

ラットセルレイン膵炎におけるライソゾーム酵素、 消化酵素動態の経時的変動

京都大学医学部外科学教室第1講座

平野 鉄也, 真辺 忠夫, 今西 勝大, 戸部 隆吉

〔原稿受付: 平成3年1月7日〕

Changes of Lysosomal and Digestive Enzymes in Rat Caerulein Pancreatitis

TETSUYA HIRANO, TADAO MANABE, KATSUHIRO IMANISHI and TAKAYOSHI TOBE

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

We evaluated the changes of lysosomal and digestive enzymes in the exocrine pancreas after caerulein induced acute pancreatitis in rats. The serum amylase levels and water content as well as pancreatic amylase and cathepsin B contents increased significantly in the early stage (0-12 h) after caerulein was administered, however, returned to the normal levels at 36 h. In the early stage, colocalization of lysosomal enzyme and digestive enzyme was found. Histologically, in the early stage, there were remarkable changes such as acinar cell vacuolization and interstitial edema, but these changes disappeared at 36 h. Furthermore, amylase and cathepsin B outputs decreased significantly in the early stage (12 h) but at 24 h, these increased significantly.

LDH discharge from dispersed acini and cathepsin B leakage from lysosomes also increased in the early stage (0-12 h), but these values returned to the normal levels at 36 h. These results indicate that exocrine pancreas needs about 36 h to recover from the caerulein induced acute pancreatitis, and in this recovering process, secretion of colocalized digestive enzyme and lysosomal enzyme seem to play an important role.

和 文 要 旨

コレシストキニンのアナログであるセルレインの投与により、ラットに急性浮腫性膵炎を誘起し、膵の経時的变化を種々のパラメーターにより検討した。セルレイン投与後12時間までは血清アミラーゼ値の上昇、膵浮腫とともに膵アミラーゼ、カテプシン B 含有量の上昇を認めたが、36時間目には正常レベルに復した。また、このセルレイン投与後早期（12時間以内）には

膵腺房細胞内でライソゾーム酵素と消化酵素の共存、再分配が認められたが、36時間目には消失した。組織学的にもこの早期には、膵腺房細胞の空胞化や間質浮腫といった著明な変化が観察されたが、36時間目にはほぼ消失した。また、コントロール群においても、セルレイン刺激でライソゾーム酵素であるカテプシン B が膵液中へ分泌され得ることが判明したが、さらに、セルレイン投与後早期にはセルレイン刺激下でのアミラーゼ排出量とカテプシン B 排出量がともに低下す

Key words: Caerulein pancreatitis, Cathepsin B, Amylase, Lysosomal enzyme.

索引用語: セルレイン膵炎, カテプシン B, アミラーゼ, ライソゾーム酵素.

Present address: First Department of Surgery, Faculty of Medicine, Kyoto University, 54 Shogoin-Kawaracho, Sakyouku, Kyoto 606, Japan.

るが、逆にセルレイン投与後24時間目には両者とも有意に増加することも判明した。しかし、これらの変化も36時間目には消失した。LDH 遊出とカテプシン B 遊出からみた細胞およびライソゾームの脆弱性はともにセルレイン投与後早期(0~12時間)には亢進したが、36時間後には正常のレベルへ回復した。

これらの変化はセルレイン誘起肺炎の回復にはほぼ36時間を要することを示唆し、この回復過程には消化酵素とライソゾーム酵素がともに脾液中へ分泌排出されることが重要な役割を果たしていると考えられ、これらの結果はさらに脾液中でのライソゾーム酵素の生理的役割をも示唆させた。

索引用語：セルレイン肺炎、アミラーゼ、カテプシン B、細胞脆弱性、ライソゾーム脆弱性、ライソゾーム酵素の再分配

緒 言

ラットにおいてコレシストキニンのアナログであるセルレインを supramaximal dose で数時間投与することにより脾間質性浮腫を特長とする急性浮腫性肺炎が誘起されることはよく知られている^{1,12,27,33,36}。このセルレイン急性肺炎においては脾臓房細胞内のライソゾーム酵素と消化酵素の共存が組織学的にも生化学的にも観察されており^{23,31,32,41} 急性肺炎の発症の重要な機構のひとつとして考えられている。ライソゾーム酵素のひとつであるカテプシン B はあらゆる状況下ではトリプシノーゲンを活性化し得るとされており^{7,11,12,28}、トリプシンは他の脾酵素を活性化し得ることから、急性肺炎の発症におけるライソゾーム酵素の果たす役割は大きいと考えられる。しかし、セルレイン肺炎時で、このライソゾーム酵素の再分配や脾外分泌機能、細胞脆弱性、ライソゾーム脆弱性を経時的にとらえた報告はない。

一方、脾液中へのライソゾーム酵素の分泌については、臨床的には慢性肺炎患者⁹ アルコール中毒患者²⁹ において、実験的には in-vitro の系^{9,13,35,42} においての報告がみられ、病理学的にもその役割の重要性が示唆される¹⁸ が、脾液中への lysosomal enzyme の分泌動態を消化管ホルモンとの関連において検討した報告はない。

今回、このセルレイン肺炎モデルを用いて経時的に脾外分泌機能、細胞脆弱性、ライソゾームの脆弱性、および脾液中へのライソゾーム酵素の分泌動態を検討

したのでその結果を報告する。

実 験 方 法

この実験には200匹の体重約 150 g の雄性ウイスターラットを使用した。12時間の絶食後、180匹のラットにネブタールの腹腔内投与 (20 mg/kg) 麻酔下に、右側外頸静脈より上大静脈へ挿管 (PE 50) を行ない静脈ルートとした。カテーテルは背部皮下を通し、尾根部より金属コイルを通して体外に誘導した。術後すべてのラットは水分と市販の固型食を自由摂取した。12時間の手術操作回復期間後、これらのラットを以下の群に分けた。さらに、20匹の正常ラットを比較のため使用した。

a. 肺炎群 (90匹) —セルレインを 5 μ g/kg・時の濃度にて 0.58 ml/分の速度にて、3.5時間持続静注し、急性肺炎を作製後、10%のグルコース含有ラクテートリンゲル液を 0.29 ml/時の速度にて持続静注した。この間は水分のみを自由摂取させ絶食とした。

b. コントロール群 (90匹) —3.5時間生理食塩水を 0.58 ml/分の速度にて3.5時間投与後、肺炎群と同様の10%グルコース含有ラクテートリンゲル液を 0.29 ml/分持続静注した。この間水分のみを自由に摂取させ、同様に絶食した。なお、両群ともセルレイン生理食塩水の投与は 9:00 AM より開始し、ラット脾外分泌系の日内変動の影響を除外した。

これら肺炎群、コントロール群をそれぞれ10%グルコース含有ラクテートリンゲル液投与 6, 12, 24, 36 時間後にベントバルビタール大量投与により屠殺し、開腹後脾の状態を観察し、下大静脈より採血後すばやく脾を摘出し、以下の実験に供した。下大静脈より採血した血液は血清分離後、血清アミラーゼ値測定用に -20°C で保存した。

