Sulfhydryl (SH) 化合物によるセルロプラスミンのオキシダーゼ活性阻害と抗炎症作用

八巻幸二・中川秀夫・鈴木一夫・鶴藤 丞*

Inhibitory effects of sulfhydryl compounds on the ceruloplasmin oxidase activity and the carrageenin-induced inflammation in rats

Koji Yamaki • Hideo Nakagawa • Kazuo Suzuki • Susumu Tsurufuji*

セルロプラスミン (Cp) は、銅を含む血清蛋白の一種であり、炎症の急性期にその血中レベルが上昇する acute-phase reactant として知られている。この Cp の生理作用の一つは、Cp のもつオキシダーゼ活性にあるといわれているので、Cp オキシダーゼ活性の抑制と抗炎症との関係について検討を行った。

方 法

炎症の実験モデルとして、ラットのカラゲニン空気嚢炎症モデルを用いた。炎症ラットの血清および滲出液 Cp の精製は、硫酸分画、Sephadex G-200 によるゲル濾過、DEAE-cellulose および hydroxyapatite カラムクロマトグラフィーにより行った。Cp オキシダーゼ活性を阻害する薬物の投与は、前日空気 (7 ml) をラット (SD, SPE, 雄, 体重 150~170 g) の背部皮下に注入して作製した空気嚢内に、2%カラゲニン溶液 (4 ml) と同時に注射し、以後12時間間隔で合計 9 回投与した。

血中および滲出液中の Cp オキシダーゼ活性の測定は 3, 5, 7 および 9 回目の投与 3 時間後に、尾動脈から採血 (約 150 μ l) および滲出液 (0.3 ml) を採集し、遠心分離した上清を活性測定の試料とした。Cp オキシダーゼ活性は、O-dianisidine を基質として使用した Schosinsky らの方法¹⁾に従った。また、薬物 9 回連続投与後 (カラゲニン注射 4 日後に相当) 3~5 時間後の滲出液重量、肉芽組織湿重量を測定し、炎症反応の指標とした。

結果と考察

(1) sulfhydryl (SH) 化合物による Cp オキシダーゼ活性の阻害 (*in vitro* 実験)

炎症ラットの血清および滲出液から精製した Cp は、SDS ディスク電気泳動 (SDS-PAGE) で単一バンドを示し、かつオキシダーゼ活性のバンドに一致するので、純粋であると考えられる。精製した血清 Cp, 滲出液 Cp の分子量は、SDS-PAGE によって求めた結果、いずれも 120,000 であった。滲出液中の Cp レベルは常に血中レベルより低く、かつ血中レベルの上昇よりも遅れて上昇することから、おそらく滲出液中の Cp は血清由来であると考えられる。

この精製 Cp のオキシダーゼ活性は D-ペニシラミン、システイン、グルタチオンや dithiothreitol など、SH 化合物によって完全に阻害された (1 分子中に 2 個の SH 基を有する dithiothreitol は、1 個の SH 基を有するシステインなどに比べ 2 倍の Cp オキシダーゼ阻害活性を示す)。Cp のオキシダーゼ活性は、Cp の Cu²⁺ に依存しているといわれているので、キレート剤である EDTA や O-phenanthroline の影響を検討した結果、キレート剤の高濃度においても Cp オキシダーゼ活性阻害は 50% 以下であり、完全に阻害されなかった。

キレート剤に比べ SH 化合物による Cp オキシダーゼ活性阻害は、低濃度において認められ特異的である。

(2) SH 化合物による Cp オキシダーゼ活性阻害と抗炎症作用 (*in vivo* 実験)

血中の Cp オキシダーゼ活性は、カラゲニン注射 10 時間後から上昇し、30 時間前後で最高値に達し、以後次第に減少する。一方、滲出液の Cp オキシダーゼ活性はカラゲニン注射 20 時間後より出現し、5 日目までゆっくり上昇し、以後一定値を保持する。

この血中および滲出液の Cp レベルの上昇に対して、Cp オキシダーゼ活性を阻害する SH 化合物を局所に連続投与して、Cp オキシダーゼ活性を阻害し、4 日後における肉芽湿重量、滲出液重量に対する影響を検討した。D-ペニシラミン (10, 30 または 100 mg/rat) は、血中および滲出液の Cp オキシダーゼ活性を用量依存的に強く阻害した: D-ペニシラミン 10 mg/rat 投与によって、血中 Cp オキシダーゼ活性の上昇が完全に阻害され、滲出液 Cp オキシダーゼ活性の上昇も強く抑制された。

* Department of Biochemistry, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Tohoku University 東北大学薬学部生化学教室

D-ペニシラミン 30, および 100 mg/rat 投与では, 血中 Cp オキシダーゼ活性が投与前よりも低くなり (100 mg 投与群においてより強い低下が認められ), 滲出液中には Cp オキシダーゼ活性が検出されず完全に阻害された. また, 4 日後における肉芽湿重量, 滲出液重量も D-ペニシラミンによってほぼ用量依存的に抑制された.

cysteamine (10 mg/rat) 投与によって滲出液 Cp オキシダーゼ活性が阻害されたが, 血中 Cp オキシダーゼ活性は, カラゲニン投与 1 日後の時点を除き, 有意に阻害されなかった. また肉芽湿重量, 滲出液重量は抑制傾向が認められるものの, 有意な抑制を受けなかった.

一方, cysteamine が 2 分子ジスルフィド結合した cystamine (20 mg/rat) 投与によって, 血中および滲出液の Cp オキシダーゼ活性の上昇が完全に阻害され, また肉芽組織の形成も有意に抑制された. SH 基をもたない cystamine は, *in vitro* 実験系において Cp オキシダーゼ活性を阻害しない. したがって, 炎症局所に投与された cystamine が, *in vivo* で SH 基をもつ 2 分子の cysteamine に分解して作用を発揮したものと推測される.

その他の SH 化合物として, D-システイン (8 mg/rat) およびグルタチオン (10 mg/rat) の連続投与によって, 血中 Cp オキシダーゼ活性は有意に抑制されず, また滲出液中の Cp オキシダーゼ活性の上昇抑制も弱いことを認めた. グルタチオンは, 低い抑制率 (15%抑制) であるが肉芽組織湿重量を有意に抑制し, 滲出液重量には影響を与えなかった.

一方, SH 基をもっていない cysteic acid (10 mg/rat) は, 血中および滲出液の Cp オキシダーゼ活性ならびに滲出液重量, 肉芽組織湿重量にはまったく影響を与えなかった.

以上の結果は, SH 化合物が Cp の重要な生理作用の一つであるオキシダーゼ活性を阻害すると同時に, 炎症反応を抑制することを示している. このように, SH 化合物は Cp のオキシダーゼ活性が関与する鉄代謝に影響を与えるだけでなく, 組織における銅レベル, 代謝に影響を与えることによって, 炎症組織の形成を抑制する可能性が考えられる.

文 献

- 1) Schosinsky, K.H., Lehman, H.P., Beeler, M.F.: Clin. Chem. 20: 1556, 1974.