

厚生科学研究費補助金

高度先端医療研究事業

新規化学修飾ヘモグロビン・ α -1 糖蛋白結合体 (PHP- α -1 AGP) の
人工血液としての開発研究

平成12年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 西 勝英

平成13年(2001)3月

目 次

I. 総括研究報告		
ピリドキシル化ポリオキシエチレン・ヘモグロビン 重合体（PHP）の摘出腸管の収縮運動に対する作用に関する研究	-----	1
西 勝英		
II. 分担研究報告		
1. PHP- α_1 AG のニトロソ化の製剤の作製	-----	7
前田 浩		
2. 微小循環系における多核球依存性血管透過性亢進の分子機構		
山本 哲郎	-----	13
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----	17
IV. 研究成果の刊行物・別刷	-----	19

I. 総括研究報告

厚生省科学研究補助金（高度先端医療研究事業）
（総括）研究報告書

ピリドキシル化ポリオキシエチレン・ヘモグロビン重合体（PHP）の
摘出腸管の収縮運動に対する作用に関する研究

主任研究者 西 勝英 熊本大学医学部薬理学第二講座 教授

研究要旨：ヘモグロビンをベースにした人工酸素運搬体重合体の投与により下痢あるいは便秘等の症状が生じるとの報告があり、内臓粘膜に対する人工血液の影響を検討する必要性が生じてきた。今回、PHP の代用血液としての有用性を検討する基礎的研究の一環として、マウス腸管平滑筋、消化運動に関する薬理学的研究を行った。摘出腸管平滑筋標本において、化学修飾ヘモグロビンである PHP は、その収縮の振幅や筋張力に影響を与えることが明らかとなり、ヘモグロビンと同様の NO 除去作用を有すること、更に収縮作動薬を用いた実験から Ca キレート作用も有することが分った。本実験結果より、PHP を臨床応用するためには、従来の PHP のもつ Ca キレート作用を軽減し、ニトロソ化して過剰な過酸化由来の毒性を軽減した新規ヘモグロビン作成の必要性があることが示唆された。

分担研究者氏名

前田 浩（熊本大学医学部・教授）

山本哲郎（熊本大学大学院医学研究科・教授）

での PHP の代用血液としての有用性を検討するとともに、Hb 自体の作用との比較検討を行うことで、PHP の化学修飾による薬理学的作用への影響も検討した。

A. 研究目的

酸素代謝系のなかで内臓粘膜は最もダメージを受けやすい部位であると知られている。ヘモグロビン（Hb）ベースの人工酸素運搬体重合体の投与により下痢あるいは便秘等の症状が生じるとの報告や PHP 投与によりエンドトキシンショック様の症状が生じるとの報告があり、腸管平滑筋、消化運動に対する影響を検討する必要性が生じてきている。以上のことから、内臓粘膜のモデルとしてマウス腸管摘出標本を用いて微少循環レベル

B. 研究方法

1. マウス摘出回腸標本の自発性収縮に対する作用

1.1 マウス回腸平滑筋標本の作成

BALB/c 系雄性マウス（3～4 週齢）をエーテルで麻酔し、素早く腹部を切開し、胃から直腸にかけて臓器を傷つけないように摘出した。回腸部分の周囲の脂肪や結合組織を除去した後、回盲接合部に近い回腸遠位部を 5mm の長さで切断し、標本をただちに 100%O₂ で通気し、37℃に保温

した Krebs' solution の入った 10ml のバス中の L 字型のフック（ガラス製）に 1g の静止張力を負荷して懸垂した。標本の安定化のため 1 時間放置し、腸管の張力は、アイソメトリックトランスデューサー（TB-611T、日本光電）及びプリアンプ（AP-621G、日本光電）を介して、ペンレコーダー（WI-641G、日本光電）に記録するとともに DAT テープレコーダー（RE-101T、TEAC）に記録した。

1.2 直接作用

PHP と Bovine Hb を 0.001~6g/dl のヘモグロビン濃度でマウスの回腸平滑筋標本に累積的に添加し、腸管に対する直接作用を検討した。自発性収縮に対する PHP と Hb の作用を検討するにあたり、収縮の振幅、頻度そして静止張力に対する作用を指標とし、各々、コントロール時の値を 1 とした時の相対値で検討した。張力の変化は収縮作用に関しては、各々の収縮作動薬で惹起される最大応答を 1 とした相対値で示した。

1.3 PHP と Bovine Hb の収縮作動薬で惹起される収縮に対する作用

張力の変化はコントロール時における各収縮作動薬で惹起される最大張力を 1 とした相対値で検討した。

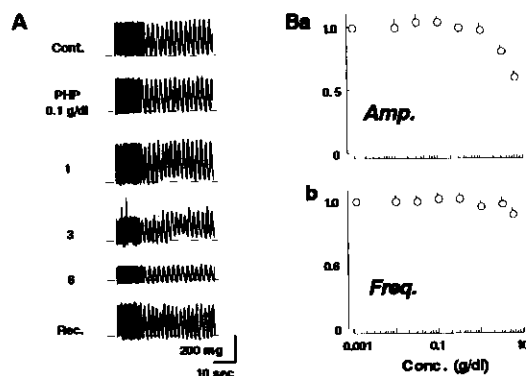
C. 研究結果

1.1 マウス回腸平滑筋摘出標本の自発性収縮に対する PHP の影響

PHP を 0.001~6g/dl の濃度で投与し、自発性収縮の振幅と頻度に対する影響を検討した。PHP は 0.1g/dl の濃度までは腸管平滑筋収縮の振幅を若干ではあるが増強し、逆に 3g/dl 以上の濃度で

は振幅の抑制を惹起した（図 1）。PHP はヘモグロビン系人工酸素運搬体であることから Hb 単独の影響も検討した。その結果、Hb も PHP と同様に 1g/dl 以下の濃度では腸管収縮の振幅増強を惹起し、その効果は PHP に比べ強かった。逆に 3g/dl 以上の濃度では振幅抑制を生じたが、PHP に比べその効果は弱かった。これら PHP と Hb により惹起される腸管平滑筋収縮の振幅変化は標準外液で再灌流するとコントロールの値にまで回復した。以上のように、PHP や Hb 濃度によって 2 層性の応答が記録されたことから、収縮に対する増強作用と抑制作用に分けて検討を行った。各々の濃度が 0.3g/dl 以下で惹起される腸管収縮増強作用に関して、特に 0.3g/dl の濃度において PHP はほとんど増強作用を示さないのに対し Hb は有為に増強作用を示した（図 2）。収縮増強作用が Hb 自体のもつ NO 消去作用によるものかどうか検討するために NO 合成阻害剤の L-NAME を用いて検討した結果、これらの収縮増強作用は PHP と Hb による NO 消去作用によることが示唆された（図 3）。更に、アセチルコリン受容体やノルアドレナリン受容体阻害剤と TTX 投与による実験結果から、PHP や Hb の収縮増強作用は自律神経系を介さず、腸管筋の神経筋接合部においてシナプス前から放出される NO の消去作用によることが示唆された（図 4）。

