

氏 名	林 秀 也 はやし ひで や
学位の種類	薬 学 博 士
学位記番号	薬 博 第 122 号
学位授与の日付	昭 和 49 年 7 月 23 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 5 条 第 1 項 該 当
研究科・専攻	薬 学 研 究 科 薬 学 専 攻
学位論文題目	種々の実験炎症反応における Cyclic 3', 5'-AMP の作用機 作に関する研究

論文調査委員 (主 査) 教授 富田 謙吉 教授 山科 郁男 教授 高木 博司

論 文 内 容 の 要 旨

無機ピロリン酸 (PPi) は、生体代謝産物として種々の酵素反応により産出されているが、その自体の生理的、及び薬理的作用については、ほとんど研究がなされていない。富田らは、かつて、中和した PPi (pH 7.2) をラット皮下に投与すると、疼痛反応を呈することを見出ししているが、今回、著者は、この現象を詳細に検討し、①PPi が特異な起炎効果を有し、肥満細胞 (Mast cell) からのヒスタミン遊離を促進すること、②これらの反応が、Cyclic 3', 5'-AMP (cAMP) で強く抑制されること、③ cAMP は、種々の実験的炎症に対しても阻害効果を示すことを見出した。

そこで、著者は、この PPi 反応と、cAMP の作用機作の解析を試みた。

(I) PPi による炎症反応と cAMP の役割

まず、著者は、PPi がいくつかの興味ある性質を有する起炎物質であることを明らかにした。

① PPi をラット、モルモットなどの皮下に投与すると、局所の血管透過性の亢進及び皮膚のヒスタミン量の増加が認められた。この反応は、投与後30分をピークとする一過性の即時反応のみで、遅延反応は、認められなかった。この点において、熱炎症時の従来の実験炎症モデルにおける二相性のものと異なる。PPi 反応は、抗ヒスタミン剤の同時投与、或いはヒスタミン遊離剤である compound 48/80による動物の前処理によって消失したことから、ヒスタミンの関与が考えられる。PPi 以外の種々のリン酸誘導体の効果を検討したところ、ATP のみに PPi によく類似した起炎作用が認められたが、PPi のような疼痛反応は起きなかった。

② PPi 反応の抑制物質を検索中、cAMP とその誘導体である dibutyryl cAMP (DBcAMP) に強い抑制効果があり、cAMP の分解系酵素の阻害剤である theophylline で、その効果は更に増強されることが判明した。この cAMP の抑制効果は、特異的で、他の cyclic 3', 5'-monophosphate nucleotide 体にはほとんど効果はない。次に、cAMP の抑制効果を既知の各種消炎剤と比較すると、hydrocortisone と同等であり、phenylbutazone の 2 倍、indomethacin の 10 倍の効力を示した。

③ 一方, *in vitro* 系において, PPI は Mast cell から特異的にヒスタミンとセロトニンを遊離するが, 白血球に対するこの作用は弱い。PPI のアミン遊離作用は, 既知の遊離剤である compound 48/80 と同様に, 脱顆粒反応を起し, 分泌顆粒から, アミンを放出する。このアミン放出時には, 細胞内可溶性酵素の乳酸脱水素酵素, (LDH) や蛋白の漏出が少ないことから, 細胞膜には, 余り損傷を与えていないことが示唆された。

④ また, *in vitro* での cAMP の抑制効果は, *in vivo* の場合と同様で, 遊離剤 (PPI, ATP, compound 48/80) の種類に関係なく, それぞれの作用を同程度に強く阻害した。

(II) 肥満細胞からのヒスタミン分泌に対する cAMP の役割

次に, cAMP の作用機作を *in vitro* の系で更に詳細に検討したところ, ①Mast cell の細胞外液中に, cAMP 及び DBcAMP を付加しておく, ヒスタミン遊離作用が強く阻害された。

② 細胞内 cAMP 濃度を高めると考えられる epinephrine, theophylline, prostaglandin によってもヒスタミン遊離反応が阻害された。

③ これらの薬物によるヒスタミン遊離抑制時には, 細胞内 cAMP 量の増加が起きており, 細胞内 cAMP 量とヒスタミン遊離抑制効果との経時的变化について調べると, 逆相関を示した。

④ Adenine-8-¹⁴C からの cAMP-8-¹⁴C の生成能も, ヒスタミン遊離抑制効果の強さとはほぼ対応していることが判った。

⑤ また, 予め, adenine-8-¹⁴C で標識化した細胞に, 短時間 ³²P を取り込ませ, cAMP と ATP プールにおける ³²P/¹⁴C の比活性を測定したところ, cAMP プールでの比活性が, ATP のそれより約 6 倍高い値を示すことから, Mast cell に cAMP の早い生成代謝系が存在することが示唆された。

