

分の¹³C累積回収率(%)において、それぞれ健常者の値のMean-SDをcut-off値とした場合に感度・特異度は高値を示した。両者を比較すると、¹³CO₂=存在比(‰)のピーク値で判断した方が、感度・特異度とも優れた試験となった。

90分で呼気試験を終了した場合、膵外分泌機能不全例14例中7例(50%)は、90分後に¹³CO₂存在比が最大値となるため、ピーク値が特定できなかった。一方、それ以外の56例は、全例が80分以内にピークに到達し、ピーク値の特定が可能だった。負荷後90分で試験を終了する場合、ピーク値を特定できないときは¹³CO₂存在比の最大値を代用する事により、負荷後240分までの試験と同様の感度・特異度となった。このため、試験時間を負荷後90分までに短縮することが可能だと考えられる。

また慢性膵炎代償期、高齢者、糖尿病、呼吸不全の各群において、健常者と比較してピーク値、およびピークまでの時間に有意差を認めなかった。これらの因子による呼気試験への影響は少ないと考えられた。

E. 結論

Benzoyl-L-tyrosyl-[1-¹³C]alanineを用いた呼気試験による膵外分泌機能検査法は、PFD試験のように蓄尿を必要としないため、腎不全例でも測定可能である。またこれまでの蓄便によるバランススタディや¹³C標識混合中性脂肪を用いた呼気試験⁹⁾と比較し90分という短い検査時間で診断が可能であり、感度も高いため膵外分泌機能不全の診断において、簡便かつ有用な検査法と考えられる。現在のところ腎不全、呼吸不全などの本試験に与える影響は少ないと考えられるが、胃全摘、肝硬変の例では¹³CO₂存在比が低値となる傾向にあり、今後検討を要する。

F. 参考文献

1. Imamura K, Nakamura T, Miyazawa T, Abe Y, Kobayashi M, Takebe K, Toyota T. Oral administration of chymotrypsin labile peptide for a new test of exocrine pancreatic function (PET) in comparison and pancreozymin-secretin test. *Am J Gastroenterol* 1978; 69 : 572-578.

2. 中村光男, 丹藤雄介, 梶 麻子, 田中 光, 松橋有紀, 柳町 幸. ¹³C-化合物を用いた吸収試験. *臨床消化器内科* 2002; 17 : 1787-1794.
3. 中村光男. 臨床医のための膵性脂肪便の知識. 医学図書出版, 東京 1998.
4. 石井敬基, 河野 匡, 伊藤あすか, 高山忠利, 山本 寛, 藤本康雄, 浅井 聡. ¹³C-ジペプチド(Benzoyl-L-Tyrosyl-[1-¹³C]Alanine)呼気テストによる簡易膵外分泌機能検査法. *消化器科* 2004; 39 : 174-177.
5. 松林恒夫, 丸山 渉. ¹³C-呼気試験の実際—基礎と実践的応用—, ¹³C医学応用研究会, 東京 2002; 102-111.
6. 梶 麻子, 中村光男, 渡辺 拓, 山田尚子, 須田俊宏, 丸山 渉, 松林恒夫, 天野 高, 佐々木康人. ¹³C標識脂肪の種類による呼気消化吸収試験診断能の比較. ¹³C医学 1999; 9 : 24-25.

G. 健康危険情報

今回用いたbenzoyl-L-tyrosyl-[1-¹³C]alanineは安定同位体¹³Cを含むdipeptideであり、放射性はなく、安全な基質であると考えられる。現在までのところ、被験者より副作用の報告はない。問題事象が生じないように、担当医師の十分な説明と観察のもと、検査を施行している。万が一身体的問題など医療費が生じた場合は、保険診療内で因果関係を調査し、対処する。

H. 研究発表

1. 論文発表 該当なし
2. 学会発表
 - 1) 松本敦史, 田中 光, 志津野江里, 松橋有紀, 柳町 幸, 長谷川範幸, 丹藤雄介, 小川吉司, 中村光男, 野木正之. ¹³C-ジペプチドを用いた膵性消化吸収不良診断の新たな検査法(1)基礎的研究. 第36回日本膵臓学会大会, 東京 2005年7月28-29日
 - 2) 松本敦史, 田中 光, 管 静芝, 志津野江里, 松橋有紀, 柳町 幸, 長谷川範幸, 丹藤雄介, 小川吉司, 中村光男, 野木正之. ¹³C-ジペプチドを用いた膵性消化吸収不良診断の新たな検査法. 第36回日本消化吸収学会総会, 神戸 2005年10月5-8日

- 3) 松本敦史, 鳴海一訓, 野木正之, 志津野江里, 田中 光, 松橋有紀, 柳町 幸, 長谷川範幸, 丹藤雄介, 松井 淳, 小川吉司, 須田俊宏, 中村光男. ^{13}C -ジペプチドを用いた膵外分泌機能不全の新しい検査法. 平成 17 年度 ^{13}C 医学応用, 呼気病態生化学研究会・合同研究会, 東京 2005 年 11 月 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

慢性膵炎における合併血管（静脈）病変の病理組織学的検討

研究報告者 須田耕一 順天堂大学大学院人体病理病態学 教授

共同研究者

高瀬 優，福村由紀，柏木聡子，比佐岳史，園上浩司，細川義則，阿部 寛，柿沼千早
(順天堂大学大学院人体病理病態学)

【研究要旨】

慢性膵炎，特に慢性アルコール性膵炎(CAP) 21例と自己免疫性膵炎(AIP) 5例における合併血管(静脈)病変を病理組織学的に対比した。CAPの内訳は，膵頭十二指腸切除術 4例，膵体尾部切除術 17例で，AIPは，膵頭十二指腸切除術 2例，膵体尾部切除術 3例である。血管平滑筋の少ない，もしくはほとんどない静脈を小静脈とし，これに対し血管平滑筋の発達した静脈を太い静脈(主に脾静脈)とした。CAPでは，小静脈には著変を認めなかった。脾静脈へは17例中10例で線維化が波及していた。そのうち，血栓形成を9例に，静脈硬化(内膜の線維性肥厚)を1例に認めた。血栓のある9例中4例で内腔の閉塞を認め，その3例では臨床的に局所性門脈圧亢進症を呈していた。AIPでは小静脈に閉塞性静脈炎を認めた。太い静脈と脾静脈では壁内への細胞浸潤と静脈硬化を認め，特に脾静脈では細胞浸潤は3例とも偏周性であり，そのうち，2例は壁全層性，1例はごくわずかの浸潤であった。以上より慢性アルコール性膵炎では，小静脈には著変はないが，太い静脈には静脈硬化(内膜の線維性肥厚)・血栓の形成を認める。自己免疫性膵炎では，小静脈には閉塞性静脈炎を認め，太い静脈には静脈硬化を認めるが，血栓の形成はない。

A. 研究目的

慢性アルコール性膵炎(chronic alcoholic pancreatitis; CAP)では脾静脈に血栓を形成し，閉塞をきたす結果，臨床的に胃静脈瘤・脾腫といった局所性門脈圧亢進症を呈することがある¹⁾。自己免疫性膵炎(autoimmune pancreatitis; AIP)では比較的細い膵内血管の閉塞性静脈炎が特徴とされる^{2,3)}。このように膵炎における合併血管病変は個々に検討されているが，両者の詳細な比較は行われていない。

今回，慢性膵炎，特に慢性アルコール性膵炎と自己免疫性膵炎における合併血管(静脈)病変を病理組織学的に対比した。

B. 研究方法

対象は順天堂医院および関連施設で得られた，CAP切除例21例およびAIP切除例5例である。CAPの術式は，膵頭十二指腸切除術 4例，膵体尾部切除術 17例，AIPの術式は，膵頭十二指腸切除術 2例，膵体尾部切除術 3例である。CAPでは，その多くは20年以上にわたり100%エタノー

ルに換算して1日100g以上のアルコールを摂取している。AIPはいずれも切除後の病理学的検討によって診断された。

切除検体はいずれもホルマリン固定後にパラフィン包埋し，4 μ mの薄切片を作成し，HE染色・EVG染色を行った。血管平滑筋の少ない，もしくはほとんどない静脈を小静脈とし，これに対し血管平滑筋の発達した静脈を太い静脈(主に脾静脈)とした。

(倫理面への配慮)

