

氏 名 (本籍) わた なべ かず よし
渡 邊 一 義

学 位 の 種 類 薬 学 博 士

学 位 記 番 号 薬 博 第 1 5 9 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 Proteinase inhibitor の 抗 炎 症 作 用 お よ
び けい 光 法 に よ る 血 管 透 過 性 亢 進 の 測 定

(主 査)

論 文 審 査 委 員 教 授 鶴 藤 丞 教 授 鈴 木 康 男

教 授 橋 本 嘉 幸

論文内容要旨

序 論

炎症反応は生体防衛反応である点において生体の恒常性維持に不可欠である。しかし、過度の炎症反応は、組織障害や機能障害など生体にとって好ましくない結果を招く場合もある。従って、炎症反応を適度に抑制する手段が必要である。

炎症組織では多形核白血球やマクロファージなどの浸潤が認められることが多い。炎症局所でこれらの細胞のリゾゾームから放出される proteinase (蛋白質分解酵素) が組織障害因子であるという考えは広く受け入れられている。また、これらの貪食細胞の炎症局所への集積をおこす補体由来の化学遊走因子 (C_{5a}) や炎症の化学仲介因子と言われているキニンなどの活性化には各種の proteinase の関与が推測されている。従って、proteinase は炎症反応を修飾していると考えられ、proteinase を阻害する物質 (proteinase inhibitor) は炎症反応に対しても抑制的に作用するのではないかと期待される。

哺乳類の血漿中にはいくつかの proteinase inhibitor が存在するが、 α -macroglobulin (αM) はその一つである。ラットの αM には α_1 -macroglobulin ($\alpha_1 M$) と α_2 -acute-phase macroglobulin ($\alpha_2 APM$) の二種類があるが、 $\alpha_2 APM$ は正常時にはほとんど血中に存在せず、炎症急性期や組織障害を受けた場合に飛躍的に血中レベルが増加する。proteinase が組織障害因子として、また、修飾因子として働く可能性がある炎症時に、血漿中の proteinase inhibitor である $\alpha_2 APM$ が急増するという現象は多分に示唆的である。

本研究では $\alpha_2 APM$ がラットにおける内因性抗炎症物質ではないかという作業仮説に基づき各種検索を行った。また、各種低分子 proteinase inhibitor の抗炎症作用について検討を行い、カラゲニン空気嚢炎症の白血球浸潤および肉芽組織形成に関与する proteinase の種類に関して考察した。

また、本研究においては新たな方法論として高感度白血球走化性試験法の開発と、炎症時に亢進する血管透過性の測定法として、けい光法による測定方法を確立した。また、この方法論の検討中に偶然認められた炎症時における血管透過性の質的变化についても若干の考察を加えた。

結果と考察

1. 炎症時のラットにおける α_2 acute-phase macroglobulin の役割

カラゲニン空気嚢炎症を惹起したラット血中では $\alpha_2 APM$ が飛躍的に増加し、 $\alpha_1 M$ も含めた血清の macroglobulin 画分 proteinase 阻害能を急増させた。その変化は $\alpha_2 APM$ レベルの変化とパラレルであり、炎症惹起後24時間をピークとするものであった。一方、炎症滲出液中の活

性 macroglobulin レベルの変化は5日目まで増加し、以後、ほぼ一定値を示すという血中とは異なる変化を示した。また、血中では α_2 APMがほとんど存在しない炎症惹起10および15日後においても、滲出液中では α_2 APMが α_1 Mに比べかなりの割合で存在していることも明らかとなった。

部分精製した α_2 APMと α_1 Mをカラゲニンと同時に空気嚢内に投与した場合、高い proteinase 阻害活性を持つ α_2 APM画分のみが4日後の肉芽組織形成を抑制した。

以上の結果は、 α_2 APMは自らの血中レベルを増加し、その結果として血中の proteinase 阻害活性を増加させることにより内因性の抗炎症物質として働きうることで、その抗炎症作用発現には proteinase inhibitor としての活性が重要であることを示唆するものである。

2. 低分子 proteinase inhibitor の抗炎症作用

proteinase 阻害スペクトルにかなりの特異性を持つ各種低分子 proteinase inhibitor を用いて、そのカラゲニン空気嚢炎症に対する作用を解析した。その結果、4日後の肉芽組織形成を抑制したものは、TPCK, leupeptin, chymostatin, antipain, cystamine などの serine- および thiol-proteinase の inhibitor であり、ラットのカラゲニン空気嚢炎症における肉芽組織形成過程に serine- および thiol-proteinase の関与が示唆された。 α_2 APMの肉芽組織形成の抑制作用も、これらの serine- および thiol-proteinase を阻害した結果であると考えられる。

また、急性期の白血球浸潤を抑制したのは、TPCKおよび leupeptin などの serine- および thiol-proteinase の inhibitor であったが、thiol-proteinase の inhibitor である cystamine が白血球浸潤に対し抑制作用を示さないことから、白血球浸潤の過程に serine-proteinase の関与が示唆されるに至った。更に、新たに開発した高感度白血球走化性試験法を用いた *in vitro* での白血球走化性運動に対するTPCKおよび leupeptin の作用の解析より、2つの inhibitor の *in vivo* 白血球浸潤抑制作用機序は異なることがわかった。すなわち、TPCKは直接白血球に作用し白血球浸潤を阻害するが、leupeptin は直接白血球の走化性を阻害する能力を持たないことが明らかとなった。従って、leupeptin は炎症局所の白血球走化性因子の産生を阻害することにより炎症部位への白血球浸潤を抑制していると考えられる。