⑥ 次に, Mast cell の細胞内顆粒を単離し, 細胞と顆粒に対する cAMP の効果を比較検討したところ, cAMP は, 遊離剤刺激後の初期反応である脱顆粒反応を強く抑制するのに対し, 脱顆粒後のアミン放出反応, ならびに, 単離顆粒からのアミン放出反応は, 阻害しない。また, 形態的観察において, cAMP 存在下の細胞は, compound 48/80, PPI で脱顆粒反応を起していないことも確めた。

(III) 実験的炎症に対する cAMP の効果

cAMP の消炎効果の有無を明らかにする目的で, 急性及び慢性の一般的実験炎症モデルを用いて, cAMP の効果について調べた。その結果,

① cAMP は, すべての投与法 (腹腔内, 皮下, 経口投与) で, ラットの足のうらにおけるカラゲニン浮腫を抑制した。

② 更に, ラットにおけるカラゲニン肉芽腫の形成を阻害した。

③ ラット皮膚を用いての熱炎症や, ヒスタミン, PPI による色素漏出反応を阻害するが, bradykinin による反応は, 阻害しなかった。

④ cAMP による阻害効果は, theophylline の存在で, 更に増強された。なお, cAMP 或いは cAMP と theophylline を腹腔内注射すると, 一時的な軽度の hyperglycemia 状態になるが, plasma 中の corticoid 量は変化していなかった。

以上の結果から, 次の知見を得た。

① PPI は、特異な起炎物質であり、それが反応する細胞は、白血球ではなく、Mast cell に作用してヒスタミンを遊離させる。

② *in vivo*, *in vitro* の系で、cAMP, DBcAMP, epinephrine 及び theophylline は、PPI の *in vitro* における炎症及び *in vitro* における Mast cell からのヒスタミン遊離を阻害する。

③ Mast cell からのヒスタミン分泌には、cAMP adenylyl cyclase 系が抑制因子として関与し、ヒスタミン分泌と細胞内 cAMP の量的変化、或いは、cAMP の生成能との間に、密接な相関がある。また、Mast cell には、cAMP の早い生成代謝系が存在すること。

④ cAMP は、Mast cell の脱顆粒反応の段階を抑制する。

⑤ cAMP は、種々の実験的炎症モデルに対しても消炎活性を有する。

論文審査の結果の要旨

著者は、生体成分の一つである無機ピロリン酸(PPI)の皮下注射時におけるラットの急性疼痛様反応に注目して研究を進め、PPI が典型的な炎症様皮膚損傷を起こす起炎作用をもっていること、cyclic AMP がこの炎症を特異的に抑制することを見出した。さらに PPI 炎症と cyclic AMP の作用機作の解明を *in vitro* の系でも試み、次の諸結果を得ている。(1) 種々のリン酸誘導体のうち、PPI, ATP のみが皮下注射により、ラットの局所の皮膚ヒスタミン量と血管透過性を増加させる。EDTA, クエン酸等は血管透過性を増強するが、ヒスタミン量は増大しない。従って PPI の起炎作用は単なるキレート剤としての作用によるものではない。(2) PPI 注射による血管透過性およびヒスタミン量の増大は、いずれも30分をピークとする一相性の反応で、他の実験炎症によく見られる二相性のものでない点に特徴がある。(3) PPI 炎症に対して cyclic AMP, dibutyryl cyclic AMP は PPI との同時投与で著明な抑制作用を示す。Cyclic AMP の抗炎作用は Hydrocortisone と同程度、Indomethacin の10倍、サルチル酸塩の100倍であった。(4) PPI 注射時のラットの急性疼痛様反応はブラディキニンによるものではない。それは、ブラディキニンによるヒスタミン増量を cyclic AMP は著明に抑制するが、血管透過性増大は差程抑制しないからである。(5) 他のヌクレオチドの効果を検討した所、5'-AMP が cyclic AMP 同様に、PPI, ATP 炎症のヒスタミン増加のみを著明に抑制することを見出した。(6) *in vitro* 系で PPI の標的細胞を検討し、PPI によるヒスタミン増量は、それが Mast cell に特異的に作用して起こるもので、白血球に対する作用ではないことを確認した。その際、PPI は Mast cell の脱顆粒反応を促進する可能性を観察した。(7) Cyclic AMP は、*in vitro* においても Mast cell からの PPI, ATP, compound 48/80 等によるヒスタミン遊離を著明に抑制する。(8) PGE₁, エピネフリン, テオフィリン等も Mast cell からのヒスタミン遊離を抑制するが、その際、細胞内の cyclic AMP 量および Adenine-8-¹⁴C → cyclic AMP-¹⁴C 生成の増大がある。(9) cyclic AMP はまた、カラゲニン浮腫、カラゲニン肉芽腫など急性、慢性型の実験炎症に対しても、注射、経口投与でかなり有効である。

以上の結果は、PPI の起炎作用、cyclic AMP の特異な抗炎作用の機構の一端を解明すると共に、Mast cell のヒスタミン遊離機構の解明に寄与する多くの新知見を含むものである。よって、本論文は薬学博士の学位論文として価値あるものと認める。