

Studies on Biochemical Parameters Related to the Severity of Acute Pancreatitis in Rats

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/8000

急性膵炎の重症度判定指標に関する実験的研究

金沢大学医学部第二外科学講座 (主任:宮崎逸夫教授)

喜 多 一 郎

(昭和62年12月23日受付)

ラットに重症度の異なる急性膵炎を作成し、膵炎発症後経時的に血清と膵組織中のデオキシリボヌクレアーゼ (Deoxyribonuclease, DNase), リボヌクレアーゼ (Ribonuclease, RNase) および各種外分泌酵素活性を測定して、これらの急性膵炎の重症度判定指標としての有用性について検討を行った。急性膵炎の作成は総胆管結紮および総胆管内トリプシン・タウルコール酸ナトリウム混合液注入により行い、それぞれ浮腫性膵炎群ならびに出血壊死性膵炎群 (壊死性膵炎群) とした。また、無処置および単開腹ラットを各々対照群とした。血清アミラーゼ値についてみると、浮腫性膵炎群の12時間値は、単開腹対照群に比し、有意 ($p < 0.05$) に上昇したが、両膵炎群間ではその測定値に差を認めなかった。また、両膵炎群の血清リパーゼ活性は、12時間目より48時間後まで、単開腹対照群に比し、有意に上昇 ($p < 0.01$) したが、両膵炎群間ではその測定値に差を認めなかった。浮腫性膵炎群の36時間目と48時間目および壊死性膵炎群の12時間目より48時間目における血清カルシウム量は、単開腹対照群の値に比し、有意 ($p < 0.05-0.01$) に低下したが、膵炎群間では差を認めなかった。両膵炎群の血清RNase活性は、12時間目より48時間後まで、単開腹対照群に比し、有意 ($p < 0.05-0.01$) に上昇したが、両膵炎群間にはその差を認めなかった。24時間目の壊死性膵炎群における血清DNase I活性は、浮腫性膵炎群の値に比し、有意 ($p < 0.05$) の上昇を示し、同様に12時間目より36時間目まで、壊死性膵炎群の血清DNase II活性は、浮腫性膵炎群の値に比し、有意 ($p < 0.05-0.01$) の上昇を示した。以上の結果より、血清DNase、特にDNase II活性の経時的測定は、急性膵炎の重症度判定に有益であることが示された。

Key words acute pancreatitis, ribonuclease, deoxyribonuclease, acute pancreatitis

近年、急性膵炎の治療は、病態の解明と共に向上し、その病態に応じた治療法が選択されている。基本的に治療法は、膵外分泌酵素阻害作用をもつ薬剤投与を中心とする内科的治療と外科的治療に分けられる。しかし、一般に主として内科的治療が行われ軽症とされる浮腫性膵炎でも死亡者がみられること、また、重症で外科的治療の対象となる出血性あるいは壊死性膵炎の鑑別診断など、個々の症例における重症度判定は治療上重要なことからである。

ところでRansonら¹⁾は、白血球の増加、血清LDHの上昇、血糖値上昇等の11項目を、またJacobsら²⁾は、アルブミンの低下、プロトロンビン時間の延長等の8項目を、予後不良因子とし、多くの研究者は重症

度判定には酵素学的検査所見、生化学的検査所見、重要臓器機能の臨床所見等の総合的把握が必要であり、特に膵由来酵素の測定が重要としている。

著者は、ラットに重症度の異なる急性膵炎を作成することにより、膵酵素の重症度判定指標としての意義について検討し、興味ある成績を得たので述べる。

材料および方法

I. 材 料

実験動物として、生後8~10週経過した体重200~300gのウィスター系雄ラットを実験に用いた。これらのラットはオリエンタル固形飼料および水にて自由摂取飼育され、実験に際しては、24時間絶食され

Abbreviations: DNase, deoxyribonuclease; RNase, ribonuclease.

たラットが使用された。

II. 方 法

1. 急性膵炎群および対照群作成方法

ラットに急性膵炎を作成したが、異なる病態および病理学的に違いのある膵炎を作成するため以下の二方法を採用した。その第一法として、ラットをエーテル麻酔下にて開腹し、Blockの方法³⁾により、総胆管十二指腸開口部の最下端を結紮し、急性膵炎ラットを作成した。

次に第二の方法として、ラットをエーテル麻酔下にて開腹し、末端を結紮した膵上部総胆管へ、3%タウルコール酸ナトリウム液、25,000単位のトリブシンおよび50mgのセファロチンナトリウムを含む生食水0.3ml~0.4mlを約6秒間かけ用手的に注入し、急性膵炎ラットを作成した。

ラットをエーテル麻酔下にて単開腹し、これらを閉腹後に単開腹対照群とした。また、24時間絶食のみのラットを、無処置対照群とした。

2. 検索方法

上記の方法で作成された急性膵炎群および単開腹対照群ラットを、各々の処置後自由に水と飼料を与えたが、いずれの群も処置後12時間目、24時間目、36時間目、48時間目に腹部大動脈よりの急速脱血による血液採取を行い、引き続き膵臓を摘出した。なお、無処置対照群も同様に採血と膵臓摘出を行い以下の如き検索を実施した。

1) 病理学的検索

膵臓の duodenal segment および splenic segment の一部を、10%ホルマリン液にて固定し、パラフィン包埋後、7 μ にて標本を切り出し、ヘマトキシリン-エオジン染色後検鏡した。その後、急性膵炎群を病理組織学的に検討し、浮腫性および壊死性膵炎群に分類した。

2) 急性膵炎群死亡率の検討

上記の二方法により作成した各々25匹のラットについて、処置後12時間以内、24時間以内、36時間以内、48時間以内の死亡率を検討した。

3) 血清および膵組織中外分泌酵素および血清カルシウム値の測定

腹部大動脈より採血した血液を遠心し、血清を分離した。また、摘出した膵を生理食塩水(10ml)と共に、Potter型ホモジナイザーに入れ、0°Cの冷却下にてホモジナイズした。次に試料を高速冷却遠心機にて0°C、10,000 \times g、20分間遠心し、上清を得た。上記方法で得られた血清および適宜希釈された膵組織抽出液について、各々の外分泌酵素を以下の如く測定した。

アミラーゼ活性値は、ultra-violet法⁴⁾により測定し

Somogyi Uで、リパーゼ活性値はLipase Kit "Marupi"⁵⁾を用い、I.Uで表した。また、血清カルシウム値はOCPC法⁶⁾により測定した。

RNase活性値は、polycytidylic acidを基質とするReddiの方法⁷⁾に準じて測定した。その単位を、278nmにおける吸光度 $\times 10^3$ を1Uとして表した。

試料中のDNase活性値の測定は以下の如く行った。試料0.5mlに、基質として牛胸腺のDNA(Sigma[®])溶液(4mg/ml)0.5mlを、さらに、緩衝液2.5mlを加え、35°C、2時間反応させた。なお緩衝液として、DNase I活性値の測定に、pH 7.5のMg²⁺ 20mMを含むトリス-塩酸緩衝液を、DNase II活性値の測定に、pH 5.0のMg²⁺ 20mMを含む0.2M酢酸緩衝液を用いた。上述の反応液には40%過塩素酸0.5mlを加え、反応停止後、12,000 \times g、15分間遠心し、得られた上清をBurton法⁸⁾にて発色させた。その単位を吸光度600nmでの吸光度 $\times 10^3$ を1Uとして表した。

膵組織蛋白質量は、Lowry法⁹⁾にて測定し、なお、前述の膵組織中外分泌酵素活性は、mg proteinあたりに換算して表示した。

3. 統計学的検定

急性膵炎群の死亡率の比較は χ^2 検定にて行った。また、各測定値は平均値 \pm 標準偏差(mean \pm S.D.)で表し、測定値の比較は二元分散分析を行ったのちDuncanの多重比較検定にて行った。

成 績

I. 膵炎の病理組織学的所見

Blockの方法による膵の組織学的所見は、総胆管結紮後12時間目より、膵間質の浮腫および好中球を中心とする間質への軽い細胞浸潤を示した(図1)。また、時間経過とともにこの間質の浮腫は高度となったが、実質の壊死は48時間目において、小範囲にわずかに認められるのみであった(図2)。なお、この方法による膵炎ラットを浮腫性膵炎群とした。

一方、タウルコール酸トリブシン混合液注入膵炎の組織学的所見は、処置後12時間目より、脂肪織の壊死に加え、散在する膵実質の壊死、さらに一部における出血を示した(図3)。この膵炎においては、時間経過とともに、実質の壊死が、高度かつ広範となり膵実質の大部分を占めるにいたった(図4)。なお、この方法による膵炎ラットを壊死性膵炎群とした。また、これらの膵炎の組織学的変化は、duodenalあるいはsplenic segmentなど各部位による差異を認めなかった。

II. 急性膵炎ラットの死亡率

浮腫性膵炎群 (n=25) の処置後 12 時間以内, 24 時間以内, 36 時間以内, 48 時間以内の死亡率は, それぞれ 8% (2/25), 24% (6/25), 28% (7/25), 36% (9/25) であった。これに対し, 壊死性膵炎群 (n=25) の

死亡率は, それぞれ 20% (5/25), 52% (13/25), 64% (16/25), 76% (19/25) であった。この群の死亡率は各時点において浮腫性膵炎群に比し高率であり, 特に, 36 時間以内, 48 時間以内の死亡率は明らかな差を示し

