

胆石，殊にコレステロール系結石に合併する 膵炎の発生因子に関する実験的研究

京都大学医学部外科学教室第2講座（指導：日笠頼則教授）

山 崎 英 博

〔原稿受付：昭和48年1月31日〕

Experimental Studies on Initiating Factors of Pancreatitis Associated with Gallstones, Especially Cholesterol Stones

by

HIDEHIRO YAMAZAKI

The 2nd Surgical Department Kyoto University Medical School

(Director : Prof. Dr. YORINORI HIKASA)

It is well known that acute pancreatitis in patients with gall stone, especially cholesterol stone, is encountered more frequently in European than in Japanese. These are considered to be due to differences of dietary customs. Recent studies from our laboratory showed that deficiencies and/or metabolic disturbances of essential fatty acids(EFA) play an important role on the formation of cholesterol stones. In this study, evidence will be presented that the high incidence of acute pancreatitis in patients with gallstones also is due to deficiencies and/or disturbed metabolism of EFA as a result of the following examinations.

The increased susceptibility to acute pancreatitis that is associated with the prolonged feeding on a lithogenic diet (i. e. EFA deficient diet) was studied at the cellular level. Fresh living pancreatic acinar cells from hamsters were put into suspension of a balanced salt solution by tissue digestion in pancreatin, collagenase, hyaluronidase and ethylene-diamine-tetraacetic acid. These cells were subjected to serial dilution cytotoxicity studies using trypsin, autogenous bile, phospholipase A and elastase ; cell counts were done on hemacytometers and cell death was determined by using a vital staining technic. Mortality of pancreatic acinar cells caused by each test material was used to compare the integrity of acinar cells from hamsters on four different diets ; 20% butter fat diet, fat free diet, 20% sesame oil diet and balanced diet.

Isolated pancreatic acinar cells from hamsters fed on the lithogenic diet were more sensitive to the effect of trypsin, autogenous bile, phospholipase A and elastase than the acinar cells of animals on non-lithogenic diets.

Little influence of lithogenic diet to the sensitivity of the pancreatic acinar cells was observed on an occasion of being changed to balanced diet even after feeding on 20% butter fat diet for 5 wks.

A little evidence of acute pancreatitis was histologically observed by animals on lithogenic diet.

These results indicate that a change occurred in the integrity of pancreatic acinar cell membranes as a result of the lithogenic diets, and that the lithogenic diet produces such an environment as might be called "acute pancreatitis predisposition"

1. 緒 言

胆石症、殊にコレステロール系結石による胆石症に合併する急性膵炎は、欧米ではかなり高率にみられ、本邦では比較的少ない¹⁾。

しかしながら、本邦人に於ける食餌の欧米化に伴い、本邦でも胆石症の中でのコレステロール系結石のしめる割合が次第に増加しつつある今日^{2,3)}、これに合併する急性膵炎も亦、必然的に増加するものと考えられる。

従来胆石症に合併する膵炎の発生機序には諸説があるが、中でも Opie の提唱した機械的共通管説⁴⁾ や十二指腸液逆流説が有力である。しかしながら、そのみでは欧米人と本邦人における、胆石症に合併する膵炎の発生頻度の相違を充分には説明し難いように思われる。

一方、胆石就中コレステロール系結石は、動物に於て食餌の変化が、その発生に重大な影響を及ぼすという事実については、既に数多くの研究⁵⁻¹¹⁾が行われており、教室の谷村¹²⁾、橋本¹³⁾らもハムスターに低級～中級の飽和脂肪酸をその構成として多量に含有する脂肪を投与すると、その胆嚢内にコレステロール系結石を形成せしめ得ることに成功している。

著者は、本論文に於て、胆石を形成せしめる因子が亦膵炎を惹起させ易い状態を作り出すのではないかと考えるに至り、胆石形成の場を提供する胆嚢を有するハムスターを駆使応用し、各種の食餌の与える影響を、膵腺細胞の細胞膜抵抗性を比較することにより、胆石に合併する急性膵炎には、全身の因子、就中食餌性因子が、密接に関与していることを実験的に証明した。

II. 実験材料並びに実験方法

試獣としては、40～50g のハムスターを使用し、一匹づつ別々のケージに入れ、1 週間市販固形食を与え

ながら環境に慣れさせた後に、次の4群に別け、夫々の飼料を与えた。即ち、I. 対照として市販固型食群、II. 無脂肪食群、III. バター食群、IV. ゴマ油食群、の4群であり、各群共雌雄各々10匹計20匹づつとした。夫々に投与された実験食の組成は、第1表の通りであり、食餌量は1匹当たり1日10gである。食餌は毎日交換追加し、水は新鮮なものを自由に与え、糞食を避ける為、ケージは底も金網になっているものを用い、務めてケ

第1表 実験食組成

	Butter fat diet	Fat free diet	Sesame oil diet
Glucose *	50.0 %	70.0 %	50.0 %
Casein **	20.0 %	20.0 %	20.0 %
Choline ***	0.5 %	0.5 %	0.5 %
Vitamins ****	1.0 %	1.0 %	1.0 %
Salt mixture †	5.0 %	5.0 %	5.0 %
C. M. C. ††	3.5 %	3.5 %	3.5 %
Butter †††	20.0 %	—	—
Sesame oil††††	—	—	20.0 %

* 注射用グルコース：第一製薬

** 牛乳抽出カゼイン：半井化学薬品

*** 塩化コリン：半井化学薬品

**** パンビタン末：武田薬品工業

† NaCl 4.6

NaH₂PO₄ 9.2

K₂HPO₄ 25.3

CaH₄(PO₄)₂H₂O 14.3

Ca lactate 36.9

MgSO₄ 7.0

KI 2.6

100.0 g

†† Carboxymethyl Cellulose

Sodium Salt：半井化学薬品

††† 天然バター：雪印乳業

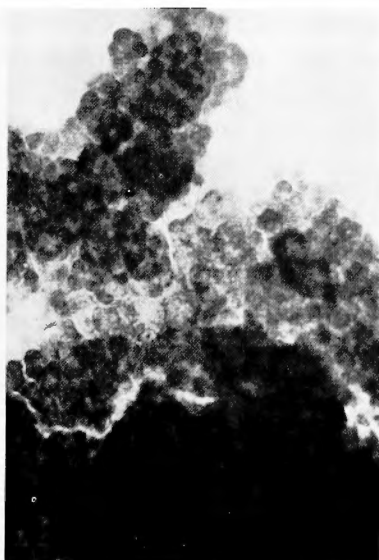
†††† 半井化学薬品

ージの清潔を保った。飼育室内温度は20～26℃に保った。食餌は完全な合成食である為、無脂肪食群では時に下痢を起して死ぬ試獣がある為、セルロースの成分としてCMCを少量加える事により、その防止に務めた。

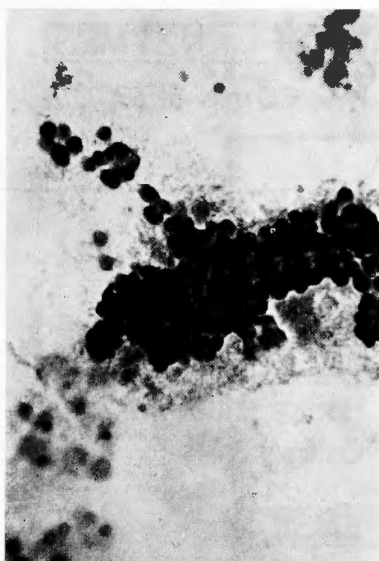
教室の多数の過去の実験から、胆石を形成せしめ得る食餌（以下胆石形成食と呼ぶ）を与えて4週間を過ぎると、ハムスターの胆嚢内に、コレステロール系結