図 1. マウス回腸平滑筋摘出標本の自発性収縮に対する PHP の影響



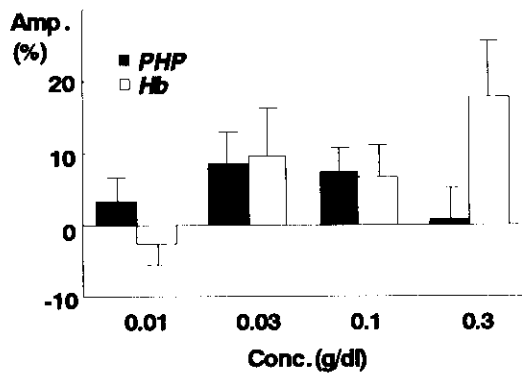


図 2. PHP と Hb の腸管収縮に対する増強作用

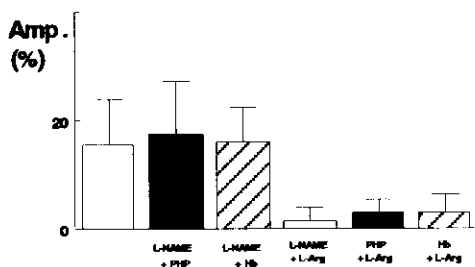


図 3. PHP と Hb の収縮増加作用に対する NO 合成酵素系の関与

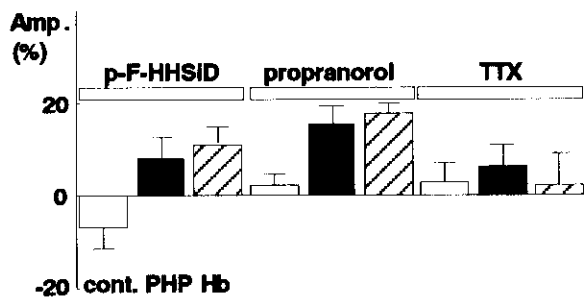


図 4. PHP と Hb の収縮増強作用に神経伝達物質の関与

次に、PHP 濃度が 3g/dl 以上で惹起される収縮抑制作用について検討を行った。6g/dl の PHP が浸透圧を上昇して収縮抑制を惹起するかどうか検討した結果、外液浸透圧はほとんど影響しないことが分った。次に、PHP の成分であるポリオキシエチレン (POE) のカルシウム (Ca) キレート作用が報告されていることから、外液 Ca 濃度の平滑筋収縮に対する影響を検討した。

1.4 外液カルシウム (Ca) 濃度の平滑筋収縮に対する影響

外液 Ca 濃度の減少にともない収縮の振幅抑制と頻度減少が生じた (図 5A)。PHP を前投与した際、一過性に収縮力の増加 (回復) を生じたが非持続性であった (図 5B)。次に、外液 Ca 濃度を 5mM として収縮が一定となった後に PHP の収縮抑制作用を検討した結果、自動性収縮に対する抑制作用がほぼ消失した (図 5C)。以上から PHP には外液 Ca のキレート作用が存在することが示唆された。

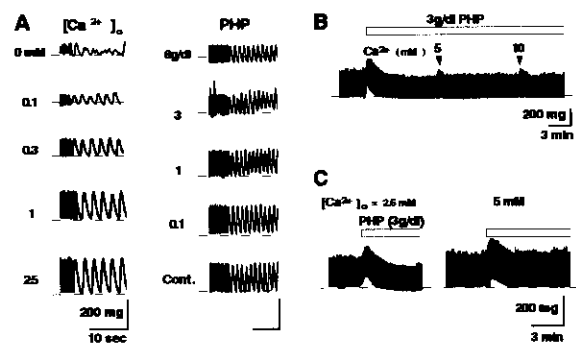


図 5. 自発性収縮に対する Ca の影響

2.1 収縮作動薬で惹起される収縮に対する PHP の影響

収縮作動薬としてアセチルコリン (ACh)、プロスタグランジン F2 α と E1 (PGF2 α と PGE1) そしてブラジキニン (BK) を用いて収縮作動薬によって惹起される収縮に対する PHP の影響を検討した。全薬品投与により用量依存性収縮応答が記録された。PHP 濃度 3g/dl の時、ACh 投与による最大収縮はコントロールの収縮張力とほぼ同じであったのに対し、PGF2 α 、PGE1そして BK 投与によって惹起される収縮は顕著に抑制され各々コントロールの 44、38 そして 56%に減少し

た (図 6)。このことから PHP による ACh と他の 3 種の薬品 (PGF_{2α}、PGE₁ そして BK) によって惹起される収縮張力の抑制過程に違いがあることが示唆された。

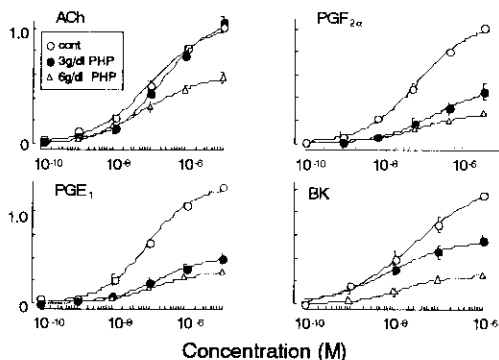


図 6. 収縮作動薬で惹起される収縮に対する PHP の影響

2.2 収縮作動薬で惹起される収縮に対する Hb の影響

収縮作動薬で惹起される収縮に対する Hb の影響を検討した。Hb は収縮作動薬で惹起される最大収縮に影響を与えなかった。ACh と PGF_{2α} を例にとり、各々で惹起される収縮力に対する Hb の影響を検討した結果、Hb は低濃度での両作動薬に対する収縮力を亢進した (図 7)。

