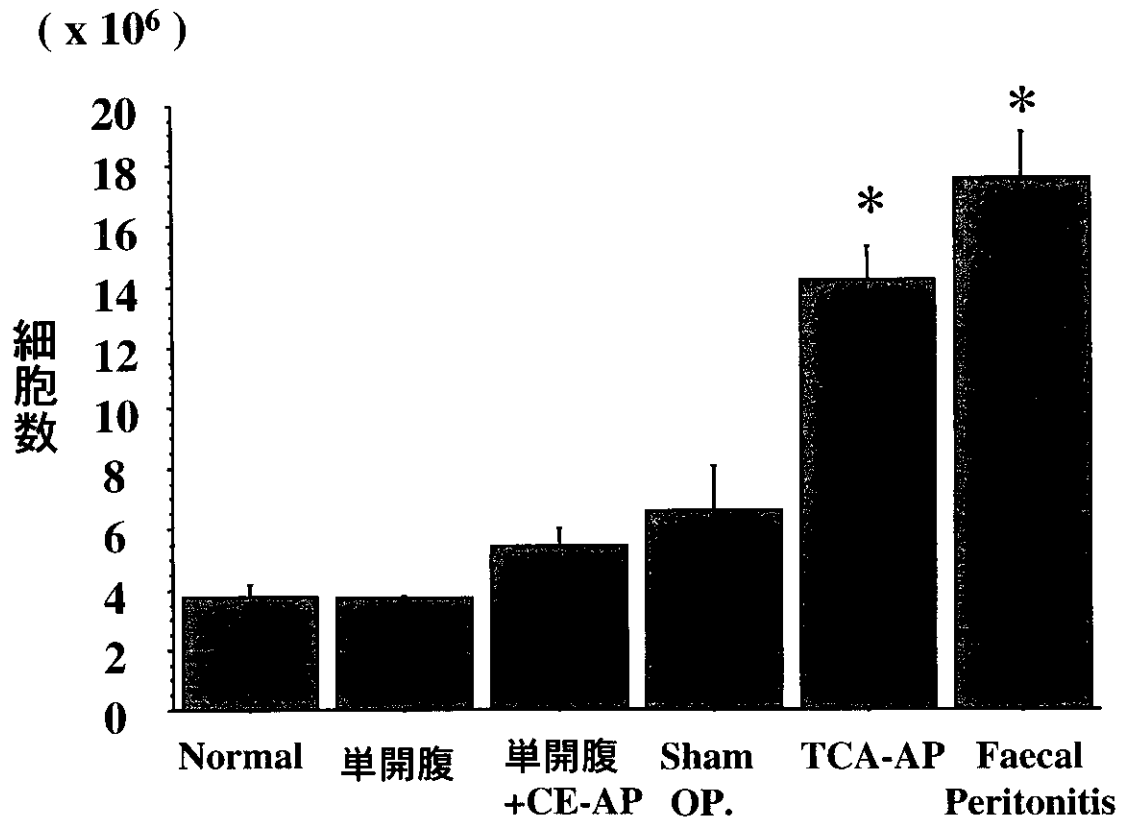


Fig. 7 腹腔内細胞総数 (6 hrs)
(Mean \pm SEM, $p < 0.05$ compared with normal rat)

Table. 2 磁気細胞分離法を用いた分離細胞の回収率

	Normal	6 hrs
総細胞数	17.6×10^6	14.8×10^6
MACS 後 細胞数	0.32×10^6	0.32×10^6
回収率	1.8 %	2.2 %

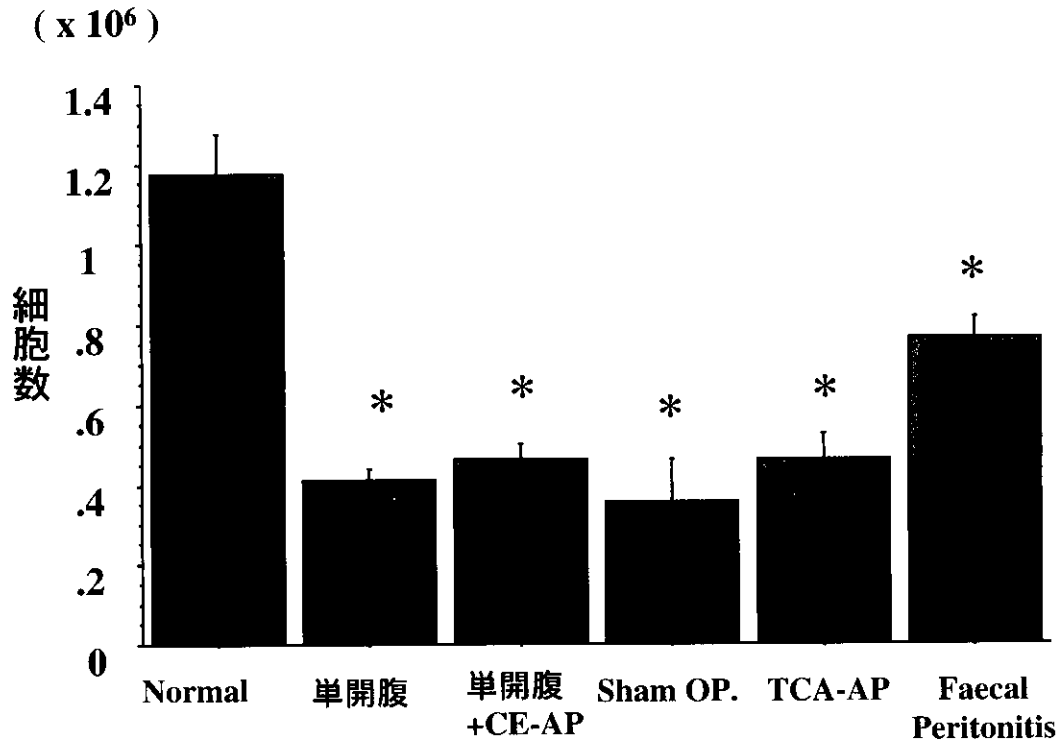


Fig. 8 (ED1+, Gr-) 細胞数 (6 hrs)
(Mean±SEM, p<0.05 compared with normal rat)

