

考 察

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) β 顆粒内容の細胞外への放出、に大きく分けられるが⁴⁾、急性膵炎病態下でこれらのシステムの変化は現在のところ明らかとなっていない。我々は、ラットタウロコール酸浮腫性膵炎モデルを用い、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 (GLUT 2)⁵⁾ の変化を報告してきた²⁾。このモデルでは、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、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が、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 GLUT 2 の発現に変化は認めなかったことより、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 1 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に障害が生じている可能性が考えられた。

本実験では、正常単離 islet にトリプシン処理を加えることで、急性膵炎の *in vitro* 環境下における islet のインスリン分泌能の検討を行った。トリパングルー取り込みは高濃度 (1%) トリプシン処理によっても認められず、このことは膵炎環境下における islet の viability は保たれていることを間接的に示唆するものと考えられた。一方、種々の濃度のトリプシン処理後の単離 islet におけるグルコース刺激によるインスリン分泌能は、トリプシン濃度依存性に低下することが明らかとなった。以上のことから、急性膵炎で認められる耐糖能障害はトリプシンなどの活性化された酵素により、islet 内部環境の機能的変化、特にインスリンシグナル伝達系の障害が惹起されることによって生じている可能性が考えられる。

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+} 、cAMP⁶⁾、syntaxin 1⁷⁾ の解析が必要であると考えられた。

参 考 文 献

- 1) 跡見 裕, 杉山政則, 中島正暢, 阿部展次. 実験急性膵炎における内分泌障害の機序. 難治性膵疾患に関する調査研究班 平成11年度研究報告書. 2000: 77-81.
- 2) Kinami Y, Mura T, Sugii M, Miyazaki I. Function of pancreatic endocrine cells in experimental acute pancreatitis. *World J Surg* 1982; 6: 471-7.
- 3) Nagamatsu S, Watanabe T, Nakamichi Y, Yamamura C, Tsuzuki K, Matsushima S. α -Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein is expressed in pancreatic β cells and functions in insulin but not γ -aminobutyric acid secretion. *J Biol Chem* 1999; 274: 8053-60.
- 4) 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.
- 5) Watanabe T, Nagamatsu S, Matsushima S, Kondo K, Motobu H, Hirose K, Mabuchi K, Kirino T, Uchimura H. Developmental expression of GLUT2 in the rat retina. *Cell Tissue Res* 1999; 298: 217-23.
- 6) 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.
- 7) 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 β cells. *J Biol Chem* 1996; 271: 1160-5.

腹腔内細胞の動態からみた急性膵炎進展の病態解明

研究報告者 松野正紀

東北大学第一外科

共同研究者 武田和憲 砂村真琴 渋谷和彦
三上幸夫

要旨 : Wistar 系雄性ラットを用い、急性膵炎時における腹腔内細胞の動態を flowcytometry を用いて解析した。また、急性膵炎腹水の腹腔内マクロファージに対する影響について検討した。軽症膵炎モデルでは発症から24時間後に腹腔内へのマクロファージの動員を認めたが、重症膵炎モデルでは逆に腹腔内マクロファージ数は減少した。腹腔内好中球数は軽症膵炎モデルでは経時的に増加したが、重症膵炎モデルでは一時的な増加の後、減少した。腹腔内マクロファージに重症膵炎腹水（濃度50%）を添加すると、24時間後までにマクロファージは死滅した。急性膵炎発症早期の炎症進展には主として常在性のマクロファージが関与すると考えられた。また、重症急性膵炎モデルにおける腹腔内マクロファージと好中球の減少は膵炎腹水の細胞障害作用が原因であると推測された。この現象と急性膵炎進展との関連については、さらに検討が必要であると考えられた。

背景と目的

近年、急性膵炎の重症化にはサイトカインが大きく関与していることが明らかになってきた。急性膵炎では膵、肝、肺などでIL-1 β やTNF- α が産生され、これらによってIL-6やIL-8などのサイトカインが誘導されて、炎症反応が進展していくと考えられている¹⁾。急性膵炎では腹水中や門脈血中のIL-1 β やTNF- α も高値を示すことが報告されており^{2,3)}、サイトカイン産生の場所として、腹腔内も重要視されている⁴⁾。この腹腔内でのIL-1 β やTNF- α の産生細胞として、腹腔内マクロファージが注目されているが⁵⁾、急性膵炎時における腹腔内マクロファージの動態は不明であり、腹腔内マクロファージと急性膵炎進展との関連についても、未だ明らかにはされていない。また、好中球も活性酸素や好中球エラスターゼなどを放出し、炎症の進展に関与すると考えられているが⁶⁾、急性膵炎時における腹腔内の好中球の動態についても明らかにされていない。そこで、今回、急性膵炎における腹腔内細胞（特に腹腔内マクロファージと好中球）の動態を明らかにし、腹腔内細胞の動態からみた急性膵炎進展の病態解明を目的とした。

方法

（実験 A）Wistar 系雄性ラット（200~250g）を用い、生理的食塩水（1 ml / kg）を胆膵管内に逆行性に注入して軽症膵炎モデルを作成した。また、同量の5%タウロコール酸を同様に注入して重症膵炎モデルを作成した。両群とも1, 6, 12, 24時間後に犠死させ、腹腔内に冷PBS液30mlを注入して洗

浄し、腹腔内洗浄液を回収した。腹腔内洗浄液中の総細胞数を計測後、腹腔内細胞に抗マクロファージ抗体（抗ED 1あるいは抗ED 2抗体）、抗顆粒球抗体（抗Gr抗体）、7-aminoactinomycin Dを加えて3重染色し、flowcytometryを用いて解析した。最後に各時点における腹腔内洗浄液中の総細胞数とflowcytometryで解析した各時点のマクロファージ分画および好中球分画の割合を乗じ、腹腔内洗浄液中のマクロファージ数および好中球数を算出した。

（実験 B）正常ラットを犠死させ、実験 Aと同様に腹腔内洗浄液を回収して、プラスチックプレートに散布した。37℃、2時間培養後、上清を除き、プレートに吸着した細胞を回収した。回収した細胞は実験 Aと同様に抗マクロファージ抗体（抗ED 1抗体）、抗顆粒球抗体（抗Gr抗体）、7-aminoactinomycin Dを加えて3重染色し、flow cytometryを用いて解析した。別のラットに実験 Aと同様に軽症および重症膵炎モデルを作成し、それぞれ6時間後に腹水を採取した。採取した腹水を50%の濃度に調整して（50% PAAF）、回収した細胞（ 1×10^6 個）に添加した。1, 6, 12, 24時間後に細胞を回収し、0.2%トリパンブルーによる染色によって各時点における生細胞数を計測した。

