

膵蛋白合成阻害に関する実験的研究：
急性膵炎の治療および膵酵素に由来する膵手術合併
症の予防

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/2297/8808

膵蛋白合成阻害に関する実験的研究

—急性膵炎の治療および膵酵素に由来する膵手術合併症の予防—

金沢大学医学部第2外科学教室 (主任:宮崎逸夫教授)

新 村 康 二

(昭和54年11月29日受付)

急性膵炎の成因に関しては、現在まで多数の研究が報告されているが、いまだ完全には解明されていない。しかし、急性膵炎時には、膵外分泌酵素に基づく自己消化作用により膵実質の出血や壊死が起こり、逸脱した酵素や産生された活性物質が血行性、リンパ行性に全身に広がり、あるいは神経系を刺激して全身症状を表わすという事実は一般に認められている。

一方、膵手術における膵瘻形成、膵腸吻合部の縫合不全および膵炎などは、しばしばみられる術後合併症である。膵手術においては、乳頭浮腫やOddi括約筋の痙攣¹⁾を招いて膵液流出を障害し、神経刺激あるいは血流障害にて膵の阻血を招き²⁾、これらの合併症発生が助長される。また、術後早期の内因性trypsininhibitorの低下は、膵自己消化に対する組織の抵抗性を減弱させることから、膵炎発生の一因となる¹⁾と考えられている。これらの膵手術後合併症の発生や進展に対し、膵外分泌酵素が重要な働きをしていることはいうまでもない。

ところで、膵外分泌腺細胞の蛋白合成機構、あるいは合成された酵素の分泌能に関し、各種の薬剤を用いた実験的研究が行われている。1969年、Martinら³⁾は5-Fluorouracilをラットに投与し、膵外分泌腺細胞における蛋白合成阻害とその分泌抑制を認めたが、この様な研究から1973年、Johanson⁴⁾らは犬を用いて実験的膵炎を作成し、5-Fluorouracil投与による治療効果を報告した。著者は、膵外分泌酵素合成阻害を一過性に生じせしめることにより、膵炎の治療ならびに膵手術後合併症の予防を行うという観点から、実

験的研究を実施した。

材料および方法

I 材料

1. 動物

食餌による影響を除くため3日間絶食した雄の呑電ラット180～300g体重のものを使用した。各実験においては同程度の体重のものを実験に供した。

2. 蛋白合成阻害剤

膵蛋白(酵素)合成阻害を生ぜしめる目的で、RNAおよび蛋白の合成阻害をもたらす可能性のある薬剤を用いた。すなわち、5-Fluorouracil 10～30mg/kg体重、Methotrexate 0.4mg/kg体重、Actinomycin D 0.025mg/kg体重、Daunomycin 1.5mg/kg体重およびVincristine 0.25mg/kg体重をそれぞれ生理的食塩水(以下生食水と略)で0.6mlに希釈したものを1日1回の投与量とした。

II 方法

1. 蛋白合成阻害剤の検討

ラットに上記の各薬剤を投与し、膵蛋白合成阻害効果を検討した。対照群のラットには生食水0.6mlを、実験群のラットには各種薬剤前記量を3日間、腹腔内に投与した。なお、5-Fluorouracilは10～30mg/kg体重を投与した。各群とも3日目の生食水または薬剤投与後、1時間目に標識アミノ酸を尾静脈内に注射し、以下の如き方法により各種薬剤の膵蛋白合成阻害効果を検討した。

1) 標識アミノ酸の膵への取込みの測定

Experimental Studies on Inhibition of Pancreatic Protein Synthesis —Treatment of Acute Pancreatitis and Prevention of Postoperative Pancreatic Complications Caused by Pancreatic enzymes—**Koji Shinmura** Department of Surgery II, (Director: Prof. I. Miyazaki) School of Medicine, Kanazawa University.

標識アミノ酸としては⁷⁵Se-Selenomethionine および DL-Leucine - 4,5 - H³ (以下³H - Leucine と略) を用いた。⁷⁵Se - Selenomethionine 0.025 μ Ci / g 体重および³H - Leucine 0.1 μ Ci / g 体重をラット尾静脈より注射し、注射後1時間目にエーテル麻酔下で睪を剔出し、睪に取込まれた放射能を測定した。⁷⁵Se - Selenomethionine を使用した場合は、Well type シンチレーションカウンターにて 280keV \pm 10% の範囲で測定し、剔出睪 1g 当りに換算した。³H - Leucine を使用した場合は、生食水にて睪血管灌流を行った後睪を剔出し、0.01M Tri-Hcl buffer (PH7.0) 4 ml を加えホモジネートし、10% TCA (三塩化酢酸) を最終濃度 5% となるように混じて濾過し、TCA 可溶分画と不溶分画とに分離し、それぞれ液体シンチレーションカウンターにて放射能を測定した。なお、シンチレーターは Toluene 700 ml, POPOP 0.1g, DOP 4g, Triton 100 の 300 ml を混じたものを使用した。また、放射能は睪 1g 当りに換算し検討した。

2) Autoradiography による検討

³H - Leucine および L - Methionine - H³ (G) (以下³H - Methionine と略) を用いて Autoradiogram を作製⁹し、外分泌細胞銀粒子を測定して検討した。³H - Leucine および³H - Methionine 1 μ Ci / g 体重を尾静脈より注射し、1時間後にエーテル麻酔下で睪を剔出した。剔出睪を直ちに 10% フォルマリンで固定し、4 μ にて切出した。各切片はディッピング法で乳剤 (Sakura NR - M₂) を塗布、乾燥した後、密封包装で 4~6 週にわたり 4℃ の冷蔵庫内で露出した。標本を現像処理後 Hematoxylin - Eosin (H - E) 染色にて後染色を行い検鏡した。

3) 組織学的検討

対照群および各種薬剤投与群の剔出睪をパラフィン包埋し、4~7 μ に切出して H - E 染色を行い、組織学的検討を行った。

2. 実験的急性睪炎に対する蛋白合成阻害の効果

ラットを無処置群と 5 - Fluorouracil 投与群の 2 群に分け、無処置群には生食水 0.6 ml を、5 - Fluorouracil 投与群には 5 - Fluorouracil 15 mg / kg 体重を前記実験と同様に投与し、3 日目の投与後 1 時間目に以下の如き方法で実験的急性睪炎を作製し、無処置睪炎群および 5 - Fluorouracil 投与睪炎群の血清 Amylase、血清 Lipase および死亡率について検討した。

1) 実験的急性睪炎の作製

0.3 ml の生食水で希釈した 2% Na - Taurocholate 溶液を軽症型睪炎の作製に、0.6 ml の生食水で希釈した 4% Na - Taurocholate 溶液に 2 mg の Trypsin を加えたものを重症型睪炎の作製に用いた。ラットをエーテル麻酔下で開腹して十二指腸ループを引き出した後、上記薬剤を、十二指腸壁を通して総胆管内に挿入した 26 ゲージ針より 6 秒間かけて注入した。その際、注入薬剤が肝内胆管および十二指腸内へ流出ないように総胆管の肝側および十二指腸側を結紮し、薬剤注入後はその結紮を解除した。

2) 血清 Amylase の測定

血清 Amylase は Amylase Test Shionogi を用い Beck-man grating spectrophotometer を使用して α - Amylase 活性を測定し、Somogyi unit で表わした。

