

アルコール性膵炎における抗膵腺房細胞
抗体に関する臨牀的、実験的研究

研究課題番号 60570307

昭和61年度科学研究費補助金（一般研究C）研究成果報告書

昭和 62 年 3 月

研究代表者 建部 高明

（旭川医科大学医学部助教授）

I は し が き

近年、アルコール性肝障害として一括されている病態のなかに、その発生や進展に免疫異常の関与するとみられる病態のあることが指摘されている。すなわち、ウイルス性慢性活動性肝炎のような組織像を呈し、しかも self perpetuationの性格を有するアルコール性慢性肝炎の存在すること¹⁻³⁾、またアルコール性肝炎やアルコール性肝硬変の発生には個体差があり（大酒家の10~30%に発生）、この個体差に遺伝免疫学的な制御をうけた免疫機構の差が関与するとみられている⁴⁾。

アルコール性膵障害の代表的な病態であるアルコール性慢性膵炎においても、発生の個体差が大きく（大酒家の1%以下に発生⁵⁾）、また成因を問わず、慢性膵炎は self perpetuationの性格を有し、アルコール性の場合その傾向が大であることが指摘される⁶⁾。

アルコール性肝障害に対する斬新な免疫学的アプローチの1つとして、アルコールやその代謝産物であるアセトアルデヒドの作用によって肝細胞膜上に表出した neoantigen⁷⁾に対する抗体を介した ADCC (antibody dependent cell mediated cytotoxicity)による細胞障害性の検討が行われつつある⁸⁻¹⁰⁾。しかし、アルコール性慢性膵炎に関しては、このようなアプローチは行われていない。

この研究は、第1に xenogeneicな膵腺房細胞膜抗原でもって動物を感作する場合 ADCCを介した膵障害が発生するかどうか、第2にエタノールを投与された動物の allogeneicな膵腺房細胞膜抗原でもって感作した場合同様の膵障害が発生するかどうか、第3にアルコール性慢性膵炎患者の血清に ADCCを介して膵腺房細胞に cytotoxicに作用する抗体が存在するかどうかを明らかにする目的で行われた。

研究組織

研究代表者：建部 高明 (旭川医科大学助教授)

研究経費

| | | |
|--------|-------|----|
| 昭和60年度 | 1,200 | 千円 |
| 昭和61年度 | 600 | 千円 |
| 計 | 1,800 | 千円 |

研究発表

学会誌発表

建部 高明、明円 亮：アルコール性膵障害における抗膵腺房細胞抗体に関する実験的および臨床的な検討。膵臓 Vol 2、1987 (発表予定)

口頭発表

建部 高明、明円 亮：アルコール性膵障害における抗膵腺房細胞抗体に関する実験的および臨床的な検討。日本膵臓学会、1987年7月24日 (発表予定)

II 研究方法と研究成績

1、イヌ膵腺房細胞でラットを感作した場合の抗膵細胞膜抗体と膵組織障害の作製

A、対象と方法

1)、イヌおよびラット膵腺房細胞の単離

雑種成犬を麻酔下で開腹して膵を切除し、切除膵を phosphate-buffered saline, pH 7.4 (PBS) で洗浄した後に、Amsterdamら¹¹⁾の方法に準じて膵腺房細胞を単離した。すなわち、脂肪組織や線維組織を十分に除去した後に、collagenase (type IV) を 1.5 mg/ml、hyaluronidase を 9.0 mg/ml、trypsin inhibitor (Trasylol) を 0.1 mg/ml に含む 0.5 % fetal calf serum (FCS) を Eagle's minimum essential medium (MEM) に加えた溶液 (A 液) を、膵組織内に少量ずつ均等に注入し、130 oscillation/min の振盪下で 50 分間 37°C で incubate した。次に、EDTA を加えた Ca-Mg free Krebs-Ringer bicarbonate buffer とともに膵組織を 5 分間 37°C で 2 回 incubate し、再び A 液とともに振盪下で 50 分間 37°C で膵組織を incubate した。さらに、MEM で洗浄後、ピペットを用いて吸引、押し出しを反復し、細胞塊を小さくし、その後メッシュを通過させ、PBS でもって 1×10^6 /ml の細胞浮遊液を調製した。鏡見すると、この浮遊液の細胞の大部分は腺房細胞であったが、膵島細胞、膵管上皮細胞も若干含まれていた。細胞浮遊液の一部に 15 % dimethyl sulfoxide (DMSO) を 1:1 に加え、感作に使用する量に合わせて分注し、-70°C に凍結保存した。使用時には、解凍後 1×10^6 /ml に再調製した。

2)、イヌおよびラット膵組織からの細胞膜抗原の抽出

細胞膜抗原の抽出には、LeGrueら¹²⁾の方法を採用した。すなわち、麻酔下で開腹して得られたイヌあるいはラットの膵組織を材料として、まず脂肪組織や線維組織を十分に除去した後に、ハサミで細切した。細切組織を PBS 中で 4 回遠心して洗浄し、得られた沈渣を

4倍量の2.5% 1-butanol in PBSのなかで5分間室温で緩徐に攪拌した。これを4℃、500 x gで10分間遠心し、その上清をさらに4℃、2,000 x gで20分間遠心した。得られた上清を100倍量のPBSに対して24時間4℃で透析して 1-butanolを除去し、さらに材料を4℃、100,000 x gで1時間遠心した。その上清の蛋白濃度をLowry法で測定した。この細胞膜抽出液は、lymphocyte stimulation testおよび脾細胞膜抗体の特異性の検討に使用した。

なお、同様の手技によってラットの肝、腎、脾および胃組織についても細胞膜抽出液を作製した。

脾細胞膜抽出液 (1 mg/dlの蛋白濃度に調製) の酵素濃度は、Table 1に示すようであった。酵素の測定に際しては、amylaseをblue starch法¹³⁾で、lipaseをBALB-DTNB法¹⁴⁾で測定した。trypsin、chymotrypsinおよびelastaseの測定には、それぞれ benzoyl-arginine-p-nitroanilide¹⁵⁾、glutaryl-L-phenylalanine-p-nitroanilide¹⁶⁾およびN-succinyl-L-(L-alanine)₃-p-nitroanilide¹⁷⁾を基質とする方法を用いた。

3)、イヌ膵腺房細胞によるラットの感作

(1)、感作方法

8週齢の Wistar系雌性ラット68匹 (体重130~135 g) を、実験群(40匹)と対照群(28匹)に分けた。実験群のラットに対しては、イヌ膵腺房細胞浮遊液 (1 x 10⁶/ml in PBS) とcomplete Freund's adjuvantを1:1に混合したemulsionの0.4 mlを、麻酔下で背部に皮下注射した。以後、complete adjuvantの代わりにincomplete adjuvantを用いて、毎週1回39週にわたり、イヌ膵腺房細胞浮遊液でラットを感作した。対照群のラットに対しては、まずcomplete adjuvantの0.2 ml、以後週1回39週にわたりincomplete adjuvantの0.2 mlを、それぞれ麻酔下で背部に皮下注射した。

(2)、各種臓器の組織像の経時的な観察

実験群については、1、2、4、6、10、20、30および40回目の感作1週後にそれぞれ5匹を屠殺した。対照群については、同様の間

隔でそれぞれ3匹(但し、4および40回目の感作後にはそれぞれ5匹)を屠殺した。屠殺後に摘出した膵、肝、腎、脾をホルマリンで固定し、それらの組織切片にHematoxylin-Eosin染色を施し、光顕的に観察した。

(3)、体重、血清lipaseおよび耐糖能の経時的な観察

実験群と対照群からそれぞれ5匹を選択し、感作前、感作後10、20および40週目に、体重を測定した。両群のそれぞれ8匹を無差別に選択し、飽食時に採血し、血清lipase活性をBALB-DTNB法¹⁴⁾で測定した。また、感作前、感作後10、20および40週目に両群から無差別に選択した5匹について、耐糖能を検討した。1晩絶食後、体重kg当たり2gの20%ブドウ糖を経口投与し、投与前、投与後30、60および120分に採血し、血糖を酵素法で測定し、その和(Σ BS)を算出した。

(3)、lymphocyte stimulation test

感作10回目の1週後に、両群から5匹ずつ選択し、エーテル麻酔下で開腹し、脾を無菌的に摘出した。結合組織の除去された摘出脾をステンレスメッシュ上でハサミで細切し、RPMI 1640を滴下させながらスパーテルで圧迫した。メッシュを通過した脾組織を18Gの注射針で吸引し、25Gの注射針で押し出し、脾細胞浮遊液を作製した。

PBSで洗浄し、混入した赤血球を塩化アンモニウムで溶血させた後に、RPMI 1640をもって 1×10^6 /mlに調製した。95%以上の生存率をTrypan blue染色で確認した後に、脾細胞浮遊液の200 μ lを96well付きマイクロプレートのwellに分注した。脾細胞を含むwellにラット膵細胞膜抽出液の20 μ l(蛋白として8 μ g)を加え、37°CでCO₂ incubatorで培養した。培養3日目に1 μ Ci(20 μ l)の³H-thymidineを各wellに加え、24時間後にharvestしてcountし、stimulation indexを算出した。

(5)、抗膵細胞膜抗体の特異性の検討

40回目の感作の終了した1週後に、実験群のラットから得られた

血清について、イヌ膵およびラットの膵、肝、腎、脾、胃のそれぞれの 1-butanol抽出液に対する反応性を、Ouchterlony法を用いて検討した。また、同血清の200 μ lにラット膵腺房細胞浮遊液の200 μ l(1×10^6 /ml)を加え、60分間4 $^{\circ}$ Cで反応させ、その遠心上清(吸収血清)とイヌおよびラットの膵細胞膜抽出液との反応性を、同様に Ouchterlony法を用いて検討した。なお、対照群のラット血清についてもイヌおよびラットの膵細胞膜抽出液との反応性を検討した。

(6)、自己抗体の有無の検討

40回目の感作終了後、実験群のラットの膵組織切片について、脱パラフィン処置後、一次抗体として抗ラットIg Gウサギ抗体(RBC、02-0010-11)を用いたAvidin-Biotin-Peroxidase complex (ABC)法によって、自己膵に沈着する抗体の有無を検討した。

(7)、抗膵細胞抗体に反応する抗原の局在の検討

脱パラフィン処置後の正常ラットの膵組織切片を、抗膵細胞膜抗体と4 $^{\circ}$ Cで1晩反応させ、PBSで洗浄し、さらに抗ラットIg Gウサギ抗体と4 $^{\circ}$ Cで1晩反応させ、その後ABC法で免疫組織染色を施し、染色性の局在を光顕的に観察した。

