

かった (図 3)。

4. 膵炎作製 2 時間後の腸管粘膜絨毛の先端部と crypt で TLR4 の発現の増加を認めたが、粘膜先端部の脱落とともに発現の低下を認めた。crypt では Paneth 細胞にも発現を認めたが、経過とともに発現は低下した (図 4)。

D. 考察

重症急性膵炎において腸管からの bacterial translocation は敗血症や膵、膵周囲感染を引き起こし後期死亡の最大の原因となっている。TLR はマクロファージや上皮に発現し、病原体を認識後、TLR シグナルにて抗菌物質の産生分泌を促進し、病原体の排除という腸管自然免疫機構に関与していると考えられている³⁾。また、炎症性腸疾患および実験モデルにおいて、炎症を有する腸管粘膜中では TLR2, 4 の発現の増加が報告されている^{4,5)}。今回の検討では重症急性膵炎モデルにおいて、回腸、右側結腸はともに早期で TLR2, 4 の発現が増加したが、その後、低下していた。これは、発症早期には、病原認識機構および生体防御反応が増強しているが、その後の免疫反応は低下していると考えられる。その後の免疫反応の低下が bacterial translocation に関与している可能性が示唆された。

E. 結語

重症急性膵炎モデルの腸管では、TLR2, 4 は早期で発現が増強し、その後、低下していた。

F. 参考文献

1. Beger HG, Bittner R, Block S, et al. Bacterial contamination of pancreatic necrosis. A prospective clinical study. *Gastroenterology* 1986; 91: 433-438.
2. Hertzog PJ, O'Neill LA, Hamilton JA. The interferon in TLR signaling: more than just antiviral. *Trends Immunol* 2003; 24: 534-539.
3. Janeway CA Jr, Medzhitov R. Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol* 2002; 20: 197-216.
4. Hausmann M, Kiessling S, Mestermann S, et al. Toll-like receptors 2 and 4 are up-regulated during intestinal inflammation. *Gastroenterology* 2002;

122: 1987-2000.

5. Cesar F, Ortega C, Ishihara S, et al. Strategic compartmentalization of toll-like receptor 4 in the mouse gut. *J Immunol* 2003; 170: 3977-3985.

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

重症急性膵炎時のショックにおける内因性カンナビノイドの関与

研究報告者 松野正紀 東北大学大学院消化器外科学 教授

共同研究者

松田和久，武田和憲，福山尚治，三上幸夫（東北大学大学院消化器外科学）

【研究要旨】

近年，Anandamide (Arachidonylethanolamide; AEA) などの内因性カンナビノイドが敗血症性ショックのメディエーターの1つであることが明らかとなった。急性膵炎の病態には不明な点も多いが，急性膵炎と内因性カンナビノイドとの関連は全く明らかにされていない。そこで今回，両者の関連について検討した。Wistar系雄性ラットを用い，急性膵炎モデル（軽症；セルレイン膵炎，重症；5%タウロコール酸膵炎）を作成した。軽症群，重症群ともに血漿 Anandamide 値は上昇したが，重症群では軽症群と比較し有意に高値を示した。さらに，重症モデルに CB1 受容体拮抗薬（AM251）を投与したところ，膵局所所見に変化はみられなかったが，平均動脈圧および生存率では有意な改善がみられた。以上より，内因性カンナビノイドは重症急性膵炎時のショックに関与しており，内因性カンナビノイドの制御が生存率の改善につながる可能性が示唆された。

A. 研究目的

重症急性膵炎は死亡率が20%にもおよぶ難治性膵疾患の一つであるが¹⁾，その重症化機序についてはいまだ不明な点も多い。近年，急性膵炎の重症化にサイトカイン，活性酸素，PAF (Platelet-activating factor) などが関与していることが明らかとなり²⁻⁴⁾，これらを対象とした新しい治療法が開発されてきた。しかし，これらの治療法はいずれも良好な結果が得られているとは言い難い⁵⁻⁷⁾。そこで現在，急性膵炎の重症化に関与するさらに新しい因子の発見や治療法の開発が望まれている。

大麻（マリファナ）中の精神活性物質として Tetrahydrocannabinol (THC) が単離・同定されたのが1964年のことであり⁸⁾，多数の構造類似体と合わせてカンナビノイドと総称される。その後，1990年にカンナビノイドに対する特異的受容体のcDNAが脳からクローニングされ⁹⁾，続いて受容体の内因性リガンドの候補として1992年に Anandamide¹⁰⁾，1995年には2-AG (2-arachidonoylglycerol)^{11,12)} という2種類のアラキドン酸誘導体が発見された。

カンナビノイド受容体の一つである CB1 受容

体は中枢神経系や血管内皮，血管平滑筋に存在して低血圧，頻脈，意識変容などを惹起する¹³⁾。また，近年，内因性カンナビノイドが敗血症性ショックの一因となっていることが報告された¹⁴⁾。また，エンドトキシン吸着療法 (PMX-DHP, direct hemoperfusion with polymyxin-B immobilized fiber) は，エンドトキシンのみならず内因性カンナビノイドも吸着することが報告されており，エンドトキシンが高値を示さない敗血症性ショックの症例でも有効な場合があることから，内因性カンナビノイドの吸着・除去がショックの改善に関与している可能性が示唆された^{15,16)}。

重症急性膵炎でもショックや意識障害を生ずることがあるが，これまでに急性膵炎と内因性カンナビノイドとの関連は全く明らかにされていない。

そこで，急性膵炎の重症度と血漿 Anandamide 値，CB1 受容体との関連，およびラット重症急性膵炎モデルに対するカンナビノイド受容体拮抗薬の効果を評価し，急性膵炎と内因性カンナビノイドとの関連を明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

1. 急性膵炎時における血液中 Anandamide 値と CB1 受容体の免疫組織化学的検討

1) Study design

Wistar 系雄性ラット (200 ~ 250 g, 日本クレア株式会社, 仙台) を以下の 3 群に分類した。①正常ラットコントロール (Normal) 群 (n = 4)。②セルレイン膵炎 (CE-AP) 群 (n = 16)。③5 % タウロコール酸膵炎 (TCA-AP) 群 (n = 16)。CE-AP はラットをジエチルエーテル (和光純薬工業株式会社, 大阪) にて麻酔後, Caerulein (Sigma Chemical Co., USA) 100 μ g/kg を頸静脈から静脈内に 1 回投与して作成した。TCA-AP は Aho などの方法に準じて作成した。即ち, ラットをジエチルエーテル麻酔後に上腹部正中切開にて開腹し, 十二指腸を体外に引き出して胆膵管を同定し, 十二指腸乳頭部を穿刺したのち, 5 % sodium taurocholate (TCA; Sigma Chemical Co., USA) を微量ポンプ (MINIPULS 3; Gilson Medical Electronics, France) にて体重 1 kg あたり 1 ml 定流量 (0.2 ml/分) で穿刺部から胆膵管内に逆行性に注入して膵炎を作成した。ジエチルエーテル麻酔下に Normal 群および膵炎作成後 1, 6, 12, 24 時間目のラットを採血し, 脱血犠死させた。採取した血液は 3,000 rpm で 10 分間遠心して血漿を分離し, -80 °C で保存した。また, Normal 群および膵炎作成後 12 時間目のラットから膵, 腎, 肺を摘出し, 以下の検討を行った。(臓器摘出を膵炎作成後 12 時間目とした理由は, 考察において述べる。)

2) 膵組織学的検討

摘出した膵は 4 °C, 10 % ホルマリンで一晩固定後, パラフィンワックスに包埋し, 3 μ m 厚の切片を作成した。脱パラフィン後に Haematoxylin-Eosin (H-E) 染色を施行し, 組織学的検討を行った。

3) 血液中 Anandamide (AEA) 値

採取した血漿は, Liquid chromatography / tandem mass spectrometry (LC/MS/MS) 法^{18, 19)} によって, Anandamide 値を測定した。すなわち, 測定試料に内標準物質を添加し, 固相化カートリッジ (OASIS HLB 1 ml 30 mg カラム) に吸着させた。蒸留水およびヘキサンで洗浄後, 酢

酸エチルで抽出した。窒素気流下, 40 °C で濃縮乾固し, 80 % メタノールで再溶解した。最後にフィルター (ULTRAFREE-MC) で遠心濾過 (10,000 rpm, 3 min, 4 °C) し, オートサンプラーバイアルに移し替えて API3000 (AB/MDS, Ontario, Canada) を用いて測定した。

4) 免疫組織化学的検討 (酵素抗体法および蛍光抗体法)

摘出した臓器は OCT コンパウンド (Tissue-Tek) (Sakura Finetek U.S.A.) に包埋後, -80 °C で保存し, クリオスタット (CM3000, LEICA, Germany) を用いて 5 μ m 厚の薄切標本を作成し, アセトン (関東化学株式会社, 東京) で固定した。

①酵素抗体法: PBS で洗浄後, 0.1 % アジ化ソーダおよび 0.3 % H₂O₂ 加 PBS を添加し, PBS で洗浄後, 10 % BSA (和光純薬工業) を添加した。続いて, 一次抗体として CB1 受容体抗体 (rabbit CB1 receptor polyclonal antibody, Cheyman chemical, USA)²⁰⁻²²⁾ または CD31 抗体 (purified mouse anti-rat CD31 (PECAM-1) monoclonal antibody, BD Biosciences, USA)²³⁻²⁵⁾ を添加し, PBS で洗浄後, ペルオキシダーゼ標識二次抗体 (Donkey anti-rabbit IgG / Goat anti-mouse IgG, Jackson Immuno Research, USA) を添加した。再び PBS で洗浄後に DAB との反応を行い, ヘマトキシリン核染色 (Mayer's Hematoxylin Soln.) (和光純薬工業) を行った。封入後, 検鏡して CB1 受容体および CD31 陽性細胞を観察した²⁶⁾。

