薬学雑誌
YAKUGAKU ZASSHI
86 (6) 467 ~ 474 (1966)

UDC 577.155.3 : 616-006

78. 小澤 光, 海野勝男, 飯塚義夫: 消化酵素の消炎作用の研究

Streptomyces griseus 産生 Protease*¹ ならびに *Bacillus amylosolvens* 産生 α -Amylase*² の抗浮腫作用

Hikaru Ozawa, Katsuo Unno, and Yoshio Iizuka: Studies on the Anti-inflammatory Action of Digestive Enzymes: Anti-edematous Action of Protease from *Streptomyces griseus* and α -Amylase from *Bacillus amylosolvens*.

(Pharmaceutical Institute, Tohoku University School of Medicine*³)

Anti-inflammatory action of several proteases and α -amylases, especially protease from *Streptomyces griseus* and α -amylase from *Bacillus amylosolvens*, was examined and their anti-edematous action in rat hind paw was observed. Anti-inflammatory mechanism was examined, and following results were obtained:

Anti-inflammatory action of protease was marked in egg-white and dextran edema, and that of α -amylase in croton oil edema. Enzyme activity and anti-inflammatory action were not always in parallel. So were also increase in capillary permeability and anti-edematous action. Extract of inflammatory fluid activated spontaneous contraction of isolated rat uterus and this activation was not antagonized by atropine and diphenhydramine. Some components in intraperitoneal fluid of enzyme pretreatment inhibited spontaneous contraction of isolated rat uterus, but these components were not identified.

(Received August 12, 1965)

protease の消炎作用については streptokinase で Christensen¹⁾ が, trypsin で Innerfield^{2,3)} が, α -chymotrypsin および bromelains で Martin^{4~6)} をはじめ数多くの報告があるが, それ以外の protease については基礎的実験が見当たらず, またその作用機序も諸説があり明確ではない. 著者等は臨床的には消炎作用があると報告⁷⁾ されているが動物実験では確認されていない *Streptomyces griseus* 産生 protease の抗浮腫作用を, α -chymotrypsin, trypsin および bromelains と比較検討した. 一方 Tejo 等⁸⁾ は α -amylase にも消炎作用のあることを臨床的に報告したが, 基礎的実験や作用機序についてはまだ報告されていないので, 著者等は α -amylase 剤 Fortizyme および *Bacillus amylosolvens* 産生の α -amylase の抗浮腫作用を検討した. 一応種々の protease および α -amylase の基礎実験において消炎効果を観察したので, これらの消炎機序を解明する目的で酵素活性および毛細血管の透過性を亢進するか否かを測定し, さらに炎症浸出液中の bradykinin 類似活性を生物検定し, それに対する消炎酵素の影響を調べ若干の知見を得たので報告する.

*¹ 日本薬学会第84年年会で発表 (1964年4月).

*² 第15回日本薬理学会北部会で発表 (1964年7月).

*³ Kita-4-bancho, Sendai.

1) I. R. Christensen, *et al.*: J. Gen. Physiol., **28**, 363 (1945).

2) I. Innerfield, *et al.*: Bull. N. Y. Acad. Med., **28**, 537 (1952).

3) I. Innerfield: "Enzymes in Clinical Medicine," (1956) McGraw-Hill.

4) G. J. Martin, *et al.*: Proc. Soc. Exp. Biol. & Med., **96**, 636 (1954).

5) G. J. Martin, *et al.*: Am. J. Pharm., **19**, 125 (1955).

6) G. J. Martin: Exp. Med. & Surg., **21**, No. 3 (1962).

7) 藤崎, 他: 日本耳鼻咽喉科学会誌, **67**, 639 (1963).

8) C. Tejo, *et al.*: Ann. Allergy, **12**, 855 (1959).

実 験 の 部

実験材料

Streptomyces griseus 産生 protease (Pronase「科研化学 K.K.」使用) Pronase: pancreatin=1:8 の合剤 (Empynase「科研化学 K.K.」使用) *Bacillus amylolvens* 産生 α -amylase (Diasmen「大和化成 K.K.」使用) α -amylase (Fortizyme「Breon Laboratory INC. New York」使用).

