

ペニシラミン及びエポキシコハク酸の関連
化合物の免疫薬理学的特異性に関する研究

竹下 紀美代

目 次

序 論	1
第 I 章 D-ベニシラミンの抗リウマチ作用の免疫薬理学的検討	4
第 1 節 D-ベニシラミンの自然発症自己免疫疾患 MRL/l 系マウスに対する作用 (免疫抑制作用)	5
1. 実験材料及び実験方法	7
2. 実験結果	
(2-1) D-ベニシラミンとサイクロフォスファミドの延命効果	9
(2-2) D-ベニシラミンとサイクロフォスファミドの免疫パラメーターに対する作用	9
(2-3) CCA, レバミゾール, サイクロフォスファミドの免疫パラメーターに対する作用	13
3. 考 察	15
4. 小 括	17
第 2 節 D-ベニシラミンのラットタイプ II コラーゲン関節炎に対する作用 (免疫調節作用)	18
1. 実験材料及び実験方法	19
2. 実験結果	
(2-1) Lewis (LEW) 系ラットタイプ II コラーゲン関節炎 (CA) 予防試験における薬物効果	22
(2-2) LEW 系ラット CA 治療試験における薬物効果	22
(2-3) SD 系ラット CA 予防試験における薬物効果	22

(2-4) SD系ラットCA治療試験における薬物効果	26
(2-5) CA発症ラットにおける抗タイプIIコラーゲン凝集 抗体(HA)価に対する薬物作用	26
(2-6) CA発症ラットにおけるタイプIIコラーゲンに対する 遅延型アレルギー反応(DTH)での薬物作用	26
(2-7) 腹腔多形核白血球数及びLeukotriene B ₄ (LTB ₄) 産生に対する薬物作用	29
(2-8) CA発症ラット及び正常ラットにおけるConcanavalin A(ConA)誘導リンパ球幼若化反応(LTR)に 対するD-ペニシラミン, レバミゾール, オーロチオ マレイト及びインドメサシンの作用	32
3. 考察	35
4. 小括	39

第II章 D-ペニシラミンの化学修飾による免疫薬理学的特異性の 発現	40
---------------------------------------	----

第1節 カルボキシル基から α 位または β 位にSAc基を有するベン ゾイルメルカプトプロピオン酸誘導体の免疫薬理学的作用 (免疫調節作用)	40
--	----

1. 実験材料及び実験方法	41
---------------	----

2. 実験結果

(2-1) SD系ラットアジュバント関節炎(AA)予防試験に おける薬物効果	45
---	----

(2-2) LEW系ラットAA予防試験における薬物効果	47
-----------------------------	----

(2-3) ラットタイプIIコラーゲン関節炎 (CA) 治療試験に おける薬物効果 -----	47
(2-4) NZB/NZW F ₁ 系 (BWF ₁)マウスにおける 延命効果 -----	49
(2-5) MRL/l系マウスにおける延命効果 -----	49
(2-6) プラーク形成細胞 (PFC) における薬物作用 -----	49
(2-7) リンパ球幼若化反応 (LTR) における薬物作用 -----	52
(2-8) カラゲニン後肢浮腫 (CE) における薬物作用 -----	52
(2-9) 遅延型アレルギー反応 (DTH) における薬物作用 -----	55
(2-10) IgE抗体産生における薬物作用 -----	55
(2-11) 老齢MRL/l系マウス腹腔マクロファージからのラ イソゾーム酵素遊離に対する作用 -----	55
3. 考 察 -----	55
4. 小 括 -----	61

第2節 カルボキシル基からγ位にSAc基を有するベンゾイルメル
カプトプロピオン酸誘導体の免疫薬理学的作用 (免疫抑制作
用) -----

1. 実験材料及び実験方法 -----	62
2. 実験結果	
(2-1) SD系ラットAA予防試験における薬物効果 -----	64
(2-2) LEW系ラットAA予防試験における薬物効果 -----	65
(2-3) DTHにおける薬物作用 -----	65
(2-4) IgE抗体産生における薬物作用 -----	65
(2-5) BWF ₁ マウスの延命効果に対する薬物効果 -----	70
(2-6) LTRにおける薬物作用 -----	70

(2-7) In vitroでの制癌作用	70
3. 考察	75
4. 小括	76
第Ⅲ章 E p-459の化学修飾による免疫薬理学的作用の多様化	77
第1節 E p-459のI型アレルギー抑制作用の各種実験系による検討	77
1. 実験材料及び実験方法	77
2. 実験結果	
(2-1) 卵白アルブミン(OA)-E p-459感作細胞のIgE抗体産生抑制作用	82
(2-2) OA-E p-459感作細胞のヘルパーT細胞活性とジニトロフェニル(DNP)-E p-459感作細胞のB細胞活性	82
(2-3) E p-459処理細胞のIgE抗体産生抑制作用の欠如	84
(2-4) OA感作マウスにおける末梢血白血球数	84
(2-5) E p-459の高濃度OA感作マウスにおけるIgE抗体産生抑制作用の欠如	87
(2-6) モルモットのOA誘導喘息モデルでのE p-459の抑制作用	89
3. 考察	89
4. 小括	94
第2節 E p-459関連化合物の免疫薬理学的作用	95
1. 実験材料及び実験方法	95

2. 実験結果

(2-1) SD系ラットアジュバント関節炎(AA)における

薬物効果とシステインプロテアーゼ阻害作用 ----- 99

(2-2) Ep-459関連化合物のIgE抗体産生における

抑制作用 ----- 101

(2-3) リンパ球幼若化反応(LTR)における薬物作用 ----- 104

3. 考察 ----- 104

4. 小括 ----- 108

総括 ----- 109

謝辞 ----- 112

掲載雑誌目録 ----- 113

参考文献 ----- 115

略語一覽

AA	adjuvant arthritis
alum	aluminum hydroxide gel
ATM	aurothiomalate
BGG	bovine gammaglobulin
BSA	bovine serum albumin
BWF ₁	NZB/NZW F ₁
CA	type II collagen-induced arthritis
CCA	N-(2-carboxy-phenyl)-4-chloroanthranilic acid disodium
CE	carrageenin-induced hind-paw edema
ConA	concanavalin A
CY	cyclophosphamide
DNP	dinitrophenyl
DTH	delayed type hypersensitivity
Ep	epoxy succinic acid
Ep-459	3-[3-methyl-1-(4-aminobutylcarbamoyl)butyl-carbamoyl]-2-oxiranecarboxylic acid
FCS	fetal calf serum
FICA	Freund's incomplete adjuvant
HA	haemagglutinating antibody
HBSS	Hank's balanced salt solution
HC	hydrocortisone
IL	Interleukin
IM	indomethacin
KLH	keyhole limpet haemocyanin

LEW	Lewis
LMS	levamisole
LPS	lipopolysaccharide
LTB ₄	leukotriene B ₄
LTR	lymphocyte transformation reaction
MEM	Eagle's minimum essential medium
MMC	mitomycin C
6-MP	6-mercaptopurine
MST	median survival time
OA	ovalbumin
PA	D-penicillamine
PCA	passive cutaneous anaphylaxis
PFC	plaque forming cell
PN	prednisolone
PBS	phosphate buffer saline
RA	rheumatoid arthritis
SAARD	slow acting antirheumatic drugs
SD	Sprague dawley
SRBC	sheep red blood cell
TSP	transferable solid phase

序 論

免疫異常による疾患の代表的なものに慢性関節リウマチ (RA) が知られている。RAにおいて液性免疫では血清リウマチ因子陽性(1), 免疫複合体増加(1), ポリクロナールB細胞活性化(2), 補体低下(3)等の異常があり、細胞性免疫ではヘルパーT細胞の増加(4), Interleukin-2 (IL-2)産生低下(2), サプレッサーT細胞機能低下(2), マクロファージ機能の異常(5)等が知られている。RAの発症機序としては、何らかの外来要因あるいは遺伝的要因により免疫系の乱れが生じ、自己成分に対しても免疫反応を起こすようになり、その結果、自己成分に対して特異性をもった抗体あるいはリンパ系細胞により組織病変が引き起こされるものと考えられている(1)。

RAの免疫異常を是正し、根本的な治療を行う目的で使用される抗リウマチ剤は Slow acting antirheumatic drugs (S A A R D) と呼ばれている(6)。具体的にはSH化合物であるD-ペニシラミン (PA) (7-12), チオプロニン(13-15), プシラミン(16-19), カプトプリル(20,21)等, 活性代謝物がSH化合物であるレバミゾール(22,23)等及びSH反応性化合物であるオーロチオマレイト, オーロチオグルコース(24-26), オーラノフィン(27,28)及びある種のエポキシコハク酸誘導体(29)等に臨床的あるいは動物実験で抗リウマチ作用が知られている。このS A A R Dはマクロファージ, リンパ球等の免疫担当細胞に存在する、あるいはこれから分泌される酵素, 蛋白質, レセプター, サイトカイン等免疫機能の発現と調節を担う様々の機能蛋白質のS S架橋, SH基へ結合・反応することによりその免疫薬理学的効果を発揮すると考えられている。即ち、PAはRA患者血清中にみられる変性した γ -グロブリンのS S架橋に結合し、変性を防ぎ抗原性の発現を抑えることにより、リウマチ因子の減少をもたらす、RAの改善に一部関与することが知られている(30)。又、PAはヒトT細胞膜に直接に影響を与えるが、このことはPAがマクロファージ, T細胞, B細胞間の相互作用に重要な働きをするレセプターに影

響を及ぼしていることが示唆されている(31,32)。Lipskyらは mitogen刺激によるヒト末梢血リンパ球幼若化反応(33)及び抗体産生細胞数の測定(34)において、銅存在下でPAが濃度依存的に抑制作用を示すことを報告している。他のSH化合物もPAと同様に抑制作用を示すことから、SH基がリンパ球表面抗原と結合して免疫抑制効果を示すのではないかと考察している。

SAARDにはその生物学的活性・特徴に著しい構造特異性が存在する。例えばPAには抗リウマチ作用があるが、PAと同様にSH基を有するシステイン、N-アセチルシステイン、2-メルカプトエチルアミンには抗リウマチ作用は認められていない(35)。また、臨床的に抗リウマチ効果が報告されているカプトプリルは本来、そのSH基によってアンジオテンシン変換酵素に結合し、アンジオテンシンIIの生成を抑制する降圧剤である(36-38)。しかし、この場合も、メルカプトアシル基の脱メチルあるいはSH基からカルボキシル基への変換によって容易に活性が低下してしまうことが知られている(36)。また、エポキシコハク酸誘導体の1つであるEp-459(エポキシサクシニルロイシルアミノブタン)はシステインプロテアーゼに対して特異性の高い強力な阻害剤であるが(39,40)、構造が単純なエポキシコハク酸のモノエステル、ジエステル、アミド等ではこの酵素に対する阻害作用は低い(41)。このように構造をより単純にすることはSH基あるいはエポキシ基等の活性基周辺の立体障害性を低下させ、その反応性を亢めることになる。その結果、同種分子間で disulfide結合するか、他のSH化合物、H₂O等普遍的に存在する物質と容易に反応することになり、目的とする特殊な蛋白質や酵素との結合が減る。さらに薬物と標的蛋白質や酵素の活性中心との立体構造的・電気的相補性に変化が生じて特異的な反応性が減弱するものと思われる。さらにPAとEp-459を較べてみると、PAはEp-459よりも比較的単純な構造をしている。これはEp-459の活性がシステインプロテアーゼ阻害作用に極めて強く限定されるのに対し、PAは免疫薬理学的効果の他にビタミンB₆欠乏(42-44)、コラーゲン繊維の成熟抑制(45-46)、味覚の喪失(47)、アレルギーの誘導(48)など種々の蛋白質SH

基，アルデヒドとの結合に基づく副作用を発現し、蛋白質との結合特異性がやや低下していることと関連しているように見える。このことから、PAに種々の化学修飾を行えば、これらの副作用の分離はもとより、その免疫薬理学的作用もより選択的に強力になる可能性が考えられる。一方、非常に複雑な構造をしているEp-459では薬物と標的蛋白質の活性中心近傍との相補性により、強い結合性と特異的な免疫薬理学的作用、即ち、IgE抗体産生抑制作用を示すものと思われる。従って、Ep-459については、構造をある程度単純化することにより多様な免疫薬理学的作用を発揮することが期待される。そこで、本研究では ① PAが複数の免疫薬理学的作用を有することを示し、続いて ② PAに種々の化学修飾を行ったPA関連化合物を合成し、それらの免疫薬理学的作用の相互分離と増強の可能性を検討した。また、③ 免疫薬理学的作用がIgE抗体産生抑制作用に限定されているEp-459については、種々の単純な関連化合物を合成し、その免疫薬理学的作用の多様性の発現を検討した。

第1章 D-ペニシラミンの抗リウマチ作用の免疫薬理学的検討

D-ペニシラミンの抗リウマチ作用の免疫薬理学的検討を行うために、対照薬物として免疫抑制剤であるサイクロフォスファミド (CY), 免疫調節剤であるレバミゾール (LMS) 及び N-(2-carboxyphenyl)4-chloroanthranilic acid disodium salt (CCA) を用いた。免疫調節剤は生体の免疫機能低下状態を増強し、免疫機能亢進状態を抑制し、しかも免疫機能正常状態には影響がない薬剤と定義されている。それらの薬剤はいずれも生体の免疫異常を是正し、その作用機序はマクロファージ, T細胞, B細胞, キラー細胞等の免疫担当細胞を介するものと考えられている。

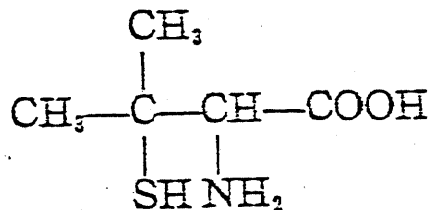
CYはアルキル化剤の1つで、肝のミクロソームによって代謝され生物学的活性を示す。代謝物はDNAグアニンのNH₂基と結合(アルキル化)し、直接DNA合成や複製を阻害する。分裂期, 静止期の両細胞に働くが、分裂期の細胞に対する作用の方が強い。従って、抗原刺激後のリンパ球が増殖する時期にCYを投与するともっとも強い抑制効果が認められる。CYの効果はT細胞よりもB細胞により強くあらわれるが、これはB細胞の方がRNAの含量が多く、蛋白合成が盛んなため、CYの作用を強く受けやすいこと及び障害をうけた際に機能の回復が遅いためと説明されている(49)。CYは強力な免疫抑制剤であり免疫調節剤であるという報告は皆無である。

LMSは駆虫薬として使用されていたが、ブルセラに対する抗体産生に増強的に働くことが実験的にマウスで認められた(50)。これが免疫増強作用を有することの研究の発端となった。その後、羊赤血球(SRBC)に対して低い免疫応答を示したC57BL/6系マウス, DBA/2系マウスに対してLMSは増強的に、逆にSRBCに対して高い免疫応答を示したBalb/c系マウス, C3H/He系マウスに対してLMSは抑制的に作用する(51)ことから、免疫調節作用を有することが認められた。作用機序として、T細胞の成熟促進作用, 機能低下しているT細胞

を正常化する作用，好中球・マクロファージの貪食能増強作用等を有している(49)。

CCAはヌードマウス，老齡マウス，免疫抑制剤投与したマウスにおいて低下している免疫能を回復させ、コルヒチン処理したマウスやNZB/NZWF₁系(BWF₁)マウスの様に免疫機能が亢進状態にある場合には抑制作用を示すことから、免疫調節剤であることが認められている(52,53)。作用機序として機能低下しているサプレッサーT細胞を正常化する作用がある(54)，LMS及びCCAの免疫抑制作用についての報告はない。

以上のことから、CYは免疫抑制作用のみ、LMS及びCCAは免疫調節作用のみを有する化合物であることが文献的に判明した。これらの対照薬とPAの免疫薬理学的作用を比較検討し、PAの抗リウマチ作用の解明を行った。



The structural formula of PA

第1節 D-ペニシラミンの自然発症自己免疫疾患MRL/1系マウスに対する作用(免疫抑制作用)

MRL/1系マウスは、自然発症自己免疫疾患マウスであり、高ガンマグロブリン血症，リウマチ因子，クリオグロブリン血症，免疫複合体，リンパ腫肥大，脾腫，関節炎，糸球体腎炎等を併発し、早期に死亡する(55,56)。自然発症自己

免疫疾患マウスとして、MRL/l系マウスのみがリウマチ因子を有しており、他のNZB系、BWF₁、SL/Ni系、PN系マウスにはリウマチ因子が存在しないことから、ヒトのRAにより近いと評価されている(57)。MRL/l系マウスでの関節炎は四肢小関節にみられ、病理組織学的には関節滑膜被覆細胞の増殖、線維芽細胞の増殖、フィブリンの析出、パンヌス形成、炎症性細胞浸潤等、ヒトのRAに類似している関節炎を発症する(58)。従って、1981年頃よりMRL/l系マウスは抗リウマチ剤の薬効評価に用いられはじめている(59-64)。

免疫抑制剤であるCYについては Shirakiら(62,63)はMRL/l系マウスで延命効果、蛋白尿の減少、リンパ腫の抑制、免疫複合体の減少、抗DNA抗体の減少を認めており、その作用機作はポリクローナルに活性化されたB細胞及び異常に亢進したヘルパーT細胞の抑制によることを報告している。Smithら(61)はMRL/l系マウスで延命効果を認め、腎炎・リンパ腫・脾腫・関節炎の発症を抑制し、その作用機作はヘルパーT細胞機能をもつLyt-1⁺T細胞を抑制し、細胞の組成を正常に回復していることによると報告している。

D-ペニシラミン(PA)のMRL/l系マウスに対する作用としてToivonenら(60)は、延命効果、蛋白尿、BUNに対しては効果はないが、脾腫・リンパ節重量・末梢白血球数の減少及びIgM型リウマチ因子の減少を認めている。Ackermanら(64)は、PAがリンパ腫を抑制せず、延命効果は示さず病理組織学的検索でも腎臓、関節炎について改善作用は認めていないが、抗DNA抗体やIgG型及びIgM型リウマチ因子を減少することを認めている。

CCAについては安倍(65)がMRL/l系マウスを1群7~10匹、8週令から20週令まで1週間に3回経口投与し、対照群と薬物投与群とを比較している。後肢のひきずり、耳介の出血巣、腹水貯留及びリンパ腫の発症を触知した臨床的症状観察及び腎臓と関節との病理組織学的解析とにより、CCAに抑制効果を認めている。しかしながら、陽性対照群を設けておらず、臨床所見と病理組織学的所

見という主観が入りやすい評価方法をとっていることから、CCAの抑制効果について疑問視されている。事実、後で述べるように今回の実験ではCCAに抑制効果を認めていない。

LMSについてはMRL/1系マウスでの検討は報告されていない。

以上のことから、免疫抑制剤CYについては明確な病態の改善効果があることが判る。免疫調節剤CCA及びLMSについては報告が少なく効果が明確ではない。従って、免疫調節剤のMRL/1系マウスに対する作用を明らかにする目的と、PAの免疫薬理学的作用の解明のため、本実験を行った。

1. 実験材料及び実験方法

(1-1) 実験動物

5週令、MRL/1系雄性マウス（Jackson 研究所）を1群7～10匹、床敷き飼育して用いた。飼育期間中、固型飼料（オリエンタル酵母社製MF）及び水は自由に摂取させた。

(1-2) 薬物

PA（大正製薬）、LMS（Sigma 社）、CY（塩野義製薬）、CCA（大正製薬）を用いた。PA、LMSは蒸留水でCYは生理食塩液で溶解し、CCAは5%アラビアゴム水溶液に懸濁した。PA（10,100mg/kg）、CCA（30mg/kg）、LMS（10mg/kg）は週3回経口投与した。CY（10mg/kg）は週1回腹腔内投与した。

(1-3) リウマチ因子の測定法

リウマチ因子はIgGのFcフラグメントに存在する抗原決定基に対する抗体である。IgGクラスのリウマチ因子の測定はIzuiとEisenbergの方法に準じて行った(66)。即ち、マウスFcフラグメント（Jackson 免疫研究所）1μg/ml溶液を室温で1時間、Transferable solid phase（TSP、

Nunc社) と incubation して吸着させた。TSP は Tween 20 含有リン酸生理食塩液 (PBS-Tween 20) で3回洗浄後、室温で1時間、1%牛血清 albumin 含有PBS (BSA-PBS) と incubation して安定化させた。安定化したTSPは室温で1時間、0.15M 2-mercaptoethanol 含1%BSA-PBS-Tween 20で希釈した20倍抗血清と incubation した。PBS-Tween 20で洗浄後、TSPは alkaline phosphatase 結合羊F(ab)² 抗体と室温で1時間 incubation した。TSPはPBS-Tween 20で5回洗浄後、p-nitrophenyl phosphate 含 0.01M diethanolamine buffer (pH 9.8) と incubation した。反応は 0.25N NaOHで停止させ、Immunoreader (NJ-2000, 日本インターメッド社) で吸光度 405nmを測定した。

(1-4) 病理組織学的検査

摘出した腎臓及び四肢関節は Lillie の10%緩衝 formalin 液で固定後、常法に従い、paraffin切片によるH.E.染色及び Erastica Masson trichrome 染色を行った。さらに腎臓については、沈着物、毛細血管等の観察のため Periodic acid-schiff (PAS) 染色も行った。各標本は顕微鏡下で組織学的観察を行った。観察にあたっては、腎臓については糸球体に注目し、1例につき20個の糸球体を対象とした。糸球体の分葉化、半月体の形成、ボーマン嚢との癒着及びフィブリノイド壊死等を発症頻度と 0~100 までの発症程度とで評価した。四肢関節は表層細胞の増殖、過形成等の関節滑膜変化及び関節軟骨・骨の変化を発症頻度と 0~24までの発症程度とで評価した。

(1-5) 統計処理

実験結果の統計学的有意性の検定はいずれも student's t-test により行った。生存日数中央値 (median survival time : MST) は制癌剤の標準法により算出した (49)。

2. 実験結果

(2-1) D-ペニシラミンとサイクロフォスファミドの延命効果

PAとCYをマウスの6週令から42.6週令 (day 298)まで、PAは週3回経口投与し、CYは週1回腹腔内投与して延命効果を調べた。その結果、対照群のMSTは197.3日、PAの100mg/kg投与群は298日、CYのMSTは>298日で、延命効果が認められた。PAの10mg/kg投与群は201日で効果が認められなかった。PAのマウス、ラットにおける最適の薬効量は100mg/kgであり、PAは最適の薬効量においてCYと同様にマウスの延命効果を示した (Fig.1. Table.1)。

(2-2) D-ペニシラミンとサイクロフォスファミドの免疫パラメーターに対する作用

PA及びCYを6週令から18.1週令 (day 127)まで投与し、延命効果を調べた。PAは週3回経口投与し、CYは週1回腹腔内投与した。さらに実験最終日には、生存しているマウスを殺し、脾臓を摘出し、重量測定を行い、腹腔全細胞数及び腹腔マクロファージ数を測定した。蛋白尿はAlbustix (Ames社)で測定し、蛋白尿が++(100mg/dl)以上を陽性と判断した。リウマチ因子はIzuiとEisenbergの方法(66)に準じて測定した。腎臓、前肢、後肢は10%中性ホルマリン液で固定し、病理組織学的検討を行った。PAは脾腫を抑制し、腹腔細胞数やリウマチ因子を有意に抑制した。CYは脾腫を抑制傾向、腹腔マクロファージ数やリウマチ因子を有意に抑制した。蛋白尿はいずれの群でも認められなかった。病理組織学的検査では対照群での腎・関節の変化はわずかであったので、薬物効果は認められなかった (Table 2)。

予備試験ではあるが、PAを21週間投与し、27週令に殺して病理組織学的検査を行った。対照群では腎臓の増殖性変化及び血管係蹄の肥厚の発症頻度はともに93%、発症程度は31.8及び18.6であった。糸球体の分葉化、フィブリノイド壊死、ボーマン嚢との癒着、半月体の形成の発症頻度は13~20

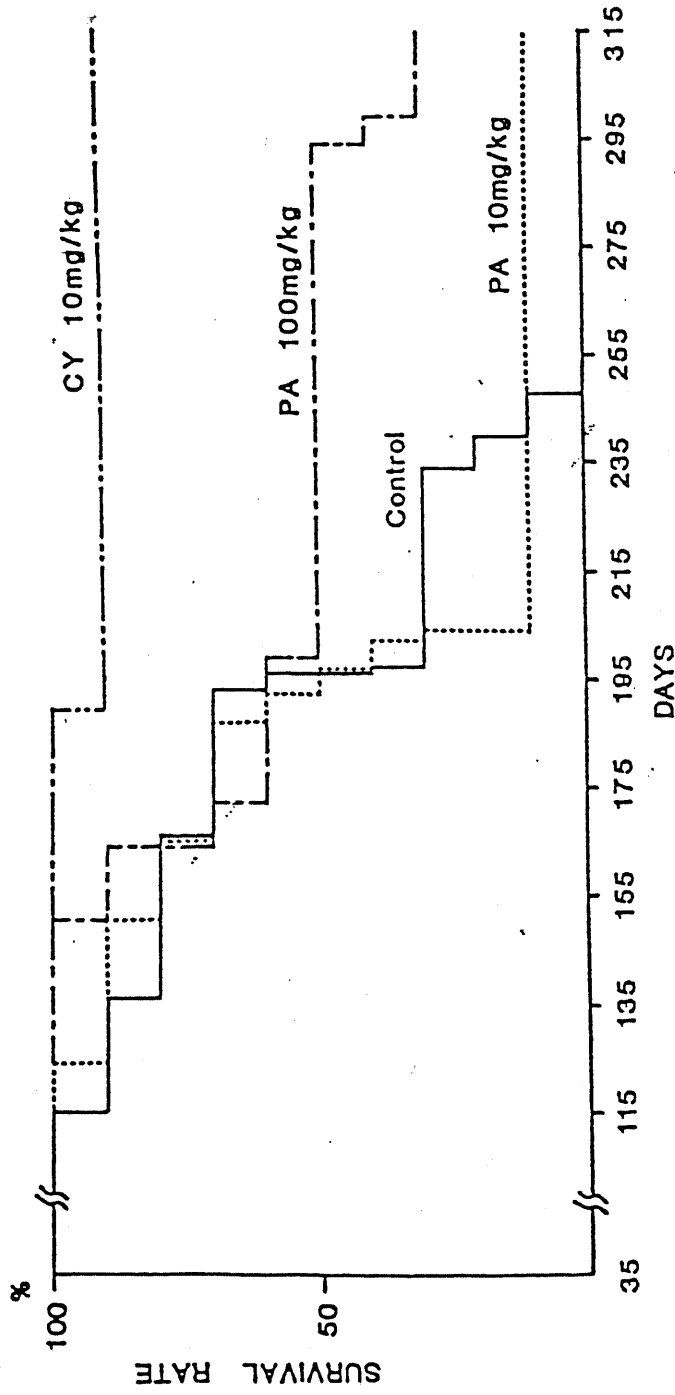


Fig. 1 Survival curves of MRL/l mice treated with 10 mg/kg of PA (-----), 100 mg/kg of PA (----), 10 mg/kg of CY (- - - -), and control mice (- - -).

Table 1 MST and % of Control in PA-treated, CY-treated and Control mice.

Group	Dose (mg/kg)	MST	% of Control
Control	-	197.3	100
PA	10	201.0	101.9
PA	100	298.0	151.0
CY	10	> 298.0	> 151.0

Table 2 Effects of PA and CY on various parameter in MRL/l mice on day 127.

Group	Dose mg/kg	B.W. g	Survival rate		Spleen mg	Spleen mg/10 g B.W.	Peritoneal cell count		Urinary protein	RF OD at 405 nm
			day 127	day 127			total cell (10 ⁶ /ml)	macrophage (10 ⁶ /ml)		
Control	-	47.0 ± 1.0	10/10	10/10	682 ± 157	146 ± 35	7.74 ± 1.32	1.81 ± 0.28	0/10	0.863 ± 0.03
PA	100	46.5 ± 0.4	10/10	10/10	357 ± 29*	77 ± 8	4.38 ± 0.42*	1.83 ± 0.70	0/10	0.752 ± 0.03*
CY	10	47.5 ± 0.7	7/7	7/7	337 ± 52	70 ± 10	6.34 ± 1.31	1.11 ± 0.16*	0/7	0.739 ± 0.01*

* Significantly different from the control at p > 0.05.

%, 発症程度は 2.6~8.8 であった。糸球体硬化の発症頻度は 6%, 発症程度は 5.6 であった。関節については滑膜での表層細胞の増殖の発症頻度は 89%, 発症程度は 0.7 であり、関節軟骨や骨の破壊はわずかであった。PA はこれらの病変変化に対して作用を示さなかった。

以上の結果より、PA は CY と同様に免疫パラメーターを改善する作用のあることが判った。同時に行った病理組織学的検索では、マウスの発症が軽度で薬物効果を判定できなかった。予試験で 27 週令まで投与したところ、対照群に病理学的に発症が観察されたが、PA の作用は認められないことが判った。

(2-3) CCA, レバミゾール, サイクロフォスファミドの免疫パラメーターに対する作用

CCA, LMS 及び CY を 6 週令から 27.6 週令 (day 193) まで投与し、死亡数を測定した。CCA, LMS は週 3 回経口投与し、CY は週 1 回腹腔内投与した。実験の最終日に生存しているマウスを殺し、脾臓, 腎臓, 胸腺, 腋窩リンパ節を摘出して重量を測定した、血中尿素窒素量 (BUN) は自動分析装置 (CL-12, 島津製作所) で測定した。リウマチ因子の測定と病理組織学的検査もあわせて行った。

その結果、対照群, CCA, LMS 及び CY 投与群の生存率は各々 80, 40, 30, 89% であった。MST は各々 >193, 177.3, 187, >193 日であった。CCA 及び LMS は延命効果を示さなかった。CY は脾腫, リンパ腫を抑制したが、他の薬物は効果がなかった。また、胸腺重量, 腎臓重量に対して効果のある薬物はなかった。CY は BUN, リウマチ因子を抑制する傾向があったが、CCA, LMS には効果はなかった (Table 3)。

病理組織学的検査では対照群の腎臓では、増殖性変化や血管係蹄の肥厚の発症頻度は各々 91, 89% であり、発症程度は 34.1, 18.3 であった。糸球体の分葉化, フィブリノイド壊死, ボーマン嚢との癒着, 半月体の形成の頻度

Table 3 Effects of CCA, LMS and CY on various parameters in MRL/l mice on day 193.

