増殖型炎症時の血管新生における Pronase の作用機序

雨宮 功治, 鈴木 潤, 木村 正康

富山医科薬科大学薬学部薬品作用学研究室*

(昭和61年7月11日〔特〕)

要約: 正常およびアロキサン糖尿病マウスのアジュバント空気嚢肉芽形成に及ぼす pronase (Pro) の抗炎症作用機序について, 肉芽新生血管構築を中心に検討した。方法は, マウス背部皮下の空気嚢中に 0.1% クロトン油含有アジュバント (FCA) を投与して肉芽腫嚢を作製した。測定は肉芽腫嚢の湿重量, コラーゲン量, カルミン色素法による新生血管量および光顕的組織像を指標として, 経時的且つ定量的に観察した。その際, hydrocortisone (HC) および indomethacin (IM) を比較対照薬として, 各被検薬物を嚢内に 1 日 1 回, 3, 5 および 7 日間直接連続投与した。その結果, 正常マウスにおいては, Pro (2 mg/kg/day), HC (1 mg/kg/day) および IM (2 mg/kg/day) の各々毒性を発現しない最大有効量では, 経時的に増大する肉芽重量がいずれも有意に抑制された。肉芽組織中のコラーゲン量は, HC で実験期間中持続的に減少し, IM でも炎症初期に有意に減少したが, Pro では明らかな作用が認められなかった。新生血管量については, 両対照薬とも持続的な抑制作用を示し, Pro の効果は明らかではなかった。組織学的にみると両対照薬投与群の肉芽血管の増生は減少しており, Pro 投与群では, 肉芽新生血管の増生促進と引き続き起こる成熟結合組織構築による修復増強効果が見られた。一方, アロキサン糖尿病マウスの肉芽形成は, 正常マウスに比べて減少しており, HC はさらにその抑制作用を増強する傾向が現われるのに対し, Pro ではその効果が, 正常マウスで観察されるほど顕著ではなかった。また, 肉芽新生血管増生の指標として用いたカルミン色素量の肉芽重量に対する ratio を比較すると, Pro 投与群は対照群よりも肉芽単位重量当りの新生血管量を増大させることが明らかとなった。

緒 言

炎症は, 生体組織に何等かの侵襲により障害が生じたとき, 生体が再生・修復などの防衛反応に応じる現象である。この炎症過程は, 一般にⅠ期: 血漿滲出, Ⅱ期: 白血球遊走, Ⅲ期: 肉芽形成と段階を経て進行する。

急性滲出期炎症と呼ばれている一連の炎症反応では, 炎症局所における血管拡張, 血管壁の透過亢進, 白血球や大単核球細胞浸潤などが認められる。その進展に中心的な役割を果たす化学仲介因子 (chemical mediators) としては, Menkin 因子¹⁾をはじめヒスタミン, セロトニン, キニン類, 補体成分さらにプロスタグランジンなどがある。更に, 炎症反応が進展して, 炎症局所における血管新生がはじまると細胞 (主に線維芽細胞) の増殖とそれに伴う結合組織マトリックスの形成によって修復過程に移行する。

しかし, 慢性増殖型炎症が成立すると, 時には関節リウマチ, 肝硬変や肺線維症などの難治性疾患を生じる。この増殖型炎症の化学仲介因子として, 各種のリン

ホカイン, ケイロン, 線維芽細胞の分裂促進因子や結合組織活性因子などが報告されている²⁾。しかし, 滲出型炎症における化学仲介因子の研究に比べてその数は少ない。また, 増殖型炎症を特徴づけている炎症肉芽組織の形成では, 線維芽細胞によるコラーゲン合成が主な研究対象になっているが, それに先行して起こる肉芽血管新生が炎症組織構築のキーポイントになっている管である。従って, 増殖型炎症に対する薬物効果を考える上で, コラーゲン合成系および分解系の制御と同様に, 肉芽新生毛細血管の薬理学的検討こそ重要な課題であると考ええる。

増殖型炎症の実験的病態モデルとしては, 主にラットの皮下に作製された空気嚢内に起炎物質を注入して炎症を惹起させる方法が用いられている。起炎物質としてはクロトン油³⁾, アジュバント (FCA)⁴⁾, カルボキシメチルセルロース (CMC)⁵⁾, カラゲニン⁶⁾ および ABA-ACBCA⁷⁾ などがよく利用されている。一方, マウスを用いての慢性炎症病態モデルは, その作製が困難で体系的な研究は全くなかった。しかし, 最近 Kimura ら⁸⁾ によってクロトン油含有アジュバント (FCA) による肉芽腫嚢法が確立された。このマウスを用いたアジュバン

* ㊟930-01 富山市杉谷2630番地

ト肉芽腫囊法の利点は、1) マウスの肉芽腫囊が、ラットに比べてより単純な炎症組織形成過程をたどるため、複雑な肉芽新生血管の発生薬理学的研究に一層有利であること；2) マウスの体重が、ラットの約 1/10 程度であるので、より微量の被検薬物で評価判定が可能であること；3) 低廉のため例数が多くとれることから、統計学的解析の信頼性が高まること；4) マウスでは遺伝的に均一な系統が豊富であるため、その特性を活用し易いこと；5) 多数の自然発症病態マウスを育成し易い点から、ヒト疾患の病態モデルとして治療学的研究が可能であることなど多い。すなわち、増殖型炎症の病態モデルとしてマウスを用いる理由は、このためである。