1) 血清アミラーゼ値と脾水分量；血清アミラーゼ値は可溶澱粉を基質とする Bernfeld⁴⁾ の方法で測定し、1 単位 (U) のアミラーゼ活性は 1 時間に 1 mg のマルトースを基質より遊離し得る活性とした。また、摘出した脾の一部についてその湿重量を測定後、150°C にて48時間乾燥後、その乾燥重量を測定し、その差から脾水分量を計算した。

2) 脾の組織学的検索；摘出した脾の一部を10%中性ホルマリンで固定後、ヘマトキシリンエオジン (H-E) 染色後、炎症細胞浸潤、脾房細胞の空胞化、間質浮腫についてそれぞれ 0 (変化なし) ~41 (最大変化) の段階をつけて評価した。

3) 膵腺房細胞の細胞分画法によるライソゾーム酵素の分配; 残りの膵組織を 1 mM MgSO_4 と 250 mM ジュークロスを含有する冷 5 mM MOPS (3-(N-morpholino)propanesulfonic acid) 緩衝液 (pH 6.5) 6 ml 中にてグラステフロンホモゲナイザーを用い注意深くホモゲナイズ後 150 xg, 15分, 4°C の低速遠沈をし, その上清について Tartakoff と Jamieson の原法⁴⁰⁾ およびラット膵のための変法^{6,33)} で, 細胞分画に分けた. まず 1300 xg, 15分, 4°C の遠沈で, チモゲン分画 (1.3 KP) を得, この上清に 12000 xg, 12分, 4°C の遠沈を加え, ライソゾーム分画 (12 KP) とその上清であるミクロゾーム分画 (12 KS) を得た. これら各分画についてライソゾーム酵素であるカテプシン B 活性を CBZ-argynyl-arginine- β -naphthylamide を基質とし McDonald と Ellis の方法²¹⁾ で測定した. 各分画のカテプシン B 活性を全体の%として表わし, ライソゾーム酵素の膵腺房細胞内での再分配の指標とした. なお, 1 単位 (U) のカテプシン B 活性は基質より 1 分間に 1 n mole の B-naphthylamine を遊離し得る活性と定義した.

4) 膵組織中アミラーゼおよびライソゾーム酵素含有量; さらに他のラットについて膵組織の一部を 0.5% Triton X-100 を含有する冷リン酸緩衝液中でポリトロンホモゲナイザーを用いてホモゲナイズし, 150 xg, 15分, 4°C で低速遠沈を行い, その上清中のアミラーゼ, カテプシン B 活性を測定し, さらに, デオキシリボ核酸 (DNA) 濃度を仔牛胸腺 DNA を標準とし, LaBarca と Paigen¹⁶⁾ の方法で測定し, 膵組織中アミラーゼ, カテプシン B 含有量 (U/mg DNA) とした.

5) ライソゾーム酵素の遊出よりみたライソゾームの脆弱性について; 残りの膵組織について冷 5 mM MOPS 緩衝液 (pH 6.5) 中でホモゲナイズし, 低速遠沈後 12000 xg, 12分, 4°C の遠沈でライソゾーム沈殿を得た. この沈殿は理論上100%のライソゾーム酵素活性を含有すると考えられる. 25°C の MOPS 緩衝液中で30, 60, 90, 120分間インキュベートし, 各々再び 12000 xg, 12分, 4°C の遠沈を行ない, 上清のカテプシン B 活性を測定し, ライソゾームの遊出率として表わし, ライソゾームの脆弱性の指標とした.

6) 分離膵腺房細胞よりの lactic dehydrogenase (LDH) よりみた細胞脆弱性について; 各時期のラットについてコラゲナーゼ消化法と震盪法を組み合わせた方法²⁶⁾ で, 膵単離腺房を作製した. この腺房を

0.1% BSA, 0.01% トリプシンインヒビターを含有する HEPES リンゲル緩衝液 (115 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM MgCl_2 , 1 mM NaHPO_4 , 1.26 mM CaCl_2 , 10 mM HEPES, pH 7.4, 100% O_2 , 37°C) 中でインキュベートし, 30, 60, 90, 120分の各 stage における上清および腺房の LDH 活性を pyruvate と reduced diphosphopyridine nucleotide (β -NADH) の消費率から測定する Bergmeyer らの方法³⁾ で測定し, 腺房からの LDH 遊出率 (%) をインキュベーション開始時の腺房内 LDH 含有量に対する割合として計算した. なお, この実験でのすべての単離腺房細胞は trypanblue を 95%以上 exclusion したものを活性化ありとして使用した.

7) In-vivo セルレイン刺激下における膵液中へのアミラーゼおよびライソゾーム酵素の分泌動態; 各グループのラットについてセルレイン投与12時間後以後に, ネフタール静脈内投与 (15 mg/kg) 麻酔下に開腹し, 膵胆管に十二指腸開口部直上で挿管 (PE 10) を行ない, 膵液採取用とした. また, 総胆管にも挿管 (PE 10) を行ない, 他端は十二指腸内へ再挿入した. さらに幽門を結紮し, 胃瘻を造設 (PE 90) し, 胃液の影響を除外した. 30分間の安定化後, セクレチン 2.0 CU/kg・時を2時間 0.58 ml/時の速度で持続静注し, 胆汁を膵胆管より洗い流した後, このセクレチンおよびセルレイン (0.2 $\mu\text{g/kg}$ ・時) を2時間持続静注した. 膵液は1時間ごとに氷冷管に採取し, 順に S_1 , S_2 , CS_1 , CS_2 と名付けた. これら各分画について膵液量 (ml/kg・時) アミラーゼ (U/kg・時) およびカテプシン B 活性 (U/kg・時) を測定した. この in-vivo の外分泌機能試験は膵炎群 6時間目においてはまだ肉眼的に浮腫が認められたために, 各グループともに12時間以後より検討した.

8) 統計学的処理; 結果はすべて mean $\pm$ SEM として表現し, 各グループ間の有意差の検定には Student の t-test を用い, $p < 0.05$ を有意差ありと判定した.

実験結果

1) 血清アミラーゼ値と膵水分含有量; セルレイン 3.5時間投与直後および 6, 12, 24, 36時間目の血清アミラーゼ値はそれぞれ 23 ± 2 , 18 ± 2 , 12 ± 2 , 8 ± 2 , 7 ± 2 U/ml となり, コントロール群の 6 ± 1 , 5 ± 2 , 6 ± 1 , 5 ± 1 , 6 ± 2 U/ml に比較すると 0 ($p < 0.001$), 6 ($p < 0.01$), 12時間 ($p < 0.05$) にそれぞれ有意に高値を示し, 24~36時間後には正常のレベルに復した (図1).

12時間絶食後の正常ラットは 6 ± 1 U/ml を示し, 一方, 脾水分含有量の変化も血清アミラーゼ値と合致するように肺炎群ではセルレイン投与直後, および投与後 6, 12, 24, 36 時間後にそれぞれ 87 ± 2 , 84 ± 2 , 80 ± 2 , 78 ± 2 , $76 \pm 2\%$ となったが, コントロール群の 75 ± 2 , 76 ± 3 , 75 ± 2 , 74 ± 2 , $75 \pm 2\%$ 正常ラットの $73 \pm 2\%$ に比べ $p < 0.01$, 6 ($p < 0.05$) 時間後に有意に高値を示した (図 2).

