

# 実験的急性膵炎時の血液凝固能異常に およぼす因子について

大阪市立大学第1外科

佐竹克介 内間恭堅  
土肥浩義 梅山馨

## FACTORS FOR COAGULATION ABNORMALITIES DURING EXPERIMENTAL ACUTE PANCREATITIS

Katsusuke SATAKE, M.D., Kyoken UCHIMA, M.D., Hiroyoshi DOHI, M.D.  
and Kaoru UMEYAMA, M.D.

First Department of Surgery, Osaka City University, Medical School

急性膵炎時に見られる血液凝固能異常に対する膵液の関与を検索する目的で、正常膵液、活性化膵液および急性膵炎時の腹水 (2ml/kg) を正常犬に静脈内注射を行ない凝血学的検討を行なった。

正常膵液および活性化膵液注射後には血中 fibrinogen 量の減少、血小板数の減少、P.T.T および prothrombin time の延長が見られたのみで、その程度は活性化膵液注射群で著明であった。腹水注射群ではこれら反応に加えて、E.L.T の短縮、F.D.P の増加が見られ、抗 Fibrin 蛍光抗体法にて肺、腎、膵に多数の fibrin 沈着が見られた。

以上の事実は、急性膵炎時の腹水中に trypsin 以外の fibrinogen catabolism を増加する因子が含まれていることが示唆された。

索引用語: Trypsin, 正常膵液, 活性化膵液, 急性膵炎時の腹水, fibrinogen catabolism

### はじめに

従来から急性膵炎重症例には血液凝固能異常を伴うことは諸家によって報告されており<sup>1)~4)</sup>、ことに、近年 Disseminated Intravascular Coagulation (D.I.C) を合併した臨床例も報告されている<sup>5)~6)</sup>。しかし、その発生機序については明らかにされていない。われわれも実験的に作成した急性壊死性膵炎犬で血液凝固能の異常、一部 D.I.C 類似の所見の合併する事を報告してきた<sup>7)</sup>。

かかる急性膵炎時の血液凝固能異常の原因として、従来から膵酵素特に trypsin の全身血流への逸脱が大きく関与すると考えられてきた。すなわち、急性膵炎時の血液凝固能異常は早期には過凝固状態にあるが、かかる状態に何らかの凝固促進物質が血中に入ることによって DIC が惹起されるものと言われ、その凝固促進物質として trypsin があげられた<sup>8)</sup>。事実、犬に大量の trypsin

を静脈に投与することによって、D.I.C と類似の所見のみられることが報告されている<sup>5)~6)</sup>。しかし、未だ明らかにされていない。

今回、われわれは、trypsin をほとんど含まない正常膵液、trypsin を多量含む活性化された膵液並びに急性膵炎時の腹腔内浸出液 (以下腹水) をそれぞれ雑種成犬の静脈内に投与した際の血液凝固能の変動について検討した結果、2~3 の知見を得たので報告する。

### I) 実験動物および方法

実験動物は雑種成犬 (体重10~15kg) を用いた。

#### 1) 正常膵液の採取法

雑種成犬を nembutal 麻酔下で開腹し、主膵管にビニールカテーテルを挿入した上、生食水 500ml に pancreozymin (100u) および Secretin (100u) を混じり、各々 1.0u/min の割合で点滴静注し、膵液を水中のビーカー

に採取した。これら操作は全て可能的に無菌的に行なった。

2) 活性化膵液の作成法: 上記正常膵液 10ml に 1mg の enterokinase を加え, 37°C, 1時間 incubate して作成した。

3) 急性膵炎時の腹腔内浸出液(腹水)の採取法: 雑種成犬を nembutal 麻酔下にて開腹し, 副膵管結紮後, 主膵管にビニールカテーテルを挿入し, 自家胆汁(0.5 ml/kg)を高圧で注入して自家胆汁性急性膵炎を作成し, 作成5時間後に腹腔内に貯溜する腹水を採取した。これら腹水の一部は48時間の細菌培養を行ない, 無菌的なものを用いた。

