

## 第 1 節

エンケファリナーゼ阻害剤（ホスホラミドン）を用いた検討

## 1. はじめに

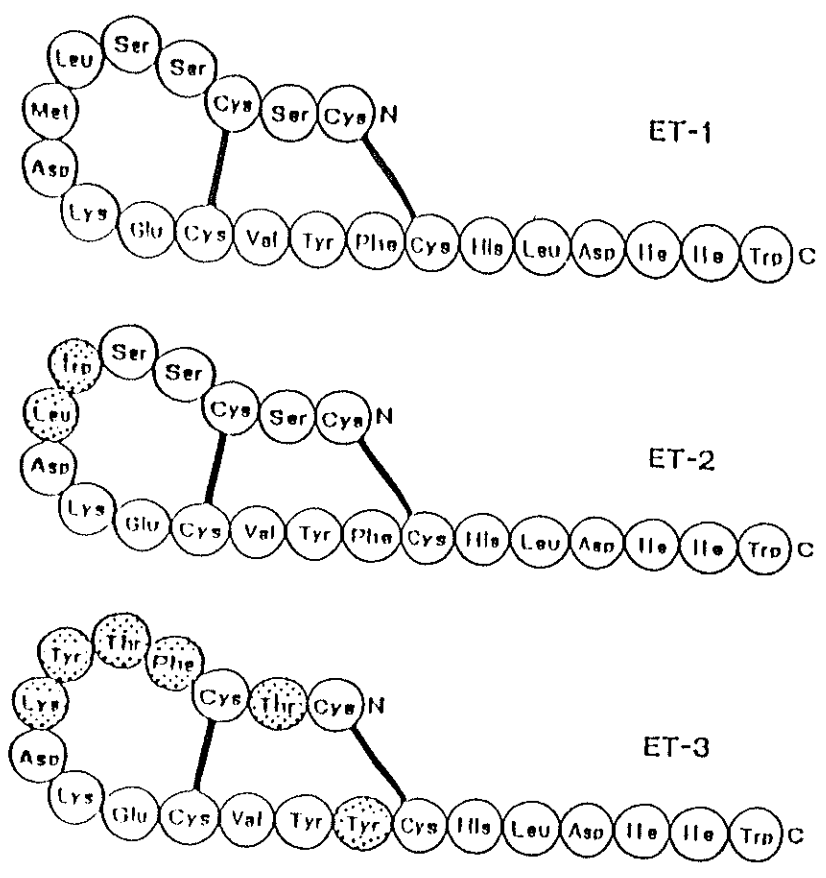
エンドセリン (ET) は、最初、血管平滑筋に対し強力な収縮活性を持つ物質として報告された(Yanagisawa, 1988)。その後の研究により、ETは血管平滑筋のみならず、気道、小腸平滑筋等の収縮作用も持ち、腎、心房、副腎からのホルモン放出の調節を行うなど様々な生理活性作用を持つことが報告されている(Yanagisawa, 1989)。

ラット胎児の諸臓器におけるET-1の、mRNA発現の検討の結果、肺、特に、細気管支上皮は腸管や髄膜とともにET-1産生量の多い部位であることが判明しており(MacCumber, 1989)、肺には多くのET-1結合部位が存在することも確認されている(Koseki, 1989; Bolger, 1990; Henry, 1990)。

気道系においては、気道上皮細胞がETを産生することが報告されており(MacCumber, 1989)、また、気道平滑筋に多数のETの受容体が存在することより、ETが気道平滑筋のトーン調節に関与している可能性が考えられる。しかし、ETの気道系における代謝についての報告は少なく、生体内において、どのような条件下でその作用が発現されるのかについては不明な点が多い。

一方、エンケファリナーゼは、エンケファリン(Matsas, 1984; Malfroy, 1985)、タキキニン(Hooper, 1985)など種々のペプチドを加水分解することが知られている。このうち、ニューロキニンA (NKA) やサブスタンスP (SP) などのタキキニン類は、neurogenic inflammationを惹起し、気道収縮、気道分泌亢進など、気管支喘息に近い病態を惹起し得る物質であることが報告されている。エンケファリナーゼ活性の低下で、これらのペプチドの作用が発現されることが知られており、気道系におけるエンケファリナーゼの役割が注目されている。

本節では、気管、および肺実質におけるET-1の代謝に、エンケファリナーゼが関与しているか否かについて、エンケファリナーゼ阻害剤であるホスホラミドンを用いて検討した。



ET-1 : Endothelin-1  
 ET-2 : Endothelin-2  
 ET-3 : Endothelin-3

図 1-1 エンドセリンファミリー

## 2. 方法

### a) 対象

Hartley系モルモット 日本S L Cより購入

### b) 試薬

ET-1、NKA、ホスホラミドンはペプチド研究所より、ペントバルビタールナトリウム、二塩酸ヒスタミンはシグマ社より、カプサイシン、塩化アセチル- $\beta$ -メチルコリン (メサコリン) は和光純薬工業より購入した。

### c) 実験方法

モルモットを用いて

1. 摘出気管を用いたET-1誘発モルモット摘出気管切片収縮
2. 小動物用体プレチスモグラフを用いたET-1吸入実験
3. 肺実質との incubation によるET-1の分解

に対するエンケファリナーゼ阻害剤であるホスホラミドンの影響を検討した。

以下、この各々について方法、および結果を述べる。

#### 2-1

ET-1誘発モルモット摘出気管切片収縮に対するホスホラミドンの影響

体重約 450g の Hartley系雄性モルモットをペントバルビタール(50mg/kg) 腹腔内投与麻醉後、正中切開にて開胸し modified Krebs-Ringer液

(NaCl 112mM; KCl 4.8mM; CaCl<sub>2</sub> 2.8mM; KH<sub>2</sub> PO<sub>4</sub> 1.2mM; MgSO<sub>4</sub> 1.2mM;

NaHCO<sub>3</sub> 25mM; glucose 5.5mM) にて右心室より肺循環系を灌流した後、気管、肺、および心臓を一塊として取り出し、気管を周囲の軟部組織から鈍的に剥離して摘出した。摘出気管の軟骨部で剖面を入れ縦切開し、2-3mm ずつの切片を横切開して作成した。この気管切片を気管の部位による反応性の違いも考慮して上、中、下部より1個ずつ取りだし、3個連結して気管平滑筋標本を作成した。1本の気管から標本を4本作成し、そのうち1個を毎回対照とした。

Modified Krebs-Ringer 液5mlで満たしたマグナス管内に作成した標本を懸垂し、一端は固定し、他端は張力トランスデューサー (TB-611T、日本光電製) に接続して等尺性に張力変化を観察した (図 1-2)

標本にまず1gの張力をかけ、1-2時間静置し平衡に達した後、ヒスタミン  $3 \times 10^{-4}$  Mを加え、この最大収縮反応を100%とし、各反応を%表示した。Modified Krebs-Ringer 液で十分洗い、平衡に達した後、生食で溶解したホスホラミドンを  $10^{-7}$  M、 $10^{-6}$  M、 $10^{-5}$  Mとなるように、または、対照として生食を加え、平衡に達するまで静置した後、ET-1を  $10^{-12}$  Mから濃度蓄積的に  $10^{-7}$  Mまで加え、用量反応曲線を作成した。マグナス管は予めシリコナイズしたものをを用いた。また、マグナス管内のmodified Krebs-Ringer液は37° Cに保ち、95% O<sub>2</sub> と5% CO<sub>2</sub> の混合気にて飽和させた。

実験データは、mean ± S. E. で表現し、統計学的検定には、unpaired t-testを用い、p < 0.05をもって有意差ありとした。

## 2-2

### 小動物用体プレチスモグラフを用いた覚醒下でのET-1吸入実験

次に、小動物用体プレチスモグラフを用いて吸入実験を行った。

Agrawalの報告(Agrawal, 1981)を参考に体プレチスモグラフを作製した。その概要をFig. 1-3に示す。アクリル製で、容量は約9Lであり、呼吸気流計を37° Cに保ち、水滴の発生を防止した。モルモットの頸部は固定さ

れ、無麻酔、自発呼吸下にてネブライザーより披検薬を吸入できるシステムである。

このシステムによって specific airway conductance(sGaw)を求めることができる。sGawを求める意義は、以下の点にある。即ち、気道抵抗(Raw)と肺気量の積がほぼ一定であることから、同じ気道状態でも、大きい肺気量で測定すると Rawは小さくなり、小さい肺気量で測定すると Rawは大きくなるので、Raw値だけでは気道障害を評価することができない。そこで Rawの逆数である気道コンダクタンス(Gaw)を任意の肺気量(V:通常は機能的残気量、FRC)で除した値であるsGawを用いれば肺気量の影響を考慮して気道抵抗を評価できる。つまり、sGawはGawを肺気量で補正した値であり、気道の“通りやすさ”を意味する指標として用いられるものである(長谷川, 1985)。

図 1-4に体プレチスモグラフの測定原理を示す。ボイルの法則よりボックス内ボリュームの変化、及び流速をモニターすることでsGawが求められる。Agrawalの方法に従い、自発呼吸下で問題になる温度差による蒸気圧の影響を除くため、呼気終末時より吸気流速が一定となるまでの期間にsGawを求めた。

図 1-5は、上段にボックス内ボリュームの変化を、中段に流速の変化を、その各々をX軸、Y軸にして描いた曲線を下段に示したものである。呼気終末時より吸気流速が一定となるまでの箇所、すなわち、Iの立ち上がりの角度のtangentより、sGawを求めた。この測定方法で求めたsGaw値は、従来の肺抵抗を用いて算出したsGaw値とほぼ一致したと報告されている(Agrawal, 1981)。

実験のプロトコルを図 1-6に示す。モルモットをボックス内に固定した状態でまずsGawを測定し、この値を100%とした。次に生食を5分間吸入させ、sGawに大きな変化がないことを確認し、続いて生食に溶解したホスホラミドン $10^{-4}$ M、あるいは対照として生食を各々5分間吸入させた。この時点でまた、sGawに大きな変化がないことを確認し、その後、生食を2分間吸入させ、引き続きET-1を2倍希釈系列で、 $0.0625 \times 10^{-5}$ Mから $10^{-5}$ Mまで2分間ずつ吸入させ、以降90分までsGawの推移を観察した。次にホスホラミドンの吸入が気道の感受性、反応性を非特異的に変化させ

た可能性があるかどうかについて、メサコリンを用いて検討した。ホスホラミドンを $10^{-4}$ M×5分間吸入の前後でメサコリンを0.0245mg/mlから2倍希釈系列で2分間ずつ吸入させsGawの変化を観察し、sGawがメサコリン吸入前の50%以下となった時点で吸入を中止した。

更に、タキキニン類の気道収縮におよぼす影響と比較検討するため、NK Aの吸入実験を、ET-1吸入と同様のプロトコールで行った。モルモットをボックス内に固定した状態でsGawを測定し、この値を100%とし、生食5分間吸入に続いてホスホラミド $10^{-4}$ M、あるいは対照として生食を各々5分間吸入させた。その後、生食を2分間吸入させ、引き続きNK Aを2倍希釈系列で、 $0.0625 \times 10^{-4}$ Mから $10^{-4}$ Mまで2分間ずつ吸入させ、以降90分までsGawの推移を観察した。

ネブライザーはオムロンNE-U11（立石電機社製）超音波ネブライザーを用い、差圧トランスデューサー（TP-602T）、呼吸気流計（TV-241T）は、日本光電社製を用いた。XYレコーダー（VQ-065A）はナショナル社のものを使用した。

