炎症ラット血漿のプロスタグランジン生合成抑制作用

小森谷恵司・保科憲二・大津 晶・斎藤典之・黒住精二・成智達之・橋本喜信*,
水野啓子・山本尚三**

Inhibition of prostaglandin synthesizing enzymes by haptoglobin and plasma of rat with inflammation An inhibitor of the prostaglandin (PG) E_2 biosynthesis was found in the plasma of rats with acute inflammation induced by carrageenin or compound 48/80. The extent of inhibition was dependent on the concentration of the plasma. The appearance of such an endogenous inhibitor was in parallel with an increase in the plasma haptoglobin (Hp) level. With chronic inflammation such as adjuvant arthritis, similar observation was obtained. The plasma collected from animals with severe arthritis inhibited the PGE_2 biosynthesis to a greater extent and showed a higher Hp level. Partially purified Hp inhibited the microsomal over-all conversion of arachidonic acid to PGE_2 . Hp also inhibited two heme-dependent reactions, *i.e.*, the PGG_2 synthesis from arachidonic acid and the conversion of PGG_2 to PGH_2 were catalyzed by a purified enzyme of seminal vesicle microsome. In contrast, the manganese protoporphyrin-activated cyclooxygenase was affected in much lesser extent. ID_{50} of the plasma of rat with inflammation on the PGE_2 biosynthesis with respect to Hp concentration was 11 $\mu\text{g/ml}$ and ID_{50} of Hp or such was 175 $\mu\text{g/ml}$. As the concentration was raised, almost complete inhibition was observed with the plasma from treated rats, but not with Hp itself. Therefore, the plasma inhibitory activity was not totally accounted for by the Hp contained in the plasma.

Keiji Komoriya • Kenji Hoshina • Akira Ohtsu • Noriyuki Saito •
Seizi Kurozumi • Tatsuyuki Naruchi • Yoshinobu Hashimoto*
Keiko Mizuno • Shozo Yamamoto**

*Teijin Institute for Biomedical Research

**Department of Biochemistry, Tokushima University, School of Medicine

動物の組織に炎症が発現するとき、prostaglandins (PGs) あるいは thromboxane (TX) が modulator として関与することを示唆する数々の報告がある^{1~9)}。この modulator として、ふるくは PGE_2 が考えられたが、最近では PGI_2 や TXA_2 の炎症における役割が注目されている^{10~18)}。また、 PGG_2 が PGH_2 に変換する際に放出される活性酸素が炎症に関与するという考えもある^{19~21)}。こうした観点に立ち、われわれは PGI_2 や活性酸素の炎症における役割を示唆してきた^{12, 22~24)}。

PG や TX は図1に示すような経路で不飽和脂肪酸である arachidonic acid から生合成されるが、この生合成をなんらかの生体内因子が制御しているという説が最近になって唱えられ^{25~30)}、その本体として haptoglobin(Hp) や albumin が注目されている^{27, 30)}。

今回、われわれは以上のような知見を追試し、動物に実験的に炎症を起こすと、血中の Hp が増加することを確認するとともに、Hp が PG endoperoxide 合成酵素

の活性化因子である heme と interaction して PG 生合成を阻害することを示唆する知見を得たので報告する。

材料と方法

(1) 実験炎症

Sprague-Dawley (SD) 系雄性ラット (体重 150~200 g) を用い、一側後肢足蹠皮下あるいは皮内に carrageenin (1 mg), dextran (1 mg), compound 48/80 (1 mg), xanthine oxidase + hypoxanthine (0.2 mg + 13.6 μg) あるいは流動パラフィンに懸濁した mycobacterium butyricum (Difco, 0.6 mg) を注入するか、sponge (10 $\pm$ 1 mg) を両側腋下部皮下に計 2 個挿入して炎症を惹起させた。また、血液はエーテル麻酔下に腹部大動脈または眼窩静脈叢より採取した。

(2) haptoglobin の精製と定量

ラット Hp は、Javid と Liang の方法³¹⁾により、carrageenin 処理24時間後に得た血漿を rat hemoglobin affinity column を用いて部分精製した。この Hp の純度は、Hp を sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel

* 帝人生物医学研究所薬理部門

** 徳島大学医学部生化学教室

図 1 biosynthesis of prostaglandins and thromboxane.