実験方法

抗浮腫作用 Martin⁹⁾ の方法に準じて検定した. すなわち体重 100~150 g. ♀ Wister 系シロネズミを用い, 1 群 6 匹とし対照にもその都度 6 匹以上用いた. 生理食塩液に溶解した各種濃度の酵素液 0.2 ml. を腹腔内投与および口腔内適用を考慮して, ハッカネズミ用胃ゾンデを使つての腔内投与で検討した. 酵素溶液は催炎 6 hr. 前, 3 hr. 前, 1 hr. 前, 30 min. 前, 同時および 1 hr. 後に投与して検討したが, 6 hr. 前, 3 hr. 前, 1 hr. 前投与が予試験的に効果があると認められたので, 主としてこの投与のみで検討した. 催炎剤としては 1000 r.p.m. で 1 min. homogenize した egg-white, 分子量約 70000 の 3% dextran 生理食塩液, 10% formalin (formaldehyde 3.5%) 生理食塩液およびオリーブ油に溶解した 1% croton oil を用いた. 催炎剤 0.1 ml. をシロネズミ後肢足蹠に皮下注射し, 他側の後肢足蹠に生理食塩液 0.1 ml. を皮下注射して対照の saline leg とした. 各種の催炎剤により適当な後肢切断時間を決定するため浮腫の厚さをノギスで測つて検討した. なお浮腫強度および浮腫抑制率は次のように示した. edema leg と saline leg は足首より切断した後肢の重量 (g.) であらわした.

$$\text{浮腫強度} = (\text{edema leg} / \text{saline leg}) - 1$$

$$\text{浮腫抑制率} = (E_c - E_d) / E_c \times 100 (\%)$$

E_c = 対照動物の浮腫強度

E_d = 薬物処置動物の浮腫強度

酵素活性の測定 protease の活性は Kunitz⁹⁾ の casein 分解法で行なった. pH 7.6 の 0.1M phosphate buffer 液を使用した. α -amylase のデンプン液化力は JIS の方法に従った. pH 5.6 の酢酸 buffer 液を使用した.

毛細血管透過性に対する作用 Innerfield¹⁰⁾ の方法に従がった. すなわち 1% trypan blue 生理食塩液に結晶酵素 5 mg. を溶解し, その 0.1 ml. をウサギ腹部皮内に投与して, 色素の拡散面積を時間毎にノギスで測定した.

炎症浸出液の抽出と生物検定 3 日前より estradiol benzoate (50 γ /kg.) を 1 日 1 回筋注して発情させた雌シロネズミを撲殺し, 摘出した子宮を $30 \pm 1^\circ$ の Magnus 装置に懸垂し, それに対する炎症浸出成分の作用をキモグラフに描記した. 栄養液は Tyrode 液を用いた. 分子量約 70000 の 3% dextran 生理食塩液, 1% formalin 生理食塩液, 55% 生理食塩液の各々 5 ml. を約 150 g. のシロネズミ背部皮下および腹腔内に注射し, 一定時間後に撲殺して炎症浸出物 2 g. をとり出し, 5 ml. の Tyrode 液を加えて氷冷しながら homogenize し再び Tyrode 液を加えて 10 ml. とした後, 3000 $\times$ G で 15 min. 遠心分離した上清を東洋濾紙 No. 3 で濾過し原液とした. 次に Elliott¹¹⁾ の bradykinin 精製法に準じて同様の炎症浸出物 2 g. に 1% trichloroacetic acid 5 ml. を加えて

homogenize し, 同様に遠心分離濾過後, 20 ml. の ether で 5 回洗浄した後, さらに 1N HCl 0.2 ml. を加えて 4 回 20 ml. の ether で洗浄したものを抽出 sample とした. 抽出 sample の調製には 3% dextran 生理食塩液で背部皮下に催炎したものを, さらに α -chymotrypsin (5 mg./kg.), α -amylase (10 mg./kg.) を催炎 3 hr. 前に腹腔内に注射し, 3% dextran 生理食塩液を腹腔内に投与した腹腔内 edema を用いた. 抗 bradykinin 作用の検定に際しては Elliott¹¹⁾ の方法に従つてウシ血清より抽出した bradykinin を用いた.