4) 血液凝固能の測定法: 血中 fibrinogen 量の測定は TG-meter (中外社製)を用いて nephelometry にて測定し, prothrombin time (PT) および partial thromboplastin time (P.T.T) はおのおのの試薬として thromboplastin liquid (Hyland 社製) および activated thrombo fax reagent (Ortho 社製)を用いて, 血液凝固時間自動測定器 (Clotex Hyland 社製) にて測定した。Fibrin degradation product (以下 F.D.P) は FDP kit (Wellcome 社製)を用いて行い Euglobulin clot lysis time (以下 ELT) は ELT recorder (Carmann 社製)を用いて測定した。血小板数は Becker-Cronkite 法で測定した。

5) 正常膵液: 活性化膵液および腹中水の trypsin 含有量の測定は bensoxyl-arginyl p-nitroanilide (BAPNA)を用いて Erlanger の方法で行った。

6) 実験方法: 正常膵液, 活性化膵液および腹水の 2ml/kg を夫々各群10頭ずつに静脈内注射した。注射前, 注射後30分, 1時間, 2時間, 3時間および5時間に採血し, 血液凝固能を測定した。なお, 実験5時間後, これら実験犬より腎, 肺, 膵を摘出し, 抗 fibrin FITC を用いて蛍光抗体法を行った。

## II) 実験成績

### 1) 正常膵液注射後の血液凝固能の変動(10頭)

正常膵液 (trypsin 含有量 0~2u/ml) 注射後の血液凝固能の変動は **Table 1** のごとくである。

血中 fibrinogen 量の変動は, 注射30分後に注射前平均値 440.25mg% (±39.85 S.E) が 387.87mg% (±19.25 S.E) と減少し, その後さらに徐々に減少の傾向を示し, 注射5時間後には, 306.87mg% (±28.85 S.E) と減少した。すなわち, 注射前値の約30%の減少が見られた。血小板数の変動は注射30分後では血中 fibrinogen 量の変動と同様に注射前の平均値  $25.8 \times 10^4 \text{mm}^3$  (±7500

Table 1 Blood coagulation and fibrinolytic factors in dogs after intravenous injection of non-activated juice

	Before injection	Time after injection				
		30 min	1 hr	2 hrs	3 hrs	5 hrs
Platelet (per $\text{mm}^3$ )	258400 (±7500)	205300 (±18900)	202500 (±25100)	218000 (±26800)	211300 (±12200)	212000 (±20500)
Fibrinogen (mg %)	440.25 (±39.98)	387.87 (±19.52)	387.87 (±34.26)	343.62 (±10.60)	333.87 (±28.70)	306.87 (±28.85)
P.T.T. (sec)	18.80 (±1.31)	20.92 (±1.37)	21.54 (±1.54)	21.10 (±1.30)	20.47 (±1.48)	22.27 (±2.10)
Prothrombin time (sec)	8.85 (±0.44)	9.77 (±0.58)	9.44 (±0.62)	9.76 (±0.46)	10.08 (±0.43)	11.08 (±0.64)
Euglobulin clot lysis time (min)	706.87 (±115.82)	792.22 (±200.04)	776.66 (±151.61)	748.88 (±123.35)	779.44 (±134.86)	794.55 (±177.4)
Fibrin degradation products ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	4.06 (±0.48)		6.25 (±0.87)	4.84 (±1.29)	4.84 (±0.95)	5.35 (±1.46)

Table 2 Blood coagulation and fibrinolytic factors in dogs after intravenous injection of activated juice

	Before injection	Time after injection				
		30 min	1 hr	2 hrs	3 hrs	5 hrs
Platelet (per $\text{mm}^3$ )	257200 (±13700)	195700 (±15100)	202500 (±10300)	198000 (±12800)	186600 (±10400)	202000 (±13900)
Fibrinogen (mg %)	414.75 (±25.67)	361.58 (±26.52)	392.41 (±36.22)	339.33 (±40.64)	302.75 (±33.04)	285.09 (±30.07)
P.T.T. (sec)	18.07 (±0.71)	19.90 (±0.83)	19.98 (±1.07)	20.38 (±1.13)	20.22 (±1.02)	20.81 (±1.18)
Prothrombin time (sec)	10.95 (±0.64)	11.21 (±0.60)	11.55 (±0.79)	11.74 (±0.79)	11.73 (±0.70)	12.06 (±0.80)
Euglobulin clot lysis time (min)	927.85 (±243.83)	732.85 (±148.50)	871.66 (±224.39)	810.00 (±207.09)	795.00 (±156.02)	895.00 (±223.79)
Fibrin degradation products ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	4.27 (±0.92)		3.75 (±0.80)	6.97 (±3.22)	5.36 (±1.69)	5.31 (±1.58)