電気泳動後染色し、デンストメータで検討した結果、約 87%であった。

血漿Hpは血漿にhemoglobinを添加しHp-hemoglobin結合物を形成させ、その peroxidase 活性により測定し、結果を血漿 100ml あたりの hemoglobin 結合能 (mg)としてあらわした³²⁾。

(3) prostaglandin 生合成

microsome による arachidonic acid から PGE₂ への全合成を以下に示す反応系で検討した。すなわち、1mg 蛋白/ml のウシ精囊 microsome (Miles Laboratories) に活性化因子として 0.25μM hemoglobin, 5 mM tryptophan, 0.3mM glutathione を、基質として 33μM arachidonic acid (Sigma) を加え50mM Tris-HCl buffer(pH 7.5) で 0.2ml とし、37°C で 8 分間 incubate した後、ただちにラット胃底部平滑筋標本を用い bioassay した。

fatty acid cyclooxygenase と PG hydroperoxidase 活性は、ウシ精囊 microsome の PG endoperoxide 合成酵素の精製標品を用い³³⁾、基質として、それぞれ 100μM [1-¹⁴C] arachidonic acid (Radiochemical Centre), 50 μM [1-¹⁴C] PGG₂ を加えて検討した³⁴⁾。

結 果

(1) 血漿の prostaglandin E₂ 生合成に対する影響

表 1 changes in the inhibitory effect of plasma on PGE₂ biosynthesis and the plasma Hp level after carrageenin injection

experiments	time after carrageenin injection	
	[24 hr]	[48 hr]
PGE ₂ biosynthesis	nmol/0.2 ml ^a (inhibition %)	
no addition	0.34 ± 0.02	0.26 ± 0.03
normal plasma 1%	0.25 ± 0.03 (26.5)	0.32 ± 0.03 (-23.1)
plasma from treated rats 0.5%	0.23 ± 0.02 (35.3)	0.25 ± 0.04 (3.8)
1%	0.03 ± 0.01* (91.2)	0.09 ± 0.01* (65.4)
plasma Hp level	mg/100 ml ^b	
normal plasma	53.8 ± 7.0	76.8 ± 10.8
plasma from treated rats	158.6 ± 16.6*	142.4 ± 5.4*

Rats were given carrageenin, and blood was collected at the indicated time after the injection. The PGE₂ biosynthesis by bovine seminal vesicle microsome and the plasma Hp level were determined as described in Materials and Methods.

a: mean ± s.e.m. of 3 to 6 assays with pooled plasma.

b: mean ± s.e.m. of 5 rats. *: significant difference from normal rat plasma (p < 0.001).

表 2 changes in the inhibitory effect of plasma on PGE₂ biosynthesis and the plasma Hp level after adjuvant injection

experiments	time after adjuvant injection		
	7 days	14 days	21 days
PGE ₂ biosynthesis	nmol/0.2 ml ^a (inhibition %)		
no addition	0.18±0.06*	0.15±0.01	0.27±0.02
normal plasma 1%	0.15±0.01 (16.7)	0.14±0.02 (6.7)	0.21±0.03 (22.2)
plasma from treated rats 0.5%	NT	NT	0.15±0.01 (44.4)
1%	0.04±0.01** (77.8)	0.05±0.01* (66.7)	0.03±0.01** (88.9)
2%	NT	0.03±0.00* (80.0)	NT
plasma Hp level	mg/100 ml ^b		
normal plasma	83.8±8.7	67.7±6.9	61.5±1.8
plasma from treated rats	220.8±6.7**	276.1±5.2**	237.1±10.1**

Rats were given the adjuvant, and blood was collected at the indicated time. The PGE₂ biosynthesis by bovine seminal vesicle microsome and the plasma Hp level were determined, as described in Materials and Methods.

a: mean±s.e.m. of 4 to 6 assays with pooled plasma. b: mean±s.e.m. of 6 to 16 rats.