実験データは、mean±S.E.で表現し、ET-1最終濃度（ $10^{-5}$ M）吸入終了時のsGawの値をホスホラミドン前吸入群、及び対照群で比較した。統計学的検定には、unpaired t-testを用いた。

## 2-3

### モルモット肺実質切片とのincubationによるET-1分解の検討

2-1と同様の方法でモルモット肺を摘出し、modified Krebs-Ringer液中で厚さ1-2mmの肺実質切片を作成した。約950mgのwet weight tissueを1mlのmodified Krebs-Ringer液に加え、 $37^{\circ}$ Cに保ち、95%  $O_2$ と5%  $CO_2$ の混合気にて飽和させた（図1-7）。

このうち一方に、生食に溶解したホスホラミドン $10^{-6}$ M、他方には対照群として生食のみを加え、5分間incubationした後、ET-1を $10^{-6}$ M添加し、15分間incubationした。ET-1を添加した直後と15分後に検体を各々0.2mlずつ採取し、1%酢酸を加え、反応を止めた。高速液体クロ

マトグラフィー（HPLC）用溶液の組成は、

A液：0.1 %トリフルオロ酢酸

B液：80%アセトニトリル+0.1 %トリフルオロ酢酸

で用いた。分離カラム CHEMCOSORB 5-ODS-II 4.6×150mm をA液流速 0.5ml/min で平衡化した状態で検体を負荷した。アセトニトリル濃度を48%まで60分かけて上昇させ、その後10分かけてアセトニトリル濃度を80%まで上昇させ、210nm の波長でモニターした。

