実験的粥状動脈硬化に対するブタ膵臓エラスターゼの 生化学的, 病理学的検討*

大 竹 信三郎**	小 出 醇**	塩 尻 博 之**
片 山 幸 一**	田 辺 義 雄**	藤 森 徹**
鈴 木 豪**	小 林 精 一**	原 久仁子**
原 田 耕 吉**	一 色 栄 造**	内 藤 晴 夫**
山 根 純 卓**	金 子 仁***	

I. 緒 言

膵臓性エラスターゼ (EC. 3. 4. 21. 11) は結合組織の弾力線維エラスチンを特異的に加水分解する酵素で, エラスチン以外のタンパク質, 例えば変性ヘモグロビン, カゼイン, フィブリン, 変性コラーゲン, コラーゲンの末端架橋部分, リボプロテインのアポ蛋白部分なども加水分解することが知られている。

膵臓性エラスターゼがエラスチンを特異的に加水分解することから, エラスチン, コラーゲン, 糖タンパク質および酸性ムコ多糖を含めた動脈壁の結合組織代謝とエラスターゼの関係については数多くの研究がなされ¹⁾, 臨床的にもアテローム性動脈硬化症および結合組織疾患への適用が試みられている。一方, 膵臓性エラスターゼの脂質代謝に及ぼす影響についても種々の検討がなされ, エラスターゼの経口および筋肉内投与により血漿中の脂質の低下やアテローム性動脈硬化斑の減少が報告されている^{2,3)}。また近年, 動脈硬化の成因および進展を考える場合, 血管壁や血中の脂質のみならず, 血小板, 凝固線溶も含めた血液側の要因が大きく関与することが示唆されている⁴⁾。このように膵臓性エラスターゼは脂質ならびに血管壁結合組織代謝に対し生理作用を有していることが

示唆されており, 実験的動脈硬化におけるエラスターゼの作用を検討することは興味深い。本報告では, コレステロール負荷ウサギにおよぼす膵臓性エラスターゼの作用を生化学的ならびに病理組織学的観点から検討した。

II. 実験材料および方法

体重約 2 kg の日本白色在来種雄性ウサギ約 30 羽を日本生物科学研究所より購入し, 無作為に 3 実験群に分けた。対照群にはウサギ用一般飼育飼料 ORC (オリエンタル酵母 KK) を, 他の 2 群; コレステロール負荷群およびコレステロール負荷 + エラスターゼ投与群は同飼料に 1% のコレステロールを加えた飼料で飼育した。摂餌料を一定にするために飽食とせず, 全期間を通じ, 1 日の給餌料を 80~100 g に設定した。1 日 1 回, 週 6 日間, コレステロール負荷群には生理食塩水を, エラスターゼ投与群には体重 1 kg 当り 408 単位の膵臓性エラスターゼ (ブタ由来) を筋注した。以後血中脂質の定量に際しては, 実験開始直前, それ以降は 4 週ごとに 1 回, 給餌前に耳静脈より採血した。血小板中セロトニン量および血漿プラスミノーゲン値の定量に際しては, コレステロール負荷前, 負荷直後, 3, 7, 11, 15 週目に採血し, 常法に従い, platelet rich plasma (PRP) および血漿を分離し測定に供した。コレステロール負荷 16 週後, 屠殺し, 心臓起始部から下降大動脈の大腿動脈分岐部まで大動脈を摘出し, 生理食塩水で血液を除