NT: not tested significant difference from normal rat plasma (*: p<0.01, **: p<0.001).

表 3 inhibitory effect of plasma on PGE₂ biosynthesis and the plasma Hp level in rats with mild and severe adjuvant arthritis

inflammation	score	PGE ₂ biosynthesis	Hp
		(inhibition %)	(mg/100 ml)
mild	2.3±0.4	27.3±3.2	166.3±15.1
severe	13.0±0*	61.9±2.2*	266.7±3.8**

Rats were given the adjuvant, and blood was collected after 21 days. The PGE₂ biosynthesis by bovine seminal vesicle microsome and the plasma Hp level were determined, as described in Materials and Methods. The values are presented as mean±s.e.m. of 3 rats. The severity of inflammation was evaluated by observations of the peripheral joints, tail and ears and expressed by the score with a maximum of 16 (38).

significant difference from rats with mild inflammation (*: p<0.01, **: p<0.001)

carrageenin 処理24時間後に得た血漿にウシ精囊 microsome の PGE₂ 生合成阻害作用が認められた。この阻害作用は血漿濃度に依存したものであった。濃度 1%では、未処理ラットの血漿が約20%の阻害作用を示したのに対して、炎症ラット血漿では約80%の著明な作用が認められた。一方、このとき血漿 Hp は未処理ラットの約3倍に増加した(表1)。

このように、carrageenin 処理したラットの血漿は

表 4 effect of plasma on PGE₂ biosynthesis and the plasma Hp level in rats suffered from various inflammation

inflammation	PGE ₂ biosynthesis	Hp
	(inhibition %) ^c	(mg/100 ml) ^d
exp. 1 ^a		
normal	-27.8	57.5±2.6
dextran	-22.7	75.5±9.3
compound 48/80	59.1	146.0±2.7*
XOD-HPX	13.6	69.0±11.1
exp. 2 ^b		
normal	13.6	89.8±9.0
sponge-granuloma	0	80.5±5.7

a: Rats were given dextran (1 mg), compound 48/80 (1 mg), or XOD-HPX (xanthine oxidase 0.2 mg + hypoxanthine 13.6 μg) and blood was collected 24 hr after the injection.

b: Rats were implanted sponge (10 mg×2/rat) and blood was collected 7 days after the operation.

c: mean of duplicate assay with pooled plasma (1 %).

d: mean±s.e.m. of 4 to 13 rats. *: significant difference from normal rat plasma (p<0.001).

PGE₂ 生合成に対して強い阻害作用と高い Hp 値を示した。そこで、carrageenin 浮腫とは別のタイプの持続的な炎症を示す adjuvant 関節炎について同様の検討を行った。

図2 effect of plasma from treated rats and that of Hp on over-all PGE₂ synthesis

The PGE₂ synthesis by bovine seminal vesicle microsome was determined, as described in Materials and Methods, in the presence of plasma collected from rats 24 hr after carrageenin injection (A) or partially purified Hp (B).

