マレイン酸プログルメタシンによる ヒト好中球スーパーオキシド産生阻害

南 和志^{*1)}, 栗若良臣^{*2)}, 平田康司・福澤健治^{*1)}

Proglumethacin maleate inhibits the superoxide generation in human polymorphonuclear leukocytes from synovial fluid of patients with arthritis

Polymorphonuclear leukocytes (PMN) play an important role in development of inflammation. In the clinical field, non-steroidal anti-inflammation drugs (NSAID), such as proglumethacin maleate, were used to therapy with arthritis. In this study, we investigated the effects of NSAIDs on superoxide generation of human PMN from synovial fluid.

On the PMNs from synovial fluid of rheumatoid arthritis (RA) patients, proglumethacin maleate significantly inhibited the superoxide generation by phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA). The rate and maximum amount of superoxide generation of PMNs were reduced to $12.72 \pm 6.32\%$ and $24.23 \pm 9.44\%$, respectively. The other NSAIDs, indomethacin farnesil, diclofenac sodium and loxoprofen sodium, were also tended to inhibit the superoxide generation by PMA, but not significantly. Indomethacin farnesil, diclofenac sodium and loxoprofen sodium reduced the rate of superoxide generation to $55.88 \pm 5.58\%$, $41.17 \pm 2.36\%$ and $45.24 \pm 1.77\%$, respectively. Proglumethacin maleate also strongly inhibited the superoxide generation of PMNs from patients of osteoarthritis (OA), but other NSAIDs did not. The rate and maximum amount of superoxide generation of PMNs from OA patients were reduced by proglumethacin maleate to $21.20 \pm 2.79\%$ and $32.36 \pm 10.09\%$, respectively. Indomethacin which is active metabolite of proglumethacin maleate for NSAID did not inhibit the superoxide generation of PMNs from RA and OA patients.

These result indicated that proglumethacin maleate have inhibitory action to superoxide generation of PMNs which is not NSAID's action. This inhibition of superoxide generation of PMNs may be one of the anti-inflammatory mechanisms of proglumethacin maleate.

Rec. 5/10/1996, Acc. 7/26/1996, pp 413~418

Kazushi Minami^{*1)}, Yoshiomi Kuriwaka^{*2)}, Yasushi Hirata・Kenji Fukuzawa^{*1)}

key words : proglumethacin maleate, superoxide, polymorphonuclear leukocytes, reumatoid arthritis, osteoarthritis

炎症反応は、さまざまな経路で悪化、進行するが、その中でも、スーパーオキシド (O_2^-) はもっとも重要な因子の1つと考えられている。関節炎における O_2^- 産生系として、食細胞、特に好中球が

重要であると考えられており^{1~3)}、慢性関節リウマチ (RA) や変形性膝関節症 (OA) の関節液には好中球の集積が見られ、好中球から産生された O_2^- による関節破壊が示唆されている^{1~3)}。

一般に RA や OA などの関節炎には、臨床的、非ステロイド系抗炎症薬 (NSAID) を用いる場合が多い。これらの薬は、ステロイド系抗炎症薬に見られるような副作用が少なく、長期にわたり投与できる。このような NSAID は、プロスタグラ

^{*1)} Faculty of Pharmaceutical Sciences, Tokushima University 徳島大学薬学部衛生化学

^{*2)} Department of Orthopaedics, Oe-Kyoudou Hospital 麻植協同病院整形外科
Offprint requests to : Kazushi Minami, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Tokushima University 1-78-1 Shomachi, Tokushima 770, Japan

ンジン産生阻害作用をもち、関節炎治療によく用いられている⁴⁾。その中でも、インドメタシン誘導体であるマレイン酸プログルメタシン(ミリダシン)は、体内で代謝された後にインドメタシンとなるため、インドメタシンにくらべて胃腸管障害などの副作用がきわめて弱い⁵⁾。また、ミリダシンは、プロスタグランジン産生を阻害するとともに、同時にロイコトリエン産生も阻害するデュアルインヒビターとして作用する抗炎症薬である⁶⁾。それゆえに、ミリダシンにはほかの NSAID 以上の作用を期待できるかもしれない。実際に、ミリダシンは、カラゲニン胸膜炎においてインドメタシンより明らかに強い白血球遊走阻止作用を示す⁷⁾。また、ミリダシンは、ほかの NSAID と比較して著しく安全係数が高いにもかかわらず、種々の浮腫や関節炎において同等ないしそれ以上の治療効果を示す^{5,7,8)}。これらの作用は、ミリダシンの 5-リポキシゲナーゼ阻害作用(ロイコトリエン産生阻害作用)に起因するとも考えられているが、ミリダシンが血小板凝集抑制効果を有していることなども報告されており⁹⁾、ミリダシンのほかの作用によるものである可能性も残されている。

