

活性酸素種による膵組織障害作用

京都大学医学部外科学教室第1講座

田村耕一郎, 真辺 忠夫, 戸部 隆吉

〔原稿受付: 平成3年6月24日〕

Effect of Oxygen Free Radicals on the Rat Pancreas *in vivo*

KOICHIRO TAMURA, TADAO MANABE and TAKAYOSHI TOBE

The 1st Department of Surgery, Faculty of Medicine, Kyoto University.

Many reports concerning the involvement of active oxygen free radicals in the pathogenesis and progression of acute pancreatitis have been published. In this study, the direct toxic effect of active oxygen free radicals on the rat pancreas was evaluated *in vivo*. Superoxide anions, generated via the xanthine/xanthine oxidase (X/XO) system, and hydrogen peroxide (H_2O_2) were used. After continuous arterial injection of X/XO into the celiac artery hemorrhage and extensive edema developed. However, additional continuous injection of superoxide dismutase (SOD) into the external jugular vein completely suppressed the hemorrhage and relieved the edema. When hydrogen peroxide ($100 \mu M/Kg/hour$) was injected continuously through the celiac artery maked hemorrhage and edema were recognized in the pancreas, both of which were suppressed by continuous injection of catalase ($10 mg/Kg/hour$) or gabexate mesilate ($10 mg/Kg/hour$) into the external jugular vein. The amylase and lipase levels in the intraperitoneal fluid rose to more than 10 times the preoperative values 5 hours after drug administration. These levels were lowered to 2 times the preoperative values by the continuous venous injection of SOD or catalase (which are specific scavengers of superoxide anions or hydrogen peroxide, respectively) or by gabexate mesilate. On the other hand, serum amylase and lipase levels remained almost constant throughout the entire experiment. Thus, the administration of active oxygen free radicals caused acute pancreatitis, which was suppressed by the systemic administration of specific scavengers for each free radical. Active oxygen free radicals were shown to have a direct, toxic effect on the pancreas.

I. 緒 言

虚血¹⁾, Choline-deficient ethionine-enriched (CDE) meal²⁾, 脱血ショック³⁾, Caerulein 投与⁴⁾ などによっ

て惹起される急性膵炎の発症, 進展にフリーラジカルの関与が指摘されている. しかしながら, これらの論文はいずれも, フリーラジカルを直接とらえたのではなく, 急性膵炎モデルにフリーラジカル生成反応阻害

Key words: Acute pancreatitis, Free radical, Free radical scavengers, Artery supplying the pancreas.

索引語: 急性膵炎, フリーラジカル, フリーラジカル消去剤, 膵支配動脈.

Present Address: First Department of Surgery, Faculty of Medicine, Kyoto University, 54 Shogoin, Kawara-cho, Sakyo-ku, Japan 606

剤⁵⁾やフリーラジカル消去剤⁶⁾を投与し、急性膵炎発症の抑制効果からフリーラジカルの関与を間接的に評価したものである。近年、Electron Spin Resonance (ESR) technique⁷⁾や Chemi-luminescence⁸⁾によるフリーラジカルの直接検出法も開発されているが、in vivo system で、フリーラジカルレの直接障害作用を証明することは、未だ困難な状態である。

フリーラジカルが関与する病変については、多くの場合、生体膜障害^{9,10)}に起因するものであり、フリーラジカルが直接、あるいは間接的に生体膜の脂質¹¹⁾や蛋白質¹²⁾を攻撃して起こすものと理解される。従って急性膵炎発症という状態は生体膜の障害によってひきおこされた結果と考えられる。活性酸素はアラキドン酸代謝等に作用して Thromboxane 生成を増加¹³⁾し、その強力な血小板凝集及び血管収縮作用¹⁴⁾により組織血流の低下を導くと共に、Leukotriene B₄を介し、白血球活性化¹⁵⁾、ライソゾーム酵素遊離¹⁶⁾を促進し、膵細胞障害をひきおこすと考えられる。本研究では、膵支配動脈より、xanthine/xanthine oxidase によるスーパーオキシド発生系又は過酸化水素の持続注入による膵への直接障害作用を評価するとともに、各々の特異的な消去剤であるスーパーオキシドディスムターゼ及びカタラーゼと、活性酸素消去作用を有する、代表的な合成プロテアーゼインヒビター¹⁷⁾であるメシル酸ガベキサートを投与してその抑制効果を検討した。