HPLCはシステムコントローラーとしてSCL-6A、ポンプはLC-6Aを、紫外線吸収検出器はSPD-6Aを用いた（島津製作所製）。



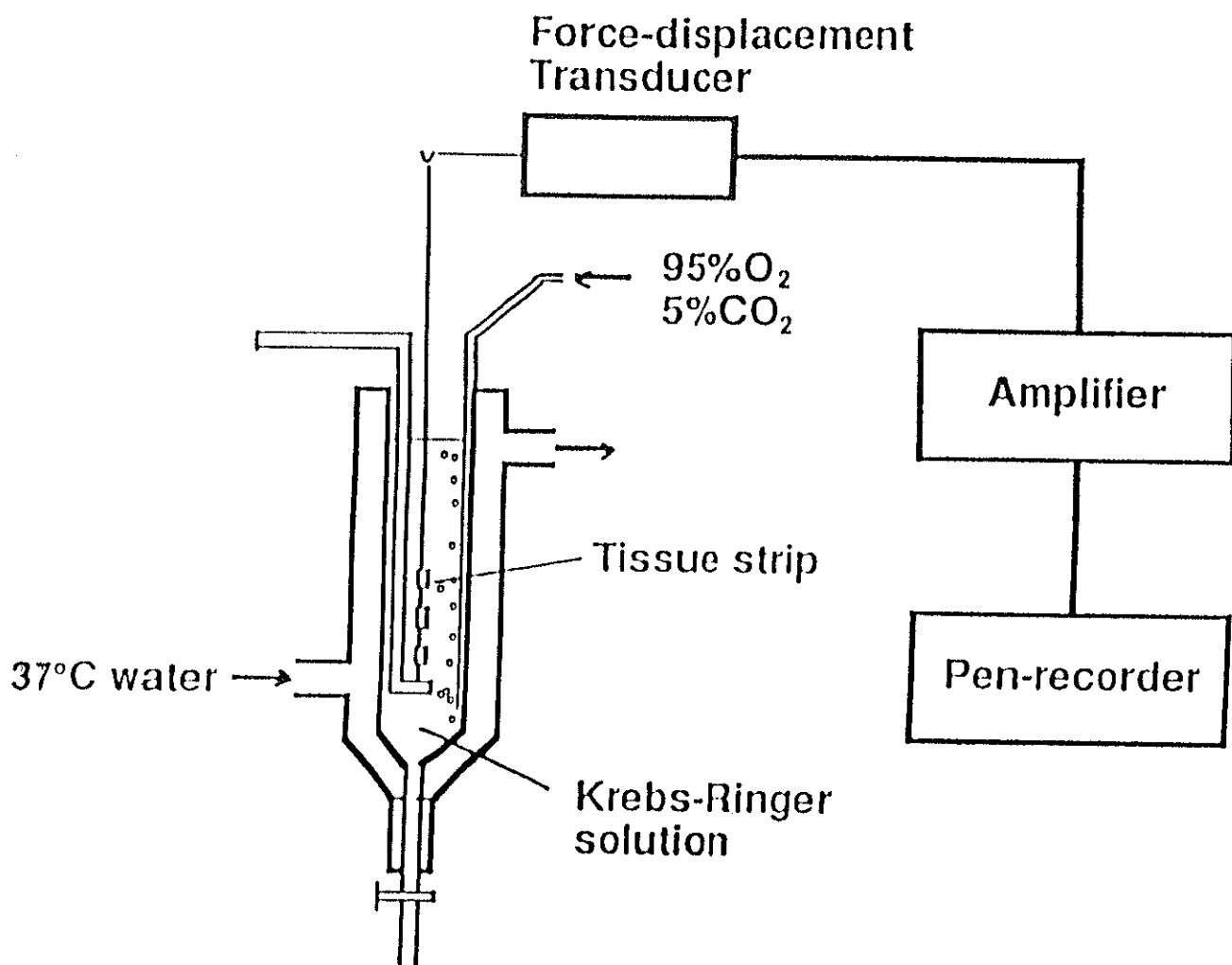


図 1-2 バイオアッセイシステム

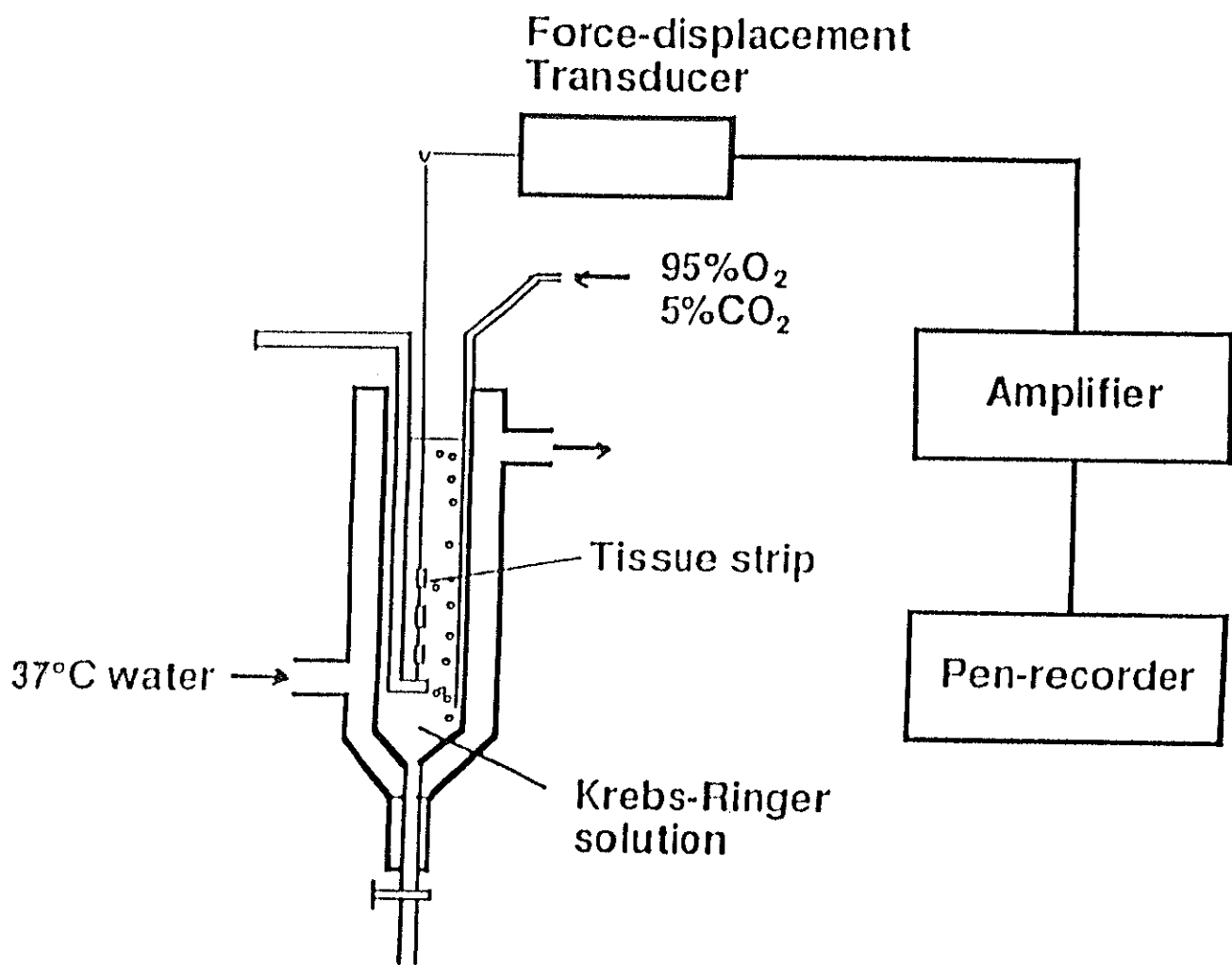


図 1-2 バイオアッセイシステム

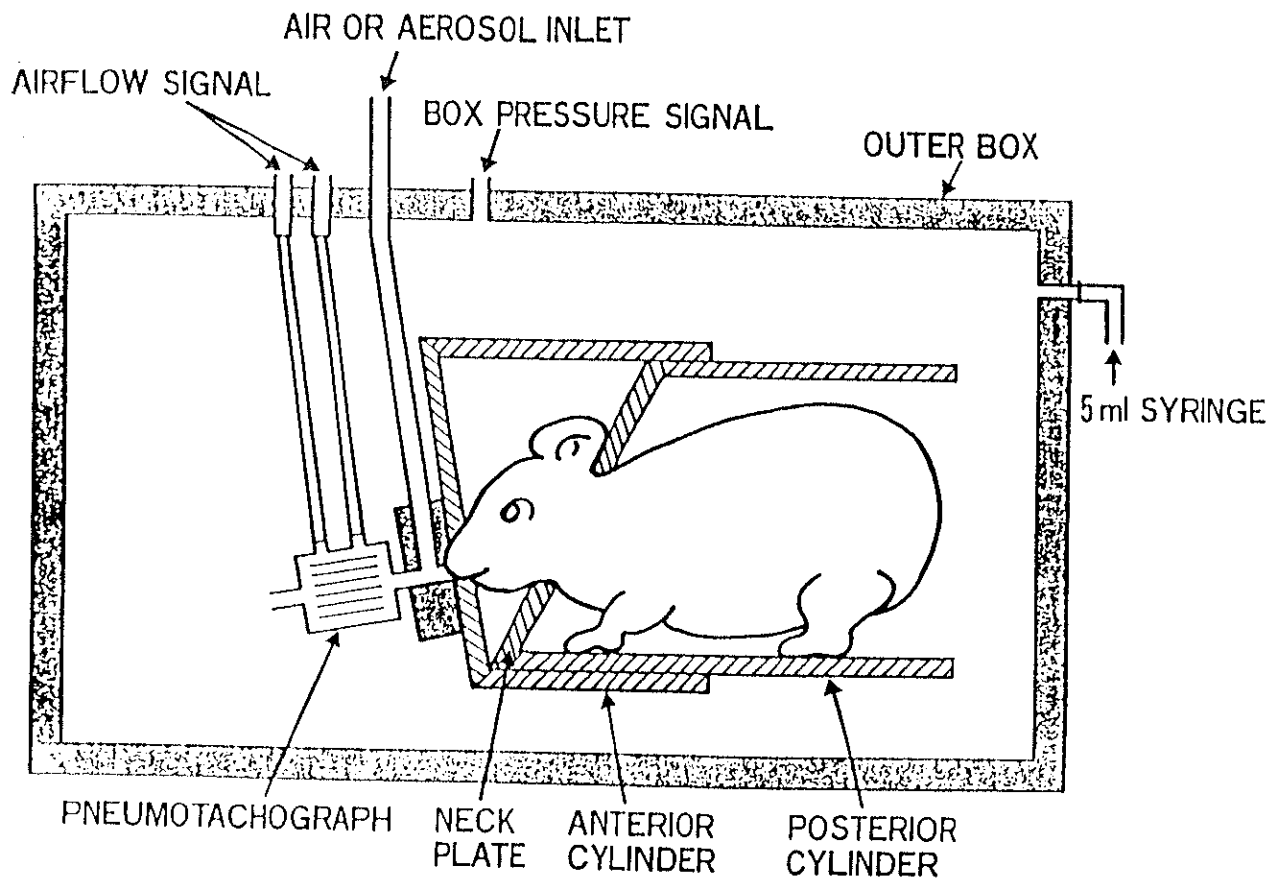
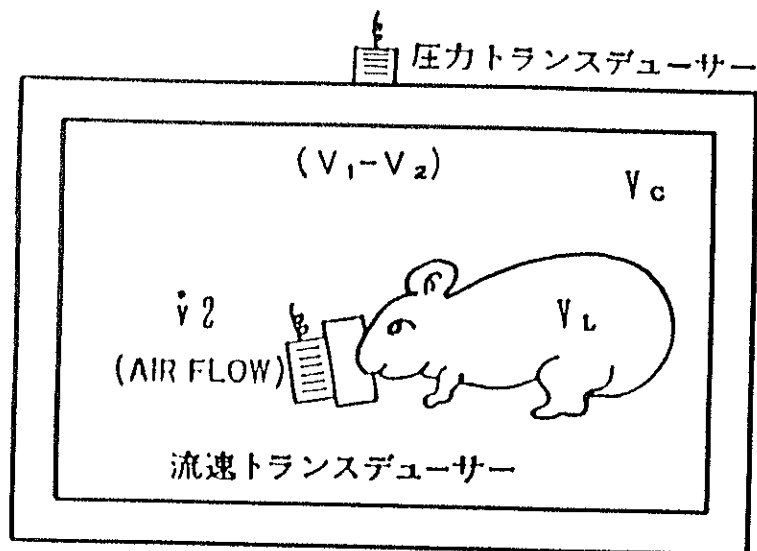


図 1-3 小動物用体プレチスモグラフの概要



V<sub>L</sub> : 胸郭容積                      V<sub>c</sub> : チャンバー内容積  
V<sub>1</sub> : 胸郭容積の変化              V<sub>2</sub> : チャンバー内容積の変化  
dP<sub>L</sub> : 胸郭内圧の変化              dP<sub>c</sub> : チャンバー内圧の変化  
P : 大気圧      R : 気道抵抗      v̇<sub>2</sub> : 呼吸流速

とすると、ボイルの法則より

$$V_L \times P = (V_L - (V_1 - V_2)) \times (P + dP_L) \dots 1$$

$$V_c \times P = (V_c - (V_1 - V_2)) \times (P + dP_c) \dots 2$$

また、導管の流速と抵抗については以下の式が成り立つ

$$R \times \dot{v}_2 = (P + dP_L) - (P + dP_c) \dots 3$$

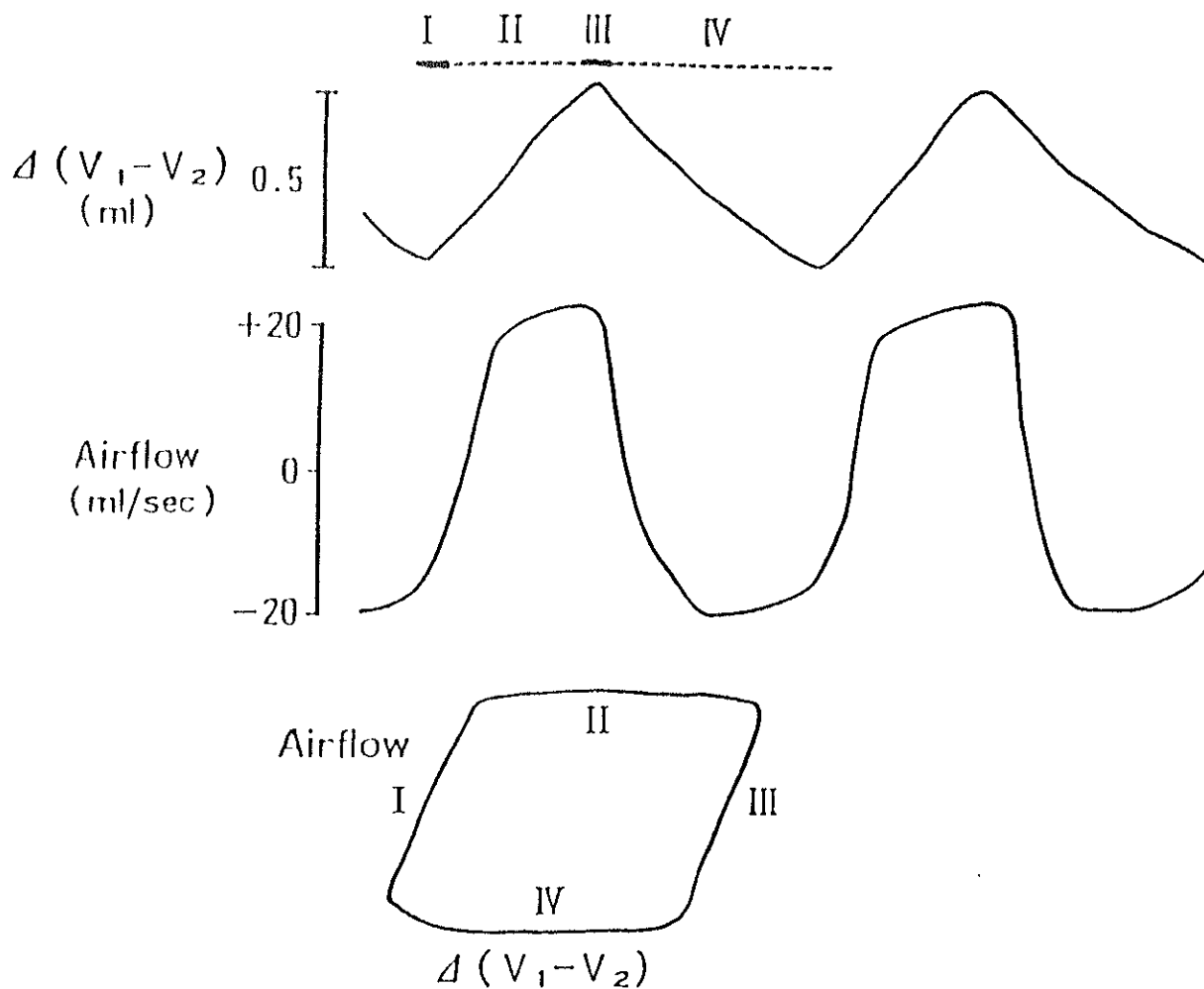
1式、2式を  $V_L \gg (V_1 - V_2)$ 、 $V_c \gg (V_1 - V_2)$  の条件下に  $dP_L$ 、 $dP_c$  について解き、3式に代入すると、

$$R \times \dot{v}_2 = (1/V_L - 1/V_c) \times (V_1 - V_2) \times P$$

$1/V_L \gg 1/V_c$  とすると、 $sGaw = (1/R) / V_L$  だから、

$$sGaw = \dot{v}_2 / (V_1 - V_2) / P$$

## ☒ 1-4 特殊気道コンダクタンス (sGaw) の測定原理



I は、呼気終末時から吸気開始時に相当し、容量変化も微量で、  
 温度差による蒸気圧の変化が無視できる。

機能的残気量レベルにおける  $sGaw$  値は、 $P_B$  を大気圧、 $P_{H_2O}$  を飽和  
 蒸気圧とし I の立ち上がりの角度を  $\theta$  とすると、以下の式から求められる。