4)、抗膵細胞膜抗体の膵障害性の検討

40回目の感作終了後、Ouchterlony法で抗膵細胞膜抗体の産生が確認されたラットの血清を、正常ラットの5匹(体重180 g)に、6日間にわたり体重kg当たり3 ml静注した。実験前、実験後 1、2、4および6日目に採血し、分離した血清のamylaseおよびlipase活性をそれぞれblue starch法¹³⁾およびBALB-DTNB法¹⁴⁾で測定した。2、5および8日目にそれぞれ1匹を屠殺して膵組織を光顕的に観察した

B、成績

1)、イヌ膵腺房細胞浮遊液で感作されたラットの生体反応

(1)、各種臓器の組織像

イヌ膵腺房細胞浮遊液とFreund's adjuvantの皮下注射を受けた実験群では6回目の感作以降に、またFreund's adjuvantのみの皮下

注射を受けた対照群では10回目の感作以降に、それぞれ膵周辺のリンパ節の腫大、膵辺縁からの著明なリンパ球浸潤による膵実質の破壊(Fig. 1)、幼若な線維組織の増生、さらには線維組織の脂肪置換といった所見が出現した。これらの所見の出現頻度は次第に増加し40回目の感作後には、実験群の7匹中6匹、対照群の5匹中3匹に観察された。その他の異常所見としては、腺房細胞の退行性変化と考えられる腺管構造の出現(tubular complex)、あるいは腺房の萎縮、脱落が観察されたが、いずれも低頻度であり、限局した区域にのみしかも両群に共通して観察された。なお、両群ともに、脾において発達したリンパ濾胞が観察されたが、肝と腎の組織変化は出現しなかった。

(2)、体重、血清lipaseおよび耐糖能

両群のラットの体重は、経過中にはほぼ同様に増加したが、40週目に実験群の体重は対照群に比べて有意に大であった(Fig. 2)。

実験群の血清lipase活性は、対照群に比べて、ほぼ全経過を通じてより高い傾向にあった(感作後3週目と21週目では有意の差)。しかし、両群ともに感作前に対する感作後の変動は乏しく、膵の急性炎症を示唆するような顕著な血清 lipaseの上昇はみられなかった(Fig. 3)。

ブドウ糖負荷時の Σ BSからみた耐糖能の変動は、Fig. 4に示すようであった。40回目の感作後、実験群の Σ BSは、対照群に比べて有意の高値を示したものの、感作前に比べて有意な変動を示さなかった。

(3)、lymphocyte stimulation test

10回目の感作後に施行したlymphocyte stimulation testの成績はTable 2に示すようであった。実験群のラットの脾から分離、培養されたリンパ球の ^3H -thymidineの取り込みは、ラット膵細胞膜抽出液の添加によって著明に増加した。これに対して、対照群の脾リンパ球の ^3H -thymidineの取り込みは膵細胞膜抽出液を添加しても全く増加しなかった。

(4)、抗膵細胞膜抗体の特異性

40回目の感作後に実験群の全ラット (5匹) から得られた血清は、イヌおよびラット膵細胞膜抽出液と反応して沈降線を形成し、特に前者との沈降線は濃厚であった (Fig. 5)。このような沈降線の形成は、あらかじめ血清をラット膵腺房細胞で吸収することによって消失した。ただし、対照群のラット血清とイヌおよびラットの膵細胞膜抽出液との間や実験群のラットの肝、腎および胃抽出液との間には、いずれも沈降線は形成されなかった。これらの成績から、実験群のラットに産生された抗膵細胞膜抗体は、種特異的ではなく、臓器特異的であると判断された。

(5)、自己膵と血清との反応

抗ラット膵細胞膜抗体の産生されたラットの膵組織切片における自己抗体の沈着は、免疫組織化学的に確認されなかった。

(6)、抗膵細胞膜抗体に反応する抗原の局在

実験群に得られた抗膵細胞膜抗体を用いたABC法によって、正常ラットの膵組織を染色すると、膵腺房細胞の腺房腔に面した細胞膜 (apical membrane) と膵島細胞の細胞質が染色された (Fig 6)。

2)、抗膵細胞膜抗体の膵障害性

抗ラット膵細胞膜抗体を含むラット血清の反復静注された正常ラットにおいて、血清 amylase および lipase はいずれも一過性に上昇したが、上昇の程度は静注前の2倍以下と軽度であった (Fig. 7)。また、静注開始後2、5および8日目の膵光顕像には、限局した区域の tubular complex の形成、腺房の脱落が観察された以外には異常所見は観察されなかった。

2、エタノール負荷ラット膵腺房細胞膜抗原でラットを感作した場合の抗膵細胞膜抗体と膵組織障害の作製

A、対象と方法

1)、ラット膵細胞膜抗原の抽出

Wistar系雌性ラットの腹腔内に1 g/kgの20 %エタノールを7日間投与し、8日目にエーテル麻酔下で屠殺し、膵を摘出した。エタノール非投与のラットの膵も同様に摘出した。摘出膵からの膵細胞膜抗原の抽出には、LeGrueら¹²⁾の方法を採用した。前述のような抽出操作の後に 250 mg/dlに蛋白濃度を調製し、1回の感作に使用する量に合わせて分注し、-20℃に凍結保存した。

2)、ラット膵細胞膜抗原によるラットの感作

8週齢のWistar系雌性ラット160匹を長期間のエタノール経口投与の有無によって2群に分けた。エタノール群(80匹)に対しては、5、10、20 %と2週間隔で段階的に濃度を上昇させたエタノールを水の代わりに自由に摂取させ、標準飼料で飼育した。非エタノール群(80匹)に対しては、エタノールの代わりに水を与え、同様に標準飼料で飼育した。全動物はspecific pathogen freeの環境で飼育された。上述の2群は、感作方法の相違によって、それぞれ以下の4亜群に分けられた。

①エタノール投与ラット膵細胞膜抗原群(20匹)：初回にはエタノール腹腔内投与ラットの膵細胞膜抽出液の0.2 mlと Freund's complete adjuvantの0.2 mlを混合した emulsionを、2回以降には incomplete adjuvantとのemulsionをそれぞれエーテル麻酔下で背部に皮下注射した。②正常ラット膵細胞膜抗原群(20匹)：初回には正常ラットの膵細胞膜抽出液の0.2 mlと Freund's complete adjuvantの0.2 mlとの emulsionを、2回以降には incomplete adjuvantとの emulsionを同様に皮下注射した。③adjuvant群(20匹)：初回には complete adjuvantの0.2 mlのみを、2回以降には incomplete adjuvantの0.2mlのみを皮下注射した。④生食水群(20匹)：終始生食水のみを皮下注射した。各亜群における皮下注射は週1回とした。

3)、体重、血清lipaseおよび耐糖能の経時的な観察

エタノール群および非エタノール群において生存中のラットについて、感作前、感作後10、20、30および40週目に体重を測定した。

エタノール群および非エタノール群について、感作前、5、10、

20および40回目の感作1週後にそれぞれ20匹（各亜群から5匹ずつ）を選択し、飽食時に採血し、分離した血清の lipase活性を BALB-DTNB法¹⁴⁾で測定した。

両群から同様に20匹ずつ選択し、感作前、10および40回目の感作1週後に、前述のような方法でブドウ糖を経口負荷し、 Σ BSを算出した。

4)、各種臓器の組織像の経時的な観察

10、20および40回目の感作1週後に、エタノール群と非エタノール群のそれぞれ4亜群から5匹ずつを選択し、エーテル麻酔下で屠殺し、膵、肝、腎および脾を摘出した。摘出臓器をホルマリンで固定し、その組織切片にHematoxylin-Eosin染色を施し、光顕的に観察した。

膵組織切片については、脱パラフィン後、抗ラットIg Gウサギ血清(Lot、1011/1273)を一次抗体として、ABC法を用いて沈着抗体(自己抗体)の有無を観察した。

5)、抗膵細胞膜抗体の特異性の検討

20回目の感作1週後に屠殺した全ラットから得られた血清について、エタノール投与ラット膵細胞膜抽出液、エタノール非投与ラット膵細胞膜抽出液、エタノール非投与ラットの肝、腎、脾および胃細胞膜抽出液のそれぞれに対する抗体産生の有無を、Ouchterlony法における沈降線の有無をもって判定した。

また、エタノール投与ラットおよび非投与ラットの膵細胞膜抗原に対する抗体の異同を検討するために、以下のように吸収試験を施行した。エタノール投与ラット膵細胞膜抽出液に対して反応する血清の50 μ lにエタノール非投与ラット膵細胞膜抽出液の150 μ lを加え、1時間37 $^{\circ}$ Cでincubateし、さらに18時間4 $^{\circ}$ Cでincubateした。その後、10分間30,000 x gで遠心し、その上清を吸収血清とし、エタノール投与ラットおよび非エタノール投与ラットの膵細胞膜抽出液に対する沈降線の形成の有無を検討した。なお、同血清50 μ lと生食水150 μ lの混合液を吸収血清の対照とした。

6)、抗脾細胞膜抗体の脾障害性の検討

エタノール群のなかのエタノール投与ラット脾細胞膜抗原群のラット5匹から40回目の感作後に得られた血清(いずれも抗体産生が確認)を、およそ40週間エタノールを経口投与されたラット5匹および投与されなかったラット5匹にそれぞれ3 ml/kg静注した。静注前、静注後 1、2、4および6日目に採血し、分離した血清のamylaseおよびlipase活性を、それぞれblue starch法¹³⁾およびBALB-DTNB法¹⁴⁾で測定した。

B、成績

1)、ラット脾細胞膜抗原で感作されたラットの生体反応

(1)、体重、血清lipaseおよび耐糖能

エタノール群および非エタノール群のそれぞれ4亜群の体重は、実験開始10週まで比較的急速に増加し、その後40週まで緩徐に増加した。また、エタノール群の体重の増加傾向は、非エタノール群に比べて、実験開始後10週から有意に少なく、両群の体重間の差は30週まで有意であった(Fig. 8)。

エタノール経口投与の有無を問わず、エタノール投与ラット脾細胞膜抗原群、非エタノール投与ラット脾細胞膜抗原群、adjuvant群、生食水群に分けてみると、いずれの群においても20および40回目の感作後に血清lipaseはやや上昇する傾向がみられたが、各群間の差は有意でなかった。このような血清lipaseの経時的な変動は、エタノール群と非エタノール群に大別してみても同様であった。ただし、10および20週におけるエタノール群の血清lipaseは、非エタノール群に比べて有意な低値を示した(Fig. 9)。

エタノール経口投与の有無を問わず、エタノール投与ラット脾細胞膜抗原群、エタノール非投与ラット脾細胞膜抗原群、adjuvant群、生食水群に分けてみると、いずれも40回目の感作後に Σ BSはやや増加する傾向がみられたが、各群間の差は有意でなかった。さらに、エタノール群と非エタノール群に大別してみても同様であった。た

