

膵管閉塞の膵ライソゾームへの影響とその抑制物質の 作用効果に関する実験的研究

京都大学医学部第1外科学教室

平野 鉄也 真辺 忠夫 戸部 隆吉

膵管結紮家兎にて膵腺房細胞の変化と新しい蛋白分解酵素阻害剤 E3123の保護効果を検討した。3時間の短期間膵管閉塞と secretin (0.2CU/kg・hr) 投与にて、門脈血中 amylase (46±4U/ml) (p<0.01), cathepsin B 値 (9.6±0.7U/ml) (p<0.01), 膵水分量 (87±2%) (p<0.05), 膵 amylase 量 (614±42U/mg DNA) (p<0.02) および in-vitro での膵ライソゾームの脆弱性はコントロール群 (amylase ; 15±2U/ml, cathepsin B ; 1.8±0.2U/ml, 膵水分量 ; 74±2, 膵 amylase 量 ; 387±23 U/mg DNA) に比べ有意に上昇・亢進を示し、膵腺房細胞内にも cathepsin B 活性がライソゾーム分画 (30±3%) より、チモーゲン分画 (49±4%) に移動するのが観察された (コントロール群 : ライソゾーム分画 ; 55±3%, チモーゲン分画 ; 23±2%)。これらの変化は E3123を5mg/kg・hr にて、膵管閉塞時に投与することにより、ほぼ完全に阻止され、2mg/kg・hr にても高アミラーゼ血症や cathepsin B 活性の移動に対して抑制効果が示された。以上の結果は膵管閉塞障害における膵腺房内ライソゾームの脆弱化に E3123が抑制効果を発揮することを示唆させるものであった。

Key words: pancreatic duct obstruction, protease inhibitor E-3123, lysosomal fragility, redistribution of lysosomal enzyme, cathepsin B

緒 言

胆石症、特に総胆管結石症との急性膵炎との密接な関連性や膵腫瘍などにおける膵管閉塞時の膵障害については以前より指摘されている^{1)~6)}。しかし、これらの病態は、胆石による膵管閉塞によるものなのか、膵管および胆管の同時閉塞と胆汁の膵管内逆流によるものかなどの病因論については不明な点も多い。一方、最近、ラットにおけるセルレイン誘起性膵炎や、マウスにおけるコリン欠乏エチオニン食による膵炎モデルにて、膵腺房内での膵ライソゾーム酵素と消化酵素の同一細胞内分画での共存 (colocaligation) が報告されている⁷⁾⁸⁾。これら両者の同一細胞分画での共存は、ライソゾーム酵素である cathepsin B による消化酵素の活性化へ進展する可能性を内在しており、膵炎の発生の機序におけるライソゾーム酵素の重要な役割を示唆させるものと思われる⁹⁾。

今回、膵管系が完全に胆管系より分離されている家兎において膵管閉塞モデルを作成し、膵ライソゾーム

酵素動態を中心に種々のパラメーターより膵腺房細胞の変化を観察するとともに、新しい合成蛋白分解酵素阻害剤である E3123 (4-guonidino-benzoate methanesulfonate) のこのモデルにおける膵腺房細胞の変化に対する抑制効果を検討したので報告する。

材料と方法

この実験には全部で48羽の雄性 New Zealand White Rabbit (体重: 2.45~2.80kg) を使用した。すべての家兎は5日間の順応期間の後に実験に使用した。16時間の絶食後、以下の3群に分け実験を行った。

① 膵管閉塞+secretin 投与群 (PDO 群16羽) ; 耳介静脈より pentobarbital (30mg/kg) を静注し麻酔後、右側大腿静脈より下大静脈まで V-3 catheter (Insul-Tab, Woburn, MA, U.S.A.) を挿管し、正中切開にて開腹した。回盲腸静脈の分枝から門脈本幹へ18G カテーテル (Medicut) を挿入し、門脈採血に供した。この時点にて1ml の血液を門脈より採血し、即座に血清分離を施行し、-20℃以下にて血清を保存し、amylase 値, cathepsin B 値を測定した。次に金属クリップを用い膵管を十二指腸合流部直上で閉塞し、いったん閉腹し同時に膵外分泌刺激のために secretin (Sigma) を

