鼻副鼻腔領域における protease と protease inhibitor に関する研究

鹿児島大学医学部耳鼻咽喉科学教室（主任：大山 勝教授）

福田 勝 則, 古 田 茂, 島 哲 也, 花 田 武 浩,
伊 東 一 則, 内 薗 明 裕, 松 永 信 也, 大 山 勝

PROTEASE AND PROTEASE INHIBITOR FROM NASAL SECRETIONS AND MUCOSAL EXTRACTS

KATSUNORI FUKUDA, M. D., SHIGERU FURUTA, M. D., TETSUYA SHIMA, M. D.,
TAKEHIRO HANADA, M. D., KAZUNORI ITOH, M. D., AKIHIRO UCHIZONO, M. D.,
SHINYA MATSUNAGA, M. D. and MASARU OHYAMA, M. D.

Department of Otolaryngology, School of Medicine, Kagoshima University, Kagoshima

Protease and protease inhibitory activities were estimated in the nasal secretions from chronic sinusitis and nasal allergy, and in the tissue extracts from nasal and paranasal pathological mucosa using ^3H -casein as substrate. And their α_1 -antitrypsin and α_2 -macroglobulin were measured by single radial immunodiffusion assay.

Considerably high protease activities were revealed in the secretions from chronic sinusitis, low in the tissue extracts and less in the secretions of nasal allergy. It was presumed that the greater part of proteases of nasal purulent secretions seemed to be originated from granulocyte elastase because of their optimal pH and reactions against ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), L-cysteine, phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) and ovomucoid trypsin inhibitor.

The α_1 -antitrypsin and α_2 -macroglobulin determined in the secretions from chronic sinusitis and in tissue extracts were not detected in the secretions of nasal allergy, in which trypsin inhibitory activities were remarkably higher. Furthermore, a low molecular weight protease inhibitor was partially isolated from the secretions of nasal allergy by gel chromatography and characterized. This protease inhibitor which had an apparent molecular weight of 10,000 daltons in sodium dodecyl sulfate gel electrophoresis showed inhibitory activities against bovine pancreatic trypsin and chymotrypsin, and proteases from the purulent secretions of the nose, but not against porcine pancreatic elastase, human plasmin and papain. These results could be suggested that a low molecular weight protease inhibitor from allergic nasal secretions might be related to that of granulocytes, especially to eosinophils.

Key words: 鼻汁, 鼻粘膜組織抽出液, protease, protease inhibitor,
 ^3H -casein 加水分解法

A87—0936—30141

はじめに

近年, 血清中 および 外分泌液中の protease と protease inhibitor はその生理的並びに, 生体防御に対する

役割上, 注目を集めている. protease は蛋白分解酵素であるばかりではなく, 生体内の種々の酵素を活性化したり, 外界からの刺激に対して血管透過因子や白血球遊走

因子を産生することで、炎症の初期の段階ではその反応過程を推進する¹⁾。そして、血中より移行した fibrin の沈着により炎症が限局化された後には、遊走して来た白血球より出される protease が抗原物質を破壊したりすることで、外界からの異物を排除する。更に、炎症の治療過程においては protease が炎症産物の分解や局所修復に関与している。今日、各種 protease 製剤が炎症の治療薬として使用されている理由でもある。

一方、protease inhibitor に関しては、血清中の α_1 -antitrypsin (α_1 -AT), α_2 -macroglobulin (α_2 -M) 等が中耳炎、気管支炎等の各種炎症性分泌物で認められ²⁾³⁾、特に α_1 -AT は顆粒球の elastase と complex を形成することで、その活性を阻害しているともいわれている²⁾。また、ヒトの気管、気管支分泌物⁴⁾⁵⁾⁶⁾、子宮頸管粘液⁷⁾⁸⁾、尿⁹⁾、精液¹⁰⁾などでは種々の低分子 protease inhibitor が見出し、それらの機能についても、それぞれの粘膜を protease の過剰の働きより保護しているとの見解が有力視されている。鼻副鼻腔領域でもこれら低分子の protease inhibitor が正常者の鼻汁で見出され¹¹⁾、また副鼻腔粘膜でも免疫組織学的に証明されるなどして¹²⁾、最近、粘膜の防御機転との関連で多くの論議がなされ¹³⁾¹⁴⁾、注目されてきている。今回我々は ^3H -casein を基質として鼻汁中ならびに鼻副鼻腔粘膜組織抽出液での protease と protease inhibitor 活性を測定すると同時に、 α_1 -AT, α_2 -M についても定量を行った結果、いささか興味ある新見解が得られたので、これらの成績を中心に慢性副鼻腔炎や鼻アレルギー等の疾患との関連について若干の考察を加えて報告する。