結 果

（実験 A）

腹腔内洗浄液中総細胞数（図1）；

軽症膵炎モデルでは腹腔内洗浄液中の総細胞数は経時的に増加した。重症膵炎モデルでは膵炎作成後6時間までは一時的に増加したが、以後減少した。

Flowcytometryによる腹腔内細胞の動態解析；

軽症膵炎モデルでは12時間後までED 1 (+), Gr (+) 分画（マクロファージ分画）は減少したが、24

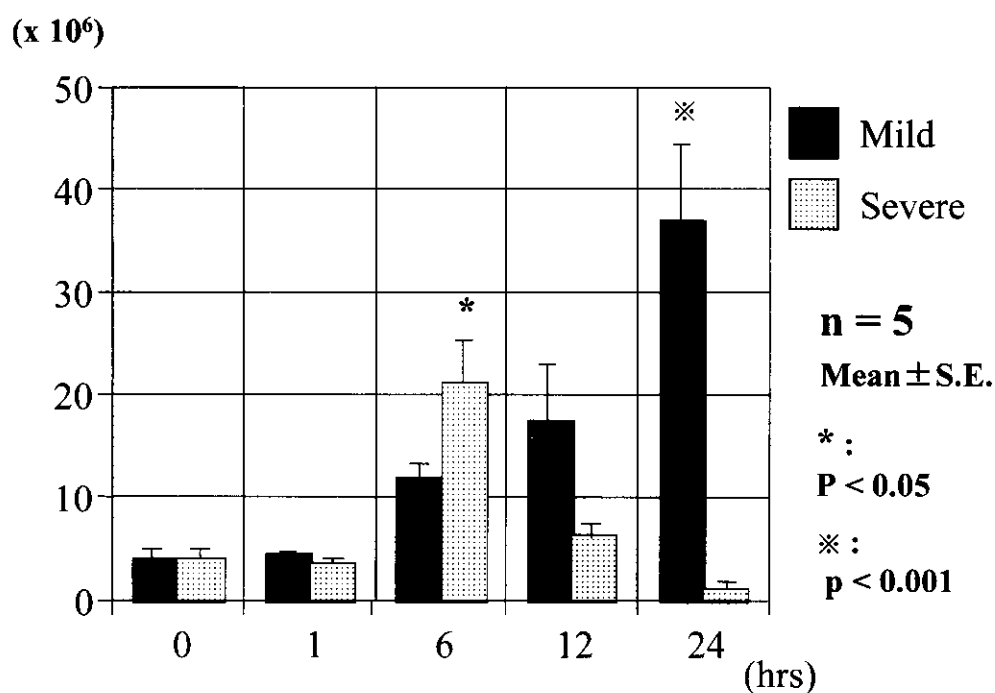


図1. 腹腔内洗浄液中総細胞数

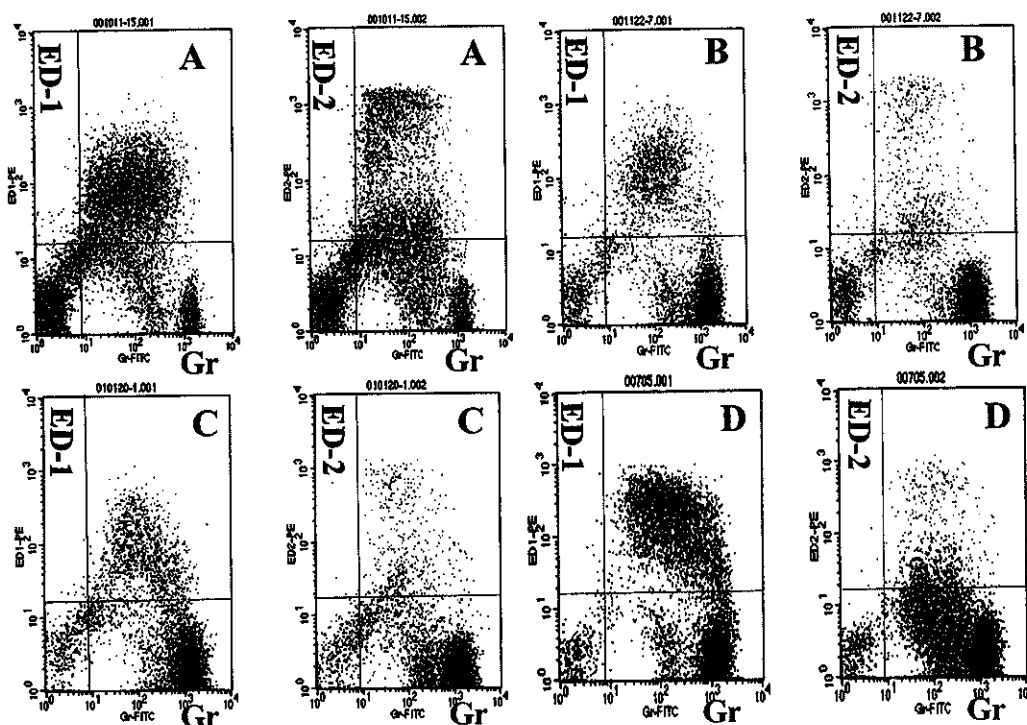


図 2. Flowcytometry による腹腔内細胞の動態解析

(軽症肺炎モデル：A：1 hr, B：6 hrs, C：12hrs, D：24hrs after induction)

腹腔内マクロファージ分画 (ED 1 (+), Gr (+)) は12時間後までは減少したが、24時間後で著明に増加した。増加した腹腔内マクロファージ分画は ED 2 (-) であった。好中球分画 (ED 1 (-), ED 2 (-), Gr (+)) は経時的に増加した。

時間後では ED 1 (+), ED 2 (-), Gr (+) 分画が増加した (図 2)。ED 1 (-), ED 2 (-), Gr (+) 分画 (好中球分画) は24時間後まで増加した。重症肺炎モデルでは、ED 1 (+), Gr (+) 分画は24時間後まで減少し、ED 1 (-), ED 2 (-), Gr (+) 分画は増加した (図 3)。

腹腔内洗浄液中マクロファージ数 (図 4)；

軽症肺炎モデルにおける腹腔内マクロファージ数は24時間後に著明に増加したが、重症肺炎モデルでは逆に経時的に減少した。

腹腔内洗浄液中好中球数 (図 5)；

軽症肺炎モデルにおける腹腔内の好中球数は経時的に増加したが、重症肺炎モデルでは6時間後までは増加したが、以後減少した。

(実験 B)

プレート吸着細胞の flowcytometry による解析 (図 6)；

プレートに吸着した細胞は95%以上がマクロファージ (ED 1 (+), Gr (+)) であると確認された。

50%PAAF 添加後のマクロファージ生細胞数 (図 7)；

軽症肺炎モデル由来の50% PAAF を添加しても24時間後までに生細胞数は変化しなかった。重症肺炎モデル由来の50% PAAF 添加した場合、12時間後で生細胞数の減少がみられ、24時間後までに生細胞は完全に消失した。

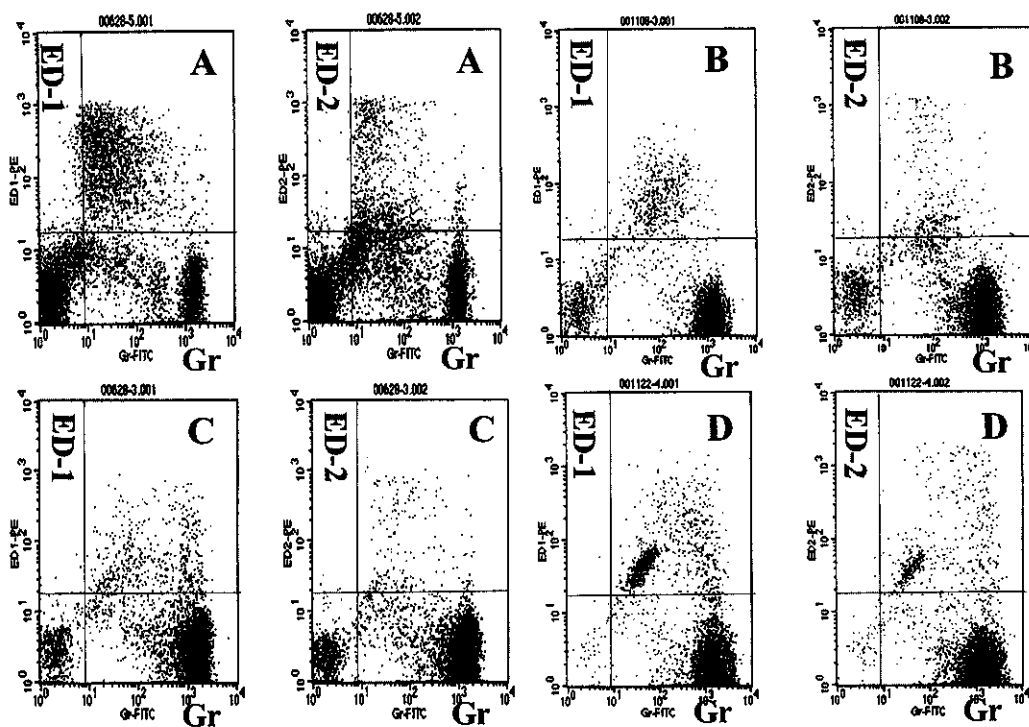


図 3. Flowcytometry による腹腔内細胞の動態解析
 (重症肺炎モデル: A: 1 hr, B: 6 hrs, C: 12hrs, D: 24hrs after induction)
 腹腔内マクロファージ分画 (ED 1 (+), Gr (+)) は24時間後まで減少した。
 好中球分画 (ED 1 (-), ED 2 (-), Gr (+)) は経時的に増加した。