Fig. 1. Inflammatory Effect of Several Substance on Rat Hind Leg

x-x egg-white Δ-Δ dextran
— croton oil ○-○ formalin

実験成績

抗浮腫作用の検討 1) 後肢切断時間の決定: シロネズミ後肢浮腫の厚さをノギスで時間ごとに測定した結果は Fig. 1 に示した. この結果から後肢切断時間は, egg-white による浮腫では催炎

9) M. Kunitz: J. Gen. Physiol., 30, 291 (1947).

10) I. Innerfield: Surgery, 44, 426 (1956).

11) D.F. Elliott, et al.: Biochem. J., 18, 60 (1961).

後 1.5 hr., dextran による浮腫では protease 類は催炎後 1.5 hr., α -amylase は 6 hr. 後, croton oil による浮腫では 6 hr. 後, formalin による浮腫では 24 hr. 後と決定した。

2) egg-white edema に対する抑制効果: 各種 protease の egg-white edema に対する抑制効果は Table I に示した。Empynase の腹腔内投与においては催炎前 30 min. 投与, 同時投与, 30 min. 後投与はまったく浮腫を抑制しなかったのが省略したが, 催炎 1 hr. 前投与, 3 hr. 前投与において 20% の抑制効果が観察された。腔内投与においてもほぼ同程度の抑制効果が観察され, 推計学的に有意の差が認められた。pancreatin の単独投与による抑制効果は腹腔内投与において 80 mg./kg. ではじめてあらわれ, 200 mg./kg. では 50% の抑制効果が認められた。しかし腔内投与においてはほとんど抑制効果が認められなかった。Pronase の単独投与においては, 腹腔内投与, 腔内投与共に浮腫抑制効果はまったく認められなかった。Pronase の単独投与においては 3 mg./kg. 以上腹腔内に投与すると 10 例中 2~3 例のシロネズミに出血傾向が認められ, 10 mg./kg. ではすべて死亡するので検定には 3 mg./kg. 以下を用いた。すでに抗浮腫作用があると報告されている α -chymotrypsin, trypsin, bromelains についても腹腔内投与で検討したところ, α -chymotrypsin では 2 mg./kg. から 30% 前後の浮腫抑制効果が認められ, 5 mg./kg. では 50% の抑制効果が認められた。trypsin についても 5 mg./kg. から浮腫抑制効果が認められ, 10 mg./kg. では 40~45%, bromelains も 50 mg./kg. で 50% の抑制効果が認められた。

TABLE I. Inhibition of Egg-white Edema by Proteases

Proteases	Dose (mg./kg.)	Route of administration	Edema intensity (inhibition %)		
			1 hr. ^{b)}	2 hr. ^{b)}	6 hr. ^{b)}
Pronase ^{a)} + pancreatin	0	i. p.	0.70 ± 0.05 (0)	0.74 ± 0.04 (0)	
	1+8	"	0.55 ± 0.04 (20)	0.56 ± 0.04 (20)	
	2+16	"	0.55 ± 0.04 (20)	0.58 ± 0.04 (20)	
	0	i. v. ^{c)}	0.73 ± 0.02 (0)	0.73 ± 0.02 (0)	0.73 ± 0.03 (0)
	1+8	"	0.55 ± 0.04 (20)	0.61 ± 0.05 (15)	0.54 ± 0.05 (25)
	2+16	"	0.57 ± 0.04 (20)	0.68 ± 0.05 (10)	0.55 ± 0.07 (25)
Pancreatin	0	i. p.	0.70 ± 0.05 (0)	0.74 ± 0.04 (0)	
	80	"	0.64 ± 0.04 (10)	0.66 ± 0.02 (10)	
	200	"	0.34 ± 0.05 (50)	0.37 ± 0.05 (50)	
	0	i. v. ^{c)}	0.73 ± 0.04 (0)	0.73 ± 0.01 (0)	
	80	"	0.73 ± 0.04 (0)	0.69 ± 0.06 (0)	
	200	"	0.76 ± 0.05 (0)	0.66 ± 0.03 (10)	
Pronase	0	i. p.	0.70 ± 0.05 (0)	0.74 ± 0.04 (0)	
	1	"	0.65 ± 0.04 (0)	0.71 ± 0.05 (0)	
	2	"	0.68 ± 0.06 (0)	0.72 ± 0.05 (0)	
	0	i. v. ^{c)}	0.73 ± 0.04 (0)	0.73 ± 0.01 (0)	
	10	"	0.74 ± 0.07 (0)	0.71 ± 0.06 (0)	
	50	"	0.78 ± 0.04 (0)	0.77 ± 0.05 (0)	
α -Chymotrypsin trypsin bromelains	5	i. p.	0.34 ± 0.04 (50)	0.42 ± 0.03 (40)	
	10	"	0.39 ± 0.05 (45)	0.41 ± 0.04 (40)	
	50	"	0.33 ± 0.05 (50)	0.48 ± 0.04 (35)	

