

腓りポ蛋白分画の能動免疫によるイヌ腓障害作成の こころみ

| | |
|-------|---|
| 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/2297/8912 |

膵リポ蛋白分画の能動免疫によるイヌ膵障害作成のこころみ

富山県立中央病院・内科

広瀬 昭一郎

石川郡中央病院・内科

中島 真

(昭和56年4月8日受付)

Key words Autoantibody, Lipoprotein, Pancreatic injury

慢性膵炎の成因にはアルコール飲用、胆石症などがあげられているが、成因不明のものも20～40%あり¹⁾²⁾、その成因として自己免疫機序も想定されている³⁾。慢性膵炎の患者血清中に抗膵抗体が高率に見出される事実⁴⁾⁷⁾もその推測を支持する。しかし、これまでに膵抗原を能動的に免疫して動物に膵外分泌腺の障害を作った報告は、われわれの知るところでは存在しない。そこで著者らは異種・同種の膵不溶性リポ蛋白の可溶化分画を抗原としてイヌを長期間免疫し、何らかの膵病変を作り得ないか検討した。その結果、膵組織へのリンパ球浸潤のような炎症性病変は生成しなかったが、酵素原顆粒の減少や消失に表現された膵腺細胞の軽い変性、および血清アミラーゼ活性の変動を認めたので報告する。

材料および方法

1. 膵の不溶性リポ蛋白分画の抽出

新鮮なウシ膵臓を屠殺場より入手した。新鮮なイヌ膵臓は当科において他の急性実験に用いられたイヌより得た。これらの膵臓は使用するまで-40℃に凍結保存した。膵の不溶性リポ蛋白分画(LP)はSmithら⁸⁾の方法の変法によって抽出した。通常、500gmの膵組織から作業を開始し、100～120gm(湿量)のLPを得た。約20gmのLPに0.2%デオキシコール酸ナトリウム液100mlを加えてホモジナイズし、さらに水室内でマグネチックスターラーにより一夜攪拌した。翌朝

9,000rpm30分間冷凍遠心後、上清をとり、この上清の容量の10倍容量の冷アセトンを加え、-20℃に一夜おき、生じた白色沈澱(LP sol)を3,000rpm15分間遠心して集めた。20gmのLPから出発して得られたLP solに5～10mlの生理的食塩水を加えホモジナイズすると蛋白濃度13～40mg/mlの液がえられた。蛋白定量はLowryら⁹⁾の方法によった。

2. イヌの免疫

A, B, C, 3群の雑種成犬を準備した。A群は8頭からなり、これらの前記の方法で準備したウシ膵LP solの30～50mg蛋白を含む液2～3ml、と同量のFreund完全アジュバント(Iatron製)をエムulsionとしてイヌの肩甲骨下へ筋注した。この注射は2週ごとに5回、ついで4週ごとに行なった。総計、2頭のイヌでは6回、5頭で9回、1頭で15回免疫注射を行なった。

B群は3頭からなり、これらにイヌ膵を材料として前記の方法で作成したLP solを筋注した。注射の間隔はA群と同じであり、投与の回数は2頭において9回、1頭では10回であった。

C群5頭を対照とした。この群では生理的食塩水-アジュバント・エムulsionをAやB群と同じ間隔で筋注した。投与回数は4頭で8回、1頭で11回であった。

3. 血中抗体の検出および血清アミラーゼ活性の測定。

毎回の膵LP solまたは対照エムulsionの注射直

Attempt to Produce Pancreatic Injury in the Dog by Active Immunization with Lipoprotein Fraction of Bovine and Canine Pancreas. Shoichiro Hirose, Department of Internal Medicine, Toyama Prefectural Central Hospital, Toyama. Shin Nakajima, Department of Internal Medicine, Ishikawa-gun Central Hospital, Matsuto.

前に5~8 ml採血して血清を分離した。この血清について、ウシまたはイヌの膵 LP sol を抗原として Ouchterlony 法¹⁰⁾により抗体を検索し、一方 Caraway 法¹¹⁾によりアマラーゼ活性を測定した。

4. 膵組織の蛍光抗体法による検索。

最終の免疫注射の7~14日後にイヌをペントバルビタールにより麻酔し、大腿動脈から採血しながら出血死させた。この間に開腹して膵の一部を摘出し、ドライアイスとアセトンの混合液により-80℃に冷却した無水エタノールへ浸して瞬間に凍結させてから引き出し、-40℃に保存した。12日以内にクリオスタットで凍結切片を作製した。