今回、筆者らは、関節炎患者から分離した膝関節液好中球を用い、ミリダシンによるヒト好中球 O_2^- 産生阻害作用を検討した。その結果、ミリダシンにほかの NSAID(ボルタレン、ロキソニン、インフリーおよびインドメタシン)には見られない強い好中球 O_2^- 産生阻害作用を見出した。

材料と方法

(1) 材料

フェリチトクロム C およびスーパーオキシドジスムターゼ(SOD)は Sigma 社の製品を使用した。好中球刺激剤として用いたホルボール 12-ミリステート 13-アセテート(PMA)およびインドメタシンはナカライテスクから購入した。インドメタシン以外の実験に用いた NSAID(ミリダシン、ボルタレン、ロキソニンおよびインフリー)は大鵬薬品工業から供与された。

(2) ヒト関節液好中球の調製

ヒト好中球は、慢性関節リュウマチ(RA)患者と変形性膝関節症(OA)患者の膝関節液より採取した⁹⁾。ヒト関節液中の細胞は、ほとんど(>99.9%)が多形核白血球であった。関節液を遠心分離($150 \times g$, 10 min.)し、上清を除いた沈渣に Ca^{2+} -free の Krebs-Ringer phosphate buffer(pH 7.4)を加えた。同様の洗浄操作をもう一度行い、コールターカウンター(日科機, COULTER MULTISIZER)を用いて 1×10^6 cells/ml に細胞濃度を調製し、好中球懸濁液を得た。なお、以上の操作はすべて氷冷下で行った。

(3) O_2^- 産生量の測定

膝関節液好中球の O_2^- 産生量は、チトクロム C 還元法により測定した¹⁰⁾。

3×10^5 cells/ml の好中球懸濁液に各種 NSAID(ミリダシン、インフリー、ロキソニン、ボルタレンおよびインドメタシン)、フェリチトクロム C およびグルコースをそれぞれ $10 \mu M$ および $5 mM$ の濃度で添加し、 $37^\circ C$ で 2 分間インキュベートした。2 個のプラスチックセルに 3 ml ずつ分取し、 $100 nM$ の PMA で好中球を刺激した。片方の対照セルには $100 units/ml$ の SOD を添加しておき、SOD で阻害できるフェリチトクロム C 還元を分光光度計(日立 330)を用いて経時的に測定した。

O_2^- 産生量は、フェリチトクロム C が還元されて生じるフェロチトクロム C 量を $550 nM$ におけるモル吸光度係数を 21.0 として O_2^- 産生量を算出し、求めた(式 1)。

$$\begin{aligned} [O_2^- \text{ 産生量}] &= [\text{フェロチトクロム C}] \\ &= A_{550} / E_{550}^{mM} \\ E_{550}^{mM} &= 21.0 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1} \quad (\text{式 1}) \end{aligned}$$

O_2^- 産生は、約 20 分から 40 分の間で終了し、それまでの総産生量を最大 O_2^- 産生量とし、また測定チャートの傾きから O_2^- 産生速度を求めた。

(4) 統計計算

結果の値はすべて、コントロール(薬剤無添加時)の値を 100%とした時の活性比の平均 $\pm$ 標準誤差として示している。データはすべて、paired t-test により統計処理され、 $P < 0.05$ は有意な差

図 1 RA 患者由来膝関節液好中球の O_2^- 産生に対する各種 NSAID の抑制効果
ヒト好中球は各種 NSAID (10 μ M) 存在下 (実線) および非存在下 (破線) において、100 nM の PMA により刺激された。 O_2^- 産生活性は 100 units/ml の SOD により消失するチトクロム C 還元量を 550 nm の吸光度を経時的に測定することにより評価した。データはそれぞれ 3 ~ 5 回行った実験の典型的な例を示している。

