

Figure 5

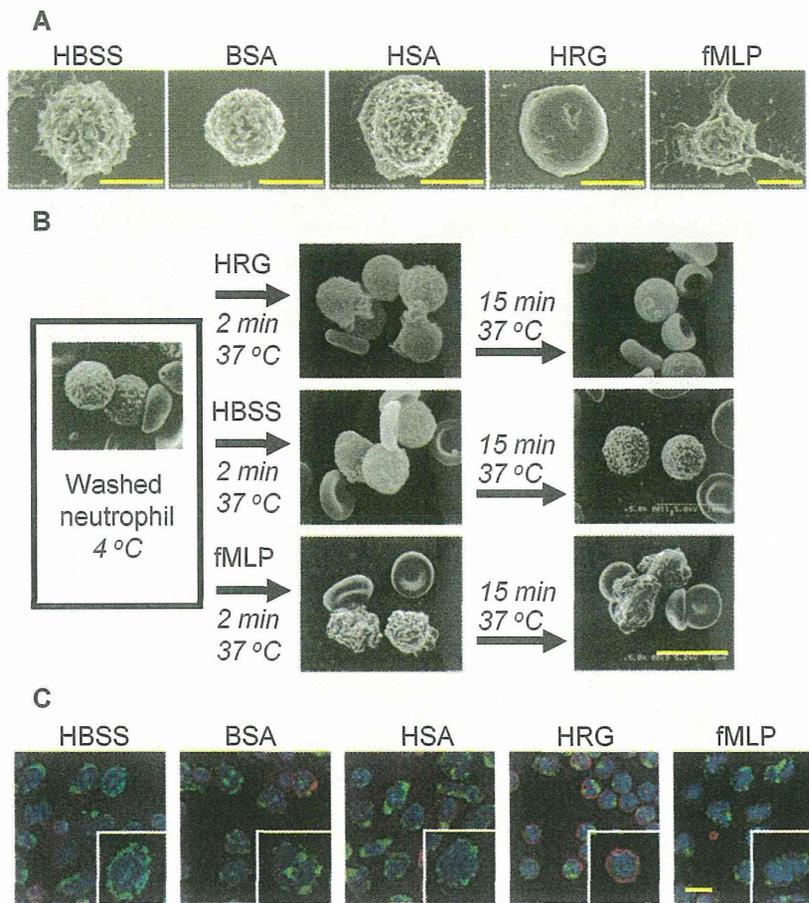


Figure 6

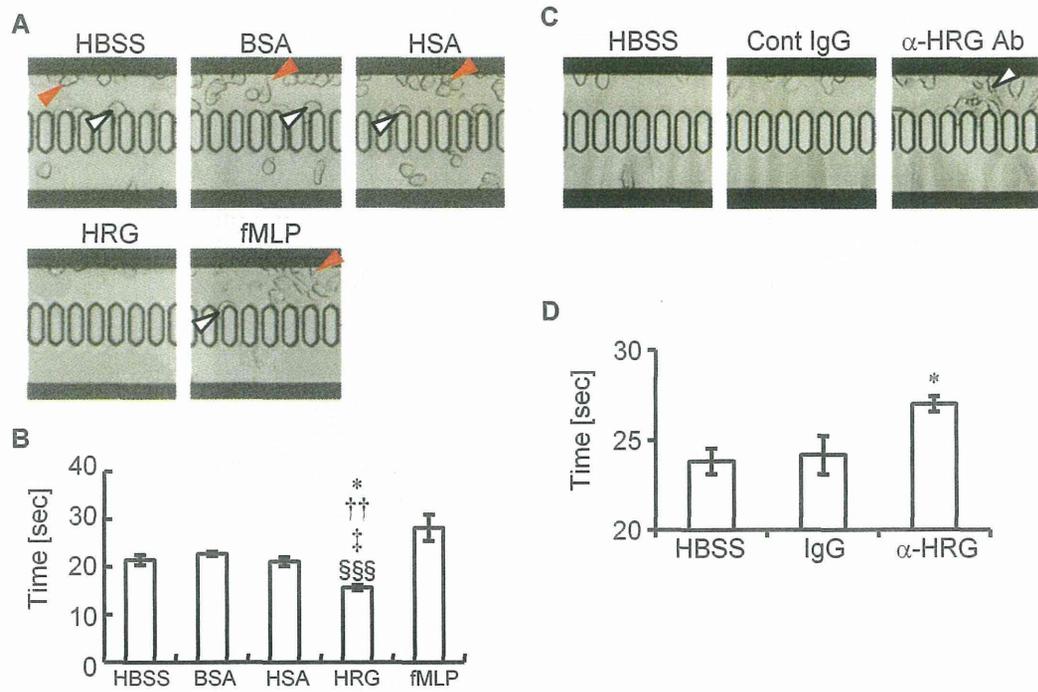


Figure 7

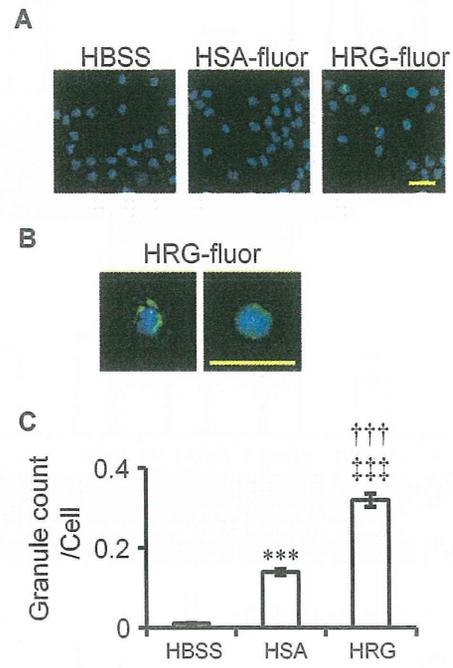
