白血球 Lysosome による炎症モデルと Betamethasone 17,21-dipropionate の炎症抑制効果

堂本千里, 岡田順子, 高野達哉, 石橋貞彦
広島大学医学部総合薬学科¹⁾

Inflammation induced by Leukocyte Lysosomes. —Anti-inflammatory Activity of Betamethasone 17,21-dipropionate—

CHISATO DOHMOTO, JUNKO OKADA, TATSUYA TAKANO and SADAHIKO ISHIBASHI
Institute of Pharmaceutical Sciences, Hiroshima University School of Medicine¹⁾

(Received February 19, 1977)

Inflammation was induced in rabbits by intracutaneous injection of lysosomal particles prepared from guinea pig leukocytes. As far as the proinflammatory activity of lysosomal particles is concerned, when assessed by leakage of intravenous dye (5% Evans Blue), intact lysosomes were more potent than the broken ones, the activity was optimal 90 min after injection, and 0.04 µg of lysosomal protein can induce the inflammation. The anti-inflammatory potency of betamethasone 17,21-dipropionate against the inflammation was higher than that of hydrocortisone acetate.

Keywords—anti-inflammatory activity; lysosome; leukocyte; hydrocortisone acetate; betamethasone 17,21-dipropionate; vascular permeability

生体に障害因子あるいは細菌が侵入するとき、その侵入部位に炎症反応が起ることは周知の事実である。炎症部位には障害因子ならびに障害産物を排除すべく白血球が集まってくる。

最近、白血球の lysosome 物質として、炎症反応に重要な役割を果していると思われる物質ならびに因子、例えば、血管透過性亢進因子 (permeability factor),²⁾ 肥胖細胞 histamine 放出因子 (mast cell histamine releasing factor),³⁾ plasmin 活性化因子 (plasmin activating factor),⁴⁾ 白血球遊走因子 (chemotactic factor),⁵⁾ および elastase⁶⁾ 等が分離精製されるようになってきた。これら白血球に存在する lysosome 物質ならびに因子は、障害因子あるいは障害産物が貪食機構により白血球細胞内にとり込まれるとき、あるいは障害因子、障害産物により、白血球そのものが崩壊してしまうような場合に細胞外に放出されるものと考えられる。⁷⁾ 実際 Golub と Spitznagel⁸⁾ は人白血球より lysosome 分画を調製し、家兎に炎症を誘導し得ることを示した。

本研究は、① casein によりモルモット腹腔内に誘導した白血球から、lysosome 顆粒分画を調製し、この lysosome 顆粒による起炎効果ならびに起炎条件を検討すること、② 白血球 lysosome 顆粒を介した抗炎症剤の新しいスクリーニング・テスト法を確立すること、ならびに、③ 臨床的に hydrocortisone acetate より抗炎症活性が高いことで知られている⁹⁾ betamethasone 17,21-dipropionate の抗炎症作用の機構を検討することを目的としたものである。

1) Location: Kasumi 1-2-3, Hiroshima.

2) N.S. Ranadive, C.G. Cochrane, *J. Exp. Med.*, **128**, 605 (1968).

3) W. Seager, A. Janoff, *J. Exp. Med.*, **124**, 833 (1966).

4) C.M. Lack, S.Y. Ali, *Nature* (London), **201**, 1031 (1964).

5) H.P. Corney, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **122**, 831 (1966).

6) A. Janoff, *Lab. Inv.*, **22**, 228 (1970).

7) G. Weissmann, R.B. Zurier, P.J. Spieler, I.M. Goldstein, *J. Exp. Med.*, **134**, 149 (1971).

8) E.S. Golub, J.K. Spitznagel, *J. Imm.*, **95**, 1060 (1966).

9) P.A. Ward, *J. Exp. Med.*, **128**, 189 (1967); P.A. Ward, J.H. Hill, *J. Imm.*, **104**, 535 (1970).