石をほぼ100%に形成する事実が判明している点^{13)~15)}より、実験食を与え始めてから3週間目に膵を摘出し実験に供した。何故ならば、4週間を過ぎると、既に胆嚢で形成された胆石が、しばしば総胆管内に排出されているのを認めるので、それが更に乳頭部に嵌頓することにより惹起されるかも知れない膵炎が存在しない事を必要としたからである。

試獣の頭部を軀幹より強力に牽引することにより、頸椎を脱臼させ、仮死状態にした上開腹し、バルビタ

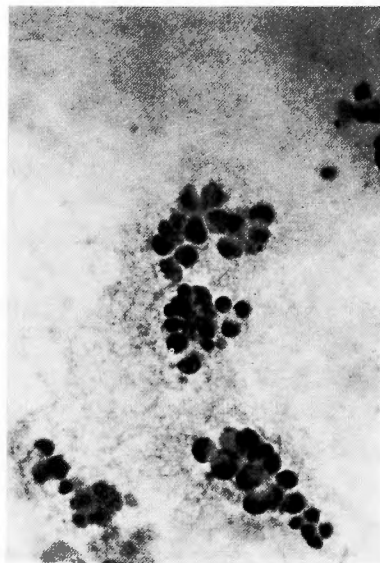


第1図-a 10分

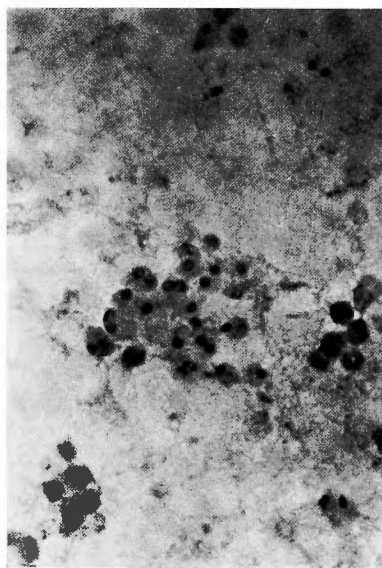


第1図-b 20分

ハムスターの膵腺細胞遊離 (100×)



第1図-c 40分



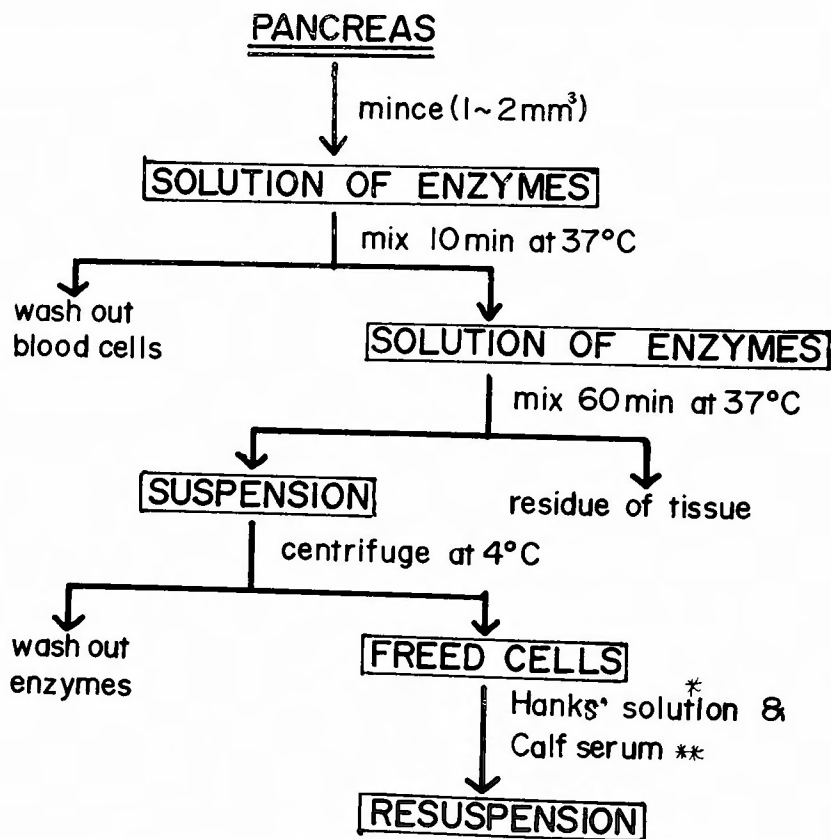
第1図-d 60分

ールやエーテル等の麻醉剤の影響なしに膵を摘出した。摘出した膵の一部は病理組織学的検索の為に採り、残りの全量は直ちにビーカーに用意した Puck 氏液¹⁶⁾の中で洗滌し、血液や余分な脂肪組織、結合組織等を除去する。この操作を新鮮な液にとりかえながら手早く3回繰り返して充分行なう。洗滌の終わった膵を小シャーレ内で Puck 氏液を少量加えて、良く切れる眼科用剪刀で $1\sim 2\text{mm}^3$ になる迄手早く細切する。別に Puck 氏液 50ml, 0.02% EDTA 25ml, ヒアルロニダーゼ 500 mg, コラゲナーゼ 5mg, 1% パンクレアチン液 25ml より成る酵素消化液を用意し、細切した膵小片を、別のビーカーに入れた 25ml の、この酵素消化液中に入れ、37°C の恒温槽の中で 200rpm の速度で10分間、磁力式攪拌器にかけ攪拌する。この操作は、更に洗滌を確実にすることと、細胞の遊離化を図るという2つの意味をもっている。

10分後清潔な4枚ガーゼで濾過し、赤血球、白血

球、脂肪細胞等を含む濾過液を棄て、ガーゼに残った純粋な膵組織片を、更に 37°C、25ml の酵素消化液に入れ、37°C、200rpm の速度で60分間磁力式攪拌器で攪拌する。この操作で膵腺細胞間の結合は解かれ、膵腺細胞は生きた儘、遊離した状態になる(第1図 a ~ d)。この液を金属メッシュ150の漏斗で濾過して濾過液を採取し、酵素の作用を止める為、1000rpm、4°C の条件のもとに10分間冷却遠心分離器にかけ、酵素を含む上清を棄てて、細胞集団の沈渣に更に 30ml の Hanks 組織培養液と仔牛血清を 4 : 1 の割合で混合した液を加えて、同じ条件下で10分間遠心分離し洗滌する。

1匹のハムスターから摘出される膵は、約 200mg であり、著者のこの細胞遊離法(第2図)によれば、1匹平均 6×10^6 個の膵腺細胞を採取することが出来るので、この細胞集団の沈渣に 2ml の Hanks 組織培養液を加えて再浮游液として検体に当てた。



第2図 細胞遊離法

* Hanks' Balanced Salt solution : 阪大微生物研究所
 ** 阪大微生物研究所

細胞数の算定にあたり，自動計数器を使用せずに細胞を血球計算盤上で，ゴミや他の細胞と，膵腺細胞とを肉眼で区別しながら計測し，更に0.3%ニグロシン液を加えて細胞が死亡していない事を確認する．細胞膜に侵害を受けて細胞が死亡していると，ニグロシンにより核，細胞質共に黒く染色されるが，生きた細胞は透明で輝いているので，その生死の判別は極めて容易である(第3図)．細胞の生存を確認すると共に細胞数を数えた後，検鏡し易い程度に，必要に応じて細胞浮游液として希釈する．



