グリコーゲン誘発腹膜炎マウスの腹腔内滲出液 および血液内白血球の経時変化

山下辰久・石橋芳雄・長岡 功・粕谷恵子・益田佳織*, 藤 治言・塩川優一**

Changes in leukocytes in peritoneal exudates and blood and vascular permeability of mice after glycogen administration Kinetics of inflammatory cell accumulation in mice in response to glycogen and influence of protease inhibitors and anti-inflammatory drugs were studied. Leukocytes in blood maximally increased at 2 hr after glycogen injection. The maximum cell accumulation in the peritoneal cavity was observed at 8 hr, whereas the protein content in the peritoneal exudate reached the maximum level at 1~2 hr and then decreased. Among drugs examined, indomethacin and dexamethasone suppressed markedly the accumulation of white cells and protein exudation.

Tatsuhisa Yamashita・Yoshio Ishibashi・Isao Nagaoka・Keiko Kasuya・Kaori Masuda*,
Haruaki Warabi・Yuichi Shiokawa**

Department of Physiological Chemistry*, Department of Internal Medicine**, Juntendo University, School of Medicine

現在、炎症機構に関してさまざまな角度からの研究がなされており、起炎剤の違いにより炎症の発現機構が異なることも知られている。一方、従来より実験動物からの好中球の調製法として glycogen を起炎剤とした炎症が用いられているが¹⁻⁵⁾、この glycogen 誘発炎症の発現機構に関する研究はほとんど行われていない。そこで glycogen 刺激による炎症の機構を解明するため、glycogen 誘発炎症モデルを作成し、その経時の変化を調べ、さらに各種蛋白質分解酵素阻害剤および抗炎症剤を用いてその抑制効果を検討した。

材料と方法

(1) 実験動物

体重約25~30 g の雄性 ddy 系マウス（6週齢）を使用した。

(2) 起炎剤

0.9% NaCl 溶液で調製した15% glycogen 溶液を用いた¹⁾。

(3) 炎症モデルの作成および腹腔内滲出液と血液の採取

マウスに起炎剤として15% glycogen 溶液 1.0 ml を腹腔内投与し、経時的にエーテル麻酔下で血液と腹腔内滲出液を採取した。すなわち、血液は抗凝固剤として

1.5% EDTA-PBS (pH 7.4) を採取する血液の1/10量用いて心臓より採取した。また、腹腔内滲出液は、腹腔内に0.4% クエン酸ナトリウム - 0.8% NaCl 溶液を5.0 ml 投与し、腹部を軽くもんでから採取した。採取した血液および腹腔内滲出液中の白血球数を算定し、それぞれ塗抹標本（Wright-Giemsa 染色）を作製して白血球百分率を求めた。また、血管透過性の指標として腹腔内滲出液の上清の蛋白量を Biuret 法で、白血球遊走活性を Boyden chamber 法¹⁾により、それぞれ測定した。

(4) 蛋白分解酵素阻害剤と抗炎症剤

低分子性蛋白分解酵素阻害剤として N- α -tosyl-L-lysine chloromethyl ketone (TLCK), L-1-tosyl-amido-2-phenylethyl chloromethyl ketone (TPCK), moniodoacetamide を、ペプチド性蛋白分解酵素阻害剤として pepstatin, leupeptin, chymostatin を、さらに高分子性蛋白分解酵素阻害剤として trasylol, soybean trypsin inhibitor を用いた。また抗炎症剤として diphenhydramine, indomethacin, dexamethasone, colchicine を用いた。種々の濃度の溶液 1 ml を glycogen 投与と同時に腹腔内投与し、6時間後における腹腔内細胞浸潤と血管透過性を測定することによりその効果を判定した。

結果と考察

(1) glycogen 誘発炎症の経時変化

まず、glycogen 投与後の腹腔内滲出液中における白

* 順天堂大学医学部生理化学教室

** 同 膠原病内科学教室

表 1 effect of alkylating agents on glycogen-induced inflammation of mice

agents	n	permeability (mg protein)	accumulation ($\times 10^{-6}$ cells)
vehicle (PBS)	(8)	7.63 ± 4.16	23.16 ± 16.93
monoiodoacetamide (10 μ moles/mouse)	(7)	$34.77 \pm 13.19^{**}$	11.16 ± 6.88
TLCK (5 μ moles/mouse)	(7)	$33.21 \pm 6.95^{**}$	11.21 ± 4.29
TPCK (50 μ moles/mouse)	(5)	12.18 ± 2.76	25.20 ± 13.29

** $P < 0.01$

図 1 time course of accumulation of WBC in the peritoneal cavity of mice treated with glycogen

白血球数の変動を調べた (図1). その結果, 腹腔内の白血球総数は glycogen 投与1時間後にわずかに減少するが, その後腹腔内への急激な細胞浸潤が起り, これは投与後約8時間でピークに達し, その後徐々に減少した. この細胞浸潤は, 主に好中球の滲出に基づくものであることがわかった. 一方, マクロファージはglycogen投与1時間後に著明な減少が認められたが, その後徐々に増加し8時間でピークに達したのち, 42時間まで同じレベルを保った. しかし, リンパ球には著明な変化は認められなかった.

