気管気管支分泌液の蛋白分解酵素に関する研究

第4報 蛋白分解酵素の気管内投与によるラット分泌液中 Inhibitor の出現

*小杉 忠誠, 松尾 理, 美原 恒

森満 保 *浜谷 松夫

A Study on Protease in Tracheobronchial Secretion

4. The Occurrence of Protease Inhibitor in Tracheobronchial Secretion of Rats after the Infusion of Proteases into the Bronchus

Tadayoshi Kosugi, M.D., Osamu Matsuo, M.D. and Hisashi Mihara, M.D.

Department of Physiology, Miyazaki Medical College, Miyazaki

Tamotsu Morimitsu, M.D.

Department of Otorhinolaryngology, Miyazaki Medical College, Miyazaki

Matsuo Hamaya, M.D.

Department of Otorhinolaryngology, Saitama Medical College, Saitama

In previous papers, we reported that the plasminogen activator existed in the tracheobronchial secretion of normal rats, but the activities that inhibit urokinase, papain and trypsin were not found. On the other hand, it has been reported that a protease inhibitor with low molecular weight was found in the nasal secretion and tracheobronchial secretion of humans with acute inflammation of the respiratory tract. Hochstrasser et al. suggested that the protease inhibitor with low molecular weight originated from the plasma inter- α -trypsin inhibitor and a trypsin-like enzyme in the inflammatory locus might play an important role in the production of this inhibitor. In order to examine the occurrence of protease inhibitor in the tracheobronchial secretion of rats, some proteases were infused into the tracheobronchus and the inhibitory activity on proteases was detected in the secretion.

The results obtained were as follows:

- 1) The occurrence of inhibitory activity on urokinase, plasmin and trypsin was not found.
- 2) The occurrence of inhibitory activity on papain was evident.

From the results obtained, it was concluded that the inhibitor against papain (SH-protease) was induced by the infusion of papain.

緒 言

気道とくに下気道の急性炎症においては、気

道分泌液中に蛋白分解酵素の出現あるいはその活性上昇がみられるとの報告がなされている¹⁾²⁾, しかしながら、この蛋白分解酵素の形態については、現在までのところ詳細は不明で

* 宮崎医科大学生理学第II講座

** 宮崎医科大学耳鼻咽喉科

*** 埼玉医科大学耳鼻咽喉科

あるが, trypsin-like enzyme が有力視されている。一方, 生体においては protease-antiprotease 系ともいうべき, 生体の防御機構が存在している。すなわち炎症の発症, 進展には, 炎症局所あるいは体液のこれらの系のうち相対的に蛋白分解酵素が上昇し, antiprotease 活性 (inhibitor) が減少する^{3), 4)}。炎症の発現防止あるいは終息には, 逆に相対的に inhibitor 上昇が予想されている。Hochstrasser らの研究では, 体液中に acid stable trypsin inhibitor が存在し, この inhibitor は血中由来の inhibitor (inter- α -trypsin inhibitor) で局所において trypsin-like enzyme により低分子化されたものであることが示されている。さらに, この inhibitor の阻害特異性は, trypsin のみではなく plasmin, chymotrypsin などに対してもみられるとの結果を報告している⁵⁾。このような結果は, 血液中に存在する蛋白分解酵素は血中の各種の生理的蛋白分解酵素阻害物質 (α_2 -macroglobulin, α_1 -antitrypsin, CI inactivator, α_2 PI など) にて, 2 重, 3 重に阻害されている⁶⁾ のとは対称的な現象である。すなわち, 血管外での炎症反応により, 蛋白分解酵素活性が局所にて上昇すると, 一種類の inhibitor にても多価の inhibitor として作用する可能性がある。このような現象は, 生体における炎症反応の制御, 統御には誠に能率のよいものといえる。しかしながら, このような結果は試験管内実験から得られたもの

であり, 生体内で起こり得るのかは明らかにされていない。そこで, 我々は気道炎症での気管気管支分泌液中の蛋白分解酵素活性の上昇を想定し, 各種の蛋白分解酵素を気管気管支内に投与し, 採取した分泌液中に inhibitor が出現するか否かを検討した。

実験方法

①実験動物

Wistar 系ラット体重 400-600 g の雄を使用した。

②蛋白分解酵素の注入と分泌液の採取方法

ウレタン麻酔下にラットの気管切開を施行し, 気管切開口部より polyethylene tube を挿入した。ついで automatic infusion pump (アトム社製) を気管内 tube に連結し, M/15 phosphate-buffer (pH 6.8) に溶解した各種蛋白分解酵素を気管内に注入すると同時に他方の tube より吸引し分泌液を採取した。