②蛍光抗体法 (二重染色): PBS で洗浄後, 10 % BSA を添加した。続いて, 一次抗体として①と同様の CB1 受容体抗体および CD31 抗体を添加し, PBS で洗浄後, 蛍光標識二次抗体 (FITC 標識 Donkey anti-rabbit IgG / Texas Red 標識 Donkey anti-mouse IgG, Jackson Immuno Research) を添加した。再び PBS で洗浄後に封入し, 検鏡して CB1 受容体および CD31 陽性細胞を観察した^{27, 28)}。画像解析ソフトとして, LaserSharp2000 (Bio-Rad Laboratories, UK) を用いた。

2. CB1 受容体拮抗薬投与による急性膵炎の局所所見および生存率の変化

1) Study design

ジエチルエーテル麻酔下に実験 1 と同様の方法で TCA-AP ラットを作成した。麻酔覚醒後は、自由飲水とした。膵炎作成直後および作成後 6 時間目に、エタノール、植物油、生理的食塩水 (1:1:18) に溶解した CB1 受容体拮抗薬 (AM251; Tocris Cookson Inc., USA)²⁹⁻³¹⁾ を 1 回あたり 3 mg/kg, 1 ml で頸静脈から投与した (AM251 (+) 群, n = 6)。この 3 mg/kg という投与量および薬剤の溶解方法は、Varga らの方法に準じた¹⁴⁾。同様に非投与群には溶媒のみを 1 回あたり 1 ml 投与した (AM251 (-) 群, n = 6)。両群とも膵炎作成後 12 時間目に採血し、脱血犠死させ、膵を摘出した。

2) 膵組織学的検討

摘出した膵は上記と同様に H-E 染色を行い、両群の組織学的変化を比較検討した。

3) 各種パラメータ比較

採取した血液を用いて、白血球数、ヘマトクリット、血清アミラーゼ、IL-6 を測定した。血清アミラーゼ (α -amylase) の測定には、Neo amylase test (第一化学薬品株式会社, 東京) を用いた。IL-6 の測定には、rat IL-6 ELISA kit (TFB, 東京) を用いた。平均動脈圧測定は、ネンブタール (大日本製薬, 大阪, 1ml/kg 皮下注) にて麻酔後、右大腿動脈に 24G サーフローを留置し、DMS-760 (西山製作所, 大阪) を接続して膵炎作成 6 時間後から測定を開始し、開始 10 分後に 2 回目の投与を行い、2 時間測定を行った。(ネンブタールは、長時間の麻酔維持が必要な場合に使用した。ジエチルエーテルで長時間の麻酔維持を行うと麻酔深度が不均一になりやすく、実験結果にも影響する可能性が高い。ネンブタールを用いることにより、実験結果に与える影響を少なくすることができると考えられる。)

4) 生存率の観察

ジエチルエーテル麻酔下に TCA-AP ラットを作成した。上記の方法と同様に、膵炎作成直後および作成後 6 時間目に AM251 を 1 回あたり 3 mg/kg, 1 ml で頸静脈から投与し (n = 10)、非

投与群には溶媒のみを投与した (n = 10)。AM251 投与後は両群とも自由飲水、自由摂食とし、膵炎作成後の生存率を観察した。(倫理面への配慮)

なお、本実験は本学の動物実験委員会の承認を得、すべての手順は National Institutes of Health (NIH) の動物取扱い規約に準じて行った。

C. 研究結果

1. 急性膵炎時における血液中 Anandamide 値と CB1 受容体の免疫組織化学的検討

1) 膵組織学的所見 (図 1)

CE-AP 群では間質の著明な浮腫と軽度の炎症

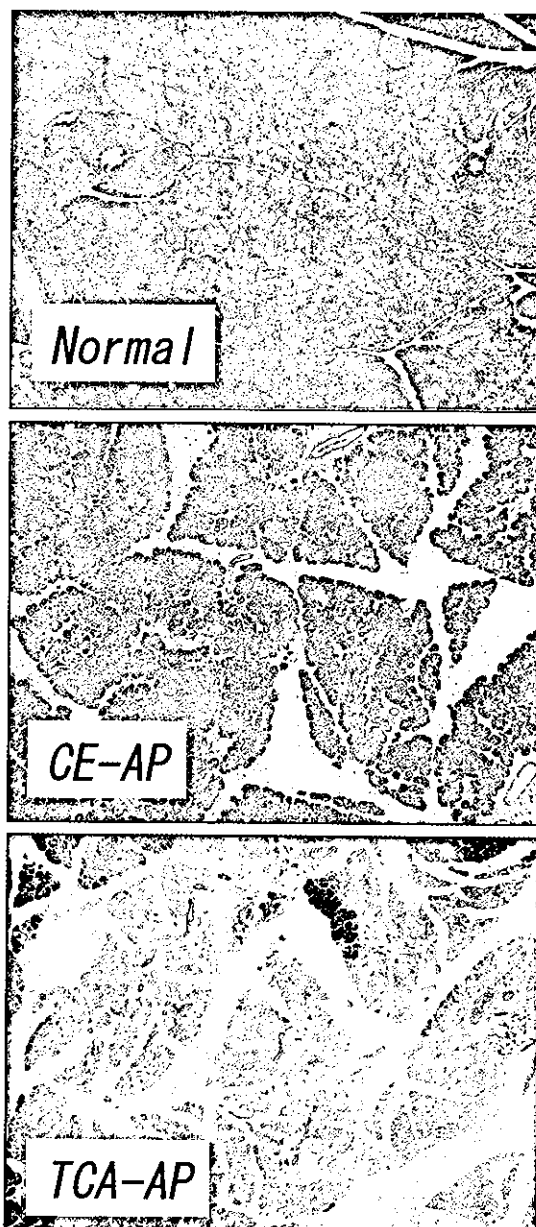


図 1 膵組織学的所見 (12 時間後) ; H-E 染色 (×100)

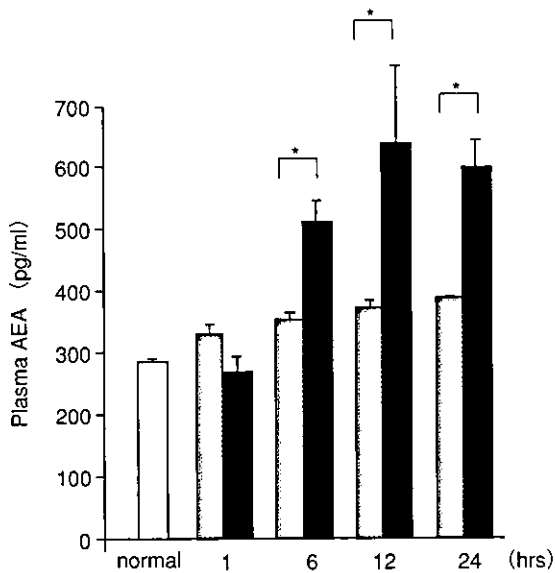


図2 血漿 Anandamide 値の推移
Mean ± S.E. (n = 4), *) p < 0.05 vs. CE-AP 群

性細胞浸潤を認め、軽症急性膵炎に一致する所見であった。TCA-AP 群では広範な腺房細胞の壊死を認め、重症急性膵炎に一致する所見であり、膵壊死 Grade は Grade3 (広範壊死型) で

あった。

2) 血漿 Anandamide 値 (図2)

血漿 Anandamide 値は CE-AP 群、TCA-AP 群ともに膵炎作成後に上昇した。正常群と CE-AP 群との比較では有意差を認めなかった。しかし、膵炎作成後 6, 12, 24 時間目では、TCA-AP 群は CE-AP 群の値に比べて有意に高値を示した。

3) 免疫組織化学所見 (図3, 4)

正常群および TCA-AP 群の腎の動脈における酵素抗体法では、CB1 受容体は血管内皮および血管平滑筋に発現が認められ、CD31 は血管内皮において発現が強く認められた。両群で明らかかな差は認めなかった (図3)。TCA-AP 群の腎、肺の動脈における蛍光抗体法では、CB1 受容体は血管平滑筋において発現が強く認められた。血管内皮でも部分的に発現が認められ、CD31 と二重に染色された (図4)。

2. CB1 受容体拮抗薬投与による急性膵炎の局所所見および生存率の変化

1) 膵の組織学的検討 (図5)

