

氏名(本籍)	くま くら せい いち ろう 熊 倉 誠 一 郎
学位の種類	薬 学 博 士
学位記番号	薬博第 173 号
学位授与年月日	昭和63年 3月25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	血管透過性亢進反応におけるBradykinin の役割の解析

(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

《序》

生体は局所組織に作用した物理的、化学的な傷害、あるいは病原微生物、免疫反応による生成産物などに対しその局所に血漿および白血球の集積を引きおこす。ひき続いて起こる組織修復も含めこれら一連の過程が炎症とよばれる生体反応であるが、この炎症反応を解析する上で炎症局所に存在する化学物質を同定しそれらの役割を知ることは、一連の過程の機序を解明するためにも重要である。またその機序の解明が、炎症による苦痛や炎症に基く組織破壊に対する根本的かつ効果的な治療法を提供することになるものと考えられる。本研究の対象であるブラジキニン(bradykinin)は、血管透過性亢進作用、発痛作用を有することから炎症の化学媒介物質(ケミカルメディエーター; chemical mediator)としての可能性が注目されてきた物質である。しかしこれまでブラジキニンは、炎症局所での定量が成功しておらず、炎症強度と内因性ブラジキニン量との関係を示した研究成果は得られていなかった。そこで本研究では血液凝固系第XII因子(Hageman factor)を活性化することが知られていたカオリン(kaolin)を起炎剤として用いた空気嚢型炎症モデルを確立して、内因性ブラジキニン量と血管透過性亢進の関係を解析した。更にそのモデルにおけるブラジキニンの産生系・分解系の役割についても検討を行った。また抗炎症薬の薬効評価に用いられる起炎剤であるカラゲニン(carrageenin)により誘発される空気嚢型炎症モデルにおけるブラジキニンの関与を、産生系・分解系の役割も含め検討した。

《実 験 方 法》

[1. 炎症モデル] カオリン(kaolin)を、0.8% carboxymethylcellulose-0.9% NaCl溶液に10 mg/mlの割合で懸濁した液を起炎剤として用いる、ラット空気嚢型炎症モデルを作製した。

(Sprague-Dawley系雄性ラットを使用した)。またカラゲニン(carrageenin)を0.9% NaCl溶液に2%の割合で溶解した液を起炎剤とした空気嚢型炎症モデルも使用した。[2. 血管透過性亢進の測定] Fluorescein isothiocyanate conjugated bovine serum albumin(F-BSA)をトレーサーとして用いた。静脈内に投与したF-BSAの何%が一定時間後に滲出液中に回収されたかを求め、血管透過性亢進の指標とした。[3. ブラジキニン量の測定] ブラジキニン測定のための滲出液は、採取した滲出液中での新たなブラジキニンの産生及び分解を防ぐため、ブラジキニンの産生系・分解系の阻害剤を含む溶液をあらかじめ入れておいたプラスチックの注射筒で、空気嚢より直接採取した。採取した滲出液中のブラジキニンはエタノール抽出の後、酵素免疫測定法で測定した。[4. キナーゼ(kininase)活性の測定] 試料中でブラジキニンを分解させ、残存したブラジキニンを酵素免疫測定法で測定した。あるいは合成基質であるBz-Gly-Arg,

Bz-Gly-His-Leuを用いて測定した。〔5. 血中プレカリクレイン(prekallikrein)量の測定〕合成基質z-Phe-Arg-MCAを用いて測定した。

