

ラットにおけるセルレイン急性膵炎時の耳下腺の変化 —in vitro 系での検討—

京都大学医学部 第1外科

平野 鉄也, 真辺 忠夫, 戸部 隆吉

〔原稿受付: 平成2年4月2日〕

Changes of Parotid Gland in Rat Caerulein-Induced Acute Pancreatitis : Study on in Vitro System

TETSUYA HIRANO, TADAO MANABE and TAKAYOSHI TOBE

First Department of Surgery, Faculty of Medicine, Kyoto University, Kyoto, Japan

To explore the relationship between exocrine pancreas and parotid gland, we measured the changes of parotid gland in in-vitro system at an acute pancreatitis induced by supramaximal dose of caerulein (5 μ g/kg/h for 3.5 hours) in rats. Both the serum amylase levels and parotid gland amylase content in rats with acute pancreatitis increased significantly compared with normal rats. The dry/wet weight ratio also decreased significantly and LDH discharge from parotid acini as well as lysosomal enzyme leakage from lysosomes in acini increased significantly compared with normal rats. In addition, redistribution of lysosomal enzyme in parotid acini was seen in acute pancreatitis.

These results indicate the edema and congestion of amylase in parotid gland, and furthermore the increased cellular and lysosomal fragility of parotid gland at an acute pancreatitis. Thus, there seems to be the intimate organ relationship between exocrine pancreas and parotid gland as well as the important roles of gut hormones such as caerulein in the pathophysiology of parotid gland.

緒 言

唾液腺と膵外分泌系との類似性については従来より多くの報告があり^{1,2)}, これら両者は臓器相関の上からも密接な関連があるものと考えられる。また, 耳下腺の外分泌機能を消化管ホルモンである secretin や cholecystokinin (CCK) が亢進させるとの報告や^{3,4)}, 耳下腺管結紮時の膵外分泌系⁵⁾ および急性膵炎下での耳

下腺の形態学的組織学的変化⁶⁾ に関する報告もあり, 耳下腺と膵外分泌系は病理学的組織学的にも互いに影響を与えているものと思われる。

急性膵炎時には, 耳下腺腺房細胞においても何らかの変化が起こることが予想されるが, 急性膵炎時の耳下腺腺房細胞の脆弱性に関する報告は皆無である。今回, われわれはラットにおいて caerulein 誘起急性膵炎時での耳下腺の脆弱性について in-vitro の系から検

Key words: Caerulein pancreatitis, Parotid Grand, LDH, Lysosomal enzyme.

索引語: セルレイン膵炎, 耳下腺, LDH, ライソゾーム酵素.

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

討を加えたのでその結果を報告する。

実験方法

実験には33匹の雄性 Wistar 系ラット（体重 150 g 前後）（静岡実験動物）を使用した。18匹のラットに12時間絶食後、pentobarbital の腹腔内投与（10 mg/kg）による浅麻酔下、右側外頸静脈への catheterization (PE 50, Clay Adams 社) を施行した。catheter は背部皮下を通し、尾根部より体外に誘導し、金属コイル内を通し、catheter を保護するとともに、このコイルをラットを入れた plastic cage に固定し、ラットの運動拘束を最小限のものとした。術後12時間は0.9%ヘパリン化（30 U/ml）生理食塩水を infusion pump (Harvard Apparatus 社) を用いて 0.21 ml/hr の速度にて持続静注した。その間、ラットは自由に水分と食餌（Purino Rodent Chow）を摂取した。12時間の生理食塩水投与後、完全に覚醒しているのを確認し、さらに注射器にて血液の逆流により catheter の開閉性を確認後、caerulein (Sigma 社) を 5 μ g/kg $\cdot$ hr の濃度にて3.5時間持続静注し、急性浮腫性肺炎を作製した⁷⁾。caerulein 投与後、pentobarbital の大量投与によりラットを屠殺し、すばやく開腹し、肺炎の存在を確認後、下大静脈穿刺により血液を採取し、血清 amylase 値の測定用とした。採血後すばやく両側耳下腺を摘出し、以下の実験に供した。

