

急性膵炎の病態生理に関する実験的研究
—特に胆汁性膵炎における phospholipase
A₂ の意義と CDP-choline の効果—

三重大学医学部第一外科学教室 (指導: 水本龍二教授)

小 坂 篤

〔原稿受付: 昭和59年1月20日〕

Experimental Studies on Pathophysiology of Acute Pancreatitis,
with Special Reference to Pancreatic Phospholipase A₂
and the Effect of CDP-choline

ATSUSHI KOSAKA

First Department of Surgery, Faculty of Medicine, Mie University
(Director: Prof. R. MIZUMOTO)

The purpose of this study was to elucidate the effect of pancreatic phospholipase A₂ on pathophysiology of acute pancreatitis. The effect of CDP-choline on acute pancreatitis was also investigated.

Acute pancreatitis was induced by an injection of bile or various pancreatic enzymes into the pancreatic duct with ligation in dogs, and then the experimental animals were divided into the following 4 groups:

Group I : intraductal injection of autologous gallbladder bile (bile pancreatitis)

Group II : intraductal injection of trypsin (trypsin pancreatitis)

Group III : intraductal injection of lipase (lipase pancreatitis)

Group IV : intraductal injection of phospholipase A₂ (phospholipase A₂ pancreatitis)

The results were as follows:

A. Changes of the specific enzyme activities in the serum and histological findings of the pancreas and the liver in experimental acute pancreatitis.

1. Activities of the various pancreatic enzymes in the serum: Serum amylase, trypsin, lipase and phospholipase A₂ activities all increased and trypsin inhibitor in the serum decreased after induction of the experimental acute pancreatitis in all four groups.

Changes of serum amylase and trypsin activities did not show significant differences among

Key words: Acute pancreatitis, Bile pancreatitis, Phospholipase A₂, Trypsin inhibitor, CDP-choline.

索引語: 急性膵炎, 胆汁性膵炎, ホスホリパーゼ A₂, トリプシンインヒビター, CDP コリン.

Present address: First Department of Surgery, Faculty of Medicine, Mie University, Tsu, Mie, 514, Japan.

the groups, except for trypsin activities in trypsin pancreatitis.

However, serum trypsin inhibitor decreased remarkably in bile pancreatitis, serum lipase activities increased markedly not only in lipase pancreatitis but also in bile pancreatitis and phospholipase A₂ pancreatitis, and serum phospholipase A₂ activities increased remarkably not only in phospholipase A₂ pancreatitis but also in bile pancreatitis.

2. Histological findings of the pancreas and the liver: In the pancreas, a definite coagulation necrosis and a severe fat necrosis were observed in bile pancreatitis and phospholipase A₂ pancreatitis, but the main changes in trypsin pancreatitis were a slight liquefaction necrosis, hemorrhage and edema of the interstitium; these changes were the slightest in lipase pancreatitis. In the liver, definite necrotic changes were observed in bile pancreatitis and phospholipase A₂ pancreatitis 18 hours after induction of acute pancreatitis, but the main changes in trypsin pancreatitis and lipase pancreatitis were slight sinusoidal congestion and degeneration.

From the above results, bile pancreatitis was considered to be closely related to phospholipase A₂.

B. Effect of CDP-choline on bile pancreatitis.

When CDP-choline was administered for bile pancreatitis, the dogs survived significantly longer than the dogs without administration of CDP-choline. The administration of CDP-choline led to less increase of serum lipase and phospholipase A₂ activities, and of serum GOT, GPT and LDH activities, and also less severe histological changes of the pancreas and the liver than for those in the group without administration of CDP-choline.

は じ め に

急性膵炎は活性化した膵酵素の間質内逸脱による化学的自己消化がその病態生理の本態をなすものと考えられており、間質へ逸脱した膵酵素が局所的ならびに全身的に作用して急性膵炎における特有な病態を発現してくるものと考えられている。そもそも急性膵炎の発生機序については Opie¹⁸⁾ の系統的研究以来、感染胆汁が膵管内に逆流して膵炎を発生するという common channel theory が提唱され、さらに膵管閉塞、膵外分泌刺激による膵管内圧亢進や十二指腸液の膵管内逆流など一連の膵管性膵炎発生機序が重視されている²¹⁾。一方、膵酵素としては従来から trypsin の重要性が注目されてきたが、いわゆる trypsin 膵炎という概念は多くの批判をうけ^{1), 4), 5)}、近年 phospholipase A₂^{2), 11), 15)} や elastase^{6), 7)} の重要性が指摘されている。

膵酵素は通常十二指腸に流入して初めて活性化されるため、胆汁が膵管内に流入するだけでは膵酵素は活性化されないといわれてきた。しかるに最近、胆汁と

膵液を混入するだけで trypsin¹⁹⁾ や phospholipase A₂^{17), 23)} などの膵酵素が活性化されることが明らかにされており、膵管性膵炎発生機序における胆汁の重要性が再認識されている。かかる立場から本研究は実験的にイヌの膵管内に自家胆嚢胆汁や各種膵酵素を注入して急性膵炎を作成し、血中各種酵素活性の変化を検索するとともに膵や肝の組織学的変化を検索して、主として胆汁性膵炎の病態生理における膵酵素、特に phospholipase A₂ の意義を明らかにする目的で行われた。さらに phospholipase A₂ は lecithin を基質としているため lecithin の生合成のうえで重要な cytidine diphosphate choline (以下 CDP-choline) の胆汁性膵炎に対する効果についても併せて検討した。

I. 実験材料並びに方法

体重 10~20 kg の雑種成犬35頭を用い、24時間絶食後 pentobarbital sodium (25 mg/kg) の静脈麻酔下に開腹し、副膵管を結紮切離した後、主膵管を十二指腸流入部で露出し、これを切開して外径 1 mm のポ

リエチレン性カテーテルを挿入し、140 mmHg 以下の圧で次の各種薬剤を注入したのちカテーテルを抜去し、主膵管を結紮して急性膵炎を作成し、これを注入した薬剤の種類により次の4群にわけて以下の検索を行った。

I群(8頭):胆嚢を穿刺して得られた自家胆嚢胆汁 0.5 ml/kg を膵管内に注入(以下胆汁性膵炎)。

II群(8頭): trypsin (P-L Biochemical 社) 1500 U/kg を生理的食塩水 0.5 ml/kg に溶解して膵管内に注入(以下 trypsin 膵炎)。

III群(6頭): lipase (Wako 社) 240 U/kg を生理的食塩水 0.5 ml/kg に溶解して膵管内に注入(以下 lipase 膵炎)。

IV群(5頭): phospholipase A₂ (Boehringer-Mannheim 社) 1200 U/kg を2% sodium taurocholate (Difco 社) 0.5 ml/kg に溶解して膵管内に注入(以下 phospholipase A₂ 膵炎)。

なお各群における薬剤の注入量は平均生存時間がほぼ16~20時間となる量を選んだ。すなわち、各群の平均生存時間はI群、胆汁性膵炎では 16 ± 4.0 時間、II群 trypsin 膵炎では 18 ± 3.3 時間、III群、lipase 膵炎では 20 ± 4.7 時間、IV群、phospholipase A₂ 膵炎では 17 ± 2.4 時間であった。

またI群と同様にして胆汁性膵炎を作成した後、CDP-choline 100 mg/kg を術直後、1時間目、3時間目の計3回末梢静脈内へ投与して実験的胆汁性膵炎に及ぼす CDP-choline の効果を検討した(8頭、CDP-choline 治療群)。

