

セルレイン膵炎時の膵外分泌機能に対する プロスタグランディン E₂ の保護効果

京都大学第一外科

安東 勝宏, 真辺 忠夫, 戸部 隆吉

〔原稿受付: 平成 4 年 2 月 4 日〕

Protective Effect of Prostaglandin E₂ on Cerulein-Induced Rat Pancreatitis

KATSUHIRO ANDO, TADAO MANABE and TAKAYOSHI TOBE

First Department of Surgery, Faculty of Medicine, Kyoto University

In order to clarify the effect of prostaglandine E₂ (PGE₂) on cerulein-induced rat pancreatitis, we investigated the interaction of PGE₂ with cerulein or secretin. Intravenous infusion of 10 $\mu\text{g}/\text{kg} \cdot \text{h}$ cerulein inhibited external secretion of the pancreas from one hour and caused macroscopic edema at 3 hours. Administration of PGE₂ relieved the inhibitory effect of supramaximal dose of cerulein and decreased the pancreatic edema. The 100 $\mu\text{g}/\text{kg} \cdot \text{hr}$ PGE₂ had no significant effect on the pancreatic juice volume and amylase secretion stimulated with 0.2 $\mu\text{g}/\text{kg} \cdot \text{hr}$ of cerulein. Intravenous injection of 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ PGE₂ inhibited both the volume and amylase secretion of pancreatic juice stimulated with 1 U/kg $\cdot \text{h}$ of secretin.

The protective effect of PGE₂ on cerulein-induced pancreatitis was not the stimulation on secretin but caused the cytoprotective effect of PG such as stabilization of cytoplasmic and lysosomal membrane.

はじめに

消化性潰瘍に対する prostaglandin の保護効果¹⁻⁵⁾はよく知られており、急性膵炎に対しても抑制効果を示すという報告も多いが⁶⁻⁹⁾、その作用機序に関しては未だ明かではない。また膵外分泌に関しても Dog, Rat では secretin 刺激下の膵液量、重炭酸分泌を抑制⁷⁻¹⁰⁾し、酵素分泌は抑制^{3), 10)}または刺激^{7), 11)}し、CCK の作用を in vivo で刺激^{7), 11)}するが³⁾、in vitro では抑制¹¹⁾す

る。Cat においては膵外分泌機能に影響しないとする報告や¹³⁾、in vivo, in vitro で secretin に対する効果が異なる¹²⁾という報告があり PG の作用は種差、実験系により一定していない。今回ラットセルレイン膵炎を用い膵外分泌動態に対する prostaglandin E₂ (PGE₂) の影響を検討し、ホルモンとの相互作用を明らかにするために、secretin および half-maximal dose の cerulein 刺激下の膵外分泌に及ぼす PGE₂ の効果を検討した。

Key words: Prostaglandin E₂, Cerulein-Induced Pancreatitis, External Secretion.

索引語: プロスタグランディン E₂, セルレイン膵炎, 膵外分泌.

Present address: First Department of Surgery, Faculty of Medicine, Kyoto University, Kyoto 606, Japan

実験方法

全ての実験には SD 雄性ラット (体重 280~360 g) を用い一晩の絶食後実験に供した。

In vivo study

Pentobarbital 50 mg/kg の腹腔内麻酔下に正中切開にて開腹, 十二指腸側より胆膵共通管内に polyethylene tube: PE-10 (Cley Adams, USA) を挿入し共通管の肝臓側は結紮した。胆汁は肝門部に胆管内に挿入した polyethylene tube: PE-50 の対側を球部より十二指腸内に挿入し内瘻化した。更に膵液を戻すために、もう 1 本 tube を十二指腸内に挿入しこの tube より、あらかじめ他のラットより胆汁膵液として採取し、凍結保存しておいたものを infusion pump を用いて 0.2 ml/h の速度で注入した。2 本の PE-50 の先端は Vater 乳頭部付近に来るような位置で固定した (図 1)。膵液採取用 tube 及び胆汁膵液注入用 PE-50 は側腹部より対外に導いた。膵液採取用 tube 自由端に glass

pipet: microtube (Drummond, USA) を取り付け 10 分毎に交換し純粋膵液を採取し膵液量、膵液中アミラーゼを測定した。静脈ルートは左外頸静脈に PE-50 を留置し確保し、pentobarbital の追加による麻酔下に以下の実験を行った。操作終了後 30~60 分の安定期間を置き、40 分間の基礎分泌を測定した後、以下の実験をおこなった。

