



# Apoptotic cell death of renal tubules in experimental severe acute pancreatitis

高瀬, 功三

---

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2000-03-31

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲2126

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1002126>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



氏名・（本籍）	たか せ こう ぞう 高 瀬 功 三	（兵庫県）
博士の専攻分野の名称	博士（医学）	
学位記番号	博い第1269号	
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当	
学位授与の日付	平成12年3月31日	
学位論文題目	Apoptotic cell death of renal tubules in experimental severe acute pancreatitis (実験重症急性膵炎における腎尿細管細胞のアポトーシス)	

審査委員	主査 教授 黒 田 嘉 和	
	教授 中 村 俊 一	教授 尾 原 秀 史

## 論文内容の要旨

### 【背景・目的】

重症急性膵炎は良性疾病でありながら、今日でもその死亡率は高く、特に早朝に合併する多臓器不全（MOF）の克服は、重要な課題となっている。とりわけ、急性腎不全は早期死亡の重要な要因と考えられており、従来から急性膵炎時の腎障害物質の存在について報告はあるものの、その発症機構はいまだ十分に解明されていないのが現状である。一方、近年、アポトーシスという新しい細胞死が提唱され、各種疾患との関係が注目されてきている。腎においても、虚血再灌流障害や敗血症モデルでの腎障害にアポトーシスの関与が報告されている。そこで、われわれは、ラット実験膵炎モデルを用いて、膵炎発症早期の腎障害におけるアポトーシスの関与を検討し、さらに実験膵炎腹水中にアポトーシスを誘導する因子の存在を *in vitro*, *in vivo* の実験系を用いて検証した。

### 【方法】

膵炎モデル：Wistar 系雄性ラット（250–300g）を用いた。重症膵炎モデルとして、胆膵管に30% デオキシコール酸を注入した壊死性膵炎（DCA 膵炎）を作成した。また、軽症膵炎モデルとして、セルレイン 5  $\mu\text{g/kg/h}$  を4時間持続静注した浮腫性膵炎（セルレイン膵炎）を作成し、DCA 膵炎と比較した。

膵炎腹水：DCA 膵炎モデルより作成6時間後に腹水を無菌的に採取して膵炎腹水とした。腹水はすべて血性腹水で、1匹のラットより平均約8 ml が採取された。膵炎腹水のアポトーシス誘導能を検討するため、遠心濾過による分子ふるいにて分子量50kd 以上の分画と50kd 以下の分画に分離した。さらにそれぞれを沸騰水上で10分間熱処理したものを作成した。

アポトーシスの解析（*in vivo*）：DCA 膵炎、セルレイン膵炎を作成したラットより作成6時間後に腎を摘出し、アポトーシスの有無を解析した。アポトーシスは、生化学的には抽出したDNA をアガロースゲル電気泳動法を用いてDNA 断片化の有無を検討し、組織学的には断片化DNA を検出する免疫染色である TUNEL（Tdt-mediated dUTP-biotin nick end labeling）染色法を行って判定した。ま

た、脾炎腹水 8 ml を正常ラット腹腔内に注入した（腹水注入）モデルの腎にアポトーシスが誘導されるか否かを、腹水注入 6 時間後の腎を摘出し、TUNEL 法を行って検討した。

アポトーシスの解析（in vitro）：脾炎腹水のアポトーシス誘導能を解析するために in vitro で以下の解析を行った。1）正常ラットより分離培養した単離尿細管索に、各種濃度の脾炎腹水を添加し、核の断片化と DNA の断片化を解析した。核の断片化は、Hoechst 33342 による核染色を行って形態学的に判定した。DNA の断片化は抽出した DNA のアガロースゲル電気泳動を行って判定した。2）正常ラット腎上皮培養細胞（NRK 細胞）に対する脾炎腹水のアポトーシス誘導能を検討する目的で、NRK 細胞に各種濃度の脾炎腹水を添加した。経時的に細胞を回収して、propidium iodide により染色した DNA 量を FACSscan により測定して、細胞周期を解析し、アポトーシスに陥った細胞数を定量した。3）NRK 細胞に脾炎腹水を添加した後、DNA 断片化を定量し得る Cell Death Detection ELISA kit を使用して、生成された断片化 DNA 量を定量し、上記の如く分画した脾炎腹水の各分画についても同様の解析を行って脾炎腹水中のアポトーシス誘導因子の解析を行った。