1. 血中膵酵素活性の測定

術前および実験的急性膵炎作成後1時間、3時間、6時間、12時間、18時間目にそれぞれ大腿静脈より採血し、ただちに血清を分離したのち各種膵酵素活性を測定した。すなわち amylase は blue-starch 法, trypsin は合成基質 α -N-benzoyl-DL-arginine-p-nitroanilide (Aldrich Chemical 社) を用いた Preiser ら²²⁾の方法に準じて測定し、さらに Laurell-Eriksson 法に準じて trypsin inhibitor の測定も行った。lipase は olive oil を基質とした Phadebas lipase test (Shionogi 社) を用いて測定し、また phospholipase A₂ は Zieve ら²³⁾の方法により被検血清を lecithin の基質液に加えて混和したのち、55°C、18時間 incubation し、Stern and Shapiro の hydroxamic acid 法により acylester bond を測定し、 $0.0001 \mu\text{mole/ml/min}$ の lecithin の

減少を1単位とした。

2. 血液生化学的検査

同様にして得られた血清の glutamic oxaloacetic transaminase (GOT, Karmen 法), glutamic pyruvic transaminase (GPT, Karmen 法), lactic dehydrogenase (LDH, Wroblewski 法), alkaline phosphatase (Al-p, King-Armstrong 法) を測定した。

3. 組織学的検索

肝組織は実験的急性膵炎作成前及び作成後6時間、12時間、18時間目にそれぞれ開腹して採取した。膵組織は各群とも死亡時採取した他、胆汁性膵炎では膵炎作成後12時間目に犠牲剖検して採取し、CDP-choline 投与の有無でこれらの変化を比較検討した。採取した組織片はただちに10%ホルマリン液で固定し、パラフィン切片を作成して hematoxylin-eosin (H-E) 染色、Azan-Mallory (A-M) 染色を行い、光顕的に観察した。また、いずれの測定値も Student t-test により検定し $p < 0.05$ をもって有意と判定した。

II. 実験成績

A. 実験的急性膵炎における血中各種酵素活性並びに膵、肝の組織学的変化

1. 血中膵酵素活性

i) 血清 amylase 活性 (Table 1): 正常犬35頭で測定した正常値は 2500 ± 749 IU/ml であったが各群とも急性膵炎作成直後から有意の上昇を示し、いずれも12時間目に peak をとり、胆汁性膵炎では 7254 ± 3285 IU/ml, trypsin 膵炎では 6942 ± 2241 IU/ml, lipase 膵炎では 6287 ± 2331 IU/ml, phospholipase A₂ 膵炎では 6580 ± 1733 IU/ml と著しい上昇を示したが各群間では有意の差は認められなかった。

ii) 血清 trypsin 活性 (Table 1): 正常値は 7 ± 3.7 U/ml であったが胆汁性膵炎, lipase 膵炎, phospholipase A₂ 膵炎では膵炎作成後も有意の変化を示さなかった。trypsin 膵炎では膵炎作成後1時間目に 16 ± 4.3 U/ml と有意に上昇して peak を示したのち6時間目には 6 ± 4.8 U/ml と低下し以後も正常値を維持した。

iii) 血清 trypsin inhibitor (Table 1, Fig. 1): 正常値は 0.78 ± 0.23 mg trypsin/ml であり、膵炎作成後、各群とも経時的に有意の低下を示した。各群間の比較では胆汁性膵炎で膵炎作成後6時間目及び12時間目の活性値がそれぞれ 0.36 ± 0.14 , 及び 0.25 ± 0.15 mg

Table 1. Changes of serum amylase, trypsin and trypsin inhibitor activities

Activities in the serum	Experimental groups	Before injection	Hrs after induction of pancreatitis.				
			1	3	6	12	18
Amylase (U/ml)	I : bile p.	2500±749 35	5175±1732 ₈	6238±2605 ₈	7023±3327 ₈	7254±3285 ₈	5173±2197 ₃
	II : trypsin p.		3493±1519 ₈	4499±1503 ₈	5307±1620 ₈	6942±2241 ₈	4800±1581 ₃
	III : lipase p.		5538±1633 ₆	5019±1741 ₆	5347±1845 ₆	6287±2331 ₆	3515±605 ₄
	IV : phospholipase A2 p.		5062±1000 ₅	5100±931 ₅	6572±1561 ₅	6580±1733 ₅	6250 ₂
Trypsin (U/ml)	I : bile p.	7±3.7 35	9±2.6 ₈	7±3.3 ₈	8±4.1 ₈	8±1.9 ₈	9±3.8 ₃
	II : trypsin p.		16±4.3 ₈	15±3.6 ₈	6±4.8 ₈	5±2.7 ₈	8±2.9 ₃
	III : lipase p.		8±1.7 ₆	9±3.2 ₆	9±3.5 ₆	6±1.5 ₆	3±1.5 ₄
	IV : phospholipase A2 p.		8±2.1 ₅	8±2.4 ₅	7±3.7 ₅	6±3.1 ₅	9 ₂
Trypsin inhibitor (mg trypsin / ml)	I : bile p.	0.78±0.23 35	0.62±0.29 ₈	0.44±0.26 ₈	0.36±0.14 ₈	0.25±0.15 ₈	0.27±0.05 ₃
	II : trypsin p.		0.62±0.13 ₈	0.55±0.14 ₈	0.50±0.18 ₈	0.48±0.15 ₈	0.33±0.10 ₃
	III : lipase p.		0.83±0.35 ₆	0.70±0.27 ₆	0.70±0.18 ₆	0.56±0.24 ₆	0.45±0.20 ₄
	IV : phospholipase A2 p.		0.64±0.19 ₅	0.66±0.25 ₅	0.56±0.21 ₅	0.46±0.17 ₅	0.35 ₂

() : number of dogs * p<0.05 vs group I . III . VI
 ** p<0.05 vs group III

trypsin/ml と著明に低下して、これらは lipase 膵炎に比し有意に低値を示した。

iv) 血清 lipase 活性 (Table 2, Fig. 1) : 正常値は 63±27 U/l であったが各群とも膵炎作成後1時間ですでに有意に上昇し、胆汁性膵炎, phospholipase A2 膵炎では以後も経時的に上昇して、それぞれ18時間目

には 899±84 U/l, 629 U/l の高値を示した. lipase 膵炎では膵炎作成後1時間目に 494±164 U/l と peak に達し、以後次第に低下した. trypsin 膵炎では膵炎作成後12時間で 329±121 U/l と peak を示したが観察期間中他群に比しいずれの時期でも低値をとった。

v) 血清 phospholipase A2 活性 (Table 2, Fig. 1) :

Table 2. Changes of serum lipase and phospholipase A2 activities

Activities in the serum	Experimental groups	Before injection	Hrs after induction of pancreatitis.				
			1	3	6	12	18
Lipase (U/l)	I : bile p.	63±27 ₈₅	554±75 ₈	573±61 ₈	609±92 ₈	759±119 ₈	899±84 ₃
	II : trypsin p.		231±98 ₈	237±75 ₈	278±122 ₈	329±121 ₈	305±142 ₃
	III : lipase p.		494±164 ₆	479±122 ₆	452±157 ₆	444±126 ₆	408±116 ₄
	IV : phospholipase A2 p.		545±165 ₅	508±120 ₅	445±133 ₅	526±190 ₅	629 ₂
Phospholipase A2 (U/ml)	I : bile p.	15±13 ₃₅	37±25 ₈	81±36 ₈	92±15 ₈	113±38 ₈	109±15 ₃
	II : trypsin p.		31±10 ₈	47±27 ₈	53±14 ₈	81±36 ₈	88±10 ₃
	III : lipase p.		27±12 ₆	54±48 ₆	72±30 ₆	87±45 ₆	95±20 ₄
	IV : phospholipase A2 p.		201±86 ₅	218±65 ₅	231±65 ₅	211±61 ₅	170 ₂

