

平成21年 6月 11 日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19590783
 研究課題名（和文） 急性膵炎重症化機序における内因性および外因性副腎ステロイド制御の
 解明
 研究課題名（英文） The elucidation of the role of endogenous and exogenous corticosteroid
 in the aggravation mechanism of acute pancreatitis
 研究代表者
 片岡 慶正（KATAOKA KEISHO）
 京都府立医科大学・医学研究科・准教授
 研究者番号：70185792

研究成果の概要：

ラット急性膵炎モデルに副腎摘出を行うと短時間で全例死亡するが、メチルプレドニゾロン（m-PLS）パルス投与を行うと死亡例はなかった。膵および肺における炎症細胞浸潤の組織学的評価と同時に、組織中および血中の各種炎症性サイトカイン、とくにマクロファージ遊走化阻止因子 MIF の分子生物学評価から、急性膵炎発症早期の全身性重症化機序に副腎皮質機能の関与と MIF 制御の重要性が示唆された。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2008年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学、消化器内科学

キーワード：急性膵炎、重症化機序、重要臓器不全、サイトカイン、MIF、副腎ステロイド

1. 研究開始当初の背景

急性膵炎はひとたび重症化すると、膵壊死から広範な炎症波及という膵局所の重症化とともに発症早期から重要臓器機能不全（MOF）という全身性重症化に至り、治療法が進歩した現在においても未だに致死率が高い疾病である。MOF への進展機序については未だに明らかでない点も多いが、SIRS（全身性炎症反応症候群）としての重症急性膵炎の病態は“cytokine storm”であるといわれ

てきた。血液濾過浄化療法としての CHDF は cytokine storm の悪循環を遮断する治療法の一つとして臨床応用されている。しかし、この cytokine storm のトリガーおよび制御機構については明らかではなかった。

近年、急性炎症に際して、早期からサイトカインネットワークを起動させ他のサイトカインの発現を促すイニシエーター役割を担っているマクロファージ遊走化阻止因子（macrophage migration inhibitory factor:

MIF) が注目されてきた。この MIF の産生、分泌の調節因子として内因性ステロイドの関与が示唆されてきた。しかし、急性膵炎進展および重症化機序への MIF の関与は不明であり、急性膵炎における副腎皮質機能の変化、内因性および外因性ステロイドの影響については全く明らかでなかった。われわれは、急性膵炎では MOF の一環として副腎皮質機能不全が生じているという作業仮説のもとに、MIF を含めた cytokine storm の制御と重症化阻止対策の研究の方向性を目指した。

2. 研究の目的

臨床の場において、重症急性膵炎は未だに致死率が高い疾病である。そこで重症急性膵炎の救命率を高める目的で、急性膵炎では重要臓器機能不全 (MOF) の一環として副腎機能不全が生じているのか？内因性ステロイド低下状態では急性膵炎は重症化するのか？急性膵炎重症化に関与する各種炎症性サイトカインの中でより上位に位置する Macrophage migration inhibitory factor (MIF) の動態は副腎皮質機能に左右されるか？などの疑問点に関して明らかでなかった。このような観点から急性膵炎発症早期での重症化機序における副腎皮質機能の役割の解明と MIF 制御から進展阻止対策を念頭においた新たな治療的戦略の臨床的応用を目指した。

3. 研究の方法

(1) 実験モデルの作成：

急性膵炎モデルは以下の方法で実験的に作成した。8 週齢 Wistar 系雄性ラット(体重約 260g)を用いた。約 16 時間の絶飲食の後、エーテル麻酔下に開腹し十二指腸を胆膵管十二指腸開口部上下 2cm で結紮し closed duodenal loop (CDL) を作成し、これにより作成される CDL 膵炎を実験に用いた。この膵炎群を中心に以下の実験群 8 群を実験に供した。①単開腹群 (コントロール)、②CDL 膵炎群、③副腎摘出群、④副腎摘出+CDL 膵炎群、この 4 群にそれぞれに外因性ステロイドとしてメチルプレドニゾロン (mPLS) を単回パルス投与した群、すなわち、⑤単開腹+mPLS 群、⑥CDL+mPLS 群、⑦副腎摘出+mPLS 群、⑧副腎摘出+CDL+mPLS 群の計 8 群を作成した。m-PSL 単回投与に対する対照としては生食投与を行った。

