

ヒト十二指腸パネート細胞における膵蛋白分解酵素の免疫組織化学的発現 とくに膵の形態および組織像との関連性について

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/2297/9145

ヒト十二指腸パネート細胞における膵蛋白分解酵素の 免疫組織化学的発現

—とくに膵の形態および組織像との関連性について—

金沢大学医学部外科学第二講座 (主任: 宮崎逸夫教授)

吉 光 裕

膵外分泌機能障害時におけるパネート細胞 (Paneth cell) と蛋白消化能との関係を知ることを目的として、膵胆道悪性腫瘍切除28例を対象にヒト十二指腸パネート細胞における膵蛋白分解酵素の免疫組織化学的発現と膵の形態、組織像および膵外分泌機能との関連について検討をおこなった。トリプシン染色において、十二指腸パネート細胞の細胞質顆粒に免疫組織化学的発現をみとめた。その発現は、パネート細胞すべてに発現をみとめる症例から、一部のパネート細胞にのみ発現をみとめる症例まで多様であった。一方、十二指腸パネート細胞にキモトリプシンの発現はみられなかった。腫瘍の浸潤により主膵管が閉塞している群では、1陰窩あたりの平均パネート細胞数は非閉塞群に比し有意に増加しており、パネート細胞におけるトリプシン陽性率も膵管閉塞群では非閉塞群に比し有意に高率であった。膵腺房細胞残存率と1陰窩あたりの平均パネート細胞数およびトリプシン陽性率との間にはそれぞれ有意な負の相関がみとめられた。また、膵機能診断 (pancreatic function diagnostant, PFD) で異常値を呈した群では、1陰窩あたりの平均パネート細胞数は PFD 正常値群に比し有意に増加していた。以上の結果は、膵腺房細胞の障害があり外分泌機能の低下があると、十二指腸においてパネート細胞の数が増加し、パネート細胞におけるトリプシン陽性率が増加していることを示しており、膵外分泌機能障害に際して、パネート細胞が蛋白消化能の代償に関与している可能性を示唆しているものと考えられた。

Key words immunohistochemistry, Paneth cells, human pancreas, pancreatic trypsin, protein digestive compensation

膵全摘後のように膵外分泌酵素が完全に欠落した状態においては、脂肪消化機能は高度に障害されるものの、糖質消化機能はほとんど障害されず、蛋白消化機能も比較的保たれることが知られている^{1)~3)}。糖質や蛋白の消化には膵酵素だけではなく、唾液、胃液、腸液中の消化酵素も関与している⁴⁾。膵外分泌酵素の欠落に際して、糖質消化の代償に唾液中のアミラーゼが関与していることは想像に難くない。一方、蛋白消化の代償については胃液および腸液中の消化酵素が関与しているものと考えられるが、その詳細については明らかではない。

パネート細胞 (Paneth cell) は Schwalbe⁵⁾ によってはじめて記載され、Paneth⁶⁾ によって詳しく報告された、小腸陰窩の底部に存在するエオジン好染性の大きな顆粒をもった円柱状の細胞である。その機能は明らかではないが、形態的に膵腺房細胞に非常に類似しており⁸⁾、膵管を結紮したハムスターの小腸や重度の慢性膵炎患者の十二指腸においてパネート細胞の肥大や過形成がみられること⁹⁾¹⁰⁾、十二指腸内の食餌通過に際してパネート細胞細胞質顆粒の開口分泌が観察されていること¹¹⁾、さらにトリプシンなどの膵由来の酵素に対してパネート細胞の細胞質顆粒が免疫組織化学的に活性をもつこと^{12)~14)} などから、パ

ネート細胞に膵腺房細胞類似の機能が存在することが推察されている。

そこで本研究では、膵外分泌機能障害時におけるパネート細胞と消化機能、特に蛋白消化機能との関係を知ることを目的として、ヒト十二指腸を材料として膵蛋白分解酵素に対する抗体を用いた免疫組織化学染色をおこない、パネート細胞におけるその発現と膵の形態、組織像および膵外分泌機能との関連性について検討をおこなった。その結果、興味ある知見を得たので報告する。

対象および方法

1. 対 象

教室にて膵頭十二指腸切除あるいは膵全摘が施行された外科的切除材料28例を対象とした。性別は男性18例、女性10例、年齢は42歳から76歳 (平均59.9歳) で、疾患の内訳は膵頭部癌が16例、中下部胆管癌が8例、胆嚢癌が4例であった。

II. 材料および方法

材料は切除後直ちに60%ウログラフィンを用いた膵管・胆管造影を施行した後、10%ホルマリンにて固定した。十二指腸下

平成7年5月25日受付, 平成7年6月27日受理

Abbreviations: BT-PABA, N-benzoyl-L-tyrosyl-P-aminobenzoic acid; ERP, endoscopic retrograde pancreatography; LSAB, labelled streptavidin biotin; MPD, main pancreatic duct; PABA, P-aminobenzoic acid; PFD, pancreatic function diagnostant; PSTI, pancreatic secretory trypsin inhibitor

行脚にはほぼ垂直方向となるように 5mm 間隔の階段切片を作成し、パラフィン包埋ののちマイクロームで厚さ 6 μ m 切片を作成し、免疫組織化学染色による検索および HE 染色による病理組織学的検索に供した。

