

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

急性膵炎重症化の分子病態の解明と予防，治療法の確立 —急性膵炎患者の遺伝子異常と侵襲関連分子の遺伝子多型の検討—

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

船越顕博（国立病院機構九州がんセンター消化器内科）

【研究要旨】

本研究の目的として，以下の3点を明らかにする．1) *PSTI* 遺伝子変異の有無と急性膵炎重症化，膵炎進展との関連性について，2) *MIF* 遺伝子多型と急性膵炎重症化，特に重症感染症合併との関連性について，3) 血清 *MIF* 値の急性膵炎重症化や敗血症合併の早期予測因子としての可能性．今年度は，新規遺伝子解析の対象となった *MIF* 遺伝子プロモーター -173 位の G, C アレルの検索システムとして制限酵素 *AluI* による PCR-RFLP 法を確立した．今後，本研究班への参加施設および協力施設すべてに，検体の採取を依頼し，遺伝子解析は平成17年度—平成18年度に約200例を目標として検討を進める．

A. 研究目的

厚生労働科学研究費補助金難治性疾患克服研究事業(平成14年度—平成16年度)では，「急性膵炎重症化の背景因子の解明と重症化の予知と予防・治療法の研究」をテーマとして，以下の2点について検討を行った．第1は，膵分泌トリプシンインヒビター (*PSTI*) 遺伝子解析による急性膵炎重症化の患者側背景因子の検討であり，第2は，トリプシノーゲン活性化ペプチド(TAP) およびマクロファージ遊走阻止因子(MIF)測定による急性膵炎重症化の早期予知の可能性の検討であった．

その結果，*PSTI* 遺伝子の N34S 変異を急性膵炎患者148例中6例(4.1%)に，-215G>A変異を2例(1.4%)に認めた¹⁾．一方，健常者165例の解析では，N34Sが1例(0.6%)に認められただけであり，*PSTI* 遺伝子変異の発現頻度は急性膵炎患者で有意に高いことが明らかとなった．一方，重症急性膵炎56例と軽・中等症膵炎92例でN34Sと-215G>A変異の頻度を比較したが，明らかな有意差を認めなかった．以上の結果から，*PSTI* 遺伝子変異は急性膵炎の発症に関与しているものの，重症化の遺伝的背景因子である可能性は低いと結論した．しかし，N34S陽性の重症例2例は，膵局所の炎症の程度が軽いわりに，腹腔内では炎症が骨盤腔まで及んでいた．症例数は

少なく結論はできないが，*PSTI* 遺伝子変異が急性膵炎における炎症の進展に抑制的な働きを有する可能性が考えられた．一方，血清TAPとMIFの測定は，軽症18例，中等症19例，重症38例の計75例で検討した．その結果，急性膵炎患者入院時の血清TAP，MIFともに，重症例では軽症例，中等症例に比べて有意に高値を示し，急性膵炎重症化の予知指標となる可能性が示された²⁾．さらに，入院後72時間以内の血清MIFのピーク値は，経過中に重症感染症を合併した症例では，感染症を合併しなかった症例に比べて有意に高値を示し，重症感染症のリスク予知因子である可能性も明らかとなった．

以上の結果をもとに，今年度の研究を以下の3点とした．1) *PSTI* 遺伝子変異の有無と急性膵炎重症化，膵炎進展との関連について症例を増やして検討する．2) *MIF* 遺伝子多型と急性膵炎重症化，特に重症感染症合併との関連について検討する．3) 血清MIFを入院時および入院後経時的に採血し，重症化や敗血症合併の予測因子となりうるか，について検討する．

B. 研究方法

1. 対象

本研究班の共同研究「急性膵炎の診断と重症度判定基準改正，妥当性の検証」では，急性膵炎の

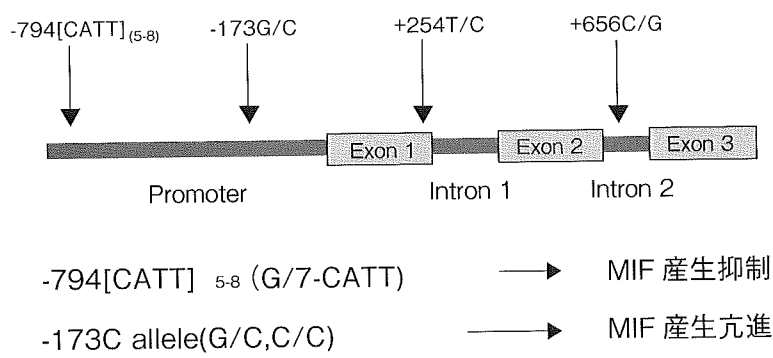


図1 MIF遺伝子の構造と多型部位

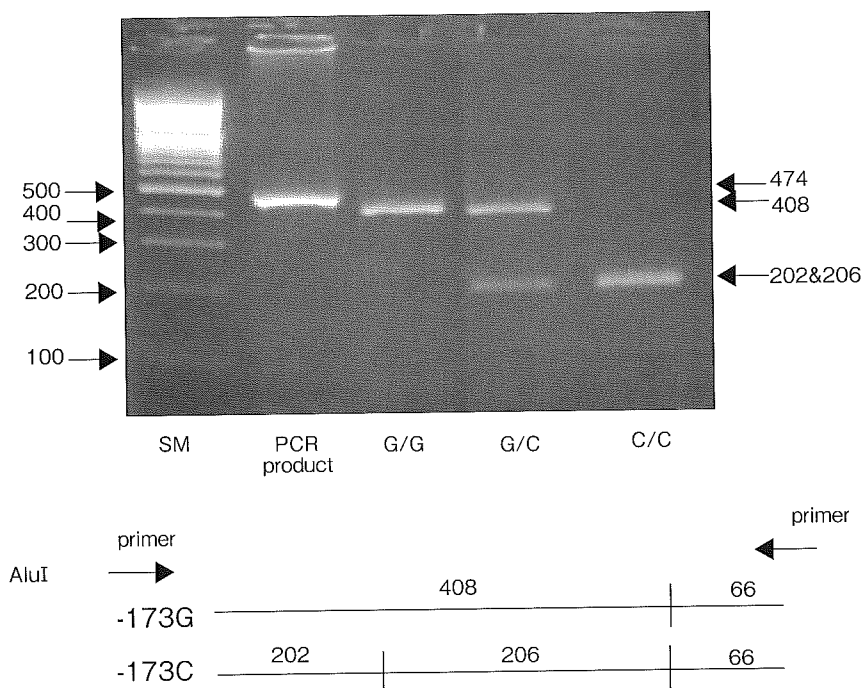


図2

新臨床診断基準と新重症度判定基準の妥当性をプロスペクティブに検討することを計画している。欠落項目のない臨床データと本研究結果を対比検討するため、上記研究グループに参加する12施設を中心とし、本研究班への参加施設および協力施設すべてに、検体の採取を依頼する。遺伝子解析は、平成17年度—平成18年度に約200例を目標として検討を進める。

2. 膵分泌性トリプシンインヒビター (PSTI)の遺伝子解析

末梢血白血球より genomic DNA を抽出し、PSTI 遺伝子の promoter 領域と、4つの各 exon を nested PCR で増幅する。ABI3100 を使用し、direct DNA sequence を行う。また、N34S と -215G>A について、制限酵素 *TspR1* と *Bgl1* を用いた PCR-RFLP によっても解析する。

3. MIF 遺伝子多型の解析

MIF 遺伝子の promoter 領域を PCR により増幅する(図1)。得られた PCR 産物を制限酵素 *AluI* を用いて切断し、電気泳動によって遺伝子多型の有無を判定する(PCR-RFLP)。

4. 血清 MIF 濃度の測定

入院時、入院後2日、3日、7日、14日の5ポイントで採血する。血清 MIF 濃度は、Human MIF enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit (札幌イムノ・ダイアグノスティック・ラボラトリー)を用いて測定する。

(倫理面への配慮)

MIF 遺伝子の多型解析以外は、前回の班研究の継続であり、遺伝子解析を含む研究計画は、東北大学医学部倫理委員会および検体を供与していただく参加施設の倫理委員会で承認されている。ヒト MIF 遺伝子多型の解析については、