Group	Dose (mg/kg)	B.W. (g)	Survival rate day 193	MST (days)	Spleen		Axillary lymph node		BUN (mg/dl)	RF OD at 105 nm
					mg	mg/10 g B.W.	mg	mg/10 g B.W.		
Control	-	50.7 ± 2.3	8/10	> 193	1029 ± 361	203 ± 73	1137 ± 398	224 ± 79	54.8 ± 8.1	0.500 ± 0.029
CCA	30	51.1 ± 3.0	4/10	177.3	757 ± 227	148 ± 42	989 ± 467	192 ± 87	53.5 ± 5.6	0.534 ± 0.048
LMS	10	49.2 ± 3.0	3/10	187.0	823 ± 268	166 ± 42	877 ± 148	178 ± 18	68.6 ± 9.0	0.552 ± 0.059
CY	10	50.8 ± 5.3	8/9	> 193	511 ± 139**	102 ± 34**	663 ± 231*	129 ± 30**	36.4 ± 2.1	0.478 ± 0.020

*** Significantly different from the control at $p < 0.05$ and $p < 0.01$, respectively.

は19~42%、発症程度は 5.8~12.4であった。糸球体硬化の発症頻度は10%、発症程度は 8.4であった。これらの病変の発症頻度と発症程度はCYにより改善された。CCAやLMSは効果を示さなかった。関節においては、滑膜での表層細胞の増殖の発症頻度と発症程度は50%、0.7であった。関節軟骨や骨の破壊はほとんどのマウスに認められなかった。これらの変化はCYでは改善されたが、他の薬物では効果がなかった。以上のことから、免疫調節剤であるCCA及びLMSにはMRL/1系マウスに対して改善作用は認められなかった。CYは改善作用を示した。

3. 考 察

MRL/1系マウスは自然発症自己免疫疾患マウスで、発症する関節炎がヒトのRAに似ていることから、抗リウマチ剤の評価に用いられている(31,32)。MRL/1系マウスの自己免疫疾患は免疫抑制剤であるCY(61-63)で改善することが報告されているが、PA, CCA, LMS等については報告が少ない。従って、抗リウマチ剤の作用メカニズムを明らかにするために、これらの薬物のMRL/1系マウスに対する作用を検討した。その結果、① PAはMRL/1系マウスに対して延命効果を示した。② PAは脾腫、腹腔細胞数の増加、リウマチ因子の出現を抑制したが、病理組織学的検査では、腎臓や関節病変に対して効果は認められなかった。③ CCA, LMSはいずれの免疫パラメーターに対して効果がなかった。④ CYはすべての免疫パラメーターを改善し、延命効果を示した。②と④は Ackerman ら(64), Toivonenら(60), Smith ら(61), Shiraki ら(62,63)の報告と一致している。AckermanらはPAがリウマチ因子の出現を抑制すること、しかし病理組織学的には効果がなかったことを報告している。ToivonenらはPAによる脾腫及び白血球数の抑制作用を認めている。③に関してはCCAにMRL/1系マウスの延命作用があることが報告されているが、追試はできなかった。①については、この報告が初め

てである。

今回の実験では、PAは脾腫や腹腔細胞数の増加を抑制し、MRL/1系マウスに対して発症抑制作用を示した。MRL/1系マウスにおいてはマクロファージ、ヘルパーT細胞の機能の亢進(68)、サブレッサーT細胞の機能の低下(68)、IL-2産生能やIL-2反応能の減少(68)、IL-3やIL-4産生能の増加(69)、 γ -インターフェロンの減少(70)等が知られている。これらはMRL/1系マウスでの異常なポリクローナルB細胞活性化(71,72)や異常な自己抗体産生の現象(73)と結び付いていると思われる。PAはブランク形成細胞(PFC)の実験においてSRBCに対し高感受性であるC3H/He系マウスに長期間経口投与した場合、抑制作用を示している(74)。その抑制作用のメカニズム検討のため、脾臓細胞移入実験を行ったところ、正常マウス脾臓細胞の移入によりPAの抑制効果は解除されたが、PA処理マウス脾臓細胞を正常マウスに移入しても変化は認められなかった。従って、PAの抑制作用はサブレッサー細胞の発現を介したのではなく、ヘルパー細胞系(ヘルパーT細胞、マクロファージ)の機能抑制によるものであると考えられている。このことからMRL/1系マウスにおいても、PAはヘルパー細胞系の機能を抑制し、これがリウマチ因子の減少と結びついていることが示唆された。又、ヘルパー細胞系以外でもサブレッサーT細胞、B細胞等、他の細胞への抑制効果も考えられる。PAは長期投与及び高用量投与により、他の免疫抑制剤と同様に、これら細胞の機能を抑制し、B細胞からの異常な抗体産生を抑制し、MRL/1系マウスに対して抑制効果を示したのではないかと考えている。PAの免疫抑制作用については、以前にAltmanら(75)はマウスの抗体産生系においてヒト血清アルブミン感作の1日前より隔日に筋肉内投与すると抑制作用が認められたと報告している。Schumacherら(76)はNMR1系マウスにPA 5.5mg/匹を抗原感作前に連日もしくは隔日で腹腔内もしくは皮下投与すると抗体産生抑制作用が認められたことを報告している。今回の実験で、MRL/1系マウスに

において、免疫学的パラメーターの改善及び延命効果を示したため、他の研究者と同様にPAに免疫抑制作用のあることを認めた。しかし、第2節で示すように、PAに免疫抑制作用以外に免疫調節作用も同時に併有していることを認めしており、このことについては今までに報告はない。

以上の結果より、PAは自然発症自己免疫疾患MRL/l系マウスにおいて他の免疫調節剤と異なり、免疫学的パラメーターの改善及び延命効果を示した。この作用はPAの免疫抑制作用によることが示唆された。

4. 小 括

PAの抗リウマチ作用の免疫薬理学的解明のため、自然発症自己免疫疾患に対するPAの抑制効果をMRL/l系マウスで検討した。近年、MRL/l系マウスが血清学的及び病理学的にヒトのRAに類似する関節炎を発症することから、抗リウマチ剤の薬効評価に用いられはじめている。PAと免疫抑制剤はMRL/l系マウスで延命効果があり、脾腫の抑制、腹腔細胞数の減少、リウマチ因子の減少等の抑制作用を示した。LMS, CCAのような免疫調節剤には効果は認められなかった。PAはMRL/l系マウスで抑制作用を示し、免疫抑制作用を有することが判った。

第2節 D-ペニシラミンのラットタイプIIコラーゲン関節炎に対する作用（免疫調節作用）

第I章第1節のMRL/l系マウスに対する検討においてPAはCYと同様に免疫抑制作用のあることが判った。第1章第2節ではラットタイプIIコラーゲン関節炎（CA）に対する作用を検討し、PAの作用メカニズムの解明を行った。本モデルは1977年に Trenthamら(77,78)により確立された比較的新しいモデルで、Freund's incomplete adjuvant（FICA）とタイプIIコラーゲンとのemulsionを背部皮内に注射することにより関節炎を発症する。CAはRAと同様に進行性、増殖性の関節病変であり、パンヌス形成が認められ、滑膜にフィブリン、免疫グロブリン、補体等の沈着があること等、病理組織学的にRAに類似していること、さらにコラーゲン関節炎発症ラットに抗II型コラーゲン抗体が認められ、自己免疫の関与が明確である(79)ことから、抗リウマチ剤の薬効評価系として用いられている。病理組織学的検索では、関節において発症から24時間以内に滑膜の浮腫とそこへの単核球及び僅かな好中球の浸潤が認められる。この段階では血管壁の壊死あるいは軟骨の破壊はおこっていない。炎症がさらに進行すると、滑膜細胞及び線維芽細胞の増殖とそれに伴う滑膜の肥厚、線維化が認められる。これがパンヌスとなって軟骨さらに軟骨下の骨に侵入し、骨破壊を行っている像が観察される。

本モデルにおける抗リウマチ剤の効果は抗炎症剤であるインドメサシン(80-83)、フェニルブタゾン(80)、イソキシカム(80)、アスピリン(81)、フェノプロフェン(83)等では明確な足浮腫抑制作用を示す。免疫抑制剤であるCY(80,83,84)、ハイドロコチゾン(80,84)、デキサメサゾン(81,87)、プレドニソロン(83)では足浮腫抑制作用が認められる。免疫調節剤としてLMSは悪化(83,84)、抑制(83)、無作用(81,83)と作用が一定していない。金製剤であるオーラノフィン(80)は悪化(70)、オーロチオグルコースでは悪化(83)、無作用(80,83)、オーロチオマレイ

レイトでは無作用(86)と同様に一定していない。PAは悪化(81), 抑制(82), 無作用(80-83, 85, 87)と各研究者により及びその実験方法, 薬物投与スケジュールにより結果が様々である。CCAについては報告がない。従って、CAにおける各種薬剤の効果を明確にする目的とPAの免疫薬理学的作用を解明するため、CAラットにPA投与を行い、後肢浮腫量, 免疫学的パラメーター(タイプIIコラーゲンに対する抗体価, 皮膚反応), Leukotriene B₄ (LTB₄)産生量, 及び脾臓細胞のConA刺激幼若化反応(LTR)での³H-TdRの取り込み量に対する作用を調べ、免疫抑制剤及び免疫調節剤の作用と比較検討した。

1. 実験材料及び実験方法

(1-1) 実験動物

8~9週令, Lewis (LEW)系及びSprague Dawly (SD)系雌性ラットを1群8~10匹, 水洗ケージ飼育して用いた。飼育期間中、固型飼料及び水は自由に摂取させた。

(1-2) 薬物

PA, LMS及びCYは蒸留水に溶解した。インドメサシン(IM, シグマ社), プレドニゾロン(PN, シグマ社)は5%アラビアゴム水溶液に懸濁した。オーロチオマレイト(ATM, 塩野義製薬)は生理食塩水に溶解した。ATMは皮下投与し他の薬物は経口投与した。

(1-3) コラーゲン

タイプIIコラーゲン(0.3%牛タイプIIコラーゲン 0.05M酢酸溶液)はコラーゲン技術研究会から入手した。

(1-4) 免疫スケジュール

0.3%タイプIIコラーゲン溶液を0.1N酢酸溶液で0.2%に希釈し、等量

の F I C A を加えて15分間ホモジナイザー (Polytron, Kinematica社) で攪拌し emulsion を調製した。それぞれのラットに 0.5mgのコラーゲンを含む 0.5ml emulsionを皮内投与した。後肢浮腫量はプレスモグラフ (室町機械) を用いて測定した。

(1-5) 凝集抗体価

抗コラーゲン抗体価は、glutaraldehyde で固定しコラーゲンで感作した感作赤血球を用いた受身凝集反応で行った。赤血球の固定の仕方はAvrameasらの方法 (88) で行った。0.01Mリン酸生理食塩液で希釈した4%羊赤血球 (SRBC) 懸濁液へ同量のコラーゲン溶液(200 μ g/ml) を加えた後、2.5% glutaraldehyde を加え、溶液を室温で2時間 incubation した。感作赤血球は0.01Mリン酸生理食塩液で3回洗浄後、0.1M glycine緩衝液(pH 7.2) で希釈し、4 $^{\circ}$ C, 1晩静置した。感作赤血球は1%ラット正常血清含0.01Mリン酸生理食塩液に懸濁し、被検血清は56 $^{\circ}$ C, 30分非働化して用いた。

(1-6) 遅延型反応 (DTH)

タイプIIコラーゲンに対するDTHはコラーゲン感作後、5~6週目のラットの耳介で行った。50mgのタイプIIコラーゲンをラットの左耳に皮内投与し、右耳には対照として0.01Mリン酸生理食塩液のみを投与した。24時間後に耳の7mm片をパンチで打ち抜いて重量測定を行い、左耳と右耳との重量の差を浮腫量とした。

(1-7) LTB₄ 産生

腹腔多形核白血球は12% casein·Na (和光純薬) を腹腔内投与して16~18時間目に採取した。細胞は Hanks' balanced salt solution (H B S S, Gibco 社) で3回洗浄後、Eagle's minimum essential medium (MEM, Gibco 社) で懸濁した。細胞懸濁液(2.5ml) は37 $^{\circ}$ C, 5分加温後、最終濃度10 μ M になるように calcium ionophore A23187 (Calbiochem 社) 10 μ l を

添加してさらに5分間 incubation した。Incubation 後、試験管を氷冷下におき、反応を停止させ、1500rpm で5分間遠心した。上清を採取し、-90℃に保存した。

(1-8) 逆層高速液体クロマトグラフィー (RP-HPLC)

サンプルの精製及び分析はHPLC (Tri Rotar-VI, 日本光電) を用いて行った。溶出はメタノール：水：酢酸 (60 : 40 : 0.1, V/V, pH 7.2) で流速 1ml/minで行った。溶離液は 280nmで測定した。合成LTB₄ (フナコシ薬品) は標品として用いた。

(1-9) リンパ球幼若化反応 (LTR)

無菌条件下にBDF₁系マウスの脾臓を摘出し、冷RPMI-1640培地を入れたシャーレ内で cell teaserにより組織をほぐして細胞浮遊液を得た。シリコンガーゼで濾過して組織片を除き、Ficoll-urografin液で分離し洗浄後、再度RPMI-1640培地に浮遊させ、細胞数を 4×10^6 個/ml に調製した。リンパ球の培養には、10% FCS (Flow社) 加RPMI-1640培地にpenicillin 100単位/ml, streptomycin 100 μ g/ml及び L-glutamine 2mMを加えて用い、U底のマイクロウェルプレート(Cooke社)の各wellに細胞浮遊液50 μ l (2×10^5 個/well), ConA(Sigma社) 0.2 μ g/50 μ l 及び各濃度の薬物液 100 μ l を添加した。5%炭酸ガス培養器中で48時間培養後、³H-TdR (5.0 Ci/mM, Amersham社) 0.25 μ Ciを加え、さらに22時間培養した。培養後、細胞を glass fiber GF/A (Whatman社) 上に集め、液体シンチレーションカウンターにより取り込まれた³H-TdR量を測定した。

(1-10) 統計処理

実験結果の統計学的有意性の検定はいずれも student's t-test により行った。

2. 実験結果

(2-1) Lewis (LEW) 系ラットタイプIIコラーゲン関節炎(CA) 予防試験 における薬物効果

LEW系ラットを day 0 にタイプIIコラーゲンで感作を行い、PA, LMS, IM, CY, PN及びATMを day 0 から day 37 まで薬物投与した。Fig.2 に示したように、PAやATM投与ラットの後肢浮腫量は対照群よりも増加し、IMやPN投与ラットの後肢浮腫量は対照群よりも減少していた。LMS投与ラットでは実験で後半のみ増加作用を示した。CY投与は浮腫量に対しては効果を示さなかった。PAは他の免疫調節剤と同様に浮腫量の増加作用を示し、免疫抑制剤であるPNやCYの効果とは異なった。

(2-2) LEW系ラットCA治療試験における薬物効果

LEW系ラットを day 0 にタイプIIコラーゲンで感作した。day 21 に同じ浮腫量 (1.06 ± 0.28 ml, 平均±標準偏差) になるようにグルーピングを行った。PA, LMS, IM, CY及びATMを day 21 から day 42 まで薬物投与した。Fig.3に示したように、後肢浮腫量はATM投与群で増加するが、IM投与群では全期間を通して抑制を示した。PA及びLMS投与群はわずかに促進作用を示した。CY投与は後肢浮腫量に対しては作用を示さなかった。PA, LMS投与の治療試験に対する効果は予防試験に対する効果よりも弱かった。PAは治療試験においても他の免疫調節剤と同様に程度は弱い促進作用を示した。

(2-3) SD系ラットCA予防試験における薬物効果

SD系ラットはタイプIIコラーゲンで day 0 に感作を行った。薬物は day 0 から day 24 まで連日投与した。Fig.4 に示したようにPA, ATM及びLMS投与は浮腫量を増加した。しかし、IM投与は浮腫量を抑制した。P

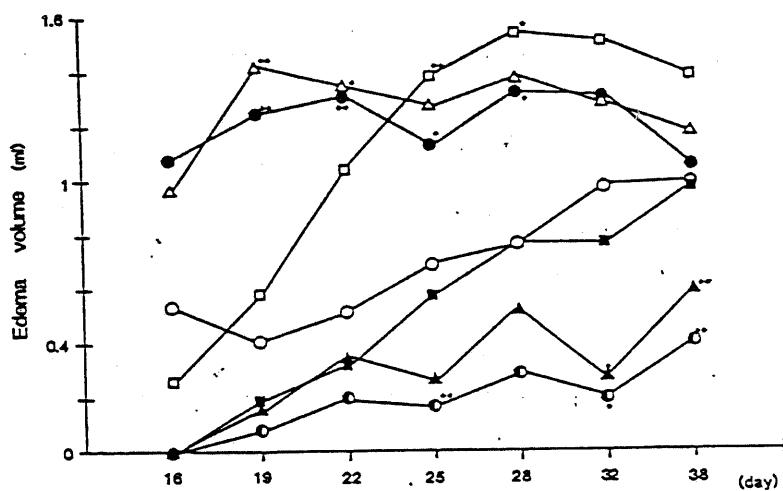


Fig. 2 Effects of drugs on the oedema volumes of foot pads in LEW rats with developing CA lesions: 100 mg/kg of PA (Δ — Δ), 10 mg/kg of LMS (\square — \square), 3 mg/kg of IM (\blacktriangle — \blacktriangle), 1 mg/kg of CY (\blacksquare — \blacksquare) and 1 mg/kg of PN (\circ — \circ) were administered p.o. and 10 mg/kg of ATM (\bullet — \bullet) was administered s.c. daily from day 0 to day 37.

*, ** Significantly different from the control (\circ — \circ) at $p < 0.05$ and $p < 0.01$, respectively.

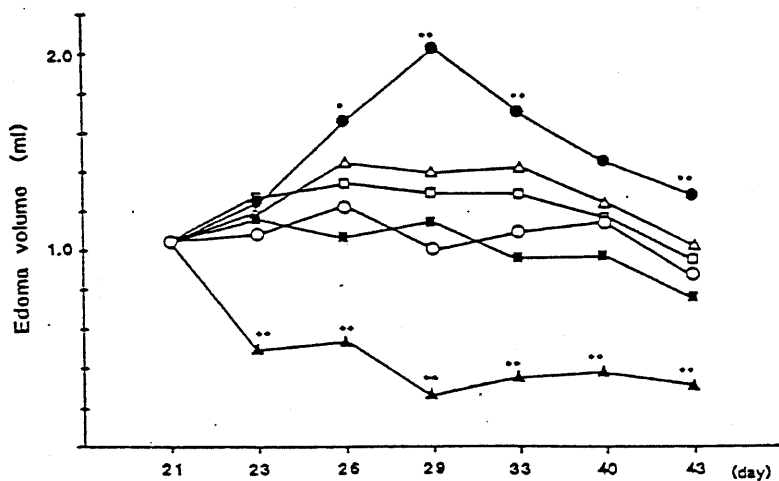


Fig. 3 Effects of drugs on the oedema volumes of foot pads in LEW rats with established CA lesions: 100 mg/kg of PA (Δ — Δ), 10 mg/kg of LMS (\square — \square), 3 mg/kg of IM (\blacktriangle — \blacktriangle), and 1 mg/kg of CY (\blacksquare — \blacksquare) were administered p.o. and 10 mg/kg of ATM (\bullet — \bullet) was administered s.c. daily from day 21 to day 42. *, ** Significantly different from the control (\circ — \circ) at $p < 0.05$ and $p < 0.01$, respectively.

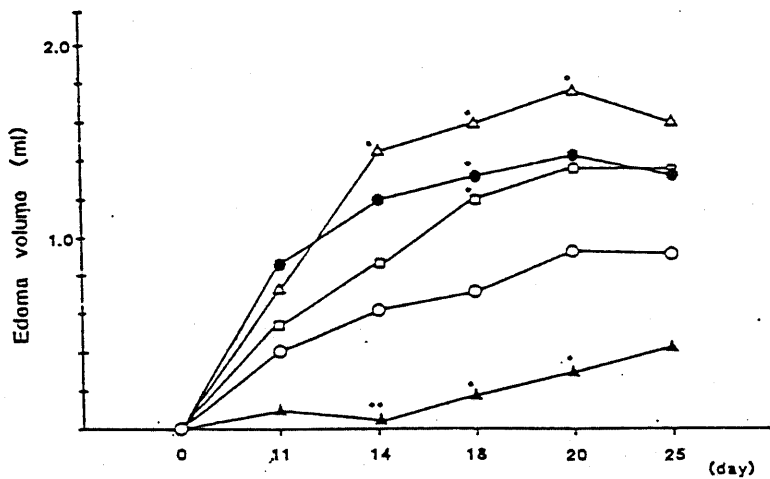


Fig. 4 Effects of drugs on the oedema volumes of foot pads in SD rats with developing CA lesions: 100 mg/kg of PA (Δ — Δ), 10 mg/kg of LMS (\square — \square), and 3 mg/kg of IM (\blacktriangle — \blacktriangle) were administered p.o. and 10 mg/kg of ATM (\bullet — \bullet) was administered s.c. daily from day 0 to day 24.
 *, ** Significantly different from the control (\circ — \circ) at $p < 0.05$ and $p < 0.01$, respectively.

A投与による浮腫量の促進効果はATM及びLMS投与よりも強かった。

(2-4) SD系ラットCA治療試験における薬物効果

SD系ラットを day 0 にタイプIIコラーゲンで感作した。 day 21 に同じ浮腫量 ($1.58 \pm 0.54 \text{ ml}$, 平均土標準偏差) になるように5群にわけた。

薬物は day 20 から day 45 まで投与した。 Fig.5 に示したように、全期間を通してATM投与群で悪化がIM投与群で抑制が見られた。PA投与群やLMS投与群は実験の後半のみで浮腫量の悪化を示した。PAは他の免疫調節剤と同様に浮腫量の悪化作用を示すことが判った。

(2-5) CA炎症ラットにおける抗タイプIIコラーゲン凝集抗体 (HA) 値に対する薬物作用

Fig.2 及び Fig.3で抗タイプIIコラーゲンHA抗体値を測定した。採血は day 36もしくは day 43 に行った。

Fig.2 での対照群のHA抗体値は day 36 で 36 ± 3.9 (平均土標準偏差) であった。PA, LMS, IM及びPN投与群のHA抗体値は各々 41 ± 15.0 , 61 ± 16.8 , 46.7 ± 11.0 , 32 ± 5.6 であり、対照群との間に有意差は見られなかった。ATM及びCY投与群でのHA抗体値は 5 ± 0.7 , 11.4 ± 2.2 で対照群のHA抗体値よりも有意に低下していた (Fig.6)。

Fig.3 での対照群のHA抗体値は 48 ± 14.4 (day 43) であった。PA, LMS, ATM, IM及びCY投与群のHA抗体値は各々 68 ± 14.1 , 48 ± 17.5 , 70.9 ± 38.6 , 34.7 ± 9.6 , 45.7 ± 6.5 で対照群のHA抗体値との間に有意差は見られなかった (Fig.6)。従って薬物効果はHA抗体値との間に相関性がないことが判った。

(2-6) CA発症ラットにおけるタイプIIコラーゲンに対する遅延型アレルギー反応 (DTH) での薬物作用

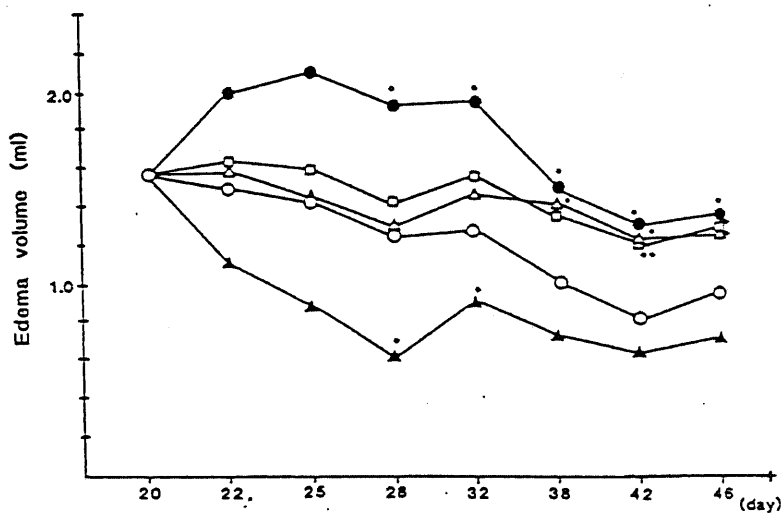


Fig. 5 Effects of drugs on the oedema volumes of foot pads in SD rats with established CA lesions: 100 mg/kg of PA (Δ — Δ), 10 mg/kg of LMS (\square — \square), and 3 mg/kg of IM (\blacktriangle — \blacktriangle) were administered p.o. and 10 mg/kg of ATM (\bullet — \bullet) was administered s.c. daily from day 20 to day 45.

*, ** Significantly different from the control (\circ — \circ) at $p < 0.05$ and $p < 0.01$, respectively.

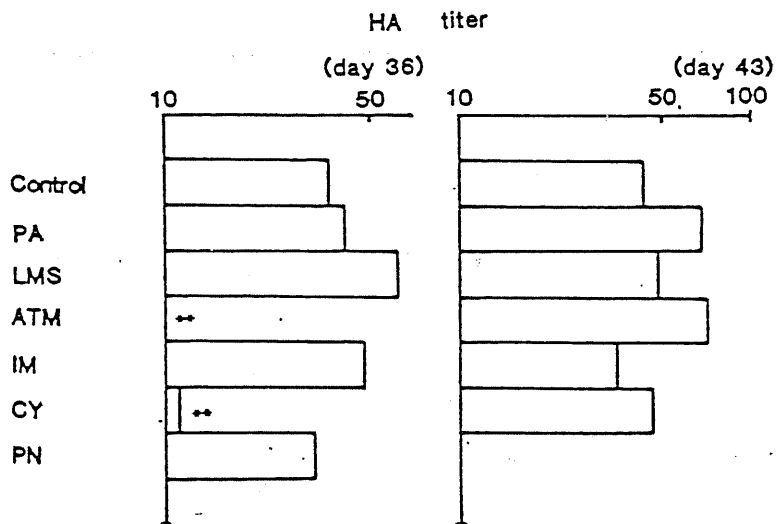


Fig. 6 Effects of drugs on the HA titre to type II collagen in CA rats. LEW rats were immunized with type II collagen in FICA on day 0 and bled from the orbital sinus on day 36 and day 43

Anticollagen antibody titre of CA rats was measured by the passive microhaemagglutination assay involving glutaraldehyde fixation of SRBC sensitized with collagen.

** Significantly different from the control at $p < 0.01$.

Fig.1 及び Fig.2でタイプIIコラーゲンに対するDTHへの薬物の作用を検討した。

Fig.2 では実験最終日に耳介にタイプIIコラーゲンを皮内投与してDTHを誘発させた。24時間後に耳の7mm片をパンチで打ち抜いて重量測定を行い、左耳と右耳との重量の差を浮腫量とした。タイプIIコラーゲンで感作した対照群のラットの耳の浮腫量は 52.3 ± 7.6 mgであった。PA, LMS, ATM, IM及びPN投与群ラットの浮腫量は 101.7 ± 6.3 , 83.3 ± 5.6 , 76.3 ± 5.4 , 74.2 ± 5.6 及び 82.4 ± 4.4 mg でいずれも対照群よりも有意に増加していた。CY投与群では 67.9 ± 3.9 mg で対照群との間に有意差は見られなかった (Fig.7)。

Fig.3 ではいずれの薬物投与群と対照群との間にも耳の浮腫量について有意差は認められなかった。薬物の効果はDTHとの間に相関関係がないことが判った。

(2-7) 腹腔多形核白血球数及び Leukotriene B₄(LTB₄)産生に対する薬物作用

Fig.5 で実験最終日にラットに casein-Naを腹腔内投与して誘導されてくる腹腔多形核白血球数及び calcium ionophore A23187 で刺激したLTB₄産生能について検討した。

タイプIIコラーゲンで感作したCA発症ラットの全細胞数は 3.42 ± 0.45 (平均±標準偏差) $\times 10^8$ 個、正常ラットでは $2.28 \pm 0.18 \times 10^8$ 個であった。正常ラットの全細胞数は著しく対照群よりも少なかった。PA, LMS, ATM, IM投与群では $3.09 \pm 0.26 \times 10^8$ 個, $3.30 \pm 0.20 \times 10^8$ 個, $3.10 \pm 0.26 \times 10^8$ 個, $3.09 \pm 0.22 \times 10^8$ 個で対照群と較べて有意差がなかった。CA発症ラットでの腹腔多形核白血球の産生するLTB₄量についても対照群と薬物投与群との間に差は見られなかった (Fig.8)。

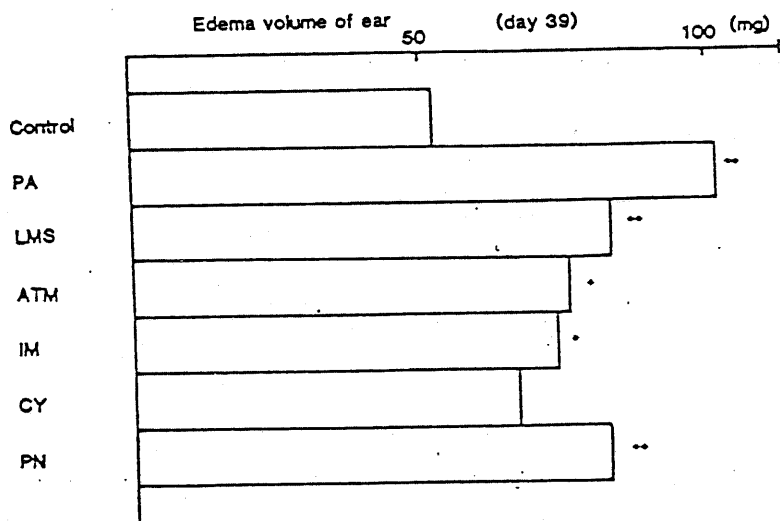


Fig.7 Effects of drugs on DTH to type II collagen in CA rats. LEW rats were immunized with type II collagen in FICA at day 0. On day 39, 50 μ g of collagen and saline were injected i.d. into the right ear and left ear of CA rat, respectively. After 24 h, 7-mm ear punch biopsies were taken from both ears and weighed. Difference between weight of right ear and left ear was regarded as the oedema volume.