(2) 検索および解析項目とその方法：

各群の生存率を求め、生存群では CDL 作成後

0, 1, 2, 4, 6 時間後に腹水、血清、膵と肺組織をサンプリングした。m-PSL はソルメドロール®を使用し、30mg/kg を生理的食塩水に溶解し CDL 作成 5 分前に尾静脈より投与した。血清では Blue starch 法によるアミラーゼ活性と ELISA 法による MIF 定量を行った。MIF を含む各種サイトカイン mRNA 発現は total mRNA を抽出し、RT-PCR 法にて解析した。すなわち、Chomczynski の方法に基づき TRIzol を用いて total mRNA を抽出し、逆転写酵素により逆転写し cDNA を作成する。この検体に RT-PCR を行い、産物をエチジウムブロマイドで視覚化し、測定値は G3PDH にて補正する。RT-PCR の対象遺伝子は MIF、TNF α 、IL-1 β 、IL-6、MCP-1、IL-8 とした。組織学的に HE 染色と MIF 免疫染色 (抗 MIF 抗体、抗 MCP-1 抗体、抗 ED-1 抗体等を用いた ABC 法) を行う。膵組織に関しては浮腫、炎症、壊死の程度を Grise の方法により評価した。肺組織での炎症細胞浸潤の程度は HE 染色標本で肺胞単位での炎症細胞を肺胞 50 個に対してカウントした。

なお、上記の動物実験は京都府立医科大学動物実験指針に基づいて行った。

4. 研究成果

(1) 各実験群における生存率と内因性ステロイド枯渇状態での致死的侵襲の強さ：

単開腹群では、操作後 6 時間以内での死亡例はなかった。副腎摘出群では n=12 において 8/12 が 1 時間以内に、全例が 2 時間以内に死亡した。CDL 膵炎+副腎摘出群では n=18 において全例が 1 時間以内に死亡した。CDL 膵炎群においては n=12 において 1/12 が 6 時間以内に死亡したが、m-PLS 投与群では死亡例はなかった。したがって、ラットでは急性膵炎にかかわらず副腎摘出すなわち内因性ステロイド枯渇状態は、致死的侵襲であった。このために内因性副腎機能低下状態での膵炎の進展過程の探索は困難と判断した。

(2) CDL 膵炎における外因性ステロイド・パルス投与の効果：

①膵および肺組織での MIF および各種サイトカイン mRNA 発現

CDL 作成後 6 時間の MIF mRNA と IL-6、IL-8、IL-1 β 、TNF- α mRNA 発現を膵および肺組織において経時的に検討した (図 1)。MIF mRNA は膵において 1 時間後から、肺において 2 時間後から有意な発現が認められた。膵では MIF に遅れて IL-8、IL-6 mRNA 発現が認められた。肺では 1 時間後に IL-6、IL-8 mRNA 発現が、6 時間後に IL-1 β mRNA 発現が認めら

れた。

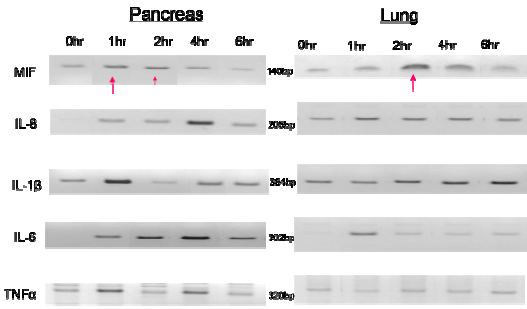


図1. CDL膵炎での膵および肺組織におけるMIFと各種サイトカインmRNA発現のRT-PCRの経時的変動

②膵湿重量、腹水量、血清アミラーゼ活性と血清MIFの変化

CDL膵炎6時間後増加した湿重量および腹水量はm-PSL単回投与群で有意に抑制された(図2A, B)。膵炎誘導後2時間後より急激な上昇を認めた血清アミラーゼ活性ならびに1時間後から有意な高値を持続した血清MIFはm-PSL単回投与群で有意に抑制された(図2C, D)。