$$\tan \theta \times \frac{1}{P_B - P_{H_2O}}$$

図 1-5

$\Delta(V_1-V_2)$ 、気流、および、その各々を X、Y  
 とした曲線のトレース

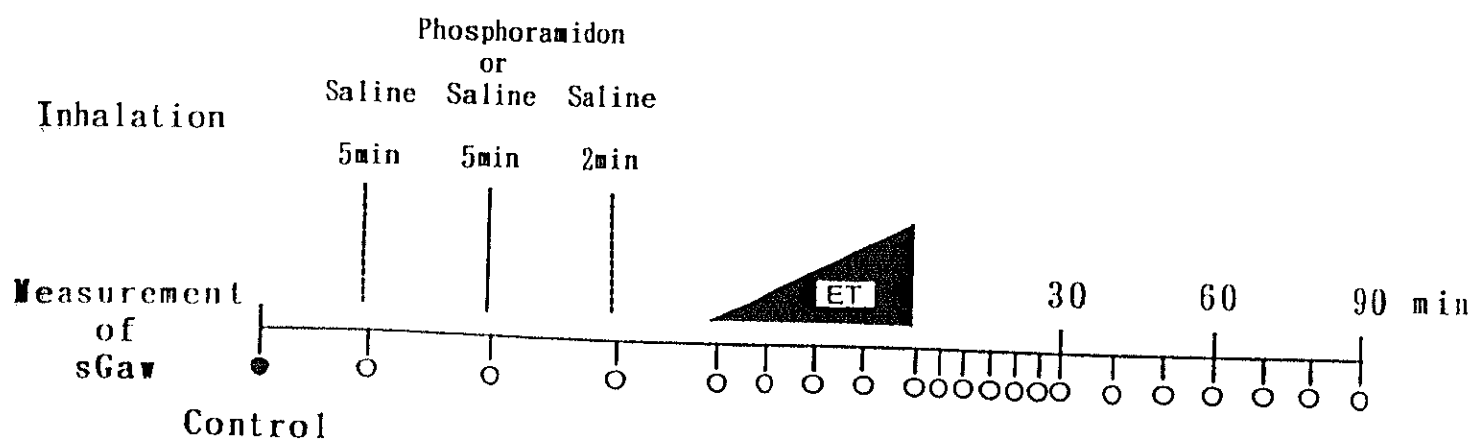


図 1-6 エンドセリン-1 吸入実験のプロトコール

guinea pig chopped parenchyma

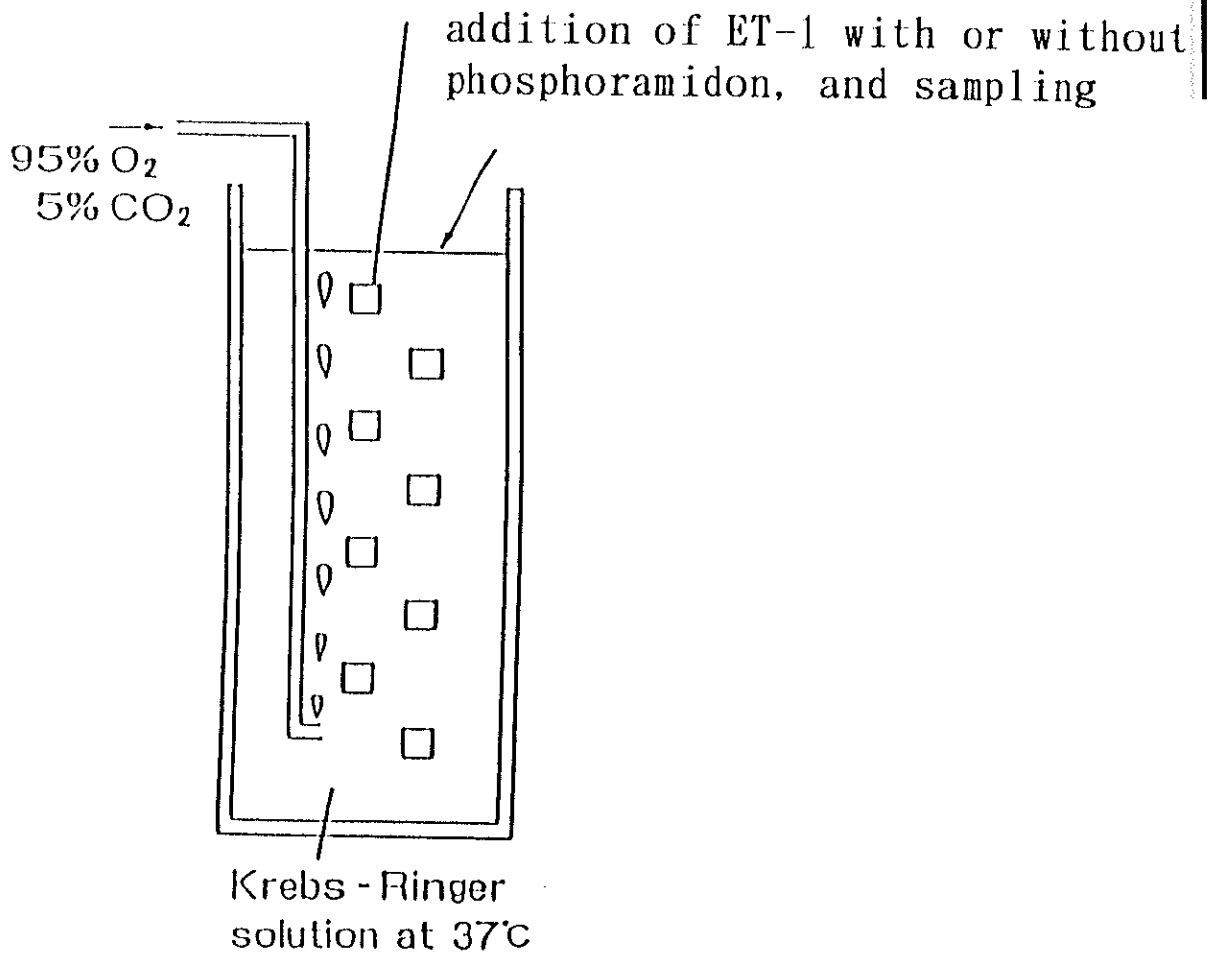


図 1-7

肺実質切片とのincubationによるエンドセリン分解の検討

### 3. 結果

#### 3-1

##### E T-1 誘発モルモット摘出気管切片収縮に対するホスホラミドンの影響

薬理的測定の結果 ( $n = 8$ ) を図 1-8 に示す。ホスホラミドン存在下では、対照群に比較し、E T-1 の用量反応曲線は、ホスホラミドンの濃度依存性に左方に移動した。ヒスタミンによる最大収縮の50%にあたる収縮を生じるのに必要なE T-1 濃度 ( $EC_{50}$ ) は、対照群で  $3.5 \pm 0.7 \times 10^{-8} M$  だったのに対し、ホスホラミドン  $10^{-7} M$ 、 $10^{-6} M$ 、 $10^{-5} M$  存在下では、各々  $9.2 \pm 0.9 \times 10^{-9} M$  ( $p < 0.05$ )、 $9.0 \pm 0.9 \times 10^{-9} M$  ( $p < 0.05$ )、 $4.5 \pm 0.8 \times 10^{-9} M$  ( $p < 0.01$ ) であった。

また、E T-1  $10^{-7} M$  における収縮反応は、対照群の  $68.8 \pm 1.7\%$  に対し、各々、 $83.1 \pm 1.4\%$ 、 $89.5 \pm 1.8\%$ 、 $93.4 \pm 1.7\%$  と有意に増強した ( $p < 0.01$ )。

#### 3-2

##### 小動物用体プレチスモグラフを用いた覚醒下でのE T-1 吸入実験

今回の測定に際し、予備的に20頭のモルモットについてsGaw算出した。sGawの実測値は、 $0.51 \pm 0.03 \text{ sec}^{-1} (\text{cm H}_2\text{O})^{-1}$  であり、Agrawal の報告した結果  $0.48 \pm 0.06 \text{ sec}^{-1} (\text{cm H}_2\text{O})^{-1}$  とほぼ一致した (Agrawal, 1981)。また、同一モルモットでは、実験開始前に測定したsGawの実測値は、日を替えて行っても一致し、再現性も良好だった。

吸入実験の結果 ( $n = 6$ ) を図 1-9 に示す。図に示すように6例ともホスホラミドン前吸入群のみが、sGawの50%以下の低下を示し、ほぼ60分以内にsGawは回復した。いずれの場合もE T-1 を最終濃度まで吸入させたときsGawは最も低下した。この際のsGawは、 $32.1 \pm 4.7\%$  だったのに対し、生食を吸入させた対照群は、E T-1 を最終濃度まで吸入させてもsGawは前値の50%以下には低下せず、E T-1 の最終濃度吸入時のsGawは、 $88.9$



%±18.1%であり、ホスホラミドン前吸入群のsGawは対照群に比較して有意な低下を認めた ( $p < 0.01$ )。

また、ホスホラミドン吸入の前後でのメサコリンに対する反応性の変化は図 1-10 に示す通りで、ホスホラミドン吸入の前後でメサコリンに対する感受性、反応性に変化は認めなかった。

図 1-11 に、NK Aの吸入実験の結果をまとめて示す。NK AによるsGawの低下も、ホスホラミドンを予め吸入させた群のみで観察された。ホスホラミドン吸入群のsGawは、NK A  $0.25 \times 10^{-4} \text{M}$ の濃度で $49.2 \pm 9.7\%$ であったが、生食を吸入させた対照群は、NK Aを最終濃度である $10^{-4} \text{M}$ まで吸入させても、sGawは $96.1 \pm 2.4\%$ と変化を認めなかった。

### 3-3

#### モルモット肺実質切片とのincubationによるET-1分解の検討

対照群、ホスホラミドン添加群とも6例で検討した。

設定した条件下では、ET-1は56.8分にピークを認めた。代表的なトレースを図 1-12 に示す。Incubation直後の場合には、対照群、およびホスホラミドンを $10^{-6} \text{M}$ 加えた群ともに、56.8分後にET-1のピークを認めた(図 1-12 A、B)。図 1-12 C、DにET-1とモルモット肺切片とを15分間 incubationした結果を示す。対照群では56.8分に認めたET-1のピークは、直後に比較して15%にまで減じ、32分に新たなピークが認められた。

一方、ホスホラミドンを添加した群は、15分経過しても56.8分に認めたET-1のピークは対照群に比べ約85%の大きさを観察され、32分後のピークは、ほとんど認められなかった。この32分後のピークは、ET-1の分解物によって新たに形成されたピークである可能性が考えられる。ホスホラミドンの存在下では、32分後のピークがほとんど認められなかったことから、ET-1の分解がホスホラミドンによって抑制された可能性が考えられる。