2) 脾の組織学的検索; 肺炎群, コントロール群の

各 stage における H・E 染色像は表 1 に要約しているが, セルレイン投与直後には著明な炎症細胞浸潤, 腺房細胞の空胞化および間質の浮腫が観察されたが, 12 時間後には改善を示し, 36 時間後には炎症細胞浸潤を除き, ほぼ正常像に回復した. コントロール群の組織像は正常ラットと同様で明らかな所見はみられなかった.

3) 脾腺房細胞内のライソゾーム酵素の分配; 肺炎群でのセルレイン投与直後, および 6, 12 時間後のチ

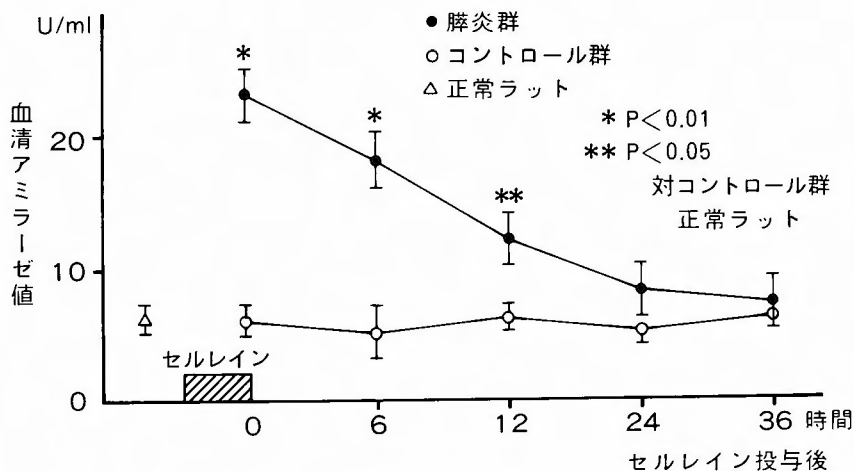


図 1 セルレイン肺炎におけるセルレイン投与後のアミラーゼ値の推移

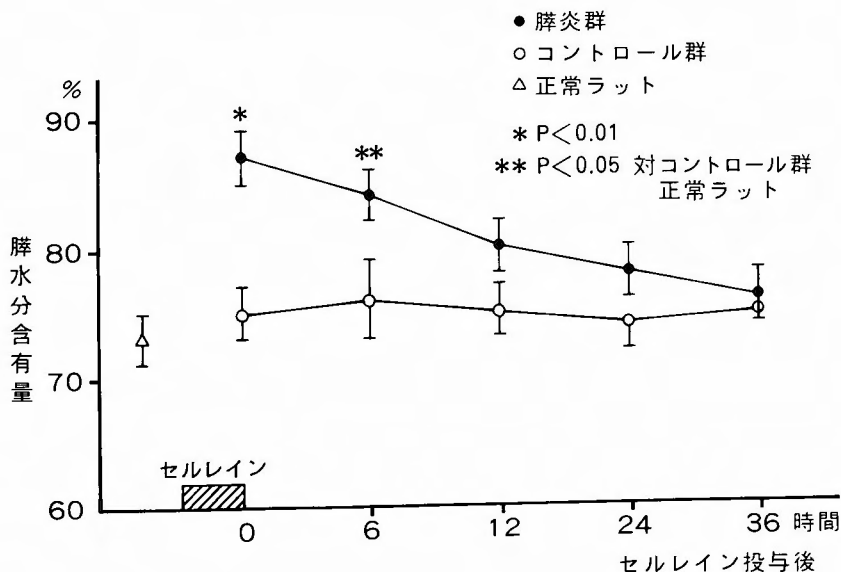


図 2 セルレイン肺炎におけるセルレイン投与後の脾水分含有量の変化

表1 セルレイン膵炎作成後の組織学的所見の変化

群	炎症細胞 浸潤	腺房細胞 空胞化	間質浮腫
膵炎群			
0 hrs (5)	2+	4+	3+
6 hrs (5)	2+	3+	3+
12 hrs (5)	1+	2+	2+
24 hrs (5)	1+	1+	1+
36 hrs (5)	1+	0	0
コントロール群			
0 hrs (5)	0	0	0
6 hrs (5)	ND	ND	ND
12 hrs (5)	0	0	0
24 hrs (5)	ND	ND	ND
36 hrs (5)	0	0	0

(n) ; 各 stage でのラット数, 組織学的所見は blinded observer により, grade 0 (変化なし) ~ grade 4+ (最大変化)の間で判定.
ND ; not determined

モーゲン分画 (1.3 KP) でのカテプシン B 活性は 44 ± 2 , 41 ± 2 , $38 \pm 2\%$ で, コントロール群の 24 ± 2 , 23 ± 1 , $25 \pm 2\%$, 正常ラットの $23 \pm 2\%$ に比べると, それぞれ有意 ($p < 0.01$) に高値をとったが, 逆にライソゾーム分画 (12 KP) でのカテプシン B 活性は 22 ± 1 , 24 ± 2 , $30 \pm 2\%$ となりコントロール群の 45 ± 3 , 43 ± 2 , $46 \pm 3\%$, 正常ラットの $45 \pm 3\%$ に比べそれぞれ有意に ($p < 0.001$) 低値であった (図3). この傾向は24時間後まで持続するが, それぞれの値の間には有意な差はなかった. 36時間目には膵炎群もコントロール群, 正常ラットもほぼ同様の値を示した.

4) 膵組織中アミラーゼおよびライソゾーム酵素含有量; 膵炎群ではセルレイン投与直後, 投与後6, 12時間後に膵組織アミラーゼ含有量はそれぞれ 1081 ± 163 , 873 ± 104 , 618 ± 72 U/mg DNA となりコントロール群の 456 ± 38 , 483 ± 52 , 463 ± 34 U/mg DNA および正常ラットの 415 ± 19 U/mg DNA に比べそれぞれ有意に ($p < 0.01$) 上昇した. 24, 36時間後には有意差はなかった.

一方, 膵組織カテプシン B 含有量も, 膵炎群では

セルレイン投与直後, 投与後6, 12時間後にそれぞれ 3643 ± 521 , 3276 ± 432 , 3018 ± 341 U/mg DNA となり, コントロール群の 1876 ± 273 , 2063 ± 316 , 2175 ± 264 U/mg DNA 正常ラットの 1927 ± 316 U/mg DNA に比べそれぞれ有意に上昇したが, 36時間後には膵炎群もコントロール群, 正常ラットもほぼ同様の値を示した (図4).

5) ライソゾーム酵素遊出からみたライソゾームの脆弱性; 各群の各 stage でのカテプシン B の遊出率は膵炎群ではセルレイン投与直後, 投与後0, 6, 12時間後コントロール群に比べ亢進しているのが観察された (表2). この傾向は24時間後にも認められたが, 有意差はなく, 36時間後には膵炎群もコントロール群, 正常ラットもほぼ同様の値を示した.

6) 分離膵腺房よりの LDH 遊出よりみた細胞の脆弱性; 膵炎群ではセルレイン投与直後, 投与後6, 12時間後にはコントロール群に比べ60~120分のインキュベーション時間においてそれぞれ有意に LDH 遊出率が亢進しているのが観察された. 24時間後にもこの傾向は持続したが, 36時間後には膵炎群, コントロール群, 正常ラットはともに同程度となった (表3).

7) in-vivo セルレイン刺激下での膵液中へのアミラーゼおよびライソゾーム酵素の分泌動態; 膵炎群ではセルレイン投与直後, および投与後6時間後, 肉眼的に浮腫が確認されたので, この in-vivo の実験は肉眼的にはほぼ浮腫の消失する12時間以降において施行した. 各群ともにセクレチン刺激のみの S_1 , S_2 分画に比べセルレインを追加した CS_1 , CS_2 分画の液量が著明に増加した. 膵炎群のセルレイン投与12時間後はコントロール群, 正常ラットに比べ S_1 , S_2 , CS_1 , CS_2 とも膵液量の volume が減少していた. しかし24時間以降は膵炎群もコントロール群, 正常ラット間に有意な差は認められなかった (表4).

アミラーゼ分泌量については膵炎群でセルレイン投与12時間後に S_1 , S_2 , CS_1 , CS_2 がそれぞれ 418 ± 43 , 392 ± 36 , 5872 ± 1126 , 4936 ± 985 U/kg・時となり, コントロール群 (S_1 : 852 ± 97 , S_2 : 754 ± 65 , CS_1 : 12463 ± 1946 , CS_2 : 11651 ± 1876 U/kg・時), 正常ラット (S_1 : 826 ± 73 , S_2 : 823 ± 82 , CS_1 : 12789 ± 2021 , CS_2 : 11523 ± 1561 U/kg・時) に比べそれぞれ有意に低下していた. しかし, 24時間後には逆に膵炎群の S_1 , S_2 , CS_1 , CS_2 がそれぞれ 1256 ± 113 , 1173 ± 95 , 18647 ± 2723 , 17853 ± 2561 U/kg・時となり, コントロール群 (S_1 : 793 ± 86 , S_2 : 616 ± 54 , CS_1 : 11987 ± 1256 ,

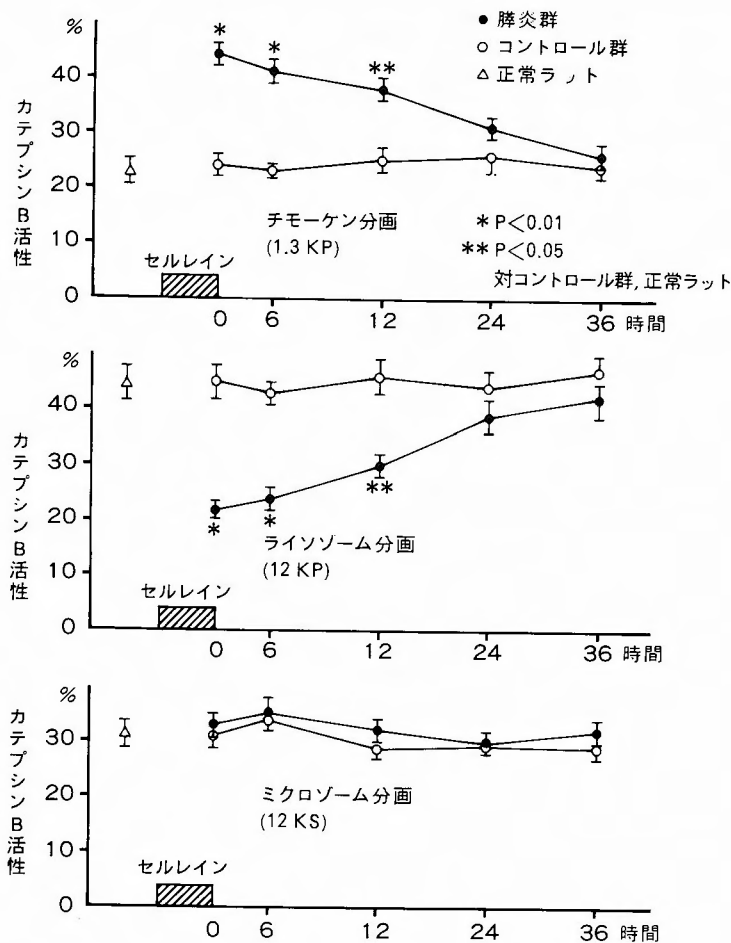


図3 セルレイン投与後のライソゾーム酵素の再分配の変化

CS₂: 12165 ± 1318 U/kg・時), 正常ラットに比べそれぞれ有意に増加した。36時間後には肺炎群の各分画でのアミラーゼ分泌量 (S₁: 1125 ± 123, S₂: 1024 ± 98, CS₁: 13477 ± 1781, CS₂: 12864 ± 1651 U/kg・時) がコントロール群 (S₁: 921 ± 102, S₂: 878 ± 72, CS₁: 10956 ± 1124, CS₂: 11561 ± 1216 U/kg・時), 正常ラットに比べ高値の傾向を示したが有意差はなかった (図5)。

脾液中へのカテプシン B 分泌量についてはアミラーゼ分泌量と同様に肺炎群では12時間目には S₁, S₂, CS₁, CS₂ での分泌量がそれぞれ 2 ± 1, 3 ± 1, 12 ± 3, 14 ± 3 U/kg・時となり, コントロール群 (S₁: 5 ± 1, S₂: 6 ± 1, CS₁: 27 ± 2, CS₂: 29 ± 3 U/kg・時), 正常ラット (S₁: 5 ± 1, S₂: 6 ± 1, CS₁: 25 ± 3, CS₂: 26 ± 2 U/kg・時) に比べそれぞれ有意に低下した。しかし, 24時間目に

は肺炎群の S₁, S₂, CS₁, CS₂ でのカテプシン B 分泌はそれぞれ 12 ± 2, 11 ± 2, 41 ± 5, 38 ± 4 U/kg・時となり, コントロール群 (S₁: 4 ± 1, S₂: 5 ± 1, CS₁: 28 ± 3, CS₂: 25 ± 3 U/kg・時) 正常ラットに比べ有意に高値を示した (図6)。この傾向は36時間目まで持続するが, 肺炎群 (S₁: 8 ± 1, S₂: 9 ± 2, CS₁: 31 ± 3, CS₂: 29 ± 3 U/kg・時) とコントロール群 (S₁: 6 ± 2, S₂: 7 ± 2, CS₁: 26 ± 2, CS₂: 24 ± 3 U/kg・時) の間に有意な差は認められなかった。さらに各分画でのアミラーゼ分泌量とカテプシン B 分泌量との間には有意な (r = 0.8743, p < 0.001) 正の相関関係が認められた (図7)。

考 察

ラットにおいてコレシストキニンのアナログであるセルレインの過剰投与 (5 μg/kg・時) で, 数時間投与

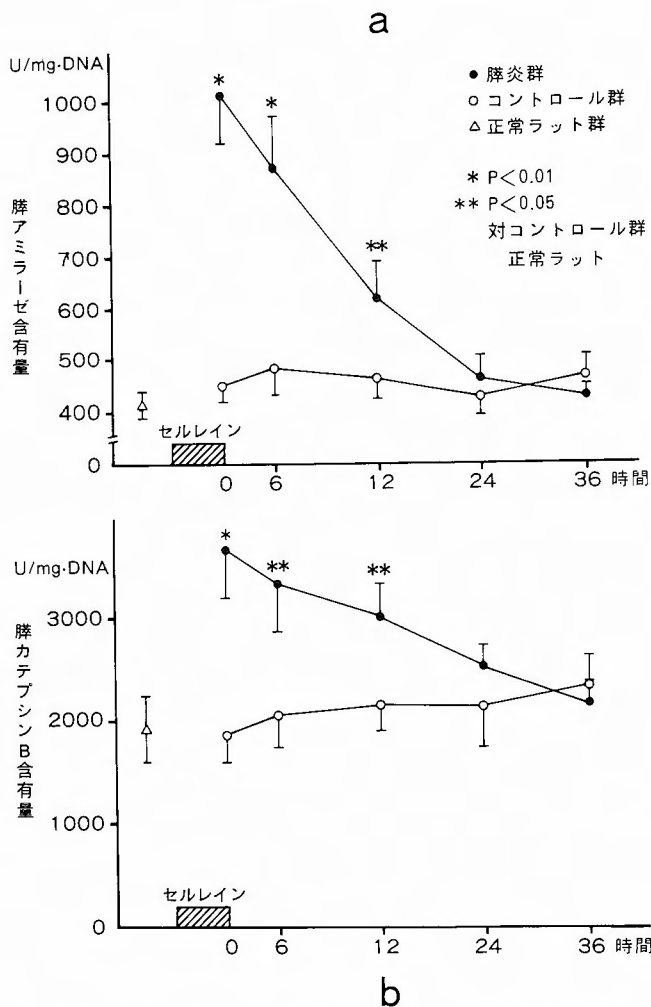


図4 セルレイン投与後の膵アミラーゼ含有量, 膵カタプシン含有量の変化

することにより血清アミラーゼ値の上昇と膵間質の浮腫を特長とする急性膵炎が惹起されることは既に確立されている^{1,17,27,33,36)}。今回、われわれはこのセルレイン急性膵炎モデルの膵炎発症後の変化を種々のパラメーターを用い経時的に観察した。その結果、セルレイン投与後6時間から12時間にかけて急性膵炎状態がみられ、明らかな血清アミラーゼ値の上昇および膵浮腫がみとめられた。

さらに、この時期においては膵腺房細胞内のライソゾーム酵素であるカタプシン B の活性が本来のライソゾーム分画 (12 KP) からチモーゲン分画 (1.3 KP) に移行する再分配が観察された。

このセルレイン膵炎において観察されるライソゾーム酵素と消化酵素との共存はカタプシン B がある状況下でトリプシノーゲンを活性化し得ること^{7,11,12,28)}より膵腺房細胞は潜在的にライソゾームおよび細胞の脆弱性を保持している^{38,39)}と考えられる。しかし、このライソゾーム酵素の再分配はセルレイン投与後24時間目から36時間目にかけてはほぼ消失し、同時にこの時期に血清アミラーゼ値も膵浮腫も正常化した。膵アミラーゼ含有量も膵炎の影響が強く残る6時間から12時間にかけてはコントロール群に比べ有意に高値を示し、この時期における膵腺房細胞内での消化酵素の鬱滞を示すものと^{10,20,34)}思われた。一方、カタプシン B

表2 セルレイン肺炎におけるセルレイン投与後のライソゾーム酵素遊出率の変化

群	インキュベーション時間(分)			
肺炎群	30	60	90	120
0 hrs (5)	10 ± 2	21 ± 3*	39 ± 3**	59 ± 4**
6 hrs (5)	9 ± 2	16 ± 2	34 ± 3**	52 ± 3**
12 hrs (5)	9 ± 2	15 ± 2	31 ± 2*	47 ± 3*
24 hrs (5)	8 ± 2	16 ± 2	23 ± 2	40 ± 3
36 hrs (5)	8 ± 3	14 ± 2	21 ± 3	39 ± 2
コントロール群				
0 hrs (5)	8 ± 3	14 ± 2	22 ± 2	38 ± 3
6 hrs (5)	7 ± 2	12 ± 2	18 ± 3	35 ± 3
12 hrs (5)	9 ± 2	16 ± 2	19 ± 2	33 ± 2
24 hrs (5)	8 ± 2	13 ± 2	21 ± 2	34 ± 2
36 hrs (5)	7 ± 2	15 ± 2	23 ± 2	31 ± 3
正常ラット (5)	7 ± 2	13 ± 1	19 ± 2	36 ± 2

(n) : ラット数, 数値はカテプシン B のライソゾームよりの遊出率 (% of total). * ; P<0.05, ** ; P<0.01 対コントロール群
正常ラット

表3 セルレイン肺炎におけるセルレイン投与後のLDH 遊出率の変化

群	インキュベーション時間(分)			
肺炎群	30	60	90	120
0 hrs (5)	5 ± 1	8 ± 1*	12 ± 1**	16 ± 2*
6 hrs (5)	4 ± 1	6 ± 1	11 ± 1*	14 ± 2*
12 hrs (5)	4 ± 1	7 ± 1	10 ± 1*	12 ± 2*
24 hrs (5)	3 ± 1	6 ± 1	8 ± 1	10 ± 2
36 hrs (5)	4 ± 1	5 ± 1	7 ± 1	9 ± 1
コントロール群				
0 hrs (5)	3 ± 1	4 ± 1	6 ± 1	10 ± 2
6 hrs (5)	4 ± 1	5 ± 1	7 ± 1	9 ± 1
12 hrs (5)	3 ± 1	4 ± 1	5 ± 1	8 ± 1
24 hrs (5)	4 ± 1	5 ± 1	6 ± 1	9 ± 2
36 hrs (5)	3 ± 1	6 ± 1	7 ± 1	8 ± 1
正常ラット (5)	3 ± 1	4 ± 1	5 ± 1	8 ± 1

(n) : ラット数, 数値は LDH 遊出率 (% of total)
* ; P<0.05, ** ; P<0.01 対コントロール群, 正常ラット

表4 セルレイン肺炎作成後におけるセクレチン, セクレチン+セルレイン刺激に対する唾液量の変化

群	唾液量 (ml/kg-h)			
肺炎群	S ₁	S ₂	CS ₁	CS ₂
12 hrs (5)	0.05 ± 0.01*	0.07 ± 0.02*	0.83 ± 0.06**	0.76 ± 0.05**
24 hrs (5)	0.11 ± 0.02	0.13 ± 0.02	1.31 ± 0.09	1.20 ± 0.08
36 hrs (5)	0.13 ± 0.03	0.16 ± 0.03	1.22 ± 0.07	1.26 ± 0.09
コントロール群				
12 hrs (5)	0.12 ± 0.02	0.14 ± 0.03	1.21 ± 0.09	1.14 ± 0.07
24 hrs (5)	0.15 ± 0.03	0.13 ± 0.03	1.25 ± 0.08	1.12 ± 0.05
36 hrs (5)	0.11 ± 0.02	0.15 ± 0.02	1.16 ± 0.04	1.18 ± 0.06
正常ラット (5)	0.14 ± 0.03	0.12 ± 0.02	1.13 ± 0.08	1.08 ± 0.05

(n) : ラット数, mean ± SEM
* ; P<0.05, ** ; P<0.01 対コントロール群, 正常ラット

含有量も同様の変化を示し, セルレイン投与後 6~12 時間目には高値を示した。

このカテプシン B の変化は正常腺房細胞内では消

化酵素と同様に膵管系へ排出するのが示され, 肺炎病態下ではその排出能が障害されと考えられた。セクレチンおよびセルレイン刺激下でのアミラーゼ分泌能

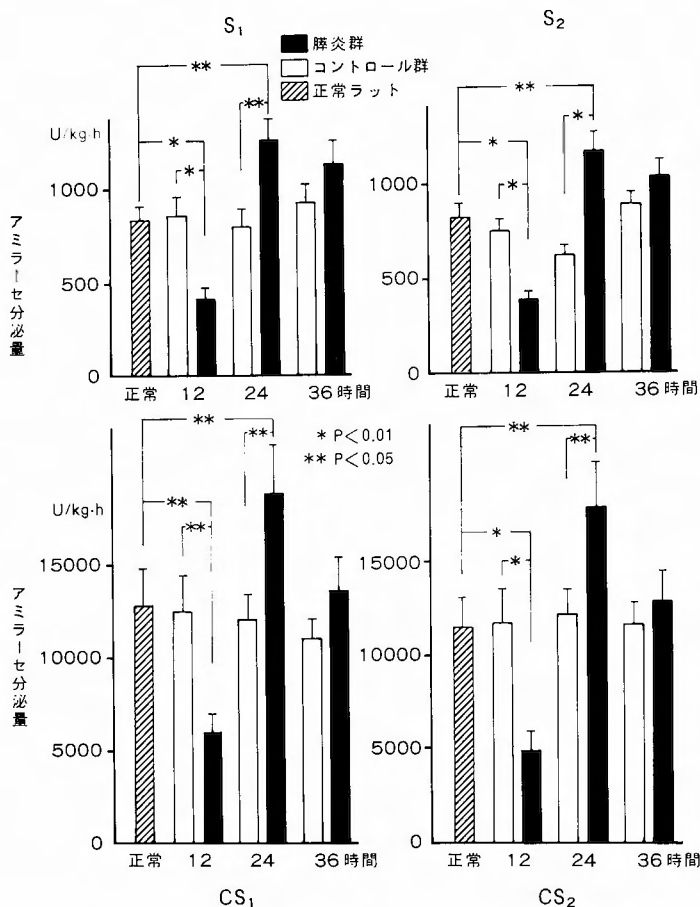


図5 セルレイン膵炎におけるセクレチン (S₁, S₂), セルレイン+セクレチン (CS₁, CS₂) に対するアミラーゼ分泌量の変化

からみた膵外分泌機能はセルレイン投与12時間後には膵液分泌能およびアミラーゼ分泌能ともに低下しており、この時期における膵外分泌機能障害を示唆させたが、24~36時間後には膵液分泌はほぼコントロール群と同程度まで回復した。アミラーゼ分泌量は24時間後コントロール群に比むしろ有意に増加しているのが観察され、セルレイン膵炎で鬱滞した消化酵素はその回復過程においては基礎分泌、刺激分泌ともに膵液中へ多量排出されることが明らかとなった。

一方、今回の実験において、ライソゾーム酵素であるカタレプシン B がセルレイン刺激により膵炎中に刺激分泌されることが明らかになった。この現象は正常ラットにおいても観察される。膵液中へのライソゾーム酵素分泌の意義は明らかではないが、何らかの生理

学的意義を示唆していると考えられる。アミラーゼ分泌とカタレプシン B 分泌の間には有意な正の相関関係がみとめられることから、これら両者がセルレインにて刺激され得る膵腺房細胞内では同一の細胞内に存在することが示唆される。消化酵素とライソゾーム酵素は膵腺房細胞内ではともに endoplasmic reticulum に付着する ribosome で合成され両者とも Golgi 装置に移送されるが、そこでライソゾーム酵素は mannose-6 phosphate により glycosylation を受け mannose-6 phosphate に特異的な受容体を介してライソゾームへと移送^{15, 16, 17)} され、一方、消化酵素は condensing vacuole に包含され、チモーゲン顆粒へと成長して腺管側に移動して行く²⁴⁾。本来これら2種の酵素はその性格上からも膵腺房細胞内では分離隔離されて存在し

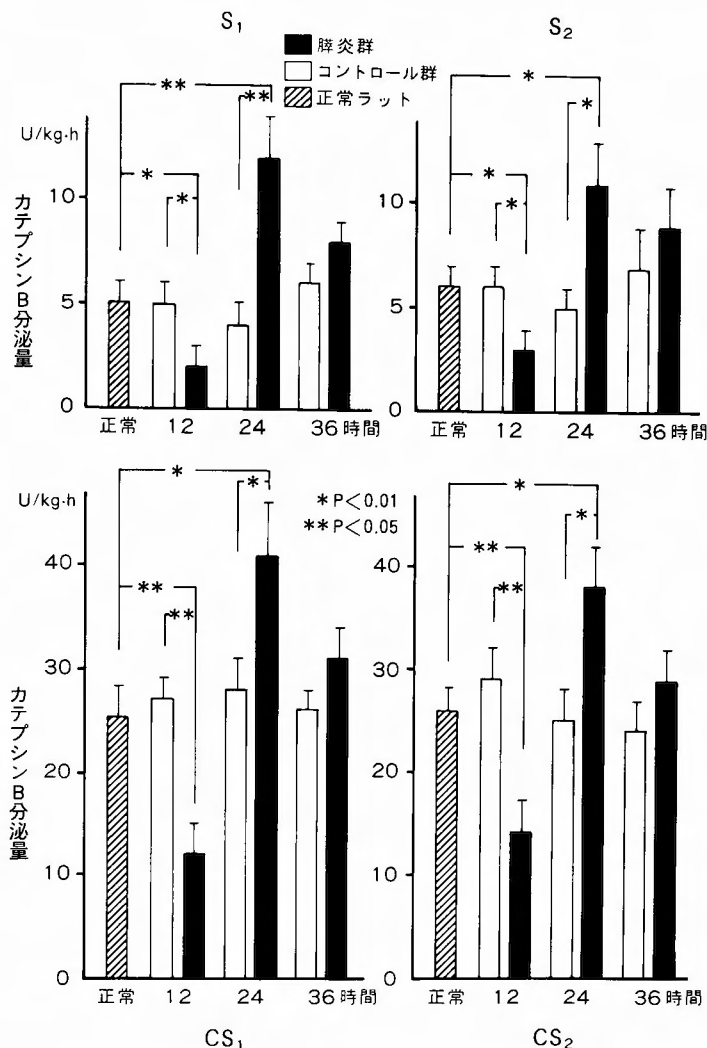


図6 セルレイン膵炎におけるセクレチン (S₁, S₂), セルレイン+セクレチン (CS₁, CS₂) に対するカテプシン B 分泌量の変化

ているものと思われるが、未成熟のチモーゲン顆粒内ではライソゾーム酵素と消化酵素の共存が観察されたとの報告もある^{19,22)}。これら2種の酵素の膵腺房細胞内での生合成、輸送、存在様式については明らかではない。おそらくこの様なライソゾーム酵素の膵液中への分泌は膵腺房細胞自体にとっては合理的な機構と考えられるが、その詳細は不明であり今後の検討が待たれる。