通常の色調で検討していること，および遺伝子・蛋白の検討は行っていないことから，倫理上の問題はないと思われる。

C. 研究結果

CAPでは，一般に小葉間に線維化を認め，炎症性細胞浸潤は非常に軽度であった。病変内の小静脈には著変を認めなかった(表1, 2, 図1)。脾静脈へは線維化が17例中10例で波及していた。そのうち，血栓形成を9例に，静脈硬化(内膜の線維性肥厚)を1例に認めた(図2)。血栓の

表1 慢性膵炎切除例*の組織学的所見(膵頭十二指腸切除術例)

症例	年齢	性	臨床診断	蛋白栓 / 膵石	太い静脈		小静脈
					静脈硬化	血栓	
1	29	女	慢性膵炎・膵癌疑い	+ / +	(+)	(-)	著変なし
2	51	男	膵癌	+ / +	(+)	(-)	著変なし
3	47	男	膵癌・嚢胞腺腫	+ / +	(+)	(-)	著変なし
4**	42	男	腫瘤形成性慢性膵炎	+ / -	(+)	(-)	著変なし

※；腫瘤形成性膵炎に相当， ※※；十二指腸狭窄を呈し， 広義の groove pancreatitis に相当

表2 慢性膵炎切除例の組織学的所見(膵体尾部切除術例)

症例	年齢	性	臨床診断	蛋白栓 / 膵石	脾静脈	小静脈
1	45	男	慢性膵炎・LPH	+ / +	血栓形成(閉塞)	著変なし
2	43	男	慢性膵炎	+ / +	著変なし	著変なし
3	59	男	慢性膵炎・膵嚢胞・LPH	- / -	血栓形成(閉塞)	著変なし
4*	49	男	膵癌	- / -	著変なし	著変なし
5	46	男	膵嚢胞	+ / -	静脈硬化	著変なし
6	51	男	慢性膵炎・膵癌疑い	- / -	著変なし	著変なし
7*	28	男	膵腫瘍・LPH	+ / +	血栓形成(閉塞)	著変なし
8	43	男	慢性膵炎	+ / -	著変なし	著変なし
9	46	男	急性膵炎・膵嚢胞	+ / +	血栓形成(再疎通)	著変なし
10	48	男	慢性膵炎	+ / +	著変なし	著変なし
11*	43	男	膵腫瘍	+ / -	血栓形成	著変なし
12	52	男	慢性膵炎	+ / +	器質化血栓(再疎通)	著変なし
13	64	男	慢性膵炎	+ / -	器質化血栓(再疎通)	著変なし
14	42	男	慢性膵炎	+ / +	器質化血栓(再疎通)	著変なし
15	42	男	慢性膵炎	+ / +	著変なし	著変なし
16*	72	男	膵癌疑い	+ / +	著変なし	著変なし
17*	65	男	膵癌疑い	+ / -	血栓形成(閉塞)	著変なし

※；腫瘤形成性膵炎に相当， LPH； localized portal hypertension

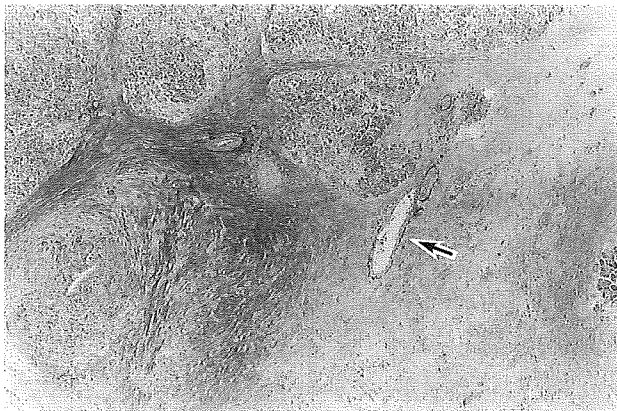


図1 慢性アルコール性膵炎の小静脈(表1の症例4)
小葉間線維化内の小静脈には著変を認めない(矢印).
(E.V.G.染色, ×60)



図2 慢性アルコール性膵炎の脾静脈(表2の症例12)
脾静脈に再疎通を伴う器質化血栓を認める(矢印). (H.E.染色, ×30)

ある9例中4例で内腔の閉塞を認め、その3例では臨床的に局所性門脈圧亢進症を呈していた。

AIPでは著明なリンパ球・形質細胞浸潤と線維化を認め、これらが小静脈に波及して閉塞性静脈炎を惹起していた(表3, 図3)。脾静脈では壁内への細胞浸潤と静脈硬化(内膜の線維性肥厚)を認めた。細胞浸潤は3例とも偏周性であり、そ

のうち、2例は壁全層性、1例はごくわずかの浸潤であった(図4)。

D. 考察

局所性門脈圧亢進症を呈した慢性膵炎切除例における脾静脈の血栓形成機序として、われわれはすでに以下のように考察している¹⁾。すなわ

表3 自己免疫性脾炎切除例における血管の組織像

症例	年齢	性	術式	脾静脈*			小静脈
				細胞浸潤	静脈硬化	血栓	
1	男	62	DP	リンパ球・形質細胞	(+)	(-)	閉塞性静脈炎
2	男	67	DP	リンパ球・形質細胞	(+)	(-)	閉塞性静脈炎
3	男	59	DP	リンパ球・形質細胞	(+)	(-)	閉塞性静脈炎
4	男	68	PD	リンパ球・形質細胞	(+)	(-)	閉塞性静脈炎
5	男	68	PD	リンパ球・形質細胞	(+)	(-)	閉塞性静脈炎

DP；脾体尾部切除術，PD；脾頭十二指腸切除術，※；太い静脈を検討



図3 自己免疫性脾炎の小静脈(表3の症例1)
小静脈は閉塞性静脈炎を呈している。(E.V.G.染色，×40)

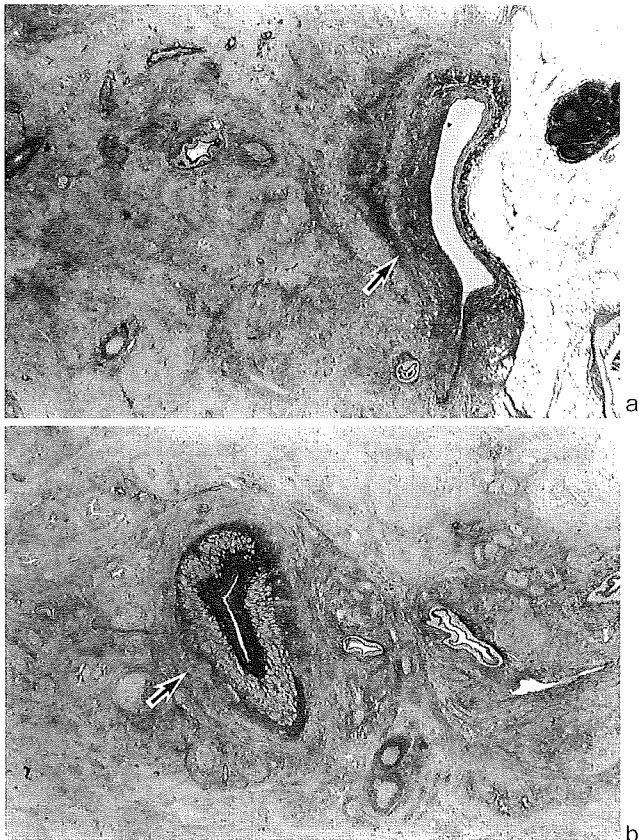


図4 自己免疫性脾炎の脾静脈

a：(表3の症例1)

波及した病変により偏周性・全層性の細胞浸潤と静脈硬化を認める。血栓の形成はない(矢印)。(E.V.G.染色，×30)

b：(表3の症例3)

病変に取り囲まれ静脈硬化を認めるが，細胞浸潤はほとんどなく，血栓の形成もない(矢印)。(E.V.G.染色，×30)

表4 慢性アルコール性脾炎と自己免疫性脾炎における静脈の組織学的所見(まとめ)

	慢性	自己免疫性脾炎
	アルコール性脾炎	
小静脈	著変なし	リンパ球・形質細胞主体 (閉塞性静脈炎) 線維化は少ない
太い静脈		
壁内の細胞浸潤	ほとんどない	あり (リンパ球・形質細胞)
静脈硬化(内膜 の線維性肥厚)	あり	あり
血栓	あり (器質化・再疎通)	なし

ち，慢性炎症/線維化が脾静脈壁に波及すると内膜の線維性肥厚(すなわち静脈硬化)が生じる。そのために局所の血流異常・うっ滞が生じ，血栓形成にいたる。

アルコール性の慢性脾炎・線維化では一般に細胞浸潤に乏しく，かつ慢性脾炎像である小葉間線維化は，小葉内線維化と異なり脾周囲組織にも進展する。そのため線維化が脾静脈に波及する⁴⁾。小静脈においても炎症/線維化の波及自体は脾静脈の場合と同様であるが，通常の検索方法では著変を認めなかった。