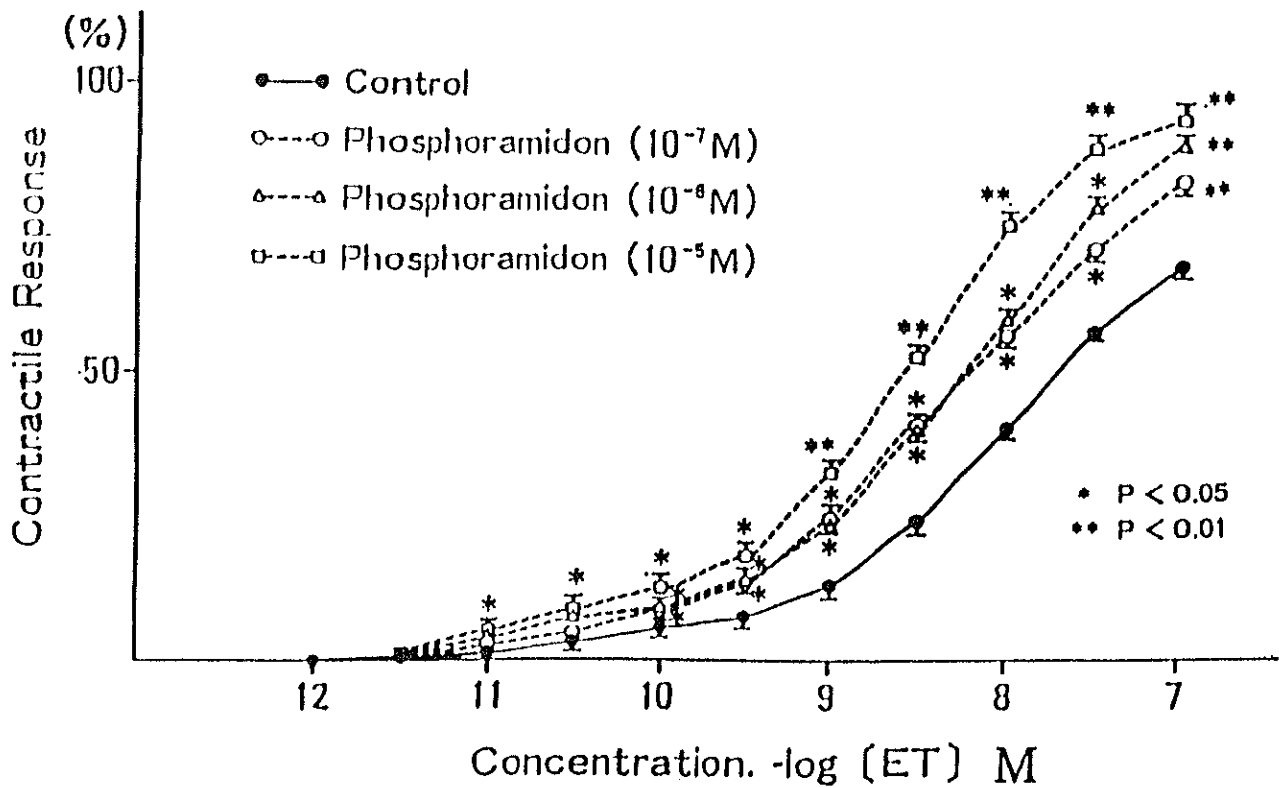


図 1-8

エンドセリン-1の用量反応曲線に対する  
ホスホラミドンの影響

●は生食を添加したコントロール群、

○、△、□は各々、ホスホラミドンを10<sup>-7</sup>M、10<sup>-6</sup>M、10<sup>-5</sup>M添加した群を表す。

ホスホラミドンの濃度依存性にエンドセリン-1の収縮反応は増強した。

mean ± S. E. (n=8) \*p<0.05, \*\*p<0.01 を示す。

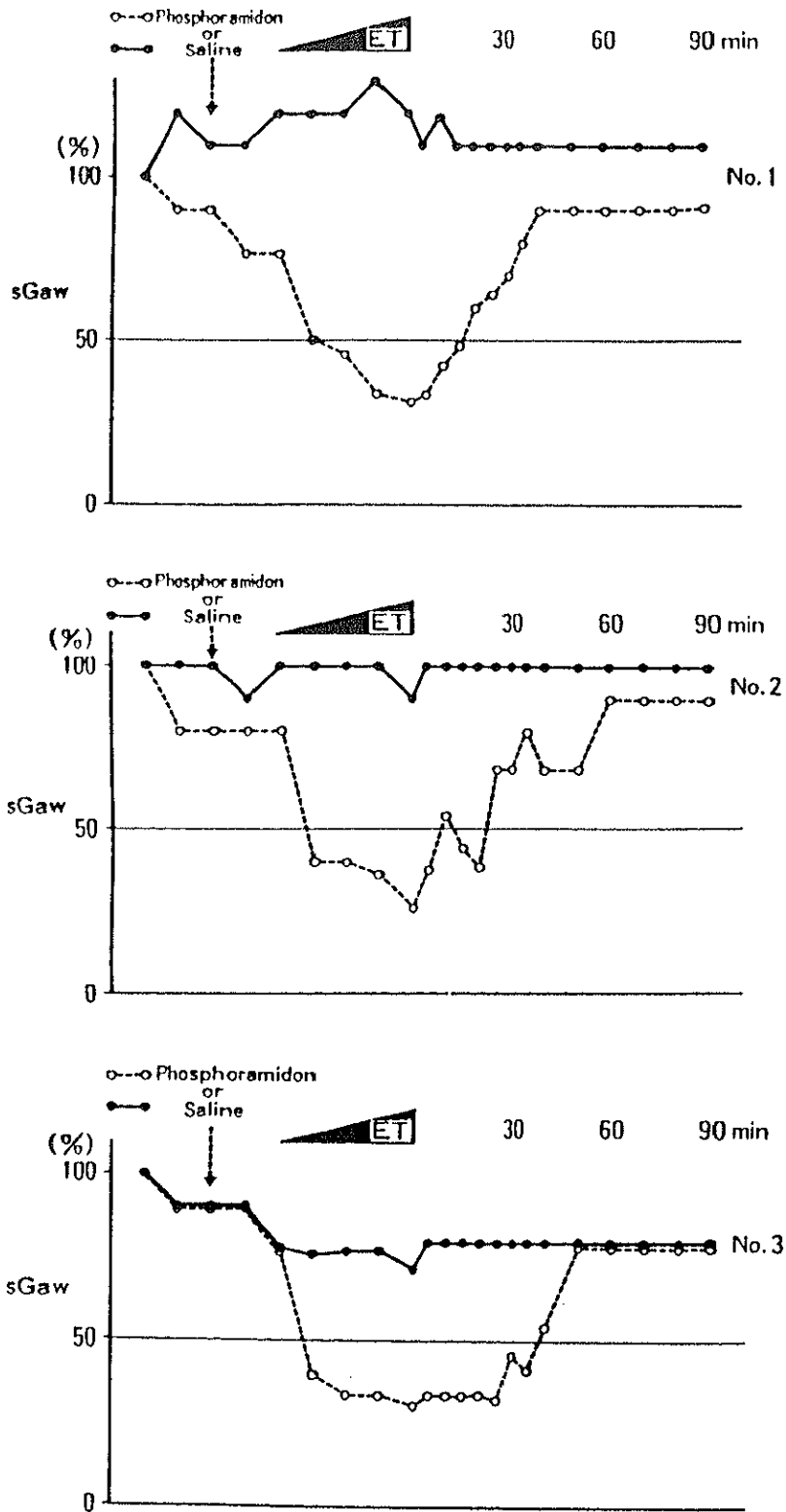


図 1-9 エンドセリン-1 吸入実験の結果

●は生食吸入後、エンドセリン-1を吸入させたコントロール群を、  
○はホスホラミドン吸入後、エンドセリン-1を吸入させた群を示す。  
ホスホラミドン前吸入群のみ、sGawの有意な低下を認めた。

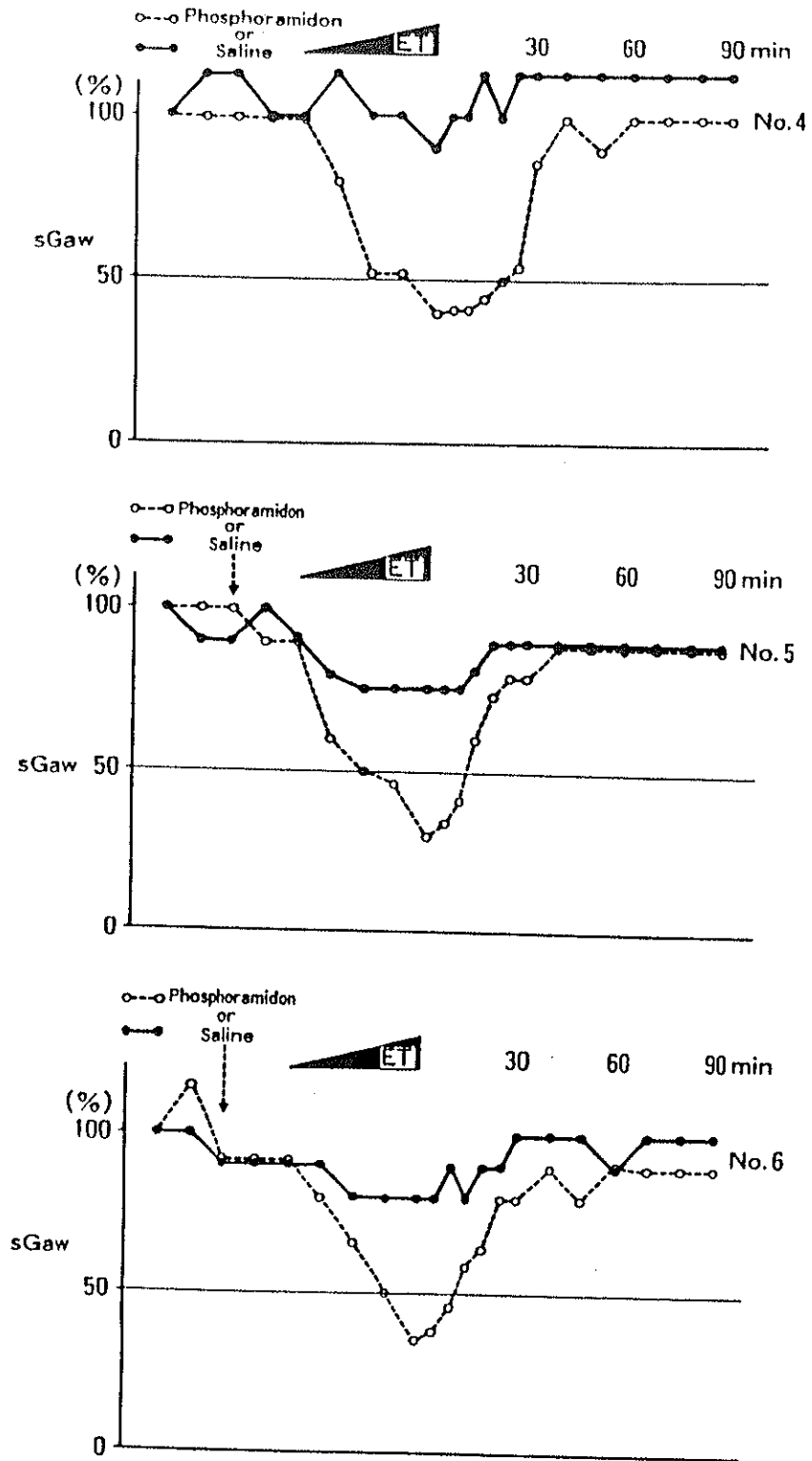


図 1-9 エンドセリン-1 吸入実験の結果

●は生食吸入後、エンドセリン-1を吸入させたコントロール群を、  
○はホスホラミドン吸入後、エンドセリン-1を吸入させた群を示す。  
ホスホラミドン前吸入群のみ、sGawの有意な低下を認めた。