研究 方 法

対象：当教室において扱った、慢性副鼻腔炎患者の鼻汁 13 例と通年性鼻アレルギー患者で、その発作時あるいは誘発時に吸引採取した鼻汁 8 例、さらには手術時に採取した病的鼻副鼻腔粘膜 7 例を使用した。

手法：本研究におけるすべての実験操作（図 1）は特別の注釈がない限り 4°C 以下にて施行した。

まず重量測定後、Dulbecco's phosphate buffered saline (DPBS)¹⁵⁾ にて 4 倍希釈後、politron homogenizer (KINEMATIKA 社製) にて 1 分間処理し、20,000g, 60 分遠心したのち、その上清を採取して protease 活性測定まで -20°C で保存した。

1) Protease 活性の測定

J. E. Zull らの方法¹⁶⁾ に準じて ^3H -casein を調製し

図 1 ^3H -casein 水解による protease ならびに protease inhibitor 活性測定の実験操作法

た。これを基質として casein 加水分解活性を測定した。更に 4 倍希釈した検体 0.1ml に ^3H -casein (0.07 mg/ml, 65,000dpm/ml) 0.1ml, DPBS 0.1ml を加え、よく混和した後、 37°C , 60 分 incubate し、2% casein 0.2ml, 20% トリクロル酢酸 0.3ml を加えて反応を停止させる。これを 3,000rpm, 20 分遠心し、上清 0.1ml の放射活性を液体シンチレーションカウンターにて測定した。また同時に蛋白定量を Lowry らの方法¹⁷⁾にて定量し、protease 活性を dpm/mg protein にて表示した。

2) Protease inhibitor 活性の測定

trypsin 溶液 (2×10^{-4} mg/ml) 0.1ml に ^3H -casein 0.1ml, 75°C , 30 分で protease 活性を非動化した検体 0.1ml を加え、以下 protease 活性測定と同様にして、trypsin の抑制の程度を % にて表示した。

3) 慢性副鼻腔炎鼻汁中 protease の性質に関する検討

protease 活性測定の際の DPBS の代わりに 3mM L-cystein, 6mM PMSF, 3mg/ml ovomucoid trypsin inhibitor, 3mM EDTA をそれぞれ加え、鼻汁中 protease 活性の変化を検討した。また検体を 56°C , 65°C , 75°C で各 30 分熱処理した場合の活性の低下、並びに pH 5.9~8.0 の数種の buffer に対して検体と基質を透

析し、各 pH での protease 活性を測定した。

4) α_1 -AT, α_2 -M の定量

鼻汁中の α_1 -AT, α_2 -M の定量を単純免疫拡散法 (M-paltigen, Behringwerke 社製) にて測定した。

5) Protease Inhibitor の精製

鼻アレルギー症例のプールしておいた検体 8 ml を、飽和硫酸にて塩析し、2 ml の DPBS に溶解した後、DPBS に対して透析し、Sephadex G-150 (1.5×85 cm, 11 ml/hr, 3.6 ml/fr.) につけ、それぞれの分画の 280 nm の吸光度、ならびに trypsin inhibitor 活性を測定した。その後、trypsin inhibitor 活性のある分画を集め、bovine pancreatic chymotrypsin (1.8×10^{-3} mg/ml), porcine pancreatic elastase (8.5×10^{-3} mg/ml), human plasmin (0.3 casein 単位/ml), 1.5 mM L-cystein を含む papain (3.4×10^{-2} mg/ml) 溶液の各 0.1 ml に対する protease inhibitor 活性を測定した。更に残りを 0.01 M Tris-HCl, 0.15 M NaCl に対して透析し、濃縮した後 99% ethanol にて蛋白を沈殿させ、Fairbanks らの方法¹⁸⁾に従って、0.1% SDS を含む polyacrylamide gel 電気泳動を施行し、その蛋白分画の特徴を検索した。