さらにこれと平行して末梢血中の白血球数の変動を調べた (図2). その結果, 腹腔内への好中球滲出に先立って, 末梢血中の好中球は, 投与2時間後にすでに正常値の4倍という著しい増加を起していることがわかったが, 末梢血中のリンパ球および単球には有意な変化は認められなかった. またさらに, 腹腔内滲出液中の蛋白量を血管透過性の指標として調べた結果, glycogen投与後1~2時間に顕著な血管透過性の亢進が起り, これと同時に, 滲出液中の白血球遊走活性が亢進することが明らかになった.

これらの結果より, glycogen 誘発炎症では, glycogen 投与2時間後に血中の好中球数が増加し, 続いて6時間

図 2 time course of variation of WBC in the blood of mice treated with glycogen

後に炎症局所への好中球の集積が起こるという急性炎症の経過をたどることが明らかになった.

(2) 各種蛋白分解酵素阻害剤および抗炎症剤の glycogen 誘発炎症に及ぼす効果

炎症反応には種々の蛋白分解酵素が関与していることが知られている⁶⁻⁸⁾. そこで各種蛋白分解酵素阻害剤を用いて, glycogen 誘発炎症におけるそれらの抑制効果を調べた. まずアルキル化剤として chymotrypsin 様酵素阻害剤である TPCK, trypsin 様酵素阻害剤である TLCK および SH プロテアーゼ阻害剤である monoiodoacetamide を用いた場合 (表1), 白血球集積および血管透過性に対する抑制作用は認められず, 逆に血管透過性が亢進した. これは, これらの試薬によって広範囲な組織障害が引き起こされたためではないかと考えられる. また, 高分子性蛋白分解酵素阻害剤として trasylol および soy bean trypsin inhibitor を用いた場合 (表2), 炎症抑制作用は認められなかった. 一方, 低分子性蛋白分解酵素阻害剤として pepstatin, leupeptin, chymostatin をそれぞれ用いた場合, chymotrypsin 様酵素阻害剤である chymostatin のみに血管透過性の抑制効果が認められた. これらの結果より, カラゲニンやクロトン油を起炎剤として用いた炎症反応に対する蛋白分解酵素阻害剤の作用の違いから⁹⁾, glycogen 誘発炎症には, それら炎症反応とは異なる炎症プロテアーゼが関与している可能性が示唆された.

つぎに従来より 繁用されている 抗炎症剤として diphenhydramine, indomethacin および dexamethasone

表 2 effect of some protease inhibitors and anti-inflammatory drugs on glycogen-induced inflammation of mice

agents	n	permeability (mg protein)	accumulation ($\times 10^6$ cells)
vehicle (PBS)	(27)	11.35 $\pm$ 1.36	40.25 $\pm$ 4.58
pepstatin (100 μ g/mouse)	(7)	13.46 $\pm$ 4.39	33.71 $\pm$ 15.83
leupeptin (100 μ g/mouse)	(7)	9.64 $\pm$ 4.77	31.86 $\pm$ 14.78
chymostatin (100 μ g/mouse)	(7)	7.33 $\pm$ 1.27*	31.86 $\pm$ 7.49
trasylol (100 KIU/mouse)	(6)	10.33 $\pm$ 3.52	30.40 $\pm$ 20.61
soy bean trypsin inhibitor (100 μ g/mouse)	(6)	8.98 $\pm$ 3.43	34.50 $\pm$ 12.76
diphenhydramine (500 μ g/mouse)	(5)	10.79 $\pm$ 5.27	22.86 $\pm$ 11.47
indomethacin (500 μ g/mouse)	(6)	5.22 $\pm$ 2.75**	20.17 $\pm$ 6.18**
dexamethasone (50 μ g/mouse)	(14)	6.04 $\pm$ 2.93**	28.37 $\pm$ 11.73*

*P<0.05, **P<0.01

表 3 effect of colchicine on glycogen-induced inflammation of mice

agents	n	permeability (mg protein)	accumulation ($\times 10^6$ cells)
vehicle (PBS)	(13)	11.14 $\pm$ 6.18	61.15 $\pm$ 26.77
colchicine (20 μ g/mouse)	(8)	10.42 $\pm$ 4.98	51.13 $\pm$ 29.03
colchicine (200 μ g/mouse)	(12)	17.17 $\pm$ 5.66*	20.04 $\pm$ 15.58**