*, ** Significantly different from the control at $p < 0.05$ and $p < 0.01$, respectively.

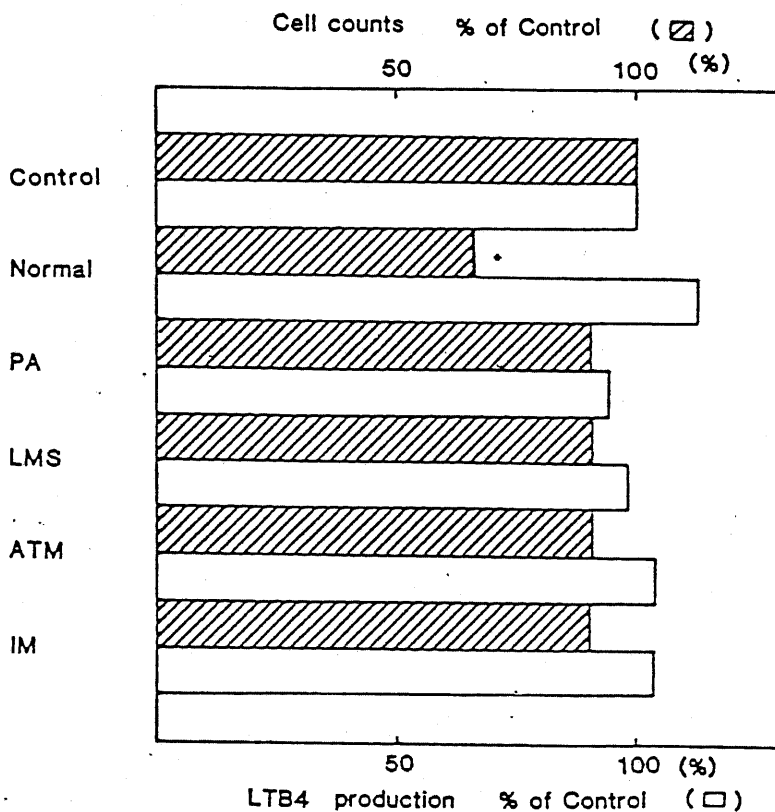


Fig. 8 Effects of drugs on the number of peritoneal polymorphonuclear neutrophils and LTB_4 synthesis. SD rats were immunized with type II collagen in FICA on day 0. On day 26, rats were injected i.p. with casein. After 16 to 18 h, rats were killed and the peritoneal cells were obtained and counted. The amount of LTB_4 synthesis from the cells stimulated with A23187 was measured by HPLC.

* Significantly different from the control at $p < 0.05$.

以上のことから、薬物は全腹腔細胞数やLTB₄産生との間に相関関係を示さないことが判った。

(2-8) CA発症ラット及び正常ラットにおける Concanavalin A (ConA) 誘導リンパ球幼若化反応 (LTR) に対するD-ペニシラミン, レバミゾール, オーロチオマレート及びインドメサシンの作用

PAを正常ラット脾臓細胞に添加すると0.3~10 μ g/mlでConA誘導LTRのDNA合成を促進したが、30 μ g/mlではPAは抑制作用を示した。CA発症ラットにおいてはPAを培養液中に添加すると0.3 μ g/mlでは効果はないが、1~30 μ g/mlではConA誘導LTRを抑制した (Fig.9a)。

LMSを正常ラット脾臓細胞に添加すると0.3~3 μ g/mlではConA誘導LTRのDNA合成を促進したが、30 μ g/mlでは抑制した。CA発症ラット脾臓細胞においてはLMSを0.3 μ g/mlの添加では作用はないが1~30 μ g/mlでは抑制作用を示した (Fig.9b)。

ATMを正常ラット脾臓細胞に添加すると、0.3, 1 μ g/mlではConA誘導LTRのDNA合成を促進したが、10, 30 μ g/mlでは反応を抑制した。CA発症ラット脾臓細胞においては0.3 μ g/mlでは効果はないが、1~30 μ g/mlでは抑制作用を示した (Fig.9c)。

IMを正常及びCA発症ラット脾臓細胞に添加すると0.3~3 μ g/mlでは効果がなかったが、10, 30 μ g/mlではConA誘導LTRを抑制した (Fig.9d)。

以上の結果から、PA, LMS, ATMの免疫調節剤は正常ラット脾臓細胞のConA誘導LTRを低濃度で促進するが、CA発症ラットのConA LTRでは抑制することが判った。一方、抗炎症剤であるIMでは正常ラット脾臓細胞及びCA発症ラット脾臓細胞のConA誘導LTRに対して低濃度で作用に差が認められなかった。ConA誘導LTRではサプレッサーT

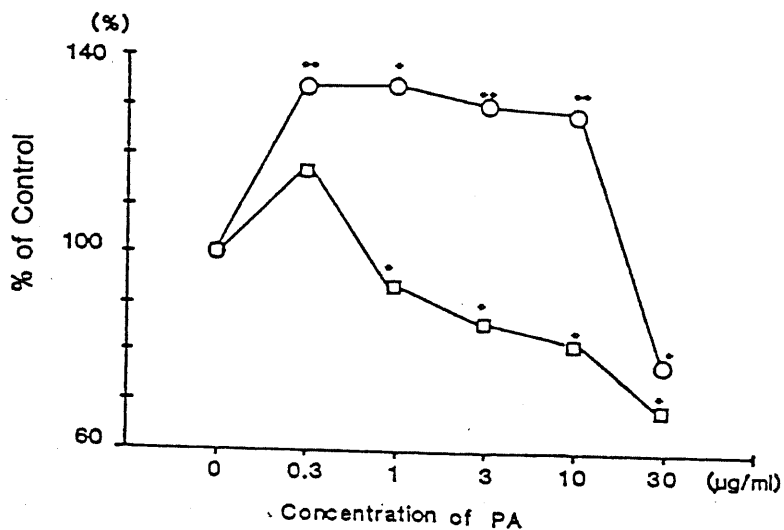


Fig. 9a Effect of PA on the Con A-induced lymphocyte transformation test in CA and normal rats. Spleen cells in CA (□—□) and normal rats (○—○) were cultured as described in *Materials and methods*. PA was added at the same time as Con A. Data represent % of control for five duplicate cultures.

*, ** Significantly different from each control (0 µg/ml) at $p < 0.05$ and $p < 0.01$, respectively.

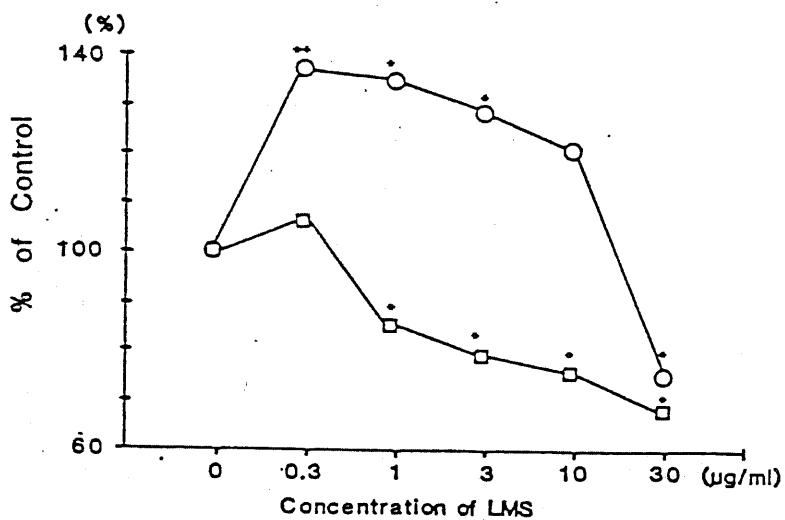


Fig. 9b Effect of LMS on the Con A-induced lymphocyte transformation test in CA and normal rats. Spleen cells in CA (□—□) and normal rats (○—○) were cultured as described in *Materials and methods*. LMS was added at the same time as Con A. Data represent % of control for five duplicate cultures.

*, ** Significantly different from each control (0 µg/ml) at $p < 0.05$ and $p < 0.01$, respectively.

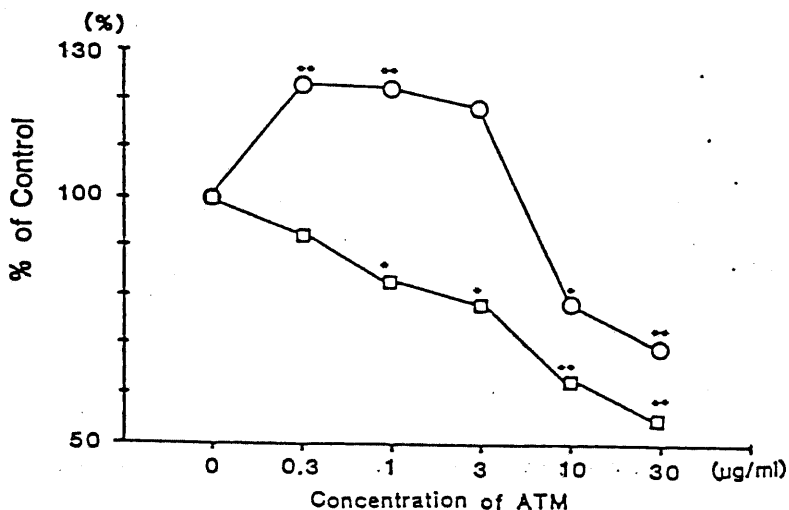


Fig. 9c Effect of ATM on the Con A-induced lymphocyte transformation test in CA and normal rats. Spleen cells in CA (□—□) and normal rats (○—○) were cultured as described in *Materials and methods*. ATM was added at the same time as Con A. Data represent % of control for five duplicate cultures.

*, ** Significantly different from each control (0 µg/ml) at $p < 0.05$ and $p < 0.01$, respectively.

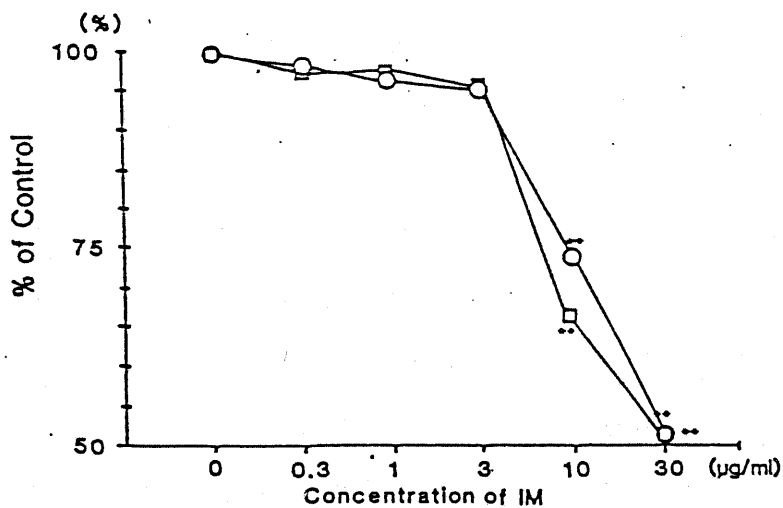


Fig. 9d Effect of IM on the Con A-induced lymphocyte transformation test in CA and normal rats. Spleen cells in CA (□—□) and normal rats (○—○) were cultured as described in *Materials and methods*. IM was added at the same time as Con A. Data represent % of control for five duplicate cultures.

*, ** Significantly different from each control (0 µg/ml) at $p < 0.05$ and $p < 0.01$, respectively.

細胞が誘導されることから、CA発症ラットにおいて免疫調節剤はサプレッサーT細胞の誘導を抑制していることが判った。

3. 考 察

PAの作用機作を調べる目的で、ラットCAに対する効果を検討し、免疫抑制剤及び免疫調節剤と比較した。CAにおいては後肢浮腫量、免疫学的パラメーター、腹腔多形核白血球からのLTB₄産生、脾臓細胞のConA刺激LTRに対する作用を調べた。その結果、PA、LMS、ATMなどの免疫調節剤はLEW系、SD系ラットCAの予防及び治療実験において促進効果を示すことが判った。

CAは細胞性免疫、液性免疫ともタイプIIコラーゲンに対して活性化しており(89,90)、感作した脾臓細胞やリンパ節細胞及びIgG抗体によりCAが他のラットに移入できる(91)。従って、CAにおける薬物効果と後肢炎症との間の相互関係を明らかにするために、タイプIIコラーゲンに対する抗体価とDTHについて検討した。しかしながら、炎症における薬物効果とタイプIIコラーゲンに対するHA抗体価及びDTHにおける薬物効果との間には相関関係は認められなかった。

LTB₄は白血球のアラキドン酸代謝でのリポキシゲナーゼ産生物質であり、炎症を促進させる mediator(91-96)である。LTB₄は好中球や単球の遊走及び亢進作用を有し、RA患者や痛風患者の関節液中には高濃度に存在し発症に深く関係している(97)。さらにLTB₄は種々の生体内刺激あるいはcalcium-ionophore などの人工的刺激により、好中球やマクロファージ等種々の細胞から遊離する。よってCA発症ラット、正常ラットでの腹腔多形核白血球数を測定し、さらに calcium ionophore A23187 で刺激してLTB₄産生を起こさせ、産生量が亢進しているかどうかを測定した。その結果、CAにおける薬物効果はLTB₄産生や細胞数との相関関係はなかった。正常ラットでは炎症を起こ

していないため細胞数はCA発症ラットよりも有意に低下していた。しかし、腹腔からではなく、炎症部位からの白血球を用いたら、違う結果が得られた可能性も考えられる。これらの薬物効果と後肢浮腫量、HA抗体価、DTH、細胞数、LTB₄産生との間に対して相関関係が認められなかったため、次にin vitroで正常ラットやCA発症ラット脾臓細胞のConA誘導LTRに対する作用を検討した。その結果、CA発症ラットのDNA合成への³H-TdRの取り込みは正常ラットよりも低かった。AA発症ラットの脾臓細胞(98)及びRA患者の末梢血リンパ球もT細胞 mitogenへの反応性が低下していることが知られている(99)。PA、LMS、ATMはCA発症ラット脾臓細胞のConA刺激LTRにおいて低濃度で有意に反応を抑制するのが判った。しかし、正常ラットでは反応を促進した。PA単独ではリンパ球分裂の刺激活性はないことから、正常ラットでの促進作用はConA刺激の伝達増強したためと思われる。一方、CA発症ラットではPAは脾臓細胞のConA刺激LTRを抑制した。動物実験モデルにおいて免疫抑制作用が、ConAで活性化された胸腺のサブレッサー細胞により誘導されることが報告されている(100-104)。従って、CA発症ラットの脾臓細胞のConA刺激LTRの抑制作用はサブレッサーT細胞数や活性を抑制していることが示唆される。PAの投与をしたAA発症ラットでの血中濃度は数μg/mlであること、PAは血漿蛋白との結合能が高いことから、このin vitroでの抑制作用はin vivoでも発現している可能性が考えられる。PA、LMS、ATMによるサブレッサーT細胞の抑制は、in vivoでの悪化作用を誘導していることが考えられる。RA患者やSLE患者ではサブレッサーT細胞数の減少が報告されている(105-107)。又、CAでのIMの抗炎症作用はよく知られている。IMはCA発症ラットでも正常ラットでもConAに対する反応性には作用はなかった。CYは今回、胸腺や腸骨リンパ節重量を抑制したが、後肢浮腫量に対して作用は認められなかった。これは投与量が低かったため、抗体産生やリンパ球の活性化を抑制できず、炎症を抑制で

きなかったものと思われた。

以上の結果から、PAはサブレッサーT細胞の誘導を抑制し、ラットCAを悪化させることが示唆された。この作用はLMS, ATM等他の免疫調節剤と同じであり、免疫抑制剤であるCYやPNとは異なることが判った。一般に免疫調節剤は老齡(108), 免疫抑制剤処理(109), 胸腺摘出等で免疫機能の低下した動物あるいは抗原に対して低感作動物の免疫応答を賦活することが知られている。抗原刺激の程度, 動物種, 系統, 性などに関係する免疫機能の状態に応じてその作用が異なり、又、投与量によってもその結果に複雑な影響が出るといわれている。PAの免疫調節作用については、マウスIgE抗体産生では免疫機能が正常な場合には抑制作用が、ストレス負荷条件下で免疫機能が低下した場合には回復作用があることが明らかになっている(110)。また、PAはLTRに対して低濃度で促進作用を、高濃度で抑制作用を示す(111)。PFCでは感作抗原としてSRBCを通常量で感作した場合にはPAで抑制作用が、少量の感作の場合には促進作用が認められている(111)。また、一般的に免疫調節剤で認められるSD系ラットAAでの抑制作用(112)及びLEW系ラットAA(113)での促進作用も報告されている。現在、免疫調節剤の作用点として、① サブレッサーT細胞を活性化する。② マクロファージ, 単球の貪食活性を増強する。③ ナチュラルキラー(NK)活性を活性化する。④ ヘルパーT細胞を抑制する。⑤ 補体活性を抑制する。⑥ マクロファージ, 単球の遊走を抑制する。⑦ 好中球の活性酵素遊離を抑制する。⑧ インターフェロンを誘導する。⑨ コラゲナーゼやアルカリフォスファターゼの活性を抑制する。⑩ リウマチ因子を陰性化する。⑪ 変性 γ -グロブリンの生成を抑制する等が考えられている。今回、新たに免疫調節剤の作用メカニズムとしてサブレッサーT細胞誘導抑制作用が認められた。コラーゲン感作により刺激された免疫系では通常ヘルパー細胞及びサブレッサー細胞の両細胞が誘導されるが、PA投与ラットではサブレッサー細胞の誘導が抑制され、相対的にヘルパー細

胞の活性が強くなるのであろう。その結果、抗原情報伝達が促進され、リンパ球の分裂増殖が激しくなり強い免疫反応が誘導されることにより、関節炎の発症が促進されるものと考えられる。サプレッサーT細胞誘導抑制作用はLEW系ラットAAでも認められている(113)が、この作用は極めて限られた条件下でのみ発現するものと思われる。即ち、AA促進作用はLEW系ラットのみ認められ、SD系ラット、Wistar系ラットでは認めていない。又、CAの発症はwister Furth (RTI^u)、LEW (RTI^l)及びDA (RTI^a)系ラットではほぼ100%の発症がみられるのに対して、MAXX (RTIⁿ)、LEW・B3 (RTI^{nv1})、August (RTI^c)系では感受性が低く、全く関節炎の発症が認められないことから、主要組織適合性複合体(MHC)、RTIの遺伝子と密接な関係がある(79)と考えられている。コラーゲンに対する免疫応答はMHC、RTIの遺伝子に支配されているため、この抗原に対して反応して発症しない系は対応する抗原に特異的なサプレッサーT細胞が存在するとされている(114)。このように、抗原に対する反応性の強弱がサプレッサーT細胞の活性の強弱によりされているものと考えられる。従って、CA発症を調節するサプレッサーT細胞活性がLEW系、SD系ラットでは弱いため、PAや他の免疫調節剤の作用を受けやすく、サプレッサーT細胞誘導抑制作用が認められたことが考えられる。

PAが臨床ではRAに対して著明な改善効果を発揮するが、その動物モデルであるCAに対しては悪化作用を示した。このことはPA類似薬物のCAにおける作用をそのまま臨床に外挿することができないことを意味するとともにCAが必ずしもRAの優れたモデルでないことを示唆する。CAでは寛解と再発の繰り返しが認められないこと、耳介の炎症を除いて関節以外の部位に炎症が認められないこと、コラーゲンに対する以外の免疫応答、例えばリウマチ因子、抗核抗体が認められないなどの相違点が報告されている(79)が、本研究により薬物感受性についても大きな違いのあることが明らかになった。しかし、PA

を始めLMS, ATMによりCAの悪化作用がみられたことから、同様の活性を有する薬物は臨床においてRAの改善作用を示す可能性が考えられる。

以上のことから、PAは免疫抑制作用の他、免疫調節作用も有しており、両作用が抗リウマチ作用の本体であると考えられた。

4. 小 括

PAはLTR, PFC, SD系ラットAA, LEW系ラットAA等での挙動から、免疫調節作用のあることが報告されている。今回、CAを用いてPAの効果を検討した。その結果、PAはオーロチオノレイトやレバミゾールのような他の免疫調節剤と同様にCAを悪化させた。免疫抑制剤は作用がないかまたは抑制作用を示し、PAとは作用が異なっていた。CA発症ラットを用いて抗タイプIIコラーゲン抗体価、皮膚反応及びロイコトリエンB₄(LTB₄)産生量を測定したが、薬物効果との間に相関関係は認められなかった。PAならびに種々の免疫調節剤はCA発症ラットの脾臓細胞をConAで刺激したLTRにおいて抑制作用を示したため、サブレッサーT細胞の誘導抑制作用があることが示唆された。以上のことから、PAは免疫抑制作用と免疫調節作用を有しており、両作用によりPAの抗リウマチ作用が発揮されるものと考えられた。

第II章 D-ペニシラミンの化学修飾による免疫薬理学的特異性の発現

第I章に述べた様に、PAは免疫薬理学的効果として免疫抑制作用と免疫調節作用を併有している。PAは免疫薬理学的効果の他に Vitamin B₆ 欠乏、コラーゲン繊維の成熟抑制、アレルギーの誘導など、種々の蛋白質SH基、アルデヒドとの結合に基づく副作用を発現する。よってPAの単純なSH基周辺の構造を修飾・複雑化することにより、機能蛋白質への結合性が増し、免疫薬理学的作用がより特異的になること及び作用の増強を目的として種々の化学修飾を行った。作用発現に必須であるCOOH基は残して親水性を保ち、組織への移行を高めるためフェニル基を導入したベンゾイルプロピオン酸を基本構造とした。又、PAの活性基であるSH基を安定化するためSAc基として置換した。SAc基は体内で活性体に転換するようにした。ベンゾイルプロピオン酸においてSAc基はカルボキシル基から α 、 β 、 γ 位と位置を変えてその免疫薬理学的効果を検討した。一般に、置換位置を変換し立体構造や距離などに変化を持たせると、蛋白質への結合性が変わることが知られているためである。第1節ではPA関連化合物のうちでカルボキシル基から α 位または β 位にSAc基を有する化合物について、第2節では γ 位にSAc基を有する化合物について免疫薬理学的作用を検討した。

第1節 カルボキシル基からの α 位または β 位にSAc基を有するベンゾイルメルカプトプロピオン酸誘導体の免疫薬理学的作用（免疫調節作用）

ベンゾイルメルカプトプロピオン酸誘導体の免疫薬理学的作用を抗リウマチ剤の薬効評価モデルであるSD系ラットアジュバント関節炎(AA)、LEW系AA、タイプIIコラーゲン関節炎(CA)、BWF₁マウス及びMRL/l系マウスに対する延命効果実験を用いて検討した。さらに液体免疫に対する作用の検討

のためブランク形成細胞 (PFC), IgE抗体産生実験を行った。細胞性免疫に対する作用の検討のため、遅延型足趾反応 (DTH) を行った。リンパ球機能に対する作用の検討のためリンパ球幼若化反応 (LTR) を、ライソゾーム酵素遊離に対する作用の検討のため老齢MRL/l系マウス腹腔マクロファージからの酵素遊離抑制実験を行った。抗炎症作用の検討のためカラゲニン足浮腫 (CE) に対する作用を検討した。

1. 実験材料及び実験方法

(1-1) 実験動物

7~9週令のSD又はLEW系雌性ラット, 5~6週令のWistar系雄性ラット, 7~9週令のBDF₁系又はBalb/c系雌マウス, 5週令のMRL/l系雄性マウス (日本チャールスリバー社) 及び6週令のBWF₁雄性マウス (動物繁殖研究所) を用いた。ラットは水洗ケージで、マウスは床敷きで第I章と同様に飼育した。

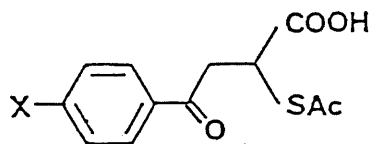
(1-2) 薬物

ベンゾイルメルカプトプロピオン酸誘導体は亀尾らの方法(115)で合成した (Table 4)。CCA (大正製薬), PA (大正製薬), CY (塩野義製薬), インドメサシン (IM, Sigma社), 6-メルカプトプリン (6-MP, 武田薬品) を用いた。In vivoではベンゾイルメルカプトプロピオン酸誘導体, CCA及び6-MPは5%アラビアゴム水溶液に懸濁した。PA, CYは蒸留水や生理食塩液に溶解した。In vitroではベンゾイルメルカプトプロピオン酸誘導体はエタノールに溶解後、培養液で希釈した。PAは培養液で溶解した。

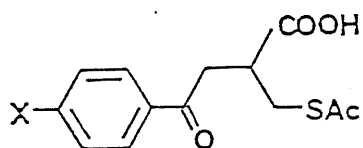
(1-3) AA

SD及びLEW系ラットを用いた。アジュバントは牛結核死菌 (M. buty-

Table 4 The structural formulas of Compound I-1~ II-3.



Compound I	X
1	H
2	4-Br
3	4-Cl



Compound II	X
1	-H
2	4-Br
3	4-CH ₃

ricum)を流動パラフィンに 6mg/ml の濃度に懸濁して調製し、ラット1匹当たり 0.1mlを尾部皮内に投与した。ラットは3週間にわたって観察した。A Aの評価は後肢浮腫量(左右両後肢の足体積を低圧トランスジューターを備えたプレシスモグラフにより測定し、day 21と day 0の後肢体積の差を後肢浮腫量とした)によった。

(1-4) CA

第I章第2節と同様に作成した。

(1-5) BWF₁ マウス腎炎, MRL/l系マウス

薬物投与を行い、生存数と蛋白尿を測定した。

(1-6) PFC

BDF₁系もしくは老齢 Balb/c 系マウスに 4×10^6 個のSRBCを尾静脈内投与して感作した。day 4にマウスを屠殺し、Cunningham & Szenberg (116)の方法に従って脾臓中のPFC数を測定した。即ち、脾臓摘出後、冷RMI-1640培地を含むシャーレに入れ、cell teaserにより組織をほぐして細胞浮遊液を得た。シリコンガーゼで濾過して組織片を除き、2回洗浄後、再度RPMI-1640培地に浮遊させた。この細胞浮遊液 0.4mlに、40%SRBC (1ml当たり 8×10^9 個)を 0.05mlとモルモット補体(高橋科学)2倍希釈液 0.05mlを加え、混和後その 0.1mlをCunningham chamber(高橋技研)に注入した。chamberをパラフィンで封入後、37°Cの孵卵器中出1時間培養して、出現するプラーク数を測定しPFC数とした。

BWF₁マウスに 5μg lipopolysaccharide(LPS)を腹腔内投与し、day 4にPFC数を測定した。LPS(1mg/ml)をSRBCと1時間、37°Cでincubationし、5回洗浄後40%LPS結合SRBCを調製した。

(1-7) カラゲニン足浮腫(CE)

Wistar系雄性ラットの左後肢足趾皮下に1% carrageenin (Sigma社) を注射して浮腫を惹起した。その後、3時間目、5時間目に後肢浮腫量をプレスモグラフにより測定した。

(1-8) DTH

Day 0 に、Balb/c系マウスの右足趾に 1×10^8 個/20 μ l のSRBC (日本生物材料センター) を皮下注射して感作した。day 4 に 1×10^8 個のSRBC を左足趾に皮下注射してDTHを惹起した。24時間後、左足趾の厚みをノギスを測定し、惹起前後における厚みの差をDTHの指標とした。

(1-9) IgE抗体産生

BDF₁系雌性マウスに卵白アルブミン(OA, 生化学工業)1 μ g をalum 4mg とともに腹腔内に投与して感作を行った。day 14 に経時的に眼窩静脈からマイクロピペット(ディスポーザブルピペット, ヘパリン処理, 44.7 μ l, Clay adams社)を用いて採血し、生理食塩液で2倍希釈とし、遠心分離して得た抗血清を-20°Cにて保存した。ラット受身皮膚アナフィラキシー反応(PCA)は約30カ所に抗血清 0.1mlを皮内投与し、4時間放置後、OA 4mgを含む0.5%エバンスブルー生理食塩液 1mlを尾静脈に投与して行った。30分後に撲殺し、皮膚の内側から青斑の直径を測定し、5mm \times 5mm以上を示す抗血清の最大希釈倍数をもってIgE抗体価とした。

(1-10) LTR

第I章第2節と同様に行った。

(1-11) ライツゾーム酵素遊離

30~40週令の老齢化MRL/l系マウス腹腔を penicillin (100U/ml), streptomycin (100 μ g/ml), heparin (1U/ml)及び10%非働化 fetal calf serum (FCS) 含有RPMI-1640培地で洗い出した。遠心洗浄後、マクロフ

ァージが 1 well あたり 5×10^5 個になるように分注して 37°C , 5% CO_2 炭酸ガスインキュベーターで24時間培養した。

acid phosphataseの測定：培養上清中の遊離酵素及び 0.1% Triton \times 100 処理マクロファージ内在性酵素は、基質である 24mM p-nitrophenyl phosphate 含有 0.2M acetate buffer (pH 5.0) と 37°C incubation した。30分後に 0.25N水酸ナトリウムで反応を停止させ、Immuno readerで吸光度 405nm 及び 510nmを測定した。

N-acetyl- β -D-glucosaminidaseの測定：基質として24mM β -nitrophenyl -N-acetyl- β -D-glucosaminide含有 0.1M citrate buffer (pH 4.2) を用い、acid phosphataseの場合と同様に測定した。

遊離酵素%は以下の式で計算した。

$$\frac{\text{吸光度 } 405-510 \text{ (培養上清) nm}}{\text{吸光度 } 405-510 \text{ (培養上清+細胞沈渣) nm}} \times 100$$

(1-12)統計処理

統計処理は Student's t-test で行った。MSTは第I章と同様に算出した。

2. 実験結果

(2-1) SD系ラットアジュバント関節炎(AA) 予防試験における薬物効果

1群10~11匹のSD系ラットを用いた。ラットに牛結核死菌を投与してAAを誘導した。day 0 から day 20 まで、I-1, I-2, II-1, II-2 の30mg/kg, 100mg/kg 及び 300mg/kg, I-3, II-3及びPAの100mg/kg, CCAの30mg/kg, CYの1mg/kg, 6-MPの3mg/kg を連日経口投与した。Table 5 に示した様に、I-1, I-2, I-3, II-1, II-2, II-3 及びCYは対照群と比べ足趾浮腫量を抑制した。PA関連化合物の100

Table 5 Effects of drugs on the edema volumes of foot pads in rats with developing adjuvant arthritis (AA) lesions.