AIPにおいては，脾静脈に病変の波及がありCAPと同様に静脈硬化(内膜の線維性肥厚)がみられるも，血栓形成は認められなかった。これは単に症例数が少ないためか，あるいは明確ではないが血管壁に及ぼす炎症/線維化の性状の違いによると想定された。また小静脈における閉塞性静脈炎は，多くの報告と同様に，炎症性細胞浸潤と線維化が血管に波及した状態である^{2,3)}。

E. 結論

慢性アルコール性膵炎では、小静脈には著変はないが、太い静脈には静脈硬化(内膜の線維性肥厚)・血栓の形成を認める。自己免疫性膵炎では、小静脈には閉塞性静脈炎を認め、太い静脈には静脈硬化を認めるが、血栓の形成はない。

F. 参考文献

1. Takase M, Suda K, Suzuki F, Nakamura T, Futagawa S. A histologic study of localized portal hypertension as a consequence of chronic pancreatitis. *Arch Pathol Lab Med* 1997; 121 : 612–614.
2. Suda K, Takase M, Fukumura Y, Ogura K, Ueda A, Matsuda T, Suzuki F. Histopathologic characteristics of autoimmune pancreatitis based on comparison with chronic pancreatitis. *Pancreas* 2005; 30 : 355–358.
3. Kamisawa T, Funata N, Hayashi T, Tsuruta K, Okamoto A, Amemiya K, Egawa N, Nakajima H. Close relationship between autoimmune pancreatitis and multifibrosclerosis. *Gut* 2003; 52 : 683–687.
4. Suda K, Takase M, Takei K, Nakamura T, Akai J, Nakamura T. Histopathologic study of coexistent pathologic states in pancreatic fibrosis in patients with chronic alcohol abuse: two distinct pathologic fibrosis entities with different mechanisms. *Pancreas* 1996; 12 : 369–372.

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

慢性膵炎における膵内神経の支配様式

研究報告者 岡崎和一 関西医科大学内科学第三 教授

共同研究者

高御堂祥一郎, 池浦 司, 松下光伸, 内田一茂 (関西医科大学内科学第三)

片岡洋祐, 山田久夫 (関西医科大学第一解剖)

【研究要旨】

自然発症慢性膵炎モデルラット (WBN/Kob ラット) を用いて慢性膵炎時に膵内で増生する知覚神経と疼痛症状の関連を行動実験と免疫組織化学的手法を組み合わせることで検討した。行動実験では, grooming が慢性膵炎モデル群で抑制され, さらに慢性膵炎モデル群間でも caerulein 投与動物は生理食塩水投与動物に比べ優位に抑制された。また, 慢性膵炎モデル群では脊髄後角での c-fos 発現が増加しており, その増加は膵内における GAP-43 の発現量と相関関係があった。以上の結果より, 慢性膵炎時の膵内神経増加と疼痛症状には何らかの関連があることが示唆された。

A. 研究目的

慢性膵炎時にみられる膵内神経増生は疼痛症状や炎症の増悪に関与している可能性があるが, その詳細は明らかでない。今回われわれは自然発症慢性膵炎モデルラットを用いて慢性膵炎時に膵内で増生する知覚神経と疼痛症状の関連を行動実験と免疫組織化学的手法を組み合わせることで検討した。

B. 研究方法

WBN/Kob 系雄性ラット (慢性膵炎モデル群) は24週齢まで特殊繁殖用飼料MB-3にて飼育した。対照として標準飼料で飼育した同週齢の正常 Wistar ラット (コントロール群) を用いた。各群とも caerulein を投与した外分泌刺激動物と生理食塩水を投与した対照動物を準備した。

行動実験および免疫組織化学染色

各群8匹の24週齢ラットを使用。ジエチルエーテル麻酔下で caerulein (40 μ g/kg, 皮下注射) あるいは0.9%生理食塩水 (1 ml, 皮下注射) を投与し, 2時間後 (pm6) に暗室へ移動。4時間後より行動実験を行った。行動のパラメータとして locomotion, grooming, rearing を10分間 \times 3 trial で測定した。6時間後にジエチルエーテル麻酔下で Amy 値測定用の採血を行い, 灌流固定。膵臓および脊髄を摘出し, 後固定, sucrose 化し

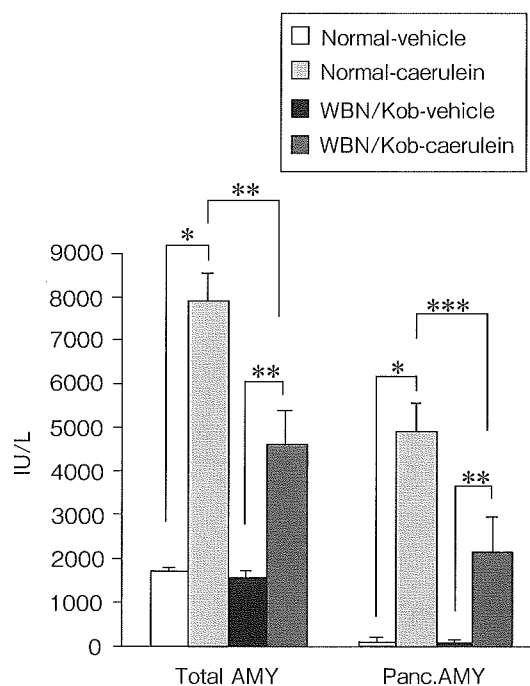


図1 血清アミラーゼ値

た後, 20 μ m 厚の凍結連続切片を作成した。脊髄標本については Th4 および Th9-Th11 について神経興奮のマーカーである c-fos 免疫染色を行い, 各動物とも任意の3切片での脊髄後角の c-fos 陽性神経細胞数をカウントした。さらに, 膵臓標本では神経可塑性マーカーである GAP-43 の蛍光染色を行い, 共焦点レーザー顕微鏡にて定量解析した。

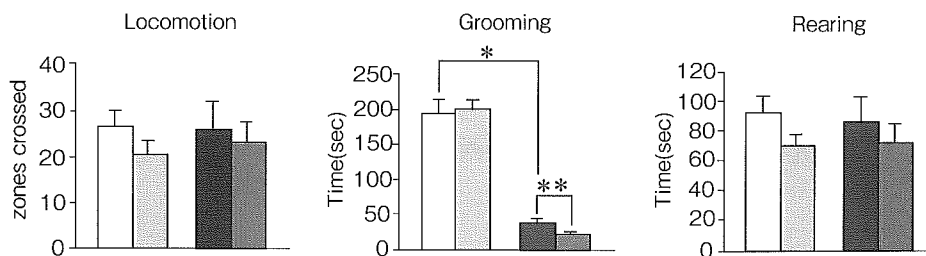


図2 行動実験

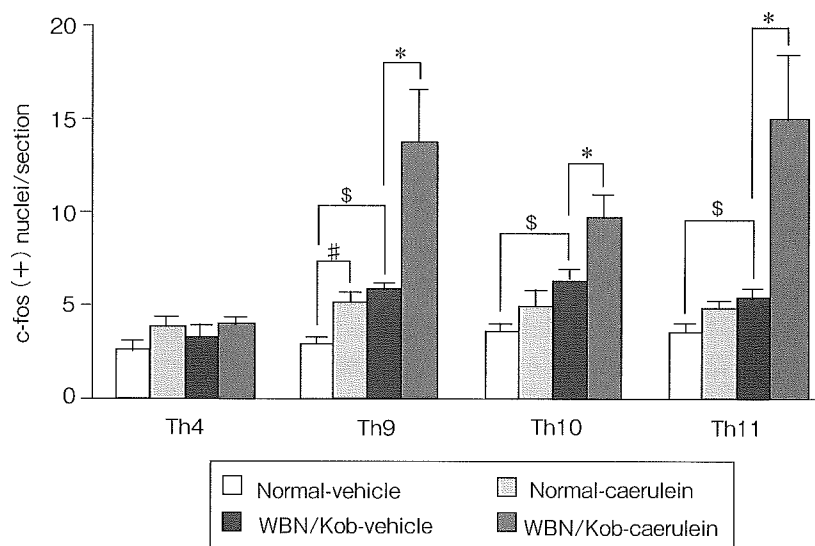


図3 脊髄後角における c-fos 発現量

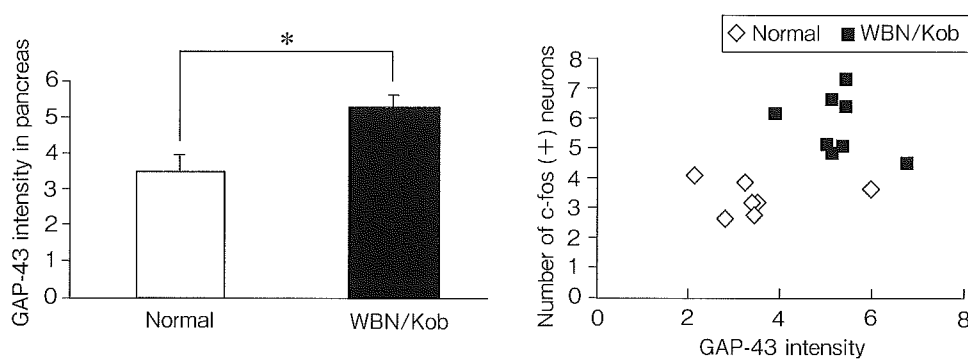


図4 GAP-43 発現量と c-fos 発現量の関連

(倫理面への配慮)

