

実験膵炎における蛋白分解酵素に関する研究

越 知 富 夫

信州大学医学部第二内科学教室(主任:小田正幸教授)

Studies on the Proteolytic Enzymes in Experimental Pancreatitis

Tomio OCHI

Department of Internal Medicine, Faculty of Medicine,
Shinshu University
(Director: Prof. M. ODA)

緒 言

膵炎の成因及び発生病理と蛋白分解酵素, とくに Trypsin との関係は, Opie & Meakins¹⁾ により, ヒト出血性膵炎において強調されて以来多くの研究^{2)~7)} 10¹⁵⁾ がある。これらの研究によれば, Trypsin が膵炎の発生になんらかの役割をもっているとする根拠は, ヒト膵炎, とくに出血性膵炎にみられる血管変化, 組織壊死が Trypsin を用いた実験的研究のさいにみられる病変に類似すること¹²⁾²³⁾, Trypsin を静注したときのショック症状, 血液凝固能の変化が, ヒト急性膵炎での変化と類似しており^{9)~13)}, またヒト急性膵炎で Antitrypsin 活性²¹⁾に変化がみられることなどである。しかしながら急性膵炎の原因は初期の研究において考えられたごとく, 胆汁, 十二指腸液の逆流により, 直接 Trypsinogen 活性化がおり, 膵炎に進展するというよりは, 胆道系, 膵管系, 代謝, 血管系, 神経系, 感染など諸因子が関与しており^{10)~13)}, Trypsinogen, 膵蛋白分解酵素の活性化は, これら因子により, 実質障害, 酵素の間質¹⁹⁾¹⁴⁾への逸脱を介して起ると考えられている。いずれにしても Trypsinogen の活性化は膵炎の発生に, 中心的な位置を与えられているが¹⁴⁾, 膵炎を起した組織について, 直接, Trypsin, Chymotrypsin の測定を行った実験では, 明らかな膵炎との関連性を認めることができなかった⁷⁾。また膵炎の臨床診断で逸脱酵素として役立っているのは, Amylase のみであり, Trypsin についてはなお一般化されていない¹⁸⁾¹⁰⁾。この理由は, 測定法, ことに基質に満足すべきものがないこと, 血中に Trypsin inhibitor を含め Trypsin の作用を中和する働きが強いことがあげられる¹⁸⁾¹⁹⁾²¹⁾。

Trypsin の基質は Kunitz ら²³⁾²⁶⁾の Casein, Anson ら²²⁾による Hemoglobin の使用にはじまり, Schwert²⁴⁾の α -Benzoyl-L-arginine ethyl ester

(BAEE) が用いられてきた。しかし Trypsin の測定が臨床的に注目されたのは, Nardi により基質 α -Benzoyl-L-argininamide hydrochloride (BAA) が導入され, 膵炎患者16名で著明な BAA 分解能 (Nardi の Trypsin) の上昇が報告されてからである²⁵⁾。その後の研究では, 必ずしも Nardi と同じ結果がえられず²⁶⁾²⁷⁾BAA 分解能の上昇を報告する研究者も, 活性が Nardi の成績に比して低いとしている²⁸⁾。また BAA は Trypsin 以外に, Cathepsin B²⁹⁾, Thrombin³⁰⁾, Plasmin³¹⁾により分解されるといわれてきた²⁹⁾。著者は Trypsin をはじめ膵蛋白分解酵素を膵炎の診断に役立たせるために, まず BAA 分解能の上昇があるかどうかを, また BAA 分解能がみられるとすれば, Trypsin が関与しているかどうかを検討した。とくに Trypsin は Endopeptidase に属する Proteinase であり, BAA 分解能のみではこの性格を証明できない点に注目し, Casein, Fibrin, BAA, および α -Benzoyl-L-arginine *p*-nitroanilide hydrochloride (BAPNA) の4つの基質を用いて, 実験膵炎犬血漿及び膵組織につき蛋白分解活性を検討し, 若干の知見をえたので報告する。

I 実験膵炎犬血漿の蛋白分解能

1. 実験材料および方法

(1) 実験動物

体重10kg前後の雑種成犬を用い, 次の3群に分けて検討した。

- i) オリーブ油注入群
- ii) 生食水注入群
- iii) 無処置群

(2) 実験膵炎犬の作製

ミンタール 25mg/kg を皮下に注射して麻酔したイヌを手術台に固定, 上腹部正中線に切開を加えて開腹。

十二指腸および臍頭部を腹腔よりだし、主臍管に2本の縫合糸を通し、1本を十二指腸側において結紮し、臍管に部分切開を加えて、傷口より臍側に向って、外径約1.5mmのポリエチレン管を10mm挿入した。この管より臍管内へ、オリーブ油0.2ml/kg、または生食水0.2ml/kgを徐々に注入した。注入後ただちに管を抜去し、臍側にかけてある糸で、臍管を結紮し、オリーブ油、生食水の逆流を防いだ。ついで創口および腹腔内にマイシリンを注入して、腹壁を縫合した。

(3) 採血方法

1/10M 蔞酸ソーダ1:血液9の割合で、前肢静脈より採血し、速やかに混合して、血漿を分離した。血漿はただちに氷室に入れ、測定は採血後2時間以内に行なった。生食水、オリーブ油群ともに、術前、術後24時間および一部については6時間、にそれぞれ採血した。

(4) 試薬および器具

i) α -Benzoyl-L-argininamide hydrochloride (BAA):

第一製薬製、ミノファーゲン製薬製、BAA 331.8mgを Phosphate buffer (pH 7.8, 0.15M) 10ml にとかして用いた。

ii) Casein:

Merck 製の Hammarsten 級 Casein を精製³²⁾し Phosphate butter (pH 7.6, 0.15M) に1%の割合に溶解して使用した。

iii) Fibrinogen:

Armour 製の Bovine fibrinogen を用い、各 lot. ごとに Clottable protein を測定³³⁾。冷却した Borate saline buffer (pH 7.8) に Fibrinogen を溶解し 0.15% 溶液を作製した。

iv) α -Benzoyl-L-arginine *p*-nitroanilide hydrochloride (BAPNA):

Sigma 製、Erlanger³⁴⁾らの方法にしたがい BAPNA 435mg を Tris buffer (pH 8.2) 1l に加熱、溶解した。

v) Trypsin:

National Biochemical Co. (NBC) 製、2×結晶、塩類不含、10mg を 0.01N HCl 100ml にとかし Stock solution とした。一部持田製薬の Trypsin を用いた。

vi) Plasmin: ミドリ十字製。

vii) Conway 皿: 柴田製 Conway 標準ユニット。

viii) ミクロビュレット:

柴田製、容量 0.1ml、1目盛 1 μ l を使用。

ix) ϵ -Aminocaproic Acid (EACA):

第一製薬の純未剤を用いた。

(5) 蛋白分解酵素活性の測定法

i) BAA 分解能の測定法

Nardi²⁵⁾³⁵⁾法に準じて測定した。すなわち、採血後ただちに分離した蔞酸血漿 0.5ml に Phosphate buffer (pH 7.8, 0.15M) 0.5ml を加え、次に、1.0ml の BAA 溶液を加えて、25°C に孵置した。1時間後に、この混合液 0.2ml をとり Conway 皿外室に注入した。Conway 皿はあらかじめ内室に 1.00ml の 2% Boric Acid と 1滴の指示薬(Bromocresolgreen-Methylred 溶液)を入れ、外室に 1ml の飽和炭酸カリ溶液を加えておく。ついで皿を回転し、外室の被検溶液と飽和炭酸カリをよく混合せしめ、室温に1時間放置したのち、内室の回収液を 0.01N HCl を用いて滴定した。盲検として、血漿のみを入れず、他は同様操作した皿および BAA のみを除いた皿を用いた。測定値は、あらかじめ作成した標準曲線を用い、Trypsin (NBC) の絶対量 (γ) に換算して表わした。

ii) Casein 分解能の測定法

Kunitz³⁷⁾にしたがった。すなわち、精製 Casein 1g を Phosphate buffer (pH 7.6, 0.15M) 100ml に溶かし 1% 溶液を作った。この基質 1ml に被検血漿 0.5ml と Phosphate buffer 0.5ml を加え 25°C, 15分孵置した。ついで 5% Trichloroacetic acid (TCA) 3ml を滴加し、少くとも30分以上、室温に放置したのち、東洋濾紙 No6 を用いて濾過した。盲検は被検血漿 0.5ml のかわりに、Phosphate buffer 0.5ml を加えて同様に操作した。つぎに日立分光々度計139型を用い、波長280m μ でこの濾液の吸光度を測定した。毎回の測定にさいして、Trypsin 2.5 γ ~30 γ を加えて、上記操作を行い、標準曲線を作成した。

iii) Fibrin 分解能の測定法

本実験においては、Activator の混入、Plasminogen の活性化による影響を除き、Trypsin の活性だけを測定するために、加熱 Fibrin 平板を用いた。平板作製法は Lassen³⁷⁾の方法によった。すなわち、ウシ Fibrinogen を 0.15% の割合で、冷 Borate saline buffer にとかし、この溶液 10ml を滅菌シャーレ (直径 9cm) にとり、水平板上で、0.5ml の Thrombin 溶液 (25u/ml) を滴下しながら、回転し、よく混和せしめて凝固させた。平板を30分室温に放置したのち、85°C, 30分間加熱して、加熱平板とした。測定はこの平板が室温にまで冷えてから行った。まず被検血漿を 0.1ml のメスピペットにとり、平板上に 0.03ml づつ滴下、37°C, 18時間孵置したのち、溶解窓の長、短径を測定し、この積をもって、平板溶解面積 (mm²) とした。測定は、平板 2枚に、2カ所行い、平均値で示

した。各測定ごとに Trypsin 2.5r~30rを同様に平板上におき、標準曲線を作成した。

iv) α -Benzoyl-L-arginine *p*-nitroanilide hydrochloride (BAPNA) 分解能の測定法

Erlanger³⁴⁾らの方法に準じて測定した。BAPNAはErlangerらにより、開発されたTrypsinの基質であり、Trypsinにより加水分解されて、*p*-Nitroanilineの黄色を呈する。Erlangerら³⁴⁾によるとTrypsinに対する至適pHは8.1附近にあり、Km (M×10⁸): 0.939, k₂: 0.611であり、BAAより分解されやすい。BAPNA (10⁻⁸M) 5mlを用い、pH 8.2, 25°C, 5分の測定条件のもとにTrypsin 1rまで測定可能であるという。著者は、血漿0.5mlにpH 8.2, 0.05M Tris buffer 0.5mlとBAPNA 5mlをくわえ、25°C, 30分孵置し、30% Acetic acid 1mlを加えて反応をとめた。ついで日立分光光度計 139型の波長410m μ で吸光度を測定した。盲検は被検血漿のかわりに、Tris buffer 0.5mlをくわえて同様に操作した。毎回の測定にさいして、2.5r~30rのTrypsinを被検血漿のかわりにくわえて、Tris bufferで全量1mlとした。以下同じ操

作を行って活性を測定し、標準曲線を作った。

v) TrypsinのBAA, Casein, Fibrin, BAPNA分解能

ウシTrypsin (NBC)を0.0025N HClに溶かし、このTrypsin 2.5r~30rを4種の基質: Casein, BAA, BAPNA, Fibrinを用いて、上記測定法により各基質分解能をみた。各基質とも、2.5rまで検出可能であるが、Fibrinは測定誤差が大きかった。これらの基質を用いて測定すれば、2.5r以上のTrypsinを含む被検体については分解能を検出することができる。

vi) Antitrypsin 測定法³⁸⁾³⁹⁾

15倍に稀釈した被検血漿とTrypsin (持田)200u./ml Tris buffer (pH 7.8, 0.15M, μ =0.15) 溶液を等量混合し、37°C 15分間孵置し、0.03mlづつ加熱平板上におき、37°C, 18時間後に、溶解面積を計測した。対照は血漿のかわりにTrypsin溶液0.03mlをおき同様に操作した。活性の表示は次の式によった。

$$\text{Antitrypsin (\%)} = \left(1 - \frac{A}{B} \right) \times 100$$

A: 血漿加 Trypsin 溶液の溶解面積 (mm²)

B: Tris buffer 加 Trypsin 溶液の溶解面積 (mm²)

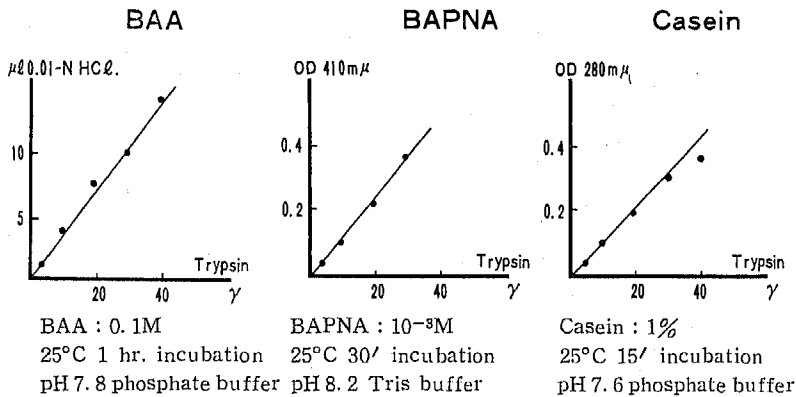


図 1. Trypsin の BAA, BAPNA, Casein 分解能

表 1 Trypsin の Fibrin 分解能 (heated plate)

Trypsin 量	Sample I	Sample II	平均値
r	mm ²	mm ²	mm ²
2	332	361	341
6	483	505	494
10	798	776	787
12	854	854	854

Trypsin : 0.0025-N HCl に溶かして 200r/ml とし、その溶液 0.01~0.06ml をおく。

2. 成績

(1) BAA, Casein, Fibrin 分解能

すでに方法の項で述べたように、次の3群について検討した。

- i) オリーブ油注入群
- ii) 生食水注入群
- iii) 無処置群

採血は多くの研究者により Trypsin 逸脱のもっとも高値をしめすと報告されている術後24時間に行っ

表 2 肺炎犬血漿 BAA, Casein, Fibrin 分解能

実験犬 No.	前 値			術 後 6 時 間 値			術 後 24 時 間 値		
	BAA 分解能	Casein 分解能	Fibrin 分解能	BAA 分解能	Casein 分解能	Fibrin 分解能	BAA 分解能	Casein 分解能	Fibrin 分解能
22	0 ^{r/ml}	6 ^{r/m}	0 ^{mm}	7 ^{r/ml}	7 ^{r/ml}	0 ^{mm}	30 ^{r/ml}	9 ^{r/ml}	0 ^{mm}
30	0	/	/	/	/	/	22	/	/
オ	54	/	8	0	/	/	/	10	0
リ	55	4	0	0	/	/	13	6	0
56	0	0	0	/	/	/	13	5	0
1	57	0	4	0	/	/	19	0	0
ブ	58	5	0	0	/	/	26	0	0
油	59	0	0	0	/	/	20	0	0
注	60	7	6	0	30	/	/	/	0
入	61	0	0	0	10	0	0	/	0
群	63	12	0	0	13	0	0	/	0
64	10	0	0	/	0	0	23	6	0
70	0	/	0	/	/	/	14	/	0
平均	3	2	0	18	0	0	20	4	0
生	27	4	/	/	/	/	0	/	/
食	29	0	/	/	/	/	0	/	/
水	65	0	0	0	/	/	0	0	0
注	66	8	/	0	/	/	7	/	0
入	68	5	0	0	/	/	30	6	0
群	69	4	0	0	/	/	4	0	0
平均	3	0	0	/	/	/	7	2	0
無	42	0	0	0	/	/	0	0	0
処	43	0	0	0	/	/	0	0	0
置	44	0	0	0	/	/	0	0	0
群	72	0	0	0	/	/	0	0	0
平均	0	0	0	/	/	/	0	0	0

た。したがって術前、術後24時間の2回、および一部については、術後6時間にも採血した。

i) BAA 分解能

オリーブ油群のBAA分解能は、表2に示すごとく前値が平均3^{r/ml}で、活性値0の例が多かった。術後6時間で30^{r/ml}と高値を示す例もみられるが、3例のみに測定を行ったにすぎないので結論はさしひかえる。24時間値は平均20^{r/ml}と上昇しており、生食水注入対照群に比して、明らかに高値を示した。ただ対照に、30^{r/ml}と高値を示す例がみられるが、生食水注入によっても肺炎がおこりうることから説明されるものと考えられる。無処置対照群の活性は全くみられなかった。

ii) Casein 分解能

オリーブ油群の前値は0~8^{r/ml}の間に分散してお

り、平均の活性は2^{r/ml}であった(表2)。24時間値は、オリーブ油群で0~10^{r/ml}、平均4^{r/ml}であり、測定の限界が2^rで、分散より考えれば有意の上昇とはいえない。

iii) Fibrin 分解能

オリーブ油、生食水、無処置群(表2)ともに、術前値、術後6時間、24時間値すべてFibrin分解能をみとめなかった。

iv) 成績の総括 i)~iii)

以上の成績をまとめて図2に示した。図にみるように、BAA分解能の上昇をみとめるが、Casein分解能の上昇はみとめず、Fibrin分解能は全くみとめられなかった。

(2) BAPNA 分解能

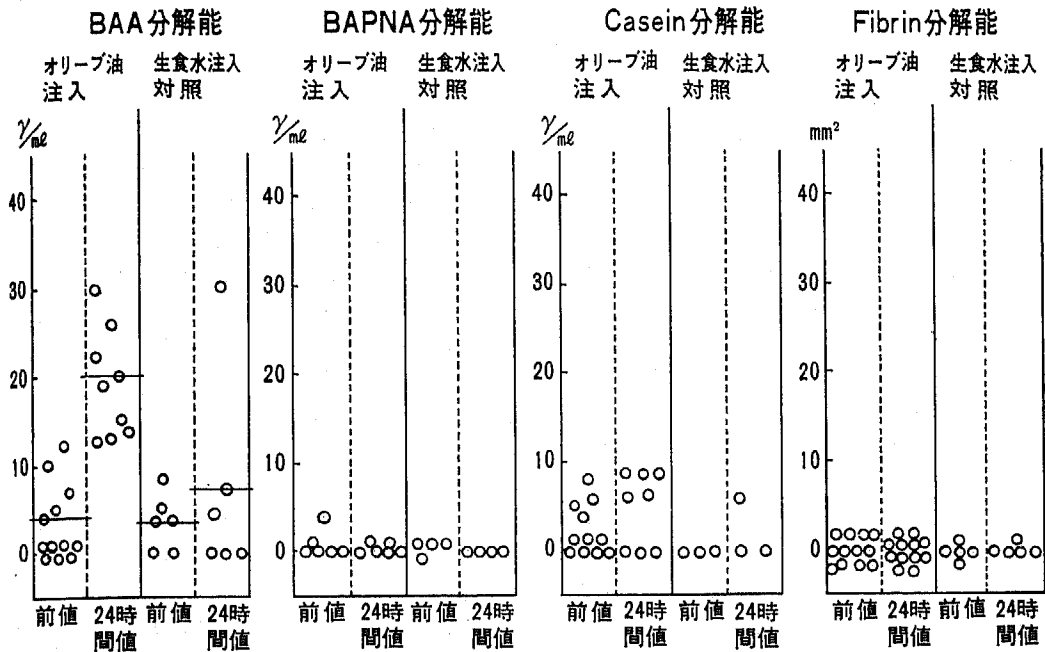


図 2. 膵炎犬血漿 BAA, BAPNA, Casein, Fibrin 分解能

表 3 膵炎犬血漿 BAPNA 分解能

	実験犬 No.	前値 r/ml	24時間値 r/ml
オリーブ油注入群	22	0	0
	55	0	0
	56	4	0
	57	0	0
	64	0	0
	70	0	0
平均		0	0
生食水注入対照群	65	0	0
	66	0	0
	68	0	0
	69	0	0
	平均		0

表 4 膵炎犬血漿 Antitrypsin 値

	実験犬 No.	前値 %	24時間値 %	Antitrypsin の変動
オリーブ油注入群	22	6.8	8.3	↑
	53	22.9	46.8	↑
	54	43.9	20.2	↓
	55	30.0	36.5	↑
	56	78.4	25.8	↓
	57	54.4	49.1	↓
平均		39.4	31.1	
生食水注入群	27	37.8	25.0	↓
	29	44.3	29.0	↓
	31	24.2	30.1	↑
	平均		35.4	28.0

iv) の成績によれば、蛋白質である Fibrin, Casein 基質の分解能が 0 ないしいちじるしく低く、BAA 分解能を示すことは、Trypsin というより、Amidase と考えた方がよい結果であった。したがって、この点をさらにたしかめるために、BAA に似た分子量の BAPNA を基質として、活性の測定を行った。成績は

図 2, 表 3 にしめすごとくオリーブ油群, 生食水群, 無処置群の分解能は、術前, 術後 24 時間ともに No 56 の前値を除けば全く活性がみとめられなかった。

(3) Antitrypsin 活性

すでに (1) - iv) でえられた BAA 分解能と Casein, Fibrin 分解能の差が Trypsin の関与を前提として

説明されるとすれば、基質-酵素の結合性に变化を考へなくてはならない。その第一は血中に逸脱した Trypsin がまず Antitrypsin と結合してこのような变化を起す可能性である。この点で Antitrypsin の測定を行うことがなんらかの手がかりを与えるのではないかと考へて、第I章(5)-vi) にもとづいて測定を行った。

成績は表4に示すようにオリーブ油群、生食注入対照群ともに、Antitrypsin の上昇を示す例と低下例があいなかばし、一定の傾向をみとめなかった。

II 肺炎犬血漿 BAA 分解酵素と Plasmin との比較

1. Plasmin の Casein, BAPNA, BAA, Fibrin 分解能

古くから指摘されているように、BAA は Trypsin 以外に Cathepsin B²⁹⁾, Thrombin³⁰⁾, Plasmin³¹⁾ により分解されるといわれてきた。BAA 分解酵素が Trypsin 以外の酵素と仮定すれば、凝固能を示す Thrombin を除いた Cathepsin B と Plasmin がもっとも可能性のある酵素といえよう。しかしながら、Cathepsin B は細胞内蛋白分解酵素で、Trypsin と同じ基質分解態度を示す酵素であり、ここに用いた基質に対する分解能の差のみによっては Trypsin と区別できない。このため著者はまず Plasmin との比較検討を行った。

(1) 方法

第I章において述べた方法で、Casein, BAA, Fibrin, BAPNA 分解能を測定した。Plasmin はミドリ十字の製品を使用した。

著者はすでに Trypsin (NBC) の4つの基質に対する分解活性について検討し、1 Casein 単位 (C. U. と略

す) Trypsin は 10r にはほぼ相当することを知らしたので、Plasmin 0.5 C.U./ml~6 C.U./ml について、それぞれの基質分解能を測定した。

(2) 成績

図3に示したごとく、Casein, Fibrin の分解能については方法において述べたように、Plasmin 1 Casein unit (C. U.) が Trypsin 10r にはほぼ相当する。しかしながら BAA 分解能は 3 C. U. まで全くみとめられず、Trypsin の分解能とはいちじむることとなる。BAPNA についても 0.5 C. U. まで活性がなく Trypsin の BAPNA 分解能に比して Plasmin の分解能が低いことがわかる。

2. BAA 分解酵素にたいする加熱、EACA の影響

BAA 分解能を示す血漿酵素が Plasmin であるとすれば、加熱、EACA により影響をうけることが知られている。すなわち Lassen ら³⁷⁾は、Plasmin 活性が 60°C, 15分の加熱により破壊されることを明らかにし、岡本ら⁷⁰⁾は Fibrin を基質にした場合に、Plasmin が低濃度の EACA により特異的に阻害されると報告した。著者はこれらの点を応用し、まず加熱の影響について EACA を用い BAA 基質でも阻害効果がみられるかどうかを検討するため以下の実験を行った。

(1) 方法

オリーブ油注入肺炎犬の24時間後血漿について、第I章(5)-iii) の測定法にしたがって、BAA 分解能を測定し、同一血漿を、60°C, 15分加熱および EACA を最終濃度 10⁻¹M になるように加え、BAA 分解能を測定した。

(2) 成績

表5に示したように、対照は 34r/ml であり、60°C, 15分加熱した血漿の活性は 34, 28r/ml 平均 31r/ml

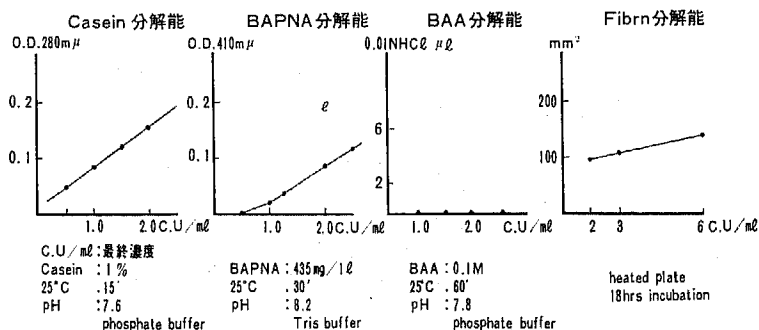


図 3. Plasmin の Casein, BAPNA, BAA, Fibrin 分解能

表5 血漿BAA分解能に対する加熱およびEACAの影響

	測定 1	測定 2	平均値
対照オリーブ油注入犬血漿	34 r/ml	34 r/ml	34 r/ml
60°C, 15分加熱	34	28	31
EACA (10 ⁻¹ M)	32	29	30

表6 血漿BAA分解能に対する加熱およびEACAの影響

	測定 1	測定 2	平均値
対照オリーブ油注入犬血漿	68 r/ml	68 r/ml	68 r/ml
60°C, 15分加熱	68	57	63
EACA (10 ⁻¹ M)	64	57	60

となり、その差が3r/mlで、すでに述べたように、BAA 測定の誤差範囲に近く、阻害率として計算しても8%で低いので、加熱の影響があるとはいえない。EACAを加えた血漿の活性は平均30r/mlで、阻害率は同じく8.8%となり明らかな阻害効果はみられない。

3. 小 括

PlasminのBAA分解能は3C.U.までみとめられない、BAPNA分解能も0.5C.U.まで0であり、Trypsinの活性とは態度がことなる。脾炎犬血漿のBAA分解酵素は加熱の影響をうけない。またEACAの影響もうけない。

III 実験脾炎犬脾組織の蛋白分解能

脾炎犬血漿にはBAA分解酵素が出現することをたしかめたが、この酵素は予期に反してウシTrypsinとは基質分解態度がことなることを明らかにした。著者は血中にBAA分解酵素のみられた実験脾炎犬の脾組織に、TrypsinおよびBAA分解酵素がみられるかどうかを検討した。

1. 実験材料および方法

(1) 実験動物

- i) オリーブ油注入群
- ii) 生食水注入群
- iii) 無処置群

の3群に分けて、第I章に述べた方法で、処置を行い、術後24時間目に、ミントール麻酔を施したのち、心臓穿刺により約50mlの空気を注入して殺した。ただちに開腹し、脾体部の一部を切除し、以下に述べる方法によって、脾ホモジネートを作製した。これらの各

群のイヌの血漿は、術前、術後24時間目に採取し、BAA, Fibrin, Casein, BAPNA 分解能を測定した。

(2) 脾組織ホモジネート作製法

脾炎犬脾組織は採取後ただちに、冷食塩水を入れたシャーレに移し、4°C前後に冷却しながら、脾組織片についている血液、血管、脂肪組織をできるだけとりさり、ほぼ1gの小片に切る。さらに濾紙上で水分をとり、化学天秤を用いて1gの組織塊とした。つぎに、あらかじめ氷水中で冷却したポッター型ホモジナイザーに、0.25M冷蔗糖溶液9mlと1gの組織片を入れ、10%ホモジネートを作製した。このホモジネートを冷却遠心機で4°C, 4000r.p.m., 15分間遠心沈澱し、上清をとって、脾ホモジネートとした。

(3) 酵素活性の測定法

i) BAA 分解能

第I章(5)-i)で、血漿0.5mlのかわりに脾ホモジネート0.5mlを加えて、同様に操作した。

ii) Casein 分解能

第I章(5)-ii)の方法を用い、血漿0.5mlにかえて脾ホモジネート0.5mlを加えた。

iii) Fibrin 分解能

加熱平板を用いて、第I章(5)-iii)の方法で測定した。血漿を滴下するところを脾ホモジネート0.03mlとした。

iv) BAPNA 分解能

第I章(5)-iv)の方法で、血漿を脾ホモジネートにかえただけでは、検体が混濁しているために、410mμでの測定ができない。著者は混濁をとりのぞくために、30% Acetic acidのかわりに、15% Trichloroacetic acid 1mlをくわえ、少くとも、30分以上室温に放置してから、濾紙を用いて濾過した。濾液は透明な液体としてえられた。30% Acetic acid 1mlを15% Trichloroacetic acid 1mlに変更したので、Trypsin(NBC)を用いて吸光度に変化を及ぼすかどうかを検討した。表7にみるように、30% Acetic acidに比して15% Trichloroacetic acidを加えたときの吸光度は、軽度低下をきたすことをたしかめた。この差は比較的

表7 BAPNA 呈色に対する30% Acetic Acid と15% TCA の影響

Trypsin r/ml	BAPNA + 30% Acetic acid O. D. (410mμ)	BAPNA + 15% TCA O. D. (410mμ)
5	0.075	0.070
10	0.152	0.143
15	0.260	0.240

表 8 脾ホモジネートの BAA, Casein, Fibrin, BAPNA 分解能

実験犬 No.	BAA分解能r/ml	Casein分解能r/ml	Fibrin分解能mmh	BAPNA分解能r/ml
オリブ油注入群	55	70	44	100
	56	17	24	163
	57	70	34	45
	22	15	12	25
	64	19	67	138
	70	4	60	210
	平均	36	40	113
生食水注入群	62	0	64	0
	65	0	35	335
	66	38	42	267
	68	42	88	217
	69	18	102	231
	平均	19	66	210
無処置群	42	8	24	21
	72	12	18	0
	73	19	22	42
	74	17	78	0
	平均	14	35	15

少いので、標準曲線を各測定ごとに作成して、被検脾ホモジネートの活性単位を求めた。また吸光度は Trichloroacetic acid を加えてから、30分放置後濾過し、ただちに測定した。

2. 成績

(1) 無処置対照群、表8に示すように、対照群の BAA 分解能は $8r/ml \sim 19r/ml$ の間にあり、平均 $14r/ml$ であった。Casein 分解能は、 $18r/ml \sim 78r/ml$ で、平均 $35r/ml$ であった。Fibrin 分解能は活性の全くみられない例、活性の高い例があり、一定の傾向がみられなかった。BAPNA 分解能は全例で全くみとめられなかった。

(2) 生食水注入群

BAA 分解能は表8に示すように平均 $19r/ml$ であり、Casein 分解能は $35 \sim 102r/ml$ 、平均 $66r/ml$ と高い活性をしめした。Fibrin 分解能は $0 \sim 335r/ml$ で活性0の例がみられた。

(3) オリブ油注入群

BAA 分解能は表に示すように $4r/ml \sim 70r/ml$ に分散しており、平均 $36r/ml$ であった。Casein 分解能は $12r/ml \sim 67r/ml$ 、平均 $40r/ml$ であった。Fibrin 分解能は $25mmh \sim 210mmh$ で、活性が全くみとめられない例はなかった。BAPNA 分解能は全例で0であった。

3. 小括および考按

無処置対照群の酵素活性は測定値のばらつきが大きい。すなわち Fibrin 分解能は $0 \sim 42mmh$ と開いており、脾ホモジネートの作製過程ならびに測定中の活性化が、それぞれの例において異なることを示していると思われる。しかし組織中に含まれている Trypsinogen, Chymotrypsinogen をはじめとする諸酵素の単純な活性化のみによらずれば、 $37^{\circ}C$ 、18時間も孵置すれば、全例に Fibrin 分解能の出現をみてもよいと考えられる。したがって活性化機序と Inhibitor 系の活性阻止の機序が複雑に働いている結果と推論した。

オリブ油脾炎群では BAA, Casein, Fibrin 分解能が全くみられない例はなく、無処置対照に比して活性の増加がみとめられる。

生食水注入対照群は、無処置対照群に比して Casein, Fibrin 分解能が高い。このことは生食水注入によっても、オリブ油脾炎群と同じように、脾組織中に酵素活性の上昇、ならびに諸操作の過程における活性化されやすい傾向がみられるためと考えられる。

以上より脾組織には、Casein, Fibrin 分解酵素、BAA 分解酵素が含まれており、無処置対照群の脾ホモジネートでは、これら酵素の活性化がおこり、BAA, Casein, Fibrin 分解能として測定された。オリブ油注入群では、BAA, Fibrin, Casein 分解能が、無処置対照に比して高値を示し、(1) 脾炎による酵素の

活性化、(2) 肺炎により測定操作中、活性化されやすい状態になる、などの要因が考えられた。BAPNA 分解能は全くみとめられなかった事実は興味がある。この点は後で検討したい。

IV 肺炎犬脾ホモジネートの Fibrin 分解能に対する EACA, AMCHA の影響

第II章において血漿 BAA 分解能に対する EACA の影響を検討したが、同様の方法を用い、Fibrin を基質として、EACA, AMCHA の阻害作用について検討を加えた。

1. 実験材料および方法

(1) 肺炎犬脾ホモジネート

第III章(1)および(2)の方法にしたがい作製した脾ホモジネートを用いた。

(2) EACA, AMCHA 含有フィブリン平板⁷⁰⁾

EACA および AMCHA (第一製薬) 純未を、EACA : $10^{-1}M \sim 10^{-3}M$, AMCHA : $10^{-3}M$ の最終濃度となるように Fibrinogen 溶液に加え、Thrombin を滴下して標準平板を作製した。加熱平板も第I章(5)-iii) にしたがって、EACA, AMCHA 加標準平板を加熱して作製した。

(3) 測定法

EACA, AMCHA を加えて凝固させた標準フィブリン平板および、加熱フィブリン平板上に、脾ホモジネート $0.03ml$ を滴下し、 $37^{\circ}C$, 18時間静置、溶解窓の面積をもって、活性をあらわした。また阻害剤を含まない標準、加熱平板の活性を求めて対照とした。

2. 成績

AMCHA $10^{-3}M$ を加えた加熱平板での活性は平均 $161mm$ で、対照の平均 $152mm$ との間に差をみとめない。また $10^{-1}M \sim 10^{-3}M$ の EACA を標準、加熱平板に加えたさいにも、対照と有意の差をみとめなかった。したがって、肺炎犬脾ホモジネートの Fibrin 分解能は AMCHA, EACA によって影響をうけなかった。

表 9 肺炎犬脾ホモジネートの Fibrin 分解能に対する AMCHA, EACA の影響 (加熱平板上)

	対 照	AMCHA($10^{-3}M$)	EACA($10^{-3}M$)
No.55	100mm	136mm	130mm
No.56	163	138	128
No.64	138	190	140
No.70	210	182	211
平均	152	161	152

表 10 肺炎犬脾ホモジネートの Fibrin 分解能に対する EACA の影響

EACA 濃度	Standard Plate			Heated Plate		
	M	mm	平均mm	mm	mm	平均mm
10^{-1}	232	225	228	175	156	165
10^{-2}	247	232	249	189	100	142
10^{-3}	263	247	255	263	247	255
Control	247	228	237	189	169	179

3. 小 括

肺炎犬脾ホモジネートの Fibrin 分解能にたいして、AMCHA, EACA の阻害効果はみとめられない。したがって Fibrin 分解に関与する諸酵素のうち Plasmin の活性はみとめられない。

V 肺炎犬脾ホモジネートの DEAE セルロースカラムによる検討

第I章で肺炎犬血漿は BAA 分解能を示す酵素を含んでいることをたしかめ、第III章において、脾ホモジネート中に BAA, Casein, Fibrin 分解能を示す酵素が含まれていることを証明した。血漿中の BAA 分解能を示す酵素と同じ態度を示す酵素を、脾ホモジネートから分離しようとして以下の検討を行った。

1. 実験材料および方法

(1) 肺炎犬脾ホモジネート

第I章の(2)の方法により、オリーブ油肺炎犬をつくり、第III章(2)にしたがって、脾ホモジネートを作製した。脾ホモジネート $5ml$ を Starting phosphate buffer (pH6.5, 0.005M) に一夜、 $4^{\circ}C$ で透析してカラムにかけた。

(2) DEAE セルロースカラムの調整

DEAE セルロース (Brown, 1.10meq/g) を水で膨潤させてのち、再蒸水および 1N NaOH で繰返し洗浄した。ついで $0.005M KH_2PO_4$ で pH を調整、再び再蒸溜水で洗い Starting phosphate buffer を 3 カラムレングス流して平衡化させた。ついで $20 \times 250mm$ のカラムに充填した。

(3) 溶出の条件⁴⁰⁾

溶出は塩濃度勾配をかけて行った。すなわち、Starting phosphate buffer を流し、Cationic protein を充分に溶出せしめてから、Starting phosphate buffer を入れる 1ℓ の広口ビンと $0.4M$ Phosphate buffer 1ℓ を入れるビンをビニール管でむすび、Starting phosphate buffer の入ったビン (混合槽) の下に、マグネチックスターをおき、よく混和せしめながら、塩濃度勾配をつくり、Anionic protein の溶出を行っ

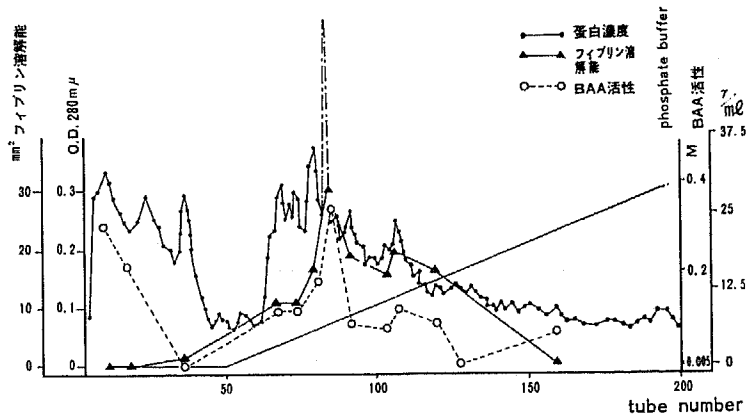


図 4. 膵炎犬膵ホモジネートの DEAE-セルロースカラムクロマトグラフ

た。溶出は 24ml/hr の流速で行い、分各画は 4 ml とした。流出液量は混合槽の液量の 1/2 を越えないように注意した。

(4) 蛋白濃度の測定

日立分光々度計 139 型を用い、280m μ で吸光度を測定し、その値をもって蛋白濃度にかえた。

2. 成 績

図 4 にみるように、Cationic protein の山と Anionic protein の山に大きくわけられ、それぞれの山は、さらに 3 つと 4 つのピークに分けられた。前の山には BAA 分解能をみとめるが Fibrin 分解能が全くみとめられなかった。後の山には、BAA 分解能と Fibrin 分解能がみとめられた。

3. 小 括

DEAE セルロースカラムにより膵炎犬膵ホモジネートを分画し、Anionic protein に属するピークに BAA 分解能と Fibrin 分解能をみとめ、Cationic Protein に相当する分画には、BAA 分解能を示し、Fibrin 分解能をしめさないピークをみた。後者は血漿 BAA 分解酵素に類似した分解態度を示した。

VI BAPNA に関する 2, 3 の検討

第 III 章においてすでに指摘したように、BAPNA は他の Casein, Fibrin, BAA 基質とは、被分解性において若干態度をこととしている。とくに膵炎犬膵ホモジネートは Casein, Fibrin, BAA 分解能を示すが、BAPNA 分解能がみられない。そこで、イヌ膵液および膵ホモジネートを Enterokinase で活性化し、BAPNA 活性を示すかどうか、またイヌにウシ Trypsin を静注し、BAPNA 分解能を測定し、どうかを検討した。

1. 方法および材料

(1) BAPNA

BAPNA (Sigma) を Tris buffer (pH 8.2, 0.05M) にとかし、 10^{-8} M 溶液として第 I 章(4)-iv) にしたがって測定した。

(2) Trypsin

持田製薬の製品で、塩類を含まない Trypsin を使用した。

(3) 膵炎犬膵ホモジネートの作製

第 III 章(2)の方法にしたがった。

2. 膵炎犬膵ホモジネートおよび膵液の Enterokinase 活性化による BAPNA 分解能の変化

表 11 に示すように Enterokinase 活性化により、膵ホモジネートの BAPNA 分解能が出現する。Enterokinase には BAPNA 分解能がみられない。したがって、膵炎犬膵ホモジネート中には、Trypsinogen が含まれており、Enterokinase により活性化されて、BAPNA 分解能を示すことがわかった。膵液についても表に示すように Enterokinase により活性化され、BAPNA 分解能がみられた。

表 11 Enterokinase 活性化による膵炎犬膵ホモジネートの BAPNA 分解能

	BAPNA 分解能 O.D.(410m μ)
1) 膵炎犬膵ホモジネート	0.005
2) 膵炎犬膵ホモジネート + Enterokinase	0.072
3) 膵液 + Enterokinase	0.300
4) Enterokinase	0.002

(0.2% Enterokinase 0.1ml 加え
37°C. 1 時間, 静置)

表 12 Trypsin 静注のさいの血漿 BAPNA分解能

	BAPNA分解能 O.D.(410m μ)
Vor.	0.010
30'	0.330
60'	0.127
90'	0.052
120'	0.060
150'	0.018
180'	0.013
300'	0.003

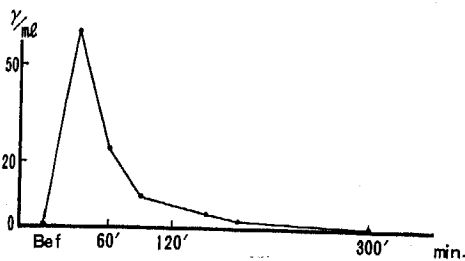


図 5. Trypsin 静注による血漿 BAPNA 分解能の経時的変動

3. Trypsin 静注時の血漿 BAPNA 分解能の変動

雑種成犬に、Trypsin 20万単位を10分かけて、静注し、経時的に採血、BAPNA 分解能を測定した。

成績

図5、表12に示すように、ウシ Trypsin を静注するさいには、BAPNA 分解能を測定できた。活性は急激に減少し、300分では全くみとめられなかった。

4. 小括

BAPNA 分解能は、イヌ膵ホモジネートを Enterokinase を用いて活性化するさいに出現した。またウシ Trypsin をイヌに静注すると、経時的に300分まで、BAPNA 分解能を測定できた。

VII 総括ならびに考按

最近 Column chromatography の応用により、ウシ膵液⁽⁴¹⁾、ブタ、イヌの膵液⁽⁴²⁾、アヒル膵組織水分解物⁽⁴³⁾より、Trypsinogen, Procarboxypeptidase A, B, Chymotrypsinogen A, B, Elastase などの蛋白分解酵素を分離することに成功し、免疫学的な同定⁽⁵¹⁾を加えて、膵液成分と Zymogen granule とが同一の酵

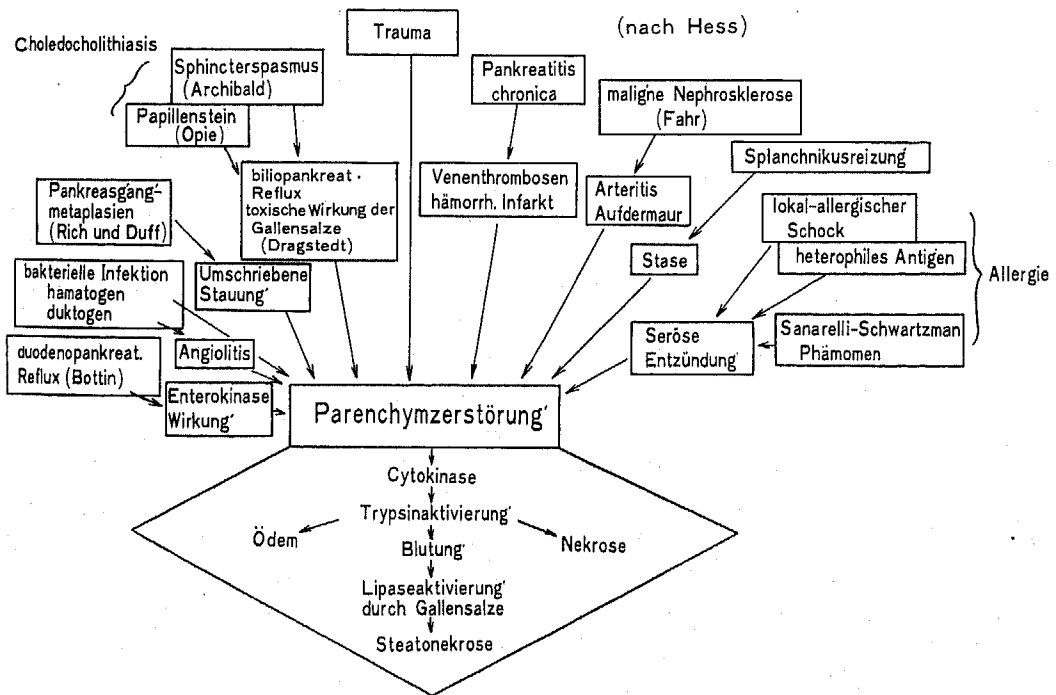


図 6.

Pathogenetische Möglichkeiten bei akuter Pankreasnekrose

素組成⁴⁴⁾⁴⁵⁾をもっていることが明らかにされた。また膵組織そのものについて、Anti-chymotrypsinogen, Anti-desoxyribonuclease, Anti-carboxypeptidase 血清を用いて、細胞内の顆粒に酵素の局在がたしかめられた⁴⁶⁾。しかしながら、これらの酵素が急性膵炎においてはたす役割については、いまだに直接的な証明がえられていない。図6に示すように、急性膵炎の原因は膵管系および血管系の障害、感染、栄養などが関与すると考えられている。初期の研究では、胆道系との関係が注目され⁴²⁾、急性出血性膵炎の病像が、血管の壊死、組織の壊死を中心とする出血であるとし²³⁾、Trypsin による自己消化が関与しているとする立場より、胆汁が Trypsinogen 活性化をきたすのではないかと考えられた。しかし White, Magee⁴³⁾により、胆汁、胆汁酸の Trypsinogen 活性化は否定された。実験膵炎の検討では、高压で膵管系に、種々の物質を注入すること⁴⁷⁾、膵管系の結紮と Secretin の静注⁴⁸⁾など、膵管系の破綻をきたす操作により、膵炎を起しうることより、(1)膵管系の破綻による間質への酵素の逸脱²⁾¹³⁾、(2)膵外分泌細胞の障害と細胞内蛋白分解酵素の活性化により²⁾¹⁴⁾、膵炎が発生すると推定されている。しかしながら実験膵炎の膵組織について直接、Trypsin 活性を証明しようとした Beck ら⁷⁾は、明らかな Trypsin 活性をみとめず、Trypsinogen 含有量の減少もみとめなかった。ヒト膵炎の血中 Trypsin は Nardi²⁵⁾により、膵炎、膵癌に著明な上昇をみると報告されたが、Gullick²⁸⁾の成績を除けば、Nemir²⁶⁾、Butin²⁷⁾らは明らかな Trypsin 活性の上昇をみとめなかった。このような成績の不一致は、Trypsin 測定の困難なことが大きな原因であり、この困難は基質および Trypsin 阻害物質に関する測定上の問題に分けられよう。

Trypsin の基質は現在のところ、Hemoglobin, Casein, Fibrin などの蛋白基質と BAA などの合成基質が用いられている。蛋白基質は血中の各種蛋白分解酵素により分解されるため、特異性に乏しい。この点を解決するために、合成基質が広く応用されるようになった。この基質の一つである BAA は Bergmann ら (1939)⁴⁹⁾により、Trypsin 基質として導入された。また Sanger ら⁵⁰⁾は、Trypsin が Lysine, Arginine の関与する Peptide を切断することを明らかにした。これらの研究を基礎にして、Nardi は始めて BAA 基質を膵疾患の診断に応用し、膵炎、膵癌患者血清に BAA 分解能の上昇をみとめ、この活性を Trypsin によるとして臨床的有用性を強調した。その後の追試で Gullick²⁸⁾は膵炎のみで軽度の BAA 活性上昇をみと

め、Nemir²⁶⁾、Butin²⁷⁾、Vartio らは膵炎、膵癌に特徴的な変化をみとめなかった。同一基質についても成績がまちまちであるが、これは臨床例で発症より測定までの期間が一定しないこと、Trypsin 活性がかならずしも Amylase, Lipase 活性と平行しないことなどによると考えられた。BAA 活性の上昇を報告した Gullick らの成績も Nardi の報告ほど高くなく、対照のとり方によっては、有意の差とは認めにくい場合のあることも注目されている。Bergmann⁴⁹⁾らは Trypsin の Esterase 作用は、BAA などの Amidase 作用に比して60倍強いことを報告していたが、Floch ら⁵²⁾はこの点を応用し BAEE を用いて膵炎9例、膵癌3例について、Trypsin を測定し、正常者の平均 32.42 ± 4.6 micromoles/hr. に比し、膵炎、膵癌では 25.15 ± 4.6 micromoles/hr. と低く、診断的価値はみとめなかった。しかし Brown⁵³⁾は同じ BAEE を用い、膵癌、急性膵炎、慢性膵炎13例で、活性の上昇を報告した。また BAEE よりさらに分解されやすい *p*-Toluene-sulfonyl-L-arginine methyl ester (TAME) を用いた検討でも Siegelman ら⁵⁴⁾は活性の上昇を、Butin²⁷⁾は有意の上昇はないと報告した。どの報告でも Esterase 活性は正常血清中にみとめられているため、活性の変動を意味づけることが困難である。また一方、Ester である BAEE, TAME とともに Plasmin の基質であり⁵⁰⁾、Amide に比して特異性の点でも劣っている。したがって Peptide 基質の方が優れていると云えよう。

BAPNA は Erlanger, Kokowsky & Cohen³⁴⁾により新しく合成された Trypsin の基質である。Trypsin により Hydrolysis をうけ、*p*-Nitroaniline の黄色を呈する。BAA の場合は Amide-lysis により NH_3 が発生し、この微量定量の操作が複雑であるが、BAPNA の場合は直接光電比色により定量できるため測定が簡単で正確である。すでに示したように Trypsin 2.5 γ ~ 30 γ の範囲で直線を示し、Erlanger ら³⁴⁾の Kinetic study によると BAPNA : Km ($\text{M} \times 10^3$) 0.939, k_3 0.611, BAA : Km ($\text{M} \times 10^3$) 2.1, k_3 0.18 であり BAA より分解をうけやすい。至適 pH は 8.1 附近にあり、BAA と大きな差はない。BAPNA 分解酵素に関する検討では、Papain によって分解されることが指摘されている³⁴⁾。われわれの検討では Plasmin によっても分解された。

著者は Trypsin を測定するためには、Proteinase とくに Endopeptidase としても活性を測定しなければならず、したがって BAA 分解能、BAEE 分解能のみの測定では不充分である点に注目し、同一検体を

BAA, BAPNA, Casein, Fibrin を用いて検討した。ウシ Trypsin (NBC) を基準として、この 2.5r~30r が BAA, BAPNA, Casein, Fibrin を用いて検出していることをたしかめた。分解能を Trypsin (NBC) の t/m によって表示した。

オリーブ油注入実験肺炎犬血漿の BAA 分解能は上昇をみたが、Fibrin, BAPNA 分解能は全くみとめられず、Casein 分解能は低かった。したがって Amidase としての活性に比して Proteinase 活性が低いといえよう。BAA 分解能に関しては、荒木⁶⁰⁾、新田⁶⁷⁾の胆汁注入による実験的脾障害で成績と一致するが、BAPNA 分解能の変動については報告がない。Casein 分解能については Rush¹⁰⁾が、血清 Euglobulin 分画について、肺炎のさいに活性の上昇をみとめているが、この活性は Plasmin, Plasminogen によると考える方が妥当であろう。教室の市川はフィブリン平板法⁶⁰⁾で、血漿には活性をみとめず、Euglobulin 分画を用いた Euglobulin lysis time によっても⁶⁴⁾、術後 48時間ではかえって活性の低下をみた。このように Protein を基質とした場合には明らかな活性の上昇を証明することができない点は注目すべきであろう。

緒言においてすでに述べたように、BAA 分解能を示す酵素は Trypsin 以外に Plasmin, Cathepsin B, Thrombin が記載されている。Plasmin は生理的に、Plasminogen として血中に存在すること、合成基質 TAME, BAEE²⁴⁾⁵⁰⁾を分解できるため、古くより BAA 分解酵素としてあげられていた。Trypsin との異同については、Plasmin が 50~60°C の加熱により不活性化されるのに比し、Trypsin は安定である³⁷⁾。また最近、Plasmin は Peptide 分子中の Lysyllysine と Arginyltryptophan のみしか分解せず、BAA を水解できないと報告されている⁵⁹⁾。EACA, AMCHA の影響についても岡本らにより Trypsin の Fibrin 分解能は全く阻害しないと報告されている⁷⁰⁾。著者は BAA 分解酵素に Fibrin 分解能がみとめられないこと、60°C、15分の加熱に耐性を示すことを明らかにした。また Plasmin は少くとも 3 C.U. すなわち Trypsin 30r に相当する量までは、BAA 分解能をみなかった。もしこの BAA 分解能が Plasmin によるとすれば、Fibrin 分解能、Casein 分解能がみられないことが説明できない。これらの事実より肺炎犬血漿の BAA 酵素は Plasmin ではないと結論した。

細胞内の蛋白分解酵素である Cathepsin B はもともと Trypsin との類似性より分類命名されているので、BAA, BAEE を分解し、Casein, Fibrin 分解能を示し、Trypsin と同じ基質分解能を有する。しか

し Trypsin とは至適 pH が 5.3 とより酸性で、SH 化合物により活性化され、Iodoacetamide で阻害される点に差異がみられる。著者はこの点について検討を行っていないのでここに用いた四つの基質に対する分解態度のみでは区別できないことを述べるにとどめた。

Thrombin は Prothrombin として生理的に血中に存在する酵素である。Thrombin が Proteolytic activity を有することは、Fibrinogen, Casein, β -lactoglobulin, Gelatin を使ったしらかめられている。合成基質に対する分解能は Sherry, Troll³⁰⁾が BAA, BAEE についてたしかめた。Thrombin の BAA 分解能は TAME, BAEE などの Esterase 活性に比して著しく低い³⁰⁾。Sherry³⁰⁾の測定では 250 units という大量の Thrombin を用い、2hr の Incubation time でかろうじて活性をみとめている。松岡⁶⁰⁾は家兎に Thrombin 125 units を耳静脈より注射し、全例激しい痙攣を起して死亡したと述べている。実験肺炎の凝固能は報告者により成績が一致していないが、最近の成績では術後より数時間後までは Prothrombin 時間、凝固時間の短縮があり、48時間以後は正常ないし延長を示すとされている。これらの事実を考えあわせると、急性肺炎の血漿にあらわれる BAA 分解能が、Thrombin によるとは考えにくい。

最後に Trypsin が BAA 分解能を示すと考えるならば、そしてまたその可能性が大きいと考えられるが、何故に蛋白基質に対する活性が殆んどみられず、Amidase として合成基質に対する活性のみが測定されるという分解能の分離が起りうるであろうか。この点に関して二つの可能性が考えられる。第一には Trypsin が血中ですみやかに分解される過程において、基質との結合性に変化をきたしてくる場合であり、第二には Trypsin-Trypsin inhibitor 結合により、Trypsin と基質の結合性に変化をきたす可能である。第一の場合には、Trypsin より分子量の小さい活性体が存在するかどうかの問題である。Trypsin による S-Sulphotrypsinogen の分解に関しては、Trypsin の構造決定の過程で、Lysine, Arginine の関与する Peptide 結合が切断され、アミノ酸 2 コの Dipeptide から 26 コの Polypeptide まで分離、精製されている⁶⁵⁾。このような小分子の Polypeptide に酵素活性があるとは考えられない。したがって Trypsin による Trypsin, Trypsinogen に分解が Lysine, Arginine の関与する Peptide に平等に作用しているとすれば、この作用を妨げ、活性中心を残し、他の部分の Polypeptide のみを切断しなければならず、蛋白又は

Polypeptide による活性中心の保護が必要と考えられる。Hessら⁶⁰⁾は Trypsin の自己分解を行わせ、セロファンチューブに対する透過性より、通常知られている Trypsin より小分子量の酵素活性を示す Minor Enzyme の存在を推定し、不活性の蛋白を、Trypsin 自己分解反応系に入れるとこの Minor Enzyme の量が多くなると報告したが、上に述べた推論をうらづける成績と考えられる。

第二の可能性は、Trypsin inhibitor との結合により蛋白基質と BAA の分解能に差を生ずる場合である。肺炎で血中に逸脱する Trypsin はすみやかに分解されると同時に、血中に大量存在する Trypsin inhibitor と結合して活性を失ない運搬される。最近旭⁶⁷⁾は抗 Trypsin 抗体による検討で、Casein 分解能はきわめて阻害をうけやすいが、BAA 分解能は阻害されにくいと報告している。また Haverback²¹⁾らの成績では α_2 -globulin 分画の Antitrypsin と結合した Trypsin に、ある基質に対する分解能がみられたという。このような事実は Trypsin と Antitrypsin 結合体に蛋白基質と合成基質に対する分解能の解離が存在するという推論を支持すると考えられる。以上肺炎血漿にみられる BAA 分解酵素について、とくに Trypsin の関与について二つの可能性を述べたが、これらの点に関してはさらに検討を要するので、ここでは推論と可能性を指摘するにとどめたい。

血漿中の BAA 分解酵素に対して、脾組織ホモジネートの酵素活性はオリーブ油、生食水、無処置群で、BAA, Casein, Fibrin 分解能がみられた。このことは脾ホモジネート作製および測定のプロセスでの活性化を示すと考えられるが、肺炎の存する場合の方がより活性化されやすいといえよう。一方 BAPNA 分解能は全くみとめられないのが特徴的である。脾ホモジネートに Enterokinase を加えて孵置すると、BAPNA 分解能が出現することより、ホモジネート中に Trypsinogen が存在し、Trypsin に転化することがわかる。したがってウシ Trypsin 型の Free Trypsin は BAA 分解酵素として関与していないといえよう。Troll⁶⁸⁾, Eisenhart⁶⁹⁾は脾障害時の脾ホモジネートに Trypsin 活性をみとめたと報告しているが、BAA 分解能、Azocasein 分解能の上昇をもってただちに Trypsin 活性とするには問題がある。この点で Willig¹⁶⁾のいう Proteolytischen Restaktivität の関与を支持したい。この酵素は BAPNA 分解能がなく、Azocasein 分解能を有し、中性領域で活性を有するとされているが、まだ分離、精製には成功していない。

肺炎犬脾ホモジネートを DEAE セルロースカラムにより分画し、Cationic protein に属する前の部分に BAA 分解能を有し、Fibrin 分解能のない分画を証明した。この分画に含まれる酵素(または酵素群)は肺炎犬血漿 BAA 酵素と似た性質を示しているので、本酵素が血中に逸脱したと考えたい。

以上実験肺炎犬血漿および脾組織の BAA 分解能を示す酵素を中心に検討を加えた。とくに Plasmin Thrombin の関与を否定し、Nardi らの主張することく BAA 分解酵素すなわち Trypsin とはいえない点を強調したい。Trypsin 測定法にかんして、BAPNA を応用する利点を述べ、3の基礎的問題についても検討した。

結 語

実験肺炎犬を作製し、血漿および脾組織について、BAA, BAPNA, Casein, Fibrin [を用いて分解能を測定した。また血漿および組織の BAA, Fibrin 分解酵素について、加熱、Plasmin 阻害剤の影響を検討。脾組織ホモジネートの DEAE セルロース分画について BAA, Fibrin 分解能を測定し次の結果をえた。

