



ラット急性膵炎モデルにおける血清中、腹水中、膵組織中のphospholipase A2の動態に関する実験的研究

小野山, 裕彦

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

1989-02-28

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲0787

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1000787>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



氏名・(本籍)	小 野 山 裕 彦 (愛 媛 県)
学 位 の 種 類	医 学 博 士
学 位 記 番 号	医博い第610号
学位授与の要件	学位規則第5条第1項該当
学位授与の日付	平成元年2月28日
学 位 論 文 題 目	ラット急性膵炎モデルにおける血清中、腹水中、膵組織中の phospholipase A ₂ の動態に関する実験的研究

審 査 委 員	主査 教授 斉 藤 洋 一
	教授 河 野 通 雄 教授 高 井 義 美

論 文 内 容 の 要 旨

緒 言

急性膵炎の本態は膵実質の自己消化であるが、各種活性化膵酵素が血中に逸脱すると重要臓器障害を惹起する。なかでも phospholipase A₂ (PLA₂) は、その活性の結果産生される lyso 体の増加とともに細胞膜破壊に関与して、肝障害、腎障害、神経障害、呼吸器障害を引き起こすといわれている。したがって血中への PLA₂ の逸脱は膵炎の重症化に大きく関与すると考えられる。また PLA₂ には膵性 PLA₂ の他に膜結合性 PLA₂ があり膵炎の重症化との関連が注目される。

しかし、血中および腹水中 PLA₂ の急性膵炎の重症度との関連において一定の見解は得られておらず、膵炎における膜結合性 PLA₂ の活性化の機構と意義についてもほとんど解明されていない。

本研究はラットを用いて重症度の異なる膵炎モデルを作成して血清中、腹水中の PLA₂ 活性を重症度との関連について検討した。また、膵組織 PLA₂ 活性を測定し膵炎における膵局所の PLA₂ の動態を検討すると共に、細胞内分布および活性化機構についても検討を加えたので報告する。

実験材料および実験方法

急性膵炎モデルの作成はラット胆膵管内に10% sodium deoxycholate (DCA : Difco 社) 0.15 ml または 2000 μ /ml trypsin 0.6 ml を注入して作成した。DCA 膵炎では膵炎作成後1時間毎に5時間まで、trypsin 膵炎では3時間、6時間、12時間の各時期に屠殺して血液、腹水、膵組織を採取した。

膵組織分画は組織を秤量後10倍量の氷冷したbuffer (0.25 M sucrose, 10 mM Tris, 1mM EDTA, 0.5% fatty acid free bovine serum albumin, 0.025% soybean trypsin inhibitor, 0.4 mM dibucaine) 中で homogenate し、100,000 $\times$ g, 90分で遠心分離し、上清を可溶画分、沈渣

は3回同じ buffer で洗浄後顆粒画分とした。Mitochondria 画分の抽出方法は Wilson³⁾の方法により行なった。

PLA₂活性の測定は Shakir らの方法で行なった。アミラーゼの測定はブルースターチ法で行なった。統計学的有意差の検定には分散分析を用いた。

実験結果ならびに考察

生存率および脾の肉眼的組織学的比較により trypsin 脾炎を比較的中程度の浮腫性脾炎、DCA 脾炎を重症の出血壊死性脾炎のモデルとして適当であった。

血清 PLA₂活性は両脾炎で有意に上昇した。出血壊死性脾炎は1時間で、浮腫性脾炎では6時間で頂値に達し、PLA₂活性はそれぞれ 16.8 ± 1.8 、 19.1 ± 2.6 n mol/hr ml であったが、両頂値間には差が無く重症度とは相関しなかった。したがって血清 PLA₂値は脾炎の重症度の指標とはならないことが判明した。一方腹水中 PLA₂活性は出血壊死性脾炎では1時間後より有意に上昇したが、浮腫性脾炎では有意には上昇せず、腹水中 PLA₂活性は重症度と相関した。この結果、臨床的には peritoneal tap によった採取した腹水の PLA₂値が重症度の判定と脾炎の進展の示標として応用できる可能性が考えられる。また、peritoneal lavage によって PLA₂による脂肪壊死などの腹腔内の障害を防止するものと考えられる。

脾組織 PLA₂活性の変動を浮腫性脾炎モデルで測定し、amylase 活性と比較して検討した。全組織活性は脾炎作成後6時間で前値に比較して PLA₂ amylase とともに著明に上昇した。しかし、全組織の顆粒画分の占める割合は、PLA₂は前値は $70.9 \pm 3.5\%$ であったが脾炎作成後6時間では、 $74.0 \pm 2.2\%$ で12時間変動は見られなかったが、amylase では前値 $55.1 \pm 6.3\%$ 、6時間では $41.0 \pm 7.0\%$ と低下傾向を示し、6時間および12時間で両者の顆粒画分の占める割合に有意差が見られた。すなわち、脾組織において amylase では可溶画分の活性が時間の経過と共に上昇するのに対し、PLA₂では顆粒画分での活性が高値を維持した。