0.2CU/kg・hrの用量にてヘパリン加(30IU/ml)生理食塩水(1.58ml/hr)に溶解させ、3時間 infusion pumpを用いて持続静注した。

② 膵管閉塞+secretin投与+E3123投与群(E₁群12羽, E₂群12羽);同様の膵管閉塞, secretin投与に加え, E3123を膵管結紮の3時間にわたり2mg/kg・hr(E₁群)と5mg/kg・hr(E₂群)の2種の用量にて, 同様にヘパリン加生理食塩水(1.58ml/hr)に溶解させ投与した。

③ コントロール, 単開腹群(Cont群8羽);同様の挿管, 採血後, 膵管部に綿棒にて軽い接触のみを加えた。

上記3群ともに, 手術麻酔中は保温マット(40℃)およびランプにて保温へ努め, 必要なら pentobarbitalの少量(10mg/kg)を投与して, 麻酔を維持した。

各群とも3時間の膵管閉塞+secretin投与後,(Cont群については, 膵管への軽い接触後), 半数の家兎については, 門脈血採取後, 大量の pentobarbitalの投与によると殺後すばやく膵臓を摘出し, 以下の実験に供した。

1) 膵水分含有量の変化;膵臓のごく一部を150℃の乾燥器にて48時間乾燥させ, 膵乾重量を測定し, 乾燥前の重量(湿重量)と比較し, 膵水分量を算出した。

2) 膵 amylase およびライソゾーム酵素含有量;膵臓の他の一部を0.5% Triton X-100 (Fisher Scientific)を含有する氷冷燐酸緩衝食塩水(pH 7.4)中にて Brinkman Polytron を使用してホモジェネートし, 4℃にて150×g, 15分の低速遠沈後の上澄について, amylase 活性, cathepsin B 値, DNA 濃度を測定し, U/mg DNA として表した。

3) 膵組織像;膵のごく一部を燐酸緩衝10%中性ホルマリン液中で固定し, hematoxylin-eosinにて染色後, 光学顕微鏡にて腺房細胞空胞化(acinar cell vacuolization), 間質性浮腫(interstitial edema), 炎症細胞浸潤(inflammatory cell infiltration)の3点について, blinded observerにより0(変化なし)~4+(最大限の変化)の間で評価を行った。

4) Cathepsin Bの膵腺房内分布;膵臓の約1/3量を6mlの氷冷0.3M サッカロース液(pH 6.5)中にて, ホモジェネートし, Tartakoff と Jamieson の膵臓の細胞分画法¹⁰⁾の変法¹¹⁾によりライソゾーム分画を得た。すなわちホモジェネートにまず, 4℃, 150×g, 10分の低速遠沈を加え, 非破碎細胞や残屑を除去し, この上澄について4℃, 1,000×g, 15分の遠沈を加えてチモーゲン分画を得た後, さらに, 4℃, 12,000×

g, 12分の遠沈を加え, ライソゾームとミトコンドリア分画と上澄(マイクロゾームと可溶性分画)を得た。これら各分画を2mlの0.3M サッカロース液中に浮遊させ, cathepsin B 活性を測定し%of total として表わし, cathepsin B の膵腺房細胞中での分布の指標とした。

5) In-vitro の培養系での膵ライソゾームの脆弱性;残りの約1/3量の膵臓について, 上記と同様のホモジェネート後, 4℃, 150×g, 10分, 4℃, 1,000×g, 15分, 4℃, 12,000×g, 12分の遠沈を順次加え, ライソゾームミトコンドリア分画を得た後, この分画を25℃の0.3M サッカロース液中にて浮遊させ, 大気中にて30分間隔にて90分まで培養し, 各時期にて再び, 4℃, 12,000×g, 12分の遠沈を加え, 上澄および沈殿分画を得, それぞれについて cathepsin B 活性量を測定し, 上澄中活性を%として表わし, 膵ライソゾームの脆弱性の指標とした。