第3図 ニグロシン染色による遊離膵細胞生死の判別(黒染しているのが死んだ細胞)

得られた細胞浮游液を梅毒血清検査用分注盆に，マイクロピペットを用いて0.1ml宛分注し，膵炎起因物質としてとりあげられている物質，即ち，1)トリプシン，2)被検同一試獣の胆嚢胆汁，3)胆汁添加トリプシン，4)フォスフォリパーゼA，5)エラスターゼ，6)フォスフォリパーゼA添加トリプシン，7)エラスターゼ添加トリプシン，の図又は表で示し

た培養希釈液を夫々0.1ml宛加えて，37Cで20分間 incubate した後，これらの物質が，濃度の差によってどの程度に細胞膜を侵害し細胞を死に至らしめるか，それぞれの食餌投与群の間で比較検討した．尚，incubation の条件を知る為に，前記の Hanks 組織培養液と仔牛血清の混合液及び生理的食塩水を用いて経時的变化を観察した．

ニグロシンは細胞膜に対する毒性が，従来用いられてきたトリパンブルーよりも一層低く，且つ健常な細胞膜はニグロシンの様なコロイド状染料を拒否する性質を有するので，各膵炎起因物質作用下に於ける細胞の生死の判別には，0.3%ニグロシン液を0.04ml加えて細胞の染色性を血球計算盤上で検鏡し，全細胞数に対する死細胞数の比率を以て比較する方法を用いた．又，先に採取した膵組織をツェンケル・ホルモル液¹⁷⁾で固定しHE染色により，夫々の食餌投与群において詳細に検索を行ない，細胞遊離時における病理組織学的所見をも検討した．

Ⅲ. 実験結果

著者は，Haig が犬の膵腺細胞遊離に成果を挙げた方法¹⁸⁾を，ハムスターの膵に应用したが，結果は viscous residue の中に数個の膵腺細胞を得るに止まり，本実験にはその儘用いる事が不可能であった．そこで，1)トリプシン，2)パンクレアチン，3)パンクレアチン+EDTA+コラゲナーゼ+ヒアルロニダーゼの三者の間に，夫々生細胞の遊離化に使用する場合，細胞収量にどれだけの違いがあるかを調べた(第2表)．トリプシンの場合には，0.25%トリプシン25ml，Puck氏液50mlの混合液を用い，パンクレアチ

第2表 酵素による細胞収量の経時的比較

	Trypsin*		Pancreatin**		Pancreatin EDTA *** Collagenase † Hyaluronidase ††	
	alive	dead	alive	dead	alive	dead
30 min	trace		trace			
60 min	13.0×10 ⁴	0	53.0×10 ⁴	0	1682×10 ⁴	0
90 min	waste		35.3×10 ⁴	22.0×10 ⁴	trace	

* Powdered trypsin 1:250: Difco Labo. USA
** パンクレアチン末: ホエイ薬工
*** 中村化学
† Sigma chemical Co. USA
†† スプレーゼ: 持田製薬

液 50ml の混合液を用いたが、両者に比較してパンクレアチン+ EDTA + コラゲナーゼ+ ヒアルロニダーゼに Puck 氏液 50ml を加えた混合液を用いた場合には、60分間の磁力式攪拌器での混合により、30~100 数十倍の細胞収量があり、しかも 100 % 生きた膵腺細胞を得た。90分では、トリプシン単独の場合 viscous residue が多量に産生されて細胞は殆ど遊離されず、又遊離された細胞は破壊されていた。パンクレアチン単独の場合には、細胞は得られるがニグロシンで染色してみると既に死んで了っているものが多数みら

第3表 Incubation time による細胞安定性の変動 (細胞生存率：%)

Incubation time (min)	10	20	30	40	50	60
Saline	100	98	97	95	97	95
Hanks' * solution	100	99	97	97	98	97

* 20% 仔牛血清加

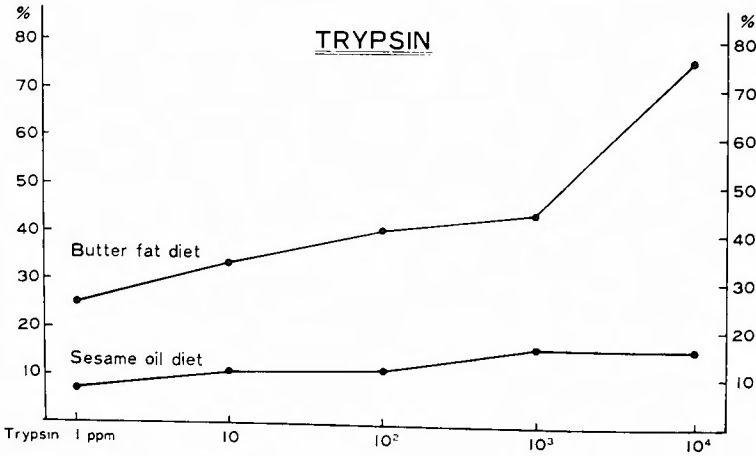
第4表 20分間の Incubation が細胞に与える影響 (細胞生存率：%)

	Balanced Diet (N=17)	Fat free Diet (N=18)	Butter fat Diet (N=19)	Sesame oil Diet (N=9)
Saline	97.3±0.2	98.7±1.3	89.6±5.3	97.2±0.4
Hanks' * solution	99.0±0.9	99.1±0.1	84.3±11.7	97.6±0.4

* 20% 仔牛血清加

第5表 トリプシン作用時の細胞安定性 (死亡率：%)

	Trypsin concentration (ppm)				
	1	10	10 ²	10 ³	10 ⁴
Butter fat diet	25.7±8.4	34.2±6.3	40.7±4.8	4.2±6.7	76.1±2.5
Fat free diet	11.8±2.2	12.7±2.4	17.2±4.4	27.3±6.0	28.2±5.9
Sesame oil diet	7.2±0.4	11.5±1.4	12.1±0.4	17.0±1.6	17.0±0.8
Balanced diet	7.7±1.9	10.0±2.8	13.3±1.7	11.3±1.6	24.1±3.2



第4図 トリプシン作用時の細胞死亡率

れた。パンクレアチン+ EDTA + コラゲナーゼ+ ヒアルロニダーゼでは、遊離し尽された感じで、90分間攪拌しても更に多くは得られなかった。 incubation timeを決めるに当り、生理的食塩水並びに Hanks 液と仔牛血清の混合液とで60分迄10分毎に追跡を行なうと、20分から生存率の低下が始まるので、生細胞の細胞膜に侵害を与える物質を作用させるに必要な最長時間は20分迄とした(第3表)。

20分間 incubation を行なって、それだけで各食餌投与群の間に差があるかどうかを比較してみると、他の群にくらべてバター食群だけが選択的に明らかに生存率が低く、細胞膜の抵抗性の減弱を暗示している事実がまず判明した(第4表)。