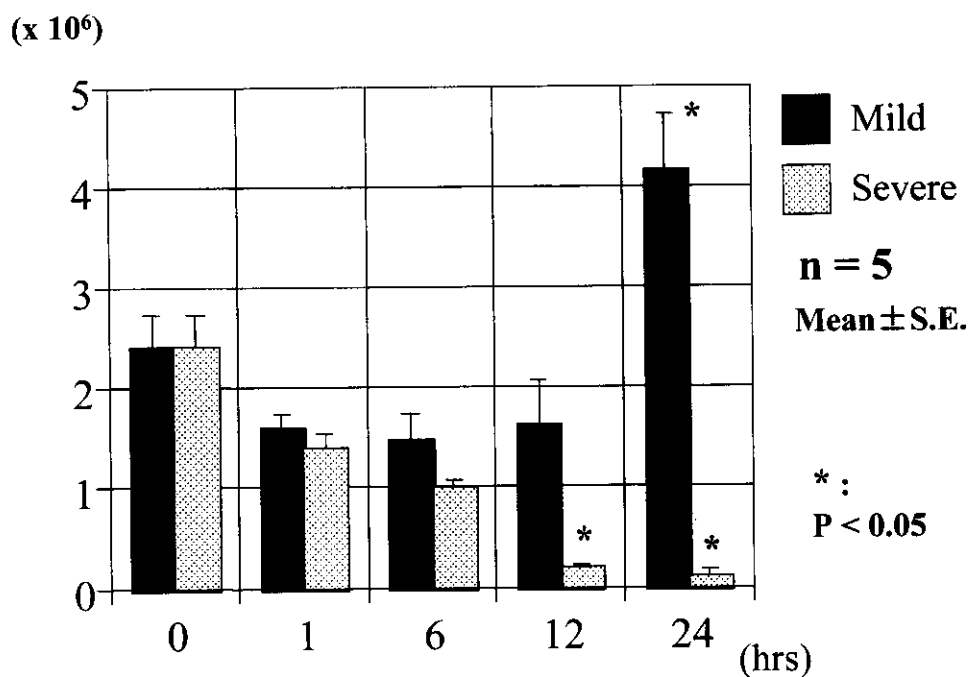


図 4. 腹腔内洗浄液中マクロファージ数

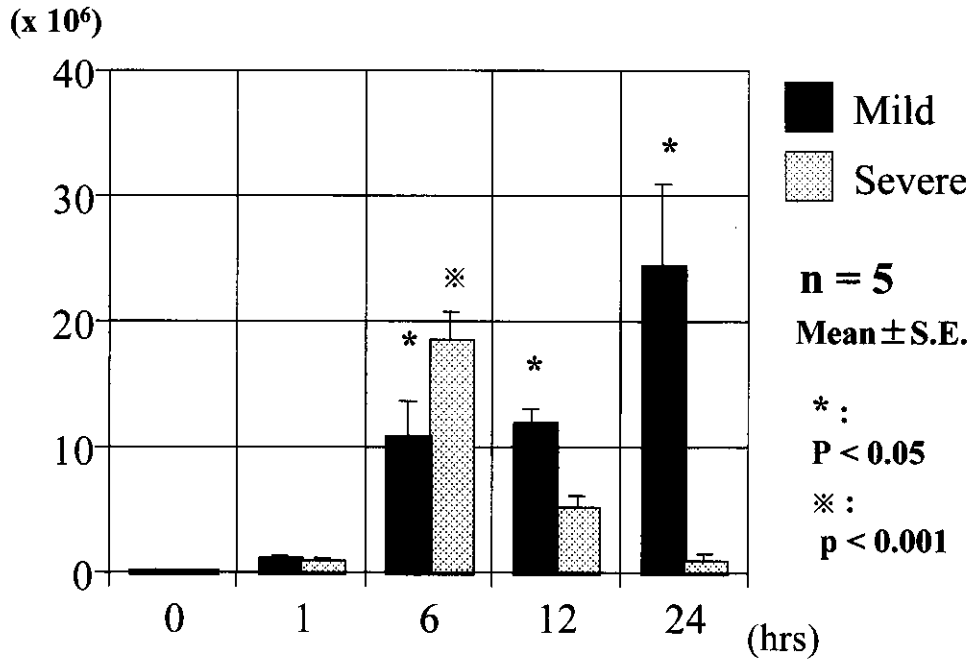


図 5. 腹腔内洗浄液中好中球数

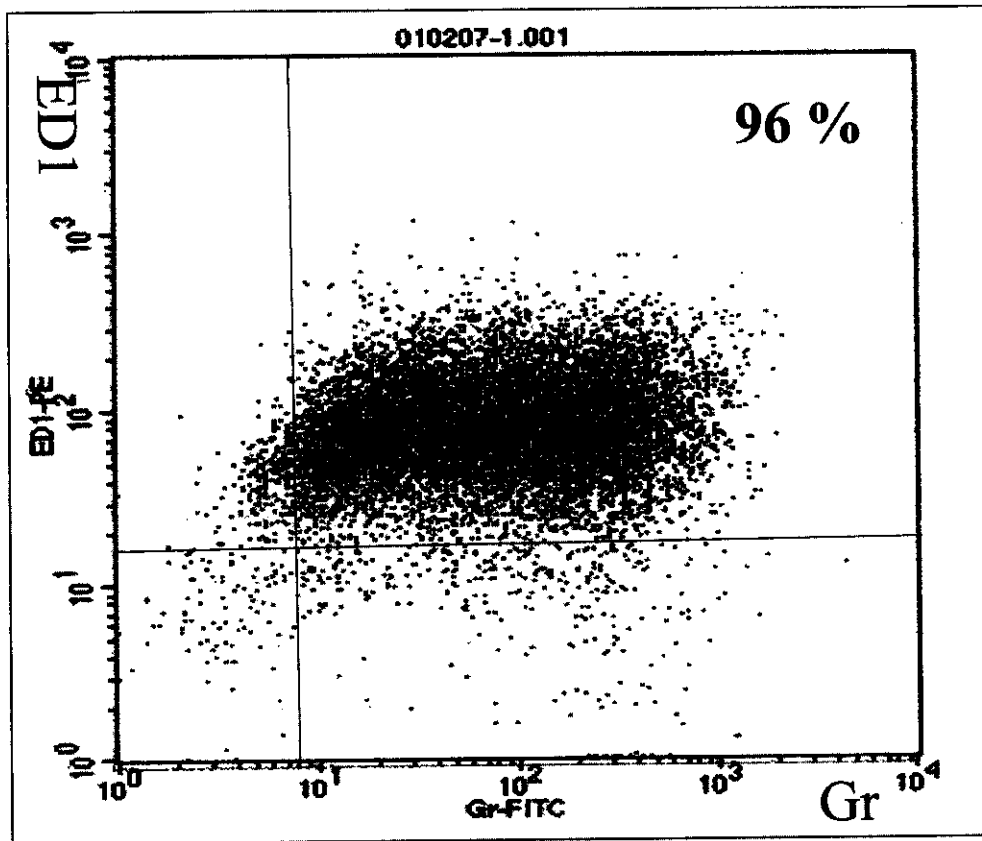


図 6. プレート吸着細胞の Flowcytometry による解析

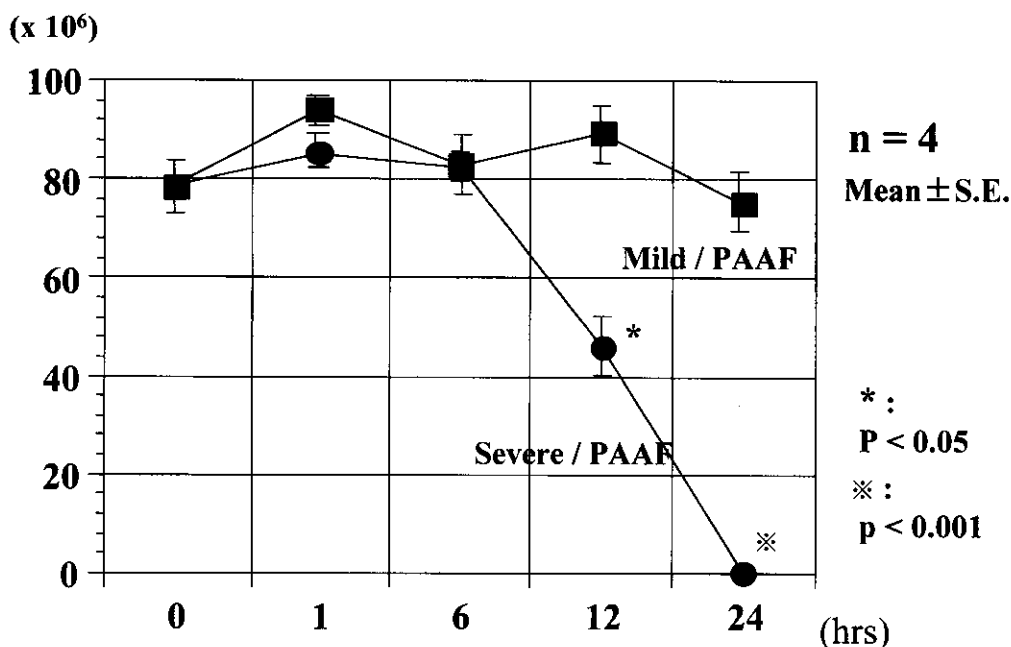


図7. 50%PAAF添加後のマクロファージ生細胞数

考 察

急性膵炎時におけるマクロファージの動態については、膵局所での報告例は散見されるが^{7,8)}、腹腔内での動態を報告したものは、われわれの検索した範囲ではみられない。これまで、腹腔内でのIL-1 β やTNF- α の産生細胞として、腹腔内マクロファージが挙げられてきた。しかし、急性膵炎における腹腔内マクロファージの動態と腹水中のIL-1 β やTNF- α 値との関連は不明であり、腹腔内マクロファージがサイトカインを介して急性膵炎の進展にどのように関与しているのか、未だ明らかにはされていない。今回我々は、急性膵炎における腹腔内細胞の動態をflowcytometryで解析した。正常ラットの腹腔内細胞の解析結果から腹腔内マクロファージはED1(+), Gr(+)であり、ED2抗原に関しては(+)と(-)の細胞が存在することが判明した。文献的にはED2(+)マクロファージは分化の進んだ組織在住型のマクロファージであり、ED2(-)マクロファージは分化の程度が低い、単球型のマクロファージであると考えられている⁹⁾。腹腔内にはこのように元来、常在性のマクロファージが存在するが、一般的に炎症が生じると局所にマクロファージが動員されてくる¹⁰⁾。今回の検討では軽症群において24時間後にED1(+), ED2(-), Gr(+)分画が増加したが、この分画が動員された単球型のマクロファージであると考えられた。即ち、急性膵炎においてマクロファージが腹腔内に誘導されるのは炎症後24時間以降と比較的遅いことが明らかとなった。我々の予備実験では、膵炎発症後1時間で腹水中のIL-1 β やTNF- α 値が上昇し、膵炎発症後24時間までには既に腹腔内へ多数の好中球が誘導されていることから、急性膵炎発症早期の炎症進展には主として常在性のマクロファージが関与すると考えられた。重症膵炎モデルでは24時間後までにマクロファージの動員は生じなかったが、重症急性膵炎では免疫系の反応低下が報告されており¹⁰⁾、これが一つの理由として考えられた。また、重症膵炎モデルでは逆に腹腔内マクロファージの減少が生じたが、これは重症膵炎腹水によるマクロファージへの障害作用が原因であると推測された。重症膵炎モデルにおける6時間後の腹腔内細胞を塗抹検鏡すると、

大部分が好中球で占められている。この所見と flowcytometry による解析結果から、好中球は ED 1 (-), ED 2 (-), Gr (+) であると考えられた。今回の検討から、好中球数も重症急性膵炎モデルでは一時的な増加の後、減少したが、この減少の機序としても、同様に重症膵炎腹水の関与が推測された。我々の予備実験では、腹腔内マクロファージが減少する重症膵炎発症後24時間で腹水中IL-1 β とTNF- α が著明に上昇することから、今後は腹腔内マクロファージや好中球の減少と急性膵炎進展との関連について、さらに検討が必要であると考えられた。

参 考 文 献

- 1) Norman J. The role of cytokines in the pathogenesis of acute pancreatitis. *Am J Surg* 1998 ; 175 : 76-83.
- 2) Takeyama Y, Nishikawa J, Ueda T, Hori Y, Yamamoto M, Kuroda Y. 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) Grewal HP, Kotb M, el-Din AM, Ohman M, Salem A, Gaber L. Induction of tumor necrosis factor in severe acute pancreatitis and its subsequent reduction after hepatic passage. *Surgery* 1994 ; 115 : 213-21.
- 4) Montraves P, Chollet-Mratin S, Marmuse JP. Lymphatic release of cytokines during acute lung injury complicating severe pancreatitis. *Am J Respir Crit Care Med* 1995 ; 152 : 1527-33.
