

氏名(本籍)	くり 栗	はら 原	あつし 篤
学位の種類	薬	学	博 士
学位記番号	薬博第	147	号
学位授与年月日	昭和59年	3月27日	
学位授与の要件	学位規則第5条第1項該当		
研究科専門課程	東北大学大学院薬学研究科 (博士課程)製薬化学専攻		

学位論文題目	ステロイド性抗炎症薬の白血球浸潤抑制作用の解析
--------	-------------------------

(主 査)

論文審査委員 教授 鶴 藤 丞 教授 橋 本 嘉 幸

教授 佐 藤 進

論文内容要旨

急性炎症の反応局所においては、血管透過性亢進と共に、好中球を主体とする細胞浸潤が認められる。浸潤した細胞は、貪食等により起炎物質の除去にあたる反面、この作用の結果生じる顆粒内中性酵素の放出、活性酸素産生及び種々のアラキドン酸代謝産物の生成等を通して炎症を増悪させる一面があると想定されている。卓越した抗炎症効果を持つ副腎皮質ホルモン（ステロイド）は、また非ステロイド剤に比し、この白血球浸潤に対しても強力な抑制作用を有するが、その作用機序に関する研究は、血管透過性亢進抑制作用に関するほど進歩はしていない。白血球浸潤は、血管透過性亢進に比し、起炎刺激後十分な反応が出現するまで、かなりの時間を要すること、薬物の作用部位として白血球自身の他、白血球機能に与える例えば走化性因子などの様々の因子が想定される事がその理由と考えられる。本研究はステロイドの抗炎症効果の作用機序について、この白血球浸潤抑制作用の面から検討を行なったものである。実験には、ステロイドの作用の強力なデキサメサゾン（DXM）を使用した。

まず第一に、DXMの白血球浸潤抑制作用が炎症の場において局所的に発現するものか、或いは全身作用なのかについて検討を行なった。in vitro で白血球に対し走化活性をもつと報告されている物質（casein等）を加えた2% CMC（sodium carboxymethyl cellulose）溶液をrat背部皮下に注入して嚢を作ると、この嚢内への強い白血球浸潤が観察される。この嚢をrat背部に2ヶ所作り、一方にDXMを $6 \times 10^{-7} \sim 6 \times 10^{-5}$ Mの濃度で投与し、2つの嚢への白血球浸潤を比較すると、何れの用量でもDXMを投与した嚢への白血球浸潤が有意に強く抑制された。この結果は、DXMの白血球浸潤抑制作用が、血漿中に産生される因子を介する全身作用としてではなく、炎症局所で白血球の運動を直接阻害するか、または局所で産生される走化因子の量を直接低下させることにより発現するというを示唆している。よって次にin vitroの実験系を用いて白血球の機能に対するDXMの効果について検討を行なった。

まず、Boyden chamberを用いて白血球の走化性に与える直接の影響を調べた。Boyden chamberはmicropore filterにより分割された上下二室よりなり、下室に加えた走化活性物質に向かって、上室に加えた白血球がfilter中へ遊走する現象を観察できる装置である。本研究ではこの細胞の遊走を、従来の ^{51}Cr -標識法を改良することにより感度よく定量することに成功した。すなわち、上室に加える細胞を ^{51}Cr で放射標識し、さらにfilterを $10 \mu\text{m}$ の薄いfilterと $150 \mu\text{m}$ の厚いfilterの2枚重ねとして、下のfilter内へ遊走した細胞数をその放射活性により定量した。標準走化活性物質として、zymosanで補体を活性化した血清（zymosan-activated serum）を用いたが、このようなcrudeな物質を用いた場合でも細胞の走化性運動を感度よく定量することができる。この実験系においてDXMを $6 \times 10^{-7} \sim 5$ M濃度で直接chamber内へ加

えても白血球の運動には何らの影響も認められないが、白血球をDXMで前処理することにより、DXMの用量及び前処理時間に依存した白血球の走化性運動の抑制が認められた。その抑制率は 6×10^{-6} M、4時間前処理の場合約30%であった。