* 1982年 7 月, 第14回日本動脈硬化学会において発表

** エーザイ株式会社研究開発本部

*** 日本医科大学老人病研究所

去, 付着脂肪を分離した後, 実験に供するまで -20°C で保存した. 摘出大動脈からの脂質の抽出はクロロホルム-メタノール(2:1 v/v)を用いた. 脂質抽出後の残渣は, 自然乾燥後脱脂大動脈とした. リポプロテインの分画は, 工藤らの方法⁵⁾ に準じ日立 65-P 型超遠心機を用いた非連続蔗糖密度勾配法にて各群 5 例について行った. 超低比重リポプロテイン (VLDL), 低比重リポプロテイン (LDL) および高比重リポプロテイン (HDL) はそれぞれ蔗糖密度 1.006, 1.063 および 1.210 で単離した. 全血中および各リポプロテイン分画中のトリアシルグリセロール (TG), コレステロール (Chol) およびリン脂質 (PL) の測定は, Cleantech TG (ヤトロン KK), Iatroset Chol-E (ヤトロン KK), および Iatroset PL-E (ヤトロン KK) を用い, 通常の方法に従って定量した. Post Heparin Lipolytic Activity (PHLA) に対する検討では, *in vitro* の系においてはラットにヘパリン 25 単位/kg を静注し, 10 分後に採血して得た血漿を酵素標品とし, これにエラスターゼを添加し酵素標品に対するエラスターゼの影響を観察した. 酵素活性の測定は Intralipid (ミドリ十字 KK) を基質として, 遊離される FFA を福井ら⁶⁾ の方法に準じて測定した. *In vivo* における検討は, 実験開始 10 週後のウサギのそれぞれにヘパリン 10 単位/kg を静注し, 10 分後に採血して得た血漿リパーゼ活性を同上の方法⁶⁾ に準じて測定し PHLA 値とした. 血小板セロトニン量の測定は, 分離した PRP 20 μl に含まれるセロトニン量を高速液体クロマトグラフィー法⁷⁾ で定量し, 同時に測定した 20 μl 中の血漿セロトニン量を差し引き, PRP 20 μl 中の血小板に含まれるセロトニン量とした. 同容量の PRP 中に含まれる血小板数はコールターカウンターを用いて測定した. 各検体については血小板 10^5 個当たりのセロトニン量を算出した. 血漿プラスミノゲン値は, 血漿からリジンセファロースを用いてプラスミノゲンを分離し, ウロキナーゼで活性化した後, その値を Friberger ら⁸⁾ の合成基質を用いる方法で測定した. エラスチン水解活性は Koide らの方法⁹⁾, サクシニルトリアニンパラニトロアニリド (Suc-(Ala)₃-pNA) 水解活性は Katagiri らの方法¹⁰⁾ に従って測定した.

ウロン酸含量はカルバズール硫酸法, ヘキサース含量はアンスロン硫酸法で測定した. タンパク量の測定は Lowry 法を用いた. ブタ膵臓エラスターゼ-I 標品の調製は, Koide らの方法¹¹⁾ に従って調製し, 電気泳動的に単一なものを使用した. 各群脱脂大動脈のブタ膵臓エラスターゼ-I による酵素分解ならびにセファデックス・カラムクロマトグラフィー条件は次のごとくである. 各群脱脂大動脈 (15 mg) を正確に秤量し, 0.05 M 炭酸水素アンモニウム液, pH 7.95 (1 ml) に懸濁した. 続いて同液に溶解した酵素液 (0.3 mg/0.1 ml) を混和後, 37°C に放置した. 48 時間, 振盪下に酵素分解を行った後, 低温下に 3,000 回転, 15 分間の遠心分離を行い上清液を分取した. 残渣をさらに 1 ml の同炭酸水素アンモニウム液にて 2 回洗滌後, 洗液を母液に合併し凍結乾燥した. このようにして得られた凍結乾燥物を 0.7 ml の同炭酸水素アンモニウム液に溶解し, 前もって同液にて平衡化したセファデックス G-100 カラム (1.5 $\times$ 92 cm) に層積し同液にて溶出した. 低温下に 1.2 ml/チューブずつ分画し, 各分画について 230 nm, 280 nm の紫外部吸光度, ウロン酸含量ならびにヘキサース含量を測定した. 血清存在下エラスターゼによる酵素分解は, 酵素液 (0.15 mg) を正常ウサギ血清 (1.5 ml) と混和し, 5°C , 15 分間プレインキュベーションを行った. 続いて, 脱脂大動脈 (15 mg) を直接酵素-血清混液に加え, 非血清存在下と同一条件下に酵素分解ならびにカラムクロマトグラフィー処理を行った. 病的組織学的検討は, 肝, 腎, 脾, 心, 肺, 紅彩, 副腎, 大動脈について行った. 大動脈は弓部の下方 1 cm の部分を切出した. 前記臓器につき, ヘマトキシリン・エオジン重染色, エラスチカ・ワンギーソン染色, アルシアン青染色, ズダン III 染色を併用し, これら臓器の細胞組織における脂質の多寡を比較検討した.

