気管気管支分泌液の蛋白分解酵素に関する研究

第7報：ラット気管気管支分泌液の線溶活性に対する Miraclid の影響

*小杉 忠 誠

**長田 紀与志, 野田 寛

A Study on Protease in Tracheobronchial Secretion

7. Effect of Nebulization of Miraclid on Fibrinolytic Activity in Tracheobronchial Secretion of Rat

Tadayoshi Kosugi, M.D.

Department of Physiology, School of Medicine, University of the Ryukyus, Naha

Kiyoshi Nagata, M.D. and Yutaka Noda, M.D.

Department of Otorhinolaryngology, School of Medicine, University of the Ryukyus, Naha

It has been reported that plasminogen activator existed in tracheobronchial secretion of rats. From the results of previous studies, it was expected that inhibition of proteolytic enzyme in tracheobronchial secretion conducted to control the process of inflammation in the respiratory tract. In this study, Miraclid, a polyvalent inhibitor derived from human urine was used in this experiment of *in vitro* and nebulization of rats. Furthermore, the effect of Miraclid nebulization on fibrinolytic activity was studied in tracheobronchial secretion of rats. From the result of *in vitro* study, it was clarified that Miraclid could inhibit caseinolytic activity of trypsin, and fibrinolytic activity of urokinase and papain. However, it was clarified that Miraclid could not inhibit caseinolytic activity of papain. On the other hand, from the results of animal experiment, it was clarified that fibrinolytic activity in tracheobronchial secretion of rats decreased in administration group in comparison to non-administration group after administration of Miraclid through nebulizer. From the above-mentioned results, it was suggested that nebulization of Miraclid might be useful to control the inflammation in the respiratory tract.

Key words : tracheobronchial secretion, fibrinolytic activity,
polyvalent protease inhibitor, Miraclid

緒 言

ラットの気管気管支分泌液中には、非炎症時では潜在的線溶活性が存在し、蛋白分解酵素阻害物質は存在していないことを既に報告した^{1)~3)}。さらには、炎症時に蛋白分解酵素活性が上昇し、何らかの機序にて分泌液中に阻害物質

が出現するものと予想された¹⁾⁴⁾⁵⁾。特に気道炎症では mast cell, basophil から histamine, serotonin 等の低分子量 chemical mediator の放出をみるばかりでなく, high molecular weight の elastase, cathepsin G の放出も報告されている⁶⁾。一方, fibrin 分解産物も試験管内実験において, histamine の放出を示す点も明らかになっている⁷⁾。

これらの結果から、分泌液中の蛋白分解酵素

*琉球大学医学部生理学第一講座

**琉球大学医学部耳鼻咽喉科学講座

活性の抑制は、気道炎症の経過を統禦できるものと予想される。さらには、抑制物質の投与に際しては、先の実験結果からも多価蛋白分解酵素阻害物質の投与が妥当と考えられる。そこで、ヒト尿由来の多価蛋白分解酵素阻害剤である Miraclid[®]を用いて、試験管内実験およびネブライザーによる Miraclid 投与実験を行った。すなわち、Miraclid のラット気管気管支分泌液の線溶活性に及ぼす影響を中心に検討したので報告する。

実験方法

1) 試 薬

Trypsin は Cooper Bio Medical 社製のものを 0.1 M, phosphate-buffer (pH 8.0) に溶解して用いた。Casein は Hammerstein のものを用いた。Papain は Sigma 社製 (25 units/ml, BAEE) を用いた。Fibrinogen は Miles 製 Bovine fibrinogen を用いた。Thrombin は持田製薬製ウシトロンビンを用いた。Urokinase は持田製薬製 Uronase を用いた。Miraclid は試験管内実験に際しては、ミラクリッド原液 Lot No. S50040S, (力価 58,800 U/ml, 比活性 2,640 U/mg, 持田製薬より提供された) を用いた。また、ネブライザーによる投与には、注射用 Miraclid 50000 単位 (持田製薬製) を用いた。

2) 実験動物

Wistar 系ラット (体重 400~600g) の雄を使用した。

3) 測定方法

カゼイン分解能は藤井らの方法に従って測定した⁸⁾。フィブリン分解能は, Astrup and Møller の方法に従って測定した⁹⁾。

4) Nebulization

日本光電製 Ultrasonic Nebulizer TUR 3200 を用いた。ノズルの先端には polyethylene 製袋を装着し、袋の一端に小孔を設け、そこにガラス管を装着した。