1. 免疫組織化学染色

膵蛋白分解酵素としてトリプシンおよびキモトリプシンについて labelled streptavidin biotin (LSAB) 法による免疫組織化学染色をおこなった。一次抗体には抗ヒト膵トリプシン・ウサギポリクローナル抗体 (rabbit anti-human pancreatic cationic trypsin immunoglobulin G, Athens Research and Technology Inc, Athens, Greece) および抗ヒト膵キモトリプシン・ウサギポリクローナル抗体 (rabbit anti-human pancreatic chymotrypsin I immunoglobulin G, Athens Research and Technology Inc) を使用し、以下の方法で染色をおこなった。切片を脱パラフィンののち 0.4% ペプシン加 0.2N 塩酸溶液にて抗原性を賦活化、0.3% H₂O₂ 加メタノールにて内因性ペルオキシダーゼの阻止をおこない、10% 正常ヤギ血清に 30 分間反応させた後、一次抗体と 4℃にて一晩反応させた。ついでビオチン標識抗ウサギイムノグロブリン・ヤギ抗体 (Dakopatts, Glostrup, Denmark) に室温で 1 時間反応させた後、ペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジン (Dakopatts) に室温で 30 分間反応させた。発色にはニッケル加 3,3'-ジミノベンチジン (Sigma, St. Louis, USA) 溶液を用い、メチルグリーンにて対比染色をおこなった。一次抗体の至適希釈倍率の決定のため、1:500, 1:1,000, 1:2,000, 1:5,000 の各希釈倍率でヒト正常膵組織を陽性コントロールとした予備染色をおこない、抗トリプシン抗体、抗キモトリプシン抗体ともに 1:2,000 を至適希釈倍率

とした。特異性の検定には、一次抗体の代わりに非免疫ウサギ血清 (Vector Laboratories, CA, USA) を用いた染色をおこない、さらにそれぞれの抗体に対応する純化抗原を用いた吸収試験をおこなった。吸収試験は、トリプシン染色についてはヒト膵トリプシン (human pancreatic trypsin, Athens Research and Technology Inc) を希釈抗体と 4℃にて一晩混和し、4,000rpm, 1 時間遠心後の上清を一次抗体の代わりに用いて染色した。キモトリプシン染色についてはヒト膵キモトリプシン (human pancreatic chymotrypsin, Athens Research and Technology Inc) を用いて同様に吸収試験をおこなった。

2. 十二指腸における組織計測

1) 1 陰窩あたりの平均パネート細胞数の算出

十二指腸上皮におけるパネート細胞の多寡を定量的に評価することを目的として、1 陰窩あたりに含まれるパネート細胞の平均個数を Balas⁹⁾ の方法に準じて算出した。すなわち、HE 染色下で 10 \times 100 倍の拡大の下に十二指腸陰窩を観察、100 個の陰窩を計測し、陰窩 1 個につき平均何個のパネート細胞が含まれるかを算出した。

2) パネート細胞における蛋白分解酵素陽性率の算出

各蛋白分解酵素の免疫組織化学染色の下で 10 \times 100 倍の拡大の下に十二指腸陰窩を観察、100 個の陰窩を計測し、染色に強く陽性となったパネート細胞が 1 陰窩あたりに平均何個含まれるかを算出し、これを先に HE 染色下で算出した 1 陰窩あたりの平均パネート細胞数に対する比率 (%) であらわしたものをパネート細胞におけるその蛋白分解酵素の陽性率とした。

3. 膵の形態および組織像の検討

膵外分泌機能に影響をおよぼす膵の形態あるいは組織学的変

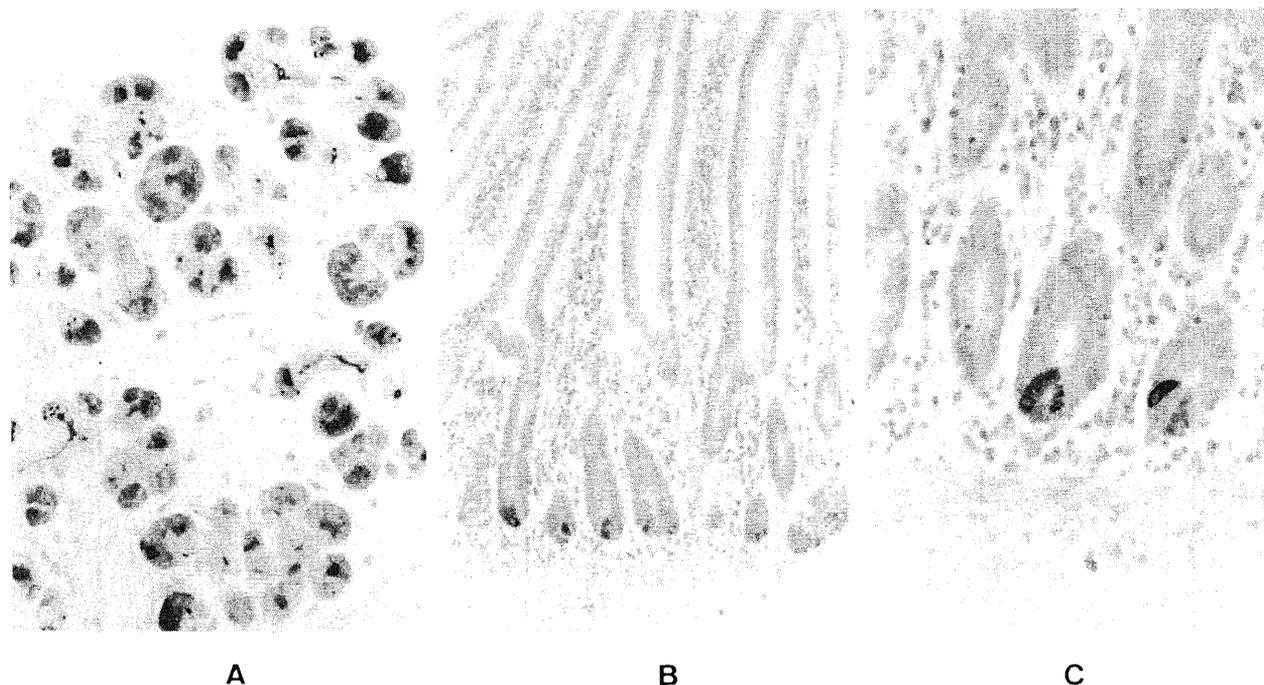


Fig. 1. Immunohistochemical localization of human trypsin. (A) Human pancreas. Immunoreaction is localized in zymogen granules of pancreatic acinar cells and intraluminal space of ducts (original magnification, \times 400). (B) Human duodenal mucosa. Immunoreaction is visible in Paneth cells (original magnification, \times 100). (C) Detail of the basal part of crypts. Marked immunoreaction is visible in a few Paneth cells, but only weak immunoreaction is found in other Paneth cells (original magnification, \times 400).