- ① cerulein ($10 \mu\text{g}/\text{kg} \cdot \text{h}$) 3 時間 ($N=6$)
cerulein ($10 \mu\text{g}/\text{kg} \cdot \text{h}$) + PGE_2 ($100 \mu\text{g}/\text{kg} \cdot \text{h}$) 3 時間 ($N=6$)
 - ② cerulein ($0.2 \mu\text{g}/\text{kg} \cdot \text{h}$) に対する PGE_2 の効果 ($N=5$)
 - ③ secretin $1 \text{ U}/\text{kg} \cdot \text{h}$ 刺激 ($N=4$)
secretin $1 \text{ U}/\text{kg} \cdot \text{h}$ + PGE_2 $100 \mu\text{g}/\text{kg}$ oneshot 静注 ($N=4$)
 - ④ normal control 群 ($N=4$) には 0.9% NaCl を持続注入した
- 3 時間の注入終了後直ちにラットを屠殺し血液と一

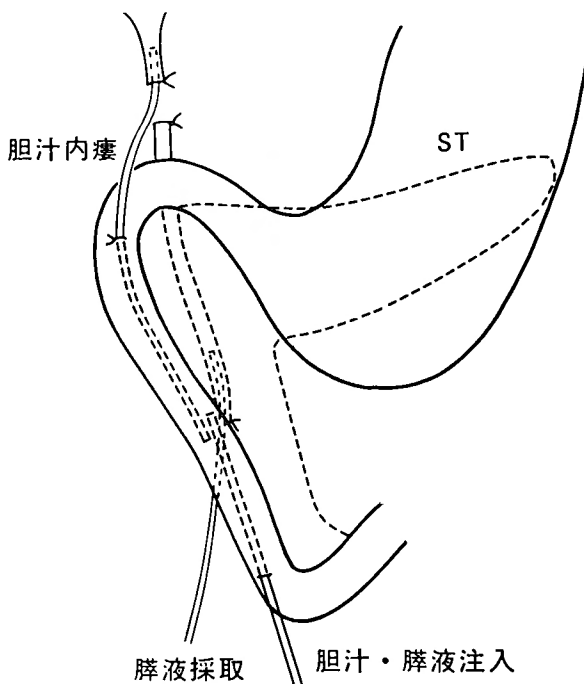
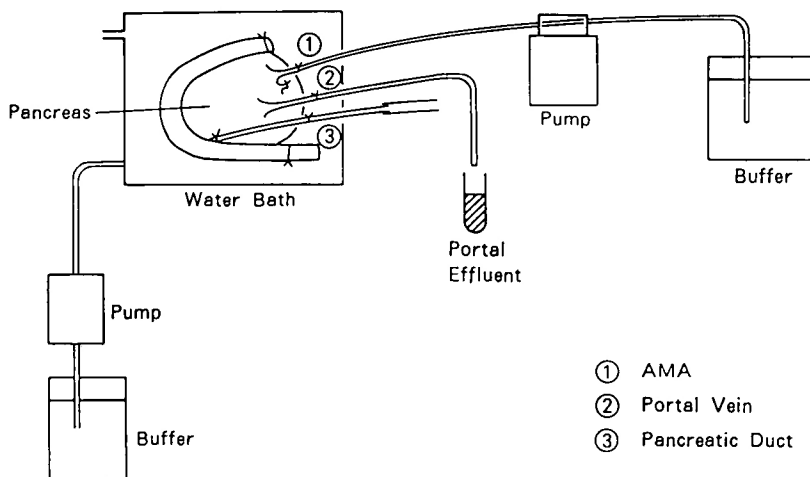


図 1 In vivo model

- ①: 膵液採取用に polyethylene tube: PE-10 を膵管内に留置
- ②: 胆汁内瘻化のため PE-50 を先端が Vater 乳頭付近にくるような位置で固定
- ③: 体外より膵液注入用に十二指腸内に挿入