- 5) Denham W, Yang J, Fink G, Zervos E, Carter G, Norman J. Pancreatic ascites as a powerful inducer of inflammatory cytokines. *Arch Surg* 1997 ; 32 : 1231-6.
- 6) Sanfey H, Bulkley GB, Camelon JL. The pathogenesis of acute pancreatitis. the source and role of oxygen-derived free radicals in three different experimental models. *Ann Surg* 1985 ; 201 : 633-9.
- 7) Goto M, Matsuno K, Yamaguchi Y, Ezaki T, Ogawa M. Proliferation of macrophages subpopulations in a rat experimental pancreatitis model. *Arch Histol Cytol* 1993 ; 56 : 75-82.
- 8) Yamaguchi Y, Matsuno K, Goto M, Ogawa M. In situ kinetics of aciner, duct, and inflammatory cells in duct ligation-induced pancreatitis in rats. *Gastroenterology* 1993 ; 104 : 1498-506.
- 9) Biewenga J, Marja B, Lambert F. G., Borst A, Ghufon M, Rooijen N. Macrophage depletion in the rat after intraperitoneal administration of liposome-encapsulated clodronate : depletion kinetics and accelerated repopulation of peritoneal and omental macrophages by administration of Freund's adjuvant. *Cell Tissue Res* 1995 ; 280 : 189-96.
- 10) Takeyama Y, Takase K, Ueda T, Hori Y, Goshima M, Kuroda Y. Peripheral lymphocytes reduction in severe acute pancreatitis is caused by apoptotic cell death. *J Gastrointest Surg* 2000 ; 4 : 379-87.

骨髄・末梢血幹細胞移植併用大量化学療法 における急性膵炎の発生

研究報告者 池 井 聰

国立熊本病院外科

共同研究者 河 野 文 夫 清 川 哲 志 真 田 功
片 瀨 茂 芳 賀 克 夫 山 下 眞 一

要旨：同種骨髄・末梢血幹細胞移植併用大量化学療法における急性膵炎，高アマラーゼ血症の発生を自験例ならびに日本血液学会認定施設のアンケート調査にて検討した。対象とした自験例は国立熊本病院で施行した同種移植症例：骨髄移植14例，末梢血幹細胞移植48例，計62例である。急性膵炎の発生は3例（4.8%），高アマラーゼ血症の発生は15例（24%）であった。移植後の血中アマラーゼ値はビリルビン値，消化管障害の程度と有意の正の相関が認められた。大量化学療法治療中には制癌剤による消化器障害が惹起され，同種骨髄・末梢血幹細胞移植による GVHD との鑑別が困難なことが多く，急性膵炎の発生と GVHD との明らかな因果関係は実証できなかった。アンケート調査では85施設中39施設（46%）より回答が得られた。同種骨髄移植・末梢血幹細胞移植における急性膵炎は691例中2例（0.3%）のみであった。

背 景

白血病，悪性リンパ腫等の治療には骨髄移植・末梢血幹細胞移植の普及に伴い大量化学療法が行われている。これらの治療中には大量化学療法による重篤な副作用が発生し，これに加えて同種骨髄移植・末梢血幹細胞移植ではさらに graft versus host disease (GVHD) による臓器障害が発生する。これらの治療中に遭遇する急性膵炎の原因は，原疾患の膵臓への浸潤，制癌剤による膵腺房細胞障害，GVHD による膵へのリンパ球浸潤などが考えられるが，その実態の解明は不十分である。

