



Title	人血清IgG由来アルキル化L鎖の抗炎症活性
Author(s)	辻川, 和丈
Citation	大阪大学, 1989, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/36692
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

人血清IgG由来アルキル化L鎖の抗炎症活性

辻 川 和 丈

人血清IgG由来アルキル化L鎖の抗炎症活性

辻 川 和 丈

目 次

第一編 緒 論	1
第二編 本 論	2
第一章 人血清 I g G 由来還元・アルキル化heavy chain、light chainの分離、 精製とカラゲニン足蹠浮腫抑制活性	2
第一節 人血清 I g G の鎖間disulfide 結合の還元・アルキル化とアルキル化 heavy chain、light chainの分離、精製	2
第二節 還元・アルキル化heavy chain、light chainのカラゲニン足蹠浮腫抑制 作用	4
第三節 小括	8
第二章 Fr. I-Lの抗炎症作用に関する検討	9
第一節 第一期反応の血管透過性に対する作用	9
第二節 第二期反応の白血球遊走に対する作用	12
第三節 第三期反応の肉芽形成に対する作用	14
第四節 肉芽腫炎症組織の糖成分に対する作用	18
第五節 副腎摘出ラットを用いたカラゲニン足蹠浮腫抑制作用	20
第六節 小括	21
第三章 生体膜に対する作用	22
第一節 CMC pouch 炎症浸出液中のlysosome内酵素とesteraseに対する作用	22
第二節 膜脂質過酸化に対する作用	24
第三節 小括	26

第四章	白血球の機能に対する作用	27
第一節	遊走能に対する作用	27
第二節	貪食能に対する作用	30
第三節	Serotonin 誘発足蹠浮腫に対する作用	32
第四節	活性酸素に対する作用	34
第五節	小括	36
第三編	考察	37
第四編	結論	41
第五編	参考文献	43

第一編 緒 論

蛋白質は、細胞の構成成分として、またその機能をつかさどる活性物質として、生命現象に最も密接な結び付きをもつ高分子含窒素有機化合物である。しかし、この蛋白質を医薬品として開発、利用するには、安定性や抗原性の面で問題があった。そこで、蛋白質を化学修飾することによりこれらの問題を解決し、さらには、新機能を発現させるといった試みがなされるようになった。¹⁾ 三村らは、人血清免疫グロブリンG(IgG)を化学修飾することを試みその鎖間disulfide 結合を還元・アルキル化後、heavy chain、light chainに分離して得られたサブフラグメントがもとのIgG には全く認められない抗潰瘍活性を発現することを発見した。^{2) 3) 4)} 胃潰瘍は胃の組織障害、つまり一種の過度の炎症状態であると考えられる。そこで著者は、このIgG 由来還元・アルキル化heavy chain、light chainの抗炎症活性について検討した。その結果、これらのサブフラグメントは、もとの人血清IgG には認められない抗炎症活性をも新たに発現させることを見出した。そこで、これらの人血清IgG 由来heavy chain、light chainのうちで、カラゲニン足蹠浮腫抑制活性のより強いアルキル化 light chain(Fr. I-L)につき各種実験炎症モデルでその有効性を調べるとともに作用メカニズムの解明を行なった。

第二編 本 論

第一章 人血清IgG 由来還元・アルキル化heavy chain、light chainの分離、精製 とカラゲニン足蹠浮腫抑制活性

市販人血清免疫グロブリン G (Native IgG) を、DEAE-cellulose column chromatographyにより、二画分 (Fr. IおよびFr. II)に分離した。この両画分に含まれる IgGの鎖間 disulfide 結合を還元・カルボキサミドメチル化後、ゲル濾過によりおのおのheavy chain (Fr. I-H、Fr. II-H) と light chain (Fr. I-L、Fr. II-L)に分離した。これらの各アルキル化サブフラグメントの抗浮腫活性を、代表的な抗炎症スクリーニングモデルであるラット・カラゲニン足蹠浮腫法により検討した。

第一節 人血清 I g Gの鎖間disulfide 結合の還元・アルキル化とアルキル化 heavy chain、light chainの分離、精製

原料として、健康正常人血清よりCohnのエタノール分画法⁵⁾により分離された市販人血清免疫グロブリン G (グロブリンーミドリ、 γ ミドリ十字、以下Native IgGと略す)を用い、Mimuraらの方法²⁾に準じ、還元・アルキル化heavy chain、light chainを分離、精製した。

IgG 由来還元・アルキル化サブフラグメントの分離、精製

市販人血清IgG (Native IgG)より還元・アルキル化サブフラグメントの分離、精製は、Chart 1 の操作に従い実施した。

Native IgGをDEAE-cellulose column chromatographyのstarting buffer である5mM Tris-phosphate buffer (pH 8.6)で透析後、常法に従い活性化したDEAE-cellulose columnに添加した。素通り画分 (Fr. Iと略す) を溶出後、0.5M Tris-phosphate buffer

(pH 8.6)をlimiting buffer としてlinear gradient 溶出を行ないFr. II を得た。Fr. I、Fr. II は、さらに5mM Tris-phosphate buffer (pH 8.6) をbaseとし、NaCl濃度を0 から0.5Mまでlinearに上昇させる条件により、rechromatographyを行ない単一画分とした。Fr. I、Fr. II は、その後イオン交換処理水に対して透析、脱塩後凍結乾燥した。

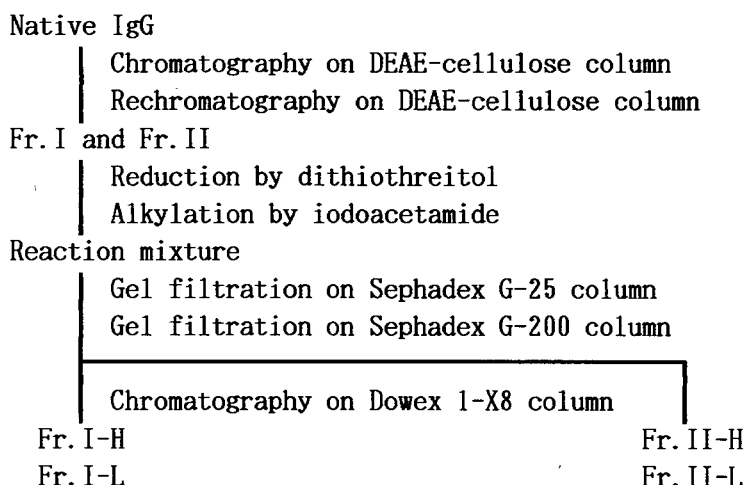


Chart 1 Purification Procedure of Active Subfragments from Human Serum IgG

Scheidegger の方法⁶⁾に準じ、抗人IgG, IgA, IgM 抗体 (Hoechst Japan)を用いて免疫電気泳動を行なった結果、Fr. I、Fr. II は抗人IgG 抗体とのみ沈降線を形成する事を確認した。次に、Fr. IまたはFr. II を0.3M Tris-HCl buffer (pH 8.0)-4mM EDTA-0.3M NaClに0.2% (w/v) になるように溶解し、N₂ガスを通気して十分脱酸素処理を行なった後、0.2M dithiothreitol (DTT、Wako Pure Chemicals) を終濃度 0.02Mになるように添加、密栓して35℃の水浴中で2時間攪拌し、IgG の鎖間disulfide 結合を還元した。その後、反応容器を遮光し、0.84M iodoacetamide (IAA、Wako Pure Chemicals) を終濃度0.04M になるように添加、35℃で20分間攪拌し、カルボキサミドメチル化した。反応終了後、直ちに、5mM phosphate buffer (pH 8.0) で平衡化したSephadex G-25 columnにより脱試薬を行な

った。なお、この間の操作は全て遮光下で進めた。このアルキル化IgG 分子中のheavy chain、light chainの分離は、鎖間の疎水結合を切断するため40mMラウリル硫酸ナトリウム (SDS、Wako Pure Chemicals) 存在下、50mM phosphate buffer (pH 8.0) で平衡化した Sephadex G-200 column により行なった。SDS は、Dowex 1-X8 (Cl⁻) columnを用い50mM phosphate buffer (pH 8.0) を溶出液として除去し、透析、脱塩後凍結乾燥して以下の検体とした。なお、Fr. I由来還元・カルボキサミドメチル化heavy chain、light chainをFr. I-H、Fr. I-L、Fr. II 由来のものをFr. II-H、Fr. II-Lと命名した。SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動によりFr. I-H、Fr. II-H は分子量約50000、Fr. I-L、Fr. II-Lは分子量約25000 であったことよりIgG の鎖間disulfide 結合が完全に還元・アルキル化されていることを確認した。

第二節 還元・アルキル化heavy chain、light chainのカラゲニン足蹠浮腫抑制作用

Fr. I、Fr. II 由来還元・アルキル化heavy chain、light chainの抗浮腫作用をカラゲニン足蹠浮腫法により検討した。

実験方法

ラット・カラゲニン足蹠浮腫法

体重150 ～180gのSD系雄性ラットを使用した。Winterらの方法⁷⁾に準じ滅菌生理食塩水で1.5%カラゲニン (Picnin-A, Zusikagaku) 懸濁液を調製し、この0.1ml を右後足皮下に注入して浮腫を誘発させた。対照として、左後足皮下に同量の滅菌生理食塩水を注入した。カラゲニン注入7時間目まで1時間ごとに、左右の足の体積を測定し、その差を各時間ごとに計算してswelling %として現わした。なお検体は、滅菌生理食塩水に溶かしカラゲニン注入30分前に腹腔内あるいは静脈内投与した。

統計処理

以後統計処理は、Student's t-test を採用した。

実験結果

Fig.1 に示すようにNative IgG、Fr. I、Fr. II、還元・アルキル化後heavy chain、light chain に分離していない状態のFr. I (alkylated Fr. I)、Fr. II (alkylated Fr. II) は 25mg/kg i. p. の用量で全くカラゲニン浮腫を抑制しなかった。またNative IgGは100mg/kg i. p. の用量でもこの浮腫を抑制しなかった。しかし、還元・アルキル化後heavy chain、light chain に分離すると、Fig.2 に示すように Fr. I-H、Fr. I-L、Fr. II-H、Fr. II-L とともに25mg/kg i. p. の用量で有意に浮腫を抑制した。

アルキル化heavy chain、light chainともFr. IあるいはFr. II 由来で作用の強さに相違が認められないこと、またIgG₂、IgG₃ よりなるFr. II と異なり、IgG₁、IgG₄ よりなるFr. I の鎖間disulfide 結合数は、heavy chain-heavy chain 間で2本、heavy chain-light chain 間で1本とサブクラスによらず一定であることより以後の実験では、Fr. I-H、Fr. I-Lにつき検討を進めた。

Fig. 3、4は、Fr. I-H、Fr. I-Lの腹腔内投与によるdose response について調べた結果である。このようにFr. I-Hは 5 mg/kg 、Fr. I-L は 1 mg/kgの用量まで有意にカラゲニンによる浮腫を抑制した。

Fig. 5 は、Fr. I-Lの静脈内投与によるカラゲニン足蹠浮腫抑制作用について検討した結果である。このように、Fr. I-Lは、静脈内投与によってもこの浮腫を有意に抑制した。また、腹腔内投与25mg/kg と静脈内投与1 mg/kg とがほぼ同等の抑制活性を示す事が明らかとなった。

