カオリン空気嚢炎症

——ブラジキニンの関与——

熊倉誠一郎・鶴藤 丞*

*Kaolin induced air-pouch inflammation;
role of bradykinin
Sei-ichiro Kumakura・Susumu Tsurufuji**

ブラジキニンはその定量が困難であるため炎症のケミカルメディエーターとしての直接的証明は得られていなかった。そこでわれわれは、ハーゲマン因子の活性化において異種表面となりうるカオリンを用いてラットに空気嚢炎症を惹起し、炎症滲出液中のブラジキニンレベルを測定することにより、炎症の場におけるブラジキニンの役割を検討した。

なお、この研究は大日本製薬総合研究所 黒岡繁、砂原憲之両氏との協同研究によるものである。

方 法

(1) 動 物

Sprague-Dawley 系雌性ラット 6 週齢 (体重 170 g 前後) を使用した。

(2) カオリン空気嚢炎症モデルの作成

ラット背部皮下に空気 7 ml を注入することによって空気嚢を作成し、翌日カオリンを 0.8% carboxymethyl cellulose (CMC-Na)-saline 溶液に 10mg/ml の割合で懸濁し、その 4 ml を空気嚢内に注入することにより炎症を惹起した。

(3) 血管透過性測定法

トレーサーとしてフルオレスセイン標識ウシ血清アルブミン (F-BSA) を用いた¹⁾。

F-BSA を 100 mg/ml の割合で saline に溶解し、その 0.2 ml を尾静脈注射する。一定時間後ラットを脱血死させ空気嚢内液全量を採取し、注射量の何%が嚢内液中に漏出したかを計算し血管透過性の指標とした。

(4) ブラジキニンの定量

ブラジキニン定量のための滲出液は soybean trypsin inhibitor (SBTI), アプロチニン, EDTA, o-フェナンスロリン, ポリブレンをあらかじめ入れておいたプラスチックシリンジで脱血前に空気嚢より 1 ml 採取し、ただちにエタノールで抽出を行った²⁾。エンザイムイムノ

extraction and EIA procedure

exudate 1ml
↓ added 2ml EtOH
↓ 0°C for 1hr
↓ 2500g, 15min
↓ sup
↓ evaporated
dried sample
↓ 50mM Tris buffer 200μl
↓ TCTFE 50μl
↓ 2500g, 15min
↓ decanted
sup 200μl

sample 100μl
β-D-galactosidase labeled BK 50μl
anti-BK Ab 50μl
buffer 200μl

↓ 0°C for 1hr
↓ protein A 100μl
↓ 0°C for 30min
↓ 1500g, 10min
↓ sup
↓ 37°C for 3min
↓ substrate 300μl
↓ 37°C for 2hr
↓ 0.2M sodium phosphate-NaCl (pH 10.3) 3ml
Ex. 365nm
Em. 448nm

TCTFE: 1, 1, 2-trichloro-trifluoro ethane

substrate: 4-methylumbelliferyl β-D-galactoside

図 1

アッセイは、標識酵素に β-D-ガラクトシダーゼ、B/F 分離にはプロテイン A 結合細菌細胞壁を用いるほか、北里大学 内田泰弘博士らの開発した方法に準じて行い、測定用キットは大日本製薬より供与いただいた (図 1)。

結果と考察

カオリン炎症の血管透過性は惹起直後の 0~10 分にピークを示すことが確かめられた。値は 1.16% であった。またブラジキニンも惹起から 10 分ごとに測定を行ったところ、10 分の時点では約 1 ng (10⁻⁹M) という値を示し、20 分ではすでに検出限界以下に低下し、以後 4 時間まで上昇することはなかった。

その 0~10 分の血管透過性ならびに 10 分の時点でのブラジキニン量に対し、キニナーゼインヒビターの効果を検討した。キニナーゼ I のインヒビターとしては、DL-2-mercaptopomethyl-3-guanidinoethylthiopropionic acid を 0.1 mg/pouch (0.1 mM), キニナーゼ II のインヒビターとしては captopril (SQ 1422.5) を 0.2 mg/pouch (0.2 mM) の局所投与で用いた。その結果、カオリン炎症惹起後 10 分における約 1 ng のブラジキニンはキニナーゼ I のインヒビターで 4 倍、captopril で 8 倍、それらの併用で 15 倍にまで上昇し、そのときの血管透過性は有意な増強を示した。

またカリクレイン-キニン系のインヒビターである SBTI の効果を検討したところ、8.4 mg/pouch (10⁻⁴M)

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

の局所投与により10分の時点でのブラジキニンレベルは約80%抑制され、0～10分の血管透過性もパラレルに抑制された。さらに、SBTIを投与しておいた場合キニナーゼインヒビターによるブラジキニンレベル、血管透過性の上昇はまったく起こらなくなった。すなわち SBTIは8.4 mgの局所投与でブラジキニン産生を完全に抑制するものと考えられる。

これらの結果より、カオリン炎症惹起直後の血管透過性亢進にはブラジキニンがその主要なメディエーターになっていることが示唆された。

つぎに惹起後3時間半から4時間の時点で同様な実験を行った。F-BSAならびに種々の薬物は3時間半の時点で投与し、4時間の時点でブラジキニンレベル、血管透過性を測定した。惹起後4時間ではカオリン炎症でブラジキニンはほとんど検出されなかったが、キニナーゼIのインヒビターならびにcaptoprilによってブラジキニンレベルは上昇し、血管透過性も平行して上昇した。しかし SBTIを同時に投与するとキニナーゼインヒビターによるブラジキニンレベル、血管透過性の上昇は起こらなかった。また SBTI 単独投与でカオリン炎症の血管透過性はまったく抑制されなかった。すなわち、この時間帯においてブラジキニンは産生されてはいるものの、滲出液中のキニナーゼによりただちに分解を受け、血管透過性に直接影響を与えていないと考えられる。

図2に炎症滲出液によるブラジキニンの分解を示した。滲出液はCMC炎症惹起後4時間のものを用い、ブラジキニンを10 ng 添加し37°Cでインキュベーションを行った。この結果、10 ngのブラジキニンはインキュベーションと同時に分解を受け、1分で完全に分解さ

図 2

れた。

以上まとめると、カオリン炎症においてブラジキニンは惹起直後にピークを示し、以後急速に減少した。その急速な減少は、滲出反応に伴うキニナーゼ活性の上昇により、産生されてもただちに分解されるためであると考えられる。この結果は、ブラジキニンが血管透過性反応に対し長時間直接作用する可能性を否定するものであると思われる。

文 献

- 1) Watanabe, K., Nakagawa, H., Tsurufuji, S.: A new sensitive fluorometric method for measurement of vascular permeability. J. Pharmacol. Method 11: 167-176, 1984.
- 2) 南 勝・他：循環器疾患患者の血漿ブラジキニン濃度について、日本薬理学雑誌 82: 159-169, 1983.