

An Experimental Study on Inhibition of Pancreatic Fibrosis following Necrotizing Pancreatitis

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/2297/7778

実験的壊死性膵炎における膵線維化抑制に関する研究

金沢大学医学部外科学第二講座 (指導: 宮崎逸夫教授)

坂 田 則 昭

(昭和60年2月7日受付)

急性膵炎後の線維増生の過程と膵線維化の抑制の可能性を化学的および形態学的に検討した。実験的壊死性膵炎は Wister 系雄性ラット膵の splenic segment を凍結処置することにより得られ、その後に膵の線維増生が観察された。凍結処置後、ラットを以下の2群に分けた。1群は対照群として無処置とした。2群は線維化抑制物質であるコルヒチン (colchicine) および L-アゼチジン-2-カルボキシリクアシッド (L-azetidine-2-carboxylic acid, AZC) を毎日、腹腔内投与した。これらのラット膵の凍結処置を受けた部位のヒドロキシプロリン量を定量し、組織学的変化は光学顕微鏡と電子顕微鏡にて観察した。凍結処置のみを受けた膵には、早期における壊死、それに続く線維増生がみられた。しかし、コルヒチンまたは AZC が投与された凍結処置後のラット膵では、膵組織中ヒドロキシプロリン値が、2週目より4週目にわたって有意に低下し ($p < 0.01$)、組織学的にも線維増生の減少が認められた。また、電子顕微鏡による観察では、ラット膵の凍結処置後、無処置の1群は、壊死周辺部または壊死内部に残存した線維芽細胞が活発に増殖し、コラーゲン産生、または脂肪細胞への転化が観察された。一方、凍結処置後、線維化抑制物質が投与された2群では、壊死部において線維芽細胞からの移行が推察される筋線維芽細胞の明らかな出現が認められた。以上の成績より、膵の線維化と線維芽細胞の活動とは密接な関係にあるが、線維化抑制物質の投与により、線維化の過程において、線維芽細胞より筋線維芽細胞が出現するため、線維化の抑制を生ずる可能性が示唆された。

Key words pancreatic fibrosis, hydroxyproline, myofibroblast, necrotizing pancreatitis

膵組織にみられる線維化は、慢性膵炎の特徴的な所見として考えられており、マルセイユ提案¹⁾では“慢性膵炎とは原因を除いても膵の機能あるいは形態学的障害が持続するものであり、これに対して急性膵炎とは原因を除けば臨床ならびに生物学的に正常に回復するもの”と規定している。しかし Banks²⁾は浮腫性膵炎でも破壊された腺房・膵管は線維組織で置換されるとしている。このように、急性膵炎後にも線維化は認められ、慢性膵炎との間に面然とした区分はできないが、慢性膵炎では、膵実質の脱落と線維化が次第に進展するものと理解される。しかし、現在この進展を阻止する治療はない。

ところで肝臓における肝線維症、肺における肺線維症は、臓器線維症として広く研究^{3)~6)}されている。肝に

おける線維増生は持続する肝細胞壊死に対する修復機構であり、原則的には皮膚あるいは腱の創瘍治癒と同様であると理解されている。肺の線維症に対しては、肺胞気管支洗浄法の導入により、特に免疫学的な面で大きな飛躍を遂げてきた。しかし、膵の線維化については、臓器線維症としての立場からの検討、或いはその対策が十分ではない。さきに高田⁷⁾は、膵凍結法により作製されたラットの実験的壊死性膵炎を用い、膵線維化の動態とコラーゲナーゼ活性を検討し、膵の線維化の進行に伴うコラーゲナーゼ活性の上昇を報告している。

そこで著者は、同様の方法を用いて膵炎を実験的に作製し、これに線維化抑制物質を投与して膵の線維化の動態およびその抑制に関する検討を行ったので報告

Abbreviations: AZC, L-azetidine-2-carboxylic acid; BALB-DTNB, British anti-lewisite tributyratesodium lauryl sulfate-5,5'-dithiobis (2-nitrobenzoic acid); KISO, Keio Inayama Shibata Ohtsuki.

する。

材料および方法

I. 材 料

1. 実験動物

オリエンタル固型飼料および水道水で飼育された体重 200~250 g の Wister 系雄性ラットを実験に供した。

2. 線維化抑制物質

線維化抑制物質として以下の 2 剤を用いた。すなわち、anti-microtubular drug としてコルヒチン (colchicine, 和光純薬工業), プロリン類似物質 (proline analogue) として L-azetidine-2-carboxylic acid (AZC, Sigma chemical company) を使用した。

II. 方 法

1. 実験的壊死性膵炎の作製

ラットは、ネブタール (5 mg/ 体重 100 g) の腹腔内投与による全身麻酔下⁸⁾で開腹された。次いで、膵の splenic segment⁹⁾を、二酸化炭素使用の凍結装置 Cryos-A (持田製薬) を用いて -60°C, 30 秒間凍結し、実験的壊死性膵炎を作製した (図 1)。

2. 実験群の作製

ラットに実験的壊死性膵炎を作製した後、術当日より 6 週間、毎日、コルヒチンおよび AZC を腹腔内に投与した。これらのラットは以下の各群に分けて検討した。

いずれの群も、術当日よりオリエンタル固型飼料および水道水が自由に与えられた。なお、飼育条件は室温 25 ± 1°C, 湿度 55 ± 5% に維持された。

正常群には無処置のラットを 8 匹用いた。

1 群は対照群として実験的壊死性膵炎を作製した後、無処置にて飼育したラットを 48 匹用いた。

2 群は線維化抑制物質を投与した群で、コルヒチン投与群と AZC 投与群に分けた。コルヒチン投与群には 144 匹のラットを用いた。実験的壊死性膵炎を作製した後、コルヒチンの投与量により、さらに 3 群に分け、各々に 0.04 mg/kg/day, 0.2 mg/kg/day または 0.4 mg/kg/day を腹腔内投与した。AZC 投与群には 96 匹のラットを用いた。実験的壊死性膵炎を作製した後、AZC の投与量により、さらに 2 群に分け、各々に 4 mg/kg/day または 20 mg/kg/day を腹腔内投与した。

3. 検索方法

上記の方法で作製された各群につき、第 1 週, 2 週, 3 週, 4 週, 5 週, 6 週目にラットをエーテル麻酔下で開腹し、次の項目につき検索を行なった。

1) 血清アミラーゼ (amylase) およびリパーゼ

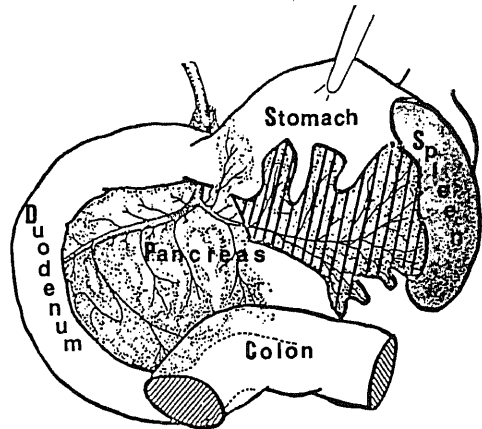



Fig. 1. Frozen area in the pancreas. , Frozen area.

(lipase) の測定

血清アミラーゼおよびリパーゼの測定は、下大静脈より採取した静脈血について行なわれた。アミラーゼはヨードデンブン比色法 (アミラーゼテストワコー, 和光純薬工業) にてリパーゼは British anti-lewisite tributyrate-sodium lauryl sulfate-5,5'-dithiobis (2-nitro-benzoic acid) (BALB-DTNB) 法 (リパーゼキット S, 大日本純薬工業) にて測定した。

2) 膵の乾湿重量比の検索

膵組織中の炎症性液体成分浸出の影響を削減するために、各群とも一定部位より採取した膵組織片は、湿重量を測定した後 -40°C, 12 時間凍結乾燥し、乾湿重量比を求めた。

3) 膵組織中ヒドロキシプロリン量の測定

膵組織中ヒドロキシプロリン量は、通常の分光計を用い mg レベルより ng レベルまで広範囲にわたって測定可能な簡便で再現性のよい Keio Inayama Shibata Ohtsuki (KISO) 法¹⁰⁾を用い、以下の如く測定した。

採取された膵組織片を、予め秤量したスクリュバイアル (S-I, 日電理化学硝子製) に入れた後、組織湿重量を測定し、次いで、これを -40°C, 12 時間凍結乾燥した後、組織乾燥重量を測定した。凍結乾燥した組織の入ったスクリュバイアルに 1 g から組織乾燥重量を差し引いた重量分の水を加え、さらに 12 N 塩酸 1 ml を追加した。このバイアルをテフロンとシリコンの二重パッキングで密栓した後、110°C の油浴中で 24 時間熱し、その中で膵組織片を酸加水分解した。次に、オキシプロリン 1~30 μg に相当する加水分解後の資料を、共通すり合せ試験管に加え、-40°C, 12 時間凍結

乾燥した後、蒸留水を4 ml 加え、さらに2 ml のほう酸緩衝液を追加して、20 分間混和した。その後、1 ml のクロラミン T 溶液を資料に加え、直ちに混和し、25 分後、チオ硫酸ソーダ溶液 3 ml を加えた。さらに、これにトルエン 5 ml を加え、密栓したのち、沸騰水浴中で 30 分間加熱した。次いで、資料を冷却後、5 分間静置した。トルエン層を 4.5 ml とり、これをほう硝カラムに通過させ、得られた澄明液の 2.5 ml を採取した。次いで、これに 1 ml のエーリッヒ試薬を加え直ちに混和した。混和 30 分後、ダブルビーム分光光度計を用い、650 nm でベースラインを零に合せた後、560 nm で資料の吸光度を測定し、予め作製された標準曲線より、各資料のヒドロキシプロリン量を求めた。なお、標準曲線は、市販のヒドロキシプロリン (Sigma chemical company) を用い、その各々 1, 5, 10, 15, 20, 30 μg に上記と同様の操作を加え、それらの吸光度を測定することにより得られた (図 2)。

4) 組織学的検索

i. 光学顕微鏡による検索

急速脱血にてラットを屠殺後、ただちに凍結処置された部位の脾組織片を摘出し、10%ホルマリン液にて固定した。標本は 4~7 μ で切り出し、ヘマトキシリン-エオジン染色にて脾組織全体像の観察を行い、アザ

ン染色にて脾組織中の線維の動態を観察した。

ii. 電子顕微鏡による検索

正常群には無処置のラット 5 匹、対照群は実験的壊死性肺炎を作製した後、無処置にて飼育したラット 20 匹、コルヒチン投与群は、実験的壊死性肺炎を作製した後、コルヒチン 0.2 mg/kg を投与した 20 匹、AZC

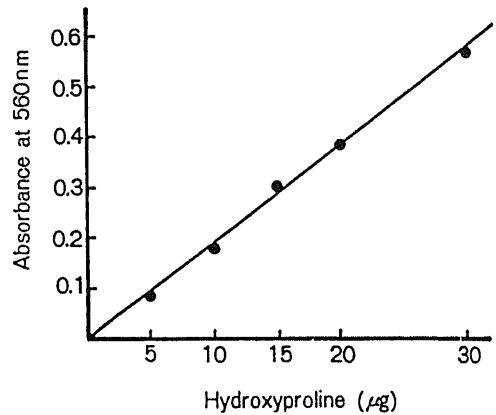


Fig. 2. Standard curve for light absorbance of hydroxyproline.

