

# 急性膵炎における重症化機構とアポトーシス

竹山 宜典

近畿大学医学部外科学教室 (肝胆膵部門)

## 緒 言

急性膵炎は、膵内での膵酵素の活性化を端緒として、膵の自己消化から非化膿性炎症を引き起こすものである。その予後は個々の症例により著しく異なり、軽症例は数日の絶食で軽快するが、重症例では集中治療の発達した現在でもいまだに死亡率が10%に達し、重症急性膵炎は厚生労働省から難病に指定されている。急性膵炎における「重症化」とは、膵に発した炎症性変化が全身に波及し、生体恒常性維持に支障をきたすものと定義される。すなわち、発症早期では肺・肝・腎不全や、血液凝固系の障害である汎血管内凝固症候群などの多臓器不全をきたし、発症後期では膵及び膵周囲への局所感染から敗血症をきたして重症化すると考えられる。したがって、発症早期の臓器障害機構と発症後期の感染対策の確立が本疾患の治療成績向上への鍵と考えられる。

重症急性膵炎では、膵局所の炎症が全身に波及して、全身炎症反応症候群 (systemic inflammatory syndrome: SIRS) が誘導され、そこに感染が併発すると敗血症から不可逆的臓器障害へと進展すると考えられている。しかし、感染が証明されない症例にも、発症早期から臓器障害が起ることから、感染を伴わない臓器障害機構も存在すると考えられる。

一方、重症急性膵炎では、発症早期より末梢リンパ球が減少していること<sup>1</sup>、その減少の程度と予後との相関が見られることがすでに報告されている<sup>2</sup>。このことは、重症急性膵炎における免疫担当臓器・細胞の障害による免疫不全の存在とその重要性を示唆している。その様な状態に感染を合併すると容易に敗血症に移行することが予想され、感染源である腸内細菌の移行現象 (bacterial translocation: BT) も膵炎重症化の因子として重要である。

一方、臓器障害を臓器の構成成分である細胞の障害として捉えれば、究極の形態として細胞死が存在する。細胞死の誘導機構から臓器障害を解析することは、本疾患の重症化機構解明への一つのアプローチであると考えられる。われわれは、1990初頭より急性膵炎における臓器障害機構としての細胞死に注

目し、その一形態であるアポトーシスが、急性膵炎の重症化機構に関与していることを世界に先駆けて実験的に検討してきた<sup>3-7</sup>。そして、膵炎の全身病変の形成に関与するといわれる膵炎腹水のアポトーシス誘導能を解析するとともに、急性膵炎における遠隔重要臓器にアポトーシスが存在することを示し、その臓器障害への関与を明らかにしてきた。さらに、感染防御において重要な役割を果たすと考えられる細胞性免疫の変化をその構成細胞であるリンパ球の変化から解析を進めてきた<sup>8,9</sup>。また、感染源であると考えられる腸内細菌の移行現象 (bacterial translocation) にも、免疫細胞や腸管粘膜上皮細胞のアポトーシスが関与することを明らかにしている<sup>10</sup>。本稿では、他の研究者の報告とともに、それらの結果をまとめて紹介する。

## アポトーシスについて

### 1) アポトーシスの概念

虚血、局所の炎症などの要因により引き起こされる細胞の死は、細胞膜の障害により惹起される細胞死であり、形態学的には細胞の膨脹が特徴的で、necrosis (壊死) と定義される。この細胞死の形態ではATP産生は不要で、核の変化は必須ではない。

これに対して、細胞膜の integrity は保持されているが、急速な細胞の縮小を特徴とする細胞死の形態が存在し、アポトーシスと定義される。アポトーシスではクロマチンが核膜周辺に凝集し、細胞全体の縮小 (shrinking) が認められ、細胞表面に大小の突起が多数出現する (budding, blebbing)。最終的には、細胞は断片化してアポトーシス小体を形成する。アポトーシス小体は速やかにマクロファージにより貪食処理され、細胞内容の漏出に引き続く炎症細胞の浸潤は起こらない。アポトーシスは生化学的には、クロマチンの基本構造であるヌクレオソーム単位でのDNA断片化 (DNA fragmentation) を特徴とする。DNAリンカー部位にDNAエンドヌクレアーゼが作用し、DNAが約180 bpの整数倍に切断されるため、これらの変化にはATPが必要であるとされる。