東北大学医学部倫理委員会に追加申請し、すでに承認を受けている。今後、協力参加施設での追加申請を行う。

C. 研究結果

今年度は、新規遺伝子解析の対象となった *MIF* 遺伝子多型の検索システムを確立することを目標とした。

図2に示すように、*MIF* 遺伝子プロモーターの -173位がGアレルの場合、PCR増幅産物は制限酵素 *AluI* によって404bpと66bpの2本のバンドに切断される(図2)。一方、-173位がCアレルの場合、図2に示すように *AluI* による切断点が2カ所出現するため、理論上は202bpと206bp、66bpの3本のバンドが現れる。実際には、202bpと206bpのバンドは重なるため1本のバンドとして認識される。以上のようなバンドのパターンによってヒト *MIF* 遺伝子プロモーター -173位の多型を検討する。

D. 考察

今年度は、ヒト *MIF* 遺伝子プロモーターの -173位のG,Cアレルを解析するPCR-RFLP法を確立した。

*MIF*は115個のアミノ酸からなる、分子量12.5 kDaの蛋白である。通常は3量体を形成して、安定な分子として存在すると考えられている。*MIF*は、マクロファージから分泌され、免疫機能や炎症の調整機能を有する重要な炎症性サイトカインの一種であるが、一方、下垂体前葉からも分泌され、ホルモン様の性格も有する特徴的な蛋白である。ヒト *MIF* 遺伝子は1994年に Paraker と Wistow によって解明されているが、3つの exon からなる全長1 kbに満たない小さな遺伝子構造であることがわかっている²⁾。

最近、*MIF* 遺伝子のプロモーター領域に2つの多型部位が存在することが明らかにされた。一つは、-794位のCATTの繰り返し配列で、ヒトによって5回～8回の繰り返しの違いが見られる。もう一つは、-173位がGかCの1塩基多型である(図1)。これらの多型は *MIF* 遺伝子のプロモーター活性に影響を与え、-173位ではCアレルが、-794位ではCATTの繰り返し配列が多い

方が、*MIF*の誘導が強い。また、-173位のG/Cと-794位の(CATT) 5～8の間には相互作用がみられ、両者の組み合わせによって *MIF* 遺伝子の発現量が影響を受けると報告されている。これまでに、若年性特発性関節炎、乾癬、アトピーなどで、これら遺伝子多型と疾患発症の関連性について検討されてきた。急性膵炎については、2003年に Makhija Rらが³⁾、-173位のCアレルの頻度が急性膵炎患者で有意に高いことを報告しているが、いまだ十分な検討は行われていない。

本研究では、これまでの班研究で明らかにしてきたように、急性膵炎の重症化や後期合併症としての重症感染症の発症と血清 *MIF* 値の間に関連性が認められたため、入院後の血清 *MIF* を経時的に測定し、臨床像と対比する。また、*MIF* 遺伝子多型を検索することによって、生体側の遺伝的背景因子として膵炎重症化や後期合併症としての重症感染症の発症のしやすさを予測できるかを検討する。

E. 結論

これまでの班研究の結果から、急性膵炎重症化や後期合併症としての重症感染症の発症を規定する生体側の因子として、*MIF* 遺伝子のプロモーター領域の多型を検討することを目的とし、*AluI*を用いたPCR-RFLPによるスクリーニング法を確立した。

F. 参考文献

1. 下瀬川徹, 松野正紀, 成瀬 達, 黒田嘉和, 大槻 眞. 急性膵炎重症化の背景因子の解明と重症化の予知と予防・治療法の研究. 厚生労働科学研究費補助金難治性疾患克服研究事業難治性膵疾患に関する調査研究 平成14年度～16年度 総括研究報告書 2005; 68-72.
2. Donn RP, Ray DW. Macrophage migration inhibitory factor: molecular, cellular and genetic aspects of a key neuroendocrine molecule. *J Endocrinol* 2004; 182: 1-9.
3. Makhija R, Demaine AG, Kingsnorth AN. Macrophage migration inhibitory factor: gene promoter region polymorphisms and acute pancreatitis. *Pancreatol* 2003; 3: 224.

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

重症急性膵炎に対する Plasma Dia-Filtration (PDF) の試み

研究報告者 藤山佳秀 滋賀医科大学消化器内科学 教授

共同研究者

安藤 朗, 畑 和憲 (滋賀医科大学消化器内科学)

五月女隆男 (滋賀医科大学救急集中治療医学)

【研究要旨】

重症急性膵炎に対する血液浄化法の進歩はめざましいものがある。その目的は炎症性サイトカインを介した多臓器不全への進展予防にある。その先駆的役割を果たしてきたのがCHDFであり、現在も重症急性膵炎に対する血液浄化法の第一選択である。さらにサイトカインなどの中分子量物質を除去するためにさまざまな方法が近年開発されている。double CHDFの試行や、super high-flux膜の開発などである。Plasma dia-filtration (PDF)は血漿分離とHDFの同時施行が可能な血液浄化法であり、肝不全や高ビリルビン血症を合併した敗血症症例や重症急性膵炎に効果があると考えられる。実際にはEvacure EC-2Aを血漿分離器として使用し、血漿分離膜の外側に透析液を還流することによりHDFの同時施行を可能としている。FFP量は約8時間あたり15単位であり、通常行われる緩徐血漿交換に比較して少なくてすむ利点がある。PDFのIL-6、IL-8のクリアランスはおよそ18 ml/minであり、自尿によるクリアランスには遠く及ばないものの、急性腎不全を伴う症例においてはThe Peak Concentration Hypothesisからも多臓器不全への進展を抑制する可能性がある。

A. 研究目的

重症急性膵炎の救命率は飛躍的に向上してきた。その中でも重要な役割を担っているのが血液浄化法の進歩である。今回施行したplasma dia-filtration (PDF)は代用肝臓として開発が進められてきたものである¹⁾。すなわち肝不全時の凝固因子補充、水分バランス是正を同時に行える手段として現在も開発段階にある。要点は新鮮凍結血漿(FFP)の補充が通常血漿交換量のおよそ半分(15~20単位)で十分な血液凝固因子を補充できることに加え、血液濾過透析(HDF)による水分バランスの調整が1本の血漿濾過カラムで施行可能などところにある。さらに血中ビリルビンの除去能力にも優れ、中分子量物質である炎症性サイトカインの除去能力も期待できる血液浄化法である。

そこで重症急性膵炎を含む敗血症症例にPDFを施行し、クリアランスを含めその効果につき検討した。

B. 研究方法

膜型血漿分離器としてはクラレのEvacure

EC-2Aを使用した。対象となるべき症例は総ビリルビン5.0 mg/dlを超える重症急性膵炎または敗血症で、多臓器不全により肝不全を合併した症例とした。

操作はQB 60~80 ml/min, QF 600 ml/h, QD 600 ml/hで行い、透析液と補液はサブラッドBSを使用し、別付けポンプでFFP 15単位を150 ml/hで投与した。抗凝固剤としてNafamostat Mesilate (FUT)を使用し、投与量の目安は開始時25 mg/h、その後ACT 140~170秒を目標に最大35 mg/hで調整した。また、8時間の施行を1クールとするが、そのままの血漿分離器、回路を使用して3クールまでは施行可能とした。またアルブミンの喪失を補填するために1クール毎に25%アルブミンを50 ml補充した。

各物質のクリアランスは血漿分離器前後の血液中濃度と濾液中濃度、濾液量より算出した。(倫理面への配慮)

実施にあたっては文書で同意を得た。

C. 研究結果

実際に測定したPDFでのクリアランスはIL-6

が18.1 ml/min, IL-8が18.8 ml/minであった(表1)。もちろんさらに分子量の小さい尿毒症物質はほぼ20 ml/min, ビリルビンも5 ml/min前後のクリアランスが得られた。

血清アルブミンの篩係数は約0.3であり, PDF約8時間施行あたり25%アルブミン50 mlの補充で十分であった。

D. 考察

重症急性膵炎急性期から2週間程度の感染を合併しない時期においては, 大量輸液による血管内脱水の是正とアシドーシスの改善が微小血管障害を介しての多臓器不全への進展を予防する。さらに血液浄化法によるサイトカイン除去がchemical mediatorを介しての臓器不全を予防することとなる。その両方の同時施行を可能としたのがPDFであり, 肝不全合併症例の凝固因子補充の観点からも合目的な血液浄化法である。