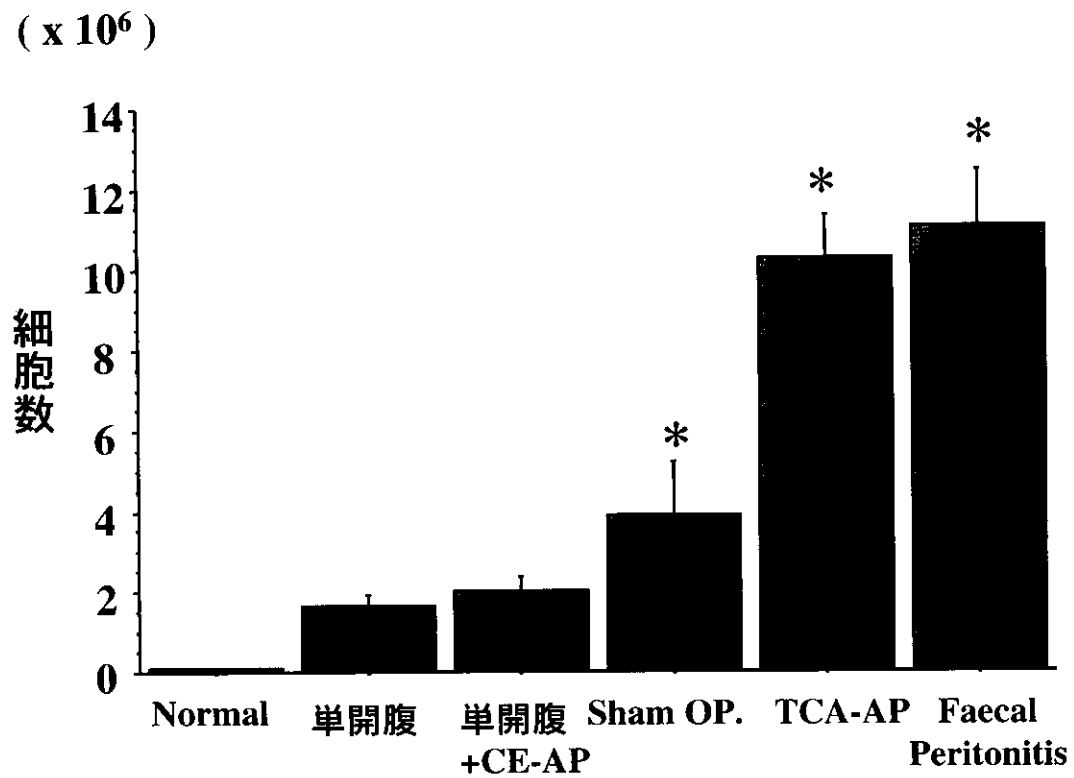


Fig. 9 (ED1-, Gr+) 細胞数 (6 hrs)
(Mean±SEM, p<0.05 compared with normal rat)

考 察

近年、急性膵炎の重症化におけるサイトカインの関与が指摘され、サイトカインを対象とした治療も試みられている。各種サイトカインは、様々な細胞に作用して互いに産生を促進し、ネットワークを構成している。マクロファージはこのサイトカインネットワークの上流に位置し、急性膵炎における全身反応の Key cell とも考えられている¹⁾。急性膵炎では腹水や門脈血中の膵酵素や TNF- α の値が末梢血に比べて著しく高値を呈しており、膵酵素によってなんらかの機序で腹腔内マクロファージが活性化され、マクロファージから産生されたサイトカインによって全身反応が惹起しているとも考えられている^{2,3)}。そこで、全身的なサイトカインの誘導を抑制する目的で、腹腔内マクロファージを対象とした治療法も試みられている^{4,5)}。しかし、実際に急性膵炎時の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く、臨床の場で腹腔内マクロファージを対象とした治療が有効か否か疑問である。我々の以前の検討⁶⁾では腹腔内洗浄液中の TNF- α 値は急性膵炎発症後 1 時間で最高値に達し、以下、減少していた。今回の検討では急性膵炎作成後の腹腔内細胞数は著明に増加していたものの、(ED1-, Gr+) 細胞の増加が主であり、(ED1+, Gr+) 細胞数は減少していた。また、急性膵炎作成後 1 時間からプレート吸着法による分離細胞の回収率が著しく低下した。正常ラットプレート吸着細胞の塗抹標本による検鏡では約 70% の細胞がマクロファージと同定され、同時に行った flowcytometry でこの細胞は (ED1+, Gr+) 分画に存在したことから、(ED1+, Gr+) 細胞は腹腔内マクロファージであると考えられた。また、(ED1-, Gr+) 細胞は経時的な flowcytometry の結果と膵炎作成後の塗抹標本から好中球であると考えられた。以上の結果から急性膵炎作成後 1 時間以降では腹腔内マクロファージ数は減少し、機能も低下 (吸着能) することが示唆され、逆に、好中球は経時的に腹腔内に誘導されることが確認された。この腹腔内マクロファージ数の減少は他のあらゆる侵襲でも惹起されており、この現象の意義とメカニズムの解明を現在続けている。また、好中球の集積は細菌培養の結果から感染によるものではないと考えられたが、集積の程度が侵襲の程度と一致しており、今後は腹腔内への好中球集積と膵炎の重症化との関連についても追求していきたいと考えている。本検討では腹腔内マクロファージの経時的な機能解析も目的としたが、プレート法、磁気細胞分離法を用いても十分な細胞数を得ることができず、新たな細胞分離法を検討中である。現在までに腹腔内マクロファージの経時的な機能変化を示すには到っていないが、これまでの結果から実際の臨床の場で腹腔内マクロファージの制御を目的とした治療は困難であると予想された。

参 考 文 献

- 1) Andersson R, Deng XM, Wang XD. Role of macrophage overactivation in the development of acute pancreatic injury in rats. *Br J Surg* 1997; 84: 775-80.
- 2) Takeyama Y, Nishikawa J, Kuroda Y, et al. Involvement of peritoneal macrophage in the induction of cytotoxicity due to apoptosis in ascitic fluid associated with severe acute pancreatitis. *J Surg Res* 1999; 82: 163-71.
- 3) Satoh A, Shimosegawa T, Toyota T, et al. Nitric oxide is overproduced by peritoneal macrophage in rat taurocholate pancreatitis: the mechanism of inducible nitric oxide synthase expression. *Pancreas* 1998; 17: 402-11.
- 4) Yang J, Denham W, Norman J. Macrophage pacification reduces rodent pancreatitis-induced hepatocellular injury through down-regulation of hepatic tumor necrosis factor alpha and interleukin-1 beta. *Hepatology*

- 1998 ; 28 : 1282-8.
- 5) Yang J, Denham W, Norman J. The physiologic consequence of macrophage pacification during severe acute pancreatitis. Shock 1998 ; 10 : 169-75.
 - 6) 松野正紀, 武田和憲, 酒井義博, 他. 重症急性膵炎時のサイトカイン制御に関する実験的検討. 厚生省特定疾患重点研究事業重症急性膵炎の救命率を改善するための研究班平成10年度研究報告書. 1999 : 51-9.

大量化学療法による急性膵炎

研究報告者 池 井 聰

国立熊本病院外科

共同研究者 片 潤 茂 芳 賀 克 夫 山 下 眞 一

河 野 文 夫 清 川 哲 志 眞 田 功

高 木 一 孝

要旨：幹細胞移植（同種骨髄・末梢血幹細胞，自己末梢血幹細胞）併用大量化学療法における急性膵炎，高アミラーゼ血症，SIRSの発生の実態を明らかにした。対象とした同種移植26例中1例（3.8%），自己移植24例中1例（4.2%），全体で2例（4%）に急性膵炎が発症した。高アミラーゼ血症の発生は同種移植11例（42.3%），自己移植9例（37.5%），全体で20例（40.0%）であった。SIRSの発症は同種移植13例（50%），自己移植13例（54.2%）であった。SIRSの期間は同種移植で24.2日と，自己移植の4.8日より有意に長期間にわたり遷延し，GVHDとの関連が示唆された。化学療法時には常に急性膵炎の発生を念頭においた診療が重要と考えられる。

背 景

各種悪性疾患に対して化学療法は欠かせない治療法である。特に，白血病，悪性リンパ腫に対しては化学療法が第一選択の治療法である。化学療法の最大の副作用である骨髄機能抑制はG-CSFと幹細胞移植（骨髄移植，末梢血幹細胞移植）によりある程度クリア出来るようになり，大量化学療法が可能となった。これらの化学療法特に大量化学療法中に重症急性膵炎を起こした報告がみられるが，その実態の解明は不十分である。