アポトーシスは、形態形成や正常免疫機構におい

て普遍的な生命現象として存在して、特異的実行機構を持たない necrosis とは異なり、細胞内の特定の作動機構を持つことが特徴的である。

## 2) アポトーシス検出法

アポトーシスの検出方法には大別して形態学的方法、組織化学的方法、生化学的方法がある。形態学的方法とは、顕微鏡観察により、その形態的特徴からアポトーシスを検出する方法であり、単に位相差顕微鏡により細胞の縮小を見るものから核の断片化やクロマチンの核内分布を DNA 特異的蛍光色素などで染色する方法 (Hoechst 33258, 33342 や propidium iodide)、また電子顕微鏡観察により、直接断片化した核やアポトーシス小体を確認する方法がある。また、FACSscan を用いて DNA の断片化や細胞周期を同時に測定でき、アポトーシス測定に多用されている。次に、組織化学的方法とは、アポトーシス細胞に特異的に出現する蛋白、遺伝子、断片化 DNA を組織化学的に検出する方法がある。その代表としては、TUNEL 法がある。これは DNA の 3'OH 末端にビオチン化 dUTP を結合させこのビオチンを免疫組織化学的に検出する方法である。さらに、細胞 DNA を抽出しこれをアガロースゲル電気泳動して約 180 bp の整数倍の DNA 断片化 (stepped ladder pattern) を確認する方法が、最も確実なアポトーシス証明法とされている。

## 発症早期における多臓器不全におけるアポトーシス

重症肺炎の発症早期には、心血管系、肺、腎、肝および血液凝固系の障害がおこる。その中で、肺、腎、肝およびリンパ組織において、実験肺炎モデルでアポトーシスが確認されている。

### 1) 肺障害

重症急性肺炎における肺障害の特徴は、低酸素血症である。軽度の低酸素血症から、adult respiratory distress syndrome (ARDS) 類似の高度の低酸素血症まで幅広い病態をきたすが、高度の低酸素血症が予後の決定因子となることが示されている。1998年に、Wang らは II 型の肺胞上皮細胞が急性肺炎時にアポトーシスをきたすことを報告している<sup>11</sup>。II 型の肺胞上皮細胞は、I 型肺胞上皮細胞の前駆細胞として肺胞上皮の修復に働くとともに、肺胞上皮サーファクタントを分泌して肺胞の表面張力をたもち肺胞の形態維持に寄与するとされる。彼らは、5% タウロコール酸肺管内注入によるラット壊死性肺炎モデルにおいて、肺炎作成 12, 24 時間後に、II 型肺胞上皮細胞がアポトーシスに陥ることを形態学的に確認し、肺炎作成後 6 時間後に肺胞洗浄液中に上昇する tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) により誘導

された II 型肺胞上皮細胞のアポトーシスが肺胞上皮のバリアー機能の障害を引き起こすと推論している。同様のラットモデルでは、2000年には Yuen らが、肺炎作成 5 時間後に肺胞上皮細胞にアポトーシスが誘導されることを TUNEL 法を用いて示した<sup>12</sup>。彼らは、同時にアポトーシス誘導蛋白である bax が発現することも見出している。また、Nakamura らも、肺炎作成 3 日後に肺胞のみならず細気管枝の上皮細胞にもアポトーシスが誘導されることを見出している。

一方、Callicutt らは 2003 年に、マウスにコリン欠乏エチオニン添加食を給餌して作成する重症肺炎モデルにおいて、給餌開始 6 日後に肺胞上皮細胞のみならず毛細血管上皮細胞にもアポトーシスが誘導されることを TUNEL 法で示している<sup>13</sup>。さらに、血管内皮細胞に誘導される接着因子である VCAM1 に対する抗体投与により、上記のアポトーシス誘導が抑制されることから、VCAM1 誘導に引き続いて起こる好中球集積がこのモデルにおけるアポトーシス誘導に関与していると推論している。

### 2) 腎障害

腎障害は、急性肺炎の重要な予後因子となっており、発症早期の乏尿は血管内脱水の結果ではあるが、それに引き続いて起こる腎障害には急性肺炎により誘導される腎毒性物質の関与が想定されてきた。一方、敗血症における腎障害は、従来は腎虚血に伴う急性尿管壊死によるものとされてきたが、最近では尿管のアポトーシスの関与が示されてきている。

我々は 1995 年に、実験肺炎や肺炎臨床例における肺炎腹水が、イヌ尿管培養細胞である MDCK 細胞にアポトーシスを誘導することを見出し、報告している<sup>3</sup>。この報告が、急性肺炎の重症化機構へのアポトーシスの関与に言及した最初の報告である。さらに、ラットの尿管にデオキシコール酸を注入する壊死性肺炎モデルでは、肺炎作成 6 時間後に尿管にアポトーシスが TUNEL 法にて観察されることを報告した<sup>5</sup>。さらに、このモデルから採取した肺炎腹水を健常ラットの腹腔に投与すると同様のアポトーシスが観察されることや、正常ラットから調整した単離尿管索に肺炎腹水が用量依存性にアポトーシスを誘導することも見出している。

### 3) 肝障害

重症急性肺炎における肝障害は、肺障害や腎障害よりも頻度は低いものの、予後規定因子のひとつと考えられており、発症早期の血中 LDH の上昇が致死率の上昇と相関することが示されている。

肝細胞のアポトーシスは、様々な肝障害で報告さ

れており, Bohlinger らはマウスのエンドトキシンショックモデルで, 肝細胞に広範なアポトーシスが誘導されることを報告している<sup>14</sup>.