だし、40週におけるエタノール群の Σ BSは、非エタノール群に比べて有意な低値を示した(Fig. 10)。

(2)、各種臓器の組織像

エタノール群および非エタノール群の膵組織に観察された著明なリンパ球浸潤による実質の破壊、tubular complexおよび腺房の萎縮、脱落の観察された頻度を各亜群別に総括すると、Table 5のようであった。すなわち、リンパ球浸潤による膵実質の破壊は、生食水群には観察されなかったが、その他の亜群ではエタノール経口投与の有無によらず観察された。また、限局した区域のTubular complexの形成、腺房の萎縮、脱落といった所見も、エタノール経口投与の有無によらず各亜群で散見された。なお、生食水群を除く各亜群において、脾のリンパ濾胞の発達が観察されたが、肝および腎における異常所見は各亜群を通じて光顕的に観察されなかった。

免疫組織学的に膵における自己抗体の沈着の有無を検討したが、全動物において沈着は確認されなかった。

(3)、抗膵細胞膜抗体の特異性

エタノール投与ラット膵細胞膜抗原群および正常ラット膵細胞膜抗原群の全動物から20回の感作後に得られた血清は、エタノールの経口投与の有無を問わず、Ouchterlony法においてエタノール投与および非投与ラット膵細胞膜抽出液に対してfuseする沈降線を形成した(Fig. 11)が、肝、腎、脾および胃細胞膜抽出液に対しては反応しなかった。次に、エタノール投与ラット膵細胞膜抽出液に対して沈降線を形成する血清をあらかじめ非エタノール投与ラット膵細胞膜抽出液で吸収すると、沈降線の形成は観察されなかった。

2)、抗膵細胞膜抗体の膵障害性

エタノール群のエタノール投与ラット膵細胞膜抗原群から得られた抗膵細胞膜血清を、長期間エタノールの経口投与されたラットおよび投与されなかったラットに静注した場合の血清amylaseおよびlipaseの経時的な変動は、Fig. 12に示すようであった。すなわち、エタノールの経口投与の有無を問わず、血清膵酵素の変動は乏しく、

急性膵炎にみられるような血清膵酵素の著増は観察されなかった。また、経過中の膵組織像にも特別の変化は観察されなかった。

3、慢性膵炎患者血清のエタノール負荷ウサギ膵腺房細胞に対する cytotoxicity の検討

A、対象と方法

1)、Target cell の調製

体重約 2 kg の家兎の腹腔内に 1 g/kg の 10 % エタノールを 1 日 1 回 7 日間にわたって注射し、8 日目にエーテル麻酔下で脱血死させ、速やかに膵を摘出した。摘出膵からの腺房細胞浮遊液は、以下のよ
うに Amsterdam ら¹¹⁾の方法に準じて作製された。

まず、Trasyolol を 7 % に加えた Dulbecco の PBS のなかで、脂肪組織や結合組織を除去した。次に、0.09% collagenase (type I)、0.5% hyaluronidase および 7 % Trasyolol を含む Eagle's MEM (溶液 A) を 27 ゲージの注射針で膵組織内に少量ずつ均等に注入して膨化させ、130 oscillation/min の振盪下で 15 分間 37°C で incubate した。さらに、5 % EDTA、Ca-Mg free PBS で 5 分間 37°C で同様に incubate し、MEM で洗淨後、A 液とともに 45 分間 37°C で incubate した。MEM で洗淨後、ピペットで吸引、押し出しを反復し、細胞塊を小さくし、5 % に FCS を加えた高濃度 phosphate buffer saline 中で凝集塊を沈殿させ、さらに上清中の赤血球を Tris NH₄Cl で溶血させ、残った膵腺房細胞を 7 % Trasyolol 加 MEM 中に 1.2×10^7 /ml に浮遊させ、Trypan blue 染色で 90% 以上の生存率を確認した。

ADCC assay に際しては、上述の膵腺房細胞浮遊液の 200 μ l に 200 μ Ci の ⁵¹Cr sodium chromate を加え、pipetting で緩徐に混合し、5 % CO₂ 下で 30 分間 37°C で incubate した。その後、7% Trasyolol MEM をもって 2 回遠心洗淨し (800 rpm、5 分間)、7 % Trasyolol MEM 中に再浮遊させ、 4×10^5 /ml に調製して target cell とした。

2)、被検血清の調製

慢性膵炎患者15例（男性：15例、年齢：50.9±10.8歳、アルコール過飲を成因とするもの：13例）および膵管造影像の正常な非膵疾患患者15例（男性：3例、女性：12例、年齢：51.4±18.0歳、大酒家は含まれず）から採血し、分離した血清は-20℃に保存した。

Assayに際しては、血清を30分間56℃でincubateして補体を不活性化した。この血清に、無処置の家兎から前述の方法で作製した膵腺房細胞浮遊液（ $1 \times 10^6/\text{ml}$ ）の等量を混合し、30分間4℃でincubateした。遠心分離後の上清に再び同量の膵腺房細胞浮遊液を加え、30分間室温で放置し、さらに遠心分離の上清を7% Trasyolol MEMで希釈し、最終的に血清を10倍に希釈調製した。

3)、Effector cellの調製

Target cellとしてニワトリ赤血球を、抗体として抗ニワトリ赤血球ウサギ抗体を用いた ADCC assay systemにおいて K cell functionが正常であった1名の健常人(30歳の男性)から採血し、Ficoll-Conray比重遠心法によって単核細胞を分離し、FCSを含むMEMをもって $4 \times 10^6/\text{ml}$ に調製してeffector cellとした。

4)、ADCC assay system

Target cellの $50 \mu\text{l}$ 、effector cellの $100 \mu\text{l}$ および被検血清の $50 \mu\text{l}$ を96 well付きmicroplateのwell中で混合した(total volume: $200 \mu\text{l}$, effector/target ratio: 20/1)。3分間800 rpmで遠心後、5% CO_2 下で6時間37℃で反応させ、再度3分間800 rpmで遠心した。遠心上清の $100 \mu\text{l}$ を採取し、その放射活性をgamma counterで測定した。被検血清のpercent cytotoxicityは、以下のように算定した。すなわち、 $[(\text{effector cell、被検血清との反応によって target cellから遊離した } ^{51}\text{Cr}) - (\text{target cellのみで遊離した } ^{51}\text{Cr})] / [(1\% \text{ Triton Xによって target cellから遊離した } ^{51}\text{Cr}) - (\text{target cellのみで遊離した } ^{51}\text{Cr})]$ を求め、これを100倍して%で表現した。

B、成績

^{51}Cr で標識したtarget cellに1% Triton Xを加えた場合のtarget

cellからの ^{51}Cr 遊離は 2,643 cpmであり、また target cellからの ^{51}Cr の自然遊離は 762 cpmであった。Table 5には、個々の患者血清のpercent cytotoxicityの成績を示した。すなわち、慢性膵炎群の平均値($2.22 \pm 2.99 \%$)は、非膵疾患群の平均値($3.77 \pm 4.11 \%$)に比べて、むしろやや高値を示したが、両群の平均値間には有意の差はなかった。

III 考 察

進行性の膵線維化を特異的な病態とする慢性膵炎においては、経過中に反復するclinicalまたはsubclinicalな膵の炎症が膵線維化の推進因子として重要視される。しかし、単なる急性膵炎の反復が進行性の膵線維化をもたらすことは否定的である。そこで、慢性膵炎では、(1)膵の急性炎症をもたらす機序に、あるいは(2)膵における急性炎症の修復過程に、特異的な要因の存在することが推測される。このような要因として免疫異常を示唆する知見は、以下のように要約される。

まず、液性免疫に関しては、1959年にThalら¹⁸⁾は剖検膵の抽出液と反応して沈降線を形成する抗体が慢性膵炎や膵癌患者の血清中に高率に検出されることを報告した。以来、膵疾患患者の血中に抗膵抗体が存在するという報告¹⁹⁻²⁵⁾がみられるが、その存在を否定する報告²⁶⁾もみられる。また、慢性膵炎では血中のIg AとIg G²⁷⁾あるいはIg AとIg M²⁸⁾が増加しているという報告、さらには抗核抗体^{29, 30)}やimmune complex^{28, 29)}が検出されるという報告も散見される。

次に、細胞性免疫に関しては、慢性膵炎では末梢血中のT cellが減少すること^{28, 30)}、膵組織抗原に対してリンパ球の幼若化現象がみられること^{31, 32)}、膵組織抗原によって白血球の遊走が阻止されること^{29, 33)}が報告されている。しかし、以上のような免疫異常が慢性膵炎のpathogenesisに関連する現象であるか、あるいは単に慢

性膵炎に付随した二次的な現象であるかは、不明である。

われわれは、慢性膵炎、なかでもアルコール性慢性膵炎において膵の急性炎症をもたらす機序に細胞性免疫の関与する可能性を検討する目的で、今回の実験を施行した。第1に、イヌ膵腺房細胞をもってラットを感作することによって、(1)被感作ラットの脾リンパ球はラット膵細胞膜抗原に対して幼若化反応を示すこと(細胞性免疫の成立)、(2)被感作ラットの血中にイヌおよびラットの膵細胞膜抗原と反応する抗体が出現すること(臓器特異的な抗体の産生)を明らかにした。この抗体は、免疫組織化学的に同種膵の腺房細胞の細胞膜の一部や膵島細胞の細胞質と反応したが、自己膵組織とは反応せず、したがってautoantibodyではなく、isoantibodyであると推定された。この点に関しては、これまでに慢性膵炎患者や実験的膵炎動物に検出されている抗膵抗体と一致する。

しかし、被感作ラットに出現したリンパ球浸潤による膵実質の破壊、これを充填するような幼若な線維化、さらには線維組織の脂肪組織への置換といった慢性的炎症所見は、adjuvantのみの皮下注射を受けたラットの膵にも観察されることから、膵細胞膜抽出液の感作で形成されたとは考え難い。すなわち、これらの膵組織変化は、Steinerら³⁴⁾やGeduldigら³⁵⁾が指摘するように、adjuvant自体の臓器障害である可能性が濃厚である。また、経過中の血中膵酵素からみて膵の急性炎症の出現は否定的であり、耐糖能からみても慢性膵炎にみられるような膵機能障害は出現しなかった。

第2に、アルコール性肝障害において推測されているように、エタノール負荷によって細胞膜上に表出されるneoantigenに対する抗体の産生を期待して、エタノールの負荷されたラット膵および正常ラット膵から抽出した2種類の細胞膜抗原でラットを感作し、産生された抗体の異同を検討した。その結果、被感作ラットには、isoantibodyが産生されたが、この抗体は両細胞膜抗原に同様に反応し、したがってneoantigenの表出はなかったと推察された。また、被感作ラットにおける抗体の産生には、長期間のエタノール経口投与の