ところで、肉芽新生血管は、糖尿病態下ではその増生が著しく抑制されることが見出されている⁹⁾。この場合に、insulin を投与すると増生阻害が回復する。これは insulin の血糖改善効果によることよりも、insulin の成長因子効果に強く依存しているものと考えられる。従って、肉芽の血管新生に対する薬物の作用を検討する上に、糖尿病態下で考察することは、増殖因子が低下している状態で検討できることを意味し、新知見が得られ易い利点がある。

そこで、本論文では、このマウス増殖型炎症モデルを用いて、肉芽重量および炎症肉芽組織中のコラーゲン量、カルミン法による血管量、さらに組織学的所見を指標として、理化学研究所で発見された *Streptomyces griseus* が産生する蛋白分解酵素 (科研 pronase)^{10~17)} の作用機序について新しい視点から検討することができた。その抗炎症作用様式については、ステロイド剤 (hydrocortisone) と非ステロイド剤 (indomethacin) を対照に比較し、正常およびアロキサン糖尿病態下で肉芽新生血管の増生およびその意義について考察した。

実験方法

1. 使用動物および飼育条件

8週齢の ICR 系雄性マウス (体重: 25~30 g, 日本クレア K.K.) を使用した。動物は、恒温 (23~25°C)、恒湿 (50~60%) および一定照明時間 (7:00 a.m. ~ 7:00 p.m.) の環境下で飼育し、固型飼料 (CE-2, 日本クレア K.K.) および給水瓶による飲料水を自由に摂取させた。また、アロキサン糖尿病マウスは、alloxan monohydrate (60 mg/kg) を尾静脈内に単回投与し作製した。

2. 被検薬物および実験材料

被検薬物として、pronase (Lot. No. PL274: 1320

×10⁴ PU/g, 科研製薬 K.K.) および hydrocortisone (和光純薬工業 K.K.) と indomethacin (住友化学工業 K.K.) を、実験材料として、Freund's complete adjuvant Kit, alloxan monohydrate, L-hydroxyproline (以上, Sigma), croton oil (純生化学工業 K.K.), carmine および組織染色用試薬 (Merck) を使用した。

3. マウスにおける adjuvant pouch の作製および被検薬物の投与条件

既報⁸⁾に準じておこなった。アロキサン糖尿病マウスを使用の場合には、実験開始 1 週間前に alloxan monohydrate を投与した。起炎物質注入 24 時間前に脱毛クリームでマウスの背部皮膚を露出し、70% アルコールで消毒後、背部皮下組織の正中線に 3 ml の空気を注入した。24 時間後にはほぼ楕円球状に隆起した空気嚢内に、0.1% croton oil を含有する adjuvant (FCA) 乳化液を 0.5 ml ずつ注入した。被検薬物の投与量は、adjuvant pouch 形成能に影響を及ぼさない、体重 10 g 当り 0.02 ml とした。まず最初に、被検薬物の用量依存性の抗炎症作用を検討するために、pronase 0.1, 1.0, 2.0 および 4.0 mg/kg, hydrocortisone 0.1, 0.5, 1.0 および 2.0 mg/kg, indomethacin 0.1, 1.0, 2.0 および 4.0 mg/kg の各 4 用量を 1 日 1 回空気嚢内に連続投与した。投与 7 日目に各群 10 匹ずつ屠殺し、空気嚢内の滲出液量および肉芽重量を測定して、生理食塩水 (n-saline) を投与した対照群に対する抑制率を算出した。次に、最大有効量に相当する pronase 2 mg/kg, hydrocortisone 1 mg/kg および indomethacin 2 mg/kg を 1 日 1 回空気嚢内に直接投与し投与 3, 5 および 7 日目に各群 10 匹ずつ屠殺して、空気嚢内の滲出液量および肉芽重量を生理食塩水処置対照群と比較し、それぞれの抑制率を算出した。さらに、摘出秤量された肉芽腫囊は、直ちに 10% 中性ホルマリン水溶液にて固定後、パラフィン切片を作製して、hematoxylin eosin (H.E.), periodic acid Schiffs (PAS), azocarmine aniline blue (AZAN) および aldehyde thionin などの染色を施して病理組織学的に検討した。

4. adjuvant 肉芽組織の hydroxyproline 量測定法

Woessner の方法¹⁸⁾を若干改変して、adjuvant 肉芽組織中に形成された hydroxyproline 量について検討した。それぞれ摘出秤量された肉芽組織を 6N-HCl 溶液に浸漬し、110°C, 18 時間加水分解後ろ過し、その 2 ml に 2N-NaOH 溶液 1 ml と蒸留水 2 ml を加えて、250 mg の活性炭を添加して、室温で 15 分間振盪後ろ過

した. hydroxyproline の酸化は, 0.005 M-chloramine T 緩衝液 0.5 ml, 3.15 M-perchloric acid 0.5 ml および 20% p-dimethylaminobenzaldehyde 0.5 ml を被検サンプル 1 ml に加えて, 60°C の温浴槽に 20 分間静置し冷却後, 分光光度計にて 557 nm の吸収を測定した.