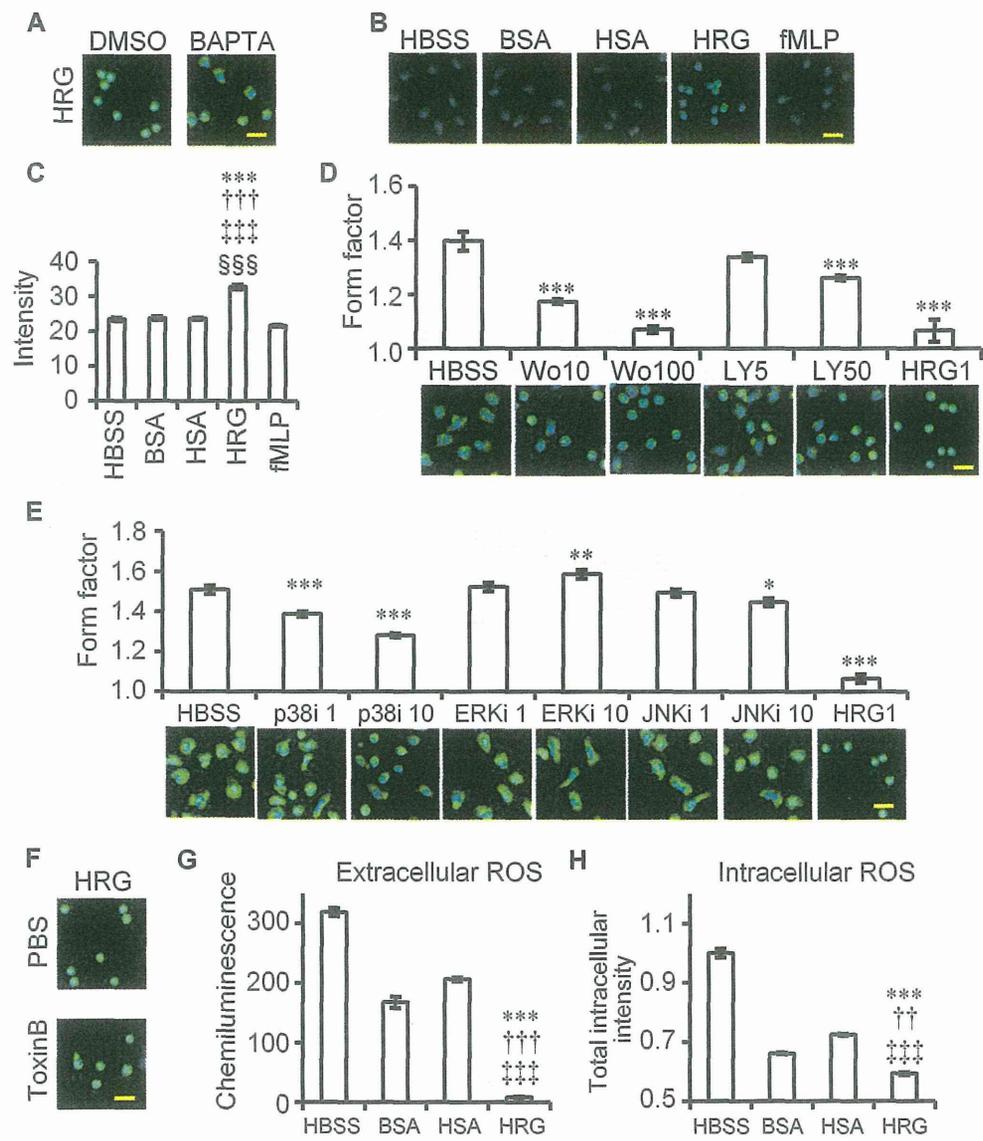
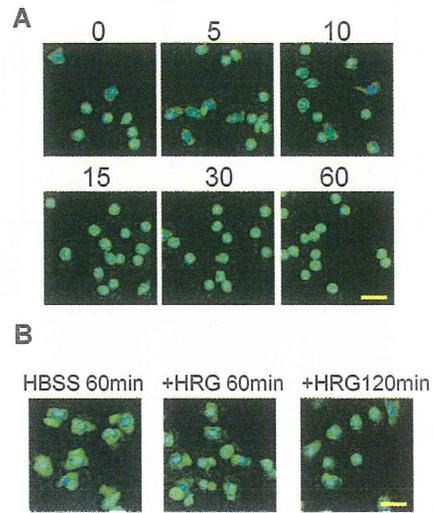
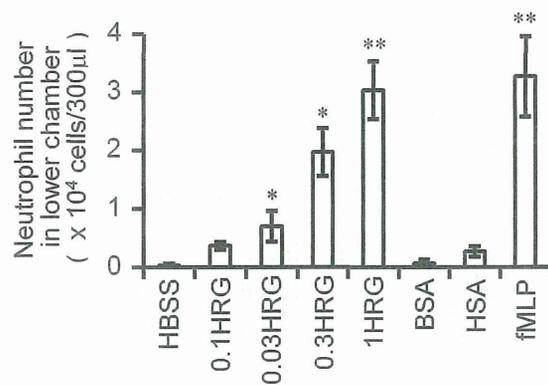


