

低酸素環境下の膵臓磷脂質代謝およびこれにおよぼす 抗生物質の影響に関する研究

関西医科大学外科学講座 (指導: 山本政勝教授)

田 中 俊 郎

STUDIES ON PHOSPHOLIPID METABOLISM OF PANCREAS UNDER HYPOXIC CONDITIONS AND INFLUENCE OF ANTIBIOTICS

Toshiro TANAKA

Department of Surgery, Kansai Medical University

(Director: Prof. Masakatsu Yamamoto)

急性膵炎犬をモデルとして、低酸素環境下における膵臓の磷脂質代謝に及ぼす phospholipase の役割を検討し、さらにこの酵素活性に阻害的に作動すると思われる薬剤とくに抗生物質を中心に検討を行った。膵炎発症後24時間で膵臓の総脂質は65%、磷脂質は45%、蛋白質は76%に減少したがとくに磷脂質の減少が顕著であった。この際、lecithin が減少し lysolecithin および遊離脂肪酸の増加が認められた。さらに、lecithin, phosphatidylethanolamine, lysolecithin などの構成脂肪酸は飽和脂肪酸が増加し、不飽和脂肪酸が減少する傾向がみられ、遊離脂肪酸では逆の傾向がみられた。一方、抗生物質に関しては、benzylpenicillin, carbenicillin, tetracyclin には著明な phospholipase 活性阻害効果が認められたが、polymyxin B には阻害効果は認められなかった。

索引用語: 急性膵炎, 磷脂質代謝, phospholipase, 脂肪酸分析, phospholipase inhibitor

I 結 言

種々の臓器細胞は、低酸素環境下にさらされると、ついには細胞壊死に陥いることは自明の理ではあるが、細胞壊死に至る過程に認められる様々な生理生化学的、形態学的変化に関してはなお不明の点も多い。そこで虚血性低酸素環境下での臓器細胞の動態を解明することは、細胞病態の代謝研究上重要な問題点の一つと考えられる。

生体膜は、蛋白質とともに磷脂質から構成されているが、この磷脂質の流動性 (fluidity) は、外界からの種々の刺激、情報によって変化を受けて細胞内の代謝系が巧妙に調節される結果、細胞機能、ひいては生物全体の“恒常性”が維持されるものとされている¹⁾。

一方、膵臓のミトコンドリアは、脳および心臓、腎臓などのミトコンドリアについて虚血性低酸素環境に対しては脆弱であるとの報告がある²⁾。したがって、虚血性低酸素環境下で膵臓細胞が壊死に至る過程では、内因性ホスホリパーゼなどの一連の酵素系の活性化が惹起され、生体膜の磷脂質の代謝に変化が生じ、ひいて

は細胞機能にも影響をおよぼすものと考えられる。

また、Creutzfeld³⁾、本庄⁴⁾らは実験的に急性膵壊死を作製して検討した結果、急性膵炎 (急性膵壊死) の発症に際してのホスホリパーゼの果す役割の重要性を指摘している。また一般に、細菌の contamination が認められない際の急性膵炎 (急性膵壊死) は、non-infectious inflammation と考えられている。

一方、近年磷脂質代謝およびホスホリパーゼに関する詳細な研究が積極的に行われた結果、クロルプロマジン⁵⁾、テトラカイン⁶⁾、ポリミキシン B⁷⁾ などにはホスホリパーゼに対する活性阻害作用のあることが報告されるようになった。

このような観点に立脚して今回著者は、前編においては実験的に作成した急性膵壊死について、虚血性低酸素環境下における膵組織の変化を主として磷脂質代謝を中心に検討を加えた。

さらに後編では、急性膵炎 (急性膵壊死) の際に認められた膵臓における磷脂質代謝の変化を in vitro において再現し、併せて虚血性低酸素環境下における膵

臓器代謝および内因性ホスホリパーゼ活性におよぼす種々の薬剤、とくに抗生物質の影響を中心に実験的に検討を行った。

II 前 編

1. 実験材料および方法

(i) 実験材料

実験動物としては体重7.0~15.0kgの成熟健全犬を用いた。実験試薬中ケイ酸およびシリカゲルHはそれぞれMallinckrodt Chemical Work (st. Louis, USA)およびMerk AG (Darmstadt, Germany)より購入、活性アルミナ(200mesh)、セライト545は半井化学(京都)より購入した。クロロホルム(CHCl₃)、メタノール(CH₃OH)、ヘキサンなどの有機溶媒はすべて使用前に再蒸留したものを使用した。

(ii) 急性膵炎の作成法

17時間絶食させた成熟健全犬に対して10mg/kgのイソゾール(吉富製薬)を静脈内投与後、仰臥位に固定の上、上腹部正中切開を施して開腹した。まず対照として膵右葉を結紮切除のち、副膵管を結紮離断した。ついで胆嚢穿刺により得られた自家胆汁0.5ml/kgを主膵管より加圧下に急速注入の上、この主膵管も二重に結紮し離断した。このようにして作成した急性膵炎犬においては表1に示したように血清アミラーゼ値(Caraway法⁹⁾)は、急性膵炎誘発後6時間で230%、さらに炎症増悪につれて24時間後では320%まで上昇をつづけた。