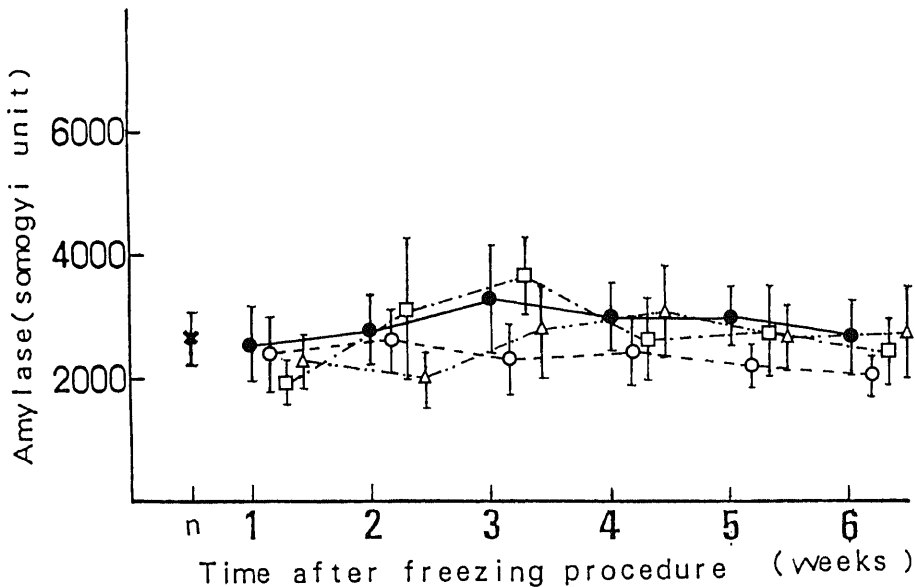


Fig. 3. Changes in plasma amylase levels after freezing procedure. Each point represents the mean \pm S.D. in 8 rats. x at n, Normal group without any procedure; ●—●, control group, freezing procedure without any additional administration of antifibrotic substances; ○—○, freezing procedure with intraperitoneal injection of colchicine 0.04 mg/kg/day; □—□, freezing procedure with intraperitoneal injection of colchicine 0.2 mg/kg/day; △—△, freezing procedure with intraperitoneal injection of colchicine 0.4 mg/kg/day.

投与群は、AZC 4 mg/kg を投与した 20 匹を用いた。摘出した腭組織片を、細切し、まずラット用生理的塩類溶液¹¹⁾中で十分洗滌し、1.25%グルタルアルデヒド溶液 (3%タンニン酸を含む) 中で前固定 (4°C, 60~90 分) して、再びラット用生理的塩類溶液中で洗滌 (4°C, 60 分) した。次いで、組織片をエタノール系列による脱水後、エポン 812 にて包埋し、超薄切片となした後、酢酸ウラニウムとクエン酸鉛による二重染色をほどこし、日立製作所 Hu-12 型電子顕微鏡にて観察した。

成 績

I. 血清アミラーゼおよびリパーゼの推移

1. アミラーゼ

正常ラットの血清アミラーゼ値は、2858±286 Somogyi U/dl (mean±S.D., n=8) であった。各群につき、血清アミラーゼを 6 週目まで 1 週ごとに測定した。対照群とコルヒチン投与群 (図 3) は、いずれの時期においても、それぞれの血清アミラーゼ値は著変を示さなかった。また、対照群と AZC 投与群 (図 4) でも同様にいずれの時期においてもその血清アミラーゼ値は、著変を生せず、両者間における差もみられなかった。

2. リパーゼ

正常ラットの血清リパーゼ値は、124.3±36.5 BALB 単位/0.05 ml (mean±S.D., n=8) であった。対照群の血清リパーゼ値は、1 週目以後、6 週まで軽度上昇したが、正常ラットの血清リパーゼに対し、いずれの時期においても、有意差を示さなかった。また、コルヒチン投与群 (図 5)、AZC 投与群 (図 6) の血清リパーゼ値は、対照群の血清リパーゼ値に比し、全経過を通じやや高い傾向を示したが、特に有意な差は認められなかった。

II. 腭の乾湿重量の比率の推移

正常ラット腭における乾燥重量と湿重量の比率は、28.6±2.1% (mean±S.D., n=8, 以下同じ) であった。腭凍結後 4 週目における対照群の乾湿重量比は 39.1±5.9% と正常ラットの比率に比して有意 (p < 0.01) に高く、5, 6 週目の比率もほぼ同様であった。コルヒチン投与群の比率でも、同様の経時的推移を示したが、対照群との間に、有意差は認められなかった (図 7)。同様に AZC 投与群の比率においても、対照群に比し軽度の低下が認められたが、有意差は認められなかった (図 8)。

III. 腭組織中ヒドロキシプロリン量の推移

正常ラットにおける腭組織中のヒドロキシプロリン

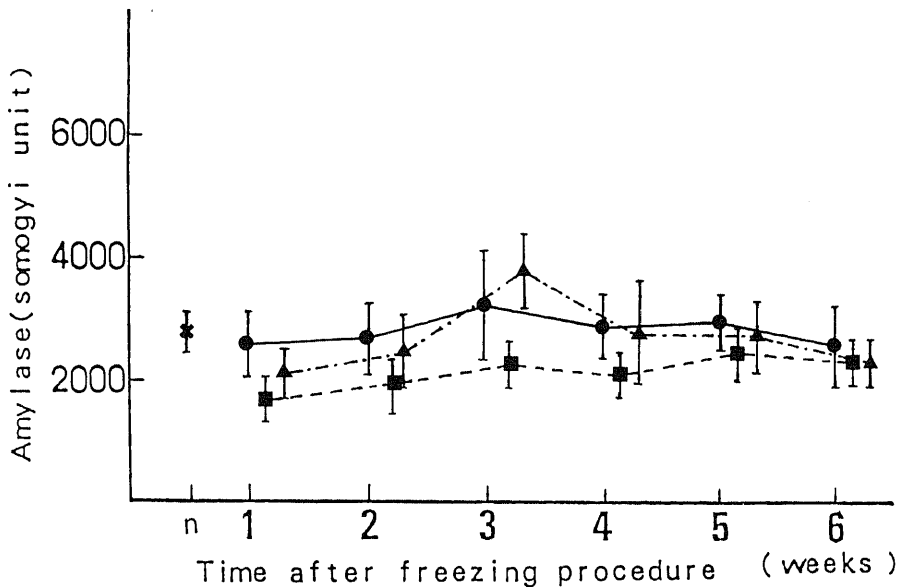


Fig. 4. Changes in plasma amylase levels after freezing procedure. Each point represents the mean±S.D. in 8 rats. x at n, Normal group without any procedure; ●—●, control group, freezing procedure without any additional administration of antifibrotic substances; ■—■, freezing procedure with intraperitoneal injection of L-azetidine-2-carboxylic acid (AZC) 4 mg/kg/day; ▲—▲, freezing procedure with intraperitoneal injection of AZC 20 mg/kg/day.

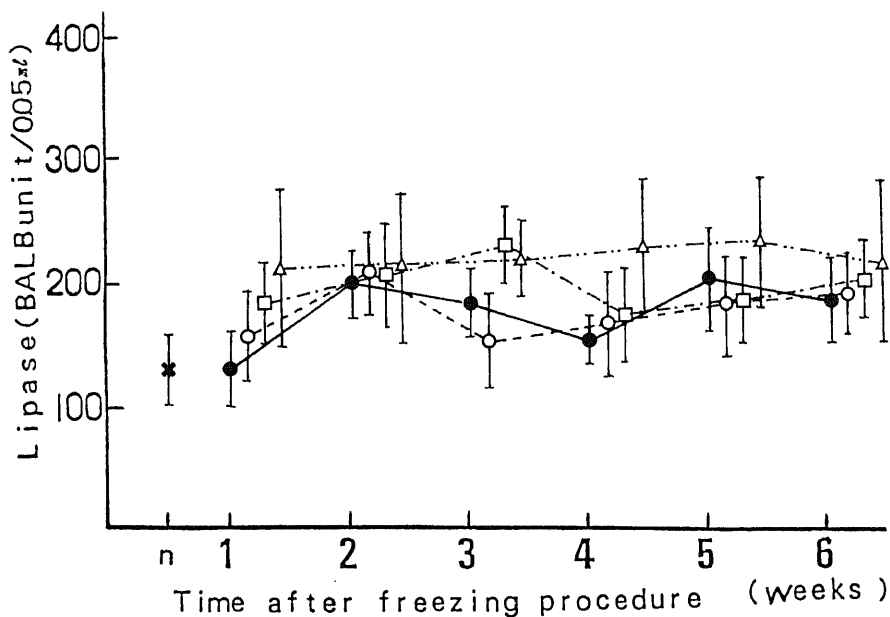


Fig. 5. Changes in plasma lipase levels after freezing procedure. Each point represents the mean \pm S.D. in 8 rats. x at n, Normal group without any procedure; ●—●, control group, freezing procedure without any additional administration of antifibrotic substances; ○—○, freezing procedure with intraperitoneal injection of colchicine 0.04 mg/kg/day; □—□, freezing procedure with intraperitoneal injection of colchicine 0.2 mg/kg/day; △—△, freezing procedure with intraperitoneal injection of colchicine 0.4 mg/kg/day.