2.3 収縮作動薬で惹起される収縮に対する浸透圧の影響

収縮作動薬の ACh と PGF_{2α} で惹起される収縮に対する高浸透圧の影響を検討した。高浸透圧条件下においても収縮作動薬による収縮は影響を全く受けなかった。

2.4 PHP の収縮抑制作用に対する外液 Ca 濃度の影響

ACh で惹起される収縮を指標として、外液 Ca

濃度の収縮に対する影響を検討した結果、PHP 存在下で ACh で惹起される持続性収縮の脱感作は外液の Ca 濃度を 1mM に減少した時と類似していた (図 8)。

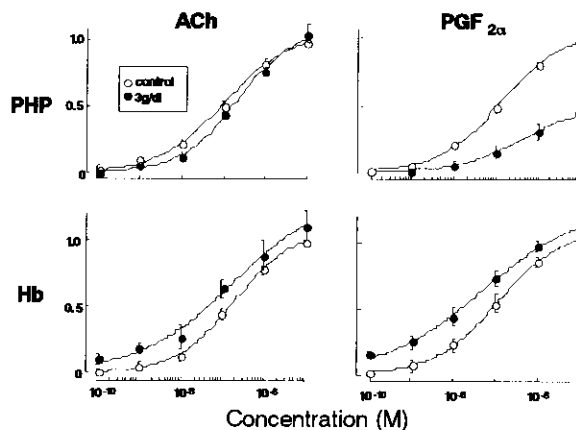


図 7. 収縮作動薬惹起による腸管収縮に対する PHP と Hb の作用

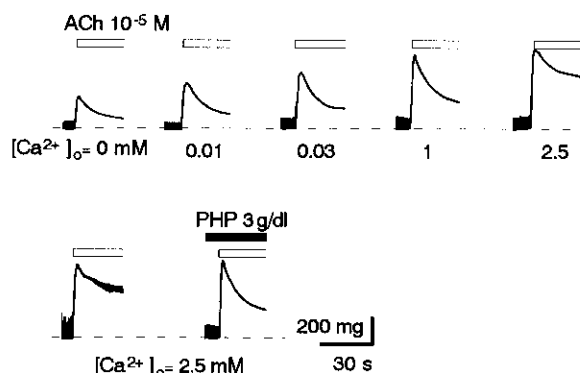


図 8. ACh で惹起される収縮力に対する外液 Ca 濃度の影響

次に、PHP の収縮過程での影響が異なると考えられた ACh と PGF_{2α} を例にとり、各々の薬品で惹起される収縮に対する外液 Ca 濃度の影響を検討した結果、細胞外 Ca 濃度を 5mM にすると、ACh で惹起される収縮は PHP 投与によって生じる持続性収縮の脱感作を消失した。一方、PGF_{2α} で惹起される収縮力は外液 Ca 濃度を上昇しても PHP による収縮力の抑制は残ったままであった (図 9)。更に、40mM の高カリウム溶液投与で惹起される

収縮が PHP 投与でのみ抑制されたことから、収縮作動薬の応答に関して PHP の Ca キレート作用が示唆された (図 10)。

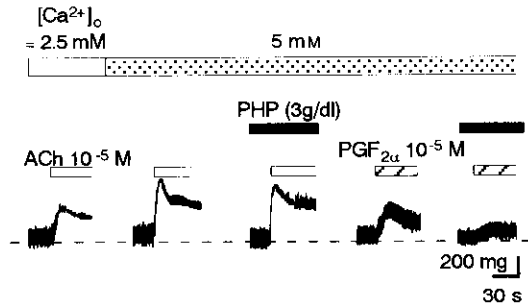


図 9. 収縮作動薬で惹起される収縮に対する外液 Ca 濃度の影響

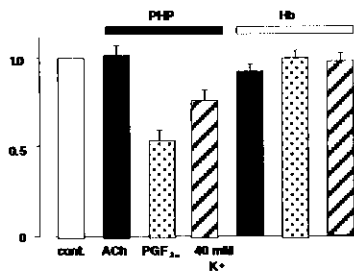


図 10. 収縮作動薬惹起による腸管の収縮に対する PHP と Hb の作用

D. 考察

小腸粘膜毛細血管は有窓性毛細血管であり、溶質や血漿蛋白あるいは血球成分などの大きな物質の輸送に適した構造であるが、低分子物質の血管外漏出も指摘される。PHP の臨床応用という立場上、PHP 成分の一部漏出の可能性も示唆されており、摘出腸管の収縮に対する PHP の作用を検討する必要性が生じてきている。

平滑筋の収縮振幅は特に筋自体の張力を反映し、頻度はイオンチャネルの開閉などの膜電位の変化の影響を受けると考えられている。PHP は頻度にあ

まり影響を与えず、振幅に影響を与えたことから平滑筋自体の収縮に対する影響が強いことが示唆された。また、自動性収縮はイオンチャネルが関与すると知られており、PHP はその Ca キレート作用によって Ca チャネル自体や Ca 依存性 K チャネルなどの開閉にも影響している可能性が考えられる。

今回、低濃度の PHP では振幅増強作用が、一方、高濃度では抑制作用が生じるという 2 層性の応答が観察された。低濃度の PHP 投与の際に生じる収縮増強は Hb 投与においても同様に生じ、特に 0.3g/dl と 1g/dl の Hb 投与の時の効果が大きかった。そしてこの PHP の収縮亢進作用は Hb 分子のもつ NO 除去作用と同等のものであることが確認された。一方、PHP は 1g/dl 以上の濃度で、収縮の振幅に対して抑制効果を示した。腸管の収縮作動薬として ACh、PGF_{2α}、PGE₁ そして BK を用いて各収縮に対する PHP の影響を検討した結果、ACh 以外の全ての薬品投与で惹起される収縮が PHP 投与により有為に抑制された。収縮作動薬によって惹起される収縮に対する外液のカルシウム濃度の影響を検討した結果、PHP による Ca キレート作用が確認され、各収縮作動薬で惹起される収縮に対する外液 Ca の依存度に違いがあることが示唆された。

今後の課題としては、PHP 成分の漏出の可能性も示唆されていることから、更に血管や腸管粘膜における PHP の透過性の問題や自律神経系における EDRE/NO の作用に対する影響、更に血小板を含めた凝固系への影響の検討も必要であると考えられる。末梢粘膜でのエンドトキシンショック様症状の緩和という点からも、さらに脳動脈に対する収縮作用や血圧上昇や徐脈という心臓対