Exp. No.	Drug	Dose (mg/kg)	Edema volume on day 21 (ml)	% of C
Exp. 1.	Control	—	3.64±0.24	100
	I-1	30	2.81±0.25	77.2
		100	3.93±0.30	108.0
		300	2.12±0.35**	58.2
Exp. 2.	Control	—	3.65±0.60	100
	I-2	30	3.42±0.29	93.7
		100	2.40±0.40	65.8
		300	1.65±0.38*	45.2
Exp. 3.	Control	—	1.16±0.07	100
	I-3	100	0.70±0.09*	60.0
Exp. 4.	Control	—	3.65±0.60	100
	II-1	30	3.18±0.57	87.1
		100	2.72±0.46	74.5
		300	1.38±0.45**	37.8
Exp. 5.	Control	—	3.65±0.60	100
	II-2	30	3.19±0.32	87.4
		100	1.98±0.48	54.2
		300	1.77±0.43**	48.5
Exp. 6.	Control	—	3.37±0.49	100
	II-3	100	0.70±0.13**	20.8
Exp. 7.	Control	—	2.15±0.31	100
	PA	100	1.86±0.35	86.5
Exp. 8.	Control	—	3.11±0.29	100
	CCA	30	2.96±0.34	95.2
	CY	1	1.90±0.40*	64.0
	6-MP	3	2.24±0.37	72.0

Rats were inoculated with 0.6 mg of *M. butyricum* on day 0 and drugs given p.o. daily from day 0 to day 20. Data represented the mean ± S.E. for 10 to 11 rats and % of control (C). *** Significantly different from the control at $p < 0.05$ and $p < 0.01$, respectively.

mg/kg 投与群の抑制効果はPAよりも強かった。PAや6-MPは浮腫量を抑制したが、有意差はなかった。CCAに効果は認められなかった。100mg/kgの投与量ではII-3, 2-acylthiomethyl-3-(4-methyl-benzoyl)-propionic acid, はPAやPA関連化合物の中で最も作用が強かった。

以上のことから、新たに合成したPA関連化合物はSD系ラットAAを抑制し、その抑制効果はPAよりも強いことが判明した。

(2-2) LEW系ラットAA予防試験における薬物効果

1群 8~10匹のLEW系ラットを用いた。ラットに牛結核死菌を投与してAAを誘導した。day 0 から day 20 まで、I-1, I-2, II-3, PAの 100mg/kg 及びCYの 10mg/kgを連日経口投与した。Fig.10 に示した様に、I-1, I-2, II-3, PAは浮腫量を促進傾向又は促進した。CYは浮腫量を抑制した。LEW系ラットAAにおいては免疫調節剤は浮腫量を促進するが、免疫抑制剤は抑制することが知られている。カルボキシル基からの α 位または β 位にSAc基を有するベンゾイルメルカプトプロピオン酸誘導体は免疫調節作用を有することが示唆された。

(2-3) ラットタイプIIコラーゲン関節炎(CA)治療試験における薬物効果

Day 0 にLEW系ラットをタイプIIコラーゲンで感作した。day 20にラット8~10匹ずつ、4群に分けた(1.58 \pm 0.54ml, 平均 \pm 標準偏差)II-3及びPAの 100mg/kg 及びIMの 3mg/kg を day 20 から day 45 まで連日経口投与した。Fig.11 に示した様に、II-3とPAは実験期間の後半に足趾浮腫量を増加した。II-3はPAよりも効果があった。IMは全期間を通じて浮腫量を抑制した。免疫調節作用を有する化合物はCAにおいて、浮腫量を増加することが知られている。II-3に免疫調節作用のあることが示唆された。

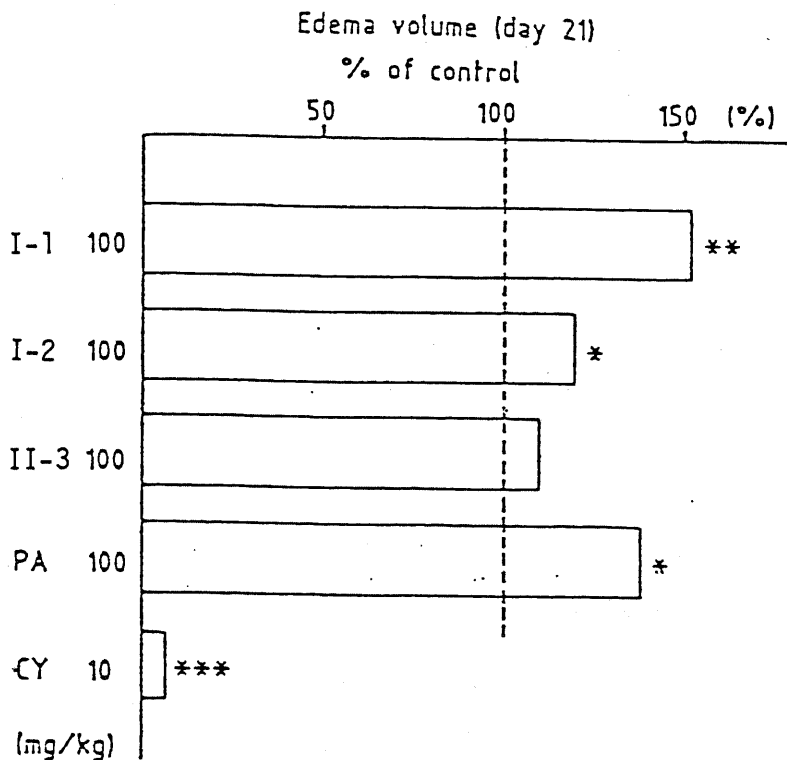


Fig. 10 Effect of drugs on the edema volumes of foot pads in Lewis rats with developing AA lesions. Lewis rats were inoculated with 0.6 mg of heat killed *Mycobacterium butyricum* in liquid paraffin to induce AA. They were treated orally with 100 mg/kg of I-1, I-2, II-3, and PA and 10 mg/kg of CY from day 0 to day 20. Results are shown as a % of control. ** Significantly different from control at $p < 0.01$.

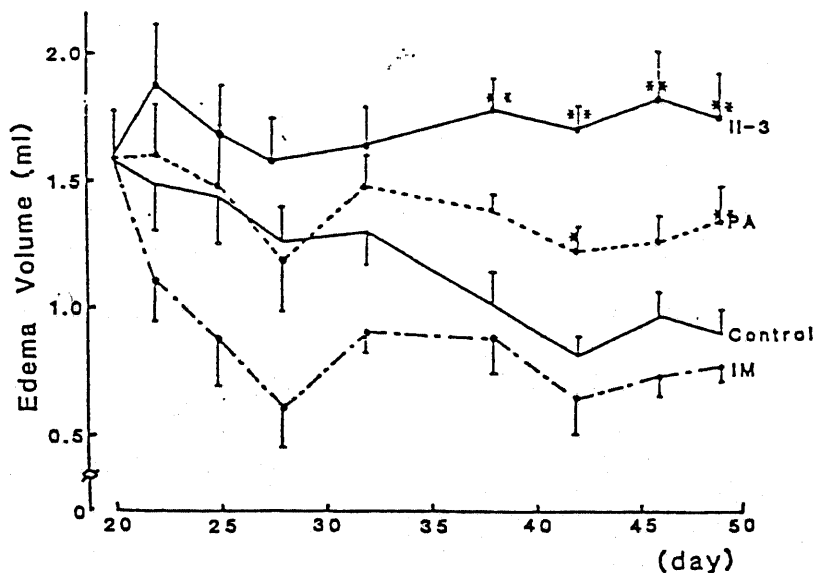


Fig. 11 Effect of drugs on the edema volumes of foot pads in Lewis rats with established CA lesions. Lewis rats were immunized with type II collagen on day 0. On day 20, rats were divided into 4 groups. They were treated orally with 10 mg/kg of II-3 and PA and 3 mg/kg of IM from day 20 to day 45. *, ** Significantly different from control at $p < 0.05$ and $p < 0.01$, respectively.

(2-4) NZB/NZW F₁系(BWF₁)マウスにおける延命効果

1群5~8匹, 10~11週令のBWF₁マウスを用いた。100mg/kg II-3, PA及び30mg/kg CCAを週3回経口投与した。10mg/kg CYは週1回腹腔内投与した。Fig.12 (A)(B)(C)に各々PAとII-3, PAとCY, CCAの延命曲線を示した。(A)においてII-3のMSTは259.5日、PAは288.5日、対照群のそれは231.5日であった。II-3は生存日数をわずかに延長した。(B)においてPA, CYのMSTは>251.5日、対照群では221.5日であった。(C)においてCCAを投与したマウスでのMSTは297.5日、対照群では291.5日であった。CCAでは効果はみられなかった。PA, CYでは生存日数を延長し、蛋白尿の出現を抑制した。BWF₁マウスで延命効果を示す化合物は免疫抑制作用を有している。II-3は免疫抑制作用を有さないことが示唆された。

(2-5) MRL/l系マウスにおける延命効果

1群7~10匹, 6週令のMRL/l系マウスを用いた。10, 100mg/kg II-3及び10mg/kg CYを投与した。II-3は週3回経口投与し、CYは週1回腹腔内投与した。Fig.13に延命曲線を示した。10mg/kg II-3のMSTは187.3日、100mg/kg II-3は189.3日、対照群は197.3日で、II-3に延命効果は認められなかった。CYは>243日で効果がみられた。MRL/l系マウスで延命効果を示す化合物は免疫抑制作用を有している。II-3は免疫抑制作用を有さないことが示唆された。

(2-6) プラーク形成細胞(PFC)における薬物作用

1群5~8匹のマウスを用いた。BDF₁系マウス及び老齢 Balb/c系マウスに suboptimal doseの 4×10^6 個SRBCを尾静脈内に注射して感作した。BWF₁マウスは5 μ g LPSを腹腔内投与して感作した。脾中のPFC数はday 4に測定した。SRBCに対して low responderであるBDF₁

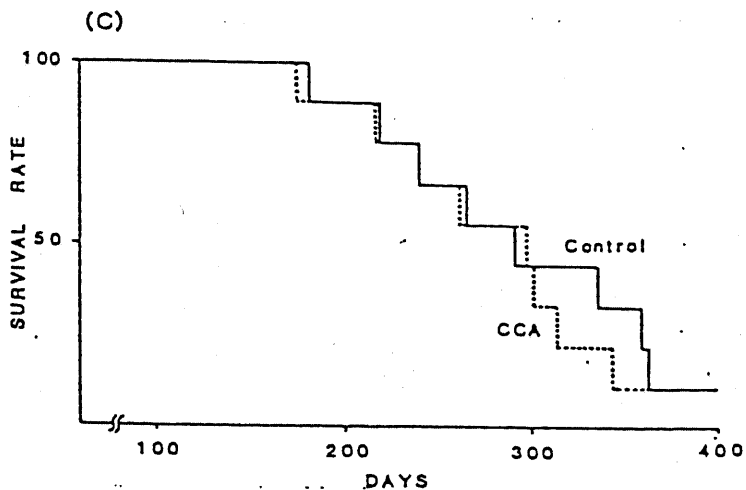
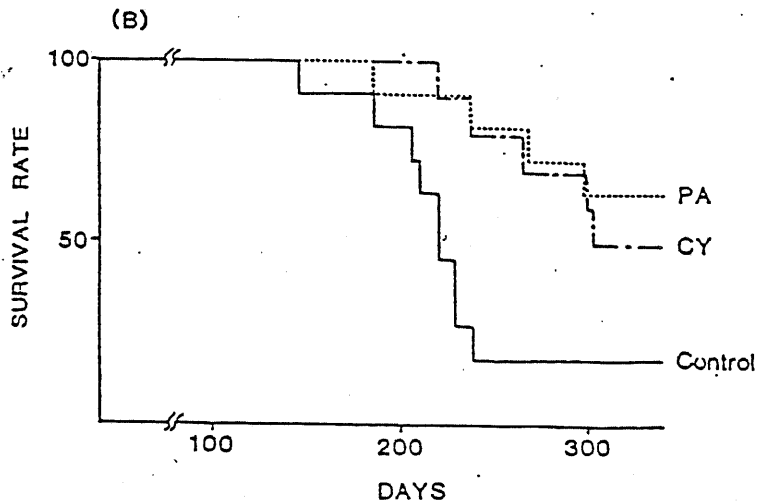
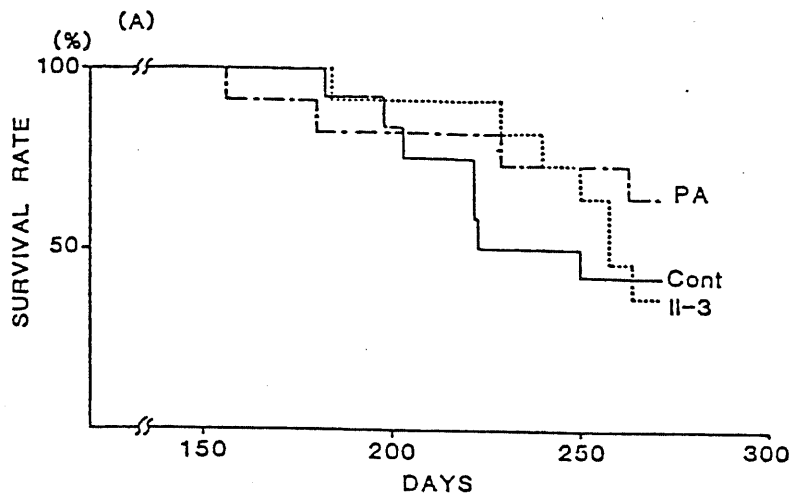


Fig. 12 Effect of drugs on the survival time in BWF_1 mice. (A) The survival curve of II-3. (B) The survival curve of PA and CY. (C) The survival curves of CCA. II-3 and PA at a dose of 100 mg/kg and CCA at a dose of 30 mg/kg were administered orally 3 times per week. CY at a dose of 10 mg/kg was administered interaperitoneally once a week.

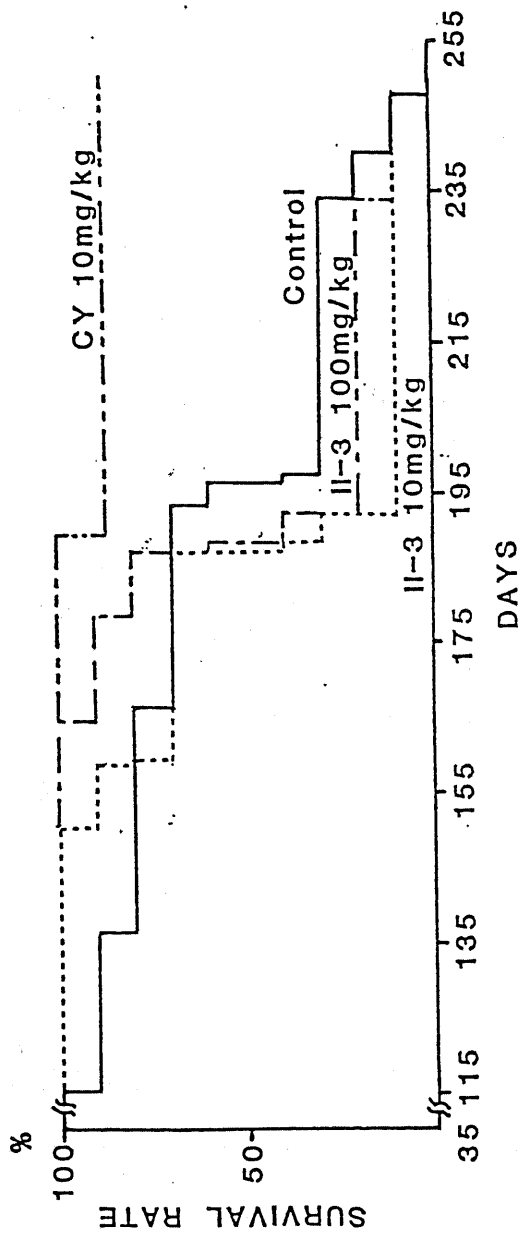


Fig. 13 Survival curves of MRL/l mice treated with 10 mg/kg of II-3(-----), 100 mg/kg of II-3(---), 10 mg/kg of CY(-----), and Control mice(—).

系マウスにII-3, PAを day 0に腹腔内投与したところ、両薬物とも10mg/kg でPFC数が増加した (Fig.14A)。57週令 Balb/C 系マウスにII-3, PAを day 0に腹腔内投与したところ、PFC数は 100mg/kg のII-3で有意に増加したが、同量のPAではわずかであった (Fig.14B)。II-3及びPAを day 0にBWF₁ マウスに腹腔内投与すると、ともにPFC数が減少した (Fig.14C)。

以上のことから、II-3はPAと同様にBDF₁ 系マウスや老齢 Balb/c 系マウスで免疫反応が低下している場合は亢進させ、一方、BWF₁ マウスで免疫機能が亢進している場合は抑制することが判った。

(2-7) リンパ球幼若化反応 (LTR) における薬物作用

mitogen 無添加条件下ではII-3及びPAはLTRに対して作用を示さなかった (Fig.15A)。ConA添加条件下では、II-3では10 μ g/mlで、PAは0.3, 3, 10 μ g/mlでDNA合成の促進がみられた (Fig.15B)。LPS添加条件下ではII-3では 10, 30 μ g/mlで、PAでは 0.3~3 μ g/mlでDNA合成の促進が認められた (Fig.15C)。以上のことから、II-3はPAと同様にリンパ球機能を促進する作用のあることが判った。

(2-8) カラゲニン後肢浮腫 (CE) における薬物作用

1群5~6匹の Wistar 系雄性ラットに1% carrageeninを注射して浮腫をおこした。100mg/kg のI-1, II-2, II-3, PAを経口投与した。対照群での後肢浮腫量は0時間で0.99 \pm 0.04ml (平均 \pm 標準偏差), 3時間で1.75 \pm 0.07ml, 5時間で1.69 \pm 0.08mlであった。これらの薬物はCEに対して効果はなかった。PAと同様にこれらのPA関連化合物には抗炎症作用がなく、従って、抗リウマチ作用は抗炎症作用に依るのではなく免疫系を介した作用であることが示唆された。

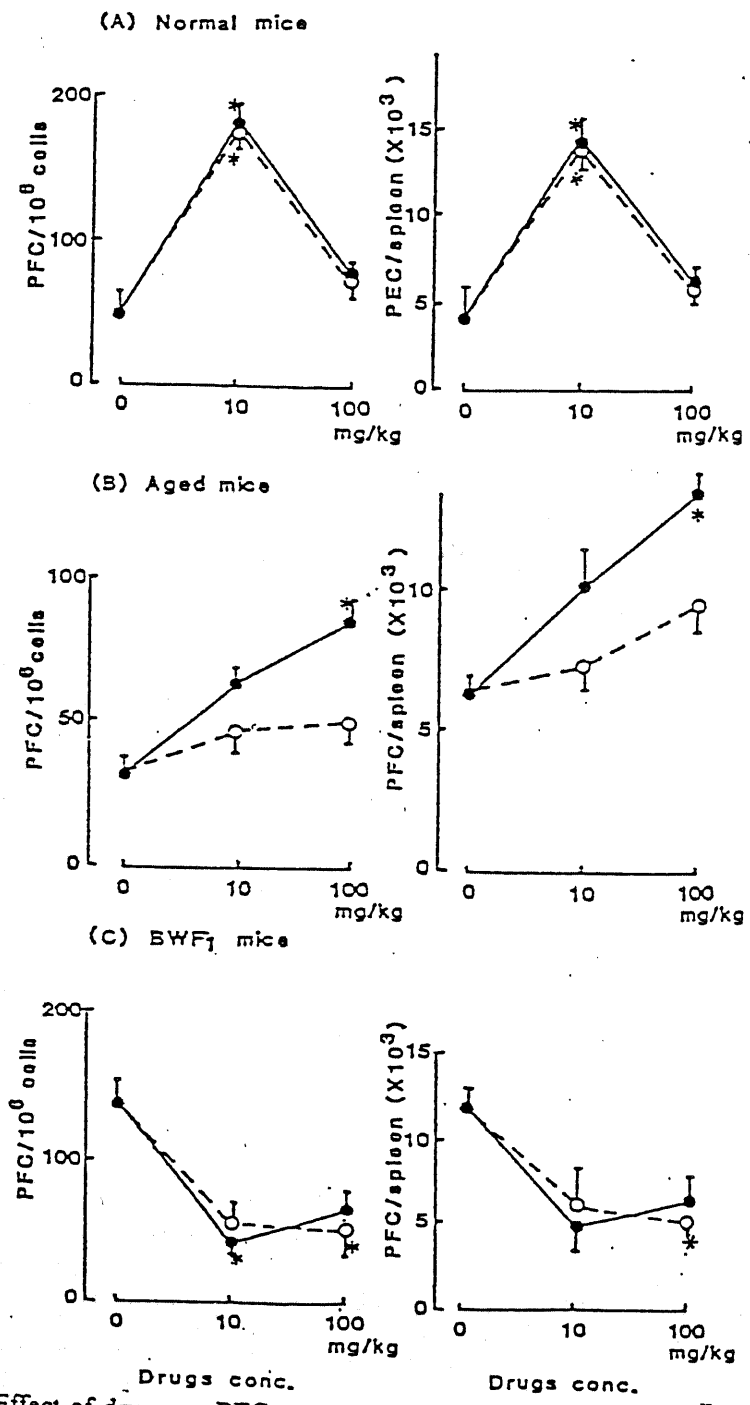


Fig. 14 Effect of drugs on PFC response in mice. (A) Normal BDF₁ mice. (B) Aged Balb/c mice were intravenously injected with 4×10^6 SRBC. (C), BWF₁ mice were intraperitoneally injected with 5 μ g LPS. Animals were treated intraperitoneally with II-3 (●—●) or PA (○—○) on day 0. *, ** Significantly different from control at $p < 0.05$ and $p < 0.01$, respectively.

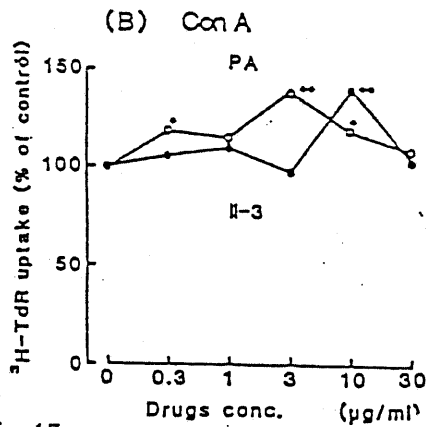
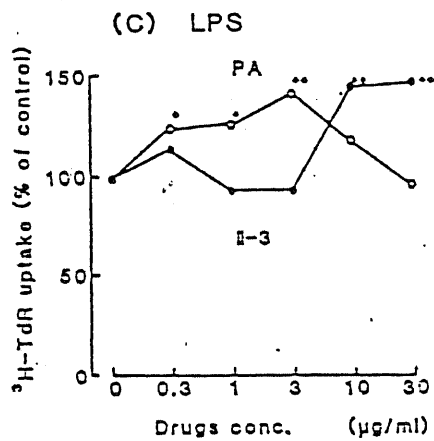
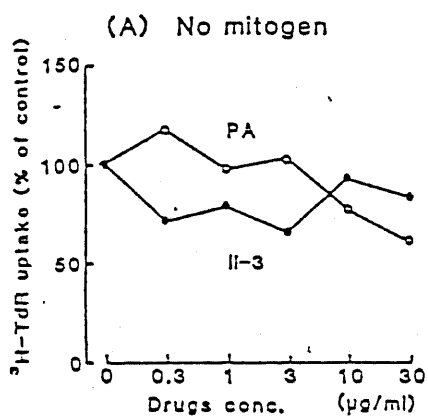


Fig. 15 Effect of drugs on LTR in mice. (A) No mitogen. (B) Con A-induced lymphocyte transformation. (C) LPS-induced lymphocyte transformation. Drugs were added to medium at the beginning of incubation. Results are shown as the % of control. *, ** Significantly different from control at $p < 0.05$ and $p < 0.01$, respectively.

(2-9) 遅延型アレルギー (DTH) における薬物作用

Balb/c系マウスを感作し反応を惹起した。薬物は day 0から day 3まで経口投与した。Table 6に示したように、100mg/kg PAはSRBCに対するDTHを抑制した。I-1, II-1, II-3, I-2及びCCAはDTHに対して効果を示さなかった。30mg/kg CYはDTHを促進したが、50mg/kg ではDTHを抑制した。PA関連化合物は細胞性免疫に対しては作用のないことが示唆された。

(2-10) IgE抗体産生における薬物作用

1群8匹のBalb/c系マウスをOAとalumで感作した。II-3, PA及びCYをday 0に腹腔内投与した。II-3及びPAは作用がなかった。CYは125mg/kgで有意に反応を抑制した (Fig. 16)。

(2-11) 老齡MRL/l系マウスの腹腔マクロファージからのライソゾーム酵素遊離に対する作用

10,30 μ g/mlのII-3は老齡MRL/l系マウス腹腔マクロファージからのライソゾーム酵素即ち、acid phosphataseやN-acetyl- β -D-glucosaminidaseの遊離を抑制した (Table 7)。

PAは3~30 μ g/mlで遊離を抑制した。CCAは酵素の遊離に対して作用を示さなかった。LMSは遊離を抑制したが有意差はなかった。若齡MRL/l系マウスではライソゾーム酵素の遊離は起こらなかったため、老化に伴いマクロファージ機能が異常となり、PAとII-3にはマクロファージ機能を是正する作用のあることが判った。

3. 考 察

免疫薬理学的作用がより特異的になることを目的としてPA関連化合物を合成し、その免疫薬理学的効果を調べPAの作用と比較した。PAは免疫抑制作

Table 6 Effects of drugs on delayed type hypersensitivity (DTH) to SRBC in mice.

Exp. No.	Drug	Dose (mg/kg)	Increase in thickness ($\times 0.01$ mm)	% of C
Exp. 1.	Control	—	155.0 \pm 5.6	100
	I-1	10	165.0 \pm 7.9	106.5
		100	155.0 \pm 6.1	100
	II-1	10	153.1 \pm 9.0	98.8
		100	158.8 \pm 8.0	102.5
	II-3	10	140.6 \pm 6.1	90.7
100		148.8 \pm 5.6	96.0	
Exp. 2.	Control	—	153.1 \pm 4.9	100
	I-2	10	155.0 \pm 5.9	101.2
		30	139.4 \pm 7.1	91.1
		100	143.6 \pm 3.0	93.8
Exp. 3.	Control	—	144.3 \pm 4.4	100
	PA	10	154.3 \pm 7.8	106.9
		100	122.5 \pm 8.5*	84.9
Exp. 4.	Control	—	153.1 \pm 4.9	100
	CCA	10	148.6 \pm 2.4	97.1
		30	159.4 \pm 8.3	104.1
		100	147.5 \pm 5.8	96.3
Exp. 5.	Control	—	122.5 \pm 4.0	100
	CY	30	145.6 \pm 5.5**	118.9

DTH was elicited as described in Materials and methods. Drugs were given p.o. daily from day 0 to day 3. Data represented the mean \pm S.E. for 8 mice and % of control (C). *** Significantly different from the Control (Cont) at $p < 0.05$ and $p < 0.01$, respectively.

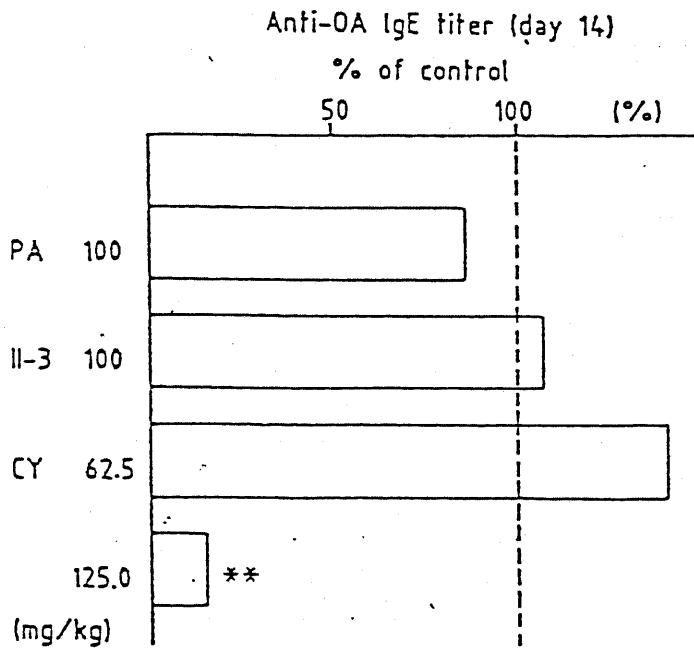


Fig. 16 Effect of drugs on IgE antibody response in mice. Balb/c mice were immunized with 1 μ g OA and 4 mg alum. They were treated subcutaneously with 100 mg/kg of II-3, and PA, and 62.5 mg/kg, 125 mg/kg of CY on day 0. Results were shown as the % of control. ** Significantly different from control at $p < 0.01$.