目 的

同種骨髄移植・末梢血幹細胞移植（以下同種移植）における急性膵炎，高アマラーゼ血症の発症の実態を明らかにする。

対 象 と 方 法

対象は平成4年より平成12年12月まで国立熊本病院血液内科において同種骨髄移植，末梢血幹細胞移植を行い，かつ移植前後に経時的に血清アマラーゼ値を測定してあった62例である。男性35例，女性27例，年齢は15歳から62歳（ 35.1 ± 11.8 ），骨髄移植14例，末梢血幹細胞移植48例で原疾患の内訳は表1

に示した。これらの症例は同種移植までに、3-6回の寛解導入化学療法、地固め療法を受けている。骨髄、末梢血幹細胞提供者は骨髄バンク16名、兄弟姉妹40名、父母親2名、息子娘4名であった。移植前大量化学治療はキロサイドとエンドキサンを中心とした制ガン剤を投与し、移植前日よりプログラフ、ステロイドホルモン等の免疫抑制剤を投与している。化学療法、免疫抑制剤の内容、要領は原疾患、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していない。

これらの症例の臨床症状とともに、血中アミラーゼ値、総ビリルビン値、GOT、GPT、BUN、Cr、CRPを経時的に測定し、同種移植後の臓器障害、急性膵炎、高アミラーゼ血症の発症について検討した。経過中における血中アミラーゼ値と総ビリルビン値、BUN値、消化管障害Stageとの関連について検討した。GVHDは皮膚病変を肉眼的に、肝障害を血清ビリルビン値で、消化器障害を下痢の程度と激しい腹痛でそれぞれStage 1-4に分類し、そのStageよりGradeが決められている（表2）。高アミラーゼ血症を呈した症例、腹痛の強い症例、肝機能障害のある症例では出来るだけ超音波検査を行い、膵肥大、膵周囲の腹水の貯留、肝臓の異常等の有無を検索した。なお同種移植は無菌室で行うためにCT検査は行っていない。

急性膵炎の診断並びに重症度判定は厚生省（当時）特定消化器系疾患調査研究班難治性膵疾患分科会研究報告書（平成10年度版、班長 小川道雄）¹⁾によった。高アミラーゼ血症は異常高値かつ治療前の2倍以上に上昇したものとした。

日本血液学会認定施設のうち小児科を除く85施設中に対して1998年、1999年に施行された骨髄移植、末梢血幹細胞移植の実施数および急性膵炎の発症数についてアンケート調査を行った。さらに急性膵炎の症例に対してはその内容を調査した。

結 果

自験例における急性膵炎の発症は62例中3例（4.8%）、高アミラーゼ血症は15例（24%）であった。急性膵炎を発症した3例はいずれも重症、Stage 4であり3例とも死亡している。この3例の総ビリルビン最高値は27.8, 48.6, 10.7mg/dL, LDH最高値は2455, 5413, 19378IU/Lと高度肝障害を併発し、GVHD；消化管障害Stage分類ではStage 3が1例、Stage 4が2例と重度の消化管障害を併発していた。死亡の原因は原疾患死2例、抗癌剤の副作用による重症肝障害1例であり、急性膵炎が直接の死因ではないが病態を悪化させる1因となっていた。全症例における血中アミラーゼの最高値は総ビリルビンの最高値と正の相関を示した（図1左）。図の中の●が急性膵炎発症例である。また血中アミラーゼの最高値は消化管障害のStageとも正の相関が認められた（図1右）。

アンケートを送付した85例中39施設（46%）より回答が得られた。自己移植418例、同種移植691例の症例があり、自己移植での急性膵炎の発症はなく、同種移植では2例（0.3%）の報告があった。2例とも重症急性膵炎で1例はGrade IVのGVHDを伴っており死亡され、もう1例は重症急性膵炎であったが回復していた。

考 案

同種骨髄移植・末梢血幹細胞移植を伴う大量化学療法中には、高熱、下痢、黄疸、皮膚炎等の重篤な

表1. 同種骨髄・末梢血幹細胞移植併用大量化学療法症例

末梢血幹細胞移植(48例)		骨髄移植(14例)	
急性骨髄性白血病	12例	急性骨髄性白血病	3例
慢性骨髄性白血病	7例	慢性骨髄性白血病	6例
急性リンパ性白血病	13例	急性リンパ性白血病	4例
骨髄異形成症候群	4例	芽球増加型不応性貧血	1例
芽球増加型不応性貧血	1例		
骨髄腫	2例		
非ホジキン性リンパ腫	4例		
成人T細胞白血病	2例		
免疫芽球性リンパ節症	1例		
再生不良性貧血	1例		
絨毛膜癌	1例		

表2. Graft versus host disease (GVHD) の Stage と Grade extent of organ involvement

Stage	Extent of organ involvement		
	Skin	Liver	Gut
1	Rash on <25% of skin	T.B 2-3mg/dl	Diarrhea > 500ml/day or persistent nausea
2	Rash on 25% - 50% of skin	T.B 3-6mg/dl	Diarrhea > 1,000ml/day
3	Rash on <50% of skin	T.B 6-15mg/dl	Diarrhea > 1,500ml/day
4	Generalized erythroderma with bullous formation	T.B >15mg/dl	Severe abdominal pain with or without ileus
Grade			
I	Stage 1 - 2	None	None
II	Stage 3 or	Stage 1 or	Stage 1
III	-	Stage 2 - 3 or	Stage 2 - 4
IV	Stage 4 or	Stage 4	-

(1994 Consensus Conference on Acute GVHD Grading)

病状を呈する。この病状の発生原因は制癌剤の副作用と GVHD が主体である。今回は同種移植における肝障害、消化管障害と急性膵炎および高アミラーゼ血症の発症について検討した。同種移植においては皮膚、肝、消化管に重篤な障害が発生しているが、これを GVHD によるものと診断するには最終的には組織検査による確認が必要とされている。しかし重篤な状態において皮膚以外の肝臓や消化管の病理検査の為の組織採取は困難であり、これらの障害が GVHD か否かの断定は今回の検討では出来なかった。治療中に遭遇する急性膵炎の原因は、原疾患の膵臓への浸潤、制癌剤による膵腺房細胞障害、GVHD による膵へのリンパ球浸潤、免疫抑制剤の関与²⁾、アデノウイルスの膵への感染³⁾などが考えられる。Salomone ら¹⁾の報告では同種移植における急性膵炎の発症は17例中3例(17.6%)であり、Ko

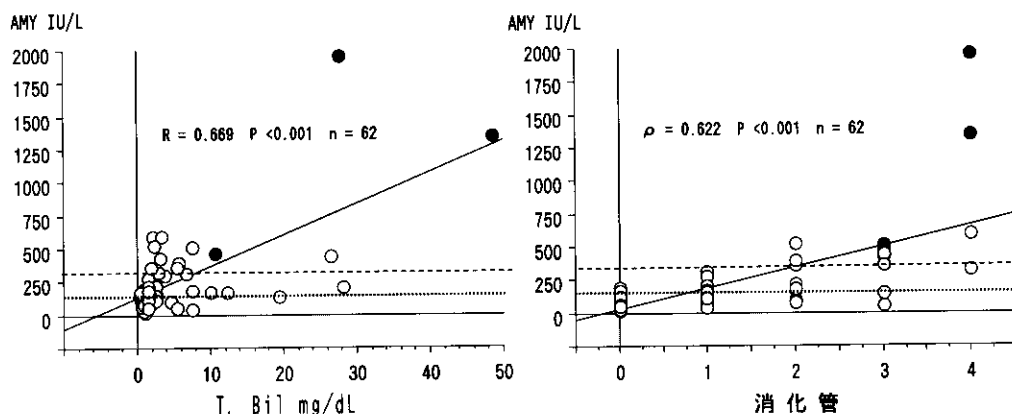


図1. 同種移植後の血中膵アミラーゼ値と総ビリルビン値, 消化管 Stage との相関

ら⁵⁾の剖検での検討では, 同種移植症例の急性膵炎の発症は184例中51例(28%)と報告している。われわれの症例では, 後からカルテ, 検査データを検討して急性膵炎であったと診断した症例は3例であったが, 治療中に急性膵炎を念頭において診療をおこなっておれば, 急性膵炎と診断した症例はもっと多いのではないかと考えられる。