我々は, 腎のアポトーシスを見出したのと同様のモデルを用いて, 膵炎作成6時間後に肝細胞にアポトーシスが誘導されることを見出し報告している<sup>6</sup>. また, このモデルから採取した膵炎腹水を健常ラットの腹腔に投与すると肝細胞にアポトーシスが観察されることや, 正常ラットから調整した初代培養肝細胞に膵炎腹水が用量依存性にアポトーシスを誘導することも見出している. (図1)我々は, この肝細胞におけるアポトーシス誘導機構として, TGF- $\beta$  の関与を指摘している. すなわち, 上記の *in vivo*, *in vitro* 実験系に, それぞれ肝細胞にアポトーシスを誘導するとされる TNF- $\alpha$  と TGF- $\beta$  の中和抗体を投与または添加したところ, TNF- $\alpha$  の中和抗体は, 肝機能障害も肝細胞のアポトーシスに影響しなかったが, TGF- $\beta$  の中和抗体は, 肝機能障害を軽減し, 肝細胞のアポトーシス誘導を抑制した. (図2)

我々は, さらに TGF- $\beta$  の産生源であると想定される肝 Kupffer 細胞や腹腔マクロファージを, リポゾームに封入したジクロロメチレンジフォスホネー

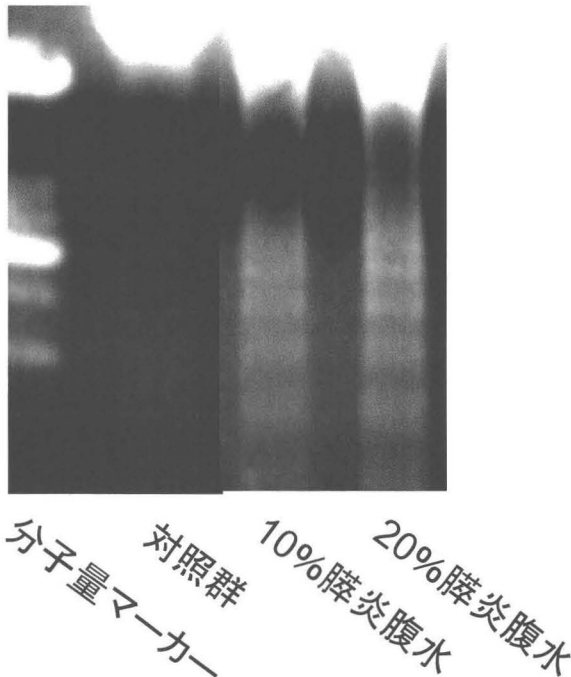


図1 ラット実験膵炎腹水によるラット初代培養肝細胞のアポトーシス誘導効果. 20%デオキシコール酸膵管内注入により作成したラット膵炎モデルの膵炎作成6時間後に採取した腹水を, ラット初代培養肝細胞に添加し, 5時間後にDNAを採取し, アガロースゲル電気泳動を行った.

トを腹腔内に投与して減少させたラットで膵炎を作成すると, 肝障害が著明に軽減し, 肝細胞のアポトーシスが減少することも報告している<sup>7</sup>. (図3)これらの結果から, 急性膵炎における急性期の肝障害機構の一部は肝細胞のアポトーシスによるものであり, その誘導機構に肝や腹腔のマクロファージが関与していることが明らかになった.

一方, Murr らは, 膵炎腹水でラット肝臓を還流すると肝細胞にアポトーシスが誘導されるという我々の結論を支持する結果を報告している<sup>15</sup>. ただし, この還流モデルでは, 肝の Kupffer 細胞は活性化されず, 腹水中に含まれる耐熱性因子によりアポトーシスが誘導されると推測している. 同じ研究グループから, 急性膵炎に伴う肝細胞アポトーシス誘導機構に関して, p38-mitogen activated protein kinase (MAPK) の活性化から caspase 3 の経路を介しているとの結果や, さらに膵由来の elastase による

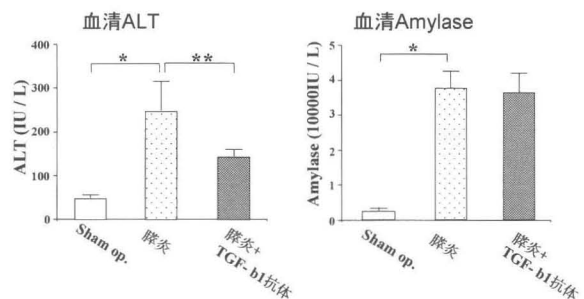


図2 ラット実験膵炎における肝障害と肝アポトーシスに対する抗 TGF- $\beta$  中和抗体の効果. 20%デオキシコール酸膵管内注入により作成したラット膵炎モデルに膵炎作成と同時に抗 TGF- $\beta$  中和抗体を静脈内投与し, 膵炎作成6時間後の末梢血の ALT と amylase を測定した. \*:  $p < 0.01$ , \*:  $p < 0.05$