当大学の動物実験倫理委員会の承認を得ている。

C. 研究結果

血清アミラーゼ(AMY)値は各群とも caerulein 投与動物で有意に増加していた(図1)。

行動実験では, grooming が慢性膵炎モデル群で抑制され, さらに慢性膵炎モデル群間でも caerulein 投与動物は生理食塩水投与動物に比べ優位に抑制された(図2)。

膵臓を主に支配する Th9-Th11 において, 慢性膵炎モデル群では脊髄後角における c-fos の発現

が増加しており, さらに慢性膵炎モデル群間でも caerulein 投与動物は生理食塩水投与動物に比べ優位に増加していた(図3)。

また, 慢性膵炎モデル群の膵内では神経可塑性マーカーの GAP-43 が強く発現しており, 脊髄後角での c-fos 発現量との相関がみられた(図4)。

D. 考察

慢性膵炎時に膵組織内で増生している神経軸索と疼痛症状の関連について考察している論文はあるが, その詳細はいまだ不明な点が多い。今回の行動実験と免疫組織化学染色を用いた検討により, 慢性膵炎時の膵内神経増生・伸長と

行動パターン・c-fos発現との関連がみられた。一般的にgroomingは強いストレス・疼痛時に増加する傾向があるが、一方でリラックスした状態でも増加するという。今回のわれわれの検討における慢性腭炎ラットのgrooming抑制は慢性腭炎による不快感を表わしているのかもしれない。

E. 結論

慢性腭炎時の腭内神経増加と行動パターンの変化・神経興奮マーカーの発現量との間に、相関関係がみられた。

F. 参考文献

なし

G. 健康危険情報

該当なし

H. 研究発表

1. 雑誌発表 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

低酸素状態が膵線維化進展に与える影響

研究報告者 大槻 眞 産業医科大学消化器・代謝内科 教授

共同研究者

渡邊史郎, 浅海 洋, 野見山陽子, 田口雅史, 田代充生, 木原康之, 中村早人
(産業医科大学消化器・代謝内科)

【研究要旨】

慢性膵炎は膵実質の脱落と線維化を特徴とする慢性進行性の難治性疾患である。ヒト慢性膵炎では膵血流が低下しており、慢性エタノール投与により膵臓(膵腺房細胞, ラ氏島)は低酸素状態となることが知られている。そこで、膵線維化の中心的役割を果たしている膵星細胞(pancreatic stellate cells; PSCs)を用いて、低酸素状態が膵線維化進展に与える影響を検討した。まず、自然発症慢性膵炎モデルであるWistar Bonn Koberi (WBN/Kob)ラットの膵臓を*in vivo*で検討すると、PSCsは低酸素状態になっていた。次にWistar系雄性ラットより単離したPSCsを低酸素条件下で培養すると、BrdU取込み量と α -SMA蛋白の発現量は増加し、さらに、1型コラーゲンmRNAの発現量も、上清中へのコラーゲン分泌量も増加した。これらの結果から、慢性膵炎においては膵局所の低酸素状態がPSCsを活性化し膵線維化を進展させる可能性が考えられた。

A. 研究目的

慢性膵炎は膵実質の脱落と線維化を特徴とする慢性進行性の疾患であるが、病因や進展機序はもとより、治療法も開発されていない難治性疾患である。1998年に膵線維化の中心的役割を果たしている膵星細胞(pancreatic stellate cells; PSCs)が分離・同定されてから^{1,2)}、PSCsを用いた*in vitro*の研究により膵線維化進展の機序が解明されつつある。

慢性膵炎では膵血流が低下している^{3,4)}、慢性エタノール投与により膵臓(膵腺房細胞, ラ氏島)は低酸素状態となることが知られている⁵⁾。そこで、低酸素状態が膵線維化進展に関与するか否かをラットPSCsを用いて検討した。

B. 研究方法

1. *In vivo*における研究

自然発症慢性膵炎モデルであるWistar Bonn Koberi (WBN/Kob)ラット(20週齢)に120 mg/kg体重のhypoxyprom-1 (pimonidazole hydrochloride)を静注し、1時間後に犠牲死させ膵臓を摘出しHE染色, Azan染色, α -SMA免疫染色, およびhypoxyprom-1染色で組織学的検討

を行った。Hypoxyprom-1は低酸素状態の細胞において、蛋白質のチオール基に結合することから、hypoxyprom-1が結合した蛋白質を認識する抗hypoxyprom-1抗体で染色すると、低酸素状態の細胞を検出できる。

2. *In vitro*における研究

Wistar系雄性ラット(200~250 g)より膵臓を摘出し、既報に準じて1) PSCsを単離、培養した。10%牛胎児血清(fetus bovine serum; FBS)加Dulbecco's modified eagle medium (DMEM)で24時間細胞を培養した後、0.1% FBS加DMEMに培地を変更し、さらに24時間培養した。その後、3% O₂の低酸素状態でPSCsを培養し以下の項目を検討した。1) PSCs増殖をBrdU取込み量で、2) PSCs活性化の指標としてPSCsの α -SMA免疫組織学的染色で、また、 α -SMA蛋白の発現量をWestern blot法で、3) 1型コラーゲンmRNAの発現量をreal time RT-PCR法で、4) 上清中へのコラーゲン分泌量をSircol collagen assay kitにて検討した。PSCsの α -SMA免疫染色と α -SMA蛋白のWestern blot法は初継代のPSCsを、その他の実験には2~3継代培養後のPSCsを用いた。