本法で作成した検量線では, 2.5 μ g/ml 以下において吸光度と hydroxyproline 濃度との間に直接的な相関関係が認められた.

5. adjuvant 肉芽組織中の carmine 色素量測定法

心臓アンジオグラフィーのために開発された Okuhira ら¹⁹⁾の carmine 色素注入法を改良して, 肉芽新生血管の定量法を確立し既に報告した⁹⁾. エーテル麻酔下のマウスに温浴中で 37°~40°C の一定温度に保持された 5% gelatin 溶液に懸濁した 10% carmine 溶液をマウス当り 1 ml ずつ尾静脈に内注入した. 注入後, 仮死状態のマウスを 4°C 以下の冷室に数時間放置し, 肉芽新生血管内に分布した carmine 懸濁液を凝固させる. 肉芽腫囊内の滲出液を採取し, 肉芽組織を摘出秤量した後, フリーザーに保管して carmine 色素定量のための試料とした. carmine 色素の定量は, 冷凍保存試料を 10 ml 用尖底遠沈管に取り, 3 N-NaOH 5 ml を加えて室温下で 30 分間振盪消化させた後, 50°C 温浴中に 10 分間放置した. 再度, 室温にて 10 分間振盪し 2,500 rpm で 15 分間遠沈して, carmine 液層をさらに 0.45 μ m 膜孔サイズのミリポアフィルター (Filter type-MA, Millipore Co. Ltd.) で濾過した. 濾液は, 若干黄色

調を帯びるため, carmine 無処置肉芽組織を同様に処理して盲検試料とし, 日立分光光度計 191 E により 530 nm の吸光度を測定して検量線から carmine 量を算出した.

6. 統計処理

結果は 1 群 10 例の平均値とその標準誤差で示し, 群間の有意差検定を *t*-test により行った.

実験結果

1. adjuvant pouch に対する用量依存性肉芽抑制作用

0.1% croton oil を含有する Freund's complete adjuvant を起炎剤として作製された肉芽腫囊内に, pronase, hydrocortisone および indomethacin を直接投与し, 実験開始後 7 日目の滲出液量および肉芽重量に対する抑制率を求めた (表 1). その結果, いずれの被検薬物も, 滲出液量および肉芽重量共に用量依存性の抑制効果がみられ, 特に hydrocortisone 0.1~1.0 mg/kg/day は著しい抑制を示した. 一方, pronase は 0.1~2.0 mg/kg/day の用量範囲内で, 滲出液量よりもむしろ肉芽重量に対して低用量から有意な抑制作用を示し, indomethacin とほぼ同程度の抑制効果であった. pronase のさらに高用量 (4.0 mg/kg/day) では, 肉芽腫囊内に直接連続投与すると蛋白分解酵素が本来有する蛋白分解作用により, 肉芽腫囊が溶解壊死に陥り, 増殖型炎症過程に及ぼす抗炎症作用の判定が不能となる. ま

Table 1 Inhibitory effect of pronase and other anti-inflammatory drugs on adjuvant-induced exudation and granuloma tissue formation in mice

Drugs	Dose (mg/kg/d)	Pouch fluid ^{a)} (ml)	Pouch granuloma ^{a)} weight (g)
Control (0.5% Tween-20)	—	1.13 $\pm$ 0.06 ^{b)}	0.396 $\pm$ 0.025
Pronase	0.1	1.01 $\pm$ 0.06 (10.6) ^{c)}	0.329 $\pm$ 0.016* (16.9)
	1.0	0.93 $\pm$ 0.07 (17.7)	0.310 $\pm$ 0.015** (21.7)
	2.0	0.85 $\pm$ 0.09* (24.8)	0.290 $\pm$ 0.020** (26.8)
Indomethacin	0.1	0.96 $\pm$ 0.08 (15.0)	0.327 $\pm$ 0.020* (17.4)
	1.0	0.86 $\pm$ 0.07* (23.9)	0.298 $\pm$ 0.017** (24.7)
	2.0	0.79 $\pm$ 0.06** (30.1)	0.278 $\pm$ 0.018** (29.8)
Hydrocortisone	0.1	0.51 $\pm$ 0.05** (54.9)	0.237 $\pm$ 0.020** (40.2)
	0.5	0.31 $\pm$ 0.03** (72.6)	0.191 $\pm$ 0.010** (51.8)
	1.0	0.24 $\pm$ 0.02** (78.8)	0.115 $\pm$ 0.011** (71.0)

a) Volumes of pouch fluid and weights of pouch wall were measured on Day 7 after injection of adjuvant. b) Mean $\pm$ S.E. of ten mice, c) %Inhibition vs control. *P<0.05, **P<0.01, compared with control.