日本血液学会認定施設のアンケート調査の結果, 同種移植における急性膵炎の発症率は0.3%であった。これは我々の検討結果や文献と大きく異なっていた。同種移植においてはきわめて重篤な病状を示すため急性膵炎が発症しても他の病状にカバーされているか, 重症急性膵炎が移植後の病態の主体であっても, 抗癌剤の副作用やGVHDとして取り扱われ急性膵炎が見落とされている可能性が考えられた。

同種移植はきわめて侵襲の大きい治療であり, 合併症の発生率, 死亡率が高い。急性膵炎がその病態を後押ししている可能性があり, この治療時には急性膵炎を念頭においた診療が必要であることを強調したい。

参考文献

- 1) 小川道雄, 広田昌彦, 早川哲夫, 松野正紀, 渡辺伸一郎, 跡見 裕, 大槻 眞, 加嶋 敬, 小泉 勝, 原田英雄, 山本正博, 西森 功. 急性膵炎の Stage 分類. 厚生省特定消化器系疾患調査研究班難治性膵疾患分科会研究報告書(班長 小川道雄). 2000: 19-22.
- 2) Nieto T, Russ P, Everson G, Bearman SI, Cagnoni PJ, Jones RB, Shpall EJ. Acute pancreatitis during immunosuppression with tacrolimus following an allogeneic umbilical cord blood transplantation. Bone Marrow Transplant 2000; 26: 109-11.
- 3) Niemann TH, Trigg ME, Winick N, Penick GD. Disseminated adenoviral infection presenting as acute pancreatitis. Hum Pathol 1993; 24: 1145-8.
- 4) Salomone T, Tosi P, Raiti C, Stanzani M, Leopardi G, Miglio 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.
- 5) Ko CW, Gooley T, Schoch HG, Myerson D, Hackman RC, Shulman HN, 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.

ラット重症急性膵炎モデルに対する 中等度低体温療法の実験的検討

研究報告者 岡 正 朗

山口大学第二外科

共同研究者 上 野 富 雄 松 岡 功 治

要旨：平成11年度でのラットセルレイン急性膵炎重症化モデルにおいて、低体温療法によって、急性膵炎における膵実質障害が軽減されることが判明した。一方、同モデルでは低体温療法を施行しなかった群においても、多臓器不全を来たさなかった。そこで平成12年度では4%glycodeoxycholic acid 膵管内注入モデルを作製した。本モデルにおいても、低体温療法により膵実質障害の軽減を認めたが、いずれの群も多臓器不全を来さず、低体温療法が重症化を防止出来るかの効果判定までには至らなかった。現在、班会議構成員の助言に沿い、ラットセルレイン急性膵炎重症化モデルにおいて、lipopolysaccharide (LPS) を増量負荷し、低体温療法が多臓器不全に対し有効であるか否か、追試を行っている。

はじめに

平成11年度のラットセルレイン急性膵炎重症化モデル¹⁾において、中等度低体温療法を行い、その重症防止効果について検討を行ったところ、低体温療法を施行しなかった群では膵腺房間が浮腫状に拡大し、腺房細胞構築の破壊と炎症細胞浸潤が観察された。一方、低体温導入群では、腺房細胞構築が保たれており、炎症細胞浸潤をわずかに認めるのみであり、低体温導入の有無で組織学的な変化が生じることが判明した。他方、本実験は全身麻酔下に全身管理を行うため、肺をはじめとする多臓器不全を来たさなかったため、平成12年度は Donryu rat を用いて、4%glycodeoxycholic acid 膵管内注入モデル²⁾を作製した。低体温療法が、多臓器不全を防止し得るか検討した。

方 法

Donryu rat を用いて、気管内挿管下、全身麻酔薬として、導入時は3.5%イソフルレンを使用し、0.5MAC イソフルレン、60%N₂にて維持を行った。1回換気量1cc/100g、呼吸数35/min.にて呼吸管理し、左大腿動脈にカニューレションし、血圧および心拍数をモニターした。輸液として、麻酔導入時にサリンヘス2ml、ヘパリン0.5ml、ミオブロック0.2mgを静注した。以後、30分毎に乳酸リンゲル液1ml、ミオブロック0.2mgを静注した。

総胆管へ順行性にカニューレションし、十二指腸 Vater 乳頭部の口側、肛門側を鉗子でクランプした後、0.1ml/100gratの4%glycodeoxycholic acidを1.2ml/hrの速度で注入した。注入開始5時間後にLPS30mg/kgを腹腔内に投与し、重症化モデルを作製した(図1)。



図 1

結 果

低体温導入群では、膵実質は病理組織学的には、腺房細胞構築が比較的保たれており、炎症細胞浸潤をわずかに認める像が観察され、低体温非導入群では膵腺房間が浮腫状に拡大し、腺房の構築の破壊と炎症細胞浸潤を認めた。しかし、本モデルにおいても、全身管理により肺、肝、腎の病理組織像は両群間に差を認めず、多臓器不全を来たさなかった。

考 察

平成11年度は Wistar 系雄性ラット（体重220–250g）にセルレイン（ $50\mu\text{g}/\text{kg}$ ）を1時間毎に計4回筋注し、初回セルレイン筋注後、6時間目にLPS $30\text{mg}/\text{kg}$ を腹腔内に投与し、急性膵炎重症化モデルを作製した¹⁾。初回セルレイン筋注後3.5時間目に、気管内挿管し、今回と同様の全身麻酔下に管理を行った。ラットセルレイン急性膵炎重症化モデルにおいては、低体温導入の有無で、膵腺房細胞の組織学的変化が異なることが判明した。

一方、今回の4%glycodeoxycholic acid 膵管内注入モデルでも、低体温の導入如何により、膵炎像の組織学的な差を認め、本療法が急性膵炎を抑制し得る可能性が、期待される結果となった。しかし、本実験系は呼吸、循環管理を中心とした全身管理を行っているため、それ自体が膵炎重症化の治療になっていることも考えられる。

低体温療法によって、重症化の予防、すなわち多臓器不全への進展を予防し得るか否かを実証することが本実験の主目的であり、現在、班会講構成員の助言に沿い、ラットセルレイン急性膵炎重症化モデルにおいて、LPSを $100\text{mg}/\text{kg}$ に増量し、低体温療法が多臓器不全に対し有効であるか否か、追試を行っている。

参 考 文 献

- 1) Sugita H, Yamaguchi Y, Ikei S, et al. Enhanced expression of cytokine-induced neutrophil chemoattractant (CINC) by bronchoalveolar macrophages in cerulein-induced pancreatitis rats. *Dig Dis Sci* 1997; 42: 154-60.
- 2) Chetty U, Gilmour HM, Taylor TV. Experimental acute pancreatitis in the rat-a new model. *Gut* 1980; 21: 115-7.