II. 材料及び方法

1. 動物モデル

体重 240~330 g の Sprague-Dawley 系雄性ラットを一夜絶食後、ペントバルビタール (50 mg/kg) の腹腔内麻酔下で、一側の外頸動脈 (CV) にポリエチレンカテーテル (PE-50) を挿入し、薬剤投与及び輸液路とした。ついで、開腹し、腹腔動脈 (CA) を露出し、大動脈との分岐部を結紮したのち、末梢側を切開し、5 cm のポリエチレンカテーテル (PE-50) を挿入し、固定した。カテーテルには側管からも薬剤が注入できるように、3 mm 径の塩化ビニールカテーテルを接続した。以下の7群にわけて実験した。

I 群 (N=6, コントロール群) : 生理食塩水を、CA、CV より、各々、45 μ l/min, 15 μ l/min で注入した。

II 群 (N=6) : CA より xanthine (X, 10⁻³ M in seline), 生理食塩水を、各々 30 μ l/min, 15 μ l/min で、又 CV より、生理食塩水を 15 μ l/min にて注入した。

III 群 (N=6) : Xanthine (X) 及び Xanthine oxidase (XO, 1 U/ml in seline) を各々、別の注射器に用意し、上記に述べた如く、CA に注入される直前で混じるように、各々 30 μ l/min, 15 μ l/min で注入した。CV より、生理食塩水を 15 μ l/min で注入した。

IV 群 (N=8) : CA より X/XO を、CV よりはスーパーオキシド ディスムターゼ (SOD, 日本化薬製, 3600 U/ml seline) を 15 μ l/min にて注入した。

V 群 (N=8) : CA より過酸化水素 (H₂O₂, 100 μ M) を 45 μ l/min, CV よりは生理食塩水を注入した。

VI 群 (N=10) : CA より H₂O₂ を CV よりカタラーゼ (10 mg/ml) を 15 ml/min で注入した。

VII 群 (N=6) : CA より H₂O₂ を、CV よりメシル酸ガベキサート (10 mg/ml) を 15 μ l/min にて注入した。

以上7群とも、前値を含め経時的に尾血管よりヘパリン採血し、血清分離し、-70°C で冷凍保存し、血清酵素の測定に用いた。又、実験前後の2回の開腹時に腹水を採取し、-70°C で冷凍保存し、逸脱酵素の測定に用いた。

更に、実験終了時 (5時間後) に脱血屠殺し、膵を摘出し、肉眼観察を行った後、一定部位を採取し膵乾湿重量比の測定及び病理組織標本作製に供した。

2. 測定項目

(i) 膵の乾湿重量比

実験終了時 (屠殺時) の5時間後に脱血後摘出した膵の一定部位を採取し、直ちに、湿重量を電子天平 (Chyo Balance Co., 日本) で計測した。その後、70°C の乾燥器に72時間静置し、乾重量を計測し、その比により浮腫の評価を行った。

(ii) 膵の肉眼標本及び病理組織像

実験終了時に脱血後摘出した膵について、浮腫及び出欠の程度を4段階評価 (0, 1, 2, 3ポイント) で数量化した。ついで、一定部位を採取し、HE 染色による病理組織標本を作成し次の5項目について、4段階評価 (0, 1, 2, 3ポイント) で数量化した。