III. 実験結果

1. 血漿脂質の経時変化

Figure 1 に血漿ならびに各リポプロテイン中の TG, Chol および PL の経時変化を示す. コレステロール負荷開始後血漿脂質は急激に上昇し, 4 週後の時点で TG 90~130 mg/dl, Chol 900~1,400

Fig. 1 Mean triacylglycerol, cholesterol and phospholipid levels in plasma and the fractionated lipoproteins.

Bars indicate $\pm$ standard error. Asterisks indicate significant differences vs cholesterol-fed group ($p < 0.05$).

▲—▲: Normal group
●—●: Cholesterol-fed group
○—○: Cholesterol plus elastase administered group

mg/dl, PL 190~320 mg/dl の値を示した。その後さらに PL は漸増し続けたが, TG, Chol は 12 週までは著しい変動はなく, 12 週以降 16 週にかけて再び急激な上昇がみられた。この血漿脂質の上昇は主として VLDL 中の Chol の著しい増加によるものであった。Chol の上昇に伴って TG, PL も上昇するが, Chol の上昇にくらべると緩徐であった。LDL 中の脂質はわずかに上昇した。HDL 中の脂質含量にはほとんど変化がみられなかった。

コレステロール負荷と同時にエラスターゼを投与した群では, 脂質の上昇は有意に抑制され, 16 週において特に顕著であった。

2. 大動脈中の脂質含量

Table 1 に, コレステロール負荷 16 週後の大動脈中の脂質分析の結果を示す。TG 含量は正常群でも比較的高く, むしろコレステロール負荷群で低値を示した。これは, おそらくは外膜に付着残存した脂質のためと考えられる。Chol, PL 含量

Table 1 Lipid contents in the aorta

	Triacylglycerol mg/g	Cholesterol mg/g	Phospholipid mg/g
Normal group	63.1±12.2	1.1±0.1	4.3±0.1
Cholesterol fed group	34.1± 7.0	13.2±2.3	7.1±0.6
Cholesterol plus elastase group	52.9± 8.9	12.9±2.2	7.5±0.5

Values indicate mea + Stanndrrd error,

Fig. 2 Post heparin lipolytic activity in vitro and in vivo.

は、コレステロール負荷群，エラスターゼ投与群ともに正常群に比し Chol 含量で約13倍，PL 含量で約 2 倍の高値を示し，エラスターゼ投与による影響は認められなかった。

3. Post Heparin Lipolytic Activity (PHLA)

Figure 2 に見られるごとく，in vitro の系においてヘパリン静注後のラット正常血漿にエラスターゼを 0～1,000 unit/ml の濃度範囲で添加した時，低濃度域 (0.1～10 unit/ml) では，PHLA はエラスターゼ無添加の場合とほとんど同じであった。一方，高濃度域 (100～1,000 unit/ml) では，逆に PHLA は完全に抑制された。コレステロール負荷 10 週後の各群の PHLA 比較では，正常群に比し，コレステロール負荷群で 4 倍，エラスターゼ投与群で 3.2 倍と顕著な上昇が認められた。コレステロール負荷群とエラスターゼ投与群間では，有意な差は認められなかった。

4. 血漿セロトニン量の経時的変動

Figure 3 に，10⁵ 個の血小板中に含まれるセロ

Fig. 3 Mean serotonin levels in the platelet.
○—○: Normal group
●—●: Cholesterol-fed group
□—□: Cholesterol plus elastase administered group

トニン量の変動を示す。正常群では，実験期間を通じて変動は認められなかったが，コレステロール負荷群では，実験開始後 3 週目で約 1/2 に低下し，その後低値を続けた。エラスターゼ投与群では，この低下が軽減された。