実験の部

白血球 Lysosome 分画の調製 モルモット (ハートレー系♀, 体重 200—250 g, 清水) 腹腔内に 12% (w/v) casein (Difco lab.) を 5 ml/200—250 g 体重になるように注入する。18 時間後放血により屠殺後, 腹腔内に 90—120 ml の Krebs-Henseleit bicarbonate 緩衝液 pH 7.4 (K-H buffer) を注入し, 誘導された白血球を洗い出す。白血球浮遊液は, 250 g-5 min 遠心し, 沈渣を 50 ml の K-H buffer にて洗浄する。得られた白血球を 50 ml の 0.34 M sucrose 1 mM EDTA·2Na 1% ethanol (0.34 M SVE pH 7.4) にて再度洗浄し, K-H buffer を除去する。250 g-5 min 遠心により得られた白血球の沈渣に 16 ml の 0.34 M SVE を加え, Dounce homogenizer A 型 (5 strokes) で軽く homogenize し, さらに 90 秒程度繰り返しピペットから吹き出して細胞を破壊する。Homogenate は 400 g-10 min 遠心により核分画を除き得られた上清を 9193 g-15 min 遠心し, 沈渣を集める。この沈渣に 4 ml の 0.34 M SVE を加え, さらに Dounce homogenizer A 型 (3 strokes) で軽く homogenize し, lysosome 分画とした。また蛋白質は Lowry の方法を用いて測定した。¹⁰⁾

Lysosome 顆粒の Latency (潜在活性) 測定 Lysosome 顆粒の崩壊程度をしらべるために lysosome 顆粒に存在する lysosome 酵素の latency を測定する。ここで latency (%) 値は大きい程, lysosome 顆粒は崩壊していないことを意味する。Lysosome 酵素の指標としては N-acetyl β -glucosaminidase (N-AGA) を用いた。

Lysosome 顆粒外酵素の測定には, 0.25 M sucrose, 0.1 M acetate buffer (pH 5.75), 0.2 mM 4-methylumbelliferyl-2-acetamido-2-deoxy- β -D-glucopyranoside (Koch light Lab.) の基質緩衝溶液 100 μ l と 0.25 M SVE に浮遊した lysosome 分画 100 μ l を 37° 10 分間 incubate する。Lysosome 顆粒外の lysosome 酵素により分解産生された 4-methylumbelliferone を蛍光分光光度計にて $E_{365}F_{450}$ を測定する。ここで得られた lysosome 顆粒外の N-AGA 活性を A_1 とする。

Lysosome 分画の N-AGA 全活性は, 0.25 M sucrose, 0.1 M acetate buffer (pH 5.75), 0.2 mM 4-methylumbelliferyl-2-acetamide-2-deoxy- β -D-glucopyranoside に 0.2% の Triton X-100 を含む基質緩衝溶液 100 μ l と 0.25 M SVE に浮遊した lysosome 分画 100 μ l とを 37° 10 分間 incubate 後, 分解産物 4-methylumbelliferone の蛍光を $E_{365}F_{450}$ にて測定し, lysosome 分画の N-AGA 全活性 A_2 を求める。Lysosome の latency は

$$\text{latency (\%)} = (1 - A_1/A_2) \times 100$$

の式より求めた。

白血球 Lysosome 分画による炎症反応の測定 白血球 lysosome 分画 0.05 ml を家兎 (1.5—2.0 kg, 宮本) の背部に 8 ケ所皮内注射し, 一定時間後 5% Evans Blue を 1 ml/kg になるように耳静脈より注射した。30 分後, 皮膚を切除反転後, 皮内注射部位に形成された Evans Blue の青色漏出斑の直径を計測した。以下 lysosome 分画による血管透過性亢進作用をもって炎症活性とした。Reference としては histamine 0.5 mg/ml saline を用いた。

Lysosome 炎症に対する抗炎症作用の測定 検定する薬はあらかじめ家兎腎部に筋注により投与し, 2 時間後白血球 lysosome 分画を皮内注射した。薬の抗炎症効果は, 炎症部位での Evans Blue 漏出反応に対する抑制効果から検討した。Control としては, hydrocortisone acetate を, blank としてはそれぞれの溶剤である vehicle を用いた。Vehicle は, Tween 80 0.1 g, 塩化ベンザルコニウム 0.1 g, NaH_2PO_4 3.8 g, Na_2HPO_4 17.9 g を 1 l の水に溶かし, pH 7.45 に合せたものを用いた。

結 果

白血球 Lysosome 分画の性状

12% casein で誘導したモルモット腹腔白血球より調製した lysosome 分画が, こわれることなく調製出来ているかどうかを確認するために, lysosome 酵素の一つである N-AGA 活性の latency を測定した。Lysosome 分画の調製の仕方によって latency は多少異同もあるが 80—95% 程度の latency を持つ lysosome 分画を調製することが出来る。このことは lysosome 顆粒のうち 80—95% は崩壊していないことを意味する。