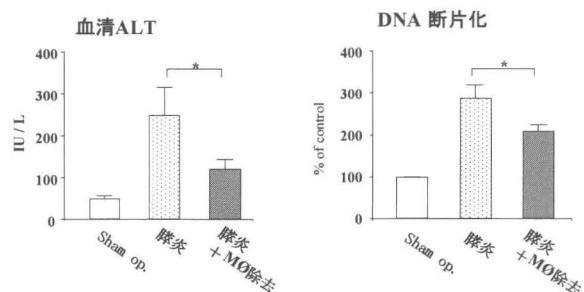


図3 ラット実験膵炎におけるマクロファージ除去の肝障害と肝アポトーシスへの効果. あらかじめ DMDP 封入 liposome を投与し, 腹腔マクロファージと Kupffer 細胞を除去したラットに, 20%デオキシコール酸膵管内注入により壊死性膵炎モデルを作成し, 膵炎作成6時間後の末梢血の ALT と肝細胞の DNA 断片化量を測定した. \*:  $p < 0.01$ , M $\Phi$ : マクロファージ

Kpffer 細胞の Fas ligand 活性化を介するという結果などが報告されているが、同じグループから相反する結果が報告されている<sup>16,17</sup>.

膵炎腹水中に含まれるアポトーシス誘導因子に関しては、我々も新たな解析結果を報告している。出血壊死性膵炎においては、ヘモグロビンが、ヘムの酸化物であるヘマチンに変換されることが知られてきたが、我々はこのヘマチンが臨床例の膵炎腹水や、実験膵炎腹水に大量に含まれること、さらにほぼ同用量のヘマチンが *in vivo* ならびに *in vitro* で肝細胞のアポトーシスを誘導することを見出している<sup>18</sup>。つまり、出血性膵炎においては肝細胞のアポトーシス誘導機構の一部をヘマチンが担っている可能性がある。

#### 後期感染性合併症におけるアポトーシスの関与

重症急性膵炎では、膵壊死や膵周辺の壊死組織に感染をきたし、発症2週以後に感染が顕在化して敗血症をきたして重篤化することが治療成績向上の隘路となっており、感染防御と敗血症への移行の阻止が治療における最重要課題となっている。起炎菌はほとんどの場合、腸内細菌であり、腸内細菌の腸管外移行、すなわち bacterial translocation (BT) が感染源である。

腸管内には100兆個以上に及ぶ細菌が存在するが、正常では腸内細菌は腸管内に留まり、腸管外へ逸脱しない。これは腸管がこれら腸内細菌に対する物理的・免疫学的なバリアを備えているため、BTとはこの腸管のバリア機能が何らかの原因で破綻することにより、腸管内に存在する細菌、真菌、あるいはエンドトキシンなどの細菌毒素が、腸管粘膜と粘膜固有層を通過して腸間膜リンパ節、脾、肝、腹腔内、血液などへ移行する現象をいう。近年、BTがICU患者の感染源不明の敗血症、あるいは敗血症性多臓器不全(MOF)の原因として注目され、1980年頃から盛んに解析されてきた。現在ではBTは熱傷、出血性ショック、腸閉塞、腹膜炎、放射線照射、完全静脈栄養、急性膵炎などで起こることが確認されている。その機序としては、①腸管壁の integrity の低下、②腸管および全身の免疫能低下、③腸管内での細菌の overgrowth、の3者が想定されている。

そのうちの、前2者に関して、アポトーシスの関与が想定されており、その結果を概説する。

##### 1) リンパ系組織におけるアポトーシス

リンパ系組織のアポトーシスに起因する細胞性免疫の低下現象はこれまで多くの研究者によって報告され、高度侵襲手術後や熱傷、敗血症などで病態を修飾していることが知られている。

重症急性膵炎でも、発症早期より末梢リンパ球、特にヘルパーTリンパ球が減少していること、その減少の程度と予後の相関が見られることがすでに報告されており<sup>1,2</sup>、重症急性膵炎における免疫担当臓器・細胞の障害による免疫不全の存在とその重要性を示唆している。

我々は、まず実験急性膵炎における胸腺の変化を解析した。5%デオキシコル酸を膵管内に注入したラット膵炎モデルでは、膵炎作成20時間後には胸腺重量と胸腺細胞数は、それぞれ単開腹群に比較して62%と66%となり、著明な低下を認めた。膵炎作成6時間後にはすでに TUNEL 陽性細胞が散見され、20時間後には胸腺が TUNEL 陽性細胞で充満していた。このモデルでは、末梢白血球数は単開腹群と膵炎群に有意差は見られなかったが、末梢リンパ球数は、膵炎作成2時間後から減少し、5時間後には単開腹群に比較して有意に減少していた<sup>19</sup>。

続いて、臨床例の解析も行った。重症急性膵炎症例を後期感染合併の有無により感染群、非感染群に分け、この両群における入院時の白血球数、リンパ球数を比較すると、白血球数には差を認めなかったが、感染群において有意なリンパ球数の減少を認めた<sup>20</sup>。さらに、感染群において、CD3 陽性でかつ CD8 陽性細胞の有意な減少が確認された。リンパ球減少機構として、末梢血リンパ球のアポトーシスを想定し、重症膵炎患者のリンパ球を分画採取し、ただちに細胞周期解析を行ったが、アポトーシス細胞比は10%以下で、健常人との差は見られなかった。しかし、リンパ球を採取後、24時間培養した後に解析すると、アポトーシス細胞比は健常人のリンパ球では上昇しなかったが、患者リンパ球では著明に上昇し

