

SIRS の際のサイトカインストームを断ち切ることにある。もちろん MOF としての急性腎不全の治療としての意味合いも重要ではあるが、むしろ前者に主眼をおいたものである。炎症性サイトカインの分子量は概ね 17kDa の IL-1 β から 54kDa の TNF- α まで分布しており、これにターゲットを絞って除去する方がサイトカイン除去効率はあがるといえる。今回使用した CTR-001 はこの分子量数万程度の蛋白質を多孔性 cellulose beads の表面の hydrophobic ligands と疎水結合することにより除去するものであり、現在臨床治験段階にある。

最重症急性膵炎症例で IL-6 (26kDa) が 1,000 pg/ml を越えるような場合に除去効率は良く、とくに発症早期の除去効果が高かったといえる。しかし、一旦除去された炎症性サイトカインも翌日のサイトカインアフェレーシス施行直前には上昇がみられることから、臨床使用するうえで発症早期の頻回の使用が望ましいと思われた。今回は 1 日 1 回の施行にとどめたが、1 日 2 回程度の施行も考慮すべきである。さらに回路の作成や脱血、返血のリスクを考えると CHDF との直並列回路での使用等、考慮すべき点は多い。

また、IL-1 β や IL-6 など分子量 3 万程度までの炎症性サイトカインは除去される印象があったが、分子量 54,000 の TNF- α に対しては臨床的には除去効果が低いように思われた。まだ症例数が少なく、各 1 症例ずつの途中報告であるが、重症急性膵炎の血液浄化療法の一選択肢として十分期待できうるものである。

E. 結語

重症急性膵炎に対するサイトカインアフェレーシス療法を施行した。使用したカラムは CTR-001 で、臨床的に分子量 3 万程度までの炎症性サイトカインは吸着効率が良く、発症早期のサイトカインストームを断ち切れる可能性が示唆された。使用適応については今後検討する必要があるが、重症急性膵炎の血液浄化療法として十分期待できるものであると考える。

F. 参考文献

1. 武本佳昭. 血液浄化療法とサイトカイン. 透析フロンティア 1999; 9: 22-9.
2. 武本佳昭, 土田健司, 吉村力勇, 仲谷達也. サイトカイン吸着療法. ICU と CCU 2003; 27:

1033-40.

G. 健康危険情報

該当なし

H. 研究発表

1. 論文発表 該当なし
2. 学会発表
1) 五月女隆男, 江口 豊, 高橋 完, 藤井応理, 佐々木禎治, 遠藤喜裕, 佐井義和, 藤山佳秀, 谷 徹, 野坂修一. 重症急性膵炎に対するサイトカインアフェレーシスの試み. 第 31 回日本集中治療医学会 福岡 2004 年 3 月 4-6 日

I. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む.)

1. 特許取得 該当なし
2. 実用新案登録 該当なし
3. その他 該当なし

重症急性膵炎に対する持続動注療法の解剖学的検討 — 第2報：膵尾部領域 —

研究報告者 木村 理 山形大学医学部消化器・一般外科 教授
共同研究者 神賀正博, 平井一郎 山形大学医学部消化器・一般外科

【研究要旨】

目的：重症急性膵炎に対して、膵酵素阻害剤および抗生剤を経動脈的に投与する持続動注療法は、最近では一般的に行われる初期治療となった。しかし膵の動脈の分布は様々である。どの血管に持続動注療法を行えば効果的であるか検討することを目的とした。

方法：解剖遺体で膵の動脈を剖出し、膵体尾部の動脈を観察、写真撮影を行った。

結果：脾動脈の分枝は主膵管の腹側、背側を走行したが、背膵動脈は常に主膵管の背側を走行した。
背膵動脈は 15/30 例(50%)は脾動脈から分岐した。
脾動脈から膵体尾部に分枝する動脈の分布には一定の分布傾向はなかった。
膵尾部への動脈血流は、膵頭部からの横行膵動脈よりも、脾動脈分枝が優位であった。

考察：膵頭部は横行膵動脈、上横行膵動脈が主な供給を行っており、膵頭部の膵炎での持続動注療法のカテーテルは胃十二指腸動脈に留置すべきであることを報告した。
膵尾部主体の膵炎では脾動脈分枝が優位であり、脾動脈に留置すべきと考えられた。
背膵動脈は 50%が脾動脈から血流を受けるが、この領域主体の重症急性膵炎に対してどの部位にカテーテルを留置すべきであるかは検討を要すると考えられた。

A. 研究目的

重症急性膵炎に対し、膵周囲の動脈から膵酵素阻害剤および抗生剤を投与する持続動注療法は一般的な初期治療となってきた。有効な動注療法をおこなうために、膵の動脈の分布を検索し、どの血管に持続動注療法を行えば効果的であるかについて検討する。

昨年度は膵頭部領域の報告をしたが、本年度は膵尾部領域を検討した。

B. 研究方法

解剖遺体を用いて膵の動脈の剖出し、膵体尾部の動脈を観察し、写真撮影を行った。

(倫理面への配慮)解剖実習、研究目的に遺体を使用する承諾を得ている。

C. 研究結果

脾動脈からの最も太い分枝を大膵動脈と定義したが^{1,2)}、他の脾動脈の分枝と解剖学的に区別することは困難と考えられた(図1)。脾動脈の分枝は主膵管の腹側および背側を走行したが、背膵動脈は常に主膵管の背側を走行した。

背膵動脈は 15/30 例(50%)は脾動脈から分岐していた。

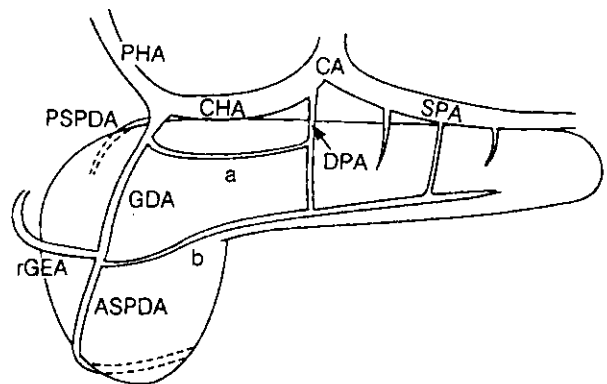


図1 Superior-Transpancreatic Artery(上部横行膵動脈, Superior TP)のシェーマ

a: 上部横行膵動脈 (Superior-Transpancreatic Artery, Superior TP)

b: 横行膵動脈 (Transpancreatic Artery, Prepancreatic arcade)

(CA: celiac axis, CHA: common hepatic artery, PHA: proper hepatic artery, PSpDA: posterior superior pancreaticoduodenal artery, rGEA: right gastroepiploic artery, ASPDA: anterior superior pancreaticoduodenal artery, rGEA: right gastroepiploic artery, ASPDA: anterior superior pancreaticoduodenal artery, DPA: dorsal pancreatic artery, SPA: splenic artery.

脾動脈から膵体尾部に分枝する動脈の分布を、個体差を考慮し、標準化してプロットした。その結果、膵体尾部では脾動脈分枝には一定の分布傾向は認められなかった。

膵体尾部への動脈血流は、膵頭部からの横行膵動脈の供給よりも、脾動脈分枝からの供給の方が優位であった。

D. 考察

膵頭部の血流は横行膵動脈、上横行膵動脈がメインの供給を行っており、重症急性膵炎での持続動注療法のカテーテルは胃十二指腸動脈に留置すべきであることを昨年報告した。

本年度は膵体尾部の解剖学的所見を検索したところ、背膵動脈領域は50%が脾動脈から血流を受けていた。われわれは「背膵動脈は総肝動脈、総肝動脈と脾動脈の分岐部に太いものがあればそれを背膵動脈とし、なければ脾動脈から最初にする太い枝を背膵動脈とする」と定義するのが妥当と考えている。この場合、背膵動脈に注入するためのカテーテルをどこに置いたらいいかは、検討を要する。

膵尾部主体の重症急性膵炎では大膵動脈を含む脾動脈分枝が優位であり、カテーテルは脾動脈に留置すべきと考えられた。

E. 結語

膵尾部領域主体の重症急性膵炎では脾動脈に持続動注カテーテルを留置すべきと考えられた。

F. 参考文献

1. Kimura W, Nagai H. Study of surgical anatomy for duodenum-preserving resection of the head of the pancreas. *Ann Surg* 1995; 221: 359-63.
2. Kimura W. Surgical anatomy of the pancreas for limited resection. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 2000; 7: 473-9.

G. 健康危険情報

該当なし

H. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 木村 理, 平井一郎, 村上 弦. 膵頭体部の血管解剖. *胆と膵* 2003; 24: 125-30.

- 2) 木村 理. 膵臓の外科解剖. *消化器画像* 2003; 5: 626-34.

2. 学会発表

- 1) 平井一郎, 山口洋志, 脇口定衛, 村上 弦, 木村優子, 木村 理. 膵を横走する動脈の解剖学的検討. 第33回日本膵臓学会大会. 仙台 2002年9月4-5日.

1. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む.)

1. 特許取得 該当なし
2. 実用新案登録 該当なし
3. その他 該当なし

ステロイド膵炎の臨床的検討

研究報告者 白鳥敬子 東京女子医科大学消化器内科学 教授
共同研究者 高山敬子, 清水京子 東京女子医科大学消化器内科学

【研究要旨】

ステロイド投与後に発症した急性膵炎において、基礎疾患などの背景因子やステロイドの投与量・投与方法などと、膵炎の重症度・経過・予後の関連性について臨床的検討を行った。ステロイド誘発膵炎4例の、ステロイド投与量は prednisolone(PSL)換算で 30~1,250mg/日、膵炎発症までの期間は3~7日であった。4例中3例は重症で、特に投与量の多かった例では重症度も重篤で治療に難渋したが、膵炎発症を機に原疾患が増悪し死亡した1例を除き、予後は良好であった。

A. 研究目的

薬剤に起因する膵炎として、薬剤性膵炎が知られており、現在その関連性から、原因として報告される薬剤は3つのカテゴリーに分類されている。Corticosteroid(以下ステロイド)はカテゴリー2「原因として強く推定される薬剤」として分類されているが¹⁾、発症機序や背景因子については、詳細は不明である。本研究では、ステロイド誘発膵炎において、ステロイド投与や基礎疾患との関連性を明らかにする目的で臨床的に検討を行った。

B. 研究方法

1999年~2002年の4年間に、当院で急性膵炎の診断基準を満たし、膵炎として診断され加療を受けた症例のうち、ステロイド誘発膵炎と診断された4症例について、背景因子、基礎疾患、ステロイドの投与量、投与方法および膵炎の重症度、

臨床経過、予後について検討を行った。なお、ステロイド誘発膵炎と診断するに当たり、1.ステロイド投与後に膵炎を発症、2.飲酒歴が無い、あっても膵炎発症前には飲酒していない、3.胆道疾患が無い、4.ステロイド投与前は腹部症状や血中膵酵素の上昇を認めない、5.ステロイドの中止あるいは減量により膵炎が改善の項目を条件とした。

(倫理面への配慮)本研究は膵炎症例の臨床検討であり、被験者の負担は全くなく、個人の特定制もできないので不利益もない。

C. 研究結果

4症例の背景を示す(表1)。年齢は23~52歳、男性3名+女性1名であった。ステロイド投与の理由としての基礎疾患は、潰瘍性大腸炎(UC)、全身性エリテマトーデス(SLE)、劇症肝炎(FH)(B型)、

表1 症例の背景

症例	年齢	性別	基礎疾患	既往歴	薬剤服用歴	飲酒歴	喫煙歴
①	25	M	UC	-	-	ビール 500ml/日×2年	20本/日×10年
②	36	F	SLE	-	PSL	-	-
③	23	M	FH(B)	-	ウル 強ミ/ ラミダジン	ビール 350ml/日×2年	-
④	52	M	血管炎 ARF DIC	陳旧性脳梗塞	パファリン	日本酒 2合/日×30年	20本/日×30年

血管炎が各1例で、膵炎との関連が考えられるような既往歴・家族歴や、膵炎発症直前の飲酒歴は無かった。

投与されたステロイドの内訳を示す(表2)。薬剤は prednisolone (PSL) が3例, methylprednisolone (MP) が1例で、1日当たり PSL 換算で 30~1,250mg, 体重1kg 当たり 0.4~20.2mg を経口または静注投与されていた。投与開始から膵炎発症までの期間は3~7日間であった。(症例②に関しては、膵炎発症半年前から PSL を維持量投与されており、原疾患の再燃後約1週間にわたり増量されていたが特に膵酵素の上昇も認められなかった為、その後の pulse 療法で投与された MP が起因薬剤と考え検討を行った)

膵炎の重症度、臨床経過、予後を示す(表3)。重症度 score は0~13点, CT Grade はⅡ~Ⅳで、ステロイドの総投与量が多いと重症化する傾向がみられ、4例中3例は重症であった。軽症であった症例④を除き、いずれもステロイドを減量あるいは中止し、抗酵素剤の単独または多剤併用投与を行い、膵炎は0.5~2.5ヵ月で鎮静化した。膵炎を機に原疾患が増悪し、それに対して血液浄化療法を必要とした症例が2例あったが、膵炎に対して血液浄化療法を行い、かつ抗酵素剤・抗生剤の動注や消化管除菌を行った、治療に難渋した重症例は、ステロイド投与量の多かった1例のみであった。原疾患の増悪のため死亡した例があったが、膵炎の予後はいずれも良好であった。

表2 ステロイド投与

症例	投与薬剤	投与量 (/日)	投与方法	投与開始から 発症まで	/BWkg	
①	PSL	60mg	i. v.	7日	1.3mg	
②	MP	1000mg (PSL換算 1250mg)	i. v.	4日	20.2mg	PSL20mg/日から漸減中SLE再燃し 80mg/日へ増量するも無効につき pulse療法施行
③	PSL	30mg	p. o.	3日	0.43mg	
④	PSL	50mg	i. v.	4日	0.77mg	

表3 膵炎の重症度と経過

症例	投与薬剤 総投与量	重症度 score	CT Grade	ステロイド	膵炎治療	膵炎
①	PSL 420mg	5	Ⅳ	減量	抗酵素剤 (FUT)	2.5ヶ月で鎮静 仮性嚢胞トレンチ
②	MP 3000mg	13	Ⅳ	減量	抗酵素剤併用 (FUT+UR) 動注 PE+HDF SDD	2ヶ月で鎮静 SLE: PSL p. o. 継続中
③	PSL 90mg	3	Ⅳ	中止	抗酵素剤併用 (FUT+UR) PE+HDF	1ヶ月で鎮静 FHの為 死亡
④	PSL 200mg	0	Ⅱ	継続	抗酵素剤 (FOY) HDF	2週間で鎮静 貯留嚢胞トレンチ CRF: HD継続中

D. 考察

ステロイド誘発膵炎の現在までの報告では、投与量・投与開始から膵炎発症までの期間・発症率・重症度などの関係はみられていない。原疾患自体との関連が考えられる場合や、原疾患が重篤な場合には多剤併用投与を行われている事があり、ステロイド単独の膵炎発症との関連を明らかにすることは難しいと考えられる。発症機序としては、蛋白分泌亢進に伴う膵液の粘稠度の増加や、膵管上皮の増殖・膵液のうっ滞が考えられているが、一方でステロイドを投与することで炎症が軽減するとの報告もある^{2,3)}。今後さらに症例数を増やし、ステロイドと膵炎の発症と重症度との関係を検討していく必要があると考えられた。

E. 結語

ステロイド誘発膵炎では、投与開始後比較的早期に膵炎を発症し、投与量が多いと重症化し治療に難渋する傾向がみられたが、早期の治療開始により予後は良好であった。

F. 参考文献

1. Mallory A, Kern F. Drug-induced pancreatitis: a critical review. *Gastroenterology* 1980; 78: 813-20.
2. Mont GL, Guillan RA, Lee SH, Watanabe I. Assessment of corticosteroid treatment of ethionine pancreatitis in the rabbit. *Am J Gastroenterol* 1983; 78: 63-7.
3. Takaoka K, Kataoka K, Sakagami J. The effect of steroid pulse therapy on the development of acute pancreatitis induced by closed duodenal loop in rats. *J Gastroenterol* 2002; 37: 537-42.

G. 健康危険情報

該当なし

H. 研究発表

1. 論文発表 該当なし
2. 学会発表
 - 1) 高山敬子, 白鳥敬子, 今井隆二郎, 森下慶一, 春山航一, 清水京子, 本間直子, 林直諒. ステロイド大量投与後に発症した重症急性膵炎の2例. 第88回日本消化器病学会総会 旭川

2002年4月24日-26日

I. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む.)