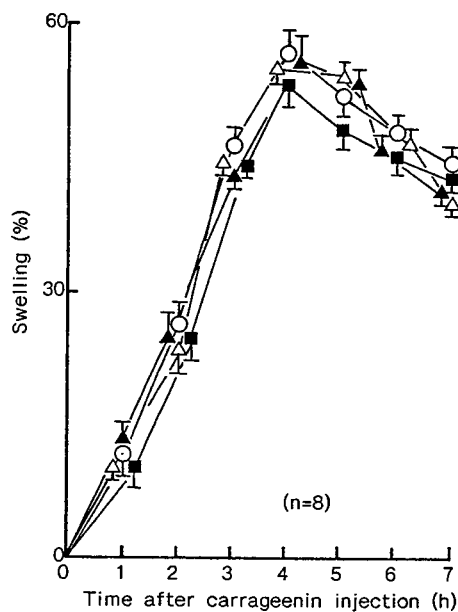
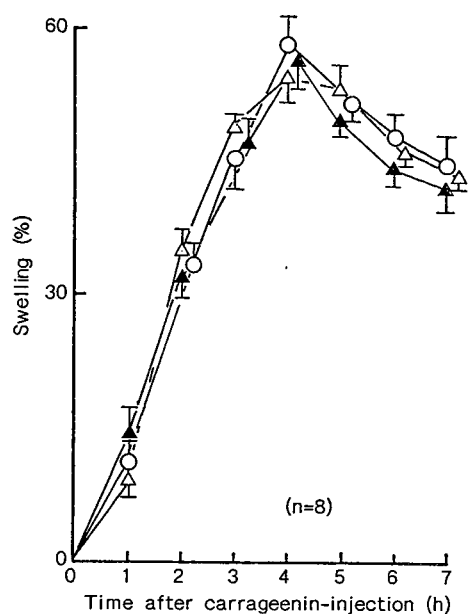


Fig.1 Effect of Native IgG, Fr.I and Fr.II on Carrageenin-induced Paw Edema in Rats

○; Control ■; Native IgG 25 mg/kg
△; Fr.I 25 mg/kg ▲; Fr.II 25 mg/kg



Effect of Alkylated Fr.I and Fr.II on Carrageenin-induced Paw Edema in Rats

○; Control △; Alkylated Fr.I 25 mg/kg
▲; Alkylated Fr.II 25 mg/kg

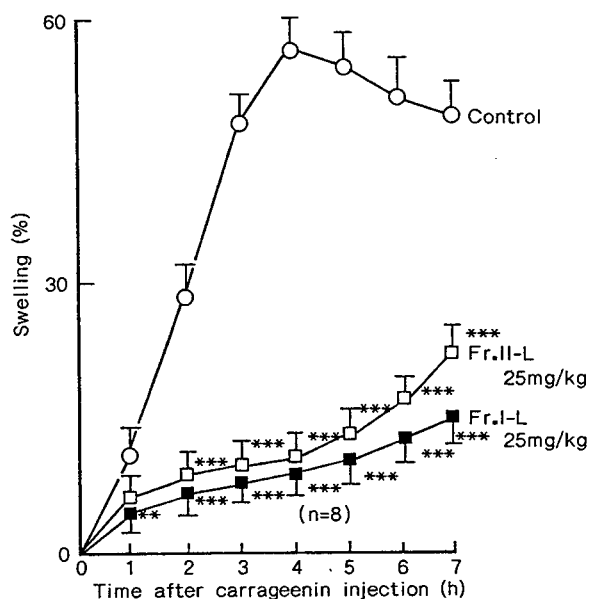
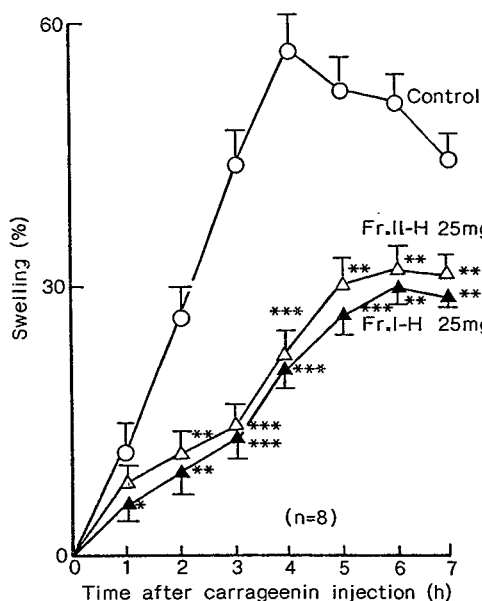


Fig.2 Effect of Alkylated Subfragments of Fr.I and Fr.II on Carrageenin-induced Paw Edema in Rats

Significantly different from the control group ; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

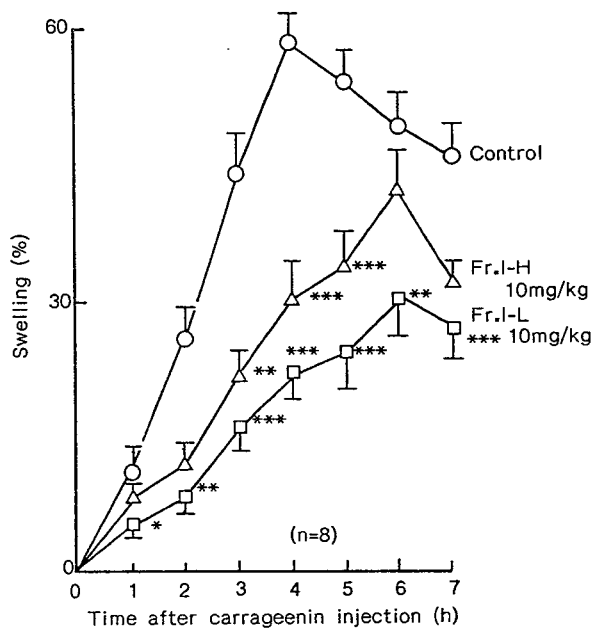


Fig. 3 Effect of Fr.I-H and Fr.I-L on Carrageenin-induced Paw Edema in Rats

Significantly different from the control group ;

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

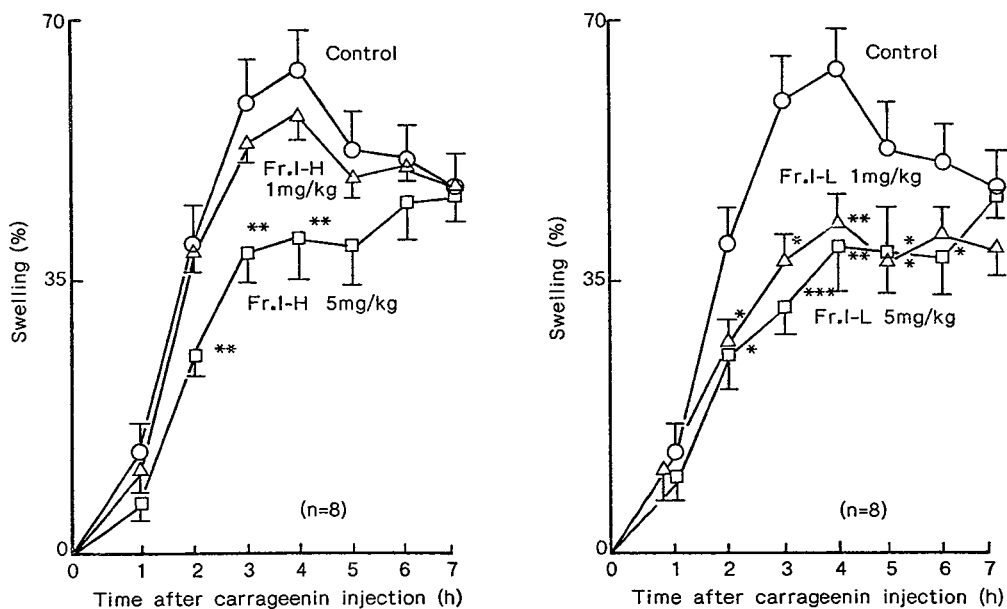
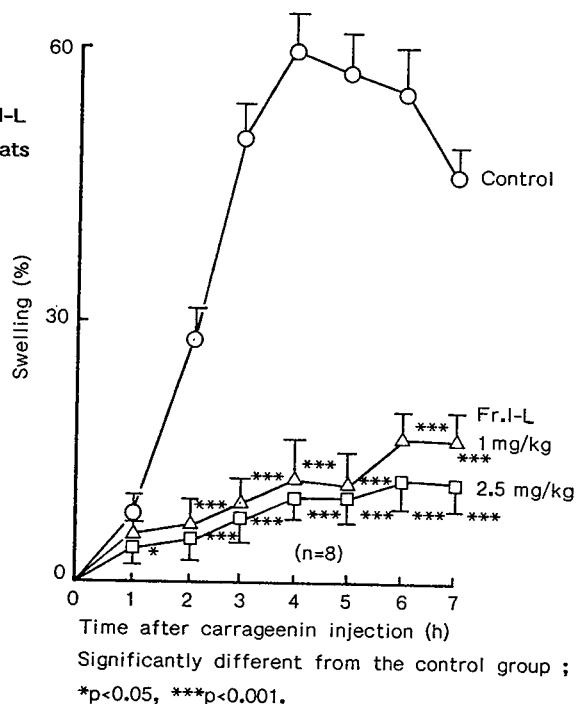


Fig. 4 Effect of Fr.I-H and Fr.I-L on Carrageenin-induced Paw Edema in Rats

Significantly different from the control group ; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Fig. 5

Effect of Intravenously Administered Fr.I-L
on Carrageenin-induced Paw Edema in Rats



第三節 小 括

抗潰瘍活性を有する人血清IgG 由来還元・アルキル化サブフラグメントであるFr. I-H、Fr. I-L、Fr. II-H、Fr. II-Lは抗浮腫活性をも有することが明らかとなった。またこの活性は、Native IgG、Fr. I、Fr. II、還元・アルキル化Fr. I、Fr. II といったIgG の立体コンホメーションを保持する分子では認められず、このIgG の鎖間disulfide 結合を還元後遊離したSH基をアルキル化し、heavy chain と light chainに分離してはじめて認められることを見出した。これらの還元・アルキル化サブフラグメントの腹腔内投与による刺激性は、全く認められないこと、人血清IgG のような異種蛋白質を投与しても浮腫は抑制されなかったこと、投与ルートにより作用の発現に差が認められなかったことよりこれらのサブフラグメントによる抗浮腫活性発現は、単に異種蛋白の刺激性によるみかけ上の効果でないことも明らかであった。そこでこれらのサブフラグメントの内、鎖間disulfide 結合数が同じIgG₁、IgG₄よりなるFr. I由来で、より抗浮腫活性が強かったアルキル化light chain であるFr. I-Lを使用し、その抗炎症作用並びに作用メカニズムの解明を試みた。

第二章 Fr. I-Lの抗炎症作用に関する検討

炎症とは、生体にとって有害な刺激に対する組織レベルでの防衛反応をさす。しかし、炎症が過度、または好ましくない状態に進み、苦痛や機能障害がもたらされたとき、この炎症を抑制する必要がある。

現在、一つの実験炎症モデルで、複雑な炎症過程における薬物の効果をすべて同時に観察することは不可能である。そこで種々の炎症過程を反映するモデルを使用して薬物の作用を調べたうえ総合的に判定する必要がある。

炎症過程は、第一期反応として血管透過性亢進、第二期反応として白血球の浸出遊走、第三期反応として肉芽の形成から組織の再生へと大きく三期に分けられている。⁹⁾ そこでこの各段階反応に沿ってFr. I-Lの抗炎症作用の検討を行なった。

第一節 第一期反応の血管透過性に対する作用

炎症の初期反応として、血管透過性が亢進する。この時、通常は血管壁を通過しえない蛋白成分と、それ以外の小分子、水の血管外への浸出が起る。炎症時には、特に大量にこれらが血管外に出、リンパに入る量が少なくなるので浮腫を生じるようになる。そこで、この血管透過性亢進に対する作用を検討した。

実験方法

マウスxylene ear法

Fujimuraらの方法⁹⁾に準じ、体重15~20gのddY系雄性マウスに0.5% pontamine sky blue (PSB)溶液 0.1ml/10gを静注しその直後、xyleneを十分含ませたフェルトを張り付けたクレンメで一方の耳を5秒間挟んだ。15分後に両耳を切断して、直径約7mmの穴をあけた板に左右の耳を別々に挟み、分光光度計のセルホルダーに挿入し、青染されていない右耳をblankとして630nmにおける透過率を測定した。なお検体は、PSB静注30分前に腹腔

内投与し、陽性コントロールとしてdexamethasone (Sigma) を使用した。

Chemical mediator による血管透過性亢進

Thomas¹⁰⁾ やCrunkhorn ら¹¹⁾ の方法に準じ、体重150 ～200gのSD系雄性ラットの背部の毛を実験前日に剃って使用した。検体を腹腔内投与し30分後に、chemical mediator を背部皮内に注入し、直ちに0.5% PSB 1ml/kg を静注した。45分後にラットを脱血死させ皮膚を剥離し、青染部分の面積 (colored area) を長径×短径として計算して判定した。

Chemical mediator として次の薬物を使用した。Serotonin (Sigma) 100 μ g/ml, Bradykinin (Sigma) 50 μ g/ml, Prostaglandin E₁ (Sigma) 1 μ g/ml.