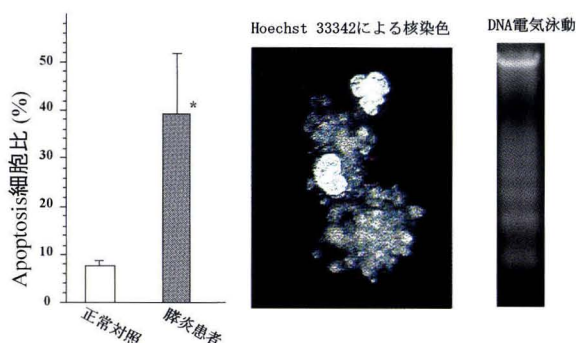


図4 重症急性膵炎患者入院時の末梢血リンパ球のアポトーシス。重症急性膵炎患者入院時の末梢血リンパ球を24時間培養し、Flow cytometry, Hoechst 33342による核染色、およびDNAアガロースゲル電気泳動を行った。Flow cytometryでは健常人から採取して24時間培養した末梢リンパ球の結果と、膵炎患者のリンパ球を比較した。\* :  $p < 0.01$

た。このときの核の断片化, DNA断片化も確認された。(図4)膵炎回復に伴い末梢リンパ球数も回復するが, それとともに24時間培養後にアポトーシス陥る細胞数の比率も減少し, 正常レベルに回復することも判明した。このような, 末梢血リンパ球のアポトーシスによる減少は上記のラット重症急性膵炎モデルでは確認されたが, 軽症浮腫性膵炎モデルであるラットセルレイン誘起膵炎モデルでは観察されなかった。

一方, 成人における代表的免疫組織である脾臓についても検討した。ラット壊死性膵炎モデルでは, 膵炎作成12, 24時間後の脾重量, 脾細胞数ともに単開腹群と比較して顕著に減少した。しかし, 胸腺とは異なり, 脾細胞にはアポトーシス像は観察されなかった<sup>21</sup>。また, あらかじめ脾摘を行うと末梢リンパ球の減少がさらに亢進することが観察され, 重症急性膵炎においては末梢組織でリンパ球がアポトーシスにより減少し, 脾臓はその再動員の供給源となっていると考えられた。

また, 腸管のリンパ組織についても検討しているが, パイエル板のリンパ球や腸間膜リンパ節でも, ラット実験膵炎作成後6時間から24時間後にかけて著明なアポトーシスを確認している(未発表データ)。

### 2) 好中球アポトーシス遅延

好中球による炎症反応がそのアポトーシスによる減少で終息することが広く知られており, この好中球のアポトーシスが, 様々な炎症性刺激により阻害され炎症反応が遷延・拡大することが知られている。O'Neilらは, 急性膵炎症例の末梢血から単離した好中球に自発的アポトーシスが, 健康人に比較して明らかに遅延していること示し, この遅延減少が重症では軽症よりもさらに顕著であることも報告している<sup>22</sup>。彼らは, 患者から採取した好中球では, Fas抗体の下流に位置するprocaspase 3のdownregulationが観察されることから, この現象がFas抗体に対する反応性の低下に起因すると結論している。

### 3) 腸管粘膜上皮細胞のアポトーシス

腸管粘膜上皮細胞のアポトーシスは, 虚血再還流, 放射線障害や閉塞性黄疸などの様々な病態で観察されており, 腸管壁のintegrityの低下からBTの要因となることが推測されている。

急性膵炎に関しては, Wangらが, 5%タウロコロール酸膵管内注入モデルを用いて, 膵炎作成6時間後に回腸粘膜上皮細胞にアポトーシスが誘導されることを, DNA断片化とTUNEL法にて示した<sup>23</sup>。彼らは, このアポトーシスが成長ホルモンの投与により回避できることを報告しており, アポトーシスの誘

