ラットカラゲニン胸膜炎における白血球浸潤と補体の活性化

米 本 光 一*

Complement activation and leukocyte migration in rat carrageenin-induced pleurisy Rat pleurisy was induced by intrapleural injection of 2% λ -carrageenin. Complement titers were measured by Lachmann's method (50% hemolysis, CH 50), using EAC142, which was made by preincubation of erythrocytes with zymosan-treated serum. *In vitro* incubation of 0.2 and 0.4% carrageenin with serum decreased the residual CH50 values dose—and time—dependently. Complement titers in pleural exudate, expressed in terms of mg protein, was lower than those in serum in the whole course and it was concluded that complement was activated in the pleural cavity. Polymorphonuclear leukocytes (PMN) increased their numbers rapidly up to 5 hr and stayed at the same level thereafter, whereas mononuclear cell number increased gradually up to 24 hr. Using dexamethasone [sharing arachidonic acid (AA) release inhibition], benoxaprofen (a lipooxygenase inhibitor with a weak cyclooxygenase inhibitor) and K-76COONa (an inhibitor of complement activation), it could be concluded that PMN migration during the first 3~7 hr may be attributable to complement and AA metabolites, but no involvement of AA metabolites was conceivable in the 14~19 hr period. Mononuclear cell migration in the beginning (3~5 hr) might not be induced by neither complement nor AA metabolites, except 7 hr, in which lipooxygenase products might be involved. Benoxaprofen inhibited mononuclear cell migration in 14~19 hr period.

Koichi Yonemoto*

* Department of Orthopedic Surgery, Kitasato University School of Medicine

白血球浸潤に補体の活性化が重要な役割をもつことは広く認められている¹⁻³⁾。一方、アラキドン酸代謝産物の TXB₂^{4,5)}, HHT⁶⁾, 12-HETE⁷⁾, 5-HETE, 8-HETE, 9-HETE, 11-HETE⁸⁾, とくに LTB₄⁹⁻¹²⁾ は強い多核白血球走化作用のあることが最近報告されている。これらの走化因子が実際の炎症巣でどのような役割をもち、どのように関与し合っているかを知ることは、きわめて興味がある。先の論文¹³⁾でラットカラゲニン胸膜炎モデルにおいて、ある時間帯にはアラキドン酸代謝産物が多核白血球浸潤に関与するが、他の大部分の時間帯は他の因子、たとえば補体による可能性が多いことを報告した。本論文では補体が実際にこの炎症モデルにおいて活性化されることを示すとともに、白血球浸潤あるいは補体の活性化に影響を与える3種の薬物を用いて多核白血球遊走因子が実際の炎症巣でどのような役割を演じているかを、ある程度解明しえたので報告する。

材料と方法

(1) 実験的胸膜炎

Sprague-Dawley 系 SPF (specific pathogen free) 雄

性ラット(8~9週齢)の右胸腔内にエーテル麻酔下で2% λ -カラゲニン(逗子化学研究所, 神奈川) 0.1ml を24ゲージ注射針の先端を鈍的にしたものを用い注射することにより胸膜炎を惹起した。カラゲニンは生理的食塩水にて加温しながら完全に溶解させたのちに使用した。

(2) 薬物投与の方法と投与時期

dexamethasone (デカドロン, 日本メルク萬有, 東京) は生理的食塩水で希釈して 0.3 mg/ml とし, 0.3 mg/kg をカラゲニン注射2時間前に腹腔内に注射した。benoxaprofen (2-[4-chlorophenyl]- α -methyl-5-benzoxazole acetic acid, 塩野義製薬, 大阪) は1% CMC (carboxymethyl cellulose) に懸濁し, 50mg/ml とし 50mg/kg をカラゲニン注射1時間前に経口投与した。K-76COONa (sodium 6, 7-dihydroxy-2, 5, 5, 8a-tetramethyl-1, 2, 3, 4, 4a, 5, 6, 7, 8, 8a-decahydronaphthalene-1-spiro-2'-[7'-carboxyl-6'-formyl-4'-hydroxy-2', 3'-dihydrobenzofuran], 大塚製薬, 東京) は1% CMC に懸濁して 90mg/ml とし 90mg/kg をカラゲニン注射直後に180mg/kg を腹腔内注射した。K-76COONa 投与群の対照として1% CMC 2 ml/kg をカラゲニン投与直後に腹腔内注射した。

(3) 採血法と胸水採取法

動脈血はエーテル麻酔下で左総頸動脈に19ゲージ注射

* 北里大学大学院医学研究科整形外科科学教室

針を刺入し、白血球数算定および塗抹標本用にヘパリンを含む試験管へ2 ml, 血清採取用にガラス試験管へ5 ml 採取し, 1時間室温に放置して凝固させたのち上清をさらに $1,000 \times g$ 10分間 0°C にて遠心し, その上清を -80°C にて保存した. 採血したラットはさらに放血致死せしめ, 開胸し胸水を採取したのち4 ml の生理的食塩水にて縦隔, 横隔膜, 壁側胸膜を十分洗浄し, この洗浄液をすべて EDTA 入り試験管に採取した. 初期の実験の一部はこの洗浄を省略した. 採取した胸水は細胞数算定用として一部を EDTA 入り試験管に分注したのち, ただちに $1,000 \times g$, 10分間 0°C にて遠心し上清を -80°C にて保存した.

白血球数算定: 胸水は Tyrode 液 (Ca^{++} free) で21倍に希釈し, 胸腔洗浄液および血液は原液のままさらにメランジュールを用い, チュルク液で希釈したのち改良型ノイパウアー血算板で計測した. 循環血液量は色素希釈法により体重当たりの割合を求め $0.064 \times \text{体重}$ とした. これにより白血球濃度からその流血中総白血球数を算定した.