Arachidonic acid皮膚発赤

体重250 ～300gのHartley 系雄性モルモットを実験前日に除毛して使用した。Kotomoらの方法¹²⁾ に準じ、アラキドン酸を40 μ g/0.05ml/siteの割合でモルモットの側腹部3か所に皮内注射して発赤を惹起させた。アラキドン酸注入60分後に肉眼により判定し発赤斑の強く明確に認められるものを3点、明確に認められるものを2点、かすかに認められるものを1点、認められないものを0点とし、3か所の合計点数を対照群のものと比較した。検体は、アラキドン酸注入30分前に腹腔内投与し、また陽性コントロールとしてphenylbutazone (Sigma) を1時間前に経口投与した。

実 験 結 果

マウスの耳をxylene刺激することにより、血管透過性が亢進した。Fr. I-Lは、25mg/kg i. p. の用量でこの透過性亢進を51% 抑制した。陽性コントロールのdexamethasone も、この透過性を有意に抑制した。(Table 1)

各chemical mediator による透過性亢進に対するFr. I-Lの効果をTable 2、3に示した。Fr. I-Lは、各 mediator による透過性亢進を全く抑制しなかった。陽性コントロールのdexamethasone は、1 mg/kg のs. c. によりserotonin、bradykinin による透過性を有意に抑制した。また、PG E₁による透過性亢進に対し有意ではないが、抑制傾向が認められた。

Table 1 Effect of Fr. I-L on Vascular Permeability by Xylene Ear Method in Mice

Treatment	Dose (mg/kg)	No. of mice	PSB ^{a)} (mg/dl)	Inhibition (%)
A) Control	----	7	6.1 ± 0.2	----
Fr. I-L	25	7	3.0 ± 0.2**	51
B) Dexamethasone	1	7	3.5 ± 0.4**	43

All values represent mean ± s.e.

A) intraperitoneal injection

B) subcutaneous injection

a) pontamine sky blue

Significantly different from the control group ; **p<0.01.

Table 2 Effect of Fr. I-L on Capillary Permeability induced by Serotonin in Rat Skin

Treatment	Dose (mg/kg)	No. of rats	Serotonin Colored area
A) Control	----	9	338.4 ± 11.9
Fr. I-L	25	9	335.9 ± 26.1
B) Dexamethasone	1	9	220.3 ± 13.1***

All values represent mean ± s.e.

A) intraperitoneal injection

B) subcutaneous injection

Significantly different from the control group ; ***p<0.001.

モルモット・アラキドン酸誘発発赤に対するFr. I-Lの効果はTable 4 に示した。コントロール群では、アラキドン酸注入30分後より発赤が認められはじめ、60分後にはこの発赤は強く明確となった。Fr. I-Lは、この発赤を25mg/kg i.p. の用量で44.2% 抑制した。シクロオキシゲナーゼ阻害剤の phenylbutazone も50mg/kg p.o. の用量でこの発赤を30.3% 抑制した。

Table 3

Effect of Fr. I-L on Capillary Permeability induced by PG E₁ and Bradykinin in Rat Skin

Treatment	Dose (mg/kg)	No. of rats	PG E ₁ Colored area	Bradykinin Colored area
A) Control	----	9	159.5 ± 11.7	214.0 ± 8.0
Fr. I-L	25	9	137.4 ± 8.1	196.2 ± 11.9
B) Dexamethasone	1	9	128.2 ± 10.6	119.7 ± 3.8***

All values represent mean ± s.e.

A) intraperitoneal injection

B) subcutaneous injection

Significantly different from the control group ; ***p<0.001.

Table 4

Effect of Fr. I-L on Arachidonic Acid-induced Erythema in Guinea Pigs

Treatment	Dose (mg/kg)	No. of guinea pigs	Score	Inhibition (%)
A) Control	----	5	8.6 ± 0.2	----
Fr. I-L	25	5	4.8 ± 0.6***	44.2
B) Phenylbutazone	50	5	6.0 ± 0.4***	30.3

All values represent mean ± s.e.

A) intraperitoneal injection

B) peroral injection

Significantly different from the control group ; ***p<0.001.

第二節 第二期反応の白血球の遊走に対する作用

組織での浮腫は、細胞間隙への水の貯留によるものである。この水分の貯留は、血管透過性亢進により血漿蛋白が血管外に浸出し、それに伴う組織液のコロイド浸透圧の変化に応じて起るものである。そして、この浸出蛋白はproteaseなどの作用で分解されchemo-

tactic factor となり白血球の遊走をもたらすようになる。白血球が炎症局所へ過剰に遊走され、活性化されると種々の物質を産生、放出し、炎症を悪化させるようになる。そこでこの白血球遊走、血漿蛋白の透過における作用を検討した。

実 験 方 法

Ishikawaらの方法¹³⁾ に準じ、実験前日に体重130 ~150gのSD系雄性ラットの背部皮下に空気5ml を注入してpouch を作製した。翌日このpouch 内に2% carboxymethyl cellulose (CMC)懸濁液5ml を注入して炎症を惹起させた。CMC 注入後2、4、6 時間目に浸出液0.2ml を採取し、その内0.1ml を蛋白定量に、残りを白血球算定用に用いた。浸出液中の蛋白量はFolin-Lowry 法¹⁴⁾ により、また白血球数は、0.05% brilliant cresyl blue の生理食塩水溶液と混和染色後、血球計数板 (Burker-Turk、エルマ光学) を用いて測定した。検体は、CMC 注入30分前に腹腔内投与し、dexamethasone は、皮下投与した。

実 験 結 果

Table 5 には、pouch中への白血球の遊走、Table 6 には、蛋白浸出の結果を示した。コントロール群では、CMC 注入2時間目以後、急激な白血球のpouch 内への遊走が認められた。Fr. I-Lは、25mg/kg i. p. で、このpouch 内への白血球の遊走を2時間目より有意に抑制した。

血漿蛋白の急激な浸出がコントロール群において白血球遊走よりも早い時間すなわち2時間目から認められた。Fr. I-Lは、この蛋白浸出をも2時間目より有意に抑制した。陽性コントロールのdexamethasone は、白血球遊走を2時間目より、蛋白浸出は4時間目より有意に抑制した。

Table 5

Effect of Fr. I-L on Leukocyte Emigration into the Pouch Fluid by the CMC Pouch Method

Treatment	Dose (mg/kg)	No. of rats	No. of leukocytes ($\times 10^6$)/ml of pouch fluid		
			2	4	6 (h)
A) Control	----	8	1.95 ± 0.29	10.27 ± 1.13	17.49 ± 1.11
Fr. I-L	25	8	$0.61 \pm 0.10^{***}$	$1.48 \pm 0.29^{***}$	$5.52 \pm 0.43^{***}$
B) Dexamethasone	1	8	$0.82 \pm 0.03^*$	$4.23 \pm 0.43^{***}$	$4.25 \pm 0.75^{***}$

All values represent mean \pm s.e.

A) intraperitoneal injection

B) subcutaneous injection

Significantly different from the control group ; * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$.

Table 6

Effect of Fr. I-L on Protein Exudation into the Pouch Fluid by the CMC Pouch Method

Treatment	Dose (mg/kg)	No. of rats	mg of protein /ml of pouch fluid		
			2	4	6 (h)
A) Control	----	8	2.27 ± 0.30	6.75 ± 0.37	9.20 ± 0.48
Fr. I-L	25	8	$1.39 \pm 0.25^*$	$4.34 \pm 0.35^{***}$	$6.57 \pm 0.58^{***}$
B) Dexamethasone	1	8	2.14 ± 0.14	$4.22 \pm 0.29^{***}$	$5.75 \pm 0.15^{***}$

All values represent mean \pm s.e.

A) intraperitoneal injection

B) subcutaneous injection

Significantly different from the control group ; * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$.

第三節 第三期反応の肉芽形成に対する作用

細胞浸潤に続く肉芽の形成は、炎症の第三期反応に属する。この肉芽組織は、異物や感染病巣の隔離のために形成されるものであるが、異常に増殖するとそのもの自身が病巣の一部を形成するようになるので、これを抑制する必要が生じる。そこで、この肉芽組織形

成に対する作用を検討した。

実 験 方 法

Felt pellet-induced granuloma

体重150 ～180gのSD系雄性ラットを使用した。Meierらの方法¹⁵⁾ に準じ35±1mg の felt pellet を 120℃30分autoclave で滅菌した。このfelt pellet をペントバルビタール麻酔下に肩胛骨の下に左右1個ずつ挿入した。挿入後8日目にpelletを摘出し60℃で恒量になるまで乾燥して重量を測定した。同時に肝臓、脾臓、副腎、胸腺を摘出して、湿重量を量り、体重100g当たりの重量として現わした。検体は、8日間連続腹腔内投与し、また陽性コントロールとして、dexamethasone を同様に皮下投与した。

Croton oil granuloma pouch

体重150 ～180gのSD系雄性ラットを使用した。Selye¹⁶⁾ やItoga ら¹⁷⁾ の方法に準じペントバルビタール麻酔下で、ラット背部皮下にN₂ ガス20mlを注入してpouch を作り、そのなかに綿実油に溶解した1%croton oilを1ml 注入した。注入後8日目に pouchの湿重量と浸出液量を測定した。同時に肝臓、脾臓、副腎、胸腺を摘出し湿重量をはかり、体重100g当たりの重量として現わした。なお検体は上述のfelt pellet 法と同様に投与した。

実 験 結 果

Felt pellet 法での肉芽形成に対するFr. I-Lの効果はTable 7 に示した。Fr. I-Lは、10 mg/kg の用量でもこの肉芽形成を有意に抑制した。この炎症モデルでの臓器重量の変動をTable 8 に示した。その結果Fr. I-Lは25mg/kg の8日間連続投与により脾臓、胸腺の重量を減少させることが明らかになった。

Croton oil granuloma pouch法での、Fr. I-Lの効果はTable 9 に示した。その結果、Fr. I-Lは25、10 mg/kgの用量で肉芽形成、浸出液貯留を有意に抑制した。またこの炎症モデルでの臓器重量の変動をTable 10に示した。Fr. I-Lは、25mg/kg の連続投与により、こ

のモデル動物の胸腺を萎縮させた。

Table 7 Effect of Successive Administration of Fr. I-L on Granuloma Formation by Felt Pellet in Rats

Treatment	Daily dose (mg/kg)	No. of rats	Granuloma (mg)
A) Control	----	16	24.4 ± 1.0
Fr. I-L	10	16	16.7 ± 1.0***
	25	16	16.6 ± 0.6***
B) Dexamethasone	0.1	16	13.8 ± 0.8***

All values represent mean ± s.e.