1. 血清 amylase 値および耳下腺乾燥/湿重量比

18匹の急性肺炎ラットについて血清 amylase 値を soluble starch を基質とする Bernfeld の方法⁸⁾にて測定した6匹の急性肺炎ラットの耳下腺の一部の重量を測定後（湿重量）、150°C にて48時間デシケーター中にて乾燥させ、その重量（乾燥重量）を測定し、乾燥/湿重量比を耳下腺の浮腫の指標として計算した。6匹の正常ラットにも同様の protocol を施行した。

2. 耳下腺組織中 amylase 含量

この6匹の肺炎ラットの残りの耳下腺を 0.5% Triton X-100 (Fisher Scientific 社) を含有する cold phosphate buffered saline (pH 7.4) 中にて Brinkmann Polytron (Brinkmann Instruments 社) を用いて homogenate とし、150 $\times$ g, 15分, 4°C の低速遠沈にて unbroken cell や debris 除去後、その上清について amylase 活性、および DNA 濃度を仔牛胸腺 DNA を基準とし、LaBarca と Paigen⁹⁾の方法にて測定し、耳下腺組織中 amylase 含有量を U/mg DNA として表した。5匹の正常ラットにおいても同様に耳下腺組織中

amylase 含有量を測定した。

3. 分離耳下腺腺房細胞よりの LDH discharge

別の6匹の肺炎ラットについて、摘出した耳下腺を、腺分離腺房細胞の作製と同様に collagenase (Worthington 社) 消化法と震盪法を組み合わせた方法¹⁰⁾にて分離耳下腺腺房細胞とした。この dispersed parotid acinar cell を 100% O₂ にて、あらかじめ pre-oxygenation を行った 0.1% BSA (Sigma 社) および 0.01% Soybean trypsin inhibitor (Cooper Diagnostics 社) を含む HEPES-Ringer buffer (pH 7.4)(115 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 1 mM NaHPO₄, 1.26 mM CaCl₂, 10 mM HEPES) 中に suspend させ、37°C の shaking water bath 中に O₂ atmosphere 下、30分間隔にて120分まで（30, 60, 90, 120分間）incubate し、各 stage にて aliquot を取り suspending medium 中および pelleted acini 中の LDH 活性を Bergmeyer らの方法¹¹⁾にて測定し、耳下腺 acinar cell よりの LDH discharge を *in vitro* incubation 開始時での acini 中の total LDH の% として表した。別の5匹の正常ラットについても同様の操作を施行し、control 群とした。

4. 耳下腺腺房細胞内での lysosome 酵素の

distribution

さらに6匹の急性肺炎ラットよりの耳下腺の一部を 5 ml の 1 mM MgSO₄ と 250 mM sucrose を含有する cold 5 mM MOPS (3-[N-morpholino] propanesulfonic acid) (Sigma 社) buffer (pH 6.5) 中にて glass-Teflon homogenizer にて注意深く homogenate とし、150 $\times$ g, 15分, 4°C の低速遠沈にて unbroken cell や debris 除去後、Tartakoff と Jamieson の subcellular fractionation の方法¹²⁾に従って、まず、1300 $\times$ g, 15分, 4°C の遠沈にて zymogen pellet (1.3 KP), 次に 12000 $\times$ g, 12分, 4°C の遠沈にて lysosomal pellet (12 KP) と microsomal and soluble fraction である supernatant (12 KS) を得た。これらすべての fraction について lysosomal enzyme である cathepsin B の活性を CBZ-arginyl-arginine- β -naphthylamide (Bachem Bioscience 社) を基質とする McDonald と Ellis の方法¹³⁾にて測定し、各 fraction の cathepsin B 活性を % of total として表した。5匹の正常ラットにも同様の protocol を施行した。