間接蛍光抗体法には膵切片を A または B 群のイヌ血清を磷酸緩衝生食水 (pH 7.2) により8倍に希釈した液によって約2時間被い、ついで FITC (fluorescein isothiocyanate) 標識抗イヌγグロブリン家兎血清グロブリン (Miles Lab., Illinois, U. S. A.) により30~60分間染色した。これらの操作は37℃の温室で行なった。

なお、対照にはアジュバンド対照 C 群のイヌ血清を用い染色した。

直接蛍光抗体法には Riggs ら¹²⁾の方法により A 群のイヌのγグロブリンを FITC により標識しついで精製したものを用い、ウシまたはイヌ膵のクリオスタット切片を37℃の温室で60~120分間染色した。なお、C 群のイヌγグロブリンを同様に標識し、対照染色標本を作成した。

5. 組織学的検索

膵の左葉と右葉、肝、腎、脾、胃、小腸、心、肺、唾液腺の一部を10%ホルマリンにより固定し、パラフィン切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジンおよびアザン染色を行なった。

成 績

1. 血中抗体の証明。

膵抗原分画 (LP sol) に対する抗体の出現をまず Ouchterlony 法により検討した。A 群のイヌ8頭ではウシ膵の投与を開始した2週後から沈降抗体が陽性となり(図1)、これは最終免疫後まで継続した(表1)。C 群(対照)の5頭では、ウシ膵 LP sol に対する沈降抗体はどの時期にも出現しなかった。B 群の3頭ではイヌ膵 LP sol に対する沈降抗体は Ouchterlony 法では証明できなかった。

FITC で標識した A 群のイヌγグロブリンによってウシ膵のクリオスタット切片を染色すると、膵腺細胞の apical portion (核上部) に蛍光が強く、腺細胞核・Langerhans 島細胞・膵間質には蛍光はみとめられなかった(図2)。対照の C 群のイヌ血清からγグロブリンを分離し同様に操作したが、原形質全般の弱い非特異的蛍光のみみられたのみであった。

2. 間接蛍光抗体法の染色所見。

ウシ膵 LP sol によって免疫した A 群のイヌ膵クリオスタット切片を自己血清で被い、ついで FITC 標識抗イヌγグロブリン家兎血清グロブリンで染色すると

Table 1. Serum Precipitin to Bovine Pancreas LP sol

| Week Dog NO | 0 | 2 | 4 | 6 | 8 | 10 | 12 | 16 | 20 | 24 |
|----------------|---|---|-----|-----|----|----|-----|-----|----|--------|
| 73- 1 | | 4 | 16 | >32 | 16 | | | 32 | 8 | 8 + |
| 73- 2 | | 8 | 16 | 16 | | | 32 | >32 | 8 | 16 + |
| 73- 5 | | 8 | 4 | 16 | 16 | 8 | | 16 | 32 | 16 + |
| 73-14 | | 4 | 16 | 16 | | | 32 | >32 | 16 | + |
| 74- 1 | | 2 | | 16 | 8 | 16 | | 16 | 16 | 8 16 + |
| 74- 2 | | 8 | >32 | 16 | 16 | | 16 | >32 | 16 | 8 + |
| 74- 7 | | 2 | 32 | 16 | | | >32 | | | + |
| 74- 8 | | 8 | 16 | 16 | | | >32 | | | + |

Maximal dilution number of canine serum is shown during the course of immunization with bovine pancreas LP sol. The dog 73-1 was sacrificed at 48 weeks. Others were sacrificed as indicated in the table.

+ denotes sacrifice.

膵腺細胞の原形質全般に蛍光があり、また腺細胞の apical portion の蛍光がより強かった (図3)。自己血清のかわりに C 群のイヌ血清で被った対照切片では蛍光は全般に微弱であった。

同種豚の LP sol で免疫した B 群 2 頭の膵凍結切片を自己血清で被い、ついで FITC 標識抗イヌγグロブリン家兎血清グロブリンで染色したところ、膵腺細胞の apical portion の蛍光が強かった (図4)。この蛍光は C 群のイヌ血清を用いた対照切片より強かった。

対照 C 群 5 頭の膵を自己血清で被い、FITC 標識抗イヌγグロブリン家兎血清グロブリンで処理した場合、膵腺細胞は微弱な蛍光を呈したに過ぎない。

3. 肉眼および光学顕微鏡所見.

