

急性膵炎重症化と血漿 ADAMTS13 活性

研究報告者 植村正人 奈良県立医科大学第3内科 准教授

共同研究者

森岡千恵, 藤本正男, 松山友美, 沢井正佳, 吉田太一, 美登路昭, 山尾純一, 福井 博
(奈良県立医科大学第3内科)

松本雅則, 藤村吉博 (奈良県立医科大学輸血部)

西尾健治, 奥地一夫 (奈良県立医科大学救急科)

【研究要旨】

重症急性膵炎(SAP)は、膵臓の著しい炎症と全身性炎症反応症候群から高率に多臓器不全を来たす予後不良な疾患である。ADAMTS13は、血小板と最も反応性に富む超高分子量 von Willebrand factor (VWF) マルチマー (unusually large VWF multimer, UL-VWFM) を分解するが、本酵素活性が低下すると UL-VWFM が増加し、血小板血栓形成傾向となり諸臓器の微小循環障害が惹起される。今回、SAP および内視鏡的逆行性胆道膵管造影(ERCP)前後における血漿 ADAMTS13 活性の動態を検討した。

血漿 ADAMTS13 活性は、SAP 早期に健常者の 1/3 に低下し、死亡例では 10% 程度にまで著減するが、生存例では徐々に上昇する。この際、ADAMTS13 活性が低いほど APACHE II スコアは高く、多臓器不全合併例では非合併例に比し著しい低値を示した。発症早期の ADAMTS13 活性は、血漿エンドトキシンならびに顆粒球エラスターゼが高いほど、低値を示した。UL-VWFM は、ADAMTS13 活性著減、高度な低 Ca 血症、acidosis、高サイトカイン血症合併例に高率に検出された。日本人の ADAMTS13 遺伝子多型である P475S(1423C>T) のヘテロ変異は、SAP 12 症例中 3 例(25%) と健常人(9.5%) に比し高い傾向にあった。なお、Perfusion CT により広範囲膵壊死を認めた例の ADAMTS13 活性は低値であった。

ERCP 後に SAP を発症した例の ADAMTS13 活性は、ERCP 後翌日には半減した(50% → 24%)。胆管閉塞による胆管炎併発例では、増加した VWF 抗原は再開通後低下した。ERCP 後、ADAMTS13 活性が前値の 15% 以上低下した群は非低下群に比し、ERCP 前の VWF 抗原が高値であった。

以上より、ADAMTS13 活性は、SAP の早期診断ならびに予後の指標になり得る可能性があり、VWF 依存性血小板過凝集により、膵微小循環障害から多臓器不全に至る病態形成に密に関与している可能性が示唆された^{1,2)}。また、ERCP 後の ADAMTS13 活性の動態は、膵炎ならびに胆管炎等による急性炎症性反応の消長と関連する可能性がある。

A. 研究目的

重症急性膵炎(SAP)は、膵臓の著しい炎症と全身性炎症反応症候群(systemic inflammatory response syndrome, SIRS)から高率に多臓器不全を来たす予後不良な疾患であるが、その発生機序は未だ十分解明されていない^{3~7)}。

ADAMTS13は、血小板と最も反応性に富む超高分子量 V10WF マルチマー(UL-VWFM)を分解するが、本酵素活性が低下すると UL-VWFM が増加し、血小板血栓形成傾向となり

諸臓器の微小循環障害が惹起される^{8,9)}。血栓性血小板減少性紫斑病(TTP)は本酵素が低下した病態^{8,9)}であることが明らかにされ脚光を浴びて以来、臓器微小循環障害の観点から種々の疾患での動態が注目されてきている^{10,11)}。従来、TTP の経過中に急性膵炎が発症することが報告されていた¹²⁾が、最近、急性膵炎の経過中に TTP が発症する例が相次ぎ^{13~15)}、膵虚血・灌流障害が重要な発症要因の一つとして注目されている^{1,2,13)}。

我々は平成21年度にSAPにおける血漿ADAMTS13活性の動態とその臨床的意義につき報告した^{1,2)}が、平成22年度は同一症例を用いて、SAPの病態形成と密に関与する血漿エンドトキシン(Et)、顆粒球エラスターゼ(poly-morphonuclear elastase, PMNE)の推移をADAMTS13活性との関連のもとに検討した。さらに、日本人のADAMTS13遺伝子多型として発見され、血栓性疾患との関連で注目されているP475S変異(1423C>T)¹⁶⁾の有無につき検討を加えた。

次いで少数例ではあるが、SAPにおける腓虚血を早期に評価し得るperfusion CT像¹⁷⁾とADAMTS13活性の推移を検討すると共に、ERCP施行前後の血漿ADAMTS13活性を測定し、ERCP後膵炎との関連を検討した。

B. 研究方法

1. SAPにおける血漿ADAMTS13活性の動態とその臨床的意義

対象は平成21年度と同一症例であり厚生省急性膵炎重症度判定基準¹⁸⁾に該当する重症急性膵炎13例(男10例, 女3例, 年齢53±15才)である²⁾。入院時APACHE II scoreは平均6±3であり、生存11例, 死亡2例である。成因はアルコール7例, 胆石2例, ERCP後1例, 特発性3例である。特殊治療として上腸間膜動脈ならびに脾動脈から抗生物質と膵酵素阻害剤の動注¹⁹⁾を11例, CHDFを3例, 膵壊死組織除去術を4例に施行している。

血漿ADAMTS13活性はADAMTS13-act-ELISA²⁰⁾、血漿VWF抗原、PMNE (Human PMN elastase ELISA Kit, Bender Medsystems)はELISAにて測定した。血漿Etはchromogenic substrate assay (Toxicolor LS-50M Kit, Seikagaku Kogyo Co., Tokyo, Japan)により測定した^{21,22)}。この際、血漿を0.02% Triton X-100と混和後、内因性Etに対するインヒビターを除去する為に、70度、10分間過熱処理後、kinetics analysisにて測定した。P475S遺伝子多型(1423C>T)は、保存血液からDNAを抽出し、12番目のexonをPCRで増幅した後、制限酵素(RSA1)で切断し、電気泳動にて

確認した。

2. SAPにおけるperfusion CT像と血漿ADAMTS13活性の動態

SAP 2例において、発症48時間以内と2週間後の2度、Perfusion CTを施行し、血漿ADAMTS13活性の推移を検討した。Perfusion CTは本調査研究班の「急性膵炎重症度評価におけるperfusion CTの有用性に関する多施設研究²³⁾」に準じて施行した。

3. ERCP前後における血漿ADAMTS13活性の動態

ERCP施行22例を対象に、ERCP施行前、施行3時間、翌朝に血漿ADAMTS13活性を測定し、ERCP後膵炎との関連を検討した。(倫理面への配慮)

本研究の主旨は予め患者あるいは家族に十分説明を行った上で同意を得ており、同意文書はカルテに保管し、そのコピーは主治医が保管している。また、P475S遺伝子多型の有無については本学ヒトゲノム・遺伝子解析研究倫理審査(受付番号65, 平成21年8月25日承認)の許可を得ている。

C. 研究結果

1. SAPにおける血漿ADAMTS13活性の動態とその臨床的意義

平成21年度に報告^{1,2)}した如く、血漿ADAMTS13活性は、SAP早期に健常者の1/3に低下し、死亡例では10%程度にまで著減するが、生存例では徐々に上昇した。この際、ADAMTS13活性が低いほどAPACHE IIスコアは高く、多臓器不全合併例では非合併例に比し著しい低値を示した。UL-VWFMは、ADAMTS13活性著減、高度な低Ca血症、acidosis、高サイトカイン血症合併例に高率に検出された。

血漿Etは、入院第1~2病日では65 pg/ml~88 pg/mlと健常者(<10 pg/ml)に比し有意に高値を示した。以後、壊死性膵炎非合併生存例では徐々に低下したが、壊死性膵炎合併3例では、第5~第7病日にかけてとさらに上昇し、回復期の第14病日に20 pg/ml前後にまで低下した。死亡例の1例では第1病日37 pg/

ml, 第2病日462 pg/ml, もう1例は第1病日51 pg/ml と高値を示した. Et 濃度が50 pg/ml 以上の高値を示した群はそれ以下の群に比して, ADAMTS13活性は低値であり(22% vs. 43%, $p < 0.05$), Et 濃度は VWF 抗原/ADAMTS13 活性比と正の相関関係にあった($r = 0.732$, $p < 0.005$).

血漿 PMNE 濃度は, 入院第1~2病日109 ng/ml~222 ng/ml と健常者(37 ng/ml)に比し3~7倍高値を示した. 死亡例2例の PMNE 濃度は, 第1病日226 ng/ml, 116 ng/ml と高値であった. Necrosectomy 施行例は非施行例に比し, 第2病日 PMNE 濃度は高値(267 ng/ml vs. 86 ng/ml, $p < 0.05$)であり, 多臓器不全合併例は非合併例に比し, 第1, 第2病日 PMNE 濃度は高い傾向にあった. 第1病日の PMNE 濃度は ADAMTS13 活性と負の相関($r = -0.648$, $p < 0.02$), VWF/ADAMTS13比と正の相関($r = 0.663$, $p < 0.02$), IL-6, IL-8 と正の相関関係にあった.

P475S のヘテロ変異は SAP 12症例中3症例(25%)にみられ, 健常人(9.5%)に比し高頻度の傾向にあった.

2. SAPにおける perfusion CT 像と血漿 ADAMTS13 活性の動態

死亡例の1例は, 76歳男性. 胆石性急性膵

炎にて某病院入院. 腹部 CT で膵腫大, 腹水の増強を認めた為, 発症4日後当院緊急入院. 造影 CT にて膵は腫大し, 頭部から尾部に亘る造影不良域と腎下極以遠に達する腹水が認められた. 膵 perfusion CT では50%以上の壊死領域を認めた. 重症度判定基準の予後因子4点, CT grade 4, APACHE II スコア-19点であった. CHDF, 抗生物質と膵酵素阻害剤の動注療法を開始したが, 翌日, 肺水腫出現し, 人工呼吸管理となる. abdominal compartment syndrome に対し減圧術を施行したが, 腎不全, 呼吸不全の改善なく, 入院18病日に死亡した. ADAMTS13活性は, 入院時21%と低値を示し, 第3病日に29%と軽度上昇したが, 以後11%~19%の低値を持続した. VWF 抗原は入院時378%と高値を示し, 第7病日に648%にまで上昇, 以後300%前後を推移した(図1).