白血球の分類: 胸水, 血液の塗抹標本を作成し, Wright 染色の後白血球400個について分類し, 百分率を計算した¹⁴⁾. 白血球分類には核の2カ所以上に分葉しているもの, および輪状の核のもので細胞質に橙赤色の顆粒を含んでいないものを好中性多核白血球とし, 細胞質に橙赤色の顆粒を含んでいるものを好酸球として, 多核白血球とは区別した. 単核球とは核がほぼ円形のものを一括したが, そのなかにはリンパ球, 単球, 貪食細胞が含まれると考えられる. 肥満細胞は濃い青紫色に染まり, 他の細胞より大きく脱顆粒しているものもみられ, 単核球とは区別可能であった. 好塩基球はこの経過時間内にはみられなかった.

(4) 補体価測定法

補体価測定は主として Lachmann¹⁵⁾の方法を用いた.

材料: ヒツジ赤血球 (ヒツジ保存血液, 日本バイオテスト社, 東京), 抗ヒツジ赤血球抗体 (CH50 用溶血素, 日本凍結乾燥研究所, 東京), gelatin (Difco 社, USA), zymosan-A (Sigma 社, USA) を用いた.

緩衝液: GVB (gelatin veronal buffer, Mg^{++} $1.76 \times 10^{-3}\text{M}$, Ca^{++} $0.25 \times 10^{-3}\text{M}$, veronal $3.14 \times 10^{-3}\text{M}$, veronal sodium $0.897 \times 10^{-3}\text{M}$, NaCl 8.5%, gelatin 1%), GGVB (glucose gelatin veronal buffer, Ca^{++} $1.76 \times 10^{-3}\text{M}$, Mg^{++} $0.25 \times 10^{-3}\text{M}$, veronal $1.57 \times 10^{-3}\text{M}$, veronal sodium $0.449 \times 10^{-3}\text{M}$, NaCl 8.5%, gelatin 1%, glucose 2.5%), EDTA・GVB (EDTA $10 \times 10^{-3}\text{M}$, veronal $3.14 \times 10^{-3}\text{M}$, veronal sodium $0.897 \times 10^{-3}\text{M}$, NaCl 8.5%, gelatin 1%), PBS (phosphate buffered saline, phosphate 0.2M, NaCl 8.5%) をすべて pH 7.2 に調整して用いた.

感作ヒツジ赤血球 (EA) 作成法: ヒツジ保存血液はすべて採血後1週間以上経過したものを用い¹⁶⁾, 使用期限は4週間以内とした. ヒツジ保存血液を遠心し赤血球のみを得たのち, PBS にて3回洗浄し, EDTA・GVB に10%浮遊液として調整し, 10 MHD (minimal hemolytic dose) の溶血素を赤血球浮遊液と等量の EDTA・GVB に溶解し, これに加え, 4°C にて15分間反応させたのち GGVB にて3回洗浄し, 約2%浮遊液として氷中に保存した. なお, EA の使用期限は2週間とした.

EAC 142 作成法: SPF ラット新鮮血清に zymosan を10 mg/ml の割合で混和し, 37°C 60分間インキュベートしたのち遠心し, 上清を -80°C にて保存し EAC 142 作成に供した. つぎに1% EA 浮遊液に至適濃度の前記 zymosan 処理血清を滴下し, 37°C 5分間反応させたのち GGVB にて3回洗浄し, 1%浮遊液として再調整した. この EAC142 は作成後24時間を使用期限とした.

50%溶血法による補体価測定法: 検体 (血清, 胸水) は 37°C にて融解し, 1分以内に測定に供した. 検体は GVB で希釈したのち, さらに数段階に希釈し, ガラス試験管に $200 \mu\text{l}$ ずつ分注し, 1% EAC 142 浮遊液を $50 \mu\text{l}$ ずつ分注し, 攪拌後 37°C 30分間インキュベートして PBS を $750 \mu\text{l}$ 加え遠心し, 上清の吸光度を415 nm で測定した. すなわち反応容量は $250 \mu\text{l}$ であり, EAC 142, 1.25×10^7 個の50%を溶血させる補体量が1 CH50 unit/ml である. 得られた補体価はさらに同一検体により蛋白質量を Lowry 法により測定し, ミリグラム蛋白質量当たりに換算した.

ヒツジ赤血球のロット差による補体価の変動に対する処理: ヒツジ赤血球にはロットにより反応性の変動があるため正常ラット10匹分の血清をプール血清として分注し, -80°C に保存しておき EAC142 作成時に1,600 units/ml 以下の CH50 値を示す赤血球は測定に用いなかった. またすべての測定に際し, プール血清を同時に測定しその平均値を31.72 units/mg protein としてそれぞれの測定値を補正した.

有意差検定: 有意差の検定には主として t 検定を用いたが, 不ぞろいな分散の場合は Aspin-Welch 法により検定した.

結 果

(1) ラットカラゲニン胸膜炎における補体の活性化

補体価測定法の検討: ラット血清に1/10容のカラゲニンを混和し, ただちに感作血球 (EA) を用いて補体価を測定すると図1aのごとく, その用量反応曲線は対照血清と平行せず, 血清量を増加させても100%溶血を示さなかった. さらに用量を増加させると逆に溶血度は減少した. 胸膜炎惹起後5時間の胸水でもカラゲニン添加血清と同様の用量反応曲線を示し, この方法では測定が不

図1 EA および EAC142 を用いた溶血曲線

ヒッジ感作血球 (EA) (a) および EAC142(b) を用いた溶血曲線を示す。図の縦軸は蒸留水にて完全溶血させた場合を 100% とした各希釈検体 (血清, 胸水) の溶血度。横軸には検体量を対数で表した。control は無添加正常ラット血清。0.2% carr は 2% λ -カラゲニンを 1/10 容の割合で混和したラット血清。5 hr P.E. は胸膜炎惹起後 5 時間の胸水。

図2 *in vitro* におけるカラゲニンによる血清補体価の変動

縦軸は生理的食塩水 100 μl または 200 μl を血清に混和直後に測定した補体価を 100% とし、1/10 容 (100 μl) または 1/5 容 (200 μl) の 2% λ -カラゲニン溶液添加血清の 0 分、30 分および 60 分インキュベーション後の補体価を百分率で表した。control は生理的食塩水添加後の血清補体価の変動を示す。横軸はインキュベーション時間を表している。

