抗炎症薬に関する研究 (第 30 報¹⁾) 2-(5H-[1]Benzopyrano[2,3-*b*]pyridin-7-yl)-
propionic Acid (Y-8004) のラット多形核白血球および肝 Lysosome に対する作用

中西美智夫, 後藤一洋

吉富製薬株式会社研究所²⁾Studies on Anti-inflammatory Agents. XXX.¹⁾ Effects of 2-(5H-[1]Benzopyrano
[2,3-*b*]pyridin-7-yl)propionic Acid (Y-8004) on Polymorphonuclear
Leucocyte and Liver Lysosomes prepared from Rats

MICHIO NAKANISHI and KAZUHIRO GOTO

Research Laboratories, Yoshitomi Pharmaceutical Industries, Ltd.²⁾

(Received November 15, 1974)

Lysosome suspensions were prepared from both polymorphonuclear leucocytes and liver of rats. The incubation of the lysosomes with or without hydrogen peroxide caused the release of enzymes (acid phosphatase, aryl sulfatase), which was inhibited by 2-(5H-[1]-benzopyrano[2,3-*b*]pyridin-7-yl)propionic acid (Y-8004), nonsteroidal anti-inflammatory drugs such as phenylbutazone, and steroidal anti-inflammatory drugs such as prednisolone. Hydrogen peroxide not only released enzymes but also caused lipid peroxidation of the lysosome suspension. The above anti-inflammatory agents inhibited the release of enzymes more strongly than lipid peroxidation in experiments using leucocyte lysosomes. The inhibitory activity of Y-8004 and nonsteroidal anti-inflammatory drugs on the release of enzymes decreased by the addition of albumin to the incubation mixture. However, in this case, steroidal anti-inflammatory drugs retained their potent activities, and strongly inhibited the release of enzymes induced by phospholipase C.

Based on these evidences, discussion was extended on the stabilizing action of Y-8004 and anti-inflammatory drugs on lysosome membranes, and on their possible mechanisms.

Lysosome が炎症の過程で重要な役割を演じていることは、よく知られた事実である。³⁾

前報⁴⁾において抗炎症作用を有する 2-(5H-[1]benzopyrano[2,3-*b*]pyridin-7-yl)propionic acid (Y-8004)⁵⁾ が被検抗炎症薬と同様に家兎多形核白血球から得られた intact lysosome 膜を安定化し、Y-8004 を含めた非ステロイド酸性抗炎症薬と、ステロイド抗炎症薬とで lysosome に対する作用態度が異なることが示唆された。

そこで、本報では Y-8004 の lysosome 膜安定化作用が、ラット白血球 lysosome や肝 lysosome に対しても認められるか否かを明らかにし、さらにステロイドおよび非ステロイド抗炎症薬の lysosome に対する作用態度の相異を明確にする目的で、各種実験条件下における上記被検化合物の lysosome に対する作用について比較検討した。その結果、Y-8004 は indomethacin のような非ステロイド酸性抗炎症薬と同様に incubation, 過酸化水素との incubation および白血球の貪食作用に伴う lysosome 酵素の遊離を抑制した。一方、ステロイド抗炎症薬は上記の酵素遊離を抑制するほか、albumin 存在下での過酸化水素による酵素遊離、phospholipase C による酵素遊離の亢進、さらに四塩化炭素投与ラット肝から得られた脆弱な lysosome からの遊離をも抑制すること

1) 第 29 報：中西美智夫, 後藤一洋, 久留正生, 薬誌, 95, 936 (1975); 本論文の要旨は第 27 回日本薬理学会 西南部会 (福岡, 1974 年 10 月) で発表した。

2) Location: Koiwai, Yoshitomi-cho, Chikugo-gun, Fukuoka.

3) G. Weissmann, *Ann. Rev. Med.*, 18, 97 (1967).

4) 中西美智夫, 後藤一洋, 薬誌, 95, 672 (1975).

5) M. Nakanishi, Y. Maruyama, M. Terasawa, K. Anami, *Japan. J. Pharmacol., Suppl.*, 24, 140 (1974).

が判明した。これらの知見から、Y-8004 および対照抗炎症薬の lysosome 膜安定化作用の意義と mechanism について考察する。

実 験 の 部

材料および方法

1. 被検化合物および被検液の調製 Y-8004, indomethacin, phenylbutazone, hydrocortisone および prednisolone を用い、すべて EtOH (特級) に溶解し被検液とした。

2. 動物 体重 200—300 g の雄性 Wistar ラットを用いた。

3. 多形核白血球 (PMNL) の採取と PMNL けんたく液の調製 生理食塩液に溶解した 35 ml の 0.3% (w/v) glycogen 溶液をラットの腹腔内に注入し、4 hr または 15—16 hr 後に 10 ml の Ca^{++} -free Hanks 溶液 (0.1% glucose および 25 U/ml のヘパリンを含む) を腹腔内に注入した。ただちにラットを放血死させたのち開腹して腹水を採取した。4 hr 後に得られた腹水中の白血球数は、 $0.5\text{--}1 \times 10^7$ cells/ml で 90% が PMNL であった。15—16 hr 後に得られたそれは、 $2\text{--}4 \times 10^7$ cells/ml で 63% が PMNL であった。これをガーゼでろ過し、ろ液を 600 g で 10 min 間遠心分離した。沈渣に腹水の 1/10 量の氷冷した Hanks 溶液 (pH 7.4, 0.1% glucose を含む)、または 0.25M sucrose-0.04M Tris acetate buffer (pH 7.4) を加えてけんたくし、同一条件で遠心分離した。4 hr 後の腹水から得られた沈渣の PMNL を上記 Hanks 溶液にけんたく (1×10^8 cells/ml) し、貪食作用による酵素遊離の実験に用いた。一方、15—16 hr 後の腹水から得られた沈渣の PMNL を 0.34M sucrose-0.04M Tris acetate buffer (pH 7.4) にけんたく (5×10^8 cells/ml) し、これから lysosome けんたく液を調製した。

4. PMNL Lysosome の調製 上記 PMNL けんたく液をピペットで激しく吸引排出 (10 回) し、lysosome を細胞外に放出したのち 600 g で 10 min 間遠心分離した。上清をさらに 9750 g で 10 min 間遠心分離し、沈渣を遠心分離前と同量または半量の 0.25M または 0.12M sucrose-0.04M Tris acetate buffer (pH 7.4) にけんたくした。この分画を lysosome けんたく液として使用した。後者の lysosome けんたく液を過酸化水素添加の実験系に用いた。反応液中のたん白の影響を調べる場合には、lysosome けんたく液に最終濃度 0.1% (w/v) の albumin (bovine serum albumin, Sigma) を添加した。白血球および lysosome けんたく液の調製はすべて 4° 以下で行った。

5. 肝 Lysosome の調製 Tanaka らの方法⁶⁾ に準じ、正常ラットおよび 0.5 ml/kg の四塩化炭素を 3 hr 前に腹腔内投与したラットから肝 lysosome けんたく液を調製した。¹⁾

6. 酵素遊離反応 1) PMNL Lysosome—2.0 ml の lysosome けんたく液に、20 μ l の被検液 (対照として EtOH) を加え、室温 (25°) で 5 min 間放置した。この反応液から 1.0 ml を取り出し、ただちに 27000 g で 10 min 間遠心分離した。残りの反応液を 37° で振盪 (75 回/min) しながら一定時間 incubate し、ただちに同一条件で遠心分離した。得られた反応前後の上清について、lysosome 酵素活性を測定した。過酸化水素を加える反応系では、1.0 ml の lysosome けんたく液に 20 μ l の被検液 (対照として EtOH) を加え、5 min 後に 1.0 ml の 0.6% (v/v) 過酸化水素-緩衝液を添加した。ただちに反応液から 1.0 ml を取り出し遠心分離した。残りの反応液を 37° で振盪 (75 回/min) しながら 30 min、または albumin 存在下では 60 min 間 incubate し、同様に遠心分離した。得られた反応前後の上清について、lysosome 酵素活性および脂質過酸化物を測定した。Phospholipase C による酵素遊離亢進に対する作用は、家兎肝 lysosome を用いた Lewis らの方法⁷⁾ に準じて検討した。すなわち、2.0 ml の lysosome けんたく液に 20 μ l の被検液 (対照として EtOH) を加え、この反応液から 1.0 ml を取り出し遠心分離した。残りの反応液を 37° で振盪 (75 回/min) しながら 30 min 間 incubate したのち、40 μ l の phospholipase C 溶液 (最終濃度 0.05 μ g/ml, N.B.C.) を加えた。さらに 30 min 間 incubate し、ただちに遠心分離した。得られた 27000 g 上清について反応前後の lysosome 酵素活性を測定した。全酵素活性は lysosome を Triton X-100 で処理したのち測定した。⁴⁾