する影響に対しての十分な検討が必要であり、人工血液の NO/CO 負荷が臓器の機能維持に必要な不可欠であり、今後 NO 付加や α 1-糖タンパクの結合などによる新規 PHP の開発が期待される。

E. 結論

PHP はマウス摘出回腸標本の自発性収縮に対し、1g/dl 以下の濃度では若干ではあるが振幅の増強を生じ、この作用は NO 消去作用によるものであることが分った。一方 3g/dl 以上の濃度では逆に振幅抑制が生じ、Hb 単独投与時よりその効果が強かったこと、更に、収縮作動薬で惹起される収縮に対する PHP の影響を検討した結果から、この PHP 投与により生じる振幅抑制には浸透圧増加が一部関与するものの、PHP の成分であるポリオキシエチレンのカルシウムキレート作用が関与することが確認された。

F. 研究発表

1. 論文発表

2. 学会発表

1. 村井恵良, 西勝英: マウス小腸平滑筋収縮に対する人工血液の影響. 第52回日本薬理学会西南部会, 平成11年 11月(鹿児島).
2. 村井恵良, 西勝英: ピリドキシル化ポリオキシエチレン・ヘモグロビン重合体の摘出腸管の収縮運動に対する作用. 第7回日本血液代替物学会年次大会, 平成12年 9月7~8日(札幌).
3. 西勝英: 第7回日本血液代替物学会年次大会, 平成12年9月7~8日(札幌).

II. 分担研究報告

厚生科学研究費補助金（高度先端医療研究事業）
分担研究報告書

PHP- α_1 AG のニトロソ化製剤の作製

分担研究者 前田 浩 熊本大学医学部微生物学教室 教授

研究要旨：PHP の臨床応用の際問題となるヘモグロビンの NO 消去作用を改善させるため、ニトロソ蛋白の作製法を確立し、ヘモグロビンや α_1 -acid glycoprotein (α_1 AG) のみならず、その他の血清蛋白、例えばアルブミンや α_1 -protease inhibitor のニトロソ化を試みた。さらに、ニトロソ化蛋白およびニトロソ化合物の NO 供与体としての活性を、それらの平滑筋弛緩反応、抗アポトーシス作用、抗酸化活性、白血球走化性抑制活性および肝虚血再灌流障害における血流維持および臓器保護作用について検討した。その結果、今回作製したニトロソ化 α_1 AG などのニトロソ化蛋白は、強い血管弛緩作用のみならず、抗酸化活性、抗アポトーシス作用や臓器保護作用など多彩な薬理活性を有していることがわかった。この様なニトロソ化蛋白と PHP を併用することにより、より安全な人工酸素運搬体の臨床応用が可能であることが示唆された。

A. 研究目的

一酸化窒素 (nitric oxide, NO) は内因性血管弛緩因子として機能しており、主要臓器の血流維持作用を発揮しているのみならず、生体内で抗酸化活性や抗アポトーシス活性を介して、細胞保護作用を発現していることが分かってきた。

PHP をはじめとする人工ヘモグロビンは、人工酸素運搬体として、その臨床応用が期待される。しかしながら、ヘモグロビンは生体内の NO の最も強力な消去剤であり、PHP などを血管内に多量、かつ長期にわたり投与した場合、血管弛緩因子としての NO の機能が損なわれ、主要臓器に虚血性ストレスを与えることが危惧される。さらに、ヘモグロビン

の含有する鉄イオンは、生体内で脂質過酸化反応を触媒し、生体に酸化ストレスをもたらす要因となることも指摘されており、人工ヘモグロビンの開発において、酸素運搬能以外のヘモグロビンの病態生理活性を改善させることが重要な課題となることが予想される。

一方、近年生体内で生じた NO は、その一部が蛋白や低分子のチオール残基とニトロソ化付加体を形成し、その機能を発揮していることが指摘されている。

そこで、本分担研究においては、PHP の NO 消去活性に伴った副作用の軽減を目的として、 α_1 AG をはじめとする各種血清蛋白由来の各種ニトロソ化蛋白を作製し、さらに、これらニトロソ化蛋白の NO 供与体として薬

理活性の解析を行った。

B. 研究方法

1. 各種蛋白質のニトロソ化

α_1 AG や α_1 -protease inhibitor (α_1 PI) などの各種血清蛋白質やヘモグロビンのニトロソ化誘導体の調整を行った。このため、まず、それぞれの精製蛋白質溶液に 10 等量 (モル比) の dithiothreitol を添加し、室温で 2 時間放置した後、Sephadex G-100 を用いたゲル濾過により、遊離 SH 基を有する蛋白質を分離した。さらに、各種蛋白質溶液に 10 等量 (モル比) の isoamyl nitrite を添加し、37°C で 30 分間反応させた。反応液を Sephadex G-25 に展開し、未反応の isoamyl nitrite を除去し、ニトロソ α_1 AG、ヒト血清アルブミン、 α_1 PI、ヘモグロビンなどを精製した。

2. ニトロソ化蛋白質の血管平滑筋弛緩作用

ニトロソ化蛋白質が、NO 供与体として血管平滑筋に対し弛緩作用を発揮することを確認するため、ウサギの胸部大動脈リング標本を用いて、それぞれのニトロソ化蛋白質の血管弛緩作用について検討した。

3. ニトロソ化蛋白質の肝虚血再灌流障害における臓器保護作用

ニトロソ化蛋白質の細胞・臓器保護作用を検討するため、ラット肝虚血再灌流障害モデルを作製し、それらの治療効果について解析した。肝虚血再灌流障害は、ラットの肝動脈および門脈を 30 分結紮し、再開直前にニトロソ蛋白質を門脈より投与し、再灌流後の肝障害に対する効果について検討した。肝障害の評価は、血中の肝逸脱酵素レベルおよび肝細胞のアポトーシス様変化を TUNEL 法により解析し、また、肝組織への好中球浸潤は、抗好中球抗体を用いて免疫組織学的に検討した。あ

わせて、肝血流量を Laser Doppler 血流計により測定した。

さらに、各種ニトロソ化蛋白質の抗酸化活性を検討するため、ニトロソ化蛋白質によるヘムオキシゲナーゼ-1 (heme oxygenase-1, HO-1) の誘導について検討した。最近 HO-1 は、生体内で強力な抗酸化能を発揮していることが明らかにされ、大変注目を浴びている。