5. 耳下腺腺房細胞内 lysosomal fragility

この6匹の肺炎ラットの残りの耳下腺について同様に 5 mM MOPS buffer 中にて homogenate とし、同様に unbroken cell や debris 除去後、12000 $\times$ g, 12分, 4°C の遠沈にて subcellular fractionation を行い

zymogen-lysosome enriched pellet を得た。この pellet は理論上は100%の lysosomal enzyme activity を含有するものと考えられるが、25°C の shaking water bath 中にて、同じく MOPS buffer 中にて30, 60, 90, 120分間 incubate し、各 stage にて再び $12000 \times g$, 12分, 4°C の遠沈を行い、particulate および soluble fraction を分離し、そのそれぞれについて cathepsin B の活性を測定し、soluble cathepsin B 活性を % of total として表し lysosomal fragility の index とした。同様の protocol を5匹の正常ラットにも行い control 群とした。

結果はすべて平均値 mean $\pm$ 標準誤差 (SEM) として表し、統計学的処理には Student の t-test を用い $p < 0.05$ をもって有意差ありと判定した。

結 果

Caerulein の supramaximal dose ($5 \mu\text{g}/\text{kg} \cdot \text{hr}$) を3.5時間持続静注後、すべてのラットはその際に著明な浮腫の形成を認め急性膵炎と判定し得た。

1. 血清 amylase 値と耳下腺乾燥/湿重量比

Caerulein 投与後のラットでは血清 amylase 値はすべて 15 U/ml 以上で $24 \pm 2 \text{ U/ml}$ ($n=18$) を示した。正常ラットは逆にすべて 10 U/ml 以下で $5 \pm 1 \text{ U/ml}$ ($n=15$) を示し、明らかに caerulein 投与群に hyperamylasemia が観察された ($p < 0.05$) (図1)。また急性膵炎時の耳下腺の乾燥/湿重量比は $14 \pm 3\%$ と

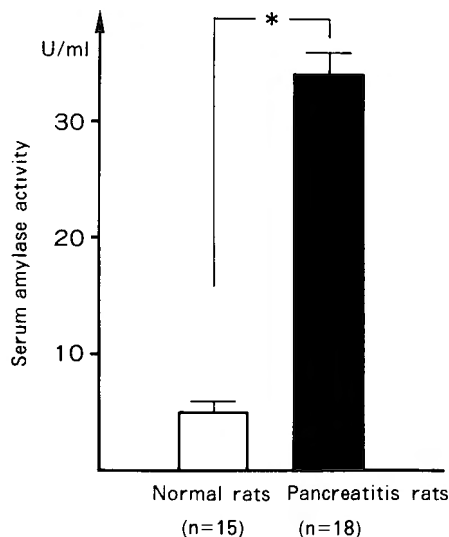


図1 正常およびセルレイン誘発急性膵炎における血清アミラーゼ値 (mean $\pm$ SEM, $p < 0.01$)

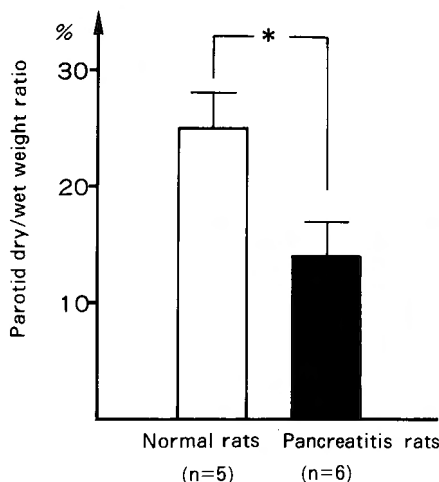


図2 正常および急性膵炎における耳下腺の dry/wet weight ratio (mean $\pm$ SEM, * $p < 0.05$)

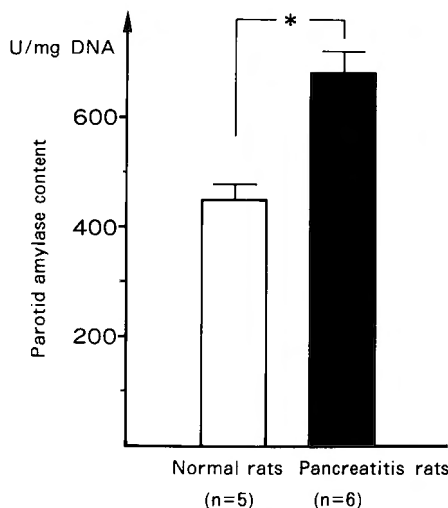


図3 正常および急性膵炎における耳下腺のアミラーゼ含量 (mean $\pm$ SEM, * $p < 0.05$)