能であることが明らかとなった。そこで EAC142 を用いて補体価を測定すると、カラゲニン添加血清は図 1b に示すごとく対照血清の用量反応曲線とほぼ一致し、100% 溶血を示した。胸膜炎惹起後 5 時間の胸水も対照血清の曲線とほぼ平行し、100% 溶血を示した。以上より、カラゲニンを含む血清およびカラゲニン胸膜炎の滲出液の補体価測定は EAC 142 を用いれば可能であることが明らかとなったので以下の実験は EAC 142 による 50% 溶血法を用いて残存補体価を測定した。

in vitro におけるカラゲニンによる補体の活性化: ラット血清に 1/10 容 (0.2%), 1/5 容 (0.4%) の 2% λ -カラゲニンを混和し、混和直後 (0 分), 37°C 30 分間あるいは 60 分間インキュベート後の補体価を測定した (図 2)。血清とカラゲニンをインキュベートしなければ (0 分), 最終濃度 0.2% カラゲニン添加血清では補体価の低下はなく、インキュベーション 30 分後では 16.6%, 60 分後では 27.1% の低下を示した。最終濃度 0.4% カラゲニン添加血清では 0 分では 5.7%, 30 分後では 38.9%, 60 分後では 50.1% の低下を示した。このことよりカラゲニンと血清を 37°C でインキュベートするとカラゲニン濃度およびインキュベーション時間に応じて補体価が低下することがわかった。この事実は *in vitro* においてカ

ラゲニンが補体を活性化することを強く示唆した。

カラゲニン胸膜炎における血清および胸水補体価の変動: 胸膜炎ラットの血清および胸水補体価をその全過程で測定すると、図 3 のごとく血清補体価は無処置の 32.4 units/mg protein に対し、5 時間では 29.0 units/mg protein と有意 ($P < 0.05$) に低下し、さらに 7 時間では 28.1 units/mg protein と有意 ($P < 0.01$) に低下したが、9 時間より投与前値と差がなくなり、24 時間では投与前よりも上昇するように思えたが有意差はなかった。胸水補体価は 1 時間では胸水量が 0.2 ml と少量のため測定不能であったが、5、7 時間ではやや低値を示し、mg 蛋白質量当たりとして表現しても全経過を通じて常に血清補体価より低値を示した。血清補体価と胸水補体価の差をカラムで示すと、3 時間より 14 時間まではほぼ一定 (7.4~8.7 units/mg protein) であった。19 時間以後はやや増加を示したが有意差はなかった。以上により胸腔内で補体が活性化されたと結論することができる。

(2) カラゲニン胸膜炎における補体価と白血球浸潤

カラゲニン胸膜炎における胸水貯留量ならびに胸水中および血中の白血球数の変動: 活性化された補体のラットカラゲニン胸膜炎における役割をみるために胸水貯留

図3 ラットカラゲニン胸膜炎の血清および胸水中補体価の時間経過

縦軸は補体価をmg蛋白質質量当りに換算したものであり、横軸はカラゲニン注射後の時間を示している。各値は血清補体価(●), 胸水補体価(○)の平均値±標準誤差を表す。カラムは血清補体価から胸水補体価を引いた差を平均値±標準誤差で示した。血清補体価は正常ラット血清と比較した。各点近くの数字は動物数を表す。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

量ならびに胸水中および血中の白血球数を算定した。胸水貯留はカラゲニン注射後急激に始まり24時間(4.0±0.5 ml)まで増加し続けた(図5c, 6c参照)。図4のごとく胸水中細胞総数は5時間まで急激に増加し、以後増加率は鈍るが、24時間では 3.1×10^8 個に達した。多核白血球数は3時間から5時間にかけて急激に増加し、以後 1.5×10^8 個のほぼ同じ値を示した。単核球数はほぼ一定の割合で24時間まで増加し 1.5×10^8 個に達した。

流血中白血球総数は5時間まで減少の傾向にあったが有意差はなかった。14時間以後は投与前の約2倍(2.5×10^8)で経過した。単核球数は白血球総数とほぼ同様の経過を示し5時間まで有意($P < 0.05$)に減少し、14時間で増加したのち一定の値(1.8×10^8)を示した。多核白血球数は14時間まで徐々に増加し、以後一定の値(7×10^8)を示した(表1参照)。

補体価、白血球数、胸水量に対する薬物の効果: 補体と白血球浸潤、胸水量との関係を知るためにこれらに影響を与えるつぎの3種の薬物の効果を検索した。

① dexamethasone: dexamethasone (0.3mg/kg) をカラゲニン投与2時間前に腹腔内投与すると図5aのごとく胸水中多核白血球数は3時間では無処置群の 4.1×10^7

図4 ラットカラゲニン胸膜炎における胸水中細胞総数、多核白血球数および単核球数の変動

縦軸は細胞数($\times 10^7$)、横軸はカラゲニン投与後の経過時間を表す。好酸球、肥満細胞は全経過を通じて少量かつ1株のため省略した。totalは総細胞数、PMNは多核白血球数、monoは単核球数を示す。各点近くの数字は動物数を表す。平均値±標準誤差で示した。

個に対し 1.8×10^7 個($P < 0.01$)、5時間では 13.3×10^7 に対し 8.8×10^7 ($P < 0.001$)、7時間では 14.0×10^7 に対し 7.6×10^7 ($P < 0.001$)、9時間では 16.2×10^7 に対し 8.6×10^7 ($P < 0.05$)の各時間において有意に抑制した。胸水中単核球数は7時間のみ 1.8×10^7 に対し 0.9×10^7 と有意($P < 0.05$)の低値を示した。血清および胸水補体価は無処置群に比し若干の低下はあるものの有意の減少は示さなかった(図5b)。胸水貯留量は3時間($P < 0.001$)、5時間($P < 0.001$)、7時間($P < 0.001$)、9時間($P < 0.01$)の各時間において有意に抑制した(図5c)。流血中多核白血球数は表1に示すように5時間では 2.4×10^7 個に対し 4.7×10^7 個($P < 0.05$)とdexamethasone投与群のほうが大きく、9時間では 8.9×10^7 に対し 5.6×10^7 ($P < 0.05$)と逆に小さくなっていた。単核球数は5時間では 5.0×10^7 に対し 2.4×10^7 ($P < 0.001$)、7時間では 5.3×10^7 に対し 1.7×10^7 ($P < 0.01$)、9時間では 7.4×10^7 に対し 2.3×10^7 ($P < 0.001$)と有意の減少を示していた。以上よりdexamethasoneは血清および胸水の補体価に影響を及ぼさず、主として胸水中への多核白血球遊走を抑制すること、および胸水貯留を強く抑制することが明らかとなった。