③試薬

Trypsin: Worthington Biochemical 社製 lyophilized trypsin (238U/mg) を用いた。

Papain: 和光純薬工業製の digestive powder (1:350) を用いた。

Urokinase (UK): 持田製薬製 Uronase (6,000u) を用いた。

Plasmin: ラット血液より Plasminogen を分

Fig. 1 Plasminogen の単離 (lysine sepharose affinity chromatography による分離, plasminogen rich fibrin plate を用いての活性測定)

離精製し、この分画に UK を加えて plasmin を作成した。その作成方法と精製過程は実験結果の項に述べる。

Lysine-Sepharose: 第一化学薬品製を用いた。

④分泌液中の蛋白分解酵素活性の測定

Trypsin (0.1mg/ml), Papain (10mg/ml), Plasmin (4.5casein units/ml), UK (20u/ml) を気管内に注入し、採取後の分泌液を Astrup & Müllertz⁵⁾ の方法に準じて作製した plasminogen rich fibrin plate に滴下し、37°C, 18-20時間 incubate 後、その溶解窓面積を測定した。注入した各種蛋白分解酵素活性に対する採取後の分泌液中蛋白分解酵素との相対的变化を調べた。

実験結果

1) ラット plasminogen の精製と plasmin の作製 (図1)

正常ラットより採取した血漿 (3.8 %クエン酸加) を集め、これを出発材料とした。Deutsch & Mertz⁷⁾, Matsuda ら⁸⁾の方法に準じて、得られた血漿を用いて lysine-sepharose affinity chromatography を行った。非吸着部分を採取後、吸着部分の溶出をまず 0.005M phosphate buffer-1.0M NaCl (pH 7.5) にて plasminogen

activator 部分を溶出し、その後 0.1M CH₃COOH にて溶出した。この 0.1M CH₃COOH にて溶出する部分を集め、蒸留水にて十分に透析し、その後凍結乾燥し plasminogen を作製した。この plasminogen を M/15 phosphate-buffer (pH 6.8) に溶解し、UK (60u/ml) 0.1ml にて 37°C, 30分 incubate し、plasmin を作製した。この plasmin を plasminogen free fibrin plate にて溶解面積を測定したところ、201.5mm² であり plasmin の標準曲線からの換算にては 4.5 casein unit/ml であった⁹⁾。この plasmin 標品を用いて以下の実験を行った。

実験結果 (図2)

1) Urokinase 注入群

UK (20u/ml) を注入した群では、注入後採取した分泌液の活性は、注入前の活性に比して減少率は 4.5±10% (Mean±standard deviation, M.±S.D.) であった。すなわち、UK 注入後、UK に対する阻害活性の出現は認められなかった。

2) Plasmin 注入群

Plasmin (4.5 casein u/ml) を注入した群では、注入後採取した活性は、注入前の活性に比して減少率は 4.7±15.5% (M.±S.D.) であった。すなわち、plasmin 溶液の気管気管支内 infusion では、plasmin に対する阻害活性は分泌液中に認められなかった。

3) Trypsin 注入群

Trypsin (0.1mg/ml) を注入した群では、注入後採取した分泌液の活性は、注入前の活性に比して減少率は 7.5±11.4% (M.±S.D.) であった。すなわち、trypsin 溶液の気管気管支内 infusion では trypsin に対する阻害活性の出現は認められなかった。

4) Papain 注入群

Papain (10mg/ml) を注入した群では、注入後採取した分泌液の活性は、注入前の活性に比して減少率は 60.1±21.7% (M.±S.D.) であった。すなわち、papain 溶液の気管気管支内 infusion では papain に対する阻害活性の出現が認められた。