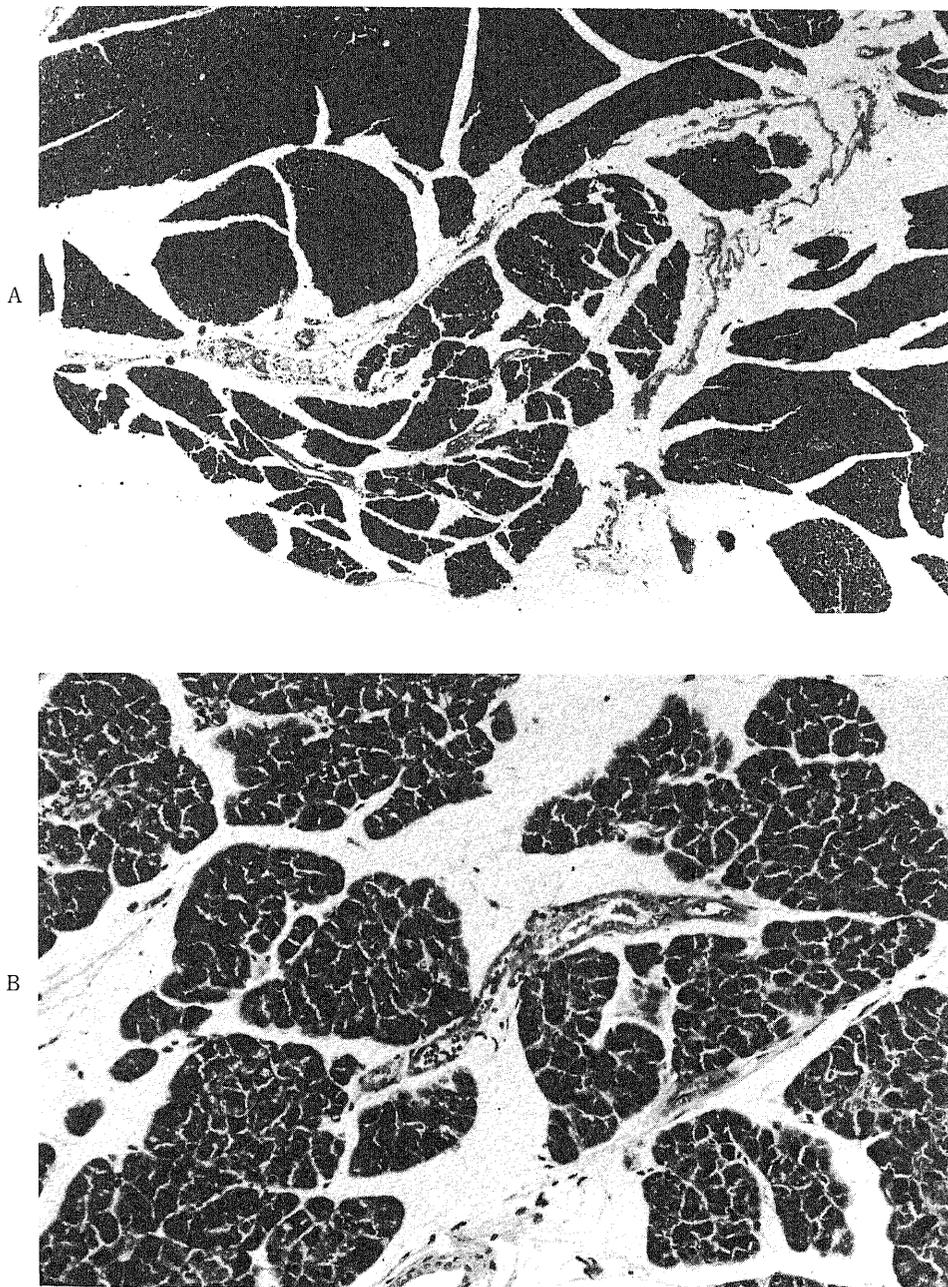


Fig. 1. Histological findings of the pancreas 12 hours after ligation of the common bile duct at its opening into the duodenum, showing interlobular edema with few inflammatory infiltrate. (Hematoxylin and eosin. A, $\times 40$; B, $\times 200$).

た ($p < 0.05$) (図 5).

III. 血清および膵組織中の外分泌酵素活性値

1. 血清アミラーゼ活性値所見

無処置対照群の血清アミラーゼ活性値は、 20.8 ± 5.2

Somogyi U/ml (単位以下同様) ($n=5$, 以下同様) であった。単開腹対照群の血清アミラーゼ活性値は、処置後 12 時間, 24 時間, 36 時間, 48 時間目において、各々 23.2 ± 7.3 , 21.6 ± 11.0 , 21.0 ± 10.3 , 20.9 ± 8.5

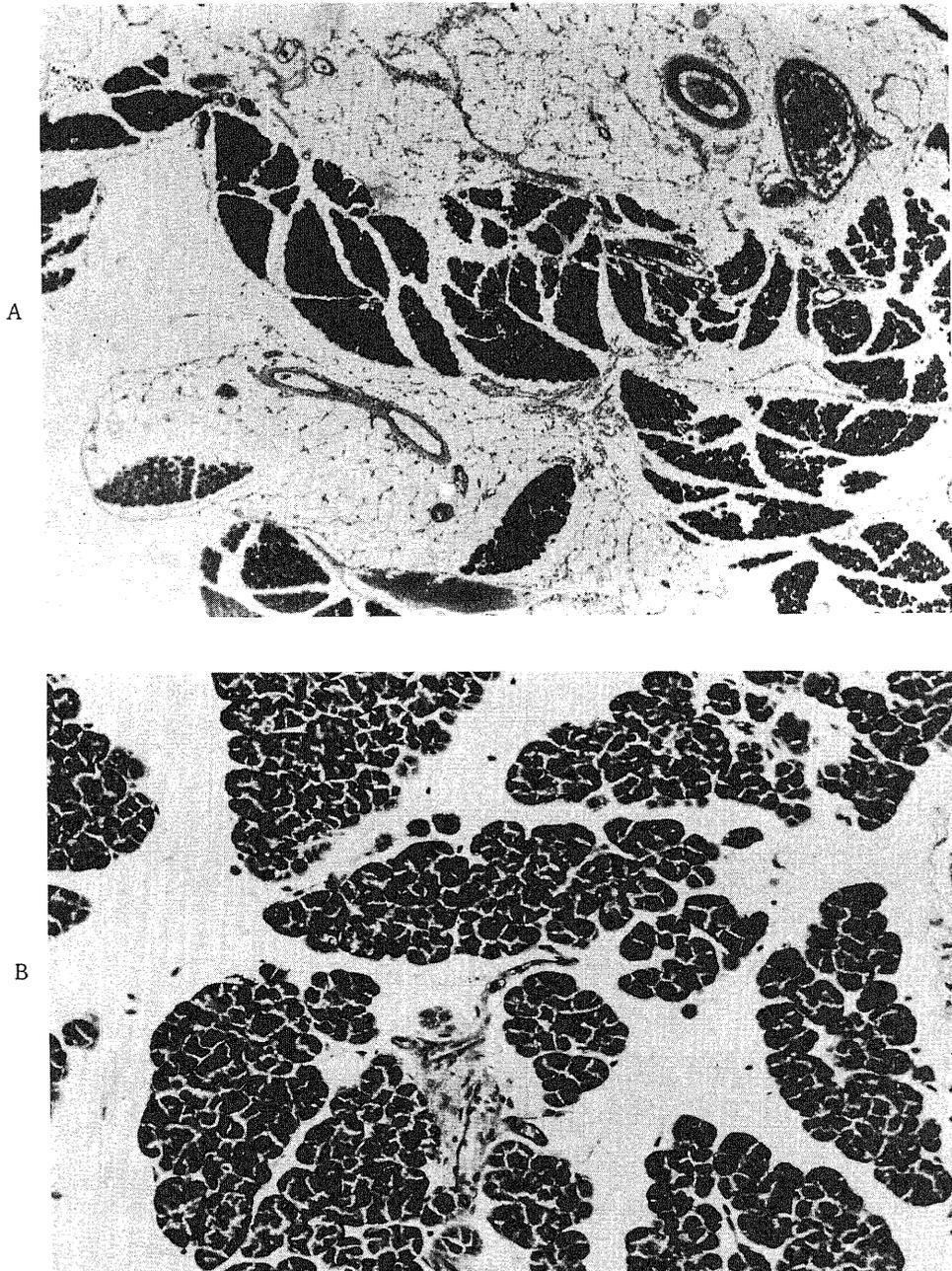


Fig. 2. Histological findings of the pancreas 48 hours after ligation of the common bile duct at its opening into the duodenum, showing prominent interlobular edema with few inflammatory infiltrate and dilatation of the acini. (Hematoxylin and eosin. A, $\times 40$; B, $\times 200$).

であり、単開腹処置による血清アミラーゼ値の変化は認めなかった。

浮腫性膵炎群の血清アミラーゼ活性値は、処置後12時間目が 38.0 ± 9.9 、24時間目が 33.9 ± 8.9 と高値を

示したが、その後、時間経過と共に活性は低下し、36時間目では 24.9 ± 16.0 であり、48時間目では 15.7 ± 7.7 と単開腹対照群の値より低値となった。しかし、各時点でこれらの値に有意の差はなかった。