Figure 8

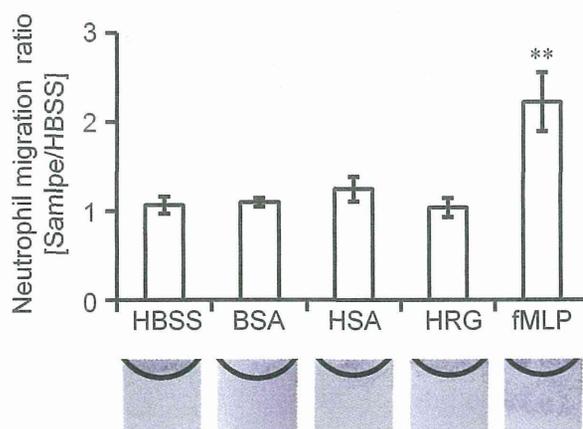




**A**



**B**



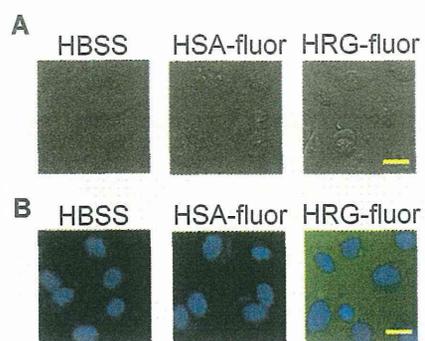
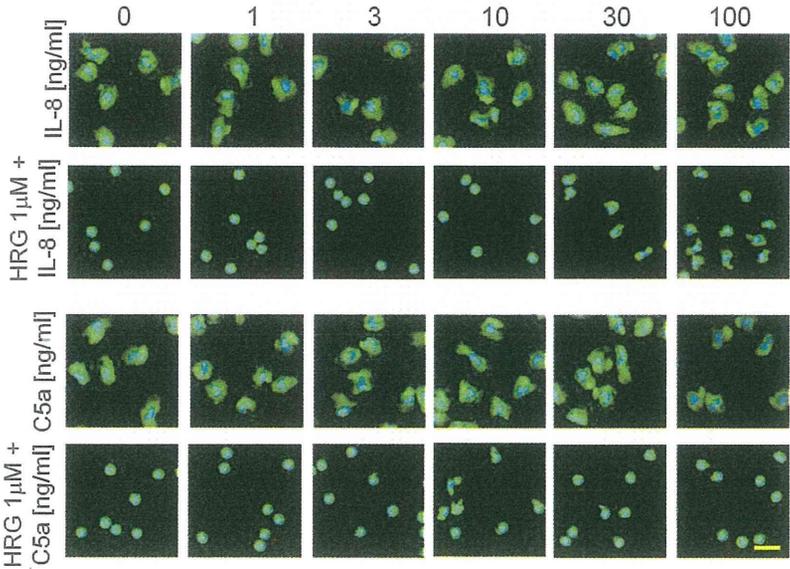
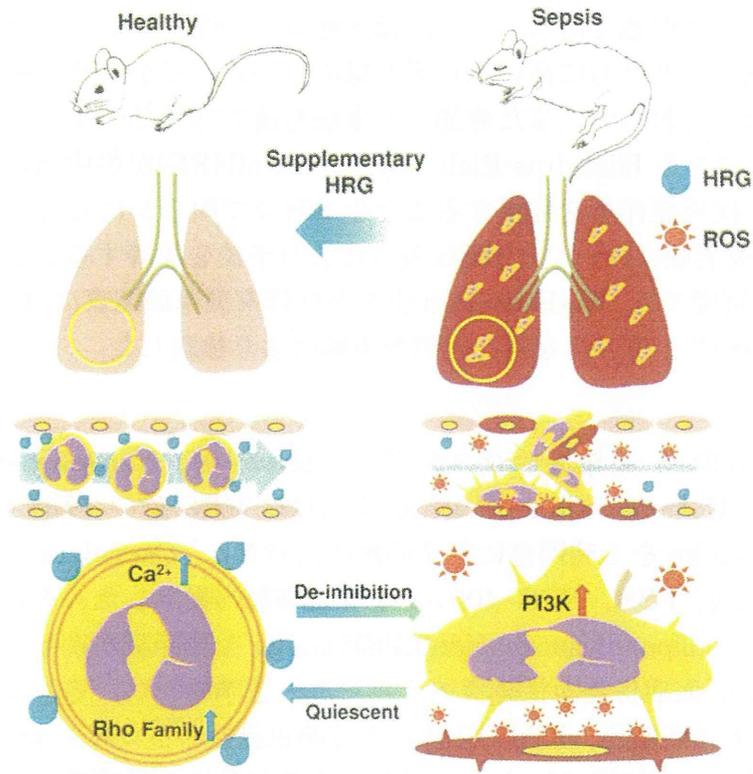


Figure E4





## Endotoxemia 併発急性膵炎モデルに関する研究

和氣秀徳、劉克約、勅使川原匡

目的：

急性膵炎は逸脱した膵酵素により自己消化を生じ、膵局所のみならず全身性に炎症病態を呈する疾患である。また、細菌感染を合併することで重症化し、多臓器障害を生じるとともに高い死亡率を認めている。しかしその病態生理は未だ明らかとなっておらず、また有効な治療法も確立されていない。我々は、血漿糖タンパクである Histidine-Rich Glycoprotein(HRG)が好中球の鎮静化維持作用を通じ、抗炎症作用を発揮することを本研究で明らかにしている。従って、重症急性膵炎病態においても HRG 投与により予後を改善することが期待される。そこで本研究では、Endotoxemia 併発急性膵炎関連肺障害に対する HRG の治療効果について、マウスを用いた動物実験により検討した。

方法：

実験には C57BL/6 系雄性マウスを用い、Sham 群、Phosphate-buffered saline(PBS)群、Human serum albumin(HSA)群、HRG 群の 3 群を作成した。Caerulein 100  $\mu$ g/kg を 1 時間毎に計 7 回腹腔内投与し、Caerulein 初回投与直後に HSA 400  $\mu$ g、PBS、HRG 400  $\mu$ g を各尾静脈内投与した。そして初回投与から 7 時間後に Lipopolysaccharide(LPS)5mg/kg を尾静脈内投与することにより、Endotoxin 血症併発急性膵炎モデルマウスを作成した。その後病理組織像、肺組織 Gr-1 免疫染色、RT-PCR 法による肺組織サイトカイン mRNA 発現量、肺湿乾重量比、肺組織 Myeloperoxidase(MPO)活性の各項目において各群間で比較検討し、Endotoxemia 併発急性膵炎関連肺障害に対する HRG の治療効果を評価した。