2) 肝 Lysosome—Incubation medium として 0.25M sucrose-0.04M Tris acetate buffer (pH 7.4)⁶⁾ を用い前報の方法¹⁾ により実験した。

結果は incubation の間に遊離した酵素活性、または生成した脂質過酸化物から、対照に対する被検化合物の抑制率として示した。

7. 貪食作用による酵素の遊離 前報の方法⁴⁾ に準じて行った。すなわち、2.0 ml の PMNL けんたく液に 10 μ l の被検液 (対照として EtOH) を加え、室温で 10 min 間放置したのち 50 μ l の zymosan (10 mg/ml, N.B.C.)、またはラット血清処理 zymosan を加え 37° で振盪 (75 回/min) しながら、30、60 または 90 min 間 incubate した。反応の前後に反応液の一部を取り出し、350 g、10 min 間の遠心分離により得られた上清について酵素活性を測定した。全酵素活性は既報の方法⁴⁾ により測定した。

8. 酵素活性の測定 Acid phosphatase (E.C. 3.1.3.2, orthophosphoric monoester phosphohydrolase), aryl sulfatase (E.C. 3.1.6.1, aryl sulfate sulfohydrolase) および β -glucuronidase (E.C. 3.2.1.31, β -glucuronide

6) K. Tanaka, Y. Iizuka, *Biochem. Pharmac.*, **17**, 2023 (1968).

7) D.A. Lewis, A.M. Symons, R.J. Ancill, *Biochem. Pharmac.*, **23**, 467 (1974).

glucurohydrolase) は、基質としてそれぞれ *p*-nitrophenyl phosphate⁹⁾ (または β -glycerophosphate⁹⁾), *p*-nitrocatechol sulfate⁹⁾ および *p*-nitrophenylglucuronide¹⁰⁾ を用いて測定した。これらの lysosome 酵素活性は、0.1 ml の酵素液 (350 g または 27000 g 上清) が、37° で 1 hr に生成する *p*-nitrophenol, inorganic phosphorous または *p*-nitrocatechol の μ g で示した。Lactate dehydrogenase (E.C. 1.1.1. 27, L-lactate: NAD oxidoreductase, LDH) は、Cabaud, Wróblewski 法¹¹⁾ により測定し、Wróblewski units で示した。脂質の過酸化は前報¹⁾ と同様に thiobarbituric acid (TBA) 法¹²⁾ により、malonaldehyde を定量し、530 nm における吸光度を TBA value として示した。なお、被検化合物は試験濃度範囲で上記酵素活性および TBA 反応を阻害しないことを確認した。

結 果

I. PMNL Lysosome および肝 Lysosome に対する作用

1) 経時変化 (Table I) 0.25M Sucrose-0.04M Tris acetate buffer 中で PMNL lysosome を incubate すると、acid phosphatase は 30, 60, および 120 min 後に、それぞれ全活性の 7, 12 および 19% 遊離した。100 μ M の Y-8004 および phenylbutazone は 60 min 後で、prednisolone は 120 min 後で最高抑制率を示した。Prednisolone は 60—120 min の間の酵素遊離を約 80% 抑制した (Expt. A)。

TABLE I. Time Course of Acid Phosphatase Release from PMN Leucocyte Lysosomes and Its Inhibition by Y-8004 and Anti-inflammatory Drugs

Compound	Free activity (% of total activity, mean $\pm$ SE, N=4) in min		
	30	60	120
Expt. A ^{a)}			
Control	6.68 $\pm$ 0.34	11.50 $\pm$ 0.44	18.69 $\pm$ 1.48
Y-8004	5.53 $\pm$ 0.18 (39.3) ^{b)}	7.80 $\pm$ 0.36 (47.7) ^{b)}	11.59 $\pm$ 1.08 (47.5) ^{b)}
Phenylbutazone	5.49 $\pm$ 0.56 (41.6) ^{b)}	6.94 $\pm$ 0.34 (58.9) ^{b)}	11.01 $\pm$ 1.15 (51.5) ^{b)}
Prednisolone	5.80 $\pm$ 0.23 (29.2) ^{b)}	8.24 $\pm$ 0.45 (41.8) ^{b)}	9.79 $\pm$ 0.85 (59.3) ^{b)}
Expt. B ^{c)}			
Control	26.8 $\pm$ 1.7	47.7 $\pm$ 1.7	67.2 $\pm$ 2.2
Y-8004	16.8 $\pm$ 1.0 (37.5) ^{b)}	34.0 $\pm$ 1.3 (28.8) ^{b)}	61.7 $\pm$ 1.5 (8.2)
Phenylbutazone	9.9 $\pm$ 0.6 (63.2) ^{b)}	25.0 $\pm$ 0.6 (47.5) ^{b)}	56.2 $\pm$ 0.7 (16.3) ^{b)}
Prednisolone	20.0 $\pm$ 0.9 (25.5) ^{b)}	31.3 $\pm$ 1.0 (34.3) ^{b)}	57.3 $\pm$ 1.8 (14.8) ^{b)}

a) Incubation medium; 0.25M sucrose-0.04M Tris acetate buffer (pH 7.4). Enzyme activity (μ g of *p*-nitrophenol): before the incubation; 2.71 $\pm$ 0.18, total; 73.1 $\pm$ 3.5.

b) $p < 0.01$, significant *v.s.* control.

c) Incubation medium; 0.12M sucrose-0.04M Tris acetate buffer (pH 7.4). Enzyme activity (μ g of *p*-nitrophenol): before the incubation; 3.1 $\pm$ 1.1, total; 94.8 $\pm$ 10.8. Figures in parentheses show the percent inhibition (the final concentration of each test agent: 100 μ M).

0.12M Sucrose-0.04M Tris acetate buffer 中で PMNL lysosome を incubate すると、酵素遊離は著明に亢進した。この場合、Y-8004 と phenylbutazone は 30 min 後で、prednisolone は 60 min 後で最高抑制率を示した。また、後者は 30—60 min の間の遊離を最も強く抑制した (Expt. B)。

なお、被検化合物の溶媒として最終濃度 1% の EtOH を lysosome けんたく液に添加したが、遊離型 lysosome 酵素活性の上昇は認められなかった。

2) 三種 Lysosome 酵素の遊離と被検化合物によるその抑制 (Table II) PMNL lysosome を 0.12M sucrose-0.04M Tris acetate buffer 中で 30 min 間 incubate した。Marker enzyme として用いた acid phosphatase (基質として *p*-nitrophenyl phosphate を使用), aryl sulfatase および β -glucuronidase は、いずれも約 20% 遊離

8) 中西美智夫, 後藤一洋, 薬誌, **94**, 660 (1974).

9) R. Gianetto, C. DeDuve, *Biochem. J.*, **59**, 433 (1955).

10) 中西美智夫, 今村 博, 後藤一洋, 薬誌, **90**, 557 (1970).

11) P.J. Cabaud, F. Wróblewski, *Am. J. Clin. Path.*, **30**, 234 (1958).

12) C. Mengel, H. Kann, *J. Clin. Invest.*, **45**, 1150 (1966).