重症急性膵炎を含むSIRSや敗血症など炎症性サイトカインが病態の本態をなす疾患において, サイトカインを除去する方法がとられる。CHDFの濾液中に炎症性サイトカインが検出されたことによりCHDFはCRRT (continuous renal replacement therapy)としてのみならずhumoral mediator除去の観点から積極的に行われてきた。また, 近年サイトカインを直接吸着する方法も開発が進んでいる。カネカの開発したCTR-001 DHPカラムは中分子量物質であるサイトカインの吸着効率を上げるために, cellulose beadsの細孔サイズを大きく設計し, *in vitro*では50 kDa以上の分子量であるTNF- α の吸着率が55%, 20 kDaを超えるIL-6の吸着率も81%まで改良されたものである。実際に重症急性膵炎でもその有効性が確認されており^{2,3)}, 今後の症例の集積が待たれる。

現在super high flux膜による中分子量物質の除去がサイトカイン除去の観点から注目を集めている。cut-off値が大きなsuper high flux膜を使用することにより, 比較的大きな分子量であるIL-6も十分に除去できることが報告された^{4,5)}。

血液浄化法の現在のトピックスがサイトカイン除去を目的としていることは間違いなく, そ

表1 PDFによる各物質のクリアランス(ml/min)

	開始1時間後	8時間後
BUN	18.4	18.6
Cre	21.5	25.4
IL-6	18.1	
IL-8	18.8	
T.Bil	5.6	4.0

クリアランス(ml/min) =

$$\{ (C_{Bi} \times Q_{Bi}) - (C_{Bo} \times Q_{Bo}) \} \div C_{Bi}$$

C_{Bi}: フィルター入口の血中濃度

Q_{Bi}: フィルター入口の血液流量

C_{Bo}: フィルター出口の血中濃度

Q_{Bo}: フィルター出口の血液流量

の難しさは中分子量物質が目的除去物質であるという点についても疑う余地はない。そこでわれわれが着目したのは単純血漿交換でサイトカインの存在する中分子量物質を除去しながら, 同時にCHDFの効果を上乘せする方法である。PDFによる実際のサイトカインクリアランスはIL-6が18.1 ml/min, IL-8が18.8 ml/minであったが, 急性腎不全合併時期にはその効果は高いものと予想される。今後の症例の集積が期待される。

E. 結論

PDFによる血液浄化法を敗血症および重症急性膵炎症例に施行し, 炎症性サイトカインであるIL-6, IL-8のクリアランスを測定した。自尿によるクリアランスには及ばないものの, 高サイトカイン血症の是正に有効である可能性が示唆された。

F. 参考文献

1. Mori T, Eguchi Y, Shimizu T, Endo Y, Yoshioka T, Hanasawa K, Tani T. A case of acute hepatic insufficiency treated with novel plasmapheresis plasma dia-filtration for bridge use until liver transplantation. *Ther Apher* 2002; 6 : 463-466.
2. Saotome T, Endo Y, Sasaki T, Tabata T, Hamamoto T, Fujino K, Andoh A, Eguchi Y, Tani T, Fujiyama Y. A case of severe acute pancreatitis treated with CTR-001 direct hemoperfusion for cytokine apheresis. *Ther Apher Dial* 2005; 9 : 367

-371.

3. 五月女隆男, 遠藤善裕, 田畑貴久, 他.
CTR-001によるサイトカイン吸着療法. 日本ア
フェリシス学会雑誌 2005; 24 : 256-263.
4. Uchino S, Bellomo R, Goldsmith D, Davenport P,
Cole L, Baldwin I, Panagiotopoulos S, Tipping P.
Super high flux hemofiltration: A new technique
for cytokine removal. Intensive Care Med 2002;
28 : 651-655.
5. Morgera S, Rocktaschel J, Haase M, Lehmann
C, von Heymann C, Ziemer S, Priem F, Hocher
B, Gohl H, Kox WJ, Buder HW, Neumayer HH.
Intermittent high permeability hemofiltration in
septic patients with acute renal failure. Intensive
Care Med 2003; 29 : 1989-1995.

G. 健康危険情報

該当なし

H. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 稲富 理, 安藤 朗, 畑 和憲, 五月女隆男,
高柳 淳, 清水信義, 藤山佳秀. ヒト膵腺房周
囲筋線維芽細胞からの造血コロニー刺激因子の
産生. 膵臓 2005; 20 : 448-454.
- 2) Saotome T, Endo Y, Sasaki T, Tabata T, Hamamoto
T, Fujino K, Andoh A, Eguchi Y, Tani T, Fujiyama
Y. A case of severe acute pancreatitis treated
with CTR-001 direct hemoperfusion for cytokine
apheresis. Ther Apher Dial 2005; 9 : 367-371.

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

遺伝子改変マウスを用いた膵炎発症機構の解析

研究報告者 広田昌彦 熊本大学医学薬学研究部消化器外科 助教授

共同研究者

大村谷昌樹, 橋本大輔, 陶山浩一 (熊本大学医学薬学研究部消化器外科, 熊本大学発生医学研究センター)

市原敦史, 藤村美憲, 馬場秀夫 (熊本大学医学薬学研究部消化器外科)

山村研一 (熊本大学発生医学研究センター)

【研究要旨】

膵炎発症におけるトリプシノーゲンの活性化(トリプシン生成)と PSTI によるその制御(活性阻害)の重要性を解析するために, PSTI 遺伝子(マウスでは *Spink3* 遺伝子)のノックアウトマウスを作成し, その表現型を解析した. 同ノックアウトマウスでは, 生後, 膵腺房細胞が空胞変性に陥り, 消失した. また, 本現象における細胞死は, ネクローシスやアポトーシスではなく, オートファジーが関与するオートファジー細胞死と呼ばれる第三の細胞死機構であることが判明した. PSTI 遺伝子(*Spink3* 遺伝子)のノックアウトマウスにおける膵腺房細胞の変性・消失現象は, PSTI 分子が膵腺房細胞の integrity の維持に極めて重要であることを意味し, 遺伝子変異による PSTI 分子の高次構造の変化が, 膵腺房細胞障害の発生に対する閾値の低下につながることを強く示唆する.

A. 研究目的

トリプシノーゲンの異所性(膵内)活性化(トリプシン生成)に引き続いて生じる連鎖的な諸プロテアーゼの活性化によって, 膵の構成細胞が自己消化されるに至るという機構が, 膵炎の主要な発症機構と考えられている. 1996年にトリプシノーゲンの遺伝子変異と膵炎発症の関係¹⁾, 続いて2000年に膵分泌性トリプシンインヒビター(pancreatic secretory trypsin inhibitor: PSTI)の遺伝子変異と膵炎発症の関係²⁾が示されて以来, 膵炎発症におけるトリプシンとそのインヒビターの意義が再認識されている³⁾. 本研究では, 遺伝子改変マウスを用いて膵炎発症におけるトリプシノーゲンの活性化(トリプシン生成)と PSTI によるその制御(活性阻害)の重要性を検討すること, を目的とした.

B. 研究方法

PSTI 遺伝子(マウスでは *Spink3* 遺伝子)のノックアウトマウスを作成し, PSTI 遺伝子変異の膵炎発症への意義を検討した.

(倫理面への配慮)

ノックアウトマウスの作成, および同マウス

を使用した実験は, 組換え DNA 実験計画書, および動物実験計画書を提出し, 承認を得たうえで, NIH animal care guideline およびヘルシンキ宣言に則って行った.

C, D. 研究結果および考察

PSTI 遺伝子(マウスでは *Spink3* 遺伝子)のノックアウトマウスを作成し, その表現型を解析した. 同ノックアウトマウスでは, 生後, 膵腺房細胞が空胞変性に陥り, 消失した. また, 本現象における細胞死は, ネクローシスやアポトーシスではなく, オートファジーが関与するオートファジー細胞死と呼ばれる第三の細胞死機構であることが判明した⁴⁾. PSTI 遺伝子(*Spink3* 遺伝子)のノックアウトマウスにおける膵腺房細胞の変性・消失現象は, PSTI 分子が膵腺房細胞の integrity の維持に極めて重要であることを意味し, 遺伝子変異による PSTI 分子の高次構造の変化が, 膵腺房細胞障害の発生に対する閾値の低下につながることを強く示唆する.

