

氏 名 (本籍)	こ 今	の 野	さとし 聡
学 位 の 種 類	薬	学	博 士
学 位 記 番 号	薬 博 第	1 5 7	号
学位授与年月日	昭和 6 0 年	3 月 2 6 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	Zymosan 空気嚢炎症モデルの確立とその急性期炎症反応の解析		

(主 査)

論文審査委員 教授 鶴 藤 丞 教授 曳 野 宏  
教授 佐 藤 進

# 論文内容要旨

## 序 論

補体は、免疫複合体による古典的経路 (classical pathway) あるいは種々の菌体成分等による第2経路 (alternative pathway) を介して活性化を受けると、その過程で各種の生理活性をもったフラグメントが産生されることが知られている。これらのフラグメントの中でアナフィラトキシン (anaphylatoxin) と一括して呼ばれる C3a, C4a, C5a は、肥満細胞に働いて脱顆粒を引き起こし、血管透過性を亢進することが知られている。また、C5a, C5a des Arg は、白血球に対する遊走活性 (chemotactic activity) をもつとされている。これらのフラグメントは、その生理活性より炎症反応に関与する可能性が示唆されている。

本研究では、補体系第2経路を活性化する作用をもつ、酵母細胞壁多糖質 zymosan によって誘発される空気嚢炎症モデルである zymosan 空気嚢炎症モデルを確立し、その急性期炎症反応を、補体の役割を中心に検討した。

## 実験方法

### (1) zymosan 空気嚢炎症の誘発

前日、ラット背部皮下に空気を 8 ml 注入して空気嚢を作製し、翌日、zymosan を 1.6% の濃度になるように懸濁させた 0.8% CMC 液を 4 ml 空気嚢内に注入して、zymosan 空気嚢炎症を惹起した。炎症を惹起してから一定時間後に、ラットを脱血死させて、嚢内の滲出液を全量採取する。採取した滲出液を phosphate buffered saline pH 7.4 (PBS) にて 2 倍希釈した後、遠心 ( $2,000 \times g$ , 20 分間) を行って上清と沈渣に分けた。沈渣は、PBS に再懸濁させ、含まれる浸潤白血球数を血球計算盤にて測定した。一方、上清はヒスタミンやタンパクの定量そして  $CH_{50}$  値測定の試料とした。zymosan 空気嚢炎症では嚢内壁に多数の白血球が凝集附着して層を形成していたため、trypsin 処理を行ってこの凝集白血球を完全に分散させて回収し、その数を測定した。但し、ヒスタミンの定量は抽出後、蛍光法にて行ない、タンパク量の測定は、Lowry 法に従った。また、 $CH_{50}$  値の測定は、Mayer 法の原法を 1/5 に縮小した方法にて行った。

### (2) casein 空気嚢炎症の誘発

白血球遊走活性をもつ alkali-solubilized casein を 2% の濃度になるように加えた 0.8% CMC 液を、前日作製した空気嚢 (8 ml) 内に 4 ml 注入して casein 空気嚢炎症を惹起した。casein 空気嚢炎症では、嚢内壁に凝集附着した白血球は存在しなかったが、zymosan 空気嚢炎症との比較のため trypsin 処理を行った。

### (3) compound 48/80空気嚢炎症の誘発

肥満細胞からヒスタミンを遊離させる作用をもつ compound 48/80 を各種濃度に溶解させた 0.8 %CMC液を、前日作製した空気嚢 (8 ml) 内に 4 ml 注入して compound 48/80 空気嚢炎症を惹起した。

### (4) 血管透過性の測定

血管透過性の測定は、トレーサーとして、fluorescein-labeled bovine albumin (F-BSA) を用いて行った。F-BSA (20 mg/0.2ml) を静注してから30分後にラットを脱血致死させ、嚢内の滲出液を全量採取する。この採取した滲出液中の全蛍光強度 (Ex 490 nm, EM 521 nm) を測定し、注射量の何%が滲出液中に漏出したかを算出し、血管透過性の指標とした。

### (5) ヒスタミン、セロトニンの涸渇

compound 48/80 の 0.1% (w/v) 溶液を、夕方から開始し、毎朝夕、計8回、ラット腹腔内に投与してヒスタミン、セロトニンの涸渇したラットを作製した。compound 48/80 の投与量は、先の6回を0.6 mg/kg とし、後の2回は1.2 mg/kg とした。炎症の惹起は、最終投与から5時間後に行った。