図 2 RA 患者由来膝関節液好中球の O_2^- 産生速度 (A) および最大産生量 (B) に対する各種 NSAID (10 μ M) の抑制率

グラフの縦軸は NSAID 非存在下における O_2^- 産生を 100% とした時の百分率で示している。NSAID 非存在下における O_2^- 産生速度および最大産生量は、それぞれ、 6.30 ± 1.12 nmol/ 10^6 cells/min および 70.96 ± 15.94 nmol/ 10^6 cells であった。値はすべて 3 ~ 5 回の実験における平均 $\pm$ 標準誤差で示している。

* $p < 0.05$, NSAID 非存在下 (100%) に対する有意差

とみなした。

結果

RA 患者由来の好中球と OA 患者由来のものとでは、PMA による O_2^- 産生速度および最大 O_2^- 産生量にまったく差は認められなかった⁹⁾。RA および OA 好中球の O_2^- 産生速度は、それぞれ、 6.32 ± 1.12 および 6.95 ± 0.93 nmol/ 10^6 cells/min であり、最大 O_2^- 産生量は、それぞれ、 70.96 ± 15.94 および 88.08 ± 6.79 nmol/ 10^6 cells であった (それぞれ平均 $\pm$ 標準誤差, $n = 5$)。

図 1 には、RA 好中球における O_2^- 産生に対する各種 NSAID の効果を示している。すべての NSAID によって好中球 O_2^- 産生は抑制されたが、その中でも、ミリダシンがもっとも効果的な O_2^- 産生阻害作用を示した。ミリダシンにより、 O_2^- 産生速度および最大 O_2^- 産生量は、それぞ

れ、 $12.42 \pm 5.47\%$ および $24.23 \pm 8.17\%$ に低下した (図 2)。一般に関節炎治療に用いられているほかの NSAID (インフリー、ボルタレンおよびロキソニン) によっても O_2^- 産生速度は抑制され、それぞれ、 $59.43 \pm 4.74\%$ 、 $41.17 \pm 2.36\%$ および $45.24 \pm 1.77\%$ に低下したが、コントロールに対する有意差は認められず、ミリダシンによる阻害よりもはるかに少なかった (図 2)。

図 3 には、OA 好中球における O_2^- 産生に対する各種 NSAID の効果を示している。ほとんどの NSAID には O_2^- 産生阻害作用は認められなかったが、ミリダシンには強い O_2^- 産生阻害作用が認められた。ミリダシンにより、 O_2^- 産生速度および最大 O_2^- 産生量は、それぞれ、 $21.20 \pm 2.79\%$ および $32.36 \pm 10.09\%$ に低下した (図 4)。

これらの NSAID はすべて生体内でプロスタグランジン産生阻害作用を示し、その結果、抗炎症

図 3 OA 患者由来膝関節液好中球の O_2^- 産生に対するミリダシンの抑制効果
ヒト好中球は各種 NSAID (10 μ M) 存在下 (実線) および非存在下 (破線) において、100 nM の PMA により刺激された。 O_2^- 産生活性は 100 units/ml の SOD により消失するチトクロム C 還元量を 550 nm の吸光度を経時的に測定することにより評価した。データはそれぞれ 3~5 回行った実験の典型的な例を示している。

図 4 OA 患者由来膝関節液好中球の O_2^- 産生速度 (A) および最大産生量 (B) に対する各種 NSAID (10 μ M) の抑制率
グラフの縦軸は NSAID 非存在下における O_2^- 産生を 100% とした時の百分率で示している。 NSAID 非存在下における O_2^- 産生速度および最大産生量は、それぞれ、 6.95 ± 0.93 nmol/ 10^6 cells/min および 88.08 ± 6.79 nmol/ 10^6 cells であった。値はすべて 3~5 回の実験における平均 $\pm$ 標準誤差で示している。
* $p < 0.05$, NSAID 非存在下 (100%) に対する有意差

図 5 RA および OA 患者由来膝関節液好中球の O_2^- 産生に対するインドメタシンの無効果
ヒト好中球はインドメタシン (10 μ M) 存在下 (実線) および非存在下 (破線) において、100 nM の PMA により刺激された。 O_2^- 産生活性は 100 units/ml の SOD により消失するチトクロム C 還元量を 550 nm の吸光度を経時的に測定することにより評価した。データはそれぞれ 3 回行った実験の典型的な例を示している。

作用を示すと考えられている。しかしながら、強いプロスタグランジン産生阻害物質であり、ミリダシンの生体内作用型であると考えられているインドメタシンには好中球 O_2^- 産生阻害作用は認められなかった(図 5)。

