

Prozime-10 (P-10) の抗炎症作用について

第 3 報

P-10 の抗炎症作用機序 (II)

岡山大学歯学部口腔外科学第1講座 (主任: 西嶋克己教授)

牧 一 雄

(昭和58年8月30日受稿)

Key words: 蛋白分解酵素, 副腎皮質細胞

ヒスタミン, コルチゾール

Ca

緒 言

抗炎症, 抗浮腫の目的で使用されている蛋白分解酵素製剤の1つである prozime-10 (P-10) をラットに静注した際, 血中 corticosterone level の著明な上昇をきたすこと, 及び副腎摘出動物でその抗炎症効果が減弱する¹⁾ことが報告されている。また, 犬に P-10 を静脈注射した場合にも, 血漿 cortisol 濃度の上昇が認められている²⁾。犬に P-10 を静脈注射した際には, 血漿 cortisol 濃度の上昇に先行する血漿 ACTH 濃度の上昇が多数の実験例で観察されているが, 少数例では血漿中の cortisol と ACTH が殆んど同時に peak level に達することが観察された。P-10 は副腎に直接作用して corticosteroid 遊離を惹起しないことが明らかになったので, ACTH と同時に血中に出現する cortisol の possible stimulant について検討したところ, histamine (Hi) である可能性が強く示唆されるに至った²⁾。

副腎皮質の糖質コルチコイドは主に ACTH によりその合成及びそれに続く分泌が調節されているが, その ACTH の生合成と分泌は, 視床下部からの ACTH 放出因子 (corticotropin releasing factor, CRF) や血中の糖質コルチコイド level により調節されていることが知られている³⁾。また, CRF の合成と分泌は, 種々なストレス, circadian rhythm や更に上位中枢よりの刺激により調節されている事も知られてい

る³⁾。このように, 複雑な機構を介して, 糖質コルチコイド分泌を調節している ACTH と同様に, 初期炎症の誘発因子でもある Hi が直接副腎皮質細胞に作用して, cortisol 遊離を惹起することは, 治癒過程を含めて炎症の全体像を理解する上で非常に興味深い。これは, 催炎の効果をもつとされてきた Hi が同時に消炎的に作用する可能性をもつことを意味するものと理解される。このような Hi の steroid 遊離作用が生体での血中 Hi 濃度, 特に生理的な変動範囲内で起こり得るか否かという点や, 副腎皮質細胞に Hi receptor が存在するか否かという問題, さらに, その base にある mechanism を犬副腎皮質細胞を使用して検討するため, 本実験を行った。

実験方法及び材料

1) 遊離副腎皮質細胞の調製方法

遊離副腎皮質細胞の調製は, Sayers ら⁴⁾の方法に準じて行った。ホルモン分泌の日内変動の影響を考慮し, 成犬を午前9時—9時30分間に pentobarbital-Na (30mg/kg) の静注により麻酔し, 12時—1時の間に出血致死させた。その後開腹して両側副腎を摘出し, 予め95% O₂+5% CO₂ の混合ガスで飽和しておいた0.2% glucose 及び0.5% BSA 含有 Krebs-Ringer bicarbonate buffer (pH 7.4, 以下 KRBGA と略) に浸漬した。副腎周囲の脂肪組織を除去し, 0.5mm の厚さに細切し, 立体顕微鏡の検鏡下に髄質を

切除した。この副腎皮質切片をさらに細切した後、0.125% trypsin 含有 KRBGA (37°C) を含む三角フラスコに移し、95% O₂ + 5% CO₂ の混合ガスで bubbling しながら10分間 incubate した。遊離した細胞を含む液層を分離し、冷却した別の容器に移した。未消化の副腎皮質細切片には、新たに0.125% trypsin 含有 KRBGA を加え、同様の操作を8—10回繰り返して行った。ブールした細胞浮遊液を200 mesh の sieve で濾過した後、4°C、20分間100 xg で遠心分離し、pellet を少量の KRBGA で洗浄後再び遠沈した。単離細胞を30ml の0.05% 1 ima bean trypsin-inhibitor 含有 KRBGA に再浮遊させ、37°C で15分間、95% O₂ + 5% CO₂ の混合ガスで bubbling させながら incubate し、その後、400 mesh の sieve で濾過後遠心分離し、得られた pellet を適量の medium に浮遊させて実験に供した。trypan blue dye exclusion method により viable cells を計測した。

2) 遊離副腎皮質細胞の incubation

遊離副腎皮質細胞の浮遊液を軽く振盪しながら試験管に分注し、95% O₂ + 5% CO₂ 混合ガスを10秒間通じてキャップをし、37°C で15分間振盪して preincubation を行った。その後、薬物含有 KRBGA を添加し、同様にガスを充填し、さらに2時間 incubate した。なお、Hi や ACTH の steroidogenesis に対する阻害剤は、preincubation 時に medium に添加して同様の操作を行った。incubation 終了後、3,000rpm で10分間遠心分離し、上清中の 11-OHCS を定量した。

3) 11-OHCS の定量

11-OHCS の定量は、Silber ら⁵⁾の方法に準じて行った。11-OHS 測定標準液として cortisol を用いたため、11-OHS 産生を表わす指標として cortisol の増加として表現した。前報と同様に radioimmunoassay により、遊離した steroid が cortisol である事を確認した。

4) cyclic AMP (cAMP) の定量

cAMP 測定用試料の調整は、Sala ら⁶⁾の方法に準じて行った。extracellular cAMP 定量の場合には、0.1mM 3-isobutyl-1-methylxanthine 含有 KRBGA で15分間 incubate した後、500xg で5分間遠心分離した上清を boiling water bath

