

実験的閉塞性黄疸作成時の膵外分泌機能の二相性変化

札幌医科大学第1外科

平田 公一 丸山 芳朗 白井 朋明
白松 幸爾 早坂 滉

TWO PHASIC CHANGE OF THE PANCREATIC EXOCRINE FUNCTION UNDER THE EXPERIMENTAL OBSTRUCTIVE JAUNDICE IN RAT

Koichi HIRATA, Yoshiro MARUYAMA, Tomoaki USUI
Koji SHIRAMATSU and Hiroshi HAYASAKA

Ist Department of Surgery, Sapporo Medical College

Wistar 系雄ラットに閉塞性黄疸を作製し、作製後28日目まで膵外分泌系因子の変化を検索した結果、黄疸作製後7日目を前後して二相性変化を認めた。すなわち黄疸作製後5日目までは、対照群と比較して膵重量・膵組織内単位 DNA 量・膵組織内蛋白量・in vitro における膵組織からのアミラーゼ放出量のいずれもが増加し、形態学的にチモーゲン顆粒の増生が認められた。これに対し7日目以後膵重量は多かったが、単位 DNA 量は対照群とほとんど差がなく、その他の因子はむしろ低下していた。チモーゲン顆粒数も低下し、顆粒内電子密度も低下していた。以上の結果から黄疸発生初期に外分泌細胞の機能亢進・肥大・増生を後期にその機能低下現象を認めた。

索引用語：閉塞性黄疸，膵外分泌機能，蛋白合成，DNA 合成

はじめに

膵に特に病変のない症例に、胆道系に比較的短時日の間に閉塞性機転が発生した場合、それによって膵外分泌能が亢進することは知られている^{1)~3)}。しかし閉塞性黄疸が長時間に及んだ場合、膵外分泌機能がいかに変化するかについては十分な検索が成されていない。

臨床病理学的に閉塞性黄疸症例に腎障害とともに膵変化を合併することが多いことも知られている⁴⁾。その病変は病理形態学的に急性膵炎型から慢性膵炎型のものまで広汎に及び個体間に差がある。この理由については種々の要因が考えられるが、胆道閉塞期間・合併肝障害の程度・胆道閉塞部位などは重要な因子と考えられる⁵⁾。そこで本研究においては、黄疸の継続時間と膵外分泌機能の変化を検索する目的から、肝門部で胆道を閉塞し、経時的に膵変化を生化学的・形態学的に調べた。

実験材料および方法

Wistar 系雄ラット（体重200~250g）に実験的黄疸

を作製し、個別のケージに収容し飼育した（以下実験群とする）。ラットに閉塞性黄疸を作製するにあたっては、エーテル麻酔下で開腹し、岩月ら⁶⁾の方法に従って膵管を結紮することなく肝門部で胆管を二重結紮・切離し、肝十二指腸間膜とともに充分遊離する方法を用いた。対照群としては、sham operation 群および非処置群を設けた。

胆管閉塞前および胆管閉塞切離後1・3・7・14・28日目に体重・血清総ビリルビン値・血清蛋白量を測定するとともに、ラットを屠殺し膵総重量、膵組織内 DNA 量⁷⁾、膵組織内蛋白量⁸⁾を測定した。さらに膵組織の一部を摘出後ただちに0.2単位/5ml の pancreozymin（エーザイ社）を含む Eagle's minimum essential medium（10% fetal calf serum を含む、pH 7.4）に入れ、95% O₂・5% CO₂の培養液中へのアミラーゼ放出量の変化を膵組織単位 DNA 量あたりで検討した。

電顕材料の作製にあたっては、まず腹部大動脈より2.5% glutaraldehyde（0.1M cacodylate buffer, pH

7.4) で臍を灌流固定した後摘出した。その後 2% Osmium 酸 (0.1M cacodylate buffer, pH 7.4) で二重固定し、型のごとくアルコール脱水・エボン812包埋後、LKB-I 型マイクロームで超薄切片を作製し、クエン酸鉛と酢酸ウラニルとの二重染色を行い、JEM-100 C 電子顕微鏡で観察した。なお各群とも屠殺前12時間を絶食としたが、水分のみを自由に与えた。