a) protease from *Streptomyces griseus*

b) time (hr.) of pretreatment by proteases before egg-white injection

c) intravaginal application

3) dextran edema, croton oil edema, formalin edema に対する抑制効果: Empynase, pancreatin, Pronase によるこれらの浮腫に対する抑制効果は Table II に示した。いずれも腹腔内投与のみで検討したが, Empynase は dextran edema に対して抑制効果が著明であり, pancreatin 16 mg./kg. + Pronase 2 mg./kg. で 55% の抑制効果が認められた。しかし Pronase の単独投与はいずれの edema をも抑制しなかった。pancreatin の単独投与は dextran edema を 45%, croton oil edema を 30% 抑制した。formalin edema に対してはどの protease も抑制効果を示さなかった。

4) egg-white edema, dextran edema の抑制効果: *B. amylosolvens* 産生 α -amylase の egg-white edema, dextran edema に対する抑制効果は Table III に示した。egg-white edema に対しては腹腔内投与, 腔内投与ともに抑制効果はほとんど認められなかったが, dextran edema では腹腔内投与 10 mg./kg. でも 50 mg./kg. でもほぼ 20% の抑制効果が認められた。しかし dextran edema に対する腔内投与では, 抑制効果は認められなかった。Tejo^{d)} が臨床的に効果があると報告した α -amylase 剤 Fortizyme についても検討したところ, *B. amylosolvens* 産生 α -amylase とほぼ同程度の抑制効果が認められた。

TABLE II. Inhibition of Dextran, Croton oil and Formalin Edema by Intraperitoneal Injections of Proteases

Phlogistic agents	Proteases	Dose (mg./kg.)	Edema intensity (inhibition %)	
			1 hr. ^{b)}	6 hr. ^{b)}
Dextran	Pronase ^{a)} + pancreatin	0	0.62±0.03(0)	0.62±0.03(0)
		1+8	0.53±0.02(15)	0.42±0.02(30)
		2+16	0.28±0.03(55)	0.43±0.04(30)
	Pronase	1	0.60±0.05(0)	
		2	0.63±0.03(0)	
		3	0.55±0.05(0)	
	pancreatin	50	0.55±0.04(0)	
		100	0.43±0.02(30)	
		200	0.34±0.02(45)	
Croton oil	Pronase ^{a)} + pancreatin	0	0.59±0.03(0)	0.62±0.03(0)
		1+8	0.60±0.02(0)	0.58±0.03(0)
		2+16	0.54±0.02(10)	0.54±0.04(10)
	Pronase ^{a)}	1	0.60±0.04(0)	
		2	0.57±0.03(0)	
		3	0.58±0.03(0)	
	pancreatin	50	0.56±0.04(0)	
		100	0.52±0.03(15)	
		200	0.42±0.05(30)	
Formalin	Pronase ^{a)} + pancreatin	0	0.76±0.02(0)	0.78±0.02(0)
		1+8	0.74±0.03(0)	0.77±0.03(0)
		2+16	0.78±0.03(0)	0.80±0.02(0)
	Pronase	1	0.76±0.04(0)	
		2	0.74±0.03(0)	
		3	0.74±0.04(0)	
	pancreatin	100	0.78±0.03(0)	
		200	0.79±0.02(0)	