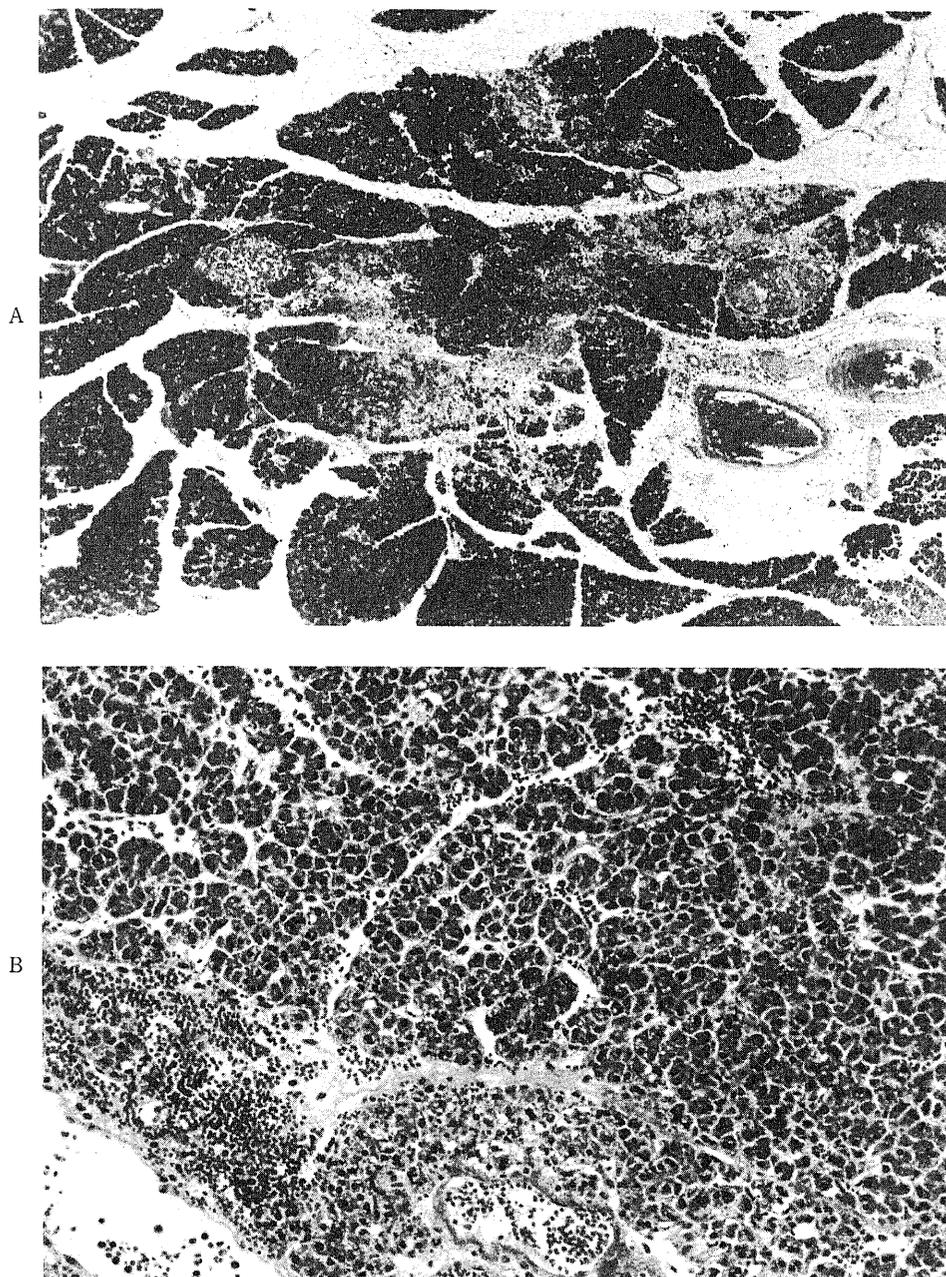


Fig. 3. Histological findings of the pancreas 12 hours after ligation of the common bile duct at its opening into the duodenum and intraductal infusion of 0.3~0.4 ml of sodium taurocholate (3%) containing trypsin (25,000 u), showing parenchymal necrosis with hemorrhage. (Hematoxylin and eosin. A, $\times 40$; B, $\times 200$).

一方、壊死性膵炎群の血清アミラーゼ活性値は、処置後 12 時間目より、 52.3 ± 24.5 と高値を示し、単開腹対照群に比し有意の上昇を示した ($p < 0.05$)。24 時間目の値は 34.1 ± 13.6 、36 時間目の値は 29.0 ± 15.0 と

高値であったが、単開腹対照群に比し有意の差を認めず、48 時間目には 18.1 ± 4.4 と低下した。また、浮腫性膵炎群と壊死性膵炎群の間で各時点における血清アミラーゼ活性値の差を認めなかった (図 6)。

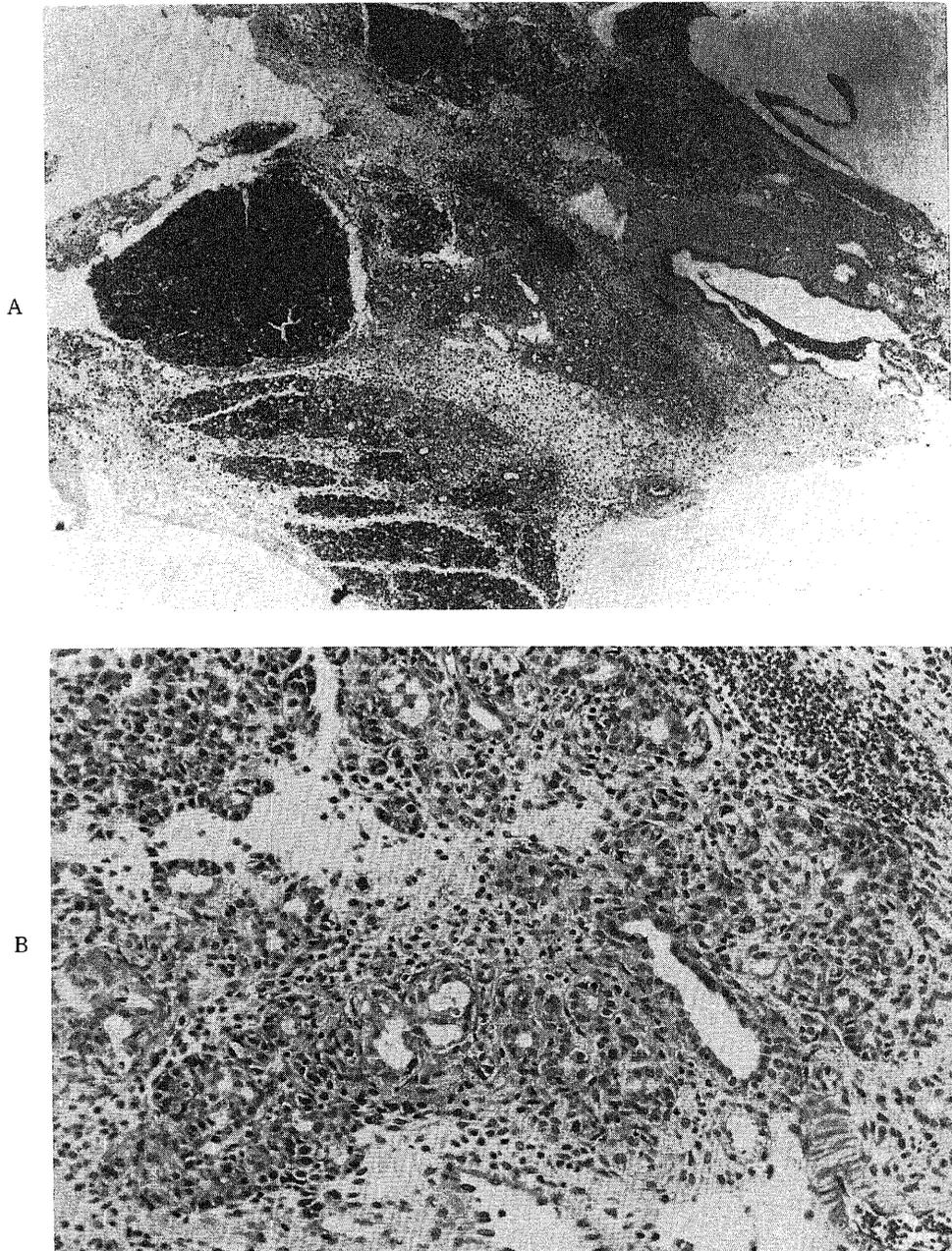


Fig. 4. Histological findings of the pancreas 48 hours after ligation of the common bile duct at its opening into the duodenum and intraductal infusion of 0.3~0.4 ml of sodium taurocholate (3%) containing trypsin (25,000 u), showing extensive necrosis throughout the pancreatic tissue associated with marked inflammatory cell infiltrate and hemorrhage. (Hematoxylin and eosin. A, $\times 40$; B, $\times 200$).

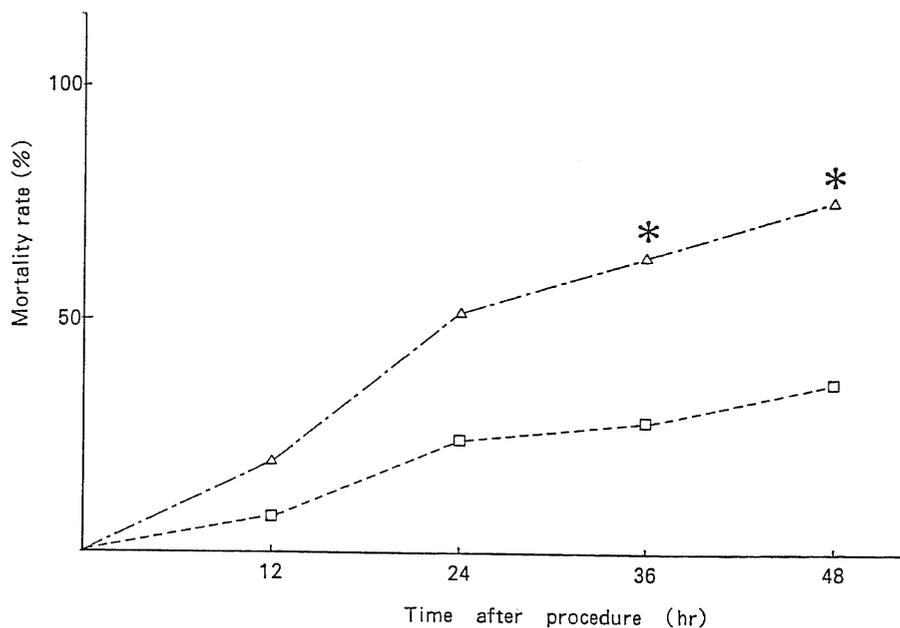


Fig. 5. Comparison of the mortality rate of experimental acute pancreatitis induced by two different procedures. □····□, edematous pancreatitis induced by ligation of the common bile duct at its opening into the duodenum; △····△, necrotizing pancreatitis induced by ligation of the common bile duct at its opening into the duodenum and intraductal infusion of 0.3~0.4 ml of sodium taurocholate (3%) containing trypsin (25,000 u). Data obtained from 25 rats for each groups. * $p < 0.05$ vs. edematous pancreatitis group by χ^2 -test.

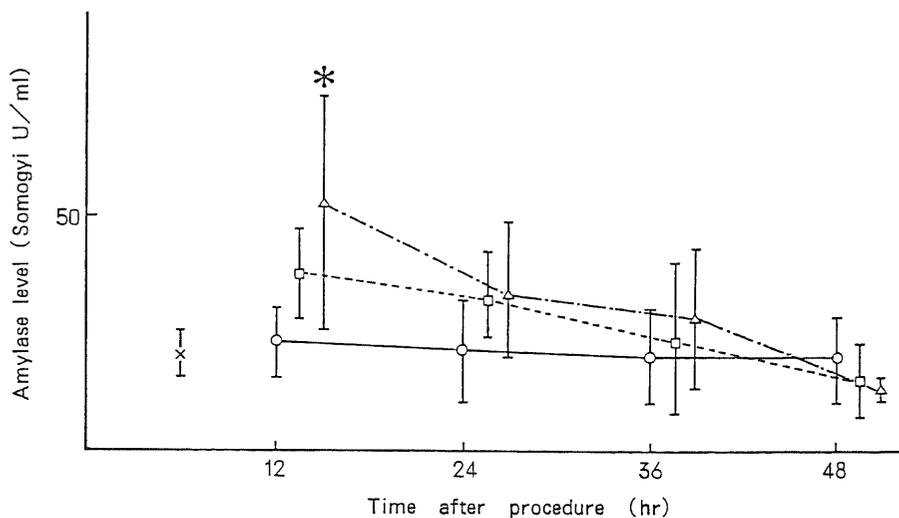


Fig. 6. Changes in plasma amylase levels after different experimental procedures. Each point represents the mean \pm S.D. in 5 rats. X, normal group without any procedure; ○—○, control group, sham operation with laparotomy; □····□, edematous pancreatitis induced by ligation of the common bile duct at its opening into the duodenum; △····△, necrotizing pancreatitis induced by ligation of the common bile duct at its opening into the duodenum and intraductal infusion of 0.3~0.4 ml of sodium taurocholate (3%) containing trypsin (25,000 u). * $p < 0.05$ vs. control group by 2-way ANOVA followed by Duncan's multiple range test.

