慢性炎症への蛋白分解酵素投与の生化学的知見

藤 崎 研 究 所

藤 崎 茂 巳

チュウビンゲン大学耳鼻咽喉科学教室

藤 崎 恭 大

大阪大学医学部耳鼻咽喉科学教室

吉 田 淳 一

大阪大学蛋白質研究所

中 村 正 彦

アメリカ公衆衛生院

三 谷 満 昭

BIOCHEMICAL ASPECTS OF PROTEASE TREATMENT ON CHRONIC INFLAMMATION

SHIGEMI FUJISAKI, M. D.

Fujisaki Institute, Osaka

YASUHIRO FUJISAKI, M. D.

Der Universität der Hals-Nasen-Ohren Klinik, Tübingen, West Germany

JUN-ICHI YOSHIDA, M. D.

Department of Otolaryngology, Osaka University School of Medicine, Osaka

MASAHICO NAKAMURA, Ph. D.

Institute for Protein Research, Osaka University, Suita

MITSUAKI MITANI, Ph. D.

National Institute of Health NIH, Bethesda, MD, U. S. A.

About twenty years have passed since we first used oral administration of pronase on human chronic paranasal sinusitis with a so-called enzyme therapy. We have been engaged in biochemical studies on chronic inflammation with special reference to the anti-inflammatory effect of protease administration. We gave pronase, an excellent proteolytic enzyme naturally produced from *Streptomyces*, to experimental animals, and found informations on the intestinal absorption, the form of complex in the blood streams and the fate of the complex on inflammatory tissues. We obtained the following results:

- 1) The intestinal absorption continued for about 60 minutes after administration of the radio-labeled protease, and 2 to 3 per cent of the radioactivity was generally detected in the blood.
- 2) Most of the protease was tightly associated with α_2 -macroglobulin in serum.

- 3) The complex with α_2 -macroglobulin in serum disappeared in the blood rapidly.
- 4) When the distribution of the complex was measured in the skin of rat with artificially introduced inflammation, the complex was found to be accumulated in the exudates to higher extent than a control.
- 5) The complex was converted to small fragments in the exudates.

From these observations we speculate on that administered pronase and their inhibitors play important roles in the process of inflammation.

Key words: 慢性炎症, 腸管吸収, プロテアーゼ, α_2 -マクログロブリン

A88-1061-00145

緒 言

「慢性炎症」は疾患の中できわめて重要なものである。しかし慢性炎症の機構についての研究は少ない現状である。

慢性炎症の生化学的特徴と機構を追究するかたわら、抗炎症剤として使用されている蛋白分解酵素製剤の腸管

吸収と抗炎症作用を追究することによって、逆に「炎症という現象」を検討してきた^{1)~6)}。今回、生化学的実験手法によって protease として pronase を用い腸管吸収の機構と血清中の protease inhibitor と考えてきた α_2 -macroglobulin (以下 α_2 MG と略す) と pronase の複合体の挙動、炎症組織への親和性、さらに pronase 内服後の臓器分布と排出について検討したことを報告する。

実験方法

蛋白分解酵素として pronase を ^{125}I で標識し、かね

図 1 ^{125}I -pronase, ^{14}C - α_2 macroglobulin, 両者反応後のそれぞれのゲルろ過 V_{e0} は void volume の位置を示す。

—●— ^{125}I , —○— ^{14}C ,

図 2 pronase 複合体投与後 40 分の血漿のゲルろ過

—●— ^{125}I , —○— ^{14}C ,

図3 pronase 静注投与の血清の経時的変化
—●—, ^{125}I -pronase. 斜線部は投与した
pronase 画分を示す.

て血清中の主要な inhibitor と考えていた $\alpha_2\text{MG}$ は ^{14}C で標識した^{7,8)}. 対照実験に使用した血清 albumin は ^3H で標識した⁹⁾. 十二指腸内または 静脈内に pronase を投与し, 経時的に門脈血を採取し, 血清を Sephacryl S-300 (分画分子量範囲 1 万~150万) を用いてゲルろ過した. ゲルろ過では蛋白質の分子量の大きいものから順に溶出するため, その溶出位置で分子量が判定でき, 複合体形成の消長を調べた. 実験動物として体重 2 kg 前後のウサギと 200g 程のラットを用いた.

実験成績

まず実験に用いた pronase と $\alpha_2\text{MG}$ を単独でゲルろ過すると, pronase は 分子量 65,000 以下の範囲に, $\alpha_2\text{MG}$ は分子量 725,000 の位置に単一の画分として溶出する. そこで両者を *in vitro* で反応させた後でゲルろ過すると $\alpha_2\text{MG}$ と重なって溶出てくる pronase があることから, 両者は複合体を形成することが明らかである (図 1). 血漿 $\alpha_2\text{MG}$ と pronase の複合体を生成し, ゲルろ過で単離した画分をラットに静注投与し, 40 分後に血漿を採取し分画した (図 2). $\alpha_2\text{MG}$ と複合体

図4 pronase の腸管吸収
数字は実験動物の個体番号を示す.