膵腺房細胞におけるトリプシノーゲンの活性化の機序については, 1) トリプシノーゲンは sorting error されたライソゾーム酵素のカテプ

シンBにより活性化されるとする「カテプシンB説」と、トリプシノーゲンはセリンプロテアーゼ活性のもとで、あるいはプロテアーゼ活性に非依存性に、酸性環境のsubcellular compartmentに移送されて活性化されるとする「autoactivation説」の2つが提唱されてきた。しかし、それぞれの説だけでは説明できない点もあり、現在どちらの説が正しいのか、あるいは主体なのか、という議論に決着はついていない。われわれの考えているオートファジーが関与するという考え方は、いわば第三の説といえる。オートファジーの惹起に伴って形成されるオートファゴゾーム(これが組織像で見られる空胞に相当する)は、トリプシノーゲンが生理的に存在するサイモングラニュールを包含しているが、オートファゴゾームは、その後、ライソゾームと癒合してオートライソゾームを形成する。われわれは、*PSTI*遺伝子(*Spink3*遺伝子)のノックアウトマウスの膵腺房細胞内で「トリプシン活性の阻害不全」が生じていることを確認している(submitted)。野生型マウスでは、トリプシンが生成しても*PSTI*の活性でトリプシン活性は制御されるが、*PSTI*遺伝子(*Spink3*遺伝子)のノックアウトマウスではトリプシン活性が維持されたままである。オートファジーの過程の中でトリプシノーゲンが活性化されることは間違いないが、トリプシンの活性が制御できないからオートファジーを生じるのか、オートファジーの過程でトリプシノーゲンが活性化されるのか、が興味ある点である。前者が「autoactivation説」、後者が「カテプシンB説」に相当するといえる。前者であれば、オートファジーは制御不能に陥ったトリプシン分子を消去するための防御的な機構であるし、後者であれば、オートファジーの機構がトリプシノーゲンを活性化する悪玉であることになる。*PSTI*を大量に含有している肝細胞では*PSTI*が欠損してもオートファジーは認められなかった。膵腺房細胞に特異的にオートファジーが認められたことは、膵腺房細胞に特異的に発現されるトリプシンの活性がオートファジーの誘導に関与することを示唆する。*PSTI*分子とオートファジー形成に必要な分子(ATG5)のダブルノックアウトマウスを作成したが、膵腺

房細胞の変性は認めなかった。本マウスでトリプシノーゲンが活性化されてトリプシン活性の制御不全を生じているのか否かの確認が、膵炎発症に関する両学説の論争に決着をつけることになるものと考え、現在、実験を準備中である。

E. 結論

*PSTI*遺伝子(マウスでは*Spink3*遺伝子)のノックアウトマウスを作成し、その表現型を解析した。*PSTI*遺伝子(*Spink3*遺伝子)のノックアウトマウスにおける膵腺房細胞の変性・消失現象は、*PSTI*分子が膵腺房細胞のintegrityの維持に極めて重要であることを意味し、遺伝子変異による*PSTI*分子の高次構造の変化が、膵腺房細胞障害の発生に対する閾値の低下につながることを強く示唆する。

F. 参考文献

1. Whitcomb DC, Gorry MC, Preston RA, Furey W, Sossenheimer MJ, Ulrich CD, Martin SP, Gates LK Jr, Amann ST, Toskes PP, Liddle R, McGrath K, Uomo G, Post JC, Ehrlich GD. Hereditary pancreatitis is caused by a mutation in the cationic trypsinogen gene. *Nat Genet* 1996; 14 : 141-145.
2. Witt H, Luck W, Hennies HC, Claßen M, Kage A, Lass U, Landt O, Becker M. Mutations in the gene encoding the serine protease inhibitor, Kazal type 1 are associated with chronic pancreatitis. *Nat Genet* 2000; 25 : 213-216.
3. Hirota M, Kuwata K, Ohmuraya M, Ogawa M. From acute to chronic pancreatitis: the role of the mutations in the pancreatic secretory trypsin inhibitor gene. *JOP* 2003; 4 : 83-88.
4. Ohmuraya M, Hirota M, Araki M, Mizushima N, Matsui M, Mizumoto T, Haruna K, Kume S, Takeya M, Ogawa M, Araki K, Yamamura K. Autophagic cell death of pancreatic acinar cells in serine protease inhibitor Kazal type 3-deficient mice. *Gastroenterology* 2005; 129 : 696-705.

G. 健康危険情報

該当なし

H. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Ohmuraya M, Hirota M, Araki M, Mizushima N, Matsui M, Mizumoto T, Haruna K, Kume S, Takeya M, Ogawa M, Araki K, Yamamura K. Autophagic cell death of pancreatic acinar cells in serine protease inhibitor Kazal type 3-deficient mice. *Gastroenterology* 2005; 129 : 696–705.
- 2) Hirota M. Activity of pancreatic secretory trypsin inhibito in essential against pancreatoxic factors. Pour PM, ed. In: *Toxicology of the Pancreas*, CRC Taylor & Francis, London 2005; 205–213.
- 3) 広田昌彦, 大村谷昌樹, 前田圭介, 橋本大輔, 陶山浩一, 市原敦史, 藤村美憲, 新田英利, 入来豊久, 柴田宗征, 杉田裕樹, 高森啓史, 金光敬一郎, 馬場秀夫, 水島 昇, 荒木正健, 荒木喜美, 山村研一. 膵内トリプシノーゲンの活性化とその制御機構の破綻. *細胞* 2005; 37 : 300–314.

2. 学会発表

- 1) Hirota M. Genetic background of Chronic Pancreatitis. Asian Pacific Digestive Week 2005 (Symposium 1: Recent hot issues of chronic pancreatitis), Soeul, Korea September 25–28, 2005.

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

ラット急性膵炎モデルにおける Macrophage Inhibitory Factor の 動態とその制御

研究報告者 片岡慶正 京都府立医科大学大学院消化器病態制御学 助教授

共同研究者

阪上順一，高田龍介，元好朋子，伊藤令子，泰井敦子，土佐正俊，馬場武彦，保田宏明，
岡上 武（京都府立医科大学大学院消化器病態制御学）

【研究要旨】

急性膵炎の進展における macrophage inhibitory factor (MIF) の関与を検討する目的で、ラット CDL 膵炎モデルでの膵と肺における MIF および各種炎症性サイトカイン発現とその動態を解析した。膵炎誘導後の膵、肺組織内では MIF の早期発現に引き続いて IL-8, IL-6, IL-1 β の発現が認められ、血清 MIF は血清アミラーゼの上昇に先行していた。さらに CDL 膵炎での肺、膵における MIF 発現とその制御に及ぼす methyl-prednisolone (m-PSL, 30 mg/kg) -pulse 単回投与の影響を検討した。膵炎誘導後増加した膵湿重量、腹水量、血清アミラーゼは m-PSL によりそれぞれ有意に抑制された。膵組織では浮腫、炎症細胞浸潤、壊死の程度は m-PSL で軽減し、肺胞炎症細胞数も有意に減少した。組織内 MIF mRNA 発現は膵炎誘導後の膵、肺においてそれぞれ 1 時間後、2 時間後にピークを認めたが、m-PSL-pulse により両組織での発現が有意に抑制された。CDL 膵炎直後から上昇し、6 時間持続して高値を示した血清 MIF は m-PSL において有意にその上昇が抑制された。以上の結果から、ラット CDL 膵炎の進展における MIF の炎症性イニシエーターとしての役割ならびに膵炎関連性肺障害の進展における MIF の関与が示唆され、また m-PSL-pulse 早期投与は MIF 発現を抑制することにより膵炎の炎症進展を阻止できる可能性が示唆された。

A. 研究目的

近年、macrophage inhibitory factor (MIF) の生理的役割として細菌感染の有無にかかわらず急性炎症に際して、ごく早期にサイトカインネットワークを起動させ他のサイトカインの発現を促すイニシエーターの役割を担っていることが明らかになってきた。最近、急性膵炎においても炎症の進展に MIF が関与していることが報告された¹⁾。SIRS としての重症急性膵炎の病態は“cytokine storm”であるといわれているが、そのトリガーおよび制御機構については明らかではなく、急性膵炎発症後の MIF の動態については不明な点も多かった。今回、われわれはラット急性膵炎モデルにおける MIF の動態を血中、膵および肺組織中で検討するとともに、methyl-prednisolone (m-PSL) -pulse 投与による MIF の制御と肺を含めた膵炎の進展に及ぼす影響について検討した。