2. 膵組織中のアミラーゼ活性値所見

無処置対照群の膵組織中のアミラーゼ活性値は 19.2 ± 4.6 Somogyi U/mg protein ($n=5$) であった。単開腹対照群の処置後 12, 24, 36, 48 時間目の値はそれぞれ 18.2 ± 4.0 , 18.0 ± 4.6 , 17.9 ± 4.8 , 18.1 ± 4.4 であり、単開腹処置による膵組織中アミラーゼ値の変

化を認めなかった。

浮腫性膵炎群の膵組織中アミラーゼ活性値は、処置後 12 時間目が 17.7 ± 3.6 であり、24, 36, 48 時間目では、それぞれ 15.3 ± 3.7 , 14.7 ± 3.9 , 15.4 ± 3.5 と低値を示したが、単開腹対照群の値との間に推計学的な有意差を認めなかった。

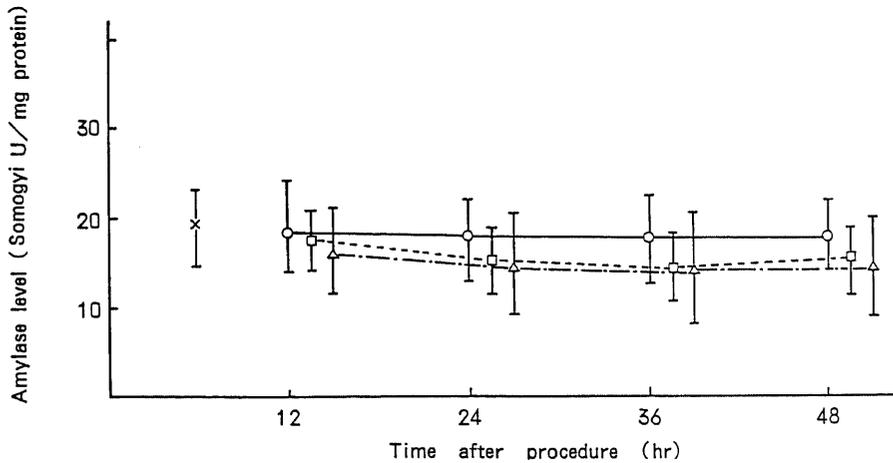


Fig. 7. Changes in amylase levels of pancreatic extracts after different experimental procedures. Abbreviations and symbols are the same as in Fig. 6.

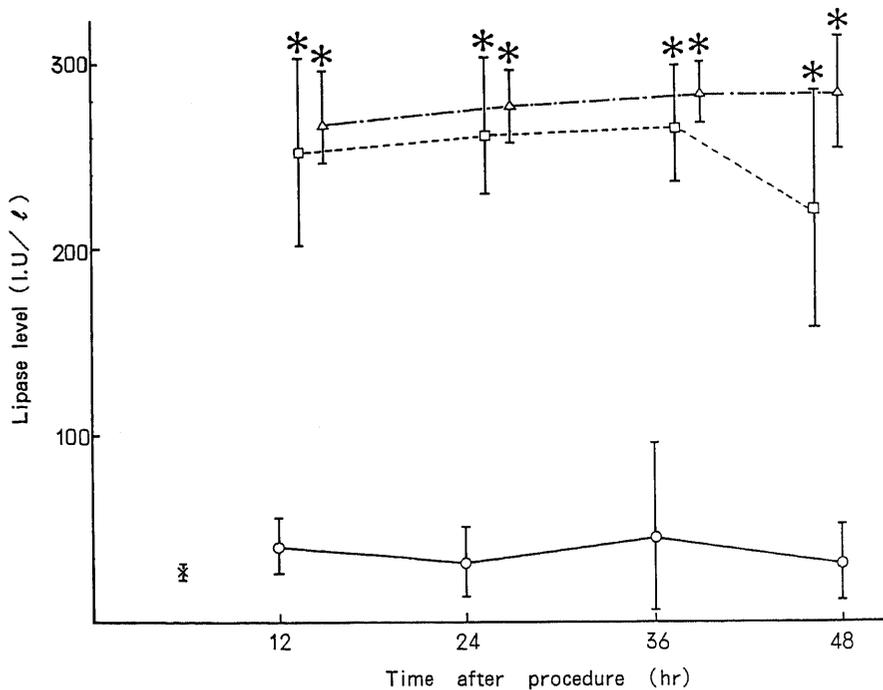


Fig. 8. Changes in plasma lipase levels after different experimental procedures. Abbreviations and symbols as same as in Fig. 6. * $p < 0.01$ vs. control group by 2-way ANOVA followed by Duncan's multiple range test.

また、壊死性膵炎群の膵組織中アミラーゼ活性値も同様の経時的変化で推移し、処置後 12, 24, 36, 48 時間目の値は各々 16.7 ± 5.0 , 14.9 ± 5.6 , 14.4 ± 6.3 , 14.7 ± 5.5 と低下したが、単開腹対照群および浮腫性膵炎群との間に活性値における有意差を認めなかった (図 7)。

3. 血清リパーゼ活性値所見

無処置対照群の血清リパーゼ活性値は、 26 ± 9 I. U/l ($n=5$) であった。単開腹対照群の処置後 12, 24, 36, 48 時間目の値は、それぞれ 40 ± 21 , 33 ± 21 , 46 ± 33 , 33 ± 24 であり、単開腹処置による血清リパーゼ値の変化に有意の差を認めなかった。

浮腫性膵炎群および壊死性膵炎群の血清リパーゼ活性値は、処置後 12 時間目に各々 256 ± 45 , 270 ± 22 と単開腹対照群に比し、明らかな高値を示した ($p < 0.01$)。また、24 時間目の値はそれぞれ 267 ± 35 , 277 ± 19 , 36 時間目ではそれぞれ 269 ± 27 , 281 ± 19 , 48 時間目ではそれぞれ 222 ± 67 , 280 ± 37 であり、各時点で単開腹対照群に比し、有意 ($p < 0.01$) に高値が持続したが、両膵炎群間では差を認めなかった (図 8)。

4. 膵組織中のリパーゼ活性値所見

無処置対照群の膵組織中リパーゼ活性値は、 55.0 ± 3.9 I. U/mg protein (単位以下同様) ($n=5$, 以下同様) であった。単開腹対照群の処置後 12, 24, 36, 48 時間目の値は、それぞれ 55.6 ± 4.2 , 54.8 ± 3.5 , 55.3 ± 3.9 , 55.0 ± 4.0 であり、単開腹処置によるリパーゼ値の変化を認めなかった。

浮腫性膵炎群の処置後 12, 24, 36, 48 時間目の値は、それぞれ 54.0 ± 3.7 , 51.9 ± 3.6 , 52.1 ± 3.8 , 49.3 ± 1.7 であり、48 時間目で単開腹対照群に比し有意の低下を示した ($p < 0.05$)。

一方、壊死性膵炎群の処置後 12, 24 時間目の値は 54.3 ± 4.6 , 51.0 ± 4.7 と単開腹対照群との間に差を認めなかったが、36 時間目の値は 49.6 ± 2.6 , 48 時間目の値は 49.3 ± 1.8 であり、いずれも単開腹対照群に比し有意に低下した ($p < 0.05$)。しかし、浮腫性膵炎群と壊死性膵炎群の間にはリパーゼ活性値の差を認めなかった (図 9)。

IV. 血清カルシウム値所見

無処置対照群の血清カルシウム値は、 5.4 ± 0.1 mEq/l ($n=5$) であった。単開腹対照群の血清カルシウム値は、処置後 12, 24, 36, 48 時間目で、それぞれ 5.2 ± 0.2 , 5.3 ± 0.2 , 5.3 ± 0.3 , 5.3 ± 0.2 であり、単開腹処置による変化を認めなかった。

浮腫性膵炎群の血清カルシウム値は 12 時間目が 5.1 ± 0.4 , 24 時間目が 4.9 ± 0.4 と低下傾向を示し、36 時間目では 4.6 ± 0.1 , 48 時間目では 4.4 ± 0.9 とさらに低値となり、36 時間目と 48 時間目では単開腹対照群に比し、有意に低値を示した ($p < 0.05$)。

一方、壊死性膵炎群の 12 時間目の血清カルシウムの値は 4.9 ± 0.2 と単開腹対照群に比し、有意に低値であった ($p < 0.05$)。また、24 時間目の値は 4.2 ± 0.6 , 36 時間目の値は 4.1 ± 0.7 , 48 時間目の値は 3.8 ± 0.7 と時間経過とともに低下し、各時点で単開腹対照群に比し、有意の低下であった ($p < 0.01$)。しかし、両膵炎群間では血清カルシウム値に有意差を認めなかった (図 10)。

V. 血清および膵組織中の RNase 活性値所見

1. 血清 RNase 活性値所見

無処置対照群の血清 RNase 活性値は、 50.4 ± 4.0 U/ml (単位以下同様) ($n=5$, 以下同様) であった。単開腹対照群の値は、処置後 12, 24, 36, 48 時間目で、

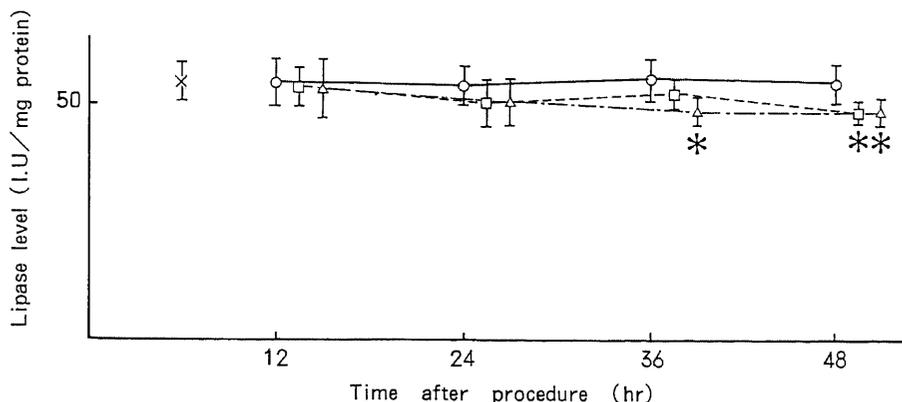


Fig. 9. Changes in lipase levels of pancreatic extracts after different experimental procedures. Abbreviations and symbols are the same as in Fig. 6. * $p < 0.05$ vs. control group by 2-way ANOVA followed by Duncan's multiple range test.