TABLE II. Release of Enzymes from PMN Leucocyte Lysosomes and Its Inhibition by Y-8004 and Anti-inflammatory Agents

Marker enzyme ^{a)}	Total activity ^{b)}	% of total activity ^{c)}	% inhibition at 30 μ M		
			Y-8004	PB ^{d)}	PDN ^{e)}
AP (PNPP)	76.2 $\pm$ 2.2	21.7 $\pm$ 0.8	32.5 $\pm$ 1.6 ^{f)}	47.4 $\pm$ 2.4 ^{f)}	28.4 $\pm$ 1.9 ^{f)}
AP (β GP)	281.2 $\pm$ 10.7	28.4 $\pm$ 0.7	24.7 $\pm$ 1.0 ^{f)}	38.4 $\pm$ 2.1 ^{f)}	21.8 $\pm$ 1.8 ^{f)}
AS	82.0 $\pm$ 2.0	18.6 $\pm$ 2.0	33.5 $\pm$ 1.3 ^{f)}	49.7 $\pm$ 2.0 ^{f)}	30.0 $\pm$ 1.7 ^{f)}
β G	137.5 $\pm$ 2.5	19.6 $\pm$ 1.1	24.8 $\pm$ 1.4 ^{f)}	40.8 $\pm$ 1.7 ^{f)}	30.2 $\pm$ 1.7 ^{f)}

Results are shown as the mean value $\pm$ SE of four separate experiments.

a) AP=acid phosphatase (PNPP; *p*-nitrophenyl phosphate or β GP; β -glycerophosphate was used as substrate). AS=

aryl sulfatase. β G= β -glucuronidase.

b) Total activity was shown as μ g of *p*-nitrophenol (AP and β G), of inorganic phosphorus (AP) or of *p*-nitrocatechol (AS) formed.

c) Per cent of total activity in controls released during the incubation for 30 min at 37° in 0.12M sucrose-0.04M Tris acetate buffer (pH 7.4).

d) Phenylbutazone.

e) Prednisolone.

f) $p < 0.01$, significant *v.s.* control.

した。 β -Glycerophosphate を基質にして測定した acid phosphatase は 28% 遊離した。一方, Y-8004, phenylbutazone および prednisolone は, それぞれの酵素遊離をいずれも有意に抑制した。

さらに, 肝 lysosome を用いて同様の実験を行なったが, 700—3500 g fraction からの上記 lysosome 酵素の遊離に, 著しい差異は認められなかった (data 省略)。

3) 濃度作用相関 (Table III, Table IV, Table V) 0.25M Sucrose-0.04M Tris acetate buffer 中で PMNL lysosome と被検液を 60 min 間 incubate した。Y-8004 は 1.0 μ M 以上で lysosome 酵素の遊離を有意に抑制し, 濃度作用相関も認められた。対照抗炎症薬も同様の作用を示し, phenylbutazone の活性が最も強力であった (Table III)。

TABLE III. Effects of Y-8004 and Anti-inflammatory Drugs on Enzyme Release from PMN Leucocyte Lysosomes in 0.25M Sucrose-0.04M Tris Acetate Buffer (pH 7.4)

Compound	Marker enzyme ^{a)}	% inhibition (mean $\pm$ SE, $N=4-6$) in μ M			
		0.10	1.0	10	100
Y-8004	AP	14.6 $\pm$ 4.2	20.4 $\pm$ 2.5 ^{b)}	30.2 $\pm$ 3.2 ^{b)}	45.5 $\pm$ 1.9 ^{b)}
	AS	15.4 $\pm$ 3.2	22.8 $\pm$ 2.1 ^{b)}	31.1 $\pm$ 2.3 ^{b)}	54.3 $\pm$ 2.1 ^{b)}
Indomethacin	AP	1.5 $\pm$ 0.1	8.3 $\pm$ 4.4	12.3 $\pm$ 3.0	37.1 $\pm$ 0.5 ^{b)}
	AS	6.3 $\pm$ 1.1	14.7 $\pm$ 2.9	22.0 $\pm$ 2.7 ^{b)}	42.4 $\pm$ 1.9 ^{b)}
Phenylbutazone	AP	14.7 $\pm$ 0.8	28.6 $\pm$ 3.2 ^{b)}	40.3 $\pm$ 3.4 ^{b)}	64.4 $\pm$ 0.2 ^{b)}
	AS	15.1 $\pm$ 1.4	29.2 $\pm$ 2.2 ^{b)}	44.1 $\pm$ 2.7 ^{b)}	63.8 $\pm$ 1.1 ^{b)}
Hydrocortisone	AP	1.9 $\pm$ 0.5	8.8 $\pm$ 2.1	12.7 $\pm$ 2.7	26.8 $\pm$ 2.0 ^{b)}
	AS	4.6 $\pm$ 0.9	12.9 $\pm$ 2.3	17.7 $\pm$ 2.1	28.2 $\pm$ 1.9 ^{b)}
Prednisolone	AP	7.9 $\pm$ 2.5	18.5 $\pm$ 1.3 ^{b)}	29.7 $\pm$ 2.5 ^{b)}	40.2 $\pm$ 1.5 ^{b)}
	AS	9.5 $\pm$ 2.3	19.5 $\pm$ 1.9 ^{b)}	32.0 $\pm$ 2.9 ^{b)}	44.5 $\pm$ 2.1 ^{b)}

a) AP: acid phosphatase, activity (μ g of *p*-nitrophenol) in the control: before the incubation; 2.2, after the incubation for 60 min; 8.3, total; 72.6, AS: aryl sulfatase, activity (μ g of *p*-nitrocatechol) in the control: before the incubation; 2.5, after the incubation for 60 min; 7.6, total; 73.4.

b) $p < 0.01$, significant *v.s.* control.

つぎに, 同じ medium 中で肝 lysosome と被検液とを 30 min 間 incubate した。Y-8004 は 10 μ M 以上で有意な抑制作用を示すが, 300 μ M での抑制率は低下傾向にあった。Prednisolone は 100 μ M 以上で acid phosphatase の遊離を有意に抑制するにすぎなかった (Table IV)。なお, この反応条件での脂質過酸化はほとんど認められなかった。

TABLE IV. Effects of Y-8004 and Anti-inflammatory Drugs on Enzyme Release from Liver Lysosomes in 0.25M Sucrose-0.04M Tris Acetate Buffer (pH 7.4)

Compound	Marker enzyme ^{a)}	% inhibition (mean $\pm$ SE, N=4) in μ M			
		10	30	100	300
Y-8004	AP	15.4 $\pm$ 1.0 ^{b)}	26.3 $\pm$ 1.8 ^{b)}	39.5 $\pm$ 1.2 ^{b)}	37.2 $\pm$ 1.1 ^{b)}
	AS	19.2 $\pm$ 0.7 ^{b)}	27.6 $\pm$ 1.3 ^{b)}	41.4 $\pm$ 1.0 ^{b)}	38.1 $\pm$ 0.6 ^{b)}
Indomethacin	AP		10.7 $\pm$ 3.8	23.1 $\pm$ 0.2 ^{b)}	16.3 $\pm$ 3.5 ^{b)}
	AS		12.0 $\pm$ 1.2 ^{b)}	23.9 $\pm$ 0.5 ^{b)}	14.0 $\pm$ 2.2 ^{b)}
Phenylbutazone	AP	22.4 $\pm$ 4.7 ^{b)}	33.3 $\pm$ 5.4 ^{b)}	52.7 $\pm$ 4.8 ^{b)}	40.7 $\pm$ 4.7 ^{b)}
	AS	12.8 $\pm$ 2.0	33.7 $\pm$ 0.8 ^{b)}	56.3 $\pm$ 0.6 ^{b)}	45.5 $\pm$ 1.1 ^{b)}
Prednisolone	AP	7.5 $\pm$ 1.6	11.4 $\pm$ 2.4	15.4 $\pm$ 2.4 ^{b)}	20.0 $\pm$ 1.9 ^{b)}

a) AP: acid phosphatase, activity (μ g of *p*-nitrophenol) in the control: before the incubation; 3.3, after the incubation for 30 min; 11.0, total; 89.1, AS: aryl sulfatase, activity (μ g of *p*-nitrocatechol) in the control: before the incubation; 1.8, after the incubation for 30 min; 14.9, total; 117.0.

b) $p < 0.01$, significant v.s. control.