導機構を成長ホルモンの欠乏であると推論している。

一方, 我々はBTの一因である腸管壁のintegrityの低下に腸管粘膜上皮細胞のアポトーシスが関与しているかどうかを解析し, 報告している<sup>24</sup>。腸管壁のintegrityを評価する方法として, ラットの一定の長さの腸管の両端を結紮して内腔に蛍光色素を封入し, それを一定時間緩衝液中で振盪培養して, 腸管外に漏出する蛍光色素の量を測定することにより, 腸管壁のintegrityを評価する系を確立した(図5)。3%デオキシコロール酸をラットの膵管内に注入して作成した壊死性膵炎モデルの回腸を膵炎作成6時間後に採取し, 上記の実験系で腸管のintegrityを測定すると, 単開腹群に比較して腸管外に漏出する色素の量が有意に多く, integrityが低下している結果であった。この腸管の粘膜上皮細胞のアポトーシスをTUNEL法ならびに断片化DNA量の定量で解析すると単開腹群に比較して, アポトーシスが顕著に亢進していた。さらに, アポトーシス誘導を遂行する酵素であるpolycaspasesの阻害剤である(Z-VAD-fmk)を, 膵炎作成と同時に投与したところ, 腸管粘膜上皮のアポトーシス細胞比と断片化DNA量の有意な減少が見られ, (図6)膵炎群で低下した回腸粘膜高が, caspase inhibitorの投与により回復していた<sup>25</sup>。さらに, 上記の方法で分子量74,200のFITC-dextranを用いて腸管の透過性を測定したところ, 膵炎群で亢進した腸管壁の透過性がcaspase inhibitorの投与により有意に抑制されていた。また, 膵炎作成18時間後の末梢血および門脈血中のエンドトキシン量を測定したところ, 膵炎群で著明に上昇していたが, caspase inhibitor投与群では有意に減少していた。(図7), さらに, この膵炎モデルでは膵炎作成24時間後の死亡率は14/32 (60.9%)に

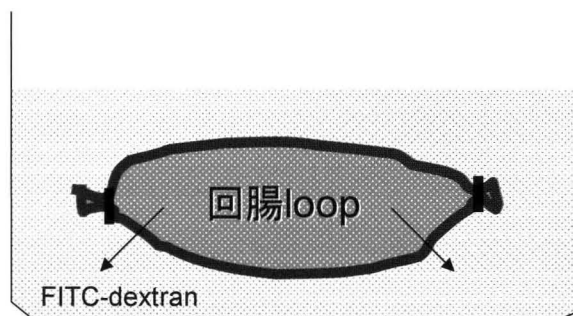


図5 ラットの腸管壁の透過性評価法。ラットの回腸を採取し, 内腔にFITCにて蛍光標識された各種濃度のdextranを注入し, 両端を結紮することにより封入する。これを37°Cの培養液中で保存し, 一定時間で腸管外に漏出する色素量を測定して腸管の透過性を評価した。

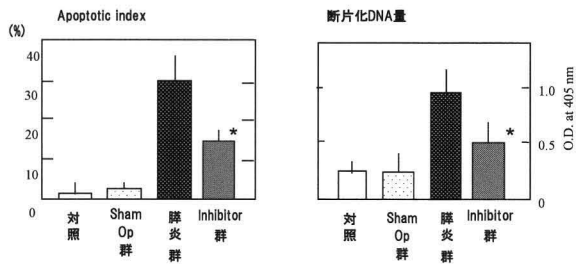


図6 ラット重症急性膵炎モデルの回腸粘膜上皮細胞のアポトーシスに対する caspase inhibitor の効果. 3%デオキシコロール酸をラット膵管に逆行性注入して作成した重症急性膵炎モデルに, polycaspase inhibitor である ZVZD-fmk (500  $\mu$ g/body) を膵炎作成直前に腹腔内投与した. 対照群は, 無処置ラット. Sham op 群は単開腹. 膵炎作成 6 時間後の回腸粘膜上皮におけるアポトーシス細胞比と, 断片化 DNA 量を測定した. \*:  $p < 0.05$  vs 膵炎群.

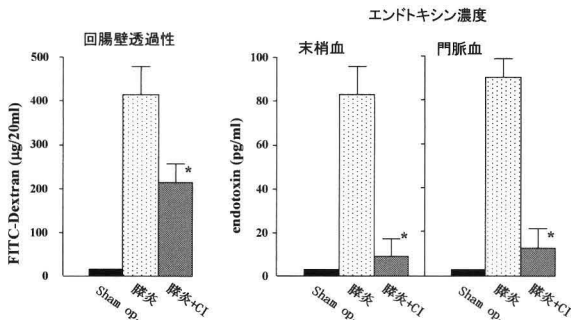


図7 ラット重症急性膵炎モデルの回腸壁の透過性とエンドトキシン・トランスローケーションに対する caspase inhibitor の効果. 3%デオキシコロール酸をラット膵管に逆行性注入して作成した重症急性膵炎モデルに, polycaspase inhibitor である ZVZD-fmk (500  $\mu$ g/body) を膵炎作成直前に腹腔内投与した. Sham op 群は単開腹. 膵炎作成 6 時間後の回腸壁の透過性を回腸ループ内に投与した分子量 71,200 の FITC-Dextran の透過量で測定した. さらに膵炎作成 18 時間後の末梢血と門脈血中のエンドトキシン濃度を測定した. \*:  $p < 0.01$  vs 膵炎群.

達するが, caspase inhibitor 投与により 8/28 (28.6%) まで低下した. ( $p < 0.05$ )

## 考 察

重症急性膵炎における遠隔臓器障害機構としては, 高サイトカイン血症による重要臓器への好中球の集積と, BT に起因する感染による集積された好中球の爆発的活性化の二段階の作用機構である, いわゆる Second attack theory が想定されている. 一方で, サイトカインカスケードにおいて好中球の上流に位置すると考えられるマクロファージの活性化

もしくは励起が軽症膵炎においても確認されており, 我々も軽症膵炎モデルであるラットのセルレイン誘起膵炎において腹腔<sup>26</sup> および肺<sup>27</sup> マクロファージが少なくとも励起状態 (priming) となっていることを報告している. 膵局所のみならず遠隔臓器や腹腔においてもマクロファージが活性化されており, 好中球を介さない臓器または細胞障害機構の存在も重要である.

