zymosan-空気嚢炎症における急性期血管透過性亢進の解析

今野 聡・鶴藤 丞*

Analysis of the mechanism of zymosan-induced inflammation in rats

Satoshi Konno・Susumu Tsurufuji*

われわれは、前日作製しておいた空気嚢内に、補体系の alternative pathway を活性化作用をもつ酵母細胞壁多糖質 zymosan を注入することにより強い炎症反応を引き起こすことができることを報告した¹⁾。今回は、この zymosan-空気嚢炎症モデルにおいて認められる急性期血管透過性亢進反応に、いかなるメディエーターが関与するかについて検討した。

方 法

(1) 動 物

実験動物は、Sprague-Dawley 系雄性ラット (SPF, 6 週齢, 体重140~210 g, 日本チャールズ・リバー社) を使用した。

(2) zymosan-空気嚢炎症

前日作製しておいた空気嚢(空気 8 ml)内に、zymosan を 1.6% (w/v) に懸濁させた 0.8% (w/v) sodium carboxymethyl cellulose (CMC) 溶液を 4 ml 注入して炎症を惹起した。また control 群では、0.8% CMC 液を 4 ml 注入した。

(3) compound 48/80-空気嚢炎症

前日作製しておいた空気嚢内に、肥満細胞の脱顆粒を引き起こす作用をもつ compound 48/80 (0.1~3 μ g/ml) を 0.8% CMC 液に溶解させ、これに 4 ml 注入して炎症を惹起した。

(4) ヒスタミン、セロトニンの枯渇

ラットの組織中のヒスタミン、セロトニンの枯渇は、Spector と Willoughby²⁾, Feldberg と Talesnik³⁾の方法に従い、compound 48/80 の連続投与により行った。0.1% (w/v) の濃度に compound 48/80 を溶解させた生理食塩水を初日の夕方から 6 回毎朝夕 0.6 mg/kg を腹腔注射し、後 2 回 1.2 mg/kg を腹腔注射した。炎症の惹起は最終 compound 48/80 投与から 5 時間後に行った。

(5) ヒスタミンの定量

採取された滲出液に PBS(-) を加えて 2 倍希釈した

後、遠心分離 (2,000 $\times$ g, 20 分, 4°C) を行って細胞を含まない滲出液を得る。この滲出液に 2 倍量の 0.4 N HClO₄ を加え、遠心分離 (2,000 $\times$ g, 1 時間) を行って得た上清について、Shore らの方法を一部改良した von Redlich らの方法⁴⁾に従い、抽出後、蛍光法にてヒスタミンの定量を行った。

(6) 血管透過性の測定

炎症惹起後、Fluorescein-標識 ウシ血清アルブミン (F-BSA) 20 mg/0.2 ml を尾静脈より注入し、30 分後に頸動脈切断により脱血死させ、滲出液を採取する。(5) の操作により得た 2 倍希釈滲出液一定量の蛍光強度より滲出液中の総蛍光強度を測定し、注射量の何%が滲出液中に漏れ出たかを計算し、血管透過性の指標とした。

(7) 組織標本の作製

炎症惹起 30 分後にラットを脱血死させ、pouch を形成している部位の皮膚を 10% 中性ホルマリン液にて 4°C 48 時間固定し、以後型どおりの方法により組織標本を作製し、トリジンブルー染色を施した。

図 1 time changes of the histamine level in the pouch fluid and plasma exudation into the pouch fluid in zymosan-air-pouch inflammation

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

図2 correlation of the histamine level in the pouch fluid with the plasma exudation into the pouch

(8) 薬物

抗ヒスタミン剤 pyrilamine (30 μg/ml), 抗セロトニン剤 methysergide (7.5 μg/ml) は, zymosan または compound 48/80 を含む CMC 液に溶解させて, 炎症惹起と同時に局所に投与した. 血漿カリクレイン阻害作用をもつ soybean trypsin inhibitor (SBTI), angiotensin converting enzyme (kininase II) 阻害剤 SQ 14225 は, 炎症惹起直後に, それぞれ局所濃度が 10^{-4} M, 50 μg/ml となるように投与した. cyclo-oxygenase 阻害剤, indomethacin (15 mg/kg) は, 炎症惹起1時間前に経口投与した.

結果と考察

(1) zymosan-空気嚢炎症における滲出液中のヒスタミン量, 血管透過性亢進の経時変化

図1に示したように, control として0.8% CMC 液を注入した群では, ヒスタミン量 (a) ならびに血管透過性 (b) が, 炎症惹起後6時間まで低い値を示したのに対し, zymosan 注入群では, ヒスタミン量, 血管透過性がともに惹起後30分にピークを示し, 惹起後1時間ではヒスタミンが約1/4, 血管透過性が約1/2に低下することが明らかとなった.