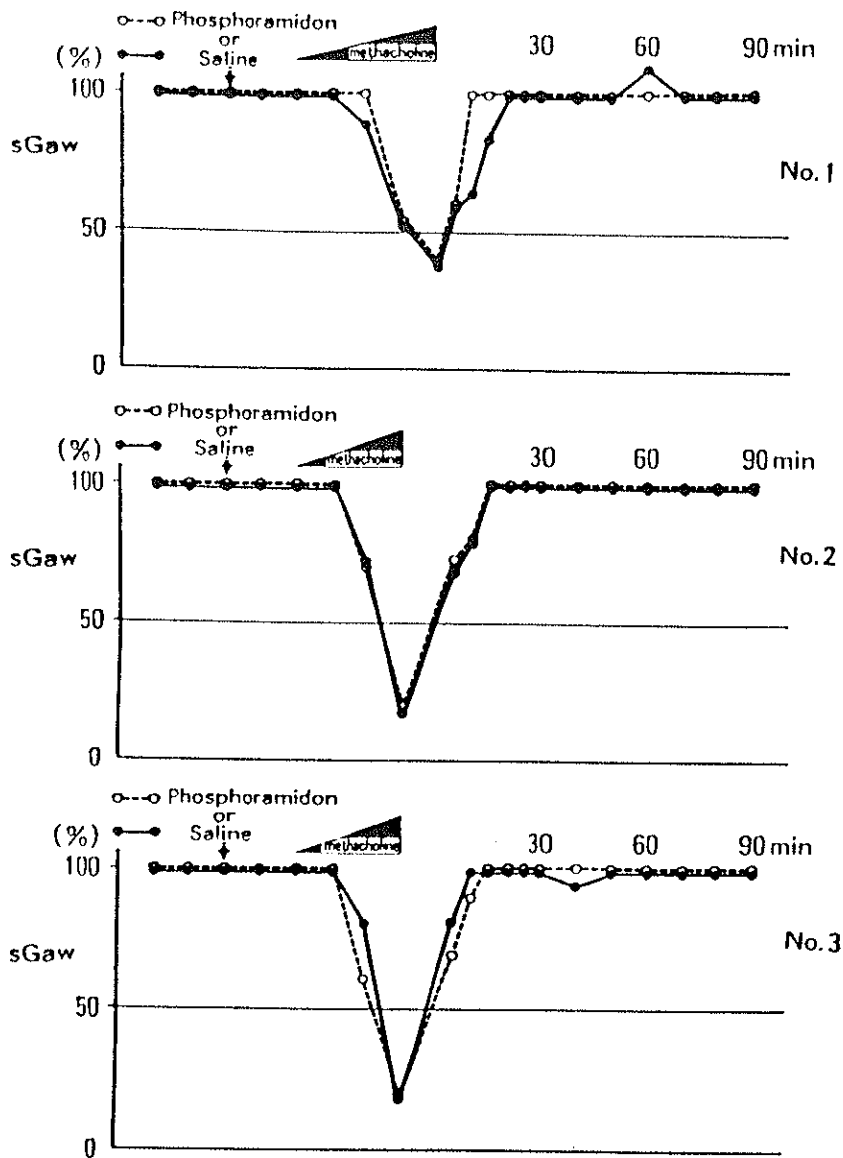


図 1-10 メサコリン吸入実験の結果

●は生食吸入後、メサコリンを吸入させた群を、  
○はホスホラミドン吸入後、メサコリンを吸入させた群を示す。  
両者に差は認められなかった。

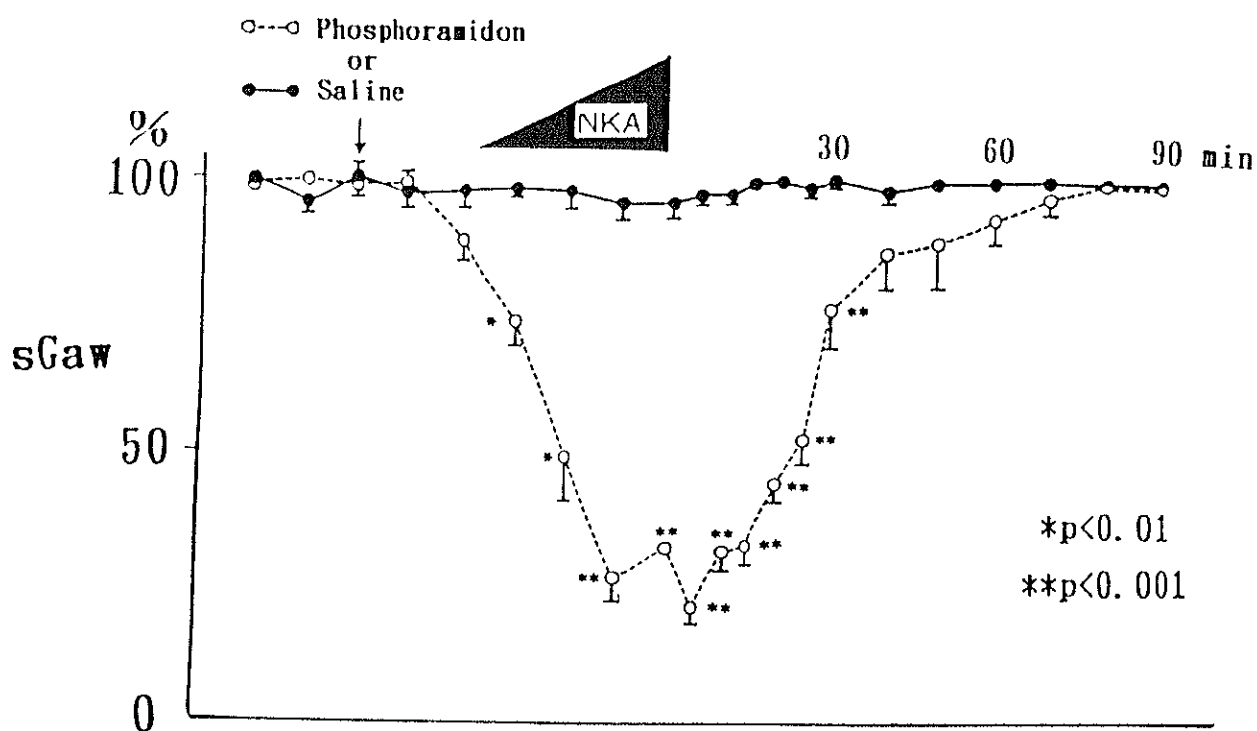


図 1-11 ニューロキニンA 吸入実験の結果

●は生食吸入後、ニューロキニンAを吸入させたコントロール群を、  
○はホスホラミドン吸入後、ニューロキニンAを吸入させた群を示す。  
ホスホラミドン前吸入群のみ、sGawの有意な低下を認めた。  
mean±S. E. (n=6) \*p<0.01, \*\*p<0.001を示す。

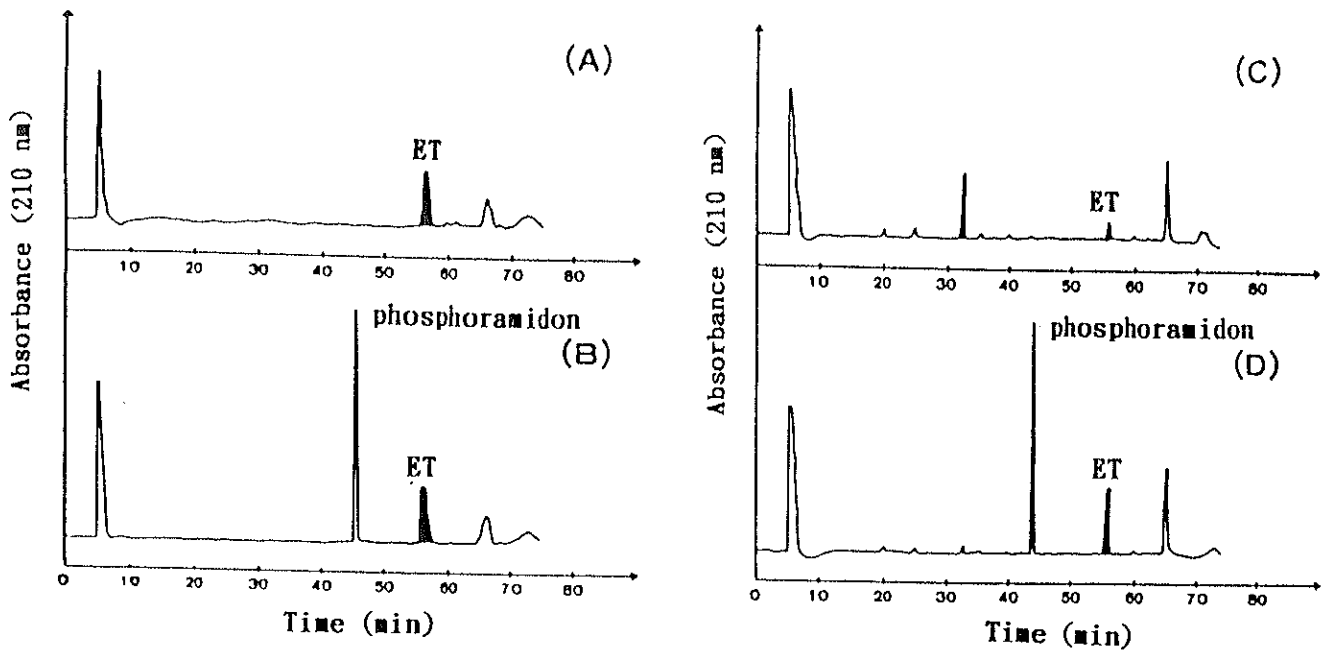


図 1-12

肺実質切片とのincubationによるエンドセリン分解の検討

—高速液体クロマトグラフィーによる解析—

- (A) 37° C で肺実質切片と incubation した直後の検体
- (B) (A) と同じ条件下でホスホラミドン $10^{-6}$ M添加した検体
- (C) 37° C で肺実質切片と30分間 incubation した検体
- (D) (C) と同じ条件下でホスホラミドン $10^{-6}$ M添加した検体

#### 4. 考察

この節では、ETの気道系における代謝に注目し、エンケファリナーゼの関与を明らかにするために、エンケファリナーゼ阻害剤である、ホスホラミドンを用いて検討を行った。

モルモット摘出気管平滑筋を用いた薬理的張力測定、および小動物用体プレチスモグラフを用いた吸入実験の両者とも、ホスホラミドンは外因性に投与したET-1の気道収縮作用を増強させた。また、モルモット肺実質切片とET-1とを incubation するとET-1は分解されるが、この反応はホスホラミドンによって抑制された。以上のことより、ET-1が生体においても、ホスホラミドンで活性阻害されるエンケファリナーゼによって代謝、分解などの調節を受けている可能性が示唆された。

今回用いた、エンケファリナーゼ阻害剤であるホスホラミドンは、エンケファリナーゼの活性発現に必要とされる、 $Zn^{2+}$ の部分に作用して活性発現を抑制するものであり、エンケファリナーゼの活性の検討に、極めて有効な物質である (Almenoff, 1983)。

モルモット摘出気管平滑筋を用いた薬理的測定の結果は、図 1-8に示す通りで、ホスホラミドンはET-1の用量反応曲線を左方へ移動させ、最大収縮反応も増強させた。予備実験で、カプサイシン $10^{-5}M$ を予め投与し、内因性のタキキニンを放出させ、洗浄した後、同様の方法で行った実験でも、ホスホラミドンの濃度依存性にET-1の収縮反応は増強し、今回の実験と同様の結果を得ている。カプサイシンは、C線維を特異的に刺激して、その神経終末からタキキニンを遊離、枯渇させ神経を変性させることが知られており (Jancso, 1977)、本実験で投与した外因性のホスホラミドンが、内因性のタキキニン類の作用を増強させて、気管平滑筋の収縮活性を増強させたのではなく、ET-1の分解を抑制し、その作用を増強させたことを示唆するものである。

小動物用体プレチスモグラフを用いた吸入実験は、覚醒下で行われ、図 1-9に示すように、ホスホラミドン前吸入群のみが、sGawの50%以下の低下を示した。一方、図 1-10に示すように、気道過敏性の検出に標準的に用いられているメサコリン (Takishima, 1981; Hargreave, 1986) に対する



気道の反応、および回復の過程は、ホスホラミドン吸入の前後で差を認めなかった。このことから、ホスホラミドンが非特異的に気道の感受性、反応性をかえた可能性は低いと考えられ、特異的にET-1の作用を増強したと考えられる。

図1-11に示すように、NK Aの吸入実験においても、ホスホラミドン前吸入群のみが、sGawの有意な低下を認めた。ホスホラミドンの吸入濃度は、ET-1の場合と同じく、 $10^{-4}$ M×5分間であったが、ET-1と同等の気道収縮を発現させるためには、モル濃度でET-1の約10倍量のNK Aを必要としたことがわかる。NK Aは、肺内における含量はSPと比較して少ないが、モルモット気管平滑筋切片標本に対し、SPよりも低濃度で強力な収縮反応を生じることが報告されているが(Uchida, 1987)、今回の結果とあわせて考えると、エンケファリナーゼ活性が低下した場合には、ETはNK Aより低濃度で気道収縮を惹起し得る物質であることが推察された。

エンケファリナーゼは、哺乳類の組織に広く分布する酵素で、中枢神経系、腎、肺、腸管、好中球、線維芽球、血管内皮細胞中にも存在するが、血管内皮細胞中の濃度は非常に低いといわれている(Erdos, 1989)。エンケファリナーゼは、ブタ腎から精製されたが(Kerr, 1974a;1974b;Mumford, 1981)、肺における含量は、腎に次いで多く(Scicli, 1989)、エンケファリン、タキキニンをはじめ、多くのペプチドの分解や代謝に係わっており、肺内においても重要な役割を担っているものと考えられる。

エンケファリナーゼはこれまでタキキニン類、特にSPとの関連の研究報告が多く、Stimler-Gerardらは、肺実質でのSPの収縮活性が相対的に弱いのは、エンケファリナーゼによるその分解が早すぎるためであるとし、ホスホラミドンの存在下にその収縮作用が増強することを報告した(Stimler-Gerard, 1987)。これは、今回のNK Aの吸入実験の結果とも一致しており、*in vitro* ではSPよりも強力な収縮活性を呈するNK Aでも、通常の条件ではモルモットに気道収縮を起こし得なかった。これは、吸入させたNK Aが、気道系に存在するエンケファリナーゼによって、次々と分解されてしまうためと考えられる。更にStimler-Gerardらは、モルモット肺実質切片とのincubationによりSPが分解されると報告して

いるが、今回の結果では、ET-1の分解は 図 1-12 に示す通りで、Stimler-Gerardらの報告にあるSPの分解と比較してみても遜色なく、ET-1はSP同様、エンケファリナーゼの基質の1つであることが示唆される。