a) protease from *Streptomyces griseus*

b) time (hr.) of pretreatment before phlogistic agents injection

TABLE III. Inhibition of Egg-white and Dextran Edema by α -Amylase

Phlogistic agents	Dose (mg./kg.)	Route of administration	Edema intensity (inhibition %)		
			1 hr. ^{a)}	3 hr. ^{a)}	6 hr. ^{a)}
Egg-white	0	i. p.	0.74±0.05(0)	0.73±0.03(0)	0.76±0.05(0)
	10	"	0.72±0.05(0)	0.63±0.04(10)	0.72±0.06(0)
	50	"	0.72±0.05(0)	0.69±0.05(0)	0.75±0.04(0)
	0	i. v. ^{b)}	0.74±0.05(0)	0.72±0.05(0)	0.76±0.03(0)
	10	"	0.86±0.05(0)	0.64±0.06(10)	0.75±0.06(0)
	50	"	0.67±0.04(0)	0.64±0.03(10)	0.70±0.03(0)
Dextran	0	i. p.	0.45±0.04(0)	0.44±0.04(0)	0.42±0.04(0)
	10	"	0.36±0.05(20)	0.34±0.05(20)	0.33±0.04(20)
	50	"	0.35±0.04(20)	0.37±0.05(15)	0.33±0.04(20)
	0	i. v. ^{b)}	0.40±0.05(0)	0.43±0.05(0)	0.42±0.05(0)
	10	"	0.43±0.06(0)	0.37±0.05(10)	0.40±0.05(0)
	50	"	0.43±0.04(0)	0.40±0.05(0)	0.39±0.05(0)
	0	i. p. (Fortizyme)		0.46±0.04(0)	
	10	"		0.34±0.04(25)	
	0	i. v. ^{b)} (Fortizyme)		0.41±0.05(0)	
	10	"		0.33±0.03(20)	

a) pretreatment time (hr.) by protease before egg-white and dextran injection

b) intravaginal application

5). croton oil edema と formalin edema に対する抑制効果: *B. amylosolvens* 産生 α -amylase の croton oil edema に対する抑制効果は Table IV に示される. α -amylase は最もよく croton oil edema を抑制しているが,

投与量, 投与時間にあまり関係なく 35% 前後の抑制効果が認められた. この抑制は腹腔内投与において著明であった. しかし formalin edema に対する抑制効果はほとんど認められなかった. 一方 Fortizyme の croton oil edema に対する抑制効果も検討したところ, *B. amylosolvens* 産生 α -amylase にやや劣る抑制効果が観察された.

TABLE IV. Inhibition of Formalin and Croton oil Edema by α -Amylase

Phlogistic agents	Dose (mg./kg.)	Route of administration	Edema intensity (inhibition %)		
			1 hr. ^{a)}	3 hr. ^{b)}	6 hr. ^{a)}
Formalin	0	i. p.	0.95 ± 0.03 (0)	0.95 ± 0.02 (0)	0.87 ± 0.02 (0)
	10	"	0.86 ± 0.04 (10)	0.85 ± 0.03 (10)	0.75 ± 0.01 (15)
	50	"	0.79 ± 0.03 (20)	0.86 ± 0.02 (10)	0.79 ± 0.03 (10)
	0	i. v. ^{b)}	0.91 ± 0.02 (0)	0.90 ± 0.03 (0)	0.94 ± 0.03 (0)
	10	"	0.89 ± 0.03 (0)	0.88 ± 0.02 (0)	0.89 ± 0.03 (0)
	50	"	0.86 ± 0.02 (0)	0.84 ± 0.04 (10)	0.85 ± 0.04 (10)
Croton oil	0	i. p.	0.67 ± 0.04 (0)	0.66 ± 0.04 (0)	0.66 ± 0.04 (0)
	10	"	0.39 ± 0.04 (40)	0.45 ± 0.05 (35)	0.60 ± 0.05 (10)
	10	"	0.43 ± 0.05 (35)	0.36 ± 0.05 (45)	0.45 ± 0.05 (30)
	50	i. v. ^{b)}	0.53 ± 0.05 (0)	0.63 ± 0.04 (0)	0.60 ± 0.04 (0)
	10	"	0.46 ± 0.05 (10)	0.39 ± 0.06 (35)	0.61 ± 0.04 (0)
	50	"	0.45 ± 0.05 (10)	0.46 ± 0.06 (25)	0.52 ± 0.04 (10)
	0	i. p. (fortizyme)		0.46 ± 0.03 (0)	
	10	"		0.55 ± 0.06 (15)	
	0	i. v. ^{b)} (fortizyme)		0.58 ± 0.03 (0)	
	10	"		0.42 ± 0.03 (25)	