0.12M Sucrose-0.04M Tris acetate buffer 中で PMNL lysosome を incubate すると、酵素遊離は著しく亢進する (Table I). この場合にも Y-8004 は 1.0 μ M から lysosome 酵素の遊離を有意に抑制し、300 μ M まで濃度作用相関が認められた. Phenylbutazone は、この反応系でも強い活性を示した (Table V).

TABLE V. Effects of Y-8004 and Anti-inflammatory Drugs on Enzyme Release from PMN Leucocyte Lysosomes in 0.12M Sucrose-0.04M Tris Acetate Buffer (pH 7.4)

Compound	Marker enzyme ^{a)}	% inhibition (mean $\pm$ SE, N=4) in μ M			
		1.0	10	100	300
Y-8004	AP	15.9 $\pm$ 3.8 ^{b)}	24.7 $\pm$ 2.8 ^{b)}	36.1 $\pm$ 2.1 ^{b)}	59.7 $\pm$ 2.4 ^{b)}
	AS	13.2 $\pm$ 2.3 ^{b)}	25.2 $\pm$ 1.4 ^{b)}	38.8 $\pm$ 2.1 ^{b)}	62.5 $\pm$ 0.6 ^{b)}
Indomethacin	AP		10.1 $\pm$ 2.3	20.2 $\pm$ 1.8 ^{b)}	38.2 $\pm$ 2.4 ^{b)}
	AS		15.8 $\pm$ 1.3 ^{b)}	25.7 $\pm$ 1.2 ^{b)}	41.7 $\pm$ 0.8 ^{b)}
Phenylbutazone	AP	19.2 $\pm$ 3.7 ^{b)}	43.9 $\pm$ 2.9 ^{b)}	59.0 $\pm$ 2.8 ^{b)}	72.8 $\pm$ 1.9 ^{b)}
	AS	25.2 $\pm$ 2.6 ^{b)}	44.3 $\pm$ 1.3 ^{b)}	63.2 $\pm$ 0.7 ^{b)}	73.7 $\pm$ 0.9 ^{b)}
Prednisolone	AP	12.1 $\pm$ 2.8	22.5 $\pm$ 0.8 ^{b)}	33.6 $\pm$ 1.2 ^{b)}	52.2 $\pm$ 2.0 ^{b)}
	AS	11.3 $\pm$ 2.9	23.5 $\pm$ 1.2 ^{b)}	34.3 $\pm$ 1.2 ^{b)}	53.3 $\pm$ 1.3 ^{b)}

a) AP: acid phosphatase, activity (μ g of *p*-nitrophenol) in the control: before the incubation; 3.6, after the incubation for 30 min; 25.0, total; 90.3, AS: aryl sulfatase, activity (μ g of *p*-nitrocatechol) in the control: before the incubation; 2.5, after the incubation for 30 min; 18.3, total; 84.6.

b) $p < 0.01$, significant v.s. control.

4) Phospholipase C による酵素遊離に対する作用 (Table VI) Phospholipase C の添加により lysosome 酵素の遊離亢進が認められた (Table I の Expt. A と比較). Y-8004 は 100 μ M でわずかにこの遊離亢進を抑制するが、indomethacin および phenylbutazone は抑制しなかった. 一方、ステロイド抗炎症薬は低濃度から酵素遊離を有意に抑制し、濃度作用相関も認められた.

5) 四塩化炭素投与ラット肝 Lysosome に対する作用 (Table VII) Incubation 前の遊離型 acid phosphatase および aryl sulfatase 活性は、それぞれ 19 および 12% で、30 min 間の incubation により前者は 16%, 後者は 24% 遊離した. すなわち、正常ラット肝から得られた lysosome (Table IV) に比較して、incubation 前の遊離型酵素活性は高く、酵素遊離速度の亢進も認められた.

この lysosome からの酵素遊離をステロイド抗炎症薬は強力に抑制した. 一方、正常ラット肝 lysosome に対し強い活性を示す phenylbutazone の抑制作用は減弱した. Y-8004 の 100 μ M における抑制率も、Table IV のそれに比較して約 1/2 に低下した. また、四塩化炭素によりさらに強い障害を受けた肝 lysosome に対しては、ステロイド抗炎症薬のみが酵素遊離を有意に抑制することを確認した.

TABLE VI. Effects of Y-8004 and Anti-inflammatory Drugs on Enzyme Release from PMN Leucocyte Lysosomes by Phospholipase C

Compound	Marker enzyme ^{a)}	% inhibition (mean $\pm$ SE, $N=3-4$) in μ M			
		0.10	1.0	10	100
Y-8004	AP		1.4 $\pm$ 2.8	4.9 $\pm$ 2.1	15.5 $\pm$ 2.7 ^{b)}
	AS		3.3 $\pm$ 1.9	5.7 $\pm$ 2.0	16.1 $\pm$ 2.0 ^{b)}
Indomethacin	AP		-6.9 $\pm$ 3.0	-10.7 $\pm$ 3.9	-15.5 $\pm$ 4.8 ^{b)}
	AS		-3.3 $\pm$ 1.0	-9.4 $\pm$ 2.0	-13.9 $\pm$ 2.2 ^{b)}
Phenylbutazone	AP		-4.0 $\pm$ 3.8	-4.8 $\pm$ 2.7	-16.6 $\pm$ 4.2 ^{b)}
	AS		-0.9 $\pm$ 0.1	-2.1 $\pm$ 0.3	-15.5 $\pm$ 2.0 ^{b)}
Hydrocortisone	AP	8.8 $\pm$ 1.2	15.1 $\pm$ 1.9 ^{b)}	23.3 $\pm$ 2.0 ^{b)}	31.4 $\pm$ 1.3 ^{b)}
	AS	10.1 $\pm$ 0.7	17.2 $\pm$ 1.7 ^{b)}	25.2 $\pm$ 1.4 ^{b)}	31.8 $\pm$ 1.0 ^{b)}
Prednisolone	AP	15.0 $\pm$ 1.7 ^{b)}	24.2 $\pm$ 2.2 ^{b)}	38.4 $\pm$ 1.6 ^{b)}	48.1 $\pm$ 1.5 ^{b)}
	AS	19.8 $\pm$ 1.2 ^{b)}	25.8 $\pm$ 1.1 ^{b)}	38.9 $\pm$ 1.3 ^{b)}	50.3 $\pm$ 1.2 ^{b)}

After the 30 min incubation of the lysosome suspension with each test solution in 0.25M sucrose-0.04M Tris acetate buffer (pH 7.4), the reaction mixture added phospholipase C solution (0.05 μ g/ml in the final concentration) was further incubated for 30 min at 37°.

a) AP: acid phosphatase, activity (μ g of *p*-nitrophenol) in the control: before the incubation; 2.7, after the incubation for 60 min; 19.4, total; 75.9. AS: aryl sulfatase, activity (μ g of *p*-nitrocatechol) in the control: before the incubation; 2.0, after the incubation for 60 min; 15.2, total; 68.3.

b) $p<0.01$, significant *v.s.* control.