急性膵炎における metallothionein の組織保護作用と SOD

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, free radical scavenger としての組織保護作用が報告されている。そこで今回, MT と superoxide dismutase (以下 SOD) との関係に注目し, SOD 抑制状態でも MT が急性膵炎の進展を抑制するかどうか検討した。

1) 亜鉛, カドミウムによる MT 誘導でセルレイン膵炎は改善した。亜鉛による MT 誘導時に膵内 SOD は変化しなかったが, カドミウムによる MT 誘導時には膵内 SOD が低下していた。2) DDC 投与で膵内 MT は変化しなかったが, 膵内 SOD は抑制状態となり, セルレイン膵炎は増悪した。3) DDC による SOD 抑制状態でも, あらかじめ亜鉛を投与し MT 誘導状態にするとセルレイン膵炎の進展が抑制された。以上の結果から, MT は急性膵炎の進展を抗酸化的に抑制していると推定された。

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, その生理作用として有害金属の解毒作用, 必須微量元素の恒常性の維持等以外に, free radical scavenger としての組織保護作用が報告されている^{1,2)}。昨年度我々も MT の誘導によりセルレイン膵炎が軽症化することを報告し, 急性膵炎における MT の組織保護作用の存在を推定した³⁾。そこで今回は MT と他の抗酸化機構との関係を検討すべく, 特に MT と superoxide dismutase (以下 SOD) との関係に注目し, SOD 抑制状態でも MT が急性膵炎に対して保護作用を示すかどうか検討した。

対象と方法

実験には Wistar 系雄性ラット (体重約200g) 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。急性膵炎は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作成した。

実験1：金属投与の膵内 SOD 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時間後に膵を摘出し, 膵内 SOD を測定した。

実験2：DDC による SOD 抑制とセルレイン膵炎に対する影響

Diethyldithiocarbamate (以下 DDC) 500mg/kg 体重を皮下注し, DDC 投与1時間後にセルレイン膵炎を作成した。セルレイン投与前に膵内 MT, SOD を測定し, 投与後3, 6, 12, 24時間に血中膵酵素, 膵重量体重比を測定した。

実験3：SOD抑制状態におけるMTのセルレイン膵炎に対する影響

セルレイン投与24時間前に亜鉛5 mg/kg体重を腹腔内投与，1時間前にDDC500mg/kg体重を皮下注した。セルレイン投与前に膵内MTとSODを，投与6時間後に血中膵酵素，膵重量体重比を測定した。

結 果

1) 亜鉛，カドミウム投与の膵内SOD活性に対する影響

金属最終投与24時間後の膵内SOD活性は，亜鉛投与群では無処置群と比較して有意差を認めなかった。しかしカドミウム投与群ではTotal-SOD，Mn-SOD，Cu/Zn-SODのいずれも無処置群と比較して有意に低下していた ($P < 0.01$ ，図1)。

2) DDC投与の膵内MT，SOD活性に対する影響

膵内MTは無処置群とDDC投与群とで有意差を認めなかった(図2 a)。DDC投与1時間後の膵内Total-SOD活性は $1.40 \pm 0.12 \text{ NU/mg protein}$ で，無処置群の約42%まで減少していた。アイソザイムをみると，Mn-SODは無処置群の約72%，Cu/Zn-SODは約21%となり，DDCの投与により，SOD活性，特にCu/Zn-SOD活性が強く抑制されていた(図2 b)。

3) DDC投与のセルレイン膵炎に対する影響

DDC投与にてSOD活性を抑制後セルレイン膵炎を作成すると，血中アミラーゼは3時間後にはすでに $10329.0 \pm 2959.0 \text{ IU/l}$ となり，無処置群のピークである6時間後($10613.4 \pm 1861.0 \text{ IU/l}$)とほぼ同程度となっていた。6時間後にさらに上昇した後は無処置群と同様徐々に低下し，24時間後にはほぼ前値まで回復した(図3 a)。血中リパーゼはDDC投与群で3時間後にはすでに $3342.8 \pm 1131.1 \text{ IU/l}$ と

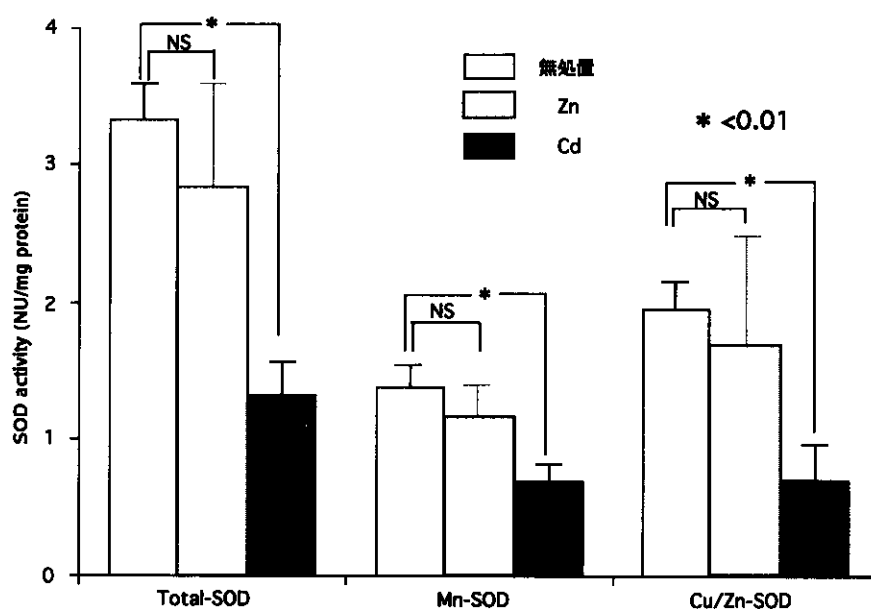


図1. 金属によるMT誘導時の膵内SOD

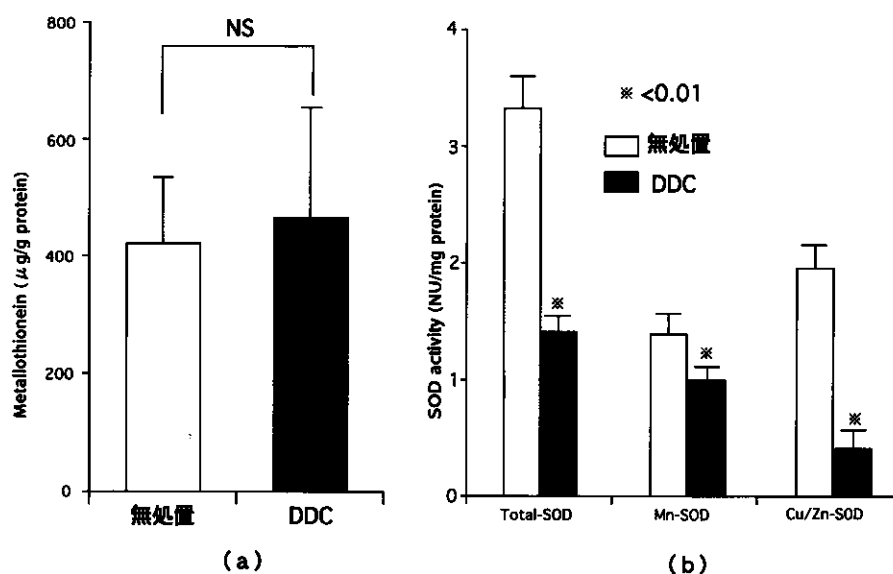


図 2. DDC 投与後の脾内 MT と SOD

なり無処置群の3時間後より有意に高く、無処置群のピークである6時間後 ($1998.2 \pm 543.8 \text{ IU/l}$) よりも高値であった。6時間後にはやや低下するものの無処置群より高値を示した。12時間以降は無処置群と同様に低下し、24時間後にはほぼ前値に回復した (図 3 b)。脾重量体重比は DDC 投与群と無処置群で差を認めなかった。

4) 亜鉛と DDC 投与の脾内 MT, SOD 活性に対する影響

亜鉛を投与し、さらに23時間後に DDC を投与すると、脾組織中 MT は $6447.4 \pm 791.3 \mu\text{g/g protein}$ となり、DDC 単独群 ($467.1 \pm 188.7 \mu\text{g/g protein}$) のほぼ13.8倍に達していた (図 4 a)。しかし、亜鉛投与は DDC による SOD 抑制効果に影響を与えなかった (図 4 b)。

5) 亜鉛と DDC 投与のセルレイン脾炎に対する影響

亜鉛と DDC 投与にて MT 誘導 SOD 抑制状態とした後にセルレイン脾炎を作成したところ、6時間後では血中アミラーゼ、リパーゼ、脾重量体重比のいずれも DDC 単独群と比較して有意に低下していた。また無処置群と比較しても有意に低値であった (図 5)。

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元素代謝の面から研究されてきたが、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¹⁾。また free radical scavenger としての作用も提唱されている²⁾。我々もこの点に注目し、昨年度の班研究会議で亜鉛またはカドミウムによる MT 誘導がセルレイン脾炎の進展に対して抑制的に作用することを報告した³⁾。しかし、生体内には MT 以外にも酸化ストレスに対する様々な抗酸化機構が存在している。そ