5. 血漿プラスミノゲン値の経時的変動

血漿プラスミノゲン値の変動を Fig. 4 に示す。実験開始後 7 週目では，エラスターゼ投与群で，他の 2 群に比し有意にその上昇を認めた。

6. 各臓器中のサクシニル・トリアラニンパラニトロアニリド水解放活性

Table 2 に見られるごとく，肝臓では，正常群に比し，コレステロール負荷群で有意 (p<0.01) に活性は低下した。エラスターゼ投与群では，コレステロール負荷群に比して有意 (p<0.01) に高かったが，正常群との間には差が認められなかった。腎臓の活性は，正常群に比し，コレステロール負荷群，エラスターゼ投与群とともに有意 (p<

Fig. 4 Mean plasminogen levels in the serum.
○—○: Normal group
●—●: Cholesterol-fed group
□—□: Cholesterol plus elastase administered group

0.01) に高く, 動脈の活性は, 逆にともに低下 ($p < 0.10$) した. 心臓, 肺臓, 脾臓の活性は, 群間に差が認められなかった.

7. 各群脱脂大動脈のエラスターゼによる分解パターンの差異

(a) 血漿非存在下の場合

Figure 5 に, 正常群, コレステロール負荷群ならびにエラスターゼ投与群より得た脱脂大動脈のエラスターゼ分解物のセファデックス G-100 カラムクロマトグラフィーパターンを示す. 各群のクロマトパターンを比較した時, 有核アミノ酸の含有に由来するタンパク質, ペプチドの溶出パタ

ーン (280 nm 紫外部吸光度), 酸性ムコ多糖類の分解溶出に由来する 530 nm の吸光度パターン, 糖タンパク質に由来する 620 nm の吸光度パターンには各群相互間で大きな差異は認められなかった. これに対し, 230 nm の吸光度パターンに正常群, エラスターゼ投与群間とコレステロール負荷群間との間に顕著な差が認められた. 正常群, エラスターゼ投与群では, 溶出画分22本目 (ピーク 1), 43本目 (ピーク 2), 55本目 (ピーク 3), および60本目 (ピーク 4) に4成分の分解生成物の溶出が認められた. これに対し, コレステロール負荷群では, 正常群, エラスターゼ投与群で観察されたピーク 4 の溶出成分が認められなかった.

(b) 血漿存在下の場合

Figure 6 に正常ウサギ血清存在下における各群脱脂大動脈のエラスターゼ分解物のセファデックス G-100 カラムクロマトグラフィーパターンを示す. 図では, 血漿存在下におけるエラスターゼの直接の大動脈への作用を求めるために, 各群大動脈について, 血漿のみにて予め分解したクロマトグラフィーパターンの値をエラスターゼ存在下で得られたクロマトパターンの値から差し引いて示してある. 図から明らかなごとく, 各群間で, 230 nm および 280 nm の紫外部吸収パターンに差異が認められた. コレステロール負荷群では, タンパク質, ペプチド性物質の溶出が顕著であった. これに反し, エラスターゼ投与群では, コレステロール負荷群に比較して, 明らかにこれら物質の溶出の減少が認められた. 同じ現象が酸性ムコ多糖, 糖タンパク質の溶出についても認められた. すなわち, 正常群, エラスターゼ投与群では, これら両成分の溶出が認められないのに対し,

Table 2 Suc-(Ala)₃-pNA hydrolyzing activity in the organs

		Liver	Kidney	Heart	Lung	Aorta	Pancreas
A n=7~9 Normal group	mean	10.14	2,136	12.64	53.72	3.32	1,467
	(S.E)	(0.84)	(157)	(0.80)	(4.61)	(0.54)	(157)
B n=9~10 Cholesterol fed group	mean	6.70	2,872	14.08	40.01	2.41	1,162
	(S.E)	(0.48)	(175)	(3.18)	(6.27)	(0.18)	(167)
C n=9~11 Cholesterol plus elastase group	mean	8.82	2,936	13.43	47.15	2.18	1,385
	(S.E)	(0.89)	(137)	(1.39)	(3.97)	(0.23)	(220)

Activity; n mole pNA released/hr/mg of protein

Fig. 5 Elution profile of elastolytic delipidated aorta hydrolysates among the groups from Sephadex G-100 column.