() : number of dogs * p<0.05 vs group II
 ** p<0.05 vs group I . II . III

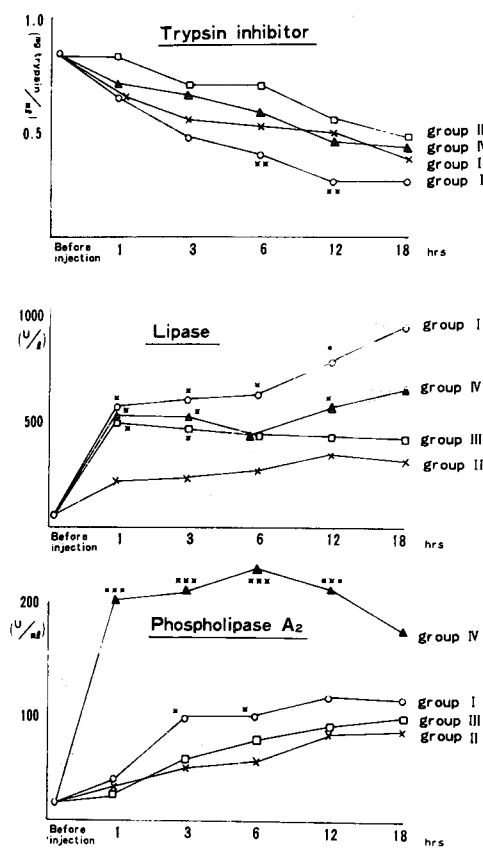


Fig. 1. Changes of serum trypsin inhibitor lipase and phospholipase A₂ activities

*p<0.05 vs group II

**p<0.05 vs group III

***p<0.05 vs group I, II, III

正常値は 15 ± 13 U/ml であったが各群とも肺炎作成後有意に上昇し、特に phospholipase A₂ 肺炎における上昇が著しく、肺炎作成後 1 時間目ですでに 201 ± 86 U/ml と著明に上昇し、6 時間目には 231 ± 65 U/ml と peak に達し、12 時間目では 211 ± 61 U/ml と高値を維持し以後低下した。ついで胆汁性肺炎における上昇が著明で 1 時間目に 37 ± 25 U/ml と上昇し、12 時間目では 113 ± 38 U/ml と peak に達した。trypsin 肺炎では 1 時間目に 31 ± 10 U/ml と上昇し以後経時的に上昇して 18 時間目では 88 ± 10 U/ml に達した。lipase 肺炎では 1 時間目に 27 ± 12 U/ml となり以後経時的に上昇し 18 時間目には 95 ± 20 U/ml と高値を示した。各群の推移を比較すると phospholipase A₂ 肺炎では 18 時間目を除いて、いずれの時期でも他の 3 群に比し有意の高値をとったが、胆汁性肺炎でも肺炎

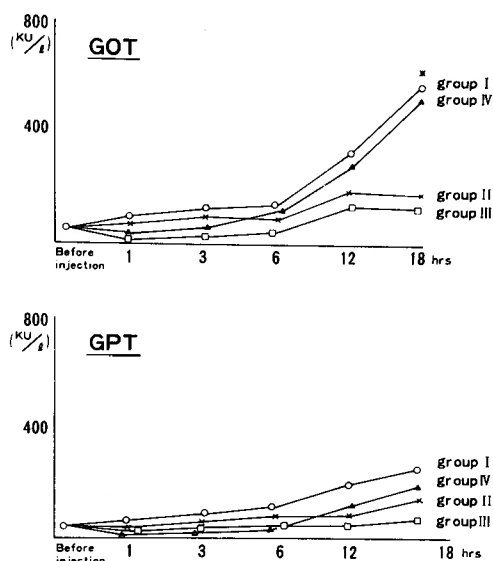


Fig. 2. Changes of serum transaminase activities
*p<0.05 vs group III

作成後 3, 6 時間目の活性値は trypsin 肺炎に比し有意に高値を示した。

2. 血液生化学的变化 (Fig. 2, Fig. 3)

血清の GOT, GPT, LDH は各群とも肺炎作成後徐々に上昇し、12 時間目からは group I 胆汁性肺炎及び group IV phospholipase A₂ 肺炎では前値に比し

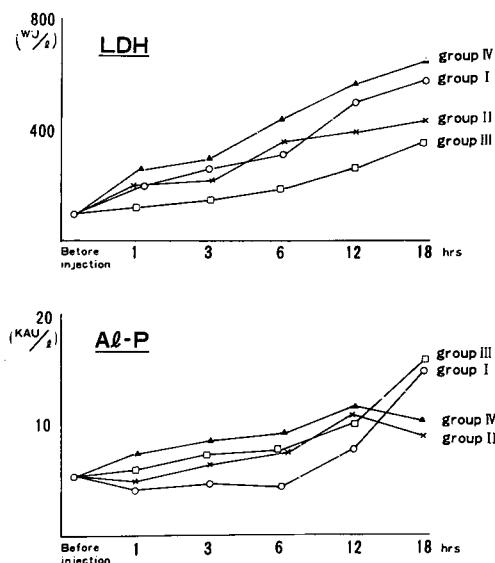


Fig. 3. Changes of serum lactic dehydrogenase and alkaline phosphatase activities

Table 3. Histological findings of the pancreas in experimental acute pancreatitis

Experimental groups	parenchyma			Interstitium		Leukocyte infiltration	Fat necrosis
	coagulation necrosis	liquefaction necrosis	hemorrhage	edema	hemorrhage		
I : bile p.	++ ~ ++	- ~ +	- ~ +	+ ~ ++	+ ~ ++	+ ~ ++	++ ~ ++
II : trypsin p.	- ~ +	+ ~ ++	+ ~ ++	++ ~ ++	++ ~ ++	+ ~ ++	- ~ +
III : lipase p.	- ~ +	- ~ +	- ~ +	++ ~ ++	+ ~ ++	++ ~ ++	- ~ +
IV : phospholipase A ₂ p.	++ ~ ++	- ~ +	+ ~ ++	+ ~ ++	+ ~ ++	++ ~ ++	++ ~ ++

- no change ++ moderate
+ slight +++ severe

有意の上昇を示し、かつ group II trypsin 肺炎、group III lipase 肺炎に比し高値を示す傾向がみられたが各群間で有意の差はなかった。Al-p は肺炎作成

