

氏 名 (本籍)	なか 中	じま 嶋	やす 康	ゆき 之
学 位 の 種 類	医	学	博	士
学 位 記 番 号	医	第	1058	号
学 位 授 与 年 月 日	昭 和 5 3 年 2 月 2 2 日			
学 位 授 与 の 要 件	学 位 規 則 第 5 条 第 2 項 該 当			
最 終 学 歴	昭 和 4 5 年 3 月 東 北 大 学 医 学 部 医 学 科 卒 業			
学 位 論 文 題 目	ELASTASE の動態に関する研究 (第 I 報) —豚 ELASTASE の RADIOIM- MUNOASSAY (第 II 報) —実験的豚急性出血性膀胱炎時の IMM UN OREACTIVE ELASTASE の変動			

(主 査)

論 文 審 査 委 員 教 授 佐 藤 寿 雄 教 授 後 藤 由 夫

教 授 菊 地 吾 郎

論文内容要旨

研究目的

急性膵炎の病態の一環を把握するため、従来から多くの問題を残していた elastase の血中濃度測定法を radioimmunoassay で検討確立し、さらにこの測定法を用いて実験的急性出血性膵炎豚における elastase の体内分布、消長を検索し、3 の知見を得た。

研究方法

i) elastase 測定法：豚膵 elastase を抗原として、Freund's complete adjuvant と共に混和し、家兎に1週から3週間隔で5回以上感作して抗血清を得た。elastase のヨード化は NEN 社製 Na^{131}I (or ^{125}I) を Greenwood と Hunter の方法に準じて標識し、Sephadex G-50 (Fine) を用い excel column (1.5×4.5cm) でゲル濾過精製した。第1反応は Tracer (約 10,000 c.p.m) 0.1 ml, 第1抗体 (最終希釈 35 万倍) 0.1 ml, standard (or sample) 0.1 ml と 0.05 M phosphate buffer 0.4 ml を 4℃ で 48 時間 incubation した後、第2抗体 (×40) 0.1 ml と正常ウサギ血清 (×200) 0.1 ml を 4℃ で 24 時間 incubation した後、遠心して BF 分離をおこなった。セリン酵素阻害剤である Diisopropyl fluorophosphate を buffer 中に用いる事により、血清中の inhibitor (α_1 -antitrypsin と α_2 -macroglobulin) の影響を除外した。ii) 急性出血性膵炎豚の作成と検索方法：膵炎の作成は子豚 (20-37kg) を用い、大腿静脈、胸管リンパ管にカニューレションした後、開復して主膵管に自家感染胆汁 (0.5 ml/kg) を高圧下、および 100 cm H₂O の圧で注入して得た。以後、経時的に末梢血、門脈血、胸管リンパ管より採血、採液し、5 時間後に屠殺して腹水、膵組織を採取した。

研究成績

i) elastase の測定法：ヨード化した elastase の specific activity は 200-300 mci/mg であった。また、標準曲線と豚血清希釈曲線は平行となり、統計学的にも有意の相関を示し ($Y=1.015 \times -3.603$, 相関係数 $r=0.988$), また inter or intra assay precision の coefficient of variation は 10% 以下, recovery も 85-95% と満足すべき結果が得られた。さらに trypsin や chymotrypsin との交叉は 0.001% 以下であり、第1抗体は豚膵 elastase に特異的であると考えられた。また、第1抗体は 140 万倍 (最終希釈倍数) まで希釈可能であり、この assay 系では 5 ng/ml まで判読可能であった。ii) elastase の体内分布、消長：高圧群の amylase の変動についてみると、末梢血、門脈血、胸管リンパ液いずれの部位においても、胆汁注入後 15 分より有意の差をもって上昇し、末梢血と門脈血ではほぼ同様の変動パターンを