中に12分間浸漬した。

intracellular cAMP 定量の場合には、遠心分離後の cell pellet を0.1mM 3-isobutyl-1-methylxanthine 含有 KRBGA に懸濁し、遠心分離後得られた cell pellet をさらに0.1mM 3-isobutyl-1-methylxanthine 含有 Tris-HCl buffer (pH 7.4) に再懸濁した。これを15秒間 sonicate し、更に boiling water bath 中に12分間浸漬した。

その後、各試料に30% TCA 0.5ml を加えた後遠沈し、上清を採取した。沈殿は6% TCA 1ml で洗い、得られた上清を合わせて水飽和エーテル3ml を加えて振盪し、エーテル層を除去した。さらに2回エーテル処理を行った。この抽出液を centrifugal evaporator で濃縮、乾固した。

cAMP の定量には、Yamasa cAMP assay kit を使用した。濃縮乾固した試料に適量の蒸留水を加えて溶解し、その100 μ l にサクシニル化試薬100 μ l を添加し、よく混合させた後、室温で放置し、その後0.3M イミダゾール緩衝液を800 μ l 添加して混合した。¹²⁵I-サクシニル cAMP チロシンメチルエステル100 μ l にサクシニル化した試料100 μ l を加え、抗 cAMP 家兔血清100 μ l を加えて混合し、36時間0°C で反応させた。その後活性炭(500 μ l)を加えて攪拌し、遠心した後の上清500 μ l をとり、この放射能を well 型 scintillation counter で測定した。

5) 実験材料

下記の化合物を使用し、括弧内に購入先または提供先を示した。

Albumin bovine (Sigma), Trypsin (Difco Laboratories), Lima bean trypsin inhibitor (Sigma), ACTH (第一製薬), Hi (東京化成), hydrocortisone (Merck), dibutyryl cAMP (Sigma), EGTA (Sigma), aminoglutethimide (Ciba-Geigy), cycloheximide (Sigma), Pyrilamine maleate (ICN), cimetidine (SK & F), theophylline (半井化学), 3-isobutyl-1-methylxanthine (Sigma), verapamil (エーザイ), ¹²⁵I-cortisol (第一ラジオアイソトープ研究所), cortisol 抗血清 (第一ラジオアイソトープ研究所)。

実験結果

1) Hi による corticosteroidogenesis (CSG) の

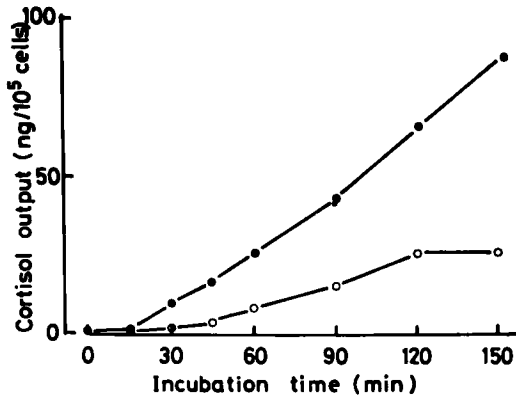


図1. Hi による副腎皮質細胞からの cortisol output の時間経過。

○—○ : 対照
●—● : Hi 10⁻⁴ M

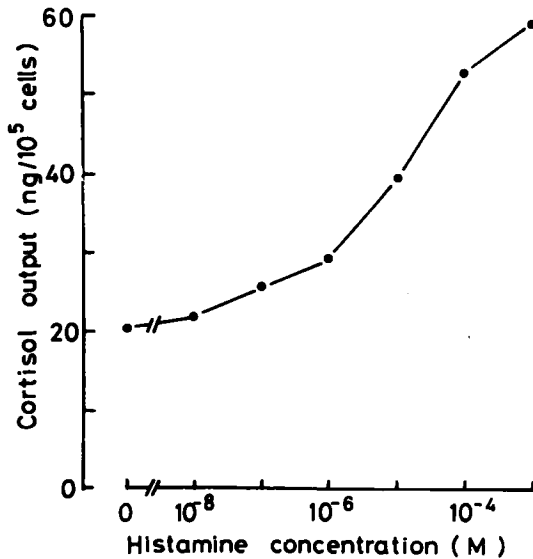


図2. Hi の corticosteroidogenesis における濃度作用曲線。

time course

図1は、遊離副腎皮質細胞に Hi 10⁻⁴ M を作用させた際の CSG の time course を示したものである。なお、CSG は cortisol output (ng/10⁵ cells) で示した。

incubation time の増加と共に cortisol output も直線的に増加したが、control medium においては、incubation time が120分で plateau

に達した。長時間の incubation では、細胞が損傷される可能性も考えられたので、Hi の CSG を調べる際には、120分間 Hi を作用させた際の cortisol output で検討する事にした。

2) Hi による CSG の濃度依存性

Hi 10⁻⁸ M - 10⁻³ M を作用させた際、明らかに濃度に依存する cortisol output が認められた(図2)。犬の血漿中 Hi 濃度は、0 - 40ng/ml (0 - 3.6 × 10⁻⁷ M) であることが報告されている⁷⁾ので、何らかの原因により血中 Hi 濃度が軽度上昇した際や、また副腎皮質中の Hi が遊離し、皮質で作用する Hi 濃度が増加した際には、Hi の皮質細胞に対する直接作用により CSG が増強されてくる可能性は充分あるものと考えられる。本実験では、非生理的ではあるが顕著な CSG が誘発される 10⁻⁴ M の Hi を用いて以下の実験を行った。