生存例の1例は, 46歳, 男性. アルコール性急性膵炎にて某病院入院. 予後因子0点, 腹部 CT grade 3(膵体尾部の造影不領域, 腎下極に達する炎症の波及)を呈した為, 当院緊急入院. 膵 perfusion CT では壊死領域はほとんど認められなかった. 膵酵素阻害剤, 抗生物質等の静注療法にて, 徐々に改善し, 第11病日に退院. ADAMTS13 活性は入院時43%, 翌日には85%と上昇, 以後84%~118%を推移し

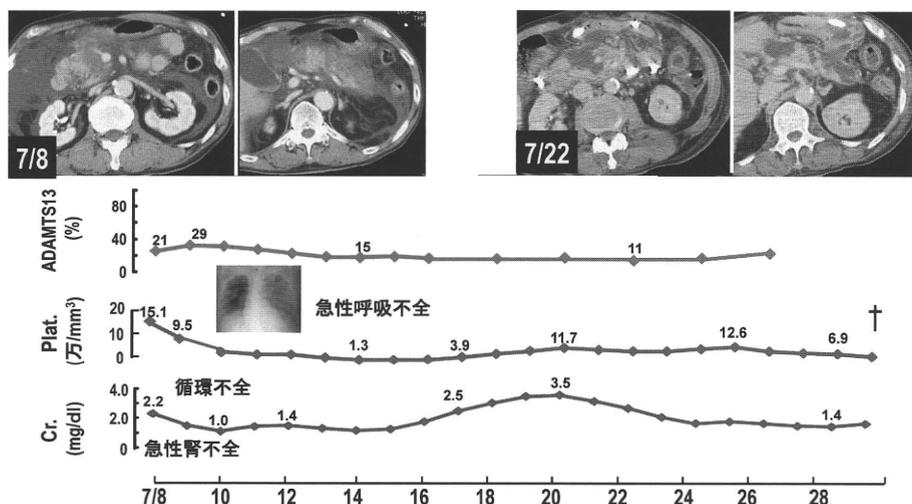


図1 重症急性膵炎における血漿 ADAMTS13 活性の推移

76歳男性, 急性膵炎にて某病院入院. 膵腫大と腹水の増強を認めた為, 発症4日後当院緊急入院. 造影 CT にて膵は腫大し, 頭部から尾部に亘る造影不良域と腎下極以遠に達する腹水が認められた. 膵 perfusion CT では50%以上の壊死領域を認めた. CHDF, 抗生物質と膵酵素阻害剤の動注療法を開始したが, 翌日, 肺水腫出現し, 人工呼吸管理となる. しかし, 腎不全, 呼吸不全の改善なく, 第18病日に死亡. ADAMTS13 活性は, 入院時21%, 第3病日に29%と軽度上昇したが, 以後11%~19%の低値を持続した.

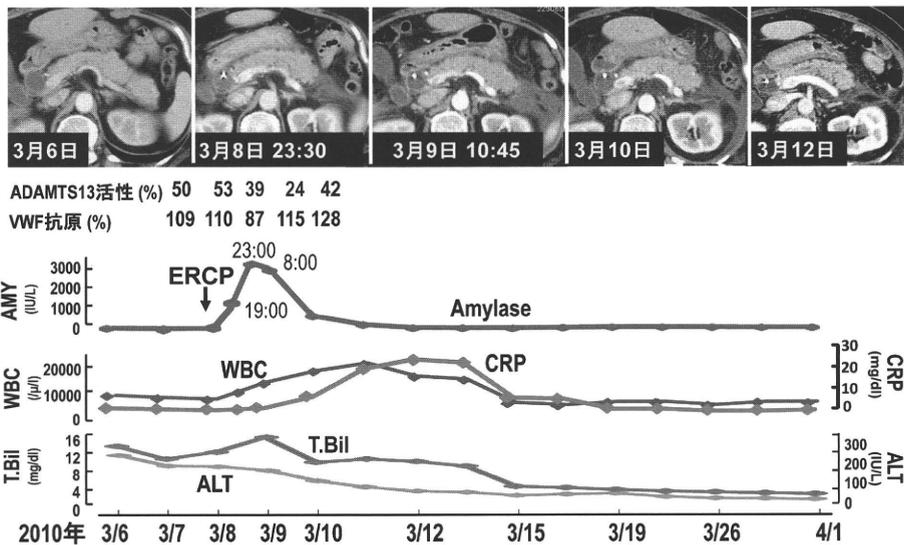


図2 ERCP後膵炎発症例におけるADAMTS13活性の推移

67歳，女性，下部胆管癌．来院時黄疸(T.Bil 12.7 mg/dl)，肝機能障害(AST 76 IU/L, ALT 248 IU/L, ALP 2187 IU/L)を認め，ERBDを施行した(所要時間30分)．ADAMTS13活性は，ERCP前50%，後3時間53%と著変なかったが，ERCP後7時間では39%と低下し，翌朝には24%と半減した

た．VWF抗原は，入院時142%，翌日253%と軽度増加したが，以後133%から111%にまで低下した．

3. ERCP前後における血漿ADAMTS13活性の動態

SAPを発症した1例は67歳，女性，下部胆管癌であり，来院時黄疸(T.Bil 12.7 mg/dl)，肝機能障害(AST 76 IU/L, ALT 248 IU/L, ALP 2187 IU/L)を認め，ERBD施行例(所要時間30分)であった．ADAMTS13活性は，ERCP前50%，後3h 53%と著変なかったが，ERCP後7hでは39%と低下し，翌朝には24%と半減した(図3)．胆管閉塞による胆管炎併発例の2例では，増加したVWF抗原は再開通後低下した(311% → 232% → 101%, 333% → 346% → 116%)．ERCP後ADAMTS13活性が前値の15%以上低下した群(n=9)は非低下群(n=13)に比し，ERCP前のVWFが高値であった(179% vs. 92%)．

D. 考察

SAPにおける血漿ADAMTS13活性はSAP早期には健常者の1/3に低下し，死亡例では10%程度にまで著減するが，生存例では徐々に上昇した．この際，ADAMTS13活性が低いほどAPACHE IIスコアは高く，多臓器不全

合併例では非合併例に比し著しい低値を示した．さらに，UL-VWFMは，ADAMTS13活性著減，高度な低Ca血症，acidosis，高サイトカイン血症合併例に高率に検出された．これらの結果は，ADAMTS13活性の低下とVWF抗原の増加が急性膵炎の重症度ならびに多臓器不全の進展と密に関連し，SAPの予後の指標になり得る可能性を示唆している^{1,2)}．

従来より，急性膵炎患者の重症化にEt血症の関与が示唆されている^{24,25)}．急性膵炎の40-66%に血中Etが検出され，多臓器不全合併例では非合併例に比し，より高率にEt血症が検出されるという²⁴⁾．また，経過中，抗Et抗体の力価が低下する例では，多臓器不全がより高度で，予後不良という成績が出されている²⁵⁾．今回，検討したSAPの血漿Etは，発症早期に健常人の6~10倍高値であり，壊死性膵炎非合併生存例では徐々に低下したが，壊死性膵炎合併例ではさらに上昇し，回復期に健常者の2倍程度にまで低下した．死亡例の2例では著明な高値を示した．この際，Et濃度が50 pg/ml以上の群はそれ以下の群に比して，ADAMTS13活性は低値であり，Et濃度が高いほど，VWF抗原/ADAMTS13活性比が高値を示した．これらの結果は，SAP発症早期にみられる高度なEt血症は，ADAMTS13活性

の低下と関連し膵炎の重症化に関わっている可能性を示唆している。

急性膵炎における Et 血症の機序として bacterial translocation が重要視されており、発症早期における腸管透過性の亢進の程度が血中 Et の上昇ならびに多臓器不全発症と密に関連するという²⁶⁾。Et は好中球、単球など種々の細胞を活性化し、炎症性サイトカイン、活性酸素などの多くの液性活性因子の産生を誘導することにより、重症感染症における病態形成の中心的な役割を担っている²⁷⁾。Et は血管内皮細胞からの VWF の放出を増加させること²⁸⁾、全身炎症性反応と関連した ADAMTS13 活性の低下は血漿中の UL-VWFM の形成を促すこと¹¹⁾、さらに健常ボランティアに Et を静注すると、急性炎症反応が惹起され、血漿 ADAMTS13 活性の低下と共に UL-VWFM が出現すること²⁹⁾が確認されている。これらの報告は我々の成績を支持するものであるが、今後 Et による ADAMTS13 活性低下の機序をサイトカインとの関連のもとにさらに検討していく必要がある。

一方、Et 等により誘導されたサイトカインは全身諸臓器へ好中球の集積と活性化をもたらし過剰の PMNE を分泌させる^{30,31)}。血中 PMNE は急性膵炎重症化の予知マーカーとしても注目されており、発症早期(第1~2病日)の血中 PMNE 上昇の程度により軽症膵炎と合併症を伴う重症膵炎との鑑別が可能であるという^{30,31)}。今回、血漿 PMNE 濃度は、入院第1~2病日には健常者に比し3~7倍高値を示した。この際、Necrosectomy 施行例は非施行例に比し、第2病日 PMNE はより高値を示し、多臓器不全合併例は非合併例に比し、第1~2病日の PMNE は高い傾向にあった。発症早期の PMNE が高い程、ADAMTS13 活性は低値を示し、IL-6、IL-8 は高値であった。これらの結果は、SAP 発症早期の PMNE 濃度は炎症性サイトカインの上昇と相俟って増加し、ADAMTS13 活性の低下と関連することを示唆している。最近、ADAMTS13 はトロンビン、プラスミン、PMNE によって分断されることが判明している³²⁾が、SAP の際、ADAMTS13