た, hydrocortisone の 2.0 mg/kg/day および indomethacin の 4.0 mg/kg/day の用量を同様に連続投与すると, 見掛上強い増殖型炎症抑制作用が発現する。しかし, 体重抑制も顕著であるので, 肉芽腫嚢内への直接連続投与による最大安全有効量は, pronase および indomethacin はそれぞれ 2.0 mg/kg/day, また hydrocortisone は 1.0 mg/kg/day 程度と推定した。

2. adjuvant pouch に対する経時的肉芽抑制作用

pronase (2.0 mg/kg/day), hydrocortisone (1.0 mg/kg/day) および indomethacin (2.0 mg/kg/day) の最大安全有効量を, 各々正常マウス肉芽腫嚢内に連続投与し, 滲出液量および肉芽重量を比較検討した (表2)。その結果, hydrocortisone は滲出液量および肉芽重量共に実験開始 3, 5 および 7 日目のいずれの時点においても, 対照群と比べて著しい抑制作用を示した。一方, pronase は炎症初期 (実験開始 3 日目) には有意な抑制作用がみられないが, 炎症中期 (実験開始 5 日目) 以降から中等度の有意な抑制効果がみられ, 7 日目の抑制率は indomethacin のそれとほぼ同程度の効力を示した。しかし, indomethacin は pronase の抑制作用の発現様式と異なり, むしろ炎症初期における抑制効果が特徴的であった。

3. adjuvant pouch 肉芽組織中の collagen 量に及ぼす影響

正常マウスの adjuvant pouch に対する pronase の

抑制作用は, 表1で示したように滲出液量よりもむしろ肉芽重量に対してより低用量から有意な効果を発揮したので, 肉芽組織中の collagen 量について比較検討した (表2)。その結果, hydrocortisone および indomethacin は共に, 肉芽重量と同時に hydroxyproline 含量に対して, 実験開始 3, 5 および 7 日目のいずれの時点においても, 対照群と比べて有意の抑制作用を示した。特に, hydrocortisone の抑制効果は顕著であった。一方, pronase は肉芽重量に対しては炎症中期以降から有意の抑制効果を示すが, hydroxyproline の含量については, いずれの時点においても有意な抑制効果を示さなかった。

4. 正常およびアロキサン糖尿病マウスの adjuvant pouch における肉芽形成および肉芽血管新生に及ぼす影響

pronase と hydrocortisone の作用を比較すると, collagen 合成に明らかな相違がみられたので, それに先行して起こると考えられる新生血管増生について carmine 色素法を用いて検討した (図1)。その結果, hydrocortisone と indomethacin は, 肉芽重量および血管量とも対照群と比べ有意の抑制作用を示した。しかし, indomethacin の作用は炎症初期に目立ち, hydrocortisone では炎症過程のいずれの時点においても常に顕著な抑制効果が認められた。一方, pronase は, 肉芽重量においては炎症初期よりもむしろ炎症中期

Table 2 Inhibitory effect of pronase and other anti-inflammatory drugs on adjuvant-induced exudation, granulation tissue formation and hydroxyproline content in normal mice

Drugs ^{a)}	Day	Pouch fluid (ml)	Pouch granuloma weight (g)	Hydroxyproline (μg)
Control (0.5% Tween-20)	3	0.35±0.02 ^{b)}	0.328±0.020	327±16
	5	0.81±0.04	0.396±0.026	416±28
	7	1.17±0.08	0.438±0.025	627±38
Pronase (2 mg/kg/d)	3	0.32±0.02 (8.6) ^{c)}	0.276±0.030 (15.9)	291±22 (11.0)
	5	0.64±0.05* (21.0)	0.306±0.027* (22.7)	440±40 (0.0)
	7	0.87±0.08* (25.6)	0.338±0.014** (22.8)	533±40 (15.0)
Indomethacin (2 mg/kg/d)	3	0.26±0.02** (25.7)	0.262±0.011** (20.1)	265±21* (19.0)
	5	0.58±0.04** (28.4)	0.270±0.021** (31.8)	318±22* (23.6)
	7	0.85±0.08* (27.4)	0.330±0.030* (24.7)	416±45* (26.5)
Hydrocortisone (1 mg/kg/d)	3	0.23±0.02** (34.3)	0.164±0.020** (50.0)	213±25** (34.9)
	5	0.31±0.02** (61.7)	0.176±0.023** (55.6)	256±30** (38.5)
	7	0.31±0.02** (73.5)	0.218±0.022** (50.2)	349±40** (44.3)

a) Drugs were repeatedly injected into the pouch. b) Mean±S.E. of ten mice, c) %Inhibition vs control. *P<0.05, **P<0.01, compared with control.

Fig. 1 Effect of pronase and other anti-inflammatory drugs on pouch weight and carmine content in normal and diabetic mice. Drugs were daily injected into the adjuvant pouch, and their effects were assayed on Day 3 (▨), Day 5 (▧), and Day 7 (□). Each bar shows the mean±S.E. of ten mice. * $P<0.05$, ** $P<0.01$, compared with control on each day.