### 【結果】

in vivo：致死的な重症脾炎モデルである DCA 脾炎は、脾に広範な出血壊死を認め、DCA 脾炎作成 6 時間後のラットから摘出した腎より抽出した DNA は、電気泳動において DNA 断片化（step ladder pattern）が認められた。TUNEL 染色においても腎尿細管細胞に TUNEL 陽性細胞が認められ、アポトーシスの誘導が確認された。一方、セルレイン脾炎は浮腫性脾炎モデルで、ほぼ完全に回復する軽症脾炎モデルであるが、セルレイン脾炎では、作成 6 時間後のラットから摘出した腎には、アポトーシスは観察されなかった。腹水注入ラットの腎においては、腹水注入 6 時間後に尿細管細胞に TUNEL 陽性細胞がみられ、脾炎腹水による in vivo でのアポトーシス誘導が確認された。

in vitro：脾炎腹水はラット単離尿細管索に対し、10%以上の濃度で添加 6 時間後に形態学的にアポトーシスに特徴的な核の断片化を引き起こし、アガロースゲル電気泳動においても DNA 断片化が認められた。FACSscan を用いた細胞周期解析から、20%の脾炎腹水は NRK 細胞に対しても、添加 8 時間後からアポトーシスを介した細胞障害活性を示し、24 時間後には約 60%の細胞がアポトーシスに陥った。脾炎腹水中のアポトーシス誘導因子の解析を行った所、アポトーシス誘導能は分子量 50kd 以上の分画でみられ、それは熱処理にて減弱した。また、炎症性サイトカインの 1 つである tumor necrosis factor- $\alpha$ （TNF- $\alpha$ ）の中和抗体を加えてもアポトーシス誘導能に変化は認められなかった。

### 【考察】

今回の検討により、ラット重症急性脾炎モデルにおいては、作成 6 時間後という早期の段階で腎尿細管細胞にアポトーシスが惹起されていることが初めて確認された。さらに、脾炎腹水中には、腎尿細管細胞に対してアポトーシスを介した細胞障害活性を持つ因子が存在することが示された。

アポトーシスと急性腎障害との関連に関しては、虚血、又は虚血再灌流により腎尿細管細胞にアポトーシスが惹起されることが知られている。一方、急性脾炎の発症早期には、hypovolemia や心不全により腎血流の低下が存在すると考えられ、これが腎アポトーシスの誘因となる可能性もある。しかし、本研究で、脾炎腹水の腎尿細管細胞に対する直接的なアポトーシス誘導能が、in vivo, in vitro で示されたことから、急性脾炎時の腎尿細管細胞のアポトーシスは脾炎腹水中に含まれる因子による直接作用であると考えられる。

脾炎の病態における腹水の重要性は、腹膜灌流療法の有効性が注目されて以来、諸家により報告さ

れており、膵炎腹水中に腎毒性物質が存在することも報告されている。膵炎腹水による腎障害機構に腎尿細管細胞のアポトーシスが関与する可能性は十分に高いと考えられる。

アポトーシス誘導因子としては、ミトコンドリア障害を惹起する活性酸素や一酸化窒素なども考えられるが、膵炎腹水中に含まれるアポトーシス誘導活性の安定性からその可能性は極めて低い。

一方、本研究の結果より膵炎腹水中のアポトーシス誘導因子は、分子量5万以上の蛋白質であると考えられ、サイトカインである可能性が高い。アポトーシスを惹起し得るサイトカインのうち TNF- $\alpha$  は急性膵炎において血中、腹水中に誘導されることが知られており、アポトーシス誘導因子として作動している可能性が高いと考えられた。しかし、抗 TNF- $\alpha$  抗体の添加は膵炎腹水による NRK 細胞のアポトーシス誘導を全く阻止し得なかった。したがって、少なくとも TNF- $\alpha$  の関与は少なく、それ以外のサイトカインの関与を考えるべきであろう。

本研究から、重症急性膵炎では、膵炎腹水中のアポトーシス誘導因子が腎尿細管細胞に作用して、アポトーシスを介した腎障害を引き起こす可能性が示唆されたが、アポトーシス誘導因子の同定とアポトーシスと腎障害との関連に関しては更なる解析が必要であると思われた。