3) 血清 Lipase の測定

血清 Lipase は Sigma Lipase kit 800 - B を用いて測定した。なお、単位は Sigma - Tietz unit で表わした。

4) 死亡率の検討

無処置睪炎群および 5 - Fluorouracil 投与睪炎群の、24 時間と 48 時間以内における死亡率を検討した。

3. 睪酵素にもとづく睪手術合併症の、蛋白合成阻害による予防

ラットを対照群と 5 - Fluorouracil 投与群に分け、それぞれの群の手術侵襲付加の前、および付加後の 6, 12, 18, 24 時間目における睪蛋白合成能と、睪組織内 Amylase ならびに Lipase 活性値を検討した。対照群には生食水 0.6 ml、5 - Fluorouracil 投与群には 5 - Fluorouracil 15 mg / kg 体重を前記実験と同様に 3 日間投与した。3 日目の投与後 1 時間目に手術侵襲を加え、以下の如き方法にて検討した。

1) 手術侵襲付加

単開腹術または睪手術を行った。単開腹術はエーテル麻酔下で開腹術のみを、睪手術はエーテル麻酔下で開腹し睪尾側を引き出し、脾門部近くの睪実質に 6-0 atraumatic Tevdek を 1 針かけて結紮を行い開腹した。

2) 睪蛋白合成能の検討

³H - Leucine を投与し睪への取込みの測定により、睪蛋白合成能の検討を行った。³H - Leucine は 0.1 μ Ci / g 体重を尾静脈より注射し、前記の実験と同様に TCA (三塩化酢酸) 処理により TCA 可溶分画と不溶分画とに分離し、液体シンチレーションカウンターにて放射能を 1 分間測定した。なお、放射能は睪の蛋白量 1 mg 当りに換算した。

3) 睪組織内 Amylase および Lipase 活性

剔出臓に 0.01M, Tris - HCl buffer (PH7.0) 30 ml を加えホモジネートし, 10,000g にて遠心して上清をとり, 適宜希釈して酵素活性および蛋白質量を測定し, 酵素活性を単位蛋白質量当りに換算した. その際, Amylase 活性は Amylase Test Shionogi を, Lipase 活性は Sigma Lipase kit 800 - B を用いて測定した.

4) 蛋白質量の測定

蛋白質量は Lowry - Folin 法⁹⁾にて測定したが, TCA 処理による TCA 可溶分画は適宜希釈して測定し, TCA 不溶分画は再び 0.01M Tris - HCl buffer (PH7.0) に溶解し, 10 分間 10,000g にて遠心した後上清をとり測定した.

成 績

1. 蛋白質合成阻害剤の検討

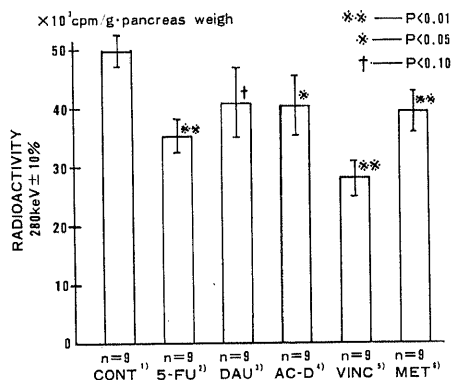
臓蛋白質合成阻害効果を各々の蛋白質合成阻害剤投与群につき検討し, 以下の結果を得た.

1) ⁷⁵Se - Selenomethionine による検討

対照群 (n = 9) の放射能は (49.6 ± 6.2) × 10³cpm / g 膵重量 (平均値 ± 標準偏差, 単位以下同様) であるのに対し, 5 - Fluorouracil 投与群 (n = 9) は (35.1 ± 5.9) × 10³, Daunomycin 投与群 (n = 9) は (40.6 ± 11.4) × 10³, Actinomycin D 投与群は (40.5 ± 9.5) × 10³, Vincristine 投与群 (n = 9) は (28.1 ± 7.5) × 10³, および Methotrexate 投与群 (n = 9) は (39.7 ± 6.8) × 10³ であった. このうち ⁷⁵Se - Selenomethionine の膵内への取込みの減少が有意 (P < 0.01) にみられたものは 5 - Fluorouracil 投与群, Vincristine 投与群および Methotrexate 投与群であり, 他の薬剤投与群においては必ずしも明らかでなかった (図 1).

2) ³H - Leucine による検討

対照群, 5 - Fluorouracil 投与群, Actinomycin D 投与群および Vincristine 投与群について検討した (表 1). TCA 可溶分画の放射能値は対照群 (n = 5) が (28.0 ± 11.5) × 10³cpm / g 膵重量 (単位以下同様) であり, Vincristine 投与群 (n = 4) の (28.5 ± 5.7) × 10³ とほぼ同様の結果であった. これに対し 5 - Fluorouracil 投与群 (n = 5) および Actinomycin D 投与群 (n = 4) では (19.4 ± 4.1) × 10³ ならびに (19.3 ± 2.9) × 10³ と ³H - Leucine の取込みの減少がみられた. 一方, TCA 不溶分画 (蛋白分画) の放射能は, 対照群 (n = 5) が (137.4 ± 15.4) × 10³ であるのに対し, 5 - Fluorouracil 投与群 (n = 5) では (98.4 ± 9.2) × 10³, Actinomy-



- 1) ...Control
- 2) ...5-Fluorouracil 10mg/kg 体重
- 3) ...Daunomycin 1.5mg/kg 体重
- 4) ...Actinomycin D 0.025mg/kg 体重
- 5) ...Vincristine 0.25mg/kg 体重
- 6) ...Methotrexate 0.4mg/kg 体重

図 1 蛋白質合成阻害剤投与時における ⁷⁵Se - Selenomethionine の膵内取込み所見.

表 1 5-Fluorouracil, ActinomycinD および Vincristine 投与による ³H-Leucine の膵内取込み状況

	n (匹数)	体重 g (M ± S D)	膵重量 (M ± S D)	× 10 ³ cpm / 膵 g (M ± S D)		
				TCA-solub	TCA-insolub	Homogenate
Control	5	127.0 ± 10.8	0.51 ± 0.09	28.0 ± 11.5	137.4 ± 15.4	165.4 ± 24.6
5-Fluorouracil	5	113.0 ± 9.8	0.43 ± 0.07	19.4 ± 4.1	98.4 ± 9.2	117.4 ± 13.1
Actinomycin D	4	133.8 ± 12.9	0.49 ± 0.09	19.3 ± 2.9	124.8 ± 6.9	144.0 ± 8.6
Vincristine	4	108.8 ± 12.4	0.54 ± 0.03	28.5 ± 5.7	79.0 ± 26.1	107.5 ± 24.7

5-Fluorouracil 15mg/kg 体重
 Actinomycin D 0.025mg/kg 体重
 Vincristine 0.25mg/kg 体重

cin D 投与群 (n = 4) は (124.8 ± 6.9) × 10³, Vincristine 投与群 (n = 4) は (79.0 ± 26.1) × 10³ といずれもその減少がみられた。

5 - Fluorouracil 投与群においては TCA 可溶分画 (P < 0.01), 不溶分画 (P < 0.05) とともに ³H - Leucine の取込みの減少がみられ, Actinomycin D 投与群においても同様の傾向がうかがわれたが, Vincristine 投与群においては TCA 可溶分画への取込みは対照群とはほぼ同様であるのに対し, 不溶分画への取込みは著明な減少 (P < 0.01) を示した。なお, それぞれの群における Homogenate の放射能は, ⁷⁵Se - Selenomethionine 使用の場合と同様の傾向がみられた。