結果と考察：

Caerulein 初回投与から 7 時間後には、病理組織上著明な膵実質の破壊、広範な間質性浮腫を主とする膵炎像を呈しており、また一過性に低 HRG 血症を認めた。そしてこれらの病態は時間経過とともに改善した。Endotoxemia 併発急性膵炎関連肺障害の評価において、HRG 群では対照群と比較し、肺組織 Gr-1 陽性細胞数、肺組織サイトカイン mRNA 発現量、肺湿乾重量比、肺組織 MPO 活性の各項目において有意な改善を認めた。

以上の結果より、HRG の投与は、重症急性膵炎で生じた低 HRG 血症を是正することにより好中球鎮静化維持作用を改善し、併発する肺障害を抑制することが示唆された。

## 実験プロトコール

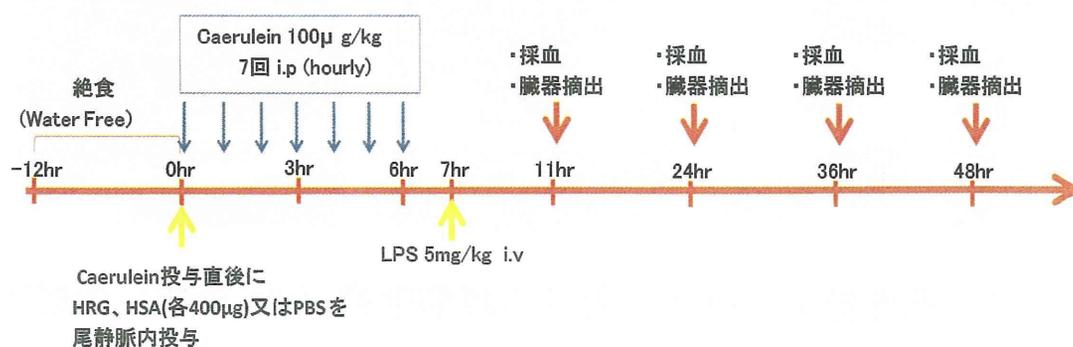
### 【Animal and reagents】

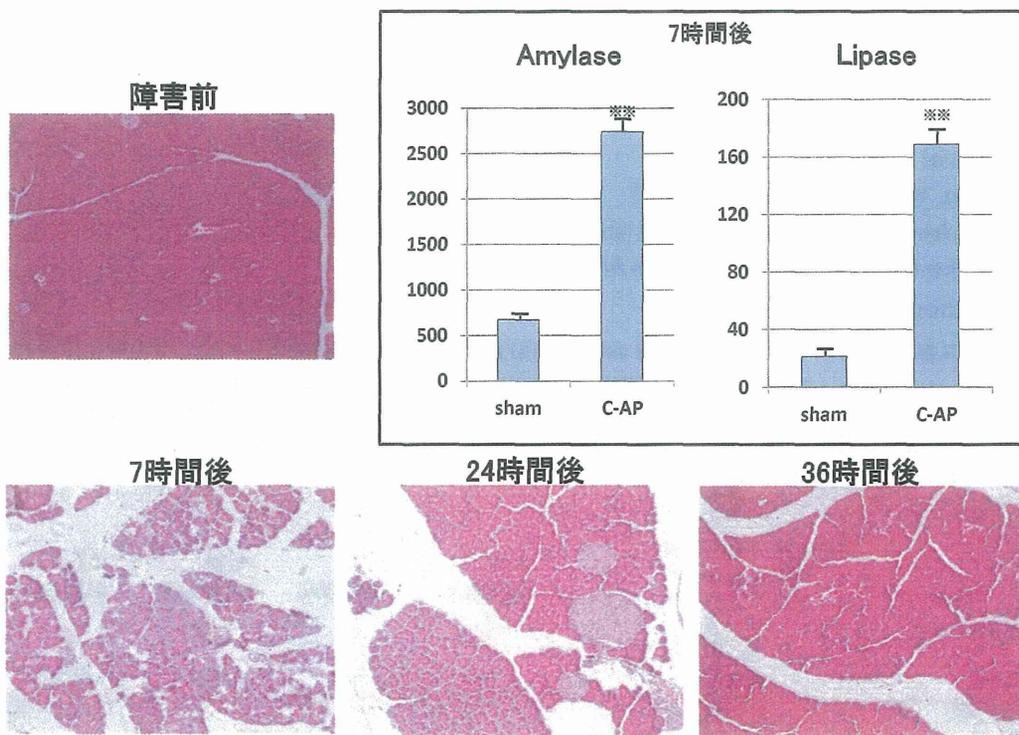
- ・C57BL/6Nマウス(8W, 22~25g, ♂)
- ・Caerulein (≥97%, HPLC )(Sigma Aldrich)
- ・LPS(Escherichia Colli O55:B5)(Sigma Aldrich)