分子がこれらプロテアーゼによりどのような修飾を受けているか否か今後検討していく必要がある。

ところで、日本人の ADAMTS13 遺伝子多型として発見され、血栓性疾患との関連で注目されている P475S 変異(1423C>T)¹⁶⁾について検討した結果、P475S のヘテロ変異が、SAP12 症例中3症例(25%)にみられ、日本人の一般健常人(9.5%)¹⁶⁾に比し高頻度の傾向にあった。この変異は欧米人では全く認められず、アジア人特有の変異と考えられる点は興味深い³³⁾。また、Hela 細胞を用いた P475S の発現実験を行った際、ADAMTS13 は培養上清に分泌されるが、その酵素活性は尿素存在下に測定する VWFM アッセイでは著しい低活性を示した¹⁶⁾。従って、今回 SAP12 例中 P475S 変異を検出し得た3例では、膵炎がより重症化しやすい素因を有している可能性があり、今後多数例での検討を要する。

SAP における perfusion CT 像と血漿 ADAMTS13 活性の動態との関連について、入院時 perfusion CT において膵壊死が50%以上であった死亡例の ADAMTS13 活性は、入院時21%と著減し、第3病日に29%と軽度上昇したが、以後11%~19%の低値を持続した(図1)。一方、膵 perfusion CT で壊死領域は認められなかった生存例の ADAMTS13 活性は入院時43%、翌日には85%と上昇、以後84%~118%を推移した。今回、少数例の検討ではあるが、血漿 ADAMTS13 活性は膵壊死領域の程度、重症度と関連する可能性が示唆され、今後さらに検討を要する。

急性膵炎の成因は平成21年度の全国調査によるとアルコール性が最も多く(32.8%)、次いで胆石(25.6%)、特発性(17.9%)、慢性膵炎(5.5%)、診断的 ERCP(3.3%)、内視鏡的乳頭処置(2.0%)の順であり、ERCP 関連膵炎の発症頻度は決して低率ではない³⁴⁾。ERCP 関連膵炎の早期診断として、最近 ERCP3 時間急性膵炎臨床診断暫定基準案が設けられており、ERCP 後3時間以内の上腹部自発痛と圧痛の出現、血中膵酵素の上昇(正常値の5倍以上)、翌日膵に急性膵炎に伴う画像異常がある

ことなどが提唱されている³⁵⁾。そこで、今回 ERCP 前、3 時間、翌朝の 3 点で血漿 ADAMTS13 を測定した結果、ERCP 後に SAP を発症した 1 例の ADAMTS13 活性は、ERCP 前 50%、後 3 h 53% と著変なかったが、ERCP 後 7 h では 39% と低下し、翌朝には 24% と半減した(図 2)。胆管閉塞による胆管炎併発例では、増加した VWF 抗原は再開通後に低下した。また、ERCP 後、ADAMTS13 活性が前値の 15% 以上低下した群は非低下群に比し、ERCP 前の VWF が約 2 倍高値であった。これらの結果は、ADAMTS13 活性と本酵素の基質である VWF 抗原の推移は、ERCP 後膵炎の発症・進展ならびに ERCP 前後の急性炎症性反応の程度と関連する可能性を示唆している。ERCP 関連膵炎の発症要因として、膵管内圧の上昇、トリプシンの活性化が重要視されている³⁶⁾。患者因子としては年齢、乳頭機能不全、ERCP 後膵炎の既往、技術因子としては 2 回以上の膵管造影、副乳頭切開術、術者に初心者が含まれるなどが列記されている³⁷⁾が、ADAMTS13 活性の推移が ERCP 関連膵炎の発症の早期診断、病態把握に有用か否か、今後さらに検討する必要がある。

E. 結論

重症急性膵炎における ADAMTS13 活性の著減と UL-VWFM の著増といった酵素・基質の不均衡は、明らかな DIC 徴候の無い時期に、既に VWF 依存性血小板過凝集から易血栓形成機序を介して膵微小循環障害から多臓器不全に至る病態形成に密に関与している可能性が示唆された。この際、発症早期の血漿 ADAMTS13 活性の低下は、サイトカイン血症と共に、エンドトキシン血症ならびに PMNE の上昇と密に関連している可能性がある。ADAMTS13 遺伝子多型である P475S のヘテロ変異は、SAP の約 1/4 に検出され、今後 SAP 発症素因との関連を解析していく必要がある。ERCP 後の ADAMTS13 活性の推移は、膵炎ならびに胆管炎等による急性炎症性反応の消長と関連する可能性が示唆された。

F. 参考文献

1. 植村正人. 重症急性膵炎における ADAMTS13 活性の動態とその臨床的意義. 厚生労働科学研究費補助金 難治性疾患克服事業 難治性膵疾患に関する調査研究(研究代表者 下瀬川徹). 平成 21 年度 総括・総合研究報告書 2010; p114-22.
2. Morioka C, Uemura M, Matsuyama T, Matsumoto M, Kato S, Ishikawa M, Ishizashi H, Fujimoto M, Sawai M, Yoshida M, Mitoro A, Yamao J, Tsujimoto T, Yoshiji H, Urizono Y, Hata M, Nishino K, Okuchi K, Fujimura Y, Fukui H. Plasma ADAMTS13 activity parallels the APACHE II score, reflecting an early prognostic indicator for patients with severe acute pancreatitis. *Scand J Gastroenterol* 2008; 43: 1387-96.
3. 廣田昌彦. 1. 急性膵炎 2. 成因と病態 日本内科学会雑誌 2010; 99: 9-14.
4. Otsuki M, Hirota M, Arata S, et al. Research Committee of Intractable Diseases of the Pancreas. Consensus of primary care in acute pancreatitis in Japan. *World J Gastroenterol*. 2006; 12: 3314-23.
5. Al Mofleh IA. Severe acute pancreatitis: pathogenetic aspects and prognostic factors. *World J Gastroenterol* 2008; 14: 675-84.
6. Cuthbertson CM, Christophi C. Disturbances of the microcirculation in acute pancreatitis. *Br J Surg* 2006; 93: 518-530.
7. Foitzik T, Eibl G, Hotz B, et al. Persistent multiple organ microcirculatory disorders in severe acute pancreatitis: experimental findings and clinical implications. *Dig Dis Sci* 2002; 47: 130-8.
8. Moake JL Thrombotic microangiopathies. *N Engl J Med* 2002; 347: 589-99.
9. Fujimura Y, Matsumoto M, Yagi H, Yoshioka A, Matsui T, Titani K. von Willebrand factor-cleaving protease and Upshaw-Schulman syndrome. *Int J Hematol* 2002; 75: 25-34.
10. Uemura M, Fujimura Y, Ko S, Matsumoto M, Nakajima Y, Fukui H. Pivotal role of ADAM-

- TS13 function in liver diseases. *Int J Hematol* 2010; 91: 20–29.
11. Claus RA, Bockmeyer CL, Sossdorf M, Lösche W. The balance between von-Willebrand factor and its cleaving protease ADAMTS13: biomarker in systemic inflammation and development of organ failure? *Curr Mol Med* 2010; 10: 236–248.
 12. Olsen H. Thrombotic thrombocytopenic purpura as a cause of pancreatitis. Report of a case and review of the literature. *Am J Dig Dis* 1973; 18: 238–46.
 13. Swisher KK, Doan JT, Vesely SK, Kwaan HC, Kim B, Lämmle B, Kremer Hovinga JA, George JN. Pancreatitis preceding acute episodes of thrombotic thrombocytopenic purpura-hemolytic uremic syndrome: report of five patients with a systematic review of published reports. *Haematologica* 2007; 92: 936–43.
 14. Boyer A, Chadda K, Salah A, Bonmarchand G. Thrombotic microangiopathy: an atypical cause of acute renal failure in patients with acute pancreatitis. *Intens Care Med*. 2004; 30: 1235–9.
 15. Vergara M, Modolell I, Puig-Divi V, Guarner L, Malagelada JR. Acute pancreatitis as a triggering factor for thrombotic thrombocytopenic purpura. *Am J Gastroenterol* 1998; 93: 2215–8.
 16. Kokame K, Matsumoto M, Soejima K, Yagi H, Ishizashi H, Funato M, Tamai H, Konno M, Kamide K, Kawano Y, Miyata T, Fujimura Y. Mutations and common polymorphisms in ADAMTS13 gene responsible for von Willebrand factor-cleaving protease activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99: 11902–11907.
 17. Tsuji Y, Yamamoto H, Yazumi S, Watanabe Y, Matsueda K, Yamamoto H, Chiba T. Perfusion computerized tomography can predict pancreatic necrosis in early stages of severe acute pancreatitis. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2007; 5: 1484–1492.
 18. Ogawa M, Hirota M, Hayakawa T, Matsuno S, Watanabe S, Atomi Y, Otsuki M, Kashima K, Koizumi M, Harada H, Yamamoto M, Nishimori I. Development and use of a new staging system for severe acute pancreatitis based on a nationwide survey in Japan. *Pancreas* 2002; 25: 325–30.
 19. Takeda K. Antiproteases in the treatment of acute necrotizing pancreatitis: continuous regional arterial infusion. *JOP* 2007; 8(4 Suppl): 526–32.
 20. Kato S, Matsumoto M, Matsuyama T, Isonishi A, Hiura H, Fujimura Y. Novel monoclonal antibody-based enzyme immunoassay for determining plasma levels of ADAMTS13 activity. *Transfusion* 2006; 46: 1444–52.
 21. Obayashi T. Addition of perchloric acid to blood samples for colorimetric limulus test using chromogenic substrate: Comparison with conventional procedures and clinical applications. *J Lab Clin Med* 1984; 104: 321–330.
 22. Obayashi T, Tamura H, Tanaka S, Ohki M, Takahashi S, Arai M, Masuda M, Kawai T. A new chromogenic endotoxin-specific assay using recombinant limulus coagulation enzymes and its clinical applications. *Clinica Clinica Acta* 1985; 149: 55–65.
 23. 武田和憲, 片岡慶正, 竹山宣典, 廣田昌彦, 多田真輔, 辻喜久, 木村憲治, 桐山勢生, 古谷智規, 下瀬川徹. 急性膵炎重症化の早期予知としての perfusion CT の有用性の検討—特に膵 perfusion CT 施行時の被曝線量の低減について— 厚生労働科学研究費補助金 難治性疾患克服事業 難治性膵疾患に関する調査研究(研究代表者 下瀬川徹) 平成21年度 総括・分担研究報告書 2010, p52–54.
 24. Fossard DP, Kakkar VV. The Limulus test in experimental and clinical endotoxaemia. *Br J Surg* 1974; 61: 798–804.
 25. Bose SM, Verma GR, Mazumdar A, Giridhar M, Ganguly NK. Significance of serum endotoxin and antiendotoxin antibody levels in predicting the severity of acute pancreatitis. *Surg Today* 2002; 32: 602–607.
 26. Ammori BJ, Leeder PC, King RF, Barclay GR, Martin IG, Larvin M, McMahon MJ. Early in-