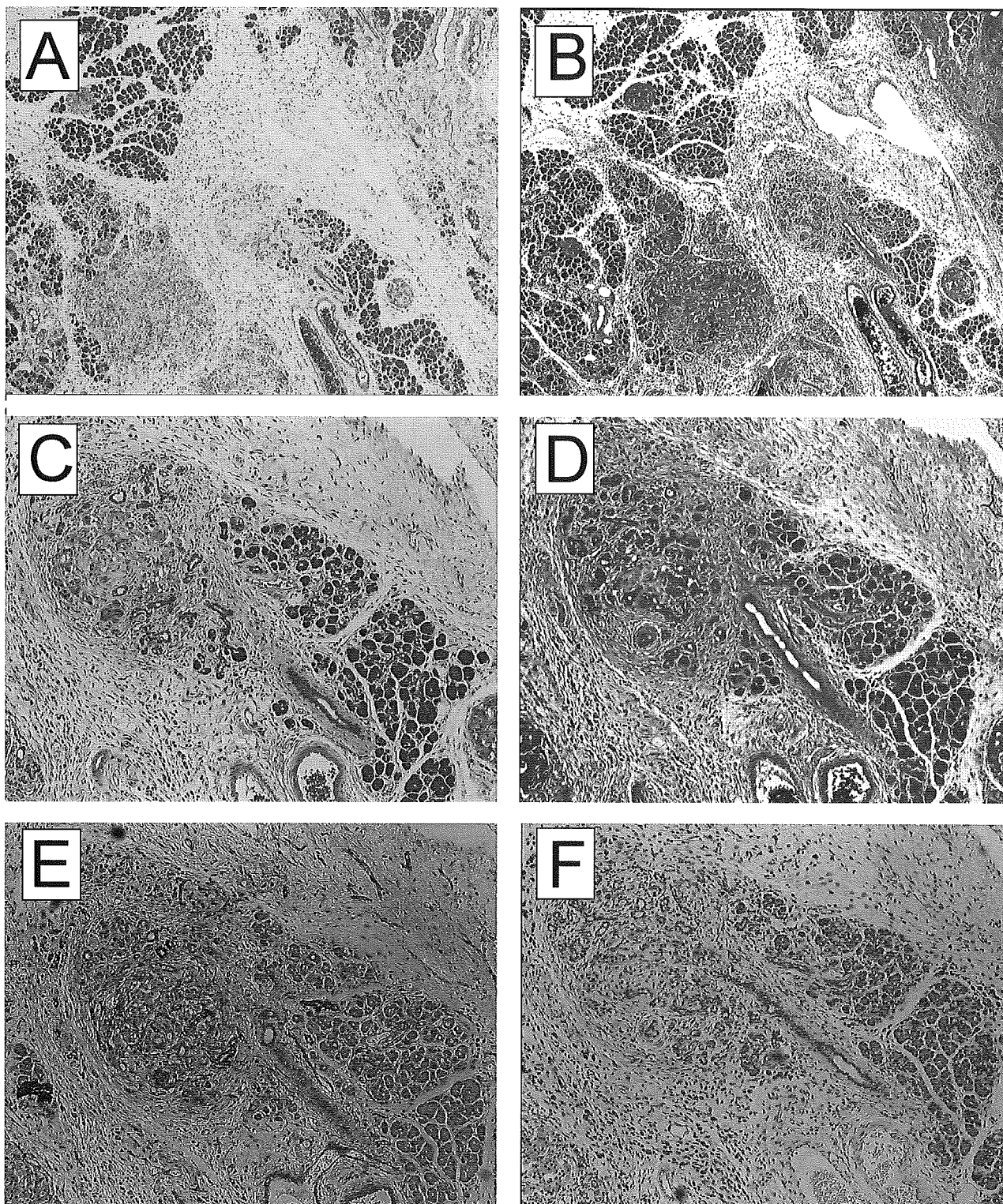


図1 WBN/Kobラット膵の組織学的検討
A, C: HE染色, B, D: Azan染色, E: α -SMA免疫染色, F: Hypoxyprobe-1免疫染色

(倫理面への配慮)

本実験は、本学の動物実験および飼育倫理委員会の承認を得、動物愛護の配慮のもとに行った。

C. 研究結果

WBN/Kobラットの膵組織では、膵実質の脱

落、小葉間の線維化を認め慢性膵炎の組織像を呈していた(図1A-D)。 α -SMA免疫組織学的染色では脈間周囲と間質に存在する紡錘形の細胞が α -SMA陽性で(図1E)、hypoxyprobe-1は実質細胞と間質の紡錘形の細胞に検出された(図1F)。また α -SMAと hypoxyprobe-1の二重染色では間質に存在する紡錘形の細胞が染色された(図2)。

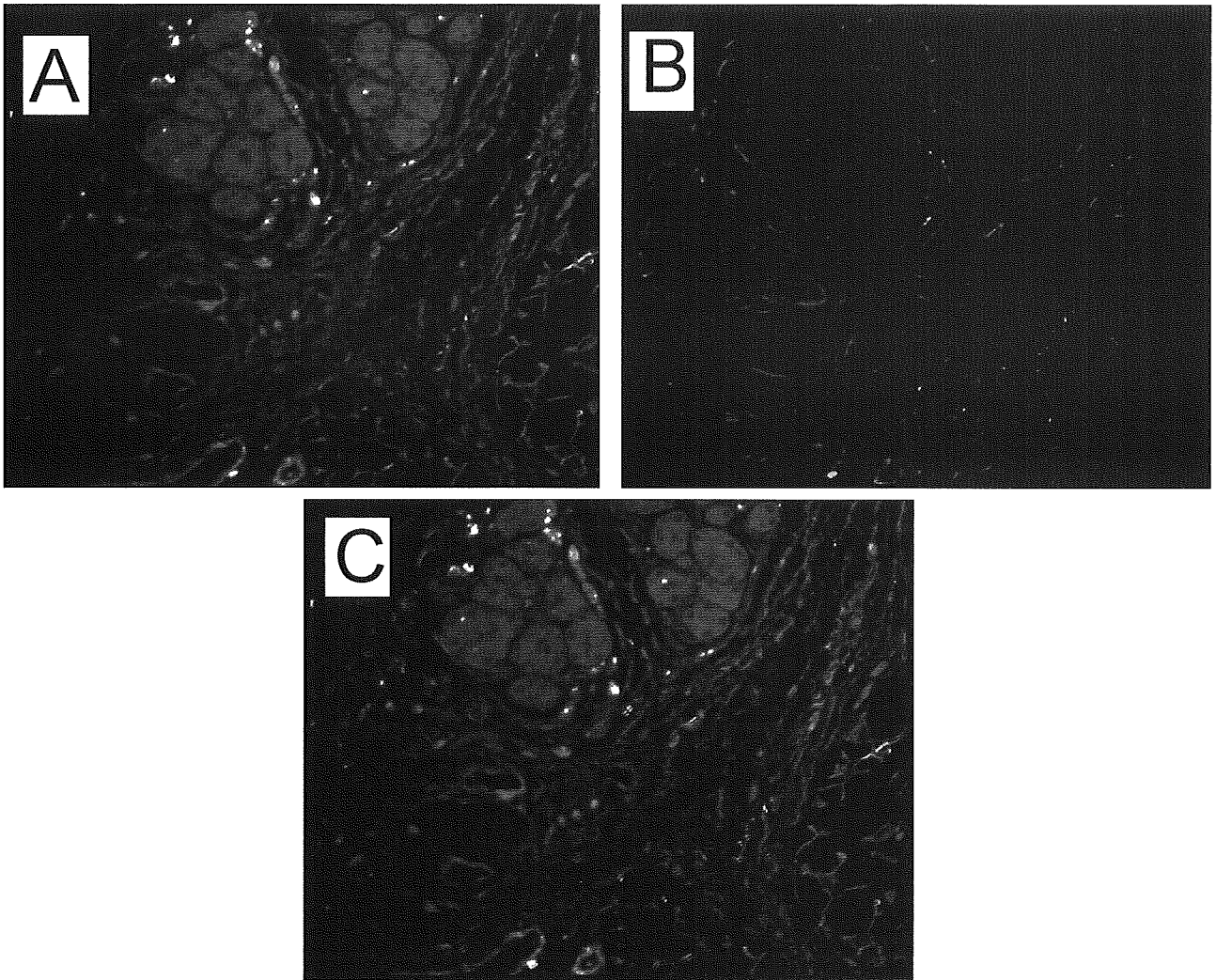


図2 WBN/Kobラット膵組織の蛍光免疫染色

A: α -SMA 蛍光免疫染色, B: Hypoxyprobe-1 免疫蛍光染色, C: α -SMA と hypoxyprobe-1 の二重免疫蛍光染色

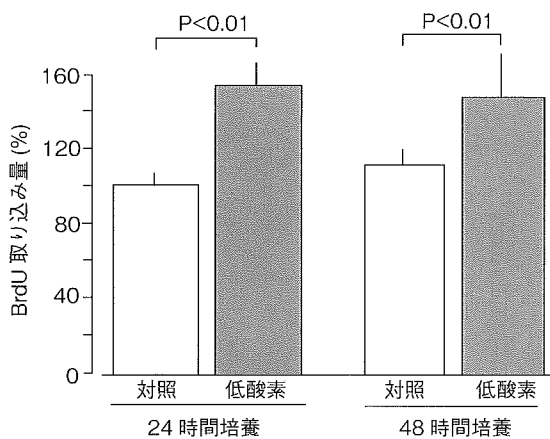


図3 低酸素(3% O₂) 条件下での培養のPSCs増殖に与える影響

対照：通常培養条件(O₂約20%), (平均値±標準誤差, n = 4)

PSCsを低酸素条件下で培養すると、培養24、48時間後に通常培養と比較しBrdU取込み量が有意に増加した(図3)。また、低酸素条件下で培養したPSCsは通常培養と比較し、 α -SMA陽性細胞が多くみられた(図4A, B)。PSCsの α -SMA

蛋白の発現量は、低酸素条件下の培養により有意に増加した(図4C)。さらに、PSCsを低酸素条件下で培養すると、1型コラーゲン mRNA の発現量と上清中へのコラーゲン分泌量が有意に増加した(図5)。