3) ACTH による CSG

生体内において副腎皮質ホルモンの生合成に関与している主体は、ACTH である。Hi 10⁻⁴ M による CSG と等価な効果をもつ ACTH 濃度を検討する目的で行った実験結果が図3に示してある。

Hi 10⁻⁴ M の cortisol output が約53ng/10⁵ cells であったことから、この CSG は ACTH の約 5 × 10⁻⁵ IU/ml に匹敵することがわかった。

4) db-cAMP による CSG

ACTH の CSG に、adenylate cyclase-cAMP system の活性化がその重要な機序になり得る事

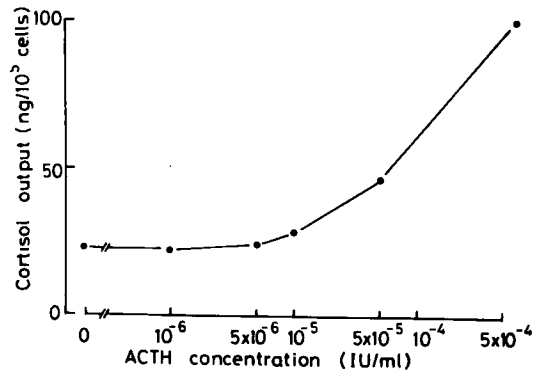


図3. ACTH の corticosteroidogenesis における濃度作用曲線。

が報告されている^{8,9)}, cAMP は steroidogenesis において second messenger⁹⁾的な役割を果たしているものと考えられているので, db-cAMP を用いてその CSG を検討し, 10^{-4} M と equivalent な効果をもつ db-cAMP 濃度について検討した。

図4に示す如く, db-cAMP は濃度に依存した cortisol output を示し, 10^{-4} M の CSG は db-cAMP 0.5–1mM の効果にはほぼ匹敵することがわかった。

5) Hi の CSG に及ぼす aminoglutethimide の影響

ACTH の CSG において cholesterol の side chain-cleaving enzyme system が, 1つの regulatory site になりうると考えられている^{10,11)}。

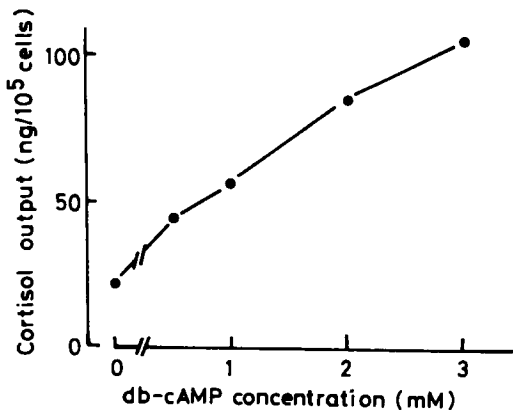


図4. db-cAMP の corticosteroidogenesis における濃度作用曲線。

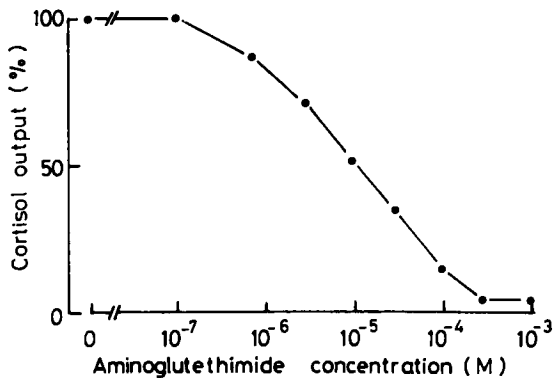


図5. 10^{-4} M の corticosteroidogenesis に及ぼす aminoglutethimide の影響。

cholesterol の側鎖開裂酵素を抑制することにより, CSG を抑制することが知られている aminoglutethimide^{12,13)}の前処置が Hi の CSG にかかなる影響を及ぼすのかについて調べたのが図5に示してある。

ACTH の場合と同様に Hi の CSG も, aminoglutethimide の濃度増大と共に抑制され, aminoglutethimide 3×10^{-4} M では完全に抑制された。

6) Hi の CSG に及ぼす cycloheximide の影響

cycloheximide や puromycin のような蛋白質合成阻害剤によっても, ACTH の CSG 効果が抑制されることが知られている。この所見は, ACTH の刺激下で corticosteroid の分泌が高い level で持続するためには, ある種の蛋白質が間断なく生合成され続けなければならないものと理解されている。Garren ら¹⁴⁾は, ラットに cycloheximide を注射した際の corticosterone の分泌減衰曲線からこの蛋白質の寿命(半減期)は, 約8分であると計算した。また, Crivello and Jefcoate¹⁵⁾が測定した ACTH の steroid 生合成に関与する特殊な蛋白質の半減期も Garren らの報告した成績とよく一致していた。cycloheximide は, ACTH を作用させた副腎皮質細胞中の cAMP 濃度の上昇を抑制しない。cycloheximide によって生合成が阻害され, ACTH の作用発現を阻害する短寿命な蛋白質は, cAMP と無関係なものであり cholesterol 側鎖開裂酵素の酵素活性を制御する調節因子であると考えられている。