目 的

骨髄・末梢血幹細胞移植併用の大量化学療法患者における急性膵炎，高アミラーゼ血症の発生の実態を明らかにする。

対 象 と 方 法

対象は平成10年に国立熊本病院で幹細胞移植を行った患者50名である。その内分けは同種移植26例（骨髄移植5例，末梢血幹細胞移植21例），自己移植24例（全例末梢血幹細胞移植）である（表1）。すべての症例は移植時の大量化学療法の前に寛解導入化学療法を3-6回受けて，完全寛解が得られている。図1に急性骨髄性白血病に対する同種末梢血幹細胞移植併用大量化学療法のレジメを示す。末梢血幹細胞移植の5日前（Day-5）と4日前（Day-4）にキロサイドイ（Ara-C）4500mg/bodyを，3日前（Day-3）と2日前（Day-2）にエンドキサン（CAP）3500mg/bodyを経静脈的に投与し，

表 1. 移植・大量化学療法症例の原疾患

同種移植 (26例)		自己移植 (24例)	
骨髄移植 5例		末梢幹細胞移植 24例	
急性骨髄性白血病	1例	悪性リンパ腫	12例
慢性骨髄性白血病	2例	急性骨髄性白血病	6例
急性リンパ性白血病	1例	慢性骨髄性白血病	1例
骨髄異型成症候群	1例	絨毛膜癌	1例
末梢幹細胞移植 21例		骨髄異型成症候群	1例
急性骨髄性白血病	5例	急性前芽球白血病	1例
慢性骨髄性白血病	4例	乳癌	2例
急性リンパ性白血病	8例		
骨髄異型成症候群	2例		
芽球増加型不応性貧血	1例		
骨髄腫	1例		

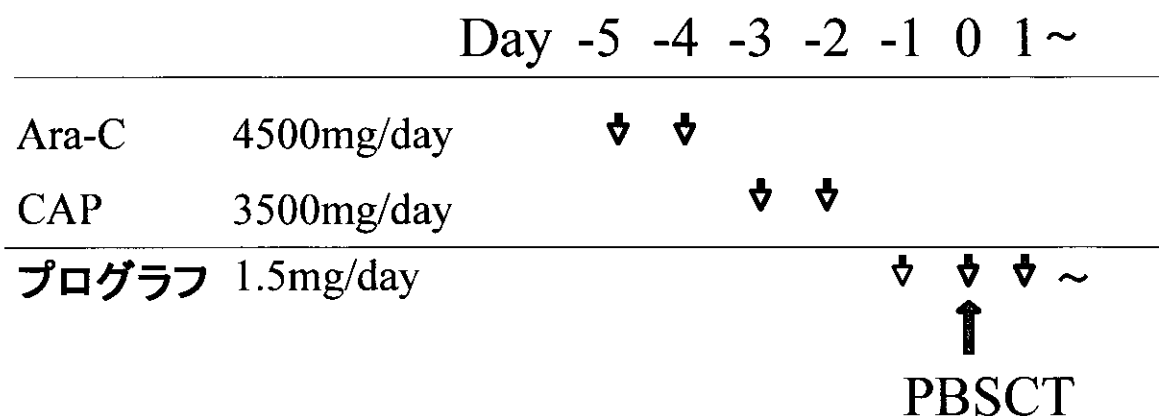


図 1. 同種末梢血幹細胞移植を併用した急性骨髄性白血病に対する大量化学療法

1日前 (Day-1) より免疫抑制剤プログラフ1.5 mg/day を連日投与し, Day 0 に同種末梢血幹細胞移植を行っている。化学療法の内容は原因疾患や病態によって異なるが, 膵炎を誘発する可能性の高いロイナーゼ (L-アスパラギナーゼ, L-ASP) は今回対象とした症例には使用されていない。

これらの症例の, 臨床症状, 血中膵アミラーゼ値, CRP, 白血球数, 中性脂肪, 血中コレステロール量等を経時的に測定し, 幹細胞移植併用大量化学療法による急性膵炎の発症, 高アミラーゼ血症の発生について検討した。

高アミラーゼ血症を呈した患者, 腹痛等の消化器症状を訴えた患者は可能な限り腹部超音波検査を行い, 膵腫大, 膵周囲の液体貯留, カラードップラーによる膵血流の有無について観察した。大量化学療法は無菌室で治療を行う為に急性膵炎発症時の CT 検査は行っていない。急性膵炎の診断ならびに重症度判定は厚生省特定疾患難治性膵疾患調査研究班(1990年版)りによった。高アミラーゼ血症は, 異常高値 (160 IU/l) 以上かつ治療前値の 2 倍以上に上昇したものを高アミラーゼ血症とした。

また全身性炎症反応症候群 (SIRS)²⁾ の発症率, 発症期間について検討した。SIRS の判定は 4 項目中, 白血球数は大量化学療法により激減しているため診断項目より除外し, 他の 3 項目中 2 項目以上陽性の症例を SIRS とした。

結 果

急性膵炎の発症は同種移植26例中1例 (3.8%), 自己移植24例中1例 (4.2%), 全体で2例 (4%) であった (図2)。診断の根拠は血中膵アミラーゼ値の上昇, 持続する腹痛, 超音波検査による膵腫大と周囲の液体貯留である。いずれも中等症であり, 絶食, 高カロリー輸液, 抗生物質, プロテアーゼインヒビター投与により軽快した。高アミラーゼ血症は同種移植26例中11例 (42.3%), 自己移植24例中9例 (37.5%), 全体で20例 (40.0%) であった (図2)。

SIRS の発症は同種移植は26例中13例 (50%), 自己移植においては24例中13例 (54.2%) であった。SIRS の期間は同種移植では24.2日と自己移植の4.8日より有意に長期間にわたり SIRS が遷延した (図3)。同種移植の26例中3例が重症感染症, 下血, 肝機能障害で死亡したが, いずれも graft versus host disease (GVHD) によるものと考えられる。死亡例は3例とも移植直後より SIRS を発症していた。自己移植例では死亡例はなかった。

考 察

今回, 幹細胞移植併用大量化学療法症例について検討したが, 同種移植と自己移植では全く異なった病態である。同種移植は多かれ, 少なかれ GVHD が発症する。急性膵炎は GVHD の一病態として, または制癌剤により, あるいは双方の侵襲で急性膵炎が発症する。一方自己移植における急性膵炎の発症は制癌剤によるものと考えられる。

化学療法による急性膵炎は, 1970年に Shaw ら³⁾ によって報告されて以来, ロイナーゼによるものが多く, Sahu ら⁴⁾ の統計によるロイナーゼによる急性膵炎の発症率は2% (915例中19例) である。Shimizu ら⁵⁾ はロイナーゼを投与した9名の小児症例は血中トリプシン, エラスターゼ-1 が有意に上昇したことを報告している。

われわれも通常量でのロイナーゼ投与により重症急性膵炎を2例経験しており, 今後ロイナーゼと急性膵炎の発症との関係をさらに検討する必要性を感じた。

ロイナーゼ以外の薬剤での急性膵炎の発症についても, azathioprine, chlorothiazide, furosemide, isosfamide, cisplatin 等による急性膵炎の発症例が報告されているが, その発症率等についての報告はない。

制癌剤による急性膵炎の発症機序は, 膵液の過剰分泌, 膵内毛細血管障害による血流障害等が考えられているがその本態は不明である。

Salomone ら⁶⁾ は同種幹細胞移植併用大量化学療法患者26例中2例 (7.7%), Shore ら⁷⁾ は68例中3例 (4.4%) の急性膵炎の発症を報告している。

これらの発症率はわれわれの26例中1例 (3.8%) と大差ないが, Ko ら⁸⁾ は同種骨髄移植後死亡症例の剖検で187例中51例 (28%) を急性膵炎と診断している。これは, 病理学的には臨床的診断より高率に急性膵炎が発生している事を示している。