各群とも残りの半数の家兎に関しては, 3時間の膵管閉塞+secretin投与後に, いったんクリップを除去し, 膵管閉塞を解除後, 閉腹し, 24時間後に同様の実験を施行した。なお, Cont群は膵管への接触後, 3時間目に再開腹し, 再度膵管への接触を行い, その後24時間目に同様の実験を施行した。これらの全家兎については, 術後絶食とし(水分は自由に摂取させ), 中心静脈へのカテーテルよりヘパリン加(30IU/ml)10%グルコース含有, lactate-Ringer液を1.58ml/kg・hrにて投与した。

酵素活性の測定: amylase 活性は, soluble starch を基質とする Bernfeld の方法¹²⁾により測定し, 1単位(U)の amylase 活性は30℃で1分間に1mgの maltose を基質より分離しうる活性値とした。Cathepsin B 活性は CBZ-arginyl-arginine-β-naphthylamide (Bacham Bioscience, Inc., Philadelphia, PA, U.S.A.) を基質として蛍光計学的に McDonald と Ellis の方法¹³⁾にて測定し, 1単位(U)の cathepsin B 活性は37℃にて, 1分間に1nanomoleの β-naphthylamine を基質より分離しうる活性とした。DNA量は, 子牛胸腺DNA(Sigma社)を基準として, LaBarca と Paigen の方法¹⁴⁾にて測定した。

統計学的処理:実験結果は,すべて平均値(mean)±標準誤差(SEM)として表わし, 統計学的検定にはANOVAとTukeyの方法を用い, p<0.05を有意差ありと判定した。なお, 組織学的所見にはWilcoxonのrank sum testを使用した。

結 果

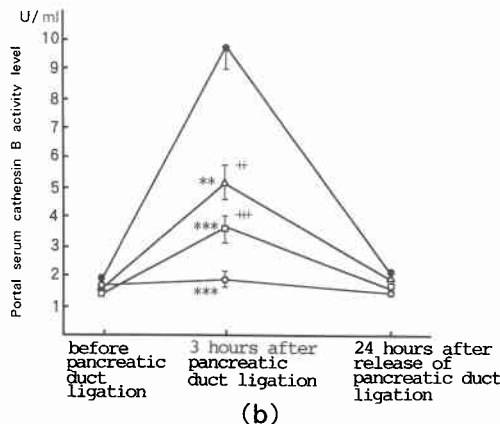
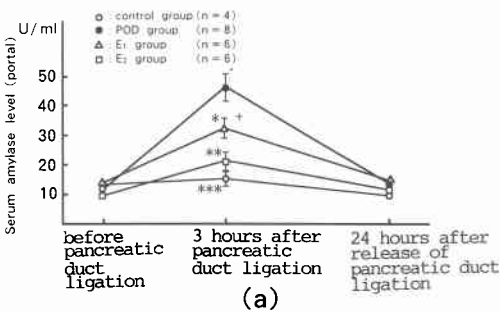
1) 門脈血中 amylase 値, cathepsin B 値, 膵水分含有量の変化: PDO 群では 3 時間の膵管閉塞+secretin 投与後, 門脈血中 amylase 値は 46 ± 4 U/ml (前値: 11 ± 2 U/ml) 著明に上昇し Cont 群 (15 ± 2 U/ml) (前値: 12 ± 2 U/ml) に比べ有意に ($p < 0.01$) 高値を示した。しかし E₁群, E₂群では門脈血中 amylase 値は, それぞれ 32 ± 3 U/ml(前値: 13 ± 2 U/ml), 21 ± 3 U/ml(前

値: 10 ± 2 U/ml) と PDO 群に比べ有意(それぞれ $p < 0.05$, $p < 0.02$) に低値を示した (Fig. 1a)。また, 閉塞解除後24時間後には, これら 4 群ともほぼ同様の値を示し, 有意差は認めなかった。門脈血中 cathepsin B 値もほぼ同様の变化を示し, PDO 群では 3 時間の膵管閉塞後 9.6 ± 0.7 U/ml (前値: 1.9 ± 0.2 U/ml) と著明に上昇し, Cont 群 (1.8 ± 0.2 U/ml) (前値: 1.6 ± 0.2 U/ml) に比べ有意 ($p < 0.01$) に高値を示した。しかし, E₁群および E₂群では, それぞれ 5.1 ± 0.5 U/ml(前値: 1.5 ± 0.2 U/ml), 3.5 ± 0.4 U/ml(前値: 1.3 ± 0.2 U/ml)を示し, PDO 群に比べ有意(それぞれ $p < 0.02$, $p < 0.01$) に低値を示した (Fig. 1b)。また, 閉塞解除後24時間には, 門脈血中 amylase 値と同様, 4 群ともほぼ同様の値を示し, 有意差は認めなかった。