A) intraperitoneal injection for 8 days

B) subcutaneous injection for 8 days

Significantly different from the control group ; ***p<0.001.

Table 8

Effect of Successive Administration of Fr. I-L on Various Organ Weights

Treatment	Daily dose (mg/kg)	Relative organ weight			
		Adrenal ^{a)}	Thymus ^{a)}	Spleen ^{a)}	Liver ^{b)}
A) Control	----	22.0 ± 1.6	201.3 ± 13.0	377.9 ± 21.9	4.5 ± 2.3
Fr. I-L	10	18.1 ± 2.0	193.9 ± 10.3	397.7 ± 23.0	4.3 ± 2.4
	25	19.7 ± 1.6	161.6 ± 3.9*	221.8 ± 17.4***	4.4 ± 2.0
B) Dexamethasone	0.1	13.7 ± 1.2***	41.4 ± 5.9***	207.3 ± 13.7***	4.5 ± 0.1

All values represent mean ± s.e. (n=8)

A) intraperitoneal injection for 8 days

B) subcutaneous injection for 8 days

a) mg/100g final body weight

b) g/100g final body weight

Significantly different from the control group ; *p<0.05, ***p<0.001.

Table 9

Effect of Successive Administration of Fr. I-L on Granuloma Formation and Exudate by Granulation Pouch Method in Rats

Treatment	Daily dose (mg/kg)	No. of rats	Pouch fluid (ml)	Granuloma (g)
A) Control	----	10	14.1 ± 1.3	3.89 ± 0.21
Fr. I-L	10	10	3.7 ± 1.0***	2.77 ± 0.19***
	25	10	2.0 ± 0.7***	2.01 ± 0.23***
B) Dexamethasone	0.1	10	2.6 ± 1.1***	1.92 ± 0.22***

All values represent mean ± s.e.

A) intraperitoneal injection for 8 days

B) subcutaneous injection for 8 days

Significantly different from the control group ; ***p<0.001.

Table 10

Effect of Successive Administration of Fr. I-L on Various Organ Weights

Treatment	Daily dose (mg/kg)	Relative organ weight			
		Adrenal ^{a)}	Thymus ^{a)}	Spleen ^{a)}	Liver ^{b)}
A) Control	----	19.0 ± 0.7	166.4 ± 11.6	426.3 ± 22.0	4.0 ± 0.1
Fr. I-L	10	20.2 ± 1.5	136.2 ± 9.1	436.0 ± 21.6	4.1 ± 0.1
	25	20.4 ± 0.9	129.8 ± 10.2*	420.6 ± 16.5	4.2 ± 0.1
B) Dexamethasone	0.1	16.4 ± 1.1	71.3 ± 8.3***	270.1 ± 14.0***	4.5 ± 0.1**

All values represent mean ± s.e. (n=10)

A) intraperitoneal injection for 8 days

B) subcutaneous injection for 8 days

a) mg/100g final body weight

b) g/100g final body weight

Significantly different from the control group ; *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001.

第四節 肉芽腫炎症組織の糖成分に対する作用

実験的増殖性炎症において、肉芽腫中の糖成分の増加が肉芽腫組織の過増殖に関与するといわれている。¹⁸⁾ また、抗炎症薬がムコ多糖や糖蛋白の著しい減少をもたらし、過増殖を抑制するという報告もある。^{19) 20)} そこでFr. I-Lの肉芽腫増殖抑制機序解明のために、croton oil granuloma pouch法を用い、肉芽腫組織中の糖成分含有量について検討した。

実 験 方 法

前述したcroton oil granuloma pouch法により炎症を惹起し、8日目に、肉芽腫を摘出し、総ムコ多糖の指標としてhexosamineを、糖蛋白質の指標としてsialic acid を、酸性ムコ多糖の指標としてuronic acid 含有量を定量した。

Hexosamine定量

Bolognani らの方法²¹⁾ に準じ、肉芽腫にpapain溶液 (Difco; 45 units) 2.5mlを加えhomogenizeし、37℃20時間消化した。遠心後上清のhexosamine量を、Gunnarの方法²²⁾ により定量した。すなわち、上清500 μ l に6N HCl 250 μ lを加え110℃14時間加水分解し、遠心後、上清600 μ l に2M Na₂CO₃ 0.4 ml、2% acetyl acetone 0.5ml 加え、89～90℃20分間加熱した。その後 ethanol 1ml, エールリッヒ試薬 (Wako Pure Chemicals) 0.5ml を加えて10分後に530nm における吸光度を測定した。標準物質として、glucosamine-HCl (Wako Pure Chemicals) を用いhexosamine-HCl量に換算して求めた。

Sialic acid 定量

肉芽腫を水でhomogenizeし、この0.3ml に0.2N H₂SO₄ 0.3mlを加え、80℃ 1時間加水分解した。遠心後、上清のsialic acid 量をWarrenのthiobarbituric acid (TBA)法²³⁾ により定量した。すなわち、上清 0.2mlに 0.2M NaIO₄ 50 μ l 加え20分間放置し、さらに 1% NaAsO₂ 0.7ml、0.6% thiobarbituric acid (Wako Pure Chemicals) 1.5ml加え15分煮沸した。冷後ethyleneglycol monomethyl ether (Wako Pure Chemicals) 2.5mlを加え3000

rpm 20分間遠心して上清の吸光度を550nm で測定した。標準物質として、N-acetylneuramic acid (Fluka A.G.Chem.)を用い sialic acid 量を、N-acetylneuramic acid に換算して求めた。

Uronic acid 定量

肉芽腫にpapain (Difco;45units) 溶液 2.5ml加えhomogenizeし、37℃48時間消化した。3000rpm 10分間遠心後、上清0.1ml に1% cetylpyridinium chloride (CPC, Sigma) 2.0ml 加え、低温室に1 夜放置した。この後3000rpm 20分間遠心し、沈殿物に0.01N NaOH 0.1mlを加えて溶解し、その1ml を取り、Bitter らの硫酸カルバゾール法²⁴⁾ により定量した。なお、標準品としてglucuronic acid (Wako Pure Chemicals)を用い、uronic acid 含量はglucuronic acid に換算して求めた。

実 験 結 果

Table 11

Effect of Fr. I-L on Hexosamine, Sialic Acid and Uronic Acid Contents of Inflamed Tissue in Rats

Treatment	Dose (mg/kg)	No. of rats	Hexosamine ^{a)}	Sialic acid ^{a)}	Uronic acid ^{a)}
A) Control	----	8	1.24±0.09	0.59±0.02	0.28±0.02
Fr. I-L	10	8	0.98±0.05*	0.49±0.04	0.29±0.04
	25	8	0.82±0.08**	0.61±0.04	0.27±0.01
B) Dexamethasone	0.1	8	1.61±0.04	0.57±0.03	0.34±0.07

All values represent mean ± s.e.

A) intraperitoneal injection for 8 days

B) subcutaneous injection for 8 days

a) µg/mg inflamed tissue

Significantly different from the control group ; *p<0.05, **p<0.01.

Fr. I-Lは、肉芽腫組織単位重量当たりのhexosamine含有量を有意に低下させた。しかし

uronic acid、sialic acid含有量に対しては全く影響しなかった。Dexamethasone は、これらの糖成分組成に対しては、全く影響しなかった。(Table 11)

第五節 副腎摘出ラットを用いたカラゲニン足蹠浮腫抑制作用

副腎皮質ホルモンである糖質コルチコイドの血中濃度は、感染、その他の原因による炎症を含むストレス時に上昇することが知られている。²⁵⁾ この糖質コルチコイドは、炎症の初期反応の浮腫や血管透過性を抑制するとともに、²⁶⁾ 白血球遊走をも抑制する。²⁷⁾ また抗炎症作用を有する薬物の中には、下垂体副腎系に作用し、副腎皮質から糖質コルチコイドの分泌を亢進させ、その抗炎症作用をもたらすものもあることが知られている。

そこで、Fr. I-Lの抗炎症作用が、この副腎からの糖質コルチコイドの分泌亢進によりもたらされたものかを明らかにするため、副腎摘出ラットによるカラゲニン浮腫抑制作用について検討した。

実験方法

体重120 ～150gのSD系雄性ラットの両側副腎を摘出し、術後5日目に第二章、第二節に記述した方法で、カラゲニン足蹠浮腫を誘発させた。

実験結果

コントロール群では、カラゲニン投与、1時間目より急激な足の腫れが認められ、時間とともにこの浮腫の増加が認められた。Fr. I-Lは、25mg/kg i. p. でこの浮腫をも有意に抑制した。(Fig. 6)

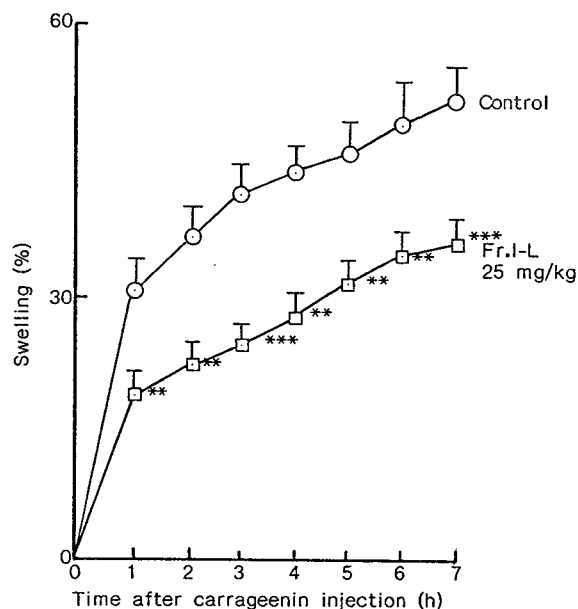


Fig. 6 Effect of Fr.I-L on Carrageenin-induced
Paw Edema in Adrenalectomized Rats

Significantly different from the control
group ; **p<0.01, ***p<0.001.