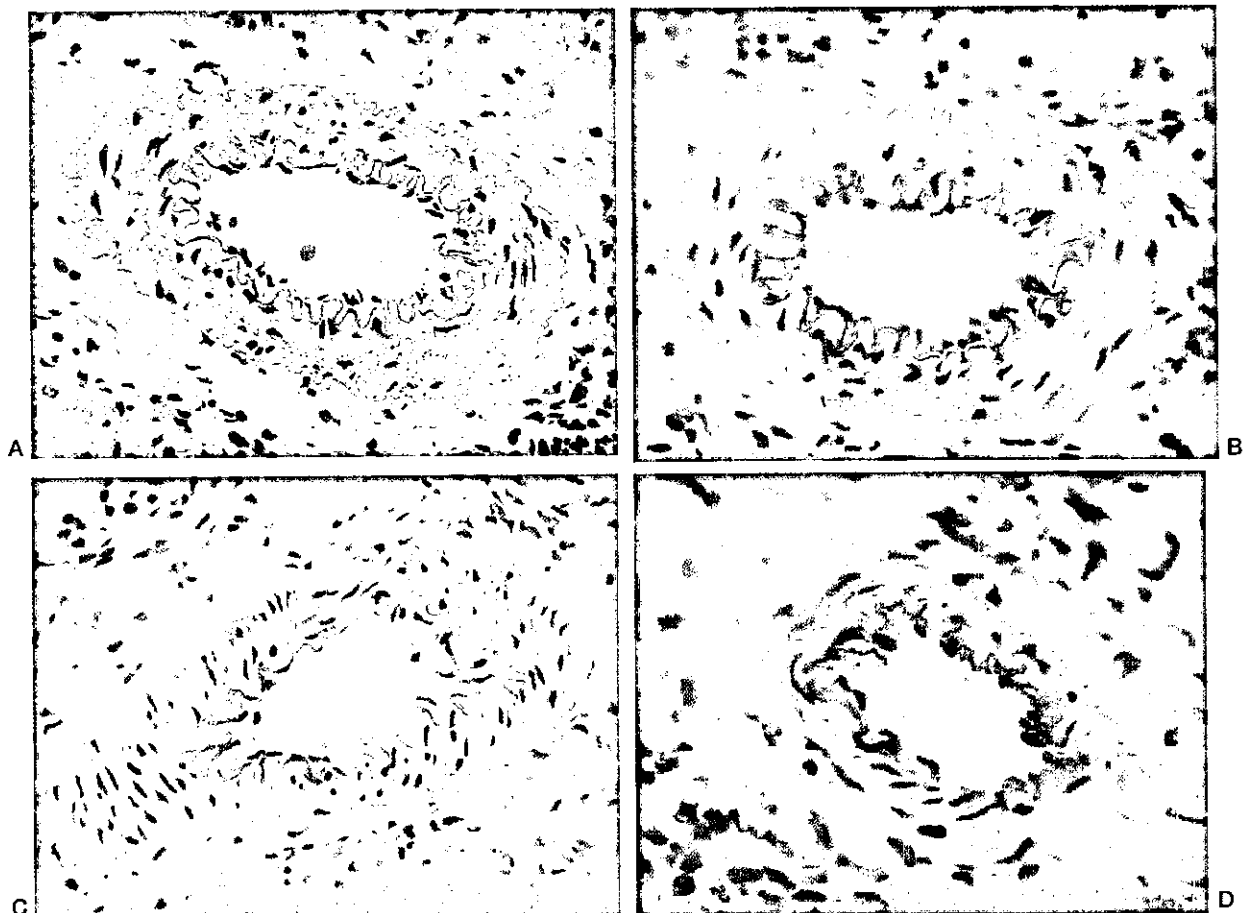


図3 免疫組織化学染色所見 (12 時間後) ; 酵素抗体法 (× 200)
正常群 A : CB1 受容体, B : CD31; TCA-AP 群, C : CB1 受容体, D : CD31

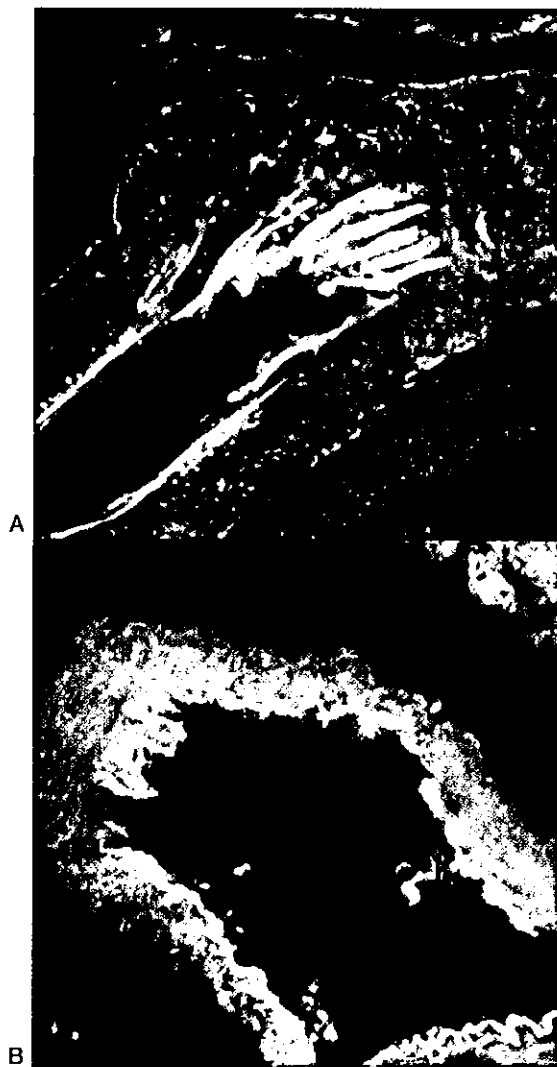


図4 免疫組織化学染色所見 (12時間後)
蛍光二重染色 (×400)
Green : CB1 受容体, Red : CD31
(A : kidney の動脈, B : lung の動脈)

AM251 (+) 群, AM251 (-) 群ともに膵には広範な腺房細胞の壊死を認めた. 膵壊死の程度に関しては, ともに Grade3 で, 両群間に明らかな差はみられなかった.

2) 白血球数, ヘマトクリット, 血清アミラーゼ, IL-6 の比較 (表1)
血清アミラーゼ, ヘマトクリット, IL-6 にお

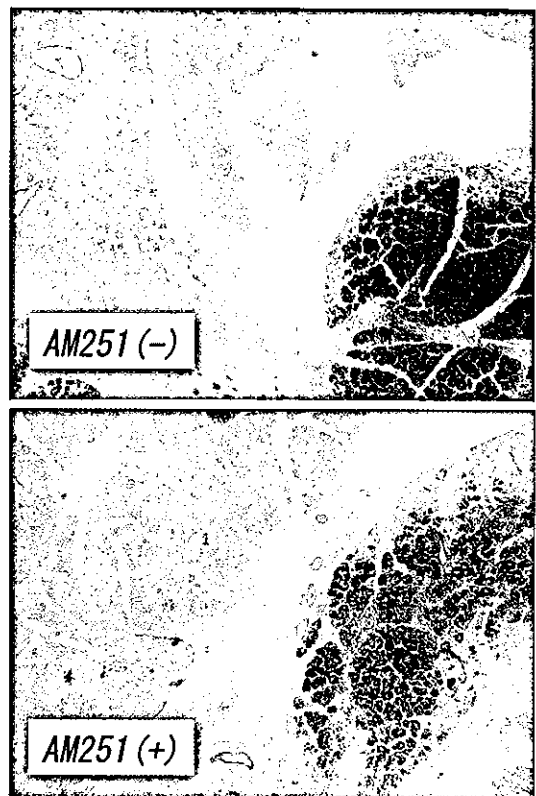


図5 膵組織学的所見 (12時間後) ; H-E 染色 (×200)

いて正常ラットと比較し有意に高値を示したが, 両群間の比較ではいずれも有意差を認めなかった.

3) 平均動脈圧の比較 (図6)

初期血圧 (0時間) は両群とも 90 mmHg 前後で有意差はなかったが, 膵炎作成 6 時間後には AM251 (+) 群の方が有意に平均動脈圧が高かった. その 10 分後に AM251 (非投与群は溶媒のみ) を投与すると両群とも直後に上昇がみられた. AM251 (-) 群ではその後はそれ以上の上昇を認めなかったが, AM251 (+) 群では投与 30 分後に投与直後よりも高値を示し, 両群の差が最大となった.

4) 生存率 (図7)

膵炎作成 72 時間後まで生存率を観察したところ, AM251 (-) 群では生存率 10 %であったの

表1 AM251 (+) 群, AM251 (-) 群のパラメータ比較 (12時間後)

	normal	AM251 (-)	AM251 (+)
Serum amylase (IU/l)	5,710 ± 560	9,945 ± 419	9,942 ± 448
WBC (/μl)	9,900 ± 3,010	11,833 ± 2,246	8,375 ± 1,644
Ht. (%)	39.9 ± 3.49	57.8 ± 7.2	57.6 ± 8.3
IL-6 (pg/ml)	81.0 ± 22.0	177.1 ± 174.2	197.9 ± 160.2

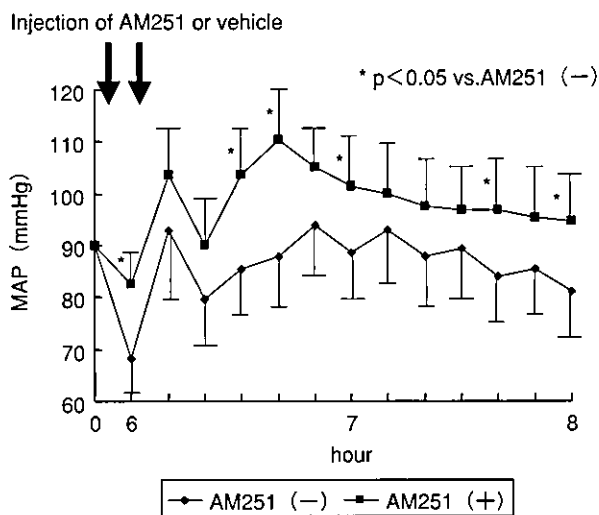


図6 平均動脈圧の比較 (6~8時間後, n=4)