後早期では変動が少なく、12時間後より上昇はじめたが各群間で有意の差は認められなかった。

3. 組織学的変化

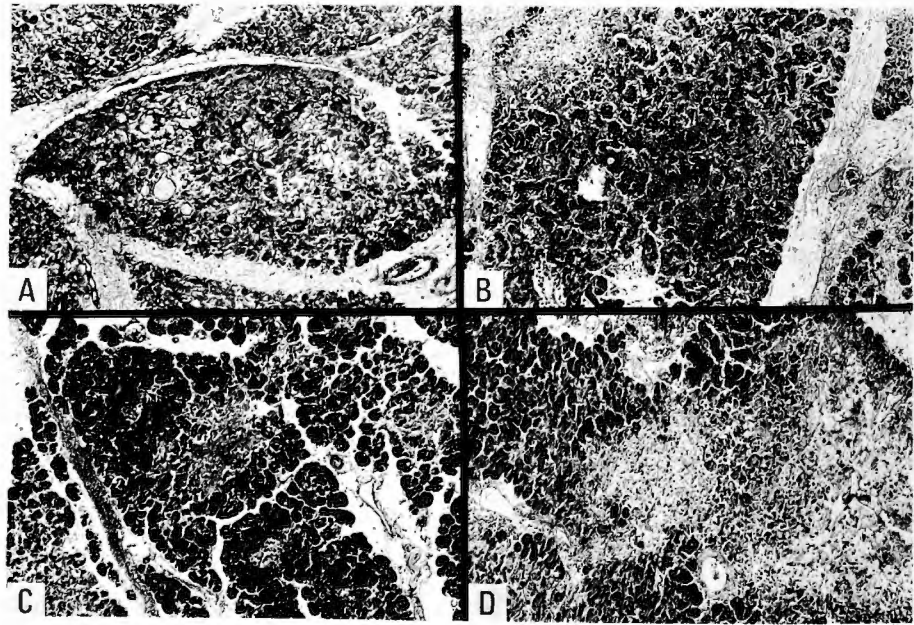


Fig. 4. Histological findings of the pancreas, 18 hours after induction of experimental acute pancreatitis (HE x 200)
A: Group 1, with autologous bile, shows extensive parenchymal necrosis
B: Group 2, with trypsin, shows severe interlobular congestion and localized parenchymal necrosis
C: Group 3, with lipase, shows mild interlobular congestion and localized parenchymal necrosis
D: Group 54, with phospholipase A₂, shows extensive parenchymal necrosis

Table 4. Histological findings of the liver in experimental acute pancreatitis

After induction of pancreatitis	Experimental groups	Intralobular area			Interlobular area		
		sinusoidal congestion	parenchymal necrosis	leukocyte infiltration	congestion	bile stasis	leukocyte infiltration
6 hrs	I : bile p.	- ~ +	-	-	- ~ +	-	-
	II : trypsin p.	+ ~ ++	-	-	+ ~ ++	-	-
	III : lipase p.	- ~ ++	-	-	- ~ +	-	-
	IV : phospholipase A ₂ p.	- ~ ++	-	-	- ~ +	-	-
12 hrs	I : bile p.	+ ~ ++	- ~ +	- ~ +	+ ~ ++	-	- ~ +
	II : trypsin p.	+ ~ ++	-	- ~ +	+ ~ ++	-	- ~ +
	III : lipase p.	+ ~ ++	-	- ~ +	- ~ +	-	+ ~ ++
	IV : phospholipase A ₂ p.	+ ~ ++	- ~ +	-	+ ~ ++	-	- ~ +
18 hrs	I : bile p.	++ ~ ###	++ ~ ###	++ ~ ###	++ ~ ###	-	+ ~ ++
	II : trypsin p.	++ ~ ###	- ~ +	- ~ +	++ ~ ###	- ~ +	- ~ +
	III : lipase p.	+ ~ ++	- ~ +	- ~ +	+ ~ ++	-	+ ~ ++
	IV : phospholipase A ₂ p.	++ ~ ###	++ ~ ###	+ ~ ++	+ ~ ++	-	+ ~ ++

- no change ++ moderate
+ slight +++ severe

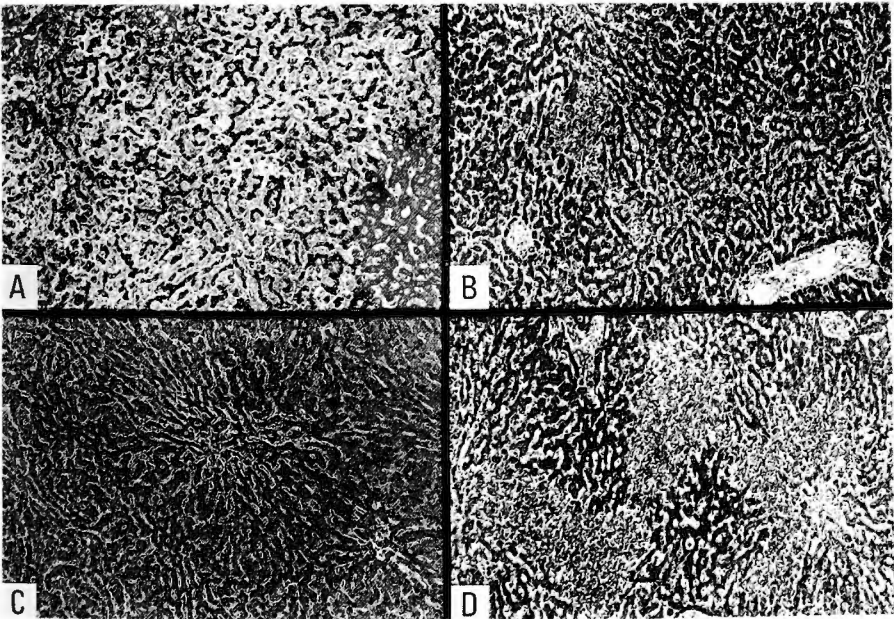


Fig. 5. Histological findings of the liver, 18 hours after induction of experimental acute pancreatitis (HE x 200)

- A: Group 1, with autologous bile, shows extensive liver cell degeneration and necrosis
- B: Group 2, with trypsin, shows marked sinusoidal congestion
- C: Group 3, with lipase, shows mild sinusoidal congestion
- D: Group 4, with phospholipase A₂, shows extensive liver cell degeneration and necrosis

i) 膵組織 (Table 3, Fig. 4)
死亡時に採取した膵組織の変化は胆汁性膵炎, phospholipase A₂ 膵炎では実質に斑状の凝固壊死巣やその周囲に好中球を主体とする炎症性細胞浸潤, 軽度の出血を認め, また脂肪壊死も著明に認められたが間質の浮腫, 出血は軽度であった. trypsin 膵炎では実質に軽度の融解壊死巣を認めたが脂肪壊死は殆んど認められず間質の浮腫, 出血が著明であった. lipase 膵炎では実質の変化は軽度であり, 脂肪壊死巣も殆んど認められなかったが間質の浮腫や細胞浸潤は著明であった.

ii) 肝組織 (Table 4, Fig. 5)
膵炎作成後6時間目の肝組織の変化は各群とも類洞の軽度のうっ血を認めるのみで肝細胞の変化は認められなかった. 12時間目では各群とも類洞やグリソン鞘域のうっ血が強くなり, 僅かながら炎症性細胞浸潤も出現し, 胆汁性膵炎と phospholipase A₂ 膵炎では肝細胞の軽度の変性や萎縮が認められた. 18時間目では各群とも著明なうっ血が続いており, 炎症性細胞浸潤が増強し, さらに胆汁性膵炎, phospholipase A₂ 膵炎では著明な肝細胞の変性, 壊死が認められたが trypsin 膵炎, lipase 膵炎では肝細胞の変化は軽度であった.

B. 実験的胆汁性膵炎に対する CDP-choline の効果

1. 生存時間 (Fig. 6)
CDP-choline 非投与群の生存時間は膵炎作成後13時間から23時間, 平均 16.0 ± 4.0 時間であり, CDP-

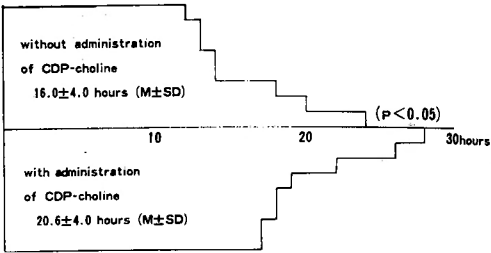


Fig. 6. Survival time in bile pancreatitis

choline 投与群では18時間から25時間, 平均 20.6 ± 4.0 時間であって CDP-choline 投与群では非投与群に比し生存時間の有意の延長が認められた.