Fig. 1 Influence of 3 hours-pancreatic duct obstruction and secretin (0.2CU/kg·hr) infusion on the changes in portal serum amylase levels (a), and portal cathepsin B levels (b) in rabbits. (—○—; control laparotomy group (n=4), —●—; PDO group-pancreatic duct obstruction and secretin infused group (n=8), —△—; E₁ group-pancreatic duct obstruction with secretin and E3123 (2mg/kg·hr) infused group (n=6), —□—; E₂ group-pancreatic duct obstruction with secretin and E3123 (5mg/kg·hr) infused group (n=6), *; $p < 0.05$, **; $p < 0.02$, ***; $p < 0.01$ compared with PDO group. +; $p < 0.05$ compared with E₂ and control group, ++; 0.05 compared with E₂ group and $p < 0.01$ compared with control group, ###; $p < 0.02$ compared with control group)

PDO 群では 3 時間の膵管閉塞時には軽度の浮腫がみられ, 膵水分含有量は $87 \pm 2\%$ に増加し, Cont 群 ($74 \pm 2\%$) に比べ有意 ($p < 0.05$) に高値を示した。しかし, E₂群では, $78 \pm 2\%$ と PDO 群に比べ有意($p < 0.05$) に低値を示したが, E₁群では有意な低値は示さなかった (Table 1)。

しかし, 閉塞解除後24時間目には 3 群ともにほぼ同様の値を示し Cont 群との間に有意差は認めなかった。



2) 膵 amylase および cathepsin B 含有量の変化について: PDO 群では 3 時間の膵管閉塞後膵 amylase 含有量は上昇し, Cont 群に比べ有意 ($p < 0.02$) に高値を呈し, 消化酵素の分泌障害を示唆させた。しかし, E₁, E₂群ではこれらの膵 amylase 含有量が PDO 群に比べ有意(それぞれ $p < 0.05$, $p < 0.02$) に低値を示した。また, 閉塞解除後24時間目には, これら 3 群はほぼ同様の値を示し, Cont 群との間に有意差は認めなかった (Table 2)。膵 cathepsin B 含有量については, PDO 群では 3 時間の膵管閉塞後, 他の 3 群に比べ高値の傾向を示したが, 有意差は認めなかった。

3) 組織学的変化: PDO 群では 3 時間の膵管閉塞より膵腺房細胞には軽度の空胞化と間質性浮腫が出現したが, E₂群ではほぼ完全に抑制されることが判明した (Table 3)。E₁群では有意差は認められなかったが, 改善の傾向が観察された。膵管閉塞解除後24時間目には, これらの変化はほぼ消失し, これら 3 群は Cont 群との間に有意差は認めなかった。

4) Cathepsin B の膵腺房内分布: PDO 群では 3 時間の膵管閉塞により cathepsin B 活性が, ライソゾム分画では $30 \pm 3\%$, チモゲン分画では $49 \pm 4\%$ と

Table 1 Influence of pancreatic duct obstruction and secretin infusion on the changes in pancreatic water content in rabbits

Group	n	Pancreatic water content (%)	
		3 hours after PDO	24 hours after removal of PDO
PDO	8	87 ± 2	78 ± 2
E ₁	6	81 ± 3	75 ± 2
E ₂	6	78 ± 2*	76 ± 2
Cont	4	74 ± 2*	75 ± 2

PDO ; pancreatic duct obstruction+secretin (0.2 CU/kg · hr) infusion, E₁, and E₂ ; pancreatic duct obstruction+secretin infusion+E₃₁₂₃ infusion (2 and 5 mg/kg · hr, respectively). Cont ; control laparotomy.

* ; p<0.05 compared with PDO group.