3) Autoradiography による検討

対照群の 5 匹, 5 - Fluorouracil 投与群の 5 匹, Actinomycin D 投与群の 3 匹および Vincristine 投与群の 3 匹に Autoradiogram を作製し検討した。対照群の 2 匹と 5 - Fluorouracil 投与群の 2 匹には

³H - Leucine をも使用したが, 他はすべて ³H - Methionine を使用した。なお, 5 - Fluorouracil 投与群の ³H - Leucine 使用例には, 5 - Fluorouracil の 30 mg / kg 体重を, ³H - Methionine 使用例には 15 mg / kg 体重を 3 日間投与したが, ActinomycinD および Vincristine は前記量を投与した。

対照群において, 標識アミノ酸投与後 1 時間目の細胞内銀粒子の大部分は Zymogen 顆粒に一致してみられるが, 若干の銀粒子は細胞内に認められた。この様な所見は 5 - Fluorouracil, ActinomycinD および Vincristine 投与例においても同様に認められた。

それぞれの薬剤投与群の Autoradiogram における細胞内の銀粒子数はいずれも対照群に比し減少をみる (表 2), ³H - Leucine を用いた放射能測定値の所見と同様の結果が認められた。即ち, ³H - Methionine 使用の Autoradiography においても, 5 - Fluorouracil と Vincristine 投与群は,

表 2 Autoradiogram 所見。各種薬剤投与による腺外分泌細胞 1 個内の銀粒子数

Labelled aminoacid	Group	No.	Number of cells	Graincount (M ± SD)
³ H - Methionine	Control	1	20	18.5 ± 2.6
		2	20	17.4 ± 2.5
		3	20	18.7 ± 2.9
	5-FU ^{*1}	1	20	9.5 ± 2.0
		2	20	8.3 ± 1.8
		3	20	10.4 ± 2.1
	VINC ^{*2}	1	20	8.9 ± 1.8
		2	20	8.8 ± 2.3
		3	20	8.8 ± 1.7
	ACTD ^{*3}	1	20	10.8 ± 2.7
		2	20	10.4 ± 1.8
		3	20	10.8 ± 1.7
³ H - Leucine	Control	1	20	22.2 ± 3.5
		2	20	22.1 ± 4.0
	5-FU ^{*4}	1	20	10.5 ± 1.9
		2	20	10.8 ± 2.4

※ 1 5-Fluorouracil 15mg/kg体重
 ※ 2 Vincristine 0.25mg/kg体重
 ※ 3 Actinomycin D 0.025mg/kg体重
 ※ 4 5-Fluorouracil 30mg/kg体重

ActinomycinD 投与群より銀粒子の数からみて蛋白合成阻害の所見が明らかであった。

4) 組織学的所見

正常膵の外分泌細胞では、核は中心よりやや cell base 側に存在し、Zymogen 顆粒は apical region に限局している (写真 1)。Zymogen 顆粒は eosinophilic で、その量は個々の細胞により必ずしも一定ではないが、細胞の $1/2 \sim 2/3$ を占めるものが殆んどであった。

薬剤投与群の形態学的変化は軽度で、その判定には慎重を要した。しかし多数の材料について総合的に観察した結果その主な変化は Zymogen 顆粒の増減にあった。個々の薬剤投与群の所見は以下の如くである。

5-Fluorouracil 投与群: 腺房と腺細胞は対照群に比して腫大し、淡明な胞体には Zymogen 顆粒数の増加を認め、その Eosin 染色性はやや低下していた。また、核は cell base に位置する傾向を示した (写真 2)。

ActinomycinD 投与群: 腺房は対照群に比し全体的に縮少し、腺細胞も縮少傾向にあり、細胞質は

basophilic で核は一般に cell base に位置していた。Zymopen 顆粒は減少し、顆粒の形成不全が推定された (写真 3)。

Vincristine 投与群: 腺細胞がやや淡明化している点を除けば、その変化は ActinomycinD 投与群とほぼ同様な所見であった。すなわち、腺房と腺細胞は一般に縮少し、Zymogen 顆粒の減少を認め、顆粒の形成不全が推測された (写真 4)。

2. 実験的急性膵炎に対する蛋白合成阻害の効果
蛋白合成阻害剤の検討結果から、膵蛋白合成阻害剤として 5-Fluorouracil を選択し実験に用いた。

1) 軽症型膵炎ラットの血清 Amylase および血清 Lipase 活性

i) 血清 Amylase 活性

単開腹後 6, 24, 48 時間後における血清 Amylase 活性値は、いずれも開腹前値とほぼ同様であった。無処置 (生食水投与) 膵炎群においては、6 時間後は $(7.5 \pm 1.73) \times 10^3$ Somogyi units / 100 ml ($n = 10$)

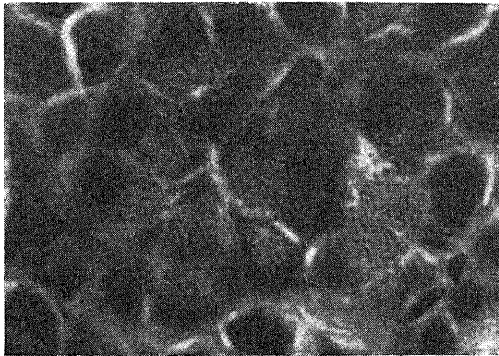


写真 1 3日間絶食した正常ラット膵。(×1000)

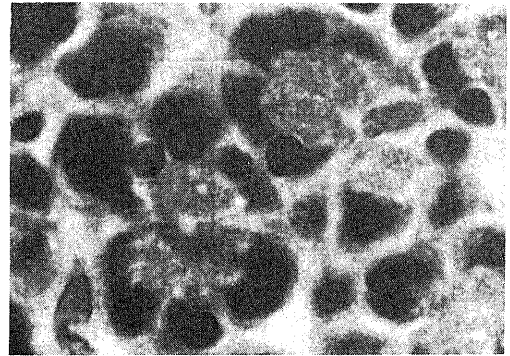


写真 3 ActinomycinD 投与のラット膵(×1000)。

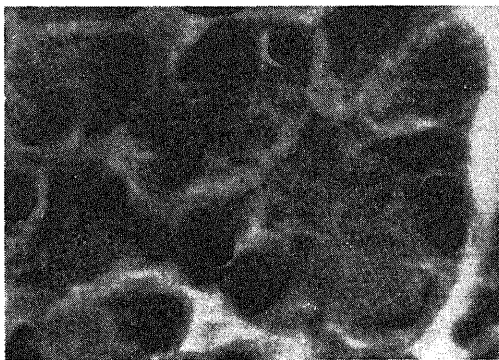


写真 2 5-Fluorouracil 投与したラット膵。(×1000)