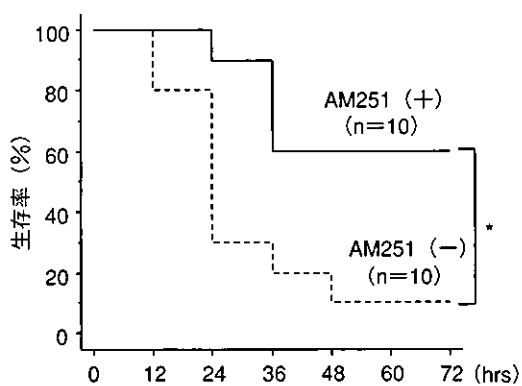


図7 生存率の変化
*) p < 0.05 vs. AM251 (-) 群

に対し, AM251 (+) 群では 60% と, 有意な改善が認められた。

D. 考察

カンナビノイドは大麻の薬効成分として発見された物質であり, カンナビノイド受容体の一つである CB1 受容体は主として中枢神経系や血管内皮細胞, 血管平滑筋細胞に発現しており, 精神神経作用や血管拡張作用を發揮する¹³⁾。また, 血球や免疫系細胞には CB2 受容体が存在しており, 免疫系の制御作用を行っている³²⁾。カンナビノイドは相反する二面性をもって生体を調節していると考えられており, 少量では神経系の刺激, 興奮, 凝固の促進, 免疫系の活性作用などを有し, 過量では神経系, 凝固系, 免疫系の抑制, 低血圧などを生じる³³⁾。また, 近年, 内因性カンナビノイドの一つである Anandamide がマクロファージから産生され, 敗血症性

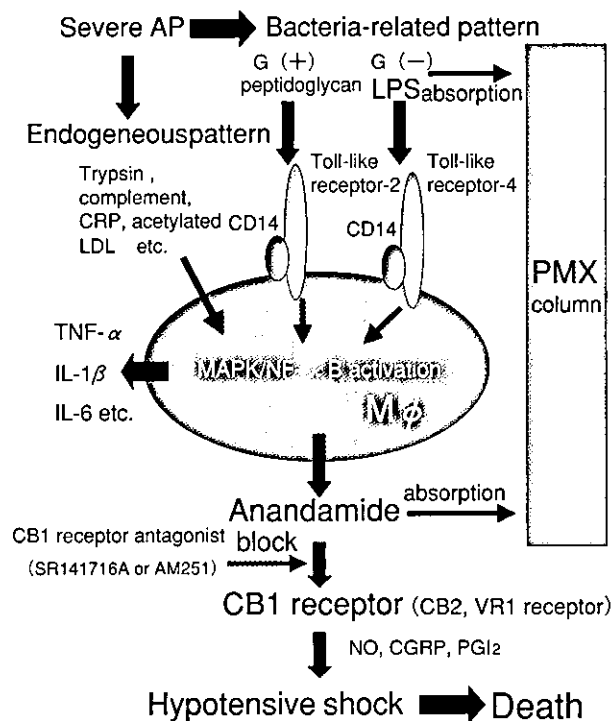


図8 The mechanism of production of Anandamide and hypotensive shock

ショックのメディエーターの一つとなることが明らかにされた¹⁴⁾。急性膵炎でも重篤な症例では循環不全, 意識障害を生じることがあるが, この病態には不明な点も多く, 急性膵炎と内因性カンナビノイドとの関連は全く明らかにされていない。そこで, 急性膵炎と内因性カンナビノイドとの関連を明らかにすることを目的とした。

今回われわれは, 正常ラット, 軽症膵炎モデルである CE-AP ラット, 重症膵炎モデルである TCA-AP ラットにおいて, 内因性カンナビノイドの一つである Anandamide を LC/MS/MS 法を用いて測定した。Anandamide は分子量 347 のアラキドン酸誘導体で, カンナビノイド受容体と結合する内因性神経伝達物質であり, 大麻の有効成分である THC と同様の薬理作用を有することが 1992 年に Devane らによって証明されている³⁴⁾。本研究では急性膵炎作成後に血漿 Anandamide 値が上昇し, さらに重症群では軽症群に比べて有意に高値を示した。敗血症では, Anandamide の産生細胞としてマクロファージが挙げられており, LPS 刺激によるショックにマクロファージが関与していることが証明されている¹⁴⁾。急性膵炎でも bacterial translocation に

よって菌血症が生じる³⁵⁾ことから、これが Anandamide の産生、放出に作用している可能性がある。図 8 に、重症急性膵炎における Anandamide 産生とショックのメカニズムをシェーマとして示した。細菌性パターンとしては peptidoglycan や LPS、内因性パターンとしてはトリプシンや補体系、CRP、アセチル化 LDL などの刺激によってマクロファージが活性化され、TNF- α や IL-1 β 、IL-6 などのサイトカインとともに Anandamide が産生される。本検討では膵炎の重症度に応じて、血漿 Anandamide 値の上昇が見られた。今回、臨床例での検討は行っていないが、臨床的に血清 amylase 値が膵炎の重症度と比例しないことは知られており、今後、血漿 Anandamide 値が重症度の指標の 1 つになる可能性が示唆された。また、本研究において血管での CB1 受容体発現について検討し、血管内皮および血管平滑筋に CB1 受容体が実際に存在することを確認した。当初、膵炎の重症度に応じた受容体数の変動を想定したが、正常ラットと重症膵炎ラットで受容体発現に明らかな変化を認めなかった。CB1 受容体発現の検討においては、腸間膜動脈を用いるのが望ましかったが、腸間膜の脂肪の存在により凍結切片を作成することが困難であったため、凍結切片の作成が比較的容易であった腎および肺の動脈を用いた。また、臓器摘出を膵炎作成 12 時間後としたのは、今回のわれわれの検討において Anandamide 値がピークとなり、かつ重症膵炎モデルの死亡が現れ始める時間であることから、このタイミングで臓器摘出を行うのが妥当と考えたからである。

本研究では、内因性カンナビノイドの急性膵炎に対する作用を検討するために、CB1 受容体拮抗薬 (AM251) の投与を行い、生存率の著明な改善が得られた。また、膵の局所所見や血清アミラーゼなどのパラメータに明らかな変化がみられなかったが、AM251 の投与により有意な血圧の上昇がみられた。出血によるラット虚血モデルでも、CB1 受容体拮抗薬の一つである SR141716A 投与によって、血圧低下の改善および生存時間の延長が報告されていることから³⁶⁾、AM251 は膵に直接的に作用するというよりはむ

しろ血管に作用し、血圧改善効果をもたらすことによって、急性膵炎の病態を改善させたものと考えられる。ところで内因性カンナビノイドは低血圧を誘導する物質として知られており、この機序としては、第一に血管に発現している CB1 受容体に作用して NO を放出させる、次にトランスポーターに取り込まれて PGI₂ 産生に利用される、最後に神経細胞に発現しているカプサイシン受容体に作用して、Calcitonin-Gene Related Peptide (CGRP) を産生させる、の 3 つが考えられている³⁷⁾。したがって、本研究では AM251 投与により、CB1 受容体をブロックすることで NO や PGI₂、CGRP などの産生が抑制され、結果として血圧上昇効果が得られたものと考えられる。(AM251 (非投与群は溶媒のみ) の 2 回目の投与後、両群とも直後に上昇がみられたが、これは補液としての効果と考えられる。) また、重症急性膵炎では高度の脱水状態となるため臨床的にも大量輸液が必須となっているが、両群のラットの経過観察において、AM251 (-) 群と比較し、AM251 (+) 群は活動性が高く水分摂取行動も多かった (データ呈示せず)。血圧低下が抑えられることによる全身状態の改善とともに、活動性が増すことにより自力での水分補給が十分に可能であったことも生存率の有意差に繋がったのではないかと推察される。図 6 で示される 2 群間の動脈圧差に加え、内因性カンナビノイドの作用の一つである意識障害や、水分摂取行動などの要因が影響して、図 7 の顕著な生存率の差をもたらしたと考える。

以上、ラット実験急性膵炎モデルにおいて血漿 Anandamide 値は上昇し、さらに重症群では軽症群に比べて有意に高値を示した。重症急性膵炎誘導後に CB1 受容体拮抗薬を投与したところ、膵局所の所見は変化しなかったが、平均動脈圧や生存率の改善がみられた。本研究から急性膵炎において内因性カンナビノイドが関与していることが初めて明らかにされた。今後、血漿 Anandamide 値を急性膵炎の重症度の指標として用いることや CB1 受容体を対象とした重症急性膵炎の新しい治療法の開発が期待される。