示し、2時間以降 plateau に達し、前値の約5倍を示した。これに対し、胸管リンパ液では胆汁注入后1時間から末梢血、門脈血と比較して高値を示し、3時間からはほぼ plateau に達し、前値の約1.3倍と高値を示した。膵組織中の amylase 濃度について、膵炎前後の膵組織で比較すると、膵炎膵ではほぼ前値の $\frac{1}{3}$ に減少していた。また屠殺時の腹水中の amylase 濃度は 150984 ± 82831 (Caraway, $M \pm SD$) と高値を示した。100 cm H₂O 注入群でも、胆汁注入后5分よりいずれの部位でも有意の差をもって上昇したが、高圧群と比較して上昇の仕方は緩やかであり、やや低値を示すが上昇パターンは類似していた。一方、elastase の変動についてみると、amylase の変動と類似しており、高圧群では前値はいずれの部位でも 90 ng/ml 前後あったが、末梢血、門脈血では胆汁注入后15分より有意に上昇し、1時間からはほぼ Plateau に達し、前値の約5-6倍を示すのに対し、胸管リンパ液では3時間ではほぼ Plateau に達し、前値の約1.2-1.3倍と末梢血、門脈血と比較して高値を示した。また、100 cm H₂O 注入群の elastase の変動についてみると、胆汁注入后5分よりいずれの部位でも有意の差をもって上昇したが、高圧群と比較するとその上昇の仕方は緩やかであり、またやや低値を示した。腹水中の immunoreactive elastase は 14712 ± 15381 ng/ml ($M \pm SD$) と amylase 同様高値を示した。膵組織中の free および total elastase 含有量を、膵炎前後の膵組織で比較してみた。Radioimmunoassay で測定すると、free elastase は 7.7 ± 1.1 μ g/mg ($M \pm SD$) から 2.2 ± 1.9 , total elastase は 18.6 ± 1.4 μ g/mg ($M \pm SD$) から 3.5 ± 3.8 といずれも有意差をもって、膵炎膵では減少していた。また、elastase の特異的な合成基質である N-benzoyl-L-alanine methyl ester (BAME) を用いて、膵組織中の elastase 活性を PH-stat autotitrator で測定してみても、膵炎膵の free および total elastase 活性はそれぞれ 1.39 ± 3.0 , 6.29 ± 3.54 BAME μ mole/min/mg dry weight ($M \pm SD$) と、control 膵の $\frac{1}{4}$ から $\frac{1}{5}$ に減少していた。また、血清、リンパ液、腹水には BAME 分解活性は全く認められず、逆に elastase の BAME 分解活性を抑制する事が判明した。胆汁注入后5時間後の膵組織をみると、肉眼的に全例出血が認められ、組織学的にみると、壊死、間質浮腫、細胞浸潤、実質内出血、一部血管壁の破壊など、明らかな急性出血性膵炎像を呈していた。

結 論

膵外分泌酵素の1つである elastase は、amylase と同様急性出血性膵炎時、血管(末梢血および門脈血)、リンパ管・腹水中に大量に逸脱し、同様に膵組織中の elastase の含有量、free および total elastase とともに著明に低下する事が判明した。しかし、その分泌動態は amylase のそれと類似しており、elastase の血中濃度測定からは、急性膵炎時の膵病変の重症度の判定をおこなう事は困難と思われた。今后、浮腫性膵炎、また人の elastase の変動と対比検討することが意義あるものと思われた。

審 査 結 果 の 要 旨

膵elastase はその特異的なelastin 分解作用を有する事から、急性出血性膵炎時に血管壁の弾性線維を破壊して出血をおこし、重症の膵炎に進展させると推測されてきた。しかし、血中elastase inhibitor の影響で、現在まで血中elastase 濃度測定に関しては満足すべき測定方法は確立されなかった。本研究ではRadioimmunoassay を用いて血中elastase 濃度を測定し、さらに豚を用いて急性膵炎を作成し、その分泌動態を研究している。

Radioimmunoassay の方法としては、まずTracer はクロラミンT法により得た。第1抗体は家兔に感作することにより得た。BF 分離は2抗体法によりおこなった。Buffer 中にセリン酵素阻害剤であるDiisopropyl fluorophosphate を用いることにより、inhibitor の影響を除外している。このassay 系における正確さ、精度、回収率も満足すべき結果がえられ、最小感度は5 ng/mlであった。次に子豚を用いて、大腿静脈、胸管リンパ管にカニューレションしたのち、開腹して門脈にカニューレションし、主膵管に自家感染胆汁0.5 ml/kgを高圧下に注入して急性出血性膵炎を作成した。以後、経時的に採血、採液し、5時間後に膵組織、腹水を採取した。その結果によると、末梢血、門脈血、胸管リンパ液中のelastase 濃度はいずれの部位でも前値は90 ng/ml前後であったが、胆汁注入后15分よりいずれの部位でも有意に上昇し、2-3時間でプラトーに達し、末梢血、門脈血では前値の5-6倍、胸管リンパ液では1.2-1.3倍と高値を示した。また腹水中にも大量のelastase が認められた。膵組織中のproelastase 及びtotal elastase 含有量は膵炎膵では著明に減少していた。amylase の変動についてみると、いずれの部位でもelastase の変動と類似していた。膵には組織学的にネクローゼ、実質内出血、一部血管壁の破壊など明らかな急性出血性膵炎像を呈していた。

以上の成績より、膵elastase は急性出血性膵炎時、血管、リンパ管及び腹水中に大量に逸脱すること、その結果膵組織中のelastase 含有量は著明に低下する事実を把握している。しかし、その変動はamylase の変動と類似しており、その血中濃度測定から膵炎の重症度を判定することは困難であろうとしている。

本研究はelastase の血中濃度測定法を確立し、実験的急性出血性膵炎時のelastase の分泌動態、役割を解明し、膵炎の病態解明に貴重な情報を提供し、治療に関しても有力なる指針を与えている。よって、本研究は学位授与に値するものと認める。