The experimental conditions are presented in the text.

コレステロール負荷群では両成分の顕著な溶出が認められた。

8. 各臓器の病理組織学的所見

肝, 腎, 脾, 心, 肺, 紅彩, 副腎, 大動脈を観察した。コレステロール負荷群では, これらの臓器に脂質沈着が著明であった。これに肝では肝細胞, 星細胞ともに, 腎ではメサンギウム細胞, 肺ではⅡ型肺胞上皮, 脾では赤髄に, 紅彩では紅彩の上皮下から網膜下層に, 大動脈では内膜の平滑筋細胞に多く認められた。大動脈は脂質沈着部位が場所によって異なり, 弓部に多かった。Table 3 に示すごとく, コレステロール負荷と同時にエラスターゼを投与した群では, 肝, 紅彩への脂質沈着は軽減される傾向にあった。

IV. 考 察

コレステロール負荷による実験動物を用いた研究で, エラスターゼが血中脂質, 特に血中コレステロールの増加を抑制すること^{2,12-16)}, ならびに大

動脈コレステロールの沈着を抑制すること^{3,12,15)}, が多くの研究者により報告されている。本研究においても, コレステロール負荷アテローム性動脈硬化症ウサギを用いた実験で, エラスターゼが血中脂質を有意に低下させることを観察した。その作用機序として, 中村と石川²⁾ は, コレステロールの肝における異化作用と胆管を通じての排泄促進を, 東野ら¹⁷⁾ はリポ蛋白質の分解促進によることを示唆している。大沢³⁾ は, 動脈硬化の発症に大動脈の metabolic barrier の関与を想定し, エラスターゼがこの barrier を保護することにより動脈壁を正常に保ち, 結果として動脈硬化の発症を抑制しているのではないかと推測している。In vitro では, PHLA は高濃度のエラスターゼによりその活性が抑制される。この作用はエラスターゼの PHLA に対する proteolytic な作用に基づくものと思われる。In vivo での PHLA 値は, コレステロール負荷群とエラスターゼ投与群では, 正常群に比して高い (Fig. 2)。この作用機序につ

Fig. 6 Sephadex G-100 column chromatography of delipidated aorta hydrolysates with elastase in the presence of serum. The experimental conditions are presented in the text.

Table 3 Lipid accumulation in tissues by pathological examination

		Liver				
		—	±	+	++	+++
Normal group	N= 9	8	1			
Cholesterol fed group	N=10				8	2
Cholesterol plus elastase group	N=11			3	6	2

		Iris				
		—	±	+	++	+++
Normal group	N= 8	8				
Cholesterol fed group	N=10			1	6	3
Cholesterol plus elastase group	N=11	2	1	1	7	

いては明らかではないが, 多分生体の合目的な反応の結果であろうと推測される. すなわち, コレステロール負荷により血漿脂質の急激な上昇が認められるが (Fig. 1), これら上昇した脂質の代謝促進のために PHLA が上昇したものと考えられる. 動脈硬化症の成因および進展因子のひとつとして, 血小板・凝固線溶を含めた血液側の要因の

関与することが今日広く指摘されている⁴⁾. 動脈硬化病巣部の傷害部位に流血中の血小板が粘着凝集しやすいことはよく知られており, 粘着凝集した血小板はその細胞成分, たとえばセロトニンを放出することにより, 血管の収縮, 壁在性の血栓が形成され则认为られる. したがって, 血小板内セロトニン量の低下は生体内での血小板粘着凝集の亢進していることを想定させる. 本実験結果においても, コレステロール負荷群では正常群に比し血小板内セロトニン量が低下していた. このことは, コレステロール負荷群では血小板と血管壁の相互作用が亢進していることを示唆している. 一方, エラスターゼ投与群では血小板セロトニン量の低下がコレステロール負荷群に比し軽減されていた. このことは, エラスターゼ投与により血小板と血管壁の相互作用が抑制されたことを示しており, エラスターゼがコレステロール負荷による動脈壁の質的变化を予防していることをうかがわせる. また, エラスターゼの投与により血漿プラスミノゲン値に上昇の傾向が見られた. この