第六節 小 括

Fr. I-Lは、第一期反応の血管透過性亢進、第二期反応の白血球浸出遊走、第三期反応の肉芽形成と一連の炎症過程の各段階すべてを強く抑制することを明らかにした。この血管透過性に対する効果は、プロスタグランジンの生合成阻害により、遊走白血球数の減少は遊走因子となりうる血漿蛋白の浸出抑制によりもたらされた可能性が示唆された。また、Fr. I-Lは、肉芽腫炎症組織単位重量当たりのhexosamine含有量をも有意に低下させた。このhexosamineは、肉芽腫形成において重要な糖成分の一つであるので、この含有量を低下させることにより肉芽腫の過増殖抑制がもたらされたものと考えられた。一方、Fr. I-Lを25mg/kg の用量で8日間連続投与することにより、胸腺や脾臓の重量が有意に減少したがこのことは、Fr. I-Lが免疫系へ何らかの影響を与えることを示すものである。

第三章 生体膜に対する作用

細胞膜は、細胞を外界から守るとともに細胞どうしの相互関係を調節している。また最近この膜を介する情報伝達機構およびその調節作用が注目されている。このような機能を有する細胞膜が変化を受けると生体に障害がもたらされる様になる。

炎症反応に関係する膜表面あるいは膜機能を介する反応を考えると、リソゾーム内酵素の遊離およびその作用、²⁸⁾ 活性酸素の生成と作用、^{29) 30)} chemotaxis 反応²⁸⁾ など多彩である。そこで、この生体膜に対する作用を検討した。

第一節 CMC pouch 炎症での浸出液中のlysosome内酵素とesteraseに対する作用

白血球やマクロファージのリソゾーム内酵素は、エンドサイトーシスによって取り込まれた障害因子、障害産物を消化分解し、生体防御に一役演じている。しかし、このリソゾーム内酵素が、細胞外に放出されることがあり、その結果、血管拡張、血管透過性亢進、白血球粘着遊走、細胞構成成分の分解など生体に悪影響を与える。²⁸⁾ そこで、Fr. I-Lのin vivoでのリソゾーム内酵素放出抑制作用をそのなかに含まれる酵素を一つの指標として測定した。また同時に、浸出液中のesterase活性をも測定した。このesteraseは、炎症の場で重要な機能を果たすtrypsin、chymotrypsin、plasmin、kallikreinなどのesteraseの総合的指標としたもので、これらの酵素による生成物が血管透過性や白血球の遊走に関与することも知られている。²⁶⁾

実験方法

第二章 第二節の白血球遊走に対する作用の項で用いたCMC pouch 法により炎症を惹起させた。CMC 注入6時間目に浸出液を採取後、同量の生理食塩水を加え2000rpm 20分間遠心した。その上清を用いリソゾーム内酵素の指標としてacid phosphatase活性を、またesterase活性を測定した。

Acid phosphatase活性

Besseyらの方法³¹⁾ に準じ、50mM citrate buffer (pH 4.8) に溶解した5.5mM p-nitro-phenyl phosphate (Wako Pure Chemicals) 0.5mlを37℃10分間preincubate 後、上記酵素液0.5ml を加え、37℃30分間incubateした。反応終了後0.1N NaOH 4ml を加え、生成したp-nitrophenol 量を400nm の吸光度で測定し、control を100 として抑制率を算出した。

Esterase活性

Robertの方法³²⁾ に準じ測定した。すなわち浸出液の2倍希釈液 0.5mlに、10 μ mol N-benzyl-L-arginine ethyl ester hydrochloride (BAEE, Sigma) 0.5ml を加え、37℃60分間incubateした。15% TCA により反応を停止し、3000rpm30分間遠心した。上清1ml にアルカリ性ヒドロキシルアミン (Wako Pure Chemicals) 1.5mlを加え、室温で25分以上放置した。次いで2N HCl 1ml, 10% FeCl₃- 0.1N HCl 1.0ml を加え、15 分後に残存するBAEE量を530nm の吸光度を測定することにより算出した。

実 験 結 果

Fr. I-Lは、25mg/kg の用量で単位浸出液当たりのesterase活性を有意に抑制した。またacid phosphatase活性に対して、有意ではないものの27.2% の抑制を示した。(Table 12)

Table 12

Effect of Fr. I-L on Esterase and Acid Phosphatase Activities of the Pouch Fluid by the CMC Pouch Method

Treatment	Dose (mg/kg)	No. of rats	Esterase BAEE μ moles/ml/h	Acid phosphatase p-nitrophenol mg/ml/h
A) Control	----	8	7.94 \pm 0.77	3.94 \pm 0.33
Fr. I-L	25	8	4.56 \pm 0.75**	2.54 \pm 0.36
B) Dexamethasone	1	8	4.46 \pm 0.26***	4.05 \pm 0.33

All values represent mean \pm s.e.

A) intraperitoneal injection

B) subcutaneous injection

Significantly different from the control group ; **p<0.01, ***p<0.001.

第二節 膜脂質過酸化に対する作用

炎症が生じると活性酸素等が産生され、生体膜が過酸化を受けて過酸化脂質が生成される。このことにより膜が不安定化されて崩壊し、生体にさらに障害をもたらすといった悪循環が起る。³³⁾ また刺激により起った炎症が、その強さに応じて全身反応を引き起こす。例えば、局所炎症により、肝臓や腎臓の膜脂質の過酸化レベルが上昇するといったことが知られている。⁸⁾ そこで、炎症時の脂質過酸化抑制作用について検討した。

実験方法

マウス・カラゲニン足蹠浮腫誘発時の過酸化脂質生成

Sharmaらの方法³⁴⁾ に準じ、体重15~20g のddY 系雄性マウスの足蹠皮下に1%カラゲニン生理食塩水懸濁液25 μ lを注入し足蹠浮腫を生じさせた。3時間目に浮腫をDial thickness gage (Mitsutoyo MGF Co.)で測定した後脱血死させ、肝臓、脾臓、腎臓を摘出し、TBA法により過酸化脂質量を定量した。検体は、カラゲニン注入30分前に腹腔内投与した。

ラット kaolin pouch炎症誘発時の肝臓の過酸化脂質生成

Bragt らの方法³²⁾ に準じ、体重130 ~150gのSD系雄性ラットの背部皮下に、6ml の空気を注入して、空気嚢を作製し、実験に用いた。空気嚢作成24時間後に生理食塩水に懸濁した10% kaolin (Wako Pure Chemicals) 4ml を嚢内に注入して炎症を起こさせ、4 日後に脱血死させて肝臓を摘出しTBA 法により過酸化脂質量を定量した。また、同時に肉芽腫の湿重量も測定した。検体は、kaolin 投与30分前に腹腔内投与した。

Thiobarbituric acid (TBA) 法³⁴⁾

10% 臓器homogenate 0.2mlに8.1% SDS 0.2ml、20% acetic acid buffer (pH 3.5)を1.5 ml、0.8% TBA (Wako Pure Chemicals) 1.5ml、H₂O 0.6mlを加え95℃60分間incubateした。冷後、3000rpm15分間遠心し、上清の吸光度を532nm で測定した。標準物質として、tetramethoxypropane (Wako Pure Chemicals)を同様に反応させ、その吸光度から過酸化脂質量を算出し、単位蛋白質重量当たりのマロンジアルデヒド量として表わした。

実 験 結 果

Table 13

Effect of Fr. I-L on Edema Induced by Carrageenin in Mice and Lipid Peroxide Levels in Various Tissues

Treatment	Dose (mg/kg)	No. of mice	Edema (Swelling %)	Lipid peroxide ^{a)}		
				Liver	Spleen	Kidney
Intact	----	8	----	8.57±0.37	3.96±0.88	4.64±0.66
A) Control	----	8	67.1±3.6	15.68±0.98 ^{###}	4.42±0.38	7.29±0.20 ^{##}
Fr. I-L	25	8	23.6±2.8 ^{***}	9.87±0.56 ^{***}	3.49±0.23	6.94±0.92
B) Dexamethasone	1	8	20.2±2.9 ^{***}	11.27±2.19	5.87±0.69	7.45±0.82

All values represent mean ± s.e.

A) intraperitoneal injection

B) subcutaneous injection

a) nmol malondialdehyde (MDA)/mg protein

Significantly different from the intact group ; ^{##}p<0.01, ^{###}p<0.001.

Significantly different from the control group ; ^{***}p<0.001

Table 14

Effect of Fr. I-L on Granuloma Formation and Hepatic Levels of Lipid Peroxidation by Kaolin Pouch Method in Rats

Treatment	Dose (mg/kg)	No. of rats	Dry granuloma weight (mg)	Lipid peroxide nmol MDA/mg protein
Intact	----	8	----	4.0 ± 0.2
A) Control	----	8	573.3 ± 36.3	5.0 ± 0.1 ^{###}
Fr. I-L	25	8	457.4 ± 19.5 ^{**}	4.0 ± 0.1 ^{***}
B) Dexamethasone	1	8	477.5 ± 23.2 ^{**}	4.4 ± 0.3 [*]

All values represent mean ± s.e.

A) intraperitoneal injection

B) subcutaneous injection

Significantly different from the intact group ; ^{###}p<0.001.

Significantly different from the control group ; ^{*}p<0.05, ^{**}p<0.01,

^{***}p<0.001.

Table 13に示すように、マウスにカラゲニン足蹠浮腫を起こすとintactマウスに比べ肝臓、脾臓、腎臓の過酸化脂質量が上昇した。特に、肝臓での上昇率が最も高かった。

Fr. I-Lは、25mg/kg の用量で足蹠浮腫を、また肝臓の脂質過酸化を有意に抑制した。

Kaolin pouch炎症時の脂質過酸化に対するFr. I-L効果をTable 14に示した。炎症が起るとintact群に比べ、肝臓の脂質過酸化量が有意に上昇した。Fr. I-L は、肉芽腫の過増殖を有意に抑制するとともに、肝臓の脂質過酸化量をもintactレベルまで低下させた。

第三節 小 括

炎症の悪化には、種々の因子や酵素系の活性化等が複雑に関与する。Fr. I-Lは、白血球からのリソゾーム内酵素の放出や、浸出液中のesterase活性を抑制した。これらの酵素に対しては、直接阻害作用を示さないことが明らかとされている⁴⁾ので、このものの投与により発現される抗炎症作用メカニズムの一つと考えられる。また、局所炎症誘発前にFr. I-Lを投与すると、その炎症に起因する全身反応すなわち、肝臓の脂質過酸化を有意に抑制した。過酸化脂質は、炎症や、その後の後発性疾患の原因ともなりうる因子であるので、この抑制は単に抗炎症作用にとどまるのではなく、生体防衛機構に重大な意義を持つものと考えられた。

第四章 白血球の機能に対する効果

急性炎症での主たる作働細胞は、白血球、特に多形核白血球である。³⁵⁾ この白血球は、刺激が加わった部位に遊走し、異物を認識し、これを貪食する。そのとき活性酸素を放出して殺菌、不活性化をおこす。²⁷⁾ しかし、過度の刺激により、これらの機能が過剰に発現されると、正常組織にも障害を与えるようになる。そこでFr. I-Lの抗炎症作用メカニズムを解明するため、白血球の機能に対する効果をin vivo, in vitro で検討した。

第一節 遊走能に対する効果

組織に刺激が加わると、その刺激の種類にかかわらず、まず多形核白血球が刺激局所に到達する。炎症反応では、血中を循環する白血球の刺激局所への動員、組織への浸潤が必発の現象で、この白血球が、炎症の基本的機構である防御に携わる。しかし、この白血球の過剰な浸潤は、逆に炎症を悪化することにもつながる。そこで、白血球の遊走に対する効果を検討した。

実験方法

ラット・カラゲニン胸膜炎

体重160 ～240gのWistar系雄性ラットを使用した。Sedgwickらの方法³⁸⁾ に準じ、胸腔中に2 mg/ml のカラゲニン生理食塩水懸濁液 0.2mlを注入して炎症を惹起させ、6時間後に脱血死させた。開胸後、胸腔中の浸出液を採取し、浸出液量を測定した。さらに20units/mlヘパリン生理食塩溶液1ml で胸腔中を洗浄後、この浸出液と混合し、白血球数を血球計数板 (Burker-Turk, エルマ光学) により数えた。また、浸出液中の白血球の生存率は、trypanblue色素排除法により算出した。なお検体は、カラゲニン注入30分前に尾静脈内投与した。

Trypanblue色素排除法³⁹⁾

0.2% trypanblue 溶液と、4.25% NaClを4 : 1の割合で混合した溶液を白血球浮遊液と等量ずつ混合後、鏡検し、青く染まった細胞を死細胞と判定して生存率を算出した。

Boyden chamber法

Boydenの方法⁴⁰⁾ に準じ、in vitroでの白血球の遊走に対する効果を、Boyden chamberを用いて判定した。直径3 μ mのporeを持つニトロセルロースフィルター (Nucleopore)を用い、このchamberを上下室に分離し、下室に遊走因子として 10^{-8} M N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine (FMLP, Sigma),あるいはサイモザン処理血清200 μ lを、上室には 10^6 cells/mlのモルモット多形核白血球 (PMNs)を200 μ l入れた。37℃20分incubate後、上室の細胞懸濁液を吸引除去し、filterを取り外してmethanolで固定した。次に、このfilterをGiemsa液 (Merck)で20分間染色し、xyleneで透明化した。そして400倍の拡大で任意に5視野を選び、filterのporeを通過した白血球数を数えて平均した。