同種移植（26例） 自己移植（24例）

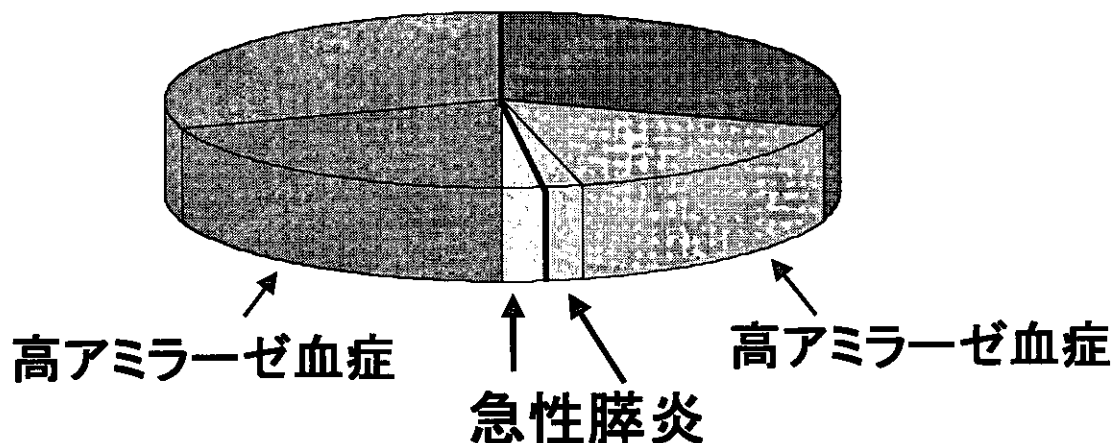


図2. 大量化学療法による急性膵炎と高アミラーゼ血症の発症率

同種移植（26例） 自己移植（24例）

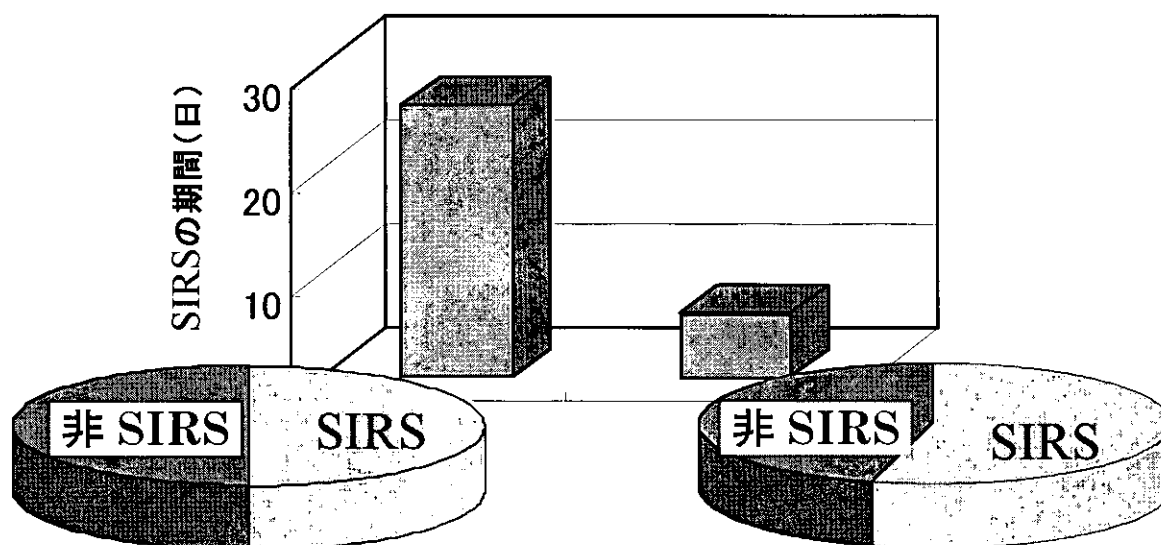


図3. SIRSの発症率とその期間

同種移植ではGVHDにより、複数の重要臓器の微細血管内皮細胞障害、DIC等により臓器の機能障害が惹起されるが、急性膵炎もその一病態として発生するものと考えられる。その他、同種移植においては50%に高脂血症が発症した。この高脂血症と急性膵炎や高アミラーゼ血症との間には、症例が少なく相関は得られなかったが、今後症例を増やして検討したい。

SIRSの発症率は、同種移植と自己移植で差がなかったが、SIRSの期間は同種移植において著明に遷延した。われわれはSIRSが5日以上遷延すると合併症発生率が高くなることを報告^{9,10)}してきたが、同

種移植の SIRS 平均期間は24.2日と長く、消化管、肝、呼吸器等の臓器障害を併発した。

今回の検討では大量化学療法における急性膵炎の発症は4%に過ぎなかったが、40%は高アミラーゼ血症を来しており、Koら⁸⁾の報告にみられるように病理学的には臨床では診断できない急性膵炎が高率に発生しているものと考えられる。約半数の症例が SIRS を発症しており、化学療法を行うときには常に急性膵炎の発生を念頭においた診療が必要である。

大量化学療法は予想される侵襲であるので、その治療前に対策をこうじる事が出来る。ただ、通常の侵襲時に惹起される生体反応と異なり、化学療法により好中球がほぼ無くなった状態での生体反応であり、現時点ではどのような対策が良いのか不明な点が多い。プロテアーゼインヒビターの前投与等を初めとして今後検討を加えたい。

参 考 文 献

- 1) 厚生省特定疾患難治性膵疾患調査研究班(齊藤洋一班長)報告書, 1990.
- 2) Members of the American college of chest physicians/society of critical care medicine consensus conference committee. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. *Crit Care Med* 1992; 20: 864-74.
- 3) Shaw MT, Barnes CC, Madden FJ, Bagshawe KD. L-asparaginase and pancreatitis. *Lancet* 1970; 2: 721.
- 4) Sahu S, Saika S, Pai SK, Advani SH. L-asparaginase (Leunase) induced pancreatitis in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Pediatr Hematol Oncol* 1998; 15: 533-8.
- 5) Shimizu T, Yamashiro Y, Igarashi J, Fujita H, Ishimoto K. Increased serum trypsin and elastase-1 levels in patients undergoing L-asparaginase therapy. *Eur J Pediatr* 1998; 157: 561-3.
- 6) Salomone T, Tosi P, Raiti C, Stanzani M, Leopardi G, Migio F, Bandini G. Clinical relevance of acute pancreatitis in allogeneic hemopoietic stem cell (bone marrow or peripheral blood) transplants. *Dig Dis Sci* 1999; 44: 1124-7.
- 7) Shore T, Bow E, Greenberg H, Persad R, Patterson D, Rubinger M, Schroeder ML. Pancreatitis post-bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant* 1996; 17: 1181-4.
- 8) Ko CW, Gooley T, Schoch HG, Myerson D, Hackman RC, Shulman HM, Sale GE, Lee SP, McDonald GB. Acute pancreatitis in marrow transplant patients: prevalence at autopsy and risk factor analysis. *Bone Marrow Transplant* 1997; 20: 1081-6.
- 9) Haga Y, Beppu T, Doi K, Nozawa F, Mugita N, Ikei S, Ogawa M. Systemic inflammatory response syndrome and organ dysfunction following gastrointestinal surgery. *Crit Care Med* 1997; 25: 1994-2000.
- 10) 池井聰, 小川道雄. 急性膵炎と SIRS. *医学のあゆみ* 1997; 181: 52-6.

急性膵炎における膵内 metallothionein の変化と誘導効果

研究報告者 木村 理
山形大学第一外科

共同研究者 神賀 正博 工藤 俊平 井一郎
蜂谷 修 布施 明

要旨： Metallothionein (以下 MT) は細胞内金属結合蛋白で、重金属の代謝解毒に関する役割が提唱されてきたが、最近では free radical scavenger としての作用も報告されている。そこで今回、MT はその抗酸化作用によって急性膵炎の進展を抑制するのではないかと考え、セルレイン膵炎における MT の作用について検討した。

1) セルレイン膵炎を作成し、膵内 MT の経時的变化を検討したところ、膵内 MT は12時間後以降の膵炎回復期に高値を示した。2) MT 誘導目的で亜鉛またはカドミウムを投与すると、膵内 MT はそれぞれ対照群の約16倍、3.3倍と著明に増加し、さらに MT 誘導状態で膵炎を作成すると、膵酵素上昇、膵浮腫が著明に改善した。

以上の結果から、MT は急性膵炎の進展に対して抑制的に作用している可能性が推定された。

はじめに

Metallothionein (以下 MT) は分子量約6500の細胞内金属結合蛋白であり、システインが構成アミノ酸の1/3を占め、芳香族アミノ酸を含まず、通常1分子あたり7個の金属原子と結合する¹⁾。その生理作用としてカドミウム、水銀など有害金属の解毒作用、銅、亜鉛などの必須金属の恒常性の維持等が報告されている¹⁾。MT は亜鉛、カドミウムなどの重金属により誘導されるが²⁾、更に各種ストレスやエンドトキシン³⁾、グルココルチコイド⁴⁾、サイトカイン⁵⁾などによっても誘導されることからその組織保護作用が指摘され、free radical scavenger としての抗酸化作用も報告されている⁶⁾。しかし、MT に関する報告は肝、腎に関するものが多く、膵に関する報告はきわめて少ない。

現在 free radical は急性膵炎の重症化に関与する因子の一つと考えられているが、本研究では MT の抗酸化作用に着目し、セルレイン膵炎における MT の変動と MT 誘導のセルレイン膵炎に対する影響について検討した。

対象と方法

実験には Wistar 系雄性ラット (体重約200 g) を使用し、膵炎作成約12時間前から実験終了まで絶食とした。

実験1：セルレイン膵炎における膵内 MT の経時的变化

ラットにセルレイン (100 μ g/kg体重) を腹腔内に単回投与し、膵炎を作成した。対照群には同量の生理食塩水を投与した。セルレイン投与前、投与後3、6、12、24、48時間に膵を摘出し、MT を測定

した。

実験2：金属によるMT誘導とセルレイン膵炎に対する影響

ラットに亜鉛（5 mg/kg体重）またはカドミウム（2 mg/kg体重）を24時間間隔で2回腹腔内投与し、最終投与24時間後に実験1と同様にセルレインを投与した。セルレイン投与前に膵内MTを、セルレイン投与6時間後に血中膵酵素、膵重量体重比を測定した。膵重量体重比は全膵湿重量（mg）を体重（g）で割った値で、膵浮腫の指標とした。

結 果

1. 膵内MTの経時的变化

膵内MTは、膵炎作成6時間後まではセルレイン群対照群共に増加した。対照群ではその後徐々に減少するのに対し、セルレイン群では6時間以降も増加し、12時間後には $632.7 \pm 172.6 \mu\text{g/g protein}$ 、24時間後には $678.6 \pm 225.2 \mu\text{g/g protein}$ となり、対照群と比較して有意（ $p < 0.01$ ）に高値を示した。また48時間後でも対照群と比較して高値であった（ $p < 0.05$ 、図1）。

2. 亜鉛、カドミウム投与による膵内MTの誘導

亜鉛またはカドミウムを投与よると、膵内MTは亜鉛投与群では $6824.8 \pm 856.8 \mu\text{g/g protein}$ 、カドミウム投与群では $1393.6 \pm 287.6 \mu\text{g/g protein}$ となり、それぞれ無処置群（ $425.3 \pm 108.1 \mu\text{g/g protein}$ ）の約16倍、約3.3倍と著明に増加していた（ $p < 0.01$ 、図2）。

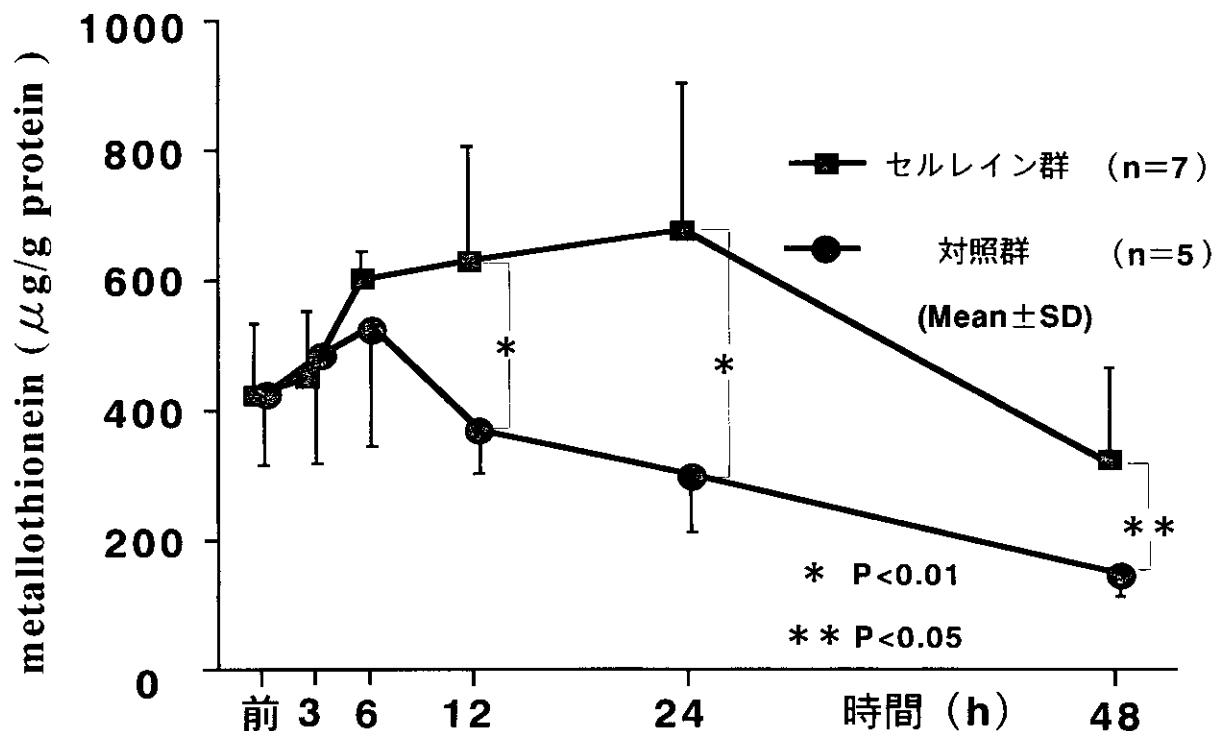


図1. 膵内MTの経時的变化

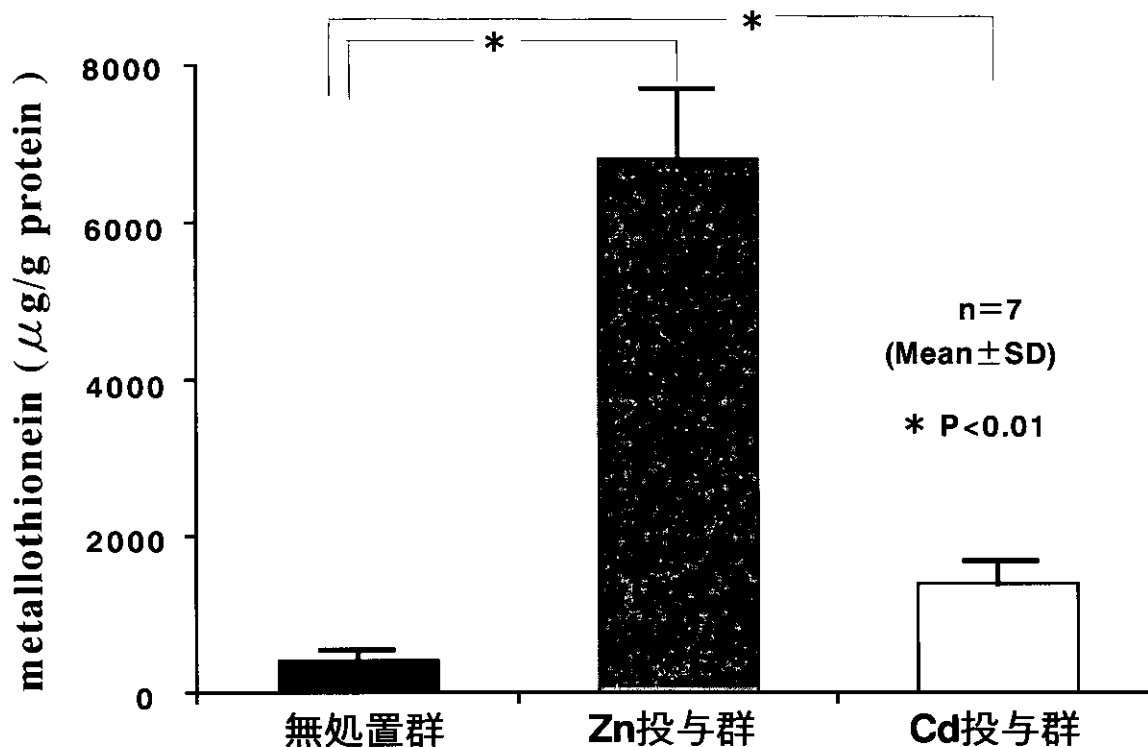


図 2. 金属投与後脾内 MT

3. MT 誘導のセルレイン脾炎に対する影響

金属投与にて MT を誘導後セルレイン脾炎を作成すると、6 時間後の血中アミラーゼは無処置群が $10613.4 \pm 1861.0 \text{IU/l}$ であるのに対し、亜鉛投与群では $2331.7 \pm 890.6 \text{IU/l}$ 、カドミウム投与群では $3973.3 \pm 3095.2 \text{IU/l}$ となり、金属投与群では有意に低値を示した ($p < 0.01$, 図 3 a)。血中リパーゼも同様に無処置群 $1998.2 \pm 543.8 \text{IU/l}$ 、亜鉛投与群 $67.2 \pm 57.6 \text{IU/l}$ 、カドミウム投与群 $146.1 \pm 110.8 \text{IU/l}$ となり、金属投与群で有意に低値を示した ($p < 0.01$, 図 3 b)。脾浮腫の指標とした脾重量体重比は、無処置群が 9.70 ± 0.86 であるのに対し、亜鉛投与群は 5.42 ± 0.42 、カドミウム投与群では 5.40 ± 0.61 となり、金属投与により脾浮腫が有意に改善した ($p < 0.01$, 図 3 c)。

考 察

MT は多量の金属を含む低分子蛋白として発見され、主に重金属毒性や必須微量金属代謝の面から研究されてきたが、金属以外にも各種ストレス、サイトカイン等多様な因子で誘導されることが判明し、最近では炎症や組織障害における急性相蛋白であるとも考えられている⁷⁾。また MT の free radical scavenger 作用は四塩化炭素やパラコート投与、放射線照射など、free radical 産生状態で MT が誘導されることから提唱されている⁷⁾。in vitro の実験では OH \cdot との反応性が高く⁸⁾、in vivo の実験からも MT をあらかじめ誘導することにより、free radical 産生剤投与による致死作用の抑制が報告されている。そこで本研究では、free radical の関与が指摘されているラットセルレイン脾炎における MT の作用を検討した。

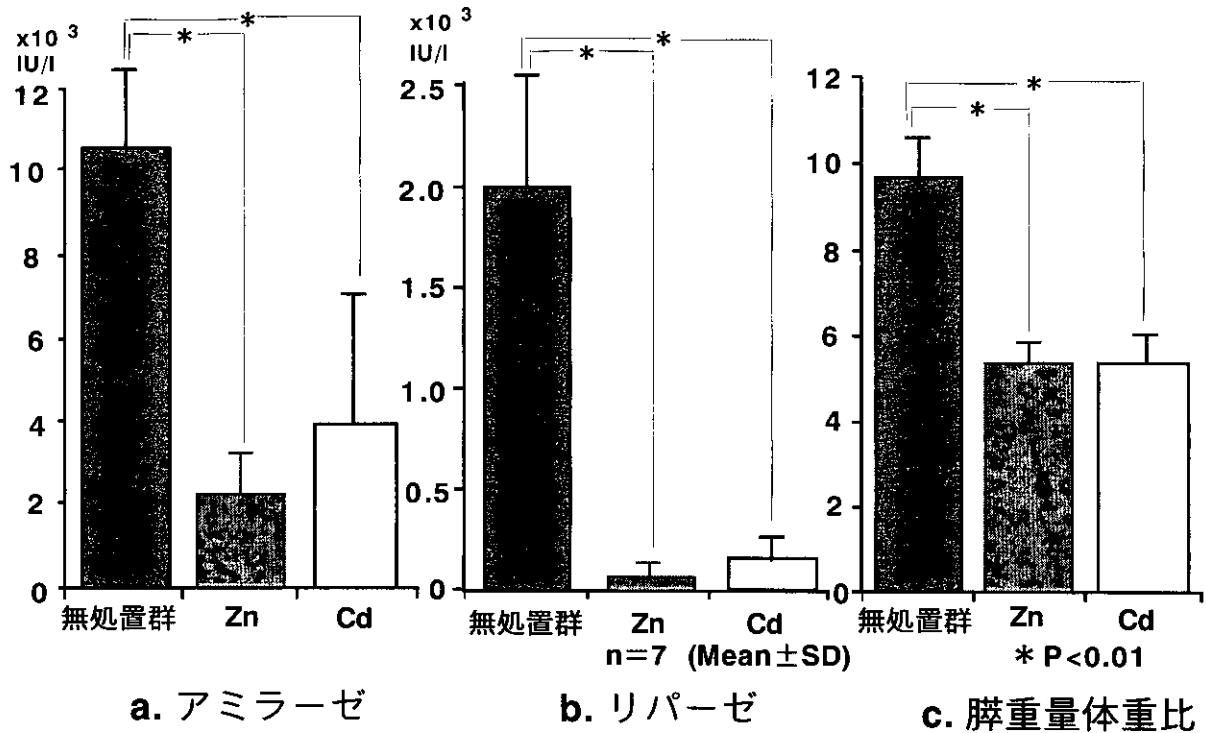


図3. MT誘導のセルレイン膵炎に対する効果

MTは絶食のみでも増加することが報告されており、6時間後までは対照群も同様に増加することから、膵炎作成直後のMT増加は絶食の影響と推定される。しかしその後の上昇は急性膵炎に対するMTの反応と考えられる。MT増加の機序については、サイトカインによるMT誘導も報告されており⁹⁾、急性膵炎に伴う高サイトカイン血症がMTの誘導に関与した可能性がある。また、ラット肝切除後の再生肝におけるMT増加の報告⁹⁾や、細胞増殖との関連を示す報告⁹⁾もあることから、膵炎の回復期の高値を示したのは、MTが膵炎で障害を受けた細胞の修復過程へ関与しているためと考えられる。