a) pretreatment time (hr.) by α -amylase before formalin and croton oil injection

b) intravaginal application

酵素活性の測定: 抗浮腫作用と酵素活性の関係を検討すべく protease 活性を Kunitz⁹⁾ の casein 分解法で測定したところ Table V の結果を得た. Pronase は α -chymotrypsin より活性が強く, bromelains と pancreatin は同程度であった. 同様に α -amylase のデンプン液化力も Table V に示した. *B. amylosolvens* 産生 α -amylase は Fortizyme の 17 倍の活性を示した.

TABLE V. Determination of Enzyme Activity of Proteases and α -Amylases

Protease activity	Proteases	Casein unit
$PU = \frac{OD}{EC \times IT}$	Pronase ^{a)}	3.82
PU: protease unit	α -Chymotrypsin	3.49
OD: optical density	Trypsin	2.73
EC: enzyme concentration	Pancreatin	0.29
IT: incubate time	Bromelains	0.27
α -Amylase activity	α -Amylases	Amylase unit
$AU = \frac{DF}{V}$	Fortizyme ^{b)}	100
AU: amylase unit	Diasmen ^{b)}	1700
DF: dilution factor		
V: volume		

a) protease from *Streptomyces griseus*

b) α -amylase from *Batillus amylosolvens*

毛細血管透過性に対する作用 α -chymotrypsin を control とした毛細血管透過性に対する作用は Fig. 2 に示した. Pronase は α -chymotrypsin と同程度の透過性の亢進を示し, Empynase はそれより劣るが同様に亢進を示した. しかし α -amylase は control と有意の差が認められなかった.

Fig. 2. Effect of Enzymes on Capillary Permeability in Rabbits

×-× saline △-△ α-amylase
○-○ α-chymotrypsin ●-● Pronase
●-● Empynase

炎症浸出液の抽出と生物活性 1) シロネズミ摘出子宮に対する炎症浸出液の抽出液の作用: 3% dextran 生理食塩液, 1% formalin 生理食塩液, 55° 生理食塩液でひきおこした炎症浸出液の原液には, 著明に摘出シロネズミ子宮の自発運動を亢進する物質が含まれていた。そこで bradykinin 精製法に準じて部分精製した炎症抽出液について, その作用を検討したところ Fig. 3 の結果を得た。3% dextran 生理食塩液で催炎したシロネズミ皮下浮腫の抽出液および dextran で催炎したシロネズミ腹腔内浮腫の抽出液中には, 原液よりは劣るがシロネズミ子宮の自発運動を亢進する物質が含まれており, この亢進は atropine (2×10^{-7} g./ml.) でも, diphenhydramine (2×10^{-7} g./ml.) でも拮抗されなかった。

Fig. 4. Effect of Extract of α-Chymotrypsin Pretreated Dextran Edema on Isolated Rat Uterus

A=atropine sulfate 2×10^{-7} g./ml.
D=diphenhydramine hydrochloride 2×10^{-7} g./ml.
E=extract of dextran edema (α-chymotrypsin 5 mg./kg. i. p. in rat, after 3 hr. dextran i. p. after 24 hr. extracted from edema)

Fig. 3. Effect of Extract of Dextran Edema on Isolated Rat Uterus

A=atropine sulfate 2×10^{-7} g./ml.
D=diphenhydramine hydrochloride 2×10^{-7} g./ml.
E₁=extract of edema after 3 hr. by dextran (s.c.)
W=wash
E₂=extract of edema after 3 hr. by dextran (i.p.)