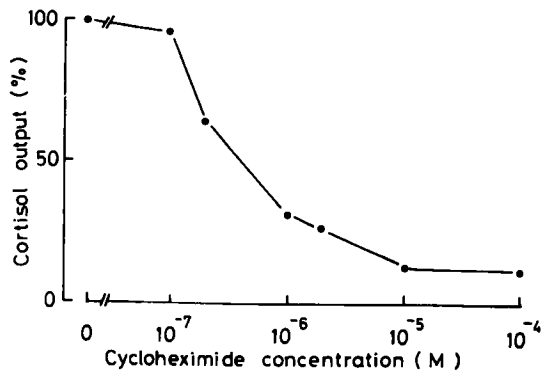


図6. 10^{-4} M の corticosteroidogenesis に及ぼす cycloheximide の影響。

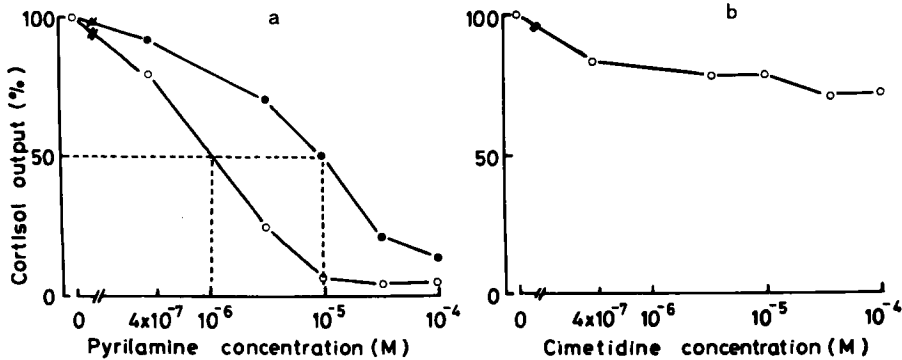


図7. Hi の corticosteroidogenesis に及ぼす pyrilamine と cimetidine の影響。
 ○—○ : Hi 10^{-4} M ●—● : Hi 10^{-3} M

図6は、Hi の CSG に対する cycloheximide の抑制効果を示している。cycloheximide の濃度増大と共に、Hi による cortisol output は減少し、cycloheximide 10^{-5} M でほぼ完全に抑制された。

以上の結果から Hi の CSG での作用点は、cycloheximide 感受性蛋白が関与している以後の段階で、ACTH の場合と類似しているものと推定される。

7) Hi の CSG に及ぼす抗 Hi 剤の影響

Hi により誘発される CSG に Hi receptor が関与しているのか否かを調べる目的で、 H_1 blocker である pyrilamine と H_2 blocker である cimetidine をそれぞれ併用することにより、Hi の効果がどのように変化するのかについて検討を行った。

a. pyrilamine の影響

図7aには、 10^{-4} M の Hi の CSG に対し、pyrilamine がいかなる影響を及ぼすのかについて検討した結果が示してある。種々な濃度の pyrilamine で15分間 preincubate した後、Hi を添加して更に2時間 incubate した。抑制作用を比較検討するために、 10^{-4} M を単独で作用させた際の cortisol output を100%として示した。pyrilamine の濃度増大と共に cortisol output は減少し、 10^{-6} M の濃度の pyrilamine 前処置で Hi の cortisol output は約50%抑制された。diphenhydramine を前処置した際にも、pyrilamine の場合とほぼ同程度の抑制効果が得られた。

b. cimetidine の影響

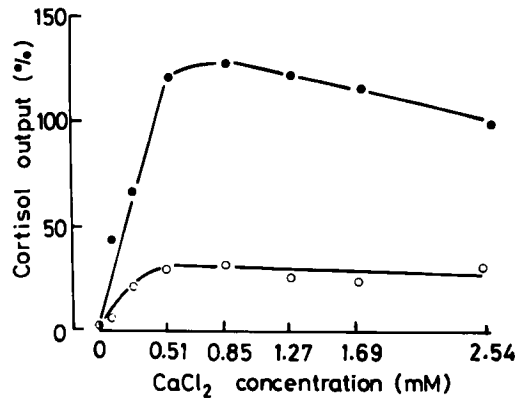


図8. Hi の corticosteroidogenesis に及ぼす媒液 Ca 濃度の影響。
 ○—○ : 対照 ●—● : Hi 10^{-4} M

図7bは、 H_2 blocker である cimetidine 前処置により、Hi の CSG 効果がいかなる影響を受けるのかについて検討したものである。Hi の CSG 効果は、高濃度の cimetidine によってもほとんど抑制されなかった。

8) Hi の CSG に及ぼす Ca^{2+} の影響

図8は、媒液中の Ca 濃度と Hi の CSG 効果との関係を調べたものである。この実験に使用した副腎皮質細胞は、単離する段階で trypsin 含有 KRBGA 中に 0.1mM EGTA を添加し、 Ca^{2+} free の条件が成立するように調製した。control や Hi を作用させた場合、 $[Ca]_o$ が 0.5—1 mM の際いずれも cortisol output が最も高く、それ以上の Ca 濃度では逆に cortisol output が低下することが観察された。この知見から、ACTH

より Hi の方が $[Ca]_o$ により特異的に依存している事がわかる。

9) Hi の CSG に及ぼす Ca-blockers の影響

Hi の CSG 効果が, Ca^{2+} を second messenger として誘発されている可能性を検討する目的で, Ca antagonist の verapamil 併用が Hi の CSG にいかなる影響を及ぼすのかについて検討した。

図 9 に示すように, verapamil の濃度が増大するに従って Hi による CSG は dose-dependent な抑制を受けることがわかった。全く同様な結果が, 他の代表的な Ca blocker である D-600 でも認められた。この所見は Hi の CSG が Ca uptake と関連している事を示している。

10) Hi による副腎皮質細胞中の cAMP 含量の変動

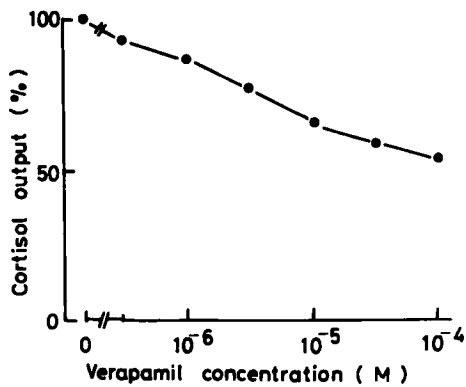


図 9. Hi (10^{-4} M) の corticosteroidogenesis に及ぼす verapamil の影響。

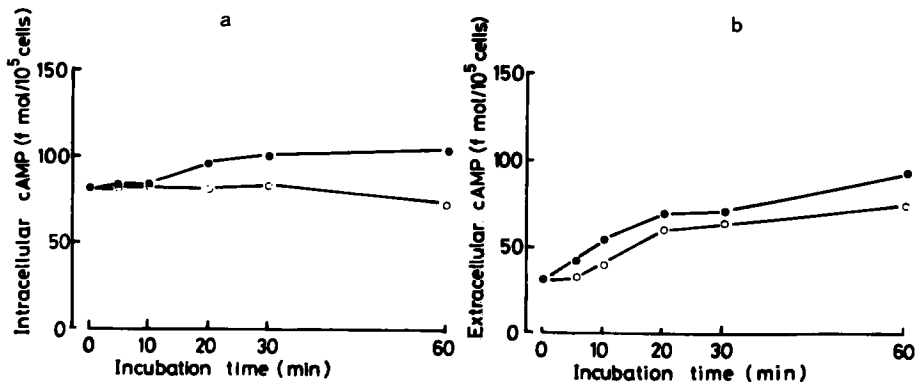


図10. Hi の副腎皮質細胞 cAMP 含量の媒液中 cAMP 濃度の経時変化。

○—○: 対照 ●—●: Hi 10^{-4} M

Hi の CSG 効果に対する cAMP の寄与を検討する目的で, cAMP の変動を媒液中に遊出する cAMP と細胞内に残存する cAMP との 2 つの fraction に分けて, 別個に検討した。

a. 細胞内 cAMP の変動 (図10a)

対照媒液中での細胞内 cAMP 含量は, 約 82 fmol/ 10^5 cells で, incubation time に関係なくほぼ一定した値を示した。これに対し Hi を作用させた際には, incubation time の増加と共に細胞内 cAMP 含量も増加し, 30分で約 100fmol/ 10^5 cells に増加した。

b. 媒液中の cAMP 量 (図10b)

対照媒液や Hi 10^{-4} M を作用させた際の細胞外液中の cAMP 量は, いずれも incubation time の増加と平行して増大した。

11) Hi 及び db-cAMP の CSG に及ぼす phosphodiesterase 阻害剤の影響

Hi の CSG 効果に対する cAMP の関与を検討する目的で phosphodiesterase 阻害剤である theophylline 及び 3-isobutyl-1-methylxanthine の併用効果について検討した。媒液には, Hi の CSG が最も強く出現する $CaCl_2$ (1 mM) 含有媒液を用いた。

a. theophylline

図11a は Hi 及び db-cAMP による CSG に対し, theophylline の併用がいかなる影響を及ぼすのかについて検討したものを示している。theophylline の濃度が 3×10^{-4} M 以下では, control 及び Hi の CSG に対し, 全く影響を及ぼさ

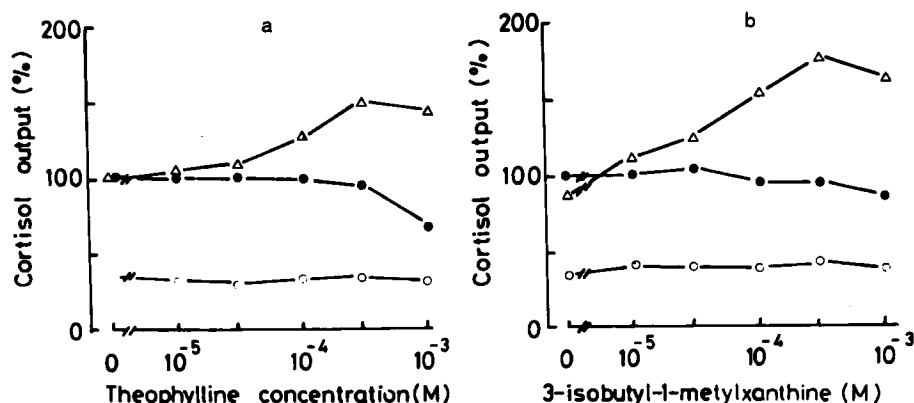


図11. Hi 及び db-cAMP による corticosteroidogenesis に及ぼす theophylline 及び 3-isobutyl-1-methylxanthine の影響.