### (6) 補体の涸渇

lecithinase (phospholipase A<sub>2</sub>) を含まないNaja Naja 由来の精製コブラ毒因子を、空気嚢を作製する0, 14, 20, 24時間前に、各々 62.5 mg/kg の用量にて4回、ラット腹腔内に投与して補体の涸渇したラットを作製した。

### (7) ラットアナフィラトキシンの精製

carboxypeptidase N (anaphylatoxin inactivator) の阻害剤の存在下にて、ラット血清中の補体を zymosan にて活性化して産生されたラットアナフィラトキシンを、CM-cellulose, Sephadex G-100, SP-Sephadex C-25, SP-Sephadex C-25のそれぞれのカラムクロマトグラフィーを順次行って精製した。最終精製品は、ポリアクリルアミドゲル電気泳動にて1本のバンドとなり、純品であった。分子量は7,000であり、モルモット回腸の収縮を引き起こす最小有効濃度は $1.1 \times 10^{-7}$  Mであった。

### (8) 薬物投与

dexamethasone は、エタノール溶液を調製し、惹起直後に0.1ml空気嚢内に注入した。

pyrilamine, methysergide は再留水に溶解させた後 zymosan-CMC液あるいは compound 48/80-CMC液に必要量加えて局所投与した。

K-76 COONa は、再留水に懸濁させ、1 N NaOHで pHを7.4として溶解させ、NaClを加えて等張とした後、口過滅菌して zymosan-CMC液、compound 48/80-CMC液に加えた。

## 実験結果と考察

### 1. zymosan 空気嚢炎症の確立と抗補体薬, 抗炎症薬の効果

zymosan 空気嚢炎症は, 対照として 0.8%CMC液を注入した群と比較して, 多数の多形核白血球の浸潤, 嚢内壁への凝集, 肉芽組織の形成, 滲出液の貯留を特徴とする激しい炎症反応が空気嚢内で起こっていることが確認された。また, casein 空気嚢炎症と異なって zymosan 空気嚢炎症における白血球浸潤は, 局所に投与されたステロイド性抗炎症薬 dexamethasone によって有意な影響を受けず, 本炎症が特異な炎症であることが示された。一方, 補体系のC5と結合して抗補体作用を示すK-76 COONa が, 本炎症における白血球浸潤を用量依存性をもって有意に抑制したことより, 補体由来の白血球遊走因子が本炎症における白血球浸潤に関与する可能性が示された。

### 2. zymosan 空気嚢炎症における発症メカニズムの解析

zymosan 空気嚢炎症では, 少なくとも炎症惹起後3時間まで, 対照群と比較して滲出液中のCH<sub>50</sub>値がそのタンパク量に比して低下していることより, 滲出液中の補体が活性化を受けて消費されている可能性が示された。また, 炎症部位の組織標本を作製して調べた結果, 皮下結合組織中の肥満細胞が顆粒を細胞周囲に放出しているのが確認された。更に, 滲出液中に肥満細胞より遊離されたヒスタミンが検出された。以上の結果より, zymosan による補体の活性化の過程で産生されたアナフィラトキシンが肥満細胞の脱顆粒を引き起こしている可能性が考えられた。また, 肥満細胞より放出されたヒスタミン, セロトニンのレベルが滲出液中で上昇するのに伴って, 血管透過性も著しく亢進することが示された。しかし, この血管透過性の亢進は, (1) compound 48/80-CMC液の注入により zymosan 空気嚢炎症と同程度のヒスタミン遊離を起こさせても, その血管透過性は zymosan-CMC液注入群の約1/2であったこと, (2) ヒスタミン, セロトニンを潤濁させたラットに本炎症を起こさせても, 0.8%CMC液注入群の約3倍の血管透過性値を示したこと, (3) 抗ヒスタミン剤 pyrilamine, 抗セロトニン剤 methysergide を併用しても, その血管透過性の抑制は部分的であったこと, 以上の結果より, ヒスタミン, セロトニンのみでは十分に説明できず, 他の化学伝介因子の関与が考えられた。