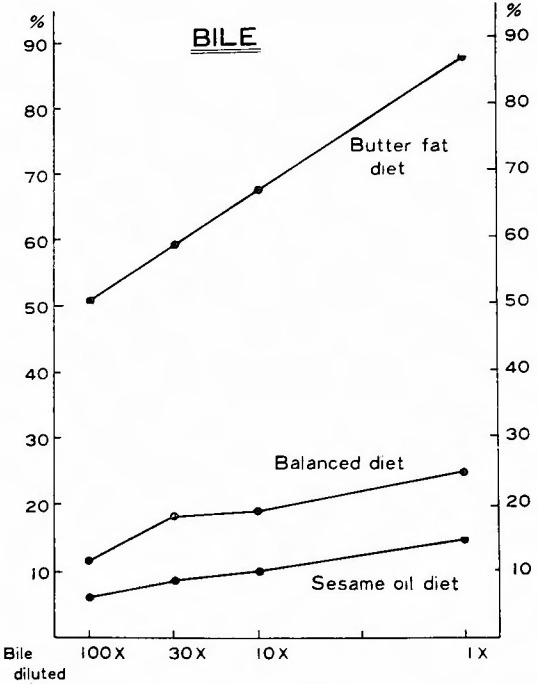
さて、侵害因子としてトリプシンを作用させた場合には、低濃度の場合には各群の間に余り差が見られな

いが、濃度が上るにつれてバター食群と無脂肪食群において、細胞の死亡率が増え、固型食群、ゴマ油食群に較べて、はるかに細胞膜の抵抗性が減弱していた(第5表、第4図)。

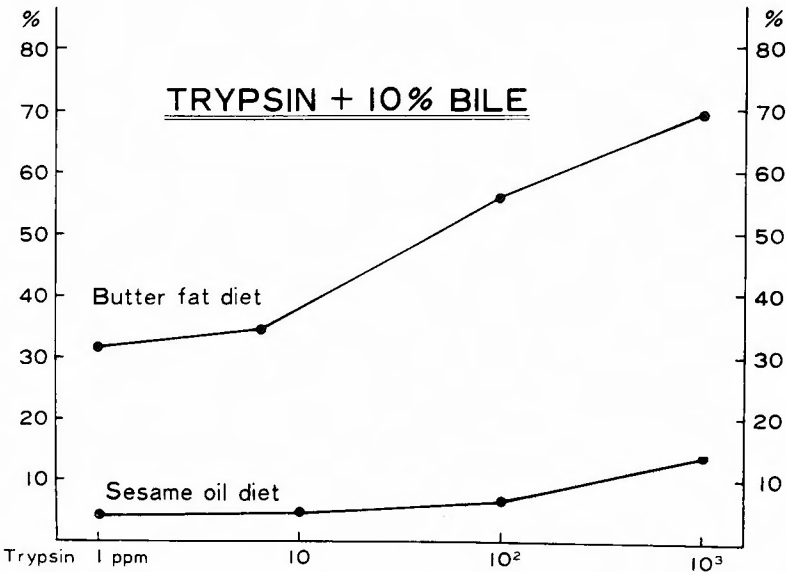
同一個体より採取した胆汁を作用させると、生食で

第6表 10%胆汁添加トリプシン作用時の細胞安定性(死亡率：%)

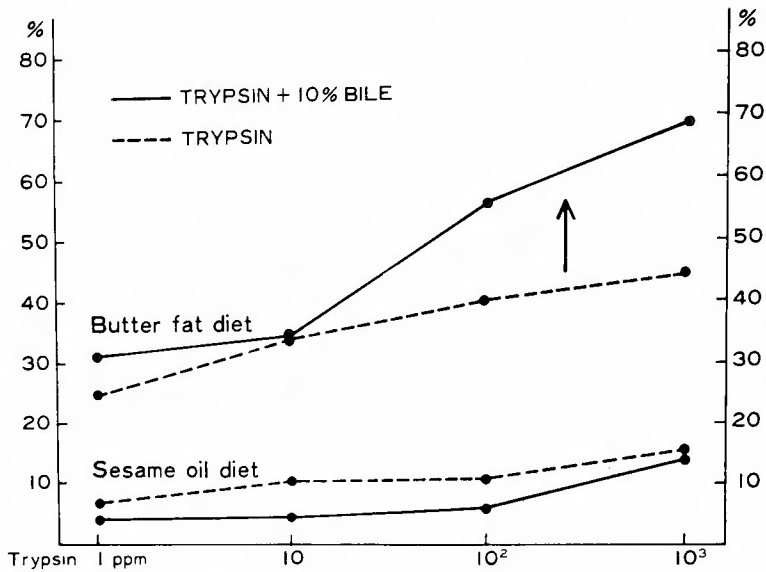
	Trypsin concentration (ppm)			
	1	10	10 ²	10 ³
Butter fat diet	31.9±7.6	34.4±7.4	56.2±6.2	69.1±5.7
Fat free diet	8.0±3.7	10.5±3.4	32.8±8.7	47.5±5.1
Sesame oil diet	4.3±1.0	4.6±0.9	6.4±0.4	14.0±5.1
Balanced diet	4.0±1.6	4.9±0.9	6.4±0.5	11.5±2.3



第5図 胆汁作用時の細胞死亡率



第6図 10%胆汁添加トリプシン作用時の細胞死亡率



第7図 10%胆汁添加トリプシン作用時とトリプシン単独作用時に於ける細胞死亡率の比較

希釈した低濃度の場合にも既にバター食群及び無脂肪食群での死亡率が、固型食群及びゴマ油食群のそれよりも、比較にならない程高く、高濃度になるにつれて他の二群に比して急速に死亡率が増加する(第5図)。

10%胆汁添加トリプシンの場合にも同様の結果が得られた(第6表、第6図)。

フォスフォリパーゼA，エラスターゼを作用させた場合にも、同様に、対照群に比較してバター食群に、細胞膜の抵抗性の減弱が認められた(第7表、第8表)。

興味ある事実として、第4図と第6図を比較してみると、トリプシンを単独に作用させた場合と、トリプシンに胆汁を加えた場合とでは、トリプシン濃度が同じであっても、全濃度にわたって胆汁添加トリプシンの方が死亡率が高い(第7図)。

フォスフォリパーゼAにトリプシンを加えて作用させた場合にも、フォスフォリパーゼA単独で作用させた場合に較べて、侵害作用が強い事が判明した(第9表)。

一方、エラスターゼにトリプシンを添加して作用させた場合には、エラスターゼ単独の場合と、余り侵害程度に差が無い様に思われる(第10表)。

これらの膵腺細胞の細胞膜抵抗性の変化が、食餌の直接の影響下にあり、且つ非可逆性器質的变化を惹起して了っているのかどうか検討する為に、バター食で飼育した試験を市販固型食に切り換えて飼育し、

その際の膵腺細胞の細胞膜のトリプシンに対する抵抗性を調べた。即ち、5週間20%バター食で飼育後、開腹により胆嚢内にコレステロール結石の存在するのを確認し(第8図、第9図)、市販固型食で更に6週間飼育し実験に供したところ、初めから市販固型食で飼育

第7表 フォスフォリパーゼA作用時の細胞安定性(死亡率：%)

	Phospholipase A* concentration (ppm)			
	10	5 × 10	5 × 10 ²	5 × 10 ³
Butter fat diet	24.4 ± 4.0	25.3 ± 3.9	30.9 ± 6.1	40.4 ± 4.8
Fat free diet	9.3 ± 3.7	9.3 ± 0.5	9.6 ± 1.9	16.4 ± 1.1
Balanced diet	4.2 ± 0.2	4.1 ± 0.9	4.7 ± 1.1	10.2 ± 1.1

Boehringer Mannheim GmbH

第8表 エラスターゼ作用時の細胞安定性(死亡率：%)