研究成績

1) Protease 活性

³H-casein の trypsin に対する加水分解曲線を図 2 に、また鼻汁の希釈倍数に対する protease 活性曲線を図 3 に示す。各検体に対しては triplicate assay を施行し、その誤差は 5% 以下であった。本法は、trypsin 1×10^{-4} mg 程度の protease 活性を測定でき、しかも isotope を使用するため、鼻汁の性状に左右されず、生体内の微量の protease 活性を正確に反映し得るものと思われた。

各症例の protease 活性は図 4 のごとく慢性副鼻腔炎鼻汁ではかなりの protease 活性が認められ、一方組織抽出液では比較的少なく、アレルギー鼻汁ではほとんど protease 活性が認められなかった。

慢性副鼻腔炎鼻汁中の protease の性質についての検討成績は表 1、図 5、図 6 に示す通りである。すなわち各種 protease inhibitor や cystein 等の薬剤を加えた場合の変化 (表 1)、検体を熱処理した場合の変化 (図 5)、さらに pH 5.9~8.0 の間での活性の変化 (図 6) 等々である。慢性副鼻腔炎鼻汁中の protease は EDTA, PMSF, ovomucoid trypsin inhibitor による活性阻害は軽微であり、また cystein 添加による活性上昇もわず

図 2 bovine pancreatic trypsin (4×10^{-4} mg/ml) による protease 活性の dose related curve.

図 3 慢性副鼻腔炎鼻汁による protease 活性の dose related curve.

図 4 鼻汁、鼻副鼻腔粘膜組織抽出液の protease 活性

図 5 慢性副鼻腔炎鼻汁中 protease の熱による活性変化.

—— 熱処理なし, 56°C, 30分,
—・— 65°C, 30分, ---- 75°C, 30分

図 6 慢性副鼻腔炎鼻汁中 protease の至適 pH.
(16倍希釈鼻汁) blank

表 1 慢性副鼻腔炎鼻汁中 protease の各種薬剤による活性の変化(16倍希釈鼻汁)

添加薬剤	protease activity (%)
L-cystein	+10.6
EDTA	- 1.7
PMSF	-21.9
ovomucoid trypsin inhibitor	-24.4

かに認めるのみであった。熱による変化に関する成績においても 56°C, 30分の熱処理では活性の低下は軽微であり, 65°C, 30分の熱処理でもなお活性が一部残存することが示された。至適 pH では, 我々の測定した範囲

図 7 鼻汁, 鼻副鼻腔粘膜組織抽出液の trypsin (2×10^{-5} mg) に対する inhibitor 活性
(16倍希釈 75°, 30分熱処理鼻汁)

図 8 鼻汁, 鼻副鼻腔粘膜組織抽出液中の α_1 -antitrypsin, α_2 -macroglobulin の定量

では pH 8.0 で最大の活性を示し, ややアルカリ側に至適 pH を持つことが判明した。

2) Protease Inhibitor 活性と α_1 -AT, α_2 -M

慢性副鼻腔炎鼻汁, 鼻副鼻腔粘膜組織抽出液, 鼻アレルギー鼻汁等における trypsin 2×10^{-5} mg に対する inhibitor 活性, また α_1 -AT, α_2 -M 量はそれぞれ図 7, 図 8 に示す。慢性副鼻腔炎鼻汁, 組織抽出液では, α_1 -AT, α_2 -M がある程度含まれているにもかかわらず, inhibitor 活性はアレルギー鼻汁に比べてかなり低く, α_1 -AT, α_2 -M と trypsin inhibitor 活性との間には相関は見られなかった。またアレルギー鼻汁では α_1 -AT, α_2 -M は測定限界以下であった。

鼻アレルギー鼻汁の trypsin に対する inhibitor 活性と慢性副鼻腔炎鼻汁中 protease に対する inhibitor 活

図 9 鼻アレルギー鼻汁の trypsin (2×10^{-5} mg) に対する inhibitor 活性.