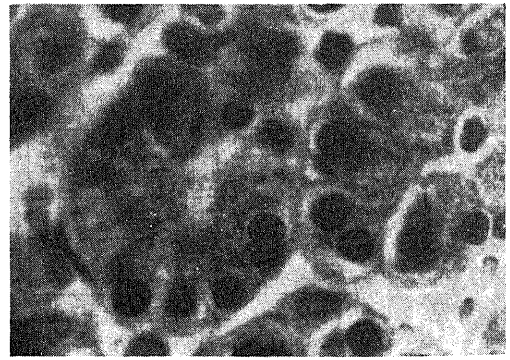


写真 4 Vincristine 投与のラット膵(×1000)。

(単位以下同様) 24 時間後は $(18.71 \pm 3.82) \times 10^3$ ($n = 6$), 48 時間後は $(15.34 \pm 3.63) \times 10^3$ ($n = 6$)であった。これに対し 5-Fluorouracil 投与膵炎群においてはそれぞれ (5.27 ± 1.02) ($n = 10$), (11.87 ± 2.81) ($n = 6$) $(7.58 \pm 2.24) \times 10^3$ ($n = 6$) と有意に血清 Amylase 活性値の低下を示した(図2)。

ii) 血清 Lipase 活性

単開腹後における血清 Lipase 活性値は単開腹前、後ともに極めて低値であった。無処置膵炎群においては、膵炎作製後 6 時間目では (7.28 ± 2.72) Sigma Tietz units/ml ($n = 10$) 24 時間目では (13.74 ± 2.65) ($n = 6$), 48 時間目では (12.58 ± 2.56) ($n = 6$) であった。これに対し 5-Fluorouracil 投与膵炎群では、それぞれ (5.61 ± 1.28) ($n = 10$), (7.55 ± 1.38) ($n = 6$), (5.47 ± 1.86)

($n = 6$) と、特に膵炎作製後 24, 48 時間目において明らかに低値を示した(図3)。

2) 実験的急性膵炎ラットの死亡率

i) 軽症型膵炎による死亡率

無処置膵炎群および 5-Fluorouracil 投与膵炎群それぞれ 12 匹づつについて検討した。24 時間以内の死亡率は無処置膵炎群 25% (3/12), 5-Fluorouracil 投与膵炎群 8.3% (1/12) であり、48 時間以内の死亡率は無処置膵炎群 33.3% (4/12), 5-Fluorouracil 投与膵炎群 16.7% (2/12) と 5-Fluorouracil 投与膵炎群においてやや死亡率の低下が認められるも、明らかな差異とはいいがたかった(図4)。

ii) 重症型膵炎による死亡率

無処置膵炎群, 5-Fluorouracil 投与膵炎群ともそれぞれ 24 匹を用いた。24 時間以内の死亡率は無処置膵炎群 83.3% (20/24), 5-Fluorouracil 投与膵炎群 29.2% (7/24) であり、48 時間以内の死亡率は無処置膵炎群 91.7% (22/24), 5-Fluorouracil 投与膵炎群 41.7% (10/24) と、5-Fluorouracil 投与膵炎群において明らかな死亡率の低下が認められた ($\chi^2 < 0.01$) (図5)。

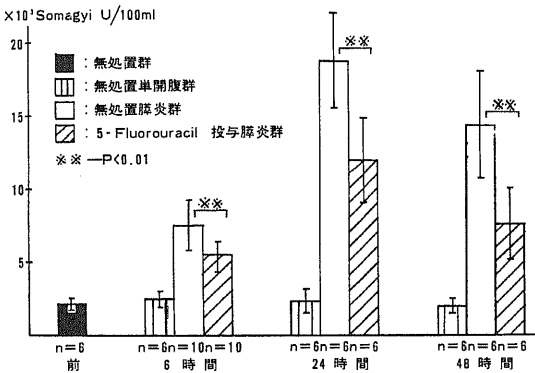


図2 蛋白合成阻害剤の実験的急性膵炎ラット血清 Amylase に及ぼす影響。

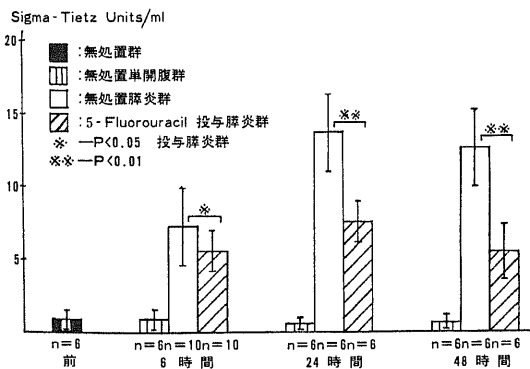


図3 蛋白合成阻害剤の実験的急性膵炎ラット血清 Lipase に及ぼす影響。

3 膵酵素に由来する膵手術合併症の膵蛋白合成阻害による予防

1) 単開腹術後における膵蛋白合成能の検討

対照群の TCA 不溶分画(蛋白分画)における術前の放射能測定値は $(294.5 \pm 34.0) \times 10\text{cpm} / \text{mg protein}$ (単位以下同様) であるのに対し、6 時間後では $(98.5 \pm 25.3) \times 10$ と著明な低下を示し、12 時間

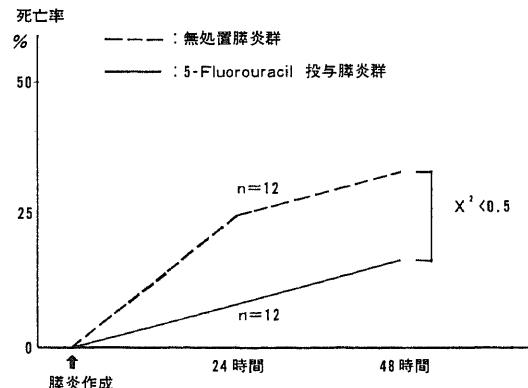


図4 蛋白合成阻害剤の実験的急性膵炎ラット死亡率に及ぼす影響 (2% Na - Taurocholate 注入)。

後には $(286.0 \pm 41.1) \times 10$ と開腹前値とはほぼ同様な結果であった。5-Fluorouracil 投与群は対照群に比し開腹術前より取込みの低下を認めたが、6時間後は対照群と同様の結果であった。しかし、12、18、24時間後にはそれぞれ $(137.0 \pm 20) \times 10$, $(158.0 \pm 26.8) \times 10$, $(163.9 \pm 25.2) \times 10$ と対照群に比して明らかな取込みの低下がみられた ($P < 0.01$) (図6)。

TCA可溶分画においては、5-Fluorouracil 投与群は対照群に比し、開腹前、後ともに全体として取込みの低下がみられ、特に18、24時間後において明らかであった ($P < 0.01$) (図7)。