それぞれ 53.0 ± 1.7 , 54.0 ± 1.5 , 53.0 ± 1.8 , 51.5 ± 1.9 であり, 単開腹処置による血清 RNase 活性値の変動を認めなかった。

浮腫性膝炎群の血清 RNase 活性値は, 処置後 12 時

間目に 410 ± 155 と高値となったが, 24 時間目では 390 ± 128 , 36 時間目では 310 ± 150 , 48 時間目では 274 ± 168 と徐々に低下した。しかし, この群の測定値は, 各時点において単開腹対照群に比し, 明らかに高

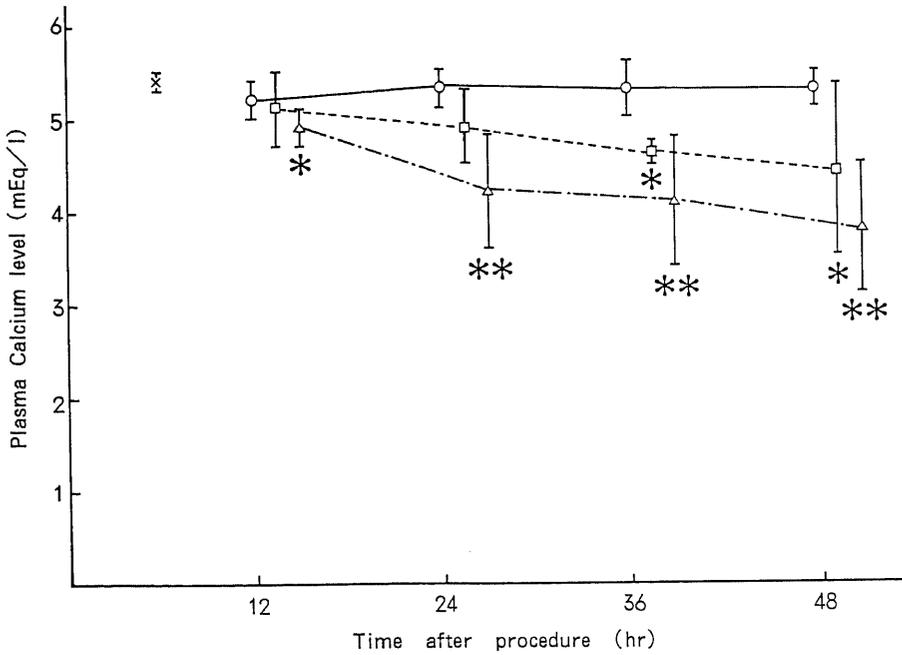


Fig. 10. Changes in plasma calcium levels after different experimental procedures. Abbreviations and symbols are the same as in Fig. 6. * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ vs. control group by 2-way ANOVA followed by Duncan's multiple range test.

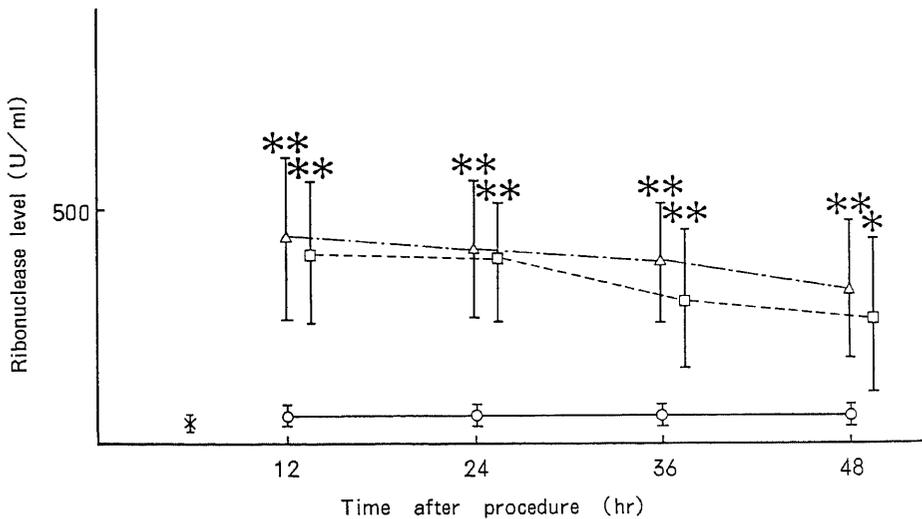


Fig. 11. Changes in plasma ribonuclease levels after different experimental procedures. Abbreviations and symbols are the same as in Fig. 6. * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ vs. control group by 2-way ANOVA followed by Duncan's multiple range test.

値であった ($p < 0.05 - 0.01$).

壊死性膵炎群の処置後 12, 24, 36, 48 時間目の血清 RNase 活性値は 447 ± 172 , 420 ± 145 , 392 ± 125 , 330 ± 150 と高値であり, 各時点で単開腹対照群に比し有意に上昇した ($p < 0.01$). しかし, 浮腫性膵炎群に比し, 壊死性膵炎群の値は各時点で高い傾向にあったが, 有意の差は認めなかった (図 11).

2. 膵組織中の RNase 活性値所見

無処置対照群の膵組織中 RNase 活性値は, 43 ± 18 U/mg protein ($n=5$) であった. 単開腹対照群の処置後 12, 24, 36, 48 時間目の RNase 活性値は, それぞれ 42 ± 17 , 44 ± 14 , 46 ± 16 , 43 ± 19 であり, 単開腹処置による測定値の変化を認めなかった. 浮腫性膵炎群の処置後 12, 24, 36, 48 時間目の RNase 活性値は, それぞれ 39 ± 17 , 34 ± 15 , 39 ± 12 , 42 ± 16 であり, 36 時間目においてやや低下を示すが, 単開腹対照群に比し, 有意の変化ではなかった.

壊死性膵炎群の処置後 12, 24, 36, 48 時間目の RNase 活性値はそれぞれ 42 ± 16 , 39 ± 15 , 44 ± 16 , 41 ± 17 であり, いずれも単開腹対照群ならびに浮腫性膵炎群の値との間に差を認めなかった (図 12).

VI. 血清および膵組織中の DNase 活性値

1. 血清 DNase 活性値所見

1) 血清 DNase I 活性値所見

無処置対照群の血清 DNase I 活性値は 685 ± 144 U/0.5 ml ($n=5$) であった. 単開腹対照群の処置後 12, 24, 36, 48 時間目の DNase I 活性値はそれぞれ

635 ± 195 , 672 ± 162 , 650 ± 98 , 646 ± 96 であり, 単開腹処置による測定値の変化を認めなかった. 浮腫性膵炎群の血清 DNase I 活性値は処置後 12 時間目が, 661 ± 247 , 24 時間目が, 794 ± 254 , 36 時間目が 743 ± 252 , 48 時間目が, 722 ± 181 であり, 24 時間目以降に高値の傾向がみられたが, 単開腹対照群に比し, 有意の差ではなかった.

一方, 壊死性膵炎群の処置後 12 時間目の DNase I 活性値は 943 ± 290 と高値であり, 24 時間目に 1270 ± 329 とさらに上昇した. 24 時間目の値は, 単開腹対照群の値, さらに, 浮腫性膵炎群の値に比し, 有意に高値であった ($p < 0.01$, $p < 0.05$). 処置後 36 時間目の値は 862 ± 282 で, 48 時間目の値は 830 ± 336 であり, いずれも高値の傾向を示した (図 13).

2) 血清 DNase II 活性値

無処置対照群の血清 DNase II 活性値は 623 ± 174 U/0.5 ml ($n=5$) であった. 単開腹対照群の値は処置後 12, 24, 36, 48 時間目に, それぞれ 628 ± 123 , 655 ± 175 , 688 ± 108 , 629 ± 129 であり, 単開腹処置による変化を認めなかった.

浮腫性膵炎群の血清 DNase II 活性値は処置後 12 時間目が 582 ± 103 , 24 時間目が 736 ± 127 , 36 時間目が 694 ± 233 , 48 時間目が 583 ± 103 と, ほとんど変動を示さなかった.

一方, 壊死性膵炎群の血清 DNase II 活性値は処置後 12 時間目が 938 ± 296 であり, 単開腹対照群および浮腫性膵炎群の値に比し, 有意に高値であった ($p <$

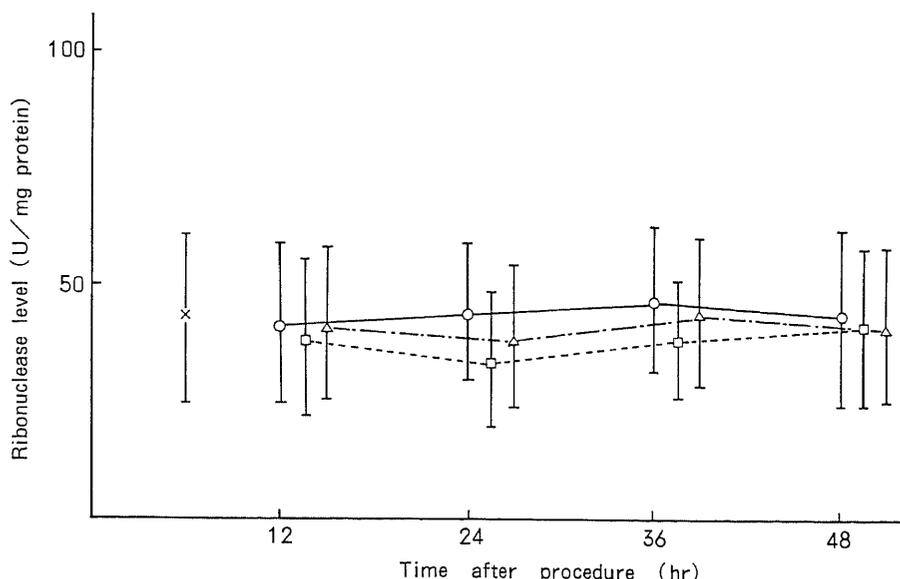


Fig. 12. Changes in ribonuclease levels of pancreatic extracts after different experimental procedures. Abbreviations and symbols are the same as in Fig. 6.