(1) 浮腫

(2) 炎症細胞浸潤

(3) 空胞変性

(4) 出血

(5) 壊死

(iii) 血清及び腹水のアミラーゼ値及びリパーゼ値の経時変化

前述の如く冷凍保存しておいた血清及び腹水を解凍後、アミラーゼはアミラーゼ A テストシオノギ (シ

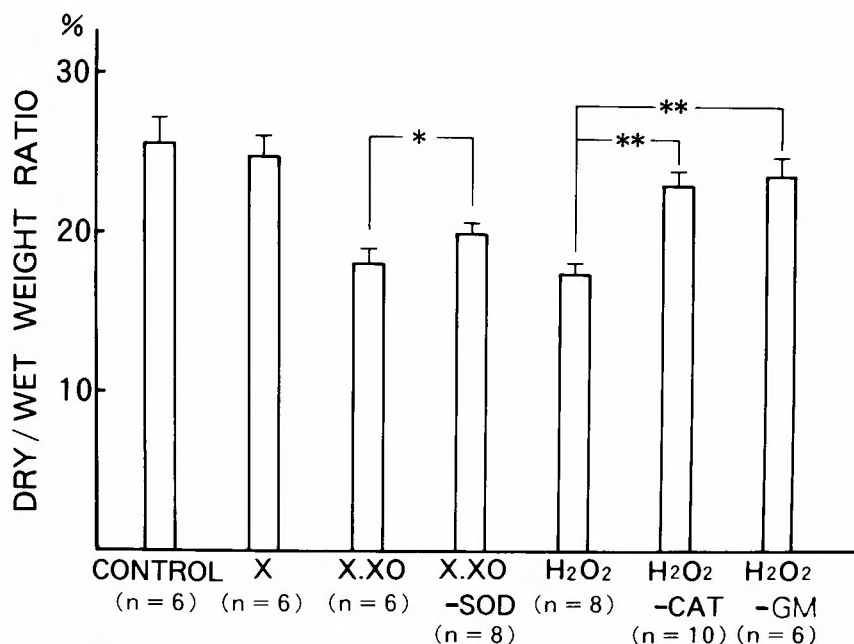


Fig. 1 Pancreatic dry to wet weight ratio 5 hours after infusion of free radical related substrates. Data are shown as mean $\pm$ SEM. * p < 0.05 compared to control, ** p < 0.01 compared to control. Details are as in Table 1.

オノギ, 日本)を用いたブルースターチ法にて, リパーゼは Lipase Kit S (大日本製薬, 日本)を用いた BALB-DTNB 法¹⁹⁾にて測定した。

3. 統計処理

得られたデータは, Mean $\pm$ S.D. にて表現し Student's t-test を用い, 危険率 5% 以下を有意差ありと判定した。

4. 結果

(i) 膵の乾湿重量比

コントロール群及びⅡ群では各々 $26 \pm 1.7\%$, $24 \pm 1.1\%$ で有意差はないが, X/XO を動脈内持続注入したⅢ群では $18 \pm 1.1\%$ と有意に低下した。SOD 投与したⅣ群では $20 \pm 0.8\%$ で有意な上昇を認めた。一方, H₂O₂ を動脈内持続注入したⅤ群では, Ⅲ群同様, 有意な低下を認めたが, カタラーゼ又はメンチン酸ガベキサートを投与したⅥ群, Ⅶ群では, $23 \pm 0.9\%$, $23 \pm 1.1\%$ とⅤ群に対して有意な増加を認めた。(Fig. 1)

(ii) 膵の肉眼標本評価

コントロール群及びⅡ群では, 浮腫, 出血ともに認めないが, X/XO 注入したⅢ群では全例に著明な浮腫を呈し, かつ 6 例中 4 例に尾部を中心に出血を認め

た。然るに, SOD 投与したⅣ群では浮腫は認めるも出血はおこらなかった。一方, H₂O₂ を投与したⅤ群では著明な浮腫を呈し, 8 例中 7 例に明瞭な出血を示

Table 1 Macroscopic examination of pancreas in rats after infusion of free radical related substrates

		edema	hemorrhage
Control	(n=6)	0.5 $\pm$ 0.2	0
X	(n=6)	0.5 $\pm$ 0.2	0
X-XO	(n=6)	3.0**	1.5 $\pm$ 0.2**
X-XO/SOD	(n=8)	2.0 $\pm$ 0.5*	0
H ₂ O ₂	(n=8)	3.0**	2.4 $\pm$ 0.3**
H ₂ O ₂ /CAT	(n=10)	0.5 $\pm$ 0.2	0
H ₂ O ₂ /GM	(n=6)	0.3 $\pm$ 0.1	0

Control: saline (45 μ l/min); X: xanthine (30 μ l/min); XO: xanthine oxidase (15 μ l/min); SOD: superoxide dismutase (15 μ l/min); H₂O₂: hydrogen peroxide (45 μ l/min); CAT: catalase (15 μ l/min); GM: gabexate mesilate (15 μ l/min).

Saline, X, XO and H₂O₂ were infused into the celiac artery, and SOD, CAT and GM were infused into an external jugular vein.

Data are expressed as mean $\pm$ SEM. * p < 0.01 compared to control. ** p < 0.001 compared to control.

