



急性膵炎の重症化因子に関する実験的研究 : ラット 摘出膵灌流法によるcarbacholとtrypsinの膵酵素逸 脱におよぼす影響

柏木, 亮一

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

1987-12-09

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

乙1127

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D2001127>

※ 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)	かしわぎ りょういち (兵庫県)
学位の種類	医学博士
学位記番号	医博第957号
学位授与の要件	学位規則第5条第2項該当
学位授与の日付	昭和62年12月9日
学位論文題目	急性膵炎の重症化因子に関する実験的研究 —ラット摘出膵灌流法による carbachol と trypsin の膵酵素逸脱 におよぼす影響—
審査委員	主査 教授 齋藤 洋一 教授 中村 和夫 教授 馬場 茂明

論文内容の要旨

要旨：急性膵炎における膵外分泌刺激ならびに膵逸脱酵素による膵炎重症化についてラット膵灌流実験モデルを用い検討した。膵炎発症により門脈および腹水中への膵酵素逸脱がみられ、 $10^{-7}M$ carbachol による外分泌刺激は重症膵炎に対し増悪作用を示した。

血中 trypsin は高濃度では正常膵に対しても膵炎発症作用を示し、膵炎膵に対しては低濃度でも増悪作用を示した。以上より膵炎においては生理的な外分泌刺激や膵逸脱酵素によって重症化する機構が存在し、膵自体への悪循環阻止に十分留意した治療法を選択することが必要と考えられた。

I. はじめに

急性膵炎において、膵から逸脱する活性化酵素や、膵外分泌の刺激などの重症化因子に着目して病態を解明する試みは、膵炎治療に有用な示唆を与えるものである。本研究ではラット灌流膵を用いて急性膵炎における外分泌刺激の影響と血中逸脱酵素の膵局所に対する作用などについて検討し、急性膵炎の重症化因子とその対策について考察を加えた。

II. 実験方法

1. 膵灌流標本の作製と正常膵灌流

Wistar 系雄性ラットを用い菅野らの方法に準じて膵灌流標本を作製した。coeliac artery (CA) および superior mesenteric artery (SA) 内に cannula を挿入し Krebs Henseleite Bicarbonate (KHB) 液を 2 ml/min の速度で灌流し portal vein (PV) に挿入した cannula より回収した。

膵灌流標本は恒温槽に浮かべ、KHB液を2 ml/minの速度で灌流した。これを bathing medium (BM)として経時的に回収した。正常膵の灌流は、50分間にわたって実験を行った(control群)。(n=5)

2. 膵炎膵の作製と灌流

灌流開始後、膵管より10% deoxycholic acid salt (DCA) 0.2ml, または0.1% DCA 0.2mlを注入し前者を重症膵炎, 後者を軽症膵炎とし、同様の灌流実験に供した。(各n=5)

3. 灌流液中の carbachol および trypsin の調整

外分泌刺激の影響をみるため、Ach作用を持つ carbamyl cholic chloride(carbachol)を 10^{-7} M 含む KHB 液を、20分間にわたって灌流し刺激を中止して以後、さらに15分間灌流した。(各n=5)

また trypsin の影響をみるため、trypsin(持田製薬 trypsin)をそれぞれ50単位/ml(以下U/ml), 20U/ml, 5 U/ml, 1 U/mlの割合で溶解した KHB 液を用いて灌流した。(各n=5)

4. 資料の採取および測定

動脈側の灌流圧を測定し、門脈から灌流液(以下PVとする)を5分毎に全量採取し回収量を調べた。BMも5分毎に10mlずつ採取した。amylase 活性は blue starch 法にて、lipase 活性は BALB を基質とした酵素法で、RNase 活性は poly C を基質とした酵素法で、trypsin 様酵素活性は Boc-Phe-Ser-Arg-MCA 合成基質を用い hydrolysis により生ずる AMC (7-amino-4-coumarin) を蛍光分光光度計で測定し、これをその酵素活性とした。

灌流終了後、膵重量を測定し、HE染色を行って病理組織学的検討に供した。

III. 結 果

1. 重症度による変化

重症膵炎群では約1.4倍の有意な灌流圧の増加が認められた($p<0.05$)。回収量も重症膵炎群では29%と有意な低下が認められた($p<0.01$)。膵重量は重量群では灌流終了時 control 群の2.2倍までに増加した($p<0.05$)。総 amylase 放出量をみると、重症度に応じての増加が認められた。BM 中へも同様に重症度に応じて amylase 放出量の増加が認められた。

組織学的所見では軽症膵炎群で軽度の edema がみられたのみであったのに対し、重症膵炎群では細胞の変性、脱落と著明な間質の edema が認められた。

2. PV および BM 中の膵酵素濃度の変動

PV 中の amylase の変動をみると、膵炎群では膵炎作製直後から頂値を示し、以後も高値が持続した。BM 中では膵炎作製後より漸増し、終了後には高値を示した。