B. 研究方法

実験には 8 週齢 Wistar 系雄性ラット (体重約 260 g) を用いた。約 16 時間の絶食の後、エーテル麻酔下に開腹し十二指腸を胆膵管十二指腸開口部上下 2 cm で結紮し closed duodenal loop (CDL) 膵炎を作成した。CDL 膵炎ラットを 2 群に分け、m-PSL 単回投与群と生食投与の対照群に分け、CDL 作成後 0, 1, 2, 4, 6 時間後に腹水、血清、膵と肺組織をサンプリングした。m-PSL はソルメドロール[®]を使用し、30 mg/kg を生理的食塩水に溶解し CDL 作成 5 分前に尾静脈より投与した。血清では Blue starch 法によるアミラーゼ活性と ELISA 法による MIF 定量を行った。MIF mRNA 発現は total mRNA を抽出し、RT-PCR 法にて解析した。組織学的に HE 染色と MIF 免疫染色を行った。膵組織に関しては浮腫、炎症、壊死の程度を Grise の方法²⁾により評価した。肺組織での炎症細胞浸潤の程度は HE 染色標本で肺胞単位での炎症細胞を肺胞 50 個に対して

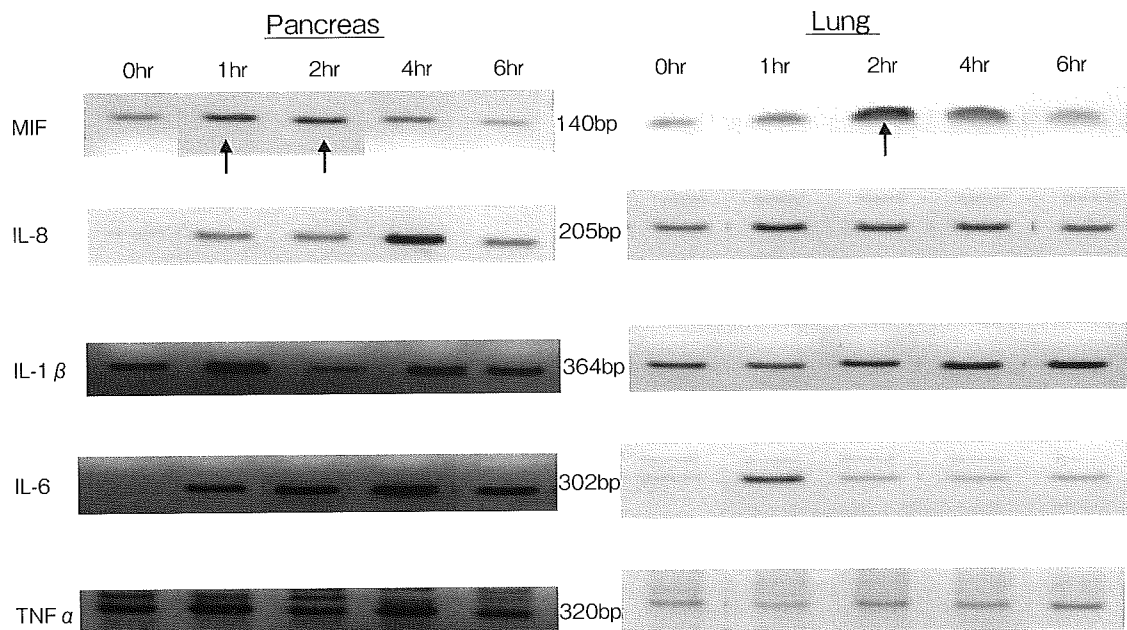


図1 CDL膵炎での膵および肺組織におけるMIFと各種サイトカインmRNA発現のRT-PCRの経時的変動

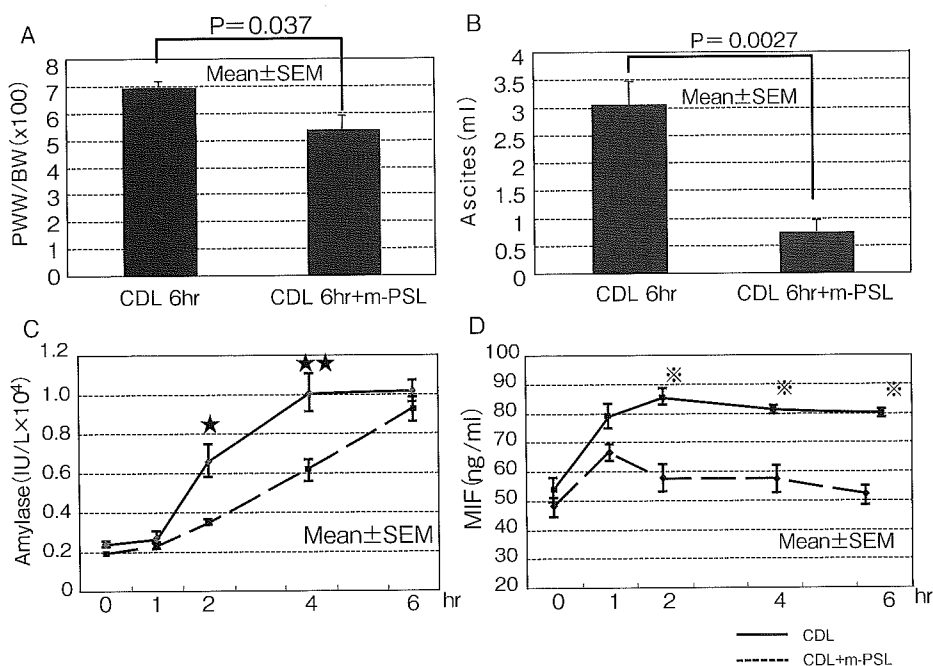


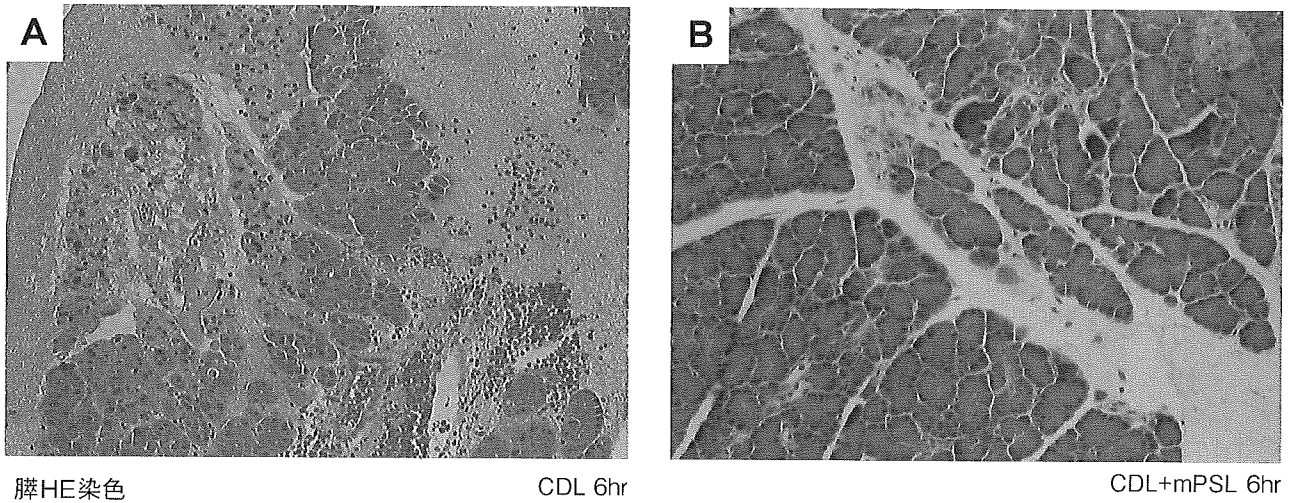
図2 ラットCDL膵炎における膵湿重量、腹水量、血清アミラーゼ値、血清MIF値
 A: 膵湿重量, B: 腹水量, C: 血清アミラーゼ値, D: 血清MIF値
 A, B: Unpaired t test, n = 6, each time period
 C, D: Turkey-Kramer multiple comparison test
 ★※P < 0.05, ★★P < 0.001

カウントした。
 (倫理面への配慮)

動物実験は京都府立医科大学動物実験指針に基づき同大学動物実験委員会の承認を得て行った。

C. 研究結果

1. CDL膵炎における膵および肺組織でのMIFと各種mRNA発現のRT-PCRの経時的変化
 CDL作成後6時間のMIF mRNAとIL-6, IL-8, IL-1β, TNF-α mRNA発現を膵および肺組織において経時的に検討した(図1)。MIF mRNAは膵において1時間後から、肺において2時間後から有意な発現が認められた。膵ではMIFに遅れて



	edema	inflammation	necrosis
CDL 6hr	2.38±0.17	2.13±0.21	1.13±0.21
CDL+mPSL 6hr	1.0±0.25	1.12±0.11	0.38±0.17
CDL vs CDL+mPSL	P<0.001	P<0.001	P<0.05