影響はみられなかった。この実験においても、被感作ラット膵に出現した組織変化はadjuvantの障害作用に起因すると考えられた。

第1および第2の実験で作製されたisoantibodyを静注することによって同種動物に膵障害の作製を試みたが、一過性の軽度の血中膵酵素の上昇が観察されたものの、膵組織変化は観察されなかった。同様の実験モデルにおいて、Fonkalsrudら²¹⁾や Alarcon-Segoviaら²⁶⁾は、イヌ膵homogenateでウサギを感作して作製した抗体をイヌに静注したところ、血中膵酵素の一過性の上昇がみられたが、膵組織変化は出現しなかったと報告している。しかし、Pokornyら²⁷⁾は抗モルモット膵ウサギ血清をモルモットの腹腔内へ投与して間質性膵炎を観察し、またRichter²⁸⁾は抗ラット膵ウサギ血清をラットの腹腔内へ投与して膵腺房細胞の萎縮と変性、線維組織の増生を観察している。このような成績の不一致は、抗原の由来する動物種や感作された動物種あるいは抗体の投与部位の相違によると推測される。

Neubergerら⁹⁾は、1週間エタノールを腹腔内へ注入したウサギから単離した肝細胞をtarget cellとし、正常人のリンパ球をeffector cellとして、これに被検血清を加えたcytotoxicity assayを施行し、アルコール性肝障害患者のおよそ半数にエタノール処置ウサギ肝細胞に対してcytotoxicityを有する抗体の存在することを報告している。第3の実験において、われわれは、同様の抗体がアルコール性慢性膵炎に存在するかどうかを明らかにする目的で、主としてアルコール過飲を成因とする慢性膵炎患者15例について、エタノール処置ウサギ膵腺房細胞をtarget cellとしてcytotoxicity assayを施行した。その結果、非膵疾患患者以上にcytotoxicityの高い抗体を有する慢性膵炎患者はみられなかった。その理由の1つとして、ヒトとウサギの膵腺房細胞膜に共通抗原が存在しない可能性が考えられる。したがって、この課題については、ヒト膵に共通した抗原の存在が確認された動物膵から調製したtarget cellを使用して再検討する必要がある。

IV 結 論

1、イヌ膵腺房細胞浮遊液 (xenogeneic antigen) でラットを長期間感作したところ、以下の成績が得られた。

1)、被感作ラットにおいて、イヌおよびラットの膵細胞膜抗原に対して細胞性免疫が成立し、しかも両抗原と反応する臓器特異的な抗体が産生された。被感作ラットの膵にはリンパ球浸潤による実質の破壊が観察されたが、この所見は感作に使用した adjuvant の障害作用に起因すると考えられた。

2)、ラット膵における免疫組織化学的な染色態度から、得られた抗体は autoantibody ではなく、isoantibody であると判断された。

3)、抗体を正常ラットに反復静注した場合、血中膵酵素の軽度の上昇が観察されたが、膵組織障害は観察されなかった。

2、エタノールの負荷されたラットの膵および正常ラットの膵から抽出された2種類の細胞膜抗原 (allogeneic antigen) でラットを長期間感作したところ、以下の成績が得られた。

1)、被感作ラットに isoantibody が作製されたが、この抗体は2種類の抗原に同様に反応した。しかも、被感作ラットにおける抗体の産生には、長期間のエタノール経口投与の影響はみられなかった。

2)、Allogeneic antigen で感作された場合の膵組織変化、また得られた抗体を正常ラットに静注した場合の反応も、xenogeneic antigen で感作された場合と、全く同様であった。

3、エタノールの腹腔内投与を受けた家兎から単離された膵腺房細胞を target cell とし、正常人リンパ球を effector cell として、これに被検血清を加える cytotoxicity assay を施行した。その結果、アルコール性慢性膵炎患者の血清は、非膵疾患患者の血清と同様な percent cytotoxicity を示した。ただし、この assay system においては、target cell の選択などに検討の余地があると考えられた。

文 献

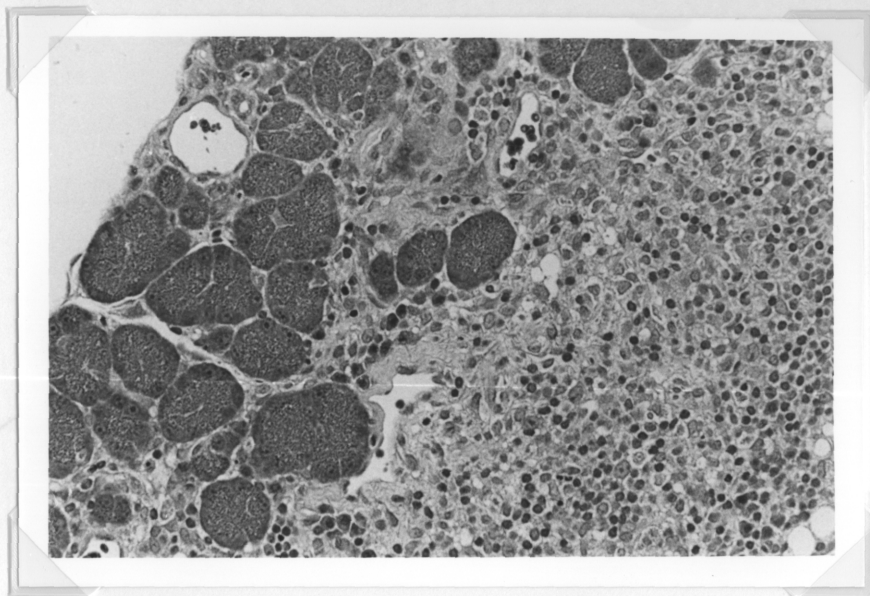
- 1)、Goldberg SJ, et al: "Nonalcoholic" chronic hepatitis in the alcoholics. *Gastroenterology* 72: 598, 1977
- 2)、Crapper RM, et al: Chronic active hepatitis in alcoholic patients. *Liver* 3: 327, 1983
- 3)、Nei J, et al: Chronic hepatitis induced by alcohol. *Digest Dis Sci* 28: 207, 1983
- 4)、Saunders JB, et al: Accelerated development of alcoholic cirrhosis in patients with HLA-B8. *Lancet* 1: 1381, 1982
- 5)、Ashley MJ, et al: Morbidity in alcoholics. Evidence for accelerated development of physical disease in women. *Arch Int Med* 137: 883, 1977
- 6)、山形敏一: 慢性肝炎の成因と臨床. *日内会誌* 65: 1009, 1976
- 7)、Gainet KC, et al: Reaction of acetaldehyde with human erythrocyte membrane proteins. *FEBS Letters* 75: 115, 1977
- 8)、Anthony RS, et al: Liver membrane antibodies in alcoholic liver disease. II. Antibodies to ethanol-altered hepatocytes. *J Clin Pathol* 36: 1302, 1983
- 9)、Neuberger J, et al: Antibodies to alcohol altered liver cell determinants in patients with alcoholic liver disease. *Gut* 25: 300, 1984
- 10)、Izumi N, et al: Lymphocyte cytotoxicity for autologous human hepatocytes in alcoholic liver disease. *Clin exp Immunol* 53: 219, 1983
- 11)、Amsterdam A, et al: Structural and functional characterization of isolated pancreatic exocrine cells. *Proc Nat Acad Sci USA* 69: 3028, 1972

- 12)、LeGrue SJ, et al: Immunological properties of l-buthanol-extracted cell surface antigens. *Cancer Res* 41: 3956, 1981
- 13)、Ceska M, et al: A new and rapid method for the clinical determination of α -amylase activities in human serum and urine. Optimal conditions. *Clin Chem Acta* 26: 437, 1969
- 14)、Kurooka S, et al: A novel and simple colorimetric assay for human serum lipase. *J Biochem* 81: 361, 1977
- 15)、Hayakawa T, et al: A simple and specific determination of trypsin in human duodenal juice. *Gastroenterol Jpn* 15: 135, 1980
- 16)、水野理文、他：十二指腸液中chymotrypsin活性の測定とその臨床的意義。日消誌 79: 858, 1982
- 17)、Bieth J, et al: The synthesis and analytical use of a highly sensitive and convenient substrate of elastase. *Biochem Med* 11: 350, 1974
- 18)、Thal AP, et al: Isoantibody formation in chronic pancreatic disease. *Lancet* 1: 1128, 1959
- 19)、Thal AP: The occurrence of pancreatic antibodies and the nature of the pancreatic antigen. *Surg Forum* 11: 367, 1960
- 20)、Murray MJ, et al: The clinical significance of circulating pancreatic antibodies. *Ann Int Med* 53: 548, 1960
- 21)、Fonkalsrud EW, et al: The occurrence of pancreatic antibodies and the experimental production of pancreatitis with pancreatic antiserum. *Surgery* 50: 134, 1961
- 22)、Herskovic T, et al: Immune mechanisms in chronic pancreatic disease. II. Serum precipitins to pancreatic homogenates in patients with pancreatic disease: Pre-

- liminary clinical observations. *Am J Digest Dis* 11: 40, 1966
- 23)、Nerenberg ST, et al: Radioimmunoassay for detection of latent chronic alcoholic pancreatitis, an unrecognized clinical syndrome. *Clin Chem* 26: 214, 1980
- 24)、Weiland DE, et al: Immunologic screening test for carcinoma of the pancreas. *Am J Surg* 116: 700, 1968
- 25)、Lendrum R, et al: serum antibodies in human pancreatic disease. *Gut* 16: 365, 1975
- 26)、Villavicencio E, et al: Isoantibodies to human pancreas A preliminary report. *Diabetes* 14: 226, 1965
- 27)、Bank S, et al: Serum immunoglobulins in calcific pancreatitis. *Gut* 14: 723, 1973
- 28)、Dani R, et al: Immunological participation in chronic calcifying pancreatitis. *Digestion* 11: 333, 1974
- 29)、Antal L, et al: Immunological investigations in acute and chronic human pancreatitis. *Digestion* 20: 100, 1980
- 30)、田中啓三、他：慢性膵炎患者の細胞性免疫能。消化器と免疫 7: 219、1981
- 31)、Scütt C, et al: Specific lymphocyte sensitization in chronic pancreatitis. *Digestion* 13: 308, 1975
- 32)、石井 徹、他：慢性膵炎患者リンパ球の膵抗原に対する反応性。消化器と免疫 6: 118、1981
- 33)、山本泰朗、他：慢性膵炎における膵特異抗原に対する細胞性免疫の検討(速報)。日消誌 77: 114、1980
- 34)、Steiner JW, et al: The local and systemic effects of Freund's adjuvant and it's fractions. *Arch Pathol* 70: 424, 1960
- 35)、Geduldig MM, et al: Pancreatic lesions in inbred mice produced by Freund's adjuvant. *Gastroenterology* 46: 175,

1964

- 36). Alarcón-Segovia D, et al: Immune mechanisms in chronic pancreatic disease. I . Occurrence of precipitins to pancreatic homogenates following certain forms of pancreatic damage: An experimental study. Am J Digest Dis 9: 845, 1964
- 37). Pokorny PF, et al: Serum amylase changes due to anti-pancreas serum. Proc Soc Exper Biol Med 102: 763, 1959
- 38). Richter K: Serum-induced chronic pancreatitis. Virchows Arch Pathol Anat 391: 177, 1981



* p < 0.05

Figure 1 Destruction of acini with marked lymphocyte infiltration is seen in the pancreas of rats immunized with acinar cell suspension and Freund's adjuvant.