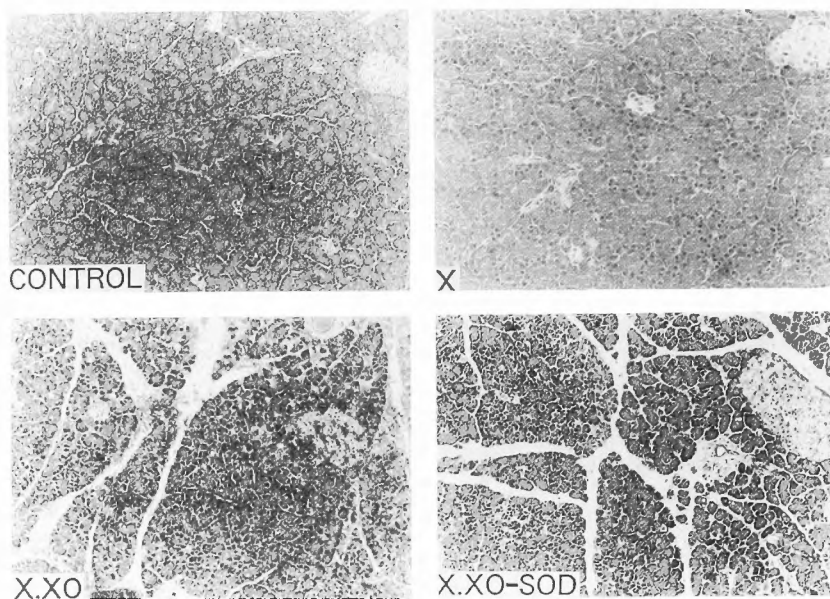


Fig. 2 Histological findings of pancreas 5 hours after infusion of free radical related substrates (Hematoxylin-eosin; original magnification $\times 100$). Details are as in Table 1.

した。然るに、カタラーゼ投与の VI 群では、浮腫及び出血ともに認めず、更にメシル酸ガベキサート投与でも 6 例中 1 例に軽度の浮腫を呈するのみで、出血は全く認めなかった。(Table 1)

(iii) 脾の病理組織像

X/XO 又は H_2O_2 投与群では、著明な浮腫、炎症細胞浸潤、出血を認めたが、空胞変性、壊死は一部のみ認めた。SOD、カタラーゼ、メシル酸ガベキサート

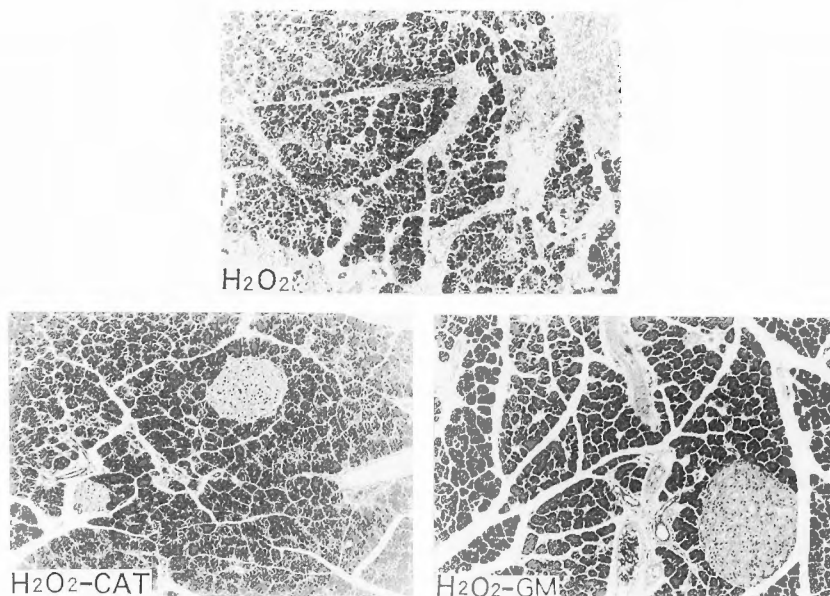


Fig. 2' Histological findings of pancreas 5 hours after infusion of free radical related substrates (Hematoxylin-eosin; original magnification $\times 100$). Details are as in Table 1.