4. α_1 AG の白血球走化性抑制作用

2%カゼインをモルモットに腹腔内投与し、14 時間後に腹腔滲出好中球を回収し、chemotaxis chamber (membrane pore size: 5 μ m) を用いた好中球の走化性試験を行った。この際、白血球走化性はヒトレコンビナント interleukin-8 (IL-8) および *N*-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine (fMLP) により誘導し、その走化性に及ぼす α_1 AG の影響を検討した。

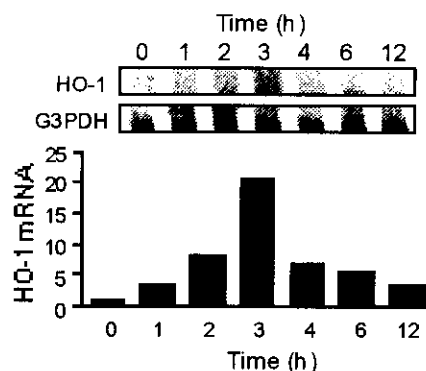


図1. 正常肝における NO ドナー投与後のヘムオキシゲナーゼ-1 (HO-1) 誘導。

ラット正常肝にニトロソ α_1 PI を投与して誘導される HO-1 mRNA の経時的変化を示す。HO-1 mRNA シグナルはノーザンブロット法からのデータを密度解析して定量化した。

C. 研究結果

今回検討した血清蛋白質およびヘモグロビンは、蛋白質の変性などを伴うことなく比較的効率よくニトロソ化された。そのニトロソ化の

程度は、 α_1 AG で 30%、 α_1 PI でほぼ 100%、アルブミンで 60%、ヘモグロビンが、20-30%であった。これらのニトロソ化蛋白は凍結乾燥後も比較的安定で、NO を良好に保持していた。

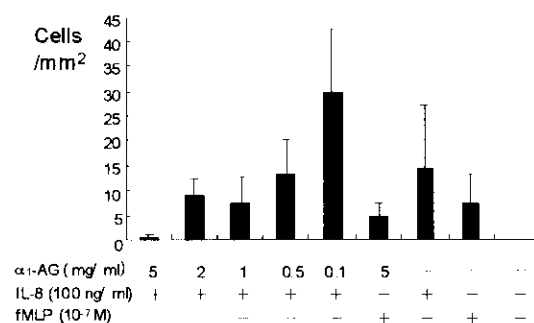


図 2. α_1 AG による白血球走化性の抑制。

C. 研究結果

今回検討した血清蛋白およびヘモグロビンは、蛋白の変性などを伴うことなく比較的効率よくニトロソ化された。そのニトロソ化の程度は、 α_1 AG で 30%、 α_1 PI でほぼ 100%、アルブミンで 60%、ヘモグロビンが、20-30%であった。これらのニトロソ化蛋白は凍結乾燥後も比較的安定で、NO を良好に保持していた。

各種ニトロソ化蛋白の薬理活性を解析したところ、いずれの蛋白もウサギ大動脈血管平滑筋に対して、強い弛緩作用を示したが、特に、特にニトロソ α_1 PI は強力な弛緩作用を示した。さらに、ニトロソ α_1 PI はラットの肝虚血再灌流障害において、強力な臓器保護作用を示し、その防御的効果は、ニトロソ化蛋白の有する抗好中球、抗アポトーシス活性により発現されているものと思われた。

また興味あることに、これらのニトロソ蛋白は、ラット肝臓において、著明な HO-1 誘導能を示した。このことは、ニトロソ蛋白が

HO-1 の発現誘導を介して、生体内で抗酸化活性を発揮する可能性を示唆している (図 1)。

以前より、 α_1 AG は血小板凝集抑制作用、免疫抑制作用、赤血球の微細間隙通過促進作用など有することが知られている。前述の如く、ヘモグロビンはその NO 消去活性により、血管内皮細胞から産生される NO を消去し、微小循環を損なう可能性が示唆されている。

また、NO は、血流中の白血球の内皮への接着を抑制することにより、白血球による血管内皮の損傷を防御していることも分かっており、ヘモグロビンが、血管系の NO を消去し白血球の内皮への接着とそれに引き続く、血管外への漏出を促し、各種臓器の虚血・再灌流障害を悪化させることも考えられる。

そこで、今回我々は α_1 AG の白血球走化性に対する作用を検討した。その結果、 α_1 AG は、モルモット好中球の IL-8 および fMLP による走化性誘導を強く抑制した (図 2)。このことは、 α_1 AG を PHP に併用することにより、ヘモグロビンによるにより誘発される白血球による血管障害を予防できる可能性を示唆している。

D. 考察

これまでの研究において、 α_1 AG のみならず、ほとんどすべての-SH 含有蛋白質のニトロソ化調整法を確立した。さらに、今回作製したニトロソ化蛋白は、生体内において強力な NO 供与活性を発揮し、NO そのものの有する多彩な生理活性、例えば血流維持、抗炎症、抗酸化、抗アポトーシス活性を介し、細胞・臓器保護作用を発揮することがわかった。

前述の通り、PHP などの人工ヘモグロビン製剤は、NO 阻害活性やヘム鉄の過剰投与に

より酸化ストレスを誘発する可能性が示唆されている。このことは、PHP を酸素運搬体として臨床へ応用する際、深刻な問題となることが予想される。従って、今回見出したニトロソ化製剤の有する多彩な生体防御活性を PHP などのヘモグロビン製剤に賦与することにより、ヘモグロビン製剤の欠点を補った安全な血液製剤の開発が可能になるものと思われた。

さらに、血小板凝集抑制作用、免疫抑制作用、赤血球の微細間隙通過促進作用に加えて、今回我々が見出した白血球走化性抑制作用、などの α_1 AG そのものの有する生理・薬理作用をうまく利用することにより安全性の高い人工ヘモグロビンの開発が可能となるといえる。

D. 結論

PHP をニトロソ化することで、もしくは、各種ニトロソ化製剤、例えばニトロソ化 α_1 AG などを PHP 製剤に添加することで、ヘモグロビンによる血流低下、酸化ストレスなどの副作用を改善させ、より安全で有効な人工酸素運搬体の開発の可能性が示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Y. Miyamoto, T. Akaike, M. Samiul Alam, K. Inoue, T. Hamamoto, N. Ikebe, J. Yoshitake, T. Okamoto and H. Maeda: Novel functions of human α_1 -protease inhibitor after S-nitrosylation: inhibition of cysteine protease and antibacterial activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **267**: 918-923 (2000).
2. T. Akaike, S. Fujii, A. Kato, J. Yoshitake, Y. Miyamoto, T. Sawa, S. Okamoto, M. Suga, M. Asakawa, Y. Nagai and H. Maeda: Viral

mutation accelerated by nitric oxide production during infection in vivo. *FASEB J.*, **14**: 1447-1454 (2000).