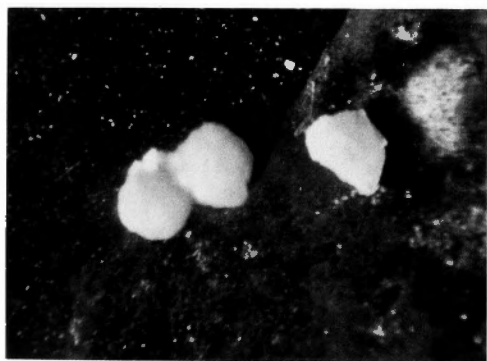
	Elastase* concentration (ppm)		
	2 × 10	2 × 10 ²	2 × 10 ³
Butter fat diet	43.7 ± 1.8	49.5 ± 3.7	60.0 ± 4.4
Fat free diet	14.5 ± 4.1	22.1 ± 3.2	38.0 ± 1.4
Balanced diet	9.3 ± 2.3	11.6 ± 2.5	21.0 ± 1.0

* Boehringer Mannheim GmbH



第8図 ハムスターの胆嚢内結石(8×)

(バター食で5週間飼育したもの。
胆嚢内に黄白色のコレステロール
系結石が見える。)



第9図 摘出されたハムスターの胆嚢内結石(8×)

第9表 トリプシン添加フォスホリパーゼ

A作用時の細胞安定性(死亡率: %)

$P_1^* + T_1^\dagger$	59.2 ± 8.7	P_1	25.3 ± 3.9	T_1	44.2 ± 6.7
$P_2^{**} + T_2^{\dagger\dagger}$	56.1 ± 9.0	P_2	24.4 ± 4.0	T_2	40.7 ± 4.8

* Phospholipase A.....5×10ppm,

** Phospholipase A.....10ppm,

† Trypsin.....10³ppm†† Trypsin.....10²ppm

(バター食群に於ける成績でフォスホリパーゼA,
トリプシンを単独に作用させた場合との比較)

第10表 トリプシン添加エラスターゼ作用時

の細胞安定性(死亡率: %)

$E_1^* + T_1^\dagger$	42.9 ± 2.0	E_1	43.7 ± 1.8	T_1	44.2 ± 6.7
$E_2^{**} + T_2^{\dagger\dagger}$	40.3 ± 2.4	E_2	42.8 ± 0.8	T_2	40.7 ± 4.8

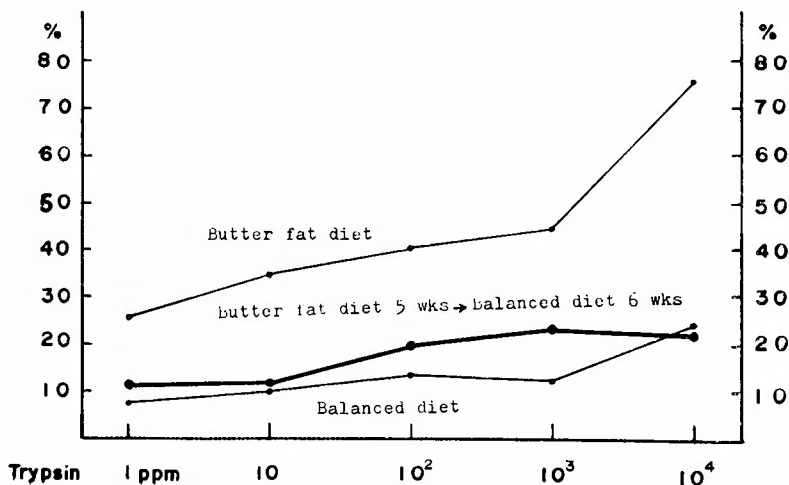
* Elastase...2×10ppm, + Trypsin...10³ppm** Elastase...4ppm, †† Trypsin...10²ppm

(バター食群に於ける成績で、エラスターゼ、トリ
プシンを単独に作用させた場合との比較)

第11表 バター食5週間投与後固形食6週間投与
した場合の細胞安定性

(トリプシン作用時の死亡率: %)

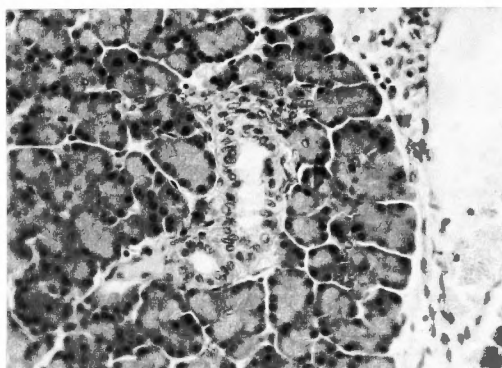
Trypsin concentration (ppm)				
1	10	10 ²	10 ³	10 ⁴
11.2 ± 1.0	12.8 ± 2.5	19.3 ± 3.6	23.7 ± 0.4	21.8 ± 2.3

第10図 バター食5週間投与後、固形食6週間投与した場合の
細胞死亡率(太線)(細線は3週間投与時)

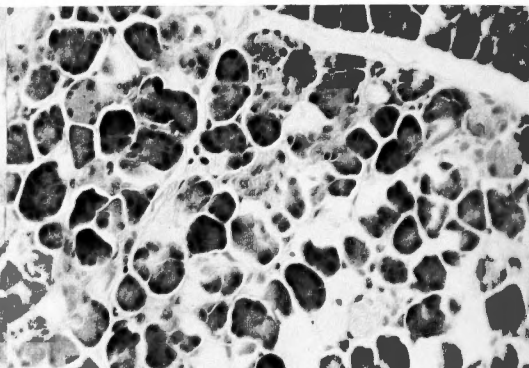
した群と、殆ど変らない結果を得た(第11表, 第10図)。尚、市販固型食に戻して6週間後には、胆嚢内結石は消失していた。

更に形態学的変化についても病理組織学的検索を行えば、実験食開始後2週、4週、8週の各群の膵に、肉眼的には、出血、壊死、腫脹、線維化等の変化は見られず、組織学的には、バター食群の4週の膵組織で小膵管上皮が腫大し、やや淡明となっている部分があり、小葉内の肥胖細胞が、やや増加しており、一部に

血管炎の様相を呈している部分が見られた。又、バター食8週の膵では、小葉内に線維化傾向にある部分が存在し、核の空胞変性、上皮基底部の好塩基性消失、胞体の空胞変性等か、何れも極く少数のものにみられた。いづれにしても、これらの変化が非常に散発的であり、亦極く一部にしか見られない事から、少なくともこの様な食餌の変化からのみでは、明らかに急性膵炎の像を呈するに至っているとは言い難い(第11図)。



第11図—a バター食4週間飼育ハムスターの膵
(400× HE染色)
(膵管上皮の軽度腫大が一部に見られた。)



第11図—b バター食8週間飼育ハムスターの膵
(400× HE染色)
(小葉内線維化傾向が極一部に見られた。)

Ⅳ 考 案

急性膵炎の病因、発生機序については、種々の説明が試みられており、従来から最も重視されているのは機械的因子である。即ち、Opieの共通管説に始まり、これに類した胆汁の膵管内逆流説乃至は膵管閉塞、膵管上皮破綻説などである。今日では、アルコールと並んで過食や脂肪の摂取過多が膵炎の最も代表的な原因として採りあげられている^{19), 20)}。Heinkelらは、1950年代のドイツ人における急性膵炎の増加を脂肪過多食に関連づけており、Sarlesら²¹⁾は、急性膵炎患者の嚴重な食事調査を行なった結果、対照群に比して多量の脂肪摂取を行っていたと述べている。一方、Makiら²²⁾は、第2次大戦後、本邦において急性膵炎の発生率及び病態が欧米のそれと類似して来た事実は、本邦人の食習慣が欧米化した為であるとしている。

これらの日常の脂肪摂取過多という状態に加えて特殊な代謝性疾患や全身感染症或は癌の合併などは別と

して、今日では一般に急性膵炎の大多数例は胆石症か或はアルコールの過飲と関連があると考えられている。アルコール膵炎では、通常、慢性反復性膵炎の型をとるのに対し、胆石症膵炎では、しばしば一回の発作がみられるのみで、以後は全く正常に復するか、再発が起っても膵不全に達進行することは少いと言われている。

本邦に於ける胆石症に合併する膵炎を考えるに当っては、次の事を念頭に置かねばならない。

- 1) 本邦人に比べて欧米人に於ては、急性膵炎に合併する胆石症、或は胆石症に合併する急性膵炎のいづれにおいても、その発生率が高い。
- 2) 欧米人に於ては、ビリルビン系結石に比してコレステロール系結石のしめる割合が高い。
- 3) 欧米人と本邦人と食習慣が異なり、欧米人では高脂肪・高蛋白食である。
- 4) 本邦でも、コレステロール系結石のしめる割合が、最近増加している。
- 5) 本邦人の食生活が欧米化してきている。

これらの事実を考えあわせれば、欧米人においてコ

コレステロール系結石の患者に急性膵炎が合併し易いことは、その食習慣、中でも脂肪摂取の過多と密接な関係があるように考えられ、4) 5)の事実を併せて考えれば、本邦においては今こそこの問題を究明しておく必要があると言える。

著者は、脂肪摂取過多が単に急性膵炎の発症に誘因となっているに止まらず、脂肪摂取の過多就中動物性脂質の摂取過多という食習慣が、根本的に膵炎にかかり易い体質を招来しているところに、その誘因としての本質があるものと考えている。

胆石形成の成因の一つとして、胆石形成食投与による胆石形成実験から、全身的要因を重視する報告⁵⁻¹¹⁾は数多く行われているが、教室でも多数の、胆石症就中コレステロール系結石の形成に関する実験的且つ臨床的研究において、高脂肪食がその発生の基本因子であることを証明してきた²³⁾⁻²⁶⁾。著者は、教室の方法による胆石形成食により飼育された試験動物を駆使応用して、その際の膵の状態を膵腺細胞の細胞膜抵抗性の変化と、病理組織学的変化の二面から観察した。試験動物としてはハムスターを用いたが Small²⁷⁾によれば、ヒビ(♀)を除けば、ハムスターは胆汁におけるコレステロールの溶存状態が最も人体に近い状態にあるので、これを選んだ。

著者の方法では、胆石形成食を投与すれば、胆石はハムスターの胆嚢内に飼育3週間目から発生し始め、4~6週間で殆どの試験動物の胆嚢内に充満し、一部は胆嚢管或は総胆管内に溢出しているのが観察され、それ以後は増量或は進行することが無い。従って、胆石による物理的な膵障害の起る以前、且つ十分に食餌性の影響を受けたと考えられる時期、即ち、胆石形成食による飼育3週間目の膵を実験に供した。

生細胞遊離法には、物理的遊離法と、酵素的遊離法とがある。物理的遊離法としては、鉄やhomogenizerを使用するが、これらはいずれも細胞自体に破壊的影響を及ぼしたり、又、細胞は間質線維組織に被われている為に、均等な細胞が得難く、しかも細胞収量が少ない憾みがある。一方、酵素的遊離法に用いられる化学的物質乃至酵素として、EDTA、トリプシン、パンクレアチン、コラゲナーゼ、ヒアルロニダーゼ、ATP、エラスターゼ、パバイン等²⁸⁾⁻³⁴⁾、従来種々用いられているが、遊離細胞の収集の際に、viscous residueを伴わない事が重要な条件の一つである。Hayashi等²⁹⁾は、人の羊膜細胞遊離の際、パンクレアチンがviscous residueを伴わず、しかも細胞収量の点で優

れていることを指摘している。

膵腺細胞の酵素的遊離法については、既に、Haig¹⁸⁾が犬の膵で行っているが、彼は1回の実験に5gという多量の膵組織を用いている。一方、ハムスターの膵の重量は、一匹当たり平均約200mgであり、Haigの方法をその儘本実験に用いるとすれば大量のハムスターが必要であり、又、人や犬の膵と、ハムスターや兎の膵を比較した場合、後者は著しく脆弱な結合組織を有する為に、前者に比して非常に軟かい組織であるから、彼の用いたトリプシン+コラゲナーゼ+EDTA法では、余りに破壊力が強く且つ採取された膵腺細胞は、それら酵素の影響を蒙ることが懸念される。従って彼の方法は、その儘本実験に用いることは出来なかった。一方、人、動物の膵の如何を問わず、実験に用いる膵の重量が一定量以下では、生きた遊離膵腺細胞の収量が著しく減少するという事実があった。そこで著者は、最低三匹以上のハムスターを1ブロックとして1回の実験に用いた。

著者は、ハムスターの膵腺細胞遊離にあたり、前述の諸々の点を検討した結果、パンクレアチン、EDTA、コラゲナーゼ、ヒアルロニダーゼ、Puck氏液の混合液を使用することにより、ハムスター一匹当たり約 6×10^6 個の生膵腺細胞を得、細胞破壊も無く、細胞遊離操作の副産物たる viscous residue も極く少ない事などから、この方法がハムスターの膵腺細胞の遊離に関する限り極めて優れた方法であると考えている。

膵炎の化学的因子として従来胆汁成分、トリプシン、フォスフォリパーゼA等が採上げられてきた³⁵⁾⁻³⁹⁾。しかし最近では更にエラスターゼも重要視されてきている^{40,41)}。これら膵腺細胞侵害物質の個々を、前述した方法により得た膵腺細胞に直接作用させ、その食餌間の相違を検討した。第5図に示す如く胆汁成分においては、明らかに高脂肪食群のみが圧倒的に障害を受け易く、一方、必須脂肪酸(EFA)を多量に含むゴマ油食群は、固型食群対照群と、ほぼ同じ態度を示し、胆汁の影響を殆ど受けない。

トリプシンについても、胆汁程ではないが、胆石形成食である高脂肪食群のみが激しい侵害を受け、EFA含有の多いゴマ油食群及び固型食群においては、その影響が軽微であった(第5表、第4図)。フォスフォリパーゼAについても第7表の如く食餌の影響が強く認められた。エラスターゼについては、純品が入手困難である為、極く一部しか実験出来なかったが、第8表の如く胆石形成食の方が影響を強く受ける事を示唆す

るデータを得た(第8表)。これらの実験成績は、Haig⁴²⁾が、脂肪としてラード40%を含む高脂肪食で6週間飼育した犬の膵腺細胞を用いて、トリプシン、Ox bile を侵害物質として実験を行ない、対照群に比して高脂肪食群の細胞膜のトリプシン並びに Ox bile に対する抵抗性が低下していたと報告していることと、同様の傾向を示している。