(iii) 総脂質の調製

湿重量約1gの膵臓からBligh-Dyer法⁹⁾に従って総脂質の抽出を行った。すなわち、細切した膵組織に

蒸留水5mlを加えた後、Ultra-Turrax(Ika werk)を用いて十分ホモジナイズした。ついで総量8mlとなるように蒸留水を加えてそのうち0.5mlを蛋白質定量(kjeldahl法)に供し、残りは蒸留水0.5mlを加えた後、CH₃OH 20mlを加えて十分攪拌後、さらにCHCl₃ 10mlを加えて十分攪拌の上、遠心分離(3,000rev./min, 5分)を行って上澄を集めた。沈渣に一相系(CHCl₃/CH₃OH/H₂O(1:2:0.8, v/v/v)溶液20mlを加え、合計5回にわたって抽出操作を繰り返した後、この全上澄を一括して95mlとした。

次にこの上澄に、CHCl₃/CH₃OH/H₂Oの混合比が、1:1:0.9(v/v/v)の二相系となるようにCHCl₃、H₂Oを、それぞれ25mlずつを加えて十分攪拌後、遠心分離(3,000rev./min, 10分)を行ってCHCl₃層を分取し、10mlのCH₃OH/H₂O(10:9, v/v)で一回洗浄後、全CHCl₃層をロータリーエバポレーター(Büchi)にて濃縮乾固して総脂質を得た。

(iv) 磷脂質の調製

Hanahanら¹⁰⁾の方法に従って、総脂質をケイ酸カラムクロマトグラフィーによって、単純脂質と磷脂質に分離した。すなわち、120℃にて1時間活性化したケイ酸/セライト545(2:1, w/w)1.5gをCHCl₃に懸濁し、ガラスカラム(1×5.5cm)に充填した。これに1mgのlipid-Pに相当する総脂質のCHCl₃溶液を注入し、まずCHCl₃/CH₃OH(98:2, v/v)50mlにて単純脂質を、ついでCH₃OH 50mlにて磷脂質を溶出した。

脂質燐量はBartlett変法¹¹⁾およびKing法¹²⁾によって測定を行ったが、CH₃OH画分における燐量の回収率は95%以上であった。

表1 急性膵炎犬における膵臓脂質、蛋白質量の経時的变化(n=5)

	注入前	3	6	12	24(時間)
血清アミラーゼ	842.9	1635.7	1950.0	2311.4	2714.3
総脂質 (mg)	35.1	31.6	27.8	22.8	22.7
磷脂質 (μg)	1000.3	905.9	845.9	626.4	446.0
蛋白質 (mg)	25.8	23.4	22.6	23.1	20.0

(v) レシチン, ホスファチジルエタノールアミン, リソレシチンの単離

上述の精製磷脂質より調製用薄層クロマトグラフィーによって, レシチン, ホスファチジルエタノールアミン, リソレシチンの単離を行った。すなわち, 120°Cにて2時間活性化したシリカゲルHプレート(20×20cm, 0.6mmthick)に磷脂質200 μ g-Pをアプライして, 溶媒CHCl₃/CH₃OH/H₂O(60:35:8, v/v/v)にて展開した。風乾後, 0.01%Rhodamin 6Gを噴霧して, 紫外線下に既知のレシチン, ホスファチジルエタノールアミン, リソレシチンのRf値に一致したバンドを, それぞれプレートよりかきとった後, Bligh-Dyer法に準じて脂質を抽出した。

得られたレシチン画分をさらに Rhodesら¹³⁾の方法によって精製した。すなわち, ガラスカラム(1×3cm)に活性アルミナ(200mesh)1gをCHCl₃にて充填後, 全レシチン画分をアプライして, 50mlのCHCl₃/CH₃OH(1:1, v/v)で溶出した。このようにして得られたレシチン, ホスファチジルエタノールアミン, リソレシチンは上述の薄層クロマトグラフィーを用いて単一であることを確認した。

(vi) 遊離脂肪酸の単離

単純脂質画分より, 調製用薄層クロマトグラフィーによって遊離脂肪酸の単離を行った。120°C, 2時間活性化したシリカゲルHプレート(20×20cm, 0.6mmthick)に5mg相当の単純脂質をアプライし, ヘキサン/エーテル/酢酸(70:25:1, v/v/v)にて展開, 風乾後0.01%Rhodamin 6Gを噴霧し, 既知の脂肪酸のRf値に一致したバンドをかきとり, Bligh-Dyer法に準じて脂質を抽出した。このようにして単離した遊離脂肪酸は薄層クロマトグラフィーによって単一であることを確認し得た。

(vii) 脂肪酸分析

使用したガスクロマトグラフは島津製の水素イオン化検出器を備えたGC-3BFである。カラムは2m×3mmのガラス製spiral tubeを用い, 充填剤には10% Silar 10 C gas chrom. Q(100~120mesh)を用いた。カラム温度は180°Cより200°Cに昇温した。窒素ガス, 水素ガス, 空気はそれぞれ1.0kg/cm², 1.0kg/cm², 0.6kg/cm²であった。各ピークの同定は, 標準品の保持時間(Rt)およびマススペクトルの比較により, また定量は半値巾法¹⁴⁾によって行った。

脂肪酸メチルエステルの調製はレシチン, ホスファチジルエタノールアミン, リソレシチン(約30 μ g-

P), また遊離脂肪酸(約900 μ g)を30mlナス型フラスコに取り, 10% methanolic HCl 5mlを加え, 2時間還流した。冷却後, ヘキサン5mlと蒸留水5mlとを加えて強振し, ヘキサン層のみを分取し, 再度残部にヘキサン5mlを加えて, 同操作を繰り返して脂肪酸メチルエステルを得, 分析に供した。