### 【Method】

- ・マウスをSham群、Phosphate buffered saline(PBS) Human serum albumin(HSA)群、HRG群を作成。

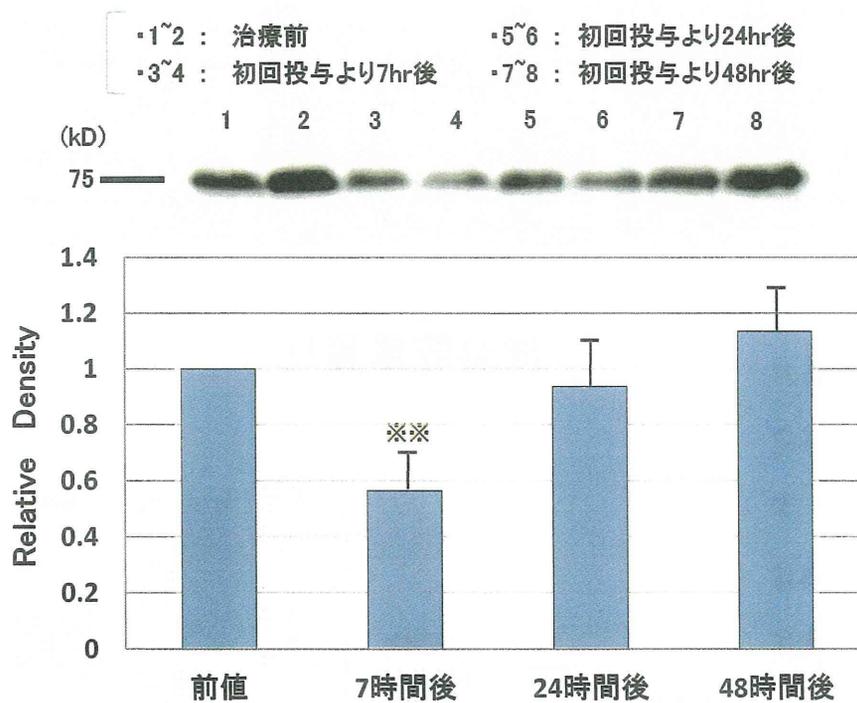
Caerulein 100μg/kg/hourlyを計7回腹腔内投与する。初回投与直後にHRG 400μg(in 100μl PBS)、PBS 100μl、HSA 400μg(in 100μl PBS)を尾静脈内投与し、7時間後にLPS 5mg/kgを尾静脈内投与する。初回投与から11時間後、24時間後、36時間後、48時間後にマウスを致死せしめ、各臓器を摘出する。





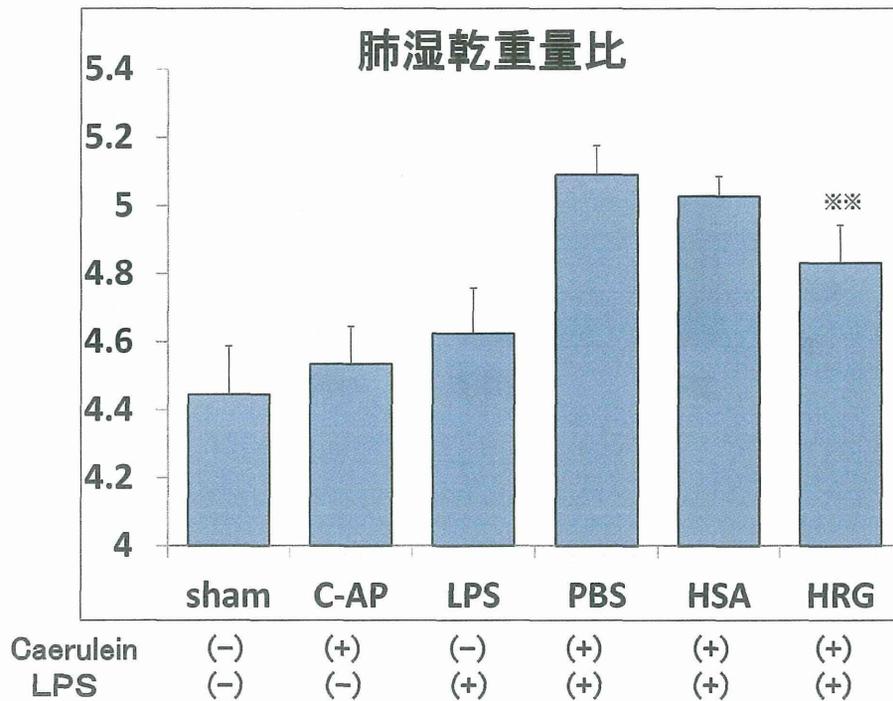
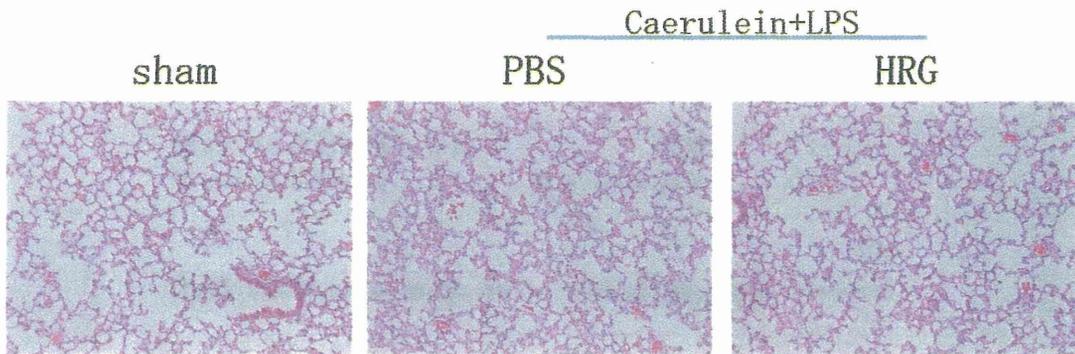
**図 1 急性膵炎マウスにおける膵病理像 (HE 染色) の経時的変化及び血清膵逸脱酵素値**

セルレインの連続7回投与によって、最終投与後7時間をピークとする急性膵炎が誘発された。急性期には膵臓からの逸脱酵素、アミラーゼとリパーゼの著明な上昇が認められた。膵臓内の炎症像は、間質組織の浮腫、出血、変性細胞の出現が7時間後に著明であり、以後36時間まで回復に向かった。