図 10 鼻アレルギー鼻汁の慢性副鼻腔炎鼻汁中 protease に対する inhibitor 活性.
— DPBS 添加, 8 倍希釈鼻アレルギー鼻汁添加

図 11 鼻アレルギー鼻汁蛋白の Sephadex G-150 gel chromatography による elution pattern と各分画の trypsin (2×10^{-5} mg) に対する inhibitor 活性ならびに 0.1% SDS 加, 7.5% polyacrylamide gel での電気泳動像. column: 1.6×85 cm, 11ml/hr, 3.6ml/fr.

性に関する成績は、それぞれ図 9、図 10 に示す。鼻アレルギー鼻汁は、かなりの低濃度で trypsin の活性を阻害し、また PMSF, EDTA, ovomucoid trypsin inhibitor でほとんど阻害を受けなかった慢性副鼻腔炎鼻汁の protease の活性も、かなりの程度で抑制することが認められた。

そこで鼻アレルギー鼻汁を Sephadex G-150 にて分

画し、各分画の protease inhibitor 活性を測定した結果は図 11 に示す通りである。分画 No. 35～45 に、蛋白濃度は低いにもかかわらず、強い trypsin inhibitor 活性が認められ、その inhibitor は計算上、約 10,000 の分子量をもつ蛋白であることが判明した。この分画を集めて各種 protease に対する inhibitor 活性を検索したところ、bovine pancreatic chymotrypsin に対しては tryp-

表 2 鼻アレルギー鼻汁中低分子 protease inhibitor の各種 protease に対する inhibitor 活性.

enzyme	inhibitor activity
bovine pancreatic trypsin	+
bovine pancreatic chymotrypsin	+
porcine pancreatic elastase	—
human plasmin	—
papain + L-cystein	—

sin と同様に強い inhibitor 活性を有するが, porcine pancreatic elastase, human plasmin, papain に関しては inhibitor 活性を示さなかった (表 2). また, 図 11 に同時にカラムにかけ前後で鼻アレルギー鼻汁蛋白の SDS 電気泳動パターンを比較したものを示すが, inhibitor 活性の強い分画では鼻アレルギー鼻汁蛋白のうち最も分子量の低い部分がほぼ単一の band として描出し得た.

考 按

鼻汁中の protease に関しては, 元来鼻汁には種々の物質が含まれ, かつ, それ自体均一でないため, 各種合成基質を用いた測定法では protease 活性測定は困難であった. そのために, わずかに気管, 気管支分泌液¹⁹⁾, 鼻汁²⁰⁾等で, 主として fibrinolytic enzyme に関する報告が散見されるに過ぎない. 今回我々が用いた ³H-casein 加水分解法では, 天然基質を利用しているため protease の基質特異性を余り考慮しなくてよく, また, isotope を用いているために, 非常に微量の protease 活性が測定可能という利点がある.

ところで, 炎症に関与する protease には, thiol protease である炎症 protease¹⁾ と顆粒球由来の cathepsin 群 protease, serine protease である elastase, plasmin, そして metal protease の範疇に入る collagenase など生体由来の protease^{21)~23)} と各種の細菌由来の protease が知られている. 慢性副鼻腔炎鼻汁中の protease は, 比較的耐熱性であることが認められ, thiol protease の可能性も全く否定できないにしても, 各種 protease inhibitor ならびに L-cystein 添加に対する反応からは, むしろ serine protease が大部分を占めていると考えられる. なかでも, 至適 pH が 8.0 とややアルカリ側にあることより, elastase, 特に慢性副鼻腔炎鼻汁中には

好中球が多数存在することからも好中球由来の granulocyte elastase²²⁾ が主体をなすものと考えられる. しかしながら, 好中球は同時に cathepsin や collagenase 等も保有しているため, このように elastase のみが優位に作用することは慢性副鼻腔炎の病態に何らかの関連があるのではないかとと思われる. ただ耐熱性に関する問題では, 鼻汁は糖蛋白をはじめとする各種高分子の糖質複合体を多く含むため, これらの物質が protease を熱から防御している可能性がある. 今後この点に関しては, 鼻汁中の protease を精製するなどして, 更に詳細に検討を加える必要があろうと思われた.