## 論文審査の結果の要旨

重症急性膵炎は良性疾病でありながら今日でもその死亡率は高く、特に早期に合併する多臓器不全 (MOF) の克服は、重要な課題となっている。とりわけ、急性腎不全は早期死亡の重要な要因と考えられており、従来から急性膵炎時の腎障害物質の存在についての報告はあるものの、その発症機構はいまだ十分に解明されていないのが現状である。一方、近年、アポトーシスという新しい細胞死が提唱され、各種疾患との関係が注目されてきている。本研究では、ラット実験膵炎モデルを用いて、膵炎発症早期の腎障害におけるアポトーシスの関与を検討し、さらに実験膵炎腹水中にアポトーシスを誘導する因子の存在を *in vitro*, *in vivo* の実験系を用いて検証している。

重症膵炎モデルとして、ラットの胆膵管に30%デオキシコール酸を注入した壊死性膵炎 (DCA 膵炎) を作成した。また、軽症膵炎モデルとして、セルレインを 5  $\mu\text{g/kg/h}$  で4時間持続静注した浮腫性膵炎 (セルレイン膵炎) を作成し、DCA 膵炎と比較した。DCA 膵炎モデルより作成6時間後に腹水を無菌的に採取して膵炎腹水とした。膵炎腹水のアポトーシス誘導能を検証するため、遠心濾過による分子ふるいにて分子量50kd 以上の分画と50kd 以下の分画に分離した。さらにそれぞれを沸騰水上で10分間熱処理したものを作成した。以上、*in vitro*, *in vivo* の実験より次の様な結果が得られている。

1) *in vivo* : 致死的な重症膵炎モデルである DCA 膵炎は、膵に広範な出血壊死を認め、DCA 膵炎作成6時間後のラットから摘出した腎より抽出した DNA は、電気泳動において DNA 断片化 (step ladder pattern) が認められた。断片化 DNA を検出する免疫染色である TUNEL 染色においても腎尿細管細胞に TUNEL 陽性細胞が認められ、アポトーシスの誘導が確認された。一方、セルレイン膵炎は浮腫性膵炎モデルで、ほぼ完全に回復する軽症膵炎モデルであるが、セルレイン膵炎では、作成6時間後のラットから摘出した腎には、アポトーシスは観察されなかった。一方、正常ラットの腹腔内に膵炎腹水を注入したラットの腎においては、腹水注入6時間後に尿細管細胞に TUNEL 陽性細胞がみられ、膵炎腹水による *in vivo* でのアポトーシス誘導が確認されている。

2) *in vitro* : 膵炎腹水はラット単離尿細管索に対し、10%以上の濃度で添加6時間後に形態学的にアポトーシスに特徴的な核の断片化を引き起こし、アガロースゲル電気泳動においても DNA 断片化

が認められた。FACSscan を用いた細胞周期解析から、20%の膵炎腹水は正常ラット腎上皮培養細胞（NRK 細胞）に対しても、添加8時間後からアポトーシスを介した細胞障害活性を示し、24時間後には約60%の細胞がアポトーシスに陥ることを見出した。膵炎腹水中のアポトーシス誘導因子の解析を行った所、アポトーシス誘導能は分子量50kd 以上の分画でみられ、それは熱処理にて減弱した。また、炎症性サイトカインの1つである tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) の中和抗体を加えてもアポトーシス誘導能に変化は認められなかった。

今回の検討により、ラット重症急性膵炎モデルにおいては、作成6時間という早期の段階で腎尿細管細胞にアポトーシスが惹起されていることが初めて確認され、膵炎腹水中には、腎尿細管細胞に対してアポトーシスを介した細胞障害活性を持つ因子が存在することが示された。アポトーシス誘導因子の同定は今後の課題となるが、今回の結果より分子量5万以上の蛋白質であると考察している。

本研究は、重症急性膵炎の腎障害について、その発症機構を研究したものであるが、従来ほとんど行われなかった腎尿細管細胞のアポトーシス誘導、膵炎腹水中のアポトーシス誘導因子の存在について重要な知見を得たものとして価値ある集積であると認める。よって、本研究者は、博士（医学）の学位を得る資格があると認める。