図3 ラットCDL膵炎6時間後の膵組織所見とm-PSL-pulseの影響 (Mean ± SEM, n = 6, each time period, Unpaired t test)

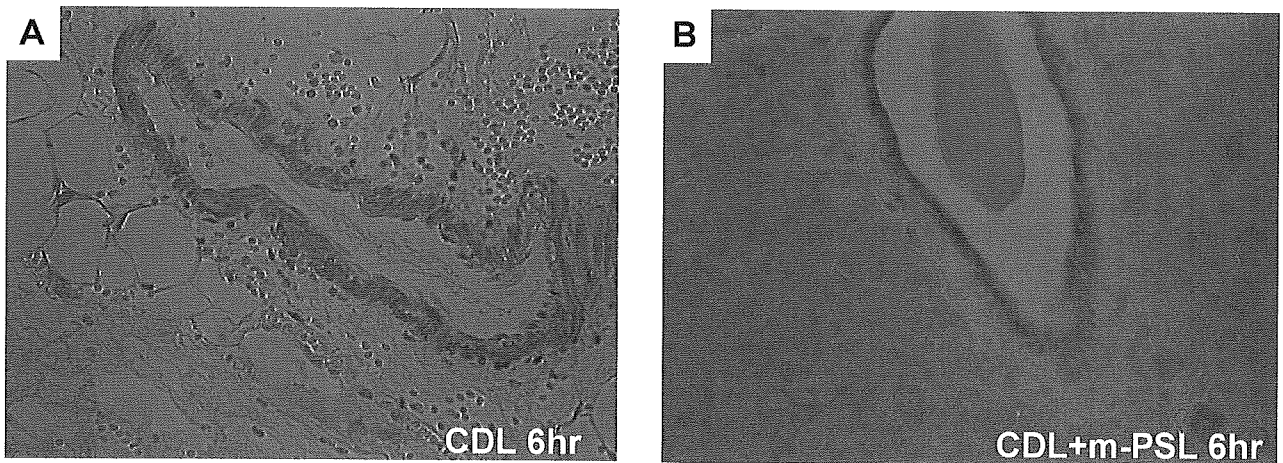


図4 膵組織におけるMIFの発現とm-PSL pulseの影響

IL-8, IL-6 mRNA発現が認められた。肺では1時間後にIL-6, IL-8 mRNA発現が、6時間後にIL-1 β mRNA発現が認められた。

2. 膵湿重量、腹水量、血清アミラーゼ活性と血清MIFの変化

CDL膵炎6時間後増加した湿重量および腹水量はm-PSL単回投与群で有意に抑制された(図2A, B)。膵炎誘導後2時間後より急激な上昇を認

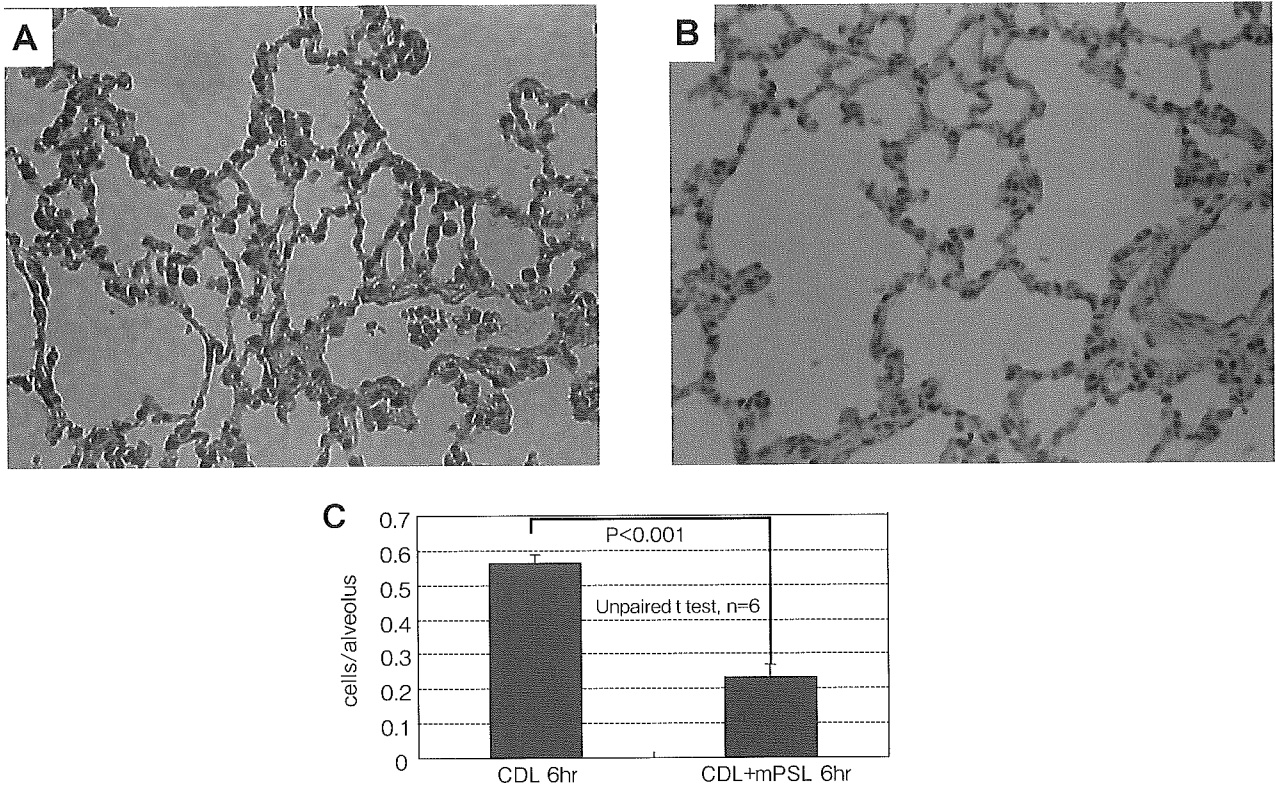


図5 ラットCDL肺炎における肺炎誘導後6時間後の肺組織HE染色像と肺胞内炎症細胞数の検討 (A: CDL肺炎, B: CDL肺炎+ m-PSL-pulse, C: 肺胞内炎症細胞数の比較)