Table 7 Effects of drugs on the abnormal release of lysosomal enzymes from the peritoneal macrophages in MRL/l mice.

Exp. No.	Drug	Concentration (µg/ml)	Acid phosphatase (% of release)	% of inhibition	N-Acetyl-β-D-glucosaminidase (% of release)	% of inhibition
Exp. 1.	Cont	—	11.3±1.0	—	17.3±2.2	—
	II-3	1	12.1±1.1	-7.1	18.7±1.2	-8.1
		3	9.7±0.7	14.2	15.9±0.3	8.1
		10	8.6±0.6*	23.9	13.7±0.3*	20.8
		30	10.9±0.5	3.5	12.7±0.7*	26.6
Exp. 2.	Cont	—	8.3±0.8	—	19.5±0.1	—
	PA	3	6.2±0.4	24.4	14.9±0.2**	23.9
		10	5.2±0.3*	37.5	16.2±0.3**	17.2
		30	5.5±0.0*	33.9	15.9±0.5**	18.6
Exp. 3.	Cont	—	29.2±2.6	—	33.3±5.1	—
	CCA	1	41.1±2.7	-40.8	35.8±1.0	-7.5
		3	38.3±1.7	-31.2	41.7±3.5	-25.2
		10	36.6±3.2	-25.3	37.0±1.1	-11.1
		30	32.7±0.6	-12.0	34.7±1.4	-4.2
Exp. 4.	Cont	—	13.3±0.7	—	16.3±0.3	—
	LMS	1	11.4±1.1	14.3	15.5±0.8	4.9
		3	11.2±1.3	15.8	14.0±0.1	14.1
		10	12.5±0.8	6.0	14.0±0.1	14.1
		30	12.4±0.6	6.8	19.8±3.5	-21.5

The peritoneal macrophages in MRL/l mice were cultured as described in Materials and methods. Data represented % of release (mean ± S.E.) and % of inhibition. *** Significantly different from the control (Cont) at $p < 0.05$ and $p < 0.01$, respectively.

用と免疫調節作用を有している。免疫調節作用に関しては、PAは非特異的 mitogen 刺激によるLTRに対して低濃度で促進、高濃度で抑制という二相性の変化を示すこと、低用量の結核死菌による軽微なAAを重症化し、抗原量が少なく免疫応答の低下条件下でのマウスPFC数を増加させること(115)及びマウスにストレス負荷を与えて免疫機能を低下させた状態でIgE抗体産生を回復させる(110)ことが報告されている。一方、PAは遺伝的に免疫機能が亢進しているBWF₁マウスに投与した場合は、抑制効果を示す(Fig.14C)。大部分の免疫調節剤、例えばPA(6-12)、プシラミン(16-19)、カプトプリル(20,21)、チオプロニン(13-15)は構造の中にSH基を有している。従って、PA関連化合物はベンゾイルプロピオン酸を基本構造とし、カルボキシル基からの α 位または β 位にSAc基を置換した。

その結果、新たに合成したPA関連化合物は免疫調節作用のみを有していることが判った。即ち、II-3はSRBCに対してlow responderであるBDF₁系マウス及び免疫機能の低下している老齢マウスで免疫機能を回復させた(Fig.14A,14B)。一方、II-3は免疫機能の亢進しているBWF₁マウスで免疫機能を抑制した(Fig.14C)。II-3はin vivoではSD系ラットでAAを抑制し(Table 5)、LEW系ラットのAA及びCAを促進した(Fig.10,11)。in vitroではLTRを他の免疫調節剤のように促進した(Fig.15)。一方、BWF₁マウス、MRL/l系マウスではII-3の延命効果はほとんど認められなかった(Fig.12,13)。このBWF₁マウス及びMRL/l系マウスの実験モデルは免疫抑制作用をもつ化合物の評価には適当である(117-119)が、免疫調節作用をもつ化合物の検討には不適である。CCAは免疫調節剤であるが、これらのマウスに延命効果を示さなかった(Fig.12C)。PAはBWF₁マウスの延命効果があるが、それは免疫抑制作用によるものと考えられる(Fig.12A,12B)。BWF₁マウス及びMRL/l系マウスは自然発症自己免疫疾患マウスでRAの動物モデルとしてその病態の解明、抗リウマチ剤の薬効評価に用いられてき

ているが、ヒトのRAに効果を示す免疫調節剤では抑制効果は認められなかった。これは両マウスでの発症状態がヒトのRAに比べ激烈なためと考えている。BWF₁マウスでは生後3カ月頃により抗DNA抗体が出現し、生後5～6カ月で高抗体価を示し、7～8カ月になると非常に明瞭な糸球体腎炎を発症する。その頃より大量な蛋白尿が続き、血中BUNの上昇がおき腎不全で死亡する(120)。このBWF₁マウスにおける腎炎は、抗DNA抗体-DNA複合体と補体が沈着しており(121)、ヒトのループス腎炎とほとんど同じと考えられている。しかしながら、ヒトのRAの発症機序は自己免疫異常ではあるが、腎障害はほとんど生じない(3)。一般にRAは生命に対する予後は良好である。MRL/l系マウスでは全身性エリテマトーデス(SLE)類似の病変として抗核抗体、抗DNA抗体、高ガンマグロブリン血症、免疫複合体等が生じる。さらにリンパ腫、血管炎、多発性関節炎、脾腫及び増殖性糸球体腎炎等が発症してくる。リンパ腫は8週令前後に出現し始め、16週令までに正常のものの100倍以上の重量を有する(122)。しかしながら、ヒトRAではリンパ腫、脾腫、腎障害はほとんど発症せず、類似点は主として多発性関節炎が発症すること、リウマチ因子が存在すること(3)のみである。以上のことから、両マウスの発症はRAと同じく自己免疫異常により生じるが、症状の発現が異なり、症状の発症程度は生命が危ぶまれる等の非常に重症であることが判る。RAにおいて第一選択薬剤は非ステロイド系抗炎症剤であり、第二選択薬剤はPA、ATM等の特異的抗リウマチ剤である。RAの重症化に伴い、副腎皮質ステロイド、CY、6-MPなどの免疫抑制剤が使用され、有効性が認められている。従って、両マウスで効果を示す薬剤は免疫抑制作用を有しているものであり、純粹に免疫調節作用のみを有する化合物には効果は認められないと考察された。

脂溶性を増すためにフェニル基をPA関連化合物に導入したところ、SD系ラットAAにおけるPA関連化合物の抑制効果はPAよりも強くなった(Table

5)。フェニル基へのハロゲン原子やアルキル基の導入はSD系ラットAAでの抑制効果を増大させた (Table 5)。これは機能蛋白質の活性中心の近傍構造と、フェニル基に置換基のついた構造が立体構造により適合し、また、フェニル基上の電子密度が高まり、カルボニル基が活性化され、結合性が増したものと考えられる。カルボキシル基から α 位もしくは β 位にSAc基を置換したPA関連化合物はPAと同様に免疫調節作用を有していたが、免疫抑制作用は消失しており、特にII-3はPAよりも免疫調節作用が強かった。よって、免疫異常によって引き起こされる疾患、例えば、RA、全身性エリテマトーデス等の治療薬として有用であると思われる。

4. 小 括

PAは1つの薬剤で免疫抑制作用と免疫調節作用をあわせもつが、免疫薬理学的作用がより特異的になることを目的として種々の化学修飾を行った。即ち、作用発現に必須であるCOOH基はそのまま残して親水性を保ち、さらに組織への薬物の移行を高めるため、フェニル基を導入したベンゾイルプロピオン酸を基本構造とした。又、PAの活性基であるSH基をSAc基とし、体内で活性体に転換するようにした。その結果、フェニル基を導入するとPAより強い免疫調節作用が認められた。その作用はフェニル基上にハロゲン、アルキル基等の置換基導入によりさらに強まった。カルボキシル基から α 位又は β 位にSAc基を有する化合物はPAと同じくAAの抑制、CAの促進、LTRの促進、低用量感作PFC及び老齢マウスPFCの促進など免疫調節作用を示した。一方、免疫抑制剤のみが効果を示すMRL/l系マウス及びBWF₁マウスでは延命効果がなく、免疫抑制作用を有していないことが判った。

第2節 カルボキシル基から γ 位にS A c基を有するベンゾイルメルカプトプロピオン酸誘導体の免疫薬理学的作用（免疫抑制作用）

第II章第1節において、カルボキシル基から α 位又は β 位にS A c基を有するP A関連化合物は免疫調節作用を有していることが判った。次にS A c基を γ 位に有する化合物について検討を行った。

1. 実験材料及び実験方法

(1-1) 実験動物

7～9週令のSD系雌性ラット，LEW系雌性ラット，BDF₁系雌性マウス及びBalb/c系雄性マウス（日本チャールスリバー社）を用いた。第I章と同様に飼育した。

(1-2) 薬物

Table 8 に構造式を示した。ベンゾイルメルカプトプロピオン酸誘導体は亀尾らの方法(115)で合成した。5-フルオロウラシル(5-FU, Sigma社)は培地に溶解して用いた。

(1-3) AA

第II章第1節と同様に行った。

(1-4) DTH

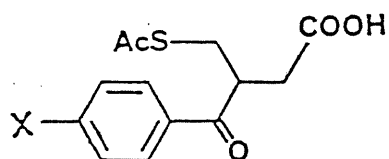
第II章第1節と同様に行った。

(1-5) I g E抗体産生

第II章第1節と同様に行った。

(1-6) BWF₁マウス腎炎

Table 8 The structural formulas of Compound III-1~IV-5.



Compound III	X	Compound IV	X
1	H	1	
2	4-Br	2	
3	4-Cl	3	
4	4-CH ₃	4	
5	4-(CH ₃) ₂ CH	5	

第Ⅱ章第1節と同様に行った。

(1-7) LTR

第Ⅱ章第1節と同様に行った。

(1-8) In vitro 細胞障害性試験

KB細胞は癌化学療法研究所から戴いた。細胞の培養は10% FCS (Flow社) 加MEMに gentamycin 80 μ g/ml (Schering社) を加えて用い、6穴プレート (Falcon plastics社) の各wellに細胞浮遊液 2ml (2×10^4 個/well) を添加した。Cell の付着のため24時間培養した後、各濃度の薬物液20 μ l を添加し、さらに72時間培養した。細胞をはがすために0.25% trypsin-EDTA を添加し、5分間培養した後に、細胞数をZMコールターカウンターで測定した。

(1-9) 統計処理

student's t-test検定を用いた。MSTは第Ⅰ章第1節と同様に計算した。

2. 実験結果

(2-1) SD系ラットAA予防試験における薬物効果

1群10~11匹のSD系ラットを用いた。SD系ラットに牛結核死菌を投与してAAを誘導した。day 0 から day 20 まで、Compound III, Compound IV及びPAの100mg/kg, CYの1又は10mg/kg, 6-MPの3又は30mg/kgを連続経口投与した。Fig.17 に示したようにIV-1及びIV-5を除いたCompound III及びCompound IVは足趾浮腫量を有意に抑制した。IV-1, IV-5, PA及び3mg/kg 6-MPは浮腫の抑制傾向を示した。すべての mono-phenyl compounds (Compound III) はAAに対して同程度の抑制作用を示した。di-phenyl compounds (Compound IV) においてはIV-4, 4-acetylthio-3-

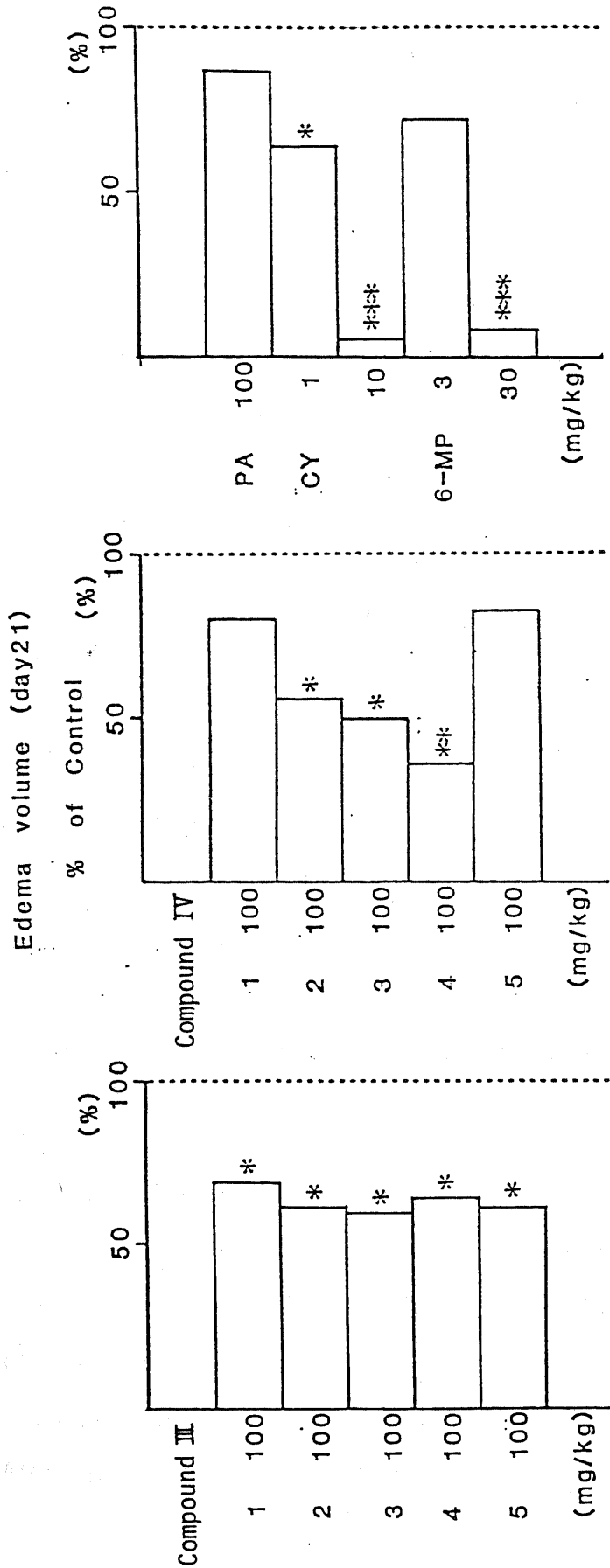


Fig. 17 Effect of drugs on the oedema volumes of foot pads in SD rats with developing AA lesions. SD rats were inoculated with 0.6 mg of *Mycobacterium butyricum* in liquid paraffin to induce AA. They were treated orally with 100 mg/kg of Compound . and PA, 1 mg/kg and 10 mg/kg of CY, and 3 mg/kg and 30 mg/kg of 6-MP from day zero to day 20. Results are shown as the percent of control. * , ** , *** mean significantly different from control at $p < 0.05$, $p < 0.01$ and $p < 0.001$, respectively.

[4-(4-chlorophenyl)benzoyl]butyric acidは最も強い抑制効果を示した。

又、Compound IVにおいてハロゲン原子の phenyl 基への導入は免疫抑制作用を増強させた。

(2-2) LEW系ラットAA予防試験における薬物効果

1群8匹のLEW系ラットを用いた。ラットに牛結核死菌を投与してAAを誘導した。day 0 から day 20 までⅢ-5, IV-4, IV-3, IV-2及びPAの100mg/kg及びCYの10mg/kgを連日経口投与した。Fig.18に示したように、IV-4, IV-3, IV-2及びCYは足趾浮腫量を抑制した。PAは足趾浮腫量を促進した。Ⅲ-5に作用は認められなかった。

結果として、di-phenyl compoundはmono-phenyl compoundよりも抑制効果が強いのが判った。カルボキシル基から γ 位にSAc基を有する化合物は免疫調節作用を有さず、免疫抑制作用のあることが判った。

(2-3) DTHにおける薬物作用

1群8匹のBalb/c系マウスを用いた。薬物はday 0からday 3まで経口投与した。Fig.19に示したように10及び100mg/kg IV-4, 100mg/kg PA及びCYはDTHを抑制したが、Ⅲ-5に作用は認められなかった。細胞性免疫に対する抑制作用はdi-phenyl compoundの方がmono-phenyl compoundよりも強いことが判った。

(2-4) IgE抗体産生における薬物作用

1群8匹のBalb/c系マウスを1 μ g OAと4mgのアラムとで感作した。100mg/kgのIV-4, IV-3, IV-2及びPA, 62.5mg/kg, 125mg/kgのCYはday 0に皮下投与した。

その結果、IV-4及びCYはIgE抗体産生を有意に抑制した。しかし、他の薬物には効果は認められなかった(Fig.20)。IV-4は他のPA関連化

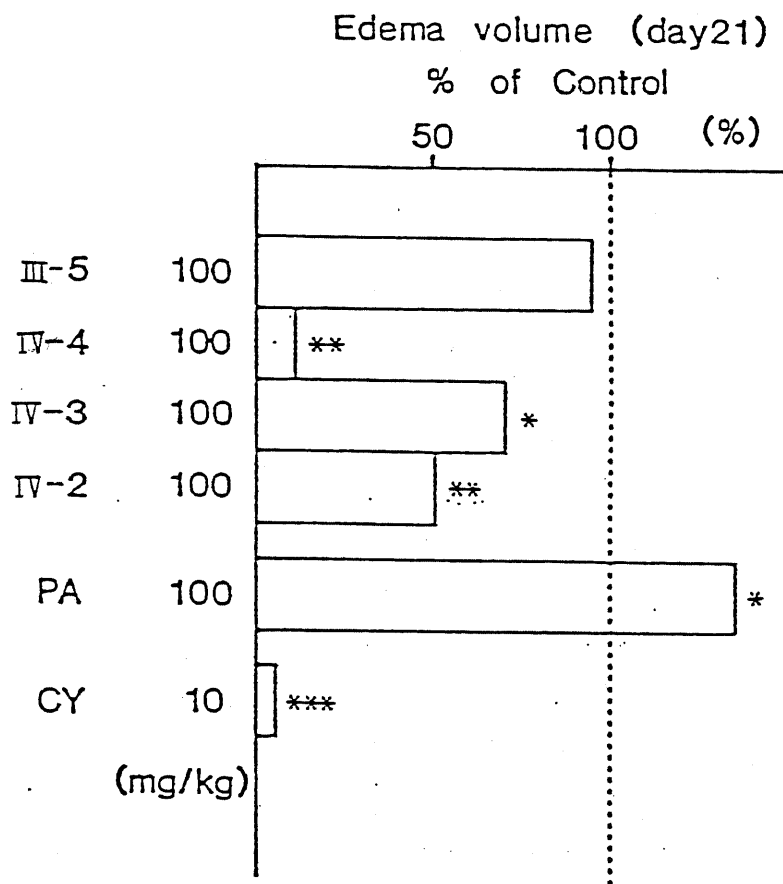


Fig. 18 Effect of drugs on the oedema volumes of foot pads in Lewis rats with developing AA lesions. Lewis rats were inoculated with 0.6 mg of *Mycobacterium butyricum* in liquid paraffin to induce AA. They were treated orally with 100 mg/kg of Compound and PA, and 10 mg/kg of CY, from day zero to day 20. Results are shown as the percent of control. *, **, *** mean significantly different from control at $p < 0.05$, $p < 0.01$ and $p < 0.001$, respectively.

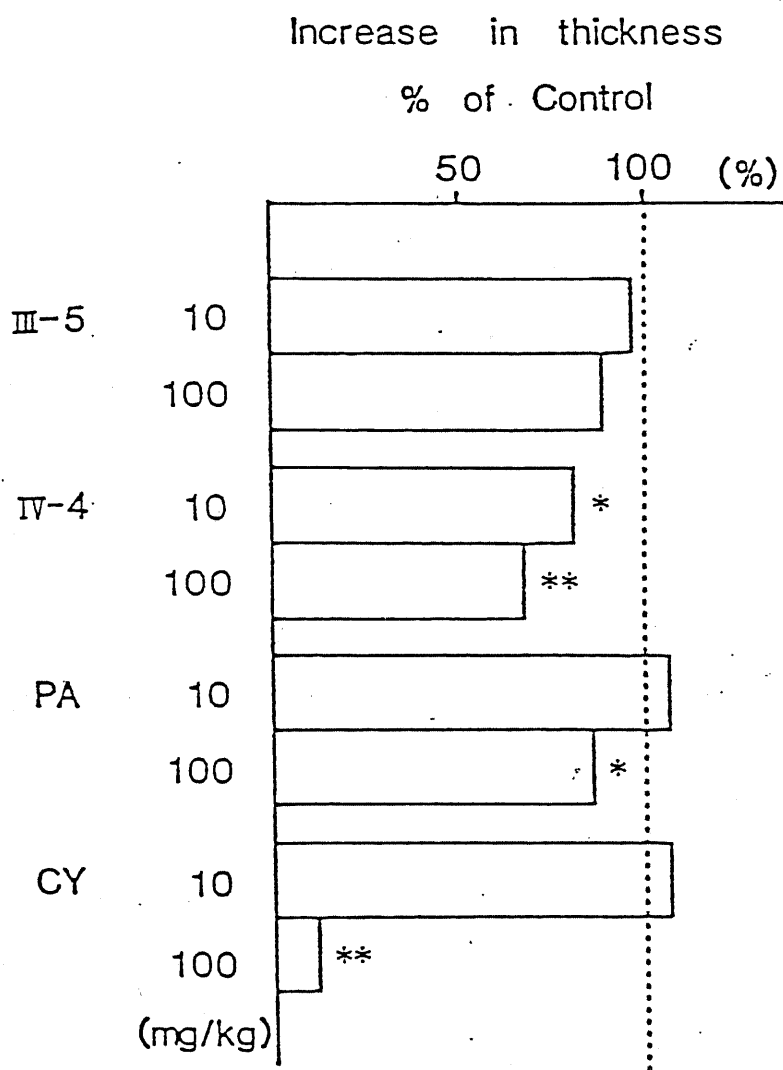


Fig. 19 Effect of drugs on DTH to SRBC in mice. Balb/c mice were immunized. They were treated orally with 10 mg/kg and 100 mg/kg of Compound and CY from day zero to day 3. Results are shown as the percent of control. *, ** mean significantly different from control at $p < 0.05$ and $p < 0.01$, respectively.

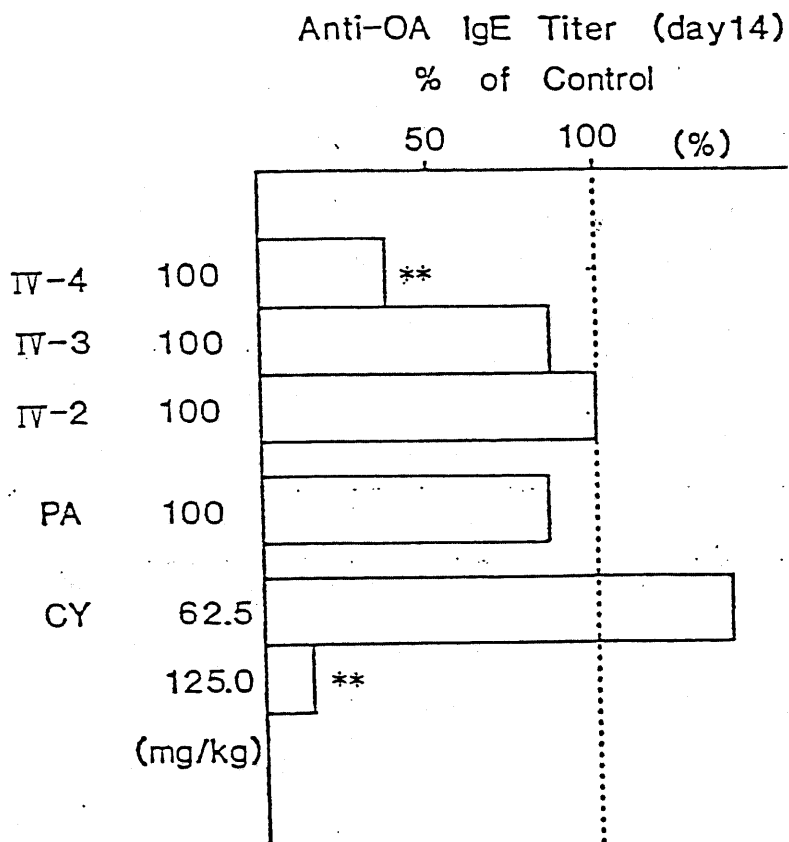


Fig. 20 Effect of drugs on IgE antibody response in mice. BDF₁ mice were immunized with 1 μ g OA and 4 mg alum intraperitoneally. They were treated with 100 mg/kg of Compound. and PA, and 62.5 mg/kg and 125 mg/kg of CY, subcutaneously at day zero. Results are shown as the percent of control. ** means significantly different from control at $p < 0.01$.

合物と比べ最も抑制効果が強かった。

(2-5) BWF₁ マウスの延命効果に対する薬物効果

1群10~13匹のマウスを用いた。100mg/kgのIV-4及びPAは週3回、経口投与した。10mg/kgのCYは週1回、腹腔内投与した。Fig.21に薬物投与群と対照群との生存曲線を示した。IV-4, PA, CY, 対照群のMSTは各々328.5日、>328.5日、>328.5日、259.5日であった。IV-4, PA, CYは延命効果があった。3剤とも蛋白尿の出現を抑制した。IV-4は免疫抑制剤であることが判った。

(2-6) LTRにおける薬物作用

Mono-phenyl compounds (Compound III)であるIII-1, III-3, III-5はmitogenの無添加条件下、ConA刺激条件下及びLPS刺激条件下でDNA合成を抑制した(Fig.22 A,B,C)。Di-phenyl compounds (Compound IV)であるIV-2, IV-4も同様にDNA合成を抑制した。IV-4は最も抑制効果が強かった(Fig.23 A,B,C)。PAは免疫調節剤であるが、mitogen無添加条件下でのLTRには作用はなかった。ConA刺激及びLPS刺激条件下では0.3~10 μ g/mlで促進作用を示した(Fig.23 A,B,C)。Mono-phenyl compound及びdi-phenyl compoundともリンパ球機能を抑制することが判り、PAとは作用が異なっていた。

(2-7) In vitroでの制癌作用

IV-4, 5-FUはKB細胞の増殖を濃度依存的に抑制した。IV-4及び5-FUのIC₅₀は実験1では各々1.65, 0.27 μ g/ml、実験2では2.96, 0.55 μ g/mlであった(Fig.24)。IV-4はin vitroで5-FUよりは弱い、制癌作用のあることが判った。

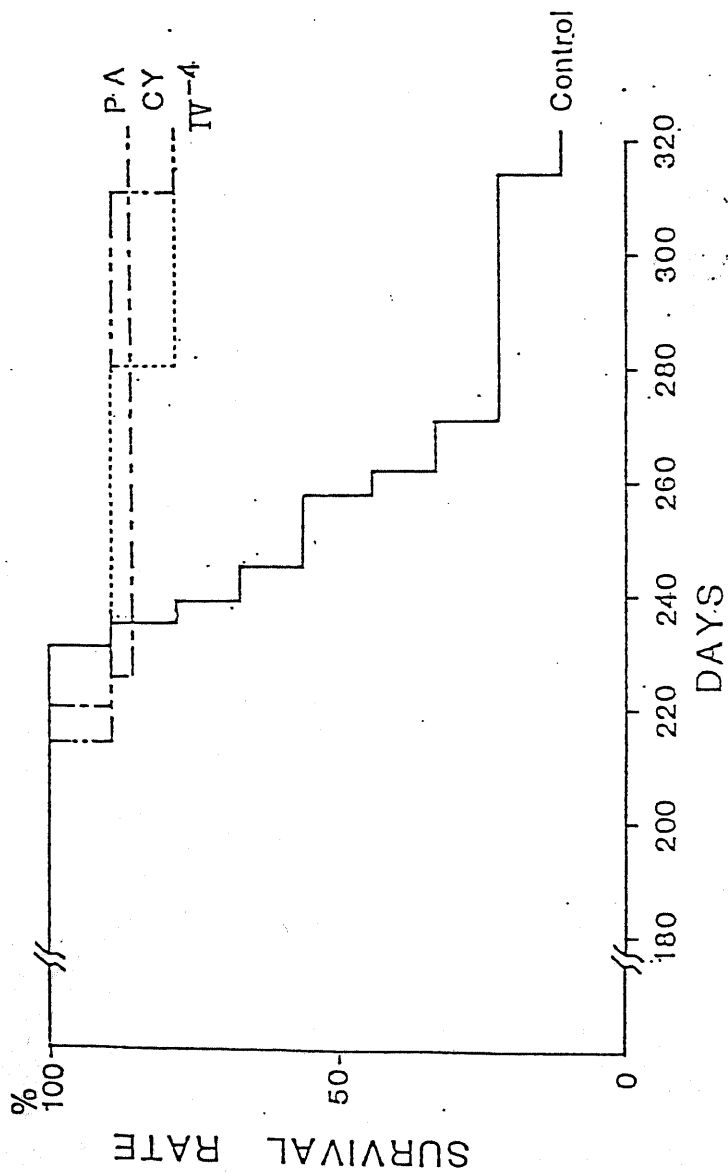


Fig. 21 Effect of drugs on the survival time of BWF₁ mice. Survival curves of BWF₁ mice treated with 100 mg/kg of IV-4 (.....) and PA (---); mice treated with 10 mg/kg of CY (-.-.-); and control mice (—).