**図2 Caerulein 誘発急性膵炎マウスにおける血漿 HRG 濃度の経時的変化 (Western Blotting)**

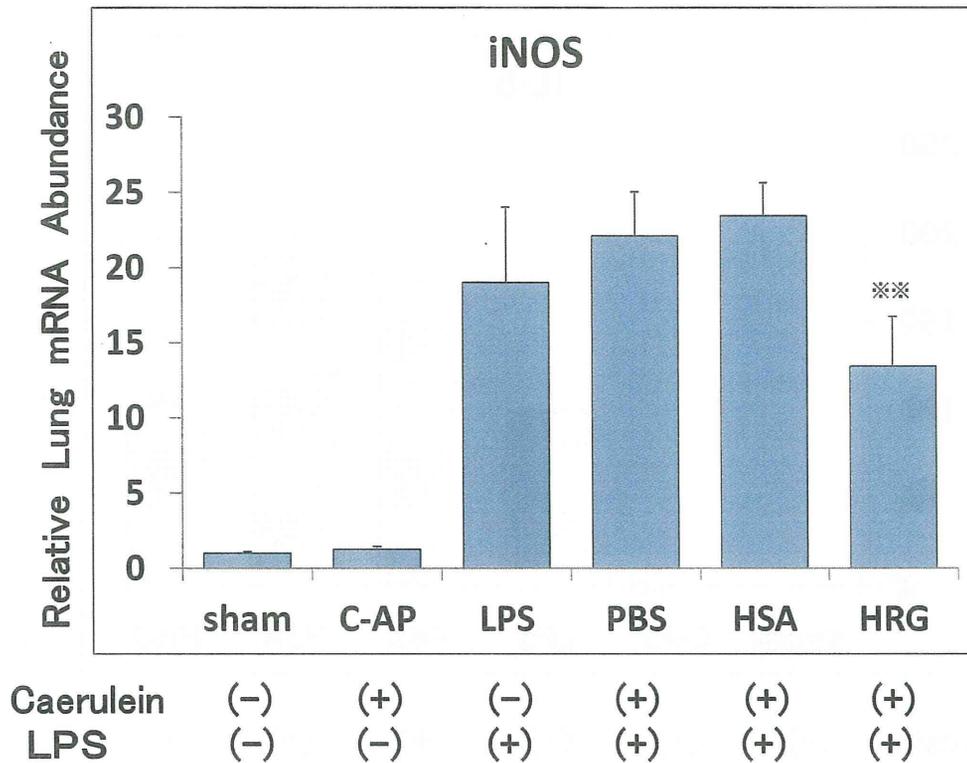
セルレイン投与後の血漿 HRG レベルは、7 時間後に有意の低下を示した。24 時間後には、血漿 HRG レベルは正常レベルに回復した。



**図 3 Endotoxemia 併発急性膵炎マウスにおける 24 時間後肺病理像及び肺湿乾重量比**

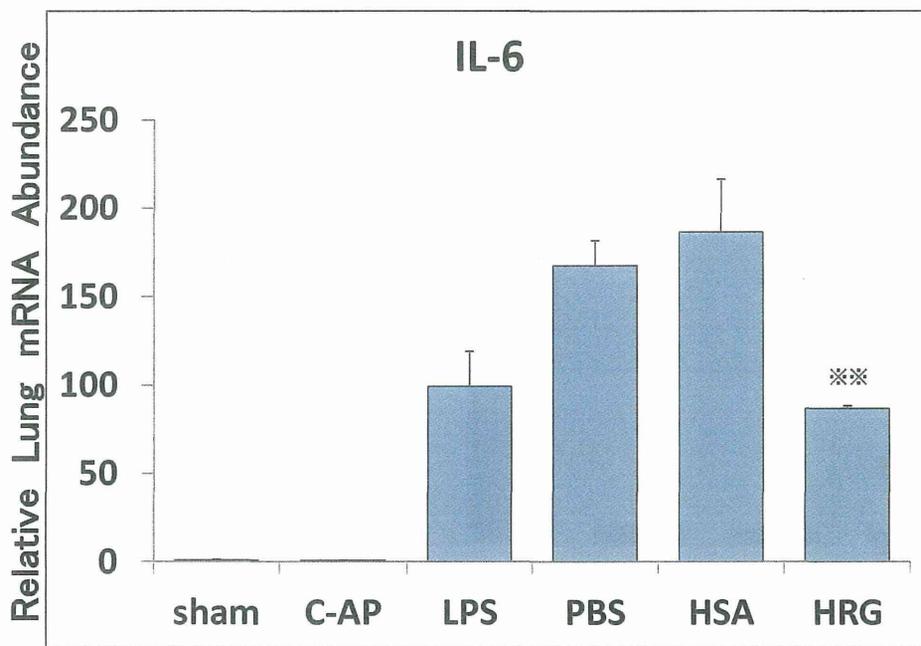
肺の湿乾重量比で肺浮腫と炎症の程度を評価すると、急性膵炎にエンドトキシンを付加することによって、肺炎症が増幅されることがわかった。HRG の静