物質が含まれており, この亢進は atropine (2×10^{-7} g./ml.) でも, diphenhydramine (2×10^{-7} g./ml.) でも拮抗されなかった。

2) 消炎酵素の炎症浸出液への影響: α-chymotrypsin (5 mg./kg.) を催炎 3 hr. 前に腹腔内に投与した後, 3% dextran 生理食塩液で催炎した 24 hr. 後の炎症浸出液の抽出液中には, Fig. 4 に示すように, シロネズミ摘出子宮の自発運動を著明に抑制する物質が含まれている。この抑制はほぼ定量的に抑制することを示している。

3) α-chymotrypsin (5 mg./kg.), α-amylase (10 mg./kg.) を腹腔内に投与した後に炎症を起さずに 6, 24 hr. 経たシロネズミ腹水を同様に抽出し検定したのが Table VI である。α-chymotrypsin 投与後 6 hr. 後の腹水抽出液も 24 hr. 後の抽出液も 0.5 ml. では自発運動を抑制し, また bradykinin で亢進した自発運動をも抑制することを示している。α-amylase についても α-chymotrypsin には劣るが同様の抑制が観察された。

考 察

1) 抗浮腫作用と酵素活性との関係: Beiler,¹²⁾ Martin¹³⁾ の主張する抗浮腫作用とタンパク質分解能が比例するという結果は得られなかった。本実験において pH 7.6 における pro-

TABLE V. Effect of Extract of α -Chymotrypsin and α -Amylase Pretreated Dextran Edema on Isolated Rat Uterus

Intraperitoneal fluid extract	Volume (ml.)	Inhibition of spontaneous contraction	Anti-bradykinin activity (bradykinin 10^{-8} g./ml.)
24 hr. after α -chymotrypsin (5 mg./kg.) i.p. injection	0.5	++	++
	0.2	++	+
	0.1	+	-
6 hr. after α -chymotrypsin (5 mg./kg.) i.p. injection	0.5	++	++
	0.2	+	+
	0.1	-	-
24 hr. after α -amylase (10 mg./kg.) i.p. injection	0.5	++	+
	0.2	±	-
	0.1	-	-
6 hr. after α -amylase (10 mg./kg.) i.p. injection	0.5	++	++
	0.2	+	±
	0.1	-	-

++ 50~100% inhibition, + 20~40% inhibition, ± slightly inhibition, - no inhibition

tease の casein 分解能の強さは Pronase > α -chymotrypsin > trypsin > pancreatin = bromelains であったが, 抗浮腫作用の強さは α -chymotrypsin > trypsin > bromelains > pancreatin で, Pronase には認められなかった. また α -amylase についても, *B. amylosolvens* 産生 α -amylase が Fortizyme の 17 倍の活性を有するにもかかわらず, 抗浮腫作用においてはほとんど差がなかった. さらに protease や α -amylase ばかりでなく choline esterase⁸⁾ にも消炎効果があると報告されており, 酵素活性と抗浮腫作用の間に必ずしも比例関係があるとは思われないし, また純度についても考慮する必要がある.

2) 毛細血管透過性亢進能と抗浮腫作用の関係: protease の毛細血管透過性亢進能が消炎作用であるという説は Innerfield,¹⁰⁾ Martin¹³⁾ 等によって支持されてきたが, Menkin,^{14,15)} Spector,¹⁶⁾ は cortisone, salicylate 系の消炎剤が毛細血管の透過性を抑制する作用を有しそれが消炎作用であると報告した. 本実験においては透過性を亢進する protease 類 (α -chymotrypsin, Empynase) にも, 亢進を示さない α -amylase にも抗浮腫作用が認められ, α -chymotrypsin と同程度に透過性を亢進する Pronase には抗浮腫作用が認められなかったことから, 毛細血管透過性亢進能と抗浮腫作用の間に比例関係は存在しないと考えられる. α -amylase の酵素活性が trypan blue により阻害されたために透過性を亢進しなかったのではないということは, *in vitro* で確認している.

3) α -chymotrypsin, α -amylase 投与により生体内に産生した摘出シロネズミ子宮の自発運動抑制物質と抗浮腫作用の関係: 本実験において α -chymotrypsin, α -amylase を腹腔内に投与後炎症を起こしても起こさなくても, その腹水には摘出子宮の自発運動を抑制する物質が含まれており, この物質は Elliott¹¹⁾ の bradykinin 精製法に準じた trichloroacetic acid 除蛋白液中に存在するので peptides ではないかと推察される. α -chymotrypsin 自体は *in vitro* で Magnus 管中に添加すると, シロネズミ摘出子宮の自発運動を著明に亢進し, かつ bradykinin と協力効果を有することは Krivoy 等¹⁷⁾ によっても報告されている. したがって α -chymotrypsin, α -amylase 投与により腹水中に産生する自発運動抑制物質は酵素とは異なるものと考えられ, これが抗浮腫作用を有すると考えられるが, この点に関してはさらに検討を要する.