○—○：対照 △—△：db-cAMP 1 mM ●—●：Hi 10^{-4} M

なかった。しかし、db-cAMP による CSG は、theophylline の濃度増大と共に増強され、 3×10^{-4} M の際には約150%の増大が認められた。しかし、それ以上の濃度の theophylline 併用は、control, db-cAMP いずれの CSG に対しても抑制した。

b. 3-isobutyl-1-methylxanthine

図11bは、3-isobutyl-1-methylxanthine を併用した際の結果を示している。theophylline の場合と同様、3-isobutyl-1-methylxanthine が 3×10^{-4} M 以下の濃度では、db-cAMP による CSG に対してのみ増強効果が認められ、Hi に対しては殆んど影響しなかった。 3×10^{-4} M 以上の濃度の 3-isobutyl-1-methylxanthine の併用は、いずれの場合にもやはり抑制的に作用した。高濃度の theophylline 及び 3-isobutyl-1-methylxanthine 併用による CSG 抑制作用は、これら薬物のもつ蛋白合成阻害作用のためと考えられる^{22,23)}。

考 察

抗炎症蛋白分解酵素 P-10 の抗炎症効果発現に副腎皮質よりの糖質 steroid 遊離が寄与している事及び corticosteroids の血中濃度上昇の主な原因になるのが、corticosteroids 遊離に先行する血中の ACTH 濃度上昇がある事は既に明らかにされている²⁾。また、P-10 をはしめ、種々な消炎酵素製剤の投与後、血中 Hi 値が上昇し、Hi

には副腎皮質に対する直接的な刺激作用があり、その結果 steroid が遊離されるという、一連の機序も明確にされてきた²⁾。本実験では、P-10 投与後、血中に出現する Hi によって発揮されると考えられる steroidogenesis が果して細胞 level でも確認されるか否かについて検討した。

ACTH の CSG 作用に際しては、副腎皮質 cAMP level の上昇を伴うことが知られている。Grahame-Smith ら¹⁶⁾は、ACTH 投与後 corticosterone の分泌増加に先行する副腎組織内の cAMP level の上昇を証明している。また、Haynes¹⁷⁾は牛の副腎皮質切片においても、ACTH の作用下に cAMP 濃度の上昇が起ることを認めており、cAMP 自身も in vitro の系で ACTH の作用を模倣しうることを示している。

しかしながら、従来主流であった cAMP の CSG における second messenger 説¹⁸⁾に対して、種々な疑問が最近提出されてきている。Bell and Sayers¹⁹⁾は、ラットの副腎細胞懸濁液を種々な濃度の ACTH で incubate した際、細胞内 cAMP 総量にほとんど有意な増加をきたさないような低濃度の ACTH によっても、corticosterone の生産は明らかに亢進されていることを報告している。また、Moyle ら²⁰⁾は cAMP を増加させる ACTH 濃度と steroid 生合成を促進させる ACTH 濃度の隔たりは、ACTH の 0-ニトロフェニルスルファニル誘導体では一層顕著になることを示した。すなわち、低濃度の

ACTH による CSG と cAMP 生合成との間には明確な相関関係がないことが強調されるに至った。Yanagibashi ら²¹⁾は、¹²⁵I-ACTH を使用し、ACTH の receptor を scatchard plot 解析し副腎皮質細胞の ACTH receptor を 2 つに分類した。1 つは high affinity で low capacity な receptor (dissociation constant $Kd_1=2.6 \times 10^{-10}$ M, 7350 sites per cell) であり、もう 1 つは low affinity で high capacity な receptor (dissociation constant $Kd_2=7.1 \times 10^{-9}$ M, 57400 sites per cell) である。前者は、ACTH に対する感受性が後者よりも高く、 Ca^{2+} influx と直結する steroidogenesis に関与しており、生理学的な濃度の ACTH で刺激した際に駆動すると考えている。後者は、ACTH に対する感受性が低く、adenylate cyclase と couple した receptor であり、非生理的な濃度の ACTH を使用した際に cAMP の生合成と平行して steroidogenesis も行うであろうという想定を行った。すなわち、ACTH には Ca^{2+} を second messenger とする steroid 生合成機構がある²²⁾ことを示唆した訳である。

一般に犬の血漿中の Hi 濃度は、非常に低く 0-40ng/ml ($0-3.6 \times 10^{-7}$ M) の範囲で変動する事が知られている⁷⁾。本実験で証明された如く、 10^{-8} M の Hi でさえ副腎皮質の steroidogenesis を惹起し得る事が判明した事は、生理学的に大変重要な知見であると考えられる。

Aminoglutethimide や cycloheximide との併用によって Hi の CSG が抑制されたことから、Hi は cholesterol 側鎖開裂酵素や、cycloheximide sensitive protein 生合成以前の段階で何らかの作用点をもつと思われる。

Hi は多くの細胞では細胞内にとりこまれなると考えられるので、当然その作用発現には膜表面に receptor が存在すると考えられる。このような場合の常套手段である antagonist の併用実験において、 H_1 blocker である pyrillamine 併用により顕著な抑制が認められたのに、 H_2 blocker である cimetidine 併用では殆ど無効であった。従って Hi による CSG には、 H_1 receptor が関与していると思われる。

Hi の CSG 機序として先づ可能性があると考

えられたのは、cAMP を second messenger とする機構である。Hi は脳をはじめ、種々な臓器で cAMP level を上げる事が知られているからである²³⁾。この仮説の妥当性を検討するため、phosphodiesterase inhibitor である theophylline や 3-isobutyl-1-methylxanthine の前処置を行ったが、Hi の CSG 効果には殆ど影響が認められなかった。しかし、副腎皮質細胞内の cAMP 含有量については、incubation time の増加と平行する細胞内 cAMP 及び媒液中 cAMP 量の増大が認められたが、対照 level よりもわずかに増加したにとどまった。これらの知見から、Hi の場合、cAMP が second messenger になるという説は妥当でないと考えられた。