実際, 急性膵炎腹水の臓器または細胞への直接障害作用が以前から報告されている. Satake らは急性膵炎腹水中に致死的な肺障害<sup>28</sup> や腎障害<sup>29</sup> を惹き起こす活性の存在を報告しており, Coticchia らは臨床例からの<sup>30</sup>, Bielecki らはイヌ急性膵炎モデルから採取した腹水が<sup>31</sup>, 肝細胞のミトコンドリア呼吸を障害することを報告している. このように, 重症急性膵炎においては液性因子による臓器・細胞障害が病態を修飾している.

本稿で示した様に, 重症急性膵炎臨床例と実験膵炎の遠隔臓器, 免疫組織や腸管粘膜上皮にアポトーシスによる細胞死が認められ, 重症急性膵炎における早期の遠隔臓器障害と, bacterial translocation から引き起こされる後期の感染性合併症にも重要な役割を果たしていることが明らかとなった.

アポトーシスの誘導機構に関しては, さまざま分子の関与が想定され, 本稿で示したように, TGF- $\beta$  などのサイトカインや各種成長因子が関与していることが想定される. 我々が, 示したようなアポトーシス実行分子である caspase などの阻害により, 臓器障害や感染成立を制御する試みがなされつつあり, 臨床応用が期待される.

リンパ組織や腸管粘膜での反応を含め, 急性膵炎に伴う全身変化が敗血症における全身変化の analogy でどこまで理解できるのか, どの点が膵炎特異的な現象でどこまで治療が可能なのかは, 今後解決すべき課題として残されている.

## 文 献

1. Antal L, Szabo G, Sonkoly S, Paloczi K, and Szegedi G (1978) Abnormalities in humoral and cellular immunoactivity in pancreatitis. II. Study of the cellular immune system. Acta Med Acad Sci Hung 35: 81-87
2. Christophi C, McDermot F, Hughes ES (1985) Prognostic significance of the absolute lymphocyte count in acute pancreatitis. Am J Surg 150: 295-296
3. Nishikawa J, Takeyama Y, Ueda T, Hori Y, Ueno N, Yamamoto M, Saitoh Y (1995) Induction of apoptotic cell death by pancreatitis-associated ascitic fluid in Madin-Darby canine kidney cells. FEBS Lett 373: 19-22
4. Takeyama Y, Nishikawa J, Ueda T, Hori Y,