2. 実験成績

(i) 成熟健常犬の膵臓の脂質, 蛋白質量の部位差
成熟健常犬の膵臓における総脂質, 磷脂質, 蛋白質量を測定した成績を図1に示した。

すなわち, 1g湿重量当り, 総脂質は36~38mg, 磷脂質は880~1,000 μ g-P, または蛋白質は26~30mgであったが, 膵臓における部位差は約10%内外であった。

したがって, 急性膵炎組織の各分析に際しては, 膵右葉を対照として, 膵左葉に作成した急性膵炎組織を経時的に摘出の上, 分析に供した。

(ii) 急性膵炎犬における膵臓脂質, 蛋白質量の変化
表1に急性膵炎誘発前後の総脂質, 磷脂質, 蛋白質の量的変化を検討した結果を示した。総脂質は1g湿重量当り急性膵炎誘発前35.1mg, 3時間後31.6mg(94%), 6時間後27.8mg(89%), 12時間後22.8mg(69%), 24時間後22.7mg(65%)と経時的に減少する傾向がみられた。

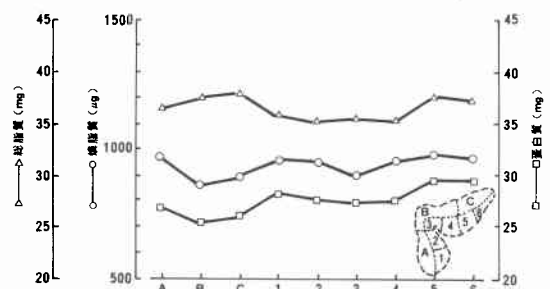
蛋白質は25.8mgから3時間後23.4mg(93%), 6時間後22.6mg(91%), 12時間後23.1mg(93%), 24時間後20.0mg(76%)と減少する傾向がみられた。

一方, 磷脂質(lipid-p)は1,000.3 μ gから3時間後905.9 μ g(84%), 6時間後845.9 μ g(78%)と漸減傾向がみられたが, 12時間後では626.4 μ g(59%), さらに24時間後では446.0 μ g(45%)と急激な減少傾向を示した。

(iii) 膵臓における脂質組成の変化

膵臓の主要な磷脂質はレシチンおよびホスファチ

図1 成熟健常犬の膵臓脂質, 蛋白質量の部位差 (n=3)



ジールエタノールアミンであり両者で約70%を占めている。図2に示したように、ホスファチジルエタノールアミンは急性膵炎誘発前後においても約20%であって、著明な変動は示さなかった。しかしながらレシチンは誘発前は56%であったのに反して、24時間後には46%に減少していた。また、レシチンの加水分解生成物であるリソレシチンは、急性膵炎誘発後12時間で7%、24時間で10%と増加傾向がみられた。

(iv) レシチン、ホスファチジルエタノールアミンにおける構成脂肪酸の変化

表2に示したように、膵炎誘発前のレシチンの主要構成脂肪酸はパルミチン酸(C16:0)、ステアリン酸

(C18:0)、オレイン酸(C18:1)、リノール酸(C18:2)、であり、アラキドン酸(C20:4)は9%であった。急性膵炎の発症につれてC18:0の増加およびC18:2、C20:4の減少傾向が認められた。

一方、ホスファチジルエタノールアミンでは、C20:4が30%以上を占めており、その他C18:0、C18:2が主要な構成脂肪酸であった。急性膵炎誘発後はC16:0、C18:0、C20:4の増加およびC18:2の減少傾向が認められた。

(v) リソレシチンの構成脂肪酸および遊離脂肪酸の変化

急性膵炎誘発後、リソレシチンおよび遊離脂肪酸の増加傾向が認められたが、その1例について、構成脂肪酸の経時の変化を検討した(表3)。リソレシチンの主要な構成脂肪酸はC16:0、C18:0、C18:1、C18:2であったが、急性膵炎誘発後24時間ではC16:0、C18:0の増加およびC18:2の減少傾向が著しかった。

同一例における遊離脂肪酸の主要なものはC16:0、C18:0、C18:1、C18:2であって、急性膵炎誘発後ではC18:0、C18:1の減少とC18:2の増加傾向が認められた。またC20:4は最初は痕跡的に過ぎなかったが、24時間後には7%まで増加していた。

3. 小括

虚血性低酸素環境下における膵臓の磷脂質代謝を検討する目的で、急性膵炎作成犬についてその磷脂質を中心に検討を加えた結果以下のような成績を収めることが出来た。

虚血性低酸素環境下では総脂質、磷脂質ならびに蛋

図2 急性膵炎における膵臓磷脂質組成の変化 (n=4)

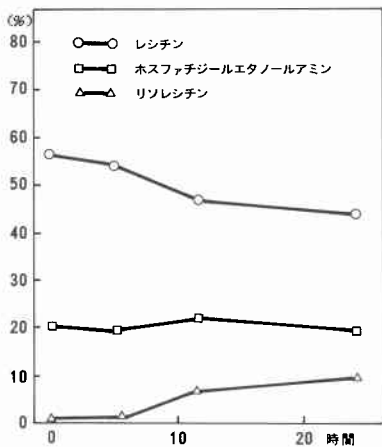


表2 レシチン、ホスファチジルエタノールアミンにおける構成脂肪酸の変化

脂肪酸	レシチン			ホスファチジルエタノールアミン		
	注入前	12	24(時間)	注入前	12	24(時間)
14:0	0.8%	1.4%	3.7%	-	-	-
14:1	1.2	1.0	0.7	7.8%	5.4%	4.0%
16:0	36.1	34.7	33.9	7.3	9.1	10.4
16:1	2.5	2.3	2.5	5.0	7.2	4.5
18:0	9.8	13.3	14.4	15.8	14.1	16.7
18:1	7.1	8.3	7.6	4.4	5.3	7.8
18:2	24.8	25.6	20.9	14.6	13.4	11.9
20:3	3.1	2.8	2.2	3.0	2.8	2.2
20:4	9.3	10.1	7.8	31.1	33.3	34.5
22:6	2.8	2.7	2.4	5.1	4.6	3.9