*P<0.05, **P<0.01

を用いてその抑制効果を調べた場合、抗ヒスタミン剤である diphenhydramine は白血球集積および血管透過性亢進のいずれにも抑制作用は認められなかった。一方、indomethacin および dexamethasone では白血球集積および血管透過性亢進ともに有意な抑制効果が認められた。近年、炎症時において、細胞膜のリン脂質中に含まれるアラキドン酸などの不飽和脂肪酸が、phospholipase A₂ の作用により遊離し、さらに cyclooxygenase などの働きにより各種 prostaglandin を生成する過程、あるいは lipooxygenase の働きにより各種 leukotriene を生成する過程がそれぞれ明らかになり、これらの代謝産物が炎症のメディエーターとなり、白血球遊走、血管透過性亢進を引き起こすことが知られている¹⁰⁻¹³⁾。また、indomethacin は cyclooxygenase を阻害することにより prostaglandin の生成を阻害し¹⁴⁾、dexamethasone は phospholipase A₂ を阻害することにより cyclooxygenase、lipooxygenase を介する両経路とも阻害することが知られており¹⁵⁾、以上のことから、glycogen 誘発炎症においてもこれら prostaglandin 系および leukotriene 系の産物がメディエーターとして関与している可能性が示唆された。

また、痛風治療薬である colchicine を用いた場合(表 3)、白血球集積は顕著に抑制されたが、逆に血管透過性の亢進は高まってしまった。colchicine の作用は白血球の運動に関与する microtubules を脱重合させることにより白血球の遊走を阻害する¹⁶⁾。一方、prostaglandin synthetase を活性化する作用があることが報告されてい

る¹⁰⁾。今回認められた血管透過性の亢進もそのためによるものと考えられる。

glycogen 誘発炎症の炎症発現機構をさらに詳しく解明するために、細胞レベルおよび生化学的なレベルで検討することが今後の課題として残されている。

本研究の一部は、順天堂大学プロジェクト研究費(No. 8102)ならびに武田科学振興財団研究奨励金の援助により行われた。

文 献

- 1) Yamashita, T., Imaizumi, N., Yuasa, S.: Effect of endocellular cryoprotectant upon polymorphonuclear neutrophil function during storage at low temperature. *Cryobiology* 16: 112-117, 1979.
- 2) Yamashita, T., Takamori, K., Tanaka, Y.: A possible preferential inhibition of chemotaxis of polymorphonuclear neutrophils by a chemical modification. *Experientia* 35: 1345-1347, 1979.
- 3) Yamashita, T., Tanaka, Y., Matsuzawa, H.: Cytoplasmic and plasma membrane adenosine triphosphatase of polymorphonuclear neutrophils. Comparison of their enzymatic properties and attempt for a direct determination of myosin ATPase activity using polymorphonuclear neutrophil extract. *Biochim. Biophys. Acta* 599: 246-253, 1980.
- 4) Ishibashi, Y., Yamashita, T.: Generation of a phagocytosis-stimulating factor by polymorphonuclear neutrophils during phagocytosis. *Int.*

- Archs. Allergy Appl. Immun. 64: 181-189, 1981.
- 5) Nagaoka, I., Yamashita, T.: Inactivation of phagocytosis-stimulating activity of tuftsin by polymorphonuclear neutrophils. A possible role of leucine aminopeptidase as an ecto-enzyme. *Biochim. Biophys. Acta* 675: 85-93, 1981.
 - 6) Hayashi, H.: The intracellular neutral SH-dependent protease associated with inflammatory reactions. *Int. Rev. Cytol.* 40: 101-151, 1975.
 - 7) Movat, H.Z.: Kinins and kinin system as inflammatory mediators. *In: Chemical Messengers of the Inflammatory Process.* ed. by Houck, J. C., Elsevier/North-Holland Biomedical Press, Amsterdam, The Netherlands., 1979, pp 47-112.
 - 8) Gleisner, J.M.: Lysosomal factors in inflammation. *In: Chemical Messengers of the Inflammatory Process.* ed. by Houck, J.C., Elsevier/North-Holland Biomedical Press, Amsterdam, The Netherlands, 1979, pp 229-260.
 - 9) 藤井節郎・他：実験炎症モデルにおける蛋白分解酵素の動態. *炎症* 3: 367-375, 1981.
 - 10) Moncada, S., Ferreira, S.H., Vane, J.R.: Prostaglandins, aspirin-like drugs and the oedema of inflammation. *Nature* 246: 217-219, 1973.
 - 11) Lewis, A.J., Nelson, D.J., Sugrue, M.F.: On the ability of prostaglandin E_1 and arachidonic acid to modulate experimentally induced oedema in the rat paw. *Brit. J. Pharmacol.* 55: 51-56, 1975.
 - 12) Turner, S.R., Tainer, J.A., Lynn, W.S.: Biogenesis of chemotactic molecules by the arachidonate lipoxygenase system of platelets. *Nature* 257: 680-681, 1975.
 - 13) Smith, M.J.H., Ford-Hutchinson, A.W., Bray, M.A.: Leukotriene B: a potential mediator of inflammation. *J. Pharm. Pharmacol.* 32: 517-518, 1980.
 - 14) Vane, J.R.: Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs. *Nature New Biol.* 231: 232-235, 1971.
 - 15) Flower, R.J., Blackwell, G.J.: Anti-inflammatory steroids induce biosynthesis of a phospholipase A_2 inhibitor which prevents prostaglandin generation. *Nature* 278: 456-459, 1979.
 - 16) Malawista, S.E., Bensch, K.G.: Human polymorphonuclear leukocytes: Demonstration of microtubules and effect of colchicine. *Science* 156: 521-522, 1967.