- Yamamoto M, Kuroda Y (1999) Involvement of peritoneal macrophage in the induction of cytotoxicity due to apoptosis in ascitic fluid associated with severe acute pancreatitis. *J Surg Res* 82: 163-171
5. Takase K, Takeyama Y, Nishikawa J, Ueda T, Hori Y, Yamamoto M, Kuroda Y (1999) Apoptotic cell death of renal tubules in experimental severe acute pancreatitis. *Surgery* 125: 411-420
6. Takeyama Y, Hori Y, Takase K, Ueda T, Yamamoto M, Kuroda Y (2000) Apoptotic cell death of hepatocytes in rat experimental severe acute pancreatitis. *Surgery* 127: 55-64
7. Hori Y, Takeyama Y, Ueda T, Shinkai M, Takase K, Kuroda Y (2000) Macrophage-derived transforming growth factor- $\beta$ 1 induces hepatocellular injury via apoptosis in rat severe acute pancreatitis. *Surgery* 127: 641-649
8. Takeyama Y, Nishikawa J, Ueda T, Hori Y (1998) Thymic atrophy caused by thymocyte apoptosis in experimental severe acute pancreatitis. *J Surg Res* 78: 97-102
9. Takeyama Y, Takase K, Ueda T, Hori Y, Goshima M, Kuroda Y (2000) Peripheral lymphocyte reduction in severe acute pancreatitis is caused by apoptotic cell death. *J Gastrointestinal Surg* 4: 379-387
10. Takeyama Y (2005) Significance of apoptotic cell death in systemic complications with severe acute pancreatitis. *J Gastroenterol* 40: 1-10
11. Wang XD, Borjesson A, Sun ZW, Wallen R, Deng XM, Zhang HY, Hallberg, Anderson R (1998) The association of type II pneumocytes and endothelial permeability with the pulmonary macrophage system in experimental acute pancreatitis. *Eur J Clin Invest* 28: 778-785
12. Yuan YZ, Gong ZH, Lou KX, Tu SP, Zhai ZK, Xu JY (2000) Involvement of apoptosis of alveolar epithelial cells in acute pancreatitis-associated lung injury. *World J Gastroenterol* 6: 920-924
13. Callicutt CS, Sabek O, Fukatsu K, Lundberg AH, Gaber L, Wilcox H, Kotb M, Gaber AO (2003) Diminished lung injury with vascular adhesion molecule-1 blockade in choline-deficient ethionine diet-induced pancreatitis. *Surgery* 133: 186-196
14. Bohlinger I, Leist M, Gantner F, Angermuller S, Tiegs G, Wendel A (1996) DNA fragmentation in mouse organs during endotoxic shock. *Am J Pathol* 149: 1381-1393
15. Murr MM, Yang J, Fier A, Foulis PR, Loughorn TP Jr., Epling-Burnette PK, Norman JG (2002) Pancreatitis-associated ascitic fluid induces hepatocyte death independent of local cytokines. *J Surg Res* 106: 308-313
16. Yang J, Fier A, Carter Y, Liu G, Epling-Burnette PK, Bai F, Loughran TP, Mastorides S, Norman JG, Murr MM (2003) Liver injury during acute pancreatitis: the role of pancreatitis-associated ascitic fluid (PAAF), p38-MAPK, and caspase-3 in inducing hepatocyte apoptosis. *J Gastrointest Surg* 7: 200-208
17. Yang J, Gallagher SF, Haines K, Epling-Burnette PK, Bai F, Gower WR Jr., Mastorides S, Norman JG, Murr MM (2004) Kupffer cell-derived Fas ligand plays a role in liver injury and hepatocyte death. *J Gastrointest Surg* 8: 166-174
18. Ueda T, Takeyama Y, Takase K, Hori Y, Kuroda Y, Ho HS (2002) Hematin is one of the cytotoxic factors in pancreatitis-associated ascitic fluid that causes hepatocellular injury. *Surgery* 131: 66-74
19. Takeyama Y, Nishikawa J, Ueda T, Hori Y (1998) Thymic atrophy caused by thymocyte apoptosis in experimental severe acute pancreatitis. *J Surg Res* 78: 97-102
20. Takeyama Y, Takase K, Ueda T, Hori Y, Goshima M, Kuroda Y (2000) Peripheral lymphocyte reduction in severe acute pancreatitis is caused by apoptotic cell death. *J Gastrointest Surg* 4: 379-387
21. Yasuda T, Takeyama Y, Ueda T, Takase K, Nishikawa J, Kuroda Y (2002) Splenic atrophy in experimental severe acute pancreatitis. *Pancreas* 24: 365-372
22. O'Neill S, O'Neill AJ, Conroy E, Brady HR, Fitzpatrick JM, Watson RW (2000) Altered caspase expression results in delayed neutrophil apoptosis in acute pancreatitis. *J Leukoc Biol* 68: 15-20
23. Wang X, Wang B, Wu K, Xu M, Gong Z (2002) Growth hormone downregulated the excessive apoptosis of ileal intestinal epithelial cells in rats during the early course of acute necrotizing pancreatitis. *Pancreas* 25: 205-209
24. Yasuda T, Takeyama Y, Ueda T, Shinzaki M, Sawa H, Nakajima T, Kuroda Y (2006) Breakdown of intestinal mucosa via accelerated apoptosis increases intestinal permeability in experimental severe acute pancreatitis. *J Surg Res* 135: 18-26
25. Yasuda T, Takeyama Y, Ueda T, Shinzaki M, Kishi S, Sawa H, Nakajima T, Kuroda Y (2007) Protective effect of caspase inhibitor on intestinal integrity in experimental severe acute pancreatitis. *J Surg Res* 138: 300-307
26. 豊川晃弘, 竹山宜典, 原之村博, 斎藤洋一 (1993) 実験急性膵炎におけるマクロファージ活性化現象. *日消誌* 90: 2909-2916
27. 原之村博, 竹山宜典, 豊川晃弘, 斎藤洋一 (1994) 急性膵炎時の肺障害機構における肺マクロファージ活性化の意義について. *日外会誌* 95: 376-381
28. Satake K, Koh I, Nishiwaki H, Umeyama K (1985) Toxic products in hemorrhagic ascitic fluid generated during experimental acute hemorrhagic pancreatitis in dogs and a treatment which reduces their effect. *Digestion* 32: 99-105
29. Satake K, Kanazawa G, Hiura A, Nishiwaki H, Ha SS, Chung YS, Umeyama K, Yukimura T (1991) Renal function in experimentally induced acute pancreatitis in dogs: how it is affected by the nephrotoxic substance in pancreatic exudate from ascitic fluid. *Jpn J Surg* 21: 88

- 95
30. Coticchia JM, Lessler MA, Carey LC, Gower WR, Mayer AD, McMahon MJ (1986) Peritoneal fluid in human acute pancreatitis blocks hepatic mitochondrial respiration. *Surgery* 100 : 850-856
31. Bielecki JW, Dlugosz J, Pawlicka E, Gabryelewicz A (1989) The effect of pancreatitis associated ascitic fluid on some functions of rat liver mitochondria. A possible mechanism of the damage to the liver in acute pancreatitis. *Int J Pancreatol* 5 : 145-156