また leupeptin はカラゲニンと同時に空気嚢内に投与した場合、ヒスタミン、セロトニンが仲介すると考えられる一過性の血管透過性の亢進を引き起こすが、それ以後は持続的な血管透過性の抑制作用を示すことも明らかとなった。従って、leupeptin はカラゲニン炎症における急性期血管透過性と白血球浸潤および慢性期肉芽組織形成のすべてに対し抑制作用を有することが明らかとなった。

本章では簡便な白血球走化性試験法も考案した。これは装置の構造の単純化および取り扱い操作の簡略化を目的としたものであったが、走化活性物質の検出感度および測定精度の面での向上が認められた。この方法は簡便かつ高感度の白血球走化性試験法としての普及が期待される。

3. 空気嚢型炎症モデルにおける、けい光法による血管透過性亢進の測定法の確立

けい光色素である fluorescein isothiocyanate を標識した牛血清アルブミン (F-BSA) をトレーサーに用いた。F-BSAをラットに静注し、一定時間後に炎症滲出液を回収した。滲出液はPBSで希釈したのち遠心し、上清中のけい光強度を測定した。これにより滲出液中に漏出したF-BSAを定量し血管透過性の指標とする方法である。F-BSAはラット血中で安定で半減期は5時間以上であり、トレーサーとして適するものであった。

この方法はすでに確立されている放射性同位元素を標識したアルブミンをトレーサーとする方法と比べ、精度的に劣らない測定が可能であった。更に長所として 1) 半減期がないためトレーサーの長期保存ができ、要時調整がしやすい。 2) 実験経費は1/10以下ですむ。 3) 特別な施設の必要性がない。 4) 取り扱い者の放射線障害の危険性がない。などがある。

4. けい光法による皮内血管透過性亢進の測定法の確立

上述のけい光法による血管透過性測定法は滲出液が採取可能な炎症モデルには適用可能であるが、その採取が困難な皮内反応での血管透過性測定には適用できなかった。この章で確立した方法は、この欠点を克服するものであり、けい光法による皮内血管透過性の測定法の確立である。この方法は血管内より漏出したF-BSAを含む皮膚組織をNaOH中で加熱することにより加水分解し、F-BSAをエタノール添加による沈殿を受けない低分子のけい光物質に変換した。それにより短時間での高率(98%)の蛍光物質の皮膚組織からの回収に成功した。

5. カラゲニン空気嚢炎症における血管透過性の質的变化

F-BSAの他に fluorescein isothiocyanate を標識した dextran, bovine IgGおよび cationized BSAをトレーサーに用い、カラゲニン空気嚢炎症における血管透過性の経時変化を調べた。その結果、F-BSAの経時変化と他のトレーサーの経時変化とは異なるパターンを示した。また、炎症惹起直後には電気的に中性または正電荷を持つ物質の方が負電荷を持つ物質より透過しやすい傾向があるが、炎症の進展と共にその傾向が縮小する方向へ向う現象が認められた。

以上の結果は、カラゲニン空気嚢炎症において血管透過性が量的だけでなく質的にも変化することを示すものである。また、単独のトレーサーを用いて得られた測定結果を、他の血漿成分の挙動にまで拡大解釈することの危険性を指摘するものである。

審 査 結 果 の 要 旨

本研究は炎症反応の研究における新しい実験法として、本研究室で開発されたカラゲニン空気嚢炎症モデルを活用して炎症反応に対するプロテアーゼ抑制物質の作用を検討し、さらにこの検討の過程を通じて蛍光色素を結合させた高分子化合物による血管透過性亢進の測定法を開発したものである。

第1章ではラットにおいて抗プロテアーゼ活性を持つ生体高分子である α_1 -マクログロブリン(α_1 -M)と α_2 -急性期マクログロブリン(α_2 -APM)の2つについて炎症時における役割を検討した結果について述べている。炎症の経過につれてこれらがどのように動くかを検討した結果、前者は炎症時に全く動きを示さないが後者は炎症経過と密接に関連して変動し、あたかも炎症反応を誘発する方向に働くプロテアーゼの作用に拮抗して炎症反応を鎮静化させる方向に作用する生体反応調節物質であるかのように振舞うことを示した。

このような知見に立脚して第2章では、今日既知の幾つかの低分子プロテアーゼ阻害作用物質について、その抗炎症作用を主としてカラゲニン誘発炎症の白血球浸潤と肉芽組織形成の問題について検討した。その結果、白血球浸潤に関してはセリンプロテアーゼおよびチオールプロテアーゼの阻害物質であるロイペプチンが抑制的に働くが、後者のみを阻害するシスタミンは無効であることからセリンプロテアーゼが大きい意味をもつと考察している。なおロイペプチンは白血球に対して直接的な遊走抑制作用を持つのではなく、炎症局所でケミカルメディエーターの産生に関わるプロテアーゼを抑制するために間接的な作用として白血球の遊出を押えていると結論している。

第3章および第4章では蛍光法によって空気嚢型炎症での血管透過性亢進について測定する問題について方法論的な検討を行なっている。高分子のキャリアーに結合させる蛍光色素としてはローダミンレッドとフロレッセンとを検討し、後者の方がすぐれた特性を持つことを認めている。この方法は従来の方法に比べてあらゆる意味で優れた測定法であって、炎症研究の上に今後貢献するものと期待される場所である。