表2に示すように、関節炎を惹起した動物においても起炎剤注入1～3週後に、PGE₂ 生合成阻害作用およびHp 値の増加が認められた。これらの変化は炎症症状の激しい動物ほどいちじるしいものであった(表3)。

代表的な実験炎症モデルである carrageenin 浮腫または adjuvant 関節炎を惹起した動物の血漿が強い PGE₂ 生合成阻害作用を示したことから、種々の炎症モデルについてさらに検討を加えた。足蹠浮腫では起炎剤注入24時間後の血漿について、肉芽腫では7日後の血漿について検討した。その結果、compound 48/80 注入24時間後の血漿に強い PGE₂ 生合成阻害作用と Hp 値の増加が観察されたが、dextran, xanthine oxidase-hypoxanthine による足蹠浮腫もしくは sponge 肉芽腫では著明な影響は認められなかった(表4)。

(2) haptoglobin の prostaglandin E₂ 生合成に対する影響

ラットに種々の炎症を惹起させたときに、ある種の炎症では血漿中に PGE₂ 生合成を阻害するものがあらわれ、また、ほぼ同時期に Hp 値が増加することから、この両者に相関関係があるようにも思われる。そのため、部分精製した Hp についてそのPG生合成に及ぼす影響を検討した。

部分精製した Hp (63～500 μg/ml) は、PGE₂ 生合成を用量依存性に阻害した(図2B)。この阻害作用を炎症ラット血漿の作用(図2A)と比較すると、血漿では Hp として ID₅₀ は 11 μg/ml であるのに対して、Hp では 175 μg/ml であった。また、Hp は濃度を増加しても完全に阻害しないのに対して、血漿はほぼ完全に阻害した。

(3) haptoglobin の fatty acid cyclooxygenase お

よび prostaglandin hydroperoxidase 反応に対する影響

ウシ精囊 microsome の精製酵素³³⁾を用いて2種の酵素反応(arachidonic acid→PGG₂, PGG₂→PGH₂)に及ぼす Hp の影響を検討した。すなわち、cyclooxygenase 活性は arachidonic acid を基質として、hematin^{33,34)}もしくは manganese protoporphyrin³⁵⁾ を活性化因子として、また hydroperoxidase 活性は PGG₂ を基質として、hematin と tryptophan³⁴⁾ を活性化因子として検討した。

図3Aに示すように、hematin を活性化因子としたとき、cyclooxygenase および hydroperoxidase 活性は Hp によって用量依存性に阻害された。これに対して manganese protoporphyrin を活性化因子としたときは、cyclooxygenase はわずかに影響されたにすぎなかった。炎症ラット血漿もほぼ同様の阻害作用を示したが、含有される Hp 量で比較したとき、その作用は部分精製した Hp より強いものであった(図3B)。また、両酵素とも正常ラット血漿ではほとんど影響されなかった(図3C)。

考 察

ラットに carrageenin を注射処理することにより、血漿に PGE₂ 生合成の阻害作用が認められ、これとはほぼ同時期に Hp が増加することが明らかになった。

ところで、Di Rosa ら²⁸⁾は、carrageenin 処理したラットの血漿に白血球の貪食時に遊離する PG 量を低下させる作用のあることを示している。われわれの知見は、酵素レベルで Di Rosa らの報告を支持しているものと考えられる。

PG 生合成の阻害作用は、adjuvant 関節炎、compound

図3 effects of Hp (A), plasma from treated rats (B) and normal rat plasma (C) on the fatty acid cyclooxygenase and PG hydroperoxidase activities. The cyclooxygenase reaction as demonstrated with hematin and 3.6 milliunits of enzyme (▲—▲) or with manganese protoporphyrin and 0.9 milliunit of enzyme (○—○), and PG hydroperoxidase reaction with 2 milliunits of enzyme (×··×) were assayed, as described in Materials and Methods. Partially purified Hp and rat plasma were added to the reaction mixture in the amount indicated.