また、ミリダシンには、この濃度(10 μM)でキサンチン-キサンチンオキシダーゼ系による O_2^- 産生に対してはほとんど作用しなかった(data not shown)ことから、今回の結果は O_2^- 不均化作用によるものではない。

さらに、ミリダシンをはじめとした各種 NSAID はすべて、好中球の非オプソニン化サイモサンの貪食にはまったく影響を及ぼさなかった(data not shown)。

考 察

今回、各種 NSAID を用いてヒト膝関節液好中球の O_2^- 産生に対する影響を検討した。その中でも、特に、ミリダシンに強い好中球 O_2^- 産生阻害作用が認められ、RA 患者および OA 患者由来好中球の O_2^- 産生をとともに強く阻害した(図 1~4)。特に、OA 患者由来好中球において、ほかの NSAID がほとんど O_2^- 産生を阻害できなかったのにもかかわらず、ミリダシンは著しい阻害作用を有していた(図 4)。また、RA 患者由来好中球の O_2^- に対しても、ミリダシンのみが有意な阻害作用を有していた(図 2)。これらのことは、RA および OA に対するミリダシンの有用性を指示するものであり、好中球が産生した O_2^- による関節破壊に対してミリダシンは効果を有することを示唆している。

NSAID はプロスタグランジン産生酵素であるシクロオキシゲナーゼを阻害して抗炎症作用を示す。今回、ミリダシンのみに O_2^- 産生阻害作用が見られたことは、この作用機構がシクロオキシゲナーゼ阻害によるものでないことを示唆している。また、ミリダシンは人体に吸収されたあと、インドメタシンに代謝され、抗炎症作用を発揮すると考えられている¹¹⁾が、強いシクロオキシゲナーゼ阻害剤であり、ミリダシンの生体内作用型であるインドメタシンには好中球 O_2^- 産生阻害

作用は認められなかった(図 5)。さらに、この濃度(10 μM)のミリダシン自体にはシクロオキシゲナーゼ阻害作用が認められない⁶⁾ことから、ミリダシンの好中球 O_2^- 産生阻害作用はプロスタグランジン産生阻害作用によるものではないと思われる。同様の結果は、ラットのマクロファージおよび好中球においても認められ、PMA 刺激による O_2^- 産生に対してミリダシンがほかの NSAID よりも著しく強い阻害作用を有していた(data not shown)。

また、ミリダシンはデュアルインヒビターとして作用し、シクロオキシゲナーゼ阻害作用とともにリポキシゲナーゼ阻害作用も知られており、ロイコトリエン産生の阻害によっても抗炎症作用を示すと考えられている⁶⁾。しかしながら、ラットマクロファージでの検討において、ミリダシンには強い O_2^- 産生阻害作用が見られたにもかかわらず、リポキシゲナーゼ阻害剤である N-ジヒドログアエアレチン酸(NDGA)にまったく O_2^- 産生阻害作用は認められなかった(data not shown)。このことから、ミリダシンの好中球 O_2^- 産生阻害機構にリポキシゲナーゼ阻害作用は関与していないものと思われる。この点について、ヒト好中球での検討が必要であろう。

臨床投与において、ミリダシンの血中濃度は約 0.1 μM と今回用いた濃度にくらべてはるかに低いものである。また、ミリダシンの関節液中への移行性については不明であるが、ミリダシンが RA や OA に対して高い有用性を有している^{12~14)}ことから、十分量のミリダシンが関節液中に移行していることが推測される。また、ラットマクロファージの O_2^- 産生阻害作用において、ミリダシンは 0.1 μM でも顕著な阻害活性を有していた(data not shown)。

本論文において、ミリダシンがヒト好中球の O_2^- 産生を強く阻害することが明らかとされ、その阻害機構としてシクロオキシゲナーゼ阻害やリポキシゲナーゼ阻害とは異なる作用機構が示唆された。現時点において、ミリダシンの O_2^- 産生阻害機構は不明である。しかしながら、ミリダシンによる O_2^- 産生阻害作用はヒト関節液好中球の