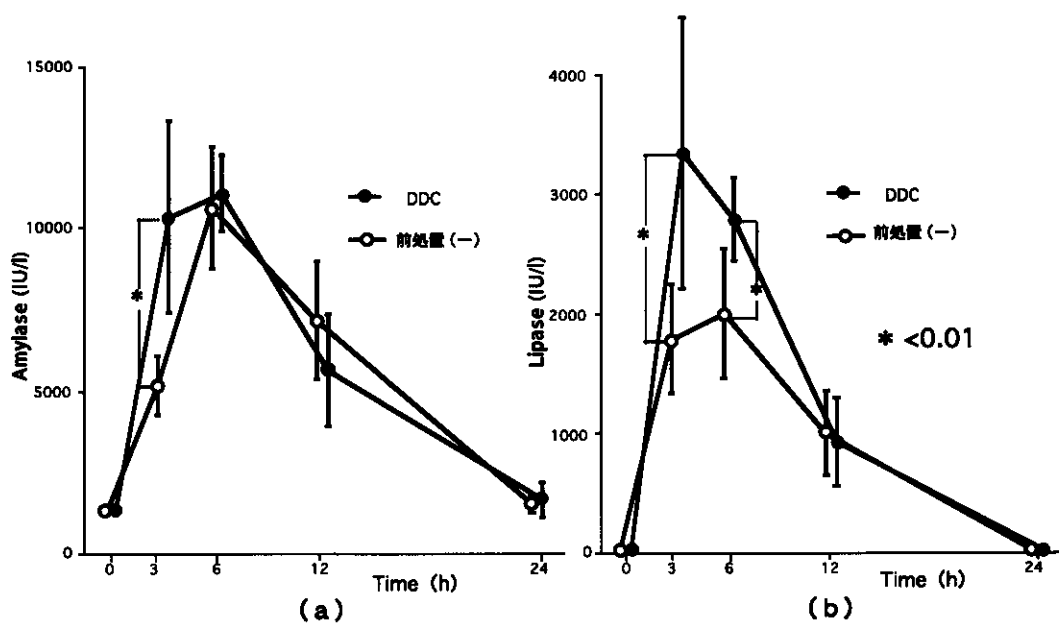


図 3. DDC 投与のセルレイン膵炎に対する影響

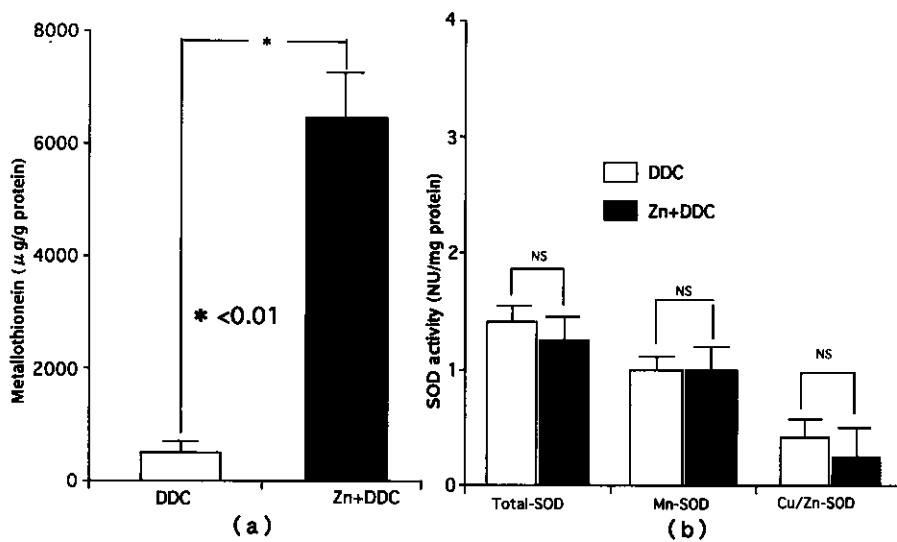


図 4. DDC, Zn + DDC 投与の膵内 MT, SOD に対する影響

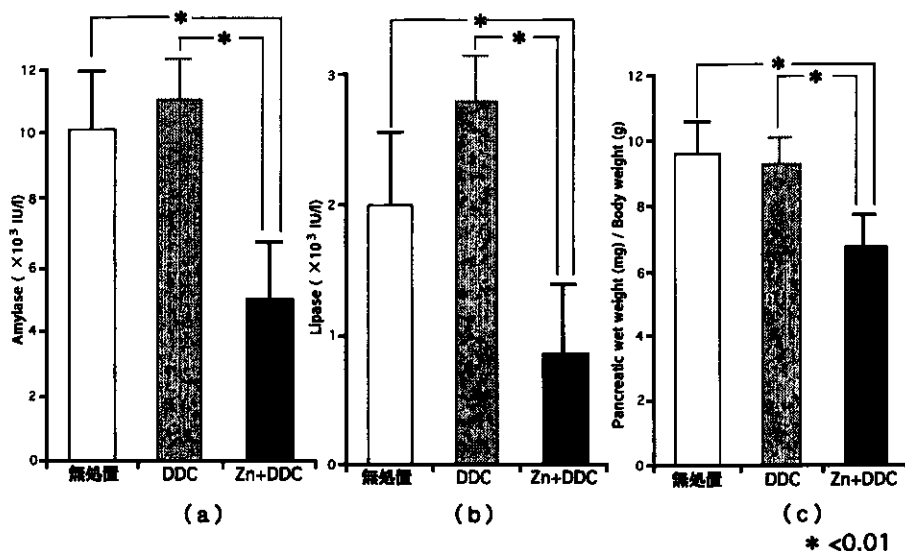


図5. DDC, Zn + DDC 投与のセルレイン膵炎に対する影響

ここで今回我々は、セルレイン膵炎におけるMTの組織保護作用を、特にSODとの関係に注目して検討した。

MT誘導剤として亜鉛、カドミウムを投与したが、亜鉛によるMT誘導時は膵内SODに変化はなかった。一方、カドミウム投与時はSOD活性が有意に低下していた。SOD以外にもカドミウムによるcatalaseやglutathione peroxidase活性の低下が報告されており⁵⁾、カドミウムの投与により抗酸化機構は抑制状態にあると考えられる。このように、カドミウムにてSODが抑制された状態でもセルレイン膵炎が改善したことから、MTがその抗酸化作用により急性膵炎を軽症化した可能性が推定された。

実験2, 3では急性膵炎におけるMTとSODの関係をさらに明らかにするため、DDC投与によりSOD抑制状態を作成し、MTが同様の作用を発現しうるかどうかが検討した。DDCは強力な銅のキレート剤であり、SOD特にCu/Zn-SOD中の銅と結合することにより、投与早期にSOD活性を抑制するとされている^{6,7)}。今回用いた500mg/kg体重で死亡例はなく、投与1時間後で膵組織中SOD活性は報告にあるCu/Zn-SODのみならず、Mn-SODも低下していた。DDC500mg/kg投与後に膵炎を作成すると、DDC非投与群と比較して血中膵酵素上昇の増悪を認めたが、これはSOD低下による相対的な酸化ストレスへの耐性の低下が原因と推定される。SODは O_2^- を H_2O_2 に不均化する酵素であり、その抑制により O_2^- が増加し組織障害をもたらすと考えられる⁷⁾。 O_2^- は O_2 から生成する最初の還元体であり、他のfree radicalの前駆体となる。また O_2^- の組織障害機序としてNOと O_2^- の反応によって発生するONOO⁻の重要性も指摘されている^{8,9)}。このようなSOD抑制状態におけるMTの急性膵炎に対する組織保護作用を検討するため、セルレイン投与24時間前に亜鉛を投与した。亜鉛の前投与により、DDC投与後でも膵組織中MTは著明に増加していた。しかし亜鉛を前投与してもDDCによるSOD活性抑制効果は変化しなかった。このようなMT増加SOD抑制状態でセルレイン膵炎を作成すると、DDC投与にて増悪した血中アミラーゼ・リパーゼのみならず膵浮腫も有意に改善した。このことからSOD低下による相対的に酸化ストレスへの耐性が低下した状態であっても、セルレイン膵炎はMTの誘導によ