- crease in intestinal permeability in patients with severe acute pancreatitis: correlation with endotoxemia, organ failure, and mortality. *J Gastrointest Surg*. 1999; 3: 252-262.
27. Opal SM. The host response to endotoxin, antilipopolysaccharide strategies, and the management of severe sepsis. *Int J Med Microbiol* 2007; 297: 365-377.
 28. Reidy MA, Chopek M, Chao S, McDonald T, Schwartz SM. Injury induces increase of von Willebrand factor in rat endothelial cells. *Am J Pathol* 1989; 134: 857-864.
 29. Reiter RA, Varadi K, Turecek PL, Jilma B, Knöbl P. Changes in ADAMTS13 (von-Willebrand-factor-cleaving protease) activity after induced release of von Willebrand factor during acute systemic inflammation. *Thromb Haemost* 2005; 93: 554-558.
 30. Gross V, Schölmerich J, Leser HG, Salm R, Lausen M, Rückauer K, Schöffel U, Lay L, Heinisch A, Farthmann EH. Granulocyte elastase in assessment of severity of acute pancreatitis. Comparison with acute-phase proteins C-reactive protein, alpha 1-antitrypsin, and protease inhibitor alpha 2-macroglobulin. *Dig Dis Sci* 1990; 35: 97-105.
 31. Viedma JA, Pérez-Mateo M, Agulló J, Domínguez JE, Carballo F. Inflammatory response in the early prediction of severity in human acute pancreatitis. *Gut* 1994; 35: 822-827.
 32. Hiura H, Matsui T, Matsumoto M, Hori Y, Isonishi A, Kato S, Iwamoto T, Mori T, Fujimura Y. Proteolytic fragmentation and sugar chains of plasma ADAMTS13 purified by a conformation-dependent monoclonal antibody. *J Biochem* 2010; 148: 403-411.
 33. Fujimura Y, Matsumoto M, Kokame K, Isonishi A, Soejima K, Akiyama N, Tomiyama J, Natori K, Kuranishi Y, Imamura Y, Inoue N, Higasa S, Seike M, Kozuka T, Hara M, Wada H, Murata M, Ikeda Y, Miyata T, George JN. Pregnancy-induced thrombocytopenia and TTP, and the risk of fetal death, in Upshaw-Schulman syndrome: a series of 15 pregnancies in 9 genotyped patients. *Br J Haematol* 2009; 144: 742-754.
 34. 下瀬川徹, 佐藤賢一, 正宗 淳, 他. 急性膵炎, 重症急性膵炎の全国調査. 厚生労働科学研究費補助金 難治性疾患克服事業. 難治性膵疾患に関する調査研究(研究代表者 下瀬川徹) 平成21年度 総合研究報告書 2010; p35-8.
 35. 峯 徹哉, 明石隆吉, 五十嵐良典, 大原弘隆, 川口義明, 宮川宏之, 西森 功, 森實敏夫, 伊藤鉄英, 入澤篤志, 片岡慶正, 木田光弘, 吉田仁, 花田敬士, 下瀬川徹. ERCP 後膵炎暫定基準案の検証 [共同研究] 厚生労働科学研究費補助金. 難治性疾患克服事業. 難治性膵疾患に関する調査研究(研究代表者 下瀬川徹) 平成21年度 総括・分担研究報告書. 2010, p80-84.
 36. Akashi R, Kiyozumi T, Tanaka T, Sakurai K, Oda Y, Sagara K. Mechanism of pancreatitis caused by ERCP. *Gastrointest Endosc* 2002; 55: 50-54.
 37. Cheng CL, Sherman S, Watkins JL, Barnett J, Freeman M, Geenen J, Ryan M, Parker H, Frakes JT, Fogel EL, Silverman WB, Dua KS, Aliperti G, Yakshe P, Uzer M, Jones W, Goff J, Lazzell-Pannell L, Rashdan A, Temkit M, Lehman GA. Risk factors for post-ERCP pancreatitis: a prospective multicenter study. *Am J Gastroenterol* 2006; 101: 139-147.

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 植村正人, 藤村吉博, 福井 博. 急性膵炎重症化と血漿 ADAMTS13 活性. 「Annual review 消化器 2011, 第Ⅲ章 胆膵-膵臓2」, 林 紀夫, 日比紀文, 上西紀夫, 下瀬川徹, 編. 東京, 中外医学社, 2011年1月刊行予定, p237-244

2. 学会発表

- 1) 森岡千恵, 植村正人, 藤本正男, 松山友美, 松本雅則, 加藤誠司, 石指宏通, 石川昌利, 辻本達寛, 沢井正佳, 吉田太之, 美登路昭, 山尾純一, 瓦谷英人, 山

崎正晴，畑 倫明，西尾健治，奥地一夫，藤村吉博，福井 博．重症急性膵炎における顆粒球エラスターゼと血漿ADAMTS13活性との関連．第96日本消化器病学会総会(新潟)．2010年4月22日～24日．

- 2) 森岡千恵，植村正人，藤本正男，松山友美，松本雅則，加藤誠司，石指宏通，石川昌利，辻本達寛，沢井正佳，吉田太之，美登路昭，山尾純一，瓦谷英人，山崎正晴，畑 倫明，西尾健治，奥地一夫，藤村吉博，福井 博．内視鏡的逆行性膵胆管造影(ERCP)前後におけるADAMTS13活性とVWF抗原の動態．第52日本消化器病学会大会(横浜)，2010年10月13日～16日．

H. 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

インターフェロン制御因子 IRF-2 の膵調節性外分泌における役割と 急性膵炎発症時の分泌抑制との関連の検討

研究報告者 大西洋英 秋田大学大学院医学専攻腫瘍制御医学系消化器内科学講座 教授

共同研究者

真嶋浩聡（秋田大学大学院医学専攻腫瘍制御医学系消化器内科学講座）

【研究要旨】

Irf2^{-/-} マウスの膵腺房細胞では調節性外分泌が障害され、その結果軽度の膵炎が進行している。このマウスは急性膵炎発症初期のモデルであり、急性膵炎発症のメカニズムの解明のために、このモデルを利用して IRF2 の標的分子の解明が急務である。

A. 研究目的

インターフェロン(IFN)は抗ウイルス作用の他に、細胞増殖抑制作用や免疫調節作用など極めて多様な生物活性をもち、I型(IFN- α/β)とII型(IFN- γ)の二つに大別される。IFN系の遺伝子の転写を制御する遺伝子としてIFN制御因子(Interferon Regulatory Factor (IRF))があり、現在9種の遺伝子からなるファミリーを形成している(IRF-1~9)。前年の検討により、*Irf2*^{-/-} マウスにおける膵臓の白色調変化の原因が調節性外分泌の異常であることを我々は明らかにした。

急性膵炎発症時には腺房細胞頂端側からの分泌が障害され、側方基底膜からの分泌が起これ、膵酵素が異所性に活性化し、膵炎が進展すると考えられている¹⁾。今回我々は、*Irf2*^{-/-} マウスの膵臓を詳細に検討し、急性膵炎のモデルとしての可能性を検証した。

B. 研究方法

1. 膵外分泌 *in vitro* モデル細胞を用いた IRF2 の外分泌に及ぼす影響の検討。
2. *Irf2*^{+/-} マウスと *Irf2*^{-/-} マウスの膵におけるオートファジー、トリプシン活性の比較。
3. *Irf2*^{-/-} *Ifnar1*^{-/-} マウスを用いた I 型インターフェロンシグナルの関与の検討。
4. 唾液腺における異常の有無の検討(HE染色, 免疫組織化学, ウェスタンブロット)。
5. 野生型マウス膵における急性膵炎発症時の

IRF2 の発現の変化(ウェスタンブロット)。

これらの動物実験はすべて、秋田大学バイオサイエンス安全委員会の承認を受け(承認番号 1-2019)、秋田大学動物実験規程に基づき施行した。

C. 研究結果

1. 膵外分泌モデルとして AR42J 細胞を使用し、*Irf2*^{-/-} マウスで認められる分泌異常が *in vitro* モデルでも再現されるかどうかを検討した。AR42J 細胞にレトロウイルスを用いて、IRF2 を過剰発現させた細胞(GFPirf2)、DNA 結合部位のみを過剰発現させたドミナントネガティブ細胞(GFPirf2dn)、コントロール細胞(GFPcont)を作成した。コレシストキニン(CCK8)、カルシウムイオノフォア(A23187)、cAMPアゴニスト(8Br-cAMP)で刺激して、そのアミラーゼ分泌を比較検討した(図1)。100pM CCK8, 5 μ M A23187 で刺激すると GFPirf2dn 細胞ではアミラーゼ分泌は抑制され、GFPirf2 細胞では亢進した。500 μ M 8Br-cAMP 単独刺激により誘導されるアミラーゼ分泌は少量のため差がみられなかったが、A23187 と共に培養すると 5 μ M A23187 の分泌刺激を増強し、コントロール細胞と比較して GFPirf2dn 細胞ではアミラーゼ分泌を抑制、GFPirf2 細胞では増強した。以上から、AR42J 細胞でも IRF2 の発現レベルに応じて *Irf2*^{-/-} マウスにみられる分泌異常が再現され、IRF2