本実験から、さらに、セルレイン膵炎の回復期であると考えられるセルレイン投与24時間後にはセルレイン刺激下での膵液中へのカテプシン B 分泌がコント

ロール群に比べ有意に増加していることが判明した。この時期にはアミラーゼ分泌も増加していることから回復期にはセルレイン膵炎で鬱滞し、かつ共存状態にあった消化酵素とライソゾーム酵素はともに膵液中へ放出されることが示された。このようにして、膵腺房細胞はセルレイン膵炎時の潜在的な細胞脆弱性を解消し、回復していくものと思われた。セルレイン膵炎後の回復過程におけるライソゾーム酵素の多量の膵液中への分泌は膵の修復過程においては重要な位置を占めるものとも思われ、この時期においては、もし、膵管系に何らかの機能的、機質的な流出障害が加わればよ

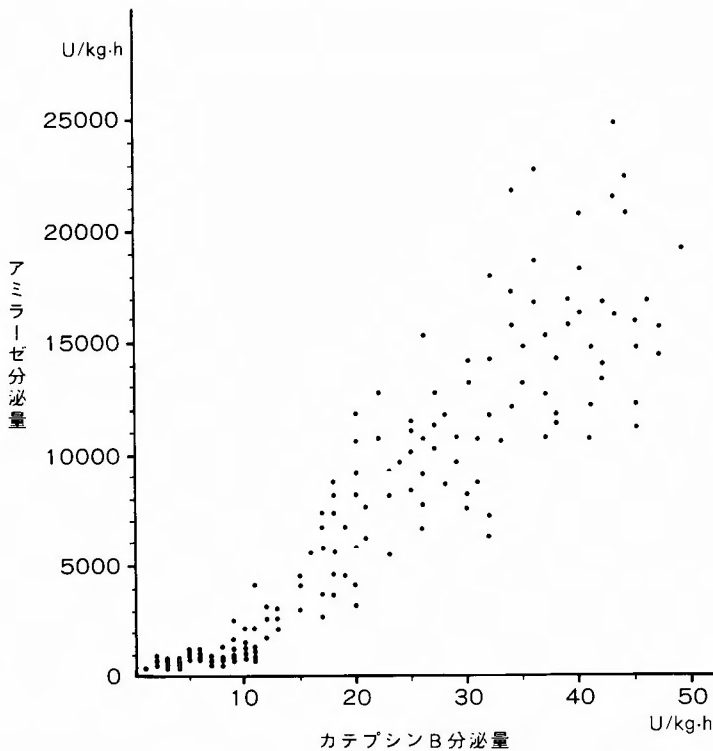


図7 膵液中に分泌するアミラーゼとカテプシン B の相関 (140サンプル, $r=0.8743$, $p<0.001$)

り重症の膵炎へ移行することも考えられる。事実、膵管腔と膵間質との間の連続性についての報告^{2,5)}もあり、この膵液中の膵酵素の存在は膵腺房細胞の膵管系という外側からの膵炎の機序について新たな可能性をも提起するものと思われる。

従来より、膵液中、胆汁中での膵炎誘起物質についてはいろいろ議論されており、感染胆汁¹⁴⁾ エンテロキナーゼの逆流や十二指腸内活性膵酵素の逆流等²⁵⁾が提唱されているが、この膵液中ライソゾーム酵素も膵炎誘起性物質として重要な位置を占めるものと考えられる。

今回、われわれはセルレイン濃度として $0.2 \mu\text{g/kg} \cdot \text{時}$ を選んだが、さらに、われわれはセルレインのより低い濃度 ($0.02 \mu\text{g/kg} \cdot \text{時} \sim 0.05 \mu\text{g/kg} \cdot \text{時}$) においても膵液中ヘライソゾーム酵素が分泌されうることを観察し、(data not shown), さらに、家兎においては十二指腸内に食事を注入してもカテプシン B が膵液中へ排出されることも認められる (data not shown) ことから膵液中の lysosomal enzyme の分泌動態、存在は

膵腺房細胞内でのライソゾーム酵素動態とともに膵炎の病態生理を考える上で重要なことと思われた。

結 論

セルレイン膵炎の修復過程を経時的に観察した結果

- 1) 血清アミラーゼ値と膵水分含有量はセルレイン投与24～36時間後には正常化した。
- 2) 組織学的にはセルレイン投与後36時間目には多少の痕跡を残すもほぼ正常の膵組織像に回復した。
- 3) セルレイン投与直後～12時間目までは膵腺房細胞内ではライソゾーム酵素の再分配、消化酵素との共存などが観察されたが、24～36時間後には消失した。
- 4) 膵アミラーゼとカテプシン B 含有量はセルレイン投与直後～12時間後までは上昇し、膵腺房細胞内での両者の鬱滞を示したが、36時間目にはほぼ正常のレベルに回復した。
- 5) LDH 遊出からみた膵腺房細胞の脆弱性およびカテプシン B の遊出よりみたライソゾームの脆弱性はともにセルレイン投与直後～12時間後までは亢進し

たが, 36時間後にはほぼ消失した。

6) 膵外分泌機能についてはセルレイン投与後12時間目まではアミラーゼ分泌, 膵液分泌の減少がみとめられたが, 24時間目には逆にアミラーゼ分泌の増加が観察された。しかし, 36時間後にはほぼ正常に復した。

7) コントロール群においてもセルレイン刺激にて膵液中ヘライソゾーム酵素が分泌されることが判明したが, セルレイン投与後12時間目には外分泌機能の低下とともに, このライソゾーム酵素の分泌も低下するが, 24時間目には逆に, ライソゾーム酵素の分泌が増加した。しかし, 36時間目にはほぼ正常の分泌動態を示した。

以上より, セルレイン誘起膵炎の修復過程においては24時間後が turning point と考えられ, 36時間後にはほぼ修復は完了するものと思われる。また, この修復過程においては消化酵素と共存するライソゾーム酵素の膵液中への分泌が重要な役割を果すものと思われる。さらに, 正常状態においてもセルレインによりライソゾーム酵素が膵液中へ分泌刺激され得ることより, 膵液中でのライソゾーム酵素の何らかの生理学的役割を示唆させるとともに膵液中の膵炎誘起物質のひとつとしても注意を払うべきと思われる。