Nebulizer 開始後 polyethylene 製袋およびガラス管内に貯留した液を回収した¹⁰⁾。Nebulizer の施行時間は、30~60 分間とした。Nebulizer による Miraclid 投与後のラット気管気管支分泌液の採取方法は既報に従った。

実験結果

1) Trypsin の casein 分解に対する Miraclid の影響

Trypsin の 25 $\mu\text{g/ml}$ 以下の濃度にて、ほぼ直線の casein 分解活性がみられた (図 1)。さらに, trypsin 25 $\mu\text{g/ml}$ に対する Miraclid の抑制活性をみると、図 2 にみられるごとく Miraclid 25 U/ml の濃度にて、ほぼ 50% の阻害がみられた。

2) Papain の casein 分解に対する Miraclid の影響

Papain の 30 $\mu\text{g/ml}$ 以下の濃度にて papain の濃度依存性にカゼイン分解活性の上昇がみられた。すなわち、ほぼ直線のカゼイン分解活性がみられた (図 3)。さらに, papain 30 $\mu\text{g/ml}$ に対する Miraclid の抑制を検討したが、Miraclid 58,800 U/ml の濃度にて抑制は認められなかった (図 4)。

3) Papain の fibrin 分解に対する Miraclid の影響

Fibrin plate を用いて, cysteine あるいは EDTA の存在下で papain の fibrin 分解能を検討した。図 5 にみられるように, papain の fibrin 分解能は, EDTA 存在下よりも cysteine 存在下にて増強するのがみられた。また, papain の 2,000 $\mu\text{g/ml}$ 以下の濃度では, papain の濃度上昇とともに fibrin 分解活性の上昇がみられた。次に, papain 30 $\mu\text{g/ml}$ の fibrin 分解能に対する Miraclid の影響を検討したが, Miraclid 29,400 U/ml の濃度にて約 38% の抑制を示した (図 6)。

4) Urokinase の fibrin 分解に対する Miraclid[®] の影響

Uronase 0.5 U/ml の fibrin 分解能に対する Miraclid の影響を検討した。その結果, Miraclid の 2,000 U/ml 付近で 50% の阻害が認められた (図 7)。

5) Miraclid の nebulizer による活性変化

Miraclid の濃度を 50 U/ml, 500 U/ml, 5,000 U/ml に調整し, nebulizer を施行し chamber 内液, polyethylene bag 内液, ガラス管内液を回収し, それらの回収液の trypsin 25 $\mu\text{g/ml}$ の casein 分解に及ぼす影響を検討した。その結

図1 Trypsinによるcasein分解能

図2 Trypsin (25μg/ml)に対するUTIの抑制 (UTI: Miraclid)

図3 Papainによるcasein分解能の標準曲線

図4 Papain (30μg/ml)に対するUTIの抑制 (UTI: Miraclid)

図5 Papainによるfibrinolysis
●●: addition of 5 mM cysteine and 1 mM EDTA
○○: addition of 1 mM EDTA

図6 Papainに対するUTIの抑制 (UTI: Miraclid)

図7 Urokinase の fibrinolysis に対する UTI の影響 (UTI: Miraclid)

果, chamber 内液では trypsin 25 $\mu\text{g/ml}$ の casein 分解能の50%阻害を示す UTI 濃度は 14.7 U/ml であった。また, polyethylene bag 内液での UTI 濃度は 90.9 U/ml ガラス管内液では 156.2 U/ml であった (表1)。

6) ラットでの Miraclid nebulization による分泌液中線溶活性の変化

注射用 Miraclid 50,000 unit を生理的食塩水に溶解して chamber 内液とした。ラットは polyethylene bag 内に置き 1 時間30分 nebulization を行った。Nebulizer 後ウレタン麻酔下に気管切開を行い分泌液を回収し, fibrin 分解能を測定した。一方, 非投与群として, 生理的食塩水を同様の条件で nebulization を行った。その結果, Miraclid 非投与群のラット分泌液の線溶活性は 30.53 ± 14.23 (mm^2), 投与群では 20.5 ± 12.76 (mm^2) であった (図8)。