1. 特許取得 該当なし
2. 実用新案登録 該当なし
3. その他 該当なし

膵腺房細胞に対する血管拡張性ホルモンの直接作用と 急性膵炎発症メカニズム

研究報告者 中村光男 弘前大学医学部保健学科病因・病態検査学 教授
共同研究者 松橋有紀, 丹藤雄介 弘前大学医学部第三内科

【研究要旨】

今回我々は、血管拡張性物質である calcitonin gene-related peptide(CGRP)の、ラット膵腺房に対する直接作用について検討した。CGRP 刺激により、JNK 及び p38 のリン酸化が認められた。また CGRP 刺激により、細胞質分画で p38 のリン酸化が認められた。また細胞質分画でチトクローム c が認められ、これはミトコンドリアから細胞質への放出によるものと考えられた。膵腺房に対し、CGRP が p38 を介してミトコンドリアの脆弱性を惹起することが考えられた。急性膵炎における CGRP の直接的・間接的作用について、今後更に検討することが必要と考えられた。

A. 研究目的

急性膵炎時、膵の虚血が生じることが知られている。血管拡張性物質である calcitonin gene-related peptide(CGRP)¹⁾が膵周囲の微小循環に関与し、間接的に膵障害に影響する事が報告されている²⁾が、膵腺房に対する直接的な作用については明らかではない。本研究では、CGRP のラット膵腺房に対する直接作用について検討した。

B. 研究方法

Wistar 系雄性ラット(体重 250~300g)よりエーテル麻酔下に膵を摘出し、膵腺房初代培養系を作成した。ラット CGRP (Sigma C-0292)で刺激し、37℃、酸素投与下にて一定時間培養した。

1) 培養後、膵腺房をホモジネートし、MAPK (Promega anti-active MAPK pAb, V8031), JNK (Promega anti-active JNK pAb, V7931), p38 (Promega anti-active p38 pAb, V1211)のリン酸化抗体を用い、Western blotting 法にて細胞質中のリン酸化 MAPK (ERK1, ERK2), リン酸化 JNK (JNK1, JNK2), リン酸化 p38 の動態を検討した。

2) 培養後、膵腺房をホモジネートし超遠心にてミトコンドリア分画と細胞質分画に分離し、リン酸化 p38 (Promega Anti-ACTIVE p38 pAb, V1211) 及び cytochrome c (BD Bioscience Anti-cytochrome c monoclonal antibody, 556433)の抗体を用い、Western blotting 法にて各分画におけるリン酸化 p38 およびチトクローム c の動態を検討した。

なお本実験は弘前大学動物実験に関する指針の規定に基づき行った。

C. 研究結果

1. 図1に Western blotting の結果を示した。CGRP 投与により、JNK 及び p38 のリン酸化が認められた。MAPK は明らかな変化を認めなかった。

2. 図2に Western blotting の結果を示した。CGRP 刺激後 30 分までの細胞質分画において、経時的に p38 のリン酸化が認められた。また、チトクローム c が認められた。

D. 考察

急性膵炎において、虚血が膵の臓器障害に関与することが知られている。虚血とそれに続く血流再開には、血管拡張性物質である一酸化窒素(NO)³⁾や CGRP¹⁾等の関与が報告されている。急性膵炎において、CGRP が膵周囲の微小循環に関与し、間接的に膵障害に影響する事が報告されている²⁾が、膵腺房に対する直接的な作用については明らかではない。今回我々は、急性膵炎における CGRP のラット膵腺房に対する直接作用について検討した。膵腺房の CGRP 刺激により、JNK 及び p38 のリン酸化が認められた。また、膵腺房をホモジネートし超遠心し、ミトコンドリア分画と細胞質分画に分離したところ、CGRP 刺激により細胞質分画における p38 のリン酸化が認められた。また、細胞質中分画でチトクローム c を認めた。チトクローム c はミトコンドリアの外膜と内膜の間に存在し、アポトーシスにより細胞質中に放出され⁴⁾、Apaf-1 と結合しこれを活性化し、カスパーゼカスケードの活性化を介してDNAの断片化、細胞死を引き起こすと考えられている⁵⁾。セルレイン急性膵炎モデルにおいて、膵炎発症前の CGRP

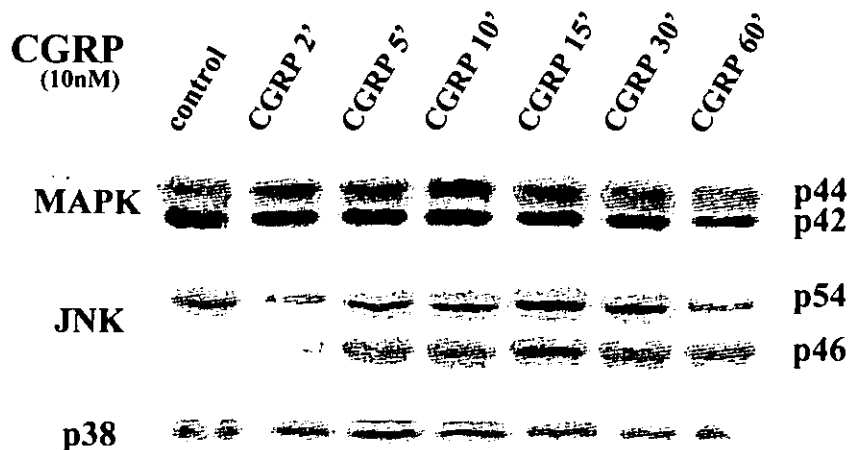


図1 CGRP 刺激による MAPK, JNK, p38 の動態

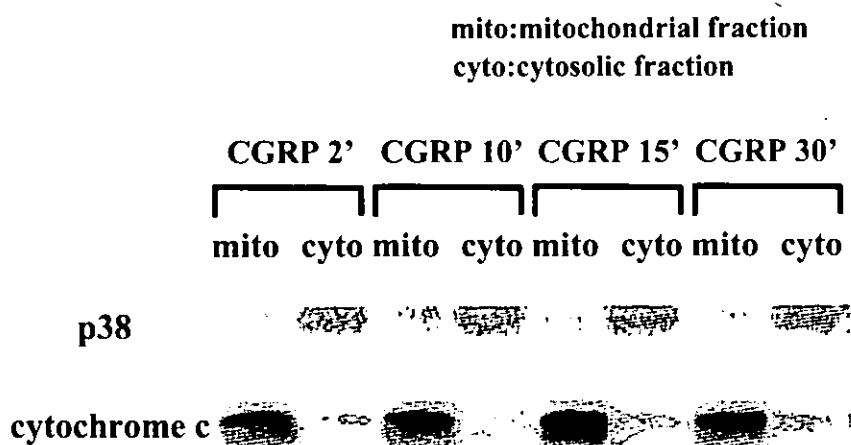


図2 CGRP 刺激による細胞質画分の p38 リン酸化と cytochrome c の増加

刺激は膵障害を軽減し、発症後の投与は膵障害を増悪させるという報告もあり⁶⁾、急性膵炎の重症度に影響を与える因子である CGRP の作用について、今後更に検討することが必要であると考えられた。

E. 結語

膵腺房の CGRP 刺激により、ミトコンドリアからチトクローム c が放出されたことより、CGRP はミトコンドリアの脆弱性を惹起することが考えられた。血管拡張性物質である CGRP が、血管拡張作用と細胞への直接作用を持つ可能性が考えられた。

F. 参考文献

1. Girgis SI, Madonald DW, Stevenson JC, Bevis PJ, Lynch C, Wimalawansa SJ, Self CH, Morris HR, MacIntyre I. Calcitonin gene-related peptide: potent vasodilator and major product of calcitonin gene. *Lancet* 1985; 6: 14-6.
2. Warzecha Z, Dembinski A, Ceranowicz P, Konturek PC, Stachura J, Tomaszewska R, Konturek SJ. Calcitonin gene-related peptide can attenuate or augment pancreatic damage in caerulein-induced pancreatitis in rats. *J Physiol Pharmacol* 1999; 50: 49-62.
3. Konturek SJ, Zbilski J, Konturek PK, Zdzieszowski M, Pawlik W. Role of endogenous nitric oxide in the control of canine pancreatic secretion and blood flow.

Gastroenterology 1993; 104: 896-902.

4. Liu X, Kim CN, Yang J, Jemerson R, Wang X. Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. Cell 1996; 86: 147-57.
5. Michael O. Hengartner The biochemistry of apoptosis. Nature 2000; 407: 770-6.
6. Warzecha Z, Dembinski A, Ceranowicz P, Stachura J, Tomaszewska R, Kosturek SJ. Effect of sensory nerves and CGRP on the development of caerulein-induced pancreatitis and pancreatic recovery. J Physiol Pharmacol 2001; 52: 679-704.