続いて *in vitro* の実験として、白血球走化因子産生について検討を行なった。炎症部位に浸潤した白血球は、様々の炎症性刺激を受けて自らさらに走化因子を産生し、その後の白血球浸潤を増幅する可能性が考えられた。本実験では、この可能性を検討するため、まず白血球を zymosan と共に培養し、生成する走化因子を、培地の走化活性の測定により定量した。その結果、使用した zymosan 量及び培養時間に応じて培地中に走化活性物質が産生放出されることが確認された。白血球由来の物質には、白血球遊走を刺激するものがいくつか報告されているが、Ca ionophore の作用の下にアラキドン酸のリポキシゲナーゼ代謝産物として生成する leukotriene B₄ (LTB₄) に、非常に強い走化活性のあることが報告されている。よって上述の培地から脂溶性画分を抽出し、LTB₄ を含む画分を高速液体クロマトグラフィ (HPLC) により分離すると、この画分のみ走化活性が認められた。培地中の走化活性はかなりの割合で脂溶性画分に回収され、しかも LTB₄ を含む画分の活性の強さは、脂溶性画分に回収された活性の強さに匹敵するものであった。これらは、培地中に見出された走化活性の大部分が白血球から産生された LTB₄ の走化活性によることを示唆している。さてこの実験系において白血球をDXMと前処理した後に zymosan で刺激すると、やはりDXMの用量及び前処理時間に応じて培地中の走化活性の低下が認められた。白血球との2時間の前処理によりDXMは 6×10^{-7} Mで65%と最大の抑制率を示した。白血球の走化性運動そのものに対するDXMの効果と比較した場合、DXMの用量、抑制率及び抑制を発現させるために必要な前処理時間のどれをとっても、走化因子産生に対して遥かに強力な抑制作用の発現することが明らかとなった。白血球の産生する走化因子の本体であるLTB₄は、大食細胞など他の炎症性細胞からも産生されることが報告されており、これまでの実験結果から、DXMを含むステロイドは、炎症局所において主に走化因子であるLTB₄産生を低下させることにより、白血球浸潤を抑制する、ということが示唆された。

ステロイドはアラキドン酸遊離を促進する phospholipase A₂ (PLA₂) を阻害することが知られている。その分子機構として白血球ないしは大食細胞から、ステロイドの存在下に産生放出される lipomodulin あるいは macrocortin と名付けられた蛋白が、PLA₂ を阻害し、ひいては抗炎症効果をもたらすとの報告がある。上述の *in vitro* の実験において、DXMと白血球の前処理培地中にDXMの抑制作用を代行しうる物質があるか否かについても検討したが、前処理培地にそのような作用は全く認められず、DXMの作用は総て細胞内にもみ発現することが確認された。つまり、たとえ lipomodulin 様の物質が産生されていたとしても、それが細胞外に放出されて効果をもたらすことはなく、細胞内で作用を発揮していることが示された。

炎症部位への白血球浸潤は、炎症局所において産生された白血球走化因子により、誘導されると考えられているが、実際の炎症局所における走化因子の動態について研究した例はほとんどない。上述の *in vitro* の実験で得られた所見を確認の上からも、本研究では次に *in vivo* の実験として、炎症滲出液中に見い出される白血球走化活性の解析を行なった。

炎症実験モデルとして、鶴藤らの開発した、化学修飾蛋白を抗原とする rat アレルギー性気管支炎モデルを使用した。この炎症モデルでは、炎症惹起後24時間前後を最大とする著しい白血球浸潤が炎症局所に認められる。そこでまず最初に炎症部位への白血球浸潤と局所の走化活性との関係について検討した。すなわち抗原で感作した動物の背部に空気を注入して気嚢を形成する。翌日この嚢内に抗原溶液を注入してアレルギー反応を惹起し、以後経時的に動物を殺して嚢内貯留液を総て回収する。回収した嚢内液中の浸潤細胞数を算定後、超遠心により上清を得、その走化活性を Boyden chamber により測定した。その結果、浸潤細胞数は炎症惹起4時間後から急速に増加し、15-24時間で最大に達し以後漸減することが確認された。一方、嚢内液中の走化活性は4時間で最大に達し、8時間後まで強い活性が存在するが、以後急速に失活し浸潤細胞数が最大に達する時期には殆ど活性のないことが確認された。つまり、嚢内液中の走化活性レベルは、浸潤細胞数の増加と著しい相関性のあることが示され、炎症局所に産生される走化因子が実際に白血球浸潤を誘導していることが示唆された。この実験結果をもとに、次に DXM の効果について検討した。アレルギー惹起と同時に DXM を局所に投与すると、浸潤細胞数及び走化活性レベル共に DXM の用量に依存して低下した。さらに DXM の影響を経時的に調べると、惹起3時間後では、浸潤細胞数がまだ少なく DXM の効果が認められないのに対し、この時点ですでに本来高いレベルにある走化活性が DXM 投与により有意に低下することが確認された。この現象はステロイドの白血球浸潤抑制作用が、まず炎症局所の走化因子のレベルを低下させることにより発現する、ということを示唆している。一方、同時に、非ステロイド剤の indomethacin の効果を同様に調べたが、白血球浸潤は抑制されるものの、走化活性には全く影響が認められず、走化活性低下はステロイドに特異的な作用であることも示唆された。