以上の様に、胆石形成食にて3週間飼育すれば、膵腺細胞に膵炎を惹起し易い状態が既に生ずる事が判明したが、かかる変化が純粋に食餌性の影響であるか否かを検討する為に、ハムスターを5週間胆石形成食で飼育し、ネムブタール麻酔下に開腹し、胆嚢内に黄白色のコレステロール結石を生じている事を職認した後、その儘開腹した同一個体を、固型食にて更に6週間飼育したところ、既に結石は溶解消失し、膵腺細胞のトリプシンに対する抵抗性も初めから固型食で飼育したハムスターの膵腺細胞と、ほぼ同じレベルにまで、その抵抗性が復元していることを知った(第11表、第10図)。胆石を形成せしめる様な食餌の状態が、直接に膵細胞の抵抗性をも同時に減弱させており、膵炎を招来し易い状態を、かもし出し、しかもその状態は、全く食餌性因子のみにより誘導されるので、食餌が変われば復元する可能性を示唆している。

この様な状態が果して人体で観察されるか否かを検討している共同研究者小山によれば、本教室に入院した胆石患者の手術時に、バイオペシーにより採取した膵組織の遊離細胞は、本実験と同様に行なったトリプシンに対する抵抗力の検索で、コレステロール結石患者のそれは、胃潰瘍患者などの対照群に比して弱い事が明らかにされつつある⁴³⁾

病理組織学的検索においては、膵腺細胞採取時は勿論の事、飼育期間を更に延長して8週間にしても、これら実験食投与のみににおいては、明らかな急性膵炎の像を呈するまでには至っていない事が判明した。

能登⁴⁴⁾は、ラットの食餌実験において、高蛋白・高脂肪食で飼育した試獣の総胆管の十二指腸流入部にクリップをかけ、急性膵炎を起さしめて病理組織学的に検討したが、その際、対照群に比して高蛋白・高脂肪食で飼育したラットの膵炎の程度が、より高度であり、更にその修復反応も旺盛であったという。

GreenやLirosayは、高脂肪・低蛋白で飼育した白ネズミにおいて、肝線維症、膵炎の組織学的変化があったと報告し、Haig⁴²⁾は、犬の膵管に胆汁及びトリプシンを注入して結紮したところ、高脂肪食で6週間

飼育した試獣の膵臓は、対照に比して、より強い障害を受けたと報告している。

一方、ハムスターの屠殺時における膀胱尿のアミラーゼ・アイソザイムについて検討した共同研究者の小川によれば⁴⁵⁾、8週間で胆石形成食群の膵アミラーゼ分画の減少を軽度認めただけで、人体にみられる様な急性膵炎の際のアミラーゼ・アイソザイムの変化は、現在のところ認められていない。

O' Brien, Van Deenen⁴⁶⁾⁴⁷⁾らは、食餌が細胞膜の安定性と構造に与える影響について詳述している。

細胞膜の構成上、脂質は蛋白に次いで非常に重要な成分であり、主として phospholipids と、コレステリン及びそのエステルを主成分としているが、細胞膜の phospholipids に合成されている脂肪酸の種類は、食餌として摂取した脂肪によって良く反映されており⁴⁸⁾⁴⁹⁾、細胞膜の安定性は、lipoprotein 膜に含まれる脂肪酸の分子構造にも一部依存している⁴⁶⁾⁴⁷⁾。従って、高脂肪食が lipoprotein 膜の分子構造を変化させて、その結果この構造の安定性を低下させるのではないかと考えられる。Haig⁵⁰⁾もその実験を通じて、高脂肪食により細胞膜の抵抗性と統合性に変化が生ずるのであろうが、その過程は明らかでない、としている。

著者の実験における高脂肪食、就中低級～中級の飽和脂肪酸を多量に含むバター食の如き動物性脂肪は、胆石を形成せしめると同時に、膵腺細胞の細胞膜にも生化学的にその構造学的変化を惹起せしめ、細胞膜の抵抗性の異常を来たさしめるに至るのに対して、多不飽和脂肪酸を多く保有するゴマ油の如き植物性脂肪は、全く逆の作用を示すことが考えられる。従って、この実験を通じて脂肪摂取過多、それも動物性脂肪の摂取過多は、病理組織学的に未だ膵炎の像を呈する以前に、既に膵腺細胞の細胞膜に変調を来たさしめ、そこに更に外因が加われば、容易に膵炎に移行し易い状態、謂わば、膵炎準備状態とも言える環境を招来している事を立証し得たものと言い得るのであろう。

V. 結 語

胆石症、就中コレステロール系結石と、それに合併する急性膵炎の発生誘因の間に、共通の因子が存在するのではないかと考え、ハムスターの胆嚢内にコレステロール系結石を形成せしめ得る食餌や、それを形成せしめ得ない食餌を種々与え、3週間後に膵を摘出し

て、組織培養に用いられる方法に準拠した方法を用いて酵素的に膵腺細胞の遊離化を行ない、その細胞浮遊液を作製して、生細胞に種々の膵細胞膜侵害物質を作らせて、ニグロシン染色により、各食餌投与群の膵腺細胞の細胞膜の抵抗性を比較検討した結果、次の様な結論を得た。

- 1) ハムスターの膵組織から遊離腺細胞を得るのには、1%パンクレアテン液 25ml, 0.02% EDTA 液 25ml, コラゲナーゼ 5 mg, ヒアルロニダーゼ 500単位、及び Puck 氏液 50ml の混合液を用い、磁力式攪拌器で 37°C, 200 rpm, 60分攪拌することが優れた方法である事を証明した。
- 2) 胆石形成食投与群の膵腺細胞の細胞は、トリプシン、胆汁、フォスフォリパーゼ A, エラスターゼ、及びトリプシンと、それらの混合物に対して、対照群のそれに比較して抵抗性が著しく減弱していた。
- 3) 胆石形成食を投与して、胆石を形成した事を確認したハムスターに再び市販固型食を与えると、一定期間後に胆石は消失し、膵腺細胞の抵抗性も亦、対照群とほぼ同じ状態にまで復元するという結果を得た。
- 4) 胆石形成食投与群の 8 週間の追跡によれば、光学顕微鏡での検索では、組織学的には明らかな急性膵炎の像は得られなかったが、極く一部のものにおいて、小葉内の線維化傾向、上皮変性、血管炎様変化等が見られた。
- 5) これらの事実からして、食餌性因子、とりわけ高動物性脂肪食により、膵腺細胞の細胞膜の抵抗性が減弱するという事実が、一層明確となり、もし他の外的誘因が加われば容易に膵炎に移行し易い状態、謂わば膵炎準備状態を形成するに至っているものと考えられる。
- 6) 近年本邦における食生活が欧米化する事により、コレステロール系結石の発生率が増加しつつあるが、それに伴ない急性膵炎の発生率も今後漸次増加するものと考えられる。

稿を終るにあたり、終始御指導下さり且つ御校閲を頂いた恩師日笠頼則教授、ならびに病理学的な面で御助言を頂いた病理学第二講座沢田真治助教授、共同研究者の谷村弘先生、小山高宣先生、内科学第二講座小川隆三講師に深く感謝の意を表する。