化として、腫瘍による主膵管 (main pancreatic duct, MPD) 閉塞の有無および膵組織における腺房細胞残存率について検討した。

1) 腫瘍による MPD 閉塞の有無

術前に施行された内視鏡的逆行性膵管造影 (endoscopic retrograde pancreatography, ERP) または摘出臓器膵管造影の所見より、MPD 閉塞の有無について判定し、MPD に閉塞のあるものを MPD 閉塞群、閉塞のないものを非閉塞群とした。

2) 膵腺房細胞残存率

膵外分泌機能を反映する膵の組織学的変化を定量化する目的で、膵腺房細胞残存率を小関ら¹⁵⁾の方法に準じて算出した。すなわち、21×21の交点を有する格子型接眼マイクロメーターを顕微鏡に挿入し、10×10倍の拡大下にその441交点について、腺房細胞上にある交点を計測した。この操作を1材料につき30視野でおこない、総交点に占める比率 (%) を膵腺房細胞残存率とした。MPD 閉塞群については腫瘍よりも十二指腸側の非腫瘍部膵組織において、非閉塞群については膵頭部膵組織において計測をおこなった。なお、膵頭部全体が腫瘍によっておきかわり、十二指腸側に正常膵が全くみられない症例については膵腺房細胞残存率0%としてあつかった。

4. 膵機能診断 (pancreatic function diagnostant, PFD)

術前膵外分泌機能を評価する臨床検査として、PFD 試験が21症例におこなわれた。PFD 試験は、早朝空腹時に PFD (E-647) 1アンプル [N-ベンゾイル-L-チロシル-P-アミノ安息香酸 (N-benzoyl-L-tyrosyl-P-aminobenzoic acid, BT-PABA) として500mg, P-アミノ安息香酸 (P-aminobenzoic acid, PABA) として169.5mg を含有] を水 250ml とともに服用させ、その後6時間蓄尿し、尿中 PABA 回収率を Bratton らの方法¹⁶⁾の Smith 変法¹⁷⁾で測定した。一般に PFD 試験では PFD 値が70% をもって正常下限とされていることから¹⁸⁾、PFD 値が70% 以上のものを正常値群、70% 未満のものを異常値群とした。

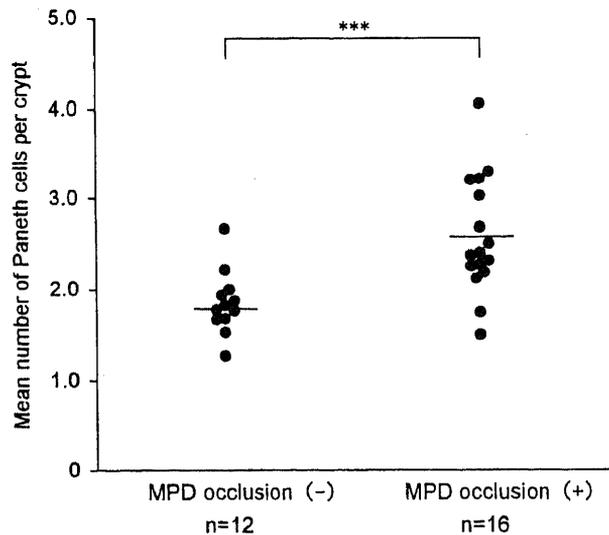


Fig. 2. Variation of mean number of Paneth cells per crypt between MPD non-occlusion group [MPD occlusion (-)] and MPD occlusion group [MPD occlusion (+)]. —, mean. *** P<0.005.

III. 成績の統計学的検討

2群間の平均値の差の検定にはウィルコクソンの順位和検定 (Wilcoxon rank-sum test) を用い、危険率5% 未満の場合に有意差ありと判定した。また、2つの変数間の相関については Pearson の相関係数にて表し、危険率5% 未満の場合に有意な相関ありと判定した。なお、成績は平均±標準偏差 ($\bar{x} \pm SD$) で表した。

成 績

I. 膵トリプシンおよび膵キモトリプシンの免疫組織化学的発現

1. 膵トリプシン抗体による染色結果

膵においては腺房細胞のチモゲン顆粒および導管管腔内にトリプシンの免疫組織化学的発現をみとめた (図1-A)。一方、十二指腸においては十二指腸上皮陰窩の底部に存在するパネー

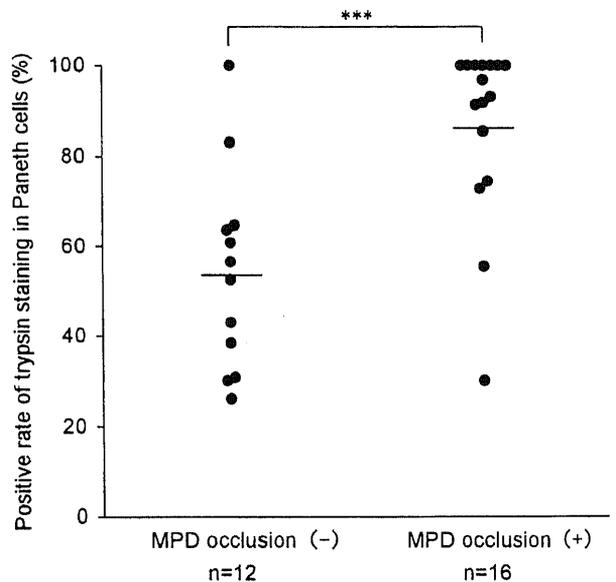


Fig. 3. Variation of positive rate of trypsin staining in Paneth cells between MPD non-occlusion group [MPD occlusion (-)] and MPD occlusion group [MPD occlusion (+)]. —, mean. *** P<0.005.

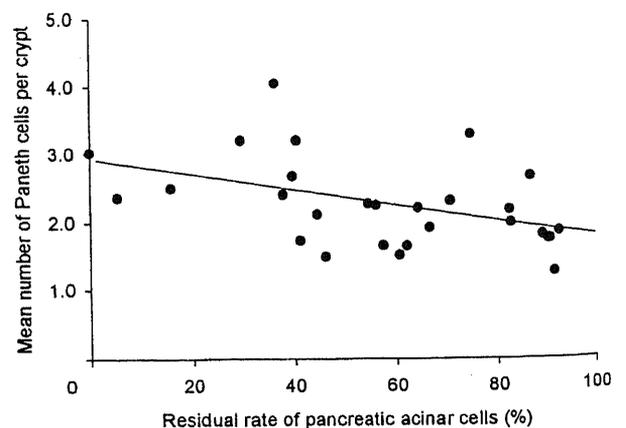


Fig. 4. Correlation of mean number of Paneth cells per crypt and residual rate of pancreatic acinar cells. $n=28$, $Y = -0.01134X + 2.907$, $r = -0.4641$, $P < 0.05$.

ト細胞の細胞質顆粒にトリプシンの発現をみとめた(図1-B). パネート細胞におけるトリプシンの発現は必ずしも一様ではなく、発現の強い細胞とほとんど発現していない細胞との混在がみられた(図1-C). 非免疫ウサギ血清を用いた染色では膵腺房細胞、パネート細胞ともに発現はみとめず、膵トリプシン純化抗原を用いた吸収試験においても膵腺房細胞、パネート細胞ともにその発現はみとめられず、パネート細胞におけるトリプシンの免疫組織化学的発現は特異的なものであると考えられた.

2. 膵キモトリプシン抗体による染色結果

膵トリプシン抗体を用いた染色と同様、膵腺房細胞のチモーゲン顆粒に発現がみられ、非免疫ウサギ血清による染色および膵キモトリプシン純化抗原を用いた吸収試験でその発現は消失した。しかし、十二指腸においては膵キモトリプシンに対する特異的発現はみられなかった。

II. 十二指腸パネート細胞と膵の形態、組織像および外分泌機能との相関

1. MPD 造影所見との関係

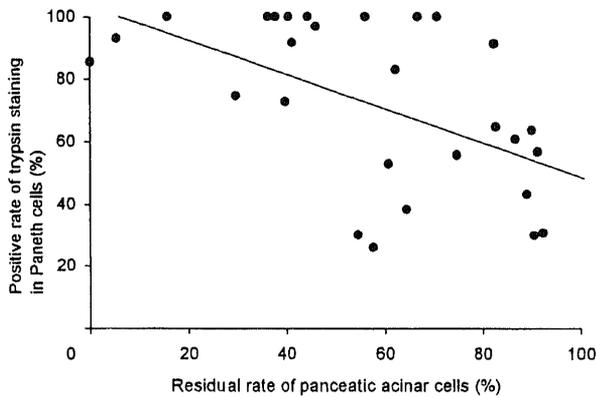


Fig. 5. Correlation of positive rate of trypsin staining in Paneth cells and residual rate of pancreatic acinar cells. n=28, $Y = -0.5359X + 103.7$, $r = -0.5364$, $P < 0.005$.

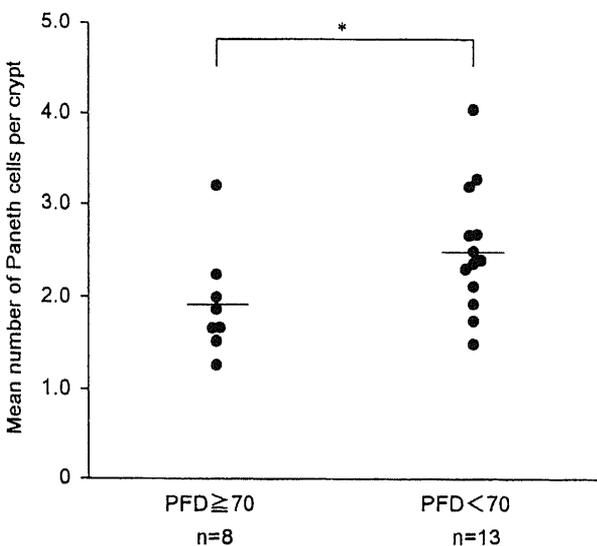


Fig. 6. Variation of mean number of Paneth cells per crypt between normal PFD group ($PFD \geq 70$) and abnormal PFD group ($PFD < 70$). —, mean. $P < 0.05$.

MPD 閉塞群は16例、非閉塞群は12例であった。HE 染色下に算出した十二指腸における1陰窩あたりの平均パネート細胞数は、非閉塞群では 1.8 ± 0.4 個であったのに対して、閉塞群では 2.6 ± 0.6 個であり、閉塞群において有意に増加していた ($P < 0.005$, 図2). パネート細胞におけるトリプシン陽性率をみると、非閉塞群では $54.2 \pm 22.3\%$ であったのに対して、閉塞群では $87.0 \pm 19.9\%$ であり、閉塞群において有意に高率であった ($P < 0.005$, 図3).

2. 膵腺房細胞残存率との関係

膵腺房細胞残存率と1陰窩あたりの平均パネート細胞数との関係を図4に示す。両者の間に有意な負の相関をみとめた ($r = -0.4641$, $P < 0.05$). 膵腺房細胞残存率とトリプシン陽性率についても、両者の間に有意な負の相関をみとめた ($r = -0.5364$, $P < 0.005$, 図5). すなわち、膵組織の破壊が強く膵腺房細胞の残存率が低いほど、十二指腸におけるパネート細胞の数は増加しており、パネート細胞におけるトリプシン陽性率は高率となっていた。

3. PFD 試験との関係

PFD 試験が施行された21例中、PFD 値70%以上の正常値群は8例、70%未満の異常値群は13例であった。1陰窩あたりの平均パネート細胞数は、正常値群では 1.9 ± 0.6 個、異常値群では 2.5 ± 0.7 個であり、異常値群において有意に増加していた ($P < 0.05$, 図6). 図7には PFD 値とトリプシン陽性率との関係を示す。正常値群では $64.3 \pm 28.5\%$ 、異常値群では $88.1 \pm 16.2\%$ であり、異常値群においてトリプシン陽性率は統計学的な有意差とはいえなかったが高い傾向をみとめた ($P = 0.06$).