Fineらは、モルモット気管上皮を剥離した標本を用いて、気管上皮があるものと比較した場合、SPに対する反応性が著しく亢進することを見出した。これは、上皮由来の弛緩性物質が減少することより、エンケファリナーゼの消失に起因するところが大きいと、喘息発作時、気道上皮が障害を受ける際、気道上皮中のエンケファリナーゼも減少し、SP等の気道収縮物質の活性が上昇する可能性を示唆した (Fine, 1989)。更に、喫煙にて気道系のエンケファリナーゼ活性が抑制され、SPへの反応性が増強するとの報告もなされている (Dusser, 1989a)。このように、エンケファリナーゼが減少、抑制を受けるような場合にはSP同様、ET-1の活性も上昇し、気道収縮の惹起に関与していることが考えられる。

我々は、ETが非常に強力な気道収縮活性を持つこと (Uchida, 1988)、喘息患者のBALF中 (Nomura, 1989) および血中 (Watanabe, 1991) のET濃度が上昇していることを報告した。気道上皮細胞でETが産生され (MacCumber, 1989)、あるいは気道上皮細胞培養上清中にETが遊離される (Black, 1989) との報告も肺とETの関係が密接であることを示している。即ち、気道上皮細胞で産生されるETが、気道平滑筋のトーンスを維持し、その産生と分解のバランスが破綻し、ETの濃度が相対的に上昇した時に、病的気道平滑筋収縮を来たすものと推察される。

*In vitro* の実験系においては、ET-1がエンケファリナーゼにより分解されるとの報告がなされ、この分解はホスホラミドンにてほぼ完全に抑制されることが観察されている (Scicli, 1989; Vijayaraghavan, 1990; Sokolovsky, 1990; Cadenas, 1992)。今回の実験結果は、これらの報告と矛盾せず、生体においてもホスホラミドンで活性阻害されるエンケファリナーゼによって、ET-1が分解されることを示唆するものである。ETは既に *in vitro* では強力な気道収縮物質として確立されてきており、その分解の、少なくとも一部にエンケファリナーゼが関与している事が分かってきたが、今回の実験結果から、生体内においても、ET-1はエンケ

ファリナーゼによる調節を受けている可能性が示され、気道上皮細胞が傷害を受けて、エンケファリナーゼ活性が低下しているような場合には *in vitro* 同様、ET-1による気道収縮活性が顕性化し、病的気道収縮を増強させる可能性があるものと考えられた。このことは、ET-1がNK AやSPと比較して強力な気管平滑筋収縮作用を有することを考えると非常に興味深く、喘息の大発作時などでは、ET-1の作用が関与している可能性も考えられる。

気管支喘息とETとの関連は、今後、更に検討を要する課題と思われる。最近、ETの拮抗剤も開発され、その拮抗剤を用いた研究も各分野で進められており (Nakamichi, 1992; Ohlstein, 1992)、喘息を含めた呼吸器疾患とETとの関連が更に明確にされてくるものと思われる。

## 5. まとめ

ET-1の生体における分解に対するエンケファリナーゼの関与について、エンケファリナーゼ阻害剤であるホスホラミドンを用いて検討した。

1. モルモット摘出気管切片のET-1に対する収縮反応は、ホスホラミドン添加群において有意に増強した。
2. 小動物用体プレチスモグラフを用いたET-1の吸入実験では、ホスホラミドン前吸入群のみsGawの有意な低下を示した。
3. モルモット肺実質切片とのincubationでET-1は分解されたが、ホスホラミドンはこの反応を抑制した。

以上よりエンケファリナーゼは、モルモット気道においてET-1の分解に関与している可能性が示唆された。喘息発作時などの気道上皮が障害を受ける場合には、気道のエンケファリナーゼが減少して、ET-1による気道収縮作用が発現されてくる可能性もあることが推察された。

## 第 2 節

ホスホラミドン吸入による気道組織のエンケファリナーゼ活性の検討

## 1. はじめに

前節において、単独吸入では気道収縮を惹起し得ない程度のET-1、NK A濃度でも、予め、エンケファリナーゼ阻害剤であるホスホラミドンを吸入させることで気道収縮作用が発現されることを報告した。

エンケファリナーゼ活性が低下するという病態は、日常、呼吸器系の疾患を悪化させる要因である喫煙 (Dusser, 1989a) や感染 (Dusser, 1989b; Boron, 1989) などによって引き起こされることが報告されている。このような状況下においては、タキニン類の活性が上昇して、気道収縮を誘発することが報告されているが、同様に、ET-1の気道収縮作用が顕性化してくる可能性もある。このことは、前節で示したように、エンケファリナーゼ活性の低下状態が同程度の場合でも、モル濃度で比較するとET-1の方が、NK Aよりも強力な気道収縮活性を有していることを考えあわせると、非常に興味深い。すなわち、気管支喘息などの病的気道収縮をETが誘発している可能性も考えられる。

本節では、前節の吸入実験において、 $10^{-4}$ M×5分間吸入させたホスホラミドンが、実際どの程度、気道組織のエンケファリナーゼ活性を減弱させているかについて検討を行なった。

## 2. 方法

### a) 対象

Hartley系モルモット 日本SLCより購入した。

### b) 試薬

ペントバルビタールナトリウムはダイナボット社、  
ホスホラミドン、7-amino-4-methylcoumarin(AMeCou)はペプチド研究所、  
2-[[tris(hydroxymethyl)methyl]amino]-ethanesulfonate (Tes)  
および octyl  $\beta$ -D-glucopyranoside (Oc  $\beta$ Glcp) は和光純薬、  
Suc-Ala-Ala-Phe-AMeCouは BACHEM 社より購入した。

### c) 実験方法

#### 2-1

##### 検体の採取

体重約400gの Hartley系雌性のモルモットを対照群、ホスホラミドン吸入群とも6匹ずつ使用した。

小動物用体プレチスモグラフ (図 1-3) を用いて生食に溶解したホスホラミドン $10^{-4}$ Mを5分間、あるいは対照群として生食のみを5分間吸入させ、その直後にモルモットをペントバルビタール 50mg/kgを腹腔内投与して麻酔し、気管、および肺を一塊として摘出し、気管分岐部で分けて各々、気管および肺分画とした。

## 2-2

### エンケファリナーゼ活性の測定

エンケファリナーゼ活性は Zimmermanらの方法 (Zimmerman, 1976;1978; Mumford;1981) に従い基質に、Suc-Ala-Ala-Phe-AMeCou (7-amino-4-methyl coumarin)を用いて測定した。この基質のAMeCou部がエンケファリナーゼの作用で切断遊離されることを利用した測定方法であり、基質に検体を反応させて、1分間に産生される AMeCou の量をもって、その検体のエンケファリナーゼ活性とした (図 1-13)。

採取した気管、肺分画をホモジネートし、50mM octyl  $\beta$ -D-glucopyranoside(Oc  $\beta$ Glc) を含む50mM 2-[[tris(hydroxymethyl)methyl]amino]-ethanesulfonate (Tes) buffer (pH 7.5) 中に浮遊させ、4 $^{\circ}$  C 100,000  $\times$ g 60分間遠心した。遠心後、得られた上清を上記基質を含む溶液 {Suc-Ala-Ala-Phe-AMeCou 0.2mM, 50mM Tes buffer, 5% dimethylsulfoxide, leucine aminopeptidase(5ug/ml), zinc acetate(50uM), calcium chloride (10mM)} と25 $^{\circ}$  C で30分間反応させ、産生されるAMeCou量を分光蛍光光度計 (F 2000形、日立) にて、励起波長 383nm、蛍光波長455nm の条件下で測定した。

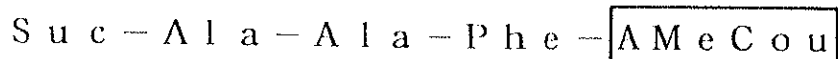
エンケファリナーゼ活性は、含有蛋白量 (バイオラッド法にて測定) にて補正し、1分間に産生されるAMeCou量にて表現し比較した。

更に、気管の遠心後に得られた検体を30分間、基質と反応させて生じるAMeCou量を 100%としてエンケファリナーゼ活性を表し、これに、予め *in vitro* でホスホラミドンを $10^{-10}$  M $\sim$  $10^{-5}$  M添加した場合の抑制効果を観察した。

実験データは、mean $\pm$ S. E. で表し、統計学的検定には unpaired t-test を用いて  $p < 0.05$  をもって有意差ありとした。



## 基質



1. エンケファリナーゼ活性は、

S u c - A l a - A l a - P h e - A M e C o u	(0.2 mM)
ロイシンアミノペプチダーゼ	(5 $\mu$ g/ml)
酢酸亜鉛	(50 $\mu$ M)
塩化カルシウム	(10mM)

を含む 1 ml の Tes buffer (pH 7.5) 中にて測定した。

2. 基質を含む上記溶液に検体を反応させ、産生される A M e C o u の量を分光蛍光光度計にて測定し、エンケファリナーゼ活性とした。測定は、励起波長 383nm、蛍光波長 455nm の条件下で行った。

3. エンケファリナーゼ活性は、1 分間に産生される A M e C o u を含有蛋白にて補正して表現した。

## 図 1-13 エンケファリナーゼ活性の測定方法

### 3. 結果

図 1-14 に、エンケファリナーゼ活性の測定に使用した基質 (Suc-Ala-Ala-Phe-AMeCou) と、その分解産物である AMeCou を、383nm の励起波長でスキャンした際の蛍光波長のスペクトラムを示す。両者の波長のピークにずれが生じることを確認し、455nm の蛍光波長を選択しモニターした。表 1-1 に各検体 (n=6) のエンケファリナーゼ活性を示す。ホスホラミドン吸入群は対照群に比して肺分画で約 54.9% (p<0.05)、気管分画で約 68.1% (p<0.001) と有意な抑制を受けた。

また、気管の超遠心で得られた検体のエンケファリナーゼ活性を 100% とすると、ホスホラミドンを *in vitro* で  $10^{-8}$ M 添加した場合、その活性は 90% 以上抑制され、 $10^{-6}$ M では、95% 以上の抑制を認め、測定したエンケファリナーゼ活性はホスホラミドン感受性があることを確認した

(図 1-15)。ホスホラミドンは、*in vitro* において、 $10^{-10}$  ~  $10^{-8}$ M においても効果を示すことが示唆され、また、エンケファリナーゼ活性の抑制は *in vitro* ではホスホラミドン  $10^{-6}$ M でほぼ最大に達することが推察された。