E. 結語

内因性カンナビノイドは重症急性膵炎時のショックに関与しており、内因性カンナビノイドの制御が生存率の改善につながる可能性が示唆された。

F. 参考文献

1. 小川道雄, 広田昌彦. 急性膵炎の症例調査. 厚生労働省特定疾患対策研究事業難治性膵疾患に関する調査研究班 平成 13 年度研究報告書 2002; 17-35.
2. Rongione AJ, Kusske AM, Kwan K, Ashley SW, Reber HA, McFadden DW. Interleukin 10 reduces the severity of acute pancreatitis in rats. *Gastroenterology* 1997; 112 (3) : 960-967.
3. Nonaka A, Manabe T, Kyogoku T, Tamura K, Tobe T. Evidence for a role of free radicals by synthesized scavenger, 2-octadecylascorbic acid, in cerulein-induced mouse acute pancreatitis. *Dig Dis Sci* 1992; 37 (2) : 274-279.
4. Yotsumoto F, Manabe T, Kyogoku T, Hirano T, Ohshio G, Yamamoto M, Imamura T, Yoshitomi S. Platelet-activating factor involvement in the aggravation of acute pancreatitis in rabbits. *Digestion* 1994; 55 (4) : 260-267.
5. Dumot JA, Conwell DL, Zuccaro G Jr, Vargo JJ, Shay SS, Easley KA, Ponsky JL. A randomized, double blind study of interleukin 10 for the prevention of ERCP-induced pancreatitis. *Am J Gastroenterol* 2001; 96 (7) : 2098-2102.
6. Schulz HU, Hoelzl H, Schrader T, Kropf S, Halangk W, Ochmann C, Matthias R, Letko G, Roessner A, Lippert H, Niederau C. Randomized, placebo-controlled trial of lazaroide effects on severe acute pancreatitis in rats. *Crit Care Med* 2001; 29 (4) : 861-869.
7. Kingsnorth AN, Galloway SW, Formela LJ. Randomized, double-blind phase II trial of Lexipafant, a platelet-activating factor antagonist, in human acute pancreatitis. *Br J Surg* 1995; 82 (10) : 1414-1420.
8. Mechoulam R, Gaoni Y. A total synthesis of Δ^1 -tetrahydrocannabinol, the active constituent of hashish. *J Am Chem Soc* 1965; 87: 3273-3275.
9. Matsuda LA, Lolait SJ, Brownstein MJ, Young AC, Bonner TI. Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. *Nature* 1990; 346 (6284) : 561-564.
10. Devane WA, Hanus L, Breuer A, Pertwee RG, Stevenson LA, Griffin G, Gibson D, Mandelbaum A, Etinger A, Mechoulam R. Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science* 1992; 258 (5090) : 1946-1949.
11. Mechoulam R, Ben-Shabat S, Hanus L, Ligumsky M, Kaminski NE, Schatz AR, Gopher A, Almog S, Martin BR, Compton DR, et al. Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors. *Biochem Pharmacol* 1995; 50 (1) : 83-90.
12. Sugiura T, Kondo S, Sukagawa A, Nakane S, Shinoda A, Itoh K, Yamashita A, Waku K. 2-Arachidonoylglycerol: a possible endogenous cannabinoid receptor ligand in brain. *Biochem Biophys Res Commun* 1995; 215 (1) : 89-97.
13. Lake KD, Compton DR, Varga K, Martin BR, Kunos G. Cannabinoid-induced hypotension and bradycardia in rats mediated by CB1-like cannabinoid receptors. *J Pharmacol Exp Ther* 1997; 281 (3) : 1030-1037.
14. Varga K, Wagner JA, Bridgen DT, Kunos G. Platelet- and macrophage-derived endogenous cannabinoids are involved in endotoxin-induced hypotension. *FASEB J* 1998; 12 (11) : 1035-1044.
15. Wang Y, Liu Y, Sarker KP, Nakashima M, Serizawa T, Kishida A, Akashi M, Nakata M, Kitajima I, Maruyama I. Polymyxin B binds to anandamide and inhibits its cytotoxic effect. *FEBS Lett* 2000; 470 (2) : 151-155.
16. Wang Y, Liu Y, Ito Y, Hashiguchi T, Kitajima I, Yamakuchi M, Shimizu H, Matsuo S, Imaizumi H, Maruyama I. Simultaneous measurement of anandamide and 2-arachidonoylglycerol by polymyxin B-selective adsorption and subsequent high-performance liquid chromatography analysis: increase in

- endogenous cannabinoids in the sera of patients with endotoxic shock. *Anal Biochem* 2001; 294 (1) : 73–82.
17. Aho HJ, Koskensalo SML, Nevalainen TJ: Experimental pancreatitis in the rat: Sodium-taurocholate induced acute hemorrhagic pancreatitis. *Scand J Gastroenterol* 1980; 15: 411–416.
 18. Kingsley PJ, Marnett LJ. Analysis of endocannabinoids by Ag⁺ coordination tandem mass spectrometry. *Anal Biochem* 2003; 314 (1) : 8–15.
 19. Porter AC, Sauer JM, Knierman MD, Becker GW, Berna MJ, Bao J, Nomikos GG, Carter P, Bymaster FP, Leese AB, Felder CC. Characterization of a novel endocannabinoid, virodhamine, with antagonist activity at the CB1 receptor. *J Pharmacol Exp Ther* 2002; 301 (3) : 1020–1024.
 20. Howlett AC, Song C, Berglund BA, Wilken GH, Pigg JJ. Characterization of CB1 cannabinoid receptors using receptor peptide fragments and site-directed antibodies. *Mol Pharmacol* 1998; 53 (3) : 504–510.
 21. Shire D, Carillon C, Kaghad M, Calandra B, Rinaldi-Carmona M, Le Fur G, Caput D, Ferrara P. An amino-terminal variant of the central cannabinoid receptor resulting from alternative splicing. *J Biol Chem*. 1995 Feb 24; 270 (8) : 3726–3731. Erratum in: *J Biol Chem* 1996; 271 (52) : 33706.
 22. Munro S, Thomas KL, Abu-Shaar M. Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature* 1993; 365 (6441) : 61–65.
 23. DeLisser HM, Newman PJ, Albelda SM. Molecular and functional aspects of PECAM-1/CD31. *Immunol Today* 1994; 15 (10) : 490–495. Review.
 24. Famiglietti J, Sun J, DeLisser HM, Albelda SM. Tyrosine residue in exon 14 of the cytoplasmic domain of platelet endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1/CD31) regulates ligand binding specificity. *J Cell Biol* 1997; 138 (6) : 1425–1435.
 25. DeLisser HM, Christofidou-Solomidou M, Strieter RM, Burdick MD, Robinson CS, Wexler RS, Kerr JS, Garlanda C, Merwin JR, Madri JA, Albelda SM. Involvement of endothelial PECAM-1/CD31 in angiogenesis. *Am J Pathol* 1997; 151 (3) : 671–677.
 26. 野地澄晴. 別冊実験医学 免疫染色・in situ ハイブリダイゼーション 1997; 17–115.
 27. Adami M, Frati P, Bertini S, Kulkarni-Narla A, Brown DR, de Caro G, Coruzzi G, Soldani G. Gastric antisecretory role and immunohistochemical localization of cannabinoid receptors in the rat stomach. *Br J Pharmacol* 2002; 135 (7) : 1598–1606.
 28. Pinto L, Izzo AA, Cascio MG, Bisogno T, Hospodar-Scott K, Brown DR, Mascolo N, Di Marzo V, Capasso F. Endocannabinoids as physiological regulators of colonic propulsion in mice. *Gastroenterology* 2002; 123 (1) : 227–234.
 29. Gatlay SJ, Gifford AN, Volkow ND, Lan R, Makriyannis A. 123I-labeled AM251: a radioiodinated ligand which binds in vivo to mouse brain cannabinoid CB1 receptors. *Eur J Pharmacol* 1996; 307 (3) : 331–338.
 30. Gatley SJ, Lan R, Pyatt B, Gifford AN, Volkow ND, Makriyannis A. Binding of the non-classical cannabinoid CP 55,940, and the diarylpyrazole AM251 to rodent brain cannabinoid receptors. *Life Sci* 1997; 61 (14) : PL 191–197.
 31. Lan R, Liu Q, Fan P, Lin S, Fernando SR, McCallion D, Pertwee R, Makriyannis A. Structure-activity relationships of pyrazole derivatives as cannabinoid receptor antagonists. *J Med Chem* 1999; 42 (4) : 769–776.
 32. Facci L, Dal Toso R, Romanello S, Buriani A, Skaper SD, Leon A. Mast cells express a peripheral cannabinoid receptor with differential sensitivity to anandamide and palmitoylethanolamide. *Proc Natl Acad Sci. USA*. 1995; 92 (8) : 3376–3380.
 33. Wang Y, Liu Y, Sarker KP, Nakashima M, Serizawa T, Kishida A, Akashi M, Nakata M, Kitajima I, Maruyama I. Polymyxin B binds to anandamide and inhibits its cytotoxic effect. *FEBS Lett* 2000; 470 (2) : 151–155.
 34. Felder CC, Briley EM, Axelrod J, Simpson JT, Mackie K, Devane WA. Anandamide, an endogenous cannabimimetic eicosanoid, binds to the

cloned human cannabinoid receptor and stimulates receptor-mediated signal transduction. Proc Natl Acad Sci USA 1993; 90 (16) : 7656-7660.

35. Runkel NS, Moody FG, Smith GS, Rodriguez LF, LaRocco MT, Miller TA. The role of the gut in the development of sepsis in acute pancreatitis. J Surg Res 1991; 51 (1) : 18-23.
36. Wagner JA, Varga K, Ellis EF, Rzigalinski BA, Martin BR, Kunos G. Activation of peripheral CB1 cannabinoid receptors in haemorrhagic shock. Nature 1997; 390 (6659) : 518-521.
37. Hogestatt ED, Zygmunt PM. Cardiovascular pharmacology of anandamide. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids 2002; 66 (2-3) : 343-351.