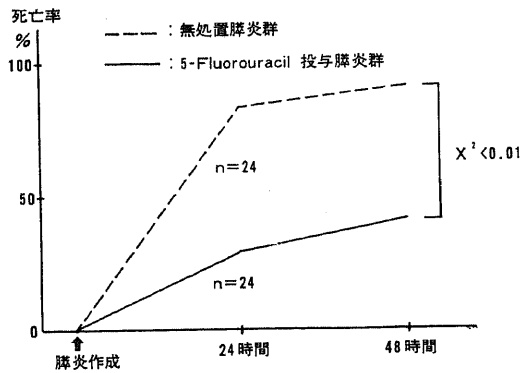


図5 蛋白合成阻害剤の実験的急性膵炎ラット死亡率に及ぼす影響 (4% Na-Tau-rocholate + Trypsin 注入)。

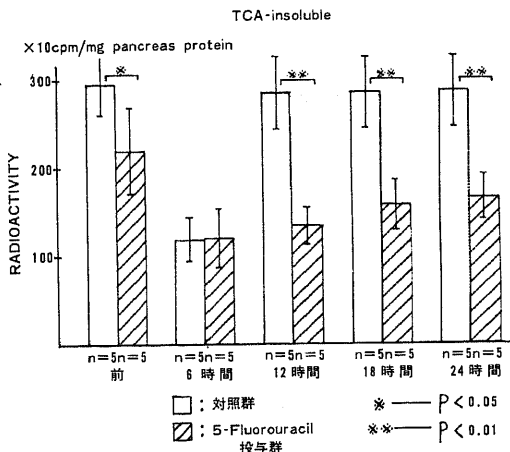


図6 単開腹術後における³H-Leucineの膵内取込み所見 (対照群と5-Fluorouracil投与群との比較). TCA-insoluble

2) 膵手術後における膵蛋白合成能の検討

対症群のTCA不溶分画における放射能測定値は、術前 $(294.5 \pm 34.0) \times 10\text{cpm/mg protein}$ (単位以下同様) に比し、手術後6時間では $(137.1 \pm 27.2) \times 10$ と著明な低下を示すが、12、18、24時間後にはそれぞれ $(242.0 \pm 31.6) \times 10$, $(312.0 \pm 29.2) \times 10$, $(287.5 \pm 37.0) \times 10$ であり、単開腹術後に比して蛋白合成能の回復はやや遅延しているが、18時間後には手術前値とはほぼ同様のレベルに回復した。これに対し、5-Fluorouracil 投与群は手術前、術後12、18、24時間ではそれぞれ $(218.0 \pm 49.2) \times 10$, $(144.0 \pm 22.3) \times 10$, $(132.1 \pm 24.5) \times 10$, $(152.1 \pm 28.3) \times 10$ と、対照群に比し明らかな低下が認められた (図8)。

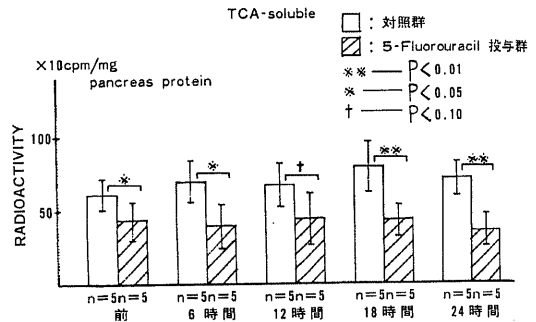


図7 単開腹術後における³H-Leucineの膵内取込み所見. TCA-soluble

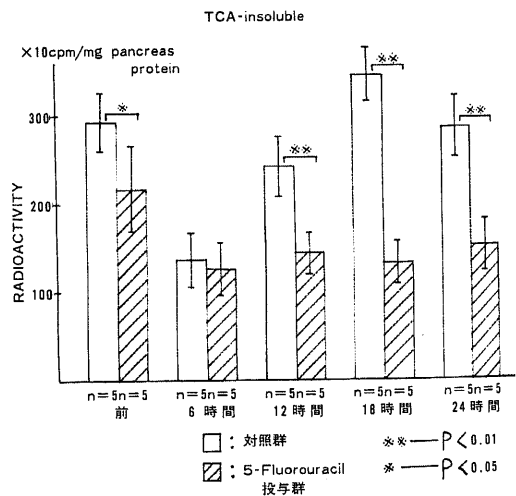


図8 膵手術後における³H-Leucineの膵内取込み所見 (対照群と5-Fluorouracil投与群との比較). TCA-insoluble

TCA 可溶分画における放射能測定値は、対照群に比し 5 - Fluorouracil 投与群は全体として取込みの低下の傾向がうかがえるが、必ずしも明らかな差とはいえなかった (図 9)。

3) 単開腹術後における膵組織内 Amylase, Lipase 活性

i) 膵組織内 Amylase 活性

対照群, 5 - Fluorouracil 投与群とも 5 匹づつを用いて検討した。対照群の開腹前 Amylase 活性値は 77.8 ± 8.5 Somogyi units / 100 ml / 100 mg protein (単位以下同様) であり、開腹後 6, 12, 18, 24 時間にはそれぞれ 80.0 ± 15.1 , 82.0 ± 10.0 , 70.5 ± 12.0 , 66.1 ± 2.1 と膵組織内 Amylase 活性値は開腹前とほぼ同様にその活性値を保持していた。一方、5 - Fluorouracil 投与群は開腹前より 56.0 ± 7.6 と対照群に比して低値を示し、開腹後 6, 12, 18, 24 時間においてそれぞれ 55.4 ± 6.0 , 50.0 ± 2.7 , 45.0 ± 9.4 , 39.3 ± 2.4 と対照群にほぼ同様に移行

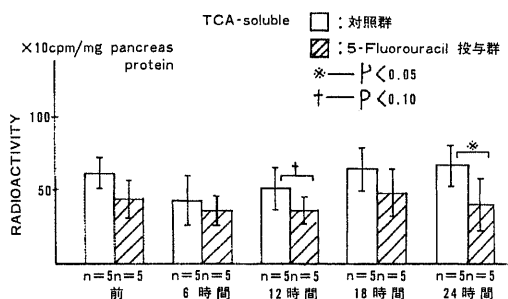


図 9 膵手術後における³H - Leucine の膵内取込み所見。TCA - soluble

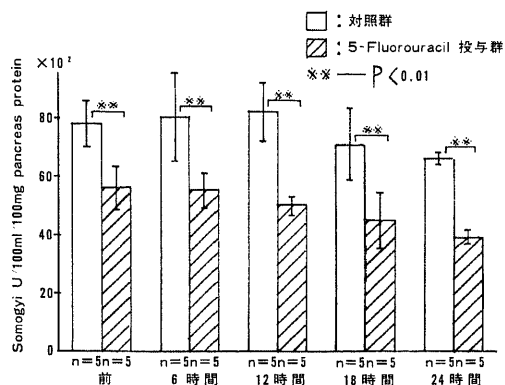


図 10 単開腹術後における膵内 Amylase 活性 (対照群と 5 - Fluorouracil 投与群との比較)。

するが、その活性値は明らかに低下していた (P < 0.01) (図 10)。

ii) 膵組織内 Lipase 活性

膵組織内 Lipase 活性値の所見は膵組織内 Amylase 活性値における所見と同様の傾向がみられた。すなわち、5 - Fluorouracil 投与群は対照群に比し、単開腹前および後 6, 12, 18, 24 時間において膵組織内 Lipase 活性値の低下が認められた (図 11)。

4) 膵手術後における膵組織内 Amylase, Lipase 活性

対照群, 5 - Fluorouracil 投与群とも 8 匹づつを用いて検討した。

i) 膵組織内 Amylase 活性

対照群においては膵手術前の Amylase 活性値は 77.8 ± 8.5 Somogyi units / 100 ml / 100 mg protein であるのに対し、術後 6, 12 時間ではそれぞれ 59.7 ± 4.5 , 58.3 ± 5.4 と一時的に低下し、18 時間後は再び活性値は上昇した。これに対し、5 - Fluorouracil 投与群は術前、後 6, 12, 18, 24 時間ではそれぞれ 56.0 ± 7.6 , 50.9 ± 3.8 , 47.5 ± 4.0 , 37.5 ± 4.1 , 36.5 ± 3.7 と漸減し、対照群に比していづれもその低下が認められた (図 12)。

ii) 膵組織内 Lipase 活性

膵手術後における膵組織内 Lipase 活性値は膵内 Amylase における結果とほぼ同様の傾向がみられた。すなわち、5 - Fluorouracil 投与群は対照群に比して膵手術前および後にわたり活性値の低下を認め、また、時間の経過とともに漸減した (図 13)。