2. 血中酵素活性の変化

i) 血清 amylase 活性 (Table 5): 正常値は 2500 ± 749 IU/ml であり, CDP-choline 非投与群, 投与群とも膵炎作成後有意の上昇を示したが両群間で有意の差を認めなかった.

ii) 血清 trypsin 活性 (Table 5): 正常値は 7 ± 3.7 U/ml であり CDP-choline 非投与群, 投与群とも膵炎作成前後で著変なく, また両群間で有意の差を認めなかった.

iii) 血清 trypsin inhibitor (Table 5, Fig. 7): 正常値は 0.78 ± 0.23 mg trypsin/ml であったが膵炎作成後は両群とも低下し, CDP-choline 非投与群では3時間目に 0.44 ± 0.26 mg trypsin/ml と有意に低下したが CDP-choline 投与群では6時間目にはじめて 0.56 ± 0.11 mg trypsin/ml と前値に比し有意に低下し,

Table 5. Changes of serum amylase, trypsin and trypsin inhibitor activities in bile pancreatitis

Activities in the serum	Experimental groups	Before injection	Hrs after induction of pancreatitis.				
			1	3	6	12	18
Amylase IU/ml	CDP (—)	2500 ± 749 35	5175 ± 1732 8	6238 ± 2605 8	7023 ± 3327 8	7254 ± 3285 8	5173 ± 2197 3
	CDP (+)		4887 ± 1741 8	6016 ± 1649 8	7268 ± 1978 8	8089 ± 1385 8	6153 ± 998 3
Trypsin U/ml	CDP (—)	7 ± 3.7 35	9 ± 2.6 8	7 ± 3.3 8	8 ± 4.1 8	8 ± 1.9 8	9 ± 3.8 3
	CDP (+)		6 ± 2.3 8	8 ± 3.9 8	7 ± 2.6 8	9 ± 3.7 8	8 ± 2.5 3
Trypsin inhibitor mg trypsin/ml	CDP (—)	0.78 ± 0.23 35	0.62 ± 0.29 8	0.44 ± 0.26 8	0.36 ± 0.14 8	0.25 ± 0.15 8	0.27 ± 0.05 3
	CDP (+)		0.65 ± 0.13 8	0.62 ± 0.13 8	0.56 ± 0.11 8	0.48 ± 0.10 8	0.43 ± 0.16 3

() : number of dogs
CDP (—) : without administration of CDP-choline
CDP (+) : with administration of CDP-choline

Table 6. Changes of serum lipase and phospholipase A₂ activities in bile pancreatitis

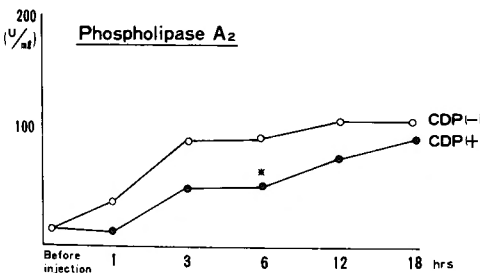
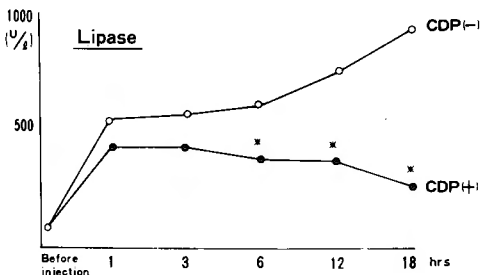
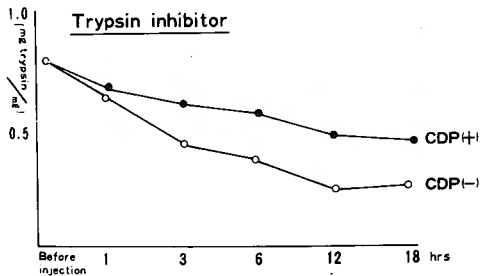
Activities in the serum	Experimental groups	Before injection	Hrs after induction of pancreatitis.				
			1	3	6	12	18
Lipase (U/l)	CDP (-)	63±27 35	554±75 8	573±61 8	609±92 8	759±119 8	899±84 3
	CDP (+)		435±58 8	432±69 8	378±54 8	375±71 8	273±39 3
phospholipase A ₂ (U/ml)	CDP (-)	15±13 35	37±25 8	81±36 8	92±15 8	113±38 8	109±15 3
	CDP (+)		15±14 8	51±18 8	58±11 8	76±17 8	94±19 3

() : number of dogs

CDP (-) : without administration of CDP-choline

CDP (+) : with administration of CDP-choline

* p<0.05 vs CDP (-)

Fig. 7. Changes of serum trypsin inhibitor, lipase and phospholipase A₂ activities in bile pancreatitis

*p<0.05 vs CDP (-)

以後は両群とも死亡するまで低下を続けた。両群の推移を比較すると肺炎作成後3時間目からは CDP-choline 投与群に比し非投与群の低下が著しく、18時間目では非投与群 0.27±0.05 mg trypsin/ml, 投与群 0.43±0.16 mg trypsin/ml と最低値を示したがいずれも有意の差ではなかった。

iv) 血清 lipase 活性 (Table 6, Fig. 7): 正常値は 63±27 U/l であったが両群とも肺炎作成後有意に上昇し、肺炎作成後1時間目で CDP-choline 非投与群では 554±75 U/l と前値の8.8倍, CDP-choline 投与群では 435±58 U/l と前値の6.9倍に上昇し、以後 CDP-choline 非投与群では経時的に上昇を続けたが投与群では6時間以後次第に低下し、肺炎作成6時間以後では CDP-choline 投与群は非投与群に比し有意に低値を示した。

v) 血清 phospholipase A₂ 活性 (Table 6, Fig. 7): 正常値は 15±13 U/ml で肺炎作成後両群とも有意の上昇を示したが CDP-choline 非投与群では1時間目ですでに 37±25 U/ml と前値の2.5倍となって有意の上昇を示したが CDP-choline 投与群では1時間目の上昇はなく、3時間目になってはじめて 51±18 U/ml となり前値に比し有意の上昇を示した。また CDP-choline 非投与群では3時間以後も上昇を続けて12時間目に peak をとり 113±38 U/ml と前値の7.5倍に上昇したが CDP-choline 投与群では上昇が緩徐かつ軽度であり、18時間目にはじめて 94±19 U/ml と最高値をとったが前値の6.3倍にとどまった。特に肺炎作成6時間後の活性値は CDP-choline 投与群では非投与群に比し有意に低値を示した。

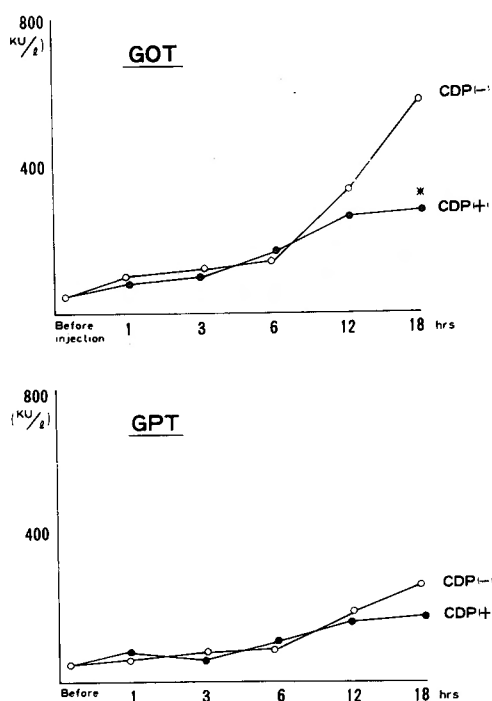


Fig. 8. Changes of serum transaminase activities in bile pancreatitis
* $p < 0.05$ vs CDP (-)