D. 考察

自然発症慢性膵炎モデルであるWBN/Kobラットの膵臓において、間質に存在する紡錘形の α -SMA陽性細胞がhypoxyprobe-1にも染色されたことから、PSCsは低酸素状態になっていると考えられた。慢性膵炎で膵血流が低下している場合や^{3,4)}、慢性エタノール投与により膵臓が低酸素状態になっている場合には⁵⁾、PSCsも低酸素状態にあると思われる。さらに、PSCsを低酸素条件下で培養すると増殖し、活性化され、コラーゲン産生が亢進することから、慢性膵炎では膵血流の低下が膵局所の低酸素状態を惹起

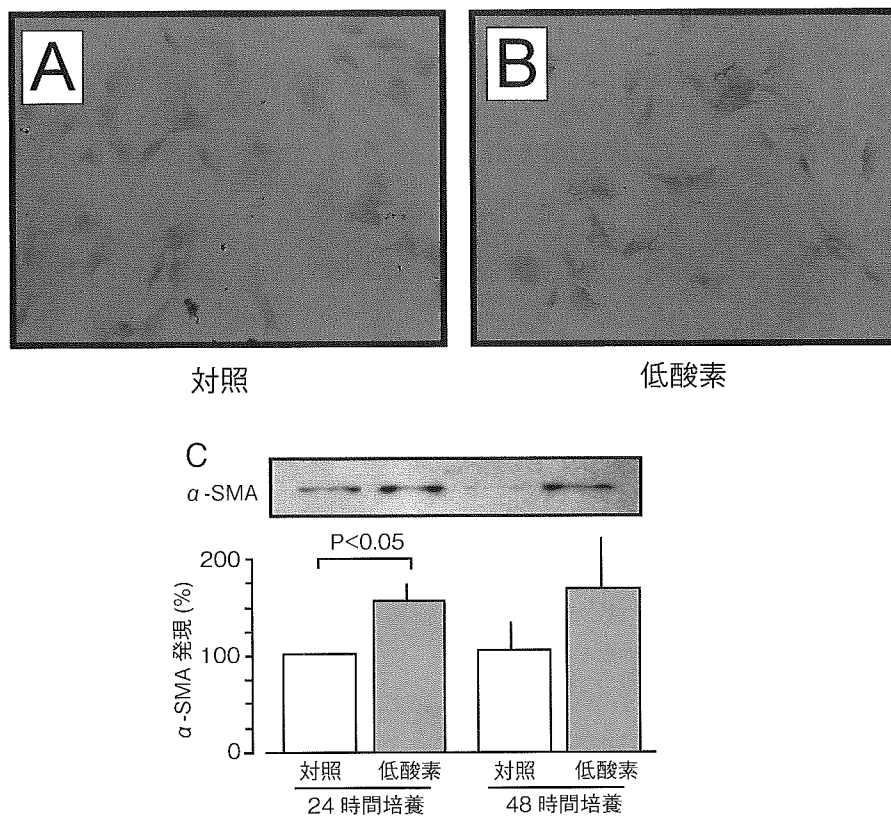


図4 低酸素(3% O₂)条件下で培養したPSCsのα-SMA蛋白発現に与える影響
A, B: α-SMA免疫染色, C: Western blot
対照: 通常培養条件(O₂約20%), (平均値±標準誤差, n = 3)

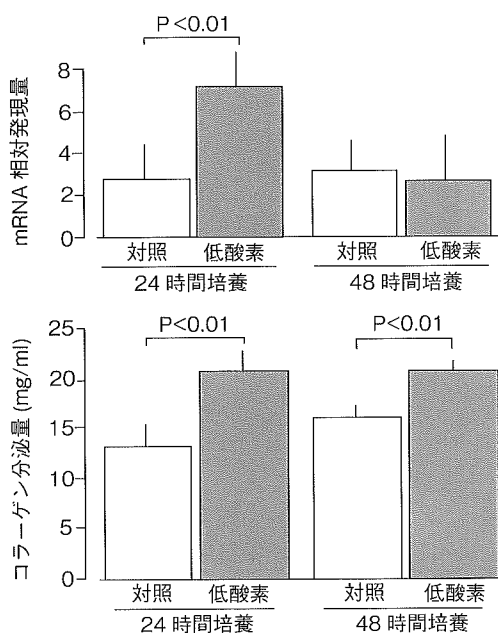


図5 低酸素(3% O₂)条件下での培養したPSCsの1型コラーゲンmRNAの発現量と培養上清中へのコラーゲン分泌量に与える影響
上段: 1型コラーゲンmRNAの発現量, 下段: 培養上清中へのコラーゲン分泌量
対照: 通常培養条件(O₂約20%), (平均値±標準誤差, n = 4)

し, PSCsが活性化され, 腓線維化が進展・増悪すると考えられた。

腎臓での検討においても, 低酸素条件下でメサンギウム細胞は増殖しコラーゲン合成を促進する⁶⁾, 肝臓においても肝星細胞を用いた検討で, 低酸素にて1型コラーゲンmRNA・蛋白は増加することから⁷⁾, 線維化の進展に低酸素状態が大きく関与していると推測される。しかしながら, 低酸素による腓線維化進展の機序についてはいまだ不明な点が多く, 今後さらなる検討が必要である。

E. 結論

慢性膵炎において膵局所の低酸素状態が膵星細胞を活性化し, 腓線維化を進展させると考えられた。

F. 参考文献

1. Apte MV, Haber PS, Applegate TL, Norton ID, McCaughan GW, Korsten MA, Pirola RC, Wilson JS. Periacinar stellate shaped cells in rat pancreas: identification, isolation, and culture. Gut 1998;

43 : 128–133.

2. 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 : 421–432.
3. Schilling MK, Redaelli C, Reber PU, Friess H, Signer C, Stoupis C, Buchler MW. Microcirculation in chronic alcoholic pancreatitis: a laser Doppler flow study. *Pancreas* 1999; 19 : 21–25.
4. Lewis MP, Lo SK, Reber PU, Patel A, Gloor B, Todd KE, Toyama MT, Sherman S, Ashley SW, Reber HA. Endoscopic measurement of pancreatic tissue perfusion in patients with chronic pancreatitis and control patients. *Gastrointest Endosc* 2000; 51 : 195–199.
5. McKim SE, Uesugi T, Raleigh JA, McClain CJ, Arteel GE. Chronic intragastric alcohol exposure causes hypoxia and oxidative stress in the rat pancreas. *Arch Biochem Biophys* 2003; 417 : 34–43.
6. Sahai A, Mei C, Pattison TA, Tannen RL. Chronic hypoxia induces proliferation of cultured mesangial cells: role of calcium and protein kinase C. *Am J Physiol* 1997; 273 : 954–960.
7. Corpechot C, Barbu V, Wendum D, Kinnman N, Rey C, Poupon R, Housset C, Rosmorduc O. Hypoxia-induced VEGF and collagen I expressions are associated with angiogenesis and fibrogenesis in experimental cirrhosis. *Hepatology* 2002; 35 : 1010–1021.

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

3. 自己免疫性膵炎

自己免疫性膵炎における補体活性化機序の検討

研究報告者 川 茂幸 信州大学健康安全センター 教授

共同研究者

浜野英明, 越知泰英, 新倉則和, 小松健一, 村木 崇, 尾崎弥生 (信州大学消化器内科)

【研究要旨】

自己免疫性膵炎は膵腫大, 膵管の不整狭細化を特徴とする特異な膵炎であり, 通常の慢性膵炎とは異なる独立した疾患と考えられる. 本疾患では血清IgG4が高率かつ特異的に上昇し, また血清補体低下例が存在することから, IgG4と補体活性化経路が発生機序に深く関与していると考えられ検討した. 自己免疫性膵炎患者, 通常の慢性膵炎患者, 健常人について血清補体値, マンノースバインディングレクチン値, 免疫複合体値を測定し検討した. 自己免疫性膵炎患者では免疫複合体が有意に上昇し, ステロイド治療後に低下した. C1q法で測定した免疫複合体値はIgG1値上昇, C4値低下と有意な相関を認め, C3は低下傾向を示した. マンノースバインディングレクチン値は自己免疫性膵炎で有意な低下を認めず, また疾患活動性を反映していなかった. 以上の結果から自己免疫性膵炎ではマンノースバインディングレクチン経路や副経路の関与はなくIgG4の直接的関与もないと考えられ, 古典的経路が関与している可能性が考えられた.