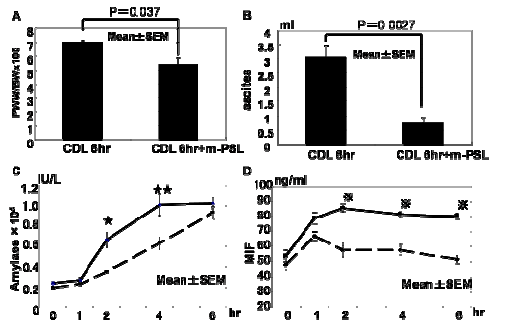
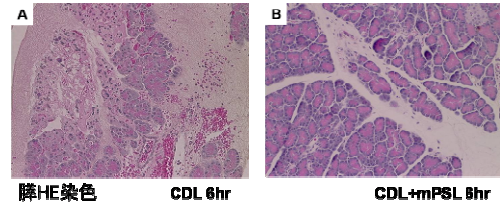


図2. ラットCDL膵炎における膵湿重量、腹水量、血清アミラーゼ値、血清MIF値

③膵における炎症性変化の組織学的評価とMIF免疫組織学的検索とm-PLSの効果

CDL膵炎におけるH.E.標本での膵組織学的評価の結果、m-PSL群では膵炎誘導後6時間後での比較では対照群に比較して有意に浮腫、炎症、壊死に関しては改善が認められた(図3)。



膵HE染色 CDL 6hr CDL+mPSL 6hr

	浮腫	炎症細胞浸潤	壊死
CDL 6hr	2.375 ± 0.17	2.125 ± 0.211	1.125 ± 0.21
CDL+ mPSL 6hr	1.0 ± 0.25	1.12 ± 0.11	0.375 ± 0.17
CDL vs CDL+mPSL	P<0.001	P<0.001	P<0.05

図3. ラットCDL膵炎6時間後の膵組織所見とm-PSL-pulseの影響

膵組織におけるMIF免疫染色での検討ではCDL膵炎6時間後では膵管上皮におけるMIF発現が増強していたが、このMIF発現はm-PSL投与後には減弱していた(図4上段)。膵炎誘導後1時間後から認められた膵組織内のMIF mRNA発現は6時間の経過を通してm-PSL-pulseにより抑制されていた(図4下段)。

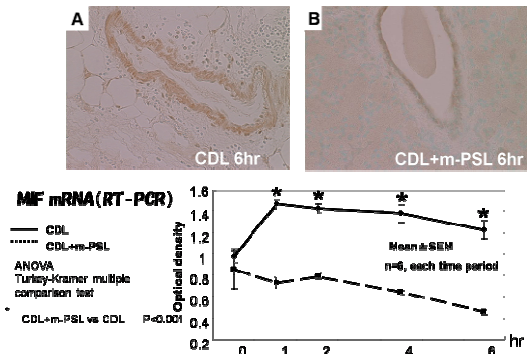


図4. 膵組織におけるMIFの発現とm-PSL-pulseの影響

④肺における肺胞内炎症細胞浸潤とMIF免疫組織学的検索とm-PLSの効果

肺組織のHE染色標本では膵炎誘導後経時的な肺胞内炎症細胞数の増加が認められた。m-PSLパルス投与においては6時間後で比較すると有意にその炎症細胞数が抑制されていた(図5)。

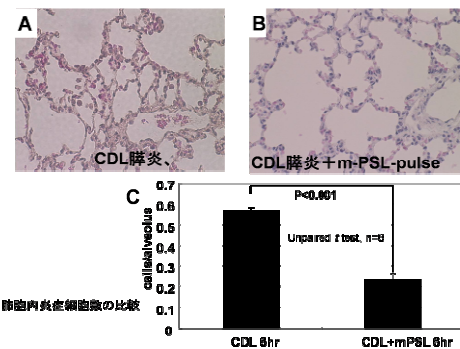


図5. ラットCDL膵炎における膵炎誘導後6時間後の肺組織HE染色像と肺胞内炎症細胞数の検討

肺組織における MIF 免疫染色の検討では、CDL 膵炎 6 時間後では気管支上皮における MIF 発現が増強していたが、この MIF 発現は m-PSL 投与群では明らかに減弱していた (図 6 上段)。一方、膵炎誘導 2 時間後をピークとする肺組織内の MIF mRNA 発現の増大は、m-PSL-pulse により CDL6 時間の経過を通して完全に抑制されていた (図 6 下段)。