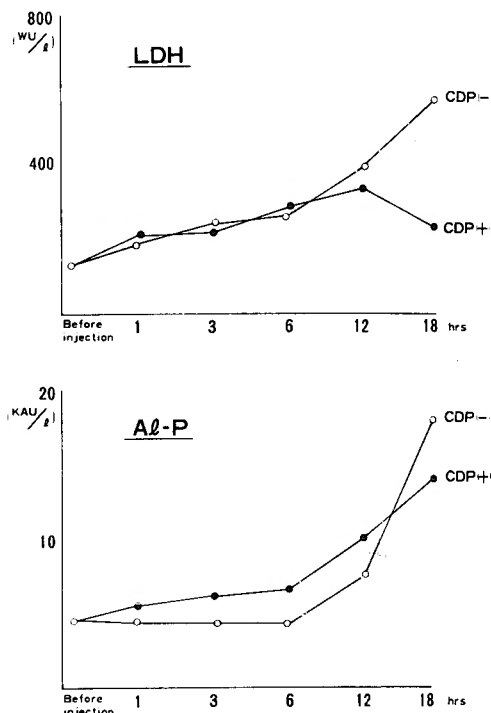


Fig. 9. Changes of serum lactic dehydrogenase and alkaline phosphatase activities in bile pancreatitis

3. 血液生化学的变化 (Fig. 8, Fig. 9)

血清 GOT, GPT, LDH は CDP-choline 非投与群で12時間以後に上昇したが投与群では軽度の上昇にとどまり、特に膵炎作成18時間後の GOT は CDP-choline 非投与群 586 ± 80 U/l, 投与群 278 ± 89 U/l と投与群の方が有意に低値をとった。Al-p は両群ともに12時間以後に前値に比し有意の上昇を示したが両群間では有意の差は認められなかった。

4. 組織学的変化 (Fig. 10)

i) 膵組織: 胆汁性膵炎作成12時間後に犠牲剖検を行って採取した膵組織では膵実質内に斑状または地図状に凝固壊死巣や脂肪壊死巣がみられたが CDP-choline 投与群では非投与群に比し、これらの変化が軽度であった。しかし間質の浮腫、出血などの変化は CDP-choline 投与、非投与の両群間で殆んど差を認めなかった。

ii) 肝組織: 膵炎作成6時間及び12時間後にみられた類洞のうっ血や肝細胞の軽度変性、細胞浸潤などの変化は CDP-choline 投与群、非投与群で殆んど差がみられなかった。膵炎作成18時間後では CDP-cho-

line 非投与群では著明な肝細胞の変性、壊死が認められたが CDP-choline 投与群ではこれらの変化は軽度であった。

考 察

急性膵炎は活性化した膵酵素の間質内逸脱による化学的自己消化がその病態生理の本態をなすものと考えられており、その発生機序としては1901年 Opie¹⁸⁾ の系統的研究以来、膵管性膵炎発生機序が重視されている。すなわち Vater 膨大部に嵌頓した結石のため総胆管と膵管とが共通管を構成し、感染胆汁が膵管内に逆流して急性膵炎を発生するという、いわゆる common channel theory である。しかし、実験的に膵管内に胆汁を注入して膵炎を作成するには過剰の注入圧や注入量が必要であり、一方膵管内圧は通常胆管内圧より高く、たとえ胆汁が膵管内に逆流した場合でも必ずしも膵炎を発生するとは限らないことから膵管閉塞や膵外分泌刺激による膵管内圧亢進という機械的因子が重視されるようになってきた²¹⁾。一方膵酵素は通常十二指腸に流入して enterokinase により活性化され

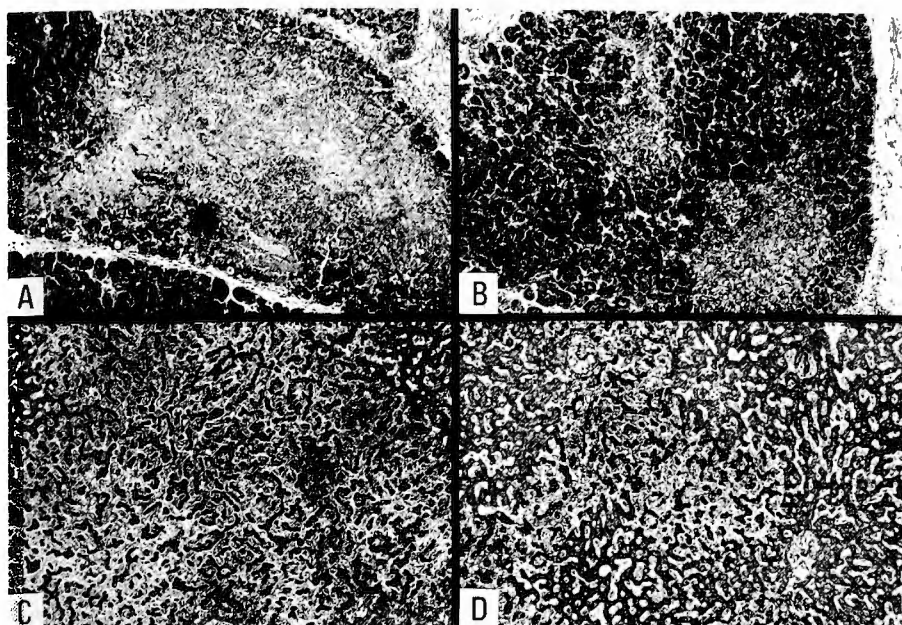


Fig. 10. Histological findings of the pancreas and the liver in experimental bile pancreatitis (HE×200)

- A: Pancreas, 12 hours after induction of pancreatitis without administration of CDP-choline, shows extensive parenchymal necrosis.
 B: Pancreas, 12 hours after induction of pancreatitis with administration of CDP-choline, shows localized parenchymal necrosis.
 C: Liver, 18 hours after induction of pancreatitis without administration of CDP-choline, shows marked liver cell degeneration and necrosis.
 D: Liver, 18 hours after induction of pancreatitis with administration of CDP-choline, shows mild liver cell degeneration and necrosis.