文 献

- Adler G, Rohr G, Kern HF: Alterations in membrane fusion as a cause of acute pancreatitis in the rat. *Dig Dis Sci* 27: 993-1002, 1982.
- Anderson MC, Schiller WR: Microcirculatory dynamics in normal and inflamed pancreas. *Am J Surg* 115: 118-127, 1968.
- Bergmeyer HU, Bernt E, Hess B: Lactic dehydrogenase. In: Bergmeyer HU, ed. *Methods in Enzymatic Analysis*. New York, Academic Press, pp736-741, 1963.
- Bernfeld P: Amylase α and β . *Methods Enzymol* 1: 149-158, 1955.
- Bockman DE, Schiller WR, Suriyapa C, et al: Fine structure of early experimental acute pancreatitis in dogs. *Lab Invest* 28: 584-592, 1973.
- DeLise R, Schulz IT, Tyrakowski T, et al: Isolation of stable pancreatic zymogen granules. *Am J Physiol* 246: G411-418, 1984.
- Figarella C, Miszczuk-Jamska B, Barrett AJ: Possible lysosomal activation of pancreatic zymogens. Activation of both human trypsinogen by cathepsin B and spontaneous acid activation of human trypsinogen I. *Biol Chem Hoppe-Seyler* 369(suppl): 293-298, 1988.
- Figarella C, Vogt E, Hösli P: Alkaline phosphatase and acid lysosomal hydrolases in pancreatic juice and fibroblast cell cultures of patients with chronic calcifying pancreatitis. *Eur J Clin Invest* 12: 145-149, 1982.
- Figura K, Weber E: An alternative hypothesis of cellular transport of lysosomal enzymes in fibroblast. Effect of inhibitors of lysosomal enzyme endocytosis on intra- and extra-cellular lysosomal enzyme activities. *Biochem J* 176: 943-950, 1978.
- Gilliland L, Steer ML: Effects of ethionine on digestive enzyme synthesis and discharge by mouse pancreas. *Am J Physiol* 239: G418-426, 1980.
- Greenbaum LM, Hirshkowitz A: Endogenous cathepsin activation of trypsinogen in extracts of dog pancreas. *Proc Soc Exp Biol Med* 107: 74-76, 1961.
- Greenbaum LM, Hirshkowitz A, Schoichet I: The activation of trypsinogen by cathepsin B. *J Biol Chem* 234: 2885-2890, 1959.
- Hösi P, Vogt E: Cystic fibrosis: Leakage of lysosomal enzymes and of alkaline phosphatase into the extracellular space. *Biochem Biophys Res Commun* 79: 741-748, 1977.
- Konok GP, Thompson AG: Pancreatic ductal mucosa as a protective barrier in the pathogenesis of pancreatitis. *Am J Surg* 117: 18-23, 1969.
- Kornfeld S: Trafficking of lysosomal enzymes in normal and disease states. *J Clin Invest* 77: 1-6, 1986.
- LaBarca C, Paigen K: A simple, rapid and sensitive DNA assay procedure. *Anal Biochem* 102: 334-352, 1980.
- Lampel M, Kern HF: Acute interstitial-pancreatitis in the rat induced by excessive doses of a pancreatic secretagogue. *Virchow Arch* 373: 97-117, 1977.
- LaRusso NF: Lysosomal enzymes in biological fluids. Physiologic and pathophysiologic significance. *Dig Dis Sci* 24: 177-179, 1979.
- Lazarus SS, Volk BW: Ultrastructure and acid phosphate distribution in the pancreas of rabbits. *Arch Pathol* 80: 135-147, 1965.
- Lombardi B, Esters LW, Longnecker DS: Acute hemorrhagic pancreatitis (massive necrosis) with fat necrosis induced in mice by DL-ethionine fed with a choline deficient diet. *Am J Pathol* 79: 464-480, 1975.
- McDonald JK, Ellis S: On the substrate specificity of cathepsin B1 and B2 including a new fluorogenic substrate for cathepsin B1. *Life Sci* 17: 1269-1276, 1975.
- Novikoff AB, Mori M, Quintana N, et al: Studies

- of secretory process in the mammalian exocrine pancreas. I. Condensing vacuoles. *J Cell Biol* 75: 148-165, 1977.
- 23) Ohshio G, Saluja A, Leli U, et al: Esterase inhibitor prevent lysosomal enzyme redistribution in two noninvasive models of experimental pancreatitis. *Gastroenterology* 96: 853-859, 1989.
 - 24) Palade G: Intracellular aspects of the process of protein synthesis. *Science* 189: 347-358, 1975.
 - 25) Pfeffer RB, Stasior O, Hinton JW: The clinical picture of the sequential development of acute hemorrhagic pancreatitis in the dog. *Surg Forum* 8: 248-251, 1957.
 - 26) Powers RE, Saluja AK, 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.
 - 27) Renner IG, Wisner JR, Rinderknecht H: Protective effect of exogenous secretin on ceruletide-induced acute pancreatitis in the rat. *J Clin Invest* 72: 1081-1092, 1983.
 - 28) Rinderknecht H: Activation of pancreatic zymogens. Normal activation, premature intrapancreatic activation, protective mechanism against inappropriate activation. *Dig Dis Sci* 31: 314-321, 1986.
 - 29) Rinderknecht H, Renner IG, Koyama HH: Lysosomal enzymes in pure pancreatic juice from normal healthy volunteers and chronic alcoholics. *Dig Dis Sci* 24: 180-186, 1979.
 - 30) Rosenfeld MG, Kreibich G, Popob D, et al: Biosynthesis of lysosomal hydrolases; Their synthesis in bound polysomes and the role of co- and post-translational processing in determining their subcellular distribution. *J Cell Biol* 93: 135-143, 1982.
 - 31) Saito I, Hashimoto S, Saluja A, et al: Intracellular transport of pancreatic zymogens during caerulein supramaximal stimulation. *Am J Physiol* 253: G517-526, 1987.
 - 32) Saluja A, Hashimoto S, Saluja M, et al: Subcellular redistribution of lysosomal enzymes during caerulein-induced pancreatitis. *Am J Physiol* 253: G508-516, 1987.
 - 33) 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.
 - 34) Saluja A, Saluja M, Villa A, et al: Pancreatic duct obstruction in rabbits causes digestive zymogen and lysosomal enzyme colocalization. *J Clin Invest* 84: 1260-1269, 1989.
 - 35) Sewell RB, Grinpuke SA, Zinsmeister AR, et al: Pharmacologic perturbation of rat liver lysosomes: effects on release of lysosomal enzymes and of lipids into bile. *Gastroenterology* 95: 1088-1098, 1988.
 - 36) Sheele G, Adler G, Kern HF: Exocytosis occurs at the lateral membrane of pancreatic acinar cells during supramaximal secretagogue stimulation. *Gastroenterology* 92: 345-353, 1987.
 - 37) Sly W, Fischer D: The phosphomannosyl recognition system for intracellular and intercellular transport of lysosomal enzymes. *J Cell Biochem* 18: 67-85, 1982.
 - 38) Steer ML, Meldolesi J: The cell biology of experimental pancreatitis. *N Engl J Med* 316: 144-150, 1987.
 - 39) Steer ML, Meldolesi J, Figarella C: Pancreatitis. The role of lysosomes. *Dig Dis Sci* 29: 934-938, 1984.
 - 40) Tartakoff A, Jamieson JE: Fractionation of guinea pig pancreas. *Methods Enzymol* 31: 41-59, 1974.
 - 41) Watanabe O, Baccino FM, Steer ML, et al: Supramaximal caerulein stimulation and ultrastructure of rat pancreatic acinar cell: early morphological changes during development of experimental pancreatitis. *Am J Physiol* 246: G457-467, 1984.
 - 42) Willcox P: Secretion of β -N-acetylglucosaminidase isozymes by cultured cystic fibrosis fibroblast. *Clin Chim Acta* 91: 81-88, 1979.