崩壊した lysosome と崩壊していない lysosome の起炎作用を比較検討するために lysosome の崩壊条件を 1) 低張処理, 2) 凍結融解により検討した。Lysosome 分画を低張の sucrose 内で 4° 15 分 incubate 後, 速やかに lysosome 分画を sucrose にて等張になるように戻し, latency を測定した。Fig. 1A に示すように, latency が 50% を示すような sucrose 濃度は 0.04 M であり, 等張 sucrose を 1/10 に希釈した条件, すなわち 0.025 M sucrose の条件で 37.9% の latency を示した。

第 2 の方法である凍結融解法を用いての lysosome の崩壊を検討すると, 2 回の凍結融解ではほぼ 50% の latency になり, 10 回の凍結融解では 32.3% にまで低下する (Fig. 1B)。

10) O.H. Lowry, N.J. Roebrough, A.L. Farr, R.J. Randall, *J. Biol. Chem.*, 193, 265 (1951).

Fig. 1. A: Osmotic Effect on the Lysosomal Integrity, B: Effect of Freezing Thawing on the Lysosomal Integrity

Fig. 2. Time Course of Vascular Permeability after Intracutaneous Administration of Lysosomal Fraction

A: Intact lysosome (latency 94.2%).
B: Lysed lysosome (latency 34.4%).

以上の結果より lysosome 分画の lysosome 顆粒は、低張処理、凍結融解により崩壊し得るような形状、すなわち囊状顆粒であることが分る。起炎反応に用いた白血球 lysosome 分画としては、80—95% の latency を示す未崩壊の lysosome 分画と、凍結融解により崩壊せしめた 30—40% latency を示す崩壊 lysosome 分画をそのまま用いることにした。

Fig. 3. Concentration of Lysosomal Fraction and Vascular Permeability

白血球 Lysosome 分画の起炎作用

Lysosome 分画 (latency 94.2%) ならびに凍結融解により崩壊せしめた lysosome 分画 (latency 34.4%) 0.05 ml を背部に 8 ケ所皮内注射し、経時的に Evans Blue による血管外漏出反応を検索した。lysosome 分画による血管外漏出反応の time course をとると、未崩壊 lysosome、崩壊 lysosome とともに 90 分で最高値に達することが分る。しかしながら崩壊 lysosome による起炎活性は多少低くばらつきも大きい (Fig. 2)。言いかえるならば未崩壊 lysosome による起炎反応は崩壊 lysosome 起炎反応よりも強く、さらにばらつきも小さいと言える。

これより以下実験には、出来るだけ崩壊していない lysosome 分画を調製し、この lysosome 分画を皮内に注入後、

60 分後に Evans Blue を耳静脈より注入、さらに 30 分後 (lysosome 注入後、計 90 分後) に家兎を屠殺し、Evans Blue の血管外漏出反応を測定する事にした。

Lysosome 分画の濃度と、起炎反応との関係は、lysosome 分画の蛋白量として最低 $2.65 \times 1/5^4 = 0.04 \mu\text{g}$ で充分起炎反応を起す量であることが分る (Fig. 3)。以下実験には蛋白量として $45-0.04 \mu\text{g}/0.05 \text{ ml}$ 程度の lysosome 分画を用いた。

Betamethasone 17,21-dipropionate の抗炎症効果

未崩壊 lysosome 分画による起炎反応に対する betamethasone の抑制効果を検討する目的で次の実験を行なった。Betamethasone 17,21-dipropionate 2 mg/kg, 10 mg/kg になるようにあらかじめ家兎臀部に筋注しておき、2 時間後に未崩壊 lysosome 分画を皮内に注入、さらに 60 分後に Evans Blue を静注し、Evans Blue の血管外漏出反応を検討した。Control としては、hydrocortisone acetate 2 mg/kg, 10 mg/kg を、blank としては、vehicle を筋注し、同時に検討した。家兎は 1 群 5 匹、計 25 匹を用い、未崩壊 lysosome 分画ならびに、blank として 0.34 M SVE 0.05 ml を、1 匹の家兎の背中に 11 ケ所皮内に注入した。Vehicle を筋注したときの Evans Blue の漏出反応の直径を 100 とし、薬剤による抑制効果を相対的に表わした (Table I)。