結果は、吉村ら¹⁸⁾の臨床報告によく一致するが、作用機序については今後の検討が必要であろう。大動脈中のコレステロール含量は、コレステロール負荷群とエラスターゼ投与群間に差は認められず、組織形態学的にも両群間に著しい差は見出せなかった。

コレステロール負荷群では、肝臓および動脈において、 $\text{Suc} \cdot (\text{Ala})_3\text{-pNA}$ 水解活性が低下し、腎臓では逆に上昇した。一方、エラスターゼ投与群では、コレステロール負荷群で見られた肝での酵素活性の低下が抑制され、ほぼ正常群と同じレベルの値を示した (Table 2)。高脂血症、動脈硬化症と $\text{Suc} \cdot (\text{Ala})_3\text{-pNA}$ 水解活性との関連については今後解明していかねばならない問題であるが、Jacob ら¹⁹⁾はリポ蛋白質代謝に関与している可能性を示唆しており、この点からも本実験結果は興味深いものと考えられる。正常群、コレステロール負荷群ならびにエラスターゼ投与群について各群のエラスターゼ分解物のカラムクロマトパターンを比較すると (Fig. 5, Fig. 6)、正常群とエラスターゼ投与群ではきわめて類似した溶出パターンが観察され、コレステロール負荷群ではこれら両群とは顕著に異なったクロマトパターンを示した。このことは、コレステロール負荷群ではその大動脈の質的性状が正常群、エラスターゼ投与群のそれとは異なっていることを示していると思われる。言いかえれば、エラスターゼ投与群ではエラスターゼの投与によりその大動脈の質的性状がきわめて正常群のそれに近い状態で保持されていることを示している。Figure. 5 の正常群、エラスターゼ投与群のクロマトパターンに見られるピーク 4 の溶出成分がコレステロール負荷群では認められない。このことは、コレステロール負荷群の大動脈では正常群、エラスターゼ投与群には見られないドラスチックな質的変化が引き起こされたことを物語るものであり、ピーク 4 の性状を調べることは動脈硬化症との関連の面から特に興味ある研究課題と考えられる。各臓器の病理組織所見では、コレステロール負荷群では各臓器にわたって著明な脂質の沈着が認められた。エラスターゼ投与により、肝、紅彩への脂質沈着が軽減される傾向にあったが、はっきりとした有意差は認めら

れなかった。この原因のひとつとして、本実験で用いた 1% コレステロール食の投与が、ウサギの高脂血症の誘発には強すぎるものが考えられる。したがってこの点に関しては、さらに低用量のコレステロール食投与による再実験が必要であろう。

V. 結 論

脾臓性エラスターゼがエラスチンを特異的に加水分解することから、動脈壁の結合組織代謝とエラスターゼの関係に関する研究は多く、エラスターゼのアテローム性動脈硬化症および結合組織疾患への臨床の試みもなされている。一方、エラスターゼは脂質代謝、血小板・凝固線溶系にも影響を及ぼすことが知られている。本研究では、血中脂質、大動脈結合組織を含めた各臓器、血小板・線溶系、各臓器における酵素活性の変動、などに及ぼす脾臓性エラスターゼの作用を、コレステロール (Chol) 負荷ウサギを用いて、生化学的、病理組織学的観点から検討した。実験動物は、1 群 10 匹：正常群、Chol 負荷群、Chol 負荷 + エラスターゼ投与群を用いた。結果：(1) Chol 負荷開始後血漿脂質は急激に上昇した。これは主として VLDL 中の Chol の著しい増加に起因した。エラスターゼ投与により、この脂質の上昇は有意に抑制された。(2) PHLA は、Chol 負荷群とエラスターゼ投与群間では有意な差はなく、ともに正常群に比し顕著な上昇を認めた。(3) 血漿セロトニン量は Chol 負荷により低下したが、エラスターゼ投与によりこの低下が軽減した。血漿プラスミノゲン値は、エラスターゼ投与群で他の 2 群に比し有意にその上昇を認めた。(4) $\text{Suc} \cdot (\text{Ala})_3\text{-pNA}$ 水解活性は、肝臓では Chol 負荷群で有意に低下した。この低下はエラスターゼ投与群で正常群の値にまで改善された。腎臓では、正常群に比し、Chol 負荷群、エラスターゼ投与群で有意に高く、動脈ではともに低下した。心臓、肺臓、脾臓では、群間に差を認めなかった。(5) 血漿存在下、および非存在下での各群脱脂大動脈のエラスターゼ分解物のカラムクロマトグラフィーパターンの比較では、正常群とエラスターゼ投与群では、Chol 負荷群とは異なっており、相互に類似したクロマトパターンを示した。酵素に対する抵抗性も、