S.E) から  $20.5 \times 10^4 \text{mm}^3$  (±18900S.E) と減少した。その後はあまり変化はみられなかった。

PTT および prothrombin time は注射前 18.80sec (±1.31 S.E) および 8.85sec (±0.44 S.E) であったが, 注射5時間後にはそれぞれ 22.27sec (±2.10 S.E), 11.08sec (±0.64 S.E) と軽度の延長が見られた。

ELT および FDP には殆んど変動は見られなかった。

### 2) 活性化膵液注射後の血液凝固能の変動(10頭)

活性化膵液 (trypsin 含有量平均 5000u/ml) 注射後の血液凝固能の変動は **Table 2** の示す如くである。

血中 fibrinogen 量の変動は, 注射30分後には注射前の平均値 414mg% (±25.7 S.E) に対し 361.5mg% (±26.5 S.E) と減少し, さらに5時間後には 285mg%

( $\pm 30.1$  S.E) と注射前値の31%の減少を示した。

血小板数の変動は、注射30分後には注射前の平均値  $25.7 \times 10^4 \text{mm}^3$  ( $\pm 13700$  S.E) に対し  $19.57 \times 10^4 \text{mm}^3$  ( $\pm 15100$  S.E) と減少し、その後軽度回復の傾向を示すが、注射5時間後でも  $20.2 \times 10^4 \text{mm}^3$  ( $\pm 13900$  S.E) と低値を示した。

P.T.T および prothrombin time は正常膵液注射群と同様に延長の傾向が見られたが、その傾向は前者に比して著明であった。

E.L.T の変動は注射30分後に、注射前の平均値  $927.85 \text{min}$  ( $\pm 243.8$  S.E) に比べて  $732.85 \text{min}$  ( $\pm 148.5$  S.E) と短縮の傾向が見られた。その後、回復の傾向が見られ5時間後には  $895.00 \text{min}$  ( $\pm 223.79$  S.E) と軽度の短縮であった。

F.D.P の変動はほとんど認められなかった。

3) 腹腔内浸出液(腹水)注射時の血液凝固能の変動(10頭)

急性膵炎時の腹腔内浸出液(腹水)(trypsin 含有量平均  $1.0 \text{u/ml}$ ) を注射後の血液凝固能の変動は **Table 3** のごとくである。

Table 3 Blood coagulation and fibrinolytic factors in dogs after intravenous injection of pancreatic exudate (ascites)

	Before injection	Time after injection				
		30 min	1 hr	2 hrs	3 hrs	5 hrs
Platelet (per $\text{mm}^3$ )	278000 ( $\pm 18600$ )	195700 ( $\pm 9800$ )	202500 ( $\pm 25300$ )	198000 ( $\pm 14300$ )	186600 ( $\pm 7400$ )	172000 ( $\pm 27100$ )
Fibrinogen (mg %)	482.42 ( $\pm 40.62$ )	361.42 ( $\pm 51.03$ )	357.71 ( $\pm 59.70$ )	346.00 ( $\pm 36.59$ )	329.00 ( $\pm 55.74$ )	302.14 ( $\pm 43.22$ )
P.T.T. (sec)	16.93 ( $\pm 0.70$ )	18.01 ( $\pm 0.71$ )	17.52 ( $\pm 0.97$ )	19.08 ( $\pm 1.32$ )	19.08 ( $\pm 1.85$ )	19.51 ( $\pm 1.07$ )
Prothrombin time (sec)	7.52 ( $\pm 0.37$ )	8.15 ( $\pm 0.53$ )	7.85 ( $\pm 0.61$ )	7.66 ( $\pm 0.50$ )	8.15 ( $\pm 0.64$ )	8.77 ( $\pm 0.36$ )
Euglobulin clot lysis time (min)	790.00 ( $\pm 154.32$ )	723.33 ( $\pm 193.38$ )	718.33 ( $\pm 161.61$ )	706.66 ( $\pm 179.06$ )	701.66 ( $\pm 166.85$ )	605.00 ( $\pm 146.11$ )
Fibrin degradation products ( $\mu\text{g/ml}$ )	3.39 ( $\pm 0.81$ )		4.10 ( $\pm 1.30$ )	9.10 ( $\pm 3.23$ )	18.75 ( $\pm 6.32$ )	12.32 ( $\pm 3.17$ )