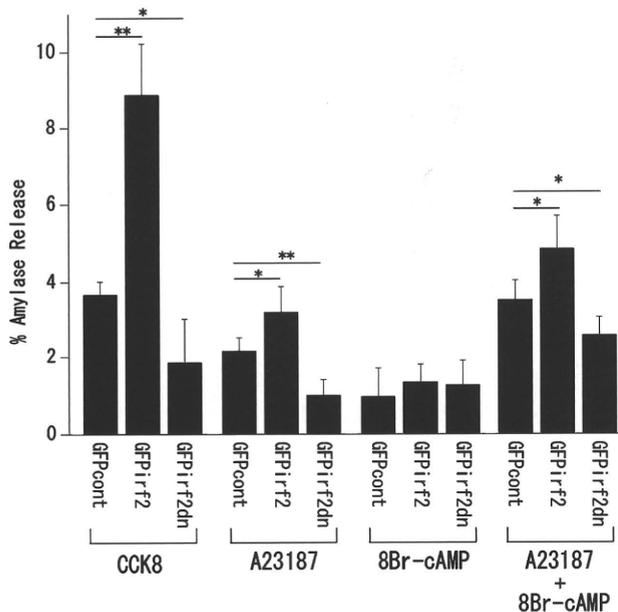


図1 AR42J細胞のアミラーゼ分泌の比較. コントロール細胞(GFPcont), IRF2過剰発現細胞(GFPirf2), IRF2ドミナントネガティブ細胞(GFPirf2dn)を樹立し, 100pM CCK8, 5 μ M A23187, 500 μ M 8Br-cAMPで15分間刺激した時の上清中に分泌されるアミラーゼ量(全体量-持続性分泌量)を比較検討した. GFPirf2細胞ではアミラーゼ分泌は増強され, GFPirf2dn細胞では抑制された. *: $P < .05$, **: $P < .01$

が調節性外分泌に重要な役割を果たしていることが示された.

2. *Irf2*^{-/-}膵腺房細胞を電子顕微鏡で観察すると細胞内に多数の空胞が見られ, その中には電子密度の高い物質や渦巻き状の膜成分も認められた(図2A). ウェスタンブロットでは微小管結合蛋白質LC3の膜結合型(LC3-II)が*Irf2*^{-/-}膵で増加しており, オートファジーが腺房内で進行していることが明らかとなった(図2B). また, 膵ホモジェネートを用いたトリプシン活性の比較でも, *Irf2*^{-/-}膵ではトリプシン活性が亢進していた(図2C). HE染色標本からでは膵炎所見(浮腫, 出血, 好中球浸潤, 壊死)は明らかではないが, *Irf2*^{-/-}膵腺房内で軽度の膵炎が進行していることをこれらは示している.

3. IRF2はIFN系の遺伝子の転写を負に制御する遺伝子であり, *Irf2*^{-/-}マウスではI型インターフェロニンシグナルが常に亢進状態となっている²⁾. この過剰なインターフェロニンシグナルの関与を調べるために, 受容体を欠損したダブルノックアウトマウス*Irf2*^{-/-}*Ifnar1*^{-/-}マ

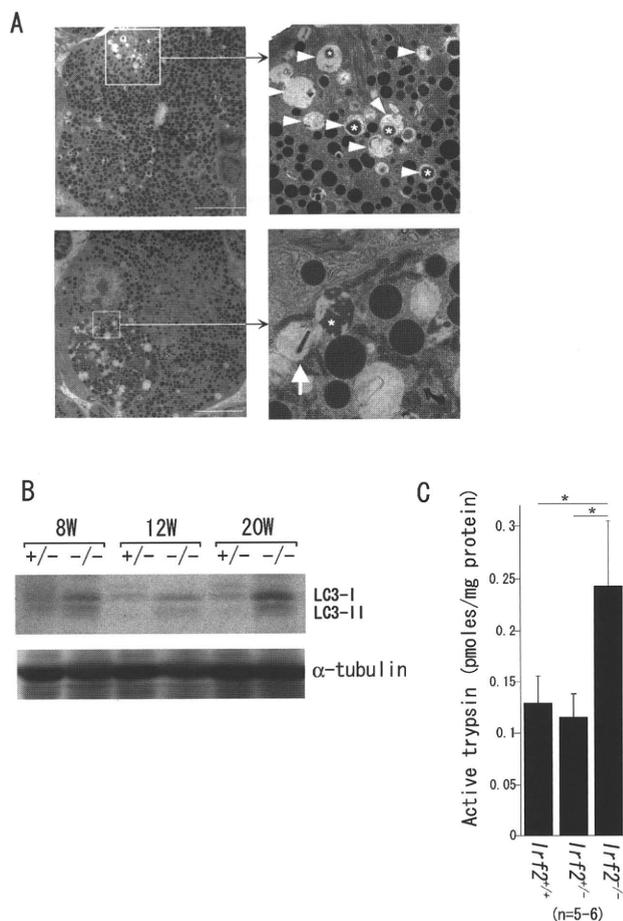


図2 *Irf2*^{-/-}膵腺房細胞内では急性膵炎が進行している. A. *Irf2*^{-/-}膵腺房細胞の電子顕微鏡像. 細胞内に多くの空胞を認める(▲). 空胞内には電子密度の高い酵素顆粒と思われる物質が認められる(*). 渦巻き状の膜成分を含む空胞もあり(↑), オートファジーによるものと考えられる. Bar = 10 μ m. B. 微小管結合蛋白質LC3のウェスタンブロット. 8週齢, 12週齢, 20週齢の*Irf2*^{+/+}, *Irf2*^{-/-}マウスの膵ホモジェネートを用いて, 抗LC3抗体によりウェスタンブロットを行った. α -チューブリンを内部コントロールとした. C. トリプシン活性の測定. 12週齢の*Irf2*^{+/+}, *Irf2*^{+/-}, *Irf2*^{-/-}マウス膵ホモジェネートを用いて, トリプシン活性を測定した. *: $P < .05$

ウスを作成し, その膵臓を検討した. このマウスの膵臓には*Irf2*^{-/-}マウスと同じ異常が見られたことから, 過剰なI型インターフェロニンシグナルはその原因ではないことが明らかとなった.

4. *Irf2*^{+/+}マウスと*Irf2*^{-/-}マウスの唾液腺(顎舌腺, 舌下腺)を切除し, HE染色により形態を, トルイジンブルー染色により酵素顆粒の分布を観察した. マウス間で差を認めず, またSNARE蛋白のウェスタンブロット, SNAP23の局在にも変化を認めなかった.

5. 野生型マウスにセルレイン膵炎を惹起し,

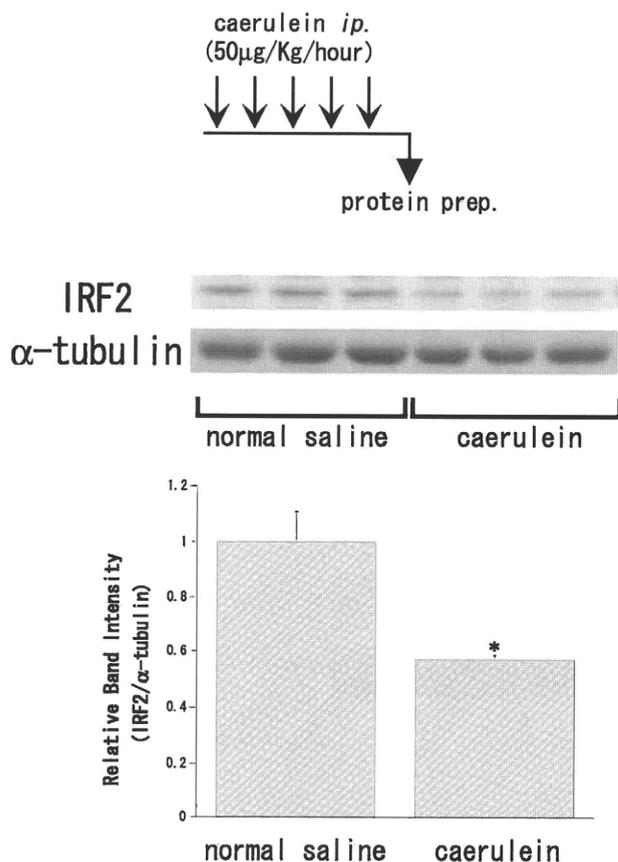


図3 セルレイン膵炎時のIRF2の発現の変化.
野生型マウスにセルレイン(50 μ g/kg)を1時間ごとに腹腔内に5回投与し、最終投与後1時間で膵臓を摘出し、ウェスタンブロットを行った。バンドの強度をImageJを用いて測定し、定量化した。 α -チューブリンを内部コントロールとした。
*: $P < .05$

IRF2の発現の変化を検討した。膵炎発症時IRF2の発現低下が認められ(図3)、この発現低下はセルレイン初回注射後1時間でも認められたことから膵炎発症のごく初期の段階でIRF2が関与している可能性が示唆された。

D. 考察

Irf2^{-/-}マウスの膵腺房細胞では調節性外分泌が障害されているが、膵腺房細胞のモデル細胞を使ってもIRF2が調節性外分泌に重要な役割を果たしていることが証明された。調節性外分泌が障害され、酵素顆粒が細胞内に充満する結果、*Irf2*^{-/-}膵腺房細胞内ではオートファジー、トリプシンの活性化が起こり、軽度の膵炎が進行する。この異常は亢進したI型インターフェロンシグナルが原因ではなく、IRF2の特異的な機能障害が原因と考えられる。また唾液腺には異常を認めないことから膵外分泌特

異的な異常である。急性膵炎実験モデルにおいて、膵炎発症早期にIRF2の発現低下がみられることから、IRF2は膵炎発症に重要な役割を果たしている可能性が示唆される。IRF2は転写因子であり、その標的となる分子の解明が今後の重要な課題である。また、最近IRF3がBaxと直接結合し、アポトーシスを制御していることが示され³⁾、IRF2もある分子の機能を直接制御している可能性もある。

E. 結論

Irf2^{-/-}マウスの膵腺房細胞では調節性外分泌の障害から軽度の膵炎が細胞内で進行しており、急性膵炎の発症初期のモデルである。

F. 参考文献

1. Gaisano HY, Gorelick FS. New Insight Into the Mechanisms of Pancreatitis. *Gastroenterology* 2009; 136: 2040-2044.
2. Matsuyama T, Kimura T, Kitagawa M, Pfeffer K, Kawakami T, Watanabe N, Kungdig TM, Amakawa R, Kishihara K, Wakeham A, Potter J, Furlonger C, Narendran A, Suzuki H, Ohashi PS, Paige CJ, Taniguchi T, Mak TW. Targeted Disruption of IRF-1 or IRF-2 Results in Abnormal Type I IFN Gene Induction and Aberrant Lymphocyte Development. *Cell* 1993; 75: 83-97.
3. Chattopadhyay S, Marques JT, Yamashita M, Peters KL, Smith K, Desai A, Williams BRG, Sen GC. Viral Apoptosis is Induced by IRF-3-mediated Activation of Bax. *EMBO* 2010; 29: 1762-1773.