検索に用いたラット数は各実験時点において、生化学的検索目的に 6 匹、形態学的検索目的に 3~4 匹である。

なお実験群において、屠殺時の血清ビリルビン値が 3mg/dl 以下を示したラットについては、実験群から除外した。

実験結果

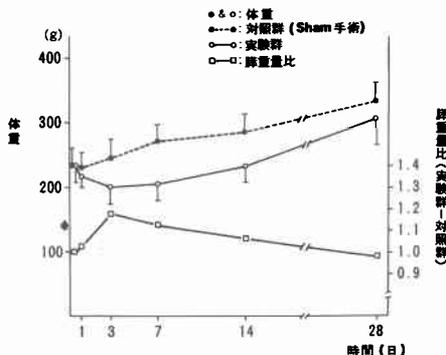
(1) 体重および臍重量

ラットの体重は図 1 に示すように sham operation 群でやや減少したが、それ以後漸増した。実験群においては 3 日目値も減少し、その後僅かずつ回復したが、7 日目で sham operation 群と約 45g の差が生じた。この体重差は、7 日目以後次第に縮小し 28 日目における平均体重差は約 15~20g となった。

つぎに実験群臍重量の変化を sham operation 群との臍重量比で検討した。この臍重量比は各時点における平均臍重量の比で表わした。sham operation 群の実験開始時平均臍重量は 725mg (SEM ± 23mg) で、実験終了時である 28 日目のそれは 806 (± 35mg) であった。実験群においては 3 日目および 7 日目にラット個体の体重減少を認めたにもかかわらず、臍重量は増加した。しかし 7 日目以後は増加傾向は減弱し、28 日目においては sham operation 群との比較で有意差を認めなかった。

(2) 血清ビリルビン・総蛋白量・アルブミン量の変

図 1 体重・臍重量の変化



化

血清ビリルビン値は 7 日目まで漸時増加したが、その後増加することなくむしろゆっくりと減少した。しかし 28 日目においてさえも 5mg/dl 前後の値を示した。なお間接ビリルビン値の上昇を認めた個体もあったが、その値は極めて軽微で (1.5mg/dl 以下)、大部分は直接ビリルビン値の上昇に起因した (図 2)。

血清総蛋白量は術後 1 日目にわずかに上昇した後 7 日目まで減少した。14 日目の値は 7 日目値とほぼ同値であったが、28 日目のそれはわずかに増加した (p < 0.05)。なお最低値を示した 7 日目の値は、大多数の症例でなお 6.0g/dl 以上であった (図 3)。

血清アルブミン値の変化は、血清総蛋白量のそれとほぼ同様で、最低値である 7 日目の平均値は 3.3g/dl であった (図 3)。

(3) 臍組織内 DNA 量

対照のひとつである無処置群の単位臍重量に対する DNA 含有量 (525 ± 13 μg/100mg 臍重量) の平均値を基準として、実験群および sham operation 群の DNA 含有量の推移を検討した。sham operation 群の変化は極く少なく、各測定時点における値に有意差はなかつ

図 2 血清総ビリルビン値の変化

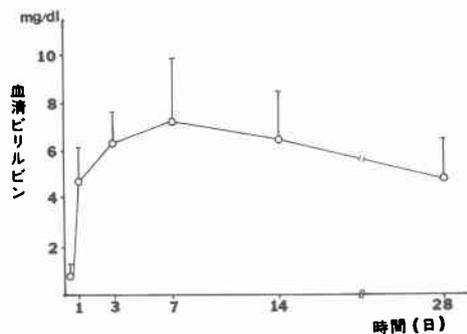
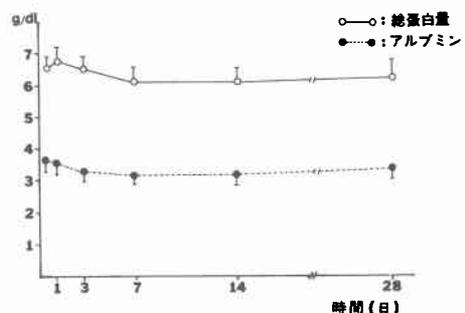


図 3 血清蛋白量・アルブミン値の変化



た。実験群においては、1～7日目まで増加を認めたが、14日目・28日目のそれはむしろ低値を示した(図4)。

(4) 膵組織単位 DNA 量に対する蛋白質の含有比

全経過において対照群である無処置群および sham operation 群における推移にほとんど変化を認めず、その値は黄疸作製前値(267±53)と有意差がなかった。実験群においては図5に示すように、1～3日目に高値を示したが、7日目には黄疸作製前値より低値を示し、14日目・28日目と次第に減少した。28日目の値は黄疸作製前値の77%で、最高値を示した3日目値の62%であった。