表3 リソレシチンの構成脂肪酸および遊離脂肪酸の変化

脂肪酸	リソレシチン			遊離脂肪酸		
	注入前	12	24 (時間)	注入前	12	24 (時間)
14:0		2.2 %	1.1 %	3.0 %	1.2 %	1.0 %
16:0		23.8	27.7	15.5	17.7	19.4
16:1		3.1	2.3	5.8	3.9	4.3
18:0		25.3	31.6	13.2	11.5	10.7
18:1		11.9	9.7	36.1	33.4	26.9
18:2		19.2	13.7	12.2	15.4	23.7
20:4		9.2	6.8	0.2	1.7	6.9

白質はともに経時的に減少する傾向がみられるが、これらの中でもとくに磷脂質の減少が顕著にみられた。また低酸素環境下での膵臓においては磷脂質の50%以上を占めるレシチンが減少し、その加水分解産物であるリソレシチンおよび遊離脂肪酸が増加する傾向がみられた。また急性膵炎発症後、レシチン、ホスファチジルエタノールアミン、リソレシチン画分においては、飽和脂肪酸が増加し、不飽和脂肪酸が減少する傾向がみられたのに反して、遊離脂肪酸では逆に不飽和脂肪酸が増加し、飽和脂肪酸が減少する傾向がみられた。以上の結果から明らかなように虚血性低酸素環境下では膵臓の磷脂質代謝は著明に変化していること、およびこの様な変化に内因性ホスホリパーゼが重要な役割を演じているのであろう可能性が示唆された。

III 後 編

1. 実験材料および方法

(i) 実験材料

使用した薬剤は以下のごとくである。ベンジルペニシリン(明治)、カルペニシリン、ポリミキシンB(台糖ファイザー)、テトラサイクリン(日本レダリー)、クロールプロマジン(塩野義)、テトラカイン(キョウリン)、メリチン(Sigma)。

また、実験動物は体重140~160gのWistar系雌性ラットを17時間絶食後使用した。

(ii) 実験方法

ラットに50mg/kgのネブタール(アボット)を腹腔内に投与の上、膵臓約300mgを摘出した。

(反応系a)

低酸素環境下での膵組織における磷脂質の分解状況を知るために、摘出膵臓を2等分の上一方は直ちに

Bligh-Dyer法に準じて総脂質の抽出を行った。すなわち、犬膵臓と同様に一相系溶媒を用いて3回抽出を繰り返し、一相系溶媒の総量が38mlとなるように抽出を行った。他方の膵組織には50mM トリス塩酸緩衝液(pH7.4) 2.0mlを加えて、37°Cで一定時間インキュベートした後、CH₃OH 5.0ml CHCl₃ 2.5ml とを加えて反応を停止の上、Bligh-Dyer法に従って総脂質の抽出を行った。

(反応系b)

抗生物質の存在下における反応系については、膵組織150mgに50mM トリス塩酸緩衝液(pH7.4)を加え、さらに各種抗生物質を添加の上、最終容量が2.0mlとなるように調製した。これを37°Cで4時間インキュベートした後、Bligh-Dyer法に従って総脂質の抽出を行った。

(反応系c)

つぎに *in vitro* において、ホスホリパーゼ活性を高めるために、メリチンの存在下で以下のような実験を行った¹⁵⁾。体重140~160gのWistar系雄性ラットから膵臓を抽出し、これを2等分の上、一方は直ちにBligh-Dyer法に従って総脂質の抽出を行い、他方は50mM トリス塩酸緩衝液(pH7.4)を加えた後、さらにメリチン50, 100, 150 μ gを加えて最終容量を2.0mlとして、37°Cで3時間インキュベートした後、Bligh-Dyer法に従って総脂質の抽出を行った。

(反応系d)

さらにメリチンの存在下における抗生物質の影響を検討するために、以下のような実験を行った。すなわち、摘出膵臓の一方は直ちにBligh-Dyer法に従って総脂質の抽出を行い、他方は50mM トリス塩酸緩衝液

(pH7.4) と抗生物質とを添加の上15分間ブレインキューベートした。その後さらにメリチン50 μ gを加えて最終容量を2.0mlに調製の上、37 $^{\circ}$ Cにて合計3時間インキュベートした後、Bligh-Dyer法に従って総脂質の抽出を行った。