図5 pronase 十二指腸投与後の血清での経時的変化
—●—, ^{125}I -pronase, 斜線部は投与した
pronase 画分を示す.

を形成していた pronase は消失し, 分子量 300,000 の画分に pronase の放射活性が認められた. これは血中

図 6 上図: 血清の pronase のゲルろ過

—●—, ^{125}I

下図: 上図の各 fraction での合成基質水解活性

—▲—, トリプシン様活性

—■—, エラスターゼ様活性

の $\alpha_2\text{MG}$ と pronase の複合体は比較的早い時期に血中より消失するが、単独の $\alpha_2\text{MG}$ と小さい分子量の画分は消失し難いことを示している。

前もってゲルろ過した pronase の単一画分をラットに静注投与し、経時的に採血し、血中の pronase の消長を調べた (図 3)。ここでは投与後 7 分と 15 分で比較してみると、pronase より大きい分子量の 2 つのピークで示される画分に pronase が存在しているが、ピーク 1 は $\alpha_2\text{MG}$ と結合した pronase を示し、ピーク 2 は血中の他の protease inhibitor との複合体と考えられる。ピーク 1 の $\alpha_2\text{MG}$ と結合した pronase は素早く消失することが認められた。時間経過に伴いほとんどの pronase は血中から消失してしまう。

次いで pronase の単一画分をウサギの十二指腸に投

図 7 炎症部位の浸出液中の ^{125}I -pronase の経時的変化

—●—, ^{125}I

数字は実験動物の個体番号を示す。

与し、門脈血とリンパ液中の pronase を測定すると、血中濃度は 1 時間以降かなり一定に保たれた。このように血中濃度が一定に保たれたのは、血中からの消失と腸管吸収によって血中に出現してくるものが平衡状態に達しているためと考えている (図 4)。全投与量の 3~4% の pronase が吸収され、他の蛋白質の腸管吸収率と比較すると高い吸収率を示した。pronase の十二指腸投与後、経時的に採血し、静注投与の時と同じように動態を調べた。静注投与と異なり、 $\alpha_2\text{MG}$ との複合体は 15 分で消失することではなく、60 分後までさらに増加し続けた (図 5)。この増加は腸管吸収による血中濃度の増加によることが明白になった。

血中の pronase は $\alpha_2\text{MG}$ と複合体を形成し体内を循環しているが、このような時 pronase の活性部位が正常な酵素活性を保有しているかどうかを合成基質を用いて活性を測定した。ゲルろ過によって分画した各画分を 2 種の合成基質 (トリプシン様基質とエラスターゼ様基質) で活性を測ると、すべての画分で活性が認められた (図 6)。このことは血中の inhibitor と複合体を形成している pronase の活性部位は正常な活性を保持したままであることを示した。しかし $\alpha_2\text{MG}$ と複合体を形成している限り、pronase は蛋白質分解酵素活性は発現できない状態である⁶⁾。

炎症組織への関与を検討するために Hans Selye の方法によりラットに Croton pouch を作り、7 日後に十二指腸に pronase を投与し Croton pouch にできた炎症

図8 炎症部位の浸出液の pronase, 遊離型 α_2 -macroglobulin, 血清 albumin の濃度変化
 —●—, ^{125}I —■—, ^{14}C —▲—, ^3H

部位の浸出液をあらかじめ挿入したドレインより採取し, ^{125}I の放射能を測定した。図7に示すように浸出液中の放射活性は漸増し続けた。このことは腸管吸収された pronase が血中の inhibitor と複合体を形成して血中から消失したが, 炎症部位の組織に集まってくることを示すものである。しかも十二指腸に投与した量の約1%に相当することは興味深いことである。しかし, 浸出液中の $\alpha_2\text{MG}$ も pronase も共にかなり小分子(分子量1万以下)にまで分解されていることを確認した。次に炎症部位への ^{125}I -pronase- $\alpha_2\text{MG}$ 複合体, 単独の ^{14}C - $\alpha_2\text{MG}$, ^3H -albumin の親和性を比較検討した。血中から炎症組織の浸出液へまでの移行は $\alpha_2\text{MG}$ 単独や albumin では血中濃度の2~3%程度なのに対し, $\alpha_2\text{MG}$ と複合体を形成した pronase では血中濃度の30%近くの濃度まで高くなる親和性を持っていることがわかった(図8)。

最後に炎症部位を持つラットに pronase を十二指腸投与した時の体内各臓器への分布を放射活性で調べた(表1)。pronase の分子量については不明だが, 肝, 腎, 肺, 尿と炎症部位などに多く移行していることが認

表1 pronase の十二指腸投与後の臓器分布

Tissue distribution of ^{125}I -pronase after intra-duodenal injection into rats bearing croton oil-induced inflammatory pouch.