1. 肺炎犬血漿 BAA 分解能は、術後24時間に上昇したが、Fibrin, BAPNA 分解能は全くみられず、Casein 分解能は著しく低かった。
2. 肺炎犬血漿の Antitrypsin 活性は一定の傾向をみなかった。
3. Plasmin (ミドリ十字製)は3Casein units まで BAA 分解能をみなかった。
4. 肺炎犬血漿 BAA 分解能は60°C, 15分の加熱、EACA の影響を受けなかった。
5. 肺炎犬脾ホモジネートは BAA, Casein, Fibrin 分解能を示した。
6. 肺炎犬脾ホモジネートの Fibrin 分解能は60°C 15分の加熱、EACA, AMCHA の影響をうけなかった。
7. 肺炎犬脾ホモジネートに Enterokinase 加えて孵置すると BAPNA 分解能が発現した。
8. 肺炎犬脾ホモジネートの DEAE セルロースカラム分画で、血漿中にみられる BAA 分解酵素と似た基質分解態度を示す酵素(または酵素群)がみられた。
9. ウシ Trypsin をイヌに静注したさいには、300分まで、BAPNA 分解能を検出できた。

以上より実験肺炎犬血漿には BAA 分解酵素がみられるが、本酵素はウシ Trypsin とことなり、Plasmin とも区別された。また血漿 BAA 分解酵素が脾組織に由来する可能性を指摘した。

本論文の要旨は第28回日本血液学会総会および第63回日本内科学会総会において発表した。

稿を終るにあたり、御指導、御校閲を賜った恩師小田正幸教授に深甚な謝意を表するとともに、有益な助言と協力を惜しまれなかった萩原洋三助教授、市川澄夫博士、本間達二博士をはじめ教室員各位に深謝いたします。

本研究の一部は厚生省癌研究助成費によった。

文 献

- 1) Opie, E. L. and Meakins, J. C. : J. exp. Med., 11 : 561, 1909.
- 2) Rich, A. R. and Duff, G. L. : Bull. Johns Hopk. Hosp., 58 : 212, 1936.
- 3) Stein, A. et al. : Ann. Surg., 142 : 690, 1955.
- 4) Grossman, M. J. : Arch. intern. Med., 96 : 298, 1955.
- 5) Anderson, M. C. et al. : Surg. Gyn. Obst., 107 : 693, 1958.
- 6) Haverback, B. J. et al. : Amer. J. Med., 29 : 424, 1960.
- 7) Beck, I. T. et al. : Gastroenterology, 43 : 60, 1962.
- 8) Magee, D. F. et al. : Brit. J. Surg., 53 : 809, 1966.
- 9) Storer, J. and Kazdan, P. : Surgery, 33 : 683, 1953.
- 10) Rush, B. and Clifton, E. E. : Surgery, 31 : 349, 1952.
- 11) Innerfield, I., Angrist, A. and Benjamin, J. W. : Gastroenterology, 19 : 843, 1951.
- 12) Innerfield, I. et al. : Amer. J. Med., 12 : 24, 1952.
- 13) Richman, A. : Amer. J. Med., 21 : 246, 1956.
- 14) Hess, W. : Chirurgie des Pankreas, 1950, Benno Schwabe, Basel.
- 15) Blumenthal, H. T. : Pancreatitis, 1st., ed., 1958, Charles C Thomas, Illinois.
- 16) Willig, F. : Klin. Wschr., 43 : 125, 1965.
- 17) Janowitz, H. D. : Gastroenterology, 42 : 481, 1962.
- 18) White, T. T. : Pancreatitis, pp99, 1966, Arnold LTD, London
- 19) 藤本稔 : 臨床病理, 10 : 584, 1962.
- 20) Buudy, H. F. and Mehl, J. W. : J. clin. Invest., 37 : 947, 1958.
- 21) Haverback, B. J. et al. : Amer. J. Gastroent., 34 : 481, 1960.
- 22) Anson, M. L. : J. gen. Physiol., 22 : 79, 1938.
- 23) Northrop, J. H. : J. gen. Physiol., 6 : 723, 1924.
- 24) Schwert, G. W., Neurath, H. and Kaufman, S. : J. biol. Chem. 172 : 221, 1948.
- 25) Nardi, G. L. : New Engl. J. Med., 258 : 797, 1958.
- 26) Nemir, P. : Surgery, 46 : 35, 1959, (Discussion)
- 27) Butin, J. W. and Graham, W. D. : Gastroenterology, 40 : 669, 1961.
- 28) Gullick, H. D. : New Engl. J. Med., 268 : 851, 1963.
- 29) Fruton, J. S. et al. : J. biol. Chem., 226 : 173, 1957.
- 30) Sherry, S. and Troll, W. : J. biol. Chem., 208 : 95, 1954.
- 31) Troll, W. et al. : J. biol. Chem., 208 : 85, 1954.
- 32) 安部英 : 日本血液学全書 6 - II, pp806, 1965, 丸善
- 33) 大柴進 : 線維素溶解現象測定法, pp17-23, 1962, プラスミン測定法研究会, 関西地区.
- 34) Erlanger, B. F. et al. : Arch. Biochem. Biophys., 95 : 271, 1961.
- 35) Nardi, G. L. : J. Lab. clin. Med., 52 : 66, 1958.
- 36) Kunitz, M. : J. gen. Physiol., 30 : 291, 1947.
- 37) Lassen, M. : Acta physiol. scand., 27 : 371, 1953.
- 38) Bergström, K. et al. : Acta med. scand., 168 : 291, 1960.
- 39) 西山恵夫 : 阪市大医誌, 12 : 97, 1963.
- 40) Keller, P. J. et al. : J. biol. Chem., 236 : 1407, 1961.
- 41) Neurath, H. et al. : J. biol. Chem., 233 : 344, 1958.
- 42) Desnuelle, P. et al. : Biochim. biophys. Acta (Amst.), 50 : 186, 1961.
- 43) Uriel, J. et al. : Biochemistry, 4 : 1740, 1965.
- 44) Cohen, E. et al. : J. biol. Chem., 236 : 1407, 1961.
- 45) Green, L. J. : J. biol. Chem., 238 : 2054, 1963.
- 46) Marshall, J. M. : Exp. Cell Res., 6 : 240, 1954.
- 47) Elliott, D. W. et al. : Ann. Surg., 146 : 669, 1957.
- 48) Menguy, R. B. et al. : Arch. Surg., 74 : 881, 1957.
- 49) Bergmann, M. : J. biol. Chem., 127 : 643, 1939.
- 50) Neurath, H. : Ann. N. Y. Acad. Sci., 68 : 11, 1957. (より引用)
- 51) Uriel, J. : Ann. N. Y. Acad. Sci., 103 : 956,

- 1963.
- 52) Floch, M. et al. : *New Engl. J. Med.*, 274 : 129, 1966.
- 53) Brown, M. E. : *New Engl. J. Med.*, 260 : 331, 1959.
- 54) Siegelman, A. M., Carlson, A. S. and Robertson, T. : *Arch. Biochem. Biophys.*, 97 : 159, 1962.
- 55) Murray, M. : *Amer. J. clin. Path.*, 31 : 107, 1959.
- 56) 荒木登 : *日本消化機病学会雑誌*, 57 : 435, 1960.
- 57) Nitta, T. : *日本外科宝函*, 33 : 703, 1964.
- 58) Obata, K. : *日本外科宝函*, 34 : 55, 1965.
- 59) 永松淳雄 : *代謝*, 2 : 195, 1965.
- 60) 松岡松三 : *最新医学*, 14 : 2477, 1959.
- 61) Lasher, E. P. and McCabe, M. M. : *Arch. Surg.*, 60 : 164, 1950.
- 62) Shinowara, G. Y. et al. : *Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.)* 83 : 423, 1953.
- 63) Encke, A. et al. : *Klin. Wschr.*, 44 : 90, 1966.
- 64) 市川澄夫 : *信州医学雑誌*, 16 : 576, 1967.
- 65) Hofmann, T., Walsh, K. A. et al. : *Fed. Proc.*, 22 : 528, 1963.
- 66) Hess, G. P. and Wainfan, E. : *J. Amer. chem. Soc.*, 80 : 501, 1958.
- 67) 旭正一 : *アレルギー*, 15 : 245, 1966.
- 68) Troll, W. Doubilet, H. : *Gastroenterology*, 19 : 326, 1951.
- 69) Eisenhart, R. H., Hartzell, G. W. et al. : *Fed. Proc.*, 20 : 252, 1961.
- 70) Okamoto, S. and Oshiba, S. : *Keio J. Med.* 11 : 117, 1962.

(昭和43年10月15日 受付)