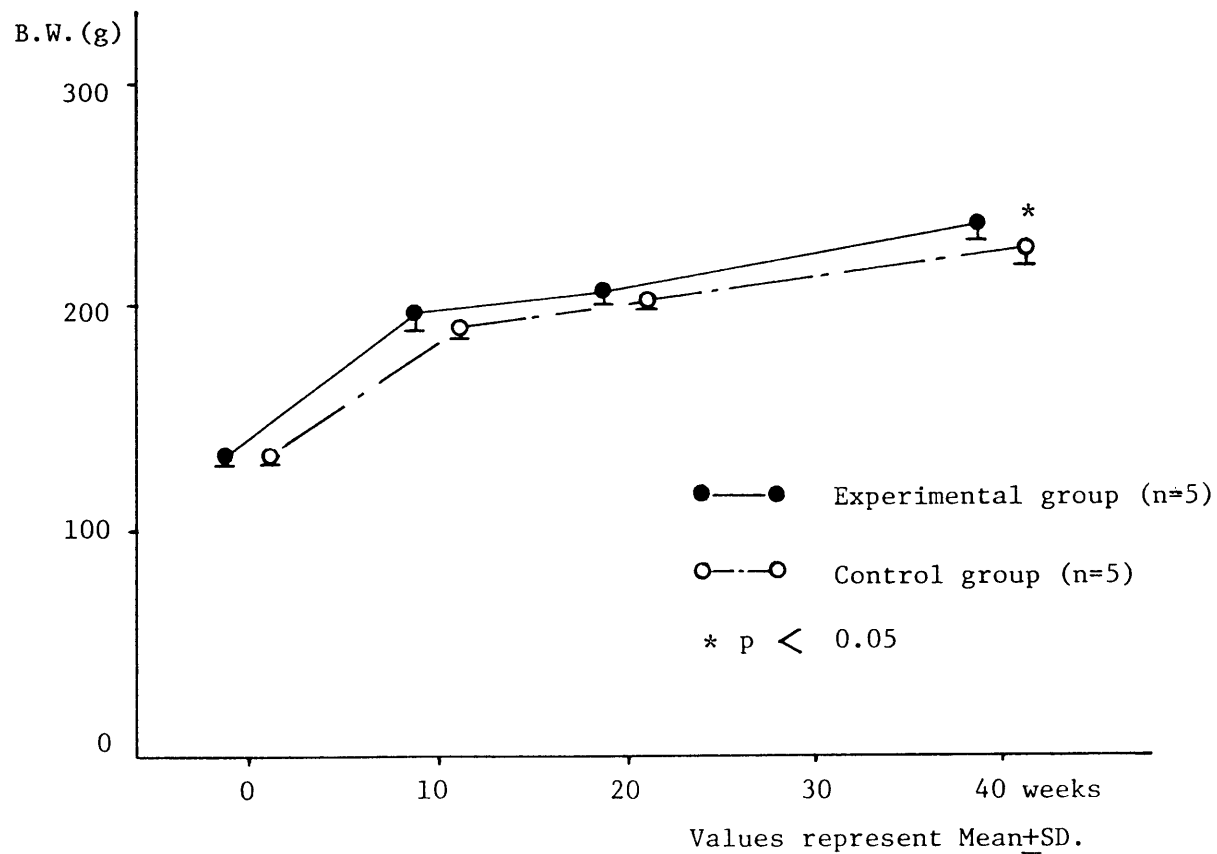


Figure 2 Time course of body weight.

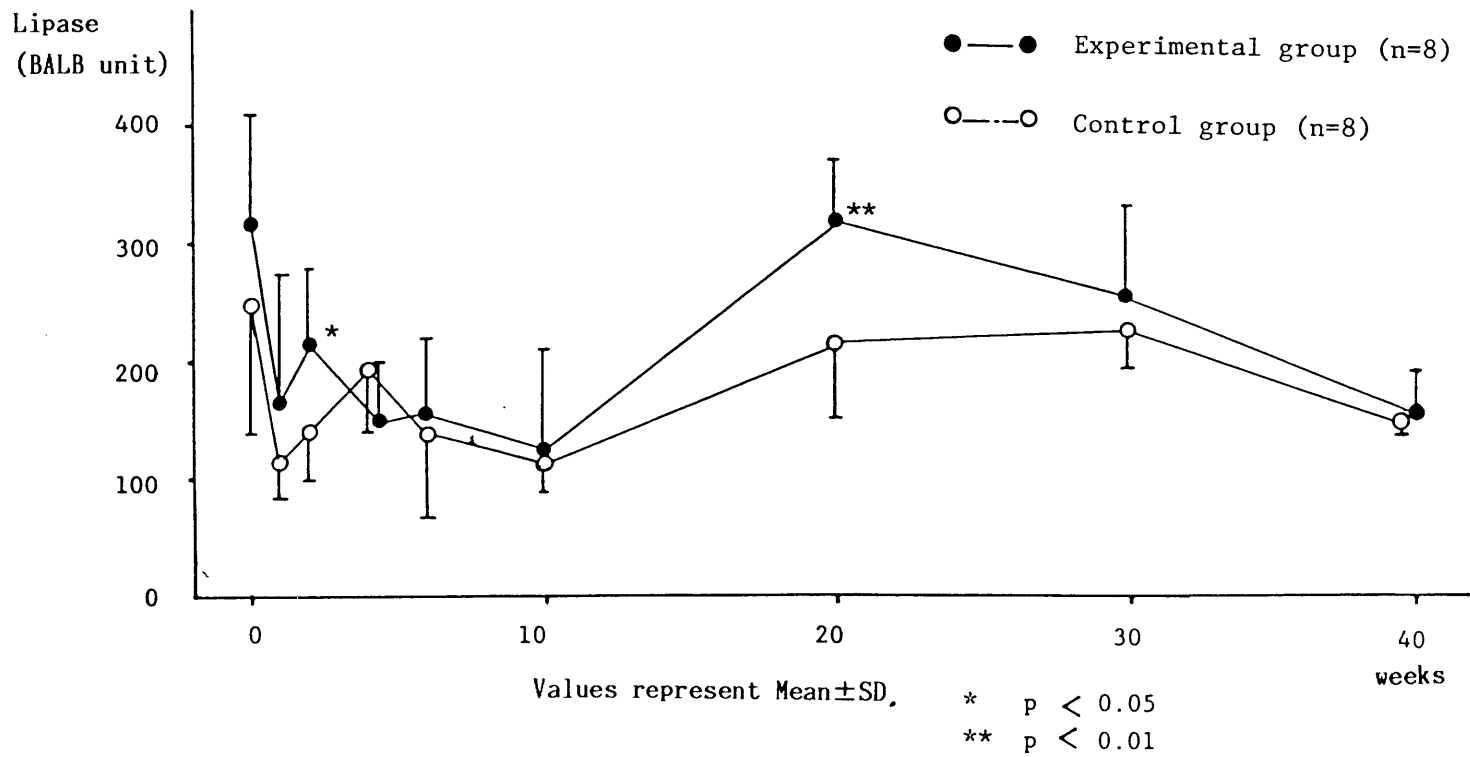


Figure 3 Time course of serum lipase

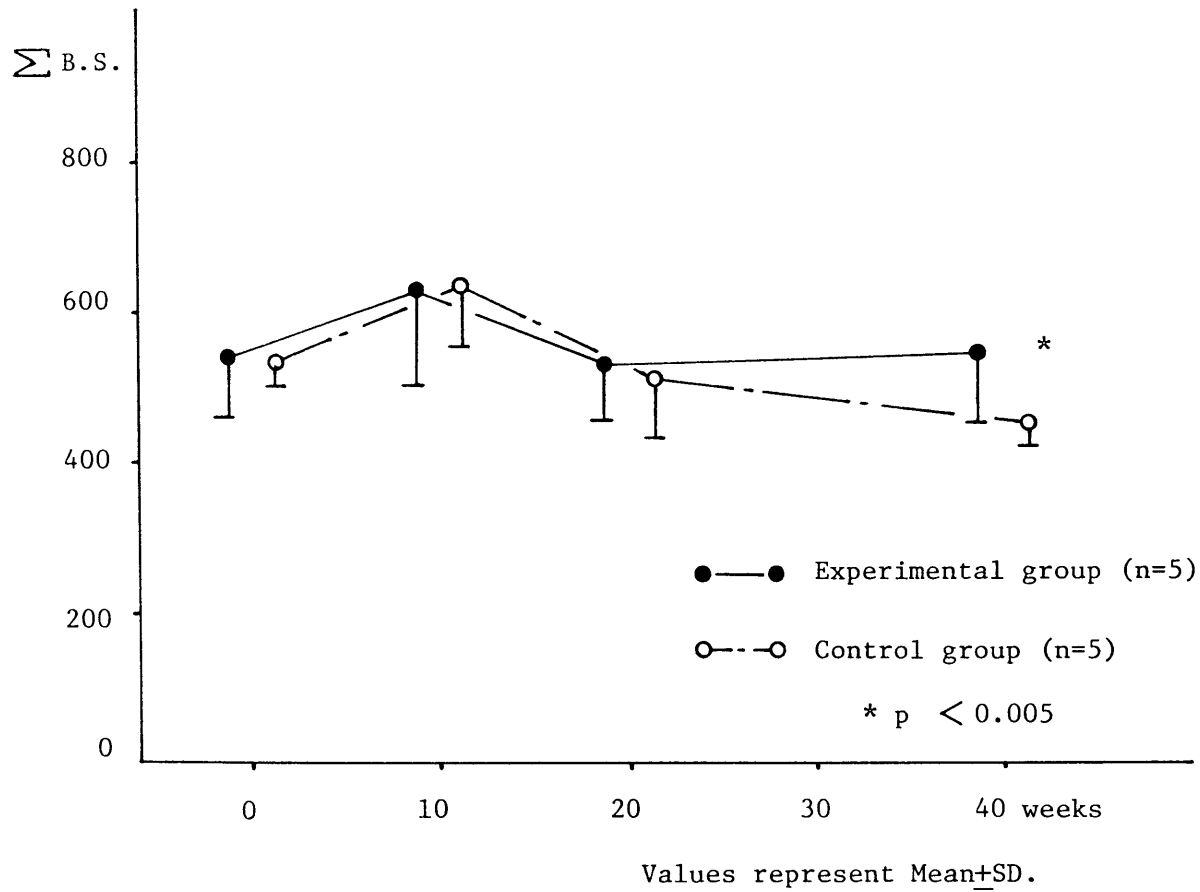


Figure 4 Time course of glucose tolerance.

