

ラットにおける血液中アミラーゼ活性 に影響を及ぼす種々な因子

赤木 玲子・伊藤 紀子・斉藤 直美
宇野 博美・坪田 典子

要 約

ラットにおける血液中アミラーゼの生理的意義を明らかにする一助として、血液中総アミラーゼ活性に及ぼす顎下腺摘除の影響を検討した。更に、血液中総アミラーゼ活性が変動する場合のP型アミラーゼとS型アミラーゼの活性を分別定量し、その際、食餌へのトリプシン添加の影響を検討した。

1) 血漿中総アミラーゼ活性は、通常一定を保っていたが、その際、顎下腺摘除により急速に低下した。トリプシン添加食を摂取させたラットでは上昇傾向がみられ、その後一定を保った。一方、トリプシン非添加食を摂取させたラットでは有意な上昇は示さなかった。

2) 血漿中S型アミラーゼ活性は、顎下腺摘除後、急速に減少し摘除前の約5%に達した。一方、対照グループでは有意な変化はみられなかった。食餌中へのトリプシン添加は、いずれのグループにも影響を及ぼさなかった。

3) 血漿中P型アミラーゼ活性は、顎下腺摘除前、一定を保っていたが、摘除後一時的に減少した。その後トリプシン添加食摂取により、もとのレベルまで上昇したが、トリプシン非添加食摂取では30日間の試験期間中、有意な上昇はみられなかった。

緒 言

デンプン分解酵素であるアミラーゼの構造及び酵素化学的な解析は古くから盛んに行われてきたが、^{1) 2) 3) 4)}消化酵素としての機能以外には、その生理的役割については可能性が示唆されながらも不明な点が多い。⁵⁾哺乳動物においては、 α -アミラーゼが生合成され消化管内に外分泌されている。ヒトの場合、生合成並びに外分泌される臓器は唾液腺及び膵臓であり、それぞれの臓器から外分泌されるアミラーゼはS型アミラーゼとP型アミラーゼと呼ばれており、異ったタンパク質のアイソザイムである。⁴⁾一方、アミラーゼは外分

泌酵素であるにもかかわらず、血液中にも活性な状態で存在しており、正常時では血漿中のS型アミラーゼとP型アミラーゼの割合は、ほぼ1:1と考えられている。しかし、膵癌で膵臓を摘出した患者では、一時的に血漿中総アミラーゼ値が低下するが、次第にもとのレベルに回復すると症例報告があり、何らかの原因により一方の分泌低下がおきた場合、それを補うべく他方の分泌亢進が起こる可能性が示唆されている。また、生体の生命が危険にさらされたり、物理的外傷を受けたりした場合には、一時的に血液中総アミラーゼ量が増加することが知られているが、その生理的意義は不明である。以上のことより、生理的条件下においては、血液中総アミラーゼ量を一定に保とうとする何らかの機構が存在する可能性が示唆される。一方、ラットにおいては、種特異的に顎下腺から α -アミラーゼの他にも、トリプシン様のタンパク質分解酵素を分泌しており、男性ホルモン依存性であることが報告されているが、その生理的意義については不明である。^{6) 7)}

本研究においては、ラットにおける血液中アミラーゼの生理的意義を明らかにする一助として、血液中総アミラーゼ活性に及ぼす顎下腺摘除の影響を検討し、更に、血液中総アミラーゼ活性が変動する場合のP型アミラーゼ、S型アミラーゼの比率を検討し、その際、食餌中へのトリプシン添加の影響を検討した。

実験方法

1. 実験動物の飼育

ウィスター系の雄ラットを1群5匹として飼育した。第1群にタンパク質分解酵素としてトリプシン(MERCK)を2～4%の割合で粉末MF食(オリエンタル酵母工業株式会社)に添加し、摂取させた。コントロールとして第2群には粉末MF食のみを摂取させた。期間は37日間とし、すべての期間において水、飼料とも自由摂取とした。