(5) In vitro 下における培養液中へのアミラーゼ分泌量

摘出ラット膵の一部(約100～150mg)を既述の要領で in vitro 下に60分間培養し、培養期間中に分泌されたアミラーゼ量の変化を観察した。分泌アミラーゼ量については、培養に用いた膵組織単位 DNA 量あたりで算出した。無処置群および sham operation 群の間に有意差はなく、さらにそれらの推移にほとんど変化なく、いずれの時期の材料についても実験開始前値と有意差がなかった。

実験群においては、黄疸作製直後から7日目までの

図4 膵組織内 DNA 量の変化

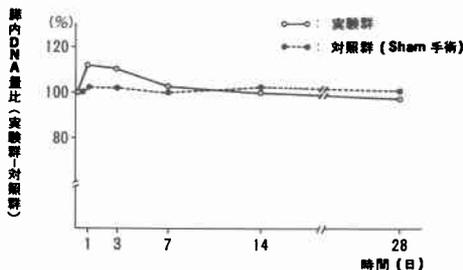


図5 膵組織内蛋白質量の変化

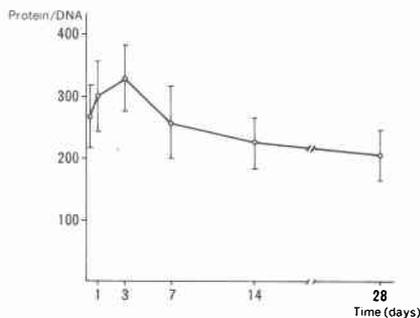
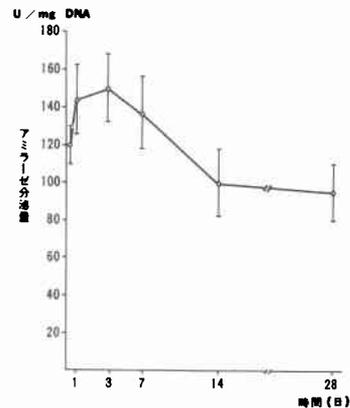


図6 In vitro における膵組織からのアミラーゼ分泌量



膵において分泌亢進現象が生じた。3日目値が最高値で、7日目にはすでに減少していたが、なお黄疸作製前値より高値であった。しかし14・28日目の黄疸後期になると、分泌アミラーゼ量は3日目値の60%値まで減少した(図6)。