Organ	Wet weight (g)	Radioactivity		% of dose
		Total (cpm)	Specific (cpm/g)	
Rat 1 after 4 hrs				
Thymus	0.446	109	244	0.04
Lung	0.711	304	428	0.12
Adrenal	0.028	4	143	0.002
Kidney	1.300	979	753	0.40
Liver	9.866	3,108	315	1.27
Spleen	0.435	123	283	0.05
Bladder	0.040	25	625	0.001
Urine	0.35ml	1,427	4,077	0.58
Granuloma tissue	2.689	756	281	0.31
" exudate	6.0ml	2,604	434	1.06
Blood plasma	15.4ml	77,15	501	3.14

Rat 2 after 5 hrs

Thymus	0.478	118	247	0.05
Lung	0.877	321	366	0.13
Adrenal	0.024	2	83	0.001
Kidney	1.520	1,136	747	0.46
Liver	9.241	2,985	323	1.22
Spleen	0.438	131	299	0.05
Bladder	0.050	12	240	0.005
Urine	0.1ml	427	4,270	0.17
Granuloma tissue	2.542	522	205	0.21
" exudate	6.5ml	1,794	276	0.73
Blood plasma	15.4ml	8,747	568	3.57

Rats were injected sc with croton oil and 7 days later, 200 μg of ^{125}I -pronase was given intra-duodenally. Radioactivity of ^{125}I -pronase in various organs were determined 4 or 5 hrs after pronase administration.

められた。おそらく $\alpha_2\text{MG}$ の受容体を持った細胞の分布と一致するものと考えている。

結論と考察

我々は抗炎症剤として使われている蛋白質分解酵素の腸管吸収と体内での挙動, 特に炎症部位への移行および体内各臓器への分布について実験的に検討した。

^{125}I で標識した pronase を実験動物の十二指腸に投与すると, 投与量の3~4%近くまでが, そのままの形で吸収され, 血中の $\alpha_2\text{MG}$ と結合して複合体を形成して血中を循環する。その時 pronase の酵素活性は失わ

れていなかった。特に pronase と α_2 NG の複合体の血中での clearance は大変早いものであった。またこの複合体は炎症組織の細胞群に対して高い親和性を示し、効率良く炎症部位に移行した。

以上のことから、慢性炎症患者に投与した抗炎症製剤の pronase は効率良く腸管吸収され、血中の protease inhibitor とすみやかに複合体を形成し、生体の排出機構によって血中より消失する。生体内に炎症部位がある場合、この複合体は炎症部位にも集まり分解を受けるようである。おそらく複合体は receptor を所有している細胞に取り込まれると考えられる⁹⁾。炎症時に血中の α_2 MG 濃度が増加することや肝での α_2 MG の生合成が亢進する現象と考え合わせて、protease 製剤の作用機構のより詳しい説明から「炎症」の機構を紐解こうと考えている。

参 考 文 献

- 1) Eagle WW: Enzyme therapy in otorhinolaryngology. Laryngoscope 70: 666, 1960.
- 2) Fujisaki S and Taniguchi T: A protease therapy for chronic sinusitis. Int Rhinol 5: 37, 1967.
- 3) Nakamura M, Nakagawa H, Yoshida J et al: Membrane-bound neutral protease and its substrate(s) from human chronic inflammatory tonsils. XII World Congress of Otorhinolaryngology. Abstracts, Budapest, 1981.
- 4) 藤崎茂巳, 谷口武彦, 宮崎宏三: 副鼻腔炎にたいする蛋白分解酵素の臨床的応用. 耳鼻臨床 54: 564, 1961.
- 5) 長谷川高敏, 藤崎茂巳, 小田隆造, 谷口武彦: Pronase 内服による慢性副鼻腔炎の治療 第1報. 耳鼻 66: 1184, 1963.
- 6) Fujisaki S und Taniguchi T: Über die Proteasetherapie für die chronischen Nasennebenhöhlenentzündungen. Proceeding of the VIIIth international congress of Otorhinolaryngology, Tokyo, 1965.
- 7) Hunter WH and Greengard FC: Preparation of iodine-131 labelled human growth hormone of high specific activity. Nature 194: 495, 1962.
- 8) Martin DD and Rabel JM: Radiolabeling of proteins by reductive alkylation with 14 C-formaldehyde and sodium cyanoborohydride. Anal Biochem 87: 562, 1978.
- 9) James K: Alpha₂-macroglobulin and its possible importance in immune systems. Trends Biochem Sci 5: 43, 1980.

本論文の要旨は第82回日本耳鼻咽喉科学会総会および European Rhinologic Society 10th Congress, Nancy, France, August 26-29, 1984 で発表した。

(原稿受付 昭和60. 4. 24日 急載)

別刷請求先 〒541 大阪市東区備後町 2-56 第二野村ビル 藤崎研究所 藤崎 茂巳