以降に抑制効果がみられたが、血管量は対照群との間に有意差が認められなかった。

さらに、アロキサン糖尿病マウスにおける肉芽組織中の血管量を正常マウスと同様に比較検討した(図1)。アロキサン糖尿病マウスでは、一般に正常マウスに比べて肉芽形成の低下がみられる。hydrocortisoneはその肉芽重量および血管量の抑制をさらに有意に強めるのに対して、pronaseは血管量および肉芽重量共に殆ど抑制作用を示さなかった。正常マウスで明らかに見られた肉芽重量に対する抑制効果も、わずかに7日目に有意差が認められたにすぎなかった。

この点を対照群に対する抑制率で比較すると(図2)、正常マウスに比べてアロキサン糖尿病マウスでは、hydrocortisoneはより一層強い抑制効果を示し、indomethacinは炎症初期に若干増強傾向が見られた。一方、pronaseはいずれの時点においても抑制率が減少した。その故、pronaseは糖尿病態によって低下した

炎症過程に対しては見掛上脱抑制化しているようにみられる。また、肉芽単位重量当りの血管量の比率を比較すると(図3)、正常およびアロキサン糖尿病マウス共に、対照群と比べhydrocortisoneおよびindomethacinは、いずれの時点においても低下傾向を示し、特にhydrocortisoneで顕著であった。しかし、対照的にpronaseはその比率を増大し、特にアロキサン糖尿病マウスでは、実験開始5日目においてその効果が強く認められた。以上の結果は、hydrocortisoneおよびindomethacinとpronaseとの作用様式に違いがあることを窺わせた。

5. adjuvant pouch における肉芽組織の形態学的変化に及ぼす影響

肉芽単位重量当りの血管量比でみると、pronaseは肉芽新生血管の増生を促進する結果となったので、この点を裏付けるために実験開始5日目の肉芽組織像を比較検討した(図4)。薬物無処置の対照群では、内層に多

Fig. 2 Time course of inhibitory effect of pronase and other anti-inflammatory drugs on pouch weight in normal and diabetic mice. Hydrocortisone (1 mg/kg: ●), indomethacin (2 mg/kg: ▲) and pronase (2 mg/kg: ■) were daily injected into the adjuvant pouch. The percentages of inhibition were calculated by measuring granuloma weight, compared with that in control mice. Each point represents the mean $\pm$ S.E. of ten mice.

Fig. 3 Time course of relative carmine content in normal and diabetic mice. Hydrocortisone (1 mg/kg: ●), indomethacin (2 mg/kg: ▲), pronase (2 mg/kg: ■) and control (0.5% tween-20: ○). The relative carmine content is expressed as mg of carmine per gram of granulation tissue. Each point represents the mean $\pm$ S.E. of ten mice. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, compared with control.

核白血球を主体とする凝固壊死巣が、中層には炎症細胞を混じた変性線維の占有化が、外層には粗い結合繊維線維が增生しはじめて、この領域にのみ新生血管の走行が認められた(図4A)。これに対して pronase 投与群では、肉芽組織は密に配列した膠原線維が主体を占め、新生血管は外層から内層に向けて縦にも增生し、広く分布している(図4B)。一方、indomethacin 投与群では、中層から外層にかけて炎症細胞を織り込むように変性線維が不規則に配列するものの、新生血管の增生は弱く、

肉芽組織の肥厚性も抑制されている(図4C)。さらに、hydrocortisone 投与群は肉芽組織の構築が著しく希薄で、炎症反応も肉芽毛細血管の新生も殆ど認められなかった(図4D)。

次に、実験開始3、5および7日目の組織学的所見を経時的に総括して表3に示す。3日目の対照群には、内層が中等度の液化壊死に陥り、中層から外層にかけて強い出血性浮腫を伴う好中球および多核白血球を主体とした炎症細胞の浸潤像が認められた。5日目になると内層

Fig. 4 Adjuvant pouch granuloma in normal mice on Day 5 after injection of Freund's complete adjuvant with croton oil. A: control (0.5% Tween-20), B: pronase-treated, C: indomethacin-treated and D: hydrocortisone-treated. Note: the superficial zone (a), middle layer (b) and outer layer. Newly arising capillary vessels are denoted by arrows. H.E. stain $\times 100$.

Table 3 Effects of pronase (Pro), indomethacin (IM), and hydrocortisone (HC) on pathohistological changes in mouse granuloma pouch induced by adjuvant with croton oil

Histological findings	Days		3				5				7			
	Drugs and Doses (mg/kg/d)		Cont	Pro	IM	HC	Cont	Pro	IM	HC	Cont	Pro	IM	HC
			(2)	(2)	(1)		(2)	(2)	(1)		(2)	(2)	(1)	
Liquefaction necrosis			+	±	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Coagulation necrosis			—	—	±	+	+++	±	±	±	++	±	±	—
Hemorrhagic change			++	+	±	—	+	—	—	—	±	—	—	—
Edematous change			++	+	—	—	+	—	—	—	±	—	—	—
Polymorphs infiltration			+	±	±	±	+++	±	+	±	++	±	±	—
Neutrophil infiltration			+	±	+	±	++	±	±	±	+	±	±	—
Lymphocyte infiltration			±	+	+	±	+	+	+	±	++	±	+	+
Histocyte infiltration			±	±	±	±	±	+	+	+	+	±	+	++
Fibroblast proliferation			±	+	±	±	++	+	+	±	++	±	+	—
Vascularization			—	±	—	—	+	++	±	±	++	+	±	—
Increase in collagen fibers			—	—	—	—	+	+	±	±	++	+	±	—
Collagen fiber undulation			—	—	—	—	+	±	±	±	++	±	+	±
Connective tissue formation			±	±	—	—	±	+	±	±	+	++	+	±

A relative scale: (—) no pathohistological change, (±) slight change, (+) overt change, (++) severe change, and (+++) very strong change.