さらに、急性膵炎におけるMTの作用を検討するため、あらかじめMTを誘導後セルレイン膵炎を作成した。MT誘導物質としては亜鉛とカドミウムを選択した。亜鉛は膵における有力なMT誘導金属とされているが、以前から膜安定作用やNADPH-cytochrome c reductase活性阻害、glutathione peroxidase活性刺激によるfree radical産生抑制作用も報告されていることから、あえて有害物質であるカドミウムも誘導物質として選択した。亜鉛によるMT誘導では、MT以外に還元型Glutathioneの増加も指摘されており、MT以外の抗酸化機構によって膵炎が軽症化した可能性は否定できない。一方、カドミウム投与ではCatalaseやGlutathione peroxidase活性の低下が報告されており¹⁰⁾、カドミウムの前投与により抗酸化機構は抑制状態にあると推定される。しかしカドミウムによるMT誘導でも膵炎は改善しており、MTがその抗酸化作用により膵炎の重症化を抑制した可能性が示唆された。

生体内には酸化的ストレスに対する様々な抗酸化機構が存在しており、MTと他の抗酸化機構との関係についてさらなる検討が必要である。

参 考 文 献

- 1) 鈴木和夫. メタロチオネインの構造と機能. 日本臨床 1996; 54: 33-9.
- 2) Onosaka S, Cherian MG. The induced synthesis of metallothionein in various tissues of rats in response to metals. II. Influence of zinc status and specific effect on pancreatic metallothionein. Toxicology 1982; 23: 11-20.
- 3) De SK, McMaster MT, Andrews GK. Endotoxin induction of murine metallothionein gene expression. J Biol Chem 1900; 265: 15267-74.
- 4) Bracken WM, Klaassen CD. Induction of metallothionein by steroids in rat primary hepatocyte cultures. Toxicol Appl Pharmacol 1987; 87: 381-8.
- 5) Sato M, Sasaki M, Hojo H. Antioxidative roles of metallothionein and manganese superoxide dismutase induced by tumor necrosis factor- α and interleukin-6. Arch Biochem Biophys 1995; 316: 738-44.
- 6) Thornalley P J, Vasak M. Possible role for metallothionein in protection against radiation-induced oxidative stress. Kinetics and mechanism of its reaction with superoxide and hydroxyl radicals. Biochim Biophys Acta 1985; 827: 36-44.
- 7) Sato M, Sasaki M, Hojo H. Induction of metallothionein by oxidative stress and possible role in acute phase response. In: Suzuki KT, Imura N, Kimura M, editors. Metallothionein III Biological Roles and Medical Implications. Basel: Birkhauser Verlag, 1993: 125-40.
- 8) Nishimura H, Nishimura N, Tohyama C. Immunohistochemical localization of metallothionein in developing rat tissues. J Histochem Cytochem 1989; 37: 715-22.
- 9) Tsujikawa K, Imai T, Kakutani M, Kayamori Y, Mimura T, Otaki N, Kimura M, Fukuyama R, Shimizu N. Localization of metallothionein in nuclei of growing primary cultured adult rat hepatocytes. FEBS Lett 1991; 283: 239-42.
- 10) Jamall I S, Smith J C. Effects of cadmium and dietary selenium on cytoplasmic and mitochondrial antioxidant defense systems in the heart of rats fed high dietary copper. Toxicol Appl Pharmacol 1987; 87: 102-10.

実験急性膵炎における腸粘膜の変化について

研究報告者 黒田 嘉和

神戸大学第一外科

共同研究者 竹山 宜典

要旨：重症急性膵炎における腸管粘膜の変化に注目し、5%デオキシコール酸膵管内逆行性注入によるラット実験膵炎モデルを用いて空腸粘膜の変化を解析した。膵炎作成後経時的に空腸粘膜絨毛高、空腸粘膜ムチン含有量を測定したところ、膵炎作成後、経時的に減少傾向を示し、24時間後には両者とも対照群に比較して有意な減少を示した。腸管粘膜が早期から萎縮し、特に腸内細菌叢に対する腸管の機械的バリアーとして重要である粘膜ムチンが減少していることが判明した。本モデルでは膵炎作成24時間後には、膵および腸間膜リンパ腺への感染成立が確認されており、腸内細菌の腸管壁を介した bacterial translocation の成立に、急性膵炎発症早期の腸管粘膜の量的・質的变化が関与していることが示唆された。

背景と目的

重症急性膵炎では、発症後期の感染から敗血症を引き起こすことが問題となっている。しかし、膵または膵周囲の壊死組織への感染は比較的早期に成立されているとされ、その起源として腸内細菌の bacterial translocation が想定されている^{1,2)}。その要因としては、炎症の波及による麻痺性イレウスから引き起こされる bacterial overgrowth、腸管血行の障害による虚血・浮腫などの腸管壁の変化、腸管固有粘膜層の免疫担当細胞や全身の免疫担当細胞の細胞性免疫障害などが想定される^{3~6)}。さらに、腸内細菌に対する直接的バリアーである腸管粘膜の変化も予想される。そこで、今回は急性膵炎における急性期の腸管粘膜の変化を明らかにする目的で、ラット実験急性膵炎モデルを用いて空腸粘膜の器質的变化を解析した。

方 法

1) 実験モデル

膵炎モデルとしては、Wistar 系雄性ラット (250–300 g) の胆膵管に 5%デオキシコール酸を逆行性に注入して作成した壊死性膵炎モデルを用いた。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) 空腸粘膜絨毛高の解析

膵炎作成24時間後に幽門輪から15cmの小腸を採取し、ホルマリン固定・パラフィン包埋し、5 μm の

薄切切片を作成した後、Hematoxylin-Eosin(HE)染色を行った。染色された小腸粘膜の絨毛高を顕微鏡下に測定した。

4) 空腸粘膜ムチン量の解析

膵炎作成24時間後に幽門輪から15cmの部位の小腸を採取し、粘膜を抽出・酸処理後にHPLCを行い、総ムチン分画のヘキソース量を測定した。ムチン量の比較に当たっては単位蛋白あたりの総ムチン分画のヘキソース量を算出し、無処理群に対する比にて表現した。

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に感染は検出されなかったが、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認めた。さらに、膵局所においても同様の感染を高率に認め、本モデルにおいては比較的早期からいわゆる bacterial translocation が成立していると考えられた。

そこで、すでに感染が成立している膵炎作成後24時間までの、小腸粘膜の変化を経時的に解析した。まず、空腸壁の絨毛高を測定した結果では、図2に示すように sham op. 群と比較して、膵炎群では徐々に絨毛が菲薄化する傾向がみられ、24時間後には sham op. 群と比較して有意な絨毛高の低下を認めた。また、小腸粘膜ムチン総量についても同様の傾向が認められ、膵炎作成後経時的に低下傾向がみられ24時間後には sham op. 群に比べて有意な減少が観察された。