なり、正常ラット ($25 \pm 3\%$) に比べ有意に ($p < 0.05$) 低下した (図2)。

2. 耳下腺腺房細胞の amylase 含量

Caerulein 誘起急性膵炎時には耳下腺腺房細胞の amylase 含量は $685 \pm 41 \text{ U/mg DNA}$ となり、正常ラット群 ($453 \pm 37 \text{ U/mg DNA}$) に比べ有意に ($p < 0.01$) 上昇した (図3)。

3. 分離耳下腺腺房細胞よりの LDH discharge

incubation 60分までは膵炎ラットの耳下腺 (30分値; $4.3 \pm 0.5\%$, 60分値; $5.0 \pm 0.3\%$) も正常ラットの耳

下腺 (30分値; $3.9 \pm 0.3\%$, 60分値; $4.8 \pm 0.4\%$) もほぼ同様の値を示したが, 90分後には膵炎ラットの耳下腺では $6.9 \pm 0.3\%$ となり, 正常ラット ($5.2 \pm 0.2\%$) に比べ有意に ($p < 0.05$) 増加し, さらに120分後には $11.9 \pm 0.4\%$ となり, 正常ラット ($8.1 \pm 0.3\%$) に比べ有意に ($p < 0.01$) 増加した (図4).

4. 耳下腺腺房細胞内での lysosome 酵素の distribution について

急性膵炎時の耳下腺 acinar cell 内での cathepsin B 活性は zymogen pellet (1.3 Kp) 中で $35.8 \pm 2.5\%$ となり, 正常ラット ($23.8 \pm 2.2\%$) に比べ有意に ($p < 0.05$) 増加したが, 逆に lysosomal pellet (12 Kp) 中では

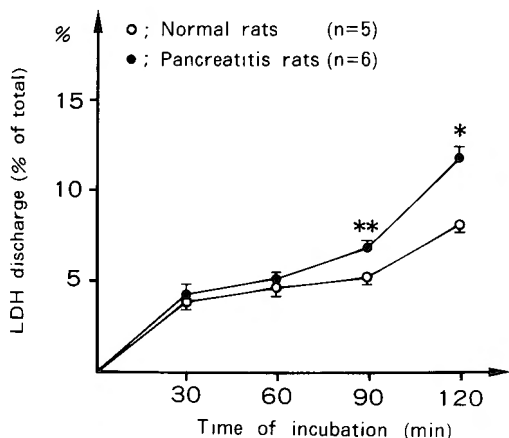


図4 正常および急性膵炎ラットにおける単離耳下腺からの LDH 放出率 (mean $\pm$ SEM, * $p < 0.01$, ** $p < 0.05$)

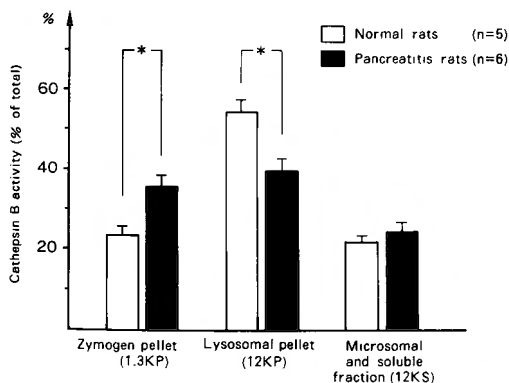


図5 正常および急性膵炎における耳下腺におけるライゾーム酵素 (カテプシン B) の各分画における活性 (mean $\pm$ SEM, * $p < 0.05$)