G. 研究発表

1. 論文発表

真嶋浩聡, 大西洋英. 膵外分泌における腺房細胞内情報伝達と分子メカニズム. *胆と膵* 2010; 31: 535-539.

2. 学会発表

- 1) Mashima H, Sato T, Horie Y, Ohteki T, Ohnishi H. Interferon regulatory factor-2 plays a pivotal role in exocytosis in pan-

creatic acinar cells. Digestive Disease Week 2010, New Orleans, 2010.5.2-5 (AGA Distinguished Abstract Plenary, oral presentation)

- 2) Mashima H, Sato T, Horie Y, Ohteki T, Ohnishi H. IRF-2 plays a pivotal role in exocytosis in pancreatic acinar cells. Joint Meeting of the International Association of Pancreatology and the Japan Pancreas Society 2010, Fukuoka, 2010.7.11-13.
- 3) 真嶋浩聡, 堀江泰夫, 大西洋英 : IRF-2 は膵腺房細胞の調節性外分泌機構に重要な役割を果たす—*Irf2*^{-/-} 膵 : 急性膵炎における膵外分泌異常のモデルとしての可能性—(パネルディスカッション) 第18回 JDDW, 横浜, 2010.10.13-16.

H. 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

急性膵炎重症化因子としての内臓脂肪の影響

研究報告者 杉山政則 杏林大学医学部外科 教授

共同研究者

鈴木 裕，中里徹矢，長尾 玄（杏林大学医学部外科）

【研究要旨】

〔目的〕急性膵炎重症化因子における肥満のタイプ，とくに内臓脂肪の影響を検討。

〔対象〕当院で治療された急性膵炎症例32例。

〔方法〕初診時臨床病理学的因子（年齢，性別，発熱，血液検査値）とBMI，腹囲，内臓脂肪面積，皮下脂肪面積を検討項目とし統計学的に急性膵炎の重症化リスク，局所および全身合併症発生率を検討。重症膵炎は厚生労働省のスコアにて診断。

〔結果〕重症例11例，軽症例21例。局所合併症例は7例，全身合併症は3例で，死亡例は認めず。重症化はSIRS項目3項目以上，白血球数の多い症例が有意に多い結果であった。局所合併症例はAMYが有意に低く，脈拍数が有意に多い結果となった。全身合併症はSIRS項目数3項目以上，Alb低値，CRP高値，脈拍数が有意差を認めた。

〔結論〕今回の検討では肥満や内臓脂肪の急性膵炎重症化・合併症発生率には大きく影響しないと思われた。SIRS項目数の増加や発熱・脈拍数の増加などは重症化や局所・全身合併症などの病状進展を視野に入れ加療すべきと思われた。

A. 研究目的

近年，急性膵炎と肥満の関係を論じた論文が数多くみられる。欧米諸国の英文論文では局所合併症や全身合併症との相関があり，致死率との相関は低いという報告が多い¹⁾。これは，各ガイドラインに反映されており，英国のガイドラインでは肥満は重要な予後規定因子として推奨され（推奨度B）²⁾，多施設によるガイドラインでもBody mass index (BMI) 30 kg/m²以上は死亡率を増加させるとしている³⁾。本邦も例外ではなく，急性膵炎ガイドライン—第3版—では，極度の肥満(BMI 30 kg/m²以上)は重症化に影響する（推奨度A）と位置付けている。しかし，本研究班で以前行われた調査では，BMIと重症化率，致死率は相関しないと報告されている。これより，内臓脂肪型肥満・皮下脂肪型肥満などの肥満のタイプの違いが急性膵炎の重症化に影響している可能性が考えられた。

本研究の目的は，急性膵炎重症化因子における，肥満のタイプ，とくに内臓脂肪の影響を解析することである。

B. 研究方法

対象は2006年から2010年まで当院で治療された急性膵炎症例32例（男性28例，女性4例）。重症膵炎の基準は2008年の厚生労働省急性膵炎重症度判定基準をもとに定義し，重症例11例，軽症例21例であった。これらに対し，各臨床病理学的項目（性別，年齢，体温，脈拍数，呼吸回数，初診時血液検査所見(Hct，白血球数，アミラーゼ，アルブミン，Ca，CRP)，全身性炎症反応症候群 Systemic Inflammatory Response Syndrome: SIRS)診断基準における陽性項目数，BMI，腹囲，皮下脂肪面積，内臓脂肪面積，内臓脂肪率(内臓脂肪面積/総脂肪面積))について，急性膵炎重症化，局所合併症(膵壊死，膵膿瘍，膵仮性嚢胞)，全身合併症(腎不全，ショック，呼吸不全)の予測因子を χ^2 検定，およびMann-Whitney U検定を用いて統計学的に解析した。なお，皮下脂肪面積と内臓脂肪面積はFat Scan Ver4.1(N2システム株式会社)を用いて，初診時に撮影されたCT画像のPacs Dataより臍レベルで測定した。

C. 研究結果

重症例11例，軽症例21例．局所合併症例は7例，全身合併症は3例で，死亡例は認めず．局所合併症の内訳は，腭壊死が4例，腭膿瘍が2例，腭仮性嚢胞が8例であった．全身合併症の3例は全て呼吸不全で，腎不全やショック，死亡例は認めなかった．

(1) 急性腭炎重症化の予測因子

急性腭炎重症化の予測因子としては白血球数とSIRS項目3項目以上，が抽出された(表1)．

(2) 局所合併症の危険因子

局所合併症の発生はAMY値が低い症例に有意に多く，脈拍数が有意に多い結果であった．

(3) 全身合併症の危険因子

全身合併症の危険因子としては脈拍数が多い症例，CRPが高い症例，血清アルブミンが低い症例が有意差をもって抽出された．

D. 考察

本研究は，急性腭炎重症化の予測因子と局所合併症および全身合併症の危険因子をretrospectiveに解析しようとするものである．とくに，CT画像より内臓脂肪計測ソフトであるFat Scanを用いて得られた内臓脂肪，皮下脂肪の急性腭炎重症化，局所合併症発生，

全身合併症発生への影響を検討した．近年の肥満と急性腭炎に関する報告では，BMI 25から30 kg/m²をカットオフ値として局所合併症や全身合併症が肥満例に多いとの報告が多い¹⁾．しかし，本邦ではBMIと致死率・重症化率と

表2 局所合併症の危険因子

	局所合併症		p 値
	あり(7例)	なし(25例)	
性別 男性	5(71.4%)	23(92.0%)	0.201
女性	2(28.6%)	2(8.0%)	
年齢	53±5	52±20	0.600
体温(°C)	37.0±1.1	36.9±6.6	0.858
脈拍数(/min)	103±25	78±18	0.024
呼吸回数(/min)	19±5	19±4	0.775
Hct(%)	42.3±9.4	44.3±5.2	0.837
WBC(/m ³)	16,743±8,018	12,700±4,924	0.179
Alb(g/dl)	3.3±0.8	3.9±0.5	0.082
AMY(IU/L)	343.3±312.9	916±758.8	0.030
Ca(mg/DL)	8.5±1.0	8.5±1.1	0.927
CRP(mg/DL)	6.1±7.2	1.8±3.0	0.170
SIRS 陽性項目 3項目以上	3(42.9%)	2(8.0%)	0.057
腹囲(cm)	90.0±17.9	89.4±13.4	0.837
BMI(kg/m ²)	21.7±3.7	23.9±4.4	0.350
内臓脂肪面積 (cm ²)	130.0±76.7	117.1±35.1	0.982
皮下脂肪面積 (cm ²)	127.0±59.2	132.0±58.9	0.802
内臓脂肪率	0.497±0.2	0.477±0.1	0.569

表3 全身合併症の危険因子

	全身合併症		p 値
	あり(3例)	なし(29例)	
性別 男性	3(100%)	25(86.2%)	1.000
女性	0(0%)	4(13.8%)	
年齢	50±5	53±19	0.307
体温(°C)	37.5±1.3	36.8±0.7	0.516
脈拍数(/min)	119.7±21.5	80.8±18.9	0.030
呼吸回数(/min)	25±4.4	18.3±3.7	0.196
Hct(%)	39.3±14.5	44.3±5.0	0.161
WBC(/m ³)	20,866.7±6,353.2	12,831.0±5,347.3	0.095
Alb(g/dl)	2.6±0.8	3.9±0.5	0.003
AMY(IU/L)	201.0±56.7	851.8±733.0	0.203
Ca(mg/DL)	7.8±1.1	8.6±1.1	0.335
CRP(mg/DL)	13.3±4.1	1.7±2.8	0.024
SIRS 陽性項目 3項目以上	2(66.7%)	3(10.3%)	0.056
腹囲(cm)	102.6±18.6	88.2±13.3	0.342
BMI(kg/m ²)	24.0±3.2	23.3±4.4	0.298
内臓脂肪面積 (cm ²)	177.5±90.0	113.8±36.9	0.347
皮下脂肪面積 (cm ²)	151.6±59	128.7±58.6	0.758
内臓脂肪率	0.53±0.06	0.48±0.1	0.521