Fig. 2 分泌液中の抑制活性

総括と考按

非炎症（正常）ラットの分泌液を採取し、試験管内にて各種蛋白分解酵素と反応させた後の分泌液中には、これら蛋白分解酵素を抑制する結果は認められない事実を既に報告した。すなわち、正常ラットの分泌液中には、fibrin を基質としての測定では inhibitor の存在は認められないという結果を報告した¹⁰⁾。一方、本実験ではラットの気管内に各種蛋白分解酵素を infusion pump を用いて注入し、注入後得られた分泌液中に蛋白分解酵素に対する抑制活性の出現がみられるか否かを検討したが、papain に対してのみ分泌液中に抑制活性が認められた。しかしながら、plasminogen activator である UK さらには plasmin, trypsin に対しては、ほとんど抑制活性の出現は認められなかった。Papain (SH-protease) に対する抑制物質としては、SH-protease inhibitor が知られているが、これらは組織中に存在しているとの報告がなされている。とくにアルサス型炎症においては、この inhibitor の出現が知られている¹¹⁾。今回、我々の実験にて認められた papain に対する抑制活性が、上記の文献にみられる inhibitor と同一のものであるのかは今後さらに同定実験が必要であろう。それでは、この papain に対する抑制物質の分泌液中への発現機序はどのようなものであるのかを以下に考察を試みた。第一には、この papain に対する inhibitor の由来が問題となる。血液成分の漏出により血液中 inhibitor の出現、漏出した血液成分の proinhibitor に対する papain による proteolytic modification の結果としての inhibitor の出現、さらには気管気管支壁を構成している細胞中に存在する inhibitor の papain による分泌液中への誘導などが考慮されなければならない。今回我々が実験に用いた papain は、thiol proteinase の一つであり蛋白質構造の中に sulfhydryl group を有している¹²⁾。これらの蛋白分解酵素に対する阻害物質としては、炎症反応にみられる中性 SH protease inhibitor がとくに知られている。すなわち、組織由来の拮抗因子が知られており、炎症の治癒局所組織の euglobulin 分画にみられる中性 SH protease inhibitor が代表的なものである。この拮抗物質は、ウサギ皮膚から得られたもので分子量は 10,000 であり、papain

に対して抑制活性を有するが trypsin, chymotrypsin, plasmin に対しては抑制活性を有していない^{13), 14), 15), 16)}。一方、血清由来の拮抗物質としては、ウサギ血清からのものが同定されている。すなわち、この血清由来の拮抗物質は多量の糖を含む糖タンパク質であり、中性 SH-protease, papain を抑制するが trypsin, chymotrypsin を抑制しないことが知られている¹⁷⁾。以上文献的には、ウサギの炎症治癒局所、および血清中に papain に対する抑制物質の存在することが知られている。しかしながら本実験の結果から、ラットにおいて血液および気管気管支壁の構成細胞中に存在している可能性が示唆された。一方、ヒト血液中には各種の蛋白分解酵素阻害物質が存在しており、その内 α_2 -macroglobulin は endopeptidase と結合することにより、高分子量の基質を用いた測定法では、それらの蛋白分解酵素の活性を抑制する作用を有している。Thiol proteinase の papain も endopeptidase であり、 α_2 -macroglobulin との結合により¹⁸⁾、その抑制活性が出現した可能性も考えられる。すなわち、気管気管支壁の血管より α_2 -macroglobulin が浸出し、これと papain との結合により papain の抑制が生じた可能性も考慮しなければならない。とくにラット、犬の α_2 -globulin はヒトの α_2 -macroglobulin と蛋白化学的に非常に似ていることがすでに報告されており^{19), 20)}、この可能性も充分に考えられる。しかしながら、もしこのような α_2 -macroglobulin の分泌液内浸出が生じているならば、他の endopeptidase すなわち serine protease である plasmin, trypsin に対しても papain と同様に抑制活性の出現が認められるはずである。本実験では papain に対してのみ抑制活性の出現が認められた結果から、各種蛋白分解酵素の infusion により分泌液中に出現する inhibitor は polyvalent な inhibitor ではなく、thiol proteinase inhibitor である可能性が強く示唆された。今後 papain に対する分泌液中の inhibitor の本態についての追求を課題としたい。

結 論

1) 各種蛋白分解酵素の気管内投与後、採取した分泌液中の蛋白分解酵素に対する抑制活性

を検討した。

2) UK, plasmin, trypsin の投与にては, 分泌液中にこれらに対する抑制活性の出現は認められなかった。しかしながら papain の投与にては, 分泌液中に papain に対する抑制活性の出現が認められた。