脂質磷の定量はKing法により、蛋白質の定量はLowry法¹⁰⁾に従って行った。

2. 実験成績

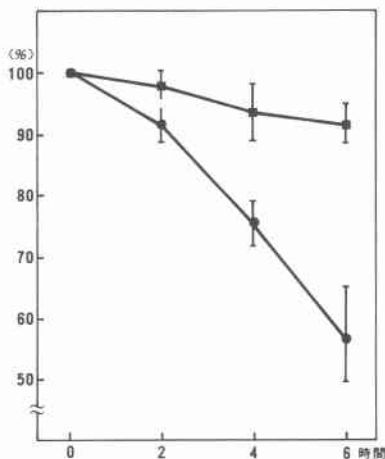
(i) ラット膵組織の磷脂質、蛋白質の経時的分解および磷脂質組成の変化

図3に示したように、蛋白質は6時間で10%の減少を示したに過ぎなかったが、磷脂質は2時間で10%、4時間で25%、6時間で45%の減少を示し、磷脂質の減少傾向は蛋白質よりも顕著であった。

反応系にメリチンを添加すると、図4に示したように、磷脂質の分解は促進される傾向がみられ、50 μ g添加時には3時間で25%の減少が認められた。100、150 μ gのメリチン添加によって、磷脂質の分解は幾分促進されるが、その程度は50 μ g添加の場合とほぼ同程度であった。

一方、ラット膵組織の磷脂質はイヌの場合と同様に、薄層上で認められたものはレシチン(50%)、ホスファチジルエタノールアミン(20%)、スフィンゴミエリン(10%)であった。これらの磷脂質は図5のように、膵組織を4時間インキュベートした時点では、ホスファチジルエタノールアミン、スフィンゴミエリン画分の変化は認められなかったが、レシチンは10%減少し、リソレシチンは逆に8%の増加がみられた。

図3 ラット膵組織の磷脂質(●), 蛋白質(■)の経時的分解 (n=5)



(ii) ラットの膵組織磷脂質分解におよぼす抗生物質の影響

ラットの膵組織を抗生物質の非存在下で、4時間インキュベートすると、磷脂質は25%の減少がみられた。一方、ベンジルペニシリンを添加した際には、その濃度が1.6mMでは15%の磷脂質減少にとどまるが、3.2mMではその分解はほぼ完全に抑制された。カルペニシリンでも1.5mMの添加で10%の減少に、3.0mMではほぼ完全に抑制された(図6a)。

テトラサイクリンも、3.0mMで磷脂質の分解を完全に抑制したが、ポリミキシンBは、3.0mMでは磷脂質の抑制をし得なかった(図6b)。

さらに、抗生物質ではないが、ホスホリパーゼ活性

図4 ラット膵組織の磷脂質分解におよぼすメリチンの効果 (n=5)

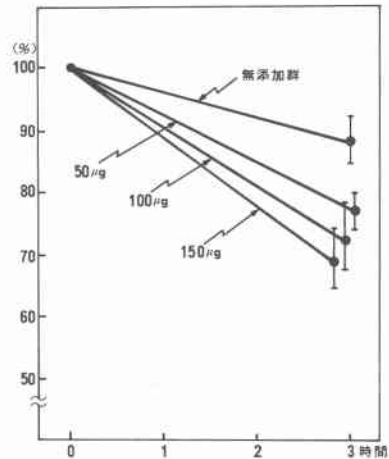


図5 ラット膵組織の磷脂質組成の変化 (n=3)

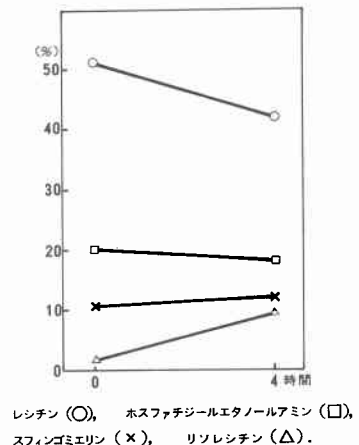
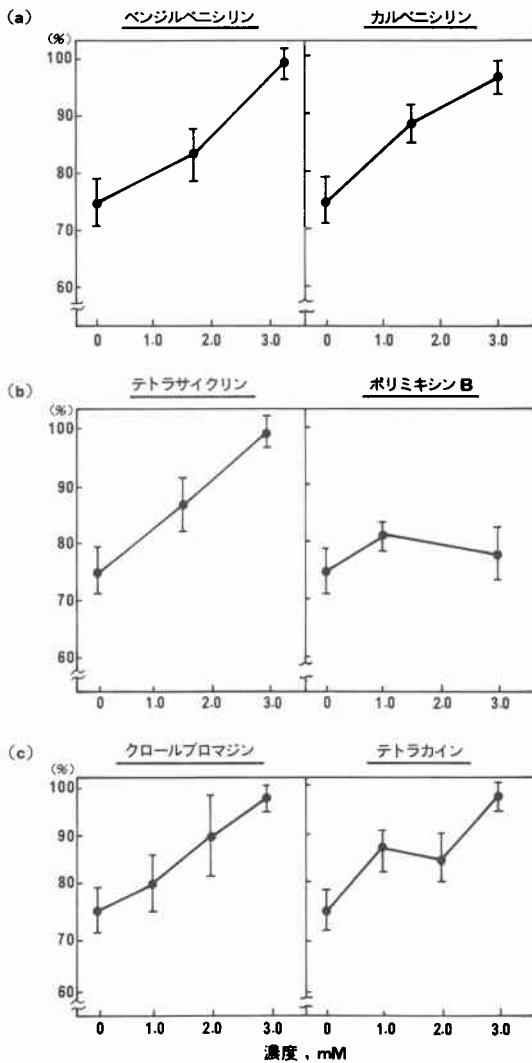