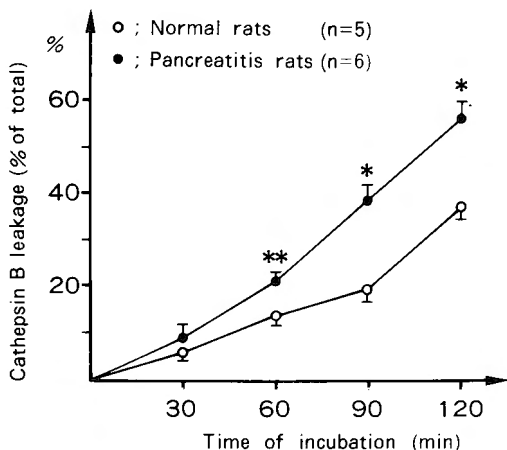


図6 正常および急性膵炎における耳下腺からのカテプシン B 放出率 (mean $\pm$ SEM, * $p < 0.01$, ** $p < 0.05$)

$39.7 \pm 3.0\%$ となり正常ラット ($54.2 \pm 3.3\%$) に比べ有意に ($p < 0.05$) 減少した (図5). また, soluble fraction 中での活性には有為な差は存在しなかった (膵炎ラット; $24.5 \pm 2.3\%$, VS, 正常ラット; $22.0 \pm 1.9\%$).

5. 耳下腺腺房細胞内での lysosomal fragility

incubation 30分後では膵炎ラット ($9.2 \pm 2.7\%$) と正常ラット ($6.1 \pm 1.3\%$) の間では有意な差はなかったが, 60分後には膵炎ラットは $21.2 \pm 2.1\%$, 90分後には $38.5 \pm 3.2\%$, 120分後には $56.4 \pm 3.4\%$ となり, 正常ラット (60分値; 13.7 ± 1.8 , 90分値; 19.5 ± 2.2 , 120分値; $37.5 \pm 2.8\%$) に比べ, それぞれ有意に (60分値; $p < 0.05$, 90分と120分値; $p < 0.01$) 増加した (図6).

考 察

ラットにおいて caerulein の supramaximal dose の持続投与にて急性浮腫性膵炎を作製した場合, 耳下腺においては乾燥/湿重量比が減少することにより浮腫の形成が考えられ, また, 耳下腺組織中の amylase 含量が上昇することより消化酵素の耳下腺内鬱滞が示唆され, これらは caerulein 誘起膵炎時の膵外分泌系と同様の变化⁷⁾ と考えられた. さらに, 急性膵炎時の分離耳下腺 acini よりの LDH discharge の増加と耳下腺腺房細胞内での lysosome 酵素の逸脱の増加より, この caerulein 誘起膵炎時の耳下腺においては細胞および細胞内小器官のレベルでの cellular fragility が示唆された. また caerulein 誘起性膵炎の膵腺房細胞内では lysosome 酵素が lysosomal fraction より zymogen frac-

tion へ shift する lysosome 酵素の redistribution¹⁴⁾ という現象が観察されるが、耳下腺内でも同様の redistribution が観察された。このような今回の結果は caerulein 誘起急性膵炎における耳下腺腺房細胞の脆弱性を示すとともに、この cellular fragility に lysosomal fragility が関与していることを示唆している。従来より、耳下腺管結紮時の膵外分泌系の変化⁵⁾ や膵管結紮時の耳下腺の変化⁶⁾ についての報告があり、これら2つの臓器は互いに影響を与えながら病理組織学的にも密接な関連性をもつものと考えられる。膵炎時の耳下腺の変化からも膵炎時における何らかの humoral factor が耳下腺に対して障害的に働く可能性が示唆され、事実、最近、caerulein 膵炎時での humoral factor に関する報告¹⁵⁾ もみられる。

一方、secretin や CCK などの消化管ホルモンが耳下腺に対して何らかの影響を与えているとの報告^{3,4)} がみられる。本実験から CCK の analog である caerulein が膵外分泌系におけると同様に直接的に耳下腺 acinar cell に作用している可能性が考えられる。いずれにしても、今回のわれわれの結果より、急性膵炎時には耳下腺にもその細胞障害が存在することが判明し、この2つの器官は臓器相関の上からも密接な関連をもっているものと考えられ、今後急性膵炎時、膵障害時での耳下腺の変化についても十分注意を払う必要があると思われる。