Buffer : KRBB

+4.3% Dextran T70

+0.25% BSA with 95% O₂ and 5% CO₂

図2 In vitro system

① AMA: 前腸間膜動脈 ② 門脈 ③ 胆膵共通管

定部位の膵組織を採取し重量を測定(湿重量)した後70°Cで72時間乾燥させ重量(乾重量)を測定し、乾/湿重量比を求め浮腫の指標とした。

In vitro study

Toyota らの方法¹⁴⁾をもとに若干の変更を加え¹⁵⁾、遊離灌流膵モデルを作成した。灌流液はCO₂ 5%, O₂ 95%の混合ガスで飽和させた後、4.3% dextran T-70 (Pharmacia, Sweden), 0.25% bovine serum albumin (Sigma, USA) 及び2.8 mM glucoseを含むKRBBを用いperistaltic pumpにて2 ml/minの速度で前腸間膜動脈より注入し、門脈より回収した。胆膵共通管の十二指腸側は結紮し、末梢側よりPE-10 tubeを挿入しmicrotubeにて膵液を採取した。約30分の安定期間後20分の基礎分泌を採取し更に40分間secretin 10⁻¹⁰ M+PGE₂ 500 µg/Lを含むbufferで刺激し膵液の反応を調べた(図2)。

secretin は porcine secretin (Sigma, USA), PEG₂ は安定性のあるPGE₂ のβ-cyclo-dextrin (β-CD) 包接化合物(小野薬品より提供)を使用し投与量はPGE₂ の量で示した。

アミラーゼ活性はblue starch 法¹⁶⁾(アミラーゼテストA, シオノギ製薬)にて測定した。

測定値はmean±SEMで表示し、Student's t-testにて危険率0.05%以下を有意差ありとした。

結 果

In vivo study

normal control 群では、3時間40分の測定中膵液量、膵液中アミラーゼ分泌量共に安定しており膵液 diversion による影響は無視できた。cerulein 10 µg/kg・h 単独投与群では3時間の時点で、膵には著明な浮腫が見られたのに対しPGE₂ 投与群では肉眼的に浮腫は抑えられており、膵の乾/湿重量比の比較でもcerulein 群が16.4±3.9%であったのに対し、PGE₂ 投与群で

表1 Cerulein 10 µg/kg・h (+PGE₂ 100 µg/kg・h) 及び Control 群の注入終了時点で血液、膵組織を採取、膵は重量(湿重量)測定後70°Cで72時間乾燥後再度重量を測定(乾重量)し乾/湿重量比を浮腫の指標とした。

	Control (N=4)	Cerulein (N=6)	Cer+PGE ₂ (N=5)
Serum Amylase (IU/L)	4520±314	13000±5480**	12890±2676**
Dry/Wet Weight (%)	31.2±1.2	16.4±3.9**	23.9±5.4*,†

MEAN±SD

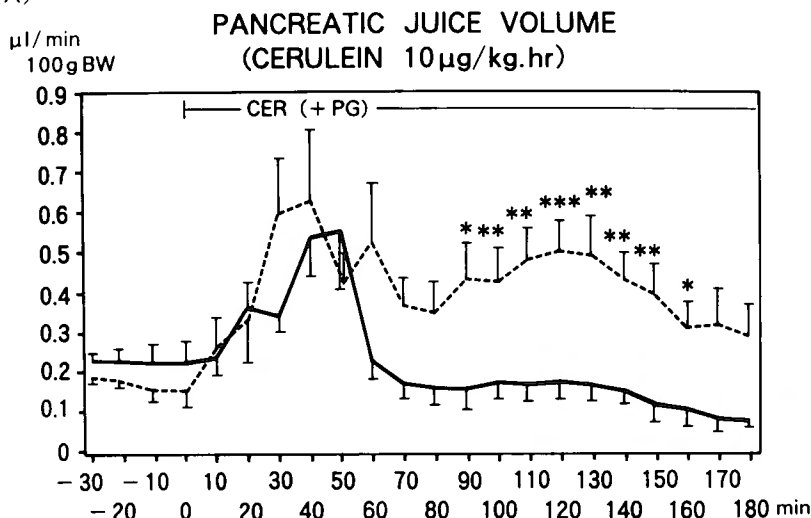
* P<0.05 vs control ** P<0.01 vs control

† P<0.05 vs Cerulein

23.9±5.4%と浮腫はPGE₂投与群で有意に抑制されたが、血清アミラーゼには両群間に有意差を認めなかった(表1)。cerulein群ではcerulein注入開始後一過性に膵液量が増加し1時間後より basal level 以下に抑制

され3時間の時点で一部ラットではほぼ完全に抑制されたが、PGE₂投与群ではこの間も膵液分泌は維持された。膵液中アミラーゼ分泌に関しても同様に PGE₂は supramaximal dose の cerulein による抑制作用を有

(A)



(B)