モルモット多形核白血球

Sbarraらの方法⁴¹⁾ に準じ、体重400 ~ 500 gのHartley系雄性モルモットの腹腔内に0.17% 滅菌glycogen (Sigma) 生理食塩水溶液100mlを注入し16時間後に脱血死させた。そして、滅菌 20 units/mlヘパリン含有生理食塩水50mlを腹腔内に注入し、よく揉んだ。開腹後浸出細胞を集め、さらに20 units/mlヘパリン含有生理食塩水50mlで2回洗浄した。この浸出液を、4℃ 650rpm 10分間遠心し浸出細胞を集めた。この細胞中に混在している赤血球は低張圧処理⁴¹⁾により溶血させ、ハンス液 (HBSS; ニッスイ②、日水製薬株式会社)で洗浄後、懸濁して使用した。なお、得られた白血球中、多形核白血球は、90~95%以上、生存率は、95%以上であった。

サイモザン処理血清

モルモット血清1mlに5mgの割合でサイモザン (Sigma)を入れ、37℃ 30分間incubateした。次いで1000rpm 10分間遠心し、上清を56℃30分間incubateして補体を非働化後、HBSSで10%に希釈して使用した。⁴³⁾

実験結果

Table 15に示すように、Fr. I-Lは、0.5 mg/kg の用量で、浸出白血球数を、1 mg/kg の用量で、浸出液量、浸出白血球数を有意に抑制した。また、この時の白血球の生存率は、平均 95%以上、また、浸出白血球の内、多形核白血球は、90%以上であった。

Table 15

Effect of Fr. I-L on Carrageenin-induced Pleurisy in Rats

Treatment	Dose (mg/kg)	No. of rats	Exudate vol. (ml)	No. of leukocytes ($\times 10^7$)
A) Control	---	7	1.38 \pm 0.19	18.0 \pm 1.5
Fr. I-L	0.5	7	0.98 \pm 0.10	11.8 \pm 0.6**
Control	---	12	1.38 \pm 0.11	14.4 \pm 1.5
Fr. I-L	1	14	0.70 \pm 0.06***	6.7 \pm 1.2***
B) Control	---	8	1.30 \pm 0.10	18.9 \pm 1.6
Dexamethasone	1	7	0.64 \pm 0.05***	11.4 \pm 1.7**

All values represent mean \pm s.e.

A) intravenous injection

B) subcutaneous injection

Significantly different from the control group ; **p<0.01, ***p<0.001.

Table 16 Effect of Fr. I-L on FMLP-induced Chemotaxis of PMNs of Guinea Pigs by Boyden Method

Treatment	Concentration (μ g/ml)	No. of PMNs emigrated
Control	---	95.7 \pm 6.9
Fr. I-L	50	101.7 \pm 12.0
	100	93.0 \pm 7.2

All values represent mean \pm s.e. (n=3).

In vitroでの白血球の遊走試験法であるBoyden chamber法においてFr. I-Lは、FMLP

(Table 16)、サイモザン処理血清 (Table 17) を遊走因子として使用したときの白血球の遊走を全く抑制しなかった。

Table 17 Effect of Fr. I-L on Zymosan-activated Serum-induced Chemotaxis of PMNs of Guinea Pigs by Boyden Method

Treatment	Concentration ($\mu\text{g/ml}$)	No. of PMNs emigrated
Control	---	115.4 \pm 10.1
Fr. I-L	50	110.3 \pm 11.1
	100	109.2 \pm 9.0

All values represent mean \pm s.e. (n=3).

第二節 貪食能に対する作用

細胞が、物質を取り込む現象を食作用 (phagocytosis) といい、細胞の最も本質的な機能の一つである。この食作用を営む細胞、すなわち食細胞には、多形核白血球、単球、マクロファージなどがある。これら食細胞による食作用は、生体防御における重要な機能の一つである。そこで、この食細胞による貪食能における効果を検討した。

実験方法

モルモット多形核白血球による in vitro でのイースト菌貪食能

モルモット多形核白血球 (1×10^7 cells/ml) 100 μl に HBSS 0.25ml を加え、37 $^{\circ}\text{C}$ で 10 分間 incubate した。次いで 50 μl のモルモット血清を加えた後、 2.5×10^8 個イースト菌懸濁液 100 μl 加え、37 $^{\circ}\text{C}$ で 30 分間 incubate した。その後、4 $^{\circ}\text{C}$ 500rpm 5 分間遠心し、細胞沈渣に 5% チールネルゼン液 (Wako Pure Chemicals) を 100 μl 加え貪食されていないイースト菌を染色後鏡検した。多形核白血球によるイースト菌取り込み能は、白血球 100 個当たりを取

り込まれたイースト菌数をもって現わした。⁴³⁾

イースト菌懸濁液の調製

Takehiraらの方法⁴³⁾ に準じ、市販パンイースト（オリエンタル酵母）500mg を生理食塩水10mlに懸濁させた後、滅菌ガーゼで濾過した。これを 4℃ 1000rpm10分間遠心し、沈渣をHBSSで2回洗浄後、 2.5×10^8 個/ml に調製した。

マウス・イースト誘発腹膜炎

Hisadomeらの方法⁴⁴⁾ に準じ、体重20～25g のICR 系雄性マウスの腹腔内に5%イースト菌懸濁液0.5ml 注入した。3時間後、脱血死させ、10units/ml ヘパリンを含むHBSS 5mlを注入した。開腹後浸出細胞を集め、総浸出細胞数、浸出細胞100 個当たりイースト菌を貪食している細胞数を数えた。検体はイースト菌懸濁液注入30分前に尾静脈内投与した。

実 験 結 果

Table 18

Effect of Fr. I-L on Phagocytosis of Yeast by Guinea Pig Peritoneal PMNs in vitro

Treatment	Concentration ($\mu\text{g/ml}$)	No. of phagocytized yeast in 100 PMNs	% of control
A) Control	----	590.7 \pm 31.0	100
Fr. I-L	50	573.6 \pm 23.5	97
	100	592.0 \pm 17.7	100
D-Penicillamine	15	664.9 \pm 29.1	113
B) Control	----	619.8 \pm 21.7	100
Cytochalasin B	5	44.6 \pm 5.8***	7

All values represent mean \pm s.e. (n=5).

Control PMNs were similarly treated with A) Hanks' balanced salt solution and B) dimethylsulfoxide without agents, respectively.

Significantly different from the control group ; ***p<0.001.

Table 18に示すように、Fr. I-Lは、100、50 $\mu\text{g/ml}$ の用量において、モルモット白血球によるイースト粒子の取り込みには、全く影響しなかった。D-penicillamine は貪食促進、

cytochalasin Bは貪食抑制の陽性コントロールとして使用した。

In vivo でのマウス食細胞による、イースト菌貪食能に対する効果を、Table 19に示した。Fr. I-Lは、有意ではなかったが、用量依存的に腹腔内への白血球の浸出抑制、および貪食を促進する傾向が認められた。また、陽性コントロールのethylcysteine は、有意に食細胞による貪食を促進させた。

Table 19

Effect of Fr. I-L on Yeast-induced Peritonitis in Mice

Treatment	Dose (mg/kg)	No. of leukocytes ($\times 10^6$)	Phagocytosis in 100 cells
A) Control	---	3.1 \pm 0.4	21.8 \pm 3.7
Fr. I-L	0.5	3.4 \pm 0.3	20.9 \pm 3.3
	1	2.4 \pm 0.2	25.7 \pm 1.9
	5	2.3 \pm 0.2	27.5 \pm 3.4
B) Ethylcysteine 100		3.4 \pm 0.3	31.6 \pm 1.8*

All values represent mean \pm s. e. (n=8).

A) intravenous injection

B) peroral injection

Significantly different from the control group ; *p<0.05.

第三節 Serotonin 誘発足蹠浮腫法

セロトニン足蹠浮腫法は、抗セロトニン薬、ステロイド性抗炎症薬の他、スーパーオキシドラジカルスカベンジャーであるsuperoxide dismutase (SOD) が有効なモデルとされこの浮腫に、活性酸素の関与が示唆されている。⁴⁵⁾ Fr. I-L は、セロトニンによる血管透過性を抑制しないことを、また副腎摘出ラットに投与してもカラゲニン足蹠浮腫を有意に抑制することを既に明らかにしている。そこで Fr. I-Lが、SOD 様の作用を有するかを、このモデルで検討した。

実 験 方 法

Tsurufuji の方法²⁶⁾ に準じ、体重25～35g のICR 系雄性マウスの右足趾皮下に0.3 μ g serotonin(Wako Pure Chemicals)を溶解した生理食塩水5 μ l を注入し、同時に左足趾皮下に、同量の生理食塩水を注入した。15分後にDial thickness gage(Mitsu-toyo MGF Co.)で左右の足の腫れを測定した。なお検体は、serotonin 注入30分前に尾静脈内投与した。

実 験 結 果

Fr. I-Lは、1 mg/kg の用量で、このserotonin 足趾浮腫を有意に抑制したが、0.5mg/kg の用量では、この抑制作用は認められなかった。(Table 20)

Table 20 Effect of Fr. I-L on Serotonin-induced Paw Edema in Mice

Treatment	Dose (mg/kg)	No. of mice	Swelling (mm)	Inhibition (%)
A) Control	---	8	1.1 \pm 0.1	----
Fr. I-L	0.5	8	1.1 \pm 0.1	0
	1	8	0.6 \pm 0.1**	40
B) Control	---	7	1.1 \pm 0.1	----
Dexamethasone	1	7	0.2 \pm 0.1***	79

All values represent mean \pm s. e.

A) intravenous injection

B) subcutaneous injection

Significantly different from the control group ; **p<0.01,

***p<0.001.

第四節 活性酸素に対する作用

白血球は、炎症局所で反応性の高い分子種である活性酸素 (O_2^- , 1O_2 , H_2O_2 , $\cdot OH$) を産生し、⁴⁶⁾ 取り込んだ微生物をこれらの活性酸素によって殺菌する。しかし、これらの活性酸素が、細胞外へ出ると、正常組織、組織液にも影響を及ぼす様になるので、炎症の悪化につながる。⁴⁷⁾ そこで、この細胞外に放出される活性酸素を効率よく除去できれば、生体障害を防御できると考えられる。白血球などの食細胞が細菌などの異物を取り込む際には活性酸素を産生すると同時に光を発生することが知られている。⁴⁸⁾ この現象はchemiluminescence (CL) と呼ばれ、食細胞機能の測定に使用したり、活性酸素の優れた指標とすることができる。しかし、このCLは非常に微弱なので、luminol を用いてこの発光を増感させて、luminol enhanced CL を発生させることにより光電子倍增感をもつchemiluminescence photometerで効率よく検出する事ができる様になる。⁴⁹⁾

実験方法

Luminol-enhanced chemiluminescence (CL)

モルモット多形核白血球が産生する活性酸素を、lumiphotometer TD-4000 (Labo Science Co.ltd) により経時的に測定した。キュベット中に 2×10^6 /ml PMNs を150 μ l 入れ37℃でincubateした。5分後に、 10^{-4} M luminol (Wako Pure Chemicals) 50 μ l、 10^{-5} M FMLPあるいはオプソニン化サイモザン 100 μ l加え、1分毎に発光量を測定した。CL強度は、relate light unit (rlu) として表わした。1 rlu は、 10^5 cpm に相当する。