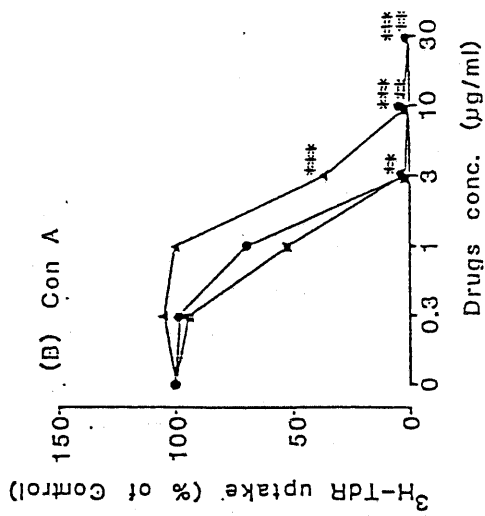
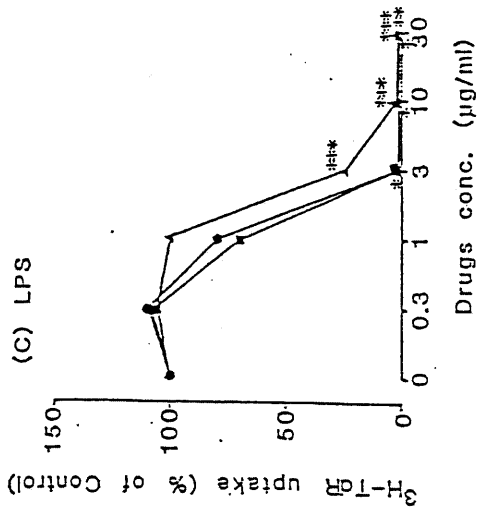
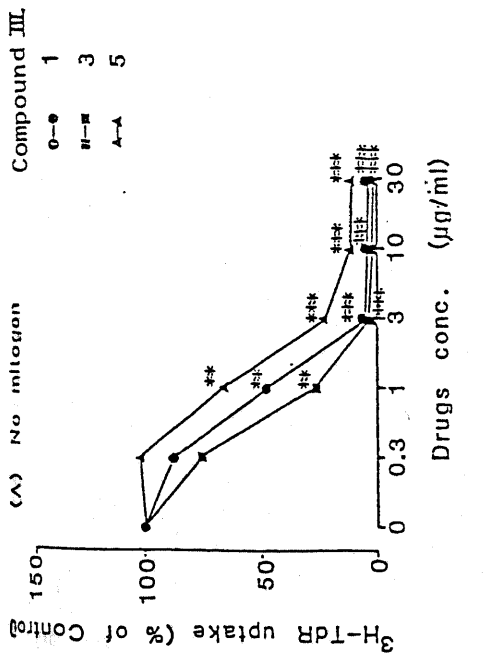


Fig. 22 Effect of Compound III on LTR in mice. Spleen cells of BDF₁ mice were cultured.

Drugs were added at the same time as mitogens. (A) No mitogen; (B) the Con A-induced LTR; (C) the LPS-induced LTR. *...*** mean significantly different from control at $p < 0.05$, $p < 0.01$, and $p < 0.001$, respectively.

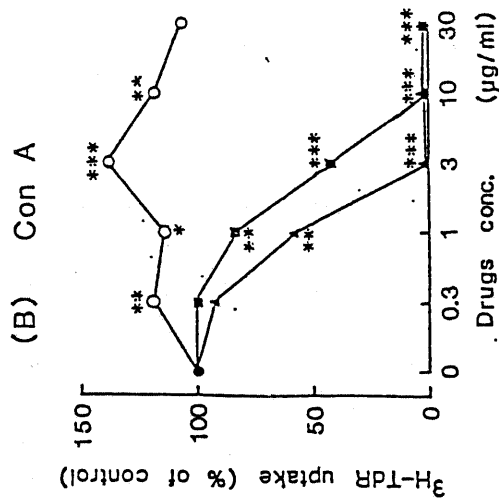
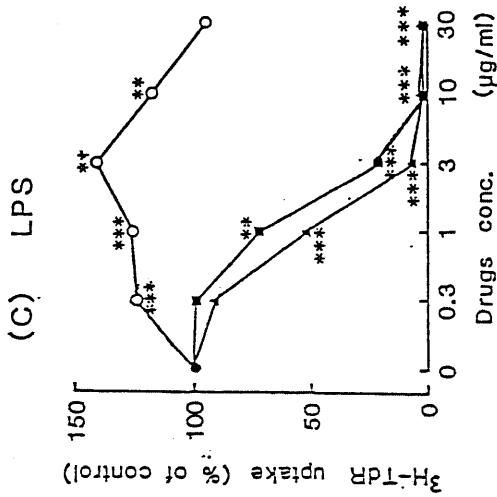
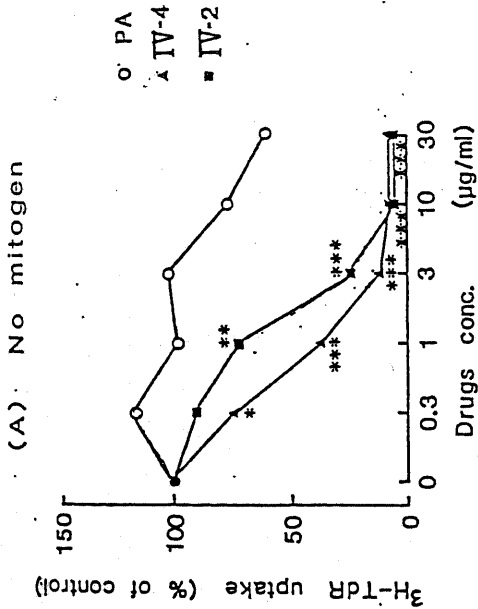


Fig. 23 Effect of Compound IV on LTR in mice. Spleen cells of BDF₁ mice were cultured

Drugs were added at the same time as mitogens. (A) No mitogen; (B) the Con A-induced LTR; (C) the LPS-induced LTR. mean significantly different from control at $p < 0.05$. $p < 0.01$; and $p < 0.001$, respectively.

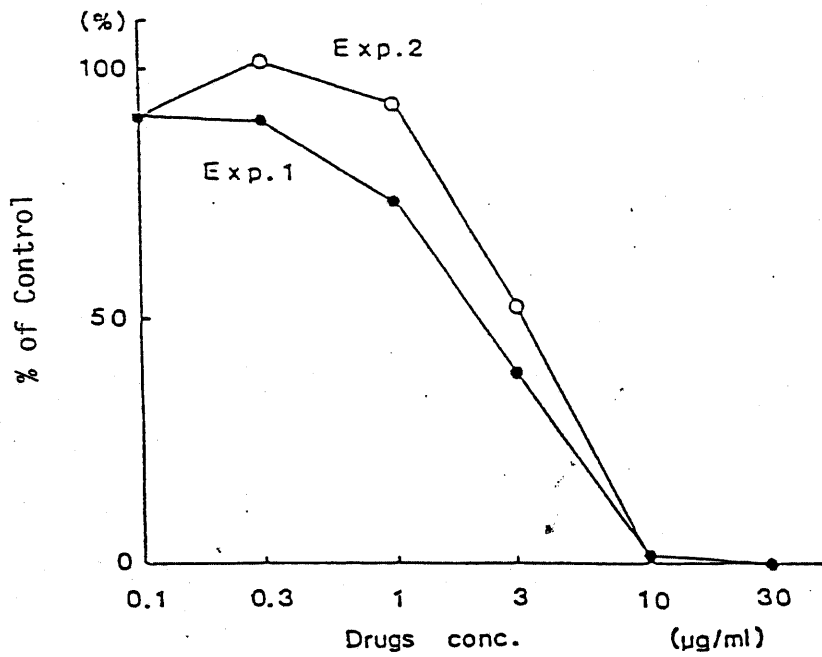


Fig. 24 Anticancer effect of 17-4 on KB cells *in vitro*. KB cells were cultured,

3. 考 察

PAの正確な薬効メカニズムは不明のままであるが、その抗リウマチ効果は、免疫抑制作用と免疫調節作用とによると思われる。PAは免疫抑制作用を次のような条件下で示す。即ち、(1) 長期間投与(74)及び (2) 高用量投与の場合(74)で恐らく、リンパ球の活性を抑制することにより生じるものと思われる。

今回、新規のPA関連化合物の合成を次のような目的のために行った。即ち、(1) 2つの異なった免疫薬理学的作用である免疫抑制作用と免疫調節作用の分離 (2) 免疫薬理学的作用の増強及び (3) 副作用の出現の軽減である。カルボキシル基から α 位もしくは β 位にSAc基を置換した薬物は免疫調節作用のみを示したため、次にSAc基を γ 位に置換した薬物の合成を行い、免疫薬理学的作用を検討した。

その結果、 γ 位にSAc基を置換した化合物はAA, LTR, マウスIgE抗体産生, DTH, KB細胞増殖をすべて抑制し、免疫調節作用を消失しているかわりにPA以上に強い免疫抑制作用を示した。今回の実験モデルにおいては純粋に免疫調節作用のみを有する化合物はSD系ラットAA抑制作用, LEW系ラットAA促進作用を示すが、BWF₁又はMRL/l系マウスに対しては延命効果を示さない。PAの様に免疫調節作用と免疫抑制作用を有する化合物はSD系ラットAA抑制作用, LEW系ラット促進作用を示し、さらにBWF₁及びMRL/l系マウスで抑制効果がある。免疫抑制作用のみを有する化合物はSD系ラット及びLEW系ラットAA抑制作用, BWF₁及びMRL/l系マウスでの延命効果を示すと考えている。PAは免疫調節作用と免疫抑制作用の両効果を併用するが、カルボキシル基から α 位もしくは β 位にSAc基を有する化合物は免疫調節作用のみ、 γ 位にSAc基を有する化合物は免疫抑制作用のみ発揮し、化学修飾による作用の特異性の発現が認められた。何故、 α 位もしくは β 位にSAc基を有する化合物は免疫調節作用を、 γ 位にSAc基を有する化合物は免疫抑制作用のみを有するのかは不明であり、今後の課題

である。

4. 小 括

PA関連化合物のうちSAc基を γ 位に有する化合物について、免疫薬理学的作用をPAと比較した。その結果、 γ 位にSAc基を有する化合物はAA, LTR, マウスIgE抗体産生, DTH, BWF, マウス腎炎をすべて抑制し、PA以上に強い免疫抑制作用を示したが免疫調節作用は消失していた。その抑制作用は mono-phenyl compound より di-phenyl compound の方が強く、またフェニル基上にハロゲン原子の置換基導入によりさらに増強された。

第II章第1節, 第2節の結果より、PA関連化合物のうち、カルボキシル基から α あるいは β 位に有する化合物は免疫調節作用を、 γ 位に有する化合物は免疫抑制作用を示し、SAc基の位置により両作用の分離がもたらされ、免疫薬理学的特異性に差が見い出された。

第Ⅲ章 E p - 4 5 9 の化学修飾による免疫薬理学的作用の多様化

E p - 4 5 9 , 3-[3-methyl-1-(4-aminobutylcarbamoyl)butylcarbamoyl]-2-oxirane-carboxylic acid は非常に複雑な構造をしており、活性基周辺に存在するロイシル部分のイソブチル等が立体障害性によって適度に反応性を抑制すること、及び薬物と標的蛋白質の活性中心近傍との相補性の一致により、強い結合性と特異的な免疫薬理学的作用を示すものと思われる。従って、E p - 4 5 9 の場合はシステンプロテアーゼ阻害活性が強いが、免疫薬理学的作用は I g E 抗体産生抑制作用のみに限定される。E p - 4 5 9 については、本質的に蛋白質 S H 基との結合性があるので、構造をある程度単純化することにより、多様な免疫薬理学的作用を発揮することが期待される。本章においては、E p - 4 5 9 の I 型アレルギー抑制作用をマウス以外にモルモットを用いた実験系で検討するとともに、種々の単純な誘導体を合成し、その免疫薬理学的作用の多様性の発現を検討した。

第1節 E p - 4 5 9 の I 型アレルギー抑制作用の各種実験系による検討

E p - 4 5 9 は既にマウス I g G 抗体産生は抑制しないがマウス I g E 抗体産生を強く抑制すること、及び E p - 4 5 9 の I g E 抗体産生抑制作用は脾臓細胞の移入により発揮できたことから、この抑制効果はサプレッサー T 細胞の誘導によることが示唆されている。今回、E p - 4 5 9 投与したマウスを用いた細胞移入実験において、ヘルパー T 細胞及び B 細胞活性を測定し、サプレッサー T 細胞の関与を詳細に検討した。さらにマウス抗体産生系以外にもモルモット喘息モデルにおいても E p - 4 5 9 の作用を検討した。

1. 実験材料及び実験方法

(1-1) 実験動物

8~10週令のBDF₁系雌性マウス（日本チャールスリバー社），9~14週令のWistar系雄性ラット（静岡実験動物農業協同組合）及び250~300gのHartley系雌性モルモット（金丸）を用いた。マウスは床敷きで、ラット及びモルモットは水洗ケージで飼育した。

(1-2) 抗原

卵白アルブミン（OA；生化学工業），bovine gammaglobulin（BGG；Miles社），Keyhole limpet haemocyanin（KLH；東京化成）を用いた。OA，BGG，KLHのdinitrophenyl（DNP）誘導体はEisenらの方法（123）に従って合成した。DNP-OA，DNP-BGG，DNP-KLHは1分子あたりDNPを17.4，15.17，10.37個含有していた。

(1-3) アジュバント

Aluminium hydroxide gel（alum）はOvaryらの方法（124）で調製した。

(1-4) 薬物

Ep-459は当研究所で合成し、構造式をFig.25に示した。CY（塩野義製薬），Mitomycin C（MMC；協和発酵）を用いた。

(1-5) 細胞移入実験及び抗体価測定

Ep-459の抑制作用を調べるために1 μ g OAとalumで感作したマウス（donor）からの 8×10^7 脾臓細胞を同系のX線照射したマウス（recipient）に移入した。移入後、直ちにrecipientを1 μ g OAとalumで感作した。細胞懸濁液はRPMI-1640培地を用いて調製し、生存率はトリパンブルー染色により、常に90%以上であった。Recipientは細胞移入の24時間前に600rad照射を行った。Ep-459はdonorにおいて感作と同時に投与した。Recipientからの採血はday 7，10，14，21に行った。Donorは1群15匹の

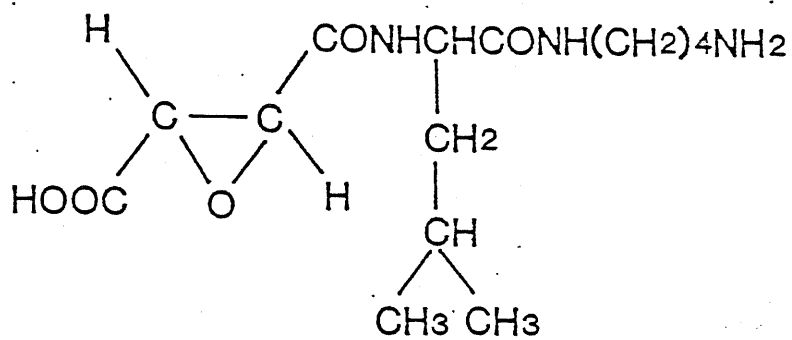


Fig. 25 Chemical structure of Ep-459.

BDF₁系マウス、recipient は1群10匹のBDF₁系マウスを用いた。

ヘルパーT細胞及びB細胞活性を測定するために、1群は10 μ g DNP-KLHと alum で感作し2週間後に脾臓細胞を摘出しB細胞 source(DNP感作細胞, DNP-primed cells)とした。もう1群は1 μ g OAと alum で感作し、2週間後に脾臓細胞を摘出し、T細胞 source (OA感作細胞, OA-primed cells)とした。4 $\times 10^7$ 個のDNP-primed spleen cellsを4 $\times 10^7$ 個のOA-primed cellsと混合し、X線照射した同系マウスに移入した。移入後、直ちに recipientを1 μ g DNP-OAと alum で感作した。Ep-459はDNP-KLH感作したマウス(DNP-Ep-459感作細胞, DNP-Ep-459 primed cells)、もしくはOA感作したマウス(OA-Ep-459感作細胞, OA-Ep-459 primed cells)に腹腔内投与した。Recipientからの採血はday 10に行った。Donorは1群15匹のBDF₁系マウス、recipientは1群10匹のBDF₁系マウスを用いた。

別の実験においては1 μ g OAと alum で感作後、2週間目の donorからの spleen cellsを37 $^{\circ}$ C、2時間、600 μ g/ml Ep-459 (Ep-459処理細胞, Ep-459 treated cells)又は37 $^{\circ}$ C、45分、50 μ g/ml MMC (MMC処理細胞, MMC treated cells)と incubationした。薬物処理しない spleen cellsはFCS含 RPMI-1640培地のみで incubationした。spleen cellsを洗い、8 $\times 10^7$ 個をX線処理した同系マウスに移入した。細胞移入後、直ちに recipientは1 μ g OAと alum で感作した。Donorは1群15匹のBDF₁系マウス、recipientは1群10匹のBDF₁系マウスを用いた。

抗体価はラットPCAで測定した(124)。2倍希釈した血清の0.1mlを皮内投与し、4時間後に4mg OAと0.5%エバンスブルーを含む抗原液1mlを静脈投与した。30分後に殺し、背部皮膚を摘出し、5mm径の青色斑を示す最

大希釈倍率をもって抗体価とした。

(1-6) 末梢白血球数

1群10匹のBDF₁系マウスを1 μ g OAとalumでday 0に感作した。500mg/kg Ep-459又は125mg/kg CYをday 0に腹腔内投与した。day 4に採血を行い、末梢白血球数をCoulter counter (Model S-Plus, Coulter Electronic Inc. USA)で測定した。

(1-7) モルモット抗原誘発喘息モデル

1群20匹のモルモットをAnderssonらの方法(125-128)に従い、10 μ g OAと100mg alumとで腹腔内投与して感作した。250mg/kg Ep-459はday 0に腹腔内投与した。モルモットはday 13に採血し、抗OAIgE抗体価はモルモットPCA(129)で測定した。

モルモットは2群に分け、1群はネブライザーで5%OAを噴霧し、死亡数を噴霧後15分間測定した。他の1群はday 14に肺組織からのヒスタミン遊離の測定に用いた。

(1-8) モルモット肺からのヒスタミン遊離

10 μ g OAとalumで感作したモルモットを殺し、肺を冷Tyrode solutionで灌流後、カミソリで細切した。肺組織250mgに2.5ml Tyrode solutionを加えて、測定に用いた。最終濃度200 μ g/mlのOAを添加し、37 $^{\circ}$ C, 45分incubationした。反応は試験管を氷冷下において停止させた。肺での全ヒスタミン量は10分間煮沸後、肺組織を除去し、その上清に1/10量の70%過塩素酸を加え、15分間放置し、蛋白質を除いた。上清中のヒスタミン量はKomatsuの方法(130)で測定した。抽出液中のヒスタミン含量はShoreらのspectrophotofluorometric法(131)で測定した。組織から自然に遊離されるヒスタミン量は抗原無添加条件下で測定した。

$$\frac{\text{抗原刺激ヒスタミン量} - \text{自然遊離ヒスタミン量}}{\text{全ヒスタミン量} - \text{自然遊離ヒスタミン量}} \times 100 (\%)$$

(1-9) 統計処理

死亡率の検定は Chi-square testを用いた。他の検定は student's t-testを用いた。

2. 実験結果

(2-1) 卵白アルブミン (OA) - E p - 4 5 9 感作細胞の I g E 抗体産生抑制作用

1 μ g OAと alum で感作した donorからの spleen cells (4×10^7)をX線照射した recipientに移入した。移入後直ちに、recipientを 1 μ g OAと alum で感作した。500mg/kg E p - 4 5 9は感作と同時に donorに投与した。対照群においては、抗OA I g E抗体価は day 5に検出され、day 10に最高になった (3277 ± 811)。そして徐々に day 10 から減少した。一方、E p - 4 5 9 primed cells を移入した群では day 10 から検出され、day 14に最高になった (244 ± 64)。そして day 21 から徐々に減少した。正常細胞を移入した群では抗OA I g E抗体価は検出できなかった。E p - 4 5 9 primed cellsを移入した群は全期間を通して対照群と比べ有意に抗体価が減少した。E p - 4 5 9による I g E抗体産生抑制作用はE p - 4 5 9 primed cells により移入された (Fig.26)。

(2-2) OA - E p - 4 5 9 感作細胞のヘルパーT細胞活性とジニトロフェニル (DNP) - E p - 4 5 9 感作細胞のB細胞活性

10 μ g DNP-KLHで感作した donorからのDNP-primed cells (4×10^7)を 1 μ g OAで感作した donorからのOA-primed cell (4×10^7)と混合し、X線照射した recipientに移入した。移入後直ちに、recipientを

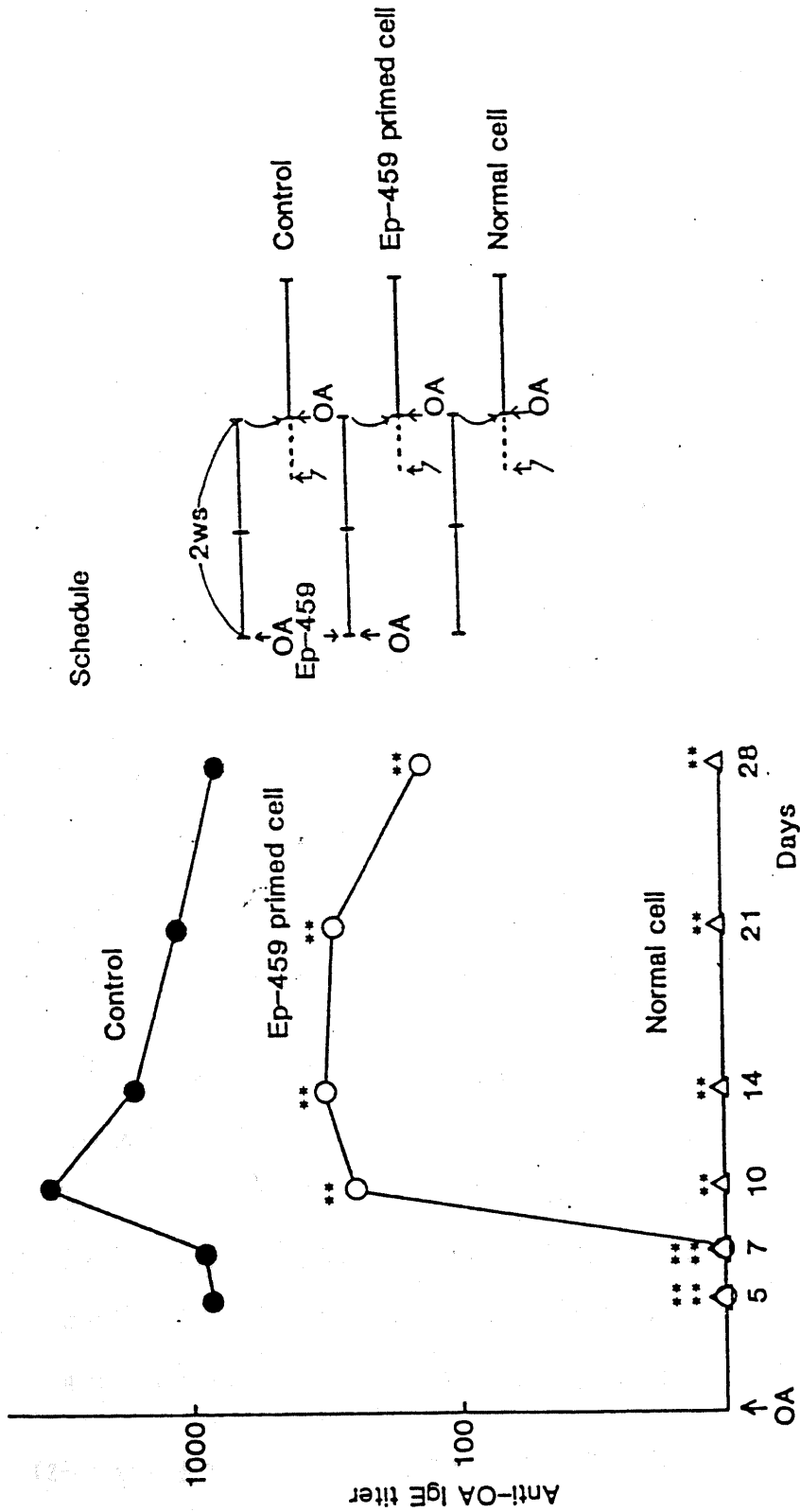


Fig. 26 Suppressive activity of Ep-459-primed cells on the IgE antibody response in BDF1 mice. Ep-459 was administered to the donors simultaneously with immunization of 1 μ g OA in alum. After 2 weeks, 8×10^7 of spleen cells from the donors were transferred into the irradiated syngeneic recipients. Immediately after the cell transfer, the recipients received 1 μ g OA in alum. ** Significantly different from the control at $p < 0.01$. Control (●), Ep-459 primed cell (○), normal cell (△).

1 μ g DNP-OAと alum で感作した。500mg/kg E p-459は10 μ g DNP-KLH又はOA感作時に donorに投与した。

対照群においては、抗OA抗体価(235 \pm 90)及び抗DNP抗体価(24 \pm 5)は day 10 に検出された。OA-E p-459 primed cells 及び正常細胞を移入した群では抗OA I g E抗体価や抗DNP I g E抗体価はみられなかった。DNP-E p-459 primed cells を移入した群では抗OA I g E抗体価(192 \pm 11)が認められた。抗DNP I g E抗体は検出されなかった。OA-E p-459 primed cells と正常細胞を移入した群との間に有意差があった。OA-E p-459 primed cells, DNP-E p-459 primed cells, 正常移入群においては抗DNP I g E抗体価は正常細胞移入群と比べ、有意差が認められた。これらのことから、E p-459はI g E抗体産生に関与しているT細胞活性やB細胞活性を抑制することが示唆された (Fig.27)。

(2-3) E p-459処理細胞のI g E抗体産生抑制作用の欠如

1 μ g OAと alum で感作した donorからの脾臓細胞を 600 μ g/ml E p-459又は50 μ g/ml MMCで処理をした。E p-459 treated cells またはMMC treated cellsの 8×10^7 をX線処理した recipientに移入した。移入後直ちに、1 μ g OAと alum で感作した。

対照群とE p-459 treated cellsを移入した群において抗OA I g E抗体価は day 5に認められ、day 7に最高となった。その後、day 21から徐々に減少した。E p-459 treated cellsを移入した群での抗OA I g E抗体価は対照群と差がなかった。MMC treated cells や正常細胞を移入した群では抗OA I g E抗体価は認められなかった。このことから、E p-459はMMCの様な核酸合成阻害剤でないことが示唆された (Fig.28)。

(2-4) OA感作マウスにおける末梢血白血球数

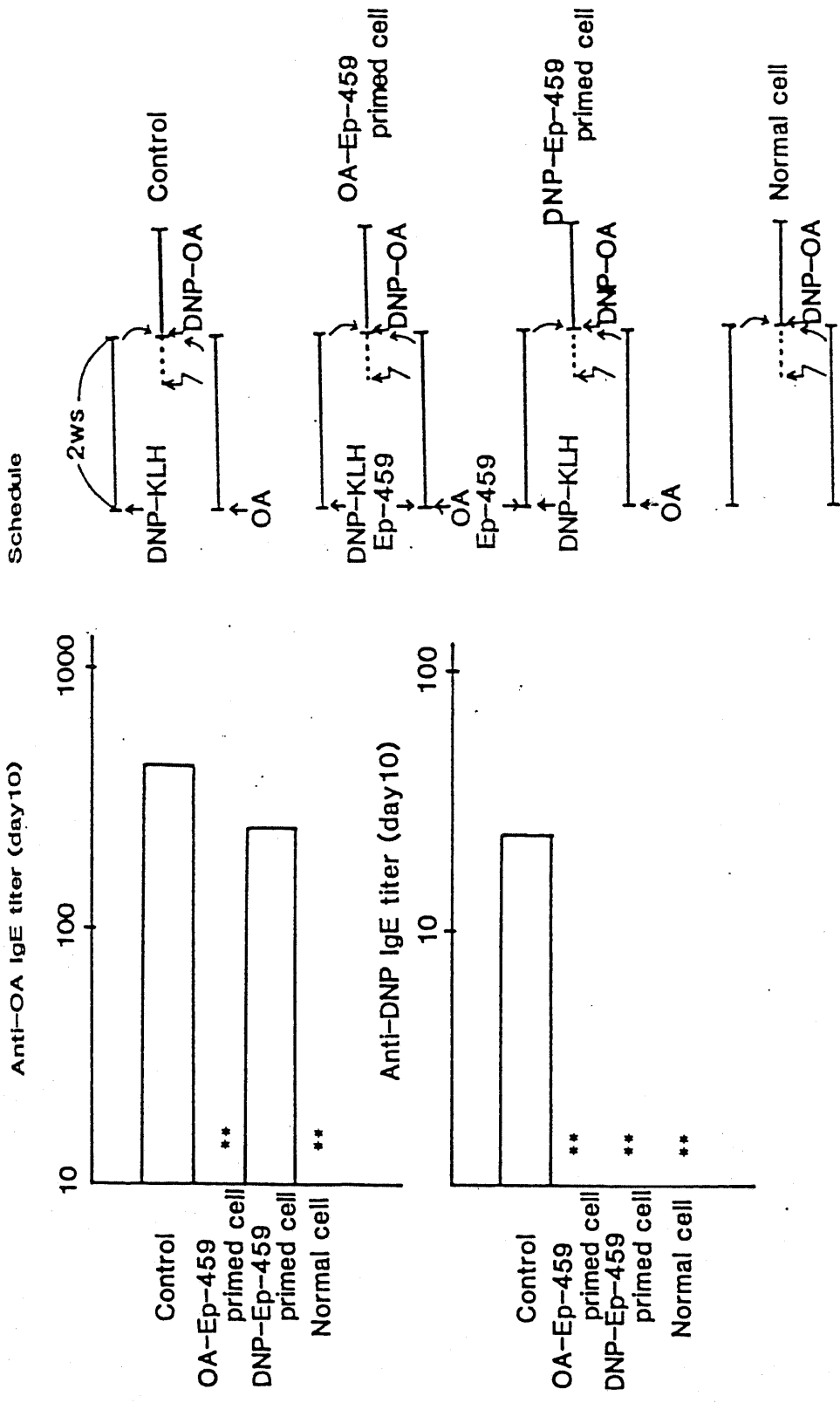


Fig. 27 Helper T-cell activity of OA-Ep-459-primed cells and B-cell activity of DNP-Ep-459-primed cells on the IgE antibody response in BDF1 mice. Ep-459 was administered to the donors simultaneously with immunization of 10 μ g DNP-KLH in alum (DNP-Ep-459-primed cells) or 1 μ g OA in alum (OA-Ep-459 primed-cells). After 2 weeks, 4×10^7 of OA-primed cells mixed with 4×10^7 of DNP-primed cells were transferred into the irradiated syngeneic recipient. Immediately after the cell transfer, the recipients received 1 μ g of DNP-OA in alum. ** Significantly different from the control at $p < 0.01$.