0.05)。活性値は処置後24時間目に 1148 ± 363 、36時間目に 1352 ± 364 と上昇し、単開腹対照群に比し、有意 ($p < 0.01$) に高値を示し、また、浮腫性肺炎群に比しても有意 ($p < 0.05$, $p < 0.01$) の高値を示した。48時間目の値は、 966 ± 420 と低下傾向を示し、単開腹対照群および浮腫性肺炎群との間に有意差を認めなかった (図14)。

2. 臍組織中のDNase活性値所見

1) 臍組織中のDNase I活性値所見

無処置対照群の臍組織中DNase I活性値は 7.9 ± 2.2 U/mg protein ($n=5$)であった。単開腹対照群の処置後12, 24, 36, 48時間目の値はそれぞれ 8.1 ± 3.0 , 8.7 ± 5.5 , 8.0 ± 4.7 , 7.4 ± 5.5 であり、単開腹処置による活性の変化を認めなかった。

浮腫性肺炎群および壊死性肺炎群の処置後12時間目のDNase I活性値はそれぞれ 7.7 ± 2.8 , 7.6 ± 3.4 で、24時間目の値は 5.9 ± 3.0 , 6.9 ± 2.7 、36時間目の値は 5.5 ± 2.4 , 6.7 ± 3.2 、48時間目の値は 5.2 ± 3.0 、

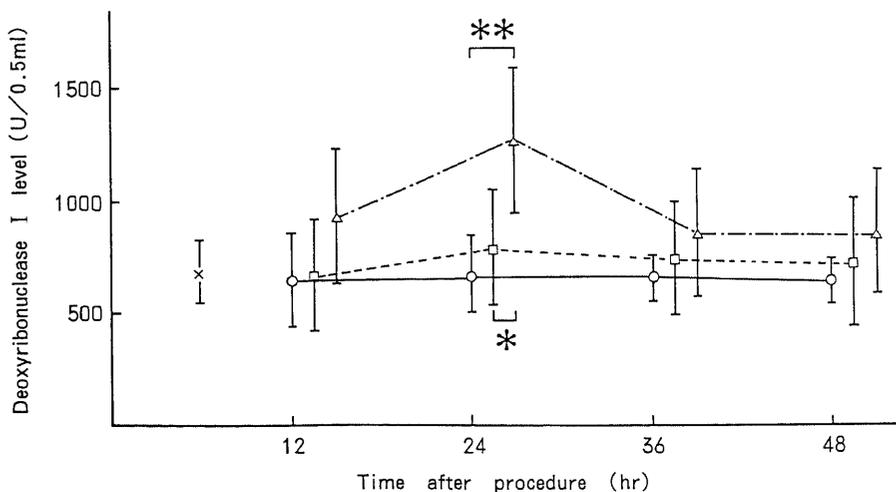


Fig. 13. Changes in plasma deoxyribonuclease I levels after different experimental procedures. Abbreviations and symbols are the same as in Fig. 6. * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ by 2-way ANOVA followed by Duncan's multiple range test.

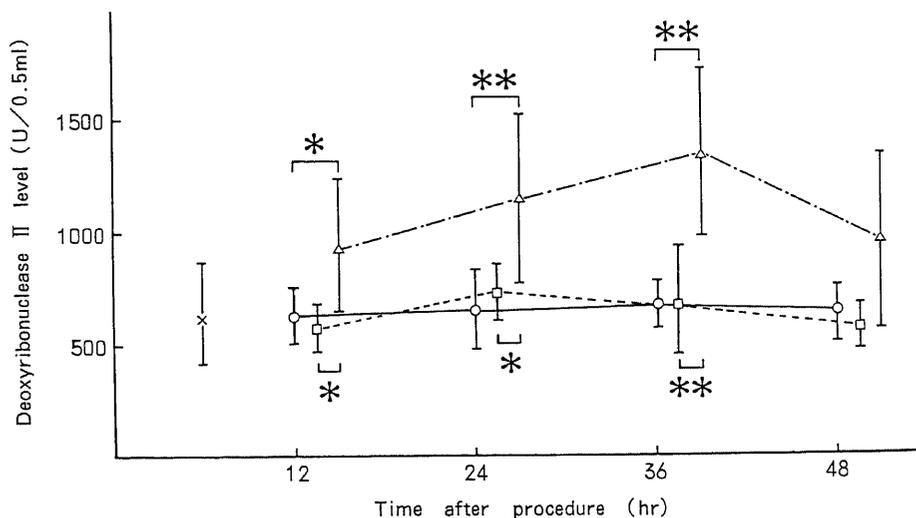


Fig. 14. Changes in plasma deoxyribonuclease II levels after different experimental procedures. Abbreviations and symbols are the same as in Fig. 6. * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ by 2-way ANOVA followed by Duncan's multiple range test.

6.7±3.2, 48 時間目の値は 5.2±3.0, 6.5±3.0 であった。これらの値は時間経過とともに低下する傾向を示したが、両膵炎群間や単開腹対照群との間に有意差を認めなかった (図 15)。

2) 膵組織中の DNase II 活性値所見

無処置対照群の膵組織中の DNase II 活性値は 22.8±5.4 U/mg protein (n=5) であった。単開腹対照群の処置後 12, 24, 36, 48 時間目の値はそれぞれ

22.0±5.1, 23.0±7.1, 21.9±7.2, 22.0±6.7 であり、単開処置による活性値の変化を認めなかった。

浮腫性膵炎群の処置後 12, 24, 36, 48 時間目の DNase II 活性値は、それぞれ 23.4±6.6, 24.0±6.9, 20.1±6.5, 20.3±7.9 であり、活性値の変動はほとんど認めなかった。

また、壊死性膵炎群においても、処置後 12 時間目の値は 22.5±5.5, 24 時間目の値は 23.8±5.9 であり、

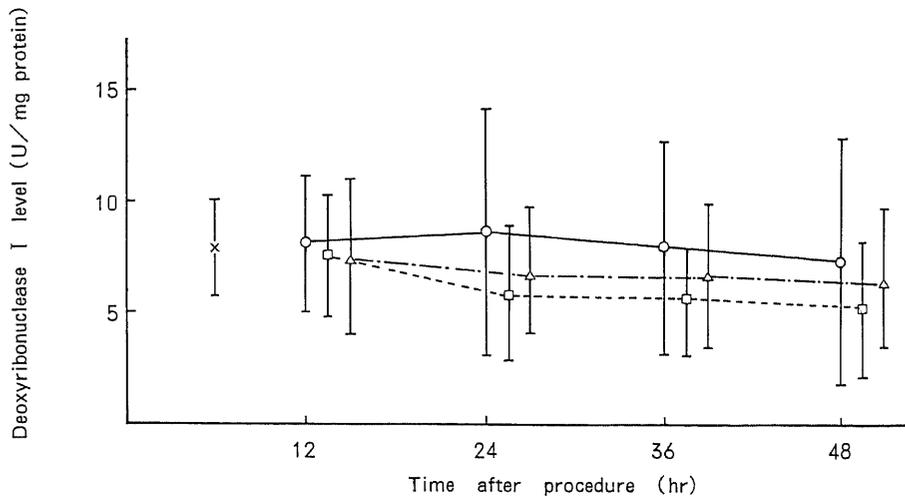


Fig. 15. Changes in deoxyribonuclease I levels of pancreatic extracts after different experimental procedures. Abbreviations and symbols are the same as in Fig. 6.

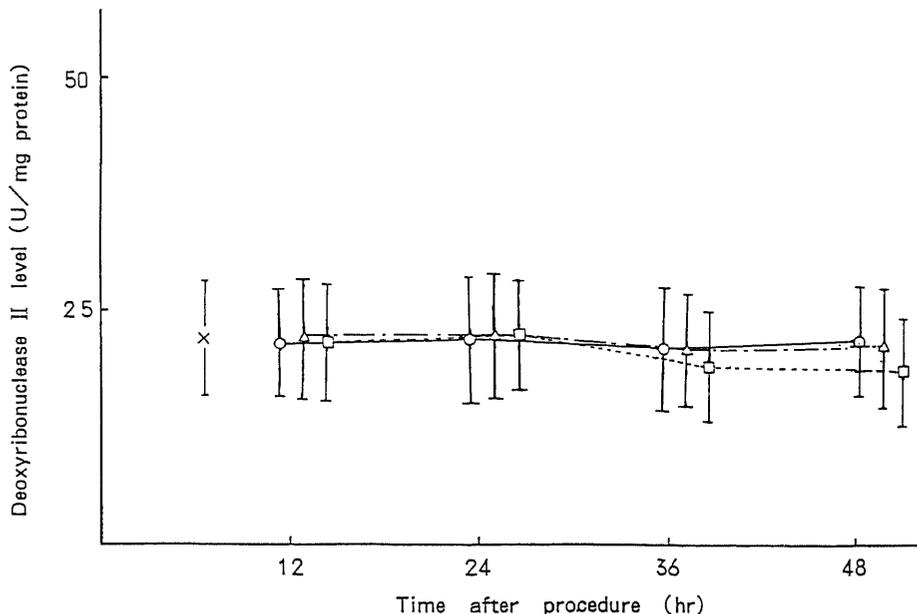


Fig. 16. Changes in deoxyribonuclease II levels of pancreatic extracts after different experimental procedures. Abbreviations and symbols are the same as in Fig. 6.