A. 研究目的

自己免疫性膵炎は膵腫大, 膵管の不整狭細化を特徴とする特異な膵炎であり, 膵実質にリンパ球形質細胞浸潤を伴う著明な線維化を認める. 各種自己抗体が陽性, ステロイド治療が奏効することより発症に自己免疫学的機序の関与が考えられ¹⁻⁸⁾, またHLA DRB1*0405-DQB1*0401 haplotypeと有意な相関を認めることより通常の慢性膵炎とは異なる独立した疾患と考えられる⁹⁾. 本疾患では血清IgG4値が高率, 特異的に上昇し, 疾患活動性と相関している⁸⁾. 本疾患患者では血清補体低下例を認め, 古典的経路, 副経路, マンノースバインディングレクチン経路¹⁰⁾ (mannose binding lectin: MBL経路)のうち, いずれかの補体活性化経路が病態に関与している可能性がある.

自己免疫性膵炎の発生機序や詳細な病態は不明であり, 厚生省難治性膵疾患調査研究班では精力的に検討を重ねてきた. IgG4が疾患活動性と関連していることより, IgG4といずれかの補体活性化経路との関連が考えられる. IgG4はC1qとの結合性がなく古典的経路には関与しないと考えられているが詳細は不明である. 今年

度の本研究目的は, 古典的経路, 副経路, MBL経路のいずれの補体活性化経路が自己免疫性膵炎の病態に関与しているかを明らかにすることである.

B. 研究方法

対象は1994年から2004年までの間に信州大学医学部消化器内科, および関連施設で診断された自己免疫性膵炎44例(男性35名, 女性9名, 平均年齢67歳, 範囲47~79歳)と, 同時期に診療された通常の慢性膵炎50例(男性44名, 女性6名, 平均年齢64歳, 範囲30~80歳)および健常人48例(男性26名, 女性22名, 平均年齢39歳, 範囲24~61歳)を対象とした. ただし, 健常人とは, 特定の疾患を有さず, 免疫学的検査, 炎症関連検査に異常を認めていないと定義した.

新鮮血清にてC3, C4, CH50を測定した. また, 炎症による影響を受けないようにCRP 3 mg/dl以上の血清は除外した. IgG4を含めたIgG subclassと, 免疫複合体はmRF法とC1q法で測定した. 血清MBL値はELISA法 (MBL-oligomer ELISA; Antibody Shop, Tokyo Japan)にて測定した.

表1 自己免疫性膵炎患者の mRF 法による血清免疫複合体値と各種検査値との相関

血清免疫複合体値 - mRF 法 - median (range)		高値群 (n = 32)	正常値群 (n = 12)	p value
C3	mg/dl	100 (33-163)	107 (52-165)	0.5670
C4	mg/dl	18.7 (4.8-95.6)	20.7 (1.8-42.9)	0.8413
CH50	U/ml	42.4 (4.3-60.4)	48.4 (4.5-70.7)	0.3568
MBL	μ g/l	2,272.5 (0-16724)	1,795 (0-10517)	0.4442
IgM	mg/dl	99 (37-313)	86 (42-144)	0.3450
IgG1	mg/dl	974.5 (319-1925)	884.5 (401-1620)	0.4681
IgG2	mg/dl	646.5 (367-1239)	629.5 (367-942)	0.7022
IgG3	mg/dl	55.5 (20-174)	58 (7-393)	0.5797
IgG4	mg/dl	744 (82-2855)	213 (22-965)	0.0009

表2 自己免疫性膵炎患者の C1q 法による血清免疫複合体値と各種検査値との相関

血清免疫複合体値 - C1q 法 - median (range)		高値群 (n = 28)	正常値群 (n = 16)	p value
C3	mg/dl	89 (33-165)	107 (63-154)	0.0762
C4	mg/dl	16.5 (1.8-42.9)	24.3 (15-95.6)	0.0105
CH50	U/ml	40.75 (4.3-60.4)	48.35 (22.4-70.7)	0.2449
MBL	μ g/l	2,139.5 (0-16724)	2,000 (0-13655)	0.4863
IgM	mg/dl	91 (37-313)	98 (42-149)	0.4386
IgG1	mg/dl	1,070 (496-1925)	769 (319-1620)	0.0132
IgG2	mg/dl	704 (367-1239)	564 (367-942)	0.1957
IgG3	mg/dl	63.4 (20-174)	47.5 (7-393)	0.1999
IgG4	mg/dl	727.5 (73-2855)	439.5 (22-1845)	0.1845

MBL欠損はMBL遺伝子のcodon54,57において、GGC→GAC, GGA→GAAのアミノ酸置換へつながる変異を持つ対立遺伝子で起こることが知られており¹⁰⁾、MBL遺伝子の変異を末梢血DNAサンプルにて検討した。

統計解析は、Wilcoxon matched-pairs signed rank testもしくはMann-Whitney testを用い、p < 0.05を有意とした。

(倫理面への配慮)

侵襲度の高い検査については目的ならびに危険性について十分説明し、承諾書を得て施行した。遺伝子検査については信州大学医学部倫理委員会の承認を得たうえで行った(平成13年3月5日承認, 受付番号12)。

C. 研究結果

1. 血清補体値

CH50値は自己免疫性膵炎で通常の慢性膵炎と比して有意に低下していた。C3, C4については有意差を認めなかったが、C3の低下を16例(36%)、C4の低下を16例(36%)、CH50の低下を7

例(16%)に認めた。

2. 血清MBL値

MBL中央値は自己免疫性膵炎2,139 μ g/L、通常の慢性膵炎4,234 μ g/L、健常人1,387 μ g/Lと自己免疫性膵炎と通常の慢性膵炎で健常人に比較して有意に高い値であった。しかし、自己免疫性膵炎と通常の慢性膵炎間で有意差を認めなかった。また、ステロイド治療前後でMBL値を比較したが、治療後に有意に低下することはなかった。

3. MBL遺伝子多型との関連

いずれの患者でもcodon 57に変異を認めなかった。自己免疫性膵炎で4例に、通常の慢性膵炎で2例にcodon 54の変異を認めたが、両群間で有意差を認めなかった。変異陽性例ではMBL値は0 μ g/Lであった。

4. 血清免疫複合体値と補体値の関連

血清免疫複合体値はmRF法では32例(73%)に、C1q法では28例(64%)に上昇を認め、いずれもステロイド治療後に有意に低下した。mRF法で測定した免疫複合体上昇例では正常例と比

較して、血清IgG4が有意に上昇していたが、補体値には有意差を認めなかった(表1)。C1q法で測定した免疫複合体上昇例では値正常例と比較して、IgG1が有意に上昇し、C4が有意に低下していた。またC3は低下傾向を認めた(表2)。

D. 考察

自己免疫性膵炎で血清補体値を測定した結果、C3, C4, CH50の低下を36%, 36%, 16%に認め、補体活性化が自己免疫性膵炎の病態に関与している症例が存在した。

IgG4と補体との関連を考える場合、IgG4は古典的経路には関与していないと報告されている。したがってMBL経路、副経路がIgG4と関連している可能性があり、今回特にMBL経路について詳細に検討した。またMBL経路は種々の自己免疫性疾患の発症に関与していると報告されている^{11,12)}。しかし、今回の検討では血清MBL値は自己免疫性膵炎と通常の慢性膵炎間で有意差を認めず、またステロイド治療前後でも有意差を認めなかった。したがって自己免疫性膵炎ではMBL経路による補体活性化は関与していないと考えられる。

MBL値は*codon 54* 遺伝子変異に規定されると報告されているが¹³⁾、今回の検討でも自己免疫性膵炎4例、通常の慢性膵炎2例に変異を認め、変異陽性例ではMBL値は0 μ g/Lであった。しかし、自己免疫性膵炎例で有意に変異陽性例が多いということはなく、自己免疫性膵炎の病態にMBL遺伝子変異の関与はないと考えられた。

今回の検討では以前の報告と同じく⁸⁾、自己免疫性膵炎例で血清免疫複合体が有意に上昇しており、ステロイド治療により有意に低下し、病態に関与していると考えられた。mRF法で測定した免疫複合体高値例では血清IgG4値が有意に上昇しており、これらの症例ではIgG4型免疫複合体が病態に関与していると考えられた⁸⁾。しかし、補体との関連はなく血清IgG4は補体活性化には直接関与していないと考えられた。一方、C1q法で測定した免疫複合体高値例では血清IgG1値が有意に上昇しており、補体C4の低下を認めた。また補体C3も低下傾向を認めた。したがって少なくとも自己免疫性膵炎の一部の症例