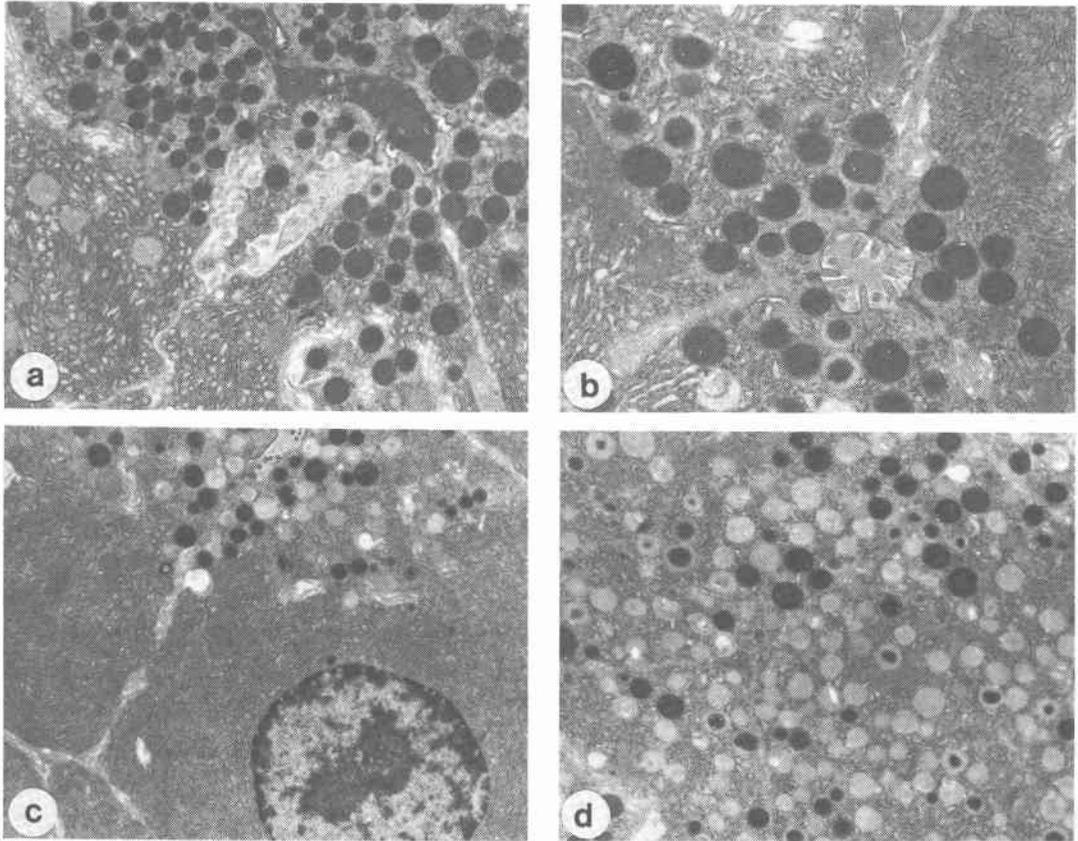
(6) 電子顕微鏡による形態学的検索

超薄切片作製前におけるトルイジンブルー染色による光顕レベルでの観察で、全経過において膵に顕著な変化を認めなかった。

超微構造的観察においては、黄疸作製直後の1日目および3日目の腺房細胞内の分泌顆粒数は比較的豊富で、細胞質中に占める程度も大きかった(図7a)。このような腺房細胞内の小器官のうち、粗面小胞体と Golgi 装置の変化が顕著である。基底側を中心に発達している粗面小胞体は円型あるいは細長く観察され、いわゆる小管型を示している。小胞体槽の幅には変動があり、隣接小胞体間距離および幅には変動があり、隣接小胞体間距離および個々の小胞内の幅もまちまちである。Golgi 装置はよく発達し Golig 野には小胞ないし小管が多く存在し多様に染まった内容物を含んでいた。また対照群より明らかに増加しているチモゲン顆粒も大小まちまちで、一部の領域において癒合像も観察された。数個の腺房細胞で囲まれている腺腔には、density のある無構造物質が存在しこれが充満していた。腺房細胞から内腔面に突出する microvilli の形態に異常なく、腺腔も拡大などの異常所見を認められなかった(図7b)。

7日目の超微構造所見は、個体間に差があった。すなわち一部のラットにおいては、3日目の所見と変化

図7 膵電子顕微鏡所見。(a) 3日目, 豊富なチモーゲン顆粒と蛋白合成期を示す粗面小胞体像, $\times 4300$, (b) 3日目, 正常腺房腔と近傍小器官, $\times 8900$, (c) 7日目, 濃淡・大小不同のチモーゲン顆粒と静止期粗面小胞体像, $\times 3900$, (d) 28日目, 淡明なまたは halo 現象を示すチモーゲン顆粒, $\times 4300$



がなかったが, 他の多くのラットにおいては粗面小胞体の形態は特に変化し, ほぼ同一の大きさの小胞体槽が一定の間隔で整然とした層状構造を形成していた。さらにチモーゲン顆粒内電子密度にばらつきが生じていた。一部のチモーゲン顆粒においては顆粒内の周辺部が透明となり, 中心部に core をもつようないわゆる halo 現象を認め, なかには density が完全に失われているものさえ観察された (図 7 c)。胞体内には滑面小胞体がやや増加し, 遊離リボソームも増加傾向にあった。

14日目および28日目に観察されるチモーゲン顆粒の density の低下は7日目のそれより一層著明となり, 顆粒内 density はほとんど消失しているか, 極めて淡明な斑点状内容を示すにすぎなかった。しかし, このような変化にもかかわらず, ほとんどのチモーゲン顆

粒膜は破壊されることなく, その連続性が維持されていた。胞体内粗面小胞体は囊状あるいは小胞状を成すものも認められるが, 大部分は小胞体槽を成していた。層状構造を呈する小胞体は腺房腔へその方向性を維持しており, density の低い顆粒間にも数多く存在した。この時期において滑面小胞体は特に増加せず, 粗面小胞体へのリボソームの付着も比較的維持されていた。また, 糸粒体, 細胞膜に変化なく, 腺房腔拡張あるいは microvilli の膨化・減少等の異常所見を全く認めず, 腺房腔内にはなお density のある無構造物質を染色できた。Golgi 装置は特に発達しておらず, またその周囲に濃縮空胞の増加もなかった (図 7 d)。