の強い多核白血球浸潤による凝固壊死化と、中層の好中球、リンパ球、組織球および線維芽細胞を内包した網目状の変性線維化に加えて、外層には新生血管を伴った粗い結合組織の増生が認められた。7日目に至ると内層の凝固壊死化も減弱傾向に移行し、中層から外層にかけて好中球、組織球および線維芽細胞を混じた細網線維と膨化膠原線維による変性結合組織形成が見られた。

indomethacin および hydrocortisone 投与群では、3日目の内層は脆弱な凝固壊死で被包され、中層から外層にかけて出血性浮腫化や炎症細胞浸潤が殆ど認められなかった。5日目においても内層の凝固壊死は軽度で、特に hydrocortisone では中層から外層にかけて炎症細胞浸潤、血管新生および膠原線維増生も微弱であった。7日目になると、indomethacin では内層から外層にかけて膨化膠原線維の増生が強まり、hydrocortisone では血管新生の抑制により膠原線維の増生は軽度であった。

これに対して pronase 投与群では、3日目に内層の軽度な液化壊死と中層の出血性浮腫がみられたが、リンパ球および線維芽細胞の増殖が目立ち、外層には軽度ながら血管新生が認められた。5日目では、内層に凝固壊死が強まり、外層から中層にかけて著しい血管新生により、リンパ球、組織球および線維芽細胞を混じた膠原線維の増生が認められ、indomethacin および hydrocortisone 投与群と非常に対照的な様相を示した。そして7日目に至ると新生血管の増生により、内層から外層にかけて膠原線維が密に配列し、しかも規則正しく走行して成熟結合組織の構築が認められた。

考 察

pronase を含む蛋白分解酵素剤の抗炎症作用機序については、1) 吸収された酵素自体が炎症巣の血管を閉塞する fibrin や組織変性蛋白を分解して、炎症滲出液の吸収を容易にし炎症部位を正常化する作用^{23,21)}、2) 炎症局所に生成した起炎症 peptides または kinin 類を不活化する作用^{22,23)}、3) plasminogen を活性化して plasmin による fibrin 溶解を高める作用²⁴⁾、4) protease inhibitor の生成と連関した間接的な抗炎症作用機序^{25,26)}などが提唱されている。pronase の抗炎症作用については、これらのいずれの作用機序にも関係する可能性が考えられるが、本研究ではこれらの機序とは別に新生血管形成に焦点を絞り、増殖型炎症に対する pronase の抗炎症作用機序を検討した。

その際、広範囲の炎症反応過程を抑制し滲出型炎症の

みならず、増殖型炎症にも強力な抗炎症作用をもつステロイド剤^{27~29)}や、一般的には滲出型炎症に有効で増殖型炎症に対しては効果が弱いと云われている非ステロイド剤^{30,31)}との比較検討により、その特徴を明らかにしようとした。すなわち、ステロイド剤は非コラーゲン蛋白の生合成よりもはるかに顕著にコラーゲン生合成を阻害する³²⁾。しかも、組織の DNA 合成も強く且つ持続的に抑制して、コラーゲン合成細胞である線維芽細胞の増殖を抑制するという³³⁾。本研究でも hydrocortisone は、増殖型炎症のいずれの時期においても hydroxyproline の含量を強く抑制した。しかし、pronase の作用はそれと異なり、炎症中期から肉芽重量を抑制するにもかかわらず、hydroxyproline 含量の有意な抑制は見られなかった。従って、コラーゲン生合成には直接的な影響を与えることなく、むしろそれに先立つ線維芽細胞の増殖に影響すると考えられる。さらに、線維芽細胞の増殖は新生血管の存続に十分影響されていることから、新生血管の関与する可能性も考えられた。

そこで、肉芽組織内新生血管に対する pronase の影響に検討を加えた。本研究で用いた毛細血管定量法は、簡便でしかも糖尿病態では特に感度よく測定できることを既に報告している³¹⁾。この方法によると、pronase の毛細血管に及ぼす作用の特徴は、肉芽重量を減少させるにもかかわらず総血管量には顕著な影響を及ぼさず、従って肉芽単位重量当りの血管量の比率では、むしろ対照群よりも増大させることがわかった。これは、ステロイド剤および非ステロイド剤にはみられない特徴である。また、組織学的検討からもこのことは裏付けられた。ステロイド剤が肉芽形成を著しく抑制して、希薄且つ脆弱な組織を構築するのに対して、pronase は炎症局所の破壊組織由来の変性蛋白や変性コラーゲン、fibrinなどを分解・吸収させて、また毛細血管の増生をも促進する結果、コラーゲン線維の正常な走行や密な配列をもたらし、成熟結合組織の構築を早めて修復過程の亢進を促すものと思われる。この点、ステロイド剤では炎症初期から血管新生を強く抑制して肉芽組織構築を脆弱化するため、投与を停止するとリバウンド現象が起り、炎症が悪化するという問題^{3,34)}には pronase の方が有利であろう。