考 察

膵外分泌機能が完全に欠落した状態においては、脂肪の消化障害は高度であるが、糖質の消化障害はほとんどみとめられず、蛋白消化障害も脂肪消化障害に比較して軽度にとどまるこ

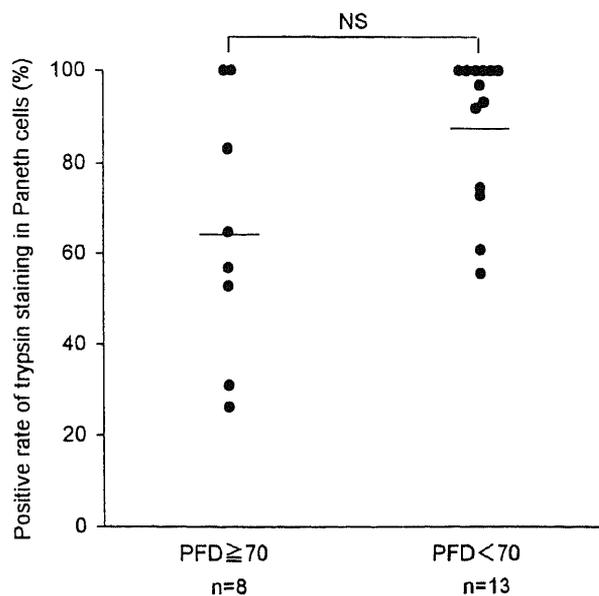


Fig. 7. Variation of positive rate of trypsin staining in Paneth cells between normal PFD group ($PFD \geq 70$) and abnormal PFD group ($PFD < 70$). —, mean. NS, not significantly different ($P = 0.06$).

とが知られている¹⁷⁻¹⁹。また、膵管結紮モデルの消化管内で有意な蛋白の消化吸収が起こることが、ブタ、ラットを用いた動物実験で示されている^{19,20}。糖質や蛋白の消化には、膵酵素だけでなく、唾液、胃液、腸液中の消化酵素も関与している⁹。膵外分泌酵素が欠落した状態での糖質消化の代償には、唾液腺アミラーゼが関与していると考えられる。Corringら¹⁸も、炭水化物の分解に際して膵アミラーゼが果たす役割はそれほど大きくなく、唾液腺アミラーゼによりほぼ正常に炭水化物は利用されると推察している。一方、膵酵素欠落時における蛋白消化機能については、どのような機序が作用して代償がなされているかについては、これまで詳細な検討はみられなかった。

パネート細胞は1872年、Schwalbe⁶によって最初に記載され、1888年、Paneth⁷によって詳しく報告された、小腸の陰窩底部に局在するエオジン好染性の大きな顆粒をもった円柱状の細胞である。電子顕微鏡でみるパネート細胞は典型的な蛋白合成型の細胞で、基底部には粗面小胞がよく発達し、核の上にはゴルジ装置が分泌顆粒を形成している²¹。また、パネート細胞の顆粒は蛋白質を多糖類で包んだ構造をなしている²²。パネート細胞の機能は不明であるが、電子顕微鏡で細胞上部に細菌群の食食作用を示す像が見られることから²³、顆粒は水解酵素であり、腸内細菌を食食および消化分解して小腸内の細菌叢の調節をおこなうとともに、細菌の抗原性を体内に移行させているとの仮説がなされていた。その一方で、パネート細胞と膵腺房細胞の形態的類似性が以前より示されており⁸、またパネート細胞と膵腺房細胞の機能的類似性を示すものとして、十二指腸内の食餌通過に際して膵腺房細胞と同様に細胞質顆粒の開口分泌がみとめられる¹⁰、コレシストキニン-パンクレオチンによって膵腺房細胞同様分泌がみとめられる²⁴などの報告がみられ、パネート細胞の顆粒は分泌顆粒であり、消化管内での消化機能に関与している可能性が示唆されていた。

今回、膵胆道悪性腫瘍による外科的切除材料を対象として、十二指腸パネート細胞と膵の形態、組織像および外分泌機能との関係について検討をおこなった。外分泌機能を反映する膵組織像の指標としては膵の線維化などの障害された、いわば否定的な部位に重きをおくより、線維化や脂肪化をまぬがれて残存した外分泌細胞の量を用いるべきとの考え²⁵から、膵腺房細胞残存率を算出し検討した。その結果、腫瘍の進展によりMPDが閉塞した群では、非閉塞群と比較して十二指腸における1陰窩あたりの平均パネート細胞数は有意に増加していた。また、膵腺房細胞残存率が低率であるほど1陰窩あたりの平均パネート細胞数は多く、両者の間には有意な負の相関をみとめた。さらに、PFD試験で70%未満の異常値群では70%以上の正常値群に比して平均パネート細胞数は有意に増加していた。すなわち、腫瘍による膵組織の破壊が強く、膵腺房細胞が障害され膵外分泌機能の低下が著しいほど、十二指腸でのパネート細胞数は増加しているという結果が得られた。Senegas-Balasら¹⁰の慢性膵炎患者の十二指腸生検材料を用いた報告でも同様に、健常者と比較してパネート細胞の有意な増加がみられたとしている。また、Balasら⁹のハムスターを用いた膵管結紮実験の結果においても、小腸パネート細胞の肥大と過形成が報告されている。これらの結果より、膵外分泌機能とパネート細胞との相関は明らかであり、パネート細胞が膵外分泌機能低下に際して増加することにより何らかの役割を果たしていることが示唆される。