3. Y. Miyamoto, T. Akaike and H. Maeda: S-Nitrosylated human α_1 -protease inhibitor. *Biochim. Biophys. Acta*, **1477**: 90-97 (2000).
4. N. Ikebe, T. Akaike, Y. Miyamoto, K. Hayashida, J. Yoshitake, M. Ogawa and H. Maeda: Protective effect of S-nitroso- α_1 -protease inhibitor on hepatic ischemia-reperfusion injury. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **295**: 904-911 (2000).
5. T. Akaike, and H. Maeda: Nitric oxide and virus infection. *Immunology*, **101**: 300-308 (2000).
6. T. Akaike and K. Inoue: S-Nitrosothiol detection by HPLC coupled with flow reactors of Hg^{2+} and Griess reagent. In *Experimental Protocols for Reactive Oxygen Species (ROS) and Reactive Nitrogen Species (RNS)* (eds. N. Taniguchi and J.M.C. Gutteridge), Oxford University Press, New York, Oxford, p. 20-24 (2000).
7. T. Akaike and H. Maeda: Pathophysiological effects of high-output production of nitric oxide. In *Nitric Oxide* (ed. L.J. Ignarro), Academic Press, San Diego, p.733-745 (2000).

2. 学会発表

1. H. Maeda: Factors controlling the EPR effect: the principal tumour targeting mechanism for polymeric drugs. 4th International Symposium on Polymer Therapeutics, January 5-7, 2000 (London, U.K.).
2. H. Maeda: Bradykinin in cancer and vascular permeability. 1st Int'l Conference on Biology, Chemistry and Therapeutic Applications of Nitric Oxide, June 3-7, 2000 (San Francisco, U.S.A.).
3. T. Akaike, S. Fujii, S. Okamoto and H.

- Maeda: NO-dependent viral pathogenesis in herpes simplex virus-induced encephalitis in mice. 1st Int'l Conference on Biology, Chemistry and Therapeutic Applications of Nitric Oxide, June 3-7, 2000 (San Francisco, U.S.A.).
4. Y. Miyamoto, M. Samuel Alam, T. Akaike, H. Hamamoto and H. Maeda: Antiapoptotic activity of *S*-nitrosylated α_1 -protease inhibitor. 1st Int'l Conference on Biology, Chemistry and Therapeutic Applications of Nitric Oxide, June 3-7, 2000 (San Francisco, U.S.A.).
 5. T. Sawa, T. Akaike, J. Fang and H. Maeda: Formation of 8-nitroguanosine triggers oxygen radical generation via cytochrome P-450 reductase system. 1st Int'l Conference on Biology, Chemistry and Therapeutic Applications of Nitric Oxide, June 3-7, 2000 (San Francisco, U.S.A.).
 6. T. Okamoto, T. Akaike, T. Sawa, Y. Miyamoto, M. Suga, M. Ando and H. Maeda: *S*-Nitroglutathione produced from peroxynitrite and glutathione activates matrix metalloproteinase (MMP) through unique sulfhydryl modification of MMP. 1st Int'l Conference on Biology, Chemistry and Therapeutic Applications of Nitric Oxide, June 3-7, 2000 (San Francisco, U.S.A.).
 7. S. Tanaka, T. Akaike, M. Ogawa and H. Maeda: Antiapoptotic effect of heme oxygenase induced by nitric oxide in experimental solid tumor. 1st Int'l Conference on Biology, Chemistry and Therapeutic Applications of Nitric Oxide, June 3-7, 2000 (San Francisco, U.S.A.).
 8. Mohammad S. Alam, T. Akaike, Y. Miyamoto and H. Maeda: Role of inducible nitric oxide synthase in host defense against *Salmonella* infection. 1st Int'l Conference on Biology, Chemistry and Therapeutic Applications of Nitric Oxide, June 3-7, 2000 (San Francisco, U.S.A.).
 9. H. Maeda, S. Tanaka, J. Wu, T. Sawa, M. Ogawa, T. Beppu and T. Akaike: Modulation of vascular blood flow and macromolecular drug delivery to tumor. 27th International Symposium on Controlled Release of Bioactive Materials, July 10-13, 2000 (Paris, France).
 10. H. Maeda: The tumor vasculature: the enhanced permeability and retention (EPR) effect is the key for tumor selective macromolecular drug targeting. 41th Enzyme Regulation Meeting, October 2-3, 2000 (Indiana Univ. School of Medicine, U.S.A.).
 11. Mohammad S. Alam, T. Akaike, Y. Miyamoto and H. Maeda: Host-defense function of inducible nitric oxide synthase in *Salmonella* infection. 10th Biennial Meeting of the International Society for Free Radical Research (SFRR 2000), October 16-20, 2000 (Kyoto, Japan).
 11. T. Akaike, T. Okamoto, T. Sawa, Y. Miyamoto and H. Maeda: Peroxynitrite activates matrix metalloproteinases through formation of *S*-nitroglutathione. 10th Biennial Meeting of the International Society for Free Radical Research (SFRR 2000), October 16-20, 2000 (Kyoto, Japan).
 12. T. Akaike, T. Okamoto, T. Sawa and H. Maeda: Activation of matrix metalloproteinases by peroxynitrite. 7th Annual Meeting of the Oxygen Society, November 16-20, 2000 (San Diego, U.S.A.).
 13. T. Sawa, T. Akaike, J. Fang and H. Maeda: Superoxide radical generation from 8-nitroguanosine via cytochrome P450 reductase system. 7th Annual Meeting of the Oxygen Society, November 16-20, 2000 (San Diego, U.S.A.).
 14. H. Maeda and T. Akaike: Microbial infection and consequence of host response in view of

NO production and accelerated mutagenic potentials. British Society for Immunology Congress 2000, December 5-8, 2000 (Harrogate, England).