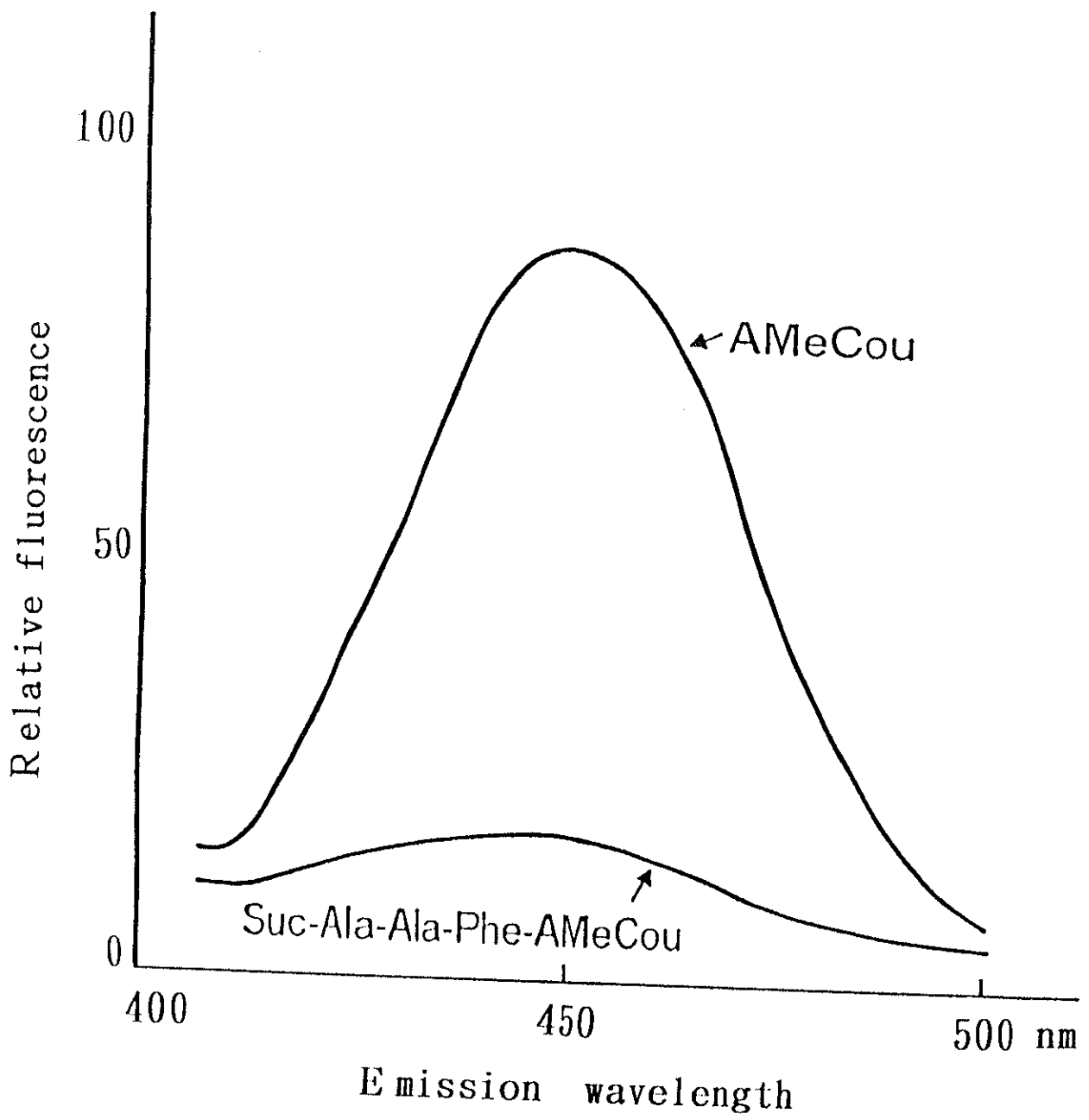


図 1-14

AMeCouと Suc-Ala-Ala-Phe-AMeCou の蛍光波長の  
スペクトラム (励起波長383nm の条件下)

表 1-1

	Trachea	Lung
phosphoramidon (-)	26.3 ± 0.6	7.1 ± 0.5
phosphoramidon (+)	17.9 ± 0.7 <sup>**</sup>	3.9 ± 0.9 <sup>*</sup>

ホスホラミドンの有無による気道組織中の  
エンケファリナーゼ活性の比較

単位は n mol AMeCou/min/mg protein

meas ± S. E. (両群とも n=6) \*p<0.05 \*\*p<0.001 を示す。

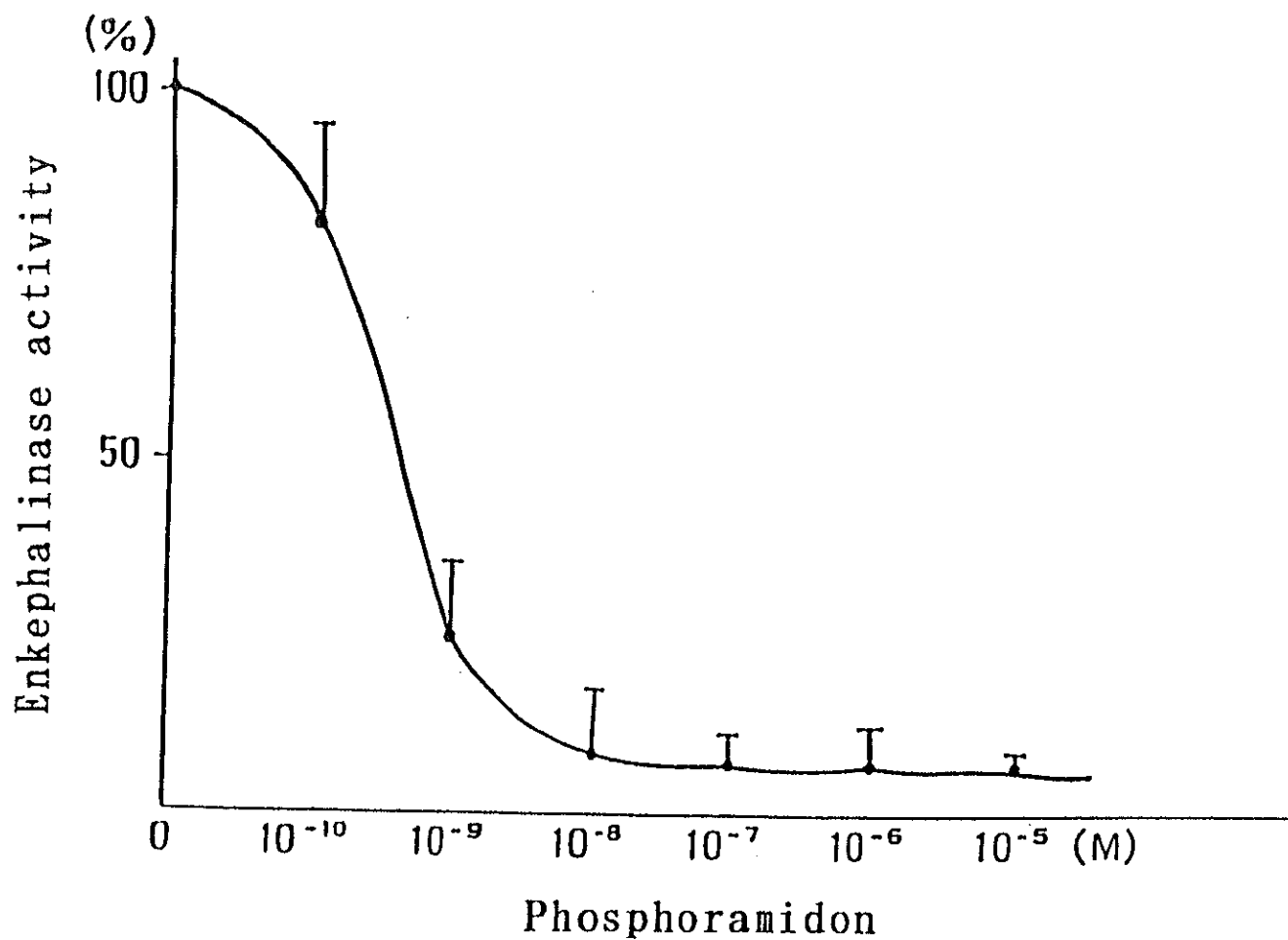


図 1-15

モルモット気管のエンケファリナーゼ活性に対する  
ホスホラミドンの影響 (*in vitro* での検討)

縦軸のエンケファリナーゼ活性は、ホスホラミドン非添加群を 100%として表示する。

ホスホラミドンの濃度依存性にエンケファリナーゼ活性は抑制された。

mean  $\pm$  S. E. (n=3)

#### 4. 考察

今回の結果から、ホスホラミドン $10^{-4}$ Mを5分間吸入させた直後には、気道系の組織において、エンケファリナーゼ活性が対照群の約55-70%程度に低下することが明らかになった。前節の結果を踏まえると、このような条件下でET-1、あるいはNKAが、気道収縮作用を発現したと考えられる。

ホスホラミドン $10^{-4}$ M×5分間吸入群のエンケファリナーゼ活性は、対照群の約55-70%程度に低下していたが、この値は、従来の報告と比較してみると、感染で作成した、エンケファリナーゼ活性が低下したモデルの値に相当するものである(Dusser, 1989b; Borson, 1989)。今回の結果から、通常の状態では気道収縮作用が発現されないような濃度のET-1、あるいはNKAでも、気道感染や喫煙、そして気管支喘息による気道上皮細胞の剥離など、エンケファリナーゼ活性が低下するような要因が働けば、その作用が発現される可能性が示唆された。臨床的に、気管支喘息患者が感染を引き金に発作を生じることは、しばしば認められが、その要因の1つに、エンケファリナーゼ活性の低下が関与している可能性がある。そして、ひとたび発作を生じると、気道上皮細胞の障害によって、更にエンケファリナーゼが減少し、病態を悪化させるという可能性が考えられる。

図 1-15 に示すように、ホスホラミドンを $10^{-4}$ M×5分間吸入させることにより、*in vitro* に換算して、 $10^{-10}$  M~ $10^{-9}$ M相当のホスホラミドンが作用していた可能性が考えられる。これは、*in vitro* において、十分にタキキニン類の反応を増強させる濃度である。

最近、モルモットを卵白アルブミン(OA)で感作後、その気管を摘出し、OAチャレンジして薬理的張力測定を行った場合、ホスホラミドンを投与することで収縮反応が長く継続することから、免疫反応で気管収縮が惹起される場合に、タキキニン様の物質が放出され、この際、エンケファリナーゼが重要な役割を担っている可能性が報告され(Kohrogi, 1991)、感染や喫煙のみならず、アレルギー性気道反応にもエンケファリナーゼが関与している可能性が示唆されている。また、種々の呼吸器疾患に有効な副腎皮

質ホルモン薬が、エンケファリナーゼ活性を上昇させることが報告されており(Borson, 1991)、呼吸器疾患に対して、副腎皮質ホルモン薬が有効な少なくともその一因は、エンケファリナーゼ活性を上昇、維持させ、タキキニン等のペプチドに対する気道の過剰な反応を抑制している点にあると考えられる。エンケファリナーゼ活性の抑制でS P、カプサイシンの刺激に対して咳嗽が惹起されやすくなり(Kohrogi, 1988)、逆に、合成エンケファリナーゼの吸入により、これらが抑制されるとの報告(Kohrogi, 1989)も、エンケファリナーゼと呼吸器疾患との係わりを強く示すものと考えられ、今後、合成エンケファリナーゼの臨床応用も期待される。

エンケファリナーゼ活性が低下した状態は、*in vivo* において、タキキニン、ETをはじめとした種々のペプチドに対して、過剰な反応を示す準備段階と考えられ、気管支喘息や気道過敏性などの病態との関連も示唆され、興味深いと考えられる。

## 5. まとめ

エンケファリナーゼ阻害剤であるホスホラミドンを吸入させた際の、気道のエンケファリナーゼ活性を、肺、および気管のホモジネートにて測定した。

1. 前節で、ET-1の収縮を惹起し得た、ホスホラミドン $10^{-4}$ M×5分間の吸入にて、気道系のエンケファリナーゼ活性は、対照群の55-70%にまで低下した。この値は、従来の報告から、気道感染症などで認められる、エンケファリナーゼ活性が低下した状態と同等のレベルであり、このような条件にて、ET-1やNK Aなどの気道収縮物質の活性が上昇する可能性が推察された。
2. エンケファリナーゼ活性の低下した状態は、ET-1、タキキニン類をはじめとした、多くのペプチドに対して気道反応性が亢進を示す、気道過敏性の準備状態であると考えられた。