肉眼的には A・B・C 各群の膵に異常をみとめなかった。ヘマトキシリン・エオジンまたはアザン染色標本の検鏡では各群の膵に実質壊死・細胞浸潤・線維化はみられず、従って急性や慢性の膵炎は発生していなかった。しかし、豚 LP sol によって免疫したイヌではしばしば腺細胞の酵素原顆粒が減少あるいは消失した部が巣状に出現した (図5.6)。対照群においても同様の部は多少はみとめられたので以下のような計測を行った。すなわち、1 頭のイヌにつき豚左葉より 1 カ所、右葉より 1~2 個所組織標本を作成し、1 枚の組織標本では 10 個の $617\mu \times 450\mu$ の区画の中の、

- a. 酵素原顆粒の数がほぼ正常、
- b. 酵素原顆粒の数がかなり減少し、1 個の細胞内に 5~10 個しか存在しない、

- c. 酵素原顆粒が全く存在しないか、1~4 個のみ存在する。

の各項目に属する細胞数を無作為に計数し表2に示した。その結果、上記の区画内の腺細胞総数 (a・b・c の各項目に属する細胞数の和) は A, B, C 各群の間で有意差はなかった。しかし、ウシやイヌ豚 LP sol 投与群では対照群に比して酵素原顆粒の減少した細胞 (b), あるいはほとんど消失した細胞 (c) が明らかに多く (それぞれ, $P < 0.001$)、酵素原顆粒数が正常と思われる細胞 (a) は明らかに少なかった ($P < 0.001$, 表2)。ウシ豚 LP sol 投与群とイヌ豚 LP sol 投与群との比較では、後者の方が酵素原顆粒の減少した細胞 (b) が多く ($P < 0.001$)、また酵素原顆粒の殆んど消失した細胞 (c) も多かった ($P < 0.05$, 表2)。

膵以外の臓器の肉眼検査では、ウシやイヌ豚 LP sol 免疫および対照の各群に多少とも脾腫大がみとめられた。ウシ豚 LP sol 投与の 2 頭では肺に米粒大の褐色結節が散在してみとめられた。肝・腎・心・胃・小腸には肉眼では異常がみられなかった。組織学的検索では豚 LP sol 投与群の全例および対照群 5 例中の 4 例において肝および肺に肉芽腫をみとめた。腎・心・胃・小腸・唾液腺には組織学的には異常をみとめなかった。

4. 血清アミラーゼ活性の推移.

免疫開始後 6 カ月間はウシ豚 LP sol 投与群の血清アミラーゼ活性は対照群のそれに比して高い傾向がみられた (図7)。ウシ豚 LP sol 投与群において、血清

Table 2. Number of Pancreatic Acinar Cells and Density of Zymogen Granule in the Cell

| Antigen Given | Bovine Pancreas LP sol | Canine Pancreas LP sol | Normal saline (control) |
|---|---------------------------|---------------------------|----------------------------|
| Number of Dogs | 8 | 3 | 5 |
| Number of Specimens Examined | 21 | 8 | 15 |
| Number of Acinar Cells (Mean \pm Standard Deviation) | | | |
| a. Acinar cells which contain numerous ZG | 48 \pm 9*** | 44 \pm 7*** | 66 \pm 7 |
| b. Acinar cells which contain 5-10 ZG | 9 \pm 2*** | 13 \pm 1*** | 5 \pm 1 |
| c. Acinar cells which contain 0-4 ZG | 24 \pm 6*** | 30 \pm 10*** | 8 \pm 3 |
| d. Total of numbers a, b and c | 78 \pm 6# | 87 \pm 12# | 79 \pm 7 |

Number of cells was counted in the area of $617 \times 450\mu$.

Level of significance in statistical evaluation compared to control; ***: $p < 0.001$.

#: not significant.