近年、Boheら¹²によって小腸パネート細胞が膵トリプシンに対して免疫組織化学的に活性をもつことが示され、パネート細胞にトリプシン類似の分泌酵素が存在し、消化管内での蛋白消化に関与している可能性が示された。本研究においても、十二指腸パネート細胞において膵トリプシンに対する免疫組織化学的発現をみとめた。しかし、その発現は各症例において必ずしも一定ではなく、パネート細胞のすべてに発現をみとめる症例から、強い発現をみとめるパネート細胞とほとんど発現をみとめないパネート細胞とが混在している症例まで多様であった。このようなパネート細胞における、トリプシンの免疫組織化学的発現の多様性に関する詳細な検討はこれまでに報告されていない。そこで各症例のパネート細胞におけるトリプシン陽性率を算出し、これを膵の形態および外分泌細胞障害の程度と比較し検討をおこなった。その結果、MPD閉塞群では非閉塞群に比してトリプシン陽性率は有意に高率であった。また、膵腺房細胞残存率が低率であるほどトリプシン陽性率は高率であり、両者間には有意な負の相関をみとめた。すなわち、膵腺房細胞の障害が大きいほどトリプシン陽性率は有意に高率であることが示され、パネート細胞におけるトリプシン陽性率と膵組織像との相関がみとめられた。この結果は、膵外分泌機能の低下に際してトリプシン陽性物質がパネート細胞内で増加して、蛋白消化機能の代償に関与している可能性を示唆するものであると考えられた。

今回検討に用いた抗体は活性型酵素であるトリプシンに対する抗体である。十二指腸と同時に染色をおこなった膵組織では、腺房細胞のチモーゲン顆粒および導管管腔内にトリプシンの免疫組織化学的発現をみとめた。Ahoら²⁶による抗トリプシン抗体を用いた正常膵における免疫染色結果でも同様に腺房細胞のチモーゲン顆粒に発現をみとめている。本来、チモーゲン顆粒中には非活性型のトリプシノーゲンのみが存在している。従って、本研究あるいはAhoら²⁶が用いた抗トリプシン抗体はトリプシンのみならずトリプシノーゲンに対しても反応する抗体であると考えられ、本研究でみられたパネート細胞顆粒中のトリプシン陽性物質は前駆体であるトリプシノーゲンである可能性を示唆するものである。Senegas-Balasら¹⁴は十二指腸を材料として、トリプシンと同時にトリプシノーゲンに対する抗体を用いた免疫組織化学染色による検討をおこない、十二指腸パネート細胞においてトリプシンとともにトリプシノーゲンの発現がみとめられることを報告している。また、Boheら^{27,28}は膵分泌性トリプシンインヒビター (pancreatic secretory trypsin inhibitor, PSTI) に対する抗体を用いた検討をおこない、パネート細胞にPSTIの発現がみられることを報告している。また、強力なトリプシンインヒビターであるアプロチニン (aprotinin) を長期間マウスに経口投与することにより、パネート細胞中の分泌顆粒の数が増加し、大きさも増大するとの報告もみられる²⁹。これらの結果は、パネート細胞内のトリプシン陽性物質は、前駆体であるトリプシノーゲンであり、PSTIと結合し活性を阻害された状態で存在していることを示唆しており、そのトリプシノーゲンはパネート細胞内で産生されることを示唆している。

PFD試験は簡便な膵外分泌機能検査法として汎用されている検査法である^{18,30,31}。試薬であるBT-PABAはキモトリプシンに対して基質特異性があり³²、本試験は消化管中のキモトリプシン活性を測定することにより膵外分泌機能を評価してい

る。従来より、膵全摘例においても PFD 値は 20~30% の値を示し、0% とならないことが報告されていた^{18,33)}。仙波³⁴⁾は PFD 試験に用いられる基質 BT-PABA の膵キモトリプシンに対する特異性に疑問をもち、膵全摘犬による検討をおこない、小腸絨毛刷子縁酵素に BT-PABA 分解能があり、膵全摘後にその活性は適応性に増加することを報告している。しかし、ヒトに比してイヌでは PFD 試験投与後の血中 PABA 値の上昇は非常に低く、ヒト、イヌ間の検査値の解離については十分な説明はなされていない³⁴⁾。パネート細胞はヒトおよびマウス、モルモットなどの齧歯類に多くみられ、イヌ、ネコには欠如することが Paneth により記載されている⁷⁾。ヒト、イヌ間の PFD 検査値の解離はパネート細胞の存在の有無による可能性があると考え、今回キモトリプシン染色による検討をおこなった。しかし、今回の検討では十二指腸パネート細胞にキモトリプシンの免疫組織化学的発現はみとめられなかった。Senegas-balas¹⁴⁾はヒト十二指腸を材料として、Bohe²⁸⁾はヒト小腸を材料として、同様にキモトリプシン染色をおこない検討しているが、今回の結果と同様、パネート細胞にキモトリプシンの発現はみられなかったと報告している。以上の結果からは、膵全摘後の PFD 値の上昇にパネート細胞が関与している可能性は免疫組織化学的検討からは否定的であると考えられた。

膵から膵液中に分泌される消化酵素は大量であり、トリプシンのみに限っても、1日の摂取蛋白を消化するための必要量の100倍近いといわれる³⁵⁾。これら大量の膵酵素は他の消化液中の酵素や脱落腸粘膜蛋白とともに分解され、腸内アミノ酸プールを形成し、再び吸収されて蛋白合成に供される。すなわち膵酵素は消化酵素として作用するだけでなく、腸内アミノ酸プールの供給源として、体内の蛋白代謝を円滑に回転させる上でも役立っている⁹⁾。今回の検討より、膵外分泌機能低下に際して、パネート細胞はその数が増加し、トリプシン陽性物質が増加することによって、消化管内での蛋白消化の代償に関与するものと考えられるが、一方、腸内アミノ酸プールの供給源として体内蛋白代謝を円滑にする上でも役立っているものと考えられた。

結 論

膵外分泌機能低下に際して、パネート細胞が消化機能、特に蛋白消化においてどのように関わるのかをみるために、膵胆道悪性腫瘍切除28例を対象に膵蛋白分解酵素に対する抗体を用いた免疫組織化学染色をおこない、十二指腸パネート細胞におけるその発現と膵の形態ならびに組織像および膵外分泌機能との関連性について検討をおこなった結果、以下の成績をえた。