また, 炎症惹起30分後の組織標本では, zymosan 群においてのみ肥満細胞の脱顆粒が観察され, zymosan 炎症において惹起直後に滲出液中に検出されるヒスタミンは, 肥満細胞の脱顆粒によって放出されたものであることが確認された.

以上の結果より, 肥満細胞より放出されたヒスタミン, セロトニンが, zymosan-空気嚢炎症における, 惹起直後の著しい血管透過性の亢進に関与する可能性が示

唆された.

(2) 血管透過性亢進における, 肥満細胞より放出されるメディエーターの役割の検討

① zymosan 誘発炎症と compound 48/80 誘発炎症との比較: 肥満細胞の脱顆粒を引き起こす物質としてよく知られている compound 48/80 を使用して, 滲出液中のヒスタミンと血管透過性との関係について検討した. zymosan 群と同程度のヒスタミン放出を引き起こした 1 μg/ml の compound 48/80 による血管透過性値は, zymosan 群の約1/2までしか上昇しなかった(図2). また, ヒスタミン, セロトニンを枯渇されたラットにおいてヒスタミン (30 μg/ml) によって誘発された血管透過性の亢進を, compound 48/80 は抑制しないことが確認され, compound 48/80 には非特異的に血管透過性を抑制する作用のないことが確認された.

② ヒスタミン, セロトニン枯渇ラットにおける炎症反応: compound 48/80 を前処置することによって, 組織中のヒスタミン, セロトニンを枯渇したラットにて, zymosan, compound 48/80 によって炎症を惹起したとき, 滲出液中に放出されたヒスタミンは, 未処置ラット群において zymosan, compound 48/80 によって放出されたヒスタミンの約1/10まで低下していた. このようにヒスタミン, セロトニンが枯渇された条件のもとでは, compound 48/80 (1 μg/ml) による血管透過性は, 0.8% CMC 注入群と同程度まで低下したにもかかわらず, zymosan によって誘発された血管透過性は, compound 48/80 注入群の約3倍の値を示した.

③ pyrilamine, methysergide の併用効果: アレルギ一性空気嚢炎症にて十分に抑制効果を示した⁵⁾, 抗ヒスタミン剤 pyrilamine (30 μg/ml) 抗セロトニン剤 me-

thysergide (7.5 $\mu\text{g/ml}$)の併用により, compound 48/80 (3 $\mu\text{g/ml}$) 注入群では, その血管透過性亢進が非常に強く抑制されたにもかかわらず, zymosan 注入群の血管透過性の亢進は, 約50%程度しか抑制されなかった.

①②③の結果より, zymosan 炎症における惹起後30分間の血管透過性の亢進には, ヒスタミン, セロトニン以外に, 他のメディエーターも関与することが強く示唆された.

(3) ブラジキニン・プロスタグランディン関与の検討
zymosan 炎症における血管透過性は, SQ 14225 (50 $\mu\text{g/ml}$) 局所投与によって有意に増強されたが, カオリン炎症にて十分に効果を示した SBTI (10^{-4}M) 局所投与によって有意な抑制が認められなかったため, ブラジキニンの産生は起きているものの分解が速いため, ほとんど血管透過性亢進には関与していないと考えられた. また, 血管透過性の亢進は, インドメタシン (15 mg/kg) の1時間前経口投与によって有意な変化が認められず, プロスタグランディンの関与は, ほとんどないものと考えられた.

結 論

zymosan-空気嚢炎症における炎症惹起後30分間に認められる血管透過性の亢進には, 肥満細胞より放出され

たヒスタミン, セロトニンなどのメディエーターが重要な役割を果たしているが, これらのみでは十分に説明できず, 他のメディエーターも関与することが強く示唆された.

文 献

- 1) Konno, S., Tsurufuji, S.: Induction of zymosan-air-pouch inflammation in rats and its characterization with reference to the effects of anti-complementary and anti-inflammatory agents. Br. J. Pharmacol. 80: 269-277, 1983.
- 2) Spector, W.G., Willoughby, D.A.: The demonstration of the role of mediators in terpenine pleurisy in rats by experimental suppression of the inflammatory changes. J. Path. Bact. 77: 1-17, 1959.
- 3) Feldberg, W., Talesnik, J.: Reduction of tissue histamine by compound 48/80. J. Physiol., Lond. 120: 550-568, 1953.
- 4) von Redlich, D., Glick, D.: Studies in histochemistry. LXXVI. Fluorimetric determination of histamine in microgram samples of tissue or microliter volumes of body fluids. Anal. Biochem. 10: 459-467, 1965.
- 5) 平沢典保, 大内和雄, 渡辺雅子, 鶴藤 丞: アレルギー性空気嚢炎症モデルの解析IV. ヒスタミンの関与. 炎症 3: 299-300, 1983.