種々な分泌細胞で、Ca が second messenger になりうる事が報告されている²⁴⁾。Ca influx を抑制する verapamil で前処置したところ、Hi による CSG は dose-dependent に抑制されることがわかった。この所見と Hi の CSG が $[Ca]_0$ に対して依存性を示した事実とを考え合わせると、Hi の CSG は Ca^{2+} uptake と密接に関連している事がわかる。一般に種々な臓器において Hi がその作用を発揮する際、 H_2 receptor を介するときには second messenger として cAMP が関与しており、 H_1 receptor の際には Ca^{2+} uptake が想定されている。今回行った副腎皮質細胞での実験でも極めて類似した結果が得られた事は、大変興味深い。Hi の CSG に関して Ca がどのような作用点でどのような役割を果しているのかは現在の所不明である。cycloheximide 感受性因子が関与する以後の steroid 生合成過程が ACTH と全く同様であると考えられるならば、それ以前の過程、すなわち、細胞膜と Hi の interaction に Ca^{2+} が何らかの機序により協力的に作用している可能性は大であると考えられる。

最近、prostaglandins (PG) にも CSG 作用が見出されている²⁵⁾。PG による CSG は cycloheximide で抑制されること²⁵⁾や、 $PGF_{2\alpha}$ には cAMP 生合成促進作用がないこと²⁶⁾、PG には Ca^{2+} を細胞内に取り込む作用があることなども報告されている²⁷⁾。これら PG のもつ CSG 機序は、Hi の CSG 機序を連想させる。副腎皮質ホルモンの生合成及び分泌に、ACTH が main

な役割を担っている事は間違いないとしても、Hi や PG のような autacoids が、副腎皮質に直接作用して CSG を惹起している可能性は高い。これらの所見は、抗炎症 steroids の分泌機構において ACTH 一辺倒の単純な理解は必ずしも正しくない事を示唆している。消炎蛋白分解酵素の作用機序について検討してきた一連の本研究において、起炎物質と考えられている Hi が一方では、生体内において最も抗炎症効果の強い steroid を遊離する事が判った。従来、Hi は炎症の場では催炎的要素のみが強調されてきたが、本実験で得られた知見は、炎症の場における Hi や、その他の autacoids の役割について再考を要求するものと言えるであろう。

要 約

成犬を pentobarbital-Na の静注により麻酔して出血致死させ、摘出した副腎を適当な厚さに細切し、実体顕微鏡の検鏡下に髓質を切除した。この副腎皮質切片を trypsin 処理して、単離させた副腎皮質細胞の生否は、trypan blue dye exclusion method により確認した。

副腎皮質細胞に種々な濃度の histamine (Hi) を作用させると、corticoidogenesis が惹起され、Hi の効果は 10^{-8}M - 10^{-3}M の範囲で濃度に依存して増大した。cholesterol side chain clearing enzyme system を阻害する aminoglutethimide や蛋白合成阻害剤の cycloheximide は、Hi の

corticoidogenesis に対し ACTH と極めて類似した抑制効果を示した。H₁ receptor blocking agent である pyrilamine 前処置は、濃度依存性に Hi の steroidogenesis 効果を抑制したが、H₂ receptor blocking agent である cimetidine は、ほとんど抑制的な影響を示さなかった。媒液中の Ca 濃度が、0.5-1 mM の際、Hi の効果は最も強く、それより低濃度でも、また高濃度でも、Hi の corticoidogenesis 効果は低下した。phosphodiesterase 阻害剤である theophylline 及び 3-isobutyl-1-methylxanthine の前処置は、db-cAMP による steroidogenesis を増強したが、Hi の効果にはほとんど影響しなかった。一方、Ca influx を阻害する verapamil の前処置は、Hi による steroidogenesis に対して濃度依存性の抑制効果を示した。以上の所見より、Hi は副腎皮質細胞の H₁ receptor に結合して Ca の細胞内への influx を増大することにより steroidogenesis を trigger すると考えられる。cycloheximide 感受性因子が関与している以降の作用機序は、ACTH の場合と極めて類似していると思像される。

謝 辞

本稿を終るにあたり、御指導、御校閲を賜った、岡山大学歯学部西嶋克巳教授ならびに薬学部田坂賢二教授に深謝致します。

本論文の要旨は、第57回日本薬理学会近畿部会において発表した。

文 献

1. Tasaka, K., Meshi, T., Akagi, M., Kakimoto, M., Saito, R., Okada, I. and Maki, K.: Anti-inflammatory activity of a proteolytic enzyme, Prozime-10. *Pharmacology* 21, 43-52, 1980.
2. 牧 一雄: Prozime-10 (P-10) の抗炎症作用について。第2報 P-10 の抗炎症作用機序 (I)。岡山医誌 96, 35-47, 1984.
3. Jones, M.T.: Control of adrenocortical hormone secretion. In *The Adrenal Gland* Raven Press, New York, pp. 93-103, 1979.
4. Sayers, G., Swallow R.L. and Giordano, N.D.: An improved technique for the preparation of isolated rat adrenal cells. A sensitive accurate and specific method for the assay of ACTH. *Endocrinology* 88, 1063-1068, 1971.
5. Silber, R.H., Busch, R.D. and Oslapas, R.: Practical procedure for estimation of corticosterone or hydrocortisone. *Clin. Chem.* 4, 278-285, 1958.
6. Sala, G.B., Hayashi, K., Catt, K.J. and Dufau, M.L.: Adrenocorticotropin action in isolated adrenal