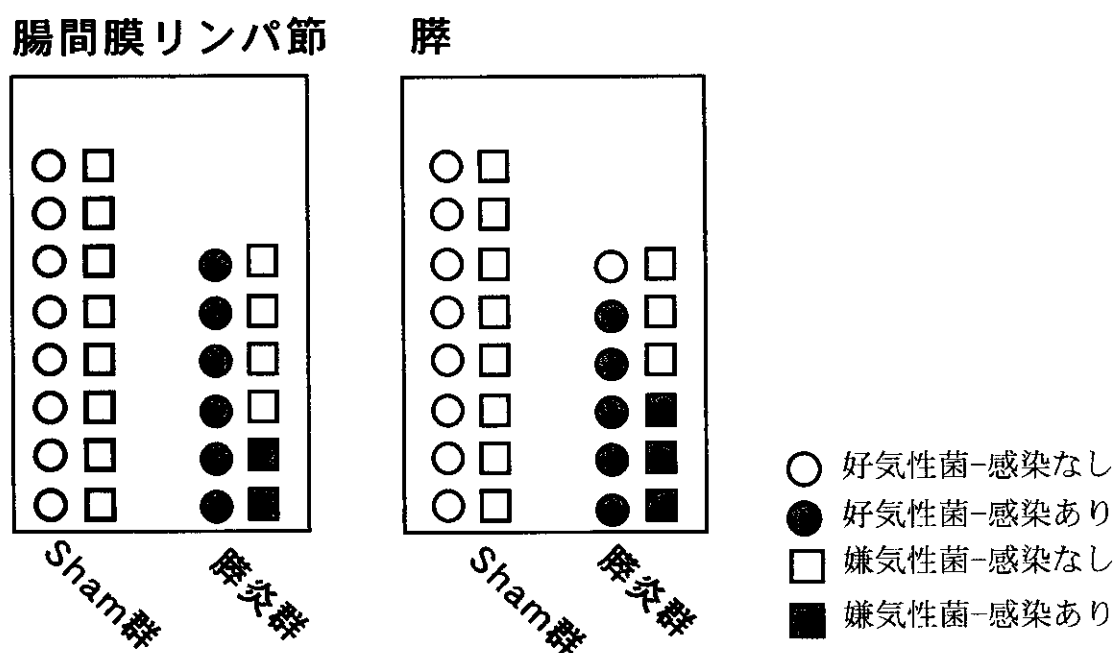


図1. DCA膵炎モデルにおける腸間膜リンパ節と膵への感染
—膵炎作成24時間後—

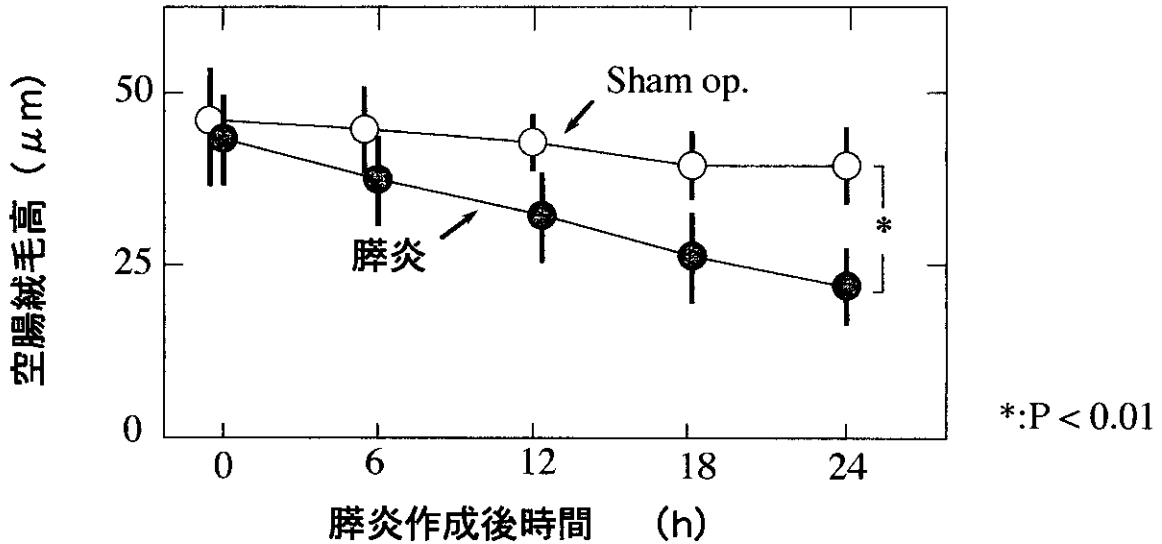


図 2. DCA 膵炎モデルにおける小腸絨毛高の経時的変化

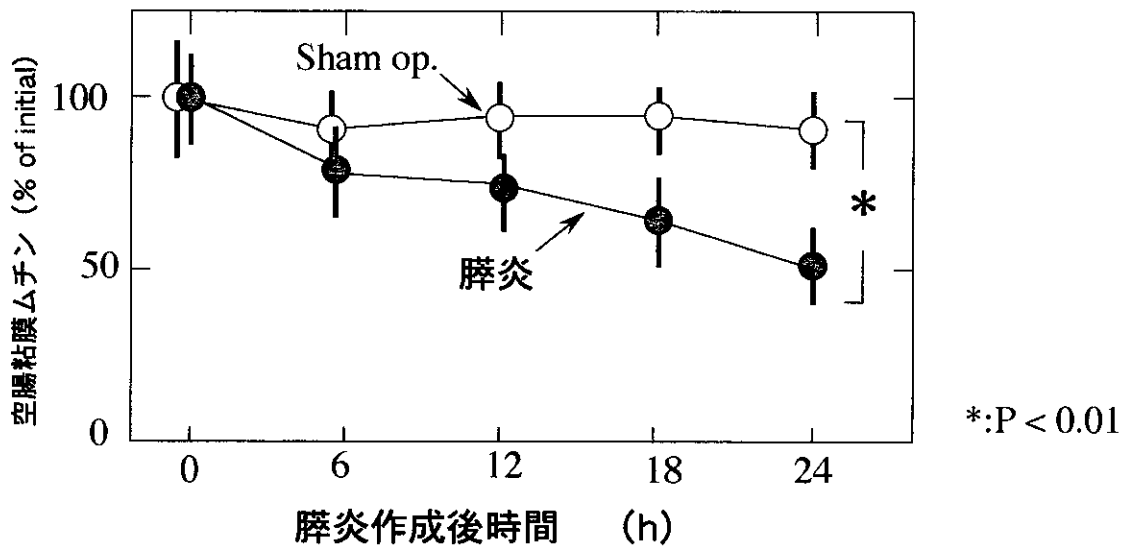


図 3. DCA 膵炎モデルにおける小腸粘膜ムチン量の経時的変化

考 察

重症急性膵炎では、発症後期に膵や膵周囲後腹膜組織の壊死部分に感染を併発し、敗血症から死亡する症例が少なくない。したがって、重症急性膵炎の治療においては感染の回避が重要な課題と考えられる。その感染源として腸内細菌叢を起源とした bacterial translocation が想定されているが、その発生機序として、腸内細菌が膵炎に併発する麻痺性イレウスにより異常繁殖 (bacterial overgrowth) すること、炎症の波及で腸管自体の細菌に対するバリアー機構が破綻することなどが考えられる。

腸管自体の細菌に対するバリアーとして最も原始的な機構は、腸管粘膜の機械的防御機構である。実