1. 十二指腸パネート細胞の細胞質顆粒において、トリプシンの免疫組織化学的発現をみとめた。その発現はパネート細胞すべてに強く発現がみられる症例から、発現の強いパネート細胞とはほとんど発現をみとめないパネート細胞とが混在する症例まで多様であった。
2. 十二指腸パネート細胞において、キモトリプシンに対する免疫組織化学的発現はみとめられなかった。
3. 主膵管閉塞では非閉塞群に比して、十二指腸における1陰窩あたりの平均パネート細胞数は有意に増加していた。また、主膵管閉塞群では非閉塞群に比して、パネート細胞におけるトリプシン陽性率は有意に高率であった。
4. 十二指腸における1陰窩あたりの平均パネート細胞数と

膵腺房細胞残存率との間には有意な負の相関がみられた。また、パネート細胞におけるトリプシン陽性率と膵腺房細胞残存率との間に有意な負の相関がみられた。

5. PFD 異常値群では PFD 正常値群に比し、十二指腸における1陰窩あたりの平均パネート細胞数は有意に増加していた。

以上の結果より、十二指腸パネート細胞は膵外分泌機能の低下に際して、その数が増加し、トリプシン陽性物質が増加することにより、消化管内での消化機能、特に蛋白消化の代償に関与しているものと考えられた。

謝 辞

本稿を終るにあたり、御指導、御校閲を賜りました恩師宮崎逸夫教授に深甚なる謝意を捧げます。また、終始御指導、御教示をいただいた金沢大学医療技術短期大学の永川宅和教授、および教室の諸兄に深く感謝の意を表します。

本論文の要旨は、第45回日本消化器外科学会総会(横浜, 1995)において発表した。

文 献

- 1) 宮崎逸夫, 佐々木誠: 膵全摘. 外科診療, 20, 401-407 (1978).
- 2) 松井征雄, 今岡真義, 青木行俊, 岩永 剛, 神前五郎, 北村次男, 中野俊一, 堀内成人, 松尾高明: 膵全摘とその術後管理. 外科診療, 37, 589-597 (1977).
- 3) 佐藤寿雄, 松野正紀, 能登 陞, 斎藤洋一: 膵全摘術, 術後の病態とその対策を中心として. 手術, 29, 905-914 (1975).
- 4) 石原敬夫: 膵臓の機能. 新外科学大系. 27A. 膵臓の外科 I (出月康夫, 川島康生, 杉町圭蔵, 高木 弘, 戸部隆吉, 堀原一, 武藤輝一, 森岡恭彦編), 第1版, 29-75頁, 中山書店, 東京, 1991.
- 5) Crane, C. W.: Studies on the absorption of ¹⁵N labelled yeast protein in normal subjects and patients with malabsorption. In H. M. Munro (ed.). The Role of the Gastrointestinal Tract in Protein Metabolism, 1st ed., p333-347., FA Davis Co, Philadelphia, 1964.
- 6) Schwalbe, G.: Beitrag zur Kenntnis der Drüsen in der Darmwandungen, insbesondere der Brunnerschen Drüsen. Arch. Mikr. Anat., 8, 92-140 (1872).
- 7) Paneth, J.: Über die sezernierenden Zellen des Dünndarm-Epicels. Arch. Mikr. Anat. Entwicklungsmech., 31, 113-191 (1888).
- 8) Matsubara, F.: Morphological study of Paneth cells in intestinal metaplasia of the stomach and duodenum of man. Acta. Pathol. Jpn., 27, 677-695 (1977).
- 9) Balas, D., Senegas-Balas, F., Bertrand, D., Frexinos, J. & Ribet, A.: Effect of pancreatic duct ligation on the hamster intestinal mucosa. Histological findings. Digestion, 20, 157-167 (1980).
- 10) Senegas-Balas, F., Bastie, M. J., Balas, D., Escourrou, J., Bommelaer, G., Bertland, Y. & Ribet, A.: Histological variations of the duodenal mucosa in chronic human pancreatitis. Dig. Dis. Sci., 27, 917-922 (1982).
- 11) Ahonen, A. & Pentilla, A.: Effect of fasting and feeding and pilocarpine on Paneth cells of the mouse.

- Scand. J. Gastroenterol., 10, 347-352 (1975).
- 12) **Bohe, M., Borgström, A., Lindström, C. & Ohlsson, K.**: Trypsin-like immunoreactivity in human Paneth cells. *Digestion*, 30, 271-275 (1984).
- 13) **Lechene de la Porte, P., Lafont, H. & Lombardo, D.**: Immunocytochemical localization of pancreatic carboxylic ester hydrolase in human Paneth cells. *Histochemistry*, 86, 211-214 (1986).
- 14) **Senegas-Balas, F. O., Figarella, C. G., Aouric, M. A., Guy-Crotte, O. M., Bertrand, C. A. & Balas, D. C.**: Immunocytochemical demonstration of a pancreatic secretory protein of unknown function in human duodenum. *J. Histochem. Cytochem.*, 39, 915-919 (1991).
- 15) 小関 梅, 能登 陸, 松野正紀, 狩野研次郎: 慢性膵炎の組織像と臨床像の対比—とくに組織計測学的立場から—. *日消会誌*, 77, 954-961 (1980).
- 16) **Bratton, A. C. & Marshall, E. K.**: A new coupling component for sulfonilamide determination. *J. Biol. Chem.*, 128, 537-550 (1939).
- 17) **Smith, H. W., Finkelstein, N., Alimoso, L., Crawford, B. & Graber, M.**: The renal clearance of substituted hippuric acid derivatives and other aromatic acid in dog and man. *J. Clin. Invest.*, 24, 388-404 (1945).
- 18) 渡辺公男: PFD 試験を中心とした術後消化吸収機能の臨床的検討. *日臨外医学会誌*, 42, 737-752 (1981).
- 19) **Corring, T. & Bourdon, T.**: Exclusion of pancreatic exocrine secretion from intestine in the pig: Existence of a digestive compensation. *J. Nutr.*, 107, 1216-1221 (1977).
- 20) **Curtis, K. J., Gaines, H. D. & Kim, Y. S.**: Protein digestion and absorption in rats with pancreatic duct occlusion. *Gastroenterology*, 74, 1271-1276 (1978).
- 21) 山田英智: パネート細胞の微細構造と機能. *細胞*, 4, 19-28 (1972).
- 22) **Merzel, J.**: Some histophysiological aspects of Paneth's cells of mice as shown by histochemical and radioautographical studies. *Acta. Anat.*, 66, 603-630 (1967).
- 23) **Erlandsen, S. L. & Chase, D. G.**: Paneth cell function: Phagocytosis and intracellular digestion of intestinal microorganism. I. *Hexamita muris*. II. *Spiral microorganism*. *J. Ultrastr. Res.*, 41, 296-318 (1972).
- 24) **Senegas-Balas, F., Balas, D., Pradayrol, L., Laval, J. & Ribet, A.**: Comparative effects of CCK-PZ on certain hydrolases in the mucosa and in the luminal content of the hamster jejunum-ileum. *Acta. Hepatogastroenterol.*, 26, 486-492 (1979).
- 25) 細田四郎, 中木高夫, 中川雅夫: 膵性消化吸収障害. *最新医学*, 34, 1685-1663 (1979).
- 26) **Aho, H. J., Putzke, H. -P., Nevalainen, T. J., Löbel, D., Pelliniemi, L. J., Dummmler, W., Suonpää, A. K. & Tessenow, W.**: Immunohistochemical localization of trypsinogen and trypsin in acute and chronic pancreatitis. *Digestion*, 27, 21-28 (1983).
- 27) **Bohe, M., Lindström, C. & Ohlsson, K.**: Immunohistochemical demonstration of pancreatic secretory proteins in human Paneth cells. *Scand. J. Gastroenterol.* 126 (Suppl.), 65-68 (1986).
- 28) **Bohe, M., Borgström, A., Lindström, C. & Ohlsson, K.**: Pancreatic endoprotease and pancreatic secretory trypsin inhibitor immunoreactivities in human Paneth cells. *J. Clin. Pathol.*, 39, 786-793 (1986).
- 29) **Ahonen, A. & Penttilä, A.**: Effect of Trasylol on Paneth cells of the mouse. *Experimentia*, 31, 577-578 (1975).
- 30) **De Benneville, P. L., Godfrey, J. W., Sims, H. J. & Imondi A. R.**: New substrates for a pancreatic exocrine function test. *J. Med. Chem.*, 15, 1098-1100 (1972).
- 31) **Gyr, K., Stalder, G. A., Schiffmann, I., Fehr, C., Vonderschmitt, D. & Fahlaender, H.**: Oral administration of a chymotrypsin-labile peptide- a new test of exocrine pancreatic function (PFD) in man. *Gut*, 17, 27-32 (1976).
- 32) **Imondi, A. R., Stradley, R. P., Butler, E. R. & Wolgemuth, R. L.**: A method for the assay of chymotrypsin in crude biological materials. *Anal. Biochem.*, 54, 199-204 (1973).
- 33) 世古口務, 五嶋博道, 水本龍二: 経口膵外分泌機能検査法 PFD による膵疾患の膵外分泌機能と術後変動. *胆と膵*, 2, 393-400 (1981).
- 34) 仙波大石, 石原敬夫, 森岡恭彦: 膵外分泌機能検査法 BT-PABA test (PFD) に関する検討—特に膵液に対する基質特異性に関して—. *日消誌*, 91, 1956-1962 (1994).
- 35) **Zebrowska, T., Low, A. G. & Zebrowska, H.**: Studies on gastric digestion of protein and carbohydrate, gastric secretion and exocrine pancreatic secretion in the growing pig. *Br. J. Nutr.*, 49, 401-410 (1983).

Immunohistochemical Expression of Pancreatic Endopeptidases in Human Duodenal Paneth Cells — Correlation with Pancreatic Morphology and Histology — Yutaka Yoshimitsu, Department of Surgery (II), School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920—J. J. J. Med Soc., **104**, 410—417 (1995)

Key words immunohistochemistry, Paneth cells, human pancreas, pancreatic trypsin, protein digestive compensation

Abstract

The correlation between immunohistochemical expression of pancreatic endopeptidases in human duodenal Paneth cells and pancreatic morphology, histology and exocrine function was investigated in 28 surgically resected pancreaticobiliary carcinomas in order to find the relation between Paneth cells and protein digestive compensation in exocrine pancreatic insufficiency. Trypsin-like immunoreactivity was found in cytoplasmic granules of Paneth cells. In some cases trypsin-like immunoreactivity was observed in all of the Paneth cells, but in other cases the immunoreactivity was only in a part of the Paneth cells. On the other hand, no immunoreactivity of chymotrypsin was found in human duodenal Paneth cells. In the group with main pancreatic duct (MPD) occlusion owing to invasion of the tumor, the mean number of Paneth cells per duodenal crypt and the positive rate of trypsin staining in duodenal Paneth cells were significantly increased, compared with those in the MPD non-occlusion group. When the residual rate of pancreatic acinar cells was compared with the mean number of Paneth cells per duodenal crypt and the positive rate of trypsin staining in duodenal Paneth cells, significant negative correlations were observed. Furthermore, in the abnormal pancreatic function diagnostic (PFD) group (PFD<70), the mean number of Paneth cells per duodenal crypt was significantly increased, compared with those in the normal PFD group (PFD≥70). Those results indicate that the severer exocrine pancreatic insufficiency is, the more the number of duodenal Paneth cells increases and the higher the positive rate of trypsin staining in duodenal Paneth cells, and that the Paneth cells take part in protein digestive compensation in exocrine pancreatic insufficiency.