オプソニン化サイモザンの調製法

サイモザン (Sigma) を20mg/ml になるように生理食塩水で懸濁し、100℃30分間煮沸した。冷後400rpm 5分間遠心し、沈渣を生理食塩水で3回洗浄した。この沈渣に、新鮮モルモット血清2.5mlを加え、37℃30分間incubateして、オプソニン化した。このオプソニン化サイモザンをHBSSで3回洗浄後、 1×10^7 particles/ml になるようHBSSで調製した。

実験結果

Fig. 7 にFMLP刺激によるCLの経時的な変化と、各検体の効果を示した。コントロール群ではFMLP刺激後、急速なCLが認められ 2分でそのピークを迎え、その後次第に低下し始めた。

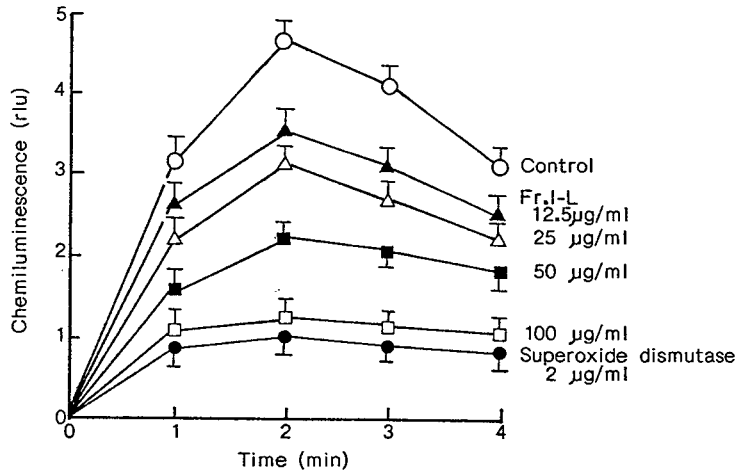


Fig. 7 Effect of Fr.I-L on FMLP-induced Chemiluminescence from Guinea Pig PMNs

All values represent mean \pm s.e. (n=4).

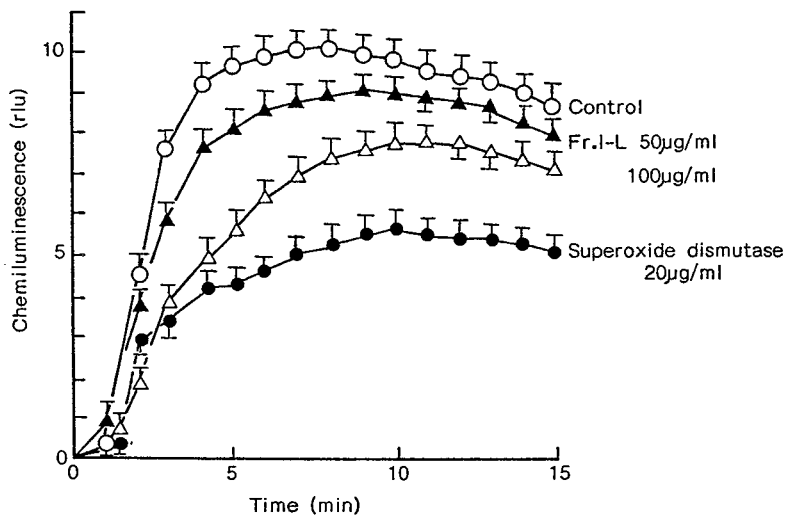


Fig. 8 Effect of Fr.I-L on Zymosan-induced Chemiluminescence from Guinea Pig PMNs

All values represent mean \pm s.e. (n=4).

Fr. I-Lは、100 μ g/mlの濃度で、ピーク時のCLを70.3% 抑制した。この効果は、SOD 2 μ g/mlの抑制率と、ほぼ一致した。また、Fr. Iは、このCLには全く影響しなかった。

刺激剤としてオプソニン化サイモザンを使用した場合のCLパターンをFig. 8 に示した。コントロール群では、刺激後約2分間のlag timeがあり、その後急激なCLの上昇が認められた。そして8分でそのピークを迎えた。Fr. Iは、全くこのCLをも抑制しなかったが、

Fr. I-L、SOD は、明らかな抑制を示した。しかしこの抑制率は、FMLP を刺激剤として使用したときに比べ弱かった。

第五節 小 括

炎症の初期に関与する白血球の機能の内、遊走、貪食、活性酸素の除去という3つの主要な機能におけるFr. I-Lの効果を実験、in vivo、in vitro で調べた。

in vivo の検定法であるカラゲニン胸膜炎において、Fr. I-L投与により炎症部位である胸腔中への白血球の遊走は有意に抑制された。しかし、in vitro での遊走においては、遊走因子の種類にかかわらずFr. I-Lは抑制作用を示さなかった。

貪食能においても、in vitro でのPMNsによるイースト菌貪食に対し、Fr. I-Lは全く影響しなかったが in vivoのイースト誘発腹膜炎では、明らかな食細胞による貪食促進作用が認められた。

また、Fr. I-Lは、PMNs によるluminol enhanced CL のレベルを低下させたので、活性酸素の除去作用を有していることが考えられた。また、その作用は、serotonin 誘発足趾浮腫を抑制することからin vivo における抗炎症作用メカニズムの1つとしても機能していることが明らかとなった。

第三編 考 察

炎症とは、刺激に対する生体の総合的な防衛反応をさす。この生体にとって合目的な炎症は時として過度の反応を引き起こし、障害をもたらすようになる。そこで、抗炎症薬を使用してこの障害を防ぐ必要が生じる。

三村らは、市販人血清IgG (Native IgG) の鎖間disulfide 結合を還元し、遊離したSH基をカルボキサミドメチル化するといった新しい観点から化学修飾蛋白質を作り、このサブフラグメントが、Native IgGには認められない抗潰瘍活性を発現することを報告した。胃潰瘍は、防御系と、攻撃系のバランスの破綻により起るとされていること⁵⁰⁾より、一種の炎症状態とも考えられる。そこで、著者は、新しい抗炎症薬の開発の基礎的研究を行なうためにこの化学修飾蛋白質である還元・アルキル化サブフラグメントの抗炎症作用について検討するとともに、その作用機作を解明するために種々の実験を行なった。

代表的な抗炎症スクリーニングモデルであるラット・カラゲニン足蹠浮腫法により、Native IgG、高度精製したIgG (Fr. I、Fr. II)、還元・アルキル化したFr. I、Fr. II (alkylated Fr. I、alkylated Fr. II)は全くこの浮腫を抑制しなかったが、還元・アルキル化後 heavy chain、light chainに分離したサブフラグメントは抗浮腫活性を発現するようになることを明らかにした。このことは、抗潰瘍活性発現効果とほぼ一致しており、この二つの疾患に対する共通作用メカニズムの存在が示唆された。

また、IgG₁、IgG₄ で構成されているFr. I、IgG₂、IgG₃ で構成されているFr. II⁵¹⁾由来アルキル化サブフラグメントで作用の強さに差が認められなかったこと、作用がより強かった light chainに比べ、heavy chainの方が、S-アルキル基の数が多いこと等を考えあわせると、この活性発現に必要な IgGの還元・アルキル化という操作は、構成フラグメントであるheavy chain、light chainに分離させるために必須であることが明らかとなった。

次に最も強い抗浮腫活性を発現させたFr. I-Lについて、炎症の各段階反応における効果を検討した。その結果、Fr. I-L投与により、モルモット・アラキドン酸誘発発赤は有意に抑制された。しかし、各chemical mediator による透過性は抑制されなかったことより、Fr. I-Lにより透過性が抑制されるメカニズムとして、血管系への直接作用によるものでは

なく、非ステロイド性抗炎症薬と同様プロスタグランジンの生合成が阻害⁵²⁾されたため発現したと考えられた。

肉芽組織の過増殖は糖成分の増加が原因であり、またコラーゲンの繊維形成、不溶化に際してムコ多糖-蛋白複合体が増加するといった報告がある。^{53) 54)} また、抗炎症薬が、hexosamine含有物質の合成を抑えて肉芽腫形成を抑制することも知られている。^{55) 56) 57)} Fr. I-L投与により、肉芽腫の過増殖が抑制された。そして、この肉芽腫の過増殖抑制メカニズムとしてhexosamine量の低下が考えられた。

急性炎症において、まず多形核白血球が炎症局所に浸出しサイトカインにより活性化されて機能したり、あるいは種々の活性物質を放出することにより生体防衛反応を司る。³⁴⁾ そこで、この白血球の機能をうまく制御することが炎症を制御することにつながるものと考えられる。血中の白血球は先ず、局所で活性化された遊走因子により血管外へ遊走される。Fr. I-Lは、*in vitro* での遊走に全く効果を示さなかったが、*in vivo* では、この遊走を有意に抑制したことは、生体内で遊走因子の生成を阻害あるいは不活化することが考えられた。この機構は十分明らかではないが、血漿蛋白の浸出を抑制し、*esterase* 活性の低下をもたらしたことより、1つに血漿由来走化性因子生成抑制によるものが考えられた。また白血球リソゾーム内には、血管透過性亢進因子、⁵⁸⁾ 白血球遊走因子、⁵⁹⁾ あるいは血管基底膜崩壊因子⁶⁰⁾ が存在することが知られている。浸出液中のリソゾーム内酵素活性がFr. I-L投与によりコントロール群より低下したことも、遊走抑制メカニズムの1つの可能性を示すものである。

炎症局所に遊走した白血球は、異物を貪食し、種々のメカニズムで殺菌、消化を行なうが、刺激が強すぎるときには、逆に生体に悪影響を及ぼすようになる。Fr. I-L投与によりこの白血球の貪食能は促進されることを明らかとした。しかし、*in vitro* では全くそのような効果は認められなかった。このことは、Fr. I-Lが、生体内で何らかの代謝を受け、その代謝物質がこのような活性を発現させるようになったと考えることができる。また、遊走を抑制しながらも一個の細胞の貪食率を上昇させたことは、少ない白血球で効率よく異物を貪食消化させることを意味し生体障害への寄与も少なくなるものと考えられる。

微生物や、可溶性刺激物質が、白血球の細胞膜を刺激すると、*respiratory burst*と呼ば

れる爆発的な酸素消費反応が起り、反応性に富む酸素代謝物、つまり活性酸素が産生される。⁶¹⁾ この活性酸素は、食食、殺菌に用いられるほかに、直接組織に障害を与える。⁶²⁾ 最近、この活性酸素の種々の疾患への関与が注目され⁶³⁾、それら疾患の発生原因の1つとされている。また、この活性酸素の1つであるスーパーオキシドアニオンラジカルを除去する薬物であるSODの臨床応用⁶⁴⁾や、その他のラジカルスカベンジャーの研究開発も進められている。Fr. I-Lは、多形核白血球を液性あるいは粒子性物質で刺激することにより産生される活性酸素を除去することが明らかとなった。Hoffsteinら⁶⁴⁾は、FMLPのような液性刺激物質により主として O_2^- が、サイモザンのような粒子性刺激物質により H_2O_2 が主として産生されると報告している。著者らの行なったCL法においてもFMLPによる刺激で産生されるCLをSODは $2\mu\text{g/ml}$ ではほぼ70%抑制したにもかかわらず、サイモザン刺激によるものは、50%抑制にはほぼ10倍のSODを有したことは、Hoffsteinらの考えを支持するものである。Fr. I-Lは、サイモザン刺激よりFMLP刺激によるCLを強く抑制したことはSODと同様 O_2^- を除去する作用が強いと考えた。