総括と考按

Reichert らは各種鼻疾患における鼻汁中の各種 protease inhibitor の動態を検討している。その結果, 急性炎症において trypsin inhibitor の阻害活性が減少していると報告している¹¹⁾。ヒト気道の分泌液中には, protease inhibitor 存在することが既に知られている。その中でも, α_1 -antitrypsin が最も病態との関係においてその役割と意義が明らかになっている。しかしながら分泌液中の全 protease inhibitor の中で, α_1 -antitrypsin の占める inhibitor 活性は約10~20%であり, 主役をなすのは, M. W. 14,000 の antiprotease であることが明らかにされた。この低分子量 protease inhibitor は, 血

図8 Miraclid nebulization による分泌液中線溶活性の変化

表1 UTI の Nebulizer による活性低下

表中の数字は, trypsin に対する50%阻害を示す UTI 濃度(UTI: Miraclid)

	UTI (U/ml)
Chamber 内液	14.7
Polyethylene bag	90.9
Glass tube	156.2

液中の protease inhibitor である inter- α -trypsin inhibitor と抗原性を同じくし, また, urinary inhibitor とも反応することが知られている。この低分子量 inhibitor は urine trypsin inhibitor と同様に acid stable inhibitor であり, また trypsin, chymotrypsin, plasmin に対して阻害活性を有することが知られている。しかしながら, 阻害 spectrum で異なるのは, 分泌液中 inhibitor は leukocyte proteinase に対しても他の inhibitor と異なり, 抑制活性を有する点である¹²⁾。このような, 低分子量 protease inhibitor は顆粒球由来の protease である elastase, cathepsin G を抑制する点も知られている¹³⁾。この inhibitor の分離・精製は Hochstrasser らにより行われており, cervical inhibitor 等とその化学的性質が似ている点も明らかにされた¹⁴⁾。

さらには, この inhibitor の物理化学的性質も明らかにされ, 他の分泌型 Kazal-type inhibitor に似ており, two domain あるいは head を有する点も明らかにされた¹⁵⁾。一方, このよう

な inhibitor の局在に関する研究では, 気管および上顎洞粘液に存在する点が蛍光抗体法にて確認されている¹⁶⁾。このような事実を基盤として考えるとき leukocyte protease から, mucous membrane を防禦しているのがこの inhibitor であると考えられる。

しかしながら, 気道炎症時では, 白血球由来の protease が増加し, これを抑制するための inhibitor が complex を作り消費されている可能性がある。そのために粘膜の破壊が生じ, 防禦機構としての粘膜機能が障碍されるものと予想される。

そこで, このような気道炎症に対しては acid stable inhibitor の補給が臨床的には有効な手段であろうと予想される。最近, 尿由来の trypsin inhibitor (UTI) である Miraclid が肺炎, ショック等への治療薬剤として広く用いられるようになったが^{17)~20)}, このような薬剤の気道への投与が炎症経過の統禦に役立つものと予想され, 試験管内実験とともに Nebulizer による Miraclid の投与を実験動物であるラットに行った。試験管内実験においては, trypsin, papain, urokinase あるいは plasmin に対する抑制活性が認められた。その中でも, trypsin に対する抑制活性が最も強い点が明らかにされた。Miraclid は, Muramatsu ら²¹⁾により報告されているように, trypsin, chymotrypsin, plasmin 等を強く阻害することが知られている。われわれの結果もほぼこれまでの報告に一致するものであった。

一方, 分泌液中には plasminogen activator が非炎症時においても存在し, これが分泌液の線溶活性の主体をなすものである点が明らかにされている。このような分泌液の線溶活性に対する抑制が, Miraclid の Nebulizer 投与により生じている点が明らかになった。すなわち, Miraclid の投与により急性炎症時等の分泌液中線溶活性上昇に対する統禦として, trypsin inhibitor, plasmin inhibitor 等として作用する polyvalent inhibitor の Miraclid が有効であろうと推察された。しかしながら, Miraclid の Nebulizer による投与に際しては, 本実験において示したように nebulization による trypsin 抑制活性の減弱がみられる点から臨床応用に際

しては先の論文にて示した detergent の添加等により¹⁰⁾, これら抑制活性の減少を防止するための何らの処置が必要といえる。

結 語

- 1) 試験管内実験にて, Miraclid は trypsin による casein 分解, papain による fibrin 分解, urokinase による fibrin 分解を抑制した。
- 2) ラットへの Nebulizer による Miraclid 投与実験では, 投与群において気管気管支分泌中の線溶活性は非投与群に比して低下していた。
- 3) 超音波ネブライザーによる Miraclid 投与では Nebulization により, Miraclid の trypsin 抑制活性の低下がみられた。