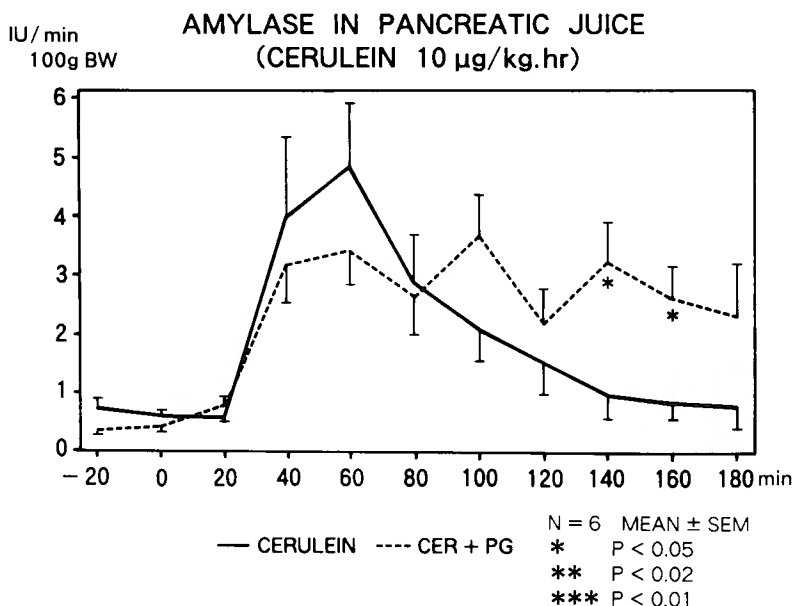


図3 (A): 膵液量 (μ l/min) (B): 膵液中アミラーゼ分泌量 (IU/min) いずれもラットの体重 100 g 当りで補正。実線は cerulein 10 μ g/kg $\cdot$ h 投与群、破線は cerulein+PGE₂ 100 μ g/kg $\cdot$ h 投与群を表す PGE₂は cerulein による膵液分泌抑制効果を、液量、酵素分泌ともに有意に軽減させた。

意に阻止した (図 3)。

half-maximal dose の cerulein 0.2 $\mu\text{g}/\text{kg} \cdot \text{h}$ 注入開始後膵液分泌量が充分安定化した80分の時点で cerulein に PGE₂ 100 $\mu\text{g}/\text{kg} \cdot \text{h}$ を加えると約30分間に渡って液量, 膵液中アミラーゼ分泌量の一過性の増加傾向を認めたが, 統計的には有意差を認めなかった (図 4)。

secretin 1 U/kg $\cdot$ h の注入開始後80分で膵液分泌量は peak に達し以後安定した。この時点で PGE₂ 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ を静注すると膵液量は徐々に減少し40分で最大抑制をうけ, その後40分で回復したが, 膵液中アミラーゼ分泌に対する抑制効果は遷延した (図 5)。