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) 松田和久, 武田和憲, 三上幸夫, 福山尚治, 松野正紀. 急性膵炎重症化におけるカンナビノイドの関与. 第34回日本膵臓学会大会, 仙台, 2003年7月
 - 2) 松田和久, 武田和憲, 大村範幸, 森田利奈, 土原一生, 阿部 永, 福山尚治, 江川新一, 砂村眞琴, 松野正紀. 急性膵炎重症化における内因性カンナビノイドの関与. 第40回日本腹部救急医学会総会, 東京, 2004年3月
 - 3) 松田和久, 武田和憲, 大村範幸, 森田利奈, 土原一生, 阿部 永, 福山尚治, 江川新一, 砂村眞琴, 松野正紀. 急性膵炎重症化における内因性カンナビノイドの関与. 第104回日本外科学会定期学術集会, 大阪, 2004年4月
 - 4) Matsuda K, Takeda K, Mikami Y, Abe H, Fukuyama S, Egawa S, Sunamura M, Matsuno S. The involvement of endocannabinoids in severe acute pancreatitis. Joint Meeting of the 11th Meeting of the International Association of Pancreatology and the 35th Annual Meeting of the Japan Pancreas Society. Sendai, July 11-14, 2004

- 5) 松田和久, 三上幸夫, 武田和憲, 福山尚治, 江川新一, 砂村眞琴, 松野正紀. 重症急性膵炎時のショックにおける内因性カンナビノイドの関与. 第9回エンドトキシン血症救命治療研究会, 盛岡, 2005年2月

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 protease-activated receptor-2 (PAR-2) の関与 — PAR-2 ノックアウトマウスを用いた検討 —

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, 菊田和宏 (東北大学大学院消化器病態学)

【研究要旨】

急性膵炎の本態は活性化されたトリプシンなどの膵酵素による膵の自己消化とされる。トリプシンの受容体として、protease-activated receptor (PAR) -2 が同定された。今回、急性膵炎における PAR-2 の役割についてノックアウトマウスを用いて検討した。野生型、ノックアウトマウスのおおのにセルレイン膵炎を誘導し、血清アミラーゼ、膵組織像、膵浮腫、myeloperoxidase 活性について検討した。またコリン欠乏エチオニン添加食誘導膵炎 (CDE 膵炎) を作成し生存率について検討した。PAR-2 ノックアウトマウス群において、セルレイン膵炎では血清アミラーゼ値、膵組織 myeloperoxidase 活性の高値、膵組織像の増悪を認めた。また CDE 膵炎ではノックアウトマウス群の生存率が低下していた。PAR-2 は、急性膵炎において防御的な役割を果たしていることが示唆された。

A. 研究目的

急性膵炎の本態は活性化されたトリプシンなどの膵酵素による膵の自己消化とされる。トリプシンの受容体として、protease-activated receptor (PAR) -2 が同定され、トリプシンが PAR-2 の活性化を介して、細胞内シグナル伝達を惹起し、細胞機能を調節することが明らかとなった¹⁾。PAR-2 は生体内に広く分布する。膵臓においては、膵腺房細胞や膵管上皮などに発現し、膵外分泌機能などに関与していると想定されている²⁾。一方、急性膵炎時には、膵における PAR-2 発現が増強し、疼痛の主要な mediator であるとの報告もある³⁾。しかし、PAR-2 発現の膵炎の病態における意義については明らかではない。最近、Kawagoe らは、PAR-2 ノックアウトマウスの樹立に成功した⁴⁾。急性膵炎における PAR-2 の役割を明らかにするため PAR-2 ノックアウトマウスを用いて検討を行った。

B. 研究方法

Kawagoe らが樹立した PAR-2 ノックアウトマウス⁴⁾ は興和株式会社 (東京) より御供与いただいた。体重 15 ~ 20 g の PAR-2 ノックアウトマウス (n = 3 ~ 4) および野生型マウス (n =

3 ~ 4) に、生理食塩水 200 μ l に溶解した 50 μ g/マウス体重 kg のセルレインを、腹腔内に 1 時間毎に 7 回投与することにより膵炎を誘導した (セルレイン膵炎)。膵炎誘導 7 時間後あるいは 18 時間後にマウスを犠牲死させ、血液、膵を採取し、以下の検討を行った。1) 血清アミラーゼ値、2) 膵組織像、3) 組織水分含量、4) 膵組織 myeloperoxidase 活性。対照群として生理食塩水 200 μ l を腹腔内に 1 時間毎に 7 回投与したマウスを用いた。致死性膵炎モデルである CDE 膵炎は以下のように作成した。24 時間の絶食後、コリン欠乏エチオニン添加飼料 (CDE 食) を 48 時間摂食させた。その後、再度 24 時間絶食としたのち、通常の飼料を摂食させた。CDE 食投与開始を膵炎誘導開始とし、12 時間毎に生存率を評価した。

(倫理面への配慮)

本研究におけるマウスの取り扱いには東北大学医学部実験動物取扱い規約に従った。

C. 研究結果

セルレイン膵炎誘導 7 時間後、野生型マウスでは血清アミラーゼは、14,400 \pm 1,743 IU/L まで上昇したが、PAR-2 ノックアウトマウスでは

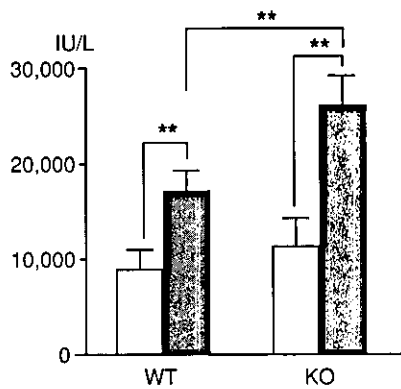


図1 膵炎誘導18時間後の血清アミラーゼ値
WT：野生型群，KO：ノックアウトマウス群
□：生理食塩水投与群，■：セルレイン投与群
n = 4, ** : p < 0.01

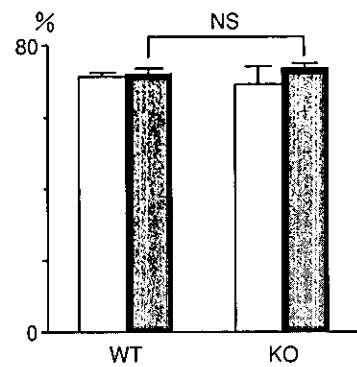


図3 膵炎誘導18時間後の膵組織水分含量
WT：野生型群，KO：ノックアウトマウス群
□：生理食塩水投与群，■：セルレイン投与群
n = 4, NS 有意差なし

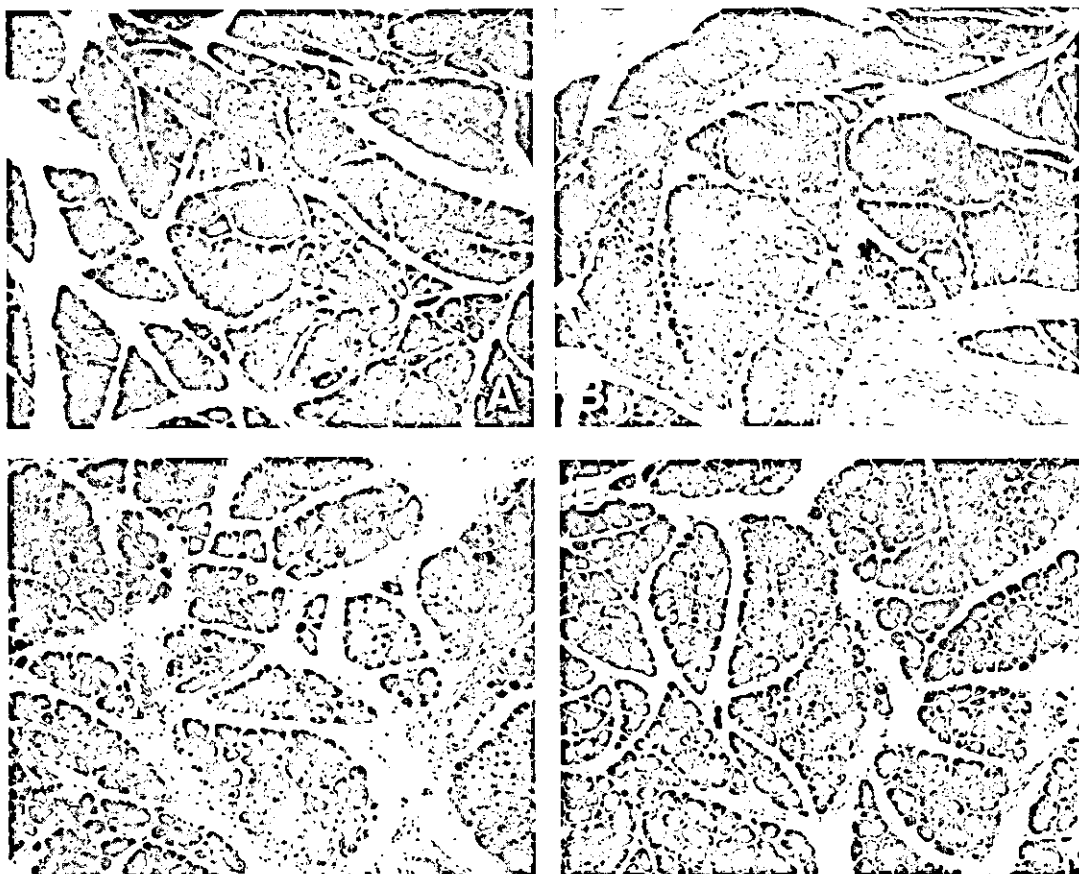


図2 膵組織像

A：野生型－膵炎誘導7時間後，B：野生型－膵炎誘導18時間後，
C：ノックアウトマウス－膵炎誘導7時間後，D：ノックアウトマウス－膵炎誘導18時間後 倍率100倍

24,066 ± 3,523 IU/Lであり有意に高値を示した (p < 0.05). 膵炎誘導18時間後の血清アミラーゼ値も同様に，野生型で17,150 ± 2,205 IU/L，ノックアウトマウス群で26,150 ± 3,048 IU/Lであり，ノックアウトマウス群が有意に高値を示した (p < 0.01) (図1).