ま と め

1. ラットにおいて caerulein の supramaximal dose の投与による急性膵炎時には耳下腺にも浮腫の形成と amylase の鬱滞が認められた。
2. 同時に、耳下腺腺房細胞よりの LDH discharge の増加、また lysosome よりの cathepsin B 逸脱の増加が認められた。
3. さらに、急性膵炎時の膵腺房細胞内と同様に lysosomal 酵素の redistribution が認められた。

以上より、caerulein 誘起膵炎時には、耳下腺にも膵腺房細胞と同様の変化が生じ、細胞および細胞内小器官レベルでの脆弱性が示唆されるとともに、膵外分泌系と、耳下腺との密接な関連性、さらに膵炎と耳下腺炎での共通の humoral factor の存在の可能性が示唆された。

文 献

- 1) Textes EC, Chou CC, Laureta HC, et al: Salivary secretion. In Physiology of the gastrointestinal

- tract. C. V. Mosby Co., St. Louis, U.S.A. p. 143-151, 1968.
- 2) Best CH, Taylor MB: Salivary secretion. In physiological basis of Medical Practice, (8th ed.) Baltimore & Wilkins Co., p. 1061-1081, 1966.
- 3) Nacchiero M and Dreiling DA: The parotid and the pancreas. I. The effects of secretion, CCK -PZ, and prostaglandin E₂ on canine parotid secretion. Mt Sinai J Med 45:187-191, 1978.
- 4) Mulcahy H, Fitzgerald O and McGeoney KF: Secretion and pancreozymin effect on salivary amylase concentration in man. Gut 13: 850, 1972.
- 5) 柿崎五郎, 斉藤隆之, 添野武彦, 他: 膵と耳下腺の関連性に関する実験的研究 (第7報) 両側耳下腺管結紮時におけるラット膵の光学顕微鏡ならびに電子顕微鏡的研究. 日消誌 73: 638-648, 1976.
- 6) 柿崎五郎, 大沼利行, 能登 隆, 他: 膵と耳下腺に関する実験的研究, (第1報) 急性膵炎時の耳下腺に及ぼす影響について (ラット使用実験) —組織学的所見ならびにアミラーゼ値からみて—。日消誌 68: 714-719, 1971.
- 7) Saluja A, Saito I, Saluja M, et al: In vivo rat pancreatic acinar cell function during supramaximal stimulation with caerulein. Am J Physiol 249: G702-710, 1985.
- 8) Bernfeld P: Amylase α and β . Methods Enzymol 1: 149-150, 1955.
- 9) LaBarca C and Paigen K: A simple, rapid and sensitive DNA assay procedure. Anal; Biochem 102: 344-352, 1980.
- 10) Powers RE, Saluja A, Houlihan MJ, et al: Diminished agonist-stimulated inositol triphosphate generation block stimulus-secretion coupling in mouse pancreatic acini during diet-induced experimental pancreatitis. J Clin Invest 77: 1668-1674, 1986.
- 11) Bergmeyer HU, Bernt E and Hess B: Lactec dehydrogenase. In: Bergmeyer H. U. ed. Methods in enzymatic analysis. New York Academic Press, p. 736-741, 1965.
- 12) Tartakoff A and Jamieson JE: Fractionation of guinea pig pancreas. Methods Enzymol 31: 41-59, 1974.
- 13) McDonald JK and Ellis D: On the substrate specificity of cathepsin B1 and B2 including a new fluorogenic substrate for cathepsin B1. Life Sci 17: 1269-1276, 1975.
- 14) Saluja A, Hashimoto S, Saluja M, et al: Am J Physiol 253: G508-516, 1987.
- 15) Saluja M, Saluja A, Zavertonic A, et al: A plasma factor is involved in the subcellular redistribution of lysosomal enzyme which follows supramaximal pancreatic stimulation with caerulein (CER). Pancreas 4: 640, 1989.