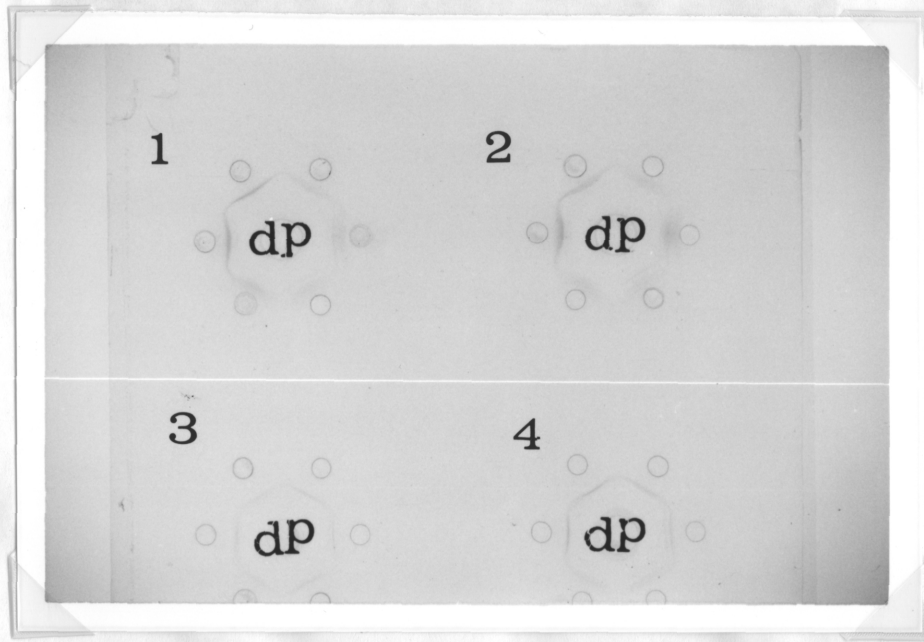


Figure 5 Photograph of gel-diffusion reactions which demonstrates lines of precipitation between l-buthanol extract from dog pancreas (dp) and serum from 6 rats.

1: not diluted serum, 2: x2, 3: x4, 4: x8 diluted serum

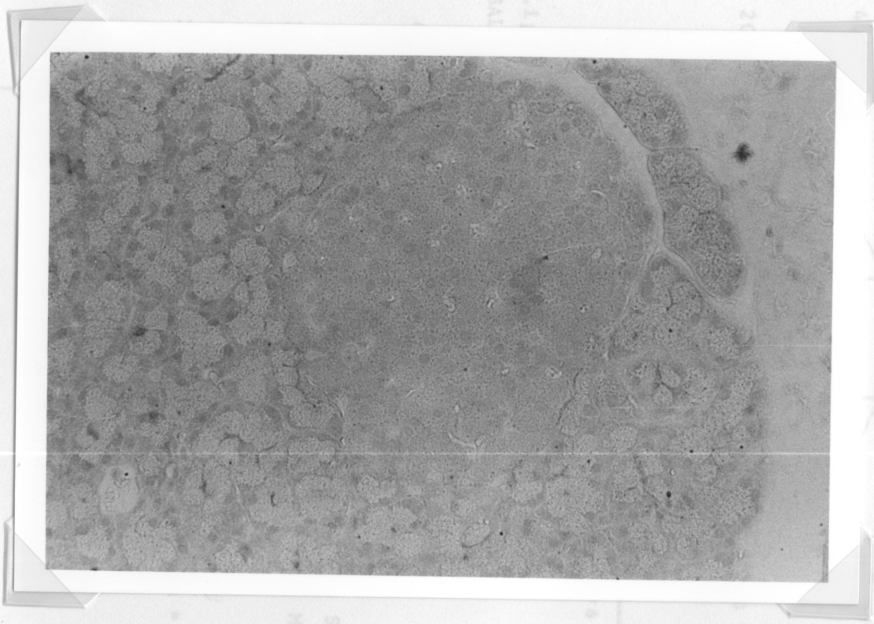
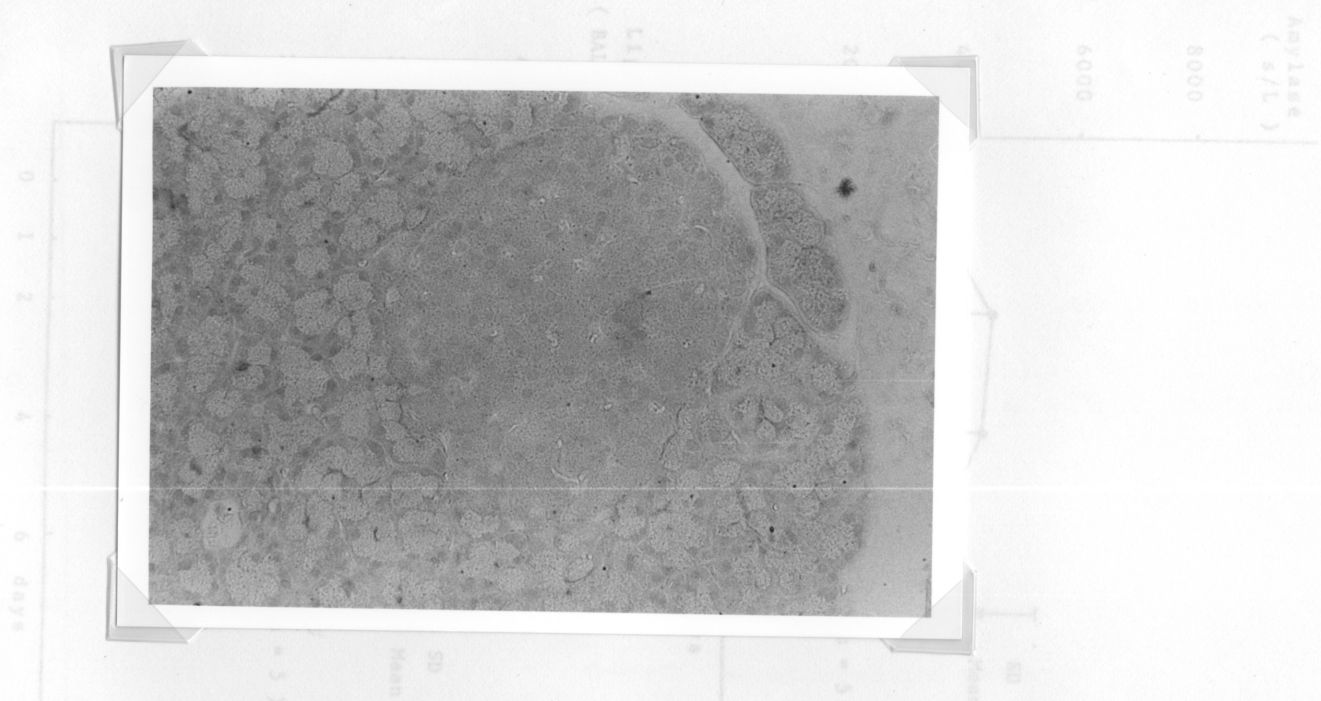


Figure 6 A normal rat pancreas treated with serum from experimental group rats and antirat IgG rabbit antibody; followed by immunohistochemical staining using ABC method. Apical membrane of acinar cells and cytoplasm of islet cells were stained.

Figure 7 Graph shows slight elevation of serum amylase and lipase values after repeated intravenous injection of rat antiserum to rat pancreas into normal rats.



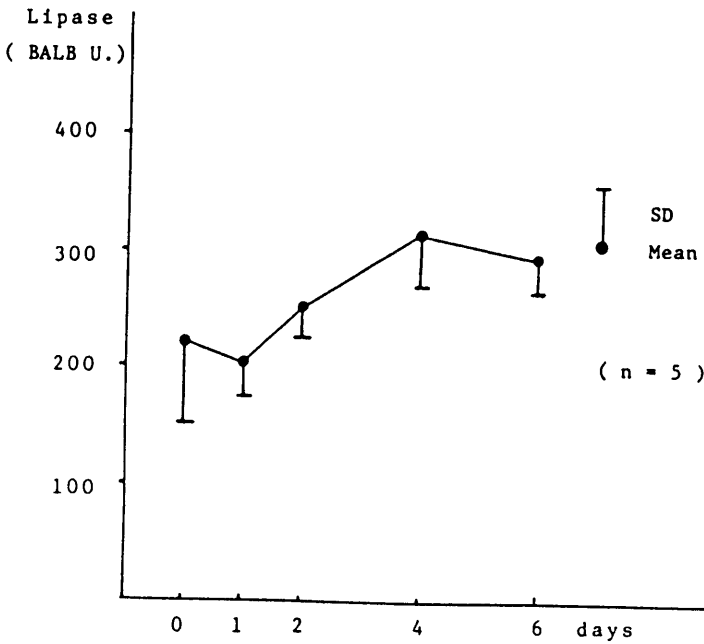
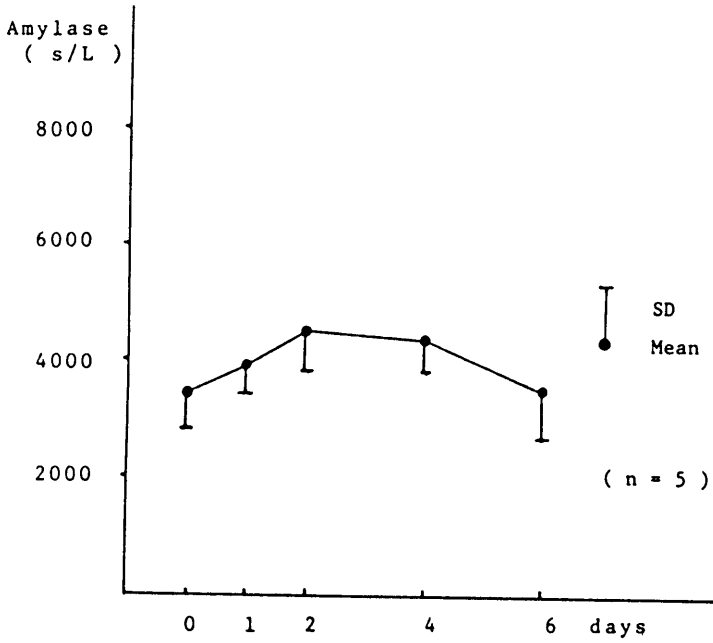


Figure 7 Graph shows slight elevation of serum amylase and lipase values after repeated intravenous injection of rat antiserum to rat pancreas into normal rats.