表1 急性腭炎重症化の危険因子

	重症例(11例)	軽症例(21例)	p 値
性別 男性	8(72.7%)	20(95.2%)	0.106
女性	3(27.3%)	1(4.8%)	
年齢	56±18	50±18	0.361
体温(°C)	36.9±0.9	36.9±0.7	0.490
脈拍数(/min)	99±26	80±20	0.092
呼吸回数(/min)	21±4	18±4	0.105
Hct(%)	43.2±8.3	44.2±5.0	0.677
WBC(/m ³)	17,718±6,334	11,419±4,297	0.007
Alb(g/dl)	3.5±0.8	3.9±0.5	0.189
AMY(IU/L)	779.0±597.2	797.0±794.7	0.706
Ca(mg/DL)	8.2±1.2	8.7±1.0	0.292
CRP(mg/DL)	5.1±6.5	1.5±2.4	0.202
SIRS 陽性項目 3項目以上	4(36.4%)	1(4.8%)	0.037
腹囲(cm)	93.3±8.3	87.6±10.7	0.513
BMI(kg/m ²)	23.6±4.4	23.3±4.4	0.953
内臓脂肪面積 (cm ²)	125.9±58.1	116.5±39.5	0.677
皮下脂肪面積 (cm ²)	130.8±44.9	130.9±65.0	0.736
内臓脂肪率	0.487±0.1	0.478±0.1	0.275

の相関は低い。本研究でも重症化因子，合併症発症の危険因子としてのBMIは同等であった。Fat Scanを用いて内臓脂肪，皮下脂肪を測定し，急性膵炎との相関を検討した報告はない。

本研究では内臓脂肪面積，皮下脂肪面積，内臓脂肪率のいずれも有意差を認めなかった。ただ，いずれの検討でも重症例，合併症発症例の方が有意差は認めなかったものの内臓脂肪面積や内臓脂肪率が多い傾向であった。今回は初診時のCTを用いて臍レベルの内臓脂肪・皮下脂肪を測定したが，臍レベルへの炎症の波及によって測定値に影響を及ぼした可能性はある。また，今回は32例と症例数も決して多くなく，さらに症例数を増やすことによって有意差が出る可能性はある。

一般的に重症度判定におけるマーカーとしてCRPが有用と認知され，ガイドラインでも推奨度Aと位置付けられ，重症度判定基準の予後因子としてCRP値15 mg/dl以上が採用されている。本研究ではCRPは重症化予測因子や局所合併症危険因子では有意差はなかったが，全身合併症の危険因子として有意に高い結果であった。しかし，重症例や局所合併症合併例においても高い傾向であった。CRPは発症から上昇まで数日の時間差がある。ガイドラインでも，発症より48時間より早期ではCRPは重症化を反映しないこともある，としている。そのため，発症より48時間・72時間後の血液検査値で検討すると有意差を認めた可能性はある。しかし，急性膵炎の重症化や合併症発症のリスクを一日でも早期に察知するには初診時の血液検査値を用いて判定するのが理想であり，そのためには他のマーカーも含めて検討する必要があると思われる。

急性膵炎重症化の予測因子は白血球高値例とSIRS項目3項目以上であり，有意差は認めなかったが脈拍数($p=0.092$)，呼吸回数($p=0.105$)も高値であった。また，局所合併症発生は脈拍数が多く血清AMY値が低い症例に有意に多い傾向であった。有意差はなかったがAlb値が低い場合($p=0.082$)，CRP値の高値例($p=0.170$)も局所合併症合併例に多い傾向であった。全身合併症としての呼吸不全合併例は

Alb値低値例，CRP高値例，血清Alb低値例が有意に多かった。有意差はなかったがWBC高値例($p=0.095$)，SIRS陽性項目3項目以上($p=0.056$)も合併例に多い傾向であった。これらを見ると，WBCやCRPなどの血液検査上の炎症反応だけでなく，脈拍数や呼吸回数などのバイタルサインも重要で軽視してはいけないということであると思われた。また，血清Alb値も急性膵炎重症化におけるマーカーとしての有用性が示唆される結果となった。

E. 結論

急性膵炎重症化，局所合併症・全身合併症発生には内臓脂肪面積，皮下脂肪面積，内臓脂肪率は有意な危険因子とはならなかった。しかし，重症例，合併症発症例の方が有意差は認めなかったものの内臓脂肪面積や内臓脂肪率が多い傾向であり，今後の症例追加によって有意差が出る可能性がある。また，SIRS項目数の増加や発熱・脈拍数の増加などは重症化や局所・全身合併症などの病状進展を視野に入れ加療すべきと思われた。

F. 参考文献

1. 竹山宜典. 急性膵炎重症化因子としての肥満. 肝胆膵 2001; 42: 59-63.
2. UK Working Party on Acute Pancreatitis. UK guidelines for the management of acute pancreatitis. GUT 2005; 54: iii1-iii9.
3. Toouli J, Brooke-Smith M, Bassi C, Carr-Locke D, Telford J, Freeny P, Imirie C, Tandon R. Guidelines for the management of acute pancreatitis. J of Gastroenterology and Hepatology 2002; 17 (Suppl.); S15-S39.

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

重症急性膵炎における好中球由来カテプシン G による 膵組織内アンギオテンシン II 産生系

研究報告者 太田哲生 金沢大学消化器・乳腺・移植再生外科 教授

共同研究者

古河浩之, 中川原寿俊（金沢大学消化器・乳腺・移植再生外科）

【研究要旨】

浮腫性膵炎から壊死性膵炎に至る病態に関して、ラット急性膵炎モデルでの研究を行っている。時間経過とともに膵組織内アンギオテンシン II 含有量が増加しており、膵間質への好中球浸潤も増加していた。アンギオテンシン II 産生系亢進が引き金となり、既存血管の収縮による血流低下が、壊死性膵炎に進展する病態に関与している可能性が推察され、今後さらなる検討予定である。

A. 研究目的

浮腫性膵炎から重症の壊死性膵炎に至る病態に関して多くの研究がなされているが、この機序が十分に解明されているとは言えない。膵内血流低下が、エンドセリンや NO 等と関連することが報告されているが¹⁾、膵炎発症の key molecule である膵トリプシンとの関係が明確ではない。トリプシンは膵炎の発症早期にキニノーゲンを基質にして降圧作用のあるブラジキニンを産生し浮腫性膵炎を引き起こすが、炎症が進行し膵組織の弱酸性下ではアンギオテンシノーゲンを基質にして昇圧作用のあるアンギオテンシン II を産生する²⁾。急性壊死性膵炎の診断の根拠となる膵実質の造影不良域の原因として、アンギオテンシン II 産生系亢進が引き金となり、さらにエンドセリン亢進や NO 低下などが加わって発生する血管収縮による血流低下が関与している可能性が推察される。好中球中のアズール顆粒内にはエラスターゼ以外に、カテプシン G やプロテイナーゼ 3 が含まれており、カテプシン G はレニンアンギオテンシン系非依存性に、アンギオテンシノーゲンを基質にアンギオテンシン II を産生することも知られている³⁾。これらの過程においてヒトでは病変部を採取できず、病態の解明には動物実験が占める割合も大きいいため、この研究を計画した。

B. 研究方法

Wister 系雄ラット (250–300 g) に対し、6% タウロコール酸ナトリウム逆行性膵管内注入 (0.4 mL/kg body weight) にて急性膵炎モデルを作成し、膵組織像の病理学的な検討と、膵組織内アンギオテンシン II 含有量の経時的な測定を行った。さらに急性膵炎モデルにおいて、好中球エラスターゼ阻害薬腹腔内投与 (10 mg/kg body weight) 時における膵組織像を検討した。

C. 研究結果

中間解析 膵炎モデル作成後、時間経過とともに炎症性細胞浸潤の程度と膵壊死巣の範囲が増大しており、膵組織像膵炎モデル作成後、急性膵炎モデルにおける膵組織中のアンギオテン

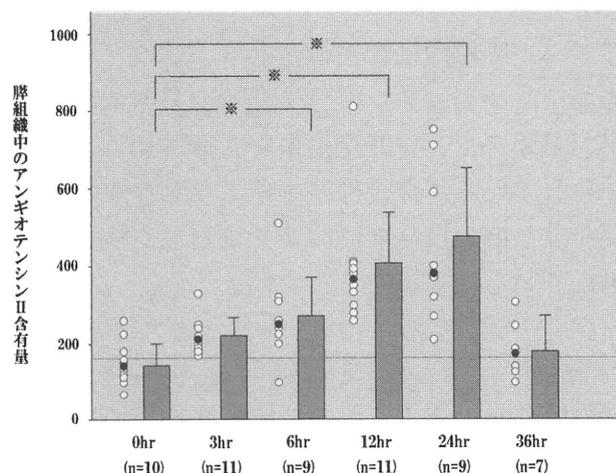


図 1 膵組織中のアンギオテンシン II 含有量の経時的推移

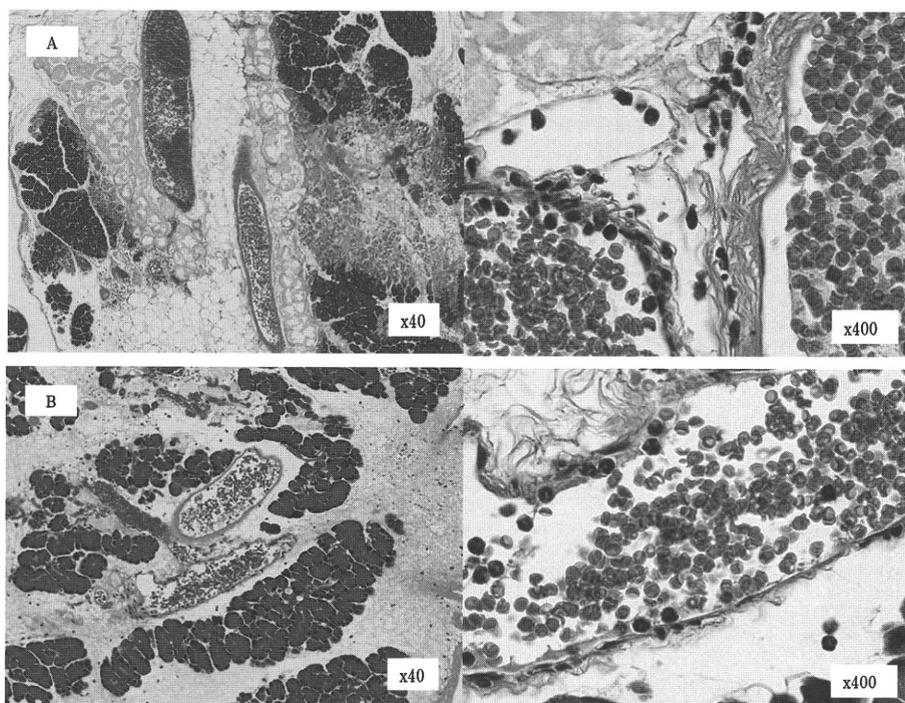


図2 6%タウロコール酸逆行性膵管内注入6時間後ラット急性膵炎組織像
A:好中球エラスターゼ阻害薬非投与時, B:好中球エラスターゼ阻害薬投与時

シンII含有量は、経時的に増加していた(図1)。好中球は主に静脈壁に接着し膵間質内へ浸潤していたが、好中球エラスターゼ阻害薬を投与した場合は、好中球の接着浸潤は比較的軽度であった(図2)。