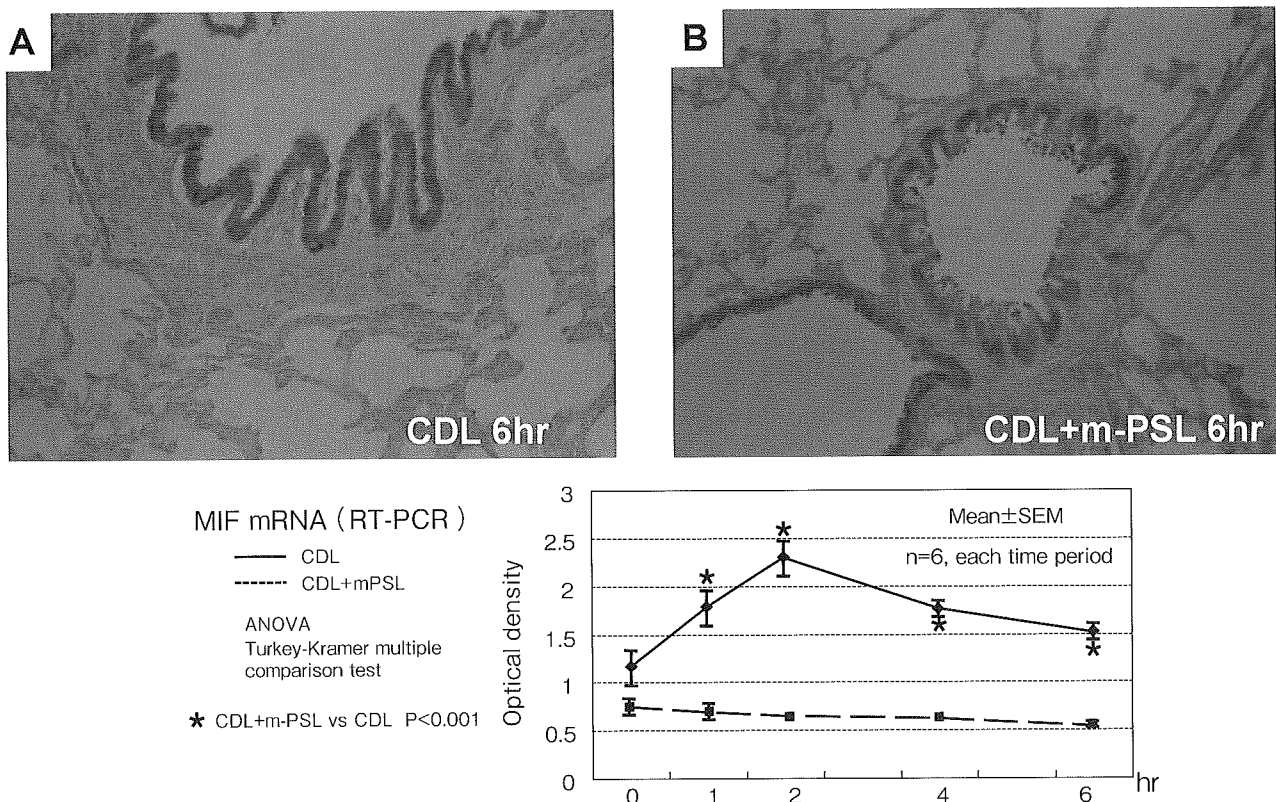


図6 肺組織におけるMIFの発現とm-PSL pulseの影響

めた血清アミラーゼ活性ならびに1時間後から有意な高値を持続した血清MIFはm-PSL単回投与群で有意に抑制された(図2C, D)。

3. 膈および肺における組織学的検討とm-PSL-pulseの影響

H.E.標本での膈組織学的評価の結果、肺炎誘導後6時間後を比較するとCDL対照療群に比較

してm-PSL群では有意に浮腫，炎症，壊死に関しては改善を認めた(図3)．膵組織におけるMIF免疫染色での検討ではCDL膵炎6時間後では膵管上皮におけるMIF発現が増強していたが，このMIF発現はm-PSL投与後には減弱していた(図4上段)．膵炎誘導後1時間後から認められた膵組織内のMIF mRNA発現は6時間の経過を通してm-PSL-pulseにより抑制されていた(図4下段)．

肺組織のHE染色標本では膵炎誘導後経時的に肺胞内炎症細胞数が増加する所見が認められたが，6時間後で比較するとm-PSL-pulseでは有意にその炎症細胞数が抑制されていた(図5)．肺組織におけるMIF免疫染色CDL膵炎6時間後では気管支上皮におけるMIF発現が増強していたが，このMIF発現はm-PSL投与後には減弱していた(図6上段)．一方，膵炎誘導2時間後をピークとする肺組織内のMIF mRNA発現の増大は，m-PSL-pulseによりCDL6時間の経過を通して完全に抑制されていた(図6下段)．

D. 考察

今回，われわれはラットCDL膵炎モデルにおけるMIFの動態とm-PSLによる制御を血中および肺・膵組織において検討した．CDL膵炎誘導により膵湿重量と腹水量の増加，血清アマラーゼ，膵および肺組織像において急性膵炎ならびに肺胞内炎症細胞数の増加を伴う膵炎関連性肺障害を認める状況下で血清MIFや膵・肺組織におけるMIF発現の増強が認められた．膵組織内MIF mRNA発現と血清中MIF上昇はCDL膵炎誘導後1時間という早期から発現しており，膵および肺組織での各種サイトカイン発現に先行し，血中MIFは血中アマラーゼ上昇よりも先駆けていた．

われわれは以前に同じくラットCDL膵炎モデルにおいてm-PSL-pulse投与が，各種炎症性サイトカインを抑制し，膵の炎症性変化を改善させることを報告した³⁾．重症急性膵炎がSIRSという全身性の炎症反応性病態からMOFに至る機序に“cytokine storm”が大きく関与することから，各々の臓器におけるMIF発現の増強は急性膵炎の進展や肺障害の発生におけるMIFのイニ

シエーター的役割を示唆している．一方では，glucocorticoidの各種サイトカイン制御と抗炎症作用が注目されてきた．今までに各種実験急性膵炎モデルにてglucocorticoid投与の効果が試みられてきたが，一致した見解はえられていない⁴⁻⁸⁾のが現状である．今回，炎症性サイトカインのより上位にあるMIFの動態を検討するとともに，その制御がm-PSL-pulseにより可能であり，同時にm-PSL-pulseが急性膵炎の病態を改善し，膵炎関連性肺組織障害も改善させる可能性を示した．各種疾患に対して臨床応用されているm-PSLすなわちソルメドロール・パルス療法は急性膵炎発症早期に限って応用すれば，重症化を阻止できる可能性が示唆された．しかし，MIFの産生・分泌の調整因子として，内因性glucocorticoidの関与が報告^{9,10)}されており，glucocorticoidの示す抗炎症作用に対するカウンターレギュレーターとしての作用も報告¹¹⁾されている．glucocorticoidとMIFの相関はいまだ不明な点が多く，今後さらに詳細な検討が必要と考えられた．

E. 結論

急性膵炎の進展におけるMIFの関与を検討する目的で，ラットCDL膵炎モデルでの膵と肺組織におけるMIF発現とその病態を検討した．急性膵炎の進展におけるMIFの炎症性イニシエーターとしての役割ならびに膵炎関連性肺障害の進展におけるMIFの関与が示唆され，またm-PSL-pulse早期投与はMIF発現を抑制することにより膵炎の炎症進展を阻止できる可能性が示唆された．

F. 参考文献

1. Sakai Y, Masamune A, Satoh A, Nishihira J, Yamagiwa T, Shimosegawa T. Macrophage migration inhibitory factor is a critical mediator of severe acute pancreatitis. *Gastroenterology* 2003; 124 : 725-736.
2. Grise K, Kim F, McFadden D. Hyperthermia induces heat-shock protein expression, reduces pancreatic injury, and improves survival in necrotizing pancreatitis. *Pancreas* 2000; 21 : 120-125.

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 : 537–542.
 4. Lium B, Ruud TE, Pillgram-Larsen J, Stadaas JO, Aasen AO. Sodium taurocholate-induced acute pancreatitis in pigs. Pathomorphological studies of the pancreas in untreated animals and animals pretreated with high doses of corticosteroids or protease inhibitors. *Acta Pathol Microbiol Immunol Scand [A]* 1987; 95 : 377–382.
 5. Barzilai A, Ryback BJ, Medina JA, Toth L, Deriling DA. The morphological changes of the pancreas in hypovolemic shock and the effect of pretreatment with steroids. *Int J Pancreatol* 1987; 2 : 23–32.
 6. Rakonczay Z Jr, Duda E, Kasazaki J, Ivanyi B, Boros I, Lonovics J, Takacs T. The anti-inflammatory effect of methylprednisolone occurs down-stream of nuclear factor-kappaB DNA binding in acute pancreatitis. *Eur J Pharmacol* 2003; 19 : 217–227.
 7. Cosen-Binker LI, Binker MG, Negri G, Tiscornia O. Experimental model of acute pancreatitis in Wistar rat: glucocorticoid treatment profile. *Dig Dis Sci* 2003; 48 : 1453–1464.
 8. Paszt A, Takacs T, Rakonczay Z Jr, Kaszaki J, Wolfard A, Tiszlavicz L, Lazar G, Duda E, Szentpali K, Czako L, Boros M, Balogh A, Lazar G Jr. The role of the glucocorticoid-dependent mechanism in the progression of sodium taurocholate-induced acute pancreatitis in the rat. *Pancreas* 2004; 29 : 75–82.
 9. Calandra T, Bernhagen J, Metz CN, Spiegel LA, Bacher M, Donnelly T, Cerami A, Bucala R. MIF as a glucocorticoid-induced modulator of cytokine production. *Nature* 1995 ; 377 : 68–71.
 10. Leech M, Santos LL, Metz C, Holdsworth SR, Bucala R, Morand EF. Regulation of macrophage migration inhibitory factor by endogenous glucocorticoids in rat adjuvant-induced arthritis. *Arthritis Rheum* 2000; 43 : 827–833.
 11. Santos L, Hall P, Metz C, Bucala R, Morand EF. Role of macrophage migration inhibitory factor (MIF) in murine antigen-induced arthritis: interaction with glucocorticoids. *Clin Exp Immunol* 2001 ; 123 : 309–314.
- 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