- cells. The intermediate role of cyclic AMP in stimulation of corticosterone synthesis. *J. Biol. Chem.* **254**, 3861—3865, 1979.
7. Barsoum, G.S. and Gaddum, J.H.: The pharmacological estimation of adenosine and histamine in the blood. *J. Physiol.* **85**, 1—14, 1935.
 8. Rae, P.A., Butmann, N.S., Tasao, J. and Schimmer, B.P.: Mutations in cyclic AMP-dependent protein kinase and corticotropin steroidogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **76**, 1896—1900, 1979.
 9. Podesta, E.J., Milsni, A., Steffen, H. and Neher, R.: Steroidogenesis in isolated adrenocortical cells. Correlation with receptor-bound adenosine-3', 5'-cyclic monophosphate. *Biochem. J.* **180**, 355—363, 1979.
 10. Stone, D. and Hechter, O.: Studies on ACTH action in perfused bovine adrenals. The site of action of ACTH in corticosteroidogenesis. *Arch. Biochem. Biophys.* **51**, 457—469, 1954.
 11. Halkerton, I. D. K., Eichhorn, J. and Hechter, O.: A requirement for reduced triphosphopyridine nucleotide for cholesterol sidechain cleavage by mitochondrial fractions of bovine adrenal cortex. *J. Biol. Chem.* **236**, 374—380, 1961.
 12. Cash, R., Brough, A.J., Cohen, M. N. P. and Satoh, P.S.: Aminoglutethimide (Elipten-ciba) as an inhibitor of adrenal steroidogenesis: mechanism of action and therapeutic trial. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **27**, 1239—1248, 1967.
 13. Užgiris, V.I., Whipple, C.A. and Salhanich, H.A.: Stereoselective inhibition of cholesterol side chain cleavage by enantiomers of aminoglutethimide. *Endocrinology* **101**, 89—92, 1977.
 14. Garren, L.D., Ney, R.L. and Davis, W.W.: Studies on the role of protein synthesis in the regulation of corticosterone production by adrenocorticotrophic hormone in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **53**, 1443—1450, 1965.
 15. Crivello, J.F. and Jefcoate, C.R.: Mechanism of corticotropin action in rat adrenal cells. I. The effects of inhibitors of protein synthesis and of microfilament formation on corticosterone synthesis. *Biochem. Biophys. Acta* **542**, 315—329, 1978.
 16. Grahame-Smith, D.G., Butcher, R.W., Ney, R.L. and Sutherland, E.W.: Adenosine 3', 5'-monophosphate as the intracellular mediator of the action of adrenocorticotrophic hormone on the adrenal cortex. *J. Biol. Chem.* **242**, 5535—5541, 1967.
 17. Haynes, R.C.: The activation of adrenal phosphorylase by the adrenocorticotrophic hormone. *J. Biol. Chem.* **233**, 1220—1222, 1958.
 18. Sutherland, E.W., øye, I. and Butcher, R.W.: The action of epinephrine and the role of the adenyl cyclase system in hormone action. *Rec. Prog. Hormone Res.* **21**, 623—646, 1965.
 19. Bell, R.J. and Sayers, G.: Isolated adrenal cells; steroidogenesis and cyclic AMP accumulation in response to ACTH. *Arch. Biochem. Biophys.* **148**, 70—76, 1972.
 20. Moyle, W.R., Kong, Y.C. and Ramachandran, J.: Steroidogenesis and cyclic adenosine 3', 5'-monophosphate accumulation rat adrenal cells. *J. Biol. Chem.* **248**, 2409—2417, 1973.
 21. Yanagibashi, K., Kamiya, N., Lin, G. and Matsuba, M.: Studies on adrenocorticotrophic hormone receptor using isolated rat adrenocortical cells. *Endocrinol. Jpn.* **25**, 545—551, 1978.
 22. Yanagibashi, K.: Calcium ion as "second messenger" in corticoidogenic action of ACTH. *Endocrinol. Jpn.* **26**, 227—232, 1979.
 23. Johnson, C.L.: Histamine receptors and cyclic nucleotides. In *Pharmacology of Histamine Receptor C.* R. Ganellin and M.E. Parsons eds., Wright, PSG, Bristol, pp. 146—216, 1982.
 24. Rubin, R.P.: Action of calcium on the secretory process. In *Calcium and the Secretory Process* Plenum

- Press, New York, pp. 25—100 1974.
25. Flack, J.D., Jessup, R. and Ramwell, P.W.: Prostaglandin stimulation of rat corticosteroidogenesis. *Science* **163**, 691—692, 1969.
 26. Honn, K.V. and Chavin, W.: Prostaglandin modulation of the mechanism of ACTH action in the human adrenal. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **73**, 164—170, 1976.
 27. Greenberg, S., Kadowitz, P.J., Diecke, F. P. J. and Long, J.P.: Effect of prostaglandin F₂ on venous contractility and 45 Ca uptake. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **145**, 80—84, 1974.

Anti-inflammatory effect of prozime-10 (P-10), a proteolytic enzyme

III. Anti-inflammatory mechanism of P-10 (II)

Kazuo MAKI

The First Department of Oral and Maxillofacial Surgery,

Okayama University Dental School

(Director : Prof. K.Nishijima)

The adrenal glands were excised from anesthetized dogs and sliced with a razor blade. In each slice the medulla was removed and was minced. After trypsin digestion, the dispersed cells were collected and preincubated in medium containing lima bean trypsin inhibitor. The incubation was carried out both with or without test drugs for 2hr, and thereafter cortisol released into the medium was determined. When histamine (Hi) was added to dispersed cells, cortisol was released in a concentration-dependent fashion. A significant release was noted at concentrations higher than 10^{-8} M of Hi. When various concentrations of ACTH and db-cAMP were added to dispersed cells, both drugs exhibited dose-dependent corticosteroidogenesis (CSG). Hi-induced CSG was inhibited by pretreatment with Ca-blockers and pyrilamine, but not affected by pretreatment with phosphodiesterase inhibitors and cimetidine. These findings indicate that Hi-induced CSG is related to H_1 receptors and Ca^{2+} influx but not with cAMP and H_2 receptors.