D. 考察

急性膵炎発症初期における浮腫性膵炎から壊死性膵炎に進展するとともに、レニンアンギオテンシン系非依存性のアンギオテンシンII産生が亢進され、これらによる膵支配動脈の機能的収縮による膵内血流動態の変化が関与していることが推察される。カテプシンGは好中球のアズール顆粒内に存在するセリンプロテアーゼであり、レニンアンギオテンシン系非依存性にアンギオテンシンII産生系を亢進させることが知られている。今後は好中球エラスターゼ阻害薬非投与群と投与群においてさらなる検討を予定している。

E. 結論

急性膵炎モデルにおいて壊死性膵炎に進展する際、アンギオテンシンII産生亢進が関与する可能性が推察された。この機序の解明のためさ

らなる検討予定である。

F. 参考文献

1. Michael D. Menger, Thorsten Plusczyk, and Brigitte Vollmar. Microcirculatory derangements in acute pancreatitis, J Hepatobiliary Pancreat Surg 2001; 8: 187-194.
2. Arakawa K, Ikeda M, Fukuyama J, et al. A pressor formation by trypsin from rennin-denatured human plasma protein, J Clin Endocrinol Metab 1976; 42: 599-602.
3. Lloyd B. Klickstein, Carol E. Kaempfer, and Bruce U. Wintroub. The Granulocyte-Angiotensin System, J Biol Chem, 1982; 257: 15042-6.

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(予定を含む)

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

急性膵炎の発症機構と個体差

研究報告者 廣田昌彦 熊本地域医療センター外科 副院長

共同研究者

大村谷昌樹（熊本大学生命資源研究・支援センター）

【研究要旨】

急性膵炎とはトリプシノーゲンの異所性(膵内)活性化(トリプシン生成)をひきがねとして、組織が膵消化酵素により自己消化を受ける疾病である。膵腺房細胞内では分泌蛋白質の品質管理・処理のために誘導されるオートファジーの機構によりトリプシノーゲンとカテプシンが同一コンパートメント(オートファゴライソゾーム)内に運ばれる。その結果生じるトリプシンの活性が first line defense としての膵分泌性トリプシンインヒビター(PSTI)の制御活性を超えると連鎖的な膵消化酵素の活性化を生じて急性膵炎を生じる。また、膵炎惹起刺激の負荷時にはトリプシノーゲン、PSTI、両者の産生が増加するが、その誘導能には量的個体差があり、それが膵炎の起こしやすさ、起こしにくさに関与すると考えられた。

A. 研究目的

急性膵炎とはトリプシノーゲンの異所性(膵内)活性化(トリプシン生成)をひきがねとして、組織が膵消化酵素により自己消化を受ける疾病である。急性膵炎は良性疾患であるにもかかわらず、重症化すると生命維持が困難な場合も少なくない。そのため、厚生労働省の特定疾患(いわゆる難病)に指定されている。急性膵炎の救命率の向上をはかるためには、その発症機序の把握はきわめて重要である。

われわれは急性膵炎の発症時に膵腺房細胞内で分泌蛋白質の品質管理・処理のために誘導されるオートファジーの機構によりトリプシノーゲンとライソゾーム酵素カテプシンが同一コンパートメント(オートファゴライソゾームと呼ばれる空胞)内に運ばれ、その結果、トリプシノーゲンが活性化されること、を証明した¹⁾。また、同機構に基づいて、急性膵炎の発症、および重症化における個体差に及ぼす事象についても解析した²⁾ので報告する。

B. 研究方法

1. 急性膵炎の発症機構

われわれはこれまでに急性膵炎の発症にオートファジーが関与することを報告してきた。

オートファジーの結果トリプシノーゲンがトリプシンに変換される可能性と、トリプシンを処理する機構としてオートファジーが誘導される可能性の二つが考えられる。この課題を解決するために、オートファジー惹起遺伝子を欠損させたオートファジーを生じないマウスを用いて解析した¹⁾。オートファジー惹起遺伝子を全身的に欠損させると生後1日以内に死亡してしまうため、膵腺房細胞特異的にオートファジー惹起遺伝子をノックアウトしたマウス(膵特異的 *Atg5* 欠損マウス)を作成した¹⁾。

2. 急性膵炎発症における個体差

急性膵炎の惹起刺激時には、トリプシノーゲンも内因性トリプシンインヒビターである PSTI(pancreatic secretory trypsin inhibitor)も産生が亢進する。急性膵炎発症への感受性が異なる5種のマウスを用いて、急性膵炎の発症・重症化における種差と、膵炎感受性規定分子であるトリプシノーゲンと PSTI のマウスホモログ(*Prss1* および *Spink3*)の非刺激時、及び膵炎惹起刺激負荷後の発現量(タンパク質, mRNA)を比較解析した。セルレイン膵炎とコリン欠乏エチオニン食膵炎の系を用いて解析した。また、*Prss1* と *Spink3* の遺伝子配列も解析した²⁾。

(倫理面への配慮)

本研究におけるマウスの取扱いに関しては、National Institute of Health (NIH) animal care guidelines に則って行った。

C. 研究結果

1. 急性膵炎の発症機構

野生型マウスに過度の膵外分泌刺激をかけた場合には、膵腺房細胞内のトリプシン活性が亢進し膵障害が惹起されたのに対し、膵特異的 *Atg5* 欠損マウスでは、過度の膵外分泌刺激をかけても膵腺房細胞内にトリプシン活性は認めず、膵障害も惹起されなかった¹⁾。

以上の結果は、1)膵腺房細胞内での異所性トリプシン生成には分泌蛋白質の品質管理・処理機構としてのオートファジーの誘導が必要であること、2)通常は膵腺房細胞内のトリプシン活性は first line defense である PSTI により阻害されて膵障害は生じないこと、および3)過度の膵外分泌刺激により生じた膵腺房細胞内のトリプシンの活性が PSTI の制御活性を超えると、トリプシンによる連鎖的な膵消化酵素の活性化を生じて膵障害を生じる、ということの意味する。

2. 急性膵炎発症における個体差

膵炎惹起刺激負荷後に、これら膵炎感受性規定分子の産生が亢進する strain と、亢進しない strain があることが判明した。Prss1 (トリプシノーゲンのマウスホモログ)の産生亢進が著明な場合は、膵炎の程度が強く、Spink3 (PSTI のマウスホモログ)の産生亢進が著明な場合は、膵炎抵抗性であった²⁾。なお、上流のプロモーター領域を 3 kb まで塩基配列を解析したところ、Spink3 では3.1%、Prss1 では1.5%の塩基配列の違いを認めた²⁾。おそらく、プロモーター領域に違いがあり、そのため、トリプシノーゲンと PSTI の誘導に個体差を生じているものと考えられた。

また、オートファジーが惹起されていることを示す分子マーカーである LC3-II の誘導は、膵炎惹起刺激後の Spink3 の産生誘導が著明なマウスでは抑制されていた²⁾。

D. 考察

1. 急性膵炎の発症機構

膵腺房細胞が分泌刺激を受け取ると、膵消化酵素(トリプシノーゲンを含む)の産生とザイモジェングラニュールの管腔側への移動、分泌が開始される。その過程でザイモジェングラニュールの一部は、分泌蛋白質の品質管理・処理機構としてのオートファジー系へと運ばれる。その結果、ライソゾーム酵素とトリプシノーゲンが同一コンパートメント内(オートファゴライソゾーム)に存在することになり、ライソゾーム酵素であるカテプシンによりトリプシノーゲンが活性化されることになる(トリプシン生成)。しかし、通常はザイモジェングラニュール内に PSTI が存在するため、トリプシン活性は抑制され、膵炎は生じない。

ところが、膵管閉塞、過剰な膵外分泌刺激時には、オートファジー系で処理されるザイモジェングラニュール量が増える。胆石性膵炎や ERCP 後膵炎では前者、アルコール性膵炎では後者を主体とした multifactorial な機序と考えられる。その結果、オートファジーにより生成するトリプシンの量が PSTI の活性を上回ると、連鎖的な膵消化酵素の活性化から膵の自己消化、すなわち急性膵炎を発症することになる。われわれはこの機構をオートファジー説として提唱した^{4~6)}。

2. 急性膵炎発症における個体差

膵炎惹起刺激の負荷時にはトリプシノーゲン、PSTI、両者の産生が増加するが、その誘導能には量的個体差があり、それが膵炎の起こしやすさ、起こしにくさに関与すると考えられた。プロモーター領域の解析を臨床例でも行う必要がある。

Spink3 の欠損マウスでオートファジーが過剰に誘導される³⁾ことを合わせて考えると、Spink3 はオートファジーの誘導を抑制することが考えられた。Spink3 の誘導が著明な場合は、オートファジー誘導とトリプシン活性の両者が抑制されて膵炎抵抗性を、Spink3 の誘導が軽度の場合には、オートファジー誘導とトリプシン活性の抑制が弱いいため膵炎感受性を示すと考えられる^{2,6)}。