TABLE VII. Effects of Y-8004 and Anti-inflammatory Agents on Release of Enzymes from Liver Lysosomes of Rats Treated with Carbon Tetrachloride

Compound	Final concn. (μ M)	% inhibition		
		AP ^{a)}	AS ^{b)}	β G ^{c)}
Y-8004	10	11.0 $\pm$ 2.0	14.1 $\pm$ 1.6	15.8 $\pm$ 1.8 ^{d)}
	100	23.4 $\pm$ 3.0 ^{d)}	23.2 $\pm$ 2.3 ^{d)}	19.6 $\pm$ 1.5 ^{d)}
Phenylbutazone	10	11.5 $\pm$ 2.4	6.5 $\pm$ 2.1	14.3 $\pm$ 2.2
	100	19.4 $\pm$ 3.0 ^{d)}	15.4 $\pm$ 1.9 ^{d)}	20.5 $\pm$ 1.2 ^{d)}
Indomethacin	10	8.4 $\pm$ 2.6	16.2 $\pm$ 1.6 ^{d)}	7.8 $\pm$ 2.1
	100	14.7 $\pm$ 3.0	25.9 $\pm$ 2.2 ^{d)}	12.4 $\pm$ 1.8
Hydrocortisone	1	9.1 $\pm$ 2.1	11.0 $\pm$ 1.4	9.3 $\pm$ 1.4
	10	24.7 $\pm$ 2.5 ^{d)}	21.6 $\pm$ 1.4 ^{d)}	17.3 $\pm$ 2.1 ^{d)}
	100	31.8 $\pm$ 2.3 ^{d)}	36.2 $\pm$ 1.0 ^{d)}	31.2 $\pm$ 2.4 ^{d)}
Prednisolone	1	11.6 $\pm$ 1.7	14.1 $\pm$ 2.5	11.2 $\pm$ 2.4
	10	25.1 $\pm$ 1.8 ^{d)}	33.6 $\pm$ 2.6 ^{d)}	20.6 $\pm$ 2.2 ^{d)}
	100	44.2 $\pm$ 3.1 ^{d)}	52.0 $\pm$ 2.5 ^{d)}	44.9 $\pm$ 2.3 ^{d)}

Results are shown as the mean value $\pm$ SE of four separate experiments. Enzyme activity in controls: before the incubation, 23.0 $\pm$ 2.1 for AP, 5.3 $\pm$ 0.4 for AS and 12.0 $\pm$ 1.3 for β G; after the incubation for 30 min, 42.2 $\pm$ 3.6 for AP, 31.7 $\pm$ 1.7 for AS and 24.6 $\pm$ 2.7 for β G; total activity, 122.7 $\pm$ 1.3 for AP, 86.9 $\pm$ 6.3 for AS and 60.8 $\pm$ 7.2 for β G.

a) AP: acid phosphatase.

b) AS: aryl sulfatase.

c) β G: β -glucuronidase.

d) $p<0.01$, significant *v.s.* control.

6) 過酸化水素による酵素遊離亢進と脂質過酸化, および Albumin 存在下の酵素遊離に対する作用 (Table VIII, Table IX, Table X) 肝 lysosome に過酸化水素を添加することにより酵素遊離速度は亢進し, 30 min 間の incubation により aryl sulfatase は約 20% 遊離した. しかも, この場合脂質の過酸化も認められた. Y-8004, indomethacin および phenylbutazone は, 酵素遊離を 100 μ M まで抑制し, 1000 μ M で促進した. しかし, これらの被検化合物は, 1000 μ M まで脂質の過酸化を濃度に比例して抑制した. Prednisolone は両者を 1000 μ M まで同程度に抑制するが, その活性は弱かった (Table VIII).

TABLE VIII. Effects of Y-8004 and Anti-inflammatory Drugs on Enzyme Release and Lipid Peroxidation by 0.3% Hydrogen Peroxide from Liver Lysosomes in 0.25M Sucrose-0.04M Tris Acetate Buffer (pH 7.4)

Compound	Marker ^{a)}	% inhibition (mean $\pm$ SE, $N=3-4$) in μ M			
		1.0	10	100	1000
Y-8004	AS	4.5 $\pm$ 1.9	15.4 $\pm$ 1.4 ^{b)}	27.9 $\pm$ 0.6 ^{b)}	-14.7 $\pm$ 1.5 ^{b)}
	LP	9.8 $\pm$ 3.0	20.0 $\pm$ 2.8 ^{b)}	30.8 $\pm$ 1.3 ^{b)}	39.2 $\pm$ 0.7 ^{b)}
Indomethacin	AS	10.8 $\pm$ 3.4	22.8 $\pm$ 1.7 ^{b)}	43.0 $\pm$ 0.8 ^{b)}	-25.7 $\pm$ 1.7 ^{b)}
	LP	12.9 $\pm$ 3.4	23.4 $\pm$ 2.3 ^{b)}	30.8 $\pm$ 1.0 ^{b)}	41.0 $\pm$ 1.3 ^{b)}
Phenylbutazone	AS	12.7 $\pm$ 2.3	33.7 $\pm$ 0.9 ^{b)}	53.5 $\pm$ 1.6 ^{b)}	-28.3 $\pm$ 0.0 ^{b)}
	LP	12.8 $\pm$ 1.9	31.2 $\pm$ 1.8 ^{b)}	41.8 $\pm$ 0.7 ^{b)}	47.0 $\pm$ 2.6 ^{b)}
Prednisolone	AS	4.5 $\pm$ 1.9	9.5 $\pm$ 2.2	12.5 $\pm$ 2.1	19.5 $\pm$ 2.1 ^{b)}
	LP	6.1 $\pm$ 2.8	8.6 $\pm$ 1.5	12.9 $\pm$ 3.0	22.6 $\pm$ 1.5 ^{b)}

a) AS: aryl sulfatase, activity (μ g of *p*-nitrocatechol) in the control: before the incubation; 5.2, after the incubation for 30 min; 29.8, total; 116.7, LP: lipid peroxidation, (TBA value at OD₅₃₀ in the control: before the incubation; 0.055, after the incubation for 30 min; 0.245.

b) $p < 0.01$, significant *v.s.* control.

つぎに, PMNL lysosome を用いて同様の実験を行なった. この場合にも, Table I (Expt. A) の成績と比較して, 酵素遊離の亢進と脂質過酸化が認められた. Y-8004 は 100 μ M まで濃度に比例して酵素遊離を抑制した. Phenylbutazone の作用は, Table III の成績に比較して著しく減弱した. 一方ステロイド抗炎症薬は Table VIII の成績に比較して強い抑制作用を示した. また, これら被検化合物の酵素遊離抑制作用は抗脂質過酸化作用よりも強力であった (Table IX).

上記反応系に albumin を添加すると lysosome 酵素の遊離は抑制され, acid phosphatase および aryl sulfatase は 60 min 間に約 10% 遊離した. Y-8004, indomethacin および phenylbutazone の酵素遊離抑制作用

TABLE IX. Effects of Y-8004 and Anti-inflammatory Drugs on Enzyme Release and Lipid Peroxidation from PMN Leucocyte Lysosomes by 0.3% Hydrogen Peroxide in 0.25M Sucrose-0.04M Tris Acetate Buffer (pH 7.4)

Compound	Marker ^{a)}	% inhibition (mean $\pm$ SE, $N=4$) in μ M		
		1.0	10	100
Y-8004	AP	12.5 $\pm$ 2.3	26.6 $\pm$ 1.9 ^{b)}	37.9 $\pm$ 2.1 ^{b)}
	AS	13.1 $\pm$ 2.1 ^{b)}	27.9 $\pm$ 1.6 ^{b)}	39.5 $\pm$ 1.8 ^{b)}
	LP	5.4 $\pm$ 2.8	14.2 $\pm$ 2.4	22.8 $\pm$ 2.6 ^{b)}
Indomethacin	AP	9.5 $\pm$ 2.6	14.8 $\pm$ 2.7 ^{b)}	22.7 $\pm$ 2.1 ^{b)}
	AS	11.8 $\pm$ 2.9	18.2 $\pm$ 2.6 ^{b)}	26.8 $\pm$ 2.0 ^{b)}
	LP	1.9 $\pm$ 2.3	8.7 $\pm$ 2.1	14.4 $\pm$ 1.9
Phenylbutazone	AP	13.2 $\pm$ 2.6 ^{b)}	27.2 $\pm$ 2.6 ^{b)}	34.9 $\pm$ 2.5 ^{b)}
	AS	12.4 $\pm$ 1.2 ^{b)}	24.7 $\pm$ 2.1 ^{b)}	34.3 $\pm$ 2.2 ^{b)}
	LP	5.6 $\pm$ 1.4	20.8 $\pm$ 3.3 ^{b)}	28.6 $\pm$ 3.0 ^{b)}
Hydrocortisone	AP	10.8 $\pm$ 2.9	18.2 $\pm$ 1.7 ^{b)}	29.7 $\pm$ 1.9 ^{b)}
	AS	15.9 $\pm$ 3.3 ^{b)}	27.2 $\pm$ 3.0 ^{b)}	40.8 $\pm$ 1.7 ^{b)}
	LP	3.0 $\pm$ 2.3	12.9 $\pm$ 2.1	23.8 $\pm$ 1.4 ^{b)}
Prednisolone	AP	18.5 $\pm$ 2.1 ^{b)}	22.7 $\pm$ 2.3 ^{b)}	30.5 $\pm$ 2.4 ^{b)}
	AS	28.7 $\pm$ 3.1 ^{b)}	38.2 $\pm$ 2.4 ^{b)}	47.9 $\pm$ 1.8 ^{b)}
	LP	9.2 $\pm$ 3.0	18.0 $\pm$ 1.9 ^{b)}	36.5 $\pm$ 2.9 ^{b)}