48/80 浮腫ラットの血漿についても認められ、この場合においても Hp の増加が観察された。一方、部分精製した Hp はウシ精囊 microsome による PGE₂ 生合成を阻害することから、炎症ラット血漿の阻害作用に血漿 Hp が関与することが示唆された。しかし、阻害作用を示すに必要な Hp 濃度は炎症ラット血漿では非常に低く、albumin²⁷⁾などの他の因子の関与が示唆された。

ところで、Hp は hemoglobin と結合することが知られている^{36,37)}。また、PG 生合成の最初のステップ (cyclooxygenase と hydroperoxidase 反応) は heme を必須とするものである^{32~35)}。これらの観点から Hp の cyclooxygenase および hydroperoxidase 活性に及ぼす影響を検討した。その結果、hematin を活性化因子としたとき、cyclooxygenase および hydroperoxidase 活性のいずれも炎症ラットの血漿および Hp によって著明に阻害された。ところが、manganese protoporphyrin を用いたとき、cyclooxygenase は阻害されず Hp と hematin との相互作用が Hp の PG 生合成阻害に関与することが示唆された。

以上のように、ラットのある種の炎症では血漿中に PGE₂ 生合成を阻害するものがあらわれること、その因子の一つとして Hp が考えられることが明らかになった。この Hp は活性化因子の heme と相互作用することにより PG endoperoxide 合成酵素を阻害することが示唆された。

以上の機作を介して、Hp を含む生体内因子が炎症の進展になんらかの役割を有していると思われる。

要 約

ラットの足蹠に carrageenin, compound 48/80あるい

は adjuvant を注射すると、一定時間後の血漿に prostaglandin E₂ 生合成の阻害作用および haptoglobin 値の増加が認められた。一方、部分精製した haptoglobin は arachidonic acid を基質とする prostaglandin E₂ 生合成を用量依存性に阻害した。ウシ精囊 microsome の精製酵素を用いてその作用機作を検討したところ、haptoglobin が活性化因子の heme と相互作用して阻害作用を示すことが明らかになった。しかし、prostaglandin E₂ 生合成に対して阻害作用を示す haptoglobin 濃度 (ID₅₀) は、炎症ラット血漿では 11 μg/ml であるのに対して、部分精製した haptoglobin では 175 μg/ml であり、炎症ラット血漿の阻害作用を haptoglobin のみで説明できないことが示唆された。

文 献

- 1) Williams, T.J., Morley, J.: Nature 246: 215-217, 1973.
- 2) Moncada, S., Ferreira, S.H., Vane, J.R.: Nature 246: 217-219, 1973.
- 3) Thomas, G., West, G.B.: Brit. J. Pharmacol. 50: 231-235, 1974.
- 4) Chahl, L.A.: J. Pharm. Pharmacol. 28: 753-757, 1976.
- 5) Chahl, J.S., Chahl, L.A.: Brit. J. exp. Pathol. 57: 689-695, 1976.
- 6) Chang, W.C., Tsurufuji, S.: Europ. J. Pharmacol. 36: 7-14, 1976.
- 7) Chang, W.C., Murota, S., Tsurufuji, S.: Biochem. Pharmacol. 25: 2045-2050, 1976.
- 8) Williams, T.J., Peck, M.J.: Nature 270: 530-532, 1977.
- 9) Katori, M., Ikeda, K., Harada, Y., Uchida, Y., Tanaka, K., Ohishi, S.: Agents Actions 8: 108-