文 献

- 1) Kosugi, T., et al.: Fibrinolytic enzyme in tracheobronchial secretion of rats: Existence of plasminogen activator. *Laryngoscope*, 90: 1045-1051, 1980.
- 2) 小杉忠誠・他: 気管気管支分泌液の蛋白分解酵素に関する研究. 第1報: ラット分泌液中の plasminogen activator, 日気食会報, 29: 247-251, 1978.
- 3) 小杉忠誠・他: 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.
- 4) 小杉忠誠・他: 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, 日気食会報, 31: 46-50, 1980.
- 5) 小杉忠誠・他: 気管気管支分泌液の蛋白分解酵素に関する研究. 第5報: ラット気管気管支分泌液の電気泳動学的解析, 日気食会報, 33: 297-301, 1982.
- 6) Meier, H.L., et al.: Purified human mast cells and basophils release human elastase and cathepsin G by an IgE-mediated mechanism. *Int. Arch. Allergy appl. Immun.*, 77: 179-183, 1985.
- 7) Eriksson, M., et al.: Fibrin-derived vasoactive peptides release histamine. *Int. J. Microcirc. Clin. Exp.*, 2: 337-345, 1983.
- 8) 藤井節郎・他: カゼイン分解法, 免疫学アレルギー学実験法, pp.420-422, 文光堂, 東京, 1971.
- 9) Astrup, T. and Müllertz, S.: The fibrin plate method for estimating fibrinolytic activity. *Arch. Biochem.*, 40: 346-351, 1952.
- 10) 高木一平・他: 気管気管支分泌液の蛋白分解酵

- 素に関する研究. 第6報: 蛋白分解酵素の超音波 Nebulizer による投与—蛋白分解酵素の活性低下の抑止について—, 日気食会報, 34 : 441-445, 1983.
- 11) Reichert, R. and Hochstrasser, K.: Veränderungen des proteasen inhibitor spiegels im menschlichen Nasensekret im Verlauf verschiedener Rhinopathien. *Z. Laryngol. Rhinol.*, 51 : 73-80, 1972.
 - 12) Hochstrasser, K., et al.: Proteinase inhibitors of the respiratory tract: Studies on the structural relationship between acid—stable inhibitors present in respiratory tract, plasma and urine. *Proteinase Inhibitors*, pp.111-116, Springer-Verlag Inc., New York, 1974.
 - 13) Schiesster, H., et al.: Acid-stable inhibitors of granulocyte neutral proteases in human mucous secretion: Biochemistry and possible biological function. *Neutral Proteases of Human Diseases Polymorphonuclear Leukocytes*, pp.195-207, Urban & Schwarzenberg, Inc., Baltimore-Munich, 1978.
 - 14) Hochstrasser, K., et al.: Isolierung und charakterisierung eines Protease inhibitors aus menschlichen Bronchialsecret. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, 353 : 221-226, 1972.
 - 15) Hochstrasser, K., et al.: The amino acid sequence of the double-headed proteinase inhibitor from canine submandibular glands. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, 356 : 1865-1877, 1975.
 - 16) Tegner, H., et al.: Localization of a low molecular weight protease inhibitor to tracheal and maxillary sinus mucosa. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, 358 : 425-429, 1977.
 - 17) 大西治夫: ヒト尿中 trypsin inhibitor の実験的急性肺炎に対する効果 (I), *日薬理誌*, 81 : 235-244, 1983.
 - 18) 小田利通・他: ヒト尿中トリプシン阻害物質 (MR-20) の抗ショック作用について, *麻酔*, 33 : 137-142, 1984.
 - 19) 大西治夫・他: ヒト尿中トリプシンインヒビターの手術侵襲に対する効果, *日薬理誌*, 85 : 1-6, 1985.
 - 20) 山村秀夫・他: 各種ショックに対する MR-20 の臨床評価—アプロチニンを対照薬とした多施設二重盲検試験—, *医学のあゆみ*, 129 : 730-738, 1983.
 - 21) Muramatsu, M., et al.: Purification and characterization of urinary trypsin inhibitor, UTI 68, from normal human urine and its cleavage by Human uropepsin. *J. Biochem.*, 88 : 1317-1329, 1980.

(別刷請求: 〒903-01 沖縄県中頭郡西原町上原207
琉球大学医学部生理学第1講座
小杉 忠誠)

(投稿受付 1987年5月16日)