a) AP: acid phosphatase, activity (μ g of *p*-nitrophenol) in the control: before the incubation; 2.9, after the incubation for 30 min; 18.3, total; 83.9, AS: aryl sulfatase, activity (μ g of nitrocatechol) in the control: before the incubation; 3.6, after the incubation for 30 min; 13.2, total; 83.4, LP: lipid peroxidation, TBA value at OD₅₃₀ in the control: before the incubation; 0.038, after the incubation for 30 min; 0.284.

b) $p < 0.01$, significant *v.s.* control.

TABLE X. Effects of Y-8004 and Anti-inflammatory Drugs on Enzyme Release from PMN Leucocyte Lysosomes by 0.3% Hydrogen Peroxide in 0.25M Sucrose-0.04M Tris Acetate Buffer (pH 7.4) Containing 0.1% Albumin

Compound	Marker enzyme ^{a)}	% inhibition (mean $\pm$ SE, N=3-4) in μ M		
		1.0	10	100
Y-8004	AP	3.5 $\pm$ 2.8	6.4 $\pm$ 2.2	13.5 $\pm$ 3.8
	AS	3.9 $\pm$ 1.6	7.8 $\pm$ 1.9	15.4 $\pm$ 2.0
Indomethacin	AP	3.4 $\pm$ 2.4	5.7 $\pm$ 2.9	14.1 $\pm$ 0.7 ^{b)}
	AS	2.3 $\pm$ 0.9	6.3 $\pm$ 2.0	14.5 $\pm$ 1.2 ^{b)}
Phenylbutazone	AP	3.1 $\pm$ 2.4	7.6 $\pm$ 1.4	16.3 $\pm$ 2.0 ^{b)}
	AS	2.7 $\pm$ 1.2	6.8 $\pm$ 1.9	16.7 $\pm$ 1.0 ^{b)}
Hydrocortisone	AP	11.9 $\pm$ 1.7	15.3 $\pm$ 1.2 ^{b)}	27.8 $\pm$ 1.6 ^{b)}
	AS	14.5 $\pm$ 1.2 ^{b)}	18.8 $\pm$ 1.6 ^{b)}	29.8 $\pm$ 1.4 ^{b)}
Prednisolone	AP	15.7 $\pm$ 2.0 ^{b)}	29.5 $\pm$ 1.6 ^{b)}	37.6 $\pm$ 1.9 ^{b)}
	AS	17.8 $\pm$ 1.3 ^{b)}	32.5 $\pm$ 1.3 ^{b)}	41.2 $\pm$ 1.2 ^{b)}

a) AP; acid phosphatase, activity (μ g of *p*-nitrophenol) in the control; before the incubation: 1.4, after the incubation for 60 min; 10.6, total; 73.8, AS; aryl sulfatase, activity (μ g of *p*-nitrocathecol) in the control; before the incubation; 1.0, after the incubation for 60 min; 7.8, total; 64.8.

b) $p < 0.01$, significant *v.s.* control.

は, albumin の共存により著しく低下した. 一方, ステロイド抗炎症薬は, この場合にも 1μ M 以上で酵素遊離を有意に抑制し, 上記被検化合物とは異なる性質を示した (Table X).

II. PMNL の食食作用に伴う Lysosome 酵素の遊離に対する作用

1) 経時変化 (Table XI) まず, PMNL を単独またはこれに zymosan を加えて incubate しても Table XI に示した lysosome 酵素は, 30 min 間に 3% しか遊離しないことを確認した. PMNL に血清処理 zymosan を加えて incubate すると, lysosome 酵素である acid phosphatase, aryl sulfatase および β -glucuronidase は incubation 時間に比例して遊離した. しかし, acid phosphatase の遊離率は最も低値であった. 一方, 遊離型 LDH 活性は 90 min 後においても上昇しなかった.

Y-8004 (30μ M) は, 血清処理 zymosan の食食作用に伴う lysosome 酵素の遊離を抑制した.

TABLE XI. Time Course of Phagocytic Release of Enzymes from PMN Leucocytes

Marker enzyme ^{a)}	Y-8004 (30 μ M)	Free activity (% of total activity, mean $\pm$ SE, N=4-6) in min				Total activity ^{b)}
		0	30	60	90	
LDH	—	3.3 $\pm$ 0.5	3.7 $\pm$ 0.8	4.1 $\pm$ 0.8	4.1 $\pm$ 0.8	1340 $\pm$ 16
AP (PNPP)	—	1.4 $\pm$ 0.2	3.7 $\pm$ 0.4	5.0 $\pm$ 0.3	6.6 $\pm$ 0.8	98.7 $\pm$ 7.0
AP (β GP)	—	2.4 $\pm$ 0.4	3.8 $\pm$ 0.5	5.9 $\pm$ 0.7	8.8 $\pm$ 0.4	140.2 $\pm$ 9.9
AS	—	1.5 $\pm$ 0.3	18.6 $\pm$ 0.7	26.6 $\pm$ 1.1	34.5 $\pm$ 2.5	165.1 $\pm$ 8.4
AS	+	1.3 $\pm$ 0.4	15.3 $\pm$ 0.8	19.5 $\pm$ 0.6	26.8 $\pm$ 0.6	
β G	—	1.3 $\pm$ 0.1	16.8 $\pm$ 0.9	23.0 $\pm$ 0.7	31.0 $\pm$ 1.3	84.4 $\pm$ 5.4
β G	+	1.3 $\pm$ 0.3	13.1 $\pm$ 0.7	18.4 $\pm$ 0.4	24.3 $\pm$ 0.6	

The leucocyte suspension (1×10^8 cells/ml) was incubated with serum-treated zymosan particles in Hanks' solution at 37°.

a) LDH=lactate dehydrogenase, AP=acid phosphatase (PNPP; *p*-nitrophenyl phosphate or β GP; β -glycerophosphate was used as substrates), AS=aryl sulfatase, β G= β -glucuronidase

b) See in the text.

2) 濃度作用相関 (Table XII) Y-8004 は 0.10μ M 以上で aryl sulfatase の遊離を有意に抑制した. この実験系ではステロイドおよび非ステロイド酸性抗炎症薬のいずれもが, 低濃度から aryl sulfatase の遊離を抑制し, 特に indomethacin の作用が著明であった. β -Glucuronidase の遊離を指標にして, 10μ M における被検化合物の抑制率を測定しても, aryl sulfatase の場合と同様の成績が得られた.