G. 健康危険情報

該当なし

H. 研究発表

1. 論文発表 該当なし
2. 学会発表 該当なし

I. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

1. 特許取得 該当なし
2. 実用新案登録 該当なし
3. その他 該当なし

急性膵炎における Toll-like receptor の動態

研究報告者 黒田嘉和 神戸大学大学院消化器外科学 教授

共同研究者 松村直樹, 上田 隆, 沢 秀博¹⁾, 竹山宜典²⁾

¹⁾神戸大学大学院消化器外科学, ²⁾近畿大学医学部外科学肝胆膵部門

【研究要旨】

生体防御における Toll-like receptor (TLR) の機能が近年注目されている。LPS 受容体である TLR4 は単球/マクロファージ上に発現し、IL-1, IL-6, IL-8, TNF- α などを産生することによりグラム陰性桿菌に対する免疫反応において重要な役割を果たしている。本研究では急性膵炎における免疫の制御機構を明らかにするため重症急性膵炎での TLR4 の動態とその意義を軽症急性膵炎と比較することにより検討した。実験モデルにおける軽症膵炎では TLR4 発現、LPS 反応性ともに上昇していた。一方、重症膵炎では実験モデル、臨床例ともに、TLR4 の発現は低下しており、実験モデルでの LPS 反応性も減少していた。以上より重症膵炎では TLR4 を介した免疫反応が抑制されている可能性が示唆された。

A. 研究目的

重症急性膵炎において感染性合併症の有無は予後を大きく左右する重要な因子であり、感染の背景として発症早期からの免疫抑制現象が関与していると考えられている。一方、Toll-like receptor (TLR) は病原性微生物の構成成分 (Pathogen-associated molecular patterns: PAMPs) を認識する重要な分子である。とくに TLR4 は Lipopolysaccharide (LPS) の受容体で、IL-1, IL-6, IL-8, TNF- α の発現を誘導し、免疫反応を惹起すると考えられている¹⁾。今回、急性膵炎における TLR4 の動態について検討を行った。

B. 研究方法

1. ラット実験膵炎モデルでの検討

麻酔下に Wistar 系雄性ラット (300-350 g) を以下の群に分類し、実験を行った。なお、本動物実験の研究計画は、動物愛護および倫理面に関して神戸大学大学院医学系研究科 animal committee の承認を得た上で実施したものである。

1) 軽症膵炎モデル (セルレイン膵炎モデル)

(1) セルレイン群: 内頸静脈よりセルレイン (5 μ g/kg) を 4 時間静注後、生理食塩水 (1 ml/hr) を 16 時間静注。

(2) コントロール群: 内頸静脈より生理食塩水 (1 ml/hr) を 20 時間静注。

2) 重症膵炎モデル (DCA 膵炎モデル)

(1) DCA 群: 胆膵管を末梢で結紮、カニューレーシ

ョンし、3% デオキシコール酸 100 μ l を逆行性に注入、閉腹後直ちに生食 10 ml を皮下注。

(2) Sham 群: 単開腹のみ、閉腹後直ちに生食 10 ml を皮下注。

セルレイン群、コントロール群はモデル作成 20 時間後に犠牲死、DCA 群、Sham 群はモデル作成 6 時間後に犠牲死させた。気管支肺胞洗浄液を採取し、肺胞マクロファージを単離し、各群において以下の検討を行った。

① TLR4 の発現の検討

各群より採取したマクロファージにおける TLR4 発現を Western blotting 法で解析した。

② LPS に対する反応性

各群より採取したマクロファージを、LPS で 4 時間刺激した後、TNF- α 産生量を ELISA を用いて測定した。

2. 重症急性膵炎臨床例での検討

重症急性膵炎臨床例と健常例とで、末梢血単球における TLR4 の発現を FACS を用いて解析した。

C. 研究結果

1. 軽症膵炎モデルでの検討

Western Blotting の結果、セルレイン群で TLR4 が高発現していた (図 1)。また、LPS 刺激の結果、セルレイン群の反応曲線は左方移動、Plateau 相

の上昇を認め、高い反応性を示した(図2).

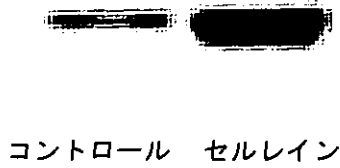


図1 セルレイン肺炎における肺胞マクロファージの TLR4 発現の Western blotting による検討

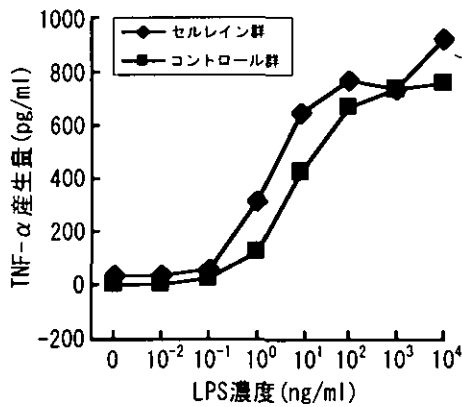


図2 LPS で4時間刺激後、セルレイン肺炎における肺胞マクロファージの TNF- α 産生量の検討

2. 重症肺炎モデルでの検討

Western Blotting の結果, DCA 群で TLR4 の発現は低下していた(図3). また, LPS 刺激の結果, DCA 群の反応曲線は右方移動, Plateau 相の下降を認め, 反応性が減弱していることを示した(図4).

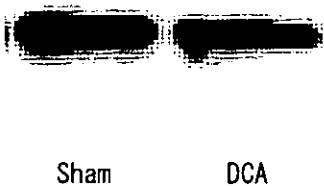


図3 DCA 肺炎における肺胞マクロファージの TLR4 発現の Western blotting による検討

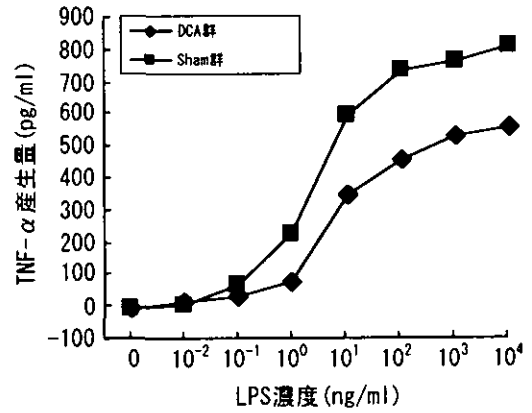


図4 LPS で4時間刺激後, DCA 肺炎における肺胞マクロファージの TNF- α 産生量の検討

3. 重症急性肺炎臨床例での検討

臨床例の末梢血単球での FACS の検討では, 重症肺炎例で TLR4 の発現が低下していた(図5).

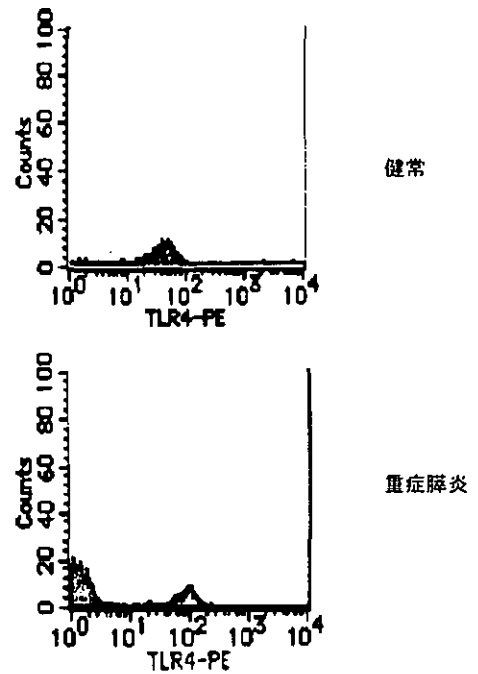


図5 重症急性肺炎臨床例における TLR4 発現の FACS による検討

D. 考察

私どもはこれまでに重症急性肺炎症例において早期に末梢血リンパ球数がアポトーシスにより減少し, 後期の感染併発と相関すること, またラット重症肺炎モデルにおいて胸腺および脾臓が萎縮し, Th1/Th2 バランスが Th1 抑制に傾いているこ

とを明らかにしてきており、重症急性膵炎では発症早期から質的にも量的にも免疫抑制状態に陥っている、すなわち免疫反応が低下していると考えられる²⁾。

今回のマクロファージでの検討では、軽症膵炎と比較して重症膵炎ではTLR4発現は低下し、LPSに対する反応性も減弱していた。重度の急性炎症疾患ではマクロファージを介した免疫反応の低下やendotoxin toleranceなどが報告されており^{3,4)}、重症急性膵炎においてもマクロファージ、TLRを介した免疫反応の低下が感染に関して重要な因子となっている可能性が示唆された。今後、他のTLRを含めてTLRsの発現の動態とその意義について解明したい。

E. 結語

軽症膵炎モデルであるセルレイン膵炎では、TLR4は高発現し、TNF α 産生能が増強しており、免疫反応が亢進していると考えられた。

重症膵炎モデルであるDCA膵炎では、TLR4は低発現し、TNF α 産生能が減弱しており、免疫反応が低下していると考えられた。

重症急性膵炎臨床例では末梢血単球上のTLR4の発現が低下していた。

F. 参考文献

1. Hertzog PJ, O'Neill LA, Hamilton JA. The interferon in TLR signaling: more than just antiviral. *Trends Immunol* 2003; 24: 534-9.
2. Takeyama Y, Takase K, Ueda T, Hori Y, Goshima M, Kuroda Y. Peripheral lymphocyte reduction in severe acute pancreatitis is caused by apoptotic cell death. *J Gastrointest Surg* 2000; 4: 379-87.
3. Schwacha MG. Macrophages and post-burn immune dysfunction. *Burns* 2003; 29: 1-14.
4. Riedel DD, Kaufmann SH. Differential tolerance induction by lipoarabinomannan and lipopolysaccharide in human macrophages. *Microbes Infect* 2000; 2: 463-71.