なり, Cont 群(ライソゾーム分画:55±3%, チモーゲン分画:23±2%)に比べ, それぞれ有意(p<0.02)に低値, 高値を示し, cathepsin B 活性のライソゾーム分画からチモーゲン分画への移動(再分布)が観察された. しかし, E₁群, E₂群ではほぼ用量に比例してこれらの cathepsin B 活性の再分布が有意(それぞれ p<0.05, p<0.02)に抑制された(Fig. 2a). さらに, 膵管閉塞解除24時間後, PDO 群では, ライソゾーム分画での cathepsin B 活性が43±3%, チモーゲン分画で35±3%と, Cont 群(ライソゾーム分画:56±3%, チモーゲン分画:24±2%), E₂群(ライソゾーム分画:55±3%, チモーゲン分画:25±2%)に比べ, 軽度とはいえ有意(p<0.05)にそれぞれの分画にて低値, 高値を示し, この時期においても軽度の cathepsin

Table 2 Influence of pancreatic duct obstruction and secretin infusion on the changes in pancreatic amylase and cathepsin B content in rabbit

Group	n	Pancreatic amylase content (U/mg DNA)		Pancreatic cathepsin B content (U/mg DNA)	
		3 hours after PDO	24 hours after removal of PDO	3 hours after PDO	24 hours after removal of PDO
PDO	8	614 ± 42	489 ± 36	1548 ± 205	1219 ± 184
E ₁	6	472 ± 31*	438 ± 25	1382 ± 141	1285 ± 137
E ₂	6	421 ± 28**	417 ± 22	1201 ± 196	1314 ± 149
Cont	4	387 ± 23**	405 ± 29	1115 ± 153	1264 ± 173

Both the amylase and cathepsin B contents were expressed as U/mg DNA.

The symbols in the groups are the same as in Tab. I.

* ; p<0.05, and ** ; p<0.02 compared with PDO group

Table 3 Influence of pancreatic duct obstruction and secretin infusion on the changes in pancreatic histology in rabbits

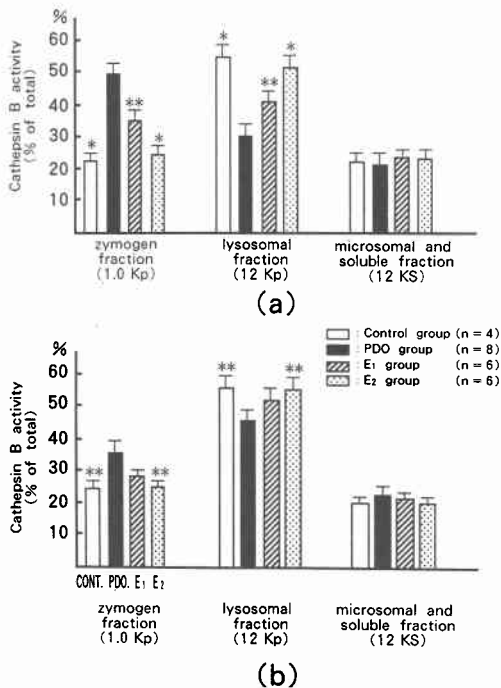
Group	n	Acinar cell vacuolization		Interstitial edema		Inflammatory cell infiltration	
		3 hours after PDO	24 hours after removal of PDO	3 hours after PDO	24 hours after removal of PDO	3 hours after PDO	24 hours after removal of PDO
PDO	8	1+ (0~2) [1.4±0.3]	0 (0~1) [0.3±0.2]	2+ (1~2) [1.6±0.2]	0 (0~1) [0.4±0.2]	0 (0~1) [0.4±0.2]	0 (0~1) [0.1±0.1]
E ₁	6	0 (0~1) [0.3±0.2]	0 (0~1) [0.2±0.2]	1+ (1~2) [1.3±0.2]	0 (0~1) [0.3±0.2]	0 (0~1) [0.3±0.2]	0 (0~1) [0.2±0.2]
E ₂	6	0* (0~1) [0.2±0.1]	0 (0) [0]	0* (0~1) [0.3±0.2]	0 (0~1) [0.2±0.2]	0 (0) [0]	0 (0) [0]
Cont	4	0* (0) [0]	0 (0) [0]	0** (0) [0]	0 (0) [0]	0 (0) [0]	0 (0) [0]

The values are expressed as rounded values. () ; the range of values, [] ; true values,

* ; p<0.05 compared with PDO group, ** ; p<0.02 compared with PDO group

Fig. 2 Influence of 3 hours-pancreatic duct obstruction and secretin infusion on the change in cathepsin B distribution in subcellular fractionation in rabbit pancreatic acinar cells (a) 3 hours after pancreatic duct obstruction, and (b) 24 hours after removal of pancreatic duct obstruction.