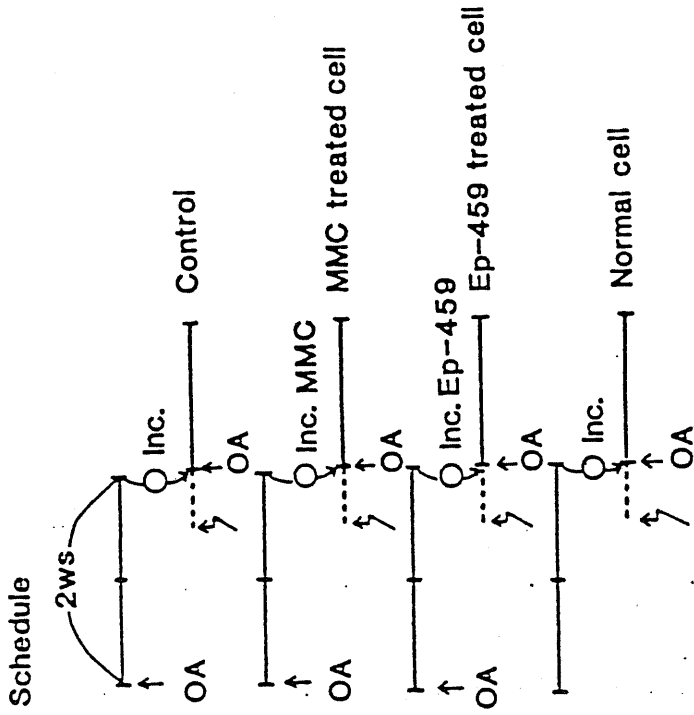
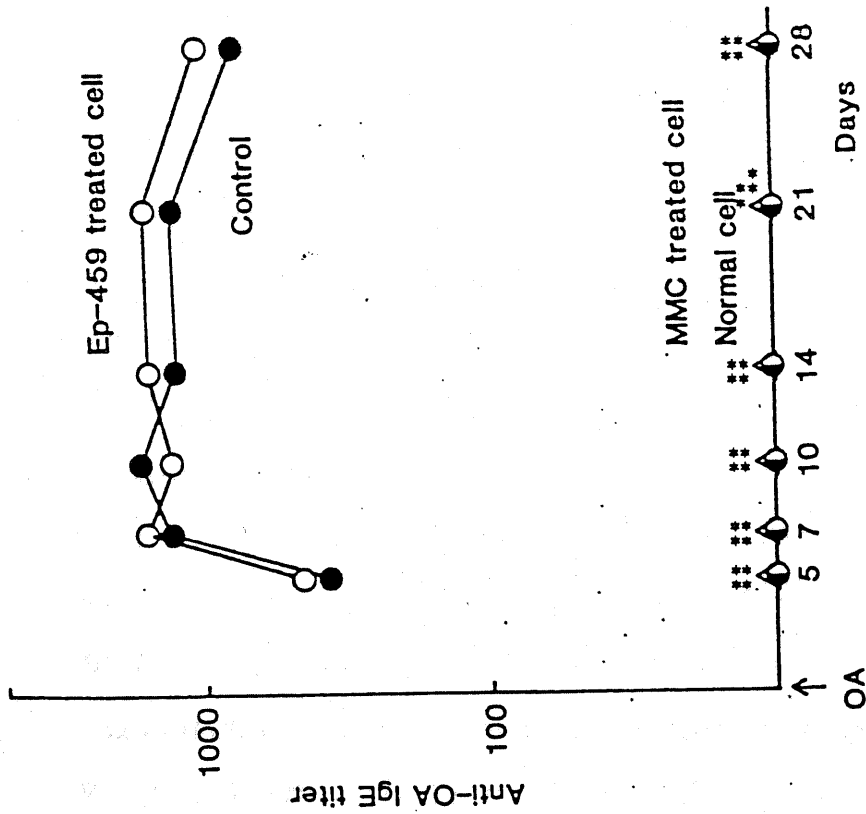


Fig. 28 Failure of Ep-459 treated cells to suppress the IgE antibody response in BDF1 mice. Spleen cells from the donor immunized with 1 μ g OA in alum were pretreated with Ep-459 for 2 h (Ep-459 treated cell, \circ — \circ), with MMC for 45 min (MMC treated cell, \bullet — \bullet), without drugs for 2 h (normal cell, Δ — Δ) at 37 $^{\circ}$ C. Washed spleen cells were transferred intravenously into the irradiated syngeneic recipients. Immediately after the cell transfer, recipients received 1 μ g OA in alum. ** Significantly different from the control (\bullet — \bullet) at $p < 0.01$.

BDF₁系マウスを1 μ g OAとalumで感作した。500mg/kg Ep-459又は125mg/kg CYはday 0に腹腔内投与した。

day 4にマウスを採血し、末梢血白血球数を測定した。Ep-459群の末梢血白血球数は(4500 \pm 950)、対照群(4180 \pm 290)との間に有意差はなかった。CY群での末梢血白血球数(2410 \pm 200)は対照群との間に有意差があった。従って、IgE抗体応答におけるEp-459の抑制効果は非特異的な免疫抑制作用とは異なった作用メカニズムによることが示唆された(Fig. 29)。

(2-5) Ep-459の高濃度OA感作マウスにおけるIgE抗体産生抑制作用の欠如

BDF₁系マウスを通常量より1000倍高い1000 μ g OAと4mg alumでday 0に感作した。500mg/kg Ep-459はday 0に、150mg/kg CYはday-3に腹腔内投与した。抗OA IgE抗体価はOA 1 μ g感作マウスよりOA 1000 μ g感作マウスの方が低かった。CY前処理群では1000 μ g OAとalumで感作した群で抗OA IgE抗体価を促進した(CY群)。対照群及びEp-459群での抗OA IgE抗体はday 7に最高となり(対照群 910 \pm 130, Ep-459群 750 \pm 140)、あとは徐々に減少していった。Ep-459群での抗OA IgE抗体は対照群との間に有意差は認められなかった。CY群での抗OA IgE抗体価はday 14に最高となり(4220 \pm 700)、day 14から徐々に減少していった。

CYとEp-459同時投与群(CY+Ep-459群)では抗OA IgE抗体価はday 21で最高(2470 \pm 530)になった。CY+Ep-459群での抗OA IgE抗体価は、CY群との間に有意差はなかった。

以上の結果から、Ep-459はマウスを高濃度のOAで感作した場合、又、マウスを高濃度のOAで感作する前にCY投与した場合には抑制作用の

ないことが判った (Fig.30)。

(2-6) モルモットのOA誘導喘息モデルでのE p-459の抑制作用

モルモットを10 μ g OAを吸着した 4mg alum で感作した。250mg/kg の E p-459は day 0に腹腔内投与した。モルモットは day 13 に採血し、抗OA I g E抗体価はモルモットPCAで測定した。

1群は day 14 に5%OAで噴霧した。死亡数は反応惹起後15分間観察して測定した。他の1群は day 14 に肺組織からのヒスタミン遊離の測定に用いた。E p-459は抗OA I g E抗体価 (対照群43.2 \pm 7.2, E p-459 0 \pm 0), 死亡率 (対照群90%, E p-459 10%), ヒスタミン遊離% (対照群20 \pm 1.05, E p-459 8.72 \pm 3.43)を抑制した (Fig.31)。このモデルにおいてはI g E抗体価と死亡率においてE p-459群と対照群との間に有意差が認められた。以上の結果、E p-459はI g E抗体産生を抑制することにより、OA誘導喘息モデルを抑制することが示唆された。

3. 考 察

枯草病, 喘息, 薬物アレルギー等は抗原特異的I g E抗体により引き起こされる(132,133)。よって、I g E抗体産生の特異的抑制作用は臨床でのアレルギー病の治療に有効な方法と思われる。I g E抗体のみを選択的に抑制する試みはいくつかなされている(134-136)が、有効な薬剤は認められていない。E p-459はシステインプロテアーゼを特異的に抑制するとともに、I g E抗体産生を強く抑制するが、生体において有益な抗体であるI g G抗体産生に対しては効果を示さない(137)ため抗アレルギー剤として有用と考えられた。E p-459はサブレッサーT細胞を誘導することにより、マウスI g E抗体産生を抑制することが既に示唆されている(137)が、その点をさらに明確にするため、細胞移入実験及びモルモット喘息での検討を行った。その結果、

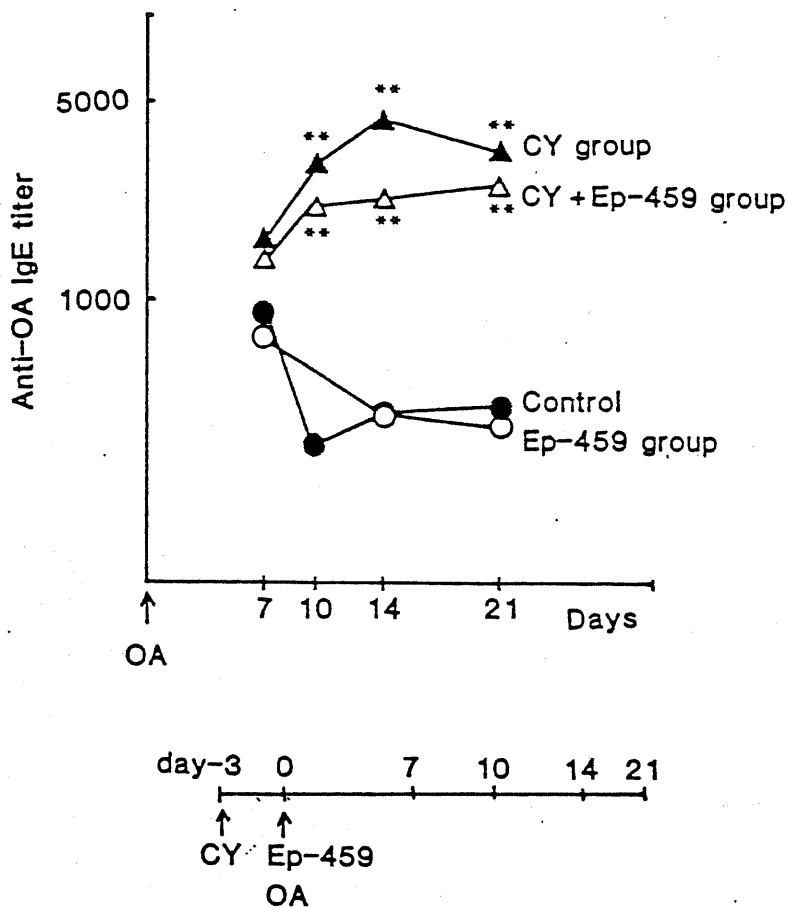


Fig.30 Failure of suppression of Ep-459 on the IgE antibody response in mice immunized with 1,000 μ g OA in alum (control, ●—●) or CY pretreated BDF1 mice immunized with 1,000 μ g OA in alum (CY group, ▲—▲). Ep-459 were administered simultaneously with immunization of 1,000 μ g OA in alum at day 0 (Ep-459 group, ○—○). Ep-459 and CY were administered intraperitoneally at day 0 and day -3 respectively (CY + Ep-459 group, △—△). Mice received 1,000 μ g in alum at day 0. ** Significantly different from the control at $p < 0.01$.

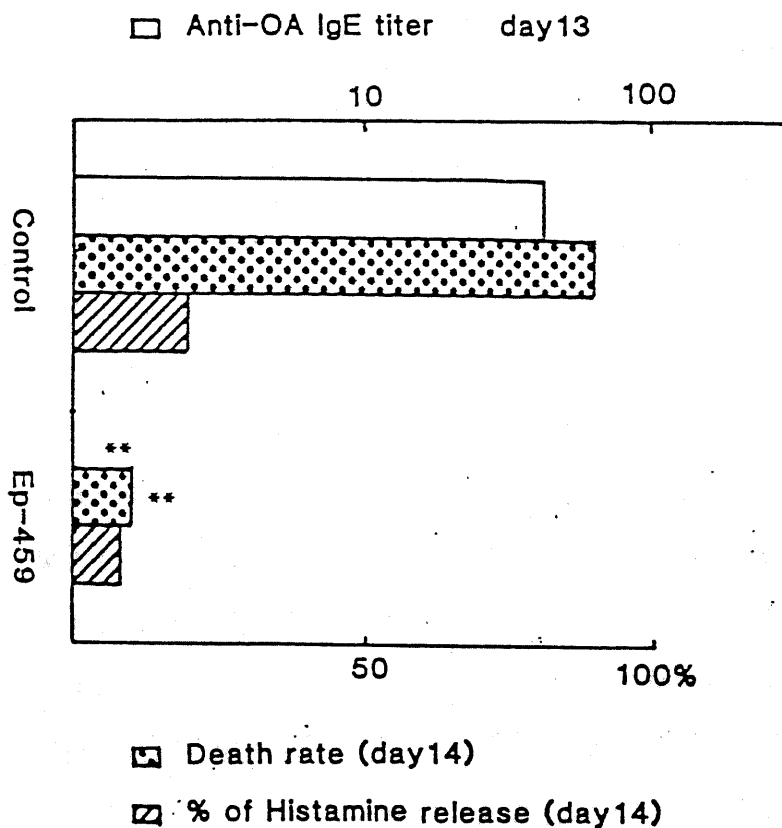


Fig.31 Suppressive effect of Ep-459 on the OA-induced bronchial anaphylaxis in guinea-pigs. Guinea-pigs were sensitized intraperitoneally with 10 μ g OA in 100 mg alum (control). Ep-459 was administered simultaneously with immunization of 10 μ g OA in 100 mg alum at day 0 (Ep-459 group). ** Significantly different from the control at $p < 0.01$.

- (1) E p - 4 5 9 の I g E 抗体産生における抑制効果は脾臓細胞により移入できた (Fig.26)。さらに、ヘルパーT細胞活性もB細胞活性もE p - 4 5 9 により抑制された (Fig.27)。
- (2) 移入実験における I g E 抗体産生は *in vitro* で donorの脾臓細胞をMMCで処理した場合には抑制されるが、E p - 4 5 9 で処理した場合には抑制されなかった (Fig.28)。一方、*in vivo* でのマウス末梢血白血球数はCYでは減少したが、E p - 4 5 9 では抑制作用は認められなかった (Fig.29)。
- (3) E p - 4 5 9 は通常感作量の1000倍である1000 μ g OAでマウスを感作したときには I g E 抗体産生抑制作用を示さなかった。又、1000 μ g OAで感作する前にCY前処置した場合にも、I g E 産生抑制作用を示さなかった (Fig.30)。
- (4) E p - 4 5 9 はモルモット喘息モデルを抑制した (Fig.31)。(2)の結果より E p - 4 5 9 はMMCやCYのような非特異的免疫抑制剤とは異なり、その抑制作用はリンパ球機能の抑制によるものでないことが示唆された。(3)の結果より、E p - 4 5 9 の効果はサブレッサーT細胞に関係があることが強く示唆された。高濃度のOAで感作したマウスでは低濃度のOAで感作したマウスに比べ、I g E 抗体価が減少している。これはサブレッサーT細胞が高濃度の抗原で誘導されているためである(138)。又、CYで前投与することにより、サブレッサーT細胞の前駆細胞が枯渇され、I g E 抗体産生が促進される(139)。即ち、E p - 4 5 9 はサブレッサーT細胞が十分に誘導された場合、もしくはサブレッサーT細胞の前駆細胞が枯渇している状態では I g E 抗体産生を抑制することはできないことが示唆される。逆に、E p - 4 5 9 はわずかししかブレッサーT細胞が誘導されず、十分量のサブレッサーT細胞の前駆細胞が存在する場合には I g E 抗体産生を抑制することが考えられる。ヘルパーT細胞及びB細胞活性もE p - 4 5 9 により抑制された (Fig.27)。T細胞、B細胞はサブレッサーT細胞により調節されているため

(140)、E p-459により誘導されたサプレッサーT細胞により抑制されたものと思われる。E p-459がシステインプロテアーゼ阻害剤であることから、I g E抗体産生におけるサプレッサーT細胞の誘導にはシステインプロテアーゼの関与が示唆される。I g E抗体産生の増強や抑制は、F c ε R又はF c γ R又はその両方をもつT細胞により産生されるI g E増強因子とI g E抑制因子により制御されていると考えられている。I g E増強因子とI g E抑制因子は共通の蛋白部分と構造遺伝子を持ち、主な作用の違いは糖鎖に存在する。I g E結合因子のグリコシレーションは他の2種のT細胞リンホカイン、すなわちグリコシレーション抑制因子(G I F)とグリコシレーション促進因子(G E F)とにより調節されている。G I Fはリン酸化されたリボモジュリンの活性断片であり、G E Fは分子量約 25,000 のトリプシン様酵素である(141)。I g E抗体産生の調節機能は複雑であり、G E F以外の酵素の関与も考えられ、システインプロテアーゼの関与も示唆される。

モルモット喘息モデルにおいて、E p-459はアナフィラキシー死亡率、抗O A I g E抗体価及び抗原刺激による肥満細胞からのヒスタミン遊離を抑制した(Fig.31)。I型アレルギーはI g E抗体が肥満細胞上のI g Eレセプターに結合し、特異的な多価の抗原と反応してI g E分子間に架橋が起こる。その刺激により細胞膜にある各種の酵素が活性化され、その結果、肥満細胞中に存在する顆粒の脱顆粒現象が起こり、それに伴って顆粒内の化学伝達物質が細胞外に放出される。これらの強力な生物学的作用を持つ物質が、その標的細胞に作用した結果、アナフィラキシー症状及びアレルギー症状を起こすと考えられている(142)。喘息においては ① 平滑筋の収縮の結果、気管支が収縮し、② 血管の拡張、透過性亢進、液成分滲出及び白血球が遊走することにより粘膜浮腫・腫脹が起こり、又、③ 腺細胞からの分泌亢進により気管支で粘液栓形成が起こり、気道狭窄となる。その結果、呼吸困難

となり喘息死が起こる(143,144)。感作モルモットにおいて、E p-459はI g E抗体産生を抑制したため、I g E抗体と肥満細胞上のI g Eレセプターとの結合量が減少し特異抗原との反応が低下し、ヒスタミン遊離が抑制されたものと思われる。その結果、気道狭窄に至らず、喘息死から免れたことが示唆される。E p-459はマウスのI g E抗体産生を抑制するのみでなく、モルモットでの喘息モデルも抑制することが判った。

以上のことから、E p-459はI g E抗体産生を特異的に抑制することにより、I型アレルギー抑制作用を示すことが判った。

4. 小 括

E p-459はマウスI g E抗体産生を強く抑制するが、マウスI g G抗体産生を抑制しないこと、及びI g E抗体産生抑制作用が脾臓細胞の移入により発揮できることから、E p-459によるI g E抗体産生抑制作用がサブレッサーT細胞の誘導によることが示唆されている(137)。今回、さらにその点を明確にするため、マウスの脾臓細胞の移入実験を行ったところ、E p-459によりヘルパーT細胞及びB細胞活性がともに抑制された。また、マウスを通常感作量の1000倍の卵白アルブミンで感作した場合及び感作する前にCY投与した場合には、E p-459はI g E抗体産生を抑制しなかった。このことはE p-459はサブレッサーT細胞が十分に誘導されている場合及びサブレッサーT細胞の前駆細胞が枯渇している状態ではI g E抗体産生を抑制しないことを意味している。今回の実験により、サブレッサーT細胞の関与が更に強く示唆された。また、モルモット喘息モデルにおいて、E p-459の投与によりI g E抗体価の減少及び肺組織の肥満細胞からのヒスタミン遊離抑制が認められ、E p-459にI型アレルギー抑制作用のあることが新たに判った。

第2節 E p - 4 5 9 関連化合物の免疫薬理学的作用

構造の複雑な化合物である E p - 4 5 9 (エポキシコハク酸アミノ酸誘導体) は立体障害により様々な蛋白質 S H 基との結合が抑制され、免疫薬理学的作用が限定される。従って、構造の単純な E p - 4 5 9 関連化合物を合成すれば免疫に関与する様々な蛋白質の S H 基と容易に結合でき、多様な免疫薬理学的作用を持つのではないかと考えた。多様な免疫薬理学的作用を持つ化合物、例えば A A や I g E 抗体産生抑制作用をもつ化合物は抗リウマチ剤や抗アレルギー剤としての開発の可能性がある。よって、化学構造の単純な E p - 4 5 9 関連化合物 (エポキシコハク酸アミド, モノエステル, ジエステル誘導体) を合成し、それらの免疫薬理学的作用をアミノ酸誘導体と比較し検討した。

1. 実験材料及び実験方法

(1-1) E p - 4 5 9 関連化合物の調製法

構造式を Table 9-1, 9-2 に示した。DL-trans-epoxysuccinyl chloride は Payne と Williams の方法 (145) でフマル酸から調製した DL-trans-epoxysuccinic acid (E p - 0) を用いて Miller の方法 (146) により調製した。

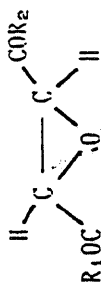
ジエステル誘導体の合成法















DL-Trans-epoxysuccinyl chloride ethyl ether 溶液 (10mmole) を 0~5 °C で対応する alcohol ethyl ether 溶液 (21mmole) もしくは pyridine ethyl ether 溶液 (21mmole) に少しずつ滴下して攪拌した。30~60 分の攪拌の後、沈殿した pyridine の hydrogen chloride 塩を濾過した。得られた ethyl ether 溶液を水洗し、無水硫酸ナトリウムで乾燥後、シリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製し、ジエステル誘導体を得た。

モノエステル誘導体の合成法

Di-ester alcohol 溶液 (10mmole) に potassium hydroxide alcohol 溶液

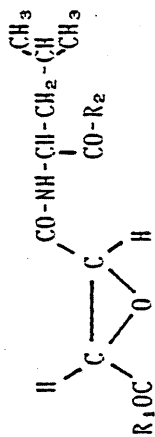
Table 9-1 Structures and mps of amide, mono- and di-ester derivatives of epoxysuccinic acid.



Group	Compound	R ₁	R ₂	mp(bp) °C
amide	Ep-316	-O-CH ₂ CH ₃	-NH-CH ₂ -	72-73°
	Ep-320	-O-CH ₂ CH ₃	-NH- 	98-100°
mono-ester	Ep-0	-OH	-OH	Payne G. B. and Williams P. II, 117)
	Ep-137	-OK	-O-CH ₂ CH ₃	Ilanada K. et al. 121)
	Ep-143	-OK	-O-CH ₂ - 	Ilanada K. et al. 121)
di-ester (R ₁ =R ₂)	Ep-107	-O-CH ₂ CH ₃	-O-CH ₂ CH ₃	84-91° (3mmHg)*
	Ep-75	-O-CH ₂ - 	-O-CH ₂ - 	221-224°
	Ep-79	-O-CH ₂ - 	-O-CH ₂ - 	>300°
	Ep-128	-O-(CH ₂) ₄ CH ₃	-O-(CH ₂) ₄ CH ₃	Miller M.V. 118)
	Ep-133	-O-CH ₂ CH=CH- 	-O-CH ₂ CH=CH- 	165°
	Ep-81	-O-CH ₂ - 	-O-CH ₂ - 	105-107°
	Ep-25	-O- 	-O- 	221-223° (6mmHg)*
	Ep-1	-O- 	-O- 	225-226° (6mmHg)*

* : bp

Table 9-2 Structures and mps of amino acid derivatives of epoxysuccinic acid.



Compound	R ₁	R ₂	mp °C
EP-453	-OC ₂ H ₅	-NH-CH ₂ -CH ₂ -CH(CH ₃) ₂	Tamai N. et al. 120)
EP-475	-OH	-NH-CH ₂ -CH ₂ -CH(CH ₃) ₂	Tamai N. et al. 119)
EP-459	-OH	-NH-(CH ₂) ₄ -NH ₂	Tamai N. et al. 119)
E-64	-OH	-NH-(CH ₂) ₄ -NH-C-NH ₂ NH	Ilanada K. et al. 122)
EP-479	-OH	-NH-(CH ₂) ₇ -NH ₂	Barrett A.J. et al. 124)

(10.5mmole) を室温で少しずつ滴下して攪拌した。室温で2時間攪拌後、ethyl ether を加え、1晩混液を冷却機の中に放置した。沈殿物を濾過して再結晶を行い、モノエステル誘導体のカリウム塩又はナトリウム塩を得た。

アミド誘導体の合成法

Ep-320 : Oxalychloride ethyl ether 溶液を DL-trans-ethyl potassium epoxysuccinate ethyl ether 溶液 (Ep-137) に氷冷下で少しずつ滴下し、室温で1時間攪拌した。さらに、cyclohexylamine ethyl ether 溶液又は furfurylamine ethyl ether 溶液を氷冷下で少しずつ滴下し、室温で1時間攪拌した。白色沈殿物を除去した後、溶液を sodium chloride 溶液で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥し、シリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製してアミド誘導体を得た (Ep-316, Ep-320)。

Ep-453, Ep-475, Ep-459, Ep-479 は Tamai, M. らの方法で合成した (147, 148)。E-64 は Hanada, K. らの方法で合成した (149)。

Ep-459 関連化合物は5%アラビアゴム蒸留水、0.5%アラビアゴム生理食塩液に溶解もしくは懸濁した。ヒドロコチゾン (HC; Sigma社) は、0.5%アラビアゴム生理食塩液に懸濁した。CY (塩野義製薬) は蒸留水に溶解した。

(1-2) 実験動物

1群10~11匹の7週令SD系雌性ラット (日本チャールスリバー社) はAAに、9~14週令 Wistar 系雄性ラット (静岡実験動物農業協同組合) はPCAに、8~10週令 Balb/c 系雌性マウス (日本チャールスリバー社) はLTRに用いた。

(1-3) AA

第II章第1節と同様に行った。

(1-4) I g E 抗体産生

第II章第1節と同様に行った。

(1-5) LTR

第II章第1節と同様に行った。

(1-6) 統計処理

AAの炎症カウントは Wilcoxon's rank sum test により行った。それ以外の検定は student's t-test を用いた。

2. 実験結果

(2-1) SD系ラットアジュバント関節炎 (AA) における薬物効果とシステインプロテアーゼ阻害作用

SD系ラットを牛結核死菌で感作し、day 0 から day 20 まで E p-459 関連化合物の 100mg/kg 及びCYの 1mg/kg を経口投与した。E p-459 関連化合物のシステインプロテアーゼ阻害活性については既に報告している (149-154)。

その結果、エポキシコハク酸アミド誘導体において E p-316 は day 21 にAAの炎症スコアを有意に抑制した。E p-320 は抑制傾向を示した。エポキシコハク酸モノエステル誘導体においては E p-137 及び E p-143 はAAの炎症スコアを有意に抑制した。E p-0 は抑制傾向を示した。ジエステル誘導体においては E p-107, E p-25 及び E p-1 は炎症スコアを抑制した。E p-75, E p-79, E p-81, E p-128 及び E p-133 は炎症スコアの抑制傾向を示した。一方、アミノ誘導体については、E p-453, E p-475 及び E p-459 はAAに対しては作用を示さなかった (Fig.32)。1mg/kg CYは有意に浮腫量を抑制した。シ

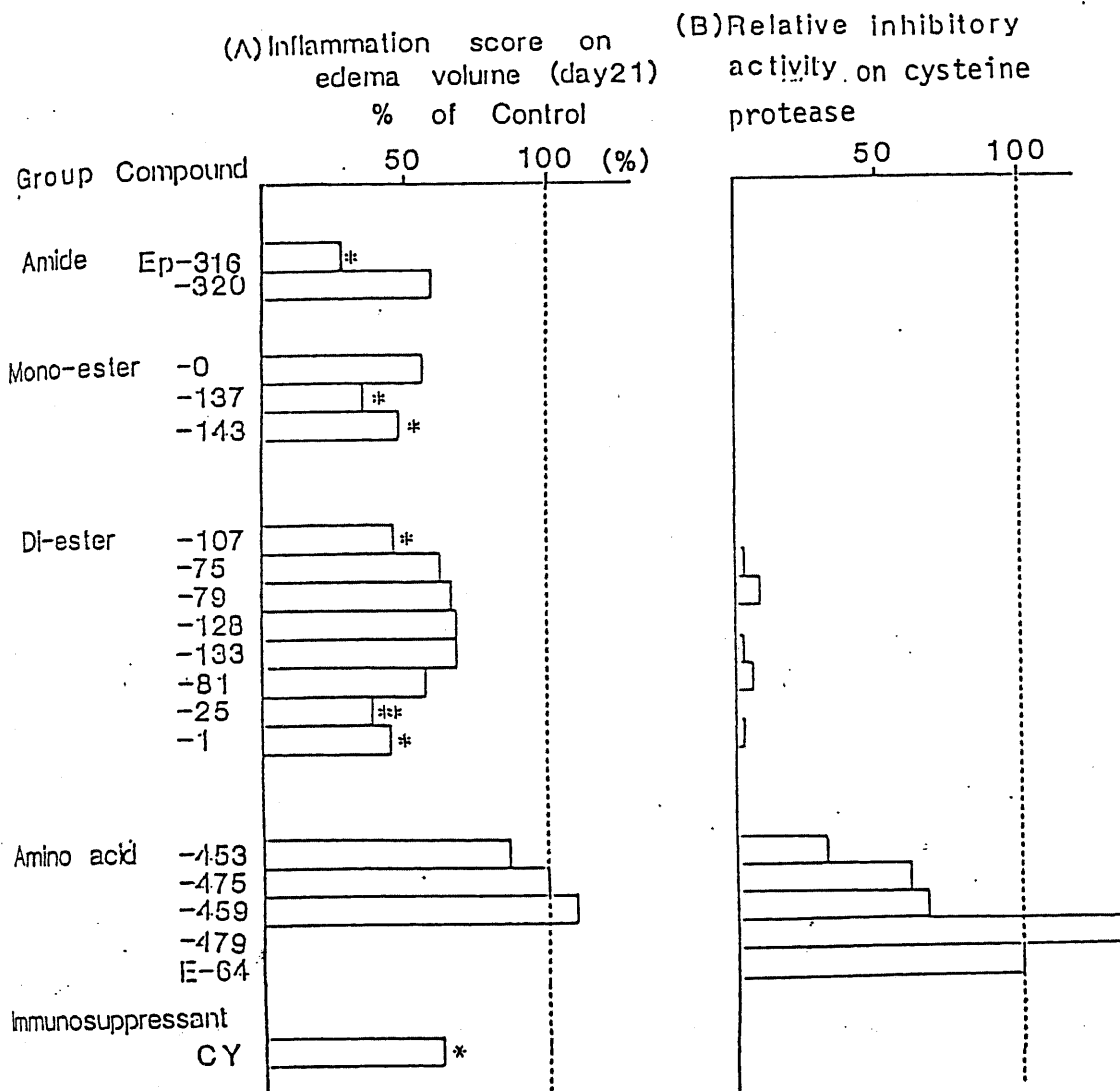


Fig.32 Effect of epoxysuccinic acids derivatives on the edema volumes of foot pads or the inflammation score in SD rats with AA lesions (A), and the relative inhibitory activity on cysteine protease. (B); 100 mg/kg of amide, mono-ester, di-ester and amino acid derivatives of epoxysuccinic acid, and 1 mg/kg of CY were administered orally from day 0 to day 20. *, **: Significantly different from the control at $p < 0.05$ and $p < 0.01$, respectively.