活性値の変動を認めなかった。また、36時間目の値は 17.1 ± 6.5 、48時間目の値は 16.1 ± 6.2 と低下の傾向を示した (図 16)。

考 察

急性膵炎の病態や重症度に関する実験的および臨床的研究はこれまでに多くみられるが、膵臓の病理学的変化を反映する病態診断あるいは重症度判定についての研究は、なお十分とは言い難く、一層の検討を要する。

ところで、急性膵炎の発生機序および病態の解明などの目的で、膵管内へのエラストラーゼ注入や自家胆汁の注入、blind loopの作成、あるいはエチオニン投与等^{10)~13)}の様々な実験モデルの作成法が報告されている。これらの方法で得られた急性膵炎の病理学的所見は、軽度の浮腫性膵炎や重篤な壊死または出血性膵炎などと多彩である。著者の用いた総胆管末端を結紮する Block 法³⁾の方法では、間質内浮腫および軽度の細胞浸潤を主体とする浮腫性膵炎の組織像がみられた。一方、この Block の方法に加え、総胆管内ヘトリプシンおよびタウルコール酸混合液を注入した方法¹⁴⁾では、膵実質や脂肪織の壊死、さらに一部に巣状の出血部をみる壊死性膵炎が認められた。また、両者の方法により作成された急性膵炎の病理学的所見における差異は、膵炎作成後 12時間目より 48時間目の期間で明らかであり、組織学的に異なる膵炎像を観察できた。ところで膵炎の病理学的所見の分類には、多くの分類¹⁵⁾¹⁶⁾が用いられているが、この実験で得られた膵炎像は、Baggenstoss¹⁷⁾の急性浮腫性膵炎および急性壊死性膵炎に相当した。また、臨床的には、急性膵炎の病理学的変化と重症度は密接な関係があるとされるが、一般的に死亡率にみられる如く、浮腫性膵炎は軽症として、壊死性膵炎は中等症から重症として扱われている¹⁹⁾²⁰⁾。このような観点から本実験においては浮腫性膵炎を軽症膵炎として、壊死性膵炎を重症膵炎として取り扱った。

急性膵炎の本態は、局所においては活性化された膵外分泌酵素の間質内逸脱に基づく自己消化による病変とされている。小葉間隙から膵静脈、あるいは胸管リンパ管を経由し、血中に逸脱した膵酵素と膵炎の重症度の関連は治療上重要である。アミラーゼの重要性は Elman らの報告²¹⁾以来広く認められている。特に、実験的膵炎早期の血中アミラーゼ上昇についてみると、胆汁を膵管へ注入後 5~10 分で活性の上昇が認められている²²⁾。著者の成績でも、処置後 12時間目の壊死性膵炎群では、単開腹対照群に比し、アミラーゼ活性の有意の上昇をみた。一方、浮腫性および壊死性膵炎群

間でその上昇程度に差を認めなかった。従って、本酵素は早期診断における有用性を示唆したが、重症度や病型のパラメーターとなり得なかった。また、膵炎の病態の進行にかかわらず 12時間目以後、血清アミラーゼ活性は低下傾向にあった。臨床でも死亡に至る重症例においてさえ血中アミラーゼの漸減²³⁾が示され、このような変化をとる機序としてアミラーゼインヒターによる失活²⁴⁾やアミラーゼの半減期が短く turnover による減少等²⁵⁾が報告されていることは興味深い。一方、実験的急性膵炎における酵素蛋白合成能の低下も²⁶⁾²⁷⁾報告されており、著者の実験においても膵組織内のアミラーゼ活性値の低下は両膵炎群において認められた。

一方、脂肪分解酵素である血清リパーゼ活性値は処置後 12時間目より 48時間目においても両膵炎群で高値が持続した。従って、血中アミラーゼ活性値に比し、その陽性率は高く、著者の成績も活性の高値持続が長時間に及ぶとの報告²⁸⁾に一致していた。しかしながら、前者同様に血中リパーゼ値の変動も病態や膵の病理学的変化を明確に表さなかった。

急性膵炎の重症度判定に関する研究として、Ranson¹⁾や Jacobs²⁾の報告があるが、それによると来院時または診断時より 48時間以内の血清カルシウム値が 8 mg/dl 以下の患者では、重症または予後不良とされている。急性膵炎時の低カルシウム血症について多くの報告²⁹⁾があるが、その機序は未だ確定されていない。著者は両膵炎群に対し、血清カルシウム値を経時的に測定したが、膵炎作成後 12時間目より 48時間目の壊死性膵炎群の値は、単開腹対照群に比し有意に低下した。また、36時間目の浮腫性膵炎群の値も低下を示したが、両膵炎群間では差を認めず、血清カルシウム値も病態や膵の病理学的変化を明確に表さなかった。

RNase は生体内に広く分布する核酸分解酵素で、phosphodiesterase 作用により、RNA を基質とし、ribonucleoside 2' ; 3'-cyclic diphosphate を生成する水解酵素³⁰⁾である。ラットの RNase に関しては、膵組織中におけるその日内変動の報告³¹⁾もみられる。臨床においては、膵癌組織中の RNase³²⁾あるいは膵癌患者における血清 RNase に関する報告³³⁾などがみられる。これらの研究のいずれも、膵癌組織由来の RNase の上昇を推測している。Warshaw³⁴⁾は、慢性膵炎、急性膵炎症例の血清 RNase 値を測定し、膵壊死や膵臓瘍などの重症例で血清 RNase 活性の明らかな上昇がみられたと報告している。Reddi は血清を合成基質 polycytidylic acid (poly C) を基質とし、pH 7.5、37°C で反応させた後、その酸可溶性分解産物を吸光度 278

nmで定量する方法を報告⁷⁾した。著者は、Reddiの方法に準じ、血清および膵組織中のRNase活性を検討した。両膵炎群で処置後12時間目より48時間目まで血清RNase値の上昇を認めたが、浮腫性膵炎群と壊死性膵炎群との間で測定値に有意差は認めなかった。

DNaseは、Kunitz³⁵⁾により牛の膵より結晶化され、また、Kurnick³⁶⁾によりヒト、犬、ラット、モルモットの血清中にその存在が報告されている。Lindahlら³⁷⁾によれば、DNaseにはI、II、III、IVの4種類があり、そのうちDNase Iは至適pH 7.1で分子量31,000、DNase IIは至適pH 4.8で分子量38,000とされている。その生理的役割の解明はまだまだ不十分であるが、Allfreyらの研究³⁸⁾によれば、“acid”DNaseはライソゾームに存在し、細胞内核酸代謝に関与し、“neutral”DNaseは膵液中に外分泌され、消化酵素として働くとされている。著者はpH 7.5の条件下で、DNase I (“neutral”DNase)を、また、pH 5.0でDNase II (“acid”DNase)を測定した。Kowlessarら³⁹⁾は、膵管結紮によるDNase I活性値の上昇、ラットのエチオン膵炎でのDNase I活性値の上昇を報告した。さらに、彼らは浮腫性膵炎および膵ノウ胞、膵瘻症例でのDNase I活性値の上昇、さらに急性出血壊死性膵炎例におけるこの活性値の著明な上昇を認め、壊死性膵炎でのDNase Iの有用性を強調した。また、船越ら⁴⁰⁾は、パンクレオザイミン-セクレチンテスト時のヒト膵液中のDNase I活性値を測定し、パンクレオザイミン負荷によるその著明な上昇や慢性膵炎症例における測定値の低下を報告している。従って、これらの血清DNase値が膵炎の病型あるいは膵実質細胞の壊死や障害程度をいかに反映するか関心がもたれる。著者の実験においては壊死性膵炎群のDNase Iの24時間値およびDNase IIの12~36時間値は、浮腫性膵炎群の測定値に比し、有意の上昇を示したが、その経時的变化をみるとDNase Iは膵炎作成後24時間で最高値に達したのに対し、DNase IIは36時間で最高値に達した。これらの両値の時間的変動差の機序として、DNase Iにはインヒビターが存在するとする船越ら⁴⁰⁾の指摘の如く、時間経過と共にその活性が低下する可能性があること、また、膵管内に分泌されるDNase Iの逸脱は早期におこるが、壊死性膵炎群における細胞破壊が長時間に及んだ場合に細胞内酵素であるDNase IIの逸脱が遷延することなどが推察される。

著者の実験において、DNase活性値、特に組織内酵素とされるDNase IIの壊死性膵炎群における血中の推移は、膵実質の壊死を酵素学的にも反映している。従って、膵の組織学的変化をかなり表すのにDNase

IIが有効なパラメーターとなりうる可能性のあることが示唆された。この点、血中RNase活性値所見が浮腫性膵炎群と壊死性膵炎群との鑑別に有用でなかった成績と異なり、本酵素は病態あるいは重症度判定に有益であると考えられる。

著者の膵炎モデルは、作成法によりそれぞれ重症度の異なる膵炎像を示したが、臨床においては、浮腫性膵炎から壊死性膵炎への進展の有無は重要な問題である。浮腫性膵炎の時期を経過せずに出血および壊死性膵炎が発生するとのThalらの報告⁴¹⁾がある一方、浮腫性膵炎に血流障害が加わり出血および壊死性膵炎へと進展するとのPopperらの報告など⁴²⁾があり、この点は未だ一致をみていない。最近においては、特にcomputed tomographyにより膵の腫大の程度、膵周囲の炎症性変化、液体貯留の有無などの所見から手術適応の決定がある程度可能とされている。しかしながら、開腹手術を施行せずに膵炎の病態診断を行うことは現在なお困難であり、画像診断を含む多くの臨床的パラメーターの検索を必要とする。これらの点において、著者の実験は、血清DNase、特にDNase II活性値の測定が膵炎の病態診断や重症度判定に有益なことを示した。

結 論

ラットに浮腫性膵炎および壊死性膵炎を作成し、処置後12、24、36、48時間目の血清および膵組織中のアミラーゼおよびリパーゼ活性、血清カルシウム量、血清および膵組織中のRNase、DNase IおよびDNase II活性を測定することにより、これらの重症度判定指標としての有用性について検討を加え、以下の結論を得た。

1. 血清アミラーゼ活性は、膵炎作成後12時間目の壊死性膵炎群において、単開腹対照群に比し、有意に高値を示したが、膵炎群間では差を認めなかった。
2. 血清リパーゼ活性は、12時間目より48時間目まで両膵炎群において、単開腹対照群に比し、有意に高値を示したが、膵炎群間では差を認めなかった。
3. 血清カルシウムは、36時間目と48時間目の浮腫性膵炎群および12時間目より48時間目の壊死性膵炎群において、単開腹対照群に比し、有意に高値を示したが、膵炎群間では差を認めなかった。
4. 血清RNase活性は、12時間目より48時間目まで両膵炎群において、単開腹対照群に比し、有意に高値を示したが、膵炎群間では差を認めなかった。
5. 血清DNase I活性は、24時間目の壊死性膵炎群において、単開腹対照群および浮腫性膵炎群に比し、有意に高値を示した。

6. 血清 DNase II 活性は、12 時間目より 36 時間目の壊死性膵炎群において、単開腹対照群および浮腫性膵炎群に比し、有意に高値を示した。

以上の成績は、血清中の DNase I および DNase II 活性値が急性膵炎の組織学的所見を反映することを、また、それらの経時的測定が重症度判定に有益であることを示した。

謝 辞

稿を終るに臨み、御指導、御校閲を賜りました宮崎逸夫教授に深謝いたします。また、直接御指導、御助言戴いた金沢医科大学一般消化器外科木南義雄教授に感謝の念を表します。