ZG: zymogen granules

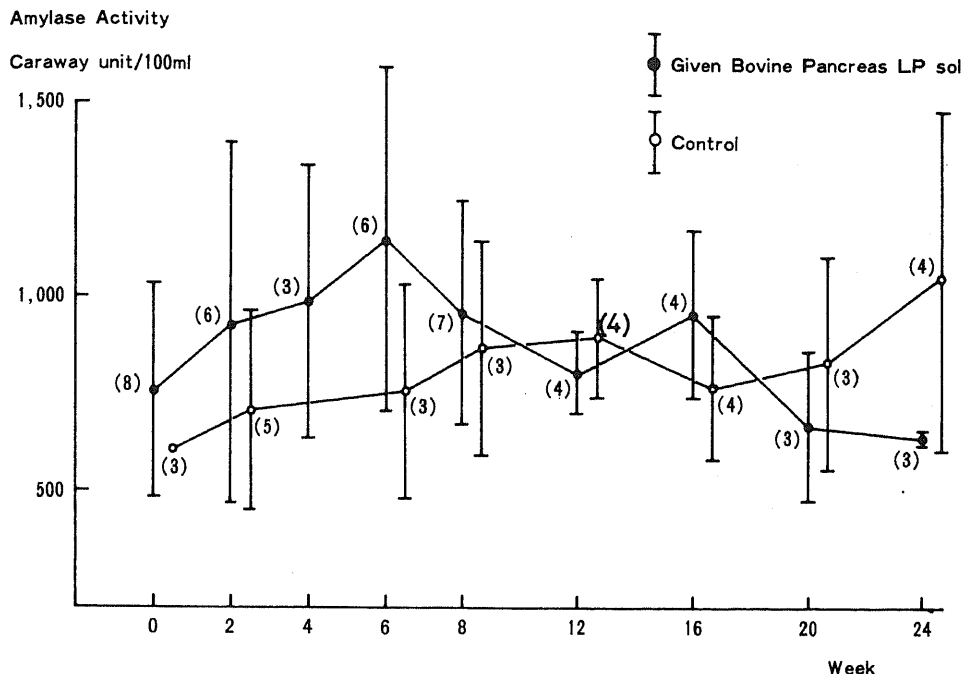


Fig. 7. Serum amylase activity. Serum amylase activity of dogs which were given bovine pancreas LP sol tended to be higher than that of control dogs during 6 weeks period after beginning of immunization, although the difference of those amylase activities was statistically not significant.

Table 3. Serum Amylase Activity before and after Immunization with Bovine Pancreas LP sol

| Dog NO | Before Immunization | Maximal Value in the 6 months' course of immunization |
|--------|---------------------|---|
| 73- 1 | 690 | 1526 |
| 73- 2 | 1130 | 1702 |
| 73- 5 | 838 | 1414 |
| 73-14 | 1195 | 1480 |
| 74- 1 | 540 | 976 |
| 74- 2 | 520 | 1046 |
| 74- 7 | 700 | 1390 |
| 74- 8 | 480 | 804 |
| Mean | 762 | 1292 |

Amylase activity was assayed in Caraway Unit. Difference of the mean values before and after immunization is statistically significant ($P < 0.001$).

アミラーゼ活性の LP sol 投与前値と投与後 6 カ月間の最高値を対として推計学的に検討すると、投与後の値が明らかに高かった ($P < 0.001$, 表 3)。

考 察

成因不明の慢性膵炎の発病機序、あるいはアルコールによる膵炎がアルコール飲用中止後も進行する機序として、自己免疫が関与する可能性が考えられる³⁾。慢性膵炎患者の血清中に抗膵抗体が高頻度に出現することは、それを支持している。^{5)~7)}。しかし動物実験で自己免疫によって慢性膵炎を作ることは、われわれの知るところでは従来成功していない。Thal⁵⁾はイヌ・家兎・アヒル・鶏をそれぞれ同種の膵と Freund adjuvant によって免疫し、さらにブドウ球菌毒素を膵へ反復注射し、12~18 カ月後に膵に高度の線維化を見出したが、この方法では細菌毒素の局所注射を併用している点から自己免疫的背景はうすい。Rose ら¹³⁾は家兎を同種膵の抽出物で、Metzgar¹⁴⁾は家兎と Rhesus サルを同種の膵によって免疫し抗体をえたが、免疫した動物の膵には何ら病変をみとめなかったと報告している。これらの成績は膵組織の生理的食塩水または

燐酸緩衝液による抽出物をそのまま抗原としており、抗原特異性が乏しく、従って生じた抗膵抗体の力価も低く膵に病変が生じなかったとも考えられる。近年、組織抗原はしばしば細胞膜、糸粒体膜、微絨毛、酵素原顆粒膜など膜系に存在することが知られて来¹⁵⁾¹⁶⁾また同種あるいは異種の細胞膜系抗原によって動物を免疫し、甲状腺¹⁷⁾・唾液腺¹⁸⁾・腎臓¹⁹⁾に容易に炎症を惹起しえることが報告されている。そこで筆者らは膵臓においてもこのような方法を用いて炎症を惹起しうる可能性があるものと考え、今回の実験を行なった。その結果ウシ膵の細胞膜リポ蛋白成分の可溶化分画(LP sol)を抗原としてイヌを免疫すると、2週後から屠殺時まで血中にその抗原に対する沈降抗体がみとめられた。この抗血清でウシ膵組織を免疫蛍光法(直接法)によって染色すると、腺細胞のapical portionがよく染色された。抗原(LP sol)は膵の不溶成分を可溶化したものであり、消化酵素のような可溶成分はほとんど含まれないにもかかわらず上記のような成績となったことは、抗体が細胞膜系、ことに細胞膜と連続性のある酵素原顆粒膜に対応するものであることを意味すると思われる。Mihara¹⁶⁾も家兎をイヌ膵の酵素原顆粒膜によって免疫し、それに対する抗体の存在をOuchterlony法で示し、酵素原顆粒膜は抗原になりうると述べ、またその抗体は家兎、ラット、モルモットなどの哺乳類の膵ホモジネートと交叉反応したと報告している。筆者らのウシ膵LP solにより免疫したイヌにおいて自己血清を用いて膵を免疫蛍光染色(間接法)を行うと、膵細胞質のび慢性的な蛍光が対照よりも強く、また腺細胞のapical portionの蛍光がより著しかった。この所見からイヌの抗ウシ膵抗体は自己膵に対しても交叉反応性を有し、従ってイヌ膵に障害が惹起される可能性がある。しかしウシ膵には膵炎を示唆する実質細胞の壊死、細胞浸潤、線維化はみとめられなかった。血中抗体の出現が臓器障害と平行しないのはしばしばみとめられることであり¹³⁾¹⁴⁾、著者らの場合ウシ膵への抗体とイヌ膵との交叉反応が比較的弱く充分量の抗体がイヌ膵と反応しなかったか、あるいは抗原抗体反応の場へ補体が結合しなかったものと思われる。イヌを同種の膵LP solで免疫した場合も血中にイヌ膵と反応する抗体を蛍光抗体法(間接法)で検出したが、組織学的検査では慢性膵炎の変化はみられなかった。ウシおよびイヌ膵のLP solのどちらを投与した場合にも間質への細胞浸潤はみとめられなかった。以上のようにわれわれの実験ではイヌの血中に自己膵と反応する抗体が存在したが、慢性膵炎に相当する組織変化は生成せず、従ってヒトの慢性膵炎が患

者の血中の抗膵抗体によって惹起されるという説を支持することは困難と思われる。

著者らの実験においてウシ膵LP solで免疫したイヌの膵において酵素原顆粒が減少または消失した腺細胞が多かったことは、ウシ膵LP solへの抗体がin vivoにおいても軽度ながら自己膵の酵素原顆粒膜と反応し障害したことを示唆する。ウシ膵LP solで免疫を開始した後イヌの血清アマラーゼが上昇したことも、酵素原顆粒膜の障害により消化酵素が血中へ逸脱したものと説明がつきそうである。イヌを同種の膵LP solで免疫した場合においても、酵素原顆粒の減少あるいは消失した膵腺細胞は対照群やウシ膵LP sol投与群に比して多かった。この場合イヌの血清中に自己膵と反応する抗体が蛍光抗体法で見出されているので、この自己抗体がin vivoにおいて膵腺細胞の酵素原顆粒膜を障害したものと思われる。このような膵腺細胞の酵素原顆粒の減少や消失はヒトの慢性膵炎においてもみとめられている²⁰⁾が、もちろん慢性膵炎の他の組織変化を伴っており、われわれの今回の成績のように膵腺細胞の酵素原顆粒の減少や消失のみがみとめられる場合は膵炎ではなく一種の変性反応とみなされるべきと思われる。

結 論

雑種成犬8頭をウシ膵の、3頭をイヌ膵の不溶性リポ蛋白の可溶化分画(LP sol)により反復免疫し、生ずる抗膵抗体により慢性膵炎の生成を期待した。

- 1). ウシ膵LP solで免疫したイヌでは免疫開始後2週から血中の沈降抗体が陽性となり、最終免疫後まで継続した。イヌ膵LP solにより免疫したイヌでは沈降抗体はOuchterlony法では証明できなかった。
- 2). ウシ膵LP solによって免疫したイヌのγグロブリンをFITCにより標識し、ウシ膵の凍結切片を染色すると腺細胞のapical portionに強い蛍光がみられた。ウシ膵またはイヌ膵のLP solによって免疫したイヌの膵切片をそれぞれの自己血清を用いて間接蛍光抗体法により染色すると、腺細胞の原形質全般あるいはapical portionに蛍光がみとめられた。これらの成績から膵LP solによって免疫し生成した抗体は腺細胞の酵素原顆粒膜を中心とした細胞内膜系と反応していると考えられた。
- 3). ウシまたはイヌ膵のLP solによって免疫した膵のヘマトキシリン・エオジン染色標本には壊死・細胞浸潤・線維化など、急性や慢性膵炎の所見はなかった。しかし、酵素原顆粒の減少あるいは消失した細胞は対照より明らかに多く、これは抗膵LP sol抗体が

酵素原顆粒膜を障害したことによると思われた。以上のように抗膵抗体によって慢性膵炎は惹起しえなかったが、酵素原顆粒の障害はひとめられた。

稿を終るに臨み、御指導を賜りました恩師東京医科歯科大学第二内科武内重五郎教授ならびに金沢大学第一内科服部信教授に感謝致します。さらに、終始御懇切なる指導を載いた金沢大学癌研究所倉田自章教授ならびに岡田収司助教授に深甚の謝意を表します。

文 献

- 1) 佐藤寿雄: 慢性膵炎調査報告(全国集計), 厚生省特定疾患, 慢性膵炎調査研究班昭和49年度業績, p.51 ~ 55
- 2) Amman, R. W., Hammer, B. & Fumagalli, I. : Chronic pancreatitis in Zurich. 1963 - 1972. *Digestion*, **9**, 404 - 415(1973).
- 3) 石井兼央: 特発性慢性膵炎. *日臨*, **36**, 2220 - 2221(1978).
- 4) Thal, A. P., Murray, M. J. & Egner, W. : Isoantibody formation in chronic pancreatic disease. *Lancet*, **I**, 1128 - 1129(1959).
- 5) Thal, A. P. : The occurrence of pancreatic antibodies and the nature of the pancreatic antigen. *Surg. Forum*, **11**, 367 - 369(1960).
- 6) Murray, M. J., & Thal, A. P. : The clinical significance of circulating pancreatic antibodies. *Ann. Intern. Med.*, **53**, 548 - 555(1960).
- 7) Fonkalsrud, E. W. & Longmire, W. P. Jr. : The occurrence of pancreatic antibodies and the experimental production of pancreatitis with pancreatic antiserum. *Surgery*, **50**, 134 - 142(1961).
- 8) Smith, J. T., Funckes, A. J., Barak, A. J. & Thomas, L. E. : Cellular lipoproteins, I. The insoluble lipoprotein of whole liver cells. *Exp. Cell Res.*, **13**, 96 - 102(1957).
- 9) Lowry, O. H., Rosenbrough, N. J., Farr, A. L. & Randall, R. J. : Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 265(1951).
- 10) Ouchterlony, O. : *Progr. Allergy*, **1** - 78, Karger, Basel, New York, 1958.
- 11) Caraway, W. T. : A stable starch substrate for the determination of amylase in serum and other body fluids. *Am. J. Clin. Pathol.*, **32**, 97 - 99(1959).
- 12) Riggs, J. L., Seiwald, R. J., Burckhalter, J. H., Downs, C. M. & Metcalf, T. G. : Isothiocyanate compounds as fluorescent labeling agents for immune serum. *Am. J. Pathol.*, **34**, 1081 - 1097(1958).
- 13) Rose, N. R., Metzgar, R. S. & Witebsky, E. : Studies on organ specificity. XI. Isoantigens of rabbit pancreas. *J. Immunol.*, **85**, 575 - 587(1960).
- 14) Metzgar, R. S. : Immunologic studies of pancreas-specific isoantigens. *J. Immunol.*, **93**, 176 - 182(1964).
- 15) Whittingham, S. & Mackay, I. R. : Tissue antigens : autoantigens, alloantigens, xenoantigens and neoantigens. *Aust. N. J. Med.*, **7**, 172 - 194(1977).
- 16) Mihas, A. A., Gibson, R. G., Hirschowitz, B. I., & Ostroy, F. : Antigenic properties of subcellular fractions from canine pancreas : Development of a zymogen membrane specific antibody. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **150**, 618 - 621(1975).
- 17) 岡田収司: 甲状腺細胞質膜系抗原の免疫学的研究. *金沢大結核研年報*, **24**, 227 - 243(1967).
- 18) 渡辺幸夫: 唾液腺の組織特異抗原に関する研究. *金沢大がん研年報*, **2**, 1 - 16(1968).
- 19) Shibata, S., Nagasawa, T., Miyakawa, Y. & Naruse, T. : Nephritogenic glycoprotein. *J. Immunol.*, **106**, 1284 - 1294(1971).
- 20) Martin, E. D. : Analysis of the individual lesions in 180 cases of pancreatic disease. *Bibl. Gastroenterol.*, **7**, 158 - 178(1965).

Attempt to Produce Pancreatic Injury in the Dog by Active Immunization with Lipoprotein Fraction of Bovine and Canine Pancreas Shoichiro Hirose, Department of Internal Medicine, Toyama Prefectural Central Hospital, Toyama, 930 Shin Nakajima, Department of Internal Medicine, Ishikawa-gun Central Hospital, Matsuto, 924 School of Medicine, Kanazawa University Kanazawa, 920 — *J. Jusen Med. Soc.*, **90**, 438–447 (1981)

Key words: Autoantibody, Lipoprotein, Pancreatic injury

Abstract

Occurrence of autoantibody to the pancreas has been reported in sera of patients with chronic pancreatitis. We made an attempt to see whether chronic pancreatitis could be experimentally produced in the dog by inducing pancreatic antibody in the serum or not.

Insoluble lipoprotein (LP) fraction of bovine or canine pancreas was solubilized in deoxycholate solution (LP sol). Eight and three mongrel dogs were immunized with bovine and canine pancreas LP sol, respectively.

Dogs which were given bovine pancreas LP sol developed serum precipitin to the antigen. In dogs which were given canine pancreas LP sol serum precipitin could not be shown by the gel diffusion method. When frozen section of bovine pancreas was stained with fluorescein isothiocyanate (FITC) conjugated γ -globulin of dogs which were immunized with bovine pancreas LP sol, bright fluorescence was seen in the apical portion of acini. After 3 to 6 months' immunization with bovine or canine pancreas LP sol dogs were sacrificed. Frozen sections of pancreata of those dogs were covered with their own sera, and then stained with an anti-dog, anti-serum globulin of rabbit origin conjugated with FITC. In the dogs given bovine pancreatic LP sol fluorescence was seen diffusely over the pancreatic acini and, often, it was bright in the apical portions of the acini. In those dogs which were given canine pancreas LP sol fluorescence was bright in apical portions of acini. Histologic examinations of hematoxylin-eosin stained sections of the pancreata of both groups of dogs did not reveal necrosis, fibrosis nor infiltration with inflammatory cells. However, zymogen granules decreased or disappeared in a significantly larger number of acinar cells in the pancreas of dogs which were immunized with bovine or canine pancreas LP sol compared with the pancreas of the control dogs.

Thus far, it would be concluded that presence of autoantibody to the pancreas as shown by the gel diffusion method and immunohistochemical reactions did not induce chronic pancreatitis in the dog, but it decreased zymogen granules in acini of the pancreas.

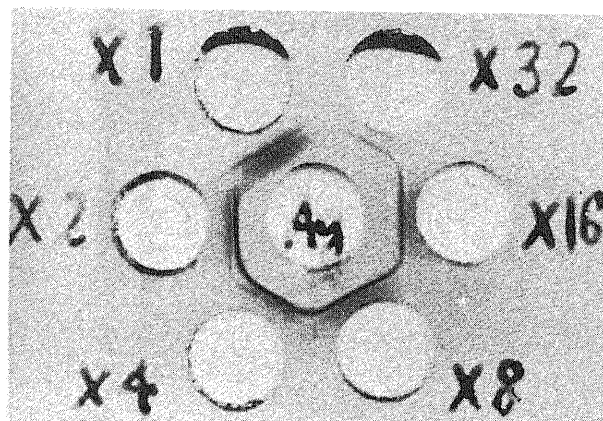


Fig. 1. Reactions of bovine pancreas LP sol and canine antiserum to the antigen by the Ouchterlony technique. Protein concentration of the antigen in the center well is about 1 mg/ml. Antiserum in peripheral wells was diluted as indicated by numbers.

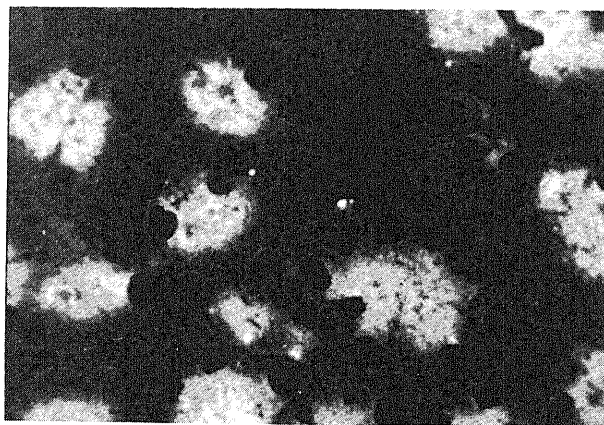


Fig. 2. Immunofluorescent staining of bovine pancreas frozen section with FITC conjugated γ -globulin of a dog (73-5) which was immunized with bovine pancreas LP sol. Strong fluorescence is seen in the apical portion of acini ($\times 400$).