Betamethasone 17,21-dipropionate 投与群では 2 mg/kg, 10 mg/kg 投与時、vehicle 投与群に対し、それぞれ 55.8, 41.9% の抑制効果を示し、 t 検定により、 $t_{\text{cal}}=3.02$ ($p<0.01$), $t_{\text{cal}}=4.20$ ($p<0.01$) となり、いずれも 1% 危険率で有意の抑制効果を示していることが認められる。一方 control に用いた hydrocortisone acetate 投

TABLE I. Anti-inflammatory Activity of Betamethasone 17,21-dipropionate

		Ratio of diameter	No. of focus	Standard error	Student "t" test
Vehicle		100	36	10.6	
Hydrocortisone acetate	2 mg/kg	134.5	40	14.9	$p > 0.05$
Hydrocortisone acetate	10 mg/kg	79.7	40	10.1	$p > 0.01$
Betamethasone 17,21-dipropionate	2 mg/kg	55.8	40	10.5	$p < 0.01$
Betamethasone 17,21-dipropionate	10 mg/kg	41.9	39	9.2	$p < 0.01$

与群では 2 mg/kg 投与時 vehicle 投与群に対し 134.5% と一見炎症亢進効果が認められるが、 t 検定値は $t_{cal} = 18.9$ ($p > 0.05$) となり 5% 危険率でもこの効果は有意ではない。又、10 mg/kg 投与時には vehicle に対して、79.6% と僅かながら抑制効果が認められるが、 t 検定より $t_{cal} = 1.42$ ($p > 0.01$) となり、この条件では 5% 危険率で有意の抑制効果は認められない。

さらに betamethasone 17,21-dipropionate 投与群と、hydrocortisone acetate 投与群を比較してみると、2 mg/kg 投与群では $t_{cal} = 4.37$ ($p < 0.01$)、10 mg/kg 投与群では $t_{cal} = 2.79$ ($p < 0.01$) となり抗炎症効果はいずれの濃度においても betamethasone 17,21-dipropionate の方が hydrocortisone acetate より 1% 危険率で有意の抑制効果を示した。

考 察

白血球からの lysosome の調製時において、無機の塩が 0.34 M SVE に僅かにでも含まれていると、細胞はこわれ難く、又こわれたとしても塩の影響でせっかくこわれた細胞内分画が再度凝集してしまう事が認められる。Homogenize する条件さえ良ければ、ピペットから細胞を数回噴出するだけで細胞を破壊する事が出来る。細胞を無理に homogenizer を用いて破壊すると細胞分画が凝集するばかりか、lysosome の latency も低下する。以上の点を注意して lysosome 分画を調製すると lysosome として全 lysosome の 80—90% 回収出来、しかも latency としては 95% 程度、すなわち 95% 程度未崩壊の lysosome 分画を調製する事が出来る。

崩壊ならびに未崩壊 lysosome 分画を皮内に注射し Evans Blue の漏出反応による起炎反応を検討してみると、未崩壊 lysosome 分画による起炎活性の方が高く、ばらつきも小さいことが分る (Fig. 2)。未崩壊 lysosome の方が効率がよい理由は、第 1 に崩壊した lysosome の場合は起炎活性を有する lysosome 物質が溶液状態で存在しているため、皮内注射後、時間の経過とともに皮内を拡散し、一過性に作用するため、持続的に作用する未崩壊 lysosome よりも起炎効果が小さくなる可能性。第 2 に、動物の個体差によってその拡散の仕方に差があるために起炎効果にばらつきが出る可能性、第 3 に lysosome 起炎物質の不活性化などの可能性とが考えられよう。理由はよく分らないが lysosome による起炎効果は未崩壊のものをを用いた方がより良い結果が得られる事が認められる。Golub と Spitznagel⁹⁾ は未崩壊 lysosome では起炎反応は小さく、崩壊 lysosome の方が強い炎症作用を示すとしているが、用いた白血球種差によるものかもしれない。

Lysosome 顆粒内に存在する物質のうち Evans Blue の漏出反応を亢進する物質としては、① permeability factor,²⁾ ② mast cell histamine releasing factor,³⁾ ③ leukokininogen を活性化して leukokinin にする leukokininogenase,¹¹⁾ ④ kininogen を活性化する作用を有する plasmin を plasminogen から活性化する plasminogen activating factor,⁴⁾ ⑤ 出血因子の 1 つと考えられつつある elastase⁶⁾ などが考えられる。また lysosome 内に局在するといわれている chemotactic factor⁵⁾ ならびに plasmin によって補体 C_3 , C_5 が活性化されることにより生ずる chemotactic factor⁹⁾ によって新たに白血球が炎症部位に集まって来ることによって炎症がさらに亢進される可能性が考えられる。すなわち炎症部位にて集まってきた白血球がさらに lysosome 物質を細胞外に放

11) L.M. Greenbaum, *Am. J. Path.*, **68**, 613 (1972).