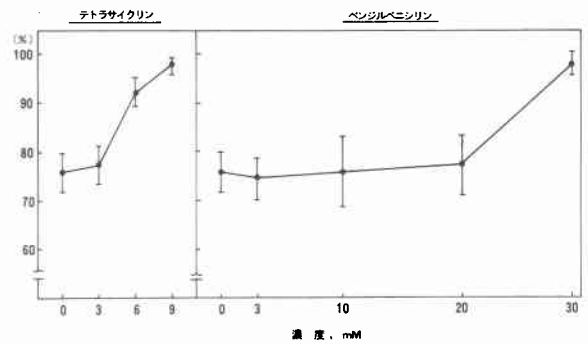
図6 ラット膵組織の磷脂質分解におよぼす薬剤の影響 (n=5)



阻害剤とされている⁵⁾クロールプロマジンおよびテトラカインの効果についても同様に検討を行ったが、両者ともに1.0mMで膵臓磷脂質の分解抑制作用が認められはじめ、3.0mMでは分解は完全に抑制されていた(図6c)。

一方、メリチンの存在下における抗生物質の効果についても検討を行ったが、結果は図7に示したように、3.0mMのテトラサイクリンでは、磷脂質の分解に対する影響は認められなかったのに反して、9.0mMでは磷脂質の分解は完全に抑制されていた。さらにベンジルペニシリンでも、30mMの添加群では抑制効果が

図7 メリチン存在下におけるラット膵組織の磷脂質分解におよぼす影響 (n=5)



認められた。これらの諸成績から明らかなように、メリチンの存在下ではメリチンの非存在下での3~10倍の抗生物質量の存在が必要であることが判明した。

IV 考 察

著者は虚血性低酸素環境下における膵細胞の病態生理を明らかにする目的で、主として磷脂質代謝とホスホリパーゼの果す役割を中心に *in vivo* ならびに *in vitro* の実験的検討を行った。

前編においては、イヌ膵管内に自家胆汁を加圧下に急速注入することによって急性膵炎(急性膵壊死)を作成の上、これを *in vivo* における膵組織の循環障害あるいは低酸素環境下のモデルと考え、この際の膵臓における磷脂質代謝を内因性ホスホリパーゼとの関連において追求した。

急性膵炎の成因は各種酵素が何らかの誘因によって膵組織で活性化され、自己の産生する酵素によって膵臓自体が自己消化 (autodigestion) をおこすことがその本能であると一般に考えられている。

従来より、膵臓の自己消化をおこす酵素としてトリプトシンが最も重視されてきた¹⁷⁾。しかし、1934年 Dragstedt ら¹⁸⁾はトリプシンは蛋白質とともに生体膜の重要構成成分であるグリセロ磷脂質に直接作用し得ないことから、トリプシン中心の膵炎発生機序に疑問を抱き、さらに Beck ら¹⁹⁾は急性膵炎の発症に際して膵組織中でのトリプシン活性の証明が困難であることを指摘した。

また、Elmslie²⁰⁾²¹⁾は実験的に膵炎を発症させる場合、一定の圧を加えて、トリプシンを膵管内へ注入するのでなければ成功し難いことを指摘した。これらの諸事実から以前のトリプシン中心の膵炎発症機序に疑問がもたれるようになった。さらに Creutzfeldt ら²²⁾は

ラットを用い、ホスホリパーゼを低濃度の胆汁酸とともに、膵管内へ注入することによって急性膵炎を発症し得ることを明らかにし、この際に蛋白質分解酵素活性はほとんど検出されなかったことから、膵炎発症におけるホスホリパーゼの重要性を指摘した。

また、本庄⁴⁾らも実験的にイヌ胆汁性膵炎において、ホスホリパーゼAの果す役割を強調している。

今回、著者の行った実験結果はこれらの報告を強く支持するものと思われる。すなわち、著者の実験結果においては急性膵炎発症後24時間で膵臓総脂質は65%、蛋白質は75%、磷脂質は45%まで減少した。特に磷脂質の著明な減少は急性膵炎と磷脂質代謝との間に強い因果関係があることを示唆しているものと思われる。

また、急性膵炎発症時の膵臓における磷脂質の質的变化をみると、約50%を占めるレシチンが発症後24時間で10%減少し、同時にその加水分解生成物質であるリソレシチンおよび遊離脂肪酸が増加していた。

元来、生体膜は磷脂質の二重層に蛋白質がうめ込まれた形²³⁾をしているが、外界からの刺激や情報に対しては内因性のホスホリパーゼなどの酵素が対応して生体膜は量的にも質的にも順応して、その“恒常性”を常に維持しているものとされている。

そこで著者は虚血性低酸素環境下のモデルとして急性膵炎(急性膵壊死)を作成し、この“恒常性”に破綻を来たした時の膵細胞の磷脂質の質的变化をより詳細に検討する目的でレシチン、ホスファチジルエタノールアミン、リソレシチンの構成脂肪酸および遊離脂肪酸の経時変化について検討を加えた。今回の実験結果から、急性膵炎の増悪につれて膵細胞の生体膜はその構築がもろくなってゆくような印象が得られた。たとえば、膵臓磷脂質の70%以上を占めるレシチンおよびホスファチジルエタノールアミン画分では、急性膵炎発症後飽和脂肪酸が増加し、不飽和脂肪酸は減少する傾向がみられた。また、レシチンの加水分解生成物であるリソレシチンについても、飽和脂肪酸が増加し、不飽和脂肪酸が減少する傾向が認められた。一方、遊離脂肪酸においても、これらの結果として不飽和脂肪酸が増加し、飽和脂肪酸が減少するものと思われた。また、リソレシチンそれ自身は細胞毒性を有しており、急性膵炎の増悪過程において膵臓に対する影響はもちろんのこと、さらには門脈系を介して肝にも何らかの障害をおよぼすであろうことが容易に推定される。