考 案

ヒトの膵臓は 70 ~ 90g 程度の臓器であるが、1 日に分泌する膵液量は 1500 ml 以上であるといわれ⁷⁾、蛋白

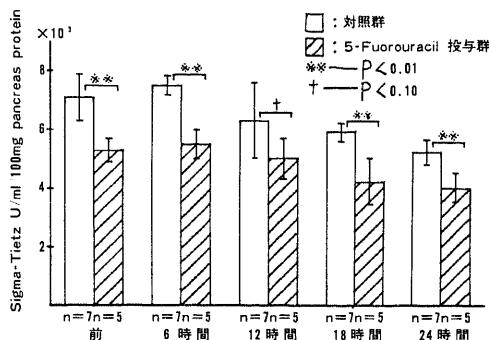


図 11 単開腹術後における膵内 Lipase 活性。

量に換算すると10~20g以上となり⁹⁾そのほとんどが外分泌酵素で、旺盛な蛋白合成能をもつことが知られている。

外分泌酵素の細胞内における合成および移動に関しては Parade ら⁹⁾やその他の研究者によって明らかにされつつある。Parade, caro¹⁰⁾らは、モルモットに³H-Leucineを注射し Autoradiography により検索した結果、5分後に粗面小胞体に、20分後に Golgi 装置に、1時間後に Zymogen 顆粒に grain を認めており、渡¹¹⁾はマウスに³H-Lysine を使用し15分後に粗面小胞体に、30分後に Golgi 装置に、1時間後に Zymogen 顆粒に grain を認めている。著者らも、3日間絶食ラットに³H-Methionine および³H-Leucine を使用し、1時間後に銀粒子のほとんどが Zymogen 顆粒上にあるのを観察した¹²⁾。腺房細胞の酵素原顆粒中のすべての蛋白は、細胞外から取込まれたアミノ酸を材料にして、①リボゾームで合成され、②粗面小胞体の内腔に隔離され、③ Golgi 装置に運ばれ、④濃縮空胞で濃縮され、⑤ Zymogen 顆粒に貯蔵されたのち、⑥適当な刺激に反応して腺房内腔へ開口

放出される⁹⁾という一連の過程を経るわけであるが、Kraehenbuhl ら¹³⁾は、Zymogen 顆粒に含まれるすべての酵素および酵素原は同時に、しかも一定の比率で放出されるとしている。

1969年 Martin ら³⁾は、5-Fluorouracil をラットに投与し、膵外分泌細胞における蛋白合成阻害とその分泌抑制を認め、1972年 Singh ら¹⁴⁾は、Puromycin および ActinomycinD をラットに投与し膵組織中の Amylase の減少を認めている。Hansson¹⁵⁾は、蛋白合成能はその細胞内の RNA の含有量に比例していると述べているが、著者らは膵外分泌細胞の蛋白合成のメカニズム中 RNA の役割に主眼を置き、RNA 合成阻害剤投与による分泌蛋白合成阻害を期待した。この RNA 合成阻害剤の選択は臨床上使用し得るものとし、制癌剤につきその作用機序を検討した。

Skipper ら¹⁶⁾にられば、5-Fluorouracil は DNA および RNA を障害するといひ、ActinomycinD および Daunomycin は DNA と結合して DNAdependent RNA の合成阻害を生ずる^{16)~19)}とされ、Methotrexate は folic reductase に作用し DNA, RNA および蛋白合成を障害する¹⁶⁾とされている。一方、Vincristine は作用機序が必ずしも明らかではないが、Creasey ら²⁰⁾によれば RNA 合成阻害を生ずるとされている。従って、これらの薬剤をスクリーニングしたが、臨床応用のためには通常投与量で効果の得られることが必要で、著者らの実験では通常投与量あるいはその2倍程度の投与量で検討した。

Martin ら³⁾は3日間絶食したラットに5-Fluorouracil (48 mg/kg体重)を投与し、顕頭および電顕にて膵外分泌腺細胞を観察した。それによれば、顕頭で basal basophilia の減弱、著明な Zymogen 顆粒の増加、Lipase の組織化学反応の減弱を、電顕で粗面小胞体の変化、種々の形の細胞質封入体の出現などを認めている。更に、Pilocarpine 投与による検索で外分泌障害を報告し、5-Fluorouracil は DNA と RNA の合成阻害により、蛋白合成と分泌機構に障害をもたらすと述べている。この様な所見は Johnson ら⁴⁾も認めており、著者らも組織学的および Autoradiography において確認している。増加した Zymogen 顆粒については、Martin らは electron density の低下や Lipase 反応の減弱などの所見よりその質的低下を指摘しており、著者らも、³H-Leucine の TCA 不溶分画(蛋白分画)への取込み減少や、Autoradiography における Zymogen 顆粒上の grain 数の減少などと、膵内酵素活性値の低下所見より、蛋白合成の量的、質的变化を生じていると考えて

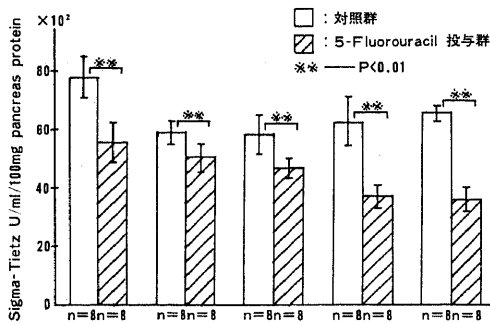


図12 膵手術後における膵内 Amylase 活性。

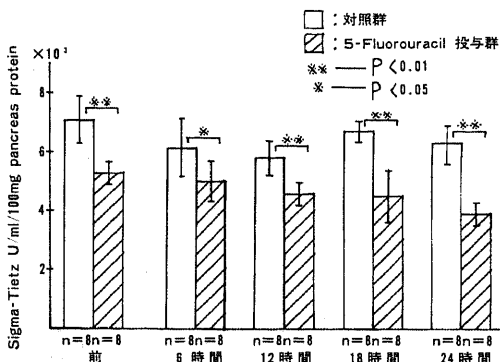


図13 膵手術後における膵内 Lipase 活性。

いる。

これに対し、蛋白合成阻害を惹起すると思われる他の処置では異なる所見が報告されている。即ち、放射線照射では Zymogen 顆粒は減少するとされており、Zelander ら²¹⁾の膵管結紮における報告でも、また、Puromycin²²⁾や ActinomycinD^{11),23)}投与においても同様な所見が認められている。即ち、著者らの ActinomycinD 投与による実験でも、核の縮小傾向や Zymogen 顆粒の減少、更に腺細胞全体の縮小傾向が認められたが、著者らの投与量では Zymogen 顆粒の減少、grain の取込みの減少および TCA 不溶分画への標識アミノ酸の取込みなどは、それほど著しくなかった。Vincristine 投与における組織学的および Autoradiogram 所見は、ActinomycinD 投与における所見と同様であった。しかし、TCA 不溶分画への³H-Leucine の取込みは著明な減少を示したが、TCA 可溶分画への取込みは対照例と同様であり、5-Fluorouracil や ActinomycinD 投与の場合と異った成績であった。このことは Vincristine が同じ蛋白合成阻害を示すとしても、他の薬剤とは違った作用機序によるものと推定された。

現在、膵外分泌酵素の阻害剤としては、Trasyrol, メシル酸ガベキサート (FOY), Chlorophyl a^{24),25)}および phospholipaseA に対する阻害剤である CDP-choline^{26),27)}などがある。これらはいづれも既に合成された膵外分泌酵素に対する抗酵素剤である。これとは別に、膵外分泌酵素合成を抑制する目的で Diamox²⁷⁾, Glucagon²⁸⁾などの使用も検討されているが、否定的な報告²⁹⁾もみられる。Lanskisch ら³⁰⁾は、ラットの実験的膵炎に対して Somatostatin 療法の有効性を報告しているが、今後興味のもたれるところである。