つぎに脾組織 PLA₂活性の変動を蛋白量あたりの比活性でみると、可溶画分では脾炎作成後の変化は作成前と比較して6時間および12時間で減少しているのに対し、顆粒画分ではそれぞれ $55.4 \pm 19.4\%$ 、 $55.8 \pm 13.3\%$ と上昇した。とくに mitochondria 画分では6時間で $48.1 \pm 19.3\%$ 、12時間で $139.2 \pm 17.4\%$ とさらに活性は増加した。すなわち、急性脾炎においては脾組織の顆粒画分、特に mitochondria 画分で PLA₂の比活性が増加した。

mitochondria 画分での膜結合性 phospholipase A 活性の上昇は細胞の energy 代謝を抑制した細胞障害と破壊につながるといわれており脾局所の病変進展に膜結合性 PLA₂の活性化が関与している可能性が考えられた。

一方、急性脾炎時には門脈系に細菌が増加するといわれ、壊死性脾炎では脾壊死巣に発症早期より感染がみられている。そこで急性脾炎における mitochondria 画分の PLA₂活性化因子として endotoxin の影響では、mitochondria 画分を preincubation すると時間依存性に PLA₂活性は上昇するが、これを sonication し、endotoxin を負荷すると、preincubation による活性の上昇

を増強した。

この事実より急性膵炎時における膜結合性 PLA₂の活性化には endotoxin の関与も示唆された。

結 論

1. 血中 PLA₂活性は急性膵炎で上昇するが重症度とは相関しなかった。腹水中 PLA₂活性の上昇は重症度と相関した。
2. 膵組織 PLA₂活性は急性膵炎の経過と共に増加し、血中のそれとは同調しなかった。その活性の上昇は主に過剰画分の上昇を反映しており、amylase とは明らかな対比を示した。
3. 急性膵炎では膜結合性 PLA₂の活性化が膵局所の病変進展と何らかの関連を有し、活性化の機序としては endotoxin の関与も示唆された。

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

(1) はじめに

急性膵炎の本態は膵実質の自己消化であるが、各種活性化膵酵素が血中に逸脱すると重要臓器障害を惹起する。なかでも phospholipase A₂ (PLA₂) は、その活性の結果産生される lyso 体の増加とともに細胞膜破壊に関与して、肝障害、腎障害、神経障害、呼吸器障害を引き起こすといわれている。したがって血中への PLA₂の逸脱は膵炎の重症化に大きく関与すると考えられる。また PLA₂には膵性 PLA₂の他に膜結合性 PLA₂があり膵炎の重症化との関連が注目される。

しかし、血中および腹水中 PLA₂の急性膵炎の重症度との関連において一定の見解は得られておらず、膵炎における膜結合性 PLA₂の活性化の機構と意義についてもほとんど解明されていない。

本研究はラットを用いて重症度の異なる膵炎モデルを作成して血清中腹水中の PLA₂活性を重症度との関連について検討した。また、膵組織 PLA₂活性を測定し膵炎における膵局所の PLA₂の動態を検討すると共に、細胞内分布および活性化機構についても検討することを目的として実験を行った。

(2) 実験材料および実験方法

急性膵炎モデルの作成はラット胆膵管内に10% sodium deoxycholate 0.15ml または 2000 μ /ml trypsin 0.6ml を注入して作成した。DCA膵炎では膵炎作成後1時間毎に5時間まで、trypsin膵炎では3時間、6時間、12時間の各時期に屠殺して血液、腹水、膵組織を採取した。

膵組織分画は組織を秤量後10倍の氷冷した buffer 中で homogenate し、100,000 $\times$ g、90分で遠心分離し、上清を可溶画分、沈渣は3回同じ buffer で洗浄後顆粒画分とした。Mitochondrion 画分の抽出方法は Wilson の方法により行なった。

PLA₂活性の測定は Shakir らの方法で行なった。アミラーゼの測定はブルースターチ法で行なった。統計学的有意差の検定には分散分析を用いた。

(3) 成績

- 1) 血中PLA₂活性は急性膵炎で上昇するが重症度とは相関しなかった。
- 2) 腹水中PLA₂活性の上昇は重症度と相関した。
- 3) 膵組織PLA₂活性は急性膵炎の経過と共に増加し、血中のそれとは同調しなかった。その活性の上昇は主に顆粒画分の上昇を反映しており、amylaseとは明らかな対比を示した。
- 4) 急性膵炎では膜結合性PLA₂活性化が膵局所の病変進展との関連を有し、活性化の機序としてはendotoxinの関与も示唆された。

これらの成績から膜結合性PLA₂活性が膵組織の細胞破壊に直結しており、血清PLA₂の測定は膵炎の重症度を反映せず、その診断には腹水中PLA₂測定が有用であり、また治療法としてのperitoneal lavageの有効性を示すものとの結論を導き出している。

本研究は急性膵炎についてそのphospholipase A₂の動態を研究したものであるが、従来ほとんど行なわれなかった測定法の開発とそれによって血清、腹水、膵組織の動態を正確に把握した価値ある集積であると認める。

よって本研究者は医学博士の学位を得る資格があると認める。