膵組織像では，野生型群に比較し，ノックアウトマウス群で小葉内まで浮腫性変化が強く，

小葉間の炎症細胞浸潤もより高度であった (図2).

膵組織の水分含量は，膵炎誘導7時間後 (データは示さず)，18時間後 (図3) のいずれも野生型群とノックアウトマウス群の間に有意差を認めなかった.

膵炎誘導18時間後の膵組織 myeloperoxidase 活性はそれぞれ野生型，ノックアウトマウス群

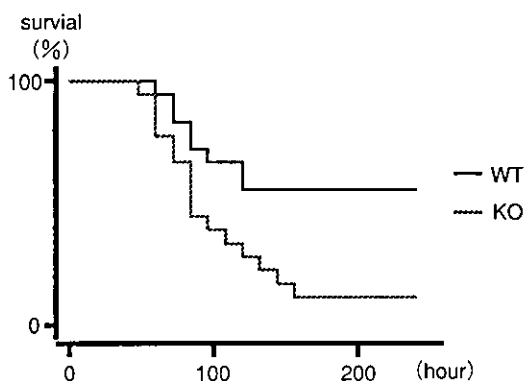


図4 CDE 膵炎生存率

Kaplan-Meier 法.

WT: 野生型群, KO: ノックアウトマウス群. n = 18

それぞれ 311 ± 78 U/g, $1,174 \pm 151$ U/g であり, 組織像と一致してノックアウトマウス群で有意に高値を示した ($n = 3$, $p < 0.01$).

CDE 膵炎における生存率は, ノックアウトマウス群で有意に低下を認めた ($n = 18$, $p < 0.01$) (図4).

D. 考察

近年, PAR-2 と疾患の関わりが注目されている. 今回, 急性膵炎における PAR-2 の役割を明らかにするため, PAR-2 ノックアウトマウスを用いた検討を行った. セルレイン膵炎において, PAR-2 ノックアウトマウスでは, 野生型と比べて, 血清アミラーゼ値, 膵組織 myeloperoxidase 活性の高値, 膵組織像の増悪を認めた. また, CDE 膵炎においてノックアウトマウス群の生存率が低下した.

急性膵炎時には, 活性化された大量のトリプシンが膵局所ならびに全身を循環する. セルレイン膵炎において PAR-2 ノックアウトマウス群で膵炎が増悪したことから, PAR-2 は膵局所の傷害を防ぐ防御機構として働くことが想定された. ごく最近, Namkung ら⁵⁾ と Sharma ら⁶⁾ によりセルレイン膵炎における PAR-2 の役割が報告されている. いずれの報告も本研究の結果と合致して膵局所においては防御作用を示すというものである. 膵の他に PAR-2 発現は血管内皮細胞や白血球などにも認められ, サイトカイン産生や白血球の内皮への接着, 血管透過性亢進など炎症促進に働くと考えられている⁷⁾. Namkung ら⁵⁾ は, 全身を循環する PAR-2 アゴニ

ストが重症膵炎時と同様の循環動態の変化を引き起こすことを報告しており, これが全身合併症に参与している可能性を示唆している. 一方, 本研究では致死性膵炎モデルである CDE 膵炎においても PAR-2 ノックアウトマウス群で生存率が低下しており, 全身的な PAR-2 の防御的役割も考えられた. そのメカニズムについては未だ明らかでなく, 今後, 重症膵炎における肺などの遠隔臓器障害における役割について更なる検討が必要である.

PAR-2 はトリプシンのみならず, 肥満細胞由来のトリプターゼによっても活性化される. 急性膵炎患者の血中トリプターゼ値が膵炎の重症度と相関し, 遠隔臓器障害のメディエーターの一つであると報告された⁸⁾. 急性膵炎の際の, 膵局所におけるトリプターゼ値は明らかではないが, トリプターゼによる活性化に対しても PAR-2 が保護的に働くと推察される. この点についても今後の検討が必要である.

E. 結語

PAR-2 は, 急性膵炎において防御的な役割を果たしていることが示唆された.

F. 参考文献

1. Nystedt S, et al. Molecular cloning of a potential proteinase activated receptor. Proc Natl Acad Sci USA 1994; 91: 9208-9212.
2. Bohm SK, et al. Molecular cloning, expression and potential functions of the human proteinase-activated receptor-2. Biochem J 1996; 314: 1009-1016.
3. Hoogerwerf WA, et al. The proteinase-activated receptor 2 is involved in nociception. J Neurosci 2001; 21: 9036-9042.
4. Kawagoe J, et al. Effect of protease-activated receptor-2 deficiency on allergic dermatitis in the mouse ear. Jpn J Pharmacol 2002; 88: 77-84.
5. Namkung W, et al. Protease-activated receptor 2 exerts local protection and mediates some systemic complications in acute pancreatitis. Gastroenterology 2004; 126: 1844-1859.
6. Sharma A, et al. Protection against acute pancreati-

tis by activation of protease-activated receptor-2.
Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 2005;
288: G388–G395.

7. Vergnolle N, et al. Protease-activated receptors in inflammation, neuronal signaling and pain. Trends Pharmacol Sci 2001; 22: 146–152.
8. Mentula P, et al. Serum levels of mast cell tryptase, vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor in patients with acute pancreatitis. Pancreas 2003; 27: e29–33.

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

実験膵炎における Immunonutrition の効果について

研究報告者 竹山宜典 近畿大学医学部外科学肝胆膵部門 助教授

共同研究者

山崎満夫，里井俊平，川辺高史，土師誠二，大柳治正

(近畿大学医学部外科学肝胆膵部門)

上田 隆 (神戸大学大学院消化器外科学)

【研究要旨】

重症急性膵炎における早期経腸栄養，特に immunonutrition の Bacterial translocation (BT) の防止効果を検討する目的で，ラット実験重症急性膵炎モデルを用いて，発症直後に上部小腸内に immunonutrition 製剤である Impact™ を投与し，24 時間後の BT を解析した．発症直後の immunonutrition 製剤の投与は，血清エンドトキシン濃度や膵および腸間膜リンパ節への BT に影響せず，発症早期の immunonutrition は BT に対しては有効性が低いものと考えられた．

A. 研究目的

重症急性膵炎は良性疾患でありながら致死率の高い重篤な疾患であり，特に感染性合併例の敗血症に対する対策が急務となっている．その感染成立機序としては，腸管からの Bacterial translocation (BT) が膵，膵周囲感染を引き起こすことが報告されている^{1,2,3)}．

一方，ICU 患者の感染対策として，感染源と考えられる腸内細菌移行 BT を抑制する目的で，Selective digestive decontamination (SDD) や早期経腸栄養の有用性が報告され，侵襲時に合併する感染症対策としてこれらの腸管対策の有効性が証明されてきた．さらに，最近では経腸栄養によって，腸管および全身の免疫を賦活することを目的とした“Immunonutrition”の概念が提唱され，各種疾患においてその有用性が報告されている．すなわち，多価不飽和脂肪酸 (ω -3 系， ω -6 系)，核酸成分，アミノ酸 (グルタミン・アルギニン)，抗酸化剤，食物繊維，短鎖脂肪酸などを強化した食品群の投与が，手術患者の surgical site infection 発生率と在院日数を低下させることなどが報告されている^{4,5)}．

重症急性膵炎臨床症例でも randomized control trial による解析で，経腸栄養や Immunonutrition の有効性が報告されている^{6,7)}．しかし，重症膵炎では，腸管運動障害があることなどから，

Immunonutrition を含め経腸栄養の開始時期等，基礎的データがほとんど存在しない．そこで，本研究ではラット重症急性膵炎モデルにおける発症後早期の immunonutrition の効果を解析した．

B. 研究方法

ラット重症急性膵炎は，胆汁酸膵管逆行性注入により，以下のような方法で作成した．すなわち，Wistar 系雄性ラットの胆膵管に PE-10 チューブを経十二指腸的に挿入し，肝門部で胆管をクランプした上で，2%デオキシコールを 0.1 ml 低圧注入した．Immunonutrition 製剤としての Impact™，対照として生理食塩水，それぞれ 5 ml を膵炎作成直後に十二指腸内から空腸上部に，one shot で注入した．Impact™ はアミノ酸としてアルギニン，核酸として RNA，脂肪酸としては ω 3 系脂肪酸を強化した immunonutrition 製剤であり，侵襲時に使用することで，術後感染性合併症発生率を軽減，レスピレータ管理期間短縮，ICU での敗血症患者の死亡率の改善や術後在院日数の短縮から，医療コストの軽減につながる事が報告されている^{8,9,10)}．

BT の評価は，膵炎作成 24 時間後に，ラットを犠牲死させ血清エンドトキシンを測定するとともに，腸間膜リンパ節，膵，腹水の細菌培養

を行った。

なお、本研究のプロトコールに関しては、近畿大学動物実験委員会において審査を受け、動物愛護の観点からも倫理面で問題ないことの承認を得て、行った。

C. 研究結果

膵炎作成 24 時間後の血清エンドトキシン測定の結果は対照群 25.9 ± 17.0 pg/ml, 43.8 ± 40.3 pg/ml で有意差はなかった。さらに、腸間膜リンパ節、膵および腹水の細菌培養の結果を、それぞれ図 1, 2, 3 に示す。膵炎作成 24 時間後には、膵および腸間膜リンパ節への BT には両群間に差を認めなかったが、腹水培養では、対照群では全例に腹水中に細菌が検出されたのに対し、Impact 群では、3/5 のラットで細菌が検出されなかった。Impact™ 投与により腹水中への細菌移行が抑制される可能性を示唆する結果であった。