1973年 Johnson ら⁴⁾は、犬の実験的膵炎に 5-Fluorouracil を投与して治療成績を検討している。作製された膵は出血性で、対照群は 24 時間以内に全例死亡したのに対し、5-Fluorouracil 投与群では全例生存し治癒したと述べている。また、1977年 Korbova³¹⁾らは、0.6 ml の 5% bile solution によりラットに実験的膵炎を作製し、trypsin inhibitor である Antilysin, 制癌剤である Cytembena, 5-Azacytidine および Cycloheximide を投与したところ、死亡率において Cytembena, 5-Azacytidine および Cycloheximide 投与例は有効であったが、Antilysin は効果がなかったと報告している。

著者らは、3日間絶食した雄呑竜ラットに 0.3 ml, 2

% Na-taurocholate を総胆管より逆行性に膵管内へ注入して膵炎を作製し、血清の Amylase および Lipase 活性を測定したところ、5-Fluorouracil 投与群は対照群に比し、いづれも低値を示した。また、0.6 ml, 4% Na-taurocholate + trypsin 2 mg 注入によって作製した膵炎ラットの死亡率では、5-Fluorouracil 投与群において明らかな低下をみた。しかしながら、著者らの実験においては膵炎作製後、輸液、抗生剤投与等の保存的療法を施していないが、このような保存的療法を加えた場合の 5-Fluorouracil 投与の効果や、膵炎がある程度進展した時期での 5-Fluorouracil 投与の効果についても、関心をもたれる。

ところで、急性膵炎時における膵外分泌細胞の蛋白合成能については興味あるところである。Machovich ら³²⁾は 0.2 ml, 1% Deoxycholate の総胆管注入による急性膵炎ラットに¹⁴C-Valine を注射し、膵への取込みを測定したところ、急性膵炎作製後 24 時間目では明らかな取込みの低下がみられるが、96 時間目においては取込みの増加がみられると述べている。また河村³³⁾によれば、総胆管結紮による (Block 法) 膵炎ラットに³H-Leucine を注射し、膵への取込みを測定したところ膵炎作製後 12, 18, 24, 48, 72 時間目の取込みは作製前に比較しそれぞれ 25.7%, 24%, 31.4%, 28.6%, 30% に低下していたという。急性膵炎時には膵外分泌細胞の酵素合成能が低下していることは明らかであるが、なお可成りの酵素合成能の残存が推定され、また、膵炎の本態が膵外分泌酵素による自己消化であることを考えれば、蛋白(酵素)合成阻害剤の投与は有効であり、特に臨床例における浮腫性、出血性の膵炎がその適応になると考えている。

膵手術後の膵瘻や膵腸吻合における縫合不全はしばしばみられる合併症である。術後膵炎も、膵臓や膵臓に近接した臓器の手術のみならず、遠隔臓器の手術に際しても発生することが知られている^{34),35)}。これらの合併症発生の第一の要因は手術法自体にあるにしても、膵外分泌酵素がこれらの合併症に関係していることが考えられる。また、術後早期には内因性の trypsin inhibitor が低下しており、膵外分泌酵素に対する抵抗性、防御性の減弱もその要因の一つと考えられている¹⁾。

著者らは、手術後において膵外分泌酵素によってもたらされる合併症を、一時的に膵の蛋白(酵素)を阻害することにより予防するという観点で、5-Fluorouracil 投与時の術後の膵蛋白合成能や膵内酵素活性について検索した。その結果、単開腹術後およ

び膵手術後における膵蛋白合成能は比較的早期に回復し、膵内酵素活性は術前とほぼ同様の活性値を保持していることを知った。これに比し、5 - Fluorouracil 投与群においては、単開腹術および膵手術後の膵蛋白合成は抑制され、膵内酵素活性も明らかに低下していた。一方、Kraehenbuhl ら³⁾は、Zymogen 顆粒に含まれるすべての酵素および酵素原は一定の比率で放出されるとし、石原³⁰⁾は、膵内中の Amylase 濃度は蛋白濃度、trypsinogen 濃度と比例関係にあると述べている。従って、著者らの実験において、5 - Fluorouracil により膵蛋白合成は抑制され、膵内の Amylase、Lipase 活性の低下をみたが、他の酵素および酵素原においても同様であると考えられ、蛋白合成阻害剤としての 5 - Fluorouracil 投与は、膵外分泌酵素によって引き起こされる膵術後合併症に有用であると考えられる。

ところで、膵蛋白合成阻害剤としては、膵への移行の高い薬剤が有効であると考えられるが、山田ら³⁷⁾はラットに 5 - Fluorouracil を投与し、膵および膵組織中に可成りの濃度の 5 - Fluorouracil を認めたとしている。

膵の蛋白合成阻害剤の中で、Puromycin や ActinomycinD などは投与中止後比較的早期に障害細胞の形態的、機能的回復が起こるとされている。しかしながら Martin ら³⁾は、5 - Fluorouracil 投与によるラットの膵外分泌細胞の形態的、機能的変化は回復まで 11 週を要すると述べており、5 - Fluorouracil は効果の持続という点では有益と思われるが、投与量、投与期間と回復に関しては、今後の検討が必要であろう。

結 論

膵蛋白合成阻害による急性膵炎の治療および膵術後合併症の予防効果を検討する目的で、この研究を行った。すなわち、ラットに膵蛋白合成阻害剤として各種の薬剤を投与し、それらの効果を検討し、その中から臨床的に使用可能な薬剤を選択した。更に、膵蛋白合成阻害剤の、実験的急性膵炎に対する効果および単開腹や膵手術後における膵蛋白合成能と膵内酵素活性への影響について検討し、以下の結論を得た。

1. 膵蛋白合成阻害剤として 5 - Fluorouracil、Daunomycin、ActinomycinD、Vincristine、Methotrexate を選択し、これらの薬剤投与時における膵への標識アミノ酸の取込み、Antoradigraphy について検討したところ、5 - Fluorouracil および Vincristine 投与群において膵蛋白合成阻害が明らか

であった。

2. 組織学的には、5 - Fluorouracil 投与では外分泌腺細胞の腫大と染色性の低下した Zymogen 顆粒の増加を、ActinomycinD および Vincristine 投与では細胞の縮小ならびに Zymogen 顆粒の減少傾向を認めた。

3. 膵蛋白合成阻害剤として 5 - Fluorouracil を用い、実験的急性膵炎に対するその効果を検討した。0.3 ml、2% Na - Taurocholate 注入による膵炎ラットにおいて、5 - Fluorouracil 投与群は非投与群に比し血清 Amylase および Lipase 活性値の低下が認められた。また、trypsin 2 mg を加えた 0.6 ml、4% Na - Taurocholate 注入による膵炎ラットの死亡率においては、5 - Fluorouracil 投与群は非投与群に比し、明らかにその低下を示した。

4. ラット単開腹術および膵手術後の膵蛋白合成能は直後に低下するが、その早期回復が認められた。しかし、5 - Fluorouracil 投与により、それらの術後の膵蛋白合成能は抑制され、膵内の Amylase および Lipase 活性値の低下の持続も認められた。

以上の実験成績により、蛋白合成阻害剤は急性膵炎の治療および膵酵素に由来する膵手術合併症の予防に有用と考えた。

稿を終えるに臨み、終始懇篤なる御指導、御校閲を賜った恩師宮崎逸夫教授に深甚なる謝意を捧げます。また、直接御指導賜った第二外科木南義男助教授、並びに適切な助言を頂いた第二生化学大川力講師、医療技術短期大学安東醇助教授、第一病理学岡田保典講師、御協力いただいた第二外科学教室の諸師に衷心より謝意を表します。