TABLE XII. Effects of Y-8004 and Anti-inflammatory Agents on Phagocytic Release of Aryl Sulfatase from PMN Leucocytes

Compound	% Inhibition (mean $\pm$ SE, $N=4-6$) in μ M			
	0.01	0.10	1.0	10
Y-8004	13.4 $\pm$ 1.4	22.5 $\pm$ 1.3 ^{a)}	32.2 $\pm$ 2.3 ^{a)}	44.4 $\pm$ 1.5 ^{a)} (43.4 $\pm$ 1.8 ^{a)})
Indomethacin	20.5 $\pm$ 3.4 ^{a)}	30.6 $\pm$ 2.6 ^{a)}	41.6 $\pm$ 1.3 ^{a)}	57.4 $\pm$ 1.9 ^{a)} (53.8 $\pm$ 3.5 ^{a)})
Phenylbutazone		13.0 $\pm$ 0.7	27.0 $\pm$ 1.7 ^{a)}	35.3 $\pm$ 2.3 ^{a)} (33.3 $\pm$ 1.8 ^{a)})
Hydrocortisone		18.4 $\pm$ 1.4 ^{a)}	28.8 $\pm$ 0.9 ^{a)}	42.1 $\pm$ 1.8 ^{a)} (39.4 $\pm$ 1.5 ^{a)})
Prednisolone	14.0 $\pm$ 1.8	29.6 $\pm$ 1.4 ^{a)}	38.8 $\pm$ 1.9 ^{a)}	47.9 $\pm$ 0.8 ^{a)} (43.1 $\pm$ 1.3 ^{a)})

The leucocyte suspension (2.0 ml, 1×10^8 cells/ml) containing each test solution (10 μ l) was incubated with serum-treated zymosan particles (50 μ l) in Hanks' solution at 37° for 30 min.

Figures in parentheses show the per cent inhibition on the release of β -glucuronidase (β G).

Enzyme activity in controls: before the incubation, 2.7 $\pm$ 0.3 for aryl sulfatase (AS) and 1.7 $\pm$ 0.2 for β G; after the incubation, 23.9 $\pm$ 2.3 for AS and 10.3 $\pm$ 0.7 for β G; total activity, 132.4 $\pm$ 8.7 for AS and 64.8 $\pm$ 5.9 for β G (μ g of *p*-nitrophenol formed).

a) $p < 0.01$, significant *v.s.* control.

考 察

Ignarro ら¹³⁾ はモルモットの、著者らはモルモット⁸⁾ および家兎^{4,14)} の腹水から得られた PMNL lysosome fraction を用いて、ステロイドおよび非ステロイド抗炎症薬が lysosome 膜を安定化することをすでに報告している。そこで、抗炎症薬のこのような作用が動物種に関係なく認められるかどうかを知るため、本報では主としてラットの腹水から得られた PMNL lysosome を用いて検討することとした。PMNL lysosome として、モルモット^{8,13)} の場合と同じく 600—9750 *g* fraction を使用した。

さらに、抗炎症薬の lysosome に対する作用が、その由来臓器によって異なるかどうかを比較するため、一部の試験では肝 lysosome を用いて検討した。Tanaka ら⁶⁾ および Ignarro¹⁵⁾ によれば、肝 homogenate の heavy lysosomal fraction (700—3500 *g*) は、whole fraction (700—18000 *g*) よりも薬物感受性が高いので、本報でも同じ分画を用いて検討した。この場合、lysosome の marker enzyme として acid phosphatase (基質: *p*-nitrophenyl phosphate) が β -glucuronidase よりも適していると報告されている。⁶⁾

Lysosome の incubation medium として、sucrose-tris acetate buffer (pH 7.4) を用い、抗炎症薬の lysosome 膜安定化作用が、多くの研究者^{6,8,10,13,14,15)} により見出されているので、本報でもこれを用いることとした。

なお、反応液中の最終濃度が 1% の EtOH は、肝 lysosome に対しほとんど影響を及ぼさないことが示されており、^{10,16)} PMNL lysosome についても同様であったので、被検化合物の溶媒として EtOH を用いた。

まず、予備実験として PMNL lysosome からの酵素遊離の経時変化を acid phosphatase を指標にして測定した。0.25M Sucrose—0.04M Tris acetate buffer 中で PMNL lysosome を incubate すると、acid phosphatase の遊離は 60 min まで直線性を示し、この時 Y-8004 および phenylbutazone は最高抑制率を示す (Table I. Expt. A) ことから、濃度作用相関 (Table III) は 60 min 値で求めた。しかし、対照の酵素遊離率が低いので、さらに低張圧 (0.12M sucrose—0.04M Tris acetate buffer) 下で incubate したところ、酵素遊離速度は亢進し Y-8004 は 30 min 値で最も強い抑制作用を示した (Table I. Expt. B)。

Baggiolini ら¹⁷⁾ は、家兎白血球を用いて *p*-nitrophenyl phosphate を基質とする lysosome 酵素は、存在しないことを示している。著者らの用いたラット PMNL lysosome fraction についてこの点を検討した。Table II から明らかなように、各酵素の遊離率および Y-8004 や対照抗炎症薬の遊離抑制率から見て、*p*-nitrophenyl phosphate を基質とする acid phosphatase が、 β -glycerophosphate を基質とする acid phosphatase, aryl

13) L.J. Ignarro, C. Colombo, *Nature New Biol.*, **239**, 155 (1972).

14) 中西美智夫, 後藤一洋, 久留正生, 薬誌, **94**, 1212 (1974); M. Nakanishi, K. Goto, *Biochem. Pharmac.*, **24**, 421 (1975).

15) L.J. Ignarro, *Biochem. Pharmac.*, **20**, 2847 (1971).

16) 飯塚義夫, 小林 和, 田中喜一郎, 薬誌, **92**, 311 (1972).

17) M. Baggiolini, J.G. Hirsch, C. DeDuve, *J. Cell Biol.*, **45**, 586 (1970).

sulfatase および β -glucuronidase に比較して、ラット PMNL lysosome の marker enzyme として不適であることを示唆する知見は得られなかった。このことは、家兎およびラットの PMNL lysosome に存在するそれぞれの acid phosphatase の基質特異性が異なる可能性のあることを示唆している。しかし、この問題に関してはさらに詳細な検討が必要であろう。したがって、以下の実験では被検化合物の lysosome に対する作用の評価を誤らないように、marker enzyme として *p*-nitrophenyl phosphate を基質にした acid phosphatase の他に aryl sulfatase を用いて検討することとした。なお、700—3500 *g* fraction の肝 lysosome を用いた場合にも同様の知見が得られたことは、すでに述べたとおりである。¹⁾

Y-8004 は、等張あるいは低張圧下で lysosome と incubate すると、ステロイドおよび非ステロイド抗炎症薬と同様に濃度に比例して酵素遊離を抑制する (Table III, Table V) ことから PMNL lysosome を安定化するものと推定される。

また、肝 lysosome に対しても Y-8004 は同様に膜安定化作用を示す (Table IV) が、PMNL lysosome に対しより低濃度で有効である。

ステロイド抗炎症薬である cortisone の中性 pH における肝 lysosome 膜安定化作用は弱く、pH 5.5 で強い作用を示すことが報告されている。¹⁶⁾ Prednisolone の pH 7.4 における作用も弱い、PMNL lysosome に対しては強い活性を示している。したがって、肝 lysosome と PMNL lysosome では、ステロイド抗炎症薬に対する感受性が異なるものと推定される。

これらのことから、ステロイドおよび非ステロイド抗炎症薬は、モルモット^{8,13)} や家兎^{4,14)} のみならず、ラットの PMNL lysosome に対しても膜安定化作用を示すものと推定される。また、上記の知見および前報^{4,14)} から、両系抗炎症薬の lysosome に対する作用態度が異なることが示唆されたので、さらに若干の検討を加えた。

Lewis ら⁷⁾ は、家兎肝 lysosome を用い、ステロイド抗炎症薬が phospholipase C による lysosome 酵素の遊離を抑制し、その作用機序はステロイド抗炎症薬と lysosome 膜のリン脂質との interaction によるものであると推定している。ラットの PMNL lysosome を用いた場合、phospholipase C は肝 lysosome⁷⁾ に対するよりも低濃度で lysosome 酵素の遊離を亢進させ、0.05 μ g/ml の phospholipase C による酵素遊離を、ステロイド抗炎症薬のみが強く抑制する (Table VI)。したがって、非ステロイド酸性抗炎症薬が lysosome 膜のリン脂質との interaction によって、膜安定化作用を示す可能性は低い。