では、古典的経路による補体活性化が関与していると考えられた。

E. 結論

自己免疫性膵炎の一部の症例で、血清免疫複合体値の上昇と古典的経路による補体活性化を認めたが、IgG4の直接的関与を証明できなかった。

F. 参考文献

1. Yoshida K, Toki F, Takeuchi T, Watanabe S, Shiratori K, Hayashi N. Chronic pancreatitis caused by an autoimmune abnormality, proposal of the concept of autoimmune pancreatitis. *Dig Dis Sci* 1995; 40: 1561-1568.
2. Horiuchi A, Kaneko T, Yamamura N, Nagata A, Nakamura T, Akamatsu T, Mukawa K, Kawa S, Kiyosawa K. Autoimmune pancreatitis simulating pancreatic lymphoma. *Am J Gastroenterol* 1996; 91: 2607-2609.
3. Ito T, Nakano I, Koyanagi S, Miyahara T, Migita Y, Ogoshi K, Sakai H, Matsunaga S, Yasuda O, Sumii T, Nawata H. Autoimmune pancreatitis as a new clinical entity, three cases of autoimmune pancreatitis with effective steroid therapy. *Dig Dis Sci* 1997; 42: 1458-1468.
4. Horiuchi A, Kawa S, Akamatsu T, Aoki Y, Mukawa K, Furuya N, Ochi Y, Kiyosawa K. Characteristic pancreatic duct appearance in autoimmune chronic pancreatitis: a case report and review of the Japanese literature. *Am J Gastroenterol* 1998; 93: 260-263.
5. Motoo Y, Minamoto T, Watanabe H, Sakai J, Okai T, Sawabu N. Sclerosing pancreatitis showing rapidly progressive changes with recurrent mass formation. *Int J Pancreatol* 1997; 21: 85-90.
6. Erkelens GW, Vleggar FP, Lesterhuis W, van Buuren HR, van der Werf SD. Sclerosing pancreatico-cholangitis responsive to steroid therapy. *Lancet* 1999; 354: 43-44.
7. Horiuchi A, Kawa S, Hamano H, Ochi Y, Kiyosawa K. Sclerosing pancreato-cholangitis responsive to corticosteroid therapy: report of

- 2 case reports and review. *Gastrointest Endosc* 2001; 53 : 518-522.
8. Hamano H, Kawa S, Horiuchi A, Unno H, Furuya N, Akamatsu T, Fukushima M, Nikaido T, Nakayama K, Usuda N, Kiyosawa K. High serum IgG4 concentrations in patients with sclerosing pancreatitis. *New Engl J Med* 2001; 344 : 732-738.
 9. Kawa S, Ota M, Yoshizawa K, Horiuchi A, Hamano H, Ochi Y, Nakayama K, Tokutake Y, Katsuyama Y, Saito S, Hasebe O, Kiyosawa K. HLA DRB10405-DQB10401 haplotype is associated with autoimmune pancreatitis in the Japanese population. *Gastroenterology* 2002; 122 : 1264-1269.
 10. Kilpatrick DC. Mannan-binding lectin: clinical significance and applications. *Biochim Biophys Acta* 2002; 1572 : 401-413.
 11. Zimmermann-Nielsen E, Baatrup G, Thorlacius-Ussing O, et al. Complement activation mediated by mannan-binding lectin in plasma from healthy individuals and from patients with SLE, Crohn's disease and colorectal cancer. Suppressed activation by SLE plasma. *Scand J Immuno* 2002; 155 : 105-110.
 12. Takahashi R, Tsutsumi A, Ohtani K, et al. Anti-mannose binding lectin antibodies in sera of Japanese patients with systemic lupus erythematosus. *Clin Exp Immunol* 2004; 136 : 585-590.
 13. Sasaki K, Tsutsumi A, Wakamiya N, et al. Mannose-binding lectin polymorphisms in patients with hepatitis C virus infection. *Scand J Gastroenterol* 2000; 35 : 960-965.
- G. 健康危険情報**
該当なし
- H. 研究発表**
1. 論文発表
 - 1) Uehara T, Hamano H, Kawa S, Sano K, Honda T, Ota H. Distinct clinicopathological entity 'autoimmune pancreatitis-associated sclerosing cholangitis'. *Pathol Int* 2005; 55 : 405-411.
 - 2) Komatsu K, Hamano H, Ochi Y, Takayama M, Muraki T, Yoshizawa K, Sakurai A, Ota M, Kawa S. High prevalence of hypothyroidism in patients with autoimmune pancreatitis. *Dig Dis Sci* 2005; 50 : 1052-1057.
 - 3) Hamano H, Kawa S, Uehara T, Ochi Y, Takayama M, Komatsu K, Muraki T, Umino J, Kiyosawa K, Miyagawa S. Immunoglobulin G4-related lymphoplasmacytic sclerosing cholangitis that mimics infiltrating hilar cholangiocarcinoma: part of a spectrum of autoimmune pancreatitis? *Gastrointest Endosc* 2005; 62 : 152-157.
 - 4) Muraki T, Hamano H, Ochi Y, Arakura N, Takayama M, Komatsu K, Komiyama Y, Kawa S, Uehara T, Kiyosawa K. Corticosteroid-responsive pancreatic cyst found in autoimmune pancreatitis. *J Gastroenterol* 2005; 40 : 761-766.
 - 5) Muraki T, Hamano H, Ochi Y, Komatsu K, Komiyama Y, Arakura N, Yoshizawa K, Ota M, Kawa S, Kiyosawa K. Autoimmune pancreatitis and complement activation system. *Pancreas* 2006; 32 : 16-21.
 - 6) Matsuda M, Hamano H, Yoshida T, Gono T, Uehara T, Kawa S, Ikeda SI. Seronegative Sjogren syndrome with asymptomatic autoimmune sclerosing pancreatitis. *Clin Rheumatol* 2005; 15 : 1-3.
 - 7) 浜野英明, 川 茂幸. 自己免疫性膵炎と IgG4. *Medical Practice* 2005; 22 : 287-289.
 - 8) 川 茂幸, 浜野英明, 越知泰英, 新倉則和, 小松健一, 村木 崇. 自己免疫性膵炎と IgG4, 消化器病学会雑誌 2005; 102 : 296-302.
 - 9) 川 茂幸. 自己免疫性膵炎. *消化器 Now* 2005; 28 : 6.
 - 10) 川 茂幸, 自己免疫性膵炎. *内科* 2005; 95 : 1196.
 - 11) 浜野英明, 川 茂幸, 越知泰英, 新倉則和, 小松健一, 村木 崇, 清澤研道. 自己免疫性膵炎の胆管病変. *消化器画像* 2005; 7 : 353-362.
 - 12) 川 茂幸, 浜野英明, 越知泰英, 新倉則和, 小松健一, 村木 崇, 今井康晴, 長谷部 修. 自己免疫性膵炎の自然経過(再発と膵石形成). *肝胆膵* 2005; 50 : 611-617.

13) 西森 功, 岡崎和一, 須田耕一, 川 茂幸, 神澤輝実, 田中滋城, 大原弘隆, 白鳥敬子, 成瀬 達, 伊藤鉄英, 小泉 勝, 大槻 眞. 自己免疫性膵炎の治療－厚生労働省難治性疾患克服研究事業 難治性膵疾患調査研究班の自己免疫性膵炎に関するコンセンサス. 膵臓 2005; 20: 343-348.

14) 村木 崇, 尾崎弥生, 浜野英明, 越知泰英, 新倉則和, 川 茂幸, 清澤研道, 岡庭信司. 体外式超音波検査による胆膵疾患の拾い上げから診断まで－このエコー所見を見逃すな－自己免疫性膵炎. 胆と膵 2005; 26: 711-716.

2. 学会発表

1) 浜野英明, 越知泰英, 川 茂幸. 膵外病変に注目した, 自己免疫性膵炎の診断能向上に関する検討. 第 91 回消化器病学会総会, 東京 2005 年 4 月 14-16 日

2) 村木 崇, 尾崎弥生, 小松健一, 浜野英明, 越知泰英, 新倉則和, 川 茂幸, 清澤研道. 自己免疫性膵炎と mannose binding lectin. 第 36 回日本膵臓学会大会, 東京 2005 年 7 月 28-29 日

3) 越知泰英, 浜野英明, 川 茂幸. 自己免疫性膵炎再燃増悪例・膵外病変合併例における疾患活動性マーカーの検討. 第 47 回日本消化器病学会大会 (DDW2005), 神戸 2005 年 10 月 5-8 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