本論文の要旨は第 67 回日本消化器病学会総会において発表した。

文 献

- 1) Ranson, J. H. C., Rifkind, K. M. & Turner, J. M.: Prognostic signs and postoperative peritoneal lavage in acute pancreatitis. *Surg. Gynecol. Obstet.*, **143**, 209-219 (1976).
- 2) Jacobs, M. L., Dagget, W. H., Civetta, J. M., Vasu, M. A., Lawson, D. W., Warshaw, A. L., Nardi, G. J. & Bartlett, M. K.: Acute pancreatitis. Analysis of factors influencing survival. *Ann. Surg.*, **185**, 43-51 (1977).
- 3) Block, M. A., Wakim, K. G. & Baggenstoss, A. H.: Experimental studies concerning factors in the pathogenesis of acute pancreatitis. *Surg. Gynecol. Obstet.*, **99**, 83-90 (1954).
- 4) Marshall, J. J., Iodice, A. P. & Whelan, W. J.: A new serum α -amylase assay of high sensitivity. *Clin. Chim. Acta.*, **76**, 277-283 (1977).
- 5) Kurooka, S., Okamoto, S. & Hashimoto, M.: A novel and simple colorimetric assay for human serum lipase. *J. Biochem.*, **81**, 361-369 (1977).
- 6) Connerty, H. V. & Briggs, A. R.: Determination of serum calcium by means of orthocresolphthalein complexone. *Am. J. Clin. Pathol.*, **45**, 290-296 (1966).
- 7) Reddi, K. K.: Nature and possible origin of human serum ribonuclease. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **67**, 110-118 (1975).
- 8) Burton, K.: A study of the conditions and mechanism of the diphenylamine reaction for the colorimetric estimation of deoxyribonucleic acid. *J. Biochem.*, **62**, 315-323 (1956).
- 9) Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. & Randall, R. J.: Protein measurement with folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275 (1951).
- 10) Creutzfeldt, W. & Schmidt, H.: Aetiology and pathogenesis of pancreatitis (current concepts). *Scand. J. Gastroenterol.*, **5**, 47-62 (1970).
- 11) Rosato, E. F., Cowan, R. P. & Rosato, F. E.: Duodenal pressure as a factor in the cause of pancreatitis. *Surgery*, **68**, 837-841 (1970).
- 12) Nevalainen, T. J. & Seppa, A.: Acute pancreatitis caused by closed duodenal loop in the rat. *Scand. J. Gastroenterol.*, **10**, 521-527 (1975).
- 13) Fitzgerald, P. J. & Alvizouri, M.: Rapid restitution of the rat pancreas following acinar cell necrosis subsequent to ethionine. *Nature.*, **170**, 929-930 (1952).
- 14) Elliott, D. W., Williams, R. D. & Stewart, W. R. C.: The role of trypsin and of bile salts in the pathogenesis of acute pancreatitis. *Surg. Forum.*, **9**, 533-537 (1958).
- 15) 立松正衛, 花之内基夫, 津田洋幸, 白井智之, 広瀬雅夫, 林 活次: いわゆる急性膵炎 65 例の病理組織学的研究. *名市大医誌*, **25**, 73-84 (1974).
- 16) 林 活次: 膵疾患の病理—急性膵炎を中心に—. *胃と腸*, **9**, 1407-1420 (1974).
- 17) Baggenstoss, A. H.: Pathology of pancreatitis. *In* Gambill, E. E. (ed.), *Pancreatitis*, 1st ed., p179-212, C. V. Mosby Co., Saint Louis, 1973.
- 18) Tuzhilin, S. A.: The clinical features of pancreatic inflammation. *Am. J. Gastroenterol.*, **61**, 97-112 (1974).
- 19) 小林重矩, 中山和道, 松永 章: 急性膵炎症例の検討. *手術*, **29**, 929-937 (1975).
- 20) 佐藤寿雄, 斎藤洋一, 白相光康, 松野正紀, 芳賀紀夫: 急性膵炎経過後の病態について. *最新医学*, **27**, 1677-1687 (1972).
- 21) Elman, R., Arneson, N. & Graham, E. A.: Value of blood amylase estimations in the diagnosis of pancreatic disease. A clinical study. *Arch. Surg.*, **19**, 943-967 (1929).
- 22) Stefanini, P., Ermini, M. & Carboni, M.: Diagnosis and management of acute pancreatitis. *Am. J. Surg.*, **110**, 866-875 (1965).
- 23) Adams, J. T., Libertino, J. A. & Schwartz, S. I.: Significance of an elevated serum amylase. *Surgery*, **63**, 877-884 (1965).

- 24) Ogawa, M., Takatsuka, Y., Kitahara, T., Matsuura, K. & Kosakai, G.: Radioimmunoassay of human pancreatic amylase. *Meth. Enzymol.*, **74**, 290-298 (1981).
- 25) Duane, W. C., Frerichs, R. & Levitt, M. D.: Simultaneous study of the metabolic turnover and renal excretion of salivary amylase-¹²⁵I and pancreatic amylase-¹³¹I in the baboon. *J. Clin. Invest.*, **51**, 1504-1513 (1972).
- 26) Fitzgerald, P. J., Vinijchaikul, K., Carol, B. & Rosenstock, L.: Pancreatic acinar cell regeneration. *Am. J. Path.*, **52**, 1039-1065 (1968).
- 27) Dargon, J. C., Paradis, D. & Morisset, J.: Non parallel response of amylase and chymotrypsinogen biosynthesis following pancreatic stimulation: A possible explanation for observed non-parallelism in pancreatic secretion. *Digestion*, **15**, 110-112 (1977).
- 28) 田中幸子, 北村次男, 黒岡 繁: 膵リパーゼ定量法の検討. *最新医学*, **34**, 1682-1687 (1979).
- 29) Allam, B. F. & Imrie, C. W.: Serum ionized calcium in acute pancreatitis. *Br. Med. J.*, **64**, 665-668 (1977).
- 30) Bernald, C. A.: Ribonuclease. *Ann. Rev. Biochem.*, **38**, 677-732 (1969).
- 31) Ehinger, B.: On the mechanism of ribonuclease secretion in the murine exocrine pancreas. *Histochemie*, **5**, 326-330 (1965).
- 32) Zenzian, E. N. & Bernard, E. A.: Distribution of pancreatic ribonuclease, chymotrypsin, and trypsin in vertebrates. *Arch. Biochem. Biophys.*, **122**, 699-713 (1967).
- 33) Reddi, K. K. & Holland, J. F.: Elevated serum ribonuclease in patients with pancreatic cancer. *Natl. Acad. Sci. USA*, **7**, 2308-2310 (1976).
- 34) Warshaw, A. L.: Serum ribonuclease elevations and pancreatic necrosis in acute pancreatitis. *Surgery*, **86**, 227-234 (1979).
- 35) Kunitz, M.: Crystalline deoxyribonuclease. *J. Gen. Physiol.*, **33**, 349-362 (1979).
- 36) Kurnick, N. B.: Deoxyribonuclease activity of sera of man and other species. *J. Gen. Physiol.*, **33**, 349-362 (1952).
- 37) Lindahl, T., Gally, J. A. & Edleman, G. M.: Properties of Deoxyribonuclease III from mammalian tissue. *J. Biol. Chem.*, **18**, 5014-5019 (1969).
- 38) Allfrey, V. & Mirsky, E.: Some aspect of the deoxyribonuclease activities of animal tissues. *J. Gen. physiol.*, **36**, 227-241 (1952).
- 39) Kowlessar, O. D. & Mcevoy, R. K.: Deoxyribonuclease I activity in pancreatic disease. *J. Clin. Invest.*, **35**, 1325-1330 (1956).
- 40) 船越顕博, 若杉英之, 木村寿成, 松本雅裕, 麻生宣則, 崎元哲郎, 杉本英克, 李 源台, 井林 博: ヒト膵液中の DNase I と DNase I インヒビターの臨床的研究. *日消病会誌*, **77**, 72-77 (1980).
- 41) Thal, A. P., Perry, J. F. & Egner, W.: A clinical and morphological study of forty-two cases of fatal pancreatitis. *Surg. Gynecol. Obstet.*, **105**, 191-202 (1957).
- 42) Porrer, H. L., Nechelels, H. & Russell, K. C.: Transition of pancreatic necrosis. *Surg. Gynecol. Obstet.*, **87**, 79-82 (1948).

Studies on Biochemical Parameters Related to the Severity of Acute Pancreatitis in Rats
Ichiro Kita, Department of Surgery (II), School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920—J. *Juzen Med. Soc.*, **96**, 1251—1268 (1987)

Key words: acute pancreatitis, ribonuclease, deoxyribonuclease

Abstract

The present study was performed to evaluate the usefulness of exocrine enzymes as an indicator for the severity of pancreatitis. Exocrine enzymes including deoxyribonuclease (DNase) and ribonuclease (RNase) both in serum and pancreatic tissue in rats with experimental acute

pancreatitis of different severity was periodically determined after the onset of the disease. In test groups, acute pancreatitis was induced by two different experimental procedures; one by ligation of the common bile duct as a model of edematous pancreatitis, and the other by intracholedochal infusion of a mixture of trypsin/Na-taurocholate as a model of necrotic pancreatitis. Intact and simply celiothomized rats served as the control groups. Serum amylase was increased significantly in the edematous pancreatitis group after 12 hours in comparison with that in the celiothomized group ($p < 0.05$), but the difference between the two pancreatitis groups was insignificant. Serum lipase was significantly raised 12 to 48 hours after the onset of the disease in both pancreatitis groups ($p < 0.01$) in comparison with that in the celiothomized group, but no significant difference was found between the two test groups. Serum calcium was significantly lowered after 36 and 48 hours in the edematous pancreatitis group and after 12 to 48 hours in the necrotic pancreatitis group in comparison with that in the celiothomized group ($p < 0.05-0.01$), with no significant differences between the test groups. Serum RNase was significantly elevated in both test groups after 12 to 48 hours in comparison with that in the celiothomized group ($p < 0.05-0.01$), with no significant differences between the test groups. The necrotic pancreatitis group showed significantly higher serum DNase I levels after 24 hours ($p < 0.05$) and significantly higher serum DNase II levels after 12 to 36 hours ($p < 0.05-0.01$) than the edematous pancreatitis group. From these results, periodical determination of serum DNase, particularly DNase II appears to be useful for assessing the severity of acute pancreatitis.