るといわれており、単に胆汁にふれるだけでは活性化されないといわれてきた。しかし最近、大川ら¹⁹⁾は実験的に直接膵管と胆管とを吻合して膵液を胆道内に流入せしめたところ膵液中の trypsin や elastase が活性化されたと報告しており、また教室の小倉¹⁷⁾、佐々木²³⁾らは胆汁と膵液とを混入するだけで phospholipase A₂ が活性化されることを明らかにしており、膵管性膵炎発生機序における胆汁の重要性が指摘されるところである。

急性膵炎の病態生理に關与する膵酵素としては古くから trypsin の重要性が指摘されてきたが trypsin 自体は細胞膜や生体組織には作用し難いこと⁴⁾、生体には trypsin inhibitor が豊富に存在し trypsin に拮抗していること⁸⁾、また実験的に膵管を破壊するほどの過剰な圧や量を注入するのでもなければ活性 trypsin を膵管内へ注入しても激症膵炎は発生し難いこと⁵⁾などから急性膵炎における trypsin の役割に疑問がもたれるようになり、最近では膵液中に豊富に存在する pho-

spholipase A₂ や elastase が注目されるようになっていく。

急性膵炎における phospholipase A₂ の関与に関しては、まず Creutzfeldt ら³⁾がラットやヒト膵炎組織中では trypsin 活性がみられず、膵内 lecithin の大部分が lysolecithin に転換していること、また実験的にラットの膵管内に胆汁酸とともに phospholipase A₂ を注入すると激しい膵炎を発生することなどを明らかにし、また本庄ら¹¹⁾は anoxia により膵腺房細胞の mitochondria に存在する phospholipase A₂ が活性化され、膵炎を発生してくることを明らかにしており、急性膵炎の発生における phospholipase A₂ の重要性を指摘している。一方、Hatao¹⁰⁾は実験的にイヌの膵管内に胆汁を注入して作成した急性膵炎では末梢血、門脈血、腹水や膵及び肝組織中に phospholipase A₂ 活性の著明な上昇を認め、その上昇が著明なもののほど重症で早期に死亡し、膵炎の重症度と関連があることを示して急性膵炎の病態生理における phospholipase

A₂ の重要性を明らかにしており、さらに最近でも Nevalainen¹⁶⁾ は急性膵炎における呼吸障害、循環障害、脳障害について phospholipase A₂ が重要な役割をもっていることを指摘している。すなわち phospholipase は細胞膜や各種 organella などの生体にとって重要な役割をはたしている膜構造の重要な構成成分をなしているリン脂質を特異的に分解し生体組織を破壊する作用があるが、特に C-2 位の脂肪酸エステル結合を特異的に分解する酵素は phospholipase A₂ と呼ばれ、生体内には可溶性と膜結合性の2種類が存在する¹⁴⁾。前者は膵液中の phospholipase A₂ で代表され、通常十二指腸に入って trypsin により活性化され、その消化酵素としての作用を現わす。後者の膜結合性 phospholipase A₂ は細胞膜や細胞内 organella の膜面に存在し、膜面でのリン脂質の代謝や機能を調整しており、カルシウムイオンによって活性化されるものが多い。急性膵炎の病態生理のうえでもこの二種の phospholipase A₂ が関与していることが明らかにされているが、本研究では主として膵性 phospholipase A₂ の急性膵炎における意義を検索した。なお elastase は elastin を選択的に分解する蛋白分解酵素の一つであり、膵腺房細胞から proelastase として分泌され、trypsin により活性化されて作用を現わし、膵炎の進展に重要な役割をもつことが明らかにされている^{6,7)}。本研究では脂質分解酵素に着目し、特に細胞膜の構成因子として重要な lecithin を選択的に破壊する phospholipase A₂ に注目して研究を行ったため elastase はとりあげなかった。

すなわち、イヌの膵管内に自家胆嚢胆汁、trypsin、lipase および phospholipase A₂ をそれぞれ注入して急性膵炎を作成し、血中各種酵素活性の変化や膵及び肝の組織学的変化を観察し、実験的急性膵炎における phospholipase A₂ の意義を検討した。その結果、血清 amylase 活性はいずれの実験群でも経時的に上昇したが各群間で有意の差は認められず、血清 trypsin 活性も trypsin 膵炎でのみ早期に上昇したが他の群では膵炎作成前後で著変を認めなかった。血清 trypsin inhibitor はいずれの実験群でも死亡するまで経時的に低下したが特に胆汁性膵炎における低下が著しかった。血清 lipase 活性は胆汁性膵炎、phospholipase A₂ 膵炎で経時的に上昇して高値をとり、trypsin 膵炎や lipase 膵炎より高値を示す傾向が認められた。血清 phospholipase A₂ 活性は当然のことながら膵管内 phospholipase A₂ 注入膵炎で著明な上昇が認められ

たが胆汁性膵炎でも膵炎作成早期から著明に上昇し、以後も trypsin 膵炎や lipase 膵炎に比し高値をとった。一方、膵や肝の組織学的変化は血清 phospholipase A₂ 活性が著明に上昇した phospholipase A₂ 膵炎と胆汁性膵炎で壊死性変化が強く、trypsin 膵炎や lipase 膵炎では変化は軽度であった。このことは phospholipase A₂ 膵炎や胆汁性膵炎では局所や血中に増加した phospholipase A₂ がその細胞膜破壊作用により膵細胞や肝細胞を障害し、これら重要臓器の壊死性変化が進行したものと考えることができる。

一方、急性膵炎に特徴的な所見として知られている脂肪壊死は従来膵炎で遊離し、局所並びに全身に撒布された lipase が中性脂肪を分解し、これにカルシウムが沈着して生ずるものと考えられてきたが、lipase を脂肪組織内へ注入しても脂肪壊死は発生せず、lecithinase を注入すると脂肪壊死を発生すること²⁰⁾ から脂肪組織の細胞膜を構成する lecithin が phospholipase により破壊されてはじめて脂肪細胞内の中性脂肪に lipase が作用し、脂肪壊死を発生するものと考えられるようになっている。本研究でも lipase 膵炎や trypsin 膵炎では脂肪壊死の発生は殆んど認められず、血清 phospholipase A₂ 活性が高値を示した胆汁性膵炎、phospholipase A₂ 膵炎では脂肪壊死が強く認められており、脂肪壊死における phospholipase A₂ の関与が指摘された。

つぎに、このように急性膵炎の発生、進展のうえで重要な役割をはたしている phospholipase A₂ 活性を抑制することが急性膵炎の治療につながるものと考えられる。しかるに膵外分泌由来の可溶性 phospholipase A₂ に対する阻害剤はこれまで知られていなかった。最近、Tykkä²⁵⁾ や Schröder ら²⁴⁾ は CaNa₂ EDTA や xylocaine, procaine などの有効性を指摘している。一方、本庄らは phospholipid の生合成にあずかる CDP-choline に着目して検討し、phosphoryl choline は膵 mitochondria の phospholipase A₂ を抑制しないが CDP-choline はこれを著明に抑制することを明らかにした。また橋平ら⁹⁾ は臨床的に急性膵炎に CDP-choline を投与し、血清 phospholipase A₂ 活性や血清 lysolecithin 濃度の減少と自覚症状の改善を認めたと述べている。最近、松田らは in vitro で CDP-choline の phospholipase A₂ 活性に対する阻害機序を検討し、その阻害形式は dose dependent であると報告している。本研究では胆汁性膵炎が血中酵素活性の変化や膵及び肝の組織学的変化のうえで

phospholipase A₂ と密接な関係にあることが明らかにされたので、さらに胆汁性膵炎を用いて CDP-choline の急性膵炎に対する効果を検討した。その結果、CDP-choline 投与群では平均生存時間が 20.6 ± 4.0 時間と非投与群の 16.0 ± 4.0 時間に比し有意に延長し、また血清 phospholipase A₂ 活性や lipase 活性も有意に低値をとった。血清 amylase 活性や trypsin 活性は CDP-choline 投与、非投与の両群間で差異を認めなかったが trypsin inhibitor は CDP-choline 投与群の方が低下が少ない傾向が認められた。また膵炎作成後 12 時間目に犠牲剖検して得た膵組織を光顕的に観察したところ CDP-choline 投与群では非投与群に比し膵実質の凝固壊死や脂肪壊死が軽度であり、また血清 GOT, GPT, LDH も低値をとる傾向を示し、肝細胞の萎縮、変性、壊死など肝の組織学的変化も軽度であり、CDP-choline の効果が観察された。