PV, BM 中の lipase, RNase 濃度についても、ともに amylase とほぼ同様な推移を示した。

PV 中の trypsin 活性は他の酵素と異なり膵炎作製後もほとんど上昇がみられなかった。これに対し BM 中では他の酵素と同時に漸増し高値を示した。以上の結果より、amylase は lipase, RNase らとほぼ一致した推移を示した。従って以後の実験は amylase 濃度の変化を測定して、逸

脱した膵酵素の指標とした。

3. carbachol 刺激の影響

重症膵炎群では carbachol 刺激を加えると灌流圧は約 2 倍にまで上昇し、回収量では 46% の低下がみられ、刺激なしの時の 29% より更に低下することが認められた ($p < 0.01$)。膵重量の変化をみると、軽症膵炎群では刺激を加えても重量増加は約 1.2 倍しかなかった。重症膵炎群では control の 2.2 倍に増加した重量が、carbachol 刺激により更にその 1.5 倍にまで増加し ($p < 0.05$)、肉眼的にも著明な edema が出現した。組織学的には間質の edema の増強と細胞の脱落、壊死の所見がより著明であった。総 amylase 放出量では、刺激に対し重症膵炎群では PV 中総 amylase は 17.8 倍に増加し、BM 中では更に 28 倍にも著増した ($p < 0.01$)。PV および BM 中 amylase 濃度の経時的变化をみると、PV では軽症群は刺激の間のみほぼ一定値をとり、刺激を中止すると低下傾向をとり、重症群では影響を示さなかった。BM では軽症群では刺激の影響は認められなかったが、重症群では更に高値をとり、2.2 倍まで上昇した。

4. 灌流液中 trypsin 投与の影響

amylase 濃度の経時的变化をみると、高濃度の trypsin の投与により、正常膵でも PV 中 amylase 濃度の上昇が認められた。一方、軽症膵炎群では低濃度の trypsin の投与でも PV 中 amylase 濃度の上昇を認め、更に trypsin 濃度依存性に上昇した。膵重量に対しては、軽症膵炎群では 5 U/ml の trypsin 濃度からすでに重量増加がみられた。また正常膵では 50 U/ml で膵炎群とほぼ同程度にまで重量が増加した。PV 中総 amylase 放出量は control 群では trypsin 濃度に比例して増加がみられたが、膵炎群では低濃度の trypsin 投与から著明な amylase 放出量の増加が認められ、20 U/ml の濃度で最大刺激であることが示された。

IV. 考 察

今回著者らは、神経や体液性その他の因子の影響をうけることなしに膵自体の病態解析が可能である膵灌流モデルを用いて膵炎の重症化因子について検討した。

正常膵を灌流後、同一条件下での 10% DCA、0.1% DCA の膵管内注入により重症、軽症膵炎の作製が可能であった。灌流圧、回収量、膵重量、総 amylase 放出量を用い、それぞれ比較検討したが、これらは膵炎の重症度をよく反映した。

今回の灌流実験では膵炎の進展状態を、生体内では門脈血に相当する PV 中の経時的な amylase 濃度の変化として、直接的に観察することができた。腹水中の酵素濃度変化も、本モデルでは BM 中の膵酵素の測定により経時的に観察が可能となった。

carbachol は Ach 様作用をもち正常膵の灌流では生理的濃度の $10^{-7}M$ で膵外分泌刺激作用を示すが、膵炎増悪作用は示さない。一方、膵炎膵に対して carbachol 刺激を行うと、特に重症膵炎では増悪が著明であった。BM 中への amylase 放出は非刺激時の約 2.2 倍と著明に上昇したのに対し、PV 中では特に刺激による上昇はみられなかったことから、重症膵炎では膵管系の破綻が高度であり、血管系よりも腹水中への leakage が増大するものと思われた。また重症膵炎ではわず

かの外分泌刺激でも増悪がみられることから、より慎重に外分泌刺激の抑制と膵の安静化をはかることが膵炎増悪の防止に不可欠であることもあきらかとなった。

膵局所に対して逸脱酵素がおよぼす影響について、灌流実験を用いると、膵自体の反応を直接的に観察することが可能である。灌流液中に各種濃度の trypsin を添加して膵炎の増悪をみると、正常膵でも高濃度の trypsin になると PV 中への amylase 放出量の増加や、膵の edema が出現し膵重量も増加した。軽症膵炎では 1 U/ml の低濃度から amylase 放出量や edema の増強がみられ濃度差に応じて変化した。このように trypsin は膵炎膵に対し低濃度でも増悪作用を持ち、高濃度になると正常膵に対しても膵炎発症因子として働くことが証明された。これは臨床的には抗 trypsin 剤の投与や、血漿交換療法などによる血液浄化が膵炎膵の増悪を阻止する意味からも有意義であることを示唆するものと考えられた。