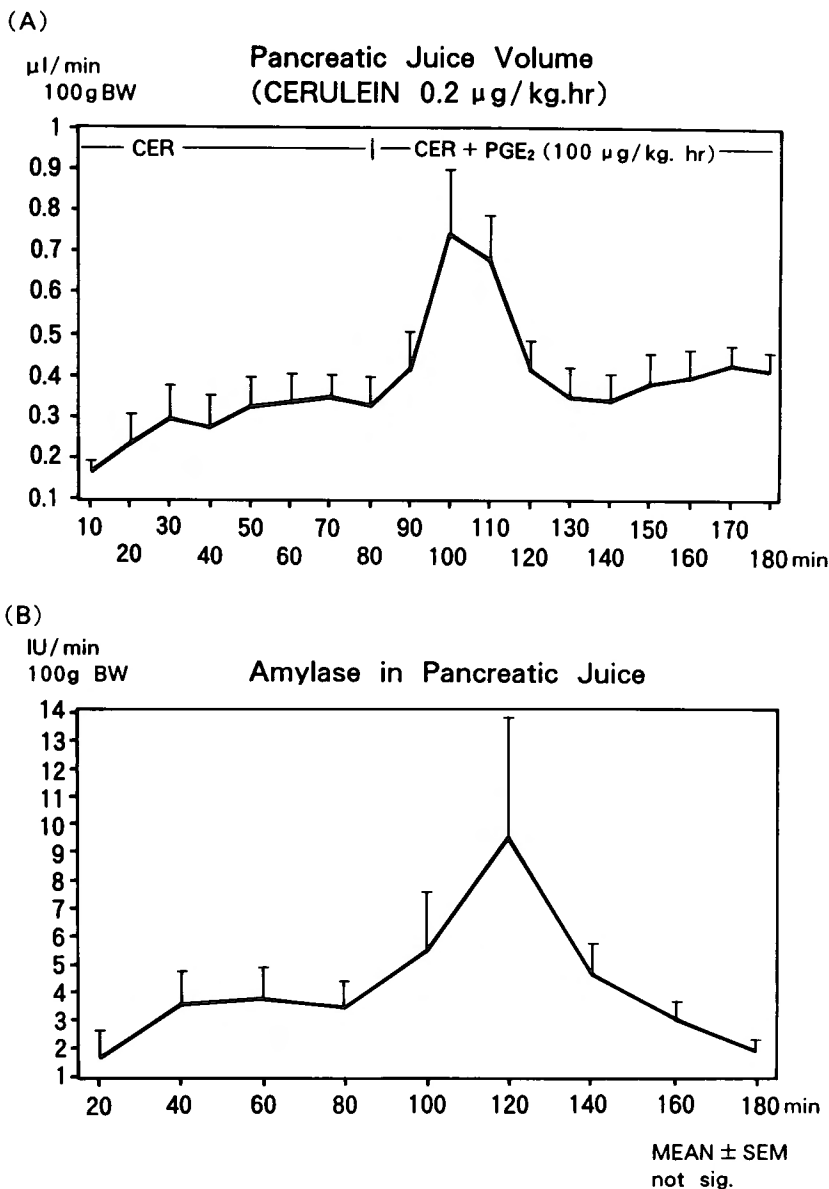


図 4 cerulein 0.2 $\mu\text{g}/\text{kg} \cdot \text{h}$ の刺激開始後膵液分泌が十分に安定した80分の時点で cerulein に PGE₂ 100 $\mu\text{g}/\text{kg} \cdot \text{h}$ を追加. (A) 膵液量, (B) 膵液中アミラーゼ共に一過性に加するが統計的には有意差を認めなかった。