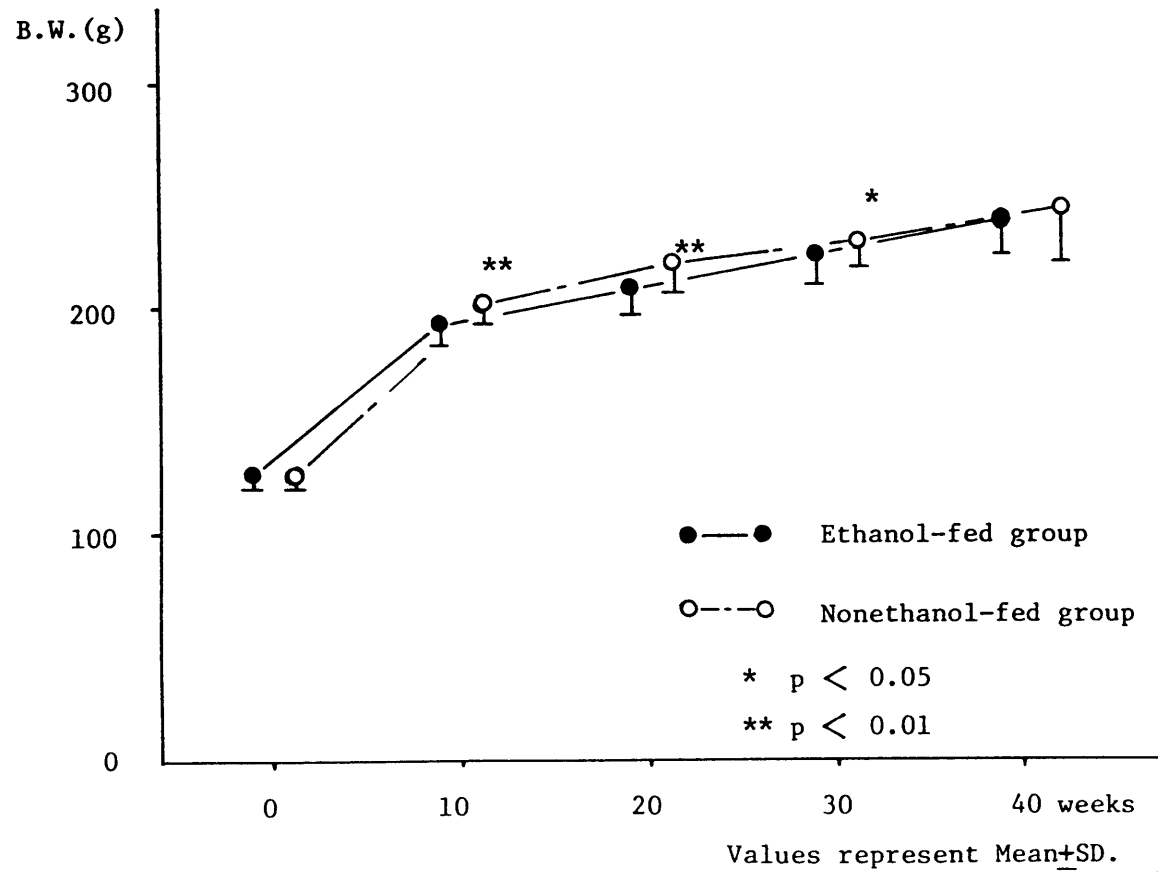


Figure 8 Time course of body weight

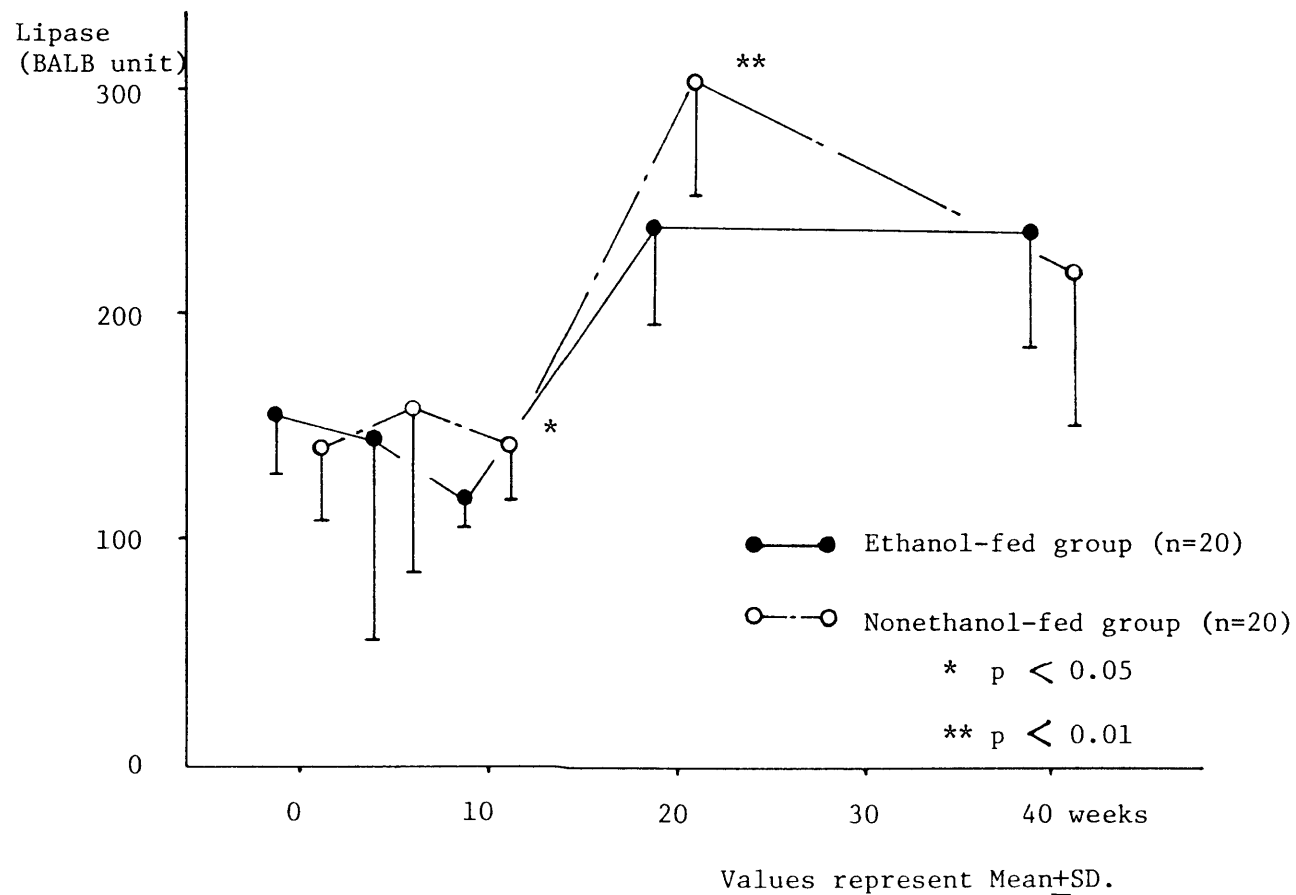


Figure 9 Time course of serum lipase

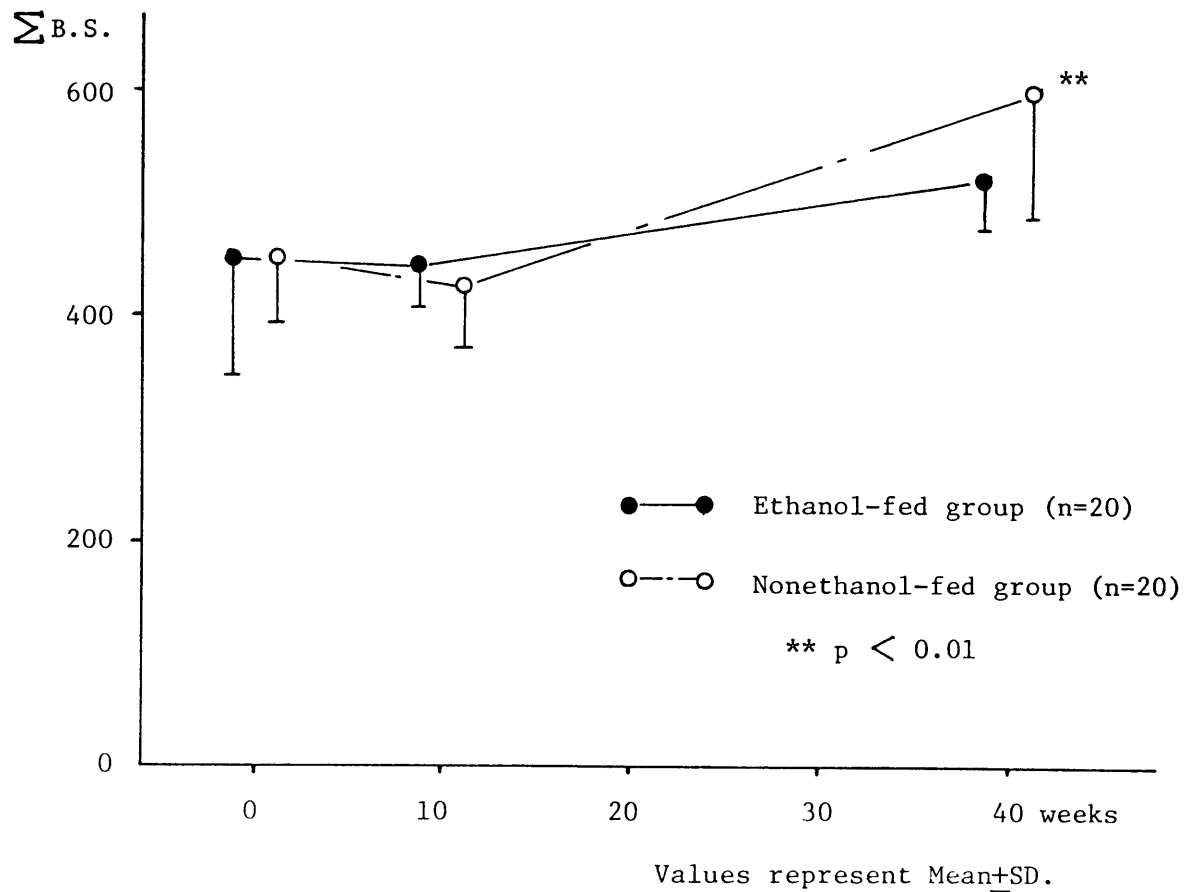


Figure 10 Time course of glucose tolerance

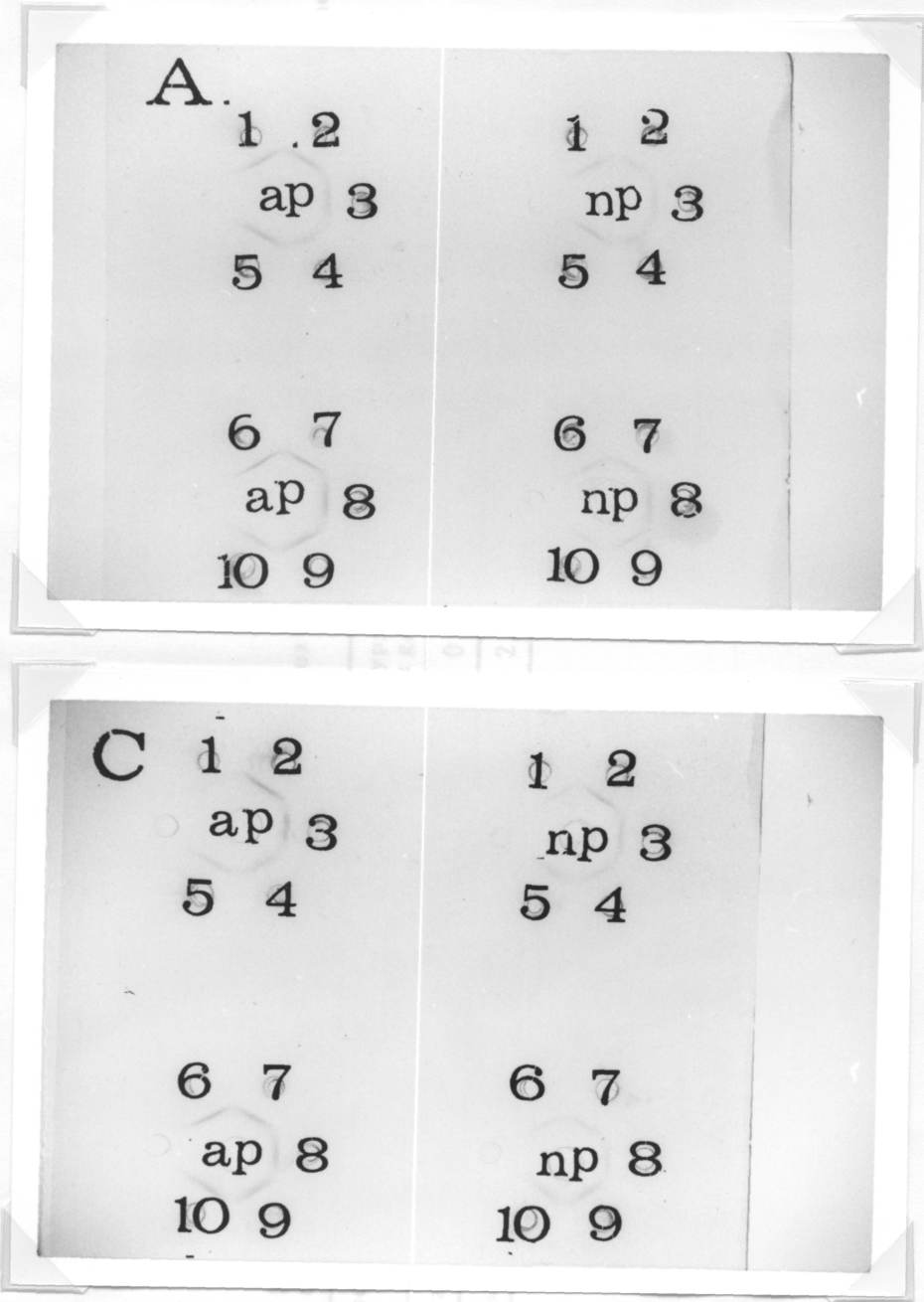


Figure 11 Photograph of gel-diffusion reactions which demonstrates lines of precipitation between l-butanol extract from the pancreas of ethanol-injected rats (ap) or l-butanol extract from the pancreas of normal rats (np) and serum of ethanol-fed group rats (A) or serum of nonethanol-fed group rats (C).

Table 1 Pancreatic enzyme activities in buthanol extracts from pancreatic acinar cell membrane of a dog and a rat

| Buthanol extracts (1 mg/dl) | Amylase (IU/l) | Lipase (IU/l) | Trypsin (μ g/ml) | Chymotrypsin (μ g/ml) | Elastase-1 (μ g/ml) |
|--------------------------------|-------------------|------------------|--------------------------|-------------------------------|-----------------------------|
| From rat pancreas | 997 | 286 | 0 | 7.4 | 0.28 |
| From dog pancreas | 1,898 | 1,040 | 2.4 | 34.5 | 0.28 |

Table 2 ³H-thymidine uptake of lymphocytes isolated from the spleen of rats after stimulation with pancreatic acinar cell membrane extract (8 μg/well)

| Rats | Stimulation index |
|--------------------|-------------------|
| Experimental group | |
| 1 | 1.50 |
| 2 | 4.56 |
| 3 | 2.63 |
| 4 | 5.59 |
| 5 | 8.65 |
| Mean ±SD | 4.59 ± 2.48 * |
| Control group | |
| 1 | 1.44 |
| 2 | 0.78 |
| 3 | 0.69 |
| 4 | 0.94 |
| 5 | 0.86 |
| Mean ±SD | 0.94 ± 0.26 |

The difference between experimental and control groups was significant ($p < 0.01$).

Table 3 Frequency of pancreatic lesions in the rats (experimental group) immunized with extract from pancreatic acinar cell membrane of dogs plus Freund's adjuvant and in the rats (control group) immunized with Freund's adjuvant alone.

| Pancreatic lesions | After the beginning of immunization (weeks) | | | | | | | |
|--|---|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| | 1 | 2 | 4 | 6 | 10 | 20 | 30 | 40 |
| Pancrenchymal destruction by lymphocyte infiltration | | | | | | | | |
| Experimental group | 0/5 | 0/5 | 0/5 | 1/5 | 2/5 | 3/5 | 2/5 | 6/7 |
| Control group | 0/3 | 0/3 | 0/5 | 0/3 | 1/3 | 1/3 | 3/3 | 3/5 |
| Tublar complex | | | | | | | | |
| Experimental group | 0/5 | 0/5 | 0/5 | 0/5 | 0/5 | 0/5 | 0/5 | 1/7 |
| Control group | 0/3 | 0/3 | 0/5 | 0/3 | 0/3 | 0/3 | 0/3 | 3/5 |
| Atrophy and loss of acini | | | | | | | | |
| Experimental group | 0/5 | 1/5 | 0/5 | 0/5 | 0/5 | 2/5 | 0/5 | 3/7 |
| Control group | 0/3 | 0/3 | 0/5 | 0/3 | 0/3 | 0/3 | 0/3 | 0/5 |

