白血球による血管内皮細胞障害に対する各種プロテアーゼインヒビターの効果

藤田 浩^{*1,2)}, 森田育男・室田誠逸^{*1)}

rapid communication

Cytoprotective effect of protease inhibitors on vascular endothelial cell injury induced by PMA-stimulated leukocytes

We examined whether or not some protease inhibitors prevent endothelial cell injury due to PMA-activated leukocytes. The effects of protease inhibitors on the cytotoxicity were determined by measuring the release of ⁵¹Cr from prelabeled cultured endothelial cells. We also examined the leukocyte produced active oxygen species by measuring luminol-chemiluminescence.

Among the protease inhibitors tested, aprotinin and urinastatin decreased the endothelial cell injury in a dose dependent manner.

These data suggest that the protease inhibitors suppress priming effect of the leukocyte produced proteases on the endothelial cell injury induced by active oxygen species.

Hiroshi Fujita^{*1,2)}, Ikuo Morita・Sei-itsu Murota^{*1)}

key words : protease inhibitor, leukocyte, endothelial cell injury

白血球は、炎症などの際、生体防御という重要な役割を果たしている一方、いくつかの病態において増悪因子として働くことも知られている。その一つに成人型呼吸窮迫症候群(adult respiratory distress syndrome, 以下, ARDS と略す)がある。つまり、敗血症などで活性化を受けた白血球が、肺血管内皮細胞に粘着し、活性酸素、プロテアーゼなどを産生する。そして、内皮細胞に障害を与える結果、血管透過性亢進、白血球浸潤を来し、重篤な肺水腫となる。今回、筆者らは、この白血球による内皮細胞障害に対して各種プロテアーゼ

方 法

既報の方法¹⁾に準じ、10% ウン胎児血清を含む

表 1 各種プロテアーゼインヒビターの活性化白血球による内皮細胞障害およびルミノール化学発光に対する効果

	endothelial cell injury (% of control)	chemiluminescence (% of control)
UR	4.87 ± 1.20	78.47 ± 4.43
AP	26.20 ± 0.81	92.93 ± 3.20
FOY	115.00 ± 3.68	108.20 ± 0.74
FUT	80.77 ± 4.09	101.70 ± 1.86

UR : 1000 U/ml. AP : 1000 U/ml. FOY : 10⁻⁷ M.
FUT : 10⁻⁴ M

インヒビターがいかなる効果を発揮するかについて検討した。

Eagle's minimum essential medium にて継代培養したウン頸動脈内皮細胞(1×10⁵ 個/ウェル)を⁵¹Cr でラベルした。この細胞層上に1×10⁶ 個の白血球をのせ、phorbol myristate acetate(以下, PMA と略す)終濃度 10 ng/ml にて Hanks 溶液中で刺激をした。5 時間後の⁵¹Cr release 量をガンマシンチレーションカウンタにて測定した。なお、specific release は以下の式で求め、% で表示した。

$$\% \text{ specific release} = (\text{test drug} - \text{spontaneous}) / (\text{triton X} - \text{spontaneous}) \times 100$$

使用薬剤は、アプロチニン(AP), ウリナスタチン(UR), メシル酸ガベキセート(FOY), メシル酸ナホモスタット(FUT)である。また、活性酸素産生の指標として、ルミノール化学発光を Biolumat (Berthold 社)にて測定した。

結 果

白血球を PMA 刺激すると、内皮細胞が障害され⁵¹Cr の放出が認められるが、AP および、UR が存在すると、その放出が有意に抑制された(表 1)。この AP, UR の内皮細胞障害抑制作用は濃度依存的であり、それぞれの ID₅₀ は AP : 274 U/ml, UR : 40 U/ml であった(図 1)。一方、FOY および、FUT は抑制効果を示されなかった。次に本プロテアーゼの効果は活性酸素種の産生抑制によるものかどうかを調べるため、ルミノール発光量の変動を測定したが、4 種類の薬剤とも有意の抑制効果は認められなかった(表 1)。

*¹⁾ Section of Physiological Chemistry, Tokyo Medical and Dental University, Faculty of Dentistry
東京医科歯科大学歯学部顎口腔機能学教室

*²⁾ The Second Department of Internal Medicine, School of Medicine, Kyorin University 杏林大学
医学部第二内科学教室

図1 活性化白血球による内皮細胞障害に対するアプロチニン(a), ウリナスタチン(b)の抑制効果

考 察

PMA は、他の刺激剤 (zymosan, fMLP, LTB_4 など)にくらべて、白血球から活性酸素、プロテアーゼを十分に産生させ、内皮細胞に強い障害をもたらす。AP や UR がこの内皮細胞障害を抑制したことは、白血球の障害因子である活性酸素があるいはプロテアーゼまたは両者に対して効果的に作用したものと考えられる。

しかし、化学発光の測定において各種プロテアーゼインヒビターの抑制効果が顕著でなかったことから、AP や UR の障害抑制効果は活性酸素産生とは無関係と思われる。それゆえ、AP, UR は、白血球プロテアーゼに作用し、これらプロテアーゼの内皮細胞障害作用が活性酸素によって相乗的に増強されるのを抑制したものと考える。AP や UR は、FOY, FUT にくらべ、白血球のエラスターゼ、カタプシンG活性を抑制する効果が強力であるという報告²⁾からもその可能性は高いと考えられる。しかし、吉田らによる、FOY の zymosan 刺激による白血球のスーパーオキシド産生抑制の報告³⁾もあり、刺激剤の種類によって、プロテアーゼインヒビターの効果が異なる場合もありえるものと推測される。

敗血症肺のような ARDS の病態にプロテアーゼが大きく関与しているとの報告⁴⁾もあり、さらに、続発することが多い播種性血管内凝固異常を考慮すると、これらの疾患に対する、プロテアーゼインヒビターの適応が有効である可能性が考えられる。

文 献

- 1) Abe, M., Morita, I., Murota, S.: A new *in vitro* method using Fura-2 for the quantification of endothelial cell injury. Prostaglandins Leucotriens and Fatty Acids. 34: 69-74, 1988.
- 2) 渋谷靖義, 国広靖之: ウリナスタチンの組織崩壊防御作用. 薬理と治療 14: 17-32, 1986.
- 3) 吉田憲正, 吉川敏一, 近藤元治: ヒト多核白血球ウミホタルルシエリン誘導体-依存性化学発光に対するプロテアーゼインヒビターの影響. 医学のあゆみ 140: 765-766, 1987.
- 4) Wewers, M.D., Herzyk, D.J., Gradek, J.E.: Alveolar fluid neutrophil elastase activity in the adult respiratory distress syndrome is complexed to alpha-2-macroglobulin. J.Clin. Invest. 82: 1260-1266, 1988.