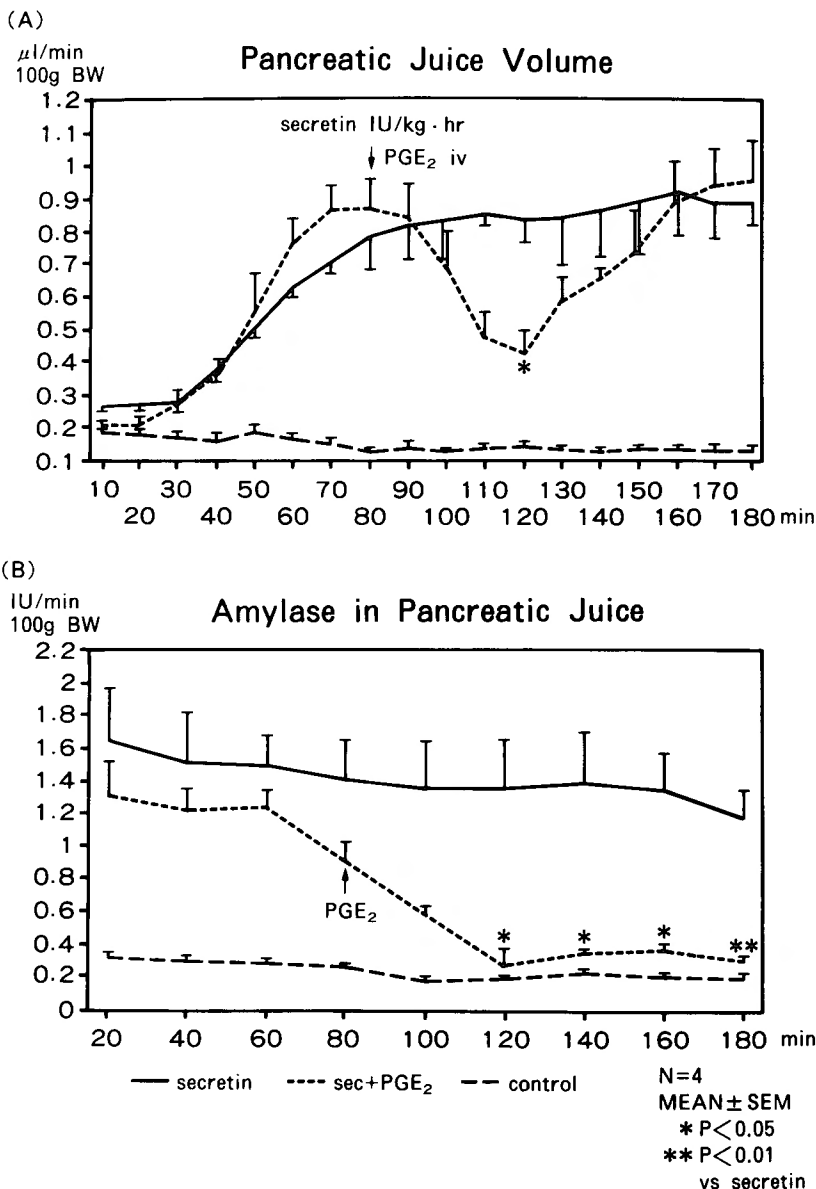


図5 secretin 1 U/kg·h 刺激開始後分泌の安定した80分の時点で PGE₂ 100 $\mu\text{g/kg}$ を静注。PG 投与後40分で (A) 胰液量, (B) 胰液中アミラーゼ共に有意に抑制され液量はその後約40分で回復したが酵素分泌の回復はそれより遷延した。

in vitro study

secretin 10^{-10} M 群 (N=6), secretin 10^{-10} M + PGE₂ 500 $\mu\text{g/L}$ 群 (N=6) に於て basal level の胰液量に差はなく両群共に刺激後胰液量は増加したが、secretin + PGE₂ 群では secretin 単独群と比べ液量の増加は有

意に低下した (図6)。

考 察

In vivo で胰外分泌機能を評価する際ラットに於ては胰液の diversion の影響が強いが、採取した胰液の

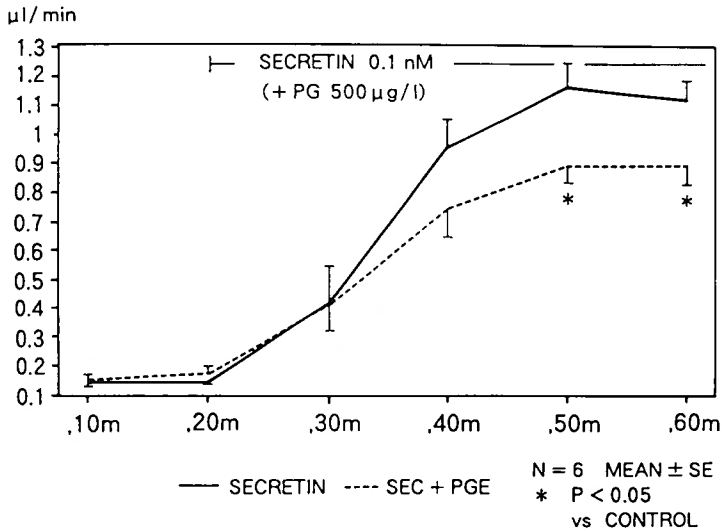


図6 遊離血流膵による secretin に対する PGE_2 の効果. 約30分の preperfusion 後20分間 basal secretion を採取し secretin 10^{10} M (実線) 及び secretin + PGE_2 500 μ g/L (破線) を含んだ Buffer で刺激. PG は secretin による膵液分泌量の増加を有意に抑制した.

10%を十二指腸に戻すことにより luminal feed-back regulation が正常に保たれると言われている¹⁷⁾. 今回我々はあらかじめ他のラットより採取し凍結保存しておいた胆汁膵液を 0.2 ml/h 十二指腸内へ注入することにより normal control 群に於て, 4時間以上に渡って充分安定した膵液分泌が得られた.

ラットの膵外分泌反応に関する報告では, PGE_2 は secretin 刺激下の膵液量, 膵酵素分泌は抑制¹⁰⁾, 十二指腸の還流による実験では PGE_2 は CCK の作用を増強¹¹⁾ したと報告されている. 今回の実験では PGE_2 は in vivo で secretin 刺激下の膵液量, 酵素分泌を抑制し in vitro に於いても膵液量を減少させたが CCK の analogue である cerulein, half-maximal dose の刺激に対して有意な影響を与えなかった. 3時間の supramaximal dose の cerulein 単独投与で膵に肉眼的浮腫を認めたが, PGE_2 を cerulein と同時投与することにより, 膵液分泌が有意に増加し浮腫も有意に軽減したことから, PGE_2 が膵腺房からの膵液分泌機構を安定化させることにより膵液分泌維持作用を介してセルレイン膵炎に対して保護的に作用したと考えられる. セクレチンのセルレイン膵炎に対する予防, 治療効果を認める報告はあるが^{18,19)}, PGE_2 はセクレチンの作用を抑制していることからセクレチンを介した分泌維持作用でないと考えられた.