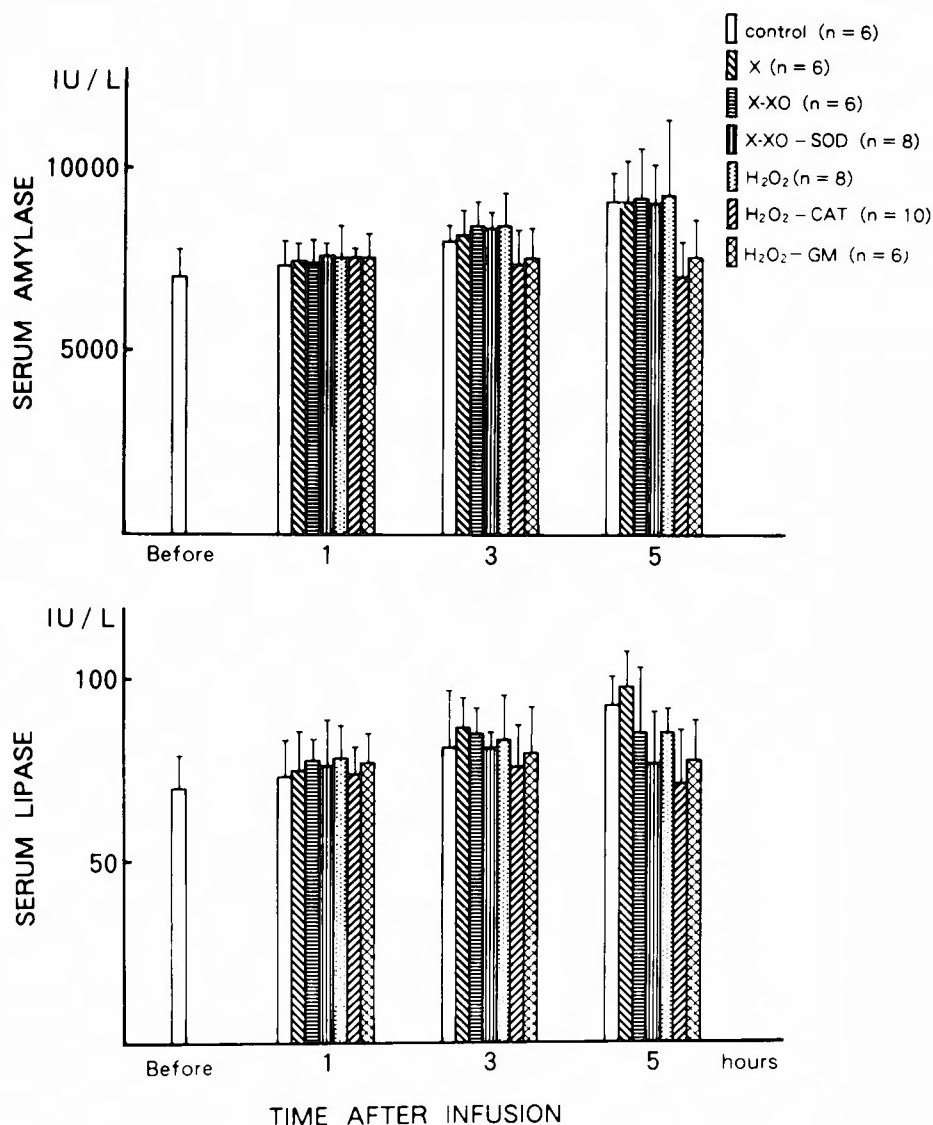


Fig. 3 Changes of serum amylase and lipase levels after infusion of free radical related substrates. Data are shown as mean $\pm$ SEM. Details are as in Table 1.

を投与した群では、浮腫は軽度認めるものの、他の所見は抑制された。(Table 2) (Fig. 2, 2')

(iv) 血清アミラーゼ値及びリパーゼ値の経時変化

Xanthine (X) を CA より注入した群で血清アミラーゼ値は、コントロール群に比べて上昇傾向は認められたが有意差はなかった。X/XO 注入群、SOD を静注しつつ X/XO を注入した群、H₂O₂ を注入した群でも同様の傾向を示したが、有意差はなかった。カタラーゼ又はメンチン酸ガベキサートを経注しつつ H₂O₂ を注

入した群ではコントロール群と同じ値を示した。又、血清リパーゼ値も同様の傾向は示したが、有意差は認めなかった。(Fig. 3)