みならず、ラットマクロファージおよびラット腹腔好中球などの PMA 刺激 O_2^- 産生に対しても認められる (data not shown) ことから、この作用は種を越えた食細胞 O_2^- 産生阻害作用であると考えられる。また一方で、ミリダシンは PMA 刺激好中球の O_2^- 産生は阻害するが、化学走化性因子 (fMLP) により刺激された好中球の O_2^- 産生は阻害しないと報告されている¹⁵⁾。このことは、ミリダシンが PMA-プロテインキナーゼ C 経路およびその下流のシグナル伝達経路を阻害していることを推測させる。いずれにしても、ミリダシンによる好中球 O_2^- 産生阻害作用はまだ解明されていない未知のミリダシン作用の一つであろう。このミリダシンによる O_2^- 産生阻害機構の解明は、新しい抗炎症薬開発の一助となるかもしれない。

文 献

- 1) Niwa Y, Sakane T, Shingu M, Yokoyama M: Effect of stimulated neutrophils from the synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis on lymphocytes- A possible role of increased oxygen radicals generated by the neutrophils. *J Clin. Immunol.* 3: 228-240, 1983.
- 2) 松原 司: 軟骨; 慢性関節リウマチにおける破壊と修復. *Med. Immunol.* 18: 77-82, 1989.
- 3) 河路秀巳, 中山義人: 活性酸素と慢性関節リウマチ, 関節症. *医薬ジャーナル* 28: 2093-2097, 1992.
- 4) Vane JR: Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs. *Nature New Biol.* 231: 232-235, 1971.
- 5) 小野尚彦, 山崎靖人, 山本紀之, 角南明彦, 三宅秀和: 非ステロイド性抗炎症薬 Proglumetacin maleate の薬理学的研究 (第 3 報) 胃腸管障害作用. *日薬理誌* 88: 205-213, 1986.
- 6) Ono N, Yamasaki Y, Yamamoto N, Sunami A, Miyake H: Pharmacological studies on proglumetacin maleate, a new non-steroidal anti-inflammatory drug (4) Mode of action on anti-inflammatory activity. *Japan J Pharmacol.* 42: 431-439, 1986.
- 7) 小野尚彦, 山本紀之, 角南明彦, 山崎靖人, 三宅秀和: 非ステロイド性抗炎症薬 Proglumetacin maleate の薬理学的研究 (第 1 報) 抗炎症作用. *日薬理誌* 88: 33-46, 1986.
- 8) 山口和政, 前川啓子, 岩崎 栄, 吉田益美, 野邑美代子, 久木浩平, 平松保造: 非ステロイド性抗炎症薬マレイン酸プログルメタシン (ミリダシン) と他剤との薬効比較. *薬理と治療* 16: 4161-4180, 1988.
- 9) Inoue K, Minami K, Kuriwaka Y, Taoka Y, Ikata T, Fukuzawa K: Phagocytosis and superoxide generation in human polymorphonuclear leukocytes from synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis. In *Frontiers of Reactive Oxygen Species in Biology and Medicine*, (Eds. Asada K, Yoshikawa T.) Elsevier, Amsterdam, 1994, p 459-460.
- 10) Pick E, Mizel D: Rapid microassays for the measurement of superoxide and hydrogen peroxide production by macrophages in culture using an automatic enzyme immunoassay reader. *J Immunol. Meth.* 46: 211-226, 1981.
- 11) Ono N, Sunami A, Yamasaki Y, Yamamoto N, Miyake H: Edffects of proglumetacin maleate and its major metabolites on allergic air pouch inflammation in rats. *Eur. J Pharmacol.* 142: 245-251, 1987.
- 12) 斎藤輝信, 五十嵐三都男, 延永正: 慢性関節リウマチに対するマレイン酸プログルメタシン (CR-604) の臨床試験. *薬理と治療* 14: 6577-6588, 1986.
- 13) 山根繁, 宮本一成, 村松郁夫, 久米守: マレイン酸プログルメタシンの変形性膝関節症に対する有用性. *薬理と治療* 14: 6589-6598, 1986.
- 14) 木村千代, 武内晴明, 谷脇功一, 弓削孝雄, 木屋博昭, 上塚満, 丸林幸雄: マレイン酸プログルメタシンの変形性膝関節症に対する治療効果. *薬理と治療* 14: 6611-6630, 1986.
- 15) 丹羽雅之, 河野健一, 野崎正勝, 鶴見介登: インドメタシンプロドラッグ (アセメタシン, プログルメタシン, インドメタシンファルネシル, CP-331) の好中球活性酸素産生に及ぼす影響. *炎症* 12: 148, 1992.