② benoxaprofen: cyclooxygenaseよりlipoxigenaseを強く抑制するといわれるbenoxaprofen¹⁷⁻¹⁹⁾(50mg/kg)を経口投与すると図6aのように胸水中多核白血球

図5 dexamethasone (DXM, 0.3 mg/kg) 投与による胸水中多核白血球数, 単核球数, 胸水量, 血清および胸水補体価の変動

縦軸はそれぞれ, a: 多核白血球数, b: 単核球数 (いずれも $\times 10^7$), c: 貯留胸水量 (ml), d: 血清ならびに胸水補体価 (mg 蛋白質量当たりで表す). 横軸はカラゲニン投与後の時間. 例数は a, b, c が共通で c に示し, d の血清と胸水が共通で血清値の上に示してある. 平均値 $\pm$ 標準誤差. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

数は3時間では無処置群の 4.0×10^7 個に対し, 3.1×10^7 個, 5時間では 14.6×10^7 に対し 12.4×10^7 , 7時間では 15.0×10^7 に対し 12.6×10^7 と胸膜炎の前半においてそれぞれ低下を示したが, 14 および 19 時間の後半と同じく有意の抑制は示さなかった. 一方, 胸水中単核球数は無処置群において増加を示す7時間では 2.3×10^7 個に対し, 1.0×10^7 個 ($P < 0.001$), 14 時間では 7.2×10^7 に対し, 4.1×10^7 ($P < 0.05$), 19 時間では 10.1×10^7 に対し 4.5×10^7 ($P < 0.001$) とそれぞれ強く抑制し, とくに 19 時間ではその抑制率は 55.6% であった (図

6 b). 血清補体価はすべての時間で無処置群に比し明らかな差はなかった. 胸水補体価は各時間で低下傾向であったが3時間のみ有意 ($P < 0.05$) の低値を示した (図6 b).

胸水貯留量は前半の3時間では無処置群の 0.9 ml に対し 0.5 ml ($P < 0.05$), 5時間では 1.3 ml に対し, 0.9 ml ($P < 0.01$), 7 時間では 2.0 ml に対し 1.3 ml ($P < 0.05$) と有意の低値を示したが, 後半の14, 19時間では明らかな差は認められなかった (図6 c). 流液中多核白血球数には明らかな抑制は示されなかったが, 単核球数は7時

図6 benoxaprofen (BNX, 50 mg/kg) 投与による胸水中多核白血球数, 単核球数, 胸水量, 血清および胸水補体価の変動

縦軸はそれぞれ, a: 多核白血球数, b: 単核球数(いずれも $\times 10^7$), c: 貯留胸水量 (ml), d: 血清ならびに胸水補体価(mg 蛋白質量当たりで表す). 横軸はカラゲニン投与後の時間. 例数は a, b, c が共通で, c に示し, d の血清と胸水が共通で血清値の上に示してある. 平均値 $\pm$ 標準誤差. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

間では無処置群の 10.2×10^7 個に対し 5.9×10^7 個 ($P < 0.05$) と低下し, さらに後半の14時間では 18.6×10^7 に対し 13.1×10^7 ($P < 0.01$), 19時間では 16.7×10^7 に対し, 11.0×10^7 ($P < 0.05$) と有意に抑制した(表1).

以上により benoxaprofen は3時間の胸水を除き補体価の変動に影響を及ぼさないにもかかわらず, 胸水中多核白血球数は有意に抑制しなかったが, 単核球数は7時間および後半の14, 19時間とともに浸潤を抑制し, 胸水貯留は前半の3, 5, 7時間で抑制することが明らかになった. これから benoxaprofen は補体の活性化にほとんど影響を与えず炎症巣への白血球浸潤, とくに単核球

浸潤を強く抑制するとともに前半の胸水貯留を抑制することが示された.

③ 抗補体薬 K-76COONa: 補体成分 C5 に結合し以後の反応進行を抑制するといわれる^{20,21)} K-76 COONa の血清補体価への影響を調べるために1% CMC に浮遊させ 180mg/kg を正常ラットに腹腔内投与し血清補体価を測定すると図7のごとく投与前値の 32.4 units/mg protein に対し, 1時間後では 25.2 units/mg protein ($P < 0.001$) と強く活性化を抑制し, 3時間では 29.0 units/mg protein ($P < 0.01$), 5時間では 28.3 units/mg protein ($p < 0.05$) となり, 投与5時間でも抑制は

表 1 流血中多核白血球数および単核球数に対する dexamethasone (DXM, 0.3 mg/kg, i. p.), benoxaprofen (BNX, 50 mg/kg, p. o.), K-76 COONa (K-76, 180 mg/kg, i. p.) の効果

PMN			Mono	
	non-treated-1	dexamethasone 0.3 mg/kg i. p.	non-treated-1	dexamethasone 0.3 mg/kg i. p.
3 hr	2.6±0.4 (10)	5.6±1.7 (4)	5.8±1.0	3.8±1.3
5 hr	2.4±0.2 (16)	4.7±1.9*(10)	5.0±0.4	2.4±0.3***
7 hr	5.3±1.0 (7)	9.9±3.9 (3)	5.3±0.9	1.7±0.1**
9 hr	8.9±0.3 (4)	5.6±1.5*(3)	7.4±0.5	2.3±0.2***
	non-treated-2	benoxaprofen 50 mg/kg p. o.	non-treated-2	benoxaprofen 50 mg/kg p. o.
3 hr	2.9±0.4 (6)	2.2±0.6 (5)	8.7±0.5	10.9±1.3
5 hr	3.0±0.4 (7)	1.7±0.6 (5)	7.9±0.4	7.3±1.2
7 hr	3.7±1.0 (5)	2.3±0.4 (5)	10.2±1.1	5.9±0.4*
14 hr	7.6±1.3 (7)	5.1±0.6 (5)	18.6±2.1	13.1±1.2**
19 hr	6.0±0.9 (5)	5.7±0.6 (5)	16.7±1.4	11.0±1.9*
	1 % CMC	K-76COONa 180 mg/kg i. p.	1 % CMC	K-76COONa 180 mg/kg i. p.
3 hr	1.7±0.4 (5)	2.3±0.3 (5)	8.4±0.7	7.6±0.6
5 hr	1.5±0.3 (5)	2.7±0.3*(5)	5.6±0.7	5.9±1.0