出する事によって炎症反応はなお一層亢進する可能性が考えられる。Lysosome 顆粒による起炎反応は、これらの因子の総合的な共同作用によるものと考えられよう。以上のように lysosome 顆粒により誘起される炎症反応は、数段階の反応によって形成されているため、炎症反応が最大になるために 90 分という長い時間を有し (Fig. 2), lysosome 物質としては homogenate 蛋白質量として $0.04 \mu\text{g}/0.05 \text{ ml}$ 程度で充分活性を示す (Fig. 3) ものと考えられる。この量は reference に用いた histamine の量 $10 \mu\text{g}/0.05 \text{ ml}$ よりもはるかに少ない量である。又 histamine による反応は 30 分以内と非常に反応時間が短く、lysosome による起炎反応は、単純な histamine のみによる反応ではないということが出来る。

以上の方法で確立された lysosome 顆粒による起炎反応モデルは、炎症反応という複雑な過程のなかで、白血球、特に白血球 lysosome が関与している部分を抽出し、単純化したモデルと考える事が出来よう。言い換えるならば、炎症反応のメカニズムを白血球 lysosome レベルから考察するに都合の良い、より単純化された系であり、抗炎症剤の作用機構をより詳細に検索したり、新しい抗炎症剤をスクリーニングするのに良い方法と考えた。

Lysosome 顆粒による起炎作用に対する抑制という立場からみた抗炎症剤としては、betamethasone の誘導体である betamethasone 17,21-dipropionate を用いた。本剤の抗炎症作用活性は、臨床的には hydrocortisone acetate より高いことで知られているが、その作用機作は未だ不明である。¹²⁾ 薬剤の lysosome 顆粒ならびに lysosome 物質に対する直接作用を避けるため、薬剤は臀部より筋注投与した。Betamethasone 17,21-dipropionate 2 mg/kg および 10 mg/kg は未崩壊 lysosome 顆粒による起炎反応に対して、いずれも 50% 以下の抑制活性を示し、 t 検定危険率 1% で明らかに有意の抑制活性を示した (Table I)。しかも同じ量の hydrocortisone acetate による起炎反応に対する抑制効果を比較した場合も、 t 検定危険率 1% で betamethasone 17,21-dipropionate の方があきらかに有意の抑制効果を示した。また lysosome によって誘導された炎症に対する hydrocortisone acetate の抑制効果があまり強く認められなかった事実を考慮するとき betamethasone 17,21-dipropionate の炎症に対する作用部位と、hydrocortisone acetate の作用部位とが多少異なっていることを意味するものと思われる。

臨床実験の結果は人間による実験であり、本実験はモルモットの白血球による家兎に対する炎症反応であるため、動物種に違いがあり必ずしも直接的に結びつくものではないが betamethasone 17,21-dipropionate の抗炎症剤としての作用部位の一つの可能性として、betamethasone 17,21-dipropionate には白血球 lysosome による起炎反応の抑制効果があるものと期待したい。しかるに白血球 lysosome による起炎反応は、幾多の lysosome 物質の総合反応であるだけに、betamethasone 17,21-dipropionate が、どの物質に対する抑制効果であるかはさらに検討を要するところである。また、ここではデーターとしては示していないが、崩壊 lysosome による起炎反応に対しても betamethasone 17,21-dipropionate は抑制効果を示すことを考え合せると Golub と Spitznagel⁹⁾ のように単純な lysosome 膜の安定化による抗炎症作用ではないように思われる。

謝辞 この研究に関する塩野義製薬の援助に謝意を表する。

12) D.I. Williams, D.S. Wilkinson, J. Overton, J.A. Milne, W.B. McKenna, A. Lyell, R. Church, *Lancet*, 1964, 1177; 小林敏夫, 西日本皮膚科, 36, 360 (1974).