Table 4 Frequency of pancreatic lesions observed in the course of immunization

| Pancreatic lesions | After the beginning of immunization | | |
|---|-------------------------------------|-----|----------|
| | 10 | 20 | 40 weeks |
| Panrenchymal destruction by lymphocyte infiltration | | | |
| Ethanol-fed group: 1 | 2/5 | 4/5 | 5/5 |
| 2 | 5/5 | 3/5 | 5/5 |
| 3 | 3/5 | 3/5 | 3/5 |
| 4 | 0/5 | 0/5 | 0/5 |
| Nonethanol-fed group: 1 | 2/5 | 4/5 | 4/5 |
| 2 | 1/5 | 2/5 | 4/5 |
| 3 | 2/5 | 4/5 | 3/5 |
| 4 | 0/5 | 0/5 | 0/5 |
| Tubular complex | | | |
| Ethanol-fed group: 1 | 1/5 | 1/5 | 0/5 |
| 2 | 0/5 | 1/5 | 0/5 |
| 3 | 1/5 | 0/5 | 1/5 |
| 4 | 0/5 | 1/5 | 2/5 |
| Nonethanol-fed group: 1 | 0/5 | 0/5 | 2/5 |
| 2 | 1/5 | 1/5 | 1/5 |
| 3 | 0/5 | 1/5 | 1/5 |
| 4 | 1/5 | 0/5 | 0/5 |
| Atrophy and loss of acini | | | |
| Ethanol-fed group: 1 | 0/5 | 2/5 | 3/5 |
| 2 | 0/5 | 0/5 | 1/5 |
| 3 | 2/5 | 2/5 | 1/5 |
| 4 | 1/5 | 0/5 | 1/5 |
| Nonethanol-fed group: 1 | 1/5 | 2/5 | 1/5 |
| 2 | 0/5 | 1/5 | 1/5 |
| 3 | 0/5 | 1/5 | 2/5 |
| 4 | 0/5 | 0/5 | 1/5 |

Subgroup 1: Immunized with ethanol-fed rat pancreas extract plus adjuvant, Subgroup 2: Immunized with nonethanol-fed rat pancreas extract plus adjuvant, Subgroup 3: Immunized with adjuvant, Subgroup 4: Injected with saline

Table 5 Percent cytotoxicity of serum from patients with chronic pancreatitis and non-pancreatic diseases

| Case | Age | Sex | Diagnosis | Percent cytotoxicity |
|---|-----|-----|------------------------------------|----------------------|
| 1 | 16 | F | Normal | 0 |
| 2 | 55 | M | Normal | 2.6 |
| 3 | 66 | F | Normal | 1.3 |
| 4 | 74 | F | Normal | 0 |
| 5 | 25 | F | Colon diverticulum | 8.9 |
| 6 | 31 | F | Colon polyp | 7.7 |
| 7 | 50 | F | Colon polyp | 0 |
| 8 | 48 | M | Cholelithiasis | 9.7 |
| 9 | 71 | F | Cholelithiasis | 0 |
| 10 | 54 | F | Diabetes mellitus | 14.4 |
| 11 | 58 | F | Diabetes mellitus | 2.1 |
| 12 | 60 | F | Diabetes mellitus | 0 |
| 13 | 59 | F | Hyperthyroidism | 0 |
| 14 | 28 | F | Hyperamylasemia | 6.3 |
| 15 | 76 | M | Macroamylasemia | 3.5 |
| Mean±SD in non-pancreatic disease group | | | | 3.77±4.11 |
| 1 | 35 | M | Alcoholc chronic pancreatitis | 0.9 |
| 2 | 37 | M | | 0 |
| 3 | 39 | M | | 0 |
| 4 | 42 | M | | 6.5 |
| 5 | 42 | M | | 0.7 |
| 6 | 47 | M | | 0.1 |
| 7 | 49 | M | | 0.5 |
| 8 | 50 | M | | 2.7 |
| 9 | 51 | M | | 1.6 |
| 10 | 53 | M | | 3.5 |
| 11 | 60 | M | Non-alcoholic chronic pancreatitis | 2.5 |
| 12 | 65 | M | | 11.4 |
| 13 | 66 | M | | 0 |
| 14 | 56 | M | | 2.3 |
| 15 | 72 | M | | 0.6 |
| Mean±SD in chronic pancreatitis group | | | | 2.22±2.99 |

The difference between non-pancreatic disease and chronic pancreatic groups was not significant.