Mizushima ら¹⁸⁾ は、たん白変性作用のある物質で赤血球膜を処理すると、非ステロイド酸性抗炎症薬の膜安定化作用が消失することなどの成績から、その膜安定化作用の一つとして、細胞膜中のたん白の保護作用が関与しているのではないかと報告している。PMNL lysosome をたん白と incubate しても、酵素遊離は抑制されることが予備実験から明らかにされたので、過酸化水素の存在下で incubate した。この場合、非ステロイド酸性抗炎症薬の酵素遊離抑制作用はたん白の共存により著明に減弱する。一方、ステロイド抗炎症薬は強い活性を示す (Table X)。このことは、非ステロイド抗炎症薬が medium 中のたん白と結合することにより、抑制率は低下し、また lysosome 膜に対してもその構造たん白と結合することにより膜を安定化するものと推定される。ステロイド抗炎症薬の活性は、たん白の影響を受けず、リン脂質の変化を伴う酵素遊離を抑制し、前述の Lewis ら⁷⁾ の考えを支持する知見が得られた。

前報¹⁴⁾ において、ステロイド抗炎症薬は intact lysosome および脆弱な lysosome に対し、また非ステロイド抗炎症薬は前者に対してのみ膜安定化作用を示すことを報告したが、その理由については考察されなかった。Table VII に示したように、四塩化炭素投与により *in vivo* で脆弱化した lysosome に対する非ステロイド酸性抗炎症薬の膜安定化作用は減弱し、ステロイド抗炎症薬の抑制作用は、逆に著しく強くなることが明らかにされた。前述の知見およびこのことから、非ステロイド酸性抗炎症薬は lysosome 膜のたん白が変性する前に作用した場合に膜安定化作用を示し、一方ステロイド抗炎症薬は、膜たん白がある程度変化した lysosome のリン脂質に結合し易く、その結果 lysosome 膜を強く安定化するものと推定される。また、Table I のステロイドおよび非ステロイド酸性抗炎症薬の酵素遊離抑制作用の相異をも、この考えで説明することができる。

つぎに、炎症組織により近い反応条件下で Y-8004 および対照抗炎症薬が lysosome 膜を安定化するか否かを知るため、過酸化水素による lysosome 酵素の遊離、および白血球の貪食に伴う lysosome 酵素の遊離に対する

18) Y. Mizushima, S. Sakai, M. Yamamura, *Biochem. Pharmac.*, **19**, 227 (1970).

作用について検討することとした。白血球は、その貪食作用に伴って lysosome 酵素を選択的に放出する。¹⁹⁾ また、過度の貪食により細胞内過酸化水素濃度が上昇し、²⁰⁾ 過酸化水素の分解に比例して lysosome から酵素 (aryl sulfatase) が遊離する。²¹⁾ 抗酸化物の欠乏した生体組織では過酸化水素のような過酸化物の影響を受けやすく、脂質から脂質過酸化物が容易に生成され、²²⁾ これが生体膜の障害作用を有する²³⁾ とされている。したがって、細胞内 lysosome は酸化的膜破壊や脂質過酸化物により障害を受け、lysosome 内起炎物質を遊離活性化することにより、炎症反応の進展に関与していると考えられる。

前報¹⁾において、肝 lysosome 酵素の遊離は過酸化水素の存在により亢進し、この場合脂質の過酸化を伴うことを示した。Y-8004 は非ステロイド酸性抗炎症薬と同様に、過酸化水素による lysosome 酵素の遊離亢進および脂質過酸化を抑制する (Table VIII)。しかし、1000 μM の高濃度では酵素遊離を促進するが、脂質過酸化のみを抑制する。また、前報の方法¹⁾により測定したラット肝 homogenate の 9000 g 上清における脂質過酸化の抑制作用は弱い (未発表)。PMNL lysosome を用いた同様の実験 (Table IX) においても、Y-8004 および対照抗炎症薬はいずれも酵素遊離と脂質過酸化の両者を抑制するが、前者に対しより強い抑制作用を示す。これらの知見から、Y-8004 および対照抗炎症薬は、lysosome 膜の安定化作用により二次的に脂質過酸化を抑制しているものと推定される。

白血球は異物の貪食に伴って lysosome 酵素を選択的に放出することを先に述べたが、この種の実験ではほとんどの場合ヒトまたは家兎の流血白血球が用いられており、¹⁹⁾ 腹水白血球を用いた検討はなされていない。腹水白血球は、その調製が容易でしかも採取時間を検討することにより 90% 以上の PMNL を含む腹水を得ることができるなど利点も多い。そこで、ラットの腹水白血球を使用し、ヒト流血白血球を用いた Ignarro の反応条件^{19a)} に準じて検討することとした。まず、予備実験から glycogen を腹腔内投与し 15—16 hr 後に得られた白血球の貪食能は弱いことが明らかにされたので、4 hr 後に採取した 90% の PMNL を含む白血球を用いて検討した。Table XI に示したように、血清処理 zymosan の添加により lysosome 酵素は選択的に遊離し、marker enzyme として aryl sulfatase または β -glucuronidase が適していることが示唆された。Y-8004 および対照抗炎症薬は、この遊離を低濃度から抑制する。しかも、非ステロイド酸性抗炎症薬の中で最強の抗炎症活性を有する indomethacin が、この貪食による lysosome 酵素の遊離を最も強く抑制する。そして、その作用強度の順位は前述の細胞から取り出した lysosome に対するそれとは異なるものであった。この理由として、貪食に伴う酵素遊離と lysosome の incubation による酵素遊離の mechanism が異なり、また細胞内および細胞外の lysosome で、薬物に対する感受性が異なることによるものと考えられる。

これらの成績から、Y-8004 および対照抗炎症薬は、炎症部位における PMNL の貪食作用による lysosome 酵素の遊離を抑制し、さらに前述のような過度の貪食により惹起される lysosome 膜の障害を抑制するものと推定される。そして、抗炎症薬のこのような活性が生体内における抗炎症作用の発現に関与しているものと考えられる。

結論として、Y-8004 は非ステロイド酸性抗炎症薬と同様に、ラットの PMNL および肝から得られた intact lysosome 膜を安定化し、PMNL の貪食による lysosome 酵素の遊離をも強力に抑制する。また、対照抗炎症薬の膜安定化作用はモルモットおよび家兎のみならず、ラットの PMNL lysosome に対しても認められることを示した。さらに、ステロイドおよび非ステロイド酸性抗炎症薬の lysosome に対する作用態度の相異は、lysosome 膜における両系抗炎症薬の結合部位のちがいによることが示唆された。

19) a) L.J. Ignarro, T.F. Lint, W.J. George, *J. Exp. Med.*, **139**, 1395 (1974); b) P.M. Henson, *J. Immun.*, **107**, 1535 (1971); D. Hawkins, *J. Immun.*, **108**, 310 (1972); G. Weissmann, R.B. Zurier, P.J. Spieler, I.M. Goldstein, *J. Exp. Med.*, **134**, 149s (1971).

20) G. Iyer, M. Islam, J. Quastel, *Nature*, **192**, 535 (1961); B. Paul, A. Sbarra, *Biochem. Biophys. Acta*, **156**, 168 (1968).

21) I. Desai, P. Sawant, A.L. Tappel, *Biochem. Biophys. Acta*, **86**, 277 (1964).

22) H. Zalkin, A.L. Tappel, *Arch. Biochem. Biophys.*, **88**, 113 (1960); J. Bunyan, J. Green, E. Edwin, A. Diplock, *Biochem. J.*, **77**, 47 (1960).

23) A.L. Tappel, *Fed. Proc.*, **32**, 1870 (1973).