

Title	カラゲニン肉芽腫中に存在するphospholipase A2活性化因子について
Author(s)	中前, 順次
Citation	大阪大学, 1987, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/35344
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉 大阪大学の博士論文について 〈/a〉 をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

氏名・(本籍)	中 前 順 次
学位の種類	歯 学 博 士
学位記番号	第 7 6 9 6 号
学位授与の日付	昭 和 62 年 3 月 26 日
学位授与の要件	歯学研究科歯学基礎系専攻 学位規則第5条第1項該当
学位論文題目	カラゲニン肉芽腫中に存在する phospholipase A ₂ 活性化因子について
論文審査委員	(主査) 教 授 猪木 令三 (副査) 教 授 鈴木不二男 助教授 石田 武 講 師 菅原 利夫

論 文 内 容 の 要 旨

phospholipase A₂ (PLase A₂) は細胞膜リン脂質を加水分解して2位の不飽和脂肪酸, 主としてアラキドン酸を遊離させる酵素であり, 炎症反応において重要な役割を果たすプロスタグランジン, ロイコトリエンなどの生合成系であるアラキドン酸カスケードの律速酵素である。近年, PLase A₂の生体内での制御機構に関して多くの研究がなされ, ステロイド性抗炎症薬により誘導され, PLase A₂活性を阻害する内在性タンパクとしてリポコルチンが発見された。一方, 急性炎症時に糖質代謝の上昇がみられること, また, 炎症部位においてムコ多糖類が増加することも報告されており, これらの糖質もリポコルチンと同様に炎症の制御に関与している可能性が考えられる。本研究は, 炎症の場におけるPLase A₂の制御機構を解明する目的で, 炎症組織からPLase A₂を調製し, 実験的炎症性増殖組織のモデルとして作成したカラゲニン肉芽腫中よりその活性を調節する物質—特に糖質に重点を置いて—の検索を試みた。

PLase A₂活性の測定は, 基質として1-パルミトイル-2-[1-¹⁴C]オレオイル-L-3-ホスファチジルコリンを用い, 37°Cで反応を行った。氷冷クロロホルム-メタノール混液(2:1)を加えて反応を停止した後, [¹⁴C]-オレイン酸をTLCにより分離し, その放射活性を測定することにより酵素活性を求めた。炎症部位からのPLase A₂の精製には, 家兎に1%グリコーゲン200mlを腹腔内投与して炎症を惹起し24時間後に採取した腹水を用いた。遠心分離で細胞成分を除いた上清を, CM-Sephadex C-25によりイオン交換カラムクロマトグラフィーを行った。3M塩化ナトリウム溶液で溶出した画分を透析, 凍結乾燥し, PLase A₂標品を得た。PLase A₂活性に影響を及ぼす因子の抽出は, 体重150gのSD系雄性ラット背部皮下に2%カラゲニン溶液を投与して作成した肉芽腫を用い, 凍

結細切後、10倍量の2%フェルールで4°Cにて48時間抽出を行った。この抽出液をpH4.5およびpH9.0にて加熱処理後、活性炭吸着を行って粗抽出物を得た。この粗抽出物をSephadex G-25によりゲルクロマトグラフィーを行い、各画分について280nmにおける紫外外部吸収測定、糖定量を行うと同時に家兎腹水より部分精製したPLase A₂に対する作用を検討した。血管透過性に対する作用は、色素漏出法により調べた。体重20gのd d Y系雄性マウス(1群6匹)にpontamine blue (15mg/ml) 100 μlを尾静脈内投与し、5分後に左側足蹠に25 μlの標品を皮下投与した。一定時間後に足蹠を切断し、ホルムアミド4 mlで60°Cにて24時間の色素抽出を行い、630nmの吸収を測定した。

グリコーゲンを投与して炎症を惹起した家兎腹水からイオン交換カラムクロマトグラフィー等により部分精製したPLase A₂は、比活性で約70倍の精製酵素標品となった。得られたPLase A₂の至適pHは7.0~8.0であり、反応開始後60分まで直線的に[¹⁴C]-オレイン酸の遊離が認められた。本実験では50mMトリス-グリシルグリシン緩衝液(pH8.0)中で、基質と30分間反応させて酵素活性を測定した。

ラット背部皮下に形成したカラゲニン肉芽腫から得た粗抽出物のSephadex G-25後の各画分について、PLase A₂活性に対する影響を調べた結果、糖のピークからやや遅れ、分子量約7,000に相当する画分にPLase A₂活性を著しく増強する作用が認められた。正常皮膚からの抽出物にはこの活性化作用は認められなかった。また、カラゲニン投与直後、1、5、10日目の肉芽腫からの抽出物のSephadex G-25画分を比較すると、5日目の画分において最も強いPLase A₂活性化作用が認められた。この活性化作用は、蛇毒あるいはハチ毒のPLase A₂に対しても認められたが、炎症部位のPLase A₂に対する作用と比較してはるかに弱いものであり、また、ブタ膵臓のPLase A₂に対してはまったくみられなかった。PLase A₂活性化因子を含む画分は、マウス足蹠における色素漏出試験において用量依存的に血管透過性亢進作用を示した。この作用を、カラゲニン投与後1、5、10日目の肉芽腫からのSephadex G-25画分で比較すると、PLase A₂の活性化作用と一致して5日目の画分が最も強かった。

以上の結果より、ラット背部皮下に形成したカラゲニン肉芽腫より抽出、分離した分子量約7,000の画分には炎症部位より調整したPLase A₂を比較的特異的に活性化する因子が存在することが示された。この因子は、肉芽形成の盛んな時期とほぼ一致して産生され、また、血管透過性亢進作用をも有する事より炎症反応に関与している可能性が示唆された。

論文の審査結果の要旨

本研究は、炎症の場合におけるホスホリパーゼA₂の制御機構を明らかにする目的で、カラゲニン肉芽腫中より本酵素活性に影響を及ぼす因子の抽出を試み、その諸性質を調べたものである。ラット背部皮下に形成したカラゲニン肉芽腫中には、炎症組織より調製したホスホリパーゼA₂を著明に活性化する因子が存在することが明らかとなり、また、本因子が血管透過性亢進作用を有することも示された。このことは、本因子が炎症反応において重要な役割を果たしていることを示唆するものであり、本研究は

炎症反応の解明において一つの重要な知見を得たもので歯学博士の学位を得るに十分価値ある業績であると認められるものである。