- 112, 1978.
- 10) Chang, W.C., Murota, S., Matsuo, M., Tsurufuji, S.: *Biochem. biophys. Res. Commun.* 72: 1259-1264, 1976.
- 11) Murota, S., Morita, I., Tsurufuji, S., Sato, H., Sugio, K.: *Prostaglandins* 15: 297-301, 1978.
- 12) Komoriya, K., Ohmori, H., Azuma, A., Kurozumi, S., Hashimoto, Y., Nicolaou, K.C., Barnette, W.E., Magolda, R.L.: *Prostaglandins* 15: 557-564, 1978.
- 13) Splawinski, J.A., Wojtaszek, B., Swies, J., Gryglewski, R.J.: *Prostaglandins* 16: 683-697, 1978.
- 14) Peck, M.J., Williams, T.J.: *Brit. J. Pharmacol.* 62: 464-465, 1978.
- 15) Williams, T.J.: *Brit. J. Pharmacol.* 65: 517-524, 1979.
- 16) Higgs, G.A., Bunting, S., Moncada, S., Vane, J.R.: *Prostaglandins* 12: 749-757, 1976.
- 17) Boot, J.R., Dawson, W., Kitchen, E.A.: *J. Physiol.* 257: 47, 1976.
- 18) Chang, W.C., Murota, S., Tsurufuji, S.: *Biochem. Pharmacol.* 27: 109-111, 1978.
- 19) Kuehl, F.A., Humes, J.L., Egan, R.W., Ham, E.A., Beveridge, G.C., Van Arman, C.G.: *Nature* 265: 170-173, 1977.
- 20) Egan, R.W., Gale, P.H., Beveridge, G.C., Phillips, G.B.: *Prostaglandins* 16: 861-869, 1978.
- 21) Katori, M., Harada, Y., Tanaka, K., Ueno, A., Yamashita, Y., Ishibashi, M., Miyazaki, H.: *Europ. J. Rheumatol. Inflammation* 1: 305-307, 1978.
- 22) Komoriya, K., Ohmori, H., Azuma, A., Kurozumi, S., Hashimoto, Y., Nicolaou, K.C.: *Japan. J. Pharmacol.* 29: 811-813, 1979.
- 23) Ohmori, H., Komoriya, K., Azuma, A., Hashimoto, Y., Kurozumi, S.: *Biochem. Pharmacol.* 27: 1397-1400, 1978.
- 24) Ohmori, H., Komoriya, K., Azuma, A., Kurozumi, S., Hashimoto, Y.: *Biochem. Pharmacol.* 28: 333-334, 1979.
- 25) Saeed, S.A., McDonald-Gibson, W.J., Cuthbert, J., Copas, J.L., Schneider, C., Gardiner, P.J., Butt, N.M., Collier, H.O.J.: *Nature* 270: 32-36, 1977.
- 26) Saeed, S.A., Kendall, P.A., McDonald-Gibson, W.J., Collier, H.O.J.: *Biochem. Soc. Trans.* 6: 1166-1169, 1978.
- 27) Kendall, P.A., Saeed, S.A., Collier, H.O.J.: *Biochem. Soc. Trans.* 7: 543-545, 1979.
- 28) Di Rosa, M., Capasso, F., Mascolo, N.: *Advances in Inflammation Research*, Vol. 1, edited by Weissman, G., Samuelsson, B. and Paoletti, R., Raven Press, New York, 1979, p 493-498.
- 29) Simon, P., Penneys, N.S., Lord, J.T., Ziboh, V.A., Mandy, S.: *Prostaglandins* 14: 363-370, 1977.
- 30) Deby, C., Caneghem, P.V., Bacq, Z.M.: *Biochem. Pharmacol.* 27: 613-615, 1978.
- 31) Javid, J., Liang, J.C.: *J. Lab. clin. Med.* 82: 991-1002, 1973.
- 32) Owen, J.A., Better, F.C., Hoban, J.: *J. clin. Pathol.* 13: 163-164, 1960.
- 33) Miyamoto, T., Ogino, N., Yamamoto, S., Hayaishi, O.: *J. biol. Chem.* 251: 2629-2636, 1976.
- 34) Ohki, S., Ogino, N., Yamamoto, S., Hayaishi, O.: *J. biol. Chem.* 254: 829-836, 1979.
- 35) Ogino, N., Ohki, S., Yamamoto, S., Hayaishi, O.: *J. biol. Chem.* 253: 5061-5068, 1978.
- 36) Hwang, P.K., Greer, J.: *J. biol. Chem.* 254: 2265-2270, 1979.
- 37) Tsapis, A., Mihaesco, C., Alfsen, A., Beuzard, Y., Rosa, J.: *Biochem. biophys. Res. Commun.* 80: 319-326, 1978.
- 38) Randall, L.O., Baruth, H.: *Arch. int. Pharmacodyn.* 220: 94-114, 1976.