* P<0.05, ** P<0.01, *** P<0.001

表の上から dexamethasone 投与群, benoxaprofen 投与群, K-76COONa 投与群を示し, 各時間についてそれぞれの無処置群あるいは 1 % CMC 投与群と比較した。() 内の数字は動物数, 平均値±標準誤差で表した。

図 7 K-76COONa (K-76, 180 mg/kg) 投与による血清補体価の変動

縦軸は補体価, 横軸は K-76 COONa 腹腔内注射後の時間を表す。各値は非投与ラットと比較した。平均値±標準誤差の近くの数字は動物数。*P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001

持続することがわかった。

ついでカラゲニン胸腔内注射直後に同量を腹腔内投与すると血清補体価は 1 % CMC のみを投与した対照の 30.9 units/mg protein に対し, K-76 COONa 投与 3 時間後では 26.2 units/mg protein (P<0.05) と有意の低下を示していたが, 胸水補体価に有意差はなかった (図 8 d)。胸水中多核白血球数は 3 時間では対照の 5.0×10^7 個に対し 2.8×10^7 個 (P<0.05), 5 時間では 15.0×10^7 個に対し 12.3×10^7 個 (P<0.05) と有意の低下を示した。3 時間から 5 時間までの増加数をみると, 対照群 10.0×10^7 個に対し投与群 9.5×10^7 個とはほぼ等しく, 3 時間までの増加が抑制されたことを示している (図 8 a)。単核球数には変化はなかった (図 8 b)。胸水貯留量は 3 時間では対照の 0.9 ml に対し投与群の 0.6 ml (P<0.001), 5 時間では 1.3 ml に対し 1.1 ml (P<0.05) と有意の抑制を示した。流血中多核白血球数は 5 時間で対照の 1.5×10^7 個に対し投与群は 2.7×10^7 個 (P<0.05) とむしろ増加し, dexamethasone と類似した傾向を示した。以上により K-76 COONa は補体活性化を抑制し, 3, 5 時間の前半における多核白血球浸潤を抑制し流血中にとどめること, また胸水貯留も抑制することが明らかとなった。

考 察

(1) ラットカラゲニン胸膜炎における補体の活性化 Mayer²²⁾ が 50% 溶血法 (CH50 測定法) による補体価

図8 K-76 COONa (K-76, 180mg/kg) 投与による胸水中多核白血球数, 単核球数, 胸水量, 血清および胸水補体価の変動

縦軸はそれぞれ a: 多核白血球数, b: 単核球数 (いずれも $\times 10^7$), c: 貯留胸水量 (ml), d: 血清ならびに胸水補体価 (mg 蛋白質当たりで表す). 横軸はカラゲニン投与後の時間. 例数は a, b, c, d 共通で 5 例ずつ. 平均値 $\pm$ 標準誤差. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

測定法を確立して以来多くの研究が行われ, 炎症巣たとえば慢性関節リウマチ²³⁾において補体が活性化されていることが知られた. さらにその後 intermediate cell を用いた補体中間成分の測定¹⁵⁾や alternative pathway の測定²⁴⁾も発表されている. 本実験においてまず補体活性を簡便に測定できる50%溶血法を用いて胸水中の補体価およびカラゲニンによる補体活性化の有無を調べようと

したところ, 図1aに示すようにカラゲニンそのものが EA を用いた CH50 測定法を妨害し, この方法では測定が不可能なことが明らかになった. 50%溶血法は感作ヒツジ赤血球と活性化された補体が結合することが前提であるが, カラゲニンは補体成分 C1 に結合し, 感作血球上での classical pathway の活性化を妨害することが報告されている^{25,26)}.

われわれの実験においてもカラゲニン濃度増加とともに溶血度が減少する(図1a)ことから感作血球上での補体の結合が妨害されることを確認した。そこでLachmann¹⁵⁾の方法を用いて以下の実験を行った。この方法はEAを用いる代わりに血清をzymosanで処理しC3以下を枯渇させた血清と感作血球をインキュベートし、感作血球上にC142を結合させたintermediate cell(EAC142)の溶血をみるものである。体液中の残存補体価を測定する場合、このEAC142を用いると、たとえ検体中にカラゲニンが存在して妨害しても、この妨害を飛び越えてC3以下の成分さえあれば赤血球に結合し、補体価を測定することが可能である。事実、0.2%カラゲニン存在下でも、この方法を用いるとカラゲニン添加血清の検量線は無添加血清とほぼ一致(図1b)、カラゲニンを含むと思われる5時間の胸水を用いても対照血清の最大溶血度に一致し、かつ平行した検量線を得ることができた。このことからEAC142を用いた測定法が以下の実験に用いられることが明らかになった。

in vitro でカラゲニン(0.2および0.4%)と正常ラット血清をインキュベートすると、濃度依存的、またインキュベーション時間依存的に補体価が減少し、カラゲニンによって血清補体が活性化される、と結論することができる。さらに免疫電気泳動法を用いると、カラゲニン添加血清のパターンはzymosan添加血清と同じパターンを示し(データは示していない)、この点からも以上の解釈が正しいことを示していた。