この pronase の効果は、肉芽および血管形成が抑制された糖尿病マウスにおいて一層顕著に現われた。既に、糖尿病態時（アロキサン糖尿病ラット）の炎症反応について、副腎皮質の肥大化および機能亢進、血中 ACTH および corticosterone 濃度の上昇、肉芽組織

形成の著しい抑制などが報告されている³⁵⁻⁴³⁾。また、肉芽組織形成が著しく抑制された糖尿病ラットに insulin を処置すると、副腎皮質機能の亢進を抑制し、cortico-sterone の血中濃度が低下するのに伴って、肉芽形成が正常な状態に回復するという^{36,39,42,43)}。既に我々もアロキサン糖尿病マウスのアジュバント嚢内に insulin を投与すると、血糖値を変化させることなく、肉芽新生血管のあることを見出している⁹⁾。このことは insulin の効果が糖尿病疾患に用いられる糖代謝改善作用とは別に、細胞増殖機能を高める成長因子作用によることを意味する。従って、insulin が糖尿病態によって誘発される細血管異常症における内皮細胞機能を正常化させ⁴⁴⁾、血管内皮細胞のプロスタグランジン (PGI₂) 産生能を回復させること⁴⁵⁾とも深い関連性を持つものと思われる。そう考えると、insulin が血管新生を促進する生理的意義は、肉芽組織内に導かれた血液が一定の役割を果たすと、線維芽細胞由来のコラーゲンを血小板レセプターが受けとめて、凝集過程を経て血管を退縮させて炎症を終らせることにあると推測される。

本研究では、糖尿病態によって低下した肉芽形成に対し、ステロイド剤はそれを増強する傾向を示したのに対して、pronase は血管量のみならず肉芽重量の抑制効果をも減弱する傾向を示した。これまでウサギによる in vivo 実験⁴⁶⁾で、pronase の血糖下降作用が見出されたのをはじめ、ラット副睾丸脂肪組織によるグルコース摂取効果⁴⁷⁾、マウス横隔膜のグルコース合成効果⁴⁸⁾が見出されている。しかし、これらの pronase によるインスリン様活性が蛋白分解酵素活性に依存しないことも証明されている⁴⁸⁾。さらに、インスリン様活性分画は精製され、その本体がかなり明らかになりつつある⁴⁹⁾。従って、pronase 投与による肉芽形成促進効果は、本研究の結果からは pronase 成分中のインスリン様活性によって新生血管を増生亢進するものと結論できよう。

文 献

- Menkin, V.: J. Exp. Med. **67**, 129 (1983)
- Caster, C.W.: Handbook of Inflammation, Edited by Glynn, E.D., vol. 3, p. 177, Elsevier/North-Holland Biochemical Press, Amsterdam (1981)
- Selye, H.: Exp. Biol. Med. **82**, 323 (1953)
- Bodalk, G.R.: Arch. Int. Pharmacodyn. Ther. **166**, 466 (1967)
- Ishibashi, H., Mori, Y. and Tsurufuji, S.: Eur. J. Pharmacol. **7**, 201 (1969)
- Fukuhara, M. and Tsurufuji, S.: Biochem. Pharmacol. **18**, 475 (1969)
- Ohuchi, K., Yoshino, S., Tsurufuji, S. and Levine, L.: Int. Arch. Allergy Appl. Immunol. **68**, 326 (1982)
- Kimura, M., Suzuki, J. and Amemiya, K.: J. Pharmacobiodyn. **8**, 393 (1985)
- Kimura, M., Amemiya, K., Yamada, T. and Suzuki, J.: J. Pharmacobiodyn. **9**, 441 (1986)
- Nomoto, M. and Narahashi, Y.: Rept. Inst. Phys. Chem. Res. **34**, 381 (1958)
- Nomoto, M. and Narahashi, Y.: J. Biochem. **46**, 653 (1959)
- Nomoto, M. and Narahashi, Y.: J. Biochem. **46**, 839 (1959)
- Nomoto, M. and Narahashi, Y.: J. Biochem. **46**, 1481 (1959)
- Nomoto, M. and Narahashi, Y.: J. Biochem. **46**, 1654 (1959)
- Nomoto, M. and Narahashi, Y.: J. Biochem. **48**, 453 (1960)
- Nomoto, M. and Narahashi, Y.: J. Biochem. **48**, 593 (1960)
- Nomoto, M. and Narahashi, Y.: J. Biochem. **48**, 906 (1960)
- Woessner, J.F.: Arch. Biochem. Biophys. **93**, 440 (1961)
- Okuhira, M., Sasaki, K. and Naka, H.: J. Med. Technol. **21**, 359 (1977)
- Innerfield, I., Angrist, A. and Schwarz, A.: J. Am. Med. Assoc. **152**, 597 (1953)
- Martin, G.R.: Ann. N.Y. Acad. Sci. **68**, 70 (1956)
- Innerfield, I. and Fernando Luongo: Proc. Soc. Exp. Biol. Med. **113**, 456 (1963)
- Innerfield, I., Bundy, R.E. and Hockenberg, R.: Proc. Soc. Exp. Biol. Med. **112**, 295 (1963)
- Hahim, A.A., Dailey, J.P. and Lesh, J.B.: Proceedings of International Symposium on Non-steroidal Anti-inflammatory Drugs (Milano), Edited by Garattini, S. and Dukes, M.N.G., p.265, Excerpta Medica, Amsterdam (1964)
- Hladovec, J., Mansfeld, V. and Horakova, Z.: Experientia **14**, 146 (1968)
- Nakagawa, H., Shuto, K., Isaja, M., Watanabe, K. and Tsurufuji, S.: J. Pharmacobiodyn. **4**, 429 (1981)
- Bangham, A.D.: Br. J. Exp. Pathol. **32**, 77 (1951)
- Melby, J.C.: Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. **17**, 511 (1977)
- Kulonen, E. and Potia, M.: Biochem. Pharmacol. **24**, 1617 (1978)
- Tsurufuji, S., Sato, H., Min, K.R. and Ohuchi, K.: J. Pharmacobiodyn. **1**, 8 (1978)
- Tsurufuji, S.: Drug Exp. Res. **5**, 79 (1979)