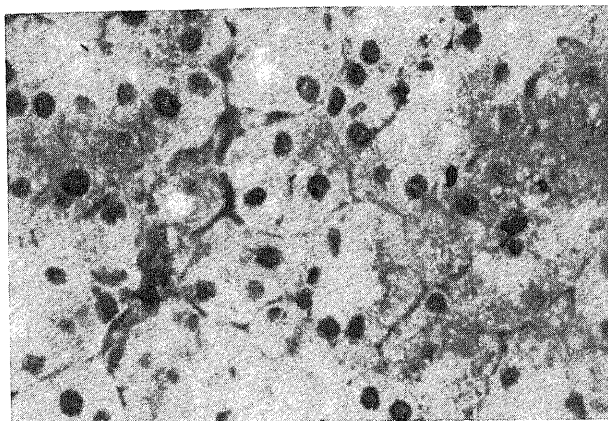


Fig. 3. Immunofluorescent staining of pancreas section of a dog (73-5) with its own serum and FITC-conjugated, anti-dog, anti-serum globulin of rabbit origin. The dog was immunized with bovine pancreas LP sol. Diffuse fluorescence appeared over the acini. Apical portions of some acini have stronger fluorescence ($\times 400$).

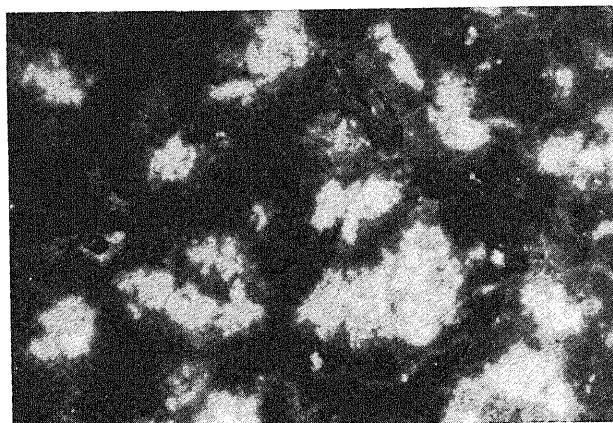


Fig. 4. Pancreas section of a dog stained with its own serum and FITC-conjugated, anti-dog, anti-serum globulin of rabbit origin. The dog was immunized with canine pancreas LP sol. Strong fluorescence appeared in the apical portion of the acini ($\times 400$).

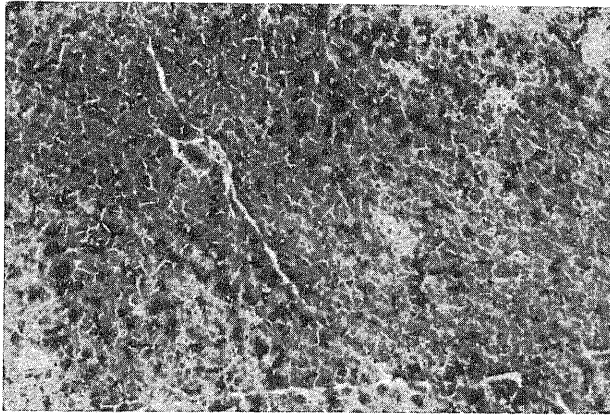


Fig. 5. Pancreas of a dog (74-8) which was immunized six times with bovine pancreas LP sol (containing 13-40 mg of protein) for 3 months. Zymogen granules (black dots) are reduced irregularly (hematoxylin-eosin stain, $\times 100$).

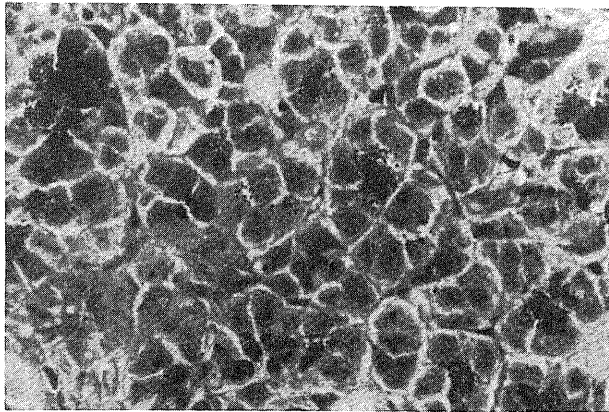


Fig. 6. Pancreas section of a dog (73-2) which was immunized 9 times with bovine pancreas LP sol (containing 30-60 mg of protein) for 6 months. There are numerous cells which have not at all or only a few zymogen granules (black dots, hematoxylin-eosin stain, $\times 400$).