2. 顎下腺摘除術

飼育開始後9日目に、エーテル（ジェテルエーテル・特級 ナカライテック株式会社）麻酔下で顎下腺一對を摘出した。麻酔から回復後同様な条件下で飼育を続けた。

3. 血漿中総アミラーゼ活性値の測定

採血はヘパリンコーティングしたガラス毛細管（DRUMMOND SCIENTIFIC CO.）を用い、眼底採血法で行った。血液はそれぞれ4℃ 6,000回転で30秒間遠心分離して血漿を分離し、蒸留水で10倍希釈したものをアミラーゼ活性、タンパク質濃度測定用の試料として用いた。血漿中総アミラーゼ活性は、CM-アミロース-DEX法（アミラーゼB-テストワークス 和光純薬株式会社）を用いて測定し、比活性で表した。なお、タンパク質濃度はLowry法⁸⁾により測定した。

4. 血漿中アミラーゼアインザイムの混合比（P/S比）の測定

10倍希釈血漿のP型アミラーゼ活性値を抗S型アミラーゼ阻害抗体（アインザイム測定用試薬 PNP 製品番号 979 759 ベーリンガー・マンハイム会社）を用いて測定した。S型アミラーゼ活性値は、血漿中総アミラーゼ活性値からP型アミラーゼ活性値を引くことにより計算で求めた。

実験結果

1) 血漿中総アミラーゼ活性に及ぼす顎下腺摘除の影響

図1に、顎下腺摘除ラットにおける血漿中総アミラーゼ活性の経日的変化を示した。飼育9日目に顎下腺を摘除すると血漿中総アミラーゼ活性は急速に減少しはじめ、飼育16日目でコントロール値の約52%になった。この減少は、食餌中へのトリプシン添加による有意な差は認められなかった。飼育16日目以降、第1群（トリプシン添加食）では血漿中総アミラーゼ活性は除々に上昇し、飼育28日目には、コントロール値の約98%まで回復し、その後、一定を保った。第2群（トリプシン非添加食）では、第1群でみられた血漿中総アミラーゼ活性の上昇は試験期間中ではみられず、コントロール値の約57%前後で一定を保った。一方、対照として、顎下腺非摘除ラットに上述と同じ条件下で飼育し、血漿中総アミラーゼ活性を経日的に測定した結果を、図2に示した。第1群、第2群ともに血漿