D. 考察

今回の解析結果では、実験膵炎作成直後の immunonutrition 製剤の腸管内投与の BT 阻止効果は明らかではなかった。今回、解析対象としたモデルは、約半数が 48 時間以内に死亡する重篤なモデルであり、さらに腸管麻痺による腸管運動障害も強く経腸栄養剤の肛門側腸管内への移行にも問題があった可能性がある。

さらに、immunonutrition は、腸管免疫および全身の免疫能を賦活させるものであるが、その分子機構のひとつとして、免疫担当細胞の膜の組成変化による機能変化が考えられる。このような、膜の組成変化には少なくとも 48 時間以上必要であると考えられており、今回の解析時期が早すぎたとも考えられる。重症急性膵炎では、発症早期のみならず、経過を通じて経腸栄養を継続することが重要であることが示唆された。

また、高度侵襲に対して immunonutrition が有効であった解析は、ほとんどが予定手術における術前投与であり、投与後単独での有効なプロトコールは存在しない。したがって、重症急性膵炎のように侵襲後に治療開始をせざるを得ない病態では、Immunonutrition に加えて、直接腸

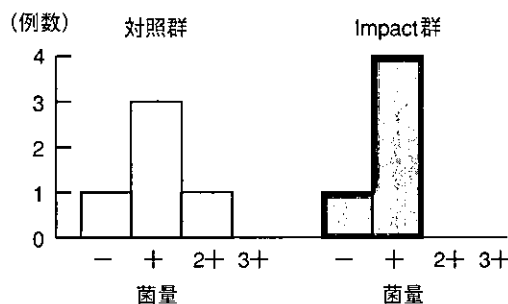


図 1 膵炎作成 24 時間後の腸間膜リンパ節培養

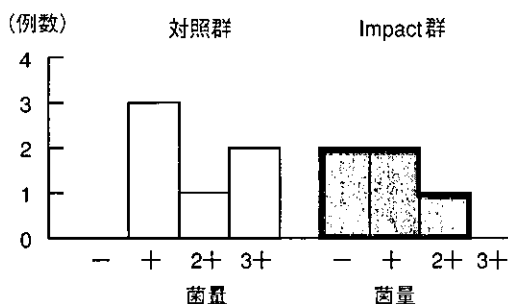


図 2 膵炎作成 24 時間後の膵培養

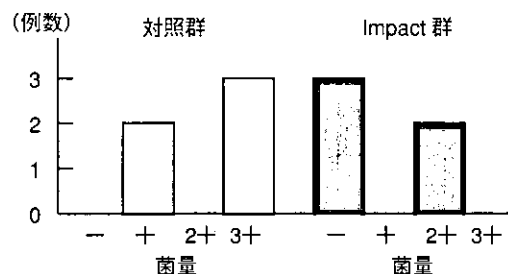


図 3 膵炎作成 24 時間後の腹水培養

管に作用して BT を抑止するような、治療法の適応が必要と考えられた。

E. 結語

重症急性膵炎における BT を抑止する目的では、immunonutrition は発症後早期のみでは不十分であり、少なくとも 24 時間以上の継続投与が必要と考えられた。

F. 参考文献

1. Runkel NS, Moody FG, Smith GS, Rodriguez LF, LaRocco MT, Miller TA. The role of the gut in the development of sepsis in acute pancreatitis. J Surg Res 1991; 51: 18-23.
2. Gianotti L, Munda R, Alexander JW, Tchervenkov JI, Babcock GF. Bacterial translocation: a potential source for infection in acute pancreatitis. Pancreas

1993; 8: 551-558.

3. Kazantsev GB, Hecht DW, Rao R, Fedorak IJ, Gattuso P, Thompson K, et al. Plasmid labeling confirms bacterial translocation in pancreatitis. *Am J Surg* 1994; 167: 201-206.
4. Windsor AC, Kanwar S, Li AG, Barnes E, Guthrie JA, Spark JL, et al. Compared with parenteral nutrition, enteral feeding attenuates the acute phase response and improves disease severity in acute pancreatitis. *Gut* 1998; 42: 431-435.
5. Ates E, Yilmaz S, Erkasap S, Ihtiyar E, Kaya Y, Pehlivan T, et al. Perioperative immunonutrition ameliorates the postoperative immune depression in patients with gastrointestinal system cancer (prospective clinical study in 42 patients). *Acta Gastroenterol Belg* 2004; 67: 250-254.
6. Kalfarentzos F, Kehagias J, Mead N, Kokkinis K, Gogos CA. Enteral nutrition is superior to parenteral nutrition in severe acute pancreatitis: results of a randomized prospective trial. *Br J Surg* 1997; 84: 1665-1669.
7. Olah A, Belagyi T, Issekutz A, Gamal ME, Bengmark S. Randomized clinical trial of specific lactobacillus and fibre supplement to early enteral nutrition in patients with acute pancreatitis. *Br J Surg* 2002; 89: 1103-1107.
8. Beale RJ, Bryg DJ, Bihari DJ. Immunonutrition in the critically ill: a systematic review of clinical outcome. *Crit Care Med* 1999; 27: 2799-2805.
9. Heyland DK, Novak F, Drover JW, Jain M, Su X, Suchner U. Should immunonutrition become routine in critically ill patients? A systematic review of the evidence. *Jama* 2001; 286: 944-953.
10. Heys SD, Schofield AC, Wahle KW. Immunonutrition in clinical practice. what is the current evidence? *Nutr Hosp* 2004; 19: 325-332.

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

II. 慢性肺炎

1) 共同研究

慢性膵炎診断基準の再検討（1）慢性膵炎の早期像

研究報告者 小泉 勝 大原総合病院附属大原医療センター 院長

共同研究者

大槻 眞（産業医科大学消化器・代謝内科）、入澤篤志（福島県立医科大学内科学第二）
石幡良一（大原総合病院胃腸科）、乾 和郎（藤田保健衛生大学第二教育病院内科）
大原弘隆（名古屋市立大学大学院臨床機能内科学）、片岡慶正（京都府立医科大学大学院消化器病態制御学）
神澤輝実（東京都立駒込病院内科）、桐山勢生（大垣市民病院消化器科）
澤武紀雄（金沢大学がん研究所腫瘍内科）、須賀俊博（札幌厚生病院）
下瀬川徹、朝倉 徹（東北大学大学院消化器病態学）
須田耕一（順天堂大学医学部病理学第一）、税所宏光（千葉大学大学院腫瘍内科学）
永井秀雄（自治医科大学消化器一般外科学）、中村光男（弘前大学医学部病因・病態検査学）
広田昌彦（熊本大学大学院消化器外科学）

【研究要旨】

現在診断されている慢性膵炎は、生存期間が短いこと、悪性腫瘍、膵癌の併発が多く、難治性膵疾患であることが再確認されている。早期に治療を開始するためには診断基準の見直しが必須である。本研究は慢性膵炎の早期の臨床像を明らかとすることを目的とし以下の検討を行った。

1. 急性膵炎からの慢性膵炎への進展はアルコール性症例、特に再発例で認められた。一線病院（大垣市民病院）の急性膵炎として初診した242例のうちアルコール性例は12.9%が、その後再発した例では35.5%が慢性膵炎に進展した。他の成因の急性膵炎例では慢性膵炎への進展は低頻度であった。大学病院（東北大学第三内科）での急性膵炎63例は2例3.1%、男性で大酒家、膵炎を繰り返した例が慢性膵炎に進行した。

2. 慢性膵炎例の臨床症状発現から慢性膵炎診断までの期間、病態を検討した。一線病院の60症例では慢性膵炎が診断された診療機会（受診時）以前に腹部症状を有した例がアルコール性例で17.8%、特発性症例で0%であった。慢性膵炎診断時の膵石灰化は56.8%と33.3%に認めた。大学病院94例では受診前6カ月以内の症状発現はアルコール性例で24.6%であった。また5年以上前から症状を示した例は28.0%であった。特発性例では症状発現後6カ月以内に診断された例が59.5%と多く、5年以上は24.3%であった。早期から膵炎として把握していた例の多くは、腹痛を繰り返す大量の飲酒を続ける男性であった。このようにアルコール性症例と特発性症例では経過が異なり、早期慢性膵炎の臨床像も違ったものと推測された。

3. 臨床的に慢性膵炎が疑診できた例のうちEUSで膵実質所見から早期慢性膵炎を疑診できた6症例の経過を平均間隔16.2カ月観察した。全症例の臨床像は悪化せず、EUSの膵実質所見の明らかな変化はなかった。入院するような膵炎発作がないこと、抗酵素剤投与が行われたことが膵炎の進展がみられなかったことと関連する可能性が考えられた。現在のEUSで早期慢性膵炎と疑診できる例は腹痛発作がなければ進展しない可能性が考えられた。

以上より石灰化以外の確実な症状所見、特に膵炎発作、腹痛を加え、成因別とした診断基準が早期診断に結びつくと考えられた。

A. 研究目的

現行の慢性膵炎の臨床診断基準は慢性膵炎で見られる症候、検査所見のうち確実な異常所見

が取り上げられ、設定されたものである¹⁾²⁾。最近の慢性膵炎症例の予後調査は糖尿病、悪性腫瘍、特に膵癌などの併発が予期値以上であり生