(v) 腹水アミラーゼ値及びリパーゼ値の経時変化

コントロール群で、腹水アミラーゼ値及びリパーゼ値は、血清アミラーゼ値及びリパーゼ値の各々 3 %、5 % の値を示した。X/XO 注入群では、コントロール値の 10.3 倍、13.8 倍となり、H₂O₂ 注入群でも各々 11.1 倍、17.3 倍と著明に増加した。SOD を注入した

Table 2 Histological findings of pancreas of rats after infusion of free radical related substrates.

		edema	cellular infiltration	vacuolization	hemorrhage	necrosis
Control	(n=6)	0	0	0	0	0
X	(n=6)	0	0	0	0	0
X-XO	(n=6)	3.0**	2.0±0.3**	3.0**	2.7±0.3**	2.7±0.3**
X-XO/SOD	(n=8)	2.0±0.4*	1.0±0.2*	0	1.0±0.2*	0
H ₂ O ₂	(n=8)	3.0**	2.0±0.3**	3.0**	2.7±0.4*	2.7±0.4**
H ₂ O ₂ /CAT	(n=10)	1.0±0.2*	1.0±0.2*	0	1.0	0
H ₂ O ₂ -GM	(n=6)	2.0±0.3**	0	0	0	0

Data expressed as mean ± SEM. *p<0.001 compared to control. **p<0.001 compared to control. Details are as in Table 1.

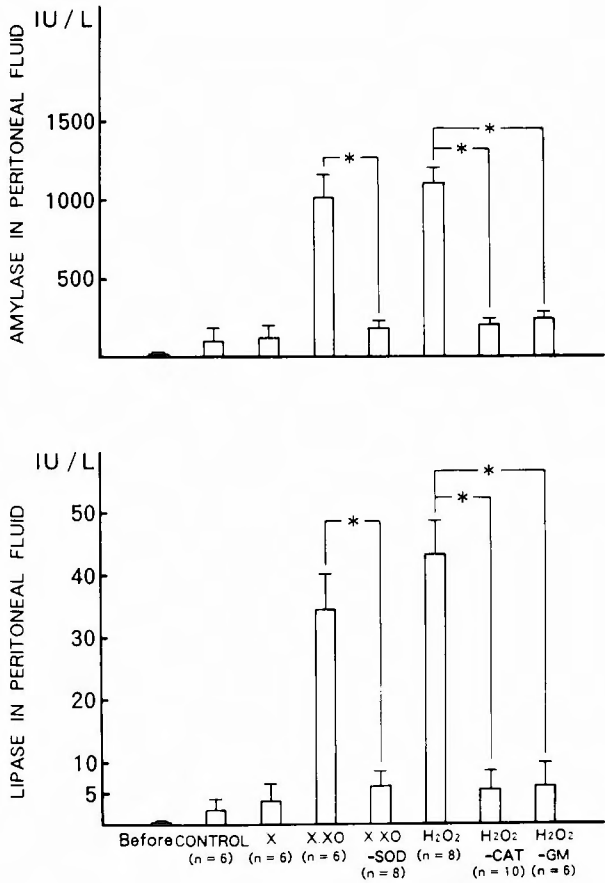


Fig. 4 Amylase and lipase levels in peritoneal fluid 5 hours after infusion of free radical related substrates. Data are shown as mean ± SEM. *p<0.001 compared to control. Details are as in Table 1.

X/XO 注入群では各々1.8倍、2.3倍の増加にとどまり
カタラーゼ+H₂O₂ 注入群では1.9倍、2.1倍、又メシ
ル酸ガベキサート+H₂O₂ 注入群では、2.1倍、2.5倍
の増加にとどまり、消滅剤による腹水アミラーゼ値及
ビリパーゼ値の上昇が著明に抑制された。(Fig. 4)

5. 考察

本実験系において、腹腔動脈よりの Xanthine/Xanthine Oxidase 又は過酸化水素の持続注入により、腹水アミラーゼ値及びリパーゼ値の上昇とともに膵には肉眼的出血、浮腫を生じ、組織学的にも急性膵炎を呈するが、各々の特異的な消去剤である SOD、カタラーゼ又は、フリーラジカル産生抑制作用をもつ合成プロテアーゼインヒビターであるメシル酸ガベキサートを投与すると、一連の変化は著明に抑制されることが明らかになった。本実験系においては、動脈よりの単独の薬剤又は生理食塩水の注入によっては膵組織には何らの変化がみられなかったことより、膵炎はフリーラジカル生成物質の動脈内注入によって惹起されたものと考えられる。