血中 fibrinogen 量の変動は、注射前の平均値  $482.42 \text{mg} \%$  ( $\pm 40.62$  S.E) に比べて注射30分後には  $361.42 \text{mg} \%$  ( $\pm 51.03$  S.E) と減少し、その後も減少の傾向を示し、注射5時間では平均  $302.14 \text{mg} \%$  ( $\pm 43.22$  S.E) と著明に減少し、注射前値の37%の減少を示していた。

血小板数の変動は、注射前の平均値  $27.8 \times 10^4 \text{mm}^3$  ( $\pm 18600$  S.E) に比べて注射30分後には  $19.57 \times 10^4 \text{mm}^3$  ( $\pm 25300$  S.E) と減少し、その後、1時間後にやや回復

図 1



の傾向を示すが、注射後2時間、3時間、5時間と経時的に減少し、注射5時間後では  $17.2 \times 10^4 \text{mm}^3$  ( $\pm 27100$  S.E) と減少していた。

P.T.T および prothrombin time の変動は経時的に軽度の延長傾向が見られ、注射前の平均値  $16.93 \text{sec}$  ( $\pm 0.70$  S.E),  $7.52 \text{sec}$  ( $\pm 0.37$  S.E) が注射5時間後にはそれぞれ  $19.51 \text{sec}$  ( $\pm 1.07$  S.E),  $8.77 \text{sec}$  ( $\pm 0.36$  S.E) と延長していた。

ELT の変動は、注射後短縮の傾向が見られ、注射前の平均値  $790.00 \text{min}$  ( $\pm 154.32$  S.E.) が注射5時間後には  $605.00 \text{min}$  ( $\pm 146.11$  S.E.) と短縮した。

FDP の変動は、注射前平均値  $3.39 \text{ug/ml}$  ( $\pm 0.81$  S.E.) が注射3時間後には  $18.75 \text{ug/ml}$  ( $\pm 6.32$  S.E.) と上昇し、さらに注射5時間後でも  $12.32 \text{ug/ml}$  ( $\pm 3.17$  S.E.) と著明な増加が見られた。

4) 抗 fibrin-FITC を用いての蛍光抗体所見

正常膵液、活性化膵液注射群の組織蛍光抗体所見は陰性であったが、急性膵炎時の腹水注射群では注射5時間後の肺(図1)、腎、膵に fibrin の蛍光抗体陽性が認められた。

考 察

急性膵炎に見られる血液凝固能異常の原因については今日なお、不明な点が多いが、膵からの trypsin の血中への逸脱が大きく関与すると推測されている。しかし、急性膵炎患者の血中 trypsin 量を種々の方法で測定されているが、その成績はかならずしも一定していない<sup>10)11)</sup>。また、血中や膵内には大量の trypsin inhibitor が存在することから、急性膵炎の血中 trypsin は著明な上昇がみられていない。これら血中 trypsin 量の動きからみた場合、trypsin のみが急性膵炎時の血液凝固能異常の原因であるとは断定しがたい。しかし、生理的

に trypsin は fibrinogen を活性化する作用を有し<sup>12)</sup>, また大量の trypsin を静脈内に注射することによって, D.I.C 様所見がみられるとの報告もあること<sup>5) 6) 8)</sup> から Ranson<sup>9)</sup> らはやはり膵酵素の血中への逸脱が大きく関与するものと推測している。これらの点から, 急性膵炎時の膵酵素の血中への逸脱がこれら血液凝固能異常に何らかの形で関与することは否定しがたい。