最後に、この炎症局所の白血球走化活性の DXM による低下が、 LTB_4 の産生抑制によるのか、また LTB_4 が実際の白血球浸潤誘導にどの程度係わっているのかについて検討を行なった。嚢内液の脂溶性画分をまず octadecylsilyl silica cartridge を用いて抽出し、その走化活性の経時変化を調べると、惹起4時間後まで嚢内液の活性上昇と並行して、この脂溶性画分の活性の上昇が認められた。これはアレルギー惹起後の早い時期の白血球浸潤誘導に LTB_4 が関与していることを示唆している。これに対し、惹起から8時間後では嚢内液そのものにはまだ強い活性が認められるものの、脂溶性画分の活性は消失しており、この時期以降の白血球浸潤が、他の恐らく蛋白性の走化因子により誘導されることが示唆された。脂溶性画分の活性が、 LTB_4 を含む画分に

由来することは、先の *in vitro* の実験同様、HPLC を用いて分離した画分の走化活性を測定することにより確認した。その上で、この脂溶性画分の走化活性に与える DXM 投与の影響について検討を行なった。DXM を先ほどと同様、惹起と同時に局所に投与すると、走化活性の最大となる 4 時間後の脂溶性画分の活性は、検出できないほど低下した。もちろんこの時、囊内液上清の走化活性は、浸潤細胞数とともに DXM 投与により有意に低下しており、一方、脂溶性画分を抽出し終えた囊内液上清の走化活性には、DXM 投与による有意な影響は認められなかった。よって、DXM の走化活性の低下作用は LTB₄ の産生抑制を介して発現すること、さらにこの走化活性の低下により白血球浸潤が低下することから、LTB₄ が実際に白血球浸潤誘導に強く関与していることが示唆された。

本研究を通じて、白血球浸潤への LTB₄ の関与が示唆された。白血球浸潤を抑制することが、炎症反応の鎮静化に大きく役立つとすれば、今後 LTB₄ 合成阻害剤を開発することにより、より強力な抗炎症薬が生み出されると考えられる。

審査結果の要旨

本研究はステロイド抗炎症薬の作用機序に関連して行なわれたもので生体レベルの実験と、生体外にとり出した白血球に生体外でステロイド抗炎症薬を作用させた実験とによって組み立てられている。生体外での実験はさらに2つの種別の実験から成り、その第1は生体外で白血球にステロイド抗炎症薬を作用させることによって、白血球の化学走化性物質へ向けての遊走能が変化するか否かを検討したものである。その結果、処理時間が長くなるほど遊走能が低下することが明らかになった。しかしその低下の程度は比較的軽度でこれをもって生体レベルでのステロイド抗炎症薬の白血球浸潤抑制作用を説明するのは無理であることが判明した。一方、生体外でインキュベートした白血球にバクテリアの模型であるザイモサンを貪食させると白血球走化物質であるロイコトリエン B_4 を産生するがこの際ステロイド抗炎症薬が存在していると数時間後にはロイコトリエン B_4 の産生能力が抑制されてくることが明らかとなった。

生体レベルの実験では、まずラットの背部皮下に2箇所または4箇所の carboxymethyl cellulose (CMC) の嚢をつくり、この嚢内液中に白血球を遊走させる実験系 (multiple pouch method) を完成した。この方法を用いてステロイド抗炎症薬の白血球浸潤抑制の有効濃度を定めたのち、アズベンゼンアルソネート結合ウシ血清アルブミン (ABA - AcBSA) で感作したラットに CMC 空気嚢を作成し、これに抗原である ABA - AcBSA を適用してアレルギーを惹起させるアレルギー空気嚢炎症を用い、炎症滲出液中への白血球遊走が滲出液の白血球走化活性と相関することを明らかにした。そしてこのアレルギー炎症局所にステロイド抗炎症薬を適用すると滲出液の白血球遊走活性の低下にもとづいて白血球遊出が抑制されることを明らかにし、さらにこの場合の白血球走化活性物質のうちで脂溶性の部分の活性がステロイド抗炎症薬の用量に依存して抑制されること、そしてその化学的自体はロイコトリエン B_4 であること明らかにした。

さらに、非ステロイド性抗炎症薬であるインドメタシンは通例の抗炎症作用を発揮する量よりも多量に投与すると若干の白血球浸潤抑制作用をあらわすが、この際には炎症滲出液自身の白血球走化活性は低下せず、ステロイド性抗炎症薬に見られる強力な白血球浸潤抑制作用とはメカニズムが違うことが判明した。

以上本研究は抗炎症薬とくにステロイド性抗炎症薬の作用機序に関して顕著な成果を収め薬学の発展に貢献したもので、薬学博士の学位を授与するに値するものと判定される。