Prostaglandin の receptor は明らかにされていないが,

細胞膜にあり GTP 結合蛋白を介して adenylyl cyclase を刺激 (G_s), 抑制 (G_i), する以外に Ca^{2+} channel (G_o) を抑制している可能性もあるといわれている²⁰⁾. また子宮筋細胞²¹⁾, 腎尿細管細胞²²⁾ では複数の receptor が存在し直接的に作用するものと, ホルモンの作用を修飾する receptor が存在しこれらの親和性が異なる可能性が示唆されている. 今回の実験では 100 μ g/kg の PGE_2 は膵房細胞に於いて抑制性G蛋白を介してセクレチンの作用を抑制する作用が主であると考えられる. PGE_2 の作用の1つに臓器血流増加作用があるが 0.2 μ g/kg $\cdot$ h の cerulein 刺激下で PGE_2 を加えても分泌機能に影響しなかったことから PGE_2 の臓器血流量を介した影響もセルレイン膵炎に対する保護効果のうで主要な要素とは考えられない.

セルレイン膵炎は, ライソゾームと分泌顆粒の分離過程の障害^{23,24)} あるいは, これらの癒合による vacuolization さらに細胞膜の障害による vacuole の細胞膜への癒合が原因^{25,26)} と考えられており, 膵液内への分泌が障害され間質へ酵素の逸脱がおけるとされているが, この際ライソゾーム酵素である cathepsin B による膵酵素の活性化も注目²⁷⁾ されている. prostaglandin には細胞膜及びライソゾーム膜を安定化する cytoprotective な作用がある²⁸⁾ とされており, PGE_2 はこの作用によりセルレイン膵炎の進展を抑え膵外分泌機能を維持したと考えられる.

結 語

急性膵炎に対するプロスタグランディンの保護効果を明らかにするため、ラットセルレイン膵炎に於ける膵外分泌動態にたいする prostaglandin E_2 (PGE_2) の作用を検討すると共に、 PGE_2 の secretin, cerulein との相互作用を調べた。 PGE_2 100 $\mu\text{g/kg} \cdot \text{h}$ は supramaximal dose の cerulein (10 $\mu\text{g/kg} \cdot \text{h}$) による膵炎の膵外分泌抑制作用を軽減させ、膵浮腫も有意に抑制した。halfmaximal dose の cerulein (0.2 $\mu\text{g/kg} \cdot \text{h}$) 刺激下の膵外分泌に対しては PGE_2 は有意な影響を与えず、また secretin 刺激下の膵液分泌に対しては液量、酵素分泌ともに抑制した。このことからセルレイン膵炎に対する PGE_2 の保護作用は、secretin を介したのではなく、腺房細胞膜のあるいはライソゾーム膜に対する cytoprotective な作用による膵腺房からの膵液排出機構の安定化作用と考えられる。