考 察

胆道系に比較的急速に閉塞機転が発生すると, 膵外分泌機能が亢進することがある。この成因については

胆道閉塞に伴う肝障害発生のため pancreozymin および secretin の両ホルモンの不活化が遷延するためであろうと先ず考えることができるが、他に膵外分泌機能に強い影響を与える vasointestinal polypeptide, pancreatic polypeptide, インスリン, グルカゴン, ソマトスタチンなどの関与も否めない。

また肝硬変および慢性肝炎における膵外分泌機能の変化として pancreozymin-secretin 試験における膵液量の増加とアミラーゼ排出量の低下があげられている⁹⁾。この外分泌酵素の排出低下については、肝障害が高度になるに従い顕著となり、膵酵素産生能が低下するためであると考えられている。この理由としては、やはりホルモンの影響を考えなくてはならない。

本実験において、膵組織内蛋白量および in vitro における膵組織からのアミラーゼ分泌量の変化、超微構造所見などから、ラットの膵外分泌系機能は閉塞性黄疸作製直後に亢進状態となり、2～4週目にはむしろ低下するという二相性の変化を示した。

光顕レベルでは、腺房細胞の機能亢進あるいは低下を明確に裏付けることができる所見を認めなかったが、超微構造的にはチモーゲン顆粒、粗面小胞体、Golgi 装置などの著明な変化を認めた。しかしこれらの変化は機能的反応としての範囲内のもので不可逆的变化とは考えられず、糸粒体・核はその形態を維持しており、autophagocytosis 所見を認めなかった。

黄疸作製直後に生じた膵外分泌機能亢進時において単位蛋白量あたりの DNA 量が増加していたことから、外分泌亢進の成因としては膵腺房細胞内の蛋白合成亢進現象に加えて DNA 合成亢進現象の双方が考えられる。また後期の外分泌能低下の成因としては、DNA 量が対照群と差のないことから蛋白分泌・合成の低下を指摘できる。この相反する二相性の変化のうち、前者については黄疸による肝障害のため、pancreozymin および secretin の不活化が延長し血中濃度が高くなるため亢進するという解釈は成り立つが、後者の低下現象については余く相反する反応であるため全く異なる機序が発生していたと考えられる。

膵腺房細胞における分泌性蛋白質の合成経路については Palade¹⁰⁾, Jamieson¹¹⁾らにより詳細に解明されてきた。すなわちリボソームにおける合成に始まり小胞体膜を貫いて輸送され、Golgi 装置・濃縮空胞などで濃縮されてからチモーゲン顆粒へと発達すると考えられている。

したがってこのような経路において膵内蛋白量の絶

対的增加あるいは減少をもたらす因子として、リボソームにおける合成量が最も重要と考えられる。ではなぜ、閉塞性黄疸初期に合成機転が亢進しえるのだろうか。この点については先にも述べたように pancreozymin の不活化遷延を指摘できよう。確かに Rothman¹²⁾らは、secretin や metacholine と比較すると pancreozymin による刺激で、膵重量をはじめ膵組織内 trypsinogen・chymotrypsinogen・amylase 量が有意に増加すると報告し、Patersen¹³⁾らも同様の結果を示した。

次に実験開始初期にみられた単位 DNA 量の増加について検討する。絶対的膵重量増加が DNA 量増加とともに観察されたことから DNA 合成能が一過性に亢進したことは確かである。しかし一般に膵組織自体は DNA 合成亢進状態である膵再生現象は、膵再生現象などと比較すると potential が非常に少ないと考えられている¹⁴⁾¹⁵⁾。たとえ膵部分切除という大きな induction を加えても、残存膵の再生は極めて少なく、部分切除以外の刺激で膵再生あるいは膵 DNA 合成亢進が発生したという報告はほとんど見当たらない。したがって本実験の初期にみられた DNA 量の増加は極めてまれな現象とも考えられる。しかし、この発現機構についてはホルモンの影響が先ず第 1 に考えられるが、既述のようにこれを示唆する文献が少ないことから今後の検討として残される。