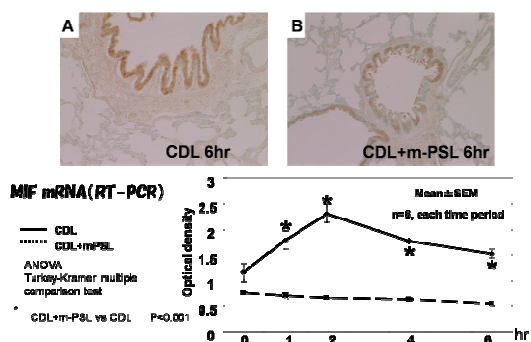


図6. 肺組織におけるMIFの発現とm-PSL pulseの影響

⑤内因性副腎ステロイド低下状態での MIF はじめサイトカイン動態の検索

当初研究計画で検索を予定していた副腎摘出時の MIF はじめ各種サイトカインの動態と急性膵炎の病態解析は、前述の如く、膵炎の有無にかかわらず、短時間で副腎摘出後ラットが全例死亡したことから、今回解析は困難であった。

(3) 総括：

重症化機序としての重要臓器機能不全 (MOF) 発現の一環として副腎機能不全が生じているのか？内因性ステロイド低下状態では重症化するのか？急性膵炎重症化に関与する各種炎症性サイトカインの中でより上位に位置する MIF の動態は副腎皮質機能で本当に左右されるか？などの検討を行い、副腎皮質機能と重症化機序の解明をラット急性膵炎モデルで行った。

今回、ラット急性膵炎モデルにおける副腎摘出術の侵襲は予想以上に大きく、短時間に全例死亡した。しかし、外因性ステロイドのパルス単回投与で生存率だけでなく、劇的な改善効果が膵に加えて肺において、組織学的変化とともに MIF をはじめとする分子生物学的検討からも実証された。急性膵炎発症早期の重症化制御に副腎皮質機能の関与の重要性が高いことが示唆され、治療的戦略としての意義が明らかになった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 8 件)

- ① 片岡慶正. 急性膵炎重症度判定基準 2008 改訂—検証と今後の展開. 日消誌、査読有り、105(8) : 2008, 1166-1173.
- ② 阪上順一、片岡慶正、他. 重症急性膵炎の治療と予後—各重症度判定基準における死亡予測. 消化器科、査読なし、46(5) : 2008, 556-560.
- ③ Taii A, Kataoka K, et al. Acute Pancreatitis from Mumps re-infection in Adulthood. JOP, 査読有り, 9(3) : 2008, 322-326.

[学会発表] (計 8 件)

- ① 片岡慶正. 急性膵炎診療の最前線. 教育講演, 日本消化器病学会近畿支部第 27 回教育講演会. 2008 年 9 月 21 日 ; 京都
- ② 阪上順一、片岡慶正、他. 急性膵炎診療に与える Visceral Fat Accumulation の影響について. 第 39 回日本膵臓学会大会. 2008 年 7 月 31 日 ; 横浜.
- ③ 片岡慶正. 膵炎診療における経腸栄養—option から standard へ—. 第 94 回日本消化器病学会総会. 2008 年 5 月 9 日 ; 福岡

[図書] (計 5 件)

- ① 片岡慶正、文光堂、「膵疾患へのアプローチ：膵疾患を理解するための基礎的事項」、井村裕夫ら編「わかりやすい内科学 第 3 版」、2007、pp682-685.
- ② 片岡慶正、中外医学社、1 章 急性膵炎、A. わが国の実態. 下瀬川徹編. 膵疾患へのアプローチ、2008、pp1-10.

[その他]

ホームページなど
難病情報センター ; 重症急性膵炎、難治性膵疾患に関する調査研究班

<http://www.nanbyou.or.jp/pdf/syoukaki5.pdf>

京都府立医科大学消化器内科学

<http://www2.kpu-m.ac.jp/~sun/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

片岡慶正 (KATAOKA KEISHO)

京都府立医科大学・医学研究科・准教授

研究者番号：70185792