中総アミラーゼ活性は、ほとんど有意な差はみられなかった。なお、データには示していないが、食餌の違いによる摂取量の有意差は認められなかった。

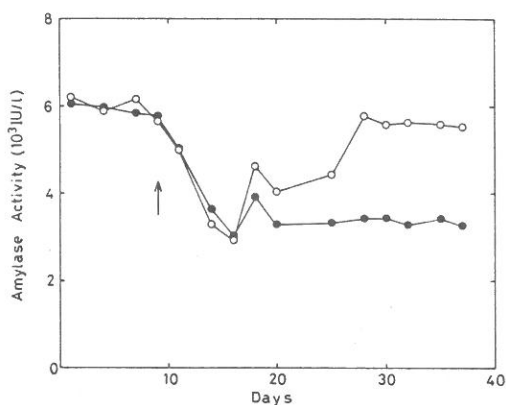


図1 顎下腺摘除ラットにおける血漿中総アミラーゼ活性の経日的変化

○は粉末MF食に2～4%トリプシンを添加し摂取させたラットの血漿中総アミラーゼ活性を表し、●は粉末MF食を摂取させたラットの血漿中総アミラーゼ活性を表す。

矢印は顎下腺を摘除した日を示す。

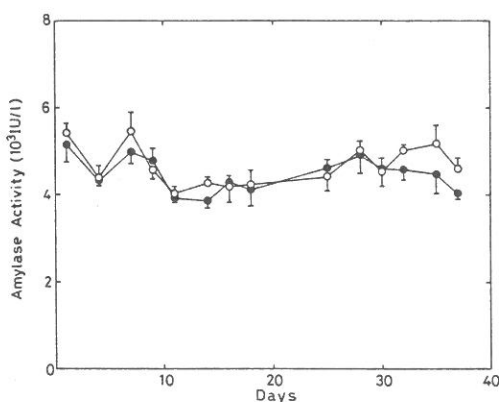


図2 顎下腺非摘除ラットの血漿中総アミラーゼ活性の経日的変化

○は粉末MF食に2～4%トリプシンを添加し摂取させたラットの血漿中総アミラーゼ活性を表し、●は粉末MF食を摂取させたラットの血漿中総アミラーゼ活性を表す。

血漿中総アミラーゼ活性値はすべて平均値±標準偏差で表す。

2) 血漿中S型アミラーゼ活性、P型アミラーゼ活性比に及ぼす顎下腺摘除の影響

顎下腺摘除の際、血漿中S型アミラーゼ活性、P型

アミラーゼ活性の経日的変化を、図3の左に示した。顎下腺摘除前は、第1群、第2群とも有意な変動を示さなかった。この時の血漿中S型アミラーゼ活性値を100とした場合、第1群の血漿中P型アミラーゼ活性値は93、第2群の血漿中P型アミラーゼ活性値は105となり、約1:1の活性比で存在していた。また、第1群、第2群の血漿中P型アミラーゼ活性は食餌へのトリプシン添加による有意差は認められなかった。飼育9日目に顎下腺を摘除すると、第1群、第2群の血漿中S型アミラーゼ活性は急速に減少し、第1群ではコントロール値の約9%、第2群ではコントロール値の約3%になった。一方、対照として、顎下腺非摘除ラットに同様な条件下で飼育した際の血漿中S型アミラーゼ活性、P型アミラーゼ活性の変動を、図3の右に示した。血漿中S型アミラーゼ活性値を100とした場合、第1群の血漿中P型アミラーゼ活性値は93~108、第2群の血漿中P型アミラーゼ活性値は104~107となり、血漿中S型アミラーゼ活性、P型アミラーゼ活性は、1:1の一定の割合であり、第1群、第2群の間には有意差は認められなかった。