G. 健康危険情報

該当なし

H. 研究発表

1. 論文発表 該当なし
2. 学会発表 該当なし

I. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得 該当なし
2. 実用新案登録 該当なし
3. その他 該当なし

急性膵炎の病態におけるトリプシン、 トリプシンレセプター系の役割

研究報告者 広田昌彦 熊本大学医学部消化器外科 講師
共同研究者 前田圭介, 木村 有, 市原敦史, 杉田裕樹
熊本大学医学部消化器外科

【研究要旨】

正常ラットの各臓器における PAR-2 の発現, 急性膵炎時の膵臓における PAR-2 の発現, 急性膵炎時の血中 PNF 濃度の変化, 急性膵炎時のサイトカイン反応と PAR-2 阻害時の変化を解析した. 膵腺房細胞, 及び導管細胞の管腔側にトリプシンレセプターである PAR-2 が強く発現されていたが, 膵腺房細胞, 及び導管細胞上のほとんどの PAR-2 分子が, 急性膵炎の惹起時に活性化されることが判明した. 本現象は, 膵外分泌の過剰刺激時にはトリプシノーゲンが活性化されてトリプシンが腺房細胞から分泌されることを意味する. また, 膵腺房細胞上の PAR-2 分子の活性化は, サイトカイン反応の惹起につながることを示唆された. 膵外臓器へ膵細胞の自己消化がおころうとしていることを伝達するための機構ではないかと推察された. 以上のように, 急性膵炎の病態形成にトリプシン, トリプシンレセプター系は強く関与する.

A. 研究目的

Protease-activated receptor(PAR)は, 受容体の細胞外ドメインの一部がプロテアーゼによって切断され, 新しく生じた N 末端のペプチド構造がリガンドとして作用する 7 回膜貫通型需要体である. リガンドがレセプターに結合することによって細胞内に情報を伝達する従来のレセプターと異なり, トリプシンなどのプロテアーゼがレセプターの一部を切断することにより細胞内に情報が伝達される. 現在までに 4 つのタイプの PAR が同定されているが, トリプシンは PAR-2 を活性化する. 膵腺房細胞内に豊富に存在するトリプシノーゲンが過剰な膵外分泌刺激によりトリプシンに活性化される際, 膵にトリプシンレセプターである PAR-2 が存在すると, PAR-2 を介して膵細胞が刺激を受ける可能性がある.

本研究では, 1. 膵臓に PAR-2 が発現しているか否か, 2. 膵炎時に PAR-2 の発現がどう変化するか, 3. PAR-2 の活性化を阻害すると急性膵炎のサイトカイン反応はどう影響を受けるか, を明らかにすることを目的とした.

B. 研究方法

PAR-2 のトリプシンにより切断を受ける部分(cleavage site)に対する抗体, 及びトリプシンによって切断されて生じる N 末端のペプチド(PAR-2 N-terminus fragment: PNF)に対する抗体を作成した. 本抗体を用いて, 正常ラットの各

臓器における PAR-2 の発現, 急性膵炎時の膵臓における PAR-2 の発現, 急性膵炎時の血中 PNF 濃度の変化, 急性膵炎時のサイトカイン反応と PAR-2 阻害時の変化を解析した. 急性膵炎の解析には, ラットエンドトキシン血症合併セルレイン膵炎を用いた.

(倫理面への配慮)本研究における実験動物の取扱いに関しては, National Institutes of Health (NIH) animal care guidelines に則って行った.

C. 研究結果

1. 正常ラット各臓器における PAR-2 の発現

正常のラットにおける PAR-2 の発現を免疫組織化学的に確認すると, 膵臓では腺房細胞, 導管細胞に両者に強い発現を認めた¹⁾. その他, 腎臓, 肺, 肝, 消化管, 心臓に発現を認めた.

2. 急性膵炎時における膵 PAR-2 発現, 及び血中 PNF 濃度の変化

急性膵炎時における膵における PAR-2 の発現の変化を, 免疫組織化学的, 及び Western blotting で解析した. 抗 PAR-2 cleavage site 抗体に対する反応は, 急性膵炎の惹起直後に軽度の低下を認めたが 12 時間後には惹起前の反応性に復した. 一方, 抗 PNF 抗体に対する反応性は, 急性膵炎の惹起後に著明に低下した. また, 血中 PNF 濃度は急性膵炎惹起後に有意に上昇した.

3. 急性膵炎時のサイトカイン反応における PAR-2 の役割

まず、抗 PAR-2 cleavage site 抗体が、膵腺房細胞由来細胞株 ARIP に対するトリプシンによる PAR-2 活性化を介する細胞内 Ca 流入を阻止することを確認した。本抗体を急性膵炎の惹起 30 分前に加えたラットでは、急性膵炎の惹起後に上昇する血中サイトカイン(IL-6, IFN γ)濃度の上昇が抑制された。

D. 考察

本研究では、PAR-2 が膵腺房細胞、及び膵導管細胞に強く発現されていることを示した。急性膵炎の惹起後、PAR-2 の cleavage site に対する染色性は保持されていたが、PNF に対する染色性は消失しており、膵腺房細胞及び導管細胞の PAR-2 は急性膵炎惹起後に活性化されているといえる。また、抗 PNF 抗体による染色性は劇的に低下していることから、PAR-2 のほとんどが活性化(PNF が切断)されているものと考えられる。このように PAR が劇的に活性化される現象は、*in vitro* ではあるが NCTC2544 細胞をトリプシンで刺激した際にも観察されている²⁾。

膵外分泌刺激物質であるセルレインで膵腺房細胞に過剰刺激を負荷すると、膵腺房細胞内でトリプシンが少量ではあるが活性化されることが知られている。したがって、本急性膵炎実験系においても腺房細胞から導管内にトリプシンが分泌されているものと考えられる。PAR-2 は、膵腺房細胞の中でも小葉中心部の管腔側や導管細胞の管腔側に発現されており、腺房細胞から管腔側に分泌されたトリプシンを感知する役割が推測される。急性膵炎におけるトリプシンとトリプシンレセプター(PAR-2)の役割としては、1. 膵外分泌へのネガティブフィードバック、2. サイトカインを産生することが報告されている腺房細胞からのサイトカイン産生への刺激(あるいは産生抑制)、などが推定される。本研究ではサイトカイン産生への影響を解析したが、抗 cleavage site 抗体を投与して同部位の切断をブロックすることにより、血中のサイトカイン濃度は低下したことから、PAR-2 の活性化はサイトカインの産生につながるものと考えられる。膵腺房細胞管腔側に発現された PAR-2 は、腺房細胞内で活性化され分泌されたトリプシンの活性を感知し、膵に過剰は外分泌刺激がかかっていること(トリプシンの活性化が起こ

っていること)をサイトカインの産生を介して膵外臓器へ伝えようとする機構ではないかと考えられる。おそらくは肝臓からのトリプシンインヒビター(α 1 アンチトリプシン, α 2-マクログロブリン, PSTI)の供給を期待しているのではないかと思われる。

E. 結語

膵腺房細胞、及び導管細胞の管腔側にトリプシンレセプターである PAR-2 が強く発現されていたが、膵腺房細胞、及び導管細胞上のほとんどの PAR-2 分子が、急性膵炎の惹起時に活性化されることが判明した。本現象は、膵外分泌の過剰刺激時にはトリプシノーゲンが活性化されてトリプシンが腺房細胞から分泌されることを意味する。また、膵腺房細胞上の PAR-2 分子の活性化は、サイトカイン反応の惹起につながることを示唆された。急性膵炎の病態形成にトリプシン、トリプシンレセプター系は強く関与する。

F. 参考文献

1. 広田昌彦, 桑田絹子, 小川道雄. 遺伝子変異による膵炎の発症機構. 小川道雄編. 消化器病セミナー90 慢性膵炎—診断と治療のコンセンサス. 東京: へるす出版 2003: 179-90.
2. Seatter MJ, Drummond R, Kanke T, Macfarlane SR, Hollenberg MD, Plevin R. The role of the C-terminal tail in protease-activated receptor-2-mediated Ca^{2+} signalling, proline-rich tyrosine kinase-2 activation, and mitogen-activated protein kinase activity. *Cell Signal* 2004; 16: 21-9.