カラゲニンを胸腔内注射したあとの各時間で補体価を測定すると、つぎのごとく補体の活性化が胸腔中で起こっている可能性が示された。すなわち胸水蛋白質量は血清の40~80%であるのでmg蛋白質量当りに補正して両補体価を比較すると、胸水中の補体価は常に血清の60.4~73.7%であり(図3)、血漿が胸腔中に漏出したことを考慮すると、明らかに胸腔中で補体が活性化されたと結論することができる。血清補体価が5~7時間で有意の減少を示すことは補体の活性化の影響が逆に血漿中に及ぶことを示し、きわめて興味があるが、なぜこの時間帯のみ補体価が低下するかについては、本実験では結論は得られなかった。

(2) 補体価と白血球浸潤に影響を与える薬物からみた白血球浸潤

① 多核白血球浸潤：胸水中多核白血球数は5時間までに最高に達した後プラトーとなったが、これは浸潤した白血球数とリンパ管を通じて炎症巣を離れる白血球の速度が等しいと解釈することができる。多核白血球浸潤については前の報告¹³⁾でdexamethasoneにより、3時間の多核白血球数が63%抑制され、cyclooxygenaseおよびthromboxane(TX)合成酵素阻害薬を用いた結果から、このうち一部(43%)はthromboxane(TX)合成酵

素生成物で他(20%)はlipoxigenase生成物による可能性が示された。dexamethasoneはmacroscortinあるいはlipomodulinを生成しphospholipase A₂を阻害することによってアラキドン酸の遊離を抑制することが知られている²⁸⁻³¹⁾。本実験でもdexamethasoneによる抑制は3時間で55.9%であり、前の報告¹³⁾とほぼ同様である。しかし5時間のそれは33.9%であり、前回報告¹³⁾(4.2%)と著しく異なる。これは無処置群の値が前回に比べて今回の実験ではやや高いためと思われる。本実験の図5aに示されるようにこの抑制は7時間(46.9%)、9時間(47.3%)でも明らかであり、血清および胸水中の補体価の変動のないこと、すなわち補体活性化の阻害がないことから、3~9時間の多核白血球浸潤の34~56%はアラキドン酸代謝産物によりなされた可能性がある。

benoxaprofenはcyclooxygenaseよりlipoxigenaseをより強く阻害することが知られているが¹⁷⁻¹⁹⁾、この薬物の投与によっても3~7時間の多核白血球数の抑制があり、上の結論を定性的に支持する。しかし抑制は23.4, 16.8, 15.9%(3, 5, 7時間)と少なく、前回報告のlipoxigenase生成物による遊走(約20%)とはほぼ一致し、この薬物によってlipoxigenase生成物による遊走が阻止された可能性を示唆するが、本実験では減少は有意ではなかった。この薬物により14, 19時間の多核白血球数に変動がなかったが、これは薬物の血中濃度低下のためではない。なぜなら10 mg/kg経口投与後の血中濃度は28時間まで保たれ³²⁾、かつ14, 19時間の単核球数が減少していることでも明らかである。したがって胸膜炎の後半(14, 19時間)の多核白血球浸潤はアラキドン酸代謝物によらず、たとえば補体による可能性を示唆する。benoxaprofenにより14, 19時間の胸水貯留量に変動のないことは後半においては血漿蛋白質漏出にもアラキドン酸代謝産物の関与のない³²⁾ことと一致し、前述の多核白血球の結果と一致する。

一方、補体成分C5に結合し補体の活性化を阻害するとされるK-76 COONa^{20, 21)}を正常ラットに投与すると、CH50測定過程において阻害がかかるために少なくとも1, 3, 5時間において補体価が22.1, 10.4, 12.5%低値を示した(図7)。そこで同量をあらかじめ胸膜炎ラットに投与すると、無処置群で血清補体価の低下がない3時間で有意に減少した。しかし胸膜炎ラットの無処置群で補体価の低下が起こっている5時間の血清および活性化が起こったと思われる3, 5時間の胸水では投与群と有意の差は示されなかった(図8d)。これは胸膜炎に伴う補体の活性化が*in vivo*でK-76COONaにより阻害されたことに加えて残存補体価の測定操作中に補体の活性化がK-76COONaにより妨害されたことの相反する結果が重なったためかもしれない。

一方、多核白血球数は42.7% (3時間) および18.3% (5時間) と有意に抑制された (図8a)。胸腔中での補体の活性化が十分抑制された証拠は示されておらず、多核白血球数の減少の程度は少ないが、この炎症モデルにおける多核白血球浸潤に補体の関与がある可能性を示している。また流血中の多核白血球数が3, 5時間、ことに5時間で有意に増加したこと (表1) は、補体活性を抑制することにより多核白血球浸潤が抑制され流血中にとどまると解釈することができる。しかし、この薬物の活性が弱くかつ効果持続が短いために後半 (14, 19時間) の多核白血球浸潤に対する補体の役割を十分明らかにすることはできなかった。

② 単核球浸潤：胸水中の単核球は24時間まで漸時増加する (図4) が K-76COONa の成績から (図8b)、少なくとも3, 5時間での浸潤には補体の関与はあってもわずかであろう。dexamethasone は流血中の単核球数を3時間を除く各時間において有意に減少させるにもかかわらず、胸腔中の単核球数を7時間を除きほとんど減少させない。したがって単核球浸潤にアラキドン酸代謝産物関与の可能性も少ない。しかしながら cyclooxygenase より lipoxigenase を阻害するといわれる benoxaprofen によって7時間 (55.8%) のみでなく、14時間 (42.7%)、19時間 (55.6%) においても有意に抑制された。この事実は benoxaprofen が lipoxigenase 阻害以外の作用によって単核球浸潤を抑制した可能性を示す^{34, 35)} が、lipoxigenase 生成物による走化作用も完全には除去できず、将来選択的 lipoxigenase 阻害薬の開発によって明らかにされると思われる。

③ 胸水貯留：ラットカラゲニン胸膜炎の胸水貯留は3時間より24時間まで漸時増加し、すでに発表された論文¹³⁾ とほぼ同様の値であった。この胸水貯留は1～24時間にわたって血漿カリクレインが活性化され、遊離されたブラジキニンの作用の上に1～5時間における PGE₂ の遊離が重なり急激に胸水貯留が開始することが明らかになっている^{36, 37)}。したがって benoxaprofen により3～7時間の胸水貯留が抑制されたことは当然である。dexamethasone による抑制は、こうしたアラキドン酸代謝物の合成阻害のほかに蛋白質合成を介して5HTやbradykininによる浮腫形成を直接抑制する作用があるので³⁸⁻⁴⁰⁾、胸水貯留はより強く抑制されたと思われる。

K-76COONa についてはアラキドン酸代謝物生成阻害や直接の静脈内皮細胞間隙形成抑制作用があるとは思われないが、補体のフラグメントが血漿漏出を起こすこと、および C5a あるいは FMLP^{41, 42)}、LTB₄⁴³⁾ が多核白血球浸潤を介して血漿漏出を起こすことが報告されているので、その作用があるかもしれない。

結 論

① ラットカラゲニン胸膜炎において3～24時間において胸腔内で補体が活性化された。

② 胸水中多核白血球数は5時間まで急激に増加し、以後24時間までプラトーを示した。単核球数は24時間まで漸時増加した。

③ 多核白血球浸潤の前半 (3～7時間) はアラキドン酸代謝物と補体が関与している可能性がある。これは補体の活性化を抑制する K-76COONa により3, 5時間の浸潤が18～43% 抑制され、アラキドン酸遊離抑制作用もある dexamethasone, lipoxigenase 阻害作用のある benoxaprofen によりそれぞれ34～56% (3～9時間)、15～23% (3～7時間) の抑制が示されたからである。14～19時間の後半の浸潤にはアラキドン酸代謝物の関与はないと思われる。

④ 単核球浸潤の初期 (3～5時間) は K-76COONa, dexamethasone, benoxaprofen のいずれによっても抑制はなく、補体、アラキドン酸代謝物の関与はないと思われるが、7時間は後二者によって抑制され、lipoxigenase 生成物関与の可能性はある。後半の14, 19時間の浸潤には benoxaprofen によって単核球数が有意に抑制され、lipoxigenase 生成物の関与を完全に否定できない。

本研究の遂行にあたり終始ご指導いただいた北里大学医学部整形外科学 山本真教授、同薬理学 鹿取信教授、ならびに多大なるご助言をいただいた同薬理学 田中邦男助教授および薬理学教室の皆さま、岩田雅子技術員に感謝いたします。

文 献

- 1) Boyden, S.: The chemotactic effect of mixtures of antibody and antigen on polymorphonuclear leucocytes. *J. Exp. Med.* 115: 453-466, 1962.
- 2) Hugli, T.E., Müller-Eberhard, H.J.: Anaphylatoxins: C3a and C5a. *Advanc. Immunol.* 26: 1-53, 1978.
- 3) Fernandez, H. N., Henson, P. M., Otani, A., Hugli, T. E.: Chemotactic response to human C3a and C5a anaphylatoxins. *J. Immunol.* 120: 109-115, 1978.
- 4) Boot, J. R., Dawson, W., Kitchen, E. A.: The chemotactic activity of thromboxane B₂. *J. Physiol.* 257: 47-48, 1976.
- 5) Kitchen, E. A., Boot, J. R., Dawson, W.: Chemotactic activity of thromboxane B₂, prostaglandins and their metabolites for polymorphonuclear leucocytes. *Prostaglandins* 16: 239-244, 1978.
- 6) Goetzl, E. J., and Gorman, R. R.: Chemotactic and chemokinetic stimulation of human eosinophil and neutrophil polymorphonuclear leukocytes by 12-L-hydroxy-5, 8, 10-heptadecatrienoic acid (HHT). *J. Immunol.* 120: 526-531, 1978.