実験膵炎におけるポリヒドロキシ酪酸投与の影響について

研究報告者 竹山宜典 近畿大学医学部外科 助教授

共同研究者

山崎満夫，里井俊平，川辺高史，土師誠二（近畿大学医学部外科）

片岡慶正（京都府立医科大学大学院消化器病態制御学），栗山昌樹（有限会社アーザス）

【研究要旨】

短鎖脂肪酸である酪酸の，急性膵炎における腸管変化やbacterial translocationに対する効果を検証する目的で，ポリヒドロキシ酪酸を前投与して，腸管内環境を変化させた後にラット実験重症急性膵炎を作成し，bacterial translocationとendotoxin translocationを解析した．ポリヒドロキシ酪酸の前投与により急性膵炎に伴う腸管からの細菌とエンドトキシンの腸管外移行が抑制された．しかし，その機序は不明であり，腸管粘膜の萎縮抑制とともに，腸管および全身の免疫能への影響の可能性も考えられる結果であった．

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¹⁻³⁾．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，bacterial translocation (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．重症急性膵炎における腸管対策としては，一般的経腸栄養の有効性は証明されているが⁴⁻⁷⁾，わが国ではその普及率は低く，重症急性膵炎の病態に即した腸管対策の確立が望まれる．

酪酸は，短鎖脂肪酸の一種で，難消化性糖質（ペクチンなど）が消化・分解されて少量の酪酸が生成される．大腸で吸収されエネルギー源となるとともに，大腸粘膜の増殖促進，慢性炎症の抑制や病原性細菌の増殖抑制などの作用が報告されている．そこで，今回はこの酪酸の腸管内投与の効果を解析する目的で，消化酵素で分解されず，腸内細菌で分解されヒドロキシ酪酸となり大腸に到達するとされるポリヒドロキシ酪酸

(PHB)の前投与がラット重症急性膵炎モデルに与える影響を検討した．

B. 研究方法

実験動物としては，Wistar系雄性ラット（100～120 g，5週齢）を用い，PHB5wt%含有飼料を14日間摂食させた後に膵炎を作成した．対照群としては，セルロース5wt%含有飼料を同様に摂食させ，14日後に膵炎を作成した．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うえで，3%デオキシコールを0.1 ml/低压注入した．また，それぞれの群に対して，単開腹のみの群を作成した．BTの評価は，膵炎作成12時間後に，ラットを犠牲死させ腸間膜リンパ節，膵細菌培養を行った．また，膵炎作成18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，回腸末端部の粘膜高を，組織標本作製して測定した．

（倫理面への配慮）

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きことの承認を得て，行った．

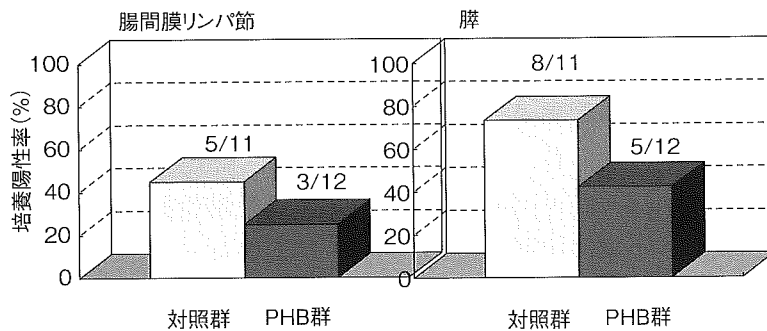


図1 Bacterial Translocation (脾炎作成12時間後)

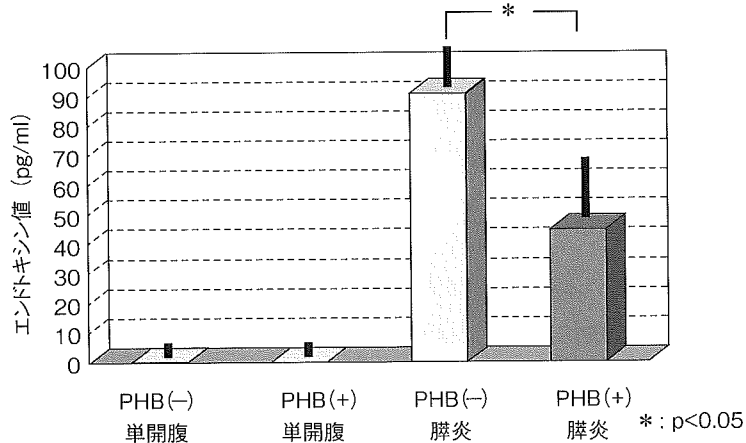


図2 血清エンドトキシン濃度 (脾炎作成18時間後)

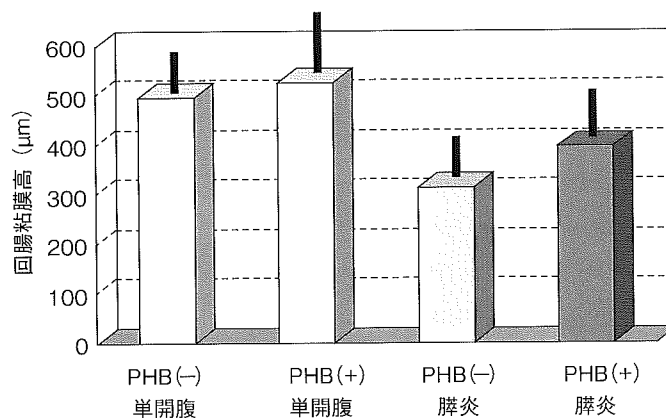


図3 回腸粘膜高 (脾炎作成18時間後)

C. 研究結果

対照群, PHB投与群ともに, 摂食量と体重増加率に差はなく, 脾炎作成後の血清腭酵素値にも差がなかった. 脾炎作成12時間後の腸間膜リンパ節, 脾の細菌培養の結果を, それぞれ図1に示す. PHB投与群では, 対照群に比較してBT頻度が低下する傾向が得られたが, 有意差はなかった. 一方, 脾炎作成18時間後の血清エンドトキシン測定の結果は対照群 $92.1 \pm 13.0 \text{ pg/ml}$, PHB投与群 $45.8 \pm 18.3 \text{ pg/ml}$ で有意差を認めた(図2). 脾炎作成18時間後の回腸末端における粘膜高は, 脾炎作成により有意に低下するが,

PHB投与により有意な改善を認めなかった(図3).

D. 考察

今回の解析結果では, 実験脾炎作成前のPHB腸管内投与が, ある程度BT阻止し, エンドトキシンの腸管外移行を阻止しうる結果が得られた. すでに明らかにされている酪酸の腸管に対する効果として, 大腸粘膜の増殖促進, 慢性炎症の抑制や病原性細菌の増殖抑制などの作用が報告されており, 今回の結果も, 腸管粘膜の萎縮の防止, 腸管免疫の賦活や腸内細菌叢への影響が

考えられる。しかし、今回の解析では少なくとも腸管粘膜の萎縮防止効果は顕著ではなかった。腸管粘膜の萎縮抑制とともに、腸管および全身の免疫能への影響の可能性も考えられ、今後の解析が必要である。また、今回の解析はあくまでも、前投与であり、膵炎作成後に投与して治療効果を解析するには、さらに投与方法などの工夫が必要であると考えられた。

E. 結論

PHBの腸管内への前投与は腸管免疫能等を賦活して、重症急性膵炎におけるBTを抑止する可能性がある。

F. 参考文献

1. Runkel NS, Moody FG, Smith GS, Rodroquez 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, Djuricin G, Prinz RA. Plasmid labeling confirms bacterial translocation in pancreatitis. *Am J Surg* 1994; 167 : 201–206.
4. Kudsk KA, Campbell SM, O'Brien T, Fuller R. Postoperative jejunal feedings following complicated pancreatitis. *Nutr Clin Pract* 1990; 5 : 14–17.
5. 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.
6. Windsor AC, Kanwar S, Barnes E, Guthrie JA, Spark JI, Welsh F, Guillou PJ, Reynolds JV. Compared with parenteral nutrition, enteral feeding attenuates the acute phase response and improves disease severity in acute pancreatitis. *Gut* 1998; 42 : 431–435.
7. Olah A, Pardavi G, Belagyi T, Nagy A, Issekutz A,

Mohamed GE. Early nasojejunal feeding in acute pancreatitis is associated with a lower complication rate. *Nutrition* 2002; 18 : 259–262.

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