脈内投与は、肺炎症を有意に抑制した。



**図 4 急性膵炎及び Endotoxemia 併発急性膵炎における 11 時間後肺組織 iNOS mRNA 発現**

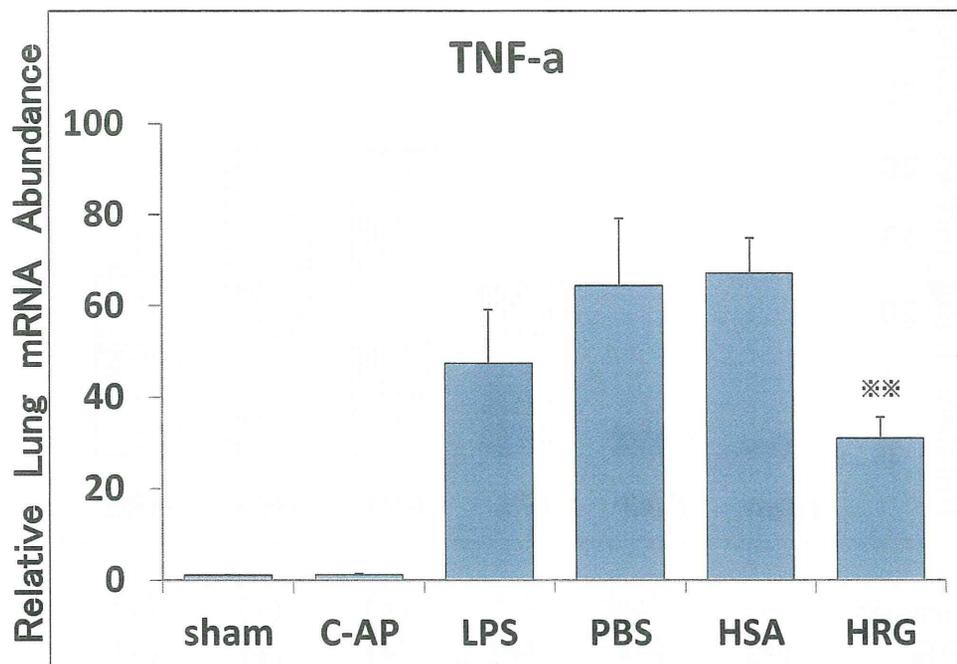
エンドトキシン付加された急性膵炎モデルにおいて、炎症急性期肺組織における iNOS mRNA 発現が HRG の静脈内投与によって有意に抑制された。



Caerulein	(-)	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)
LPS	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)

**図 5 急性膵炎及び Endotoxemia 併発急性膵炎における 11 時間後肺組織 IL-6 mRNA 発現**

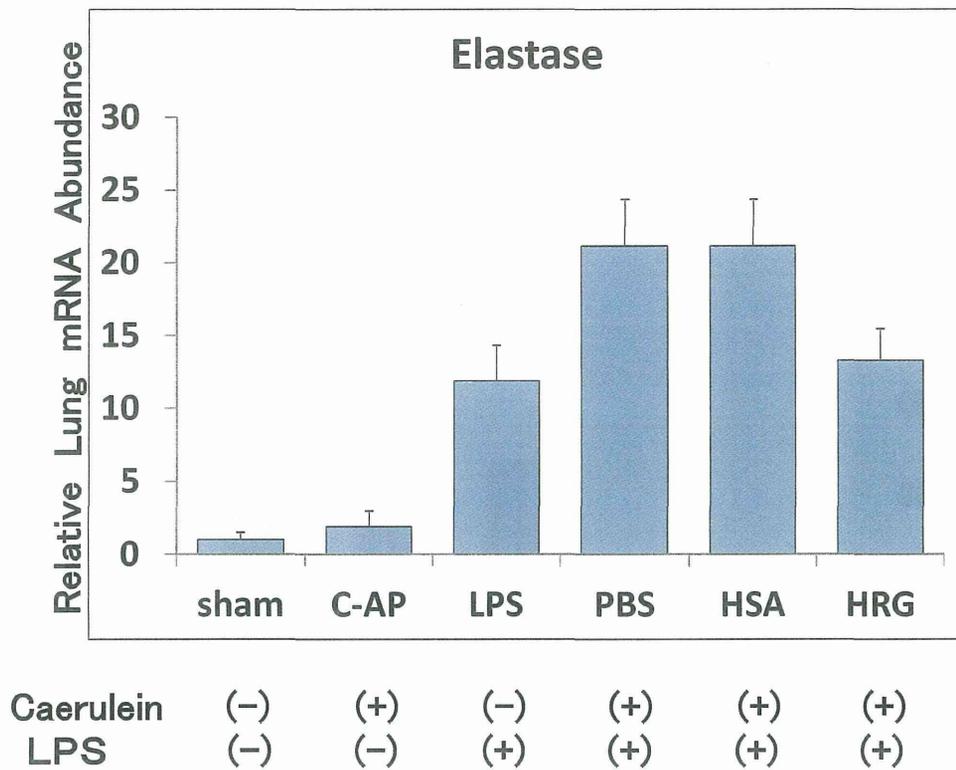
エンドトキシン付加された急性膵炎モデルにおいて、炎症急性期肺組織における IL-6 mRNA 発現が HRG の静脈内投与によって有意に抑制された。



Caerulein	(-)	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)
LPS	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)