Chol 負荷群に比し, 正常群, エラスターゼ投与群ではともに大であった。(6) 病理組織学的所見では, コレステロール負荷群で, 各臓器で脂質の沈着が著明であった。エラスターゼ投与群では, 肝, 紅彩で脂質の沈着が軽減される傾向にあった。

文 献

- 1) Zemlenyi, T.: Enzyme chemistry of arterial wall; Chapter XXII: The relation between elastase, atherosclerosis and lipoprotein lipase. Lloyd-Luke Ltd., London, 209-213 (1968).
- 2) 中村治雄, 石川昌子: コレステロール代謝に及ぼすエラスターゼの作用. 日老医誌, **8**: 225-232 (1971).
- 3) 大沢 旭: エラスターゼ(弾性線維分解酵素)の抗動脈硬化作用について. 日内会誌, **59**: 230-239 (1970).
- 4) Woolf, N.: Thrombosis and atherosclerosis. In: The thrombotic process in atherosclerosis. Chandler, A. B., Eurenus, K., MacMillan G. C., Nelson, C. B., Schwarz, C. J., Wessler, S., (ed.), Plenum Press, New York and London, Advances in Exp. Med. Biol., **104**: 145-167 (1978).
- 5) 工藤明生, 中村尚人, 田中信行, 新井 健: 蔗糖密度勾配遠心法による血清リポ蛋白の分離. 動脈硬化, **6**: 39-42 (1978).
- 6) 福井 巖, 久城英人: リポプロテインリパーゼ. 臨床化学, **1**: 115-129 (1972).
- 7) Fujimori, T., Yamanishi, S., Tajima, T. and Yamatsu, K.: HPLC determination of endogenous serotonin released from aggregating platelets. J. Pharmacol. Method., **7**: 105-113 (1982).
- 8) AB. KABI DIAGNOSTICA (April 1977): Determination of anti-plasmin in plasma with S-2251, Laboratory Instruction.
- 9) Koide, A., Yoshizawa, M. and Kurachi, K.: Crystallization and properties of carboxypeptidase A γ from porcine pancreas. Eur. J. Biochem., **117**: 383-388 (1981).
- 10) Katagiri, K., Ito, K., Miyaji, M., Takeuchi, T., Yoshikane, K. and Sasaki, M.: Succinyl trialanine p-nitroanilide-hydrolytic enzymes in human serum. An improved method for clinical diagnosis. Clin. Chim. Acta., **95**: 401-404 (1979).
- 11) Koide, A. and Yoshizawa, M.: Crystallization and identification of a binary complex of an elastase I and a carboxypeptidase A γ from porcine pancreas. Biochem. Biophys. Res. Commun., **100**: 1091-1098 (1981).
- 12) 藤城 昇, 太田秀哉, 川島司郎, 三好成文, 河出芳助, 町田元実: 家兎実験的粥状動脈硬化症に対するエラスターゼの予防効果について. 日老医誌, **8**: 100-103 (1971).
- 13) 山崎晴一郎, 有馬 正, 南部征喜, 井上庄二: Elastase complex の高脂血動物に及ぼす影響: 臨床と研究, **48**: 975-978 (1971).
- 14) 山崎晴一郎, 南部征喜: Cholesterol 代謝に関する研究—Elastase complex の Cholesterol 代謝に及ぼす影響. 臨床と研究, **49**: 1647-1649 (1972).
- 15) 亀谷富夫: コレステロール負荷家兎の血漿および大動脈壁リポ蛋白に及ぼすエラスターゼの影響: 動脈硬化 **6**: 101-113 (1978).
- 16) 瀬山義幸, 宇佐美英治, 飯島洋実, 山下三郎: Elastase の作用研究. (1) 実験的家兎高脂血症における Elastase の脂質代謝と結合組織に及ぼす影響. 動脈硬化, **9**: 135-142 (1981).
- 17) 東野俊夫, 石丸芳江, 沢 直樹, 銅直利之, 佐藤信博, 宮本東生: Elastase complex の lipolyse 作用に関する基礎的研究. 臨床と研究, **48**: 2402-2411 (1971).
- 18) 吉村良之介: エラスターゼの線溶系の因子に及ぼす影響について. 基礎と臨床, **9**: 1777-1790 (1975).
- 19) Jacob, M. P., Bellon, G., Robert, L., Hornebeck, W., Ayrault-Jarrier, M., Burdin, J. and Polonovski, J.: Biochem. Biophys. Res. Commun., **103**: 311-318 (1981).