- 7) Goetzl, E.J., Woods, J.M., Gorman, R.R.: Stimulation of human eosinophil and neutrophil polymorphonuclear leukocyte chemotaxis and random migration by 12-L-hydroxy-5, 8, 10, 14-eicosatetraenoic acid. *J. Clin. Invest.* 59: 179-183, 1977.
- 8) Goetzl, E.J. and Sun, F.F.: Generation of unique mono-hydroxy-eicosatetraenoic acids from arachidonic acid by human neutrophils. *J. Exp. Med.* 150: 406-411, 1979.
- 9) Ford-Hutchinson, A.W., Bray, M.A., Doig, M.V., Shipley, M.E., Smith, M.J.H.: Leukotriene B₄, a potent chemokinetic and aggregating substance released from polymorphonuclear leukocytes. *Nature* 286: 264-265, 1980.
- 10) Smith, M.J.H., Ford-Hutchinson, A.W., Bray, M.A.: Leukotriene B₄: a potential mediator of inflammation. *J. Pharm. Pharmacol.* 32: 517-518, 1980.
- 11) Ford-Hutchinson, A.W., Bray, M.A., Cunningham, F.M., Davidson, E.M., Smith, M.J.H.: Isomers of Leukotriene B₄ possess different biological potencies. *Prostaglandins* 21: 143-152, 1981.
- 12) Goetzl, E.J., Pickett, W.C.: Novel structural determinants of the human neutrophil chemotactic activity of leukotriene B₄. *J. Exp. Med.* 153: 482-487, 1981.
- 13) 初谷秀二: ラットカラゲニン胸膜炎における多核白血球の遊走に関するアラキドン酸代謝物の役割. *北里医学* 10: 528-538, 1980.
- 14) 金津赫生, 宇高奎二: 実験動物の血液学. ソフトサイエンス社, 1981, p 326-342.
- 15) Lachmann, P.J., Hobart, M.J.: *Handbook of experimental immunology*. Blackwell, 1978, 5A. 1-5A. 23.
- 16) 稲井真彌, 安田玲子: 免疫血清学. 医歯薬出版, 1980, p 585-610.
- 17) Cashin, C.H., Dawson, W., Kitchen, E.A.: The pharmacology of benoxaprofen (2-[4-chlorophenyl]- α -methyl-5-benzoxazole acetic acid), LRCL 3794, a new compound with antiinflammatory activity apparently unrelated to inhibition of prostaglandin synthesis. *J. Pharm. Pharmacol.* 29: 330-336, 1977.
- 18) Walker, J.R., Dawson, W.: Inhibition of rabbit PMN lipxygenase activity by benoxaprofen. *J. Pharm. Pharmacol.* 31: 778-780, 1979.
- 19) Dawson, W., Boot, J.R., Harvey, J., Walker, J.R.: The pharmacology of benoxaprofen with particular reference to effects of lipxygenase product formation. *Eur. J. Rheum. Inflam.* 5: 61-68, 1982.
- 20) Miyazaki, W., Tamaoka, H., Shinohara, M., Kaise, H., Izawa, T., Nakano, Y., Kinoshita, T., Hong, K., Inoue, K.: A complement inhibitor produced by stachybotrys complementi, nov. sp. K-76, a new species of fungi imperfecti. *Microbiol. Immunol.* 24: 1091-1108, 1980.
- 21) Hong, K., Kinoshita, T., Miyazaki, W., Izawa, T., Inoue, K.: An anticomplementary agent, K-76 monocarboxylic acid. *J. Immunol.* 122: 2418-2423, 1979.
- 22) Mayer, M.M.: Complement and complement fixation. *Experimental Immunochemistry*. 2nd ed. Charles C Thomas, Springfield, 1967, p 133-240.
- 23) Pekin, T.J., Zvaifler, N.J.: Hemolytic complement in synovial fluid. *J. Clin. Invest.* 43: 1372-1382, 1964.
- 24) Platts-Mills, T.A.E., Ishizaka, K.: Activation of the alternate pathway of human complement by rabbit cells. *J. Immunol.* 113: 348-358, 1974.
- 25) Davies, G.E.: Inhibition of guinea-pig complement *in vitro* and *in vivo* by carrageenin. *Immunol.* 6: 561-568, 1963.
- 26) Davies, G.E.: Inhibition of complement by carrageenin: Mode of action, effect on allergic reactions and on complement of various species. *Immunol.* 8: 291-299, 1965.
- 27) Borsos, T., Rapp, H.J., Crisler, C.: The interaction between carrageenin and the first component of complement. *J. Immunol.* 94: 662-666, 1965.
- 28) Blacwell, G.J., Carnuccio, R., Di Rosa, M., Flower, R.J., Parente, L., Persico, P.: Macrocortin: a polypeptide causing the antipholipase effect of glucocorticoid. *Nature* 287: 147-149, 1980.
- 29) Flower, R.J., Blackwell, G.J.: Anti-inflammatory steroids induce biosynthesis of a phospholipase A₂ inhibitor which prevents prostaglandin generation. *Nature* 278: 456-459, 1979.
- 30) Carnuccio, R., Di Rosa, M., Persico, P.: Hydrocortisone-induced inhibitor of prostaglandin biosynthesis in rat leucocytes. *Br. J. Pharmacol.* 68: 14-16, 1980.
- 31) Hirata, F., Shiffmann, E., Venkatasubramanian, K., Salomon, D., Axelrod, J.: A phospholipase A₂ inhibitory protein in rabbit neutrophils induced by glucocorticoids. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77: 2533-2536, 1980.
- 32) Harada, Y., Tanaka, K., Uchida, Y., Ueno, A., Oh-ishi, S., Yamashita, K., Ishibashi, M., Miyazaki, H., Katori, M.: Changes in the levels of prostaglandins and thromboxane and their roles in the accumulation of exudate in rat carrageenin-induced pleurisy. *Prostaglandins* 23: 881-895, 1982.
- 33) Chatfield, D.H., Green, J.N.: Disposition and metabolism of benoxaprofen in laboratory animals and man. *Xenobiotica* 8: 133-144, 1978.
- 34) Meacock, S.C.R., Kitchin, E.A., Dawson, W.: Effects of benoxaprofen and some other non-steroidal anti-inflammatory drugs on leucocyte migration. *Eur. J. Rheum. Inflam.* 3: 23-28, 1979.
- 35) Meacock, S.C.R., Civil, G.W., Dawson, W., Kitchin, E.A.: Studies on leucocyte-drug inter-

- ction with benoxaprofen. *Eur. J. Rheum. Inflam.* 5: 51-60, 1982.
- 36) Katori, M., Ikeda, K., Harada, Y., Uchida, Y., Tanaka, K., Oh-ishi, S.: A possible role of prostaglandins and bradykinin as a trigger of exudation in carrageenin-induced rat pleurisy. *Agents and Actions* 8: 108-112, 1978.
 - 37) Katori, M., Uchida, Y., Oh-ishi, S., Harada, Y., Ueno, A., Tanaka, K.: Involvement of plasma kallikrein-kinin system in rat carrageenin-induced pleurisy. *Eur. J. Rheum. Inflam.* 2: 217-219, 1979.
 - 38) Tsurufuji, S., Sugio, K.: Molecular mechanism in the manifestation of anti-inflammatory activity of glucocorticoids. *Eur. J. Rheum. Inflam.* 1: 226-231, 1978.
 - 39) Tsurufuji, S., Sugio, K., Takemasa, F.: The role of glucocorticoid receptor and gene expression in the anti-inflammatory action of dexamethasone. *Nature* 280: 408-410, 1979.
 - 40) Tsurufuji, S., Sugio, K., Takemasa, F., Yoshizawa, S.: Blockade by antiglucocorticoids, actinomycin D and cycloheximide of anti-inflammatory action of dexamethasone against bradykinin. *J. Pharmac. Exp. Therap.* 212: 225-231, 1980.
 - 41) Williams, T.J., Jose, P.J.: Mediation of increased vascular permeability after complement activation. *J. Exp. Med.* 153: 136-153, 1981.
 - 42) Wedmore, C.V., Williams, T.J.: Control of vascular permeability by polymorphonuclear leukocytes in inflammation. *Nature* 289: 646-650, 1981.
 - 43) Björk, J., Hedqvist, P., Arfors, K.: Increase in vascular permeability induced by leukotriene B₄ and the role of polymorphonuclear leukocytes. *Inflammation* 6: 189-200, 1982.