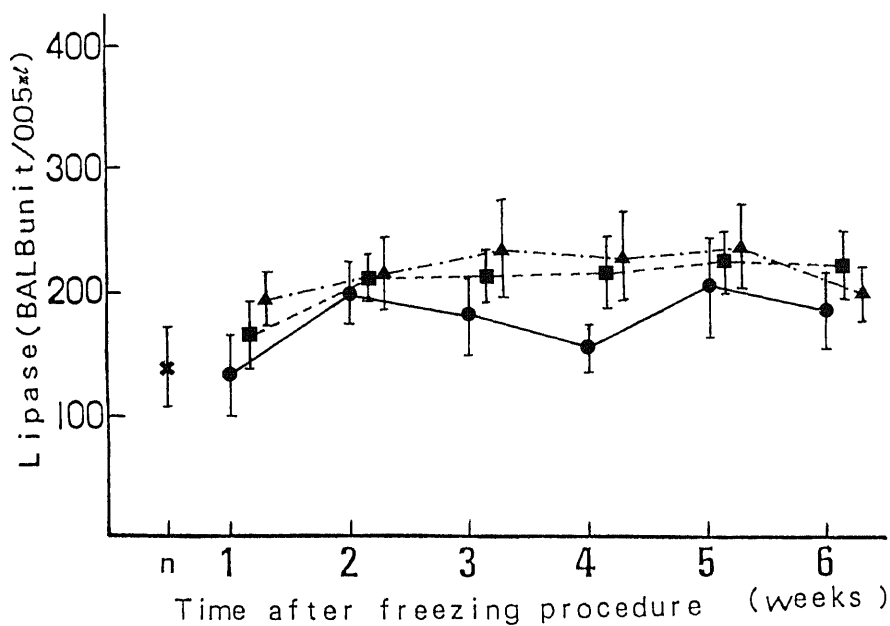


Fig. 6. Changes in plasma lipase levels after freezing procedure. Each point represents the mean \pm S.D. in 8 rats. x at n, Normal group without any procedure; ●—●, control group, freezing procedure without any additional administration of antifibrotic substances; ■—■, freezing procedure with intraperitoneal injection of AZC 4 mg/kg/day; ▲—▲, freezing procedure with intraperitoneal injection of AZC 20 mg/kg/day.

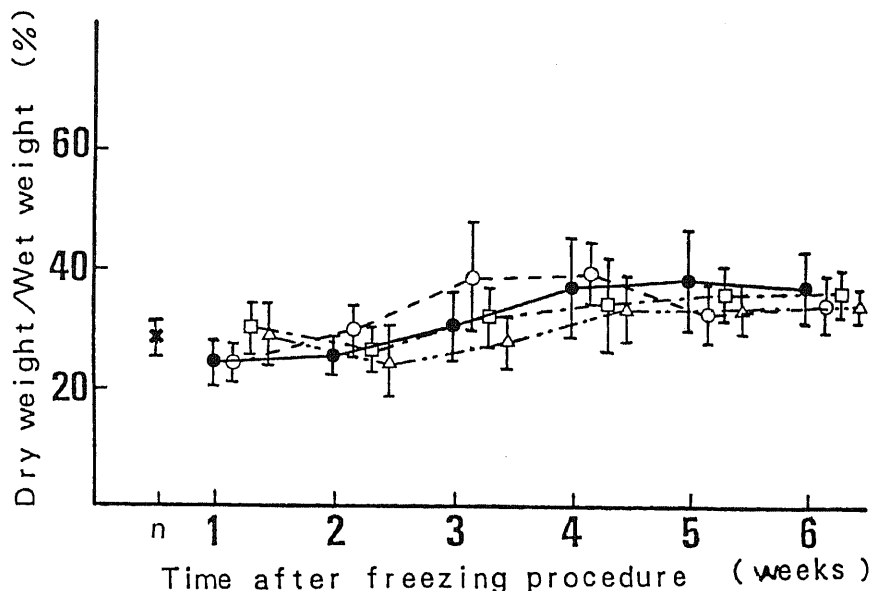


Fig. 7. Changes in the ratio of dry to wet weights of the pancreas tissue after freezing procedure. Each point represents the mean \pm S.D. in 8 rats. x at n, Normal group without any procedure; ●-●, control group, freezing procedure without any additional administration of antifibrotic substances; ○-○, freezing procedure with intraperitoneal injection of colchicine 0.04 mg/kg/day; □-□, freezing procedure with intraperitoneal injection of colchicine 0.2mg/kg/day; △-△, freezing procedure with intraperitoneal injection of colchicine 0.4 mg/kg/day.

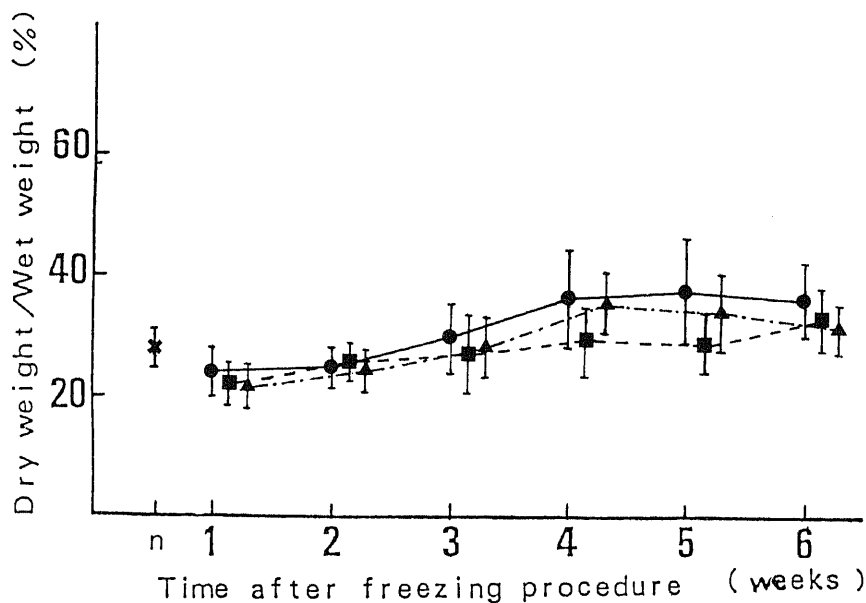


Fig. 8. Changes in the ratio of dry to wet weights of the pancreas tissue after freezing procedure. Each point represents the mean \pm S.D. in 8 rats. x at n, Normal group without any procedure; ●-●, control group, freezing procedure without any additional administration of antifibrotic substances; ■-■, freezing procedure with intraperitoneal injection of AZC 4 mg/kg/day; ▲-▲, freezing procedure with intraperitoneal injection of AZC 20 mg/kg/day.

量は、 $3.42 \pm 0.76 \mu\text{g}/\text{mg}$ (豚乾燥重量 mg (mean \pm S.D., $n=8$, 以下同じ)であった。対照群の測定は、豚凍結後 1 週で、 $5.14 \pm 1.26 \mu\text{g}/\text{mg}$ と正常群の値に比し有意 ($p < 0.01$) に増加した。さらに 2 週目の測定値は $7.56 \pm 1.14 \mu\text{g}/\text{mg}$, 3 週目には $7.58 \pm 1.26 \mu\text{g}/\text{mg}$, 4 週目には $7.88 \pm 1.48 \mu\text{g}/\text{mg}$ と 2 週目以後著増した。しかし、5 週目の値は $5.04 \pm 0.69 \mu\text{g}/\text{mg}$ となり、6 週目も $5.14 \pm 1.12 \mu\text{g}/\text{mg}$ であった。一方、コルヒチン $0.04 \text{ mg}/\text{kg}$ 投与群の豚凍結後 1 週目の値は $3.89 \pm 0.49 \mu\text{g}/\text{mg}$, 2 週目は $5.41 \pm 0.40 \mu\text{g}/\text{mg}$, 3 週目は $5.59 \pm 0.36 \mu\text{g}/\text{mg}$, 4 週目は $5.71 \pm 0.47 \mu\text{g}/\text{mg}$ であり、いずれも対照群に比し有意 ($p < 0.01$) の低下が認められた。しかし、5 週目の測定値は $4.29 \pm 0.37 \mu\text{g}/\text{mg}$ で、6 週目は $4.72 \pm 0.29 \mu\text{g}/\text{mg}$ となり、対照群に比し軽度の低下を示した (図 9)。

コルヒチン $0.2 \text{ mg}/\text{kg}$ 投与群のハイドロキシプロリン量は、1 週目が $4.42 \pm 0.36 \mu\text{g}/\text{mg}$ であったが、2 週目が $5.03 \pm 0.68 \mu\text{g}/\text{mg}$, 3 週目が $5.77 \pm 0.78 \mu\text{g}/\text{mg}$, 4 週目が $5.20 \pm 0.66 \mu\text{g}/\text{mg}$ と、対照群に比し有意 ($p < 0.01$) の低下を示した。しかし、5 週目の測定値は $4.73 \pm 0.64 \mu\text{g}/\text{mg}$ で、6 週目は $4.66 \pm 0.37 \mu\text{g}/\text{mg}$ であり、対照群との間に著差をみなかった (図 10)。

コルヒチン $0.4 \text{ mg}/\text{kg}$ 投与群のハイドロキシプロリン量は、1 週目が $4.61 \pm 0.62 \mu\text{g}/\text{mg}$, 2 週目が $3.78 \pm 0.27 \mu\text{g}/\text{mg}$, 3 週目が $4.63 \pm 0.43 \mu\text{g}/\text{mg}$, 4

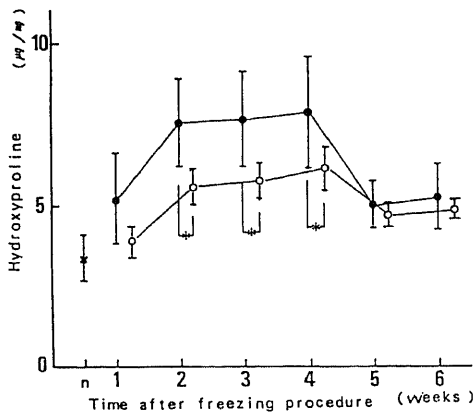


Fig. 9. Changes in hydroxyproline levels of the pancreas after freezing procedure. Each point represents the mean \pm S.D. in 8 rats. x at n, Normal group without any procedure; ●—●, control group, freezing procedure without any additional administration of antifibrotic substances; ○—○, freezing procedure with intraperitoneal injection of colchicine $0.04 \text{ mg}/\text{kg}/\text{day}$; △—△, freezing procedure with intraperitoneal injection of colchicine $0.2 \text{ mg}/\text{kg}/\text{day}$. * $P < 0.01$.

週目が $4.59 \pm 0.57 \mu\text{g}/\text{mg}$ であり、2, 3, 4 週目の値は対照群に比し有意 ($p < 0.01$) に低下した。しかし、5 週目の測定値は $4.36 \pm 0.32 \mu\text{g}/\text{mg}$, 6 週目は $4.16 \pm 0.42 \mu\text{g}/\text{mg}$ であり、いずれも対照群との間に著差をみなかった (図 11)。

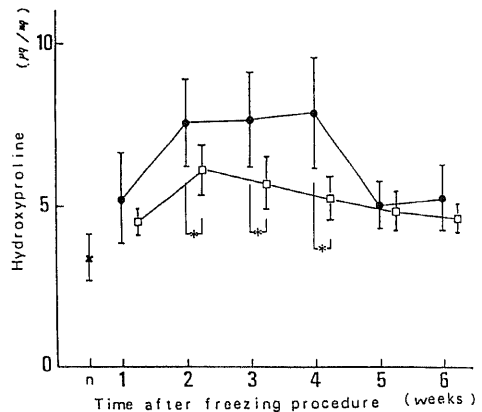


Fig. 10. Changes in hydroxyproline levels of the pancreas after freezing procedure. Each point represents the mean \pm S.D. in 8 rats. x at n, Normal group without any procedure; ●—●, control group, freezing procedure without any additional administration of antifibrotic substances; ○—○, freezing procedure with intraperitoneal injection of colchicine $0.2 \text{ mg}/\text{kg}/\text{day}$; △—△, freezing procedure with intraperitoneal injection of colchicine $0.4 \text{ mg}/\text{kg}/\text{day}$. * $P < 0.01$.

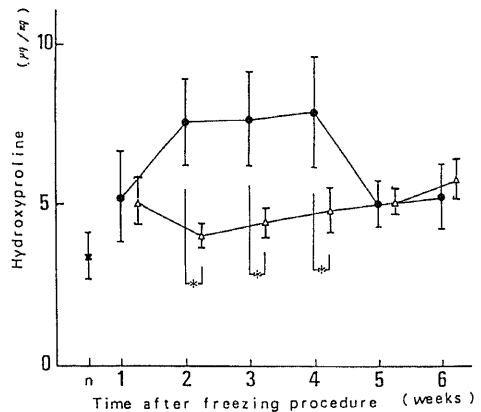


Fig. 11. Changes in hydroxyproline levels of the pancreas after freezing procedure. Each point represents the mean \pm S.D. in 8 rats. x at n, Normal group without any procedure; ●—●, control group, freezing procedure without any additional administration of antifibrotic substances; ○—○, freezing procedure with intraperitoneal injection of colchicine $0.04 \text{ mg}/\text{kg}/\text{day}$; △—△, freezing procedure with intraperitoneal injection of colchicine $0.2 \text{ mg}/\text{kg}/\text{day}$. * $P < 0.01$.

AZC 4 mg/kg 投与群のハイドロキシプロリン量は、1週目が $3.91 \pm 0.49 \mu\text{g}/\text{mg}$ であったが、2週目が $4.29 \pm 0.82 \mu\text{g}/\text{mg}$ 、3週目が $5.85 \pm 0.30 \mu\text{g}/\text{mg}$ 、4週目が $5.58 \pm 0.40 \mu\text{g}/\text{mg}$ であり、対照群に比しいずれも有意 ($p < 0.01$) の低下を示した。しかし、5週

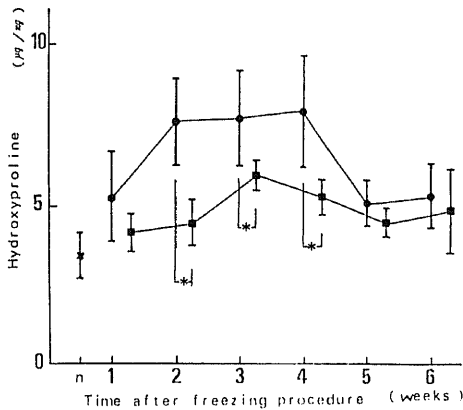


Fig. 12. Changes in hydroxyproline levels of the pancreas after freezing procedure. Each point represents the mean \pm S.D. in 8 rats. x at n, Normal group without any procedure; ●—●, control group, freezing procedure without any additional administration of antifibrotic substances; ■—■, freezing procedure with intraperitoneal injection of AZC 4 mg/kg/day. * $P < 0.01$.

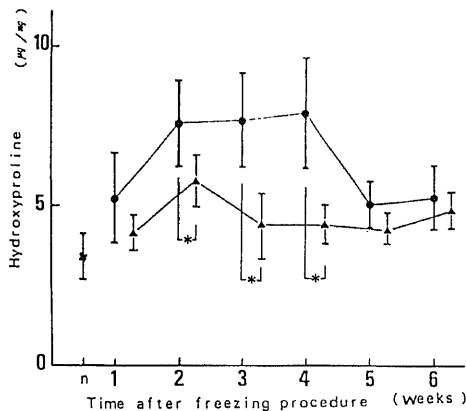


Fig. 13. Changes in hydroxyproline levels of the pancreas after freezing procedure. Each point represents the mean \pm S.D. in 8 rats. x at n, Normal group without any procedure; ●—●, control group, freezing procedure without any additional administration of antifibrotic substances; ▲—▲, freezing procedure with intraperitoneal injection of AZC 20 mg/kg/day. * $P < 0.01$.

目の測定値は $4.32 \pm 0.36 \mu\text{g}/\text{mg}$ 、6週目は $4.39 \pm 1.87 \mu\text{g}/\text{mg}$ であり、対照群との間に著差をみなかった (図 12)。

AZC 20 mg/kg 投与群のハイドロキシプロリン量は、1週目が $4.33 \pm 0.36 \mu\text{g}/\text{mg}$ であったが、2週目が $5.36 \pm 0.64 \mu\text{g}/\text{mg}$ 、3週目が $4.48 \pm 0.90 \mu\text{g}/\text{mg}$ 、4週目が $3.93 \pm 0.58 \mu\text{g}/\text{mg}$ であり、いずれも対照群に比し有意 ($p < 0.01$) の低下を示した。しかし、5週目の測定値は $4.16 \pm 0.37 \mu\text{g}/\text{mg}$ 、6週目は $4.11 \pm 0.42 \mu\text{g}/\text{mg}$ であり、対照群との間に著差をみなかった (図 13)。

IV. 膵の組織学的変化

1. 光学顕微鏡による検索

膵凍結処置後、初期の変化は、実質の壊死所見のみが著明であるが、2~3日後、壊死周辺部に炎症細胞浸潤が起こり、細膵管の増生もみられるようになった。1週目には線維増生が明かにみられ、また、毛細血管、炎症細胞浸潤および細膵管の増生も著明となった。コルヒチン投与群でも線維増生が認められたが、対照群に比して軽度であった。AZC 投与群においてみられる線維増生も前者と同様の所見であった。対照群では2~3週にかけてさらに線維化が進行し、3週目にピークとなった。一方、残存壊死部は、かなり縮小し、細膵管、炎症細胞浸潤像も減少傾向を示した。この時期におけるコルヒチン投与群、AZC 投与群では、対照群に比して、尚一層、線維増生が抑制された。4週目以後になると、線維増生が認められなくなり、脂肪組織の増加がみられるようになった (図 14)。5週目6週目に至ると、脂肪組織の占める割合は増加し、毛細血管や細胞浸潤が認められなくなり、細膵管の増生もほぼみられなくなった。対照群、コルヒチン投与群、AZC 投与群のそれぞれ各群における線維化の度合の変化が認められなくなった。

2. 電子顕微鏡による検索

1) 正常ラット膵の小葉間結合組織中に観察された線維芽細胞は、粗面小胞体およびミトコンドリアの発達が悪く、核に比較し、細胞質の占める割合が小さかった。したがって機能的に活発な動きを示す状態の線維芽細胞はみられなかった。一方、細胞間隙は多量の膠原線維と動・静脈、毛細血管、神経線維、膵管などが観察された (図 15, a)

2) 対照群ラットの膵壊死部における変化

凍結処置後、1週目の膵房細胞では、粗面小胞体の異常な拡張、隣接する小胞体間における平行性の消失、ゴルジ装置の不規則な変形と膨化などが認められた。正常な膵房中心細胞には多量のミトコンドリアが存在したが、処置後1週目にミトコンドリアはクリスタを

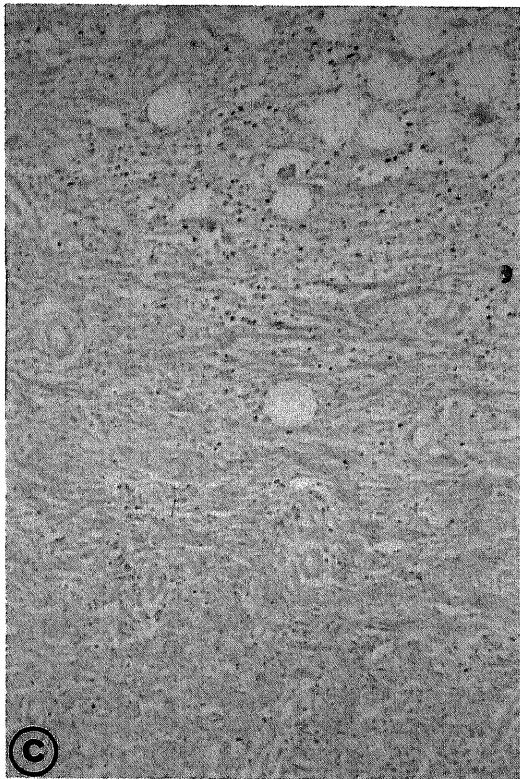
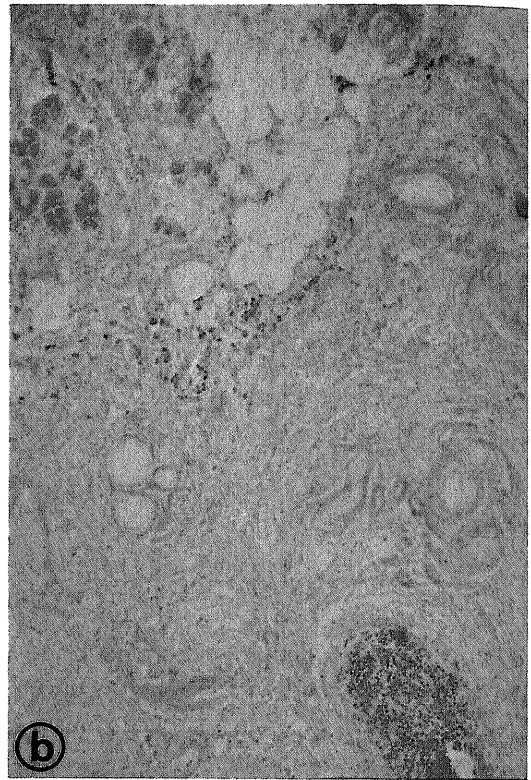


Fig. 14. Histological findings of the pancreas after freezing procedure. Azan stain, $\times 100$.

a: Light micrograph of the pancreas of control group 4 weeks after freezing procedure without any additional administration of antifibrotic substances. Strong fibrosis was seen and mild adipose tissue appeared.

b: Light micrograph of the pancreas of rats 4 weeks after freezing procedure with intraperitoneal injection of colchicine 0.2 mg/kg/day. Mild fibrosis was seen and mild adipose tissue appeared.

c: Light micrograph of the pancreas of rats 4 weeks after freezing procedure with intraperitoneal injection of AZC 4 mg/kg/day. Mild fibrosis was seen and mild adipose tissue appeared.

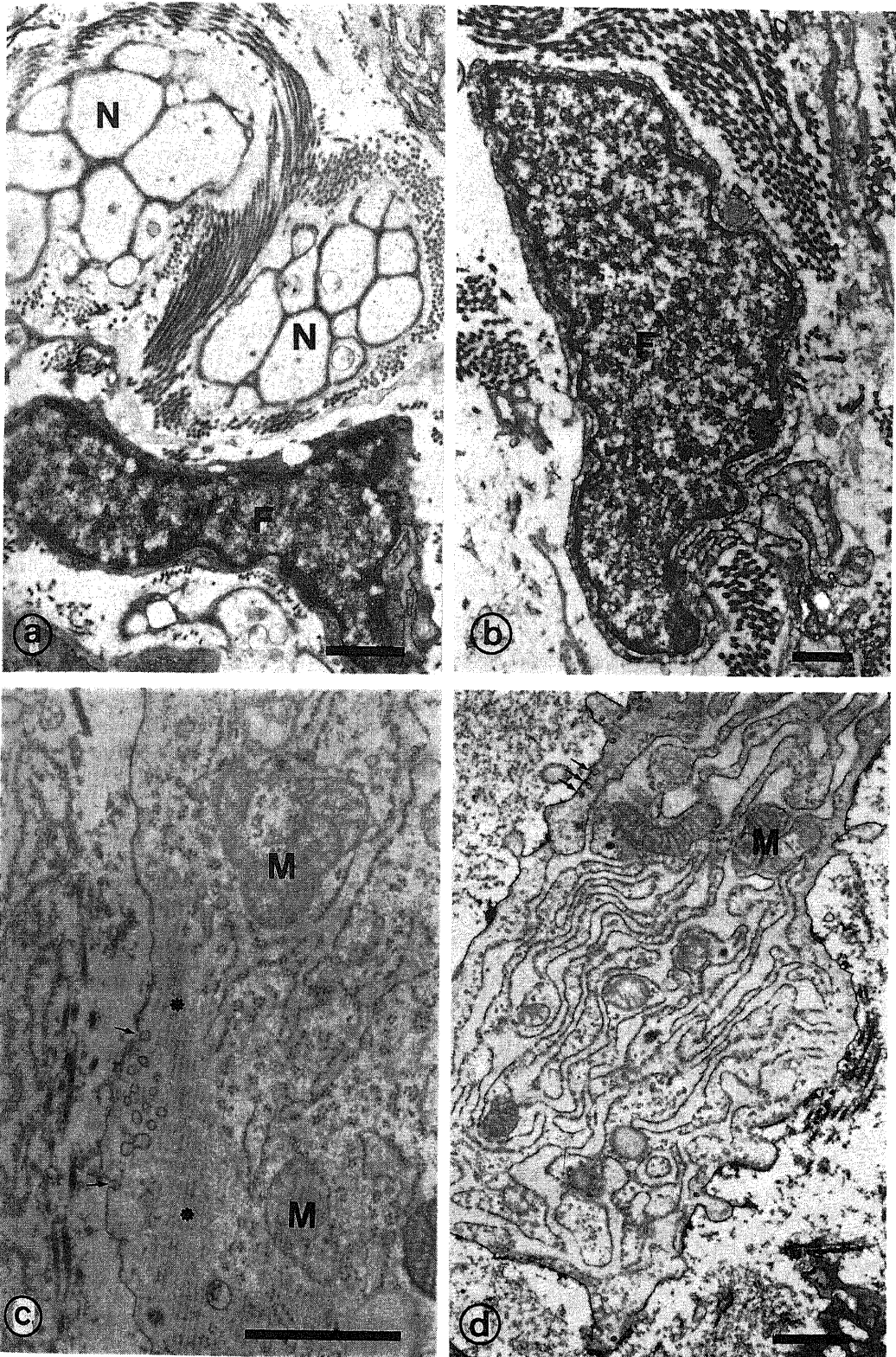


Fig. 15.

消失し、その数も減少していた。これら2種の細胞は、細胞小器官の変性ととともに、細胞全体の変化も著しく、細胞膜は不規則な突出、陥入を生じ、また、これら細胞の周囲に複雑な形の空隙を生じていた。この時期の線維芽細胞には粗面小胞体の拡張と数の減少、ゴルジ装置の変形、ないし崩壊、ミトコンドリアの変形およびクリスタの消失などが観察された(図15, b)。しかし、線維芽細胞の周囲には、正常膵の小葉間結合組織にみられたものとほぼ同量の膠原線維の存在を認めた。処置後3週目の結合組織中には、細胞小器官が殆んど崩壊し、細胞膜が複雑に陥入し、明らかに壊死に陥った状態の線維芽細胞が多数みられた。これらの細胞の他に、小滴を含む線維芽細胞や、核分裂中の組織

球もしばしば観察された(図16, a)。また、基底膜の残りが著明に残る毛細血管の変性像もみられた(図16, a)。処置後6週目の結合組織には、退縮中と考えられる線維芽細胞が多く、それらの近傍には多数の顆粒を飽食した肥満細胞が認められた(図17, a)。

3) 凍結処置後コルヒチン投与を行なった膵壊死部における変化

腺房細胞および腺房中心細胞は、いずれも凍結処置後に無処置ラット膵で観察された所見と同じ変化を示し、著明な変化像がみられた。処置後1週目のコルヒチンが投与された膵の小葉間結合組織中には、変化・退縮を示す線維芽細胞に混じり、核に比し細胞質の占める割合が著しく大きい細胞が出現した(図15, c)。

Fig. 15. Electron micrographs of the interlobular connective tissue in the pancreas of rats without any procedure and with freezing procedure. Scale in each photograph, 1 μ m.

- a: Fibroblast and the nerve bundles in the normal specimen. The nerve bundle (N) consists of several unmyelinated nerve fibers embedded in the peripheral cytoplasm of a Schwann cell, and is wholly covered with a basement membrane and a number of collagen fibrils. The fibroblast (F) is flattened and stellate in shape, and has little cytoplasm, where the granular endoplasmic reticulum is poorly developed. $\times 12,000$.
- b: Fibroblast in the experimentally induced necrotic portion of the rat pancreas 1 week after the freezing procedure. The cell (F) does not appear to have a strong ability to form collagen fibrils, although there are many fibrils in the intercellular matrix. $\times 9,600$.
- c: Part of the fibroblast in the experimentally induced necrotic portion of the pancreas in the rat injected with colchicine 0.2 mg/kg/day for one week following the freezing procedure. The cell has much cytoplasm, and mitochondria (M) are large and form a complexly branched structure. The swollen and branched granular endoplasmic reticulum is well developed. The plasma membrane sometimes forms caveolae (arrows), and some small vesicles are seen around such profiles. Many microfilaments are present, running parallel with each other in the peripheral cytoplasm (asterisks). $\times 24,000$.
- d: Part of the fibroblast in the experimentally induced necrotic portion of the pancreas in the rat injected with AZC 4 mg/kg/day for one week following the freezing procedure. The cell has much cytoplasm, and the swollen and branched granular endoplasmic reticulum is developed throughout the cytoplasm. The plasma membrane forms caveolae (arrows), and vesicles are present around them. Microfilaments are also seen at the upper area of the micrograph. $\times 12,000$.

Fig. 16. Electron micrographs of the interlobular connective tissue in the pancreas of rats at 3 weeks after freezing procedure. Scale in each photograph, 1 μ m.

- a: Several fibroblasts, the histiocyte, and the blood capillary in the experimentally induced necrotic portion of the rat pancreas 3 weeks after the freezing procedure. In this phase, the fibroblast including many droplets (thick arrow) appears, and some cells (thin arrows) are seen to form such droplets within the cytoplasm, all of which seem to be in the course of transition into fat cells. The histiocyte in the nuclear division (large asterisk) is observed. A degenerating capillary (small asterisk) is seen. $\times 3,600$.
- b: Part of the fibroblast in the experimentally induced necrotic portion of the pancreas in the rat injected with colchicine 0.2 mg/kg/day for 3 weeks following the freezing procedure. The number of profiles of the swollen granular endoplasmic reticulum is greatly decreased. The mitochondria are poorly developed. The Golgi complex (G) are seen to be related with the endoplasmic reticulum. Many microfilaments are observed, running parallel with each other in the peripheral cytoplasm (asterisks), where the dense bodies are also found. $\times 12,000$.
- c: The fibroblast in the experimentally induced necrotic portion of the pancreas in the rat injected with AZC 4 mg/kg/day for 3 weeks following the freezing procedure. Both free and attached ribosomes are less frequent than in the active fibroblasts. The granular endoplasmic reticulum is also poorly developed. $\times 12,000$.

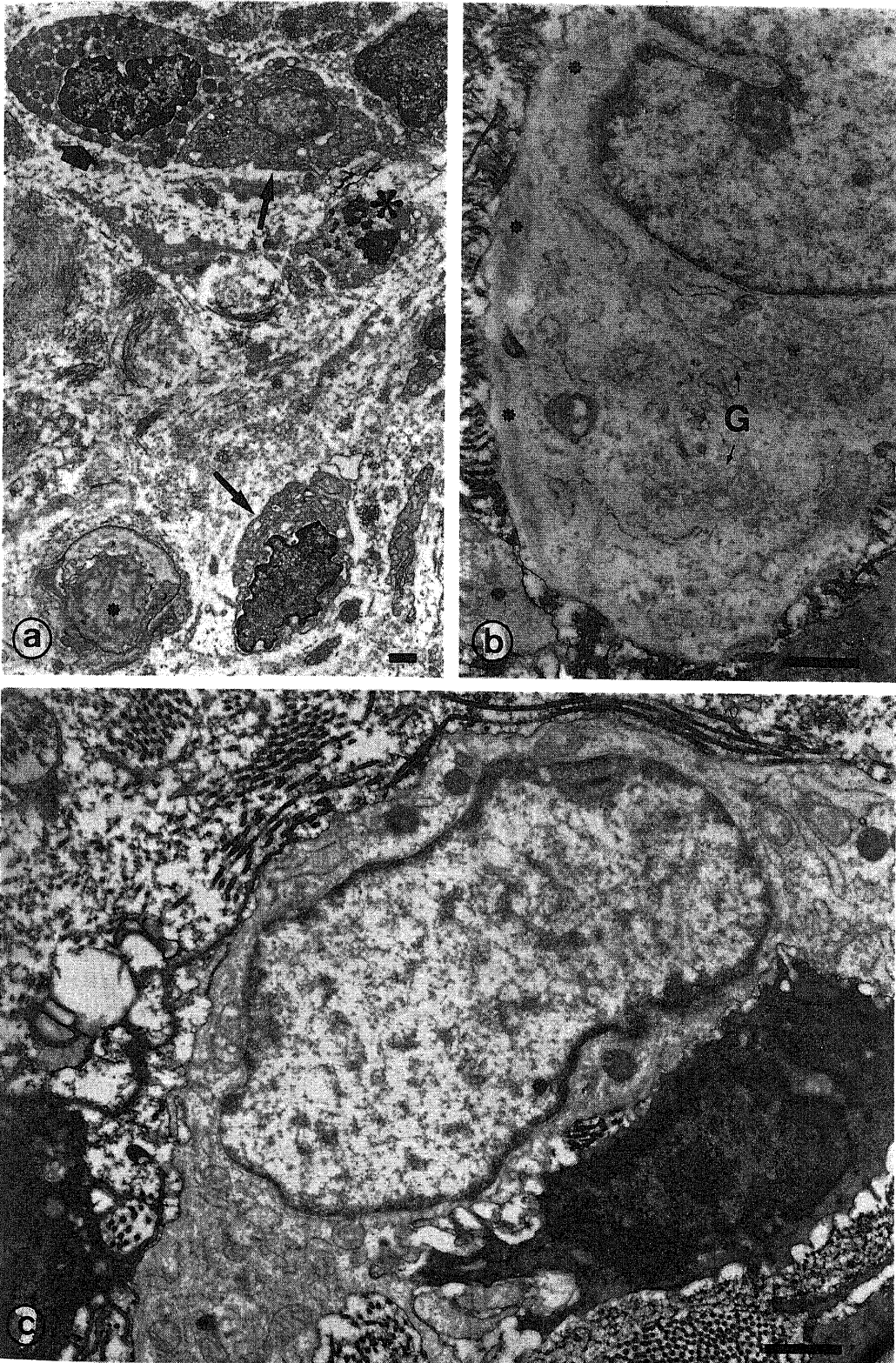


Fig. 16.

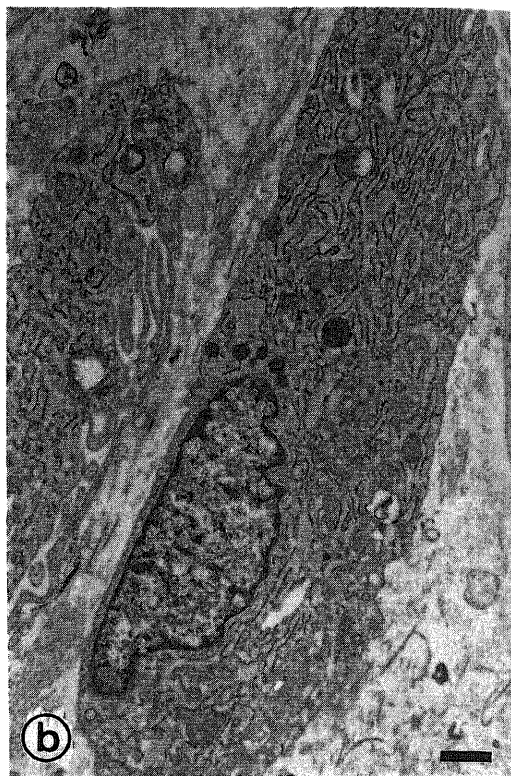
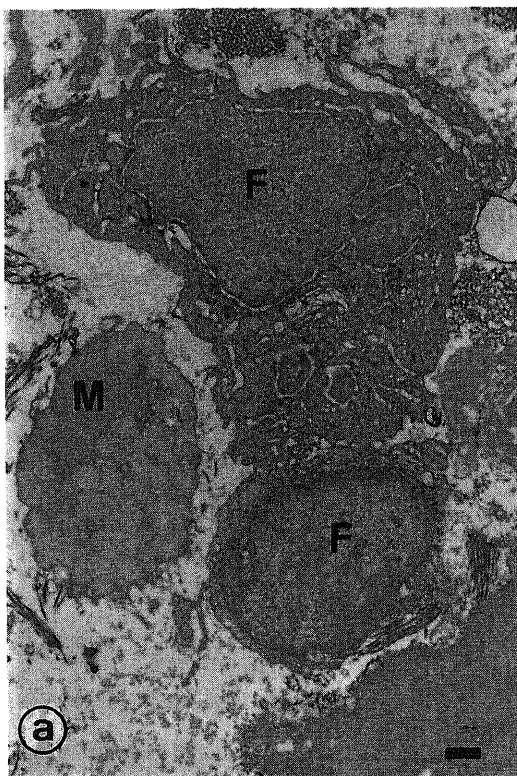


Fig. 17. Electron micrographs of the interlobular connective tissue in the pancreas of rats at 6 weeks after the freezing procedure. Scale in each photograph, $1 \mu\text{m}$.

- a: Fibroblasts and mast cells in the experimentally induced necrotic portion of the rat pancreas 6 weeks after the freezing procedure. A mast cell (M) occurs close against the fibroblasts (F), which seem to be in a catagenic state. $\times 4,800$.
- b: Part of fibroblasts in the experimentally induced necrotic portions of the pancreas in the rat injected with colchicine 0.2 mg/kg/day for 6 weeks following the freezing procedure. The swollen and branched granular endoplasmic reticulum is well developed. The plasma membrane shows frequent deep invaginations. Dense bodies of various sizes, probably derived from phagocytosis, appear in the cytoplasm. $\times 7,200$.
- c: The fibroblast in the experimentally induced necrotic portion of the pancreas in the rat injected with AZC 4 mg/kg/day for 6 weeks following the freezing procedure. In this phase, the fibroblast is flattened and stellate in shape, and has few organelles. $\times 12,000$.

この細胞には、クリスタが発達し、複雑に分岐するミトコンドリアが多数存在し、拡張、分岐した粗面小胞体の発達が認められた。細胞膜はしばしば小湾入(caveolae)を示し、それらの近傍には多数のピノサイトーシス小胞が観察された(図15, c, 矢印)。この種の細胞には、多数のほぼ平行に配列されたマイクロフィラメントの集束が細胞辺縁部にみられた(図15, c, 星印)。凍結処置およびコルヒチン投与3週後の結合組織中にも、この種の細胞は多数認められ、マイクロフィラメントの集束には、平滑筋細胞に存在する筋フィラメントの濃厚体(dense body)と同じ構造がみられた(図16, b, 星印)。また、その他の線維芽細胞には、拡張した粗面小胞体のみみられたが、その数は少なく、付着リボゾームの数も少なかった。また、ミトコンドリアの発達程度も低下していた(図16, b)。処置後6週目の線維芽細胞にはやはり拡張した粗面小胞体が存在したが、あるものは小胞腔が細胞外に穿孔することによって実際の細胞容積は狭くなっていた(図17, b)。これらの細胞には発達したミトコンドリアがみられなかった。

4) 凍結処置後 AZC 投与を行なった腓壊死部における変化

凍結処置後1週目の小葉間結合組織には、コルヒチン投与を行なった腓にみられた変化と同じく、核に比較し細胞質の占める割合の大きい線維芽細胞が観察された。それらの細胞には、しばしばマイクロフィラメントの集束が細胞辺縁部にみられ、細胞膜には小湾入が存在し、ピノサイトーシス小胞が多数認められた(図15, d, 矢印)。これらの細胞も、コルヒチン投与腓と同じく、筋線維芽細胞に相当した。増大した細胞質中には、拡張、分岐した粗面小胞体が広く発達し、付着リボゾームの数も多数存在していた。処置後3週目の小葉間結合組織にみられた線維芽細胞には、いずれも粗面小胞体およびゴルジ装置がみられたが、ミトコンドリアの発達は悪かった(図16, c)。処置後6週目に観察された線維芽細胞の多くは、正常腓と同様の所見を示した(図17, c)。

考 察

急性腓炎の過半数は適切な処置により機能障害を残すことなく治癒する。しかし、低率ではあるが、急性腓炎より慢性腓炎へ移行する報告¹²⁾もみられる。山形¹³⁾は、種々の原因で生じた腓の炎症性変化の結果として、腓の線維化が発生し、腓の形態学的変化や、これに伴う機能異常をきたすが、これは不可逆であり、進行的であると述べている。

腓炎後にみられる腓の線維化は臨床的にも重大な問

題であり、この解明のため、種々の実験的腓炎モデル¹⁴⁾¹⁵⁾が作製されている。林田ら¹⁶⁾はイヌに対して腓凍結による実験的壊死性腓炎を作製し、腓の線維増生を得ている。また、木南ら¹⁷⁾は、ラットに対して、腓実質を contact freezing することによる実験的壊死性腓炎を作製し、腓の線維化の動態を観察した。今回、著者も比較的短期間にかつ確実に腓組織に線維増生を生じしめることが可能なこの contact freezing 法を実験に用いた。

腓炎は、血中や尿中の腓酵素を測定することにより、ある程度まで推定が可能¹⁸⁾¹⁹⁾である。ラット腓凍結処置後、無処置群、および、コルヒチンまたは AZC 投与群の血清アミラーゼ値は、6週まで測定したが、各群間に有意差は認められなかった。一方、ラット腓凍結処置後、無処置群、およびコルヒチンまたは AZC 投与群の血清リパーゼは、AZC 投与群において軽度の上昇を認めたが、無処置群との間に有意差を認めなかった。これらの所見は、薬剤の投与により、腓酵素に著しい影響をおよぼさないことを示すと推察された。

ところで腓線維化の程度を定量的に検討するために若干の方法²⁰⁾²¹⁾が報告されている。

組織中の水分含有量は、臓器によりほぼ一定²²⁾であるとされている。そこで、実験的壊死性腓炎の各時期における腓の組織水分量を検索することにより、腓の組織学的変化の推測を試みた。腓の湿重量に対する乾燥重量の比率は、正常腓では、ほぼ30%であるが、凍結処置後1、2週目には軽度の低下を示した。つまり、この時期においても組織浮腫のあることが推定された。しかし、4週目以後にその比率は40%近くに達し、正常ラットの比率に比して有意に上昇した。これは、腓実質細胞の減少や線維化の進行、それに3週目より出現し始めた脂肪組織が増加したための変化と推察された。また、コルヒチン投与群、AZC 投与群の比率も、同様の経時的推移を示した。

組織中ハイドロキシプロリンは、コラーゲン蛋白に特有の構成アミノ酸であり、コラーゲンの全アミノ酸に対する比率がほぼ一定していることから、その測定は、膠原線維量の良い指標になると考えられている。実験的壊死性腓炎後の腓線維化の定量を、能登²³⁾は Prockop-Udenfreind 法²⁴⁾を用い、また、井上²⁵⁾は Nauman 法²⁶⁾を用いて、各々腓組織中ハイドロキシプロリン値を測定することから行なっている。しかし、これらの方法は、測定範囲が狭く、操作が複雑で、かつ測定値に安定性を欠き、長期の習熟が要求される。しかし、著者の用いた KISO 法は、検索部位を一塊として容易に測定することが可能であり、また、その測定に安定性が認められることから有益と思われた。凍

結処置後の腓組織中ハイドロキシプロリン値は4週目まで増加し、5週目以後低下した。この結果は、4週目まで、腓線維化の増量を示すと推察された。

ところで、腓線維化の治療には、積極的なものが現在無い状況にある。これは、慢性腓炎のなり立ちとして、腓実質の脱落と線維化が次第に進展することによるが、この進展を完全に阻止する治療法が開発されていないことにある²⁷⁾。いずれにしろ、慢性腓炎の本態は、腓組織の線維化とそれに伴う腓機能障害にあることにより、腓線維化を抑制することが、急性腓炎から慢性腓炎への移行を阻止する意味で極めて重要である。このような観点から、コラーゲン線維形成の機序の各段階に影響を与える線維化抑制物質 antifibrotic drugs を投与することにより、腓線維化の動態の観察とその抑制の可能性を検討した。

コルヒチンは、代表的な anti-microtubular drugs であり、プロコラーゲンの細胞内移送および細胞外への分泌を障害することが知られている^{28)~30)}。また、既存のコラーゲン線維に作用してそれを減少させる³¹⁾ことも期待される。Rojkind 一派は、四塩化炭素肝障害ラットを用いた実験で、コラーゲンの合成能の低下と肝機能の改善を認めたことを報告した³¹⁾。また、肝硬変患者を対象とした二重盲検法による成績が発表され³²⁾、コルヒチンの線維化の抑制効果が示唆された。

プロリン類似物質 (proline analogues) である AZC の作用機序は、プロリンに代ってプロコラーゲン鎖にとりこまれることにより、プロリンの水酸化とそれに続く三重らせん構造が作られなくなり、プロコラーゲン分子の細胞外への分泌とそれに続くコラーゲン形成が阻害される^{33)~35)}ことにあるという。Rojkind 一派は、四塩化炭素肝障害ラットを用いて、コルヒチン投与と同様に、AZC を投与することによって、肝線維化の抑制、コラーゲン合成能の低下と肝機能の改善を認めたと報告した³⁶⁾³⁷⁾。

ところで、コルヒチンまたは AZC 投与群では、2週目より、非投与群に比較して有意にハイドロキシプロリン値の低下を認めている。しかし、コルヒチン投与量を 0.04 mg/kg, 0.2 mg/kg, 0.4 mg/kg に分けて検討したが、ハイドロキシプロリン値には各々の投与量による大きな差がみられなかった。しかし、0.4 mg/kg 投与において、本剤の副作用と思われる脱水による死亡例がみられた。また、AZC 投与群でも投与量を 4 mg/kg と 20 mg/kg としたが、両投与量に基づくハイドロキシプロリン値の変化に有意差は認められなかった。

凍結処置後のラット腓を組織学的に観察すると以下の如くであった。すなわち、凍結部に融解壊死を認め、

その周囲に細胞浸潤が起り、1週目より線維芽細胞が出現し、3週目にピークとなる線維増生が生じた。しかし、コルヒチンまたは AZC を投与することによって、その線維化が抑制される所見が、アザン染色による検索で認められた。これらの組織学的変化は、組織中のハイドロキシプロリン値の推移と一致した所見を示唆している。

また、電子顕微鏡にて、各群の線維芽細胞を形態学的な面から詳しく検討した。その結果、コルヒチンまたは AZC 投与群では、1週目以後に、ピノサイトーシス小胞やマイクロフィラメントを特徴とする平滑筋細胞様の細胞が観察された。これらの細胞は、Gabbiani ら³⁸⁾により命名された筋線維芽細胞に相当するものと考えられる。筋線維芽細胞は、細胞膜に小湾入を形成し、マイクロフィラメントの集束を含むことで平滑筋細胞に類似するばかりでなく、機能的にも平滑筋細胞と同様な収縮物質をもつことが証明されている^{39)~43)}。さらに筋線維芽細胞を含む肉芽組織片は、セロトニン、アンジオテンシン、バゾプレッシン、ノルエピネフリン、ブラジキニンにより収縮し⁴¹⁾⁴⁶⁾、プロスタグランジン E₁, E₂, またはパパペリンにより弛緩する⁴⁹⁾ことから、平滑筋細胞と同様の機能が備わっているとされる。本研究において観察された筋線維芽細胞の動態を中心に、コルヒチンまたは AZC 投与による壊死部の変化を無処置群のそれと比較したところ、以下の経過が推察された。ラット腓の凍結処置後、無処置の例では、まず腓実質を構成する腺房細胞および腺房中心細胞に変性、壊死が起る。一方、壊死部周辺から浸潤したと考えられる組織球による壊死細胞の貧食及び酵素分解が進み、実質内に空隙が形成されていく。これと併行して、壊死部周辺または壊死部内に残存した線維芽細胞の活発な増殖とコラーゲン産生または脂肪細胞への転化が開始され、すでに形成されつつある空隙を膠原線維や脂肪細胞が充填していく。その結果、壊死部の線維化または脂肪組織への置換が起るものと考えられる。これとは異なり、凍結処置後、コルヒチンまたは AZC を投与した腓では、まず腓実質に生じた壊死部が周辺より浸潤する組織球により貧食、分解され、そこに空隙が生じる。この頃より筋線維芽細胞が出現し、増殖して創傷収縮が始まる。これは、創傷肉芽組織における、創傷収縮の時期に一致して、筋線維芽細胞が増殖する⁴⁷⁾⁴⁸⁾との報告と一致する。また、この筋線維芽細胞は、肺線維症⁴⁹⁾、サルコイドーシス⁵⁰⁾、プラズマ細胞肉芽腫⁵¹⁾、肝線維症⁵²⁾⁵³⁾などの線維性病巣に観察され、これらの病巣の収縮に関与するものと考えられている。これらの報告にみられるように、筋線維芽細胞が出現し増殖し、できた空隙を充填して

創傷収縮が起こったと考えられた。しかし筋線維芽細胞に移行しない線維芽細胞の存在もしばしば観察された。これらの細胞には、コルヒチンまたは AZC 投与によるコラーゲン合成阻害作用により、凍結処置後、無処置の膵のように膠原線維を形成したり、脂肪細胞への転化が生ぜず、壊死部における線維化は抑制されたものと考えられた。

結 論

急性壊死性膵炎後におこる膵線維化の動態観察とその抑制を目的とし、ラットに実験的壊死性膵炎を作製し、線維化抑制物質であるコルヒチンまたは AZC を投与した。膵線維化の動態を膵組織内ハイドロキシプロリン値の測定と組織学的検索にて検討した。また、電子顕微鏡にて線維芽細胞を観察し以下の結果を得た。

1. 膵凍結処置後、1週より6週まで、毎週血清アミラーゼおよびリパーゼを測定したが、凍結処置後、無処置群とコルヒチンまたは AZC を投与した群との間には特に有意差を認めなかった。

2. 膵凍結処置後、無処置群の膵組織内ハイドロキシプロリン値は、2週から4週にかけて、正常ラットの膵組織内ハイドロキシプロリン値より有意 ($p < 0.01$) に上昇したが、凍結処置後、コルヒチンまたは AZC を投与した群では、無処置群と比較して、膵組織内ハイドロキシプロリン値は2週から4週にかけて有意 ($p < 0.01$) に低下した。

3. 膵凍結処置により、膵実質の壊死がみられ、1週日より線維増生が始まり2から3週にかけて線維化がさらに進行し、4週目以後、線維増生は認められなくなり、脂肪組織の増加がみられた。しかし、凍結処置後、コルヒチンまたは AZC 投与群にも、同様に線維増生はみられたが、無処置群と比較して、その線維増生は2から4週にかけて軽度であった。

4. 線維芽細胞の電子顕微鏡的所見は以下の如くであった。膵凍結処置後、無処置群では、壊死部周辺または壊死内部に残存した線維芽細胞の活発な増殖とコラーゲン産生または脂肪細胞への転化がみられた。しかし、凍結処置後、コルヒチンまたは AZC を投与した膵では、線維芽細胞から移行したと考えられる筋線維芽細胞が出現し、壊死部が縮小された。

以上の成績は、膵壊死後におけるその修復過程と膵線維化の動態を明らかにするとともに、線維化抑制物質の投与による膵線維化抑制の可能性を示唆した。

(本論文の要旨は、第25回日本消化器病学会秋季大会において発表した。)

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、御助言を戴いた金沢医科大学一般消化器外科木南義男教授、電子顕微鏡による検索に御指導を戴いた金沢医療短大水上稔教授、さらにハイドロキシプロリン量の測定に御指導を戴いた高田道明博士に感謝の念を表します。

文 献

- 1) Sarles, H. (ed.): Pancreatitis, Symposium, Marseilles, April 25 and 26, 1963. *Bibl Gastroenterol.* Fasc. 7. Verlag, S. Karger, Basel. 1965.
- 2) Banks, P. A.: Pancreatitis. p181-192, Plenum Medical Book, New York and London, 1979.
- 3) 堺 隆広: 肝臓—構造と機能(織田敏次・岡博編), 105-136頁, 中外医薬社, 東京, 1982.
- 4) Rojkind, M. & Kershenobich, D.: Clinical hepatology. p126-143. In G. Csomo's & H. Thaler (ed.), Springer-Verlag Co., New York, 1983.
- 5) Rojkind, M. & Kershenobich, D.: The liver annual 3/1983. p189-204. In I. M. Arias (ed.), Elsevier Co., Oxford, 1983.
- 6) Snider, G. L.: Interstitial pulmonary fibrosis which cell is the culprit? *Am. Rev. Resp. Dis.* **127**, 535-539 (1983).
- 7) 高田道明: 実験的壊死性膵炎における膵線維化とコラーゲナーゼ活性に関する研究. *十全医会誌*, **91**, 473-488 (1982).
- 8) 田嶋嘉雄: 実験動物学・各論(田嶋編), 第5版, 453-455頁, 朝倉書店, 東京, 1972.
- 9) Richards, C., Fitzgerald, P. J., Carol, B., Rosenstock, L. & Lipkin, L.: Segmental division of the rat pancreas for experimental procedures. *Lab. Invest.*, **13**, 1303-1321 (1964).
- 10) Inayama, S., Shibata, T., Ohtuki, J. & Saito, S.: A new microanalytical method for determination of hydroxyproline connective tissue. *Keio J. Med.*, **27**, 43-46 (1978).
- 11) Krebs, H. A.: Untersuchungen über den Stoffwechsel der Aminosäuren im Tierkörper. *Hoppe-Seyl. Z., Physiol. Chem.*, **217**, 191-227 (1933).
- 12) 佐藤寿雄: 慢性膵炎調査研究班, 昭和49年度研究業績, 1974.
- 13) 山形徹一: 慢性膵炎の概念と分類. *日本臨床*, **25**, 2673-2678 (1967).
- 14) 小西孝司: 実験的膵石症. *日消会誌*, **73**, 917-927 (1976).
- 15) 細田四郎: 膵疾患実験モデルの現況. 胆と膵, **4**, 1321-1323 (1983).

- 16) 林田康男・権田厚文・横田広夫・山崎忠光・高田方凱・城所 功: 肺炎の実験モデル. 医学のあゆみ, **103**, 346-352 (1977).
- 17) 木南義男・高田道明・宮崎逸夫: 急性肺炎後における線維化と膵コラゲナーゼ活性に関する実験的研究. 日消会誌, **80**, 91-97 (1983).
- 18) 小川道雄: アミラーゼ. 消化器外科, **3**, 1115-1123 (1980).
- 19) 北村次男・黒岡 繁: ヒト血清リパーゼの膵疾患診断指標としての意義. 医学のあゆみ, **109**, 587-598 (1979).
- 20) 小泉金次郎: 膵機能と病理組織所見. 日本膵臓病研究会プロシーディングス, **2**, 109-110 (1972).
- 21) 小関 柊・能登 陸・松野正紀・狩野研二郎: 慢性肺炎の組織像と臨床像との対比: とくに組織計測学的立場から. 日消会誌, **77**, 954-962 (1980).
- 22) 柴田徹一・稲山誠一・中村 薫・中里由利子・細田泰弘: 凍結乾燥法を用いる微量臓器中の水分ならびに肺結合組織中コラーゲンの微量定量法. 医学のあゆみ, **113**, 413-415 (1980).
- 23) 能登 陸: 肺炎の修復過程に及ぼす食餌の影響: ラットについての実験的研究. 日消会誌, **69**, 869-877 (1972).
- 24) Prockop, D. J. & Udenfriend, S.: A specific method for the analysis of hydroxyproline in tissue and urine. *Anal Biochem.* **1**, 228-239 (1960).
- 25) 井上吉弘: 膵線維化の機序に関する実験的研究: 特に膵組織ヒドロキシプロリン量と膵線維化. 日消外会誌, **13**, 1369-1378 (1980).
- 26) Neuman, R. E. & Logan, M. A.: The determination of hydroxyproline. *J. Biol. Chem.*, **184**, 299-306 (1950).
- 27) 建部高明: 慢性肺炎の治療の基本的な考え方, 内科の立場から. 胆と膵, **4**, 861-865 (1983).
- 28) Diegelman, R. F. & Peterkofsky, B.: Inhibition of collagen secretion from bone and cultured fibroblasts by microtubular disruptive drugs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **69**, 892-896 (1972).
- 29) Ehrlich, H. P. & Bornstein, P.: Microtubules in transcellular movement of procollagen. *Nature New Biol.*, **238**, 257-260 (1972).
- 30) Ehrlich, H. P., Ross, R. & Bornstein, P.: Effects of antimicrotubular agents in the secretion of collagen. A biochemical and morphological study. *J. Cell Biol.*, **62**, 390-405 (1974).
- 31) Rojkind, M. & Kershenovich, D.: Effect of colchicine on collagen, albumine and transferrin synthesis by cirrhotic rat liver slices. *Biochim. Biophys. Acta.*, **378**, 415-423 (1974).
- 32) Kershenovich, D., Uribe, M., Suarez, G. I., Mata, M. J., Perez-Tamayo, R. & Rojkind, M.: Treatment of cirrhosis with colchicine. A double-blind randomized trial. *Gastroenterology*, **77**, 532-536 (1979).
- 33) Takeuchi, T. & Prockop, D. J.: Biosynthesis of abnormal collagens with amino-acid analogues. I, Incorporation of L-azetidine-2-carboxylic acid and cis-4-fluro-L-proline into procollagen and collagen. *Biochim. Biophys. Acta*, **175**, 142-155 (1969).
- 34) Takeuchi, T., Rosenbloom, J. & Prockop, D. J.: Biosynthesis of abnormal collagens with amino-acid analogues. II, Inability of cartilage cells to extrude collagen polypeptides containing L-azetidine-2-carboxylic acid or cis-4-fluro-L-proline. *Biochim. Biophys. Acta*, **175**, 156-164 (1969).
- 35) Uitto, J. & Prockop, D. J.: Incorporation of proline analogues into polypeptides. Effects on the production of extracellular procollagen and on the stability of the triplehelical structure of the molecule. *Biochim. Biophys. Acta*, **336**, 234-251 (1974).
- 36) Rojkind, M.: Inhibition of liver fibrosis by L-azetidine-2-carboxylic acid in rats treated with carbon tetrachloride. *J. Clin. Invest.*, **52**, 2451-2456 (1973).
- 37) Kershenovich, D. & Rojkind, M.: Effect of the administration of L-azetidine-2-carboxylic acid on albumine and transferrin biosynthesis by liver slices of rats treated with carbon tetrachloride. *Biochim. Biophys. Acta*, **319**, 216-222 (1973).
- 38) Gabbiani, G., Ryan, G. B. & Majno, G.: Presence of modified fibroblasts in granulation tissue and their possible role in wound contraction. *Experientia*, **27**, 549-550 (1971).
- 39) Adelstein, R. S., Conti, M. A., Johnson, G., Poston, I. & Pollard, T. D.: Isolation and characterization of myosin from cloned mouse fibroblast. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **60**, 3693-3697 (1972).
- 40) Gabbiani, G., Hirschel, B. J., Ryan, G. B., Statkov, P. R. & Majno, G.: Granulation tissue as a contractile organ. A study of structure and function. *J. Exp. Med.*, **135**, 719-734 (1972).
- 41) Gabbiani, G. & Montandon, D.: Reparative processes in mammalian wound healing. The role

of contractile phenomena. p187-219. In G. H. Bourne & J. F. Danielli (ed.), Academic Press, New York, San Francisco, 1977.

42) Hirschel, B. J., Gabbiani, G., Ryan, G. B. & Majno, G.: Fibroblasts of granulation tissue: Immunofluorescent staining with anti smooth muscle serum. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 138, 466-469 (1971).

43) Kapanci, Y., Assimacopoulos, A., Iil , C., Zwahlea, A. & Gabbiani, G.: "Contractile interstitial cells" in pulmonary alveolar septa: A possible regulator of ventilation/perfusion ratio? Ultrastructural immunofluorescence, and in vitro studies. I. cell Biol., 60, 375-392 (1972).

44) Ryan, G. B., Cliff, W. J., Gabbiani, G., Irl , C., Montandon, D., Statkov, P. R. & Majno, G.: Myofibroblasts in human granulation tissue. Human Pathol., 5, 55-67 (1974).

45) Penter, R. G., Sheetz, M. & Singer, S. J.: Detection and ultrastructural localization of human smooth muscle myosin-like molecules in human non-muscle cells by specific antibodies. Proc. Nat. Sci., 72, 1359-1363 (1975).

46) Majno, G., Gabbiani, G., Hirschel, B., Ryan, G. B. & Statkov, P. R.: Contraction of granula-

tion tissue in vitro. Similarity to smooth muscle. Science, 173, 548-550 (1971).

47) Rudolph, R., Guber, S., Suzuki, M. & Woodward, M.: The life cycle of the myofibroblast. Surg. Gynecol. Obstet., 145, 389-394 (1977).

48) 大井章史: 創傷治癒における線維芽細胞の超微細構造的変化. 十全医会誌, 91, 923-938 (1982).

49) Adler, K. B., Craighead, J. E., Vallyathan, N. V. & Evans, S. N.: Actin-containing cells in human pulmonary fibrosis. Am. J. Pathol., 102, 427-437 (1981).

50) Judd, P. A., Finnegan, P. & Curran, R. C.: Pulmonary sarcoidosis: A clinicopathological study. J. Pathol., 115, 191-198 (1974).

51) Buell, R., Wang, N. S., Seemayer, J. A. & Ahmed, M.: Endobronchial plasma cell granuloma. A light and electron microscopic study. Human Pathol., 7, 411-426 (1976).

52) Hruban, Z., Russel, R. H., Boter, J. L., Glagov, S. & Bagaheri, S. A.: Ultrastructural changes in livers of two patients with hypervitaminosis A. Am. J. Pathol., 76, 451-468 (1974).

53) Grimand, J. A. & Borojevic, R.: Myofibroblasts in hepatic schistosomal fibrosis. Experientia, 33, 890-892 (1977).

An Experimental Study on Inhibition of Pancreatic Fibrosis following Necrotizing Pancreatitis

Noriaki Sakata, Department of Surgery (II), School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa, 920 - J. Juzen Med. Soc., 94, 236-254 (1985)

Key words: pancreatic fibrosis, hydroxyproline, myofibroblast, necrotizing pancreatitis

Abstract

This study was designed to observe the chemical and morphological changes of fibrous proliferation in the pancreas following acute pancreatitis, and to search a possibility of inhibiting pancreatic fibrosis. Experimental necrotizing pancreatitis was produced by a freezing procedure in the splenic segment of the pancreas of male Wister rats. After the freezing procedure, the rats were divided into 2 groups: control group had no additional procedure, and the other group received daily an intraperitoneal administration of colchicine or L-azetidine-2-carboxylic acid (AZC) as antifibrotic substances. Hydroxyproline levels of the frozen areas in the pancreas were determined during the course of time, and histological changes in the pancreas were examined by light and electron microscopies. The pancreas which received the freezing procedure revealed necrosis in the early stage and subsequent fibrous proliferation. In the rats administered with the antifibrotic substances, hydroxyproline levels in the pancreatic tissue were significantly lower

than the control level during 2 to 4 weeks after the freezing procedure ($p < 0.01$), and the inhibitory effect on fibrous proliferation was histologically noted. Electron microscopic examinations revealed the following changes. In the control group, fibroblasts resided in the surrounding region or inside necrosis actively proliferated and produced a lot of collagen fibers. Furthermore, inversion from fibroblasts to fatty cells was observed. On the other hand, in the rats administered with antifibrotic substances, the myofibroblasts presumably transformed from fibroblasts were obviously seen in the necrotic region. The above results indicate a close relationship between pancreatic fibrosis and activity of fibroblasts, and simultaneously suggest that the inhibition of fibrosis following an administration of antifibrotic substances was brought about by the appearance of myofibroblasts.