15. Mohammad Samiul Alam, 赤池孝章, 宮本洋一, 前田 浩: Streptococcal pyrogenic exotoxin B によって誘導されるアポトーシスのニトロソチオールによる阻害. 第 73 回日本細菌学会総会, 平成 12 年 5 月 29 日~5 月 31 日 (札幌).
16. 田中真一郎, 赤池孝章, 小川道雄, 前田 浩: 固型腫瘍における NO 産生と heme oxygenase-1 誘導の病態生理学的意義. 第 73 回日本生化学会, 平成 12 年 10 月 11~14 日 (横浜).
17. 前田 浩: 感染・炎症と化学発癌における共通因子としてのフリーラジカル: とくに活性酸素と窒素化合物による DNA 損傷 (オーバービュー). 第 59 回日本癌学会総会, 平成 12 年 10 月 4 日~6 日 (横浜).

厚生科学研究費補助金

分担研究報告書

微小循環系における多核球依存性血管透過性亢進の分子機構

分担研究者 山本哲郎 熊本大学医学研究科分子病理学講座教授

研究要旨

微小循環系の反応のうち、多核球浸潤には血管透過性亢進が伴うのに対し、単球浸潤においては、たとえ末梢血の単球増多症があった場合にも血管透過性は全く亢進しないことを、平成 11 年度にモルモットを用いた実験により明らかにした。

このことは、多核球浸潤に伴う血管透過性亢進が、白血球が後毛細管細静脈壁を通過する際に起こる血漿成分の物理的漏出ではなく、多核球からの能動的シグナルに血管内皮が反応して起こる現象であることを強く示唆した。

細胞間における局所的な情報伝達法として、細胞接触によるものと、化学伝達因子のパラクリン作用によるものが知られている。

まず、前者の可能性を検討するために、フコイダンを用いて、セレクチンと糖質性リガンドとの結合を阻害することによって多核球と血管内皮の接触を抑制しようと考えたが、フコイダンを投与することによりモルモットの多くがショックに陥ったため実験を継続できなかった。

後者の可能性を検討するために、ヒスタミン H1 受容体アンタゴニスト、ブラディキニン B2 受容体アンタゴニスト、及び、システインロイコトリエン受容体アンタゴニストによる多核球依存性血管透過性亢進抑制の有無を観察した。

ヒスタミン、及び、ブラディキニン受容体アンタゴニストは全く影響を与えなかったが、ロイコトリエン受容体アンタゴニスト（プランルカスト）は、部分的ながら多核球依存性血管透過性を有意に抑制した。

A. 研究目的

我が国の日常時における疾患が生活習慣病などの高齢者の慢性疾患に移行しているため、医学研究の対象も慢性疾患が主体になりつつある。しかし、緊急災害時や、平時でも若年者における疾病は、火傷や外傷といった急性炎症性疾患が中心であり、国家的に見た場合、急性炎症反応の機構の解明とその制御は依然として重要な研究課題である。

微小循環系の反応が精緻に制御されながら進行してゆく過程がこの急性炎症において観察で

きる。その反応の中心は、白血球浸潤と血管透過性亢進であるが、これら 2 つの現象が完全に連結したものに、多核球依存性血管透過性亢進が挙げられる。この現象を制御することは炎症反応全体を制御する上で不可欠であるが、そのための機構解明は未だ不十分な状態にとどまっている。

我々は平成 11 年度の研究において、多核球に最も近い白血球系統である単球は、その浸潤過程で血管透過性を亢進させないことを見い出した。このことは、多核球依存性血管透過性亢進

が、白血球の後毛細管静脈壁通過時の血漿成分の物理的漏出ではなく、多核球が特異的に引き起こす能動的な現象であることを示している。

そこで本年度は、まず、多核球浸潤を競合的に単球浸潤に切り換えた場合に、この血管透過性を抑制できるかどうかを検討し、次に、この多核球依存性血管透過性亢進における多核球から血管内皮細胞への情報伝達機構を、化学伝達因子のリセプター阻害剤を用いた薬理学的方法により検討した。

B. 研究方法

(倫理面への配慮) ハートレー系モルモットを用い、熊本大学医学部動物実験審査委員会の許可の基に実験を行った。なお、モルモットの屠殺においては十分にエーテルで麻酔した状態で頸動脈から脱血した。

多核球浸潤は、多核球走化因子(ザイモザン活性化モルモット血漿)を皮内注射することにより引き起こした。競合的に単球浸潤へ切り換える場合はザイモザン活性化血漿に単球走化因子(S19 リボソーム蛋白2量体)を混じて皮内注射した。

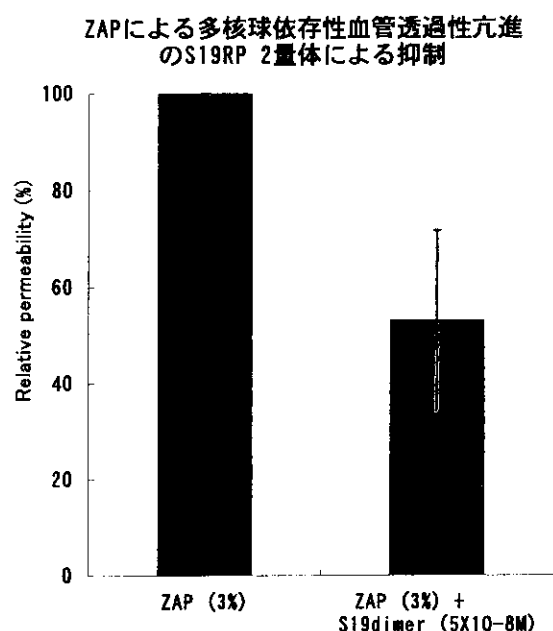
局所の細動脈拡張は、プロスタグランジンE1を皮内投与して引き起こした。

血管透過性亢進は、エバンス青を静注して血流中のアルブミンを標識し、皮内注射局所の血管外に透過したアルブミン・エバンス青複合体を、切除した局所皮膚からホルムアミド(60℃ 2日間)で抽出した後、分光光度計で吸光定量した。