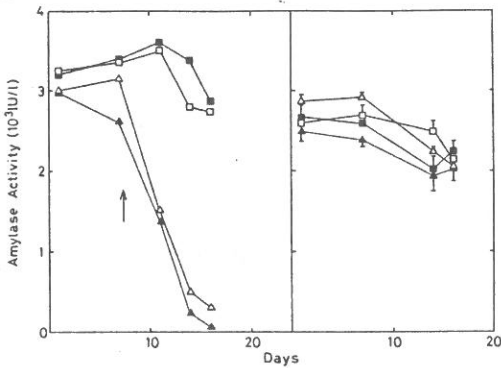


図3 血漿中S型アミラーゼ活性、P型アミラーゼ活性の経日的変化

図の左には、顎下腺摘除動物の値を、右には、非摘除動物の値を示した。非摘除動物群の値はすべて平均値±標準偏差で表す。

△は粉末MF食に2~4%トリプシンを添加し摂取させたラットの血漿中S型アミラーゼ活性を表し、▲は粉末MF食を摂取させたラットの血漿中S型アミラーゼ活性を表す。

□は粉末MF食に2~4%トリプシンを添加し摂取させたラットの血漿中P型アミラーゼ活性を表し、■は粉末MF食を摂取させたラットの血漿中P型アミラーゼ活性を表す。

矢印は顎下腺を摘除した日を表す。

3) 顎下腺摘除ラットにおける血漿中P型アミラーゼ活性に及ぼすトリプシン摂取の影響

図4では、顎下腺摘除の際の血漿中P型アミラーゼ活性の変化を飼料へのトリプシン添加時と非添加時とを比較して示した。顎下腺摘除前、血漿中P型アミラーゼ活性は第1群(トリプシン添加食)、第2群(トリプシン非添加食)の間で有意差は認められなかった。しかし、顎下腺摘除後、血漿中P型アミラーゼ活性は一時的に低下し、血漿中P型アミラーゼ活性は飼育16日目で最低に達し、コントロール値の約80%まで低下した。その後、第1群の血漿中P型アミラーゼ活性は次第に上昇し、コントロール値とほぼ同じ値となり、その後、一定を保った。第2群の血漿中P型アミラーゼは、ゆるやかに減少し続け、コントロール値の約60%で一定を保った。一方、対照として、顎下腺非摘除ラットに上述と同じ条件下で飼育し、得られた血漿中P型アミラーゼ活性の変動を図5に示した。第1群、第2群とも血漿中P型アミラーゼ活性は有意差は認められなかった。飼育期間終了後、解剖し、アミラーゼ分泌臓器を摘出し、湿重量を測定したところ、トリプシン添加食を摂取させた顎下腺摘除ラットでは、他のラットに比べて膵臓が1.7倍であった。

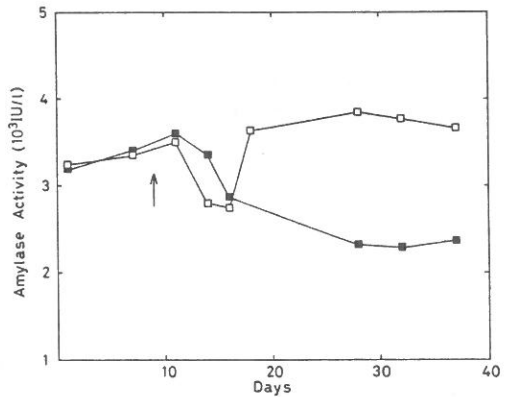


図4 顎下腺摘除ラットの血漿中P型アミラーゼ活性の変化

□は粉末MF食に2~4%トリプシンを添加し摂取させたラットの血漿中P型アミラーゼ活性を表し、■は粉末MF食を摂取させたラットの血漿中P型アミラーゼ活性を表す。

矢印は顎下腺を摘除した日を表す。

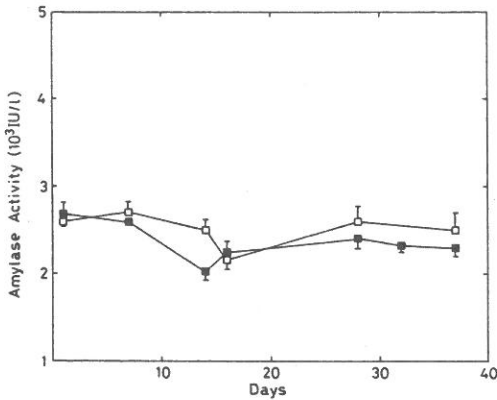


図5 顎下腺非摘除ラットの血漿中P型アミラーゼ活性の変化

□は粉末MF食に2～4%トリプシンを添加し摂取させたラットの血漿中P型アミラーゼ活性を表し、■は粉末MF食を摂取させたラットの血漿中P型アミラーゼ活性を表す。

血漿中P型アミラーゼ活性値はすべて平均値±標準偏差で表す。

考 察

ラットの血漿中総アミラーゼ活性は、多少の日内変動があるものの、通常はほぼ一定を保っている。(図2)⁵⁾ところが、顎下腺を摘除することにより血漿中総アミラーゼ活性は経日的に低下し、摘除後7日目以降に徐々に上昇する傾向が観察された。(図1)この場合、生体に存在しているアミラーゼ分泌器官のいずれかの動態によるものであるかを検討するために、S型アミラーゼ阻害抗体を用いアイソザイムを分別して測定した。ラットの血漿中S型アミラーゼ活性、P型アミラーゼ活性は、通常はほぼ1:1の割合で存在し、一定を保っていると考えられる。(図3の右)⁵⁾ところが、顎下腺摘除ラットの血漿中S型アミラーゼ活性、P型アミラーゼ活性を測定したところ、顎下腺摘除前、血漿中S型アミラーゼ活性、P型アミラーゼ活性はほ