G. 健康危険情報

該当なし

H. 研究発表

1. 論文発表 該当なし
2. 学会発表 該当なし

I. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

1. 特許取得 該当なし
2. 実用新案登録 該当なし
3. その他 該当なし

急性膵炎に対するイノシン投与の検討

研究報告者 下瀬川徹 東北大学大学院消化器病態学 教授
共同研究者 正宗 淳, 山極哲也 東北大学大学院消化器病態学

【研究要旨】

近年、プリンヌクレオシドであるイノシンが種々の炎症性疾患実験モデルに対して強力な抗炎症作用を示し、その生存率を改善させたと報告されている。我々はこれまで、ラット浮腫性膵炎モデル(セルレイン膵炎)に対するイノシン投与が膵局所ならびに肺への炎症細胞浸潤を抑制し、膵炎像を改善させることを明らかにした。今回、出血壊死性膵炎モデルであるタウロコール酸膵炎を用いてイノシン投与の検討を行なった。イノシン投与により膵炎誘導 12 時間後の血清アミラーゼ値、ヘマトクリット値、組織 myeloperoxidase 活性の上昇が抑制された。組織上、膵への炎症細胞浸潤が抑制され、肺胞壁の肥厚および肺への炎症細胞浸潤が軽減した。以上より、イノシンが今後、急性膵炎の治療薬となり得る可能性が示唆された。

A. 研究目的

プリンヌクレオシドであるイノシンは生体内において、アデノシンデアミナーゼによってアデノシンから生成される。イノシンは免疫応答制御作用や抗炎症作用を有する。我々はこれまで、ラット浮腫性膵炎モデル(セルレイン膵炎)に対するイノシン投与が膵局所ならびに肺への炎症細胞浸潤を抑制し、膵炎像を改善させること、またこれらの効果がイノシンの後投与でも有効であることを明らかにした¹⁾。今回、ラット出血壊死性膵炎モデルであるタウロコール酸膵炎に対するイノシン投与の効果を検討した。

B. 研究方法

体重 210-240 g の Wistar 系雄性ラットをペントバルビタールによる麻酔下で開腹し、胆膵管内に 5% タウロコール酸 (taurocholic acid; TCA) を逆行性に注入 (1 ml/kg 体重) し、膵炎を誘導した。膵炎誘導 30 分前にイノシン (100, 200 mg/kg 体重)、対照として同量の生理食塩水を腹腔内に投与した。膵炎誘導 12 時間後に以下の指標につき評価した。1) 血清アミラーゼ値 2) ヘマトクリット値 3) 組織像 4) 組織 myeloperoxidase (MPO) 活性。また、膵炎ラットの生存率についても検討した (倫理面への配慮) 今回の動物実験は全て、東北大学医学部の動物実験倫理委員会の承諾を受けた後に施行した。

C. 研究結果

TCA 膵炎において、イノシン (200 mg/kg 体重) 投与により血清アミラーゼ値、ヘマトクリット値の上昇が抑えられた ($p < 0.05$) (図 1)。組織上、膵への炎症細胞浸潤が抑制され (図 2-A, B)、膵 MPO 活性値が低値を示した ($p < 0.05$) (図 3-A)。肺への炎症細胞浸潤、肺胞壁肥厚が軽減し (図 2-C, D)、肺 MPO 活性も低値を示した ($p = 0.06$) (図 3-B)。イノシン投与群では生存率の改善傾向を認めたが、統計的有意差は見られなかった。

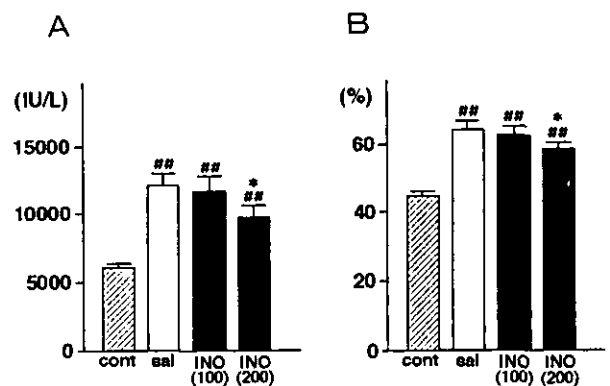


図 1 TCA 膵炎に対するイノシン投与の影響 (膵炎誘導 12 時間後)

A: 血清アミラーゼ値

B: ヘマトクリット値

##: $p < 0.01$ (正常ラット (cont) vs. 生理食塩水投与群 (sal), イノシン投与群 (INO:100, 200 mg/kg 体重)),
*: $p < 0.05$ (生理食塩水投与群 (sal) vs. イノシン投与群 (INO:100, 200 mg/kg 体重))

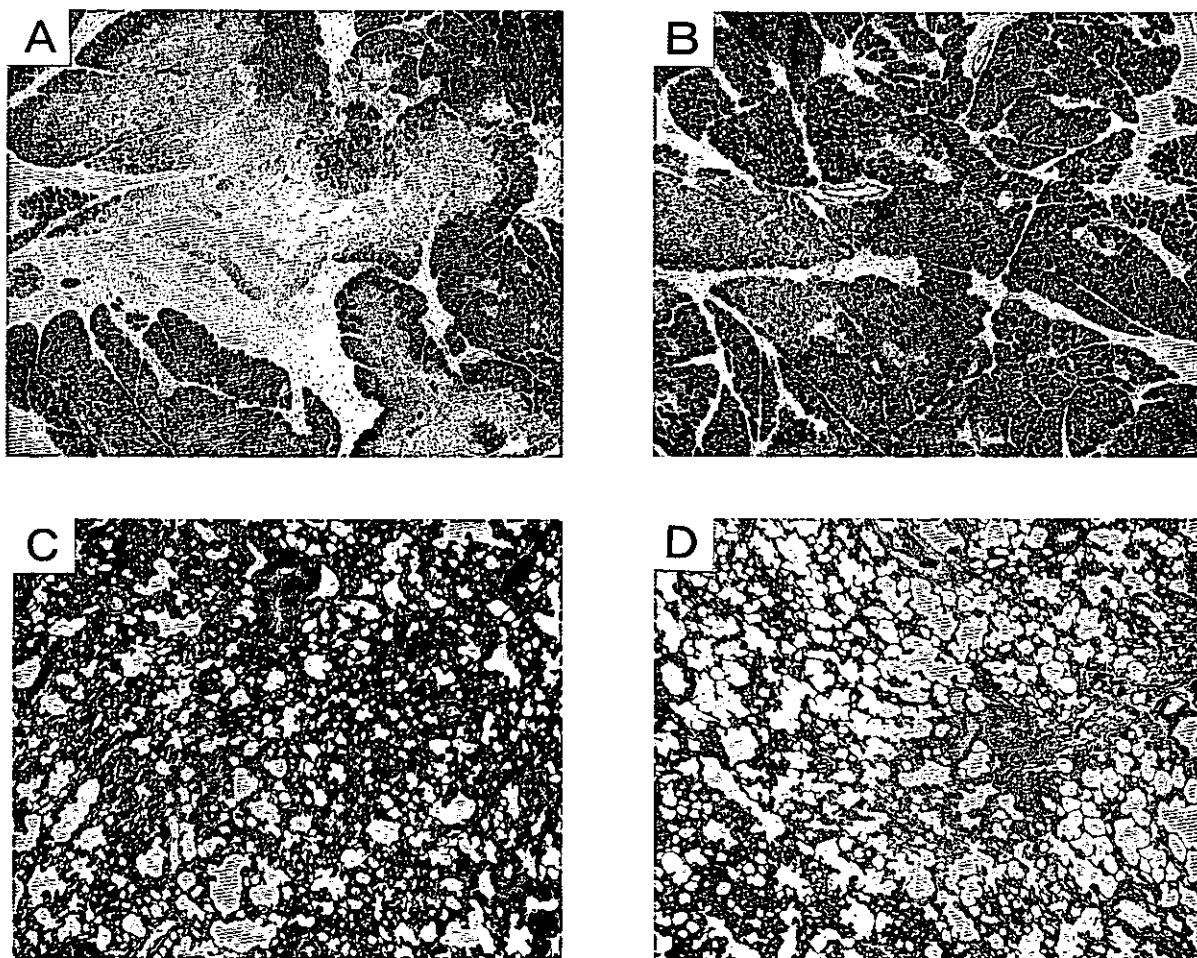


図2 TCA 膵炎誘導 12 時間後の組織像 (倍率×400)

A : 生理食塩水投与群, B : イノシン投与群
C : 生理食塩水投与群, D : イノシン投与群

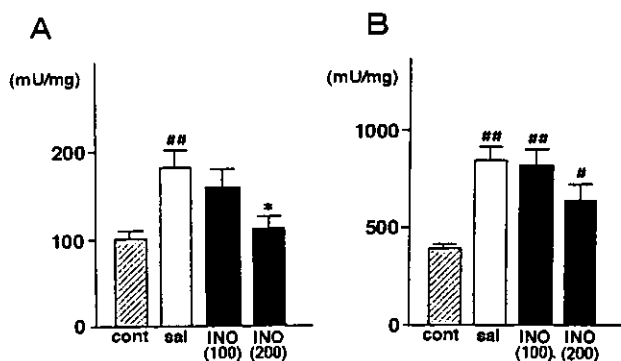


図3 TCA 膵炎に対するイノシン投与の影響
(膵炎誘導 12 時間後)

A : 膵 myeloperoxidase (MPO) 活性

B : 肺 myeloperoxidase (MPO) 活性

: $p < 0.01$, # : $p < 0.05$ (正常ラット (cont) vs. 生理食塩水投与群 (sal), イノシン投与群 (INO:100, 200mg/kg 体重)), * : $p < 0.05$ (生理食塩水投与群 (sal) vs. イノシン投与群 (INO:100, 200mg/kg 体重))