黄疸後期に生じた蛋白合成低下の機序を解析することは、前述の亢進状態が説明されているならば相反する反応であるかは容易なこととも言えよう。形態学的には、腺房細胞の壊死・線維化などの所見は全く存在せず、従って膵腺房細胞の絶対数低下が考えられないこと、および DNA 量が対照群と差がないことから、蛋白合成低下の原因は個々の腺房細胞の機能低下にあると考えられる。これをホルモンの影響と考えられるならば、肝に不活化遷延をおこす肝硬変像が増強していたことから膵腺房細胞機能に対する antagonists の血中濃度の上昇、あるいは agonists の産生低下を指摘できる。膵腺房細胞の Ca⁺⁺イオンを介しての分泌・合成に関与する receptor として今日まで 5 種類知られている。この receptor に対する agonists についてはかなり明らかになっているが、antagonists についてはほとんど明らかでない¹⁶⁾。Atropine および局麻剤の一部そして Bt₂ cyclic GMP が知られているだけで、本実験における病態とは直接関係はない。

小沢ら¹⁷⁾は黄疸時の膵 β 細胞のインスリン分泌と

糸粒体呼吸酵素活性の関係から検索した結果、肝硬変あるいは黄疸症例では呼吸酵素活性の低下あるいは活性化遅延のためインスリン分泌が低下していたという。このような現象は代謝の旺盛な外分泌細胞にあてはまると考えられる。

しかしながら *in vivo* の実験下では多くの因子が直・間接的に影響を与えており、わずか2~3の因子で説明することは危険を伴なう。今後、ホルモンの定量を加えるとともに、*in vitro* の系における検索が必要であると考えられた。

結 語

閉塞性黄疸時の膵外分泌機能変化をラットを用いて実験的に検索した結果、黄疸発生初期に外分泌細胞の機能亢進・肥大・増生を後期に蛋白合成低下を認め、二相性変化のあることを報告した。

文 献

- 1) 西田良夫, 渡辺公男, 中川長雄ほか: 胆道閉塞時における膵の外分泌機能. 日膵研プロシーディング 3: 116-118, 1973
- 2) Chung A, Richter W: Early changes in the exocrine pancreas of the dog and rat after ligation of the pancreatic duct. *Am J Path* 63: 521-534, 1974
- 3) Geratz JD, Lamb JC: Influence of bile duct ligation on exocrine pancreatic secretory activity in the rat. *Am J Physiol* 226: 119-122, 1974
- 4) 藤原道夫, 李 雨元, 馬淵基雄ほか: 閉塞性黄疸における術後腎不全と膵の関連性. 日外会誌 76: 1-2, 1975
- 5) 中野 哲: 各種疾患におけるP-S試験成績; 胆道末端部の悪性腫瘍. 名大膵研グループ編: 膵臓病診断学. 医歯薬出版, 東京, 1976, p161-163
- 6) 岩月 淳, 河野信博, 三谷 淳, 河野信博, 三谷 進ほか: ラットでの肝外閉塞性黄疸の実験モデルに関する研究. 日消外会誌 11: 178-182, 1978
- 7) Volkin E, Cohn EW: Estimation of nucleic acid. *Meth Biochem Anal* 1: 287-303, 1954
- 8) Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr AL, et al: Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265-275, 1951
- 9) 広瀬昭一郎: 肝疾患における膵障害に関する研究. 日消病会誌 65: 351-362, 1968
- 10) Palade GE: Intracellular aspects of the process of protein synthesis. *Science* 189: 347-357, 1975
- 11) Jamieson JD: The secretory process in the pancreatic exocrine cell: Morphologic and biochemical aspects. In *Secretin, Cholecystokinin, Pancreozymin and Gastrin*. [Ed.: Jorpes JE Mutt V] 34, Berlin, Heidelberg Springer, 1973, p195-217
- 12) Rothman SS, Wells H: Enhancement of pancreatic enzyme synthesis by pancreozymin. *Am J Physiol* 213: 215-218, 1967
- 13) Patersen H, Solomon TE, Grossman MI: Pancreatic secretion in rats after chronic treatment with secretin plus caerulein. *Gastroenterol* 76: 790-794, 1979
- 14) Pearson KW, Scott D, Torrance B: Effects of partial surgical pancreatectomy in rats. I. Pancreatic regeneration. *Gastroenterol* 72: 469-473, 1977
- 15) Sidorova VF: Effect of age on ability of the rat pancreas to regenerate. *Bull Eksp Biol Med* 68: 79-83, 1969
- 16) 岩月矩之: 膵外分泌機構. 一最近の動向一. 胆と膵 3: 515-523, 1982