《結果・考察》

I カオリン空気嚢型炎症モデルの確立とその血管透過性亢進に対するブラジキニンの産生系・分解系の関与

血液凝固第XII因子を活性化するカオリンを起炎剤に用いて、内因性ブラジキニンによる炎症反応を誘発するモデルとしてカオリン空気嚢型炎症モデルを作成した。このモデルでは惹起直後に滲出液中のブラジキニン量が4分を最大値として上昇し、20分以降は検出限界(0.07ng/ml)以下に減少した。血管透過性も0-10分に最大値を示し、ブラジキニン量と炎症強度に相関関係が得られた。惹起後10分の滲出液中でブラジキニン分解活性が認められたため、ブラジキニン量の急激な減少は滲出液中のキナーゼによるものであると考えられた。惹起後0-10分で、キナーゼIのインヒビターであるDL-2-mercaptomethyl-3-guanidinoethylthiopropanoic acid及びキナーゼIIのインヒビターであるcaptoprilを投与しブラジキニン量を増加させた場合、血管透過性はさらに亢進し、血漿カリクレインの阻害剤であるsoybean trypsin inhibitor(SBTI)を用いてブラジキニンの産生を抑制した場合は血管透過性も抑制され、ブラジキニン量の変動と血管透過性が対応して変化した。以上の結果よりカオリン炎症初期ではブラジキニンが産生され血管透過性亢進に関与していること、さらにそのブラジキニン量の減少は炎症局所のキナーゼによるものであることが明らかになった。惹起後4時間ではブラジキニン量が検出限界以下であり、SBTIを投与しても血管透過性が抑制されないことから、ブラジキニン単独で血管透過性亢進には関与していないと考えられるが、キナーゼIIを抑制した場合に、多量のブラジキニンが滲出液中で測定できるようになる。この事実はブラジキニンの産生がこの時間帯でも続いていることを示し、この時間帯はキナーゼIIがブラジキニン分解に大きく関与していると結論された。また惹起後4時間目はプロスタグランジン(prostaglandin)とキナーゼにより分解され得なかった内因性ブラジキニンが相乗作用をして、血管透過性が亢進していることが明らかになった。

II カオリン空気嚢型炎症モデルにおけるキナーゼ活性

カオリン空気嚢型炎症モデルにおいて、キナーゼインヒビターを投与するとブラジキニン量の減少は起こらなくなること、また空気嚢内にブラジキニンを注射した場合、低い用量では血管透過性を亢進し得ないが、キナーゼインヒビターと併用すると作用が発現されることから、滲出液中においてはキナーゼがブラジキニンの作用発現に重要な役割を果たしていることが明らかになった。従来キナーゼIとIIの活性の測定には合成基質であるBz-Gly-ArgとBz-Gly-

His-Leuが繁用されている。しかし合成基質を用いた場合は同一の試料中のキナーゼ I と II の効力の比較ができないということと、感度が悪いという2つの欠点がある。そこで本研究においては試料にブラジキニンを添加し一定時間反応させ、残存したブラジキニン量を酵素免疫測定法で定量するという方法でキナーゼ活性を測定した。カオリン炎症の惹起後10分の滲出液中に存在するキナーゼ活性の由来については、可能性として 1) 血管透過性亢進に伴う血漿成分の漏出 2) 組織に存在するキナーゼの空気嚢内への浸潤 3) 炎症性細胞からの放出が考えられる。そこでこれらの可能性に関して検討を行ったところ、皮下組織に存在するキナーゼ II の空気嚢内への浸潤が最も重要であると結論された。

III カオリン空気嚢型炎症モデルの初期血管透過性亢進に対するStem Bromelainの効果

Stem bromelainは血液凝固系第XII因子の活性化を介して、プレカリクレインと高分子キノーゲンを枯渇することが知られているthiol proteaseであるが、それによってブラジキニン産生が抑制されるかという点に関しては検討されていなかった。そこでその点を明らかにするためカオリン空気嚢型炎症モデルに対するbromelainの効果を検討した。Bromelainを投与したラットではプレカリクレイン量は用量依存的に抑制され、そのラットにカオリン炎症を惹起した場合、ブラジキニン量と血管透過性共に用量依存的に抑制された。またbromelain投与によって血中ではキナーゼ活性が上昇していたが、滲出液中では上昇していなかった。またbromelainを投与しておいた状態では、キナーゼインヒビターにより増加する滲出液中のブラジキニン量は有意に抑制された。以上よりbromelainは血漿カリクレイン-キニン系の枯渇によりブラジキニン産生を抑制し内因性ブラジキニンによる炎症反応を抑制できることが明らかになった。

IV カラゲニン空気嚢型炎症モデルにおけるブラジキニンの関与

カラゲニン空気嚢型炎症モデルでは惹起後30-60分に滲出液中のブラジキニン量は最大値を示し、血管透過性も惹起後30-60分に一過性の亢進を示した。また滲出液中のキナーゼ活性を測定したところブラジキニン量が減少を始める惹起後1時間では強い活性が見られた。惹起後30-60分でブラジキニン量はcaptoprilを用いることにより著しく増加し、血管透過性も強い亢進を示した。またSBTIによりブラジキニン量を減少させると血管透過性も有意に抑制された。この結果からカラゲニン炎症30-60分の血管透過性亢進にブラジキニンは関与していることが明らかになった。また惹起後3.5-4時間においてもcaptoprilがブラジキニン量、血管透過性を増強したことから、カラゲニン空気嚢型炎症モデルの場合滲出液中のブラジキニン分解にはキナーゼ II が重要な役割を果していることが明らかになった。惹起後3.5-4時間での滲出液中の僅かのブラジキニンとプロスタグランジンが相乗作用をし血管透過性を亢進していることが明らかになった。