D. 考察

重症急性膵炎では膵局所の炎症が遠隔に波及し、マクロファージ、好中球などの炎症細胞や全身の血管内皮細胞が活性化されることによ

て、重要臓器の機能不全を引き起こすと考えられる。イノシンはこれまでで生理的活性を示さない物質であると考えられてきたが、最近、敗血症、急性肺障害、急性腸炎などの種々の炎症性疾患実験モデルにおいて強力な抗炎症作用を示し、その生存率を改善させたと報告されている²⁻⁴⁾。また、in vitro において、lipopolysaccharide 刺激によるヒト単球、好中球、血管内皮細胞からの TNF- α 、IL-6、IL-8 などの炎症性サイトカイン産生を抑制することが明らかにされている。我々はこれまで、ラット浮腫性膵炎モデルであるセルレイン膵炎に対してイノシンを投与することにより、膵局所ならびに肺への炎症細胞浸潤が抑制され、膵炎像が改善すること、またこれらの効果がイノシンの後投与でも有効であることを明らかにした¹⁾。本研究で我々は、重症急性膵炎モデルであるラットタウロコール酸膵炎(出血壊死性膵炎)に対するイノシン投与の検討を行なった。イノシン投与により血清アミラーゼ値、ヘマトクリット値、組織 MPO 活性の上昇が抑制された。組織

上, 膵ならびに肺への炎症細胞浸潤が抑制され, 膵炎像が改善することを示した. 我々は, 急性膵炎に対するイノシンの抗炎症作用には一部で好中球遊走, 活性を誘導する cytokine-induced neutrophil chemoattractant-1 の抑制を介する機序があること, またイノシンが膵血流増加作用を有することを明らかにしている¹⁾. 本研究でイノシンが急性膵炎の病態改善させた機序として, 炎症性サイトカイン産生阻害を介した炎症細胞浸潤の抑制, 膵血流増加作用が考えられた. しかしながら, 生存率の有意な改善効果はみられず, 今後, イノシンの投与量, 投与方法の検討が必要であると考えられた.

E. 結語

イノシン投与によりラットタウロコール酸膵炎の膵ならびに肺への炎症細胞浸潤が改善した. イノシンは既に臨床で使用されている薬剤であり, 今後, 急性膵炎の治療薬となり得る可能性が示唆された.

F. 参考文献

1. Yamagiwa T, Shimosegawa T, Satoh A, Kimura K, Sakai Y, Masamune A. Inosine alleviates rat caerulein pancreatitis and pancreatitis-associated lung injury. *J Gastroenterol* 2004; 39: 41-9.
 2. Hasko G, Kuhel DG, Nemeth ZH, Mabley JG, Stachlewitz RF, Virag L, Lohinai Z, Southan GJ, Salzman AL, Szabo C. Inosine inhibits inflammatory cytokine production by a posttranscriptional mechanism and protects against endotoxin-induced shock. *J Immunol* 2000; 164: 1013-9.
 3. Liaudet L, Mabley JG, Pacher P, Virag L, Soriano FG, Marton A, Hasko G, Deitch EA, Szabo C. Inosine exerts a broad range of antiinflammatory effects in a murine model of acute lung injury. *Ann Surg* 2002; 235: 568-78.
 4. Mabley JG, Pacher P, Liaudet L, Soriano FG, Hasko G, Marton A, Szabo C, Salzman AL. Inosine reduces inflammation and improves survival in a murine model of colitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2003; 284: G138-44.
- #### G. 健康危険情報
- 該当なし
- #### H. 研究発表
1. 論文発表
 - 1) Yamagiwa T, Shimosegawa T, Satoh A, Kimura K, Sakai Y, Masamune A. Inosine alleviates rat caerulein pancreatitis and pancreatitis-associated lung injury. *J Gastroenterol* 2004; 39: 41-9.
 2. 学会発表
 - 1) 山極哲也, 佐藤晃彦, 正宗 淳, 境 吉孝, 下瀬川徹. ラットセルレイン膵炎に対するイノシン投与の影響. 第 32 回日本膵臓学会大会 北九州 2001年7月12-13日
 - 2) Yamagiwa T, Satoh A, Masamune A, Kimura K, Sakai Y, Shimosegawa T. Inosine improves rat caerulein pancreatitis and pancreatitis-associated lung injury. Meeting of the European Pancreatic Association and International Association of Pancreatology. Heidelberg Germany June 21, 2002
- #### I. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む.)
1. 特許取得 該当なし
 2. 実用新案登録 該当なし
 3. その他 該当なし

重症急性膵炎発症後 G-CSF 投与の効果

研究報告者 杉山政則 杏林大学医学部第一外科学 助教授
共同研究者 脱 紅芳, 阿部展次, 跡見 裕 杏林大学医学部第一外科学

【研究要旨】

重症急性膵炎においては致命率が依然として高い。その原因の一つに膵および膵周囲組織・臓器の感染合併症が挙げられる。教室ではこれまでマウス・セルレイン膵炎モデルを用いて、重症膵炎では血中および腹腔浸出好中球表面のオプソニレセプター(CD11b および CD32/16)の発現が軽症膵炎より低下することを示してきた。さらに、この重症急性膵炎モデルに G-CSF を前投与すると、末梢血好中球と腹腔浸出好中球の数が増加し、腹腔浸出好中球 CD11b および CD32/16 の発現が上昇することも示した。今回、重症急性膵炎惹起後に G-CSF を投与して、好中球オプソニレセプターの発現を検討した。後投与でも前投与と同様の効果が示された。

A. 研究目的

本研究班のこれまでの全国調査で、重症急性膵炎では致命率が依然として高いことが示されている¹⁾。その死因では敗血症をはじめとした感染性合併症が多かった。重症急性膵炎の治療成績向上のためには感染予防対策の検討が課題となっている。好中球は感染予防のファーストラインである。好中球の減少あるいは機能異常の場合に生体が感染しやすいことがよく知られている。一方 G-CSF は好中球増殖因子として、臨床的には白血球減少症例によく用いられている。また、腹膜炎モデルに G-CSF を投与すると、腹腔浸出好中球が増加し、腹腔内感染が改善されたという報告もある。

教室ではこれまでマウス・セルレイン膵炎モデルを用いて、重症膵炎では血中および腹腔浸出好中球表面のオプソニレセプター(CD11b および CD32/16)の発現が軽症膵炎より低下することを示してきた²⁾。さらに、この重症急性膵炎モデルに G-CSF を前投与すると、腹腔浸出好中球数が増加し、腹腔浸出好中球 CD11b および CD32/16 の発現が上昇することも示した。G-CSF の重症急性膵炎への臨床応用の可能性をさらに検討するために、マウス重症急性膵炎の惹起後に G-CSF を投与して、末梢血と腹腔浸出好中球の CD11b と CD32/16 の発現および腹腔内臓器の細菌感染状況を検索した。

B. 研究方法

動物の取り扱いには米国国立衛生研究所のガイドラインを準じ、杏林大学動物実験室倫理委員会の承認を得て行った。Balb/c マウスを用い、セルレイン 50 μ g/kg 体重を 1 時間毎に 13 回皮下投与し、重症急性膵炎を作成した。セルレイン最終投

与 2 時間後に生理食塩水(n=12)あるいは G-CSF(120 μ g/kg 体重, n=12)を投与し、さらに最終投与 14 時間後に追加投与した。セルレイン最終投与 12 時間後または 24 時間後に犠牲解剖し(各 n=6)、末梢血、腹腔浸出液を採取した。CD11b あるいは CD32/16 モノクローナル抗体と反応させて、赤血球を除去した後、FACSscan を用いフローサイトメトリーにより、好中球の CD11b、CD32/16 の発現を測定した。さらに膵、肝、腸間膜リンパ節を無菌採取し、好気・嫌気菌培養を行った。セルレインおよび G-CSF を投与しないマウスで同様の検討を行い、Control 群とした。

C. 研究結果

マウスは屠殺まですべて生存していた。血中アミラーゼ値は膵炎惹起後有意に上昇したが、生理食塩水投与群と G-CSF 投与群の間に有意差を認めなかった(図 1)。膵炎惹起後の膵組織像では、膵の浮腫、白血球浸潤および散在性あるいは巣状な腺房細胞壊死がみられた。生理食塩水投与群と G-CSF 投与群の間に、差異を認めなかった(図 2)。

末梢血および腹腔浸出液中の白血球数は膵炎惹起後 12 時間に Control と比べ有意な変化はなかったが、好中球数は有意に上昇した。白血球数と好中球数は G-CSF 投与群では生理食塩水投与群より有意に上昇した(表 1)。末梢血および腹腔浸出液中の CD11b 陽性好中球数および CD32/16 陽性好中球数は、膵炎惹起後 12 時間に Control より有意に上昇したが、G-CSF 投与群では生理食塩水投与群と比べ、12 時間後の 24 時間後のいずれにおいても有意に上昇した(図 3a, 4a, 5a, 6a)。

膵炎惹起後、末梢血好中球 CD11b と CD32/16 の

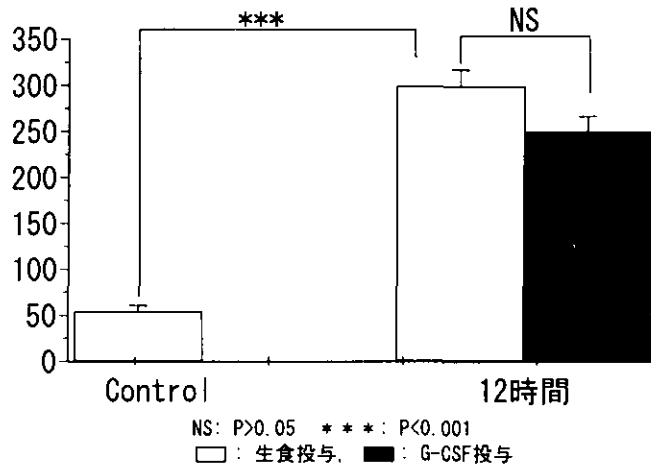


図1 血中アミラーゼの変化

表1 末梢血・腹腔浸出液中の白血球・好中球数

	末梢血 (/mm ³)		腹腔浸出液 (×10 ⁵)		
	白血球	好中球	白血球	好中球	
Control	2480±168	713±99	17.7±1.7	3.9±0.3	
12時間	生食投与	2350±256	1259±195-	8.0±1.0-	
	G-CSF投与	3116±135**	2154±117**	31.0±1.3*	16.0±2*
24時間	生食投与	1650±207	756±150	14.2±1.8	7.0±0.9
	G-CSF投与	4420±274**	3002±250**	24.8±2.2*	13.0±2.0*

**P<0.05, **P<0.01, 生食投与群 vs G-CSF投与群.
-: P<0.05, -: P<0.01, 生食投与群 vs Control群.

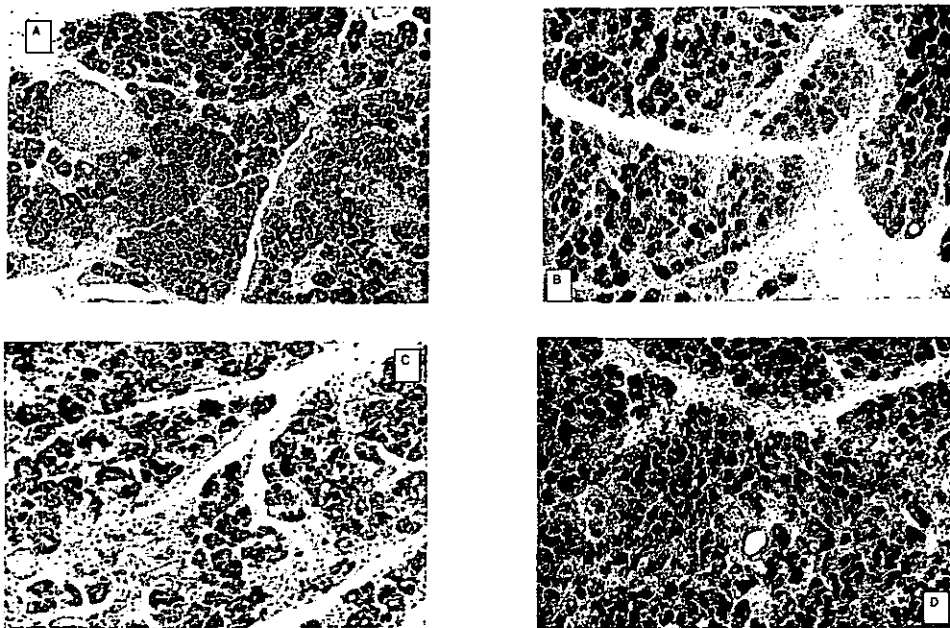
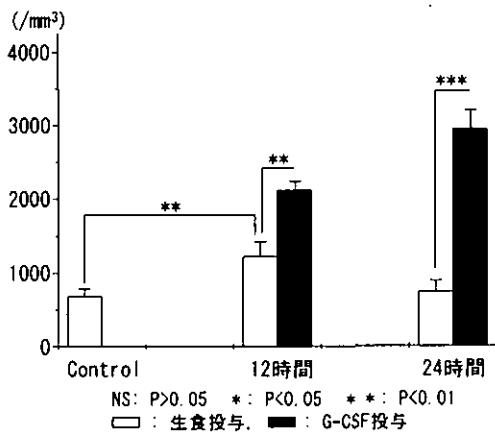


図2 膵組織像

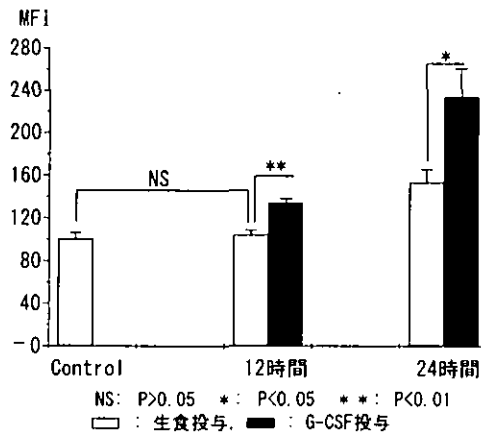
A: 膵炎惹起後生食投与群, 12時間 B: 膵炎惹起後G-CSF投与群, 12時間
C: 膵炎惹起後生食投与群, 24時間 D: 膵炎惹起後G-CSF投与群, 24時間

平均蛍光強度は Control と比べて、有意な変化がなかった。しかし末梢血好中球 CD11b の平均蛍光強度は肺炎惹起 12 時間、24 時間後に G-CSF 群で有意に増強した。末梢血好中球 CD32/16 の平均蛍光強度は 24 時間後に G-CSF 群で有意に増強した (図 3 b, 4 b)。

腹腔浸出好中球 CD11b と CD32/16 の平均蛍光強

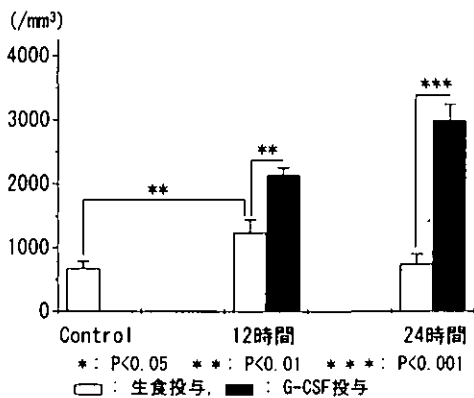


a. CD11b 陽性好中球数

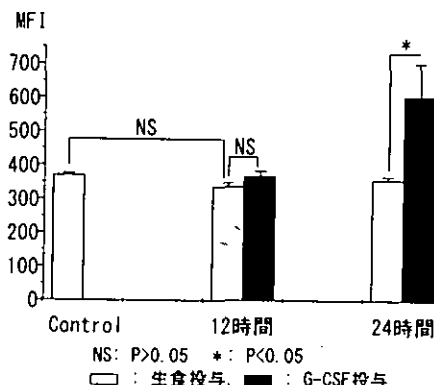


b. CD11b 陽性好中球平均蛍光強度

図 3 血中好中球 CD11b の発現

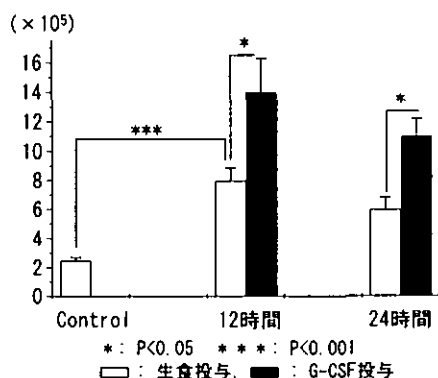


a. CD32/16 陽性好中球数

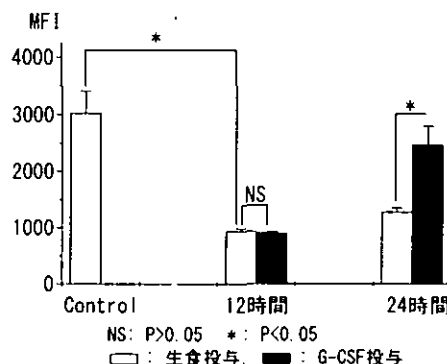


b. CD32/16 陽性好中球平均蛍光強度

図 4 血中好中球 CD32/16 の発現



a. CD11b 陽性好中球数



b. CD11b 陽性好中球平均蛍光強度

図 5 腹腔浸出液中好中球 CD11b の発現

度は肺炎惹起後に Control より有意に低下した。G-CSF 投与によって、24 時間後に有意に増強した (図 5 b, 6 b)。

脾、腸管リンパ節、肝の細菌培養陽性の症例数は G-CSF 投与群と生理食塩水投与群の間に有意差がなかった (表 2)。肺炎惹起後 12 時間の脾細菌検出率は両群とも 50%であった。検出した菌種