—○—; control group (n=4), ●; PDO group (n=8), △, ▽; E₁ group (n=6), □, ▢; E₂ group (n=6) (*; p<0.02 and **; p<0.05 compared with PDO group.)



B 活性の再分布が持続していることが示された (Fig. 2b).

5) In-vitro の培養系でのライソゾームの脆弱性: PDO 群では 3 時間の膵管閉塞により, in-vitro でのライソゾームの培養において, cathepsin B の可溶性分画での値は特に 60 分, 90 分値で, Cont 群に比べ有意(それぞれ p<0.05, p<0.02)に高値を示しライソゾームの脆弱性の亢進を示唆したが, E₁, E₂ 群ではほぼ用量に比例してこのライソゾームの脆弱性を抑制した (Table 4). 膵管閉塞後 24 時間目には, ライソゾームの脆弱性の亢進もほぼ消失し, これら 3 群と Cont 群との間に有意差は認めなかった.

考 察

膵管閉塞時の膵炎・膵障害モデルとして, 今回, 家兎における短期間 (3 時間) 膵管閉塞+膵外分泌刺激モデルを使用し, 種々のパラメーターより膵腺房細胞の変化を検討した結果, 膵管閉塞後, 門脈血中 amylase 値, cathepsin B 値の上昇, 膵水分含有量の上昇, 膵 amylase 含有量の上昇, また組織学的に詳細は不明であるが, ライソゾームの crinophagy とも考えられる軽度の膵腺房細胞の空胞化, 中程度の間質性浮腫などの変化が認められた. 消化酵素と cathepsin B などのライソゾーム酵素はともに粗面小胞体に付着したリボゾームにて生合成され, ゴルジ装置を経て, 一方はチモージェン顆粒へ¹⁵⁾, 他方はライソゾームへと¹⁶⁾¹⁷⁾分離されて輸送される. 生理的条件下ではこれら 2 者の合成以後の膵腺房細胞内の同一分画での共存は理論上考えられないが, 膵炎の発生の機序ではライソゾーム酵素である cathepsin B と消化酵素の腺房細

Table 4 Influence of pancreatic duct obstruction and secretin infusion on the changes in lysosomal fragility in in-vitro incubation in rabbits

Group	n	3 hours after PDO			24 hours after removal of PDO		
		Soluble cathepsin B activity (% of total)			Soluble cathepsin B activity (% of total)		
		Incubation time (min)			Incubation time (min)		
		30	60	90	30	60	90
PDO	8	10±2	23±2	38±3	8±2	17±2	28±2
E ₁	6	9±2	18±2	27±2*	7±2	15±2	27±2
E ₂	6	6±2	13±2*	23±2**	7±1	13±2	25±2
Cont	4	7±1	14±2*	24±2**	6±1	13±2	26±2

The symbols in the groups are the same as in Tab I.

*; p<0.05, and ** p<0.02 compared with PDO group.

胞内での共存が想定されている⁷⁾⁹⁾。Cathepsin Bは trypsinogenを活性化しうるとされ¹⁸⁾¹⁹⁾このライソゾーム酵素と消化酵素の共存は消化酵素の膵房細胞内での活性化において重要な役割を果たしていると考えられている。今回私どものモデルにおいては、膵組織中や血中での trypsinを直接証明していないため、このモデルにおいて、cathepsin Bによる trypsinogenの活性化の関与は不明であるが、膵管閉塞モデルにおいても、細胞分画法によって、cathepsin Bが本来のライソゾーム分画より、さらに重いチモーゲン分画へ移動、再分布しているのが観察された。この cathepsin Bの再分布が、単に膵腺房細胞内での拡散(diffusion)によるものなのか、あるいは何らかの受容体への結合(binding)を介したものなのかは不明であるが、膵管閉塞により、ライソゾーム酵素がゴルジ装置からライソゾームへという本来の膵腺房細胞内での輸送経路から離れてチモーゲン顆粒と合体することを示唆させるものとも考えられた。しかも、膵管閉塞解除後24時間目には、門脈血中 amylase, cathepsin B値、膵水分含有量がほぼ正常値に復したのにもかかわらず、cathepsin Bの再分布は軽度ながらも、依然持続する傾向が観察され、このライソゾーム酵素の再分布の消失にはかなりの時間を要することが示唆された。