腹腔動脈よりのカニューレーションにより膵血流の障害が考えられる。腹腔動脈及び前腸間膜動脈の結紮によって低アミラーゼ血症を伴った、著明な膵線房の空胞変性を呈するが、腹腔動脈の結紮のみでは何ら変化を示さない²⁰⁾ これは、側副血行により、膵への血流が維持され、膵組織の integrity を保たせる。側副血行は、カニューレーション後、カニューレーションよりの逆流により確認できる。

本実験に用いた、スーパーオキシド発生系の1つである xanthine/xanthine oxidase より産生されるスーパーオキシド及び過酸化水素の濃度は、ヒト多形核白血球を刺激し発生しうるスーパーオキシド又は過酸化水素量²¹⁾の数倍程度であると理論上考えられる。

急性膵炎の病態における本態は、膵内における消化酵素の活性化²²⁾による一連の蛋白分解反応および膵腺房細胞膜の破壊である。そのトリガーとなる因子には、胆汁、フォスホリパーゼ A₂、コレシストキニン (CCK)、エタノール、トリプシン、プロテアーゼが挙げられるが、最近、強い組織障害性を持つフリーラジカルが注目されている。急性膵炎におけるフリーラジカルの関与については、フリーラジカル生成反応阻害剤⁵⁾やフリーラジカル消去剤⁶⁾を投与して急性膵炎発症の抑制が認められることにより、その関与が示されてきた。フリーラジカルの主発生源としては、組織内の xanthine oxidase 系²³⁾と好中球系²⁴⁾が知られている。xanthine と xanthine oxidase を混合培養すると、酸素分子よりスーパーオキシドと、一連のフリーラジカルが生成される²⁵⁾。腸管において、in vivo で xanthine と xanthine oxidase を注入することにより、腸管の微小血管の透過性が亢進する^{26,27)}ことが示されてい

る。

フリーラジカルは、膜の透過性を亢進させ、白血球を活性化し¹⁵⁾その集積による微小血管の血流抵抗を増加させる²⁸⁾ことが知られている。本実験は、生体内で産生されうる濃度のスーパーオキシド又は過酸化水素の腹腔動脈への投与により急性膵炎が発症し、消去剤により抑制されることを示し、フリーラジカルがトリガーとなって急性膵炎が発症することを直接的に示した。

References

- 1) Sanfey H, Bulkley GB and Cameron JL: The pathogenesis of acute pancreatitis. The source and role of oxygen-derived free radicals in three different experimental models. *Ann Surg* 1985; 201: 633-639.
- 2) Rutledge, PL, Saluja AK, Powers RE and Steer ML: Role of oxygen-derived free radicals in diet-induced hemorrhagic pancreatitis in mice. *Gastroenterology* 1987; 93: 41-47.
- 3) Prints H, Saluja AK, Leli U, Sengupta A, Steer ML: Effects of hemorrhagic shock, aspirin and ethanol on secretagogue-induced experimental pancreatitis. *Int J Pancreatol* 1990; 6: 202-217.
- 4) Wisner J, Green D, Ferrell L and Renner I: Evidence for a role of oxygen derived free radical in the pathogenesis of caculcin induced acute pancreatitis in rats. *Gut* 1988; 29: 1916-1923.
- 5) Lankisch PG, Pohl U, Otto J, Scemeatkowski UW, Gröne HJ: Xanthine oxidase inhibitor in acute experimental pancreatitis in rats and mice. *Pancreas* 1989; 4: 436-440.
- 6) Guice KS, Mutter DE, Oldhan KT, Townsend CM Jr., Thompson JC: Superoxide dismutase and catalase: a possible role in established pancreatitis. *Am J Surg* 1986; 151: 163-169.
- 7) Finkelstein E, Rosen GM, Rauckman EJ: Production of hydroxyl radical by decomposition of superoxide spintrapped adducts. *Mol Pharmacol*, 1982; 21: 262-265.
- 8) Roldán EJA, Pinus CR, Turners JF, Boveris A: Chemiluminescence of ischemic and reperfused intestine in vivo. *Gut* 1989; 30: 184-187.
- 9) Lynch E, Eridovich I: Effects of superoxide on the erythrocyte membrane. *J Biol Chem* 1978; 253: 1823-1845.
- 10) Girotti AW, Thomas JP: Damaging effects of oxygen radicals on resealed erythrocyte ghosts. *J Biol Chem* 1984; 259: 1744-1752.
- 11) Yamamoto Y: Oxidation of biological membranes and its inhibition. Free radical chain oxidation of