組織学的検査においては、屠殺直後に分離した皮膚をパラフィン包埋・切片とし、ヘマトキシリン・エオジンで染色して光学顕微鏡標本とした。

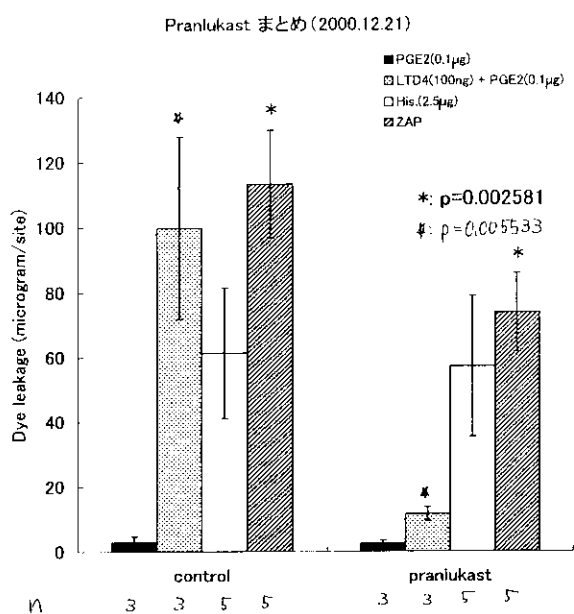
C. 研究結果

ザイモザン活性化血漿(3~10%) 0.1mlを皮内注射すると、多核球浸潤と共に血管透過性亢進が観察された。ところが、ザイモザン活性化血漿(最終濃度3%)と、S19 リボソーム蛋白2量体(最終濃度 $5 \times 10^{-8}M$)とを混合して皮注射した場合には、白血球浸潤像は単球優位性に変化すると共に、血管透過性も50%まで抑制された。



ザイモザン活性化血漿、あるいはヒスタミンないし、ブラディキニン皮内接種する60分前にヒスタミンH1リセプターアンタゴニストのジフェンヒドラミンを30mg/kg腹腔内投与した場合、あるいは、45分前にブラディキニンB2リセプターアンタゴニストのHOE140を10nmol/kg皮下投与した場合、それぞれヒスタミン、及びブラディキニンによる血管透過性亢進は、ほぼ完全に抑制されたものの、多核球依存性血管透過性亢進は全く影響されなかった。

一方、ロイコトリエンリセプターアンタゴニストのプラナルカスト 30mg/kg をザイモザン活性化血漿、あるいは、ロイコトリエン D4 皮注の 1 時間前にモルモットに経口投与したところ、ロイコトリエン D4 とプロスタグランジン E2 との混合液が引き起こす血管透過性亢進を約 80% 抑制すると共に、多核球依存性透過性亢進を約 35% 抑制した。この抑制は $P=0.0026$ で統計学的に有意であった。



ザイモザン活性化血漿皮注の 20 分前にセレクチン・インヒビターであるフコイダン 10mg/kg を静脈内投与したところ、大半のモルモットがショックに陥り、透過性測定実験は実施できなかった。

D. 考察

これまで単球やリンパ球に対する特異的な走化因子が自由に使える状況になかったため、多核球依存性血管透過性亢進が多核球に特異的なものか、白血球浸潤に普遍的なものであるのかが不明であった。今回の単球特異的な走化因子 S19 リボソーム蛋白 2 量体を用いた実験により、

少なくとも単球浸潤においては血管透過性亢進を伴わないことが明らかとなった。多核球浸潤及び血管透過性亢進が慢性炎症に比して急性炎において顕著であることを考えると、この多核球依存性血管透過性亢進は急性炎症に対応した多核球特異的なものである可能性が高い。

多核球依存性血管透過性亢進の分子メカニズムは依然として不明であるが、今回のプラナルカストを用いた実験により、システイニルロイコトリエンが関与している可能性が出て来た。ロイコトリエンはプロスタグランジンと同様にアラキドン酸代謝産物であり、5-リポキシゲナーゼ経路により産生される。システイニルロイコトリエンであるロイコトリエン C4 や D4 は、それ自身が血管透過性亢進因子であることが知られており、後毛細管細静脈内皮細胞のリセプターを介して作用するので、多核球依存性血管透過性亢進に関与していても不自然ではない。

もしその場合には、ロイコトリエン C4 を産生する細胞が多核球なのか、血管内皮細胞なのかという疑問が出てくる。内皮細胞は 5-リポキシゲナーゼを持たないので、ロイコトリエン C4 の前駆体であるロイコトリエン A4 を産生できない。しかし、ロイコトリエン C4 合成酵素は有しているため、A4 が供給されれば C4 を産生することは可能である。一方、多核球は 5-リポキシゲナーゼを豊富に有しており、アラキドン酸をロイコトリエン A4 に変換できる。従って、多核球により産生供給されたロイコトリエン A4 が内皮細胞によりロイコトリエン C4 に変換され、オートクリン的に内皮細胞に作用して透過性を亢進させている可能性がある。

ただし、ロイコトリエンリセプターであるプラナルカストを増量しても、多核球依存性血管透過性亢進は 35% 以上は抑制出来なかった。

従って、この亢進現象には別の機序も関与している可能性が高い。

細胞間接着により情報伝達が行われている場合も多いため、多核球依存性血管透過性亢進においても、多核球と内皮細胞間の接着を阻害する実験を試みる必要がある。今回は海藻由来の多糖体であるフコイダンを用いた実験を試みたが、そのショック惹起作用により結果を得ることができなかった。

この多核球依存性血管透過性亢進の機序を更に解明するには、血管内皮細胞の培養系を用いた透過性亢進測定法の開発が不可欠と思われる。

E. 結論

白血球浸潤に伴って血管透過性亢進が亢進する現象は、多核球特異的なもので、急性炎症における単球に対応した微小循環系の反応である可能性が高い。この血管透過性亢進は、少なくとも部分的に、システイニルロイコトリエン産生に依存していると考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Tokita, K. Uchida, Y. and Yamamoto, T.: Augmentation of polymorphonuclear leukocyte-dependent vascular permeability enhancement by granulocyte-colony stimulating factor administration. (投稿中)

2. 学会発表

- 1) 斎田和孝, 山本哲郎: 血管透過性亢進からみた多核白血球と単球の微小循環系への作用の違い. 第 26 回日本微小循環学会総会. 平成 13 年 2 月 16 日, 倉敷. プログラム・抄録集 25 頁 (抄録).

G. 知的所有権の取得状況

特になし