本論文の要旨は昭和 52 年日本膵臓病研究会第 8 回年次大会（東京）および昭和 53 年第 64 回日本消化器病学会総会（札幌）において発表した。

文 献

- 1) White, T. T., Morgan, A & Hopton, D. : Postoperative pancreatitis: A Study of Seventy Cases. *Amer. J. Surg.*, **120**, 132 - 137 (1972).
- 2) 水本龍二 : 急性膵炎の病因. *最新化学*, **27**, 1671 - 1674 (1972).
- 3) Martin, B. F., Levin, R. J. & Kugler, J. H. : A light and electron microscope study of the exocrine pancreas following administration of 5-fluorouracil. *J. Anat.*, **104**, 93 - 107 (1969).
- 4) Johnson, R. M., Barone, R. M., Newson, B. L., Gupta, T. D. & Nyhus, L. M. : Treatment of expe-

- rimental acute pancreatitis with 5-fluorouracil. Amer. J. Surg., **125**, 211-222 (1973).
- 5) 松沢大樹 : ラジオオートグラフィー手技と応用. 朝倉書店 1969.
- 6) **Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. M. & Randall, R. J.** : Protein measurement with Folin phenol reagent. J. Biol. Chem., **193**, 265-276 (1951).
- 7) **Bodansky, O. & Bodansky, M.** : Biochemistry of disease. 2nd Edition Macmillan, New York 339 1952.
- 8) 竹内正・渡辺伸一郎・白鳥敬子 : 膵液の性状. 医学のあゆみ, **103**, 317-321 (1977).
- 9) **Palade, G. E.** : Intra cellular aspect of the process of protein synthesis. Science, **189**, 347-358 (1975).
- 10) **Caro, L. G. & Palade, G. E.** : Protein synthesis, storage and discharge in the pancreatic exocrine cell. An autoradiographic study. J. cell Biol., **20**, 473-495 (1964).
- 11) 渡仲三 : 膵内外分泌細胞の電子顕微鏡的観察. 日本臨床, **31**, 490-504 (1973).
- 12) 木南義男・河村允・杉井衛・新村康二・板根義博・水上哲秀・宮崎逸夫 : 膵外分泌腺の蛋白合成におよぼす各種制癌剤の効果. 日消病会誌, **72**, 811-821 (1975).
- 13) **Kraehenbuhl, J. P., Racine, L. & Jamieson, J. D.** : Immunocytochemical localization of secretory proteins in bovine pancreatic exocrine cells. J. Cell Biol., **72**, 406-423 (1977).
- 14) **Singh, M., Black, O. & Webster, P. D.** : Effect of drugs on pancreatic amylase in vitro. Gastroenterology, **63**, 449-457 (1972).
- 15) **Hansson, E.** : The formation of pancreatic juice proteins studied with labeled acids. Acta physiol. Scand., **46**, 161-169 (1959).
- 16) **Skippe, H. E., Schabel, F. M., Mellett, L. B., Montgomery, J. A., Wikoff, L. J., Lloyd, H. H. & Brochmann, R. W.** : Implications of biochemical, cytokinetic, pharmacologic, and toxicologic relationships in the design of optimal therapeutic schedules. Cancer chemotherapy Rept., **54**, 431-450 (1970).
- 17) 下山正徳 : 抗癌剤の殺細胞作用の様式からみた適切な投与方法. 最新医学, **28**, 850-859 (1973).
- 18) **Goldberg, I. & Rabinowitz, M.** : Actinomycin D inhibition of deoxyribonucleic acid dependent synthesis of ribonucleic acid. Science, **136**, 315-316 (1962).
- 19) **Kahan, E., Kahan, F. M. & Hurwitz, J.** : The role of deoxyribonucleic acid in ribonucleic acid synthesis. J. Biol. Chem., **238**, 2491-2497 (1963).
- 20) **Creasey, W. A., & Markiw, M. E.** : Biochemical effects of the vinca alkaloids 11. A comparison of the effects of colchicine, vinblastine and vincristine on the synthesis of ribonucleic acids in Ehrlich ascites carcinoma cells. Biochim. Biophys. Acta, **87**, 601-609 (1964).
- 21) **Zelander, T.** : The ultrastructure of the rat exocrine pancreas after experimentally occurred outflow. J. Ultrastructure Research, **10**, 89-102 (1964).
- 22) **Longnecker, D. S. & Farbar, E.** : Acute pancreatic necrosis induced by promycine. Laboratory Investigation, **16**, 321-329 (1967).
- 23) **Rodriguez, T. G.** : Ultrastructural changes in the mouse exocrine pancreas induced by prolonged treatment with actinomycin D. J. Ultrastructural Research, **19**, 116-129 (1967).
- 24) **Skyring, A. P., Singner, A. & Tornta, P.** : Treatment of acute pancreatitis with trasylol ; Report of a controlled therapeutic trial. Brit. Med. J., **2**, 627-629 (1965).
- 25) 香月武人 : 急性膵炎の診断と治療. 外科治療, **29**, 266-272 (1973).
- 26) 戸田安士・早川哲夫・中島澄夫・野田愛司 : 急性膵炎の治療 - 内科的立場から - 最新医学, **27**, 1688-1695 (1972).
- 27) 水本龍二 : 急性膵炎. 臨床外科, **29**, 455-458 (1974).
- 28) **Knight, M. J., Condon, J. R. & Smith, R.** : Possible use of glucagon in the treatment of pancreatitis. Brit. Med. J., **2**, 440-442 (1971).
- 29) **Condon, R. E., Woods, J. H., Poulin, T. L., Wagner, W. G. & Pissiotis, C. A.** : Experimental pancreatitis treated with glucagon or Lactated Ringer Solution. Arch. Surg., **109**, 154-158 (1974).
- 30) **Lankisch, P. G., Koop, H., Winckler, K., Folsch, U. R. & Creutzfeldt, W.** : Somatostatin

therapy of acute experimental pancreatitis. *Gut*, **18**, 713-716 (1977).

31) **Korbova, L., Kohout, J., Malis, F., Balas, V., Cizkova, J., Marek, J. & Cihak, A.** : Inhibitory effect of various cytostatics and cycloheximide on acute experimental pancreatitis in rats. *Gut*, **18**, 913-918 (1977).

32) **R. Machovich, M. Papp & I. Fodor** : Protein synthesis in acute pancreatitis. *Bioch. Med.*, **3**, 376-383 (1970).

33) 河村允・新村康二・坂根義博・杉井衛・木南義男・宮崎逸夫 : 実験的急性膵炎における膵蛋白合

成. 第62回日本消化器病学会 (1976).

34) **Peterson, L. M., Colins, J. J. & Wilson, R. E.** : Acute pancreatitis occurring after operation. *S. G. O.*, **127**, 23-28 (1968).

35) **Feiner, H.** : Pancreatitis after Cardiac surgery. *Amer. J. Surg.*, **131**, 684-688 (1976).

36) 石原敬夫 : 膵酵素分泌機序の研究. *日消会誌*, **71**, 839-853 (1974).

37) 山田伸明・石井兼央・膳所富士男・中村耕三 : 抗癌剤と抗菌剤の膵液中排泄. *日消会誌*, **71**, 901-905 (1974).