《総括》

本研究では滲出液中のブラジキニンを定量することにより、炎症局所において産生された内因性ブラジキニンと、炎症強度（血管透過性亢進反応）両者に立脚した根拠に基づいてブラジキニンの役割を検討することが可能になった。

ラットの皮下でカオリンによって血漿カリクレインーキニン系を活性化した場合にブラジキニンが産生され、そのブラジキニンは血管透過性亢進に関与することが明らかになった。しかしそのブラジキニンの産生が続いている状態でも皮下組織から浸潤してきたキナーゼIIにより分解をうけ、滲出液中の量が減少することも明らかになった。また血漿カリクレインーキニン系を枯渇した状態において、ブラジキニン産生が抑制されることが明らかになった。更にこれまで起炎作用の機序が明確にされていなかったカラゲニン空気嚢型炎症モデルにおけるブラジキニンの関与が示され、内因性ブラジキニン量が血管透過性亢進と相関関係を示す時期が存在することが明らかになった。またこれらの研究を通じてカオリン空気嚢型炎症モデルの初期は、ブラジキニンの産生系・分解系に対する薬物の効果を検討することが可能な実験系であること、酵素免疫測定法を用いたキナーゼ活性の測定法が、簡便かつ精度のよい方法であることも示された。更にブラジキニンの定量法並びにその産生系・分解系の関与を証明するための方法論は、カラゲニン空気嚢型炎症モデルに適用したように、他の炎症モデルや実際の病態におけるブラジキニンの役割を解明するために有用であることが示された。

審 査 結 果 の 要 旨

ブラジキニンとは過去40年間にわたって、炎症反応の発現に関与する生体内物質ではないかと言われながら、今日に至るまで決定的な証拠が得られないままに推移してきた。この点について本研究は、明快な実験的証拠に基づいて炎症におけるブラジキニンの役割およびブラジキニン産生系および分解系の役割を解明することに成功したものである。

熊倉はこの研究に当たり、まず実験法を確立するためカオリン空気嚢型炎症を開発し、これと共にカラゲニン空気嚢型炎症をも活用して本研究を実施した。カオリン空気嚢型炎症の誘発には、ラットの背部皮下に空気を注射して空気嚢を作成しておき、この空気嚢内にカルボキシメチルセルロース (CMC) の溶液に懸濁したカオリンを注入するという方法を考案した。また、本研究を成功に導いた要素として、空気嚢型炎症と共に特筆すべきものは炎症局所のブラジキニンの濃度を正確に測定する方法を確立したことである。

これらの実験法を確立したのち、まずカオリン空気嚢型炎症における局所血管透過性と浸出液ブラジキニン濃度の時間経過を測定した。その結果、炎症を誘発してから30分後までの期間において、ブラジキニン濃度の時間経過は血管透過性の時間経過とよく相関すること、ブラジキニン濃度は炎症誘発後急上昇し5分後に最高値に達するが、その後は急速に低下し、20分後には測定感度以下になってしまうほど急速に低下することを明らかにした。ついで、ブラジキニンのこのような急速な消失の原因を検討した。それは炎症局所 (嚢内液) にブラジキニン分解酵素 (キナーゼ II) が急速に出現するからであり、このキナーゼは局所組織に由来するものであることを解明した。炎症局所においては、炎症誘発の4時間後にもブラジキニン産生系は活発に働いており、ブラジキニン産生は続いているが、キナーゼが組織から浸出液中に溶けこんでくるために、産生されるブラジキニンが急速に分解してしまうことが解明された。

カラゲニン炎症においても基本的には同じことが起こっている。しかし、カラゲニン炎症の場合には嚢内液のキナーゼ活性の上昇速度が遅いので、ブラジキニンは炎症誘発 (カラゲニン溶液の空気嚢内への注入) 後60分間は上昇を続けることができるが、その後は急速に低下し測定感度以下になってしまうことが明らかにされた。

このように、本研究は炎症病態の生化学的メカニズムの解明により、その薬物治療へのアプローチに対して理論的拠り所を与えたもので、薬学博士の学位を授与するに十分なものと判定する。