ぼ1:1の割合で存在したが、⁵⁾顎下腺を摘除することにより血漿中S型アミラーゼ活性は、急速に低下した。(図3の左)したがって、図1の血漿中総アミラーゼ活性の減少は、顎下腺摘除による血漿中S型アミラーゼ活性の減少を反映しているものと考えられる。

次に、図5に示すとおり、ラットの血漿中P型アミラーゼ活性は、通常はほぼ一定を保っており、飼料の違いによる影響はないものと考えられる。ところが、顎下腺摘除ラットの血漿中P型アミラーゼ活性を検討した結果、顎下腺摘除前、有意差なく一定を保っていた血漿中P型アミラーゼ活性は、摘除後一時的に減少した。この減少は、顎下腺摘除術が原因で起った食餌摂取量の減少(コントロール期間の約1/3の摂取)による影響と考えられる。データには示していないが、この期間の体重の減少(摘除前の約90%)も、その影響を反映していると考えられる。一時的に減少した血漿中P型アミラーゼ活性は、次第に一定に達し、特にトリプシン添加食を摂取させたラットでは、顕著な上昇が見られた。(図4)この血漿中P型アミラーゼ活性の変動が、図1の飼育16日目以降、トリプシン添加食ラットの血漿中総アミラーゼ活性の上昇をもたらしているものと考えられる。また、飼育期間終了後、アミラーゼ分泌器官の剖見結果からも顎下腺摘除ラットにおいては、トリプシン添加食の摂取による脾重量の増加が見られており、血漿中P型アミラーゼ活性の上昇結果に符合するものと考えられる。以上、本実験結果より、トリプシンが直接的あるいは間接的に、膵臓外分泌細胞を刺激し、膵臓からのアミラーゼ分泌に影響を及ぼす可能性が示唆される。また、眼底採血を行った際に、トリプシン添加食を摂取させたラットは、概して、止血に時間を要した。このことから、血液凝固阻止作用をもつトリプシンが、⁹⁾活性な状態で消化管内から血液中に移行している可能性が考えられ、その結果、膵外分泌へ影響を及ぼす可能性が示唆される。

参 考 文 献

- 1) Fischer, E. H. and Stein, E. A. α -Amylases, in the Enzymes, 2nd ed. Vol. 4 (Boyer, P.D., Lardy, M. and Mybäck, k. eds.), Academic Press, New York, pp. 313-343 (1960)
- 2) Thoma, J.A., Spradlin, J. E. and Dygert, S. Plant and Animal Amylases, in The Enzymes, Vol, 5 (P. D. Boyer, ed.), Academic Press, New York, pp. 115-189 (1971)
- 3) Karn, R. C. and Malacinski, G. M. Adv. Comp. Physiol. Biochem, 7, 1-103 (1978)
- 4) 臨床化学分析 IV 酵素分析ライブラリー-3 東京化学同人齊藤正行, 北村元任, 丹羽正治編(1982)
- 5) アミラーゼ 生化学へのアプローチ p. 205 中村道徳監修 大西正健 板野正健 谷口肇編(1986)

ラットにおける血液中アミラーゼ活性に影響を及ぼす種々な因子

- 6) K. D. BHOOLA, GUNDULA DOREY AND C. W. JONES THE INFLUENCE OF ANDROGENS ON ENZYMES (CHYMO-TRYPSIN-AND TRYPSIN-LIKE PROTEASES, RENIN, KALLIKREI AND ON CELLULAR STRUCTURE OF THE MOUSE SUBMAXILLARY GLAND *J. Physiol.* 235, pp. 503-522 (1973)
- 7) K. G. JOHNSON SWEAT STORAGE AS A FACTOR INFLUENCING SWEAT DISCHARGE IN SHEEP *J. Physiol.* 235, pp. 523-534 (1973)
- 8) Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. : Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. chem.* 193, 265-275, (1971)
- 9) 入門酵素化学 西沢一俊 志村憲助編 (1976)

平成2年4月1日受付

平成2年12月4日受理