本論文の要旨は、

第 4 回日本成人病研究会

第58回日本消化器病学会総会

において発表した。

なお、本研究は文部省科学研究費（一般研究 B）の補助のもとに行なわれた。

文 献

- 1) 三宅博：胆石症。日本外科全書，24巻1：149～257, 1957.
- 2) 西村正也，中山文夫：胆石生成の生化学。日本臨床，24（6）：1017～1020, 1966.
- 3) 谷村弘：日本人の食事の欧米化とその危険性特に胆石発生を中心として。京都医誌，20（2）：93, 1971.
- 4) Opie, E.L.: Relation of Cholelithiasis to disease of the pancreas and to fat necrosis. Amer. J. Med.Sci., 121：27, 1901.
- 5) 日笠頼則ほか：Polyenoic Fatty Acid をめぐる臨床的諸問題，特に外科的立場から（その1）（その2）（その3）。最新医学，22：796, 937, 1227, 昭42.
- 6) 田中秋三：実験的胆石発生に関する硫黄の意義，京都府立医科大学雑誌，5：1715～1755, 昭6.
- 7) 横山保：日外会誌，36：2083, 1935.
- 8) 瀬木研一：胆石の成因に関する知見補遺。実験消化器病学，13：1733～1743, 昭3.
- 9) 臼杵天成：胆汁中の Ca, Mg, Ka, Na, 及類脂肪体の含有量に及ぼす内分泌機能の影響に就きて附，胆石の形成に対する一考察。実験消化器病学，4：1006, 1926.
- 10) 山沢準三郎：胆石の成因に関する実験的並に臨床的研究。実験消化器病学，9：3333～360, 昭9.
- 11) Dam, H. and Christensen, F. Alimentary production of gallstones in hamsters I. Acta path. microbiol. scand., 30：236, 1952.
- 12) 谷村弘，日笠頼則：胆石症コレステロール結石。日本臨床，30（1）：234～241, 1972.
- 13) Hashimoto, K.: Experimental studies on gallstones in hamsters. Arch. Jap. Chir., 35（6）：981～996, 1966.
- 14) Togo, M.: Cholesterol gallstone formation in hamsters with histological findings in livers and gallbladders. Arch. Jap. Chir. 38 4：565～580, 1969.
- 15) Muroya, H.: Stimulative effect of dietary glucose on hepatic cholesterol biosynthesis and formation of cholesterol gallstones in hamsters. Arch. Jap. Chir. 37（1）：76～93, 1968.
- 16) 山田正篤：組織培養基礎と応用，朝倉書店，東京，昭45.

- 17) 緒方知三郎: 病理組織顕微鏡標本の作り方手ほどき, 南山堂, 東京, 昭30.
- 18) Haig, T. H. B. : Methods in pancreatitis using living acinar cells. The Canadian Journal of Surgery, 13 : 251~254, 1970.
- 19) Mores, L. J. & Achs, S. Acute pancreatitis, a clinical evaluation and review of 154 cases. Ann. Surg., 130 : 1044~1058, 1949.
- 20) Sullens, W. E. & Lichterstein, M. E. : Acute pancreatitis, diagnosis and treatment. Ann. Surg. 134 : 853~862, 1951.
- 21) Sarles, H. et al : Aetiology and pathology of chronic pancreatitis. Bibl. Gastroent., 7 : 114, 1965.
- 22) Maki, T. et al : Differences in clinical manifestations of chronic pancreatitis between the Japanese and Western peoples. Tohoku J. Exp. Med., 92 : 291, 1967.
- 23) Hikasa, Y. et al : Initiating factors of gallstones, especially cholesterol stones I. Arch. Jap. Chir., 33 : 601, 1964.
- 24) Hikasa, Y. et al : Initiating factors of gallstones, especially cholesterol stones II. Arch. Jap. Chir., 34 : 1430~1461, 1965.
- 25) Hikasa, Y. et al : Initiating factors of gallstones, especially cholesterol stones III. Arch. Jap. Chir., 38 : 107~124, 1969.
- 26) Tanimura, H. : Experimental studies on the etiology of cholelithiasis. Arch. Jap. Chir., 34 : 1160~1180, 1965.
- 27) Small : 第9回国際消化器病学会. Paris, 1972.
- 28) Anderson, N. G. : The mass isolation of whole cells from rat liver. Science, 117 : 627~628, 1953.
- 29) Hayashi, H., LoGrippe, G. A. : Preparation of primary human amnion cells by pancreatin procedures and their susceptibility to enteroviruses. J. Immun. 90 : 956~959, Jun. 1963.
- 30) Swallow, R. L., Sayers, G. : A technic for the preparation of isolated rat adrenal cells. Proceeding of the Society for Experimental Biology and Medicine. 131 : 1~4, 1969.
- 31) Portanova, R. et al : A trypsin technic for the preparation of isolated rat anterior pituitary cells. Proc. Soc. Exptl. Biol. and Med. 133 : 573~576, 1970.
- 32) Yamada, T., Ambrose, E. J. : Preparation of cell suspensions from tissues using collagenase and hyaluronidase, especially for measuring the electrical changes of surface membranes of mammalian cells. Exp. Cell Res. 44 : 634~636, 1966.
- 33) Lasfargues, E. Y. Cultivation and behavior in vitro of the normal mammary epithelium of the adult mouse. Exp. Cell Res. 13 : 553~562, 1957.
- 34) Rinaldini, L. M. : An improved method for the isolation and quantitative cultivation of embryonic cells. Exp. Cell Res. 16 : 477~505, 1959.
- 35) Zieve, L., and Vogel, W. C. : Measurement of Lecithinase A in Serum and Other Fluids. J. Lab. & Clin. Med. 57 : 586, 1961.
- 36) Doizaki, W. M., Zievel. Turbidimetric serum phospholipase A activity in acute pancreatitis. J. Lab. & Clin. Med. 67 : 108~115, 1966.
- 37) Schmidt, H. et al : ein möglicherweise entscheidender Faktor in der Pathogenese der akuten Pankreatitis. Klin. Wschr. 45 : 163~164, 1967.
- 38) Gjone, E. og Mendeloff, A. : Serum-lyolecitin ved pankreas-og leversykdommer. Nord. Med. 69 : 233, 1963.
- 39) 本庄一夫ほか: 急性膵炎の病因. 総合臨床, 18 : 2779~2784, 1969.
- 40) Geokas, M. C. et al : The role of elastase in acute hemorrhagic pancreatitis in man. Laboratory Investigation. 19 : 235, 1968.
- 41) Rinderknecht, H. et al : Determination of elastolytic activity in blood of normal subject and patients with acute pancreatitis. Clin. Chim. Acta. 19 : 89~95, 1968.
- 42) Haig, T. H. B. : Experimental pancreatitis intensified by a high fat diet. Surg. Gyneco. & Obst. : 914~918, 1970.
- 43) 小山高直: 日本外科宝庫掲載予定
- 44) 能登陸: 膵炎の修復過程におよぼす食餌の影響. 日本消化器病学会雑誌, 69 : 869~877, 1972.
- 45) 小川隆三: アミラーゼ・アイソザイムの臨床的研究. 臨床化学シンポジウム第12号, 1972. 投稿中.
- 46) O'Brien, N. J. S. Cell membranes : composition ; structure ; as well as function. J. Theor. Biol. 15 : 307, 1967.
- 47) Van Deenen, L. L. M. : Some structural and dynamic aspects of lipids in biological membranes. Ann. N. Y. Acad. Sci. 137 : 717, 1966.
- 48) Hilditch, T. P. : The chemical construction

- tion of natural fats. 3rd Ed. N. Y., John Wiley and Sons, 1956.
- 49) Walker, B. L. and Kummerow, E. A. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 115 : 1099, 1964. Cited by J. D. Robinson in, Interactions between protein Sulphydryl groups and lipid double bonds in biological membranes. Nature. 212 : 199, 1966.
- 50) Haig, T. H. B. : Nutritional alteration of pancreatic acinar cell stability. Ann. Surg. 172 : 852~860, 1970.