本実験で行われた正常膵液, 活性化膵液 および 急性膵炎時の腹水 (2ml/kg) を健常犬に注射した時の血中 amylase 値の変動は自家胆汁性急性膵炎犬にみられたと同等あるいはそれ以上の血中 amylase 値の増加がみられたことは<sup>13) 14)</sup>, 本実験が急性膵炎時の膵液の血中への逸脱を示したものと見える。このような実験条件下で trypsin をほとんど含まない正常膵液を注射した後にも, 血中 fibrinogen 量の減少, 血小板数の減少, PTT および prothrombin time の延長がみられたが, かかる血液凝固能の変化には一般に膵 lipase や phospholipase A は影響しないと報告されている<sup>5)</sup> ことから, 正常膵液注射後の血液凝固能異常を来たした原因には trypsin 以外に何らかの物質の存在が示唆される。また, trypsin を多量に含む活性化膵液を注射した際にみられる血液凝固能でも, 正常膵液注射時とほとんど同程度の変化であり, これは trypsin 50,000単位迄を静脈内投与した Innerfield<sup>9)</sup> らの成績と同様の傾向であることから活性化膵液注射後にみられる反応は trypsin の影響とも考えられる。

しかしながら, 正常膵液, 活性化膵液注射後にみられる血液凝固能異常は, 一般に急性膵炎早期にみられる過凝固状態や DIC 様状態と若干異なっており, 急性膵炎の血液凝固能異常の原因として, 単に膵液の血中への逸脱のみがその原因と考えがたい。さらに, 本実験では trypsin をほとんど含まない急性膵炎時の腹水を注射した際の血液凝固能は正常膵液 および 活性化膵液注射群のそれと比べて著明な変化がみられた。すなわち, 血中 fibrinogen 量の減少, 血小板数の減少, P.T.T および, prothrombin time の延長, それに加えて ELT の短縮および F.D.P の著明な上昇がみられた。これら凝血学的所見は D.I.C に類似した所見と考えられ, Innerfield<sup>9)</sup> や Kwaan<sup>5)</sup> らが trypsin の大量に注射した際にみられた所見と同様の所見にあった。

Wardle<sup>15)</sup> は olive oil や trypsin を膵管内に注入して作成した急性膵炎ラットに radioactive labeled fibrinogen を静脈内に注射した際の fibrinogen の血中からの消失率

を観察しているが, その成績によると血中 fibrinogen は早期に消失し, 腎, 肺, 膵および脾に fibrin の沈着することから, 急性膵炎時には fibrinogen catabolism が亢進すると報告している。しかも, trypsin を静脈内に注射した時も同様の所見がみられることから, 急性膵炎時の fibrinogen catabolism の亢進の原因を trypsin に求めている。

しかし, 本実験では trypsin をほとんど含んでいない腹水を注射した5時間後の抗 fibrin 蛍光抗体法による検査で肺, 腎および脾に多数の fibrin の沈着がみられた。すなわち, fibrinogen catabolism の亢進が推測されたが, この事実は急性膵炎時の腹水中に trypsin 様の fibrinogen catabolism を亢進さす何らかの因子を含んでいることを示唆したものと見える。事実, 急性膵炎時の腹水中には種々の毒性物質の存在がみられており<sup>16)</sup>, われわれの実験成績でも腹水中に多量の Kinin-forming enzyme の存在が示唆されている<sup>17) 18)</sup>。また近年, 腹腔内ドレナージや腹膜灌流などによる腹腔内浸出液の除去が, 重症急性膵炎の治療に有効とされており, 急性膵炎時に腹腔内に貯溜する腹水中に膵炎の進展, 予後に関係する物質の存在を示唆しているものといえる。

本実験成績では急性膵炎時に貯溜する腹水中に trypsin 以外に DIC の原因となり得る凝固促進物質の存在を示唆し, これら物質の解明は急性膵炎の治療および DIC 合併の防止などに役立つと考えられ, 今後の研究課題といえよう。

## 結 果

正常犬を用いて正常膵液, 活性化膵液および急性膵炎時の腹水 (2ml/kg) を静脈内注射を行ない, 凝血学的検査を行った結果正常膵液注射群および活性化膵液注射群には血中 fibrinogen 量の減少, 血小板の減少, PTT および prothrombin time の延長がみられた。また, その程度は活性化膵液注射群で著明であった。しかし, 急性膵炎時の腹水注射群では血中 fibrinogen 量の減少, 血小板数の減少, PTT および prothrombin time の延長, それに加えて ELT の短縮および FDP の著明な増加がみられ, 抗 fibrin 蛍光抗体法にて肺, 腎および脾に多数の fibrin 沈着を認めた。以上の成績より, 急性膵炎時の腹水中に trypsin 以外の fibrinogen catabolism を増加する因子が含まれていることが示唆された。