### 3. zymosan, compound 48/80 誘発ヒスタミン遊離に対する, 新抗補体薬K-76 COONa の抑制作用

zymosan 空気嚢炎症における肥満細胞の脱顆粒がアナフィラトキシンによって引き起こされている可能性が示されたので, 抗補体薬K-76 COONa の効果について検討した。K-76 COONa は, 本炎症におけるヒスタミン遊離及び血管透過性の亢進を用量依存性をもって有意に抑制した。しかし, K-76 COONa は, 補体非依存性のヒスタミン遊離誘発剤である compound 48/80 にて誘発した空気嚢炎症におけるヒスタミン遊離及び血管透過性の亢進, ならびに, 腹腔細胞からの

ヒスタミン遊離を用量依存性をもって有意に抑制した。この結果より、K-76 COONa は、抗補体作用の他に、肥満細胞からのヒスタミン遊離を抑制する作用をもつことが明らかになった。

#### 4. ラットアナフィラトキシンのラット肥満細胞に対する作用

(1)精製コブラ毒因子を前処置して補体を涸渇させたラットに zymosan 空気嚢炎症を惹起したところ、そのヒスタミン遊離及び血管透過性の亢進は何ら影響を受けなかったこと。(2)アナフィラトキシン活性をもつ zymosan 処理ラット血清を20%の濃度になるように加えた 0.8%CMC液を空気嚢内に注入しても有意なヒスタミン遊離が起こらなかったこと。(3)精製ラットアナフィラトキシンを50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度になるように加えた 0.8%CMC液を空気嚢内に注入しても、ヒスタミン遊離が起こらないこと。(4)精製ラットアナフィラトキシンを Tyrode 液 (pH7.4) に溶解させて皮内に注射しても血管透過性が亢進されないこと。以上の結果より、zymosan 空気嚢炎症において観察される肥満細胞の脱顆粒は、アナフィラトキシンによって引き起こされたものではないことが明らかにされた。また、ラットアナフィラトキシンには、ラットの結合組織中の肥満細胞に脱顆粒を起こさせる作用のないことが明らかにされた。

## 審査結果の要旨

本論文は炎症反応の研究における新しい実験法として、ゼイモサンを起炎物質とするラットの空気嚢型炎症モデルを開発し、この炎症モデルの特性を検討したものである。ゼイモサンはバクテリアのモデルとして炎症反応や生体防衛反応の研究、特に白血球の細菌貪食過程の研究などに広く利用されている物質であり、その本体は酵母細胞壁の多糖体である。また空気嚢型炎症モデルは本研究室で多種類のものが既に開発されており、その線の研究の一環として本研究も行なわれたものである。

本論文の第1章はゼイモサン空気嚢型炎症モデルの作成についての基礎的な条件を求めて、その作成法を確立したうえで、このモデルに対する抗補体薬、抗炎症薬の作用について検討を加えたものである。抗補体薬としてはK-76 COONa について、また抗炎症薬としてはステロイド抗炎症薬であるデキサメサゾンについて検討した。本炎症モデルは白血球が炎症局所すなわちラット背部に作成した空気嚢の内壁に多数凝集するほか、空気嚢内の滲出液中にも多数浸潤してくる点に特徴をもつものであるが、炎症の誘発と同時に薬物を局所投与して検討すると、抗補体薬K-76 COONa は白血球遊出を用量依存的に抑制するが抗炎症ステロイドであるデキサメサゾンは白血球遊出を全く抑制しないという珍しい特徴を持つことが明らかになった。

第2章においてはゼイモサン空気嚢炎症の発症メカニズムについて解析している。その結果、滲出液中の補体レベルは著しく低下していること、マスト細胞の脱顆粒があることに加えて、炎症誘発30分後の滲出液中のヒスタミンのレベルが著しく上昇していることなどから本炎症の血管透過性が著しく亢進している起炎直後にはマスト細胞の脱顆粒が大きな意味を持つことが明確にされた。

第3章の研究では、上記のようにマスト細胞の脱顆粒が大きい意味をもつと考えられるところから補体活性化の結果生じたアナフィラトキシンが脱顆粒を惹起させているのではないかと想定の下に抗補体作用を持つK-76 COONa の影響について検討し、この薬物は抗補体作用とは関係のない形でも脱顆粒を抑制し得ることを発見した。

さらに第4章ではラットのアナフィラトキシンを精製して、その生物活性を検討しマスト細胞脱顆粒作用がないことを認め、ゼイモサン誘発の炎症初期には補体と関係のないメカニズムが関与していることを示唆している。