protease inhibitor では, α_1 -AT, α_2 -M, α_1 -antichymotrypsin 等が各種炎症病巣に血中より漏出することで, 炎症場での protease の過剰の働きを制御しており, 今回の測定でも慢性副鼻腔炎鼻汁およびその組織抽出液でかなりの量が検出されている. しかし, 顆粒球由来の protease に関しては, 80~90% の inhibitor 活性を低分子 protease inhibitor が担っているとされている¹³⁾. また, この低分子 protease inhibitor は, 正常者では血中にはわずかしき存在せず, 急性肺炎で有意に上昇が認められることなどから¹³⁾, 急性炎症の反応産物であることも十分考えられる. 加えて, 粘膜分泌液中に多量に認められることにより, 分泌性の protease inhibitor であることも推測され, 化膿性炎症の粘膜局所での重要な防御因子として注目されている¹⁴⁾. ところが低分子 protease inhibitor は単一ではなく, 分子量, 等電点が異なるいくつかのものが報告されており, かつまた, それぞれ抑制する protease も異なっていることも知られている^{5)~14)}. 現在の段階では, 今回我々の見出した鼻アレルギー鼻汁中の低分子 protease inhibitor は分子量と各種 protease に対する inhibitor 活性, なかでも, granulocyte elastase が慢性副鼻腔炎鼻汁中の protease の主要部分をなすと仮定すると, この protease に対して inhibitor 活性を有していることから, Ohlsson らの anti-leukoprotease⁵⁾ あるいは, Hochstrasser らの SI-I¹⁴⁾ に類似しているものと思われる. しかし, 彼等が報告した低分子 protease inhibitor は膿性分泌液より単離精製されたものであるに対して, 我々の protease inhibitor は慢性副鼻腔炎鼻汁よりもむしろ鼻アレルギー鼻汁で多く見出されているので, 鼻アレルギーの病態, 特に鼻アレルギー鼻汁に多く存在するところの好酸球との関連が強く示唆される. 極めて興味ある問題として今後, 更に詳細な検討が必要なことはいうまでもない.

ま と め

慢性副鼻腔炎鼻汁, 病的鼻副鼻腔粘膜組織抽出液およびアレルギー鼻汁中の protease と protease inhibitor 活性を ^3H -casein を基質として測定した。その結果,

1) 慢性副鼻腔炎鼻汁中 protease 活性はかなり高く, 組織抽出液では低値であり, 鼻アレルギー鼻汁ではほとんど活性を認めなかった。

2) 慢性副鼻腔炎鼻汁中 protease は各種薬剤による変化や至適 pH 等により, その大部分は顆粒球由来の elastase である可能性が示唆された。

3) α_1 -antitrypsin, α_2 -macroglobulin 量は, 慢性副鼻腔炎鼻汁, 組織抽出液である程度検出されたが, 鼻アレルギー鼻汁では測定限界以下の量であった。しかし, trypsin 阻害活性は, 鼻アレルギー鼻汁ではるかに高かった。

4) 鼻アレルギー鼻汁中の protease inhibitor は, gel chromatography にて部分精製され, SDS 電気泳動にて分子量約 10,000 の蛋白であることが確認された。この protease inhibitor は, ヒト plasmin や papain は抑制しないが, chymotrypsin と慢性副鼻腔炎鼻汁中の protease を抑制し, 顆粒球, 特に鼻アレルギー鼻汁中に多く含まれる好酸球との関連が示唆された。