結 論

雑種成犬を用い、副膵管を結紮切離し、主膵管よりそれぞれ自家胆嚢胆汁、trypsin, lipase 又は phospholipase A₂ を注入した後、主膵管を結紮して実験的急性膵炎を作成し、血中各種酵素値の変動及び膵や肝の組織学的変化を検索し、さらに胆汁性膵炎に対する CDP-choline の効果を検討して以下の成績を得た。

A. 血中膵酵素活性並びに膵、肝の変化

1. 血清 amylase や trypsin は膵炎作成後上昇したが各群間で有意の差はなかった。
2. 血清 trypsin inhibitor は胆汁性膵炎、trypsin 膵炎、phospholipase A₂ 膵炎で著明に低下したが、lipase 膵炎における低下は比較的軽度であった。
3. 血清 lipase 活性は胆汁性膵炎、phospholipase A₂ 膵炎で経時的に上昇して高値をとったが、trypsin 膵炎や lipase 膵炎では前 2 者に比して低値を示した。
4. 血清 phospholipase A₂ 活性は phospholipase A₂ 膵炎で著明に上昇し、胆汁性膵炎でも高値を示したが、trypsin 膵炎や lipase 膵炎では前 2 者に比して低値をとった。
5. 組織学的に膵は胆汁性膵炎や phospholipase A₂ 膵炎で実質の凝固壊死が著明で脂肪壊死も強く、壊死性膵炎の像を呈した。trypsin 膵炎では膵実質は軽度の融解壊死を示したが間質の出血が主であった。lipase 膵炎では膵の変化が最も軽度で実質壊死は殆んど認められず、間質の浮腫が主であった。肝の変化は膵炎作成後 6 時間では各群とも類洞のうっ血が主で

あり、胆汁性膵炎や phospholipase A₂ 膵炎では 12 時間目より肝細胞に軽度の変性、壊死が出現し、18 時間目には著明な壊死性変化が認められるようになった。trypsin 膵炎や lipase 膵炎では 18 時間目でも類洞のうっ血が主であり、肝細胞の変性は軽度であった。

以上、胆汁性膵炎では血中膵酵素活性の変化や膵及び肝の組織学的変化からみて phospholipase A₂ と密接な関係にあることが指摘された。

B. 胆汁性膵炎に対する CDP-choline の効果

胆汁性膵炎に CDP-choline を投与すると平均生存時間は有意に延長し、血清 phospholipase A₂ や lipase 活性は有意に抑制され、血清 GOT, GPT, LDH の上昇は軽度で、組織学的にも膵実質の壊死や肝細胞の変化が軽度となる傾向が認められ、CDP-choline の効果が観察された。

稿を終るにあたり、御指導御校閲を賜った水本龍二教授に深甚なる謝意を表するとともに御協力頂いた三重大学第一外科、日高直昭講師をはじめ研究室の諸先生に感謝致します。尚本論文の要旨は第 68 回日本消化器病学会総会において発表した。また本研究の一部は昭和 56 年度科学研究費補助金（奨励研究、A）、課題番号 56770595）によった。

文 献

- 1) Beck IT, Pinter EJ, et al: The role of pancreatic enzymes in the pathogenesis of acute pancreatitis. II The fate of pancreatic proteolytic enzymes in the course of acute pancreatitis. *Gastroenterology* **43**: 60-70, 1962.
- 2) Creutzfeldt W, Schmidt H, et al: The pathogenesis of pancreatitis. *Proc 3rd World Congress of Gastroenterology, TOKYO*, vol 314-317, 1966.
- 3) Creutzfeldt W, Schmidt H: Aetiology and pathogenesis of pancreatitis (Current Concept): *Scand J Gastroent Suppl* **6**: 47-62, 1970.
- 4) Dragstedt LR, Haymond HE, et al: Pathogenesis of acute pancreatitis (Acute pancreatic necrosis) *Arch Surg* **28**: 232-291, 1934.
- 5) Elmslie R, White TT: An investigation into trypsin in the pancreaticobiliary tree. *Brit J Surg* **53**: 586-593, 1966.
- 6) Geokas MC, Murphy DR, et al: The role of elastase in acute pancreatitis. I Intrapaneatic elastolytic activity in bile induced pancreatitis in dogs. *Arch Path* **86**: 117-126, 1968.
- 7) Geokas MC: The role of elastase in acute pancreatitis II Intrapaneatic elastolytic activity in trypsin induced acute pancreatitis in dogs. *Arch Path* **86**: 127-134, 1968.
- 8) Haberback BJ, Dyce B, et al: Trypsin, trypsinogen and trypsin inhibitor in human pancreatic

- juice. *Am J Med* **29**: 424-433, 1960.
- 9) 橋平成章, 森 立輔, 他: 膵炎におけるリン脂質代謝について, Phospholipase A に対する CDP-choline の効果. *日本臨床* **28**: 126-177, 1971.
- 10) Hatao M: On etiology and pathophysiology of acute pancreatitis with special reference to participation of phospholipase A. *Arch J Chir* **38**: 76-106, 1969.
- 11) 本庄一夫, 小沢和恵, 他: 膵炎治療の問題点. *臨床外科* **23**: 13-23, 1968.
- 12) 本庄一夫, 高三秀成, 他: 膵及び肝障害時における Nicholin の治療効果. *実験治療* **44**: 81-82, 1969.
- 13) 松田泰樹, 小川道雄, 他: ヒト膵 Phospholipase A₂ 活性に対する CDP-choline の阻害機序および阻害効果の検討. *薬理と治療* **10**: 53-61, 1982.
- 14) 水本龍二, 日高直昭, 他: 急性膵炎における Phospholipase A₂ とその効果. *胆と膵* **3**: 875-881, 1982.
- 15) 水本龍二: 急性膵炎の病態生理. *日臨外会誌* **29**: 115-117, 1968.
- 16) Nevalainen TJ: The role of phospholipase A₂ in acute pancreatitis. *Scand J Gastroent* **15**: 641-650, 1980.
- 17) 小倉嘉文: 膵液胆道内逆流の実験的研究. 一特に肝胆道系に及ぼす効果について. *日外会誌* **84**: 141-149, 1983.
- 18) Opie EL: The relation of cholelithiasis to disease of the pancreas and to fat necrosis. *Am J Med Sci* **121**: 27-43, 1901.
- 19) 大川治夫, 澤口重徳, 他: 膵管胆管合流異常モデルの研究. I 犬モデルの作成及びその病変の研究. *日小外会誌* **17**: 13-21, 1981.
- 20) Panabokke RG: An experimental study of fat necrosis. *J Path Bact* **75**: 319-331, 1958.
- 21) Popper HL: Transition of pancreatic edema into pancreatic necrosis. *Surg Gyne Obst* **87**: 79-82, 1948.
- 22) Preiser H, Maestracci D, et al: Modification of an assay for trypsin and its application for the estimation of enteropeptidase. *Clin Chim Acta* **59**: 169-175, 1975.
- 23) 佐々木英人: 膵液胆道内逆流の閉塞性黄疸に及ぼす効果. *日外会誌* **83**: 473-485, 1982.
- 24) Schröder T, Kinnunen PKJ, et al: Xylocaine treatment in experimental pancreatitis in pigs. *Scand J Gastroent* **13**: 863-865, 1978.
- 25) Tyykka H, Mahlberg K, et al: Phospholipase A inhibitors and their possible clinical use in the treatment of acute pancreatitis. *Scand J Gastroent* **15**: 519-528, 1980.
- 26) Zieve L, Vogel WC, et al: Measurement of lecithinase A in serum and other body fluids. *J Lab Clin Med* **57**: 169-175, 1975.