一方、Trumpら²⁴⁾はラット腎臓スライスを用いて、*in vitro*における虚血性低酸素環境下でのミトコンドリアの磷脂質の変化を検討した結果、低酸素環境下での腎臓では内因性ホスホリパーゼの活性化によって磷脂質においては不飽和脂肪酸が減少し、飽和脂肪酸の増加がみられたとしている。

これらの結果は著者の *in vivo* における急性膵炎犬に認められた膵臓構成脂肪酸の経時変化とよく一致しており、急性膵炎(急性膵壊死)発症に際して、内因性ホスホリパーゼ、とくにA₂の果す役割が重要であることが明らかとなった。

さらに著者は後編においてラット膵組織片を用いて *in vitro* においてイヌ急性膵炎(急性膵壊死)に認められた磷脂質代謝の変化を再現し、虚血性低酸素環境下での内因性ホスホリパーゼの果す役割と、それにおよぼす各種薬剤、とくに抗生物質の影響に関して実験的検討を行った。

抗生物質の非存在下では急性膵炎犬と同様に膵臓における磷脂質の減少は蛋白質の減少よりも顕著であり、さらに膵臓磷脂質の質的变化もみられた。したがって、この実験系は急性膵炎犬に認められた膵臓の磷脂質代謝の様相と内因性ホスホリパーゼの関与とを、*in vitro* において十分再現し得たものと考えられる。

ついで、著者は各種薬剤の内因性ホスホリパーゼに対する影響を検討した結果、ベンジルペニシリン、カルベニシリンは3.0mMにて膵臓磷脂質の減少をほぼ完全に抑制した。その機序に関しては不明の点が多いが、生体膜を構成する代表的な磷脂質であるレシチンを例にとれば、化学的には一般に、1,2-diacyl-sn-glycerol-3-phosphocholine であるが、この中にはひとつの分子中に疎水性の脂肪酸部分と、親水性のホスホコリンがあるために、レシチンしたがってまた一般に磷脂質は、両親媒性の物質と考えられている。一方、ベンジルペニシリン、カルベニシリンもまた両親媒性の薬剤である。したがって、これらの抗生物質は Michell²⁵⁾、Defrize-Quertain²⁶⁾らがいうように、内因性ホスホリパーゼの基質である膵臓の“膜磷脂質”に作用することによって、生体膜の生理、生化学的性状に何らかの変化を生じさせ、したがって活性化された内因性ホスホリパーゼから防禦されたものと考えられる。

同様の機序によるホスホリパーゼ阻害剤としては、局所麻酔剤が近年報告されている⁶⁾。著者の行った実験結果からも、テトラカインには顕著な膵臓の磷脂質

減少の抑制効果が認められた。

しかし、これらの仮説はあくまでもその一要因として考えられ、今回著者が検討した抗生物質の中で、テトラサイクリンはキレート作用を有した薬剤であり、内因性ホスホリパーゼ活性の発現に不可欠である細胞内 Ca^{2+} Zn^{2+} などを除去する作用があり、その結果、ホスホリパーゼ活性は失活し、膵臓磷脂質減少の抑制効果が認められたものと考えられる。

さらに著者は内因性ホスホリパーゼをより一層活性化させる¹⁹⁾ために、メリチンを投与して実験を行った。これによるとベンジルペニシリン、テトラサイクリンにより、高濃度で膵組織片を前処置しておけば膵臓磷脂質の減少は抑制された。

従来、抗生物質の一義的な意義は、微生物に作用することであるが、今回著者の行った実験の検討結果からも明らかのように、高等動物の磷脂質代謝にも重要な役割を演じていることが判明した。

V 総括ならびに結論

虚血性低酸素環境下における膵臓磷脂質代謝と、それにおよぼす各種薬剤の影響について主として抗生物質を中心として実験検討を行い、以下の成績を収めることができた。

① 虚血性低酸素環境下では総脂質、磷脂質および蛋白質はともに経時的に減少する傾向がみられたが、なかでもとくに磷脂質における減少が顕著であった。

② 膵臓の主要な磷脂質はレシチン、ホスファチジルエタノールアミン、スフィンゴミエリンであるが、低酸素環境下では磷脂質の50%以上を占めるレシチンが減少し、その加水分解生成物質であるリソレシチンおよび遊離脂肪酸の増加が認められるなど質的にもかなりの変化を来していることが明らかとなった。

③ 膵臓のレシチン、ホスファチジルエタノールアミン、リソレシチンの構成脂肪酸および遊離脂肪酸は低酸素環境下においては大きく変動した。すなわち、急性膵炎発症後、レシチン、ホスファチジルエタノールアミン、リソレシチン画分においては、飽和脂肪酸が増加し、不飽和脂肪酸が減少する傾向がみられた。さらに遊離脂肪酸では逆に不飽和脂肪酸が増加し、飽和脂肪酸が減少する傾向がみられた。これらの諸成績から、虚血性低酸素環境下においては、膵臓の磷脂質代謝は著明に変化することが明らかとなったが、この際とくに内因性ホスホリパーゼの果す役割が重要であることが明らかとなった。