文 献

- 1) Rovert A, Nezamis JE, Lancaster C, et al: Cytoprotection by prostaglandins in rats. *Gastroenterology* 77: 433-443, 1979.
- 2) Rovert A: Cytoprotection by prostaglandins. *Gastroenterology* 77: 761-767, 1979.
- 3) Brendan JR, Whittle, Graham S: Evaluation of the protection of rat gastric mucosa by a prostaglandin analogue using cellular enzyme marker and histologic techniques. *Gastroenterology* 88: 315-327, 1985.
- 4) Manabe T, Steer M: Protective effect of PGE_2 on diet-induced acute pancreatitis in mice. *Gastroenterology* 78: 777-781, 1980.
- 5) Prevention by prostaglandins of caerulein-induced pancreatitis in rats. *Lab. Inv* 60: 677-691, 1989.
- 6) Coelle EF, Adham N, Elashoff J, et al: Effect of prostaglandin and indomethacin on diet-induced acute pancreatitis in mice. *Gastroenterology* 85: 1307-1312, 1983.
- 7) Rosenberg V, Biezunski D, Gonda M, et al: Influence of a synthetic prostaglandin analog on pancreatic secretion. *Surgery* 79: 509-514, 1976.
- 8) Konturek SJ, Tasler J, Jaworek J, et al: Prostacyclin inhibits pancreatic secretion. *Am. J. Physiol.* 238: G531-G536, 1980.
- 9) Iwatsuki K, Furuta Y, Hashimoto K: Effect of prostaglandin $F_{2\alpha}$ on the secretion of pancreatic juice induced by secretin and dopamine. *Experimentia* 29: 319-320, 1973.
- 10) Bourry J, Demol P, Sarles H: Interaction de la dimethyl prostaglandin E_2 et de l'ethanol sur la secretion pancreatique du rat. *Can. J. Pharmacol.* 57: 152-156, 1979.
- 11) Gabrylewicz A, Szalaj W, Kinalska I, et al: The effect of prostaglandin E_1 on exocrine pancreatic secretion (in vivo and in vitro). *Pol. J. Pharmacol.* 26: 263-267, 1974.
- 12) Case RM, Scratcherd T: Prostaglandin action on pancreatic blood flow and on electrolyte and enzyme secretion by exocrine pancreas. *J. Physiol* 226: 393-405, 1972.
- 13) Konturek SJ, Radecki T, Pucher A: Comparison of natural and synthetic prostaglandins on gastric and pancreatic secretions and peptic ulcer formation in conscious cats. *Digestion* 14: 44-61, 1976.
- 14) Toyota T, Sato S, Kudo M, et al: Secretory regulation of endocrine pancreas. *J. Clin. Endo. Metab.* 41: 81-89, 1975.
- 15) Ando K, Manabe T, Kyogoku T, et al: Functional changes of the exocrine perfused rat pancreas in cerulein-induced pancreatitis. *Digestion* (in press).
- 16) Ceska M, Birath K, Brown B: A new and rapid method for the clinical determination of amylase activities in human serum and urine. *Clin. Chem. Act* 26: 437-444, 1969.
- 17) Miyasaka M, Green GM: Effect of partial exclusion of pancreatic juice on rat basal pancreatic secretion. *Gastroenterology* 86: 114-119, 1984.
- 18) Renner IG, Wisner JR, Lavigne BC, et al: Partial restoration of pancreatic function by exogenous secretin in rat cerulein-induced acute pancreatitis. *Dig. Dis. Sci.* 31: 305-313, 1986.
- 19) Renner JG, James R, Wisner J, et al: Protective effect of exogenous secretin on cerulide-induced acute pancreatitis in the rat. *J. Clin. Invest.* 72: 1081-1092, 1983.
- 20) 千葉 勉: 消化管細胞の受容体と細胞内情報伝達. *医学のあゆみ* 159: 756-760, 1991.
- 21) Tahra Z, Harbon S: Heterogenous regulations of cAMP responses in pregnant rat myometrium. Evolution from a stimulatory to an inhibitory prostaglandin E_2 and prostacyclin effect. *Mol. Pharmacol.* 32: 249-256, 1987.
- 22) Dominguez JH, Shuler F, Olszowy MW, et al: Prostaglandin E_2 is an inhibitor of adenylate cyclase in rabbit proximal tubule. *Am. J. Physiol.* 254: C304-C309, 1988.
- 23) Steer M, Meldolesi J, Figarella C: Pancreatitis. *Dig. Dis. Sci.* 29: 934-938, 1984.
- 24) Saluja A, Saito I, Houlihan MJ, et al: In vivo rat pancreatic acinar cell function during supramaximal stimulation with caerulein. *Am. J. Physiol.* 249: G702-G710, 1985.

- 25) Adler G, Rohr G, Kern HF: Alteration of membrane fusion as a cause of acute pancreatitis in the rat. *Dig. Dis. Sci.* 27: 993-1002, 1982.
- 26) Scheele G, Adler G, Kern H: Exocytosis occurs at the lateral plasma membrane of the pancreatic acinar cell during supramaximal secretagogue stimulation. *Gastroenterology* 92: 345-353, 1987.
- 27) Saluja A, Hashimoto S, Saluja M, et al: Sub-cellular redistribution of lysosomal enzymes during caerulein-induced pancreatitis. *Am. J. Physiol.* 253: G508-516, 1987.
- 28) Furgason WW, Edmonson AW, Starling JR, et al: Protective effect of prostaglandin E₁ (PGE₁) on lysosomal enzyme release in serotonin-induced gastric ulceration. *Ann. Surg.* 177: 648-654, 1973.