参 考 文 献

- 1) 石田 貢 林 秀男: 炎症プロテアーゼ 蛋白質 核酸 酵素 25:579-589, 1980.
- 2) Carlsson B, Lundberg C and Ohlsson K: Granulocyte protease inhibition in acute and chronic middle ear effusion. *Acta Otolaryngol* 95: 341-349, 1983.
- 3) Stockly RA, Afford SC and Burnett D: The electrophoretic mobility of α_1 -proteinase inhibitor: Effects of proteolysis and cigarette smoke. *Hoppe-Seyler's Z Physiol Chem* 363: 387-393, 1982.
- 4) Hochstrasser K, Reichert R, Schwarz S, et al: Isolation and characterization of a protease inhibitor from human bronchial secretion. *Hoppe-Seyler's Z Physiol Chem* 353: 221-226, 1972.
- 5) Ohlsson K, Tegner H and Akeson U: Isolation and partial characterization of a low molecular weight acid stable protease inhibitor from human bronchial secretion. *Hoppe-Seyler's Z Physiol Chem* 358: 583-589, 1977.
- 6) Kueppers F and Bromke BJ: Protease inhibitors in tracheobronchial secretions. *J Lab Clin Med* 101: 747-757, 1983.
- 7) Haendle H, English H and Werle E: A new trypsin-chymotrypsin inhibitor in human female cervical secretion. *Hoppe-Seyler's Z Physiol Chem* 351: 545-546, 1970.
- 8) Schiessler H, Arnhold M, Ohlsson K, et al: Inhibitors of acrosin and granulocyte proteinases from human genital tract secretions. *Hoppe-Seyler's Z Physiol Chem* 357: 1251-1260, 1976.
- 9) Sumi H, Toki N, Takasugi S, et al: Low molecular weight trypsin-plasmin inhibitors isolated from papain treated urinary trypsin inhibitor. *Thromb Haemostas* 47: 14-18, 1982.
- 10) Ohlsson K, Tegner H, Fritz H, et al: Immunological similarity between low molecular weight trypsin-chymotrypsin inhibitors from human bronchial secretion and seminal plasma. *Hoppe-Seyler's Z Physiol Chem* 357: 1241-1244, 1976.
- 11) Hochstrasser K, Haendle H, Reichert R, et al: The occurrence and properties of a proteinase inhibitor in human nasal secretion. *Hoppe-Seyler's Z Physiol Chem* 352: 954-958, 1971.
- 12) Tegner H and Ohlsson K: Localization of a low molecular weight protease inhibitor to tracheal and maxillary mucosa. *Hoppe-Seyler's Z Physiol Chem* 358: 425-429, 1977.
- 13) Fryksmark U, Ohlsson K and Tegner H: The mucosal defence capacity against proteolytic leukocyte enzymes. *Rhinology* 21: 39-43, 1983.
- 14) Hochstrasser K: Proteinase and their inhibitors in human nasal mucus. *Rhinology* 21: 217-222, 1983.
- 15) Dulbecco R and Vogt M: Plaque formation and isolation of pure lines with polyomyelitis viruses. *J Exp Med* 99: 167-182, 1954.
- 16) Zull JE and Repke DW: Studies with tritiated polypeptide hormones. *J Biol Chem* 247: 2183-2188, 1972.
- 17) Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, et al: Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265-275, 1951.

- 18) Fairbanks G, Steck TL and Wallach DFH: Electrophoretic analysis of the major polypeptide of the human erythrocyte membrane. *Biochemistry* 10: 2606-2617, 1971.
- 19) 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 日気食会報 30: 293-297, 1979.
- 20) 浜口幸吉: 鼻副鼻腔における protease—抗protease 系に関する研究 日耳鼻 86: 37-43, 1983.
- 21) 青木洋祐 横山 武 千代田 晨: 顆粒球のプロテアーゼ 蛋白質 核酸 酵素 25: 463-471, 1980.
- 22) Ohlsson K and Ohlsson I: The neutral proteases of human granulocyte.: Isolation and partial characterization of granulocyte elastase. *Eur J Biochem* 42: 519-527, 1974.
- 23) Ohlsson K and Ohlsson I: The neutral proteases of human granulocyte.: Isolation and partial characterization of two granulocyte collagenases. *Eur J Biochem* 36: 473-481, 1973.

稿を終えるにあたり、御指導を賜りました東京都養育院附属病院免疫・輸血科大山俊郎先生に深謝いたします。

なお、本論文の要旨は、第22回日本鼻科学会総会、ならびに、第83回日本耳鼻咽喉科学会総会において口演した。

(原稿受付 昭和59. 2. 3日)

別刷請求先 〒890 鹿児島市宇宿町 1208-1

鹿児島大学医学部耳鼻咽喉科学教室 福田勝則