④ 低酸素環境下における内因性ホスホリパーゼに

対する抗生物質の影響を検討した結果、ベンジルペニシリン、カルペニシリン、テトラサイクリンには著明なホスホリパーゼ活性阻害効果が認められたが、ポリミキシンBには、この作用が認められなかった。さらに内因性ホスホリパーゼをより一層活性化させるためにメリチンを投与して実験を行った結果、ベンジルペニシリン、テトラサイクリンにはより高濃度の投与によって同様のホスホリパーゼ活性阻害効果のあることが明らかとなった。

稿を終るに臨み終始御懇篤なる御指導ならびに御校閲を賜りました恩師山本政勝教授に深甚の謝意を捧げるとともに医化学教室において終始御指導をいただき、また御校閲賜りました本学医化学齋藤国彦教授に心より深謝の意を表す。また数々の御教示、御協力をいただきました外科学教室員ならびに医化学教室員各位に感謝の意を表す。

なお、本論文の要旨は第53回、第54回日本生化学学会大会において発表した。本研究の一部は昭和53年度文部省科学研究費(第348258号)の援助による。

文 献

- 1) 野沢義則：生体膜脂質の調節機構、生化学 51：314—347, 1979
- 2) Ozawa K, Seta K, Araki H, et al: The effect of ischemia on mitochondrial metabolism. J Biochem 61: 512—514, 1966
- 3) Creutzfeld W: Proceeding of 3rd World Congress of Gastroenterology. Vol 4, 1966, p311
- 4) Ishikawa T, Honjo I: Pathophysiology of the liver and pancreas in experimentally produced acute pancreatic necrosis and therapeutic effect of penicilline. Arch Jap Chir 34: 287—309, 1965
- 5) Chien KR, Abrams J, Serroni A, et al: Accelerated phospholipid degradation and associated membrane dysfunction in irreversible, ischemic liver cell injury. J Biol Chem 253: 4809—4817, 1978
- 6) Scherphof KR, Westenberg H: Stimulation and inhibition of pancreatic phospholipase A₂ by local anesthetics as a result of their interaction with the substrate. Biochem Biophys Acta 398: 442—451, 1975
- 7) Saito K, Okada Y, Kawasaki N: Inhibitory effect of some antibiotics on phospholipase. J Biochem 72: 213—214, 1972
- 8) Caraway WT: A stable starch substrate for the determination of amylase in serum and other body fluid. Am J Clin Path 32: 97—99, 1959
- 9) Bligh EG, Dyer WJ: A rapid method of total lipid extraction and purification. Can J Bio-

- chem 37 : 911—917, 1959
- 10) Hanahan DJ, Dittmer JC, Warashina E: A column chromatographic separation of classes of phospholipid. *J Biochim Chem* 228 : 685—700, 1957
 - 11) Bartlett GR: Phosphorus assay in column chromatography. *J Biol Chem* 234 : 466—468, 1959
 - 12) King EJ: The colorimetric determination of phosphorus. *Biochem J* 26 : 292—297, 1932
 - 13) Rhodes DN, Lea CH: Phospholipids 4. On the composition of hen's egg phospholipids. *Biochem J* 65 : 526—533, 1957
 - 14) Kates M: "Techniques of lipidology: In Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology Edited by TS Work, E Work. North-Holland Publishing Company, Amsterdam, 1972
 - 15) Mollay C, Kreil G, Berger H: Action of phospholipase on the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli*. *Biochim Biophys Acta* 426 : 317—324, 1976
 - 16) Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr AL, et al: Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193 : 265—275, 1951
 - 17) Anderson MC, Needleman SB, Gramatica L: Further inquiry into the pathogenesis of acute pancreatitis. Role of pancreatic enzymes. *Arch Surg* 99 : 185—192, 1969
 - 18) Dragstedt LR, Haymond HE, Ellis JC: Pathogenesis of acute pancreatitis. (Acute pancreatic necrosis). *Arch Surg* 28 : 232—239, 1934
 - 19) Beck IT, Pinter EJ, Solymar J: The role of pancreatic enzyme in pathogenesis of acute pancreatitis. *Gastroenterology* 43 : 60—70, 1962
 - 20) Elmslie R, White TT: An investigation into trypsin in the pancreaticobiliary tree. *Br J Surg* 53 : 586—593, 1966
 - 21) Elmslie R, White TT, Magee DF: The significance of reflux of trypsin and bile in the pathogenesis of human pancreatitis. *Br J Surg* 53 : 809—816, 1966
 - 22) Creutzfeld W, Schmidt H: Aetiology and pathogenesis of pancreatitis (current concept). *Scand J Gastroenterol* 5(Suppl 6) : 47, 1970
 - 23) Singer SJ, Nicolson GL: The fluid mosaic model of the structure of cell membrane. *Science* 175 : 720—731, 1972
 - 24) Smith MW, Collan Y, Kahng MW, et al: Changes in mitochondrial lipids of rat kidney during ischemia. *Biochim Biophys Acta* 618 : 192—201, 1980
 - 25) Michell RH, Bowley DAM, Brindley DN: A possible metabolic explanation for drug induced phospholipidosis. *J Pharm Pharmacol* 28 : 331—332, 1976
 - 26) Defrize-Quertain R, Chatelain P, Puysschaert JM: Phospholipase inactivation induced by aminopiperazine derivative: A study at the lipid-water interface. *J Pharm Pharmacol* 30 : 608—612, 1978
-