Summary

The Biochemical and Pathological Studies on Effects of Porcine Pancreatic Elastase in Experimental Atherosclerosis with Hyper-Cholesterolemia

Shinzabro OHTAKE*, Atsushi KOIDE*, Hiroyuki SHIOJIRI*, Kouichi KATAYAMA*,
Seiichi KOBAYASHI*, Toru FUJIMORI*, Suguru SUZUKI*, Yoshio TANABE*,
Kuniko HARA*, Kokichi HARADA*, Eizo ISSIKI*, Haruo NAITOH*,
Sumitaka YAMANE* and Masashi KANEKO**

*Eisai Research Laboratory, Eisai Co. Ltd.

**Research Institute of Gerontology, Nippon Medical School

The effects of porcine pancreatic elastase on hypercholesterolemic rabbits have been studied. The lipid levels in plasma and tissues, post heparin lipolytic activity (PHLA) in plasma, serotonin contents and plasminogen levels in plasma, succinyl trialanine p-nitroanilide (Suc-(Ala)₃-pNA) hydrolytic activity in tissues and the susceptibility of aorta to elastolytic hydrolysis were analyzed in normal, cholesterol-fed and cholesterol plus elastase injected group.

The results were as follows:

1) A rapid increase of the plasma lipids was observed immediately after cholesterol feeding began and the striking increase in the lipid levels of the plasma were mainly due to a large increase of cholesterol in VLDL. A significant decrease of the plasma lipid levels was observed in the elastase injected group.

2) The high levels of PHLA were observed in the cholesterol-fed and the elastase injected group compared with that of the normal group, but no significant differences were observed between the cholesterol-fed and elastase injected group.

(3) A significant decrease of serotonin contents was observed in the cholesterol-fed group, and the decrease was prevented by the elastase

injection.

4) The high plasminogen levels were observed in the elastase injected group, compared with those of the other two groups.

5) Suc-(Ala)₃-pNA hydrolytic activity in the liver was decreased significantly in the cholesterol-fed group, and the administration of elastase prevented the decrease of the activity. The activity in the kidney was increased significantly in the cholesterol-fed and the elastase injected group and the activity in the aorta was decreased in both groups compared with that of the normal group.

6) The elution profile of elastolytic aorta hydrolysates with and without serum showed that the pattern in the elastase injected group was similar to that of the normal group whereas the pattern in the cholesterol-fed group was different from the others.

7) Pathologically, it was observed that a large amount of the lipids was accumulated in tissues. However, the slight sign of the lipid reduction was seen in the liver and the iris from the rabbits treated with the elastase.

Key words: Atherosclerosis, Hypercholesterolemic rabbit, Aorta, Elastase.