## 文 献

- 1) Lafer, C.J. and Hinerman, D.L.: A morphologic study of pancreatic carcinoma with

- reference to multiple thrombi. *Cancer*, **14**: 944—952, 1961.
- 2) Mckay, D.G., Massell, H. and Hertig, H.T.: Carcinoma of body of pancreas with fibrin thrombosis and fibrinogenopenia. *Cancer*, **6**: 862—869, 1953.
  - 3) Shinowara, G.Y., Stutman, L.J. Walters, I.L., Roth, M.E. and Walker, E.J.: Hypercoagulability in acute pancreatitis. *Am. Surg.*, **105**: 104—108, 1963.
  - 4) Dreiling, D.A., Blum, L. and Sanders, M.: Thrombophlebitis, blood coagulation and pancreatic disease. A study of pancreatic secretion in patients with thrombophlebitis. *Arch. Int. Med.* **96**: 490—495, 1955.
  - 5) Kwaan, H.C., Anderson, M.C. and Gramatica, Z.: A study of pancreatic enzyme as a factor in the pathogenesis of disseminated intravascular coagulation during acute pancreatitis. *Surgery*, **69**: 663—672, 1971.
  - 6) Ranson, J.H.C., Lackner, H., Berman, I.R. and Schinelle, R.: The relationship of coagulation factors to clinical complications of acute pancreatitis. *Surgery*, **81**: 502—511, 1977.
  - 7) 佐竹克介, 内間恭堅, 土肥浩義, 梅山 馨: 実験的急性壊死性膵炎にみられる血液凝固能の異常. *日消外会誌*, **9**: 490—495, 1976.
  - 8) Innerfield, I., Schwarz, A. and Angrist, A.: Intravenous trypsin: Its coagulant, fibrinolytic and thrombolytic effects. *J. Clin. Invest.*, **31**: 1049—1055, 1952.
  - 9) Erlanger, B.F., Kokovsky, N. and Cohen, W.S.: The preparation and properties of two new homogenic substrate of trypsin. *Arch. Biochem.* **95**: 291—293, 1961.
  - 10) Floch, M.H. and Groisser, V.W.: Serum preteolytic enzyme activity in pancreatic disease. *N. Engl. J. Med.* **263**: 1129—1130, 1960.
  - 11) Nardi, G.Z.: Serum trypsin determination in pancreatic disease. *J. Lab. Clin. Med.* **52**: 66—69, 1958.
  - 12) Alexander, B., Rimon, A. and Katchalski, E.: Active of water-soluble trypsin derivatives on fibrinogen clottability. *Trumb. Diath. Hiath. Haemorrh.* **16**: 507—509, 1966.
  - 13) Appert, H.E., Dimbiloglu, M.D., Pairent, F.W. and Howard, J.M.: The relative tolerance of the dog to intravenous injection of pancreatic juice. *Surgery*, **64**: 805—813, 1968.
  - 14) Yacoub, R.S., Appert, H.E. and Howard, J.M.: Systemic manifestations of acute pancreatitis. Effects of the intravenous infusion of pancreatic juice in dogs. *Arch. Surg.* **99**: 47—53, 1969.
  - 15) Wardle, E.N.: Fibrinogen and albumin catabolism in experimental pancreatitis in rat. *J. Surg. Res.* **15**: 122—131, 1973.
  - 16) Nemic, P., Jr. and Drabkin, D.L.: Pathogenesis of acute necrotizing haemolajie pancreatitis. Experimental study. *Am. J. Med. Sci.* **252**: 361—364, 1956.
  - 17) Satake, K., Rozmanith, J.S., Appert, H.E., Carballo, J., and Howard, J.M.: Hypotension and release of kininforming enzyme into ascitic fluid exudate during experimeantl pancreatisti in dogs. *Ann. Surg.* **177**: 497—502, 1973.
  - 18) 佐竹克介, 梅山 馨: 急性膵炎の病態生理, II, 急性膵炎時の腹腔内浸出液 (腹水) および正常膵液の全身循環動態に及ぼす影響. *日消外*, **8**: 485—490, 1975.