In vivoで活性酸素のみにより炎症が惹起され、薬物の作用を検定できるよいモデルは現在ほとんどない。しかし、Oyanagui⁴⁵⁾は、Tsurufujiら²⁶⁾により確立されたserotonin誘発足蹠浮腫がPG合成阻害剤である非ステロイド性抗炎症薬で全く抑制されず、ステロイド性抗炎症薬や、抗セロトニン薬、SOD様物質により抑制されことを報告した。そこでこのモデルを用いFr. I-Lの効果を検討した。その結果、抗セロトニン作用を示さず副腎皮質ホルモン分泌により抗炎症作用を発現するのではないFr. I-Lもこの浮腫を有意に抑制した。このことは、in vivoにおいてもFr. I-Lは活性酸素を除去することにより抗炎症作用を発現したものと考えられた。

この活性酸素は、リソゾーム内酵素の放出や、プロスタグランジン生合成にも関与することが知られている。⁶⁵⁾ Fr. I-Lによる炎症部位でのリソゾーム内酵素活性の低下やプロスタグランジンの生合成阻害が、このものの活性酸素除去作用のみによって発現したのかは明らかでないが、しかし、その一翼を担っているものと考えられた。また、膜脂質の過酸化は、この活性酸素によりもたらされることも明らかにされている。⁶³⁾ Fr. I-Lが、局所炎症による全身反応である肝臓の脂質過酸化を有意に抑制したことは、活性酸素を除去し

たためにもたらされた事が示唆された。

最近、胃潰瘍の発症原因として、虚血、再環流時に産生される活性酸素が注目されている。⁶⁶⁾ Fr. I-L が、抗炎症、抗潰瘍の両活性を発現する共通作用メカニズムの1つとしてこの活性酸素の除去が考えられた。

第四編 結 論

- 1) 市販人血清IgG 由来還元・アルキル化サブフラグメントであるFr. I-H、Fr. I-L、Fr. II-H、Fr. II-Lは、もとのIgG には全く認められないカラゲニン足蹠浮腫抑制活性を新たに発現した。この抗浮腫活性の発現には、IgG の鎖間disulfide 結合を還元・アルキル化後、heavy chain、light chain に分離することが必須であった。
- 2) 特に強いカラゲニン足蹠浮腫抑制作用を示したFr. I-Lは、種々の実験炎症モデルに有効であり、血管透過性亢進、白血球浸出遊走、肉芽の形成という炎症の一連の過程をすべて抑制した。
- 3) 炎症部位でのリソゾーム内酵素活性や、esterase活性は、Fr. I-Lの投与により抑制された。また局所炎症に起因する全身反応の一つである肝臓の膜脂質過酸化をも有意に抑制した。
- 4) Fr. I-L投与により、白血球の炎症局所への遊走は抑制され、遊走した少ない白血球による異物の貪食能は促進した。またFr. I-Lは、in vitroにおいて刺激された白血球が産生する活性酸素を除去することが明らかとなり、特にスーパーオキシドアニオンラジカルを除去する可能性が示唆された。また、in vivo においても、Fr. I-Lは、活性酸素がその炎症の発生に関与するセロトニン誘発足蹠浮腫を有意に抑制した。

終に幸いにして興味ある新知見を得、ここに論文としてまとめ得ましたのは偏に恩師、大阪大学薬学部教授三村務先生の御指導御鞭撻の賜物であり心より御礼申し上げます。また実験に際し、種種御指導御協力頂きました微生物薬品化学教室の諸氏に感謝致します。さらに、実験材料を提供頂きました、株式会社ミドリ十字に感謝いたします。

第六編 参 考 文 献

- 1) 稲田祐二, 前田 浩 ; 続タンパク質ハイブリッド, 共立出版 (1988).
- 2) T.Mimura, T.Terada, M.Iwai, I.Kohda, S.Take, K.Maeda and S.Aonuma ; J.Pharm. Dyn., 6, 397 (1983).
- 3) T.Mimura, T.Terada, M.Iwai, T.Terada, I.Kohda, K.Tsujikawa, K.Maeda and S. Aonuma ; J.Pharm.Dyn., 6, 449 (1983).
- 4) T.Mimura, M.Iwai, K.Maeda, I.Kohda, K.Tsujikawa and S.Aonuma ; J.Pharm.Dyn., 6, 718 (1984).
- 5) E.J.Cohn, I.E.Strong, W.L.Hughes Jr., D.J.Malford, L.N.Ashworth, M.Melin and H.L.Tayler ; Am.Chem.Soc., 78, 751 (1956).
- 6) J.J.Scheidegger ; Int.Arch.Allergy, 7, 103 (1955).
- 7) C.A.Winter, E.A.Risley and G.W.Nuss ; Proc.Soc.Exp.Biol.Med., 111, 544 (1962).
- 8) 水島 裕, 塩川優一 ; 炎症と抗炎症療法, 医歯薬出版 (1982).
- 9) H.Fujimura, S.Tsurumi and M.Hayasi ; Nippon Yakurigaku Zasshi, 64, 379 (1968).
- 10) G.Thomas and G.B.West ; Br.J.Pharmac., 50, 231 (1974).
- 11) P.Crunkhorn and A.L.Willis ; Br.J.Pharmac., 41, 57 (1971).
- 12) H.Ishikawa and Y.Mori ; Eur.J.Pharmac., 7, 201 (1961).
- 13) S.Kotomo, S.Higuchi, M.Tanaka, K.Goto, Y.Nagata and M.Oseki ; Nippon Yakurigaku Zasshi, 78, 185 (1981).
- 14) O.H.Lowry, N.J.Rosebrough, A.L.Farr and R.J.Randall ; J.Biol.Chem., 9, 193 (1951).
- 15) R.Meier, W.Shuler and P.Desaulier ; Experientia, 6, 469 (1950).
- 16) H.Selye ; Proc.Soc.Exp.Biol.Med., 82, 328 (1953).
- 17) E.Itoga and Y.Miyake ; Nippon Yakurigaku Zasshi, 88, 369 (1986).
- 18) G.Drodi and G.Romeo ; Br.J.Exptl.Pathol., 48, 80 (1967).

- 19) E.V.Chandrasekaran and B.K.Bachhawat ; *Biophys.Acta*, 177, 265 (1969).
- 20) L.Lykar, M.M.Mason and H.Rosenkrantz ; *Endocrinology*, 72, 292 (1963).
- 21) L.Bolognani, G.Coppi, F.Berta and V.Zanbotti ; *Nature*, 190, 913 (1961).
- 22) B.Gunnar ; *Acta.Chem.Scand.*, 2, 467 (1948).
- 23) L.Warren ; *J.Biol.Chem.*, 234, 1971 (1959).
- 24) T.Bitter and H.M.Muir ; *Anal. Biochem.*, 4, 330 (1962).
- 25) J.R.Hodges, M.T.Jones and M.A.Stockham ; *Nature*, 193, 1187 (1962).
- 26) S.Tsurufuji, K.Sugio and F.Takemasa ; *Nature*, 280, 408 (1979).
- 27) J.C.Houch and Y.M.Patel, ; *Nature*, 206, 159 (1956).
- 28) 水上茂樹, 柿沼カツ子 ; 白血球と食作用, 講談社サイエンティフィク (1986).
- 29) 大柳善彦 ; スーパーオキシドと医学, 共立出版 (1981).
- 30) C.G.Rider and J.E.Niedel ; *J.Biol.Chem.*, 262, 5603 (1987).
- 31) H.Sumii, M.Muramatsu and S.Fuji ; *Biochem.Biophys.Acta.*, 327, 207 (1973).
- 32) O.A.Bessey, O.H.Lowry and M.J.Brock ; *J.Biol.Chem.*, 164, 321 (1946).
- 33) P.C.Bragt, E.P.M.Schenkelaars and I.L.Bonta ; *Prostaglandins and Medicine*, 2, 51 (1979).
- 34) S.C.Sharma, H.Mukhtar, S.K.Sharma and C.R.Krishna Murt ; *Biochem.Pharmac.*, 21, 1210 (1971).
- 35) 大川 博, 大石誠子, 八木國夫 ; 生化学, 49, 829 (1977).
- 36) G.Werssman, J.E.Smoden and M.Korchak ; *N.Engl.J.Med.*, 303, 27 (1980).
- 37) R.I.Freshney ; *Animal Cell Culture*, IRL Press (1988).
- 38) A.D.Sedgwick and P.Lees ; *Agents and Actions*, 18, 439 (1986).
- 39) S.Boyden ; *J.Exptl.Med.*, 115, 453 (1962).
- 40) A.J.Sbarra and M.L.Karnovsky ; *J.Biol.*, 234, 1355 (1959).
- 41) J.A.Metcalf, J.I.Gallin, W.M.Nauseef and R.K.Root ; *Laboratory Manual of Neutrophil Function*, Raven Press (1987).
- 42) 今田喬士 ; 細胞性免疫機能の検査のすべて, 医歯薬出版 (1985).
- 43) S.Takerira, M.Hori, N.Kitani and T.Mori ; *Clin.Immunol.*, 9, 494 (1977).

- 44) T.Hisadome, Y.Nakamura, T.Okumoto and T.Ikegami ; Nippon Yakurigaku Zasshi, 88, .369 (1986).
- 45) Y.Oyanagi ; Agents and Actions, 14, 228 (1984).
- 46) M.Babior, R.S.Kipnes and J.T.Curnutte ; J.Clin.Invest., 52, 741 (1973).
- 47) R.C.Allen and L.D.Loose ; Biochem.Biophys.Res.Comm., 69, 245 (1976).
- 48) R.C.Allen, R.L.Stjernholm and R.H.Steele ; Biochem.Biophys.Res.Comm., 47, 679 (1972).
- 49) M.E.Wilson, M.A.Trush, K.Van Dyke, M.J.Kyle, M.D.Mullet and W.A.Neal ; J.Immunol.Meth., 23, 315 (1978).
- 50) H.Shay, D.C.H.Sun ; Gastroenterology, 1, 420 (1963).
- 51) J.G.L.Peterson and K.J.Dorrington ; J.Biol.Chem., 249, 5633 (1974).
- 52) J.R.Vane ; Nature New Biol., 231, 232 (1971).
- 53) B.P.Toole and D.A.Lowther ; Arch.Biochem.Bhys., 128, 569 (1968).
- 54) D.A.Lowther and M.Natarajan ; Biochem.J., 127, 607 (1972).
- 55) E.V.Chandrasekaran and B.K.Bachhawat ; Biophys.Acta, 177, 265 (1969).
- 56) L.Likar, M.M.Mason and H.Rosenlrantz ; Endocrinology, 72, 292 (1963).
- 57) G.Coppi and G.Bonardi ; J.Pharm.Pharmac., 20, 313 (1968).
- 58) N.S.Ranadive and C.G.Cochrane ; J.Exp.Med., 128, 605 (1968).
- 59) H.P.Corney ; Proc.Soc.Exp.Biol.Med., 122, 831 (1966).
- 60) A.Janoff ; Lab.Invest., 22, 228 (1970).
- 61) B.M.Babior, R.S.Kipnes and J.T.Curnutte ; J.Clin.Invest., 52, 741 (1973).
- 62) E.W.Kellgg and I.Fridorich ; J.Biol.Chem., 252, 6721 (1977).
- 63) 井上正康 ; 活性酸素と疾患, 学会出版センター (1987).
- 64) W.Puhl, G.Biehl, R.Kolbel and H.Hofer ; Eur.J.Rheumatol.Inflammation, 4, 264 (1981).
- 65) S.T.Hoffstein, D.E.Gennaro and R.M.Manzi ; Inflammation, 9, 425 (1985).
- 66) Y.Oyanagui ; Biochem.Pharmacol., 25, 1465 (1976).
- 67) D.N.Granger ; Gastroenterol., 81, 22 (1981).