さらに in-vitro の系においては膵管閉塞および回復過程での細胞内小器官であるライソゾームの脆弱性が観察された。

これらの結果は、膵管閉塞および secretin 投与により膵管内圧を上昇させることにより、膵腺房細胞内では、多量のライソゾーム酵素がチモーゲン顆粒中へ輸送されるとともに膵腺房細胞内では消化酵素の分泌障害が誘起されるものと思われた。また、ライソゾーム自体の脆弱性も亢進し、より多量のライソゾーム酵素が膵臓より逸脱し、門脈循環に移行するとともに、膵臓に可逆的な軽度の損傷を与えるものと想像された。今回の家兎膵管閉塞モデルでの結果を単純に臨床面での急性膵炎に応用することはできないが、このように、短期間の膵管閉塞による膵管内圧上昇モデルは、膵障害としてはごく軽度のものと考えられ、膵炎初期の病態での種々のパラメーターの解析および種々の薬剤の膵損傷に対する効果を観察するのに最適のモデルと考えられた。

新しい合成蛋白分解酵素阻害剤である E-3123は、既存の合成蛋白分解酵素阻害剤と同様 guanidinoesterの一種であり、従来の阻害剤と同様に、trypsin, phos-

pholipase A, や kallikrein などの蛋白分解酵素を抑制するといわれ²⁰⁾、虚血性膵炎での有効性も報告されている²¹⁾。E-3123は508daltons という分子量より、膵血管床より膵腺房細胞内に十分到達しうることが期待され、この膵障害モデルでの膵腺房細胞への損傷に対する抑制効果が予想された。今回、膵管閉塞+secretin 投与時に、E3123を同時に5mg/kg・hrの用量にて投与することにより、門脈血清 amylase, cathepsin B値の上昇、膵腺房細胞よりの消化酵素の分泌障害を示すと思われる膵 amylase 含有量の上昇、膵水分量の上昇および膵臓の組織学的変化を有意に阻止するとともにライソゾームの脆弱性の亢進をも阻止することが判明した。2mg/kg・hrのE-3123の投与にても、一部のパラメーターについては有意の効果を示した。蛋白分解酵素阻害剤の投与でライソゾーム酵素の膵腺房細胞内での再分布も阻止しうることが判明した事実は、ライソゾーム酵素の再分布に関与する何らかの蛋白分解酵素を阻害することにより、また、ライソゾーム膜の安定化作用などを通してE-3123は膵腺房細胞においてライソゾーム酵素の再分布やライソゾームの脆弱性の亢進に対し抑制的に作用することを示唆すると考えられる。

本研究は文部省科学研究費(B-03454319)、厚生省膵難治性疾患研究費の援助を受けた。

文 献

- 1) Opie EL: The etiology of acute hemorrhagic pancreatitis. Bull Johns Hopkins Hosp 12: 182-188, 1901
- 2) Molander DW, Bell ET: Relation of cholelithiasis to acute hemorrhagic pancreatitis. Arch Pathol 41: 17-18, 1946
- 3) Dworken HJ: Recent experience with spontaneous disappearing gallstones. Gastroenterology 38: 76-86, 1960
- 4) Acosta JL, Ledesma CL: Gallstone migration as a cause of acute pancreatitis. N Engl J Med 290: 484-487, 1974
- 5) Armstrong CP, Taylor TV, Jeacock J et al: The biliary tract in patients with acute gallstone pancreatitis. Br J Surg 72: 551-555, 1985
- 6) Frei GJ, Grei VT, Thirlby RC et al: Biliary pancreatitis. Clinical presentation and surgical management. Am J Surg 151: 170-175, 1986
- 7) Steer ML, Meldolesi J, Figarella C: Pancreatitis. the role of lysosomes. Dig Dis Sci 29: 934-938, 1984
- 8) Saluja A, Hashimoto S, Saluja M et al: Sub-

- cellular redistribution of lysosomal enzymes during caerulein-induced pancreatitis. *Am J Physiol* 253 : G508—516, 1987
- 9) Steer ML, Meldolesi J: The cell biology of experimental pancreatitis. *N Engl J Med* 316 : 144—150, 1987
 - 10) Tartakoff A, Jamieson JE: Fractionation of guinea pig pancreas. *Methods Enzymol* 31 : 41—59, 1974
 - 11) DeLisle R, Schulz I, Tyrakowski T et al: Isolation of stable pancreatic zymogen granules. *Am J Physiol* 246 : G411—418, 1984
 - 12) Bernfeld P: Amylase α and β . *Methods Enzymol* 1 : 149—158, 1955
 - 13) 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
 - 14) LaBarca C, Paigen K: A simple, rapid and sensitive DNA assay procedure. *Anal Biochem* 102 : 334—352, 1980
 - 15) Palade G: Intracellular aspects of the process of protein synthesis. *Science* 189 : 347—358, 1975
 - 16) Sly W, Fischer D: The phosphomannosyl recognition system for intracellular and intercellular transport of lysosomal enzymes. *J Cell Biochem* 18 : 67—85, 1982
 - 17) Kornfeld S: Trafficking of lysosomal enzymes in normal and disease states. *J Clin Invest* 77 : 1—6, 1986
 - 18) Greenbaum LM, Hirshkowitz A: Endogenous cathepsin activator of trypsinogen in extracts of dog pancreas. *Proc Soc Exp Biol* 107 : 74—76, 1961
 - 19) Figarella C, Misczuk Jamska B, Barrett HAJ: Possible 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
 - 20) 宮本 要, 菱沼宇春, 永川純一ほか: 合成 Protease inhibitor (E-3123) の実験的急性膵炎に対する効果. *日薬理誌* 91 : 285—293, 1988
 - 21) Iwatsuki K, Horiuchi A, Yonekura H et al: Ischemia-induced acute pancreatitis in the dogs and its amelioration by a new synthetic protease inhibitor, E3123. *Asia Pac J Pharmacol* 5 : 113—119, 1990

Experimental Study on the Influence of Pancreatic Duct Obstruction on Pancreatic Lysosome in Rabbits and its Protection by a Protease Inhibitor

Tetsuya Hirano, Tadao Manabe and Takayoshi Tobe
First Department of Surgery, Faculty of Medicine, Kyoto University

To evaluate the changes in pancreatic acinar cells in pancreatic duct obstruction as well as the protective effects of a new potent protease inhibitor, E3123, we measured the portal serum amylase and cathepsin B levels, pancreatic water content, pancreatic amylase and cathepsin B content, histological changes, as well as the cathepsin B distribution in acinar cells and lysosomal fragility in in-vitro incubation after short-term (3 hours) pancreatic duct obstruction by secretin (0.2 U/kg·hr) infusion in rabbits. Portal serum amylase, cathepsin B levels, pancreatic water content, pancreatic amylase content and lysosomal fragility in duct-obstructed animals were significantly increased compared with the control group, and a marked shift of cathepsin B activity from the lysosomal fraction to the zymogen fraction was observed in this group. These changes had almost disappeared 24 hours after the removal of duct obstruction with only a slight remnant of the cathepsin B redistribution. However when E3123 was infused at a dose of 5 mg/kg·hr during the duct obstruction, these changes observed in the duct-obstructed group were almost completely inhibited. A dose of 2 mg/kg·hr also have a protective effect against hyperamylasemia and cathepsin B redistribution. These results indicate the important role of lysosomal enzymes and the therapeutic effect of E3123 on the subcellular levels in the pathogenesis of acute pancreatitis.

Reprint requests: Tetsuya Hirano First Department of Surgery, Faculty of Medicine, Kyoto University
54 Shogoin-Kawaracho, Sakyoku, Kyoto, 606 JAPAN