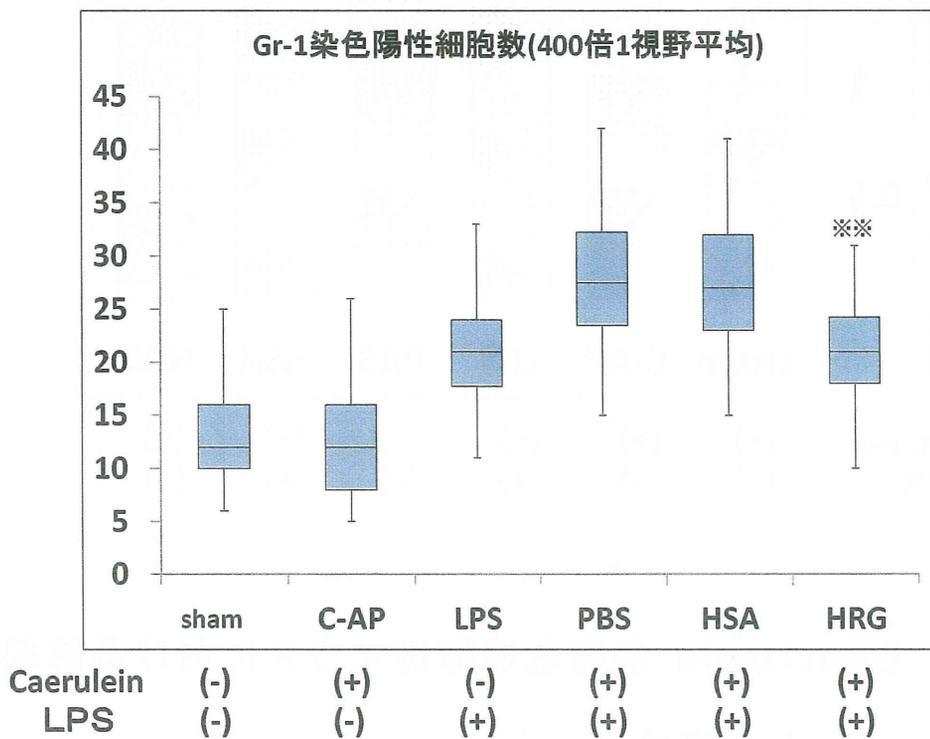
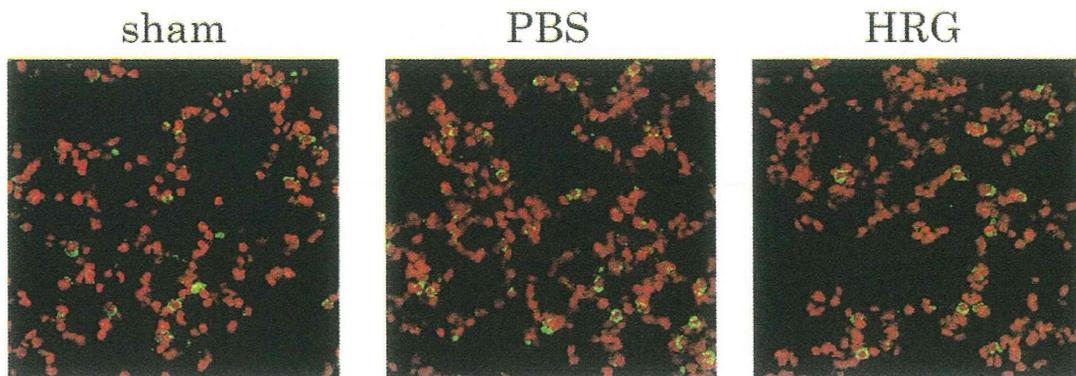
**図 6 急性膵炎及び Endotoxemia 併発急性膵炎における 11 時間後肺組織 TNF- $\alpha$  mRNA 発現**

エンドトキシン付加された急性膵炎モデルにおいて、炎症急性期肺組織における TNF- $\alpha$  mRNA 発現が HRG の静脈内投与によって有意に抑制された。



**図 7 急性膵炎及び Endotoxemia 併発急性膵炎における 11 時間後肺組織 Elastase mRNA 発現**

エンドトキシン付加された急性膵炎モデルにおいて、炎症急性期肺組織における Neutrophil elastase mRNA 発現が HRG の静脈内投与によって有意に抑制された。



**図 8 Endotoxemia 併発急性膵炎マウスにおける 24 時間後  
肺組織 Gr-1 染色像及び各 Gr-1 陽性細胞数**

HRG 静注投与は肺組織への好中球浸潤を有意に抑制した。

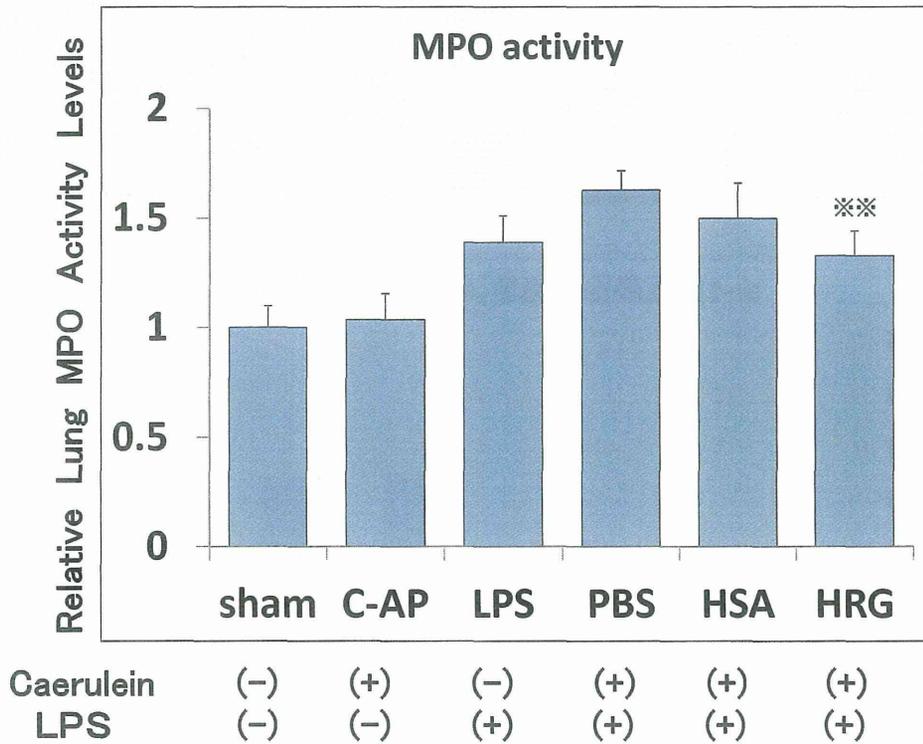


図 9 Encotixemia 併発急性膵炎マウスにおける肺組織

### Myeloperoxidase 活性

HRG 静注投与は肺組織内の Myeloperoxidase 活性を有意に抑制した。