- erythrocyte ghost membranes by oxygen. *Biochem Biophys Acta* 1985; **819**: 29-36.
- 12) Koster JF, Slec RG: Lipid peroxidation of human erythrocyte ghost induced by organic hydroperoxides. *Biochem Biophys Acta* 1983; **752**: 233-239.
 - 13) Palder SB, Huval W, Lelouk S: Reduction of polymorphonuclear leukocyte accumulation by inhibition of cyclooxygenase and thromboxane synthetase in the rabbit. *Surgery* 1986; **99**: 72-80.
 - 14) Tate RM, Morris HG, Schroeder WR, Repine JE: Oxygen metabolites stimulate thromboxane production and vasoconstriction in isolated saline perfused rabbit lung. *J Clin Invest* 1984; **74**: 608-614.
 - 15) Galdman G, Welburn R, Paterson IS, Klausner JM, Kobzik L, Valeri CR, Shepro DS, Hechtman HB: Ischemia-induced neutrophil activation and diapedesis is lipoxygenase dependent. *Surgery* 1990; **107**: 428-433.
 - 16) Rinderknecht H: Activation of pancreatic zymogens. Normal activation, premature intrapancreatic activation, protective mechanism against inappropriate activation. *Dig Dis Sci* 1986; **31**: 314-321.
 - 17) Tamura K, Manabe T, Imanishi, Tobe T: Effects of protease inhibitors on active oxygens. *Cytoprotection and Cytobiology* (Cytomedia, London) 1989, (in press)
 - 18) Ceska M, Birath K, Brown B: A new and rapid method for the clinical determination of α -amylase activities in human serum and urine. *Clin Chem Acta* 1969; **26**: 437-444.
 - 19) Bergmeyer HU, Bernt E: Empfehlungen der Deutschen Gesellschaft für Klinische Chemie. *Z Klin Chem U Klin Biochem* 1972; **10** Jg: 182-192.
 - 20) Tamura K, Manabe T, Tobe T: Effect of postischemic reperfusion of the rat pancreas. (in submission)
 - 21) Tamura K, Manabe T, Tobe T: Effect of synthetic protease inhibitors on Superoxide. Hydrogen peroxide and Hydroxyl radical production of by human polymorphonuclear leucocytes. *Hepato-Gastroenterology* (in press).
 - 22) Steer ML, Meldoleni J: The cell biology of experimental acute pancreatitis. *N Engl J Med* 1987; **316**: 144-150.
 - 23) Granger DN, McCord JM: Xanthine oxidase inhibitors attenuates ischemia-induced vascular permeability changes in the cat intestine. *Gastroenterology* 1986; **90**: 80-84.
 - 24) Iizuka T, Kanegasaki S: Pyridine and imidazole reversibly inhibit the respiratory burst in porcine and human neutrophils: Evidence for the involvement of cytochrome b558 in the reaction. *Biochem Biophys Res Commun* 1985; **130**: 621-626.
 - 25) Fridovich I: Quantitative aspects of the production of superoxide anion radical by milk xanthine oxidase. *J. Biol. Chem.* 1970; **245**: 4053-4057.
 - 26) Parks DA, Shah AK, Granger DN: Oxygen radicals: Effects on intestinal vascular permeability. *Am J Physiol* 1984; **247**: 167-170.
 - 27) Suematsu M, Tsuchiya M: Oxygen-derived free radicals from leukocytes and lipid peroxidation in microcirculatory disturbance. *Progress in Angiology Edizine Minerva Medica*, Torino 1986; 157-160.
 - 28) Smith SM, Holm-Rutilli L, Perry MA, Crisham MB, Arfors KE, Granger DN, Kvietys PR: Role of neutrophils in hemorrhagic shock-induced gastric mucosal injury in the rat. *Gastroenterology* 1987; **93**: 466-471.