結 論

各種 protease および α -amylase のシロネズミにおける抗浮腫作用, ならびにその作用機序を種々検討し次の

- 12) J.M. Beiler, *et al.*: Fed. Proc., **15**, 217 (1956).
- 13) G.J. Martin, *et al.*: Ann. N.Y. Acad. Sci., **68**, 70 (1957).
- 14) V. Menkin: "Dynamics of Inflammation," (1940) Macmillan.
- 15) V. Menkin: Science, **123**, 527 (1956).
- 16) W.G. Spector: Pharm. Rev., **10**, 475 (1958).
- 17) W. Krivoy, D. Kroeger: Brit. J. Pharmacol., **22**, 329 (1964).

結論を得た。

1) protease 類の抗浮腫作用は egg-white edema, dextran edema に対して著明であり, α -amylase の抗浮腫作用は croton oil edema に対して著明であった。また腔内投与よりも腹腔内投与において抑制効果が著明であった。

2) *Streptomyces griseus* 産生 protease は pancreatin の抗浮腫作用を増強した。

3) 酵素活性と抗浮腫作用の間に必ずしも比例関係は認められなかった。

4) protease 類は毛細血管の透過性を亢進したが, α -amylase は透過性を亢進しなかったことから, 毛細血管透過性亢進能と抗浮腫作用の間に平行関係は存在しないものと考えられる。

5) dextran edema, formalin edema, thermal injury edema の炎症浸出液およびその抽出液中には, 発情期シロネズミ摘出子宮の自発運動を亢進する物質が含まれており, この亢進は atropine, diphenhydramine では拮抗されなかった。

6) α -chymotrypsin, α -amylase を腹腔内に投与後6時間, 24時間経たシロネズミの腹水中には, 発情期シロネズミ摘出子宮の自発運動および bradykinin によって亢進した自発運動を抑制する物質が含まれていることが判明したが, その本体は不明である。

本研究にあたり御指導を賜りました東北大学元教授 岡崎寛蔵博士ならびに protease 活性の一部を測定された東北大学薬学科 奈良 武氏および bradykinin の抽出を担当された小林 清氏に感謝致します。

東北大学医学部薬学科

〔薬 学 雑 誌〕
YAKUGAKU ZASSHI
86 (6) 474 ~ 478 (1966)

UDC 577.158.025 : 615.785

79. 高木敬次郎, 五味保男^{*1}: モノアミン酸化酵素阻害剤の研究
(第2報^{*2}) Phenethylamine 誘導体の作用

Keijiro Takagi and Yasuo Gomi: Studies on Monoamine Oxidase
Inhibitors. II. Action of Phenethylamine Derivatives.

(Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of Tokyo^{*3})

The dose-response relationships of phenethylamine derivatives and pentylamine as substrate or inhibitor of rat liver monoamine oxidase were investigated. Increased concentration of tyramine increased the rate of oxidative deamination which later decreased. This bell-shaped dose-response curve of tyramine agreed fairly well with the theoretical curve calculated from eq. (3). Dissociation constants of tyramine-monoamine oxidase complex were estimated to be $K_m = 4.5 \times 10^{-4} M$ as a substrate and $K_I' = 1.0 \times 10^{-2} M$ as an inhibitor. Phenethylamine, 4-methoxyphenethylamine, and pentylamine were more or less active as substrates of monoamine oxidase, but also inhibited monoamine oxidase at higher concentration partially non-competitively. From these results, it is concluded that these amines act both as a substrate and an inhibitor, and the dose-response curves of these amines can be represented by eq. (3).

(Received August 12, 1965)

モノアミン酸化酵素 (MAO) は種々のモノアミン, 特に phenethylamine 誘導体に強い親和力を有しており, これらの化合物は基質として MAO により酸化され, あるいは阻害剤として MAO 活性を阻害する。基質としての

*1 Present address: Pharmaceutical Institute, Tohoku University School of Medicine, Kitayobancho, Sendai.

*2 第1報: 本誌, 82, 1431 (1962).

*3 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo.