

図4 ESWL およびステント治療を行った慢性膵炎患者 222 例の主膵管狭窄の有無

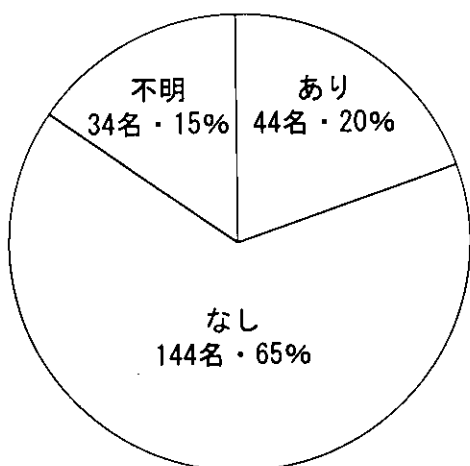


図5 ESWL およびステント治療を行った慢性膵炎患者 222 例の疼痛再発  
疼痛再発：平均 15.6 ヶ月

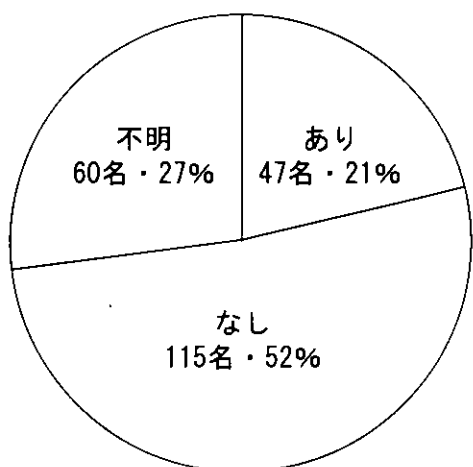


図6 ESWL およびステント治療を行った慢性膵炎患者 222 例の膵石再発  
膵石再発：平均 15.8 ヶ月

っても膵管ステントは約半数の症例でしか留置されていないことが示された。治療後の疼痛再発、膵石再発に関しては治療例の 20%、21%ずつでそれぞれ平均 15.6 ヶ月、15.8 ヶ月に発症していることが示された(図 5, 6)。この数値は当該治療の短期予後成績であり、膵石再発と疼痛再発とがほぼ同頻度で同時期に生じていること背景には、疼痛再発で精査した結果、膵石再発が確認されたことを示しているものと思われた。

#### D. 今後の予定

二次調査に関しては一次調査で回答のあった症例数の約 30%前後でしか個人票が回収されていないため、今後、未回答の医療施設に対し個別に回答を依頼する予定である。その上で本調査の主眼の 1 つである長期成績の検討を行ない、さらに ESWL 単独実施例、ESWL・ステント併用例、およびステント単独例について、以下の各項目を検討する予定である。

##### 1. Outcome の指標

- 1) 除痛効果/発症抑制効果
- 2) 栄養状態への効果
- 3) 耐糖能の維持
- 4) 外分泌能の維持
- 5) 他治療への移行率
- 6) ステント効果の安定性(平均交換回数/年)

##### 2. 適応に関する検討

- 1) 成因と outcome の関連性
- 2) 膵石の数(単発・多発別)・分布・大きさと outcome
- 3) 主膵管狭窄の程度と outcome

#### E. 参考文献

1. 税所宏光, 石原 武, 山口武人. 慢性膵炎におけるステント・ESWL 治療の適応と長期 outcome 調査. 厚生労働科学研究費補助金特定疾患対策研究事業難治性膵疾患に関する調査研究 平成 14 年度総括・分担研究報告書 2003: 110-2.

#### F. 健康危険情報

該当なし

**G. 研究発表**

- 1. 論文発表 該当なし
- 2. 学会発表 該当なし

**H. 知的財産権の出願・登録状況（予定も含む）**

- 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

## II. 慢性膀胱炎

### 2) 各個研究プロジェクト

A 臨床研究

B 実験研究

## 慢性膵炎早期診断マーカーの検討

研究報告者 越智浩二 岡山大学大学院生体情報医学 助教授  
共同研究者 水島孝明, 谷岡洋亮, 白髭昭典, 松下公紀  
岡山大学大学院生体情報医学

### 【研究要旨】

慢性膵炎の早期診断マーカーとしての膵液中 prolyl hydroxylase (PH) の位置付けを明らかにする目的で、膵液中 PH 濃度が 200ng/ml を基準に、膵液中 PH 高値群と PH 低値群に分け、臨床経過を追跡調査し、膵管像、膵内分泌機能の進行について検討を行った。追跡調査を行った 31 例のうち PH 高値群は 8 例認め、その内訳は慢性アルコール症 3 例、慢性膵炎疑診群 3 例、非石灰化慢性膵炎 2 例であった。膵管像の悪化は PH 高値群では 33%、PH 低値群では 11% に認め、膵内分泌機能の悪化は PH 高値群で 14%、PH 低値群で 17% に認めた。膵管像の悪化例はいずれもアルコール性であり、飲酒状態の検討や追跡症例数を増やす必要性はあるが、膵液中 PH が膵管像進行のマーカーである可能性が示唆された。

### A. 研究目的

慢性膵炎の早期診断マーカーで確立したものは現時点ではないのが現状である。早期診断マーカーが確立されれば、慢性膵炎の早期治療が可能となる。われわれはこれまで膵液中 prolyl hydroxylase (PH) を測定し、膵内の線維合成系亢進のマーカーであり、大酒家などで膵液中 PH が高値を示し、早期診断マーカーである可能性が示唆されたが<sup>1)</sup>、臨床的な検討はなされていない。そこで、われわれは膵液中濃度と臨床経過について検討を行った。

### B. 研究方法

膵液は内視鏡的膵液採取法<sup>2)</sup>を用いて採取した。早朝空腹時に内視鏡を用いて、膵外分泌を抑制する抗コリン剤は用いずに、膵管内にカニューレを選択的に挿入し、セクレチン 100 単位静注刺激下に膵液を約 8 ml 用手吸引にて採取した。PH は ELISA 法にて測定した。成因、疼痛経過、膵管像の推移、膵内分泌機能の推移を膵液中 PH 高値群、PH 低値群で比較検討した。膵液の採取、臨床像の経過については十分な説明を行い、書面にて同意を確認した。

### C. 研究結果

膵液中 PH 濃度を測定し、経過を観察できた症例は 31 例で、症例の内訳は慢性膵炎確診群 13 例(石灰化慢性膵炎 5 例、非石灰化慢性膵炎 8 例)、慢性膵炎疑診群 9 例、慢性アルコール症 5 例、対照群 4 例で、性別は男性 18 例、女性 13 例である。

平均観察期間は 6.6 年で、死亡が 3 例(9.4%)観察された。31 例の膵液中 PH 濃度を図 1 に示す。膵液中 PH 濃度を 200ng/ml 以上を PH 高値群、200ng/ml 未満を PH 低値群に設定すると、PH 高値群は 8 例に認められ、その内訳は慢性アルコール症 3 例、慢性膵炎疑診群 3 例、非石灰化慢性膵炎 2 例であり、石灰化慢性膵炎群 5 例は PH 低値群であった。

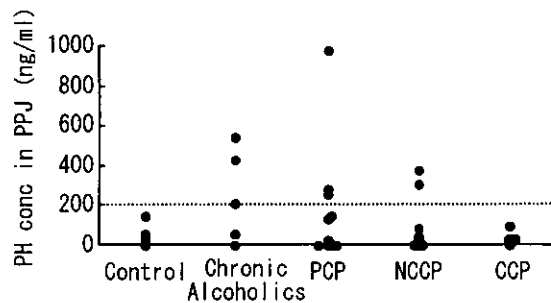


図 1 膵液中 prolyl hydroxylase 濃度

膵管像の推移をみると、PH 高値群では 2 例(33.3%)に膵管像の悪化を認めたが、いずれもアルコール性であった(表 1 A)。PH 低値群は 2 例(11.1%)に進行例を認めたが、これらも成因はアルコール性であった。

膵内分泌機能の推移をみると、PH 高値群では 1 例(14.3%)で膵内分泌機能の悪化を認め、PH 低値群では 4 例(17.4%)に悪化を認めた(表 1 B)。PH 低値群で膵内分泌の悪化を認めた 4 例中 3 例は石灰化慢性膵炎であった。

表1 膵液中 prolyl hydroxylase 濃度と  
(A)膵管像, (B)内分泌の推移

(A) 膵管像の変化		
	不変	進行
PH高値群	4 (2)	2 (2)
PH低値群	16 (9)	2 (2)

(B) 膵内分泌の変化		
	不変	進行
PH高値群	6 (4)	1 (0)
PH低値群	19 (10)	4 (3)

( )はアルコール性

#### D. 考察

PH はコラーゲン合成の律速酵素であり, コラーゲン合成が亢進した場合, 臓器での酵素活性, 酵素量が増加することが知られている。われわれはラットを用いたコリン欠乏食+エチオニン腹腔内投与ラットで, 8週間で膵の線維化が完成することが報告したが, 線維化が完成する以前の4週, 6週目で膵ホモジネートでの PH 濃度がピークに達することが観察され, 膵内 PH は線維化が完成する以前のマーカーとして有望視された<sup>3)</sup>。さらに, ヒト膵液中 PH の測定では, 慢性膵炎の成因で重要な位置を占めるアルコール多飲者や比較的軽症の慢性膵炎で高値を占めることが明らかになり, 膵液中 PH は早期診断マーカーとして期待されたが<sup>2)</sup>, その臨床的位置付けについては検討はなされていない。

今回, 慢性膵炎の予後調査の一環として, 膵液中 PH 濃度測定者について, 追跡調査を行い, その膵管像や膵内分泌機能について検討を行ったところ, PH 高値群では 33%に膵管像の進行を認めただのに対し, PH 低値群では 11%に進行を認め, 膵液中 PH が高値例で膵管像の悪化が多い傾向を認めた。一方, 膵内分泌機能では両群に差を認めなかった。

膵液中 PH は慢性膵炎の早期診断マーカーとして有望視されたが, アルコールの継続飲酒で上昇するため<sup>2)</sup>, 単なるアルコールの影響を反映している可能性も否定できない。今後さらに追跡症例をふやし, 検討する必要がある。

#### E. 結語

膵液中 PH 濃度の高値は膵管像の進行を予知するマーカーである可能性が示唆された。

#### F. 参考文献

- Ochi K, Matsumura N, Yamamoto R, Chowdhury R, Mizushima T, Tanaka J, Harada H. Prolyl hydroxylase and tissue inhibitor of metalloproteinase in pure pancreatic juice in patients with chronic pancreatitis. *Pancreas* 1998; 16: 487-90.
- Ochi K, Harada H, Mizushima T, Tanaka J, Matsumoto S. Intraductal secretin test is as useful as duodenal secretin test in assessing exocrine pancreatic function. *Dig Dis Sci* 1997; 42: 492-6.
- Riaz C, Ochi K, Tanaka J, Harada H, Ichimura M, Miki H. Does recurrent acute pancreatitis lead to chronic pancreatitis? Sequential morphological and biochemical studies. *Pancreas* 1997; 14: 334-41.

#### G. 健康危険情報

該当なし

#### H. 研究発表

- 論文発表 該当なし
- 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。)

- 特許取得 該当なし
- 実用新案登録 該当なし
- その他 該当なし

## ヒストグラム解析を用いた超音波内視鏡による 慢性膵炎の診断

研究報告者 須賀俊博 札幌厚生病院 院長  
共同研究者 宮川宏之, 岡村圭也, 長川達哉, 平山 敦, 阿部 環,  
柏谷琴映, 矢花 崇 札幌厚生病院第2 消化器科

### 【研究要旨】

超音波内視鏡(EUS)による慢性膵炎を診断する上でより客観的な指標の導入を目指し、膵のEUS像をヒストグラムにより解析し定量化することにより慢性膵炎の診断を試みた。対象は92例(男性52例,女性40例 平均年齢54歳)であった。EUS検査時、設定を固定し静止画を装置のハードディスクに保存した。膵体部に25mm<sup>2</sup>のROIを3箇所設定しその輝度ヒストグラムの解析を行った。ヒストグラムの変化では、加齢や高度脂肪置換と思われる例で平均輝度の上昇と歪度の低下が見られた。慢性膵炎では分散や歪度が上昇し、加齢とは明らかに異なる変化であった。早期がより多く含まれると思われる疑診例でより強く分散、歪度、尖度の上昇傾向が見られた。慢性膵炎の診断にEUS像のヒストグラム解析が膵実質の変化を定量評価する方法として有用であることが示唆された。

### A. 研究目的

慢性膵炎の早期診断は現在の診断基準では難しいのが現状である。EUSのterminologyのガイドラインが示されEUSによる慢性膵炎の診断が注目されている。われわれはEUSによる慢性膵炎を診断する上でより客観的な指標の導入を目指し、膵のEUS像をヒストグラムにより解析し定量化することにより慢性膵炎の診断を試みた。

### B. 研究方法

症例は2003年にEUSが行われ、腫瘍性病変のある例を除き画像の保存の可能であった92例である。男性52例(平均年齢53.7歳)、女性40例(平均年齢53.7歳)であった。EUSの使用機種はOLYMPUS EUM-2000, GF-UM2000である。通常検査時に装置のgain 10, contrast 5, range 6cmとしSTCや他の設定をすべて同一とし膵体部をスキャンし装置のハードディスク(HD)に保存した。HDからは800x600ピクセルのビットマップ画像として取り出すことができる。この画像に膵体部の探触子の中心部から2-3cmの深度で膵管や脈管を含まない25mm<sup>2</sup>のROIを設定し、これを画像解析ソフト(Popimaging)にて解析した。1症例で膵体部の3箇所につき同様の操作を行い平均値を計測した。画像は画像解析ソフトで輝度を256階調のヒストグラムに変換しその分布の平均輝度、分散、歪度、尖度に注目し解析した。

(倫理面への配慮)今回の検討はすでに同意を得て行った通常検査の保存画像の検討が対象であり倫理面で問題ないと思われた。

### C. 研究結果

対象症例の内訳は表1のとおりである。対象症例92例は外来または入院で、EUS以外には臨床症状や血液生化学検査さらにUS, CT検査や、MRCP, ERCP検査が行われ診断された。各症例は日本膵臓病学会(2001年)の診断基準によりERCPやMRCPを中心として慢性膵炎の判定を行った。臨床症状、血液生化学やUSのみで慢性膵炎と診断した例はなかった。正常例は胆石症や胆嚢ポリープでの検査の受診例が多かった。慢性膵炎確診例、準確診例はそれぞれ診断基準を満たしたものである。慢性膵炎疑診例は慢性膵炎と考えられるが現在の診断基準では確診や準確診にあてはまらないものである。このグループは慢性膵炎早期例が多く含まれると考えられ例である。膵嚢胞は諸検査

表1 正常例における性差、年齢、脂肪置換による比較  
]:は両群に有意差あり \*:は正常と差あり

	例	年齢	輝度平均	分散	歪度	尖度
正常例	65	53.7	101.5	265.4	0.099	3.07
男	33	54.6	97.2	288.5	0.159	3.03
女	32	53.2	104.2	261.4	0.098	3.11
45以下	12		87.7	278.7	0.261	3.04
70以上	12		106.4	295.3	0.033	2.97
脂肪置換例	20	59.0	113.5*	247.3	-0.045*	2.98

で腫瘍性病変が否定され慢性膵炎も否定的な例で多くは単発の小嚢胞例である。急性膵炎の1例は自己免疫性膵炎の可能性のある例であり他も軽症急性膵炎である。

### 1. 正常例での検討

画像解析において平均輝度は膵実質全般の高・低エコーの目安となると思われ、正常例では平均輝度  $101.5 \pm 18.8$  (mean  $\pm$  1SD) である。分散はヒストグラムのばらつきを現し均一のエコーでは低値を示す。正常例では  $265.4 \pm 59.2$  であった。歪度はヒストグラムの非対称性を示す指標で、階調度数の平均値周りの3次モーメントと標準偏差の3乗の比として定義される。0以上であればヒストグラムの頂部から右裾広がり、0以下であれば左裾広がりかを示し正常は  $0.1 \pm 0.21$  であった。尖度は階調度数の平均値周りの4次モーメントと標準偏差の4乗の比として定義され、分布のとんがりの程度を表す指標で、正規分布が3で示される。3以上で分布はなだらかとなり、3以下で尖状となる。正常は  $3.07 \pm 0.26$  とほぼ正規分布に近い値を示した。

性差は表1のように女で尖度がやや高かった。年齢では45歳以下と70歳以上のともに12例で比較すると高齢になるに従い輝度が上昇し歪度が減少した。画像上脂肪置換の強い例(20例)では加齢と同じように輝度が上昇し歪度が低下したがかならずしも脂肪置換例に高齢者が多いわけではなかった(表1)。

なおCTやMRCPを含めた検査や生化学検査で慢性膵炎を否定され正常例としたが、EUSで慢性膵炎様所見の見られたものが7例あった。これらはEUSのみで診断できる慢性膵炎の可能性があり今後の検討課題である。

### 2. 疾患別検討

平均輝度は正常例  $101.5 \pm 18.8$ 、慢性膵炎確定例  $100.3 \pm 22.4$ 、準確定例  $82.7 \pm 29.3$ 、慢性膵炎疑診  $88.7 \pm 21.1$ 、膵嚢胞  $94.9 \pm 10.8$ 、急性膵炎  $54.8 \pm 25.7$  であり正常例が最も高かった。準確定群では正常例と比べ有意に低かった。軽症急性膵炎は2例のみであるが高度に低下した(図1, 表2)。分散は正常  $276.0 \pm 67.7$ 、確定  $425.8 \pm 176.2$ 、準確定  $308.8 \pm 138.6$ 、疑診  $374.6 \pm 66.1$ 、膵嚢胞  $282.0 \pm 57.6$ 、急性膵炎  $184.8 \pm 100.5$  と慢性膵炎では分散は上昇し確定例で最も高く疑診例が次に上昇

していた。膵嚢胞は正常例と大差なく、軽症急性膵炎では低下した(図2)。歪度は正常が  $0.1 \pm 0.21$ 、確定  $0.25 \pm 0.26$ 、準確定では  $0.43 \pm 0.22$ 、疑診  $0.54 \pm 0.14$ 、膵嚢胞  $0.17 \pm 0.09$ 、急性膵炎  $0.57 \pm 0.08$  であり正常と比べ膵嚢胞以外では上昇が見られ、確定準確定群より疑診群で上昇が強く膵炎が進行するに従い低下に転じると思われた。膵嚢胞は嚢胞部を除き正常と考えられる例でヒスト

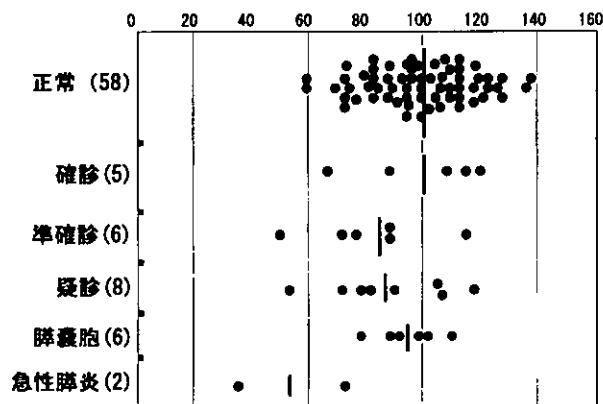


図1 平均輝度

準確定例や疑診例は輝度の低下傾向が見られる。確定例は正常や膵嚢胞例に近い。

表2 各疾患における輝度、分散、歪度、尖度  
太字は正常例と差あり

	例	年齢	輝度平均	分散	歪度	尖度
正常例	65	53.7	100.8	276.0	0.131	3.07
慢性膵炎確定	5	56.2	100.3	425.8	0.249	3.09
慢性膵炎準確定	6	61.3	82.7	308.8	0.427	3.36
疑診群	8	46	88.7	374.6	0.543	3.29
膵嚢胞	6	60.1	94.9	282.0	0.169	2.99
急性膵炎	2	29.5	54.8	184.8	0.573	3.65

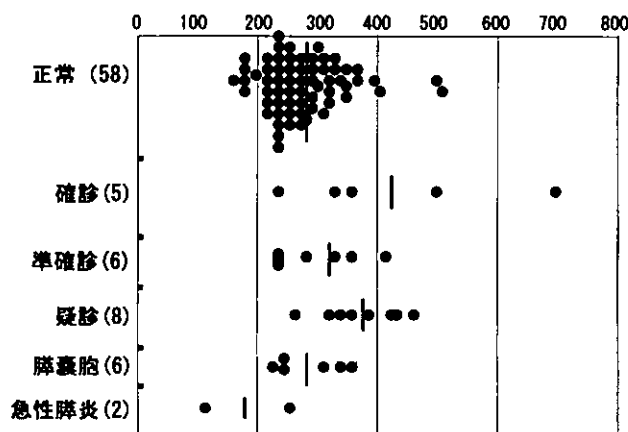


図2 分散

分散は確定例で最も高く疑診例、準確定が次に上昇していた。正常と膵嚢胞は同様である。

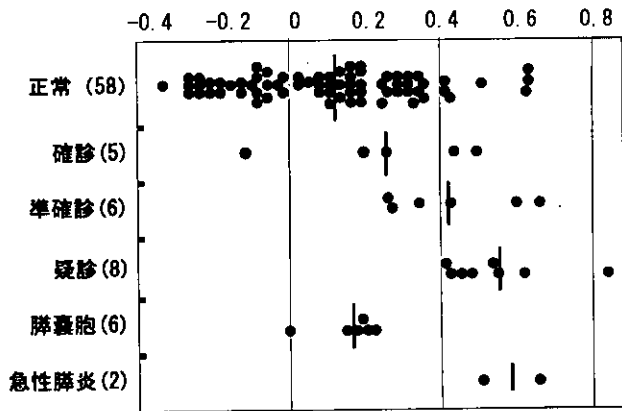


図3 歪度

歪度は疑診例で最も高く準確診, 確診と進行するにつれ低下する。軽症急性膵炎も上昇していた。

グラムからも正常と変わりが見られなかった(図3)。尖度は正常が  $3.07 \pm 0.25$  であり, 確診  $3.09 \pm 0.34$ , 準確診では  $3.36 \pm 0.91$ , 疑診  $3.29 \pm 0.32$ , 膵嚢胞  $2.99 \pm 0.14$ , 急性膵炎  $3.65 \pm 0.08$  であった。準確診, 疑診, 急性膵炎で高めであった(図4)。

#### D. 考察

EUS 上明らかに正常と思われる例では, EUS による膵体部の speckle はきめ細かく均一のエコーで, 分散は低めとなり, 輝度は脂肪置換が多いものは高輝度となるがそうでなければそれほど輝度が高くない。歪度は speckle が均一なほど分布のゆがみが少なく 0 に近く, 尖度も 3 に近づく。最近超音波による組織性状診断のひとつとしてテクスチャ解析が行われている<sup>1-5)</sup>。これにより内部組織の繊維化などの特異的变化を捉える指標として有用であることが示めされている。肝疾患や顎下腺における超音波による組織診断の検討から<sup>1,2)</sup>, 画像のヒストグラム解析が繊維化の指標になることが示唆されており, 特に組織学的に膵と類似しているとされる顎下腺で加齢の変化や唾石症における変化<sup>1)</sup>が類似した結果であったことから, 膵の EUS によるヒストグラムを用いた数量化により膵繊維化や脂肪置換の変化を画像で捕らえられる可能性が十分あると思われる。正常例のなかで他の検査や臨床的にまったく正常で EUS のみで慢性膵炎と診断された例が 7 例あったが, ヒストグラムでは慢性膵炎例と同様に分散や歪度の上昇がみられた。これらの例は膵の組織学的異常が EUS に反映されている可能性があり今後慢性膵炎に進展するか経過観察が必要であると考えられる。

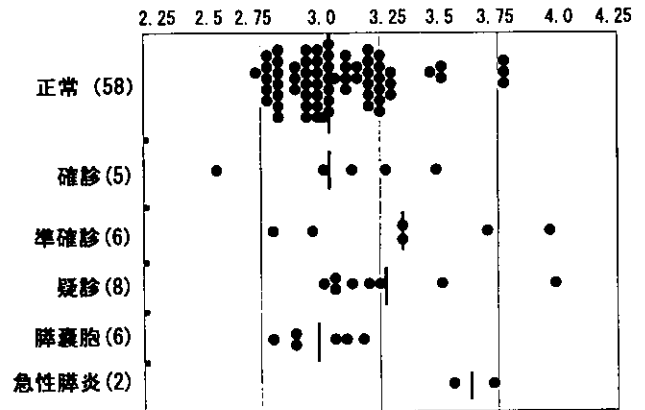


図4 尖度

尖度は準確診例, 疑診例で上昇し確診例は正常・膵嚢胞例に近い。

慢性膵炎の診断は ERCP が gold standard とされてきたが, その侵襲性と早期診断能には問題のあるところである。広くスクリーニング検査として用いられている US は侵襲がなく一般的な検査ではあるが, その描出能は早期の膵疾患の診断に耐えるとは言い難い。EUS は CT など客観的な画像に対し検者の描出力や経験さらに施設間で画像の解釈も異なり膵炎の診断を基準化することが難しかった。今回 EUS 画像を定量的に捉え診断に応用することで今までの検者の主観や施設間の相違の影響を排除し, より客観的な評価が可能となると思われる。膵は他臓器よりもより超音波画像を得ることが難しく, さらに EUS は技術的にも腹部超音波検査ほど簡単ではないが, 今回用いた膵体部の描出は比較的容易であり, さらに他の方法より侵襲が少なく膵の組織学的変化を定量化し診断に役立てることができる可能性が推測され, 慢性膵炎の診断への応用が期待される。

#### E. 結語

膵の EUS 画像から輝度ヒストグラムを作成した。慢性膵炎の診断では分散, 歪度, 尖度が上昇し早期が多く含まれると思われる疑診例でも同様の傾向がみられ, 慢性膵炎のより早期の診断の可能性が示唆された。

#### F. 参考文献

1. 三輪邦弘, 神田重信, 湯浅賢治. 輝度ヒストグラム解析法を用いた顎下腺超音波増の定量的分析. 歯科放射線 2002; 42: 110-20.
2. 藤井康友, 谷口信行, 王 怡, 重田浩一郎, 尾本きよか, 伊藤紘一, 曹 景文, 隈崎健二,



伊藤貴司, 高山智司. 肝の超音波組織性状診断に関する研究 -ROI の分割化による RF 信号の包絡振幅のヒストグラム解析法を用いた肝硬変の評価-. J Med Ultrasonic 2001 ; 28 : 25-33.

3. 木村俊一. 腹部実質臓器の超音波検査に関する研究-echo-histogram による肝腎コントラストの定量的測定. 特に慢性肝疾患および腎疾患における検討-. 超音波医学 1986 ; 13 : 425-33.
4. 谷口信行, 伊藤紘一, 鈴木 修, 川井夫規子, 森 博昭, 中村みちる. ヒストグラムによる脂肪肝の肝腎コントラストの評価法とその問題点について. 超音波医学 1991 ; 18 : 856-63.
5. Morita Y, Takiguchi M, Yasuda J, Eom K, Hashimoto A. Endoscopic ultrasonographic findings of the pancreas after pancreatic duct ligation in the dog. Vet Radiol Ultrasound 1998; 39, 557-62.

#### G. 健康危険情報

該当無し

#### H. 研究発表

1. 論文発表 該当無し
2. 学会発表 該当無し

#### I. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

1. 特許取得 該当無し
2. 実用新案登録 該当無し
3. その他 該当無し

## 慢性膵炎における主膵管狭窄の治療 —メタリックステント 短期留置—

研究報告者 乾 和郎 藤田保健衛生大学第2教育病院消化器内科 助教授  
共同研究者 芳野純治, 奥嶋一武, 三好広尚, 中村雄太  
藤田保健衛生大学第2教育病院消化器内科

### 【研究要旨】

我々は慢性膵炎に伴う主膵管狭窄の新しい治療法としてメタリックステント短期留置法を考案し、ESWL後の結石再発例3例に対して結石再発予防目的に本法を行った。フルカバーしたDiamond Stentを膵管内に2～7日間留置し、狭窄部を拡張した。経過観察期間は14～21ヶ月(平均17ヶ月)で、結石再発や膵炎発作はなく、経過良好である。合併症としてステントの刺激による疼痛を2例に認めた。主膵管狭窄に対するDiamond Stentの短期留置法は有効な拡張術であり、結石再発予防効果が期待できる。今後、症例を重ねて更なる検討をする必要がある。

### A. 研究目的

膵石症に対する体外衝撃波結石破砕療法(ESWL)は1987年のSauerbruchらの報告<sup>1)</sup>が最初で、以後本邦でも試みられ主膵管内結石の非手術的治療法としての有用性に関する報告<sup>2-4)</sup>もされている。しかし、長期予後において結石再発の問題があり、特に主膵管狭窄例では結石再発が多い。我々は主膵管狭窄の治療としてプラスチックステントを用いた膵管ステンティングを行ったが、十分な結石再発予防効果は得られず、ステントの閉塞が結石再発や膵炎発作を惹起した可能性も示唆された。そこで、メタリックステントを短期留置して、ステントの拡張力により狭窄部を拡張する方法を考案した。本法を慢性膵炎に伴う主膵管狭窄3例に実施したので、その治療効果の有無を明らかにすることを目的として研究を行った。

### B. 研究方法

対象は慢性膵炎に伴う頭部主膵管狭窄3例で、年齢は39～59歳(平均51歳)、全例男性、慢性膵炎の原因はアルコール性2例、特発性1例であった。全例膵石症でESWLによる治療歴があり、結石除去後に再発した症例で、再発回数は2～5回(平均3回)であった。

治療するにあたり倫理面には充分配慮し、全例でinformed consentが得られた後に実施した。

主な使用機器と材料は、十二指腸内視鏡オリンパス社製TJF type200, Boston Scientific社製Diamond Stent(ステント長40mm), ガイドワイヤー—Boston Scientific社製Jagwire(0.035inch)で

あった。Diamond Stentはポリウレタンでフルカバーし、ステント外径は10mm 2本と8mm 1本であった。

ステント留置は再発結石をESWLで除去した後に行った。全例結石除去のため内視鏡的膵管口切開術はすでに実施されている症例であった。実際の方法を以下に述べる。当日は絶飲食とし、乳酸加リンゲル液にて血管確保した。前投薬として出棟時に硫酸アトロピン0.5mgとペンタゾシン30mgを筋注、内視鏡挿入前に臭化ブチルスコポラミン40mg筋注とジアゼパム15mg静注を行った。ステントの留置方法は、X線透視室にて膵管造影後に造影用カニューレから膵管内へガイドワイヤーを挿入し、ガイドワイヤーを膵管内へ残してカニューレを抜去した。その後、ステントのデリバリーシステムをガイドワイヤーを介して膵管内へ挿入し、ステントを留置した。

術後は、ステント挿入当日は絶食で飲水のみ許可し、翌日血液検査を行った後に食事を許可した。また、膵炎予防のため輸液、抗生剤投与、メシル酸ガベキサート600mg投与を2日間行った。

### C. 研究結果

ステントは2～7日間(平均4日間)留置後に抜去した。抜去後の膵管造影では狭窄部は拡張され、造影剤の流出も良好であった。ステント抜去後の経過観察期間は14～21ヶ月(平均17ヶ月)で、結石再発や膵炎発作はない。

合併症として、ステント留置中にステントの刺激による疼痛を2例に認め、ジクロフェナクナト

リウム坐剤投与やペンタゾシン筋注で対処した。  
ステント抜去により疼痛は消失した。

#### D. 考察

慢性膵炎症例とくに膵石症例において膵管狭窄はしばしばみられ、膵液の鬱滞により膵管内圧の上昇を引き起こし疼痛や膵石形成の一因になると考えられる。膵管狭窄や膵石を放置すれば膵炎発作を繰り返すことにより慢性膵炎が進行し、やがては膵機能が廃絶して社会生活に重大な影響を及ぼすことになる。膵管狭窄や膵石そのものを除去する治療法は膵切除術や膵管減圧術などの手術療法が主流であったが、最近では ESWL が膵石にも応用され、有用な非手術的膵石除去法であると報告<sup>2-4)</sup>されており、我々も膵石症の第一選択の治療法として ESWL を行っている<sup>3)</sup>。しかし、ESWL には結石再発の問題があり、我々の症例でも平均 4 年の経過観察期間で 42% に再発を認めている。主膵管狭窄の有無でカプランマイヤー法で累積再発率を比較すると 1 年累積再発率は主膵管狭窄例 57%、非狭窄例 8% であり、狭窄例は有意に高い再発率であった。再発予防のためプラスチックステント留置を試みたが、十分に狭窄部を拡張することはできず、再発予防効果も得られなかった。また、ステント閉塞により再発や膵炎発作を惹起した可能性も示唆された。そこで、メタリックステントを膵管内に留置し、ステントの拡張力によって狭窄部を拡張する方法を考案した。ステントは拡張後に確実に抜去するためにフルカバーとし、カバーにより分枝膵管を閉塞してしまうため短期間留置する方法とした。今回の検討では全例狭窄部の拡張に成功し、拡張後に結石再発や膵炎発作もなく経過良好であり、膵管狭窄の治療法として期待できる結果が得られた。問題点は 2 例でステントの刺激による疼痛を認めたことであり、1 例で外径 8 mm にステントを加工して用いた。ステントの細径化などの疼痛対策と長期予後の検討が今後の検討課題である。

#### E. 結語

主膵管狭窄に対する Diamond Stent の短期間留置法は有効な拡張術であり、結石再発予防効果が期待できる。今後、症例を重ねて更なる検討をする必要がある。

#### F. 参考文献

1. Sauerbruch T, Holl J, Sackmann M, Werner R, Wotzka R, Paumgartner G. Disintegration of a pancreatic duct stone with extracorporeal shock waves in a patient with chronic pancreatitis. *Endoscopy* 1987; 19: 27-8.
2. Ohara H, Hoshino M, Hayakawa T, Kamiya Y, Miyaji M, Takeuchi T, Okayama Y, Gotoh K. Single application extracorporeal shock wave lithotripsy is the first choice for patients with pancreatic duct stones. *Am J Gastroenterol* 1996; 91: 1388-94.
3. 奥嶋一武, 中澤三郎, 芳野純治, 若林貴夫, 小林 隆, 滝 徳人, 中村雄太, 高島東伸, 鶴飼宏司. 体外衝撃波結石破碎療法—総胆管結石, 膵石. 内藤靖夫, 乾 和郎編. 胆膵治療における最新の進歩. 東京: 医学図書出版株式会社, 1988: 22-9.
4. 税所宏光, 山口武人, 石原 武. 膵石を伴う慢性膵炎の内科的治療. *日本消化器病学会雑誌* 2002; 99: 1186-90.

#### 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) 奥嶋一武, 乾 和郎, 芳野純治, 若林貴夫, 三好広尚, 中村雄太, 永田正和. ESWL と膵管 stent 併用療法の有用性と問題点. 第 34 回日本膵臓病学会大会 (ワークショップ) 千葉 2003 年 7 月 10 日
  - 2) 奥嶋一武, 乾 和郎, 中村雄太. 膵管 stent による主膵管狭窄の治療—再発予防の試み—. 第 66 回日本消化器内視鏡学会総会 (ワークショップ) 大阪 2003 年 10 月 16 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

## 新しい慢性膵炎モデル—持続的膵管内圧負荷による膵線維化モデル

研究報告者 大槻 眞 産業医科大学第三内科 教授  
共同研究者 山本光勝, 大谷宗規, 田口雅史, 田代充生, 木原康之, 中村早人  
産業医科大学第三内科

### 【研究要旨】

慢性膵炎患者では膵管内圧が上昇していることから, ラットの膵管内圧を持続的に上昇させて慢性膵炎モデルの作成を試みた. 雄性ウイスターラットの胆膵管十二指腸開口部と肝門部胆管にそれぞれカニューレを挿入し膵液と胆汁を体外へ一旦流出させ, その後十二指腸へ戻すモデルを作成した. 術後3日より2週間, 膵管に挿入したカニューレの遠位端を挙上させて膵管内圧を上昇させた. 膵液のアミラーゼ濃度は圧負荷群では圧負荷開始後急激に低下し, その後更に低下したが, 蛋白濃度は一過性に低下した後増加した. 圧負荷2週間後, 膵液ムコ蛋白濃度は対照群より有意に増加しており, 膵液蛋白濃度の増加の一因と考えられた. 圧負荷群の膵臓は, 組織学的に小葉形成と膵管拡張を認め, 小葉内, 小葉間にフィブロネクチン, 3型コラーゲンの沈着, 及び $\alpha$ -SMA陽性細胞の増加を認め, また TGF $\beta$  mRNA 発現の増加も認めた. 膵管内圧を亢進させることにより, 組織学的及び生理学的に人間の慢性膵炎に極めて類似した慢性膵炎モデルを作成できた. この結果から慢性膵炎の発症及び進行には, 膵管内圧の亢進が重要と考えられた.

### A. 研究目的

慢性膵炎の治療法の新たな開発や病態の解明のため適切な実験モデルの開発が望まれているが, 未だに組織学的, 生理学的に人間の慢性膵炎に類似した実験モデルはない. 慢性膵炎患者において蛋白塞栓や膵石の形成や, 膵液の粘稠度の亢進等から膵管内圧が上昇していることが報告されている. この様な膵管内圧や膵組織内圧の上昇は腹痛や仮性嚢胞の原因と考えられているが, 膵管内圧の亢進と膵線維化の進行については十分に検討されていない. 我々はラットの膵管内圧を持続的に上昇させ, 慢性膵炎モデルの作成を試みた.

### B. 研究方法

体重 270 g の雄性ウイスターラットの胆膵管十二指腸開口部と肝門部胆管にそれぞれカニューレを挿入し膵液, 胆汁を一旦体外へ流出させ, その後十二指腸へ再注入する実験モデルを作成した. ラットはボルマングージに入れて飼育し, 術後3日より2週間, 膵管に挿入したカニューレの遠位端を挙上させることにより膵管内圧を上昇させた(圧負荷群). まず膵管カニューレの遠位端を膵臓から 25cm の高さに上げ, その後は1日に5cm ずつ上昇させ, 膵液の流れが妨げられたら流れが保たれる位置まで膵管カニューレの遠位端を下げて,

膵管内圧を調整した. 対照群には圧負荷群と同様にカニューレを挿入したが, 膵管に圧負荷は加えなかった.

(倫理面への配慮)本実験は本学の動物実験及び飼育倫理審査委員会の承認を得て行った.

### C. 研究結果

膵管内圧負荷開始後, 圧負荷群の膵液量の低下と共に膵液中のアミラーゼ濃度も著しく低下した(図1A, B). 圧負荷群の膵液中の蛋白濃度は圧負荷開始直後一旦低下したもののその後は徐々に増加し, 2週間後には圧負荷開始前とほぼ同じ濃度にまでに回復した(図2). 膵管内圧負荷2週間後の膵液ムコ蛋白濃度は対照群と比較して有意に増加していた(図3).

圧負荷群の膵臓は, 組織学的に膵管拡張と小葉間, 小葉内の著明な線維化と炎症細胞浸潤, 及び実質の高度な萎縮を認めた(図4A). 膵免疫組織化学染色では小葉間及び小葉内に著明な3型コラーゲン(図4B)とフィブロネクチン(図4C)の沈着を認め,  $\alpha$ -smooth muscle actin( $\alpha$ -SMA)陽性細胞の増加を膵管周囲, 小葉間, 小葉内に認めた(図4D). 対照群にはこれらの変化は認められなかった.

膵線維化の刺激機構を解明するために, 膵臓に

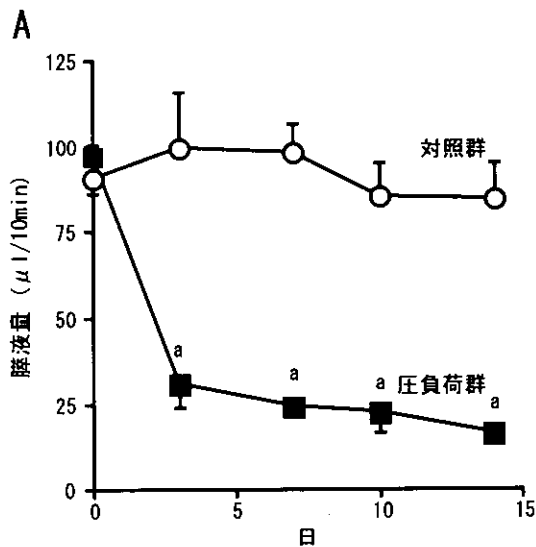


図 1A 膵管内圧負荷後の膵液量の変化

膵液量は膵管内圧負荷開始後著しく減少し、その後は膵液量が一定に保てるように膵管内圧負荷を調整した。a: P<0.05 vs control

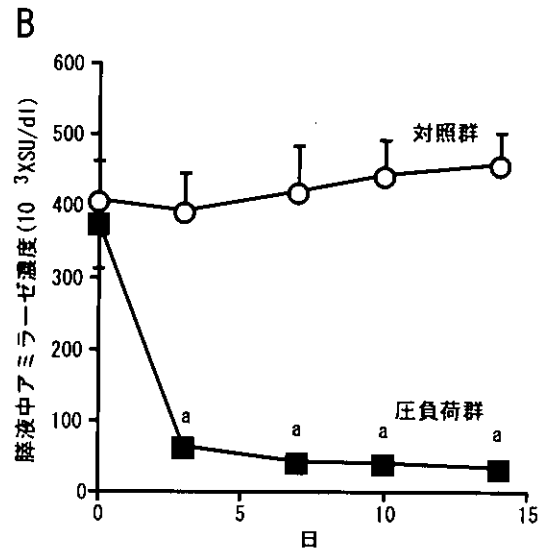


図 1B 膵管内圧負荷後の膵液アミラーゼ濃度の変化

膵液アミラーゼ濃度は膵管内圧負荷開始後著しく低下し、その後更に低下した。a: P<0.05 vs control

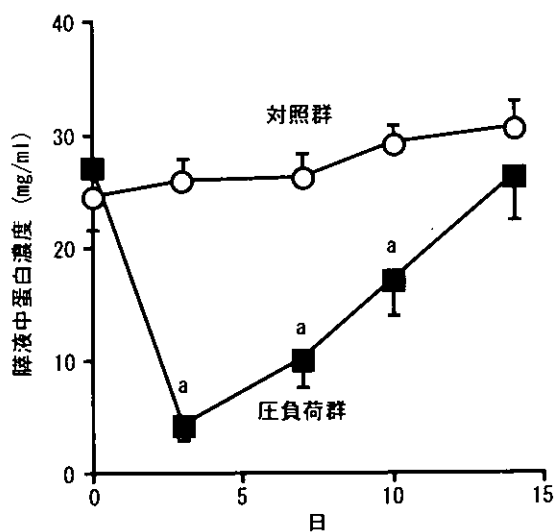


図 2 膵管内圧負荷後の膵液中の蛋白濃度の変化

膵液中の蛋白濃度は膵管内圧負荷開始後著しく低下しましたが、その後は徐々に増加し 2 週間後には対照群と同程度まで回復した。a: P<0.05 vs control

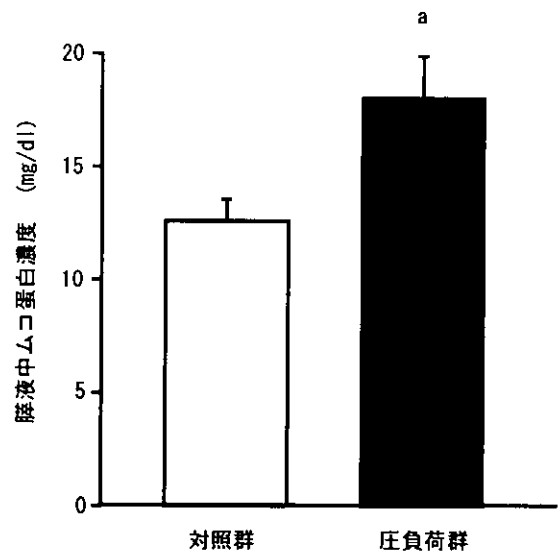


図 3 膵管内圧負荷後の膵液中のムコ蛋白濃度の変化

膵管内圧負荷 2 週間後、膵液中のムコ蛋白濃度の有意な増加を認めた。a: P<0.05 vs control

における TGFβ mRNA 発現を定量的リアルタイム RT-PCR 法にて測定した結果、圧負荷群では対照群と比較して約 4 倍の有意な増加を認めた(図 5)。

#### D. 考察

慢性膵炎の病態には未だに不明な点が多く、また膵臓に線維化が生じると非可逆的であり、現在

も有効な治療法はない。これらを解決するには適切な慢性膵炎実験モデルを開発する必要があると考えられる。

慢性膵炎の成因としてアルコールが最も多いが、大酒家でも慢性膵炎を発症するのは数%にすぎない<sup>1)</sup>、動物実験においてアルコールを大量摂取させても慢性膵炎を作成することは困難である<sup>2)</sup>。これらの事実は慢性膵炎の発症にはアルコール

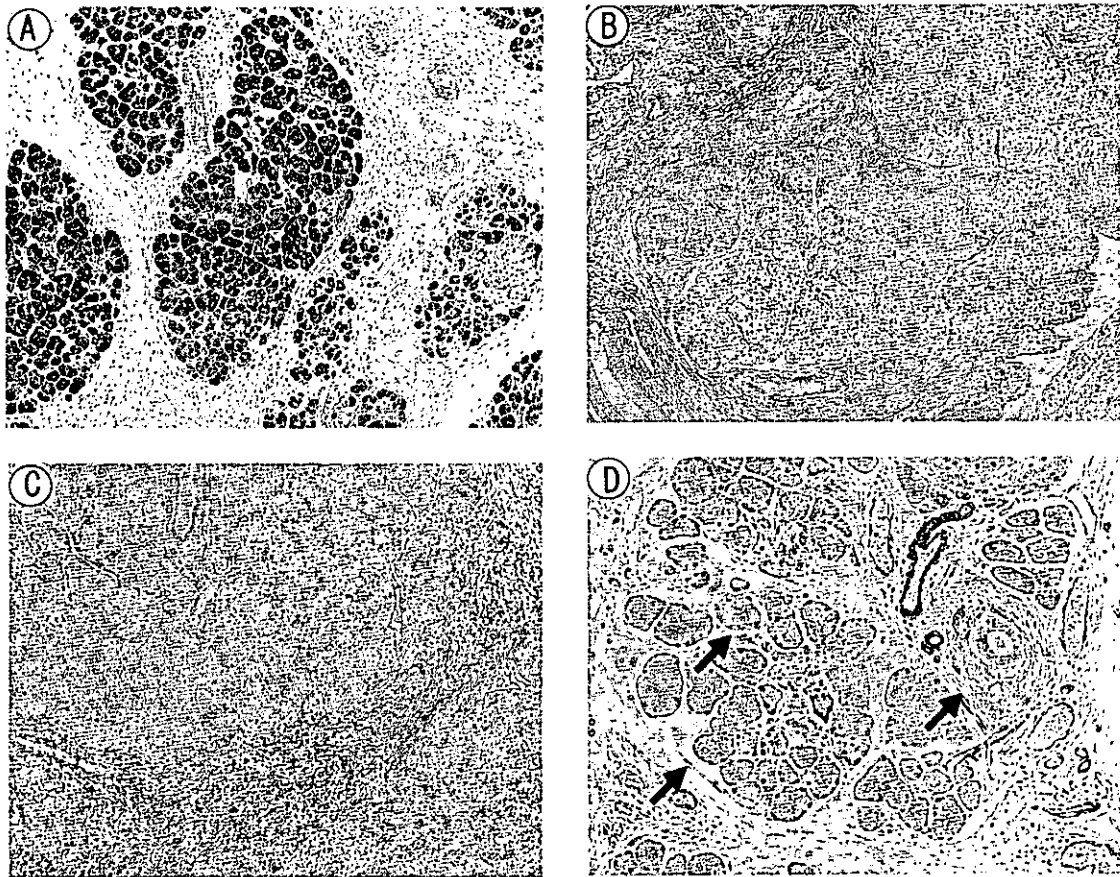


図4 膵管内圧負荷2週間後の膵組織像

- A: 膵臓は小葉形成を認め腺房細胞は萎縮し、小葉間、小葉内に線維化及び炎症細胞浸潤を認める。(HE染色; 倍率100倍)  
 B: 小葉間、小葉内に3型コラーゲンの沈着を認める。(免疫組織化学染色; 倍率100倍)  
 C: 小葉間、小葉内にフィブロネクチンの沈着を認める。(免疫組織化学染色; 倍率100倍)  
 D: 導管周囲、小葉間、小葉内に $\alpha$ -SMA陽性細胞の増加を認めた(矢印は左から小葉間、小葉内、導管周囲を示す。)(免疫組織化学染色; 倍率100倍)

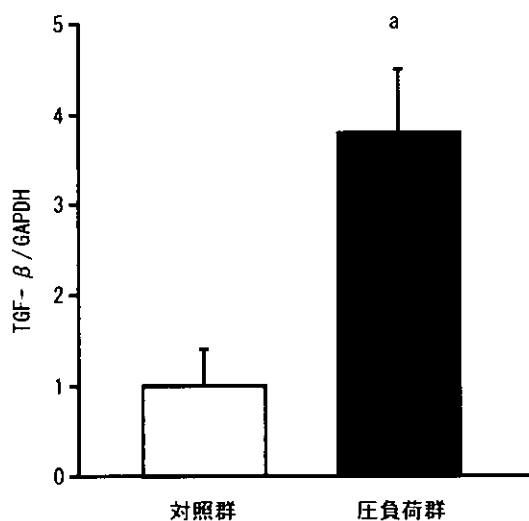


図5 膵管内圧負荷後の膵 TGF  $\beta$  mRNA 発現の変化

膵管内圧負荷2週間後、膵臓に有意な TGF  $\beta$  mRNA 発現の増加を認めた。a:  $P < 0.05$  vs control

摂取以外の要因が強く関与していることを示唆している。

本実験モデルでは膵液流出を完全に止めるのではなく、一定の膵液流出を保ちながら膵管に圧負荷を加えると、脂肪置換は少なく、膵小葉間、小葉内に3型コラーゲンとフィブロネクチンの沈着を伴う線維化及び $\alpha$ -SMA陽性細胞の増加を認め、人間の慢性膵炎と類似した組織所見を呈していた<sup>3)</sup>。また本実験モデルでは膵液中のムコ蛋白濃度が著明に増加しており、人間の慢性膵炎患者における膵液成分の変化と一致していた<sup>4)</sup>。本実験モデルでも蛋白塞栓様の塞栓物質は膵管内に認められており、更に長期観察すると膵石形成が認められるのではないかとと思われる。

近年 TGF  $\beta$  がラットや人間の膵星細胞を活性化させ膵線維化を促進させる事が報告されている<sup>5)</sup>。本実験においても膵管内圧負荷により TGF  $\beta$  mRNA 発現の亢進を認め、 $\alpha$ -SMA陽性細胞が増加

していたことより、膵管内圧負荷により膵星細胞が活性化され膵線維化が進行したと考えられる。

現在の所、膵管内圧の亢進は慢性膵炎の原因か結果かは明らかでないが、本実験は膵管内圧上昇を生じさせた結果、膵臓に線維化を生じさせており、膵管内圧の亢進は慢性膵炎の原因に成り得ることを示している。

#### E. 結語

膵管内圧を亢進させることにより、人間の慢性膵炎と極めて類似した実験モデルを作成できた。この結果から慢性膵炎の発症、進展には膵管内圧の亢進が重要であると考えられた。

#### F. 参考文献

1. Haber P, Wilson J, Apte M, Korsten M, Pirola R. Individual susceptibility to alcoholic pancreatitis: still an enigma. *J Lab Clin Med* 1995; 125: 305-12.
2. Singh M, LaSure MM, Bockman DE. Pancreatic acinar cell function and morphology in rats chronically fed an ethanol diet. *Gastroenterology* 1982; 82: 425-34.
3. Suda K. Pathogenesis and progression of human pancreatic fibrosis. *Med Electron Microsc* 2000; 33: 200-6.
4. Harada H, Takeda M, Yabe H, Hanafusa E, Hayashi T, Kunichika K, Kochi F, Mishima K, Kimura I, Ubuga T. The hexosamine concentration and output in human pure pancreatic juice in chronic pancreatitis. *Gastroenterol Jpn* 1980; 15: 520-6.
5. Bachem MG, Schneider E, Gross H, Weidenbach H, Schmid RM, Menke A, Siech M, Beger H, Grunert A, Adler G. Identification, culture, and characterization of pancreatic stellate cells in rats and humans. *Gastroenterology* 1998; 115: 421-32.

#### 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) 山本光勝, 大谷宗規, 柴田道彦, 大槻 眞. 新しい慢性膵炎モデルの開発. 第89回日本消化器病学会大会 さいたま 2003年4月24-26日
- 2) Yamamoto M, Otani M, Otsuki M. Development of new model of chronic pancreatitis in rats. Annual Meeting of American Pancreatic Association. Chicago, November 6-9, 2003

#### 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

## 慢性膵炎における Notch signaling の役割に関する研究

研究報告者 石井裕正 慶應義塾大学医学部消化器内科学 教授  
共同研究者 秋葉保忠, 山岸由幸 慶應義塾大学医学部消化器内科学

### 【研究要旨】

発生過程において Notch signaling は細胞分化, 増殖および器官形成などに関与する. 膵発生において Notch signaling は外分泌と内分泌への分化の方向性を決定付けている. 慢性膵炎における Notch signaling の関与を明らかにする目的で, 慢性エタノール投与ラットおよび四塩化炭素(CCl<sub>4</sub>)長期投与ラットの膵における, Notch(N)およびその ligand である Delta(D1)の発現と分布の変化を組織化学的に検討した. 健常膵では, N2がβ細胞に, N4がα細胞に認められた. N3はα, β以外のラ氏島細胞, 膵管細胞, 腺房中心細胞に, D1はラ氏島内間葉系細胞, 膵管細胞に認められた. CCl<sub>4</sub>投与ラット膵では N3および D1ともに染色性の低下を認め, 膵内陽性部位も減少していた. エタノール投与ラット膵では N3および D1の低下とともに N2の染色性が増加した. 以上より, Notch が subtype 別に膵に発現し, 慢性膵刺激により発現が変化することから, 慢性膵炎における膵機能異常とくに内分泌障害に関与する可能性が示唆された.

### A. 研究目的

発生過程において Notch signaling が重要な役割を担い, 側方抑制を介して細胞の運命を決定し, 分化, 増殖および器官形成などに関与することが知られている. 膵発生においては Notch signaling は外分泌と内分泌への分化の方向性を決定付けている<sup>1)</sup>. すなわち Notch が活性化されると抑制遺伝子である HES などが誘導され外分泌細胞へと分化し, Notch ligand である Delta が活性化されると内分泌誘導遺伝子である NGN3 が誘導され, その後様々な内分泌細胞へと分化しラ氏島を形成することが知られている. したがって Notch signaling の異常は膵腺房やラ氏島の低形成や過形成を引き起こす. しかし, Notch signaling の生体での役割や病態時の関与は明らかでない. 慢性膵炎では組織構築の変化と分泌機能異常が生じており, Notch signaling が関与している可能性が考えられる. そこで, 慢性膵炎における Notch signaling の関与を調べるため, 慢性膵刺激モデルである慢性エタノール投与ラットおよび四塩化炭素長期投与ラットにおける Notch および Delta の膵内分布の変化を組織学的に検討した.

### B. 研究方法

動物の取り扱いには慶應義塾大学実験動物センターのガイドラインに準じて行った. 等重量の Wistar 系雄性ラット(体重 100-150 g, Charles River 実験動物, 東京)を対象として, 既報に従

い慢性エタノール投与ラットを作成した<sup>2)</sup>. すなわち, 蛋白質 18%, 脂質 36%, 炭水化物(dextrin)47%の総合栄養液体飼料(liquid rat diet, Bio-Serv®, Frenchtown, NJ, USA)を8週間投与した対照群および炭水化物のうち総カロリーの36%までをエタノールで置換した等カロリー(1 kcal/ml)の液体飼料を8週間投与した慢性エタノール投与群を作成した. また, 四塩化炭素長期投与群は四塩化炭素(CCl<sub>4</sub>)1.5 ml/kg 週二回8週投与により作成した<sup>2)</sup>. 健常群(control; n=3), エタノール投与群(EtOH-fed; n=3), 対照液体飼料群(pair-fed; n=3)および CCl<sub>4</sub>投与群(CCl<sub>4</sub>-treated; n=3)の各々の膵組織を用いて組織化学的に検討を行った.

各膵組織を10%中性ホルマリン溶液に8時間浸漬固定し, paraffin 切片を作成し, 間接抗体法を施行した. 一次抗体は抗 Notch 1 (N1), Notch 2 (N2), Notch 3 (N3), Notch 4 (N4)および Delta 1 (D1) (Santa Cruz 社, goat polyclonal), 抗 insulin および glucagon (DAKO 社, rabbit polyclonal) を用いた. 二次抗体は horseradish peroxidase 結合 donkey 抗 rabbit-IgG もしくは goat-IgG 抗体 (Chemicon 社) を用い, diaminobenzidine tetrahydrochloride により発色した. 観察は Nikon 光学顕微鏡を用い, CCD camera (浜松フオトニクス社, 静岡)により撮像した.



## C. 研究結果

### 1. 健常群豚におけるNおよびDの分布

健常豚において、N2、N3、N4、DI1がラ氏島に認められ、insulin および glucagon との二重染色により、N2陽性細胞はラ氏島の中央に分布し(図1a)insulin と共存し、N4陽性細胞はラ氏島の辺縁部に同心円状に分布し(図1b)glucagon を共発現していた。N3はこれらN2とN4両者の分布域の中間に位置していた(図1c)。DI1はラ氏島の中央部の間葉系細胞と思われる細胞に分布した(図1d)。

また、N3は膵管上皮細胞や導管細胞、腺房中心細胞にも認められ、DI1は導管細胞にも認められた。いずれの群においてもN1は認められなかった。

### 2. 慢性エタノール投与群の検討

EtOHの8週投与により、肝は脂肪化を呈し脂肪肝の所見であった<sup>2)</sup>。膵実質には明らかな変化は認めないが、膵管の拡張、膵小葉間隙の拡大が認められた。対照群に比しEtOH群ではN2の発現の増強が認められた(図1e)がN4について

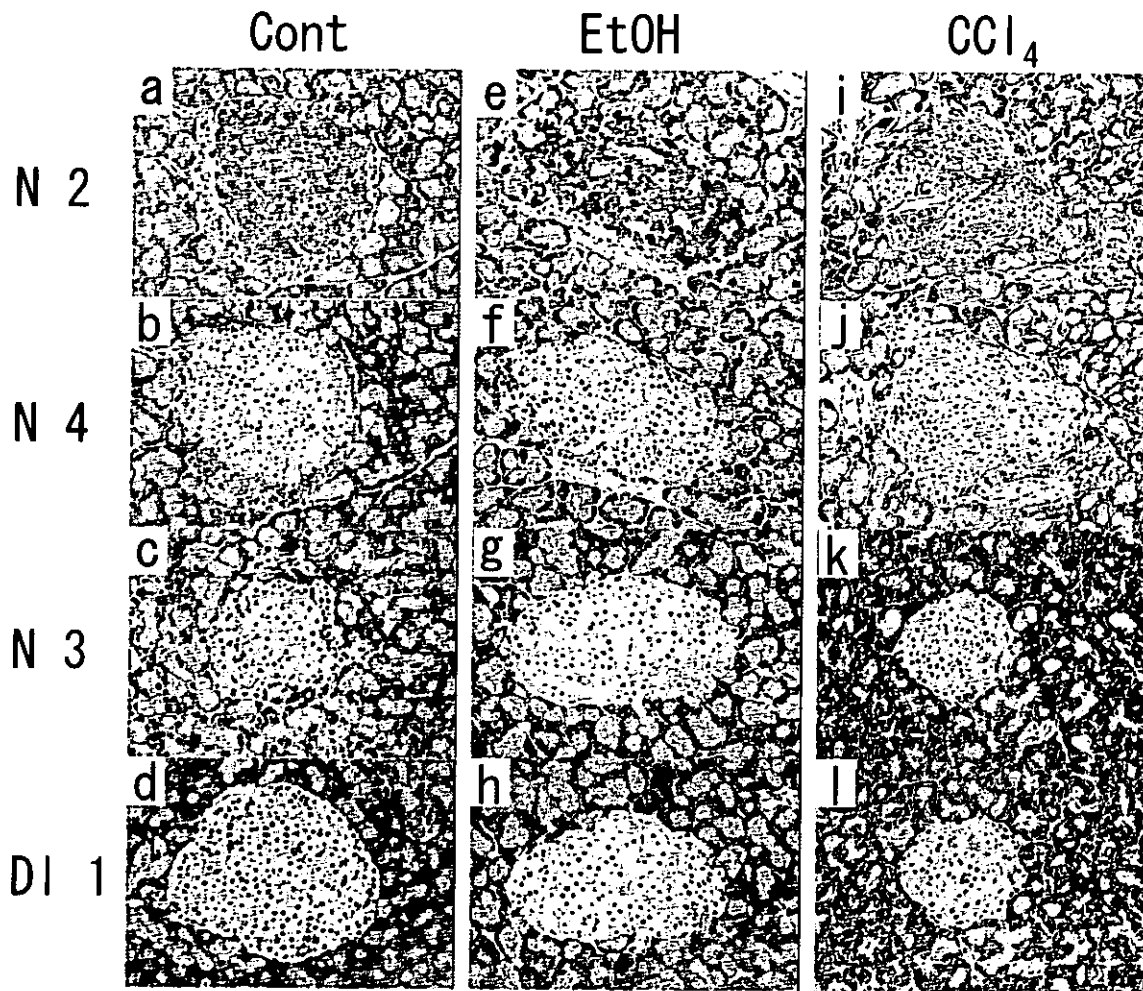


図1 ラット膵におけるNotchおよびDeltaの分布と発現の変化

- a-d: 健常豚においては、Notch 2 (N2)がβ細胞に(a)、Notch 4 (N4)がα細胞に認められる(b)。Notch 3 (N3)はラ氏島、導管細胞、腺房中心細胞に認められる。Delta 1 (DI 1)はラ氏島内間葉系細胞や導管細胞に認められる(d)。倍率×400。
- e-f: 慢性エタノール投与群の膵における変化。N2 (e)の発現は増強しているが、N4は変化を認めない(f)。ラ氏島内および腺房内のN3 (g)およびDI 1 (h)の発現は低下している。倍率×400。
- i-j: CCl<sub>4</sub>長期投与群の膵における変化。N2 (i)およびN4 (j)の発現強度は変化を認めないが、それぞれの分布配列が乱れている。ラ氏島内および腺房内のN3 (k)およびDI 1 (l)の発現は低下している。倍率×400。

は変化を認めなかった(図1f). 一方, N3は対照群に比し EtOH 群で発現の低下が認められた(図1g). D11は EtOH 群でラ氏島内の発現が低下した(図1h)が, 膵管では増強していた.

### 3. CCl<sub>4</sub>長期投与群の検討

CCl<sub>4</sub>の8週投与により, 肝は線維化, 結節状になり肝硬変の所見であった<sup>2)</sup>. 膵実質には明らかな変化は認めないが, 小動静脈平滑筋細胞の空胞化および肥厚が認められた. ラ氏島内 N2および N4の発現強度に変化は認めなかったが, N2および N4陽性細胞の同心円状の分布配列が不規則に乱れており, N4陽性細胞がラ氏島中央にもまだらに認められた(図1i, j). しかし N3および D11はラ氏島および腺房部においてもほぼ消失していた(図1k, l).

## D. 考察

慢性膵炎の終末像は組織荒廃による内外分泌機能低下であるが, その進展過程においては慢性刺激による分泌調節異常や組織破壊と再生の繰り返しが考えられる. 膵β細胞は緩徐ではあるが自己再生しているとされており, 膵島傷害時には再生が促進される可能性が考えられる. また腺房や膵管にも再生能があることから, 慢性膵炎の進展過程で再生に関与する molecule が変化していることが想定される. Notch signaling pathway は膵の発生過程において, 内分泌-外分泌の方向性を制御し, 膵形成に重要であることが知られている. このことから慢性膵炎の進展過程に, 発生過程に重要な Notch signaling が関与することが想定される. しかし, これまで成熟膵の Notch の役割については検討されたことがなかった. そこで, 成獣ラット膵における Notch の分布を検討するとともに, 慢性膵刺激モデルである慢性エタノール投与ラットおよび四塩化炭素長期投与ラットにおける Notch の膵内分布の変化を検討した.

Notchには1から4の isoform が知られており, 胎児期膵にはいずれも発現することが知られている. 今回の検討で, 健常膵では Notch 1の発現は認められず, Notch 2, 3, 4および Notch の ligand である Delta 1がいずれもラ氏島内に分布することが明らかになった. さらに, Notch 2がβ細胞に, Notch 4がα細胞に発現し, Delta 1はラ氏島内間葉系細胞に分布することが明らかになった. Notch 3はα, β以外の内分泌細胞, お

そらく D 細胞に存在すると考えられた. これらのことは, Notch がラ氏島の発生だけでなく成熟後の maintenance にも関与している可能性を示している<sup>3)</sup>. さらに, Notch 3や Delta 1は膵管上皮, 導管細胞にも発現していた.

慢性エタノール投与では対照群に比し, Notch 2の発現が増強していた. この変化の意味するところは定かでないが, 慢性エタノール投与によるラ氏島の形態変化やインスリン分泌異常に関与する可能性が考えられた. また慢性エタノール投与および CCl<sub>4</sub>長期投与により Notch 3および Delta 1の発現が著明に低下しており, 慢性膵刺激による傷害との関連が考えられた. さらに, CCl<sub>4</sub>投与群ではラ氏島内の Notch 2と Notch 4の分布が不規則に乱れていた. こうした, α細胞とβ細胞の配列の乱れは streptozotocin による膵島傷害後の再生過程でも認められており, CCl<sub>4</sub>による膵島傷害とともに内分泌細胞の再生を示す変化であると考えられた.

以上のことから, 成熟膵においても Notch signaling が存在し生理的役割を担っていることが想定された. また, 膵傷害過程の Notch 発現の変化が慢性膵炎への進展や膵機能異常に関与する可能性が示唆された. 今後, 発現蛋白量や mRNA の変化や糖尿病モデルなどを用いたβ細胞の動態との関連を検討する必要があると考えられた. また, 膵発生と癌化過程には共通点が多いとされており<sup>4)</sup>, 膵癌における Notch signaling の関与も検討する必要があると考えられた.

## E. 結語

Notch が subtype 別に膵に発現し, とくにラ氏島内で内分泌細胞の調節に関与していると考えられた. 慢性膵刺激により発現が変化することから, 慢性膵炎における膵機能異常とくに内分泌障害に関与する可能性が示唆された.

## F. 参考文献

1. Kim SK, Hebrok M. Intercellular signals regulating pancreas development and function. *Genes Dev* 2001; 15: 111-27.
2. 秋葉保忠, 中村正彦, 石井裕正. 胃-肝-膵相関における一酸化窒素合成酵素および塩基性線維芽細胞増殖因子の関連. *肝臓* 1998; 63: 205-11.
3. Yoshida T, Tokunaga A, Nakao K, Okano H.

Distinct expression patterns of splicing isoforms of mNumb in the endocrine lineage of developing pancreas. Differentiation 2003; 71: 486-95.

4. Heiser PW, Hebrok M. Development and cancer: Lessons learned in the pancreas. Cell Cycle 2004; 3(3): 270-272.

#### 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

## 慢性膵炎進展における angiotensin II の関与の検討

研究報告者 伊藤鉄英 九州大学大学院病態制御内科学 講師  
共同研究者 井上直子, 河辺 颯, 大野隆真, 有田好之, 名和田新  
九州大学大学院病態制御内科学

### 【研究要旨】

Angiotensin II (ANG II) は強力な血管収縮作用を有し、主に生体内の血圧調整に重要な役割を果たしている。また ANG II には ANG II type1 (AT1) 受容体を介して肝線維化進展に関与することが報告されてきた。よって我々は、膵線維化過程における ANG II の関与を明らかにするため、ラット dibutyltin dichloride (DBTC) 慢性膵炎モデルを用いて AT1 受容体拮抗薬の膵線維化抑制効果を検討した。さらに、膵星細胞 (Pancreatic stellate cell; PSC) における ANG II の関与も検討した。In vivo では既報の方法にてラット DBTC 慢性膵炎モデルを作成し、DBTC 投与後 7 日目より AT1 受容体拮抗薬である valsartan 10mg/kg/day を連日経口投与した (valsartan 治療群)。対照群 (DBTC 群) には蒸留水を同量経口投与した。28 日目に犠牲死させ、酵素学および組織学的検討と、膵内の MCP-1, TGF- $\beta$  および PDGF mRNA の発現を検討した。In vitro では PSC における ANG II 受容体の発現を確認し、ANG II 刺激 ( $10^{-9}$  M $\sim$  $10^{-5}$  M) に対する PSC の増殖能を検討した。さらに ANG II 刺激 ( $10^{-5}$  M) に対する AT1 受容体拮抗薬 ( $10^{-7}$  M $\sim$  $10^{-5}$  M) の PSC 増殖抑制効果を検討した。結果として、in vivo では valsartan 治療群で膵線維化の進展が抑制され、サイトカイン・ケモカインの発現も低下した。In vitro では PSC は AT1a と AT2 受容体を発現しており、ANG II 刺激に対して PSC は増殖し、valsartan 投与にてその増殖が抑制された。以上、ANG II は AT1 受容体を介して膵線維化進展に関与する可能性が示唆された。

### A. 研究目的

Angiotensin II (ANG II) は強力な血管収縮作用を有し、主に生体内の血圧調整や水電解質調整に関して重要な役割を果たしている。近年、ANG II にはそれ以外に、細胞増殖、線維化、apoptosis、血管再構築など様々な作用があることが報告され注目されている。また、ANG II は肝線維化過程において、ANG II type1 (AT1) 受容体を介して線維化進展に関与することが報告されてきた<sup>1)</sup>。今回我々は、膵線維化過程における ANG II の役割を明らかにするため、ラット dibutyltin dichloride (DBTC) 慢性膵炎モデルを用いて AT1 受容体拮抗薬の膵線維化抑制効果を検討した。さらに、膵星細胞 (Pancreatic stellate cell; PSC) における ANG II の関与を検討した。

### B. 研究方法

Sparmann ら<sup>2)</sup> の DBTC 投与によるラット膵線維化モデルに改良を加え、DBTC 慢性膵炎モデルを作成した<sup>3)</sup>。実際には雄性 Lewis ラット (180-200 g) の右内頸静脈より、ethanol,

glycerol, dimethyl sulfoxide で溶解した DBTC 7 mg/kg を一回投与した。DBTC 投与後 7 日目から AT1 受容体拮抗薬である valsartan 10 mg/kg/day を連日経口投与 (valsartan 治療群) し、28 日目に犠牲死。膵臓を摘出し、膵外分泌能の指標として膵内の蛋白、アミラーゼ含有量を測定した。対照群として、同様に DBTC 投与後 7 日目から蒸留水を同量連日経口投与した (DBTC 慢性膵炎群)。組織学的検討および膵内の MCP-1, TGF- $\beta$ , PDGF mRNA の発現について検討した。

次に、Schneider ら<sup>4)</sup> の PSC 単離法に改良を加え、雄性 Lewis ラット (180-200 g) より膵臓を摘出して collagenase 処理後、Percoll を用いた細胞分画法にて PSC の単離・培養を行った。PSC における ANG II 受容体の発現を RT-PCR 法にて検討した。ANG II 刺激による PSC の増殖能を cell count 法にて検討した。PSC  $5 \times 10^4$  個/ml を 24 時間培養し、さらに 24 時間無血清培養後、ANG II  $10^{-9}$  M $\sim$  $10^{-5}$  M 入り培地で 72 時間培養後、cell count を行った。また、ANG II 刺激 ( $10^{-5}$  M) に対する valsartan の PSC 増殖抑制効果を cell count 法にて検討した。PSC  $5 \times 10^4$  個/ml を 24