- 32) Nakagawa, H., Fukuhara, M. and Tsurufuji, S.: *Biochem. Pharmacol.* **20**, 2253 (1971)
- 33) Ohno, T., Ishibashi, S. and Tsurufuji, S.: *Biochem. Pharmacol.* **21**, 1057 (1972)
- 34) Shin, K.H., Nakagawa, H. and Tsurufuji, S.: *Biochem. Pharmacol.* **23**, 381 (1974)
- 35) Adamkiewicz, V.W. and Adamkiewicz, L.M.: *Am. J. Physiol.* **197**, 377 (1959)
- 36) Sheldon, W.H. and Bauer, H.: *J. Exp. Med.* **112**, 1059 (1960)
- 37) Saba, G.C. and Hoet, J.J.: *Acta Endocrinol.* **40**, 349 (1962)
- 38) Nagy, S., Redei, A. and Karady, S.: *J. Endocrinol.* **22**, 143 (1963)
- 39) Devecerski, M.S. and Frawley, T.F.: *Endocrinology* **73**, 386 (1963)
- 40) Kraus, S.D.: *Acta Endocrinol.* **47**, 149 (1964)
- 41) Kraus, S.D.: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **143**, 460 (1973)
- 42) Field, J.B.: *Endocrinology* **56**, 499 (1955)
- 43) Kraus, S.D.: *Acta Endocrinol.* **54**, 328 (1967)
- 44) Østerby, R., Gudersén, H.J.G. and Christensen, N.J.: *Diabetes* **27**, 745 (1978)
- 45) Harrison, H.E., Reece, A.H. and Johnson, M.: *Diabetologia* **18**, 65 (1980)
- 46) Hayashi, S., Ueki, H., Hamamura, K. and Tsukada, M.: *Chem. Pharm. Bull.* **12**, 1393 (1964)
- 47) Kuo, J.F., HolmLund, C.E., Dill, L.K. and Bohonos, N.: *Arch. Biochem. Biophys.* **117**, 269 (1966)
- 48) Kubota, Y., Ueki, H. and Shoji, S.: *J. Biochem.* **72**, 235 (1972)
- 49) Ueki, H., Nakata, H., Funakoshi, T., Shoji, S. and Kubota, Y.: *Chem. Pharm. Bull.* **27**, 2959 (1979)

Abstract—Mechanism of action of pronase on chronic proliferative inflammation including granuloma angiogenesis in mice. Kouji AMEMIYA, Jun SUZUKI and Masayasu KIMURA (Department of Chemical Pharmacology, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Toyama Medical and Pharmaceutical University, 2630 Sugitani, Toyama 930-01, Japan). *Folia pharmacol. japon.* **88**, 279~288 (1986)

Effects of pronase on granuloma angiogenesis and granulation tissue formation were investigated using granuloma pouches induced by Freund's complete adjuvant containing 0.1% croton oil in normal and alloxan diabetic mice. Granuloma angiogenesis was measured by the carmine dye infusion method. Pronase (2 mg/kg/day) was daily injected into the pouch for 3 to 7 days, and its effects were compared with those of hydrocortisone (1 mg/kg/day) and indomethacin (2 mg/kg/day). Pronase significantly inhibited the wet weight of pouch granuloma, mainly in the later stage of inflammation in normal mice. But it failed to decrease both the content of hydroxyproline in granuloma and the amount of carmine dye infused into the newly developed capillaries, whereas hydrocortisone and indomethacin significantly decreased them. In pathohistological findings, pronase increased angiogenesis and subsequently enhanced the repair rate by a dense arrangement of mature connective tissue, although hydrocortisone and indomethacin markedly decreased angiogenesis. In alloxan diabetic mice, granulation tissue was significantly produced less than that in normal mice. Hydrocortisone potentiated the decrease in granulation tissue formation of diabetic mice, whereas pronase did not markedly affect on it. The ratios of the amount of capillaries to the wet weight of granuloma tissue in pronase-treated mice were higher than those of control mice. Pronase was concluded to enhance angiogenesis in granuloma tissue in addition to the activation of collagenolysis and proteolysis.