V. 結 論

膵灌流実験モデルを用いて急性膵炎を作製し、重症化因子としての膵外分泌刺激と逸脱膵酵素の膵炎膵に対する影響を検討し以下の結論を得た。

- 1) 膵炎発症により門脈、腹水への膵酵素の逸脱がみられた。
- 2) 門脈および腹水中への総 amylase 放出量は膵炎の重症度をよく反映し amylase 濃度は経時的に膵炎の進展と相関して上昇した。
- 3) 門脈および腹水中の lipase や RNase の変動は amylase のそれとほぼ一致した。
- 4) 10^{-7} M carbachol による外分泌刺激は正常および軽症膵炎にはほとんど影響を与えないが、重症膵炎に対して増悪作用を示した。
- 5) 血中の trypsin は 50 U/ml の高濃度では正常膵に対しても膵炎発症作用を示し、膵炎膵では 5 U/ml の低濃度でも増悪作用を示した。

論文審査の結果の要旨

急性膵炎の臨床経過は多様で膵炎の進展に関する多くの重症化因子の存在が想定されているが、最も重要な因子として膵から局所および全身に逸脱する活性化酵素や、それによって生ずる toxic な物質の関与が考えられている。また食事摂取による膵外分泌の刺激、あるいは膵局所および全身に存在する防御機構の破綻なども重要な因子として考えられる。

本研究ではラット灌流膵を用いて急性膵炎における外分泌刺激の影響と血中逸脱酵素の膵局所に対する作用などについて実験的に検討し、急性膵炎の重症化因子とその対策について考察を加えた。

1. 実験方法

体重 200~300g の Wistar 系雄性ラットの膵を菅野らの方法に準じて膵を十二指腸を付着させたまま周囲組織より遊離し、膵灌流標本を作製し flow through 法で灌流を行った。灌流開始後 10

分間の resting の後、膵管内留置の tube より 10%deoxycholic acid salt 0.2ml, または 0.1% DCA 0.2ml を 30 秒間で低圧注入しそれぞれ出血壊死性、浮腫性膵炎のモデルとした膵炎膵に対する外分泌刺激の影響をみるため、Ach 様作用をもつ carbamyl cholic chloride (carbachol) を 10^{-7} M 含む KHB 液を、control 群では灌流開始 15 分後より、膵炎群では膵炎作製 15 分後よりそれぞれ 20 分間にわたって灌流し刺激を中止して以後、さらに 15 分間灌流した。また trypsin の影響をみるため、control 群では灌流開始 10 分後より、膵炎群では膵炎作製 15 分後より、trypsin をそれぞれ 50 単位/ml (以下 U/ml), 20U/ml, 5U/ml の割合で溶解した KHB 液を用いて灌流した。

動脈側の灌流圧を測定し、門脈から灌流液 (以下 PV とする) を 5 分毎に全量採取回収量を調べた bathing medium も 5 分毎に 10ml ずつ採取したこれらについて amylase 活性, lipase 活性 RNase 活性 trypsin 様酵素活性 膵重量などを測定した。

2. 成績

膵灌流実験モデルを用いて急性膵炎を作製し重症度と膵酵素逸脱現象との相関について観察し、重症化因子としての膵外分泌刺激と逸脱膵酵素の膵炎膵に対する影響と検討し以下の成績を得た。

- 1) 膵炎発症により門脈、腹水への膵酵素の逸脱がみられた。
- 2) 門脈および腹水中への総 amylase 放出量は膵炎の重症度をよく反映し amylase 濃度は経時的に膵炎の進展と相関して上昇した。
- 3) 門脈および腹水中の lipase や RNase の変動は amylase のそれとほぼ一致した。
- 4) 10^{-7} M carbachol による外分泌刺激は正常および軽症膵炎にはほとんど影響を与えないが、重症膵炎に対し増悪作用を示した。
- 5) 血中の trypsin は 50U/ml の高濃度では正常膵に対しても膵炎発症作用を示し、膵炎膵では 5U/ml の低濃度でも増悪作用を示した。

以上より膵炎においては、膵炎の重症度に応じた酵素逸脱現象と、生理的外分泌刺激や逸脱酵素による重症化機構が存在し、臨床的には外分泌刺激を抑制し膵の安静をはかることの他に、逸脱酵素に対しては trypsin inhibitor の使用や血漿交換による血液浄化などの治療が、他臓器障害を防止するだけでなく膵自体への悪循環作用を阻止する意味において意義あるものと結論した。

本研究は急性膵炎について、その重症化因子を研究したものであるが、従来ほとんど行われなかった酵素逸脱の影響を灌流実験モデルを用いて明確な知見を得たものとして価値ある集積であると認める。よって本研究者は医学博士の学位を得る資格があると認める。