謝辞: 本研究の一部は文部省科学研究費(457424)の補助を受けた。

文 献

- 1) Reichert, R. & Hochstrasser, K.: Veränderungen des Proteaseninhibitorenspiegels im menschlichen Nasensekret im Verlauf verschiedener Rhinopathien. *Z. Laryng. Rhinol.*, 51 : 73-80, 1972.
- 2) Hochstrasser, K., Schuster, R., Reichert, R. and Heimbürger, N.: Nachweis und quantitative Bestimmung von Komplexen zwischen Leukozytenproteasen und α_1 -Antitrypsin in Körpersekreten und Körperflüssigkeiten. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, 323 : 1120-1124, 1972.
- 3) Jobling, J.W., Peterson, W. and Eggstein, A.: The mechanism of anaphylactic shock. *J. Exp. Med.*, 22 : 407-417, 1965.
- 4) 伊崎正勝: 炎症性皮膚疾患と酵素療法, 日本医事新報, 2664 : 12-18, 1975.
- 5) Hochstrasser, K., Bretzel, G., Feuth, H., Hilla, W. and Lempart, K.: The inter- α -trypsin inhibitor as precursor of the acid stable proteinase inhibitors in human serum and urine. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, 357 : 153-162, 1976.
- 6) Astrup, T. and Müllertz, S.: The fibrin plate method for estimating fibrinolytic activity. *Arch. Biochem.*, 40 : 346-351, 1952.
- 7) Deutsch, D.G. & Mertz, E.T.: Plasminogen, purification from human plasma by affinity chromatography. *Science*, 170 : 1095-1096, 1977.
- 8) Matsuda, M., Iwanaga, S., Nakamura, S.: A simple, large scale method for preparation of plasminogen-free fibrinogen, *Thromb. Res.*, 1 : 619-630, 1972.
- 9) 小杉忠誠: 副鼻腔炎手術に対する抗プラスミン剤投与の検討, 耳鼻, 22 : 442-462, 1976.
- 10) 小杉忠誠, 松尾理, 美原恒, 森満保, 浜谷松夫: 気管気管支分泌液の蛋白分解酵素に関する研究, 第3報 ラット分泌液中のprotease-antiprotease系の解析, 日気食会報, 30 : 293-297, 1979.
- 11) 林秀男, 樋口安典: 炎症プロテアーゼ, 炎症学叢書 Vol. 2, edited by 安平公夫等, 医学書院, 東京, pp. 78-93 1976.
- 12) Mihalyi, E.: Thiol proteinases. Application of proteolytic enzymes to protein structure studies. Vol. 1. (edited. Mihalyi, E.), CRC Press, Florida, pp. 99, 1978.
- 13) Udaka, K.: Studies on the role of sulfhydryl groups in the biochemical mechanisms of allergic inflammation. V, Antiprotease in the cutaneous lesions of Arthus-reaction and its significance. *Kumamoto Med. J.*, 16: 70-81, 1963.
- 14) Udaka, K. and Hayashi, K.: Further purification of a protease inhibitor from rabbit skin with healing inflammation. *Biochim. Biophys. Acta.*, 97 : 251-261, 1965.
- 15) Udaka, K. and Hayashi, K.: Molecular-weight determination of a protease inhibitor from rabbit skin with healing inflammation. *Biochim. Biophys. Acta.*, 104 : 600-603, 1965.
- 16) Kambara, T., Aimoto, T. and Hayashi, H.: Incorporation of 35 S-methionine or 35 S-cystin into polypeptide protease inhibitor in the rabbit skin with healing inflammation. (preliminary report) *Tohoku J. Exp. Med.*, 24 : 237-242, 1968.
- 17) 佐々木実, 南方かよ子, 加藤泰治, 山本紘靖, 丹羽正明: チオールプロテアーゼに特異的な血清中のプロテアーゼインヒビター, 医用酵素, 2 : 70, 1977.
- 18) Heimbürger, N.: Biochemistry of proteinase inhibitors from human plasma, A review of recent development. Proteinase inhibitors. (edited by Fritz, H., Tschesche, H., Greene, L.J. and Truscheit, E.), Springer-Verlag, New York, pp. 14-22, 1974.
- 19) Ganrot P.O.: Determination of α_2 -macroglobulin as trypsin-protein esterase. *Clinica Chimica Acta.*, 14 : 493-501, 1966.
- 20) Ohlsson, K.: Comparison of affinity of trypsin for two α_2 -macroglobulin fractions and for α_1 -antitrypsin in dog serum. *Clinica Chimica Acta.*, 32 : 215-220, 1971.

別刷請求: 〒889-16 宮崎県宮崎郡清武町木原5200
宮崎医科大学第二生理
小杉 忠誠

(投稿受付 1979年10月31日)