ステインプロテアーゼ抑制作用に関しては、E p-75, E p-79, E p-133, E p-81, E p-1の抑制作用はわずかであり、アミド、モノエステル誘導体及びE p-75, E p-79, E p-133, E p-81, E p-1以外のジエステル誘導体ではほとんど抑制作用は認められなかった。反対にE p-453, E p-475, E p-459及びE p-479の抑制作用は著しく強かった(Fig.32)。アミノ酸誘導体であるE-64, E p-479についてはSDラットAAに対する作用は未検討であるが、システインプロテアーゼに対しては強い抑制作用を示した。

結果として、エポキシコハク酸誘導体のアミド、モノエステル、ジエステル誘導体はAAを抑制するが、しかしアミノ酸誘導体では効果はみられなかった。一方、システインプロテアーゼ阻害作用については、前者の誘導体ではわずかであったが、後者の誘導体では著明に強いことが判った。

(2-2) E p-459 関連化合物の I g E 抗体産生における抑制作用

Balb/c系マウスにOAとalumを腹腔内投与して感作した。500mg/kg E p-25及びE p-1, 125mg/kg HC, 250mg/kg CYをday 0に皮下投与した。採血はday 10, 14, 21, 30に行った。Table 10に示したように、E p-25, E p-1はday 10には著しくI g E抗体価を抑制したが、day 10以外では効果はみられなかった。HC, CYは全期間を通じて著しくI g E抗体価を抑制した。結果としてE p-25, E p-1の抑制効果は弱く、day 10のみ抑制効果があることが判った。

Balb/c系マウスにOAとalumを腹腔内投与して感作した。エポキシコハク酸のアミノ酸誘導体の62.5, 125, 250及び500mg/kgをday 0に皮下投与した。採血はday 10, 14, 21, 28及び35に適宜行った。Table 11に示したように、62.5mg/kgのE-64はI g E抗体産生をday 10, 14及び21に抑制した。E-64, E p-475の125mg/kgでは全期間を通じて抑

Table 10 Suppressive effects of di-esters derivatives of spoxysuccinic acid on IgE antibody response.

Drug	Dose mg/kg	Anti-OA IgE titer				
		day 10	day 14	day 21	day 30	
Control	0	780 ± 158 (100)	440 ± 79 (100)	340 ± 47 (100)	250 ± 63 (100)	
Ep-25	500	136 ± 12** (17.4)	288 ± 47 (65.5)	272 ± 24 (80.0)	232 ± 30 (92.8)	
Ep-1	500	93 ± 13** (11.9)	320 ± 107 (72.7)	320 ± 72 (94.1)	213 ± 49 (85.2)	
II C	125	27 ± 8** (3.5)	97 ± 22** (22.0)	104 ± 24** (30.6)	132 ± 52 (52.8)	
C Y	250	0 ± 0** (0)	0 ± 0** (0)	0 ± 0** (0)	0 ± 0** (0)	

Groups of 10 Balb/c mice were immunized intraperitoneally with OA and alum. The drugs were administered subcutaneously on day 0. Blood was collected on day 10, 14, 21 and 30. Results are shown as mean ± S.E.. Parenthesis is % of Control. ** : Significantly different from Control at $P < 0.01$.

Table 11 Suppressive effects of amino acid derivatives of epoxysuccinic acid on IgE antibody response.

No. of Experiment	Drug	Dose mg/kg	Anti-OA IgE titer					
			day 10	day 14	day 21	day 28	day 35	
Exp. 1.	Control	0	251 ± 44 (100)	336 ± 56 (100)	200 ± 27 (100)	136 ± 24 (100)	102 ± 20 (100)	
	Ep-64	62.5	53 ± 11* (21.1)	60 ± 10** (17.9)	86 ± 20** (43.0)	86 ± 20 (63.2)	60 ± 20 (58.0)	
		125.0	29 ± 22** (11.6)	34 ± 16** (10.1)	26 ± 14** (13.0)	26 ± 10** (19.1)	24 ± 10** (23.5)	
	Ep-475	62.5	250 ± 35 (99.6)	300 ± 155 (89.3)	130 ± 33 (65.0)	100 ± 19 (73.5)	90 ± 17 (88.2)	
		125.0	48 ± 20** (19.1)	73 ± 15** (21.7)	58 ± 22** (29.0)	37 ± 12** (27.2)	15 ± 6** (14.7)	
Exp. 2.	Control	0	39 ± 15 (100)	43 ± 14 (100)	132 ± 53 (100)	124 ± 55 (100)		
	Ep-453	500.0	0 ± 0** (0)	0 ± 0** (0)	96 ± 14 (72.7)	107 ± 34 (86.3)		
	Ep-479	500.0	18 ± 18 (46.2)	0 ± 0** (0)	0 ± 0* (0)	27 ± 5 (21.8)		
Exp. 3.	Control	0	329 ± 75 (100)					
	Ep-459	62.5	150 ± 83* (45.6)					
		125.0	55 ± 22** (16.7)					
		250.0	0 ± 0** (0)					

Groups of 10 Balb/c mice were immunized intraperitoneally with OA and alum. Amino acid derivatives of epoxysuccinic acid were administered subcutaneously on day 0. Blood was collected on day 10, 14, 21, 28 and 35. Results are shown as mean ± S.E.. Parenthesis is % of Control. * and **: Significantly different from Control at P < 0.05 and P < 0.01, respectively.

制作用を示した。500mg/kg, E p - 4 5 3, E p - 4 7 9 は I g E 抗体産生を day 10, 14, 21, 28 及び 35 に抑制又は抑制傾向を示した。E p - 4 5 9 の抑制作用が長期にわたることは既に報告している(109)。

以上のことから、E p - 4 5 9 関連化合物のうちエポキシコハク酸ジエステル誘導体の I g E 抗体産生抑制作用は弱い、エポキシコハク酸アミノ酸誘導体の抑制作用は強いことが判った。

(2-3) リンパ球幼若化反応 (L T R) における薬物作用

mitogen の無添加の条件下では E p - 1 を B D F₁ 系マウスの脾臓細胞の培養液中に添加すると 3, 10 μ g/ml の濃度において L T R を抑制した。しかし、E p - 4 5 9 は効果はみられなかった (Fig. 33A)。C o n A 添加条件下においては E p - 1 は 10, 30 μ g/ml 濃度において反応を抑制した。しかし、E p - 4 5 9 は効果がなかった (Fig. 33B)。L P S 添加条件下においては E p - 1 は 1~30 μ g/ml 濃度で抑制した。しかし、E p - 4 5 9 は効果はみられなかった (Fig. 33C)。

以上の結果から、E p - 1 は免疫抑制作用をもつが、E p - 4 5 9 は L T R に対して抑制作用のないことが判った。

3. 考 察

免疫薬理学的作用の多様化の発現を目的として、構造の単純なエポキシコハク酸アミド、モノエステル、ジエステル誘導体を合成し、その免疫薬理学的作用を調べ、構造の複雑なアミノ酸誘導体と比較した。

Table 12 に示したように、エポキシコハク酸のアミド、モノエステル、ジエステル誘導体はシステインプロテアーゼ阻害作用は弱い、SD 系ラット AA, I g E 抗体産生, L T R を抑制した。一方、アミノ酸誘導体はシステインプロテアーゼを強く阻害し、I g E 抗体産生を強く抑制するが、SD 系ラット AA,

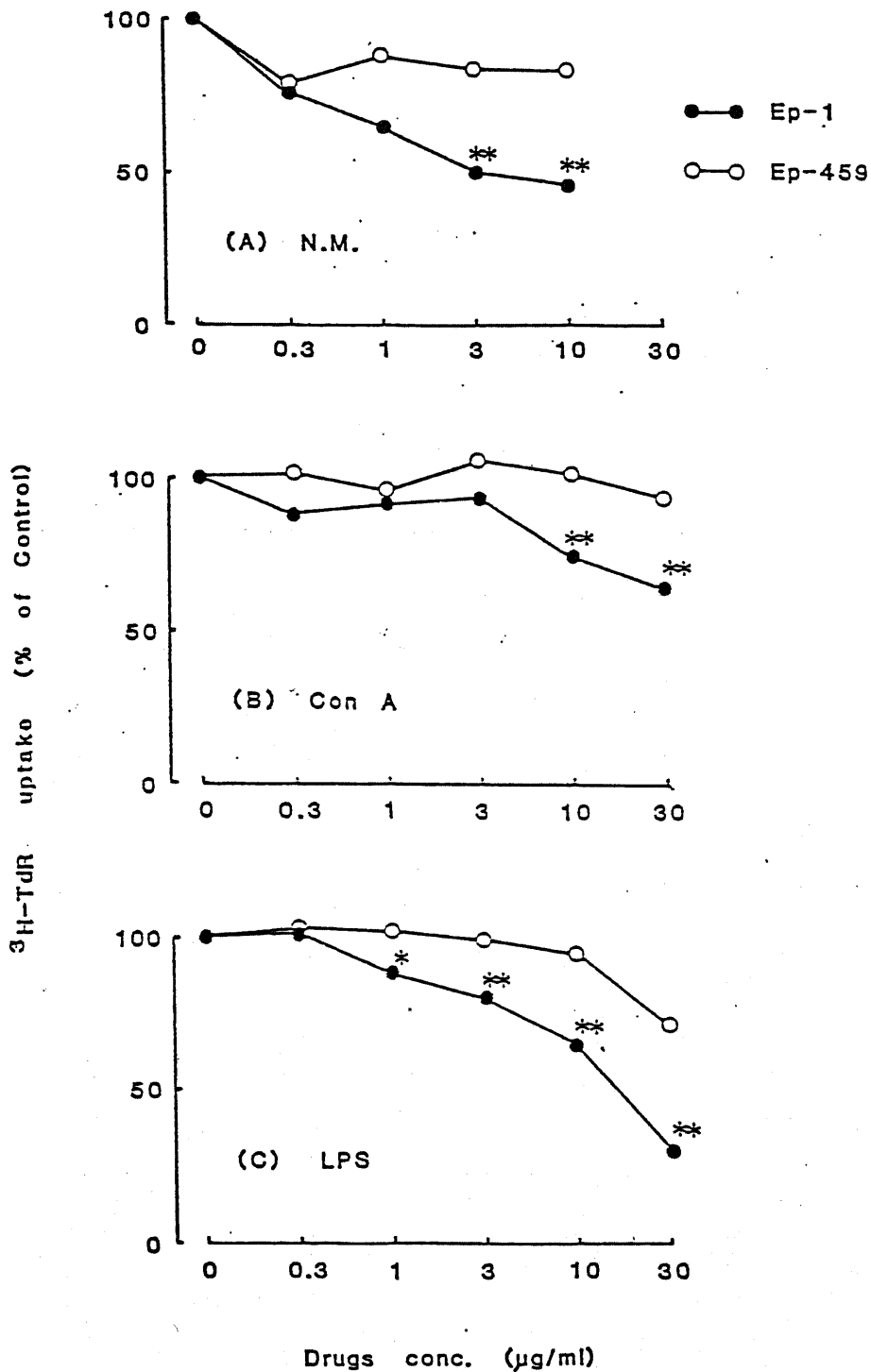


Fig. 33 Effect of epoxysuccinic acid derivatives on the lymphocyte transformation test in mice;
 (A) No mitogen. (B) Con A-induced lymphocyte transformation.
 (C) LPS-induced lymphocyte transformation.
 Drugs were added at the same time as mitogen.

Table 12 Summary of effects of epoxy succinic acid derivatives on the immunopharmacological studies.

Groups	Inhibitory activity on cysteine protease	AA	IgE antibody response	LTR
amide	↓	↓ ↓	n.d.	n.d.
mono-ester	↓	↓ ↓	n.d.	n.d.
di-ester	↓	↓ ↓	↓	↓
amino acid	↓ ↓	→	↓ ↓	→

Each immunopharmacological study was done.

n.d. : not done.

LTRに対しては作用を示さなかった。又、エポキシコハク酸のアミド、モノエステル、ジエステル誘導体の化学構造はアミノ酸誘導体のそれよりも単純であった (Table 9-1, 9-2)。

以上の結果から、エポキシコハク酸誘導体でより化学構造の単純なものはいくつかの免疫薬理学的作用を併有するが、酵素阻害作用は弱いことが判った。一方、化学構造のより複雑な誘導体はIgE抗体産生のみを特異的に抑制し、酵素阻害作用が強いことが判った。一般に、薬物は酵素、蛋白質、レセプター、サイトカイン等、免疫機能の発現と調節を担う様々の機能蛋白質のSS架橋、SH基への結合・反応することによりその免疫薬理学的効果を発揮する。ジエステル誘導体であるEp-1は化学構造が単純なため立体障害はわずかであり、AA, IgE抗体産生, LTRに関与する蛋白質のSH基に容易に結合できたのであろう。しかし、機能蛋白質の活性中心とEp-1との立体的・電氣的相補性が完全に一致していないため、これらの免疫薬理学モデルでの抑制効果は弱いものと考えられた。Ep-459の場合はEp-1より複雑な構造をしており、容易に様々な蛋白質SH基と結合できないが、IgE抗体産生に関与している機能蛋白質の活性中心とは相補性が完全に一致しており、強い抑制作用を示したものと思われる。IgE抗体産生に関与している機能蛋白質の活性中心はシステインプロテアーゼのそれと類似しているか、もしくはシステインプロテアーゼそのものと考えている。Ep-459は非特異的な免疫抑制剤ではなく、その抑制作用はサブレッサーT細胞に関与している (137)。即ち、Ep-459の抑制作用は感作したマウスの脾臓細胞により移入でき、さらにEp-459の抑制作用はサブレッサーT細胞が十分に誘導されておらず、サブレッサーT細胞の前駆細胞が十分に存在している条件下で認められる。Ep-459はサブレッサーT細胞の成熟の stimulator であると考えているため、機能蛋白質はこれらの細胞の成熟に関与しているのかもしれない。一方、Ep-1は、LTR, AA, IgE抗体産生を抑制するため、免疫抑制剤であると考え

ている。

以上の結果から、エポキシコハク酸にアミノ酸誘導体が2つ導入された側鎖の長い、比較的構造が複雑なアミノ酸誘導体は、システインプロテアーゼ阻害作用が強く、その免疫薬理学的作用はI g E抗体産生抑制作用のみに限定するが、エポキシコハク酸アミド、モノエステル、ジエステル誘導体のように、側鎖の短い比較的構造の単純な化合物はシステインプロテアーゼ阻害作用が弱く、多様な免疫薬理学的作用を示すことが判った。

4. 小 括

E p - 4 5 9 の構造は複雑で、蛋白質に対する結合は特異的であり、従って免疫薬理学的効果も限定されている。そこで、構造を簡略にし蛋白質に対する結合特異性を減らせば多様な免疫薬理学的作用が発現するものと考え、E p - 4 5 9 関連化合物であるエポキシコハク酸アミド、モノエステル、ジエステル誘導体の合成を行い、その免疫薬理学的効果をAA, I g E抗体産生, L T Rを用いて検討した。その結果、E p - 4 5 9 のように構造の複雑なアミノ酸誘導体はシステインプロテアーゼ阻害活性が強く、その免疫薬理学的作用はI g E抗体産生抑制作用のみに限定されているが、エポキシコハク酸アミド、モノエステル、ジエステル誘導体のようにシステインプロテアーゼ阻害作用が弱く、構造の単純な化合物はAA抑制作用, I g E抗体産生抑制作用, L T R抑制作用等、多様な免疫薬理学的作用を示した。

以上のことから、蛋白質SH基へ結合するものは免疫薬理学的効果をもち、構造が複雑なものから単純なものに移行するに従い、その作用の強さを特異性が減弱し、多様性が増すことが認められた。

総 括

Slow acting antirheumatic drugs (SAARD) と呼ばれる抗リウマチ剤は、自己免疫疾患である慢性関節リウマチ (RA) の免疫異常を是正する薬剤であり、具体的にはSH化合物であるD-ペニシラミン (PA) 及びSH反応性化合物であるエポキシコハク酸誘導体等に臨床あるいは動物実験で抗リウマチ作用が認められている。SAARDは免疫担当細胞の酵素、レセプター、サイトカイン等の機能蛋白質のSH基、SS架橋への結合・反応することによりその免疫薬理学的効果を発揮するが、その生物学的作用の発現には著しい構造特異性が存在する。例えば、構造の単純な薬物は活性基周辺の立体障害性が低下し、非特異的な反応が亢進するが、その結果として標的蛋白質への反応性が低下する。さらに薬物と標的蛋白質の活性中心との立体構造的・電気的相補性に変化が生じて特異的な反応性が減弱するものと思われる。PAの場合はエポキシコハク酸誘導体の1つであるEp-459 (エポキシサクシニルロイシルアミノブタン) に較べて単純な構造をしており、種々の蛋白質SH基やアルデヒド基との結合に基づく副作用や複数の免疫薬理学的作用を有している。このことから、PAに種々の化学修飾を行ったPA関連化合物を合成し、免疫薬理学的作用の相互分離と増強の可能性を検討した。一方、非常に複雑な構造をしているEp-459の場合はシステインプロテアーゼ阻害作用が強いが、免疫薬理学的作用がIgE産生抑制作用のみに限定される。それ故、多様な免疫薬理学的作用の発現を目的として種々の単純な構造のEp-459関連化合物を合成して、その免疫薬理学的作用を検討した。

第I章においては、PAの抗リウマチ作用が複数の免疫薬理学的作用から成り立っているか否かを検討した。その結果、自然発症自己免疫疾患MRL/l系マウスでは、PAは免疫抑制剤と同様に延命効果、脾腫の抑制、腹腔細胞数の減少、リウマチ因子の減少等の抑制作用を示した。免疫調節剤では効果がなかったことから、PAは免疫抑制作用を有していることが判った。次にアジュバント関節炎 (AA)

よりも自己免疫の関与が明確であるタイプIIコラーゲン関節炎(CA)を用いてPAの効果を検討した。その結果、PAは他の免疫調節剤と同様にCAの悪化作用を示し、免疫抑制剤とは作用が異なるため免疫調節作用があることが判った。この際、CAラットの脾臓細胞をConcanavalin A(ConA)で刺激したリンパ球幼若化反応(LTR)において抑制作用を示したため、サブレッサーT細胞の誘導の抑制作用があることが示唆された。以上のことから、PAは免疫抑制作用と免疫調節作用を有しており、両作用によりPAの抗リウマチ作用が発揮されるものと考えられた。

第II章においては、PAのSH基周辺の構造を複雑にすることにより、機能蛋白質への結合性が増し、免疫薬理学的作用がより特異的になることを期待してPA関連化合物を合成し、その免疫薬理学的作用を検討した。その結果、PA関連化合物のうちでカルボキシル基から α 位または β 位にSAc基を有する化合物はAAの抑制作用、CA及びLTRの促進作用等免疫調節作用を示したが、MRL/l系マウス及びBWF₁マウスでは効果が認められず、免疫抑制作用を消失していた。一方、カルボキシル基から γ 位にSAc基を有する化合物はAA, LTR, 遅延型アレルギー反応(DTH), BWF₁マウス腎炎をすべて抑制し、PA以上に強い免疫抑制作用を示したが、免疫調節作用は認められなかった。以上のことからPAは免疫調節作用と免疫抑制作用を併有するが、カルボキシル基から α 位もしくは β 位にSAc基を有する化合物は免疫調節作用のみ、 γ 位にSAc基を有する化合物は抑制作用のみ発揮し、構造変換による両作用の分離が認められた。さらにPA関連化合物のうちでフェニル基さらにフェニル基にハロゲン、アルキル基等を有するものは、より強い免疫調節作用または免疫抑制作用を示した。

第III章では免疫薬理学的作用が限定されているEp-459について、種々の単純な構造の誘導体を合成し、その免疫薬理学的作用の多様性の発現を検討した。Ep-459はマウスIgE抗体産生を強く抑制するが、マウスIgG抗体産生を抑制しないこと及びIgE抗体産生抑制作用は脾臓細胞の移入により発揮できること

から、E p-459によるI g E抗体産生抑制作用がサブレッサーT細胞の誘導によることが示唆されている。モルモット喘息モデルにおいて、E p-459投与によりI g E抗体価の低下及び肺組織の肥満細胞からのヒスタミン遊離抑制が認められ、E p-459にI型アレルギー抑制作用のあることが判った。

次に、E p-459の構造を単純にした化合物の免疫薬理学的作用を検討した。その結果、E p-459のように構造の複雑なアミノ酸誘導体はシステインプロテアーゼ阻害作用が強く、その免疫薬理学的作用はI g E抗体産生抑制作用に限定されているが、エポキシコハク酸のアミド、モノエステル、ジエステル誘導体のようにシステインプロテアーゼ阻害作用が弱く、構造の単純な化合物はAA抑制作用、I g E抗体産生抑制作用、L T R抑制作用等多様な免疫薬理学的作用を示した。以上のことから、E p-459関連化合物において、構造が複雑なものから単純なものに移行するに従い、その作用の強さと特異性が減弱し多様性が増すことが認められた。

結論として、本研究においてはS H化合物であるP A関連化合物及びS H反応性化合物であるE p-459関連化合物について、免疫薬理学的特異性と構造との関係を調べ、以下のことが判明した。

- ① P Aに免疫調節作用と免疫抑制作用の両作用が認められた。
- ② P A関連化合物のうちで、カルボキシル基から α 位または β 位にS A c基を有する化合物は免疫調節作用を、 γ 位にS A c基を有する化合物は免疫抑制作用を示し、免疫薬理学的特異性に差が見い出された。
- ③ P A関連化合物のうちでフェニル基さらにフェニル基上にハロゲン、アルキル基等を有するものは、より強い免疫調節作用または免疫抑制作用を示した。
- ④ E p-459関連化合物は構造の複雑なものから単純なものへ移行するに従って、システインプロテアーゼ阻害作用が減弱し、I g E抗体産生抑制作用に加えてAA抑制作用及びL T R抑制作用が認められ、免疫薬理学的作用に多様性が発現した。

謝 辞

本研究に際し、御指導と御高配を賜りました千葉大学薬学部 教授 廣瀬聖雄博士に深く感謝の意を表します。

また、本研究の機会を与えられ、終始御激励、御鞭撻を戴きました大正製薬株式会社 常務取締役 大関正弘博士に深謝致します。

さらに、実験を遂行するに当たり、種々御指導と御助言を戴きました同薬理研究室室長 相原弘和博士，同薬理研究室 次席研究員 小友進博士，並びに絶えず御協力を戴きました同微生物研究室 主任研究員 玉井正晴氏，同有機化学研究室 主任研究員 富沢一雪博士，主任研究員補 亀尾一弥博士に心から感謝致します。

掲載雑誌目録

本論文の主要部分は次の報文の内容よりなり、第I章は1, 2、第II章は3, 4、第III章は5, 6の雑誌に掲載、又は掲載予定である。

1. Takeshita, K., Fukazawa, I., Kimura, M., Otomo, S., Aihara, H. : Effect of D-penicillamine on spontaneous autoimmune disease in MRL/l mice.
Int. J. Immunotherapy III(4) 251-259 (1987)
2. Takeshita, K., Otomo, S., Aihara, H. : Effects of antirheumatic and anti-inflammatory agents on type II collagen-induced arthritis in rats.
Int. J. Immunotherapy III(3) 201-211 (1987)
3. Takeshita, K., Fukazawa, I., Futaki, N., Kameo, K., Tomisawa, K., Otomo, S., Aihara, H. : Immunopharmacological studies of new 3-benzoyl-4-mercaptobutyric acids. Immunomodulating effects. Arzneim. Forsch. Drug Res. 38(1), 495-596 (1988)
4. Takeshita, K., Fukazawa, I., Nakaike, S., Kameo, K., Tomisawa, K., Otomo, S., Aihara, H. : Immunopharmacological studies of new 3-benzoyl-4-mercaptobutyric acids. Immunosuppressive effects. Drug Exp. Clin. Res. in press. (1988)
5. Takeshita, K., Otomo, S., Aihara, H., Yoshimura, H., Hanada, K. : Suppressive effects of Ep-459 on the IgE antibody response in mice and the bronchial anaphylaxis in guinea pigs. Int. J. Immunotherapy II(4) 279-288 (1986)

6. Takeshita, K., Tamai, M., Amamoto, T., Oguma, K., Fukazawa, I., Otomo, S.,
Aihara, H. : Immunopharmacological studies of epoxysuccinic acid
derivatives. Int.J.Immunotherapy in press. (1988)

参考文献

- (1) Natvig, J.B., Munthe, E. : Ann.NY.Acad.Sci., 256, 88 (1975)
- (2) 坂根 剛 : “免疫の研究”, 山村雄一編, p.132, 同文書院, 東京 (1986)
- (3) 塩川優一 : “膠原病・リウマチ学”, p.125, 朝倉書店, 東京 (1982)
- (4) Veys, E.M., Hermanns, P., Schindler, J. : J.Pneumatol., 9, 25 (1982)
- (5) Srastony, P., Rosenthal, M., Andreis, M. : Ann.NY.Acad.Sci., 256, 117 (1975)
- (6) Stecher, V.J., Carlson, J.A., Connolly, K.M., Bailey, D.M. : Medicinal Research Reviews, 5, 371 (1985)
- (7) Dresner, E., Trombly, P. : Clin.Res., 8, 16 (1960)
- (8) Jaffe, I.A. : J.Lab.Clin.Med., 60, 409 (1962)
- (9) Dixon, A.St.J., Davies, J., Dormandy, T.L., Hamilton, E.B.D., Holt, P.J.L., Mason, R.M., Thompson, M., Weber, J.C.P., Zutshi, D.W. : Ann.Rheum.Dis., 34, 416 (1975)
- (10) Shiokawa, Y., Horiuchi, Y., Honma, M., Kageyama, T., Okada, T., Azuma, T. : Azuma, Arth.Rheum., 20, 1464 (1977)
- (11) Multicetre trial grop : Lancet, 1, 275 (1973)
- (12) Husiccon, E.C. : In Penicillamine Research in Rheumatoid Disease, ed. by Munthe, E., p.222, Fabritius & Sonner, Oslo (1977)
- (13) Amor, B., Mery, C., de Gery, A. : Arthritis Rheum., 25, 698 (1982)
- (14) Passero, G., Ciompi, M.L. : Arthritis Rheum., 22, 803 (1979)
- (15) Passero, G., Pellegrini, P., Ambanelli, U., Ciompi, M.L., Colanussi, V., Ferraccioli, G., Barbieri, P., Mazzoni, M.R., Menegale, G., Trippi, D. : Arthritis Rheum., 25, 923 (1982)
- (16) Nakata, K., Suda, H., Yamauchi, H., Iso, T. : Japan J.Pharmacol., 37, 85

(1985)

- (17) 山内秀泰, 林 成光, 笠松貞夫, 須田 浩, 中田勝彦, 笹野 稔, 磯 正
: 日薬理誌, 85, 275 (1985)
- (18) 山内秀泰, 林 成光, 笠松貞夫, 中田勝彦, 壬生寛之, 磯 正: 日薬理誌,
85, 243 (1985)
- (19) 山内秀泰, 森河康一, 桑野光明, 正田光史, 藤村健一, 堀内正人, 植村 攻,
磯 正: 日薬理誌, 86, 25 (1985)
- (20) 杉山英二, 矢野三郎: リウマチ, 25, 582 (1985)
- (21) 佐藤俊祐, 海沼滋典, 松浦美喜雄, 奥石義晴: 第30回 日本リウマチ学会要
旨集, p.204, 横浜 (1986)
- (22) Schuermans, Y. : Lancet, 111 (1975)
- (23) Multicenter study group : Ann.Rheum.Dis., 41, 159 (1982)
- (24) Gruskin, B.J. : Arthritis Rheum., 21, 168 (1978)
- (25) 吉沢久嘉: リウマチ, 19, 277 (1979)
- (26) Highton, J., Panayi, G.S., Shepherd, P., Griffin, J., Gibson, T. :
Ann.Rheum.Dis., 40, 254 (1981)
- (27) Walz, D.T., Dimartino, M.J., Griswold, D.E. : Scand.J.Rheumatol.,
Suppl., 51, 16 (1983)
- (28) Finkelstein, A.E., Roisman, F.R., Manni, J.A. : Arthritis rheum.,
Suppl., 25, 136 (1982)
- (29) Amamoto, T., Okazaki, T., Komurasaki, T., Oguma, K., Tamai, M., Hanada, K.,
Omura, S. : Japan J.Pharmacol., 34, 335 (1984)
- (30) 小友 進, 高橋紀美代, 笹島道忠, 田中一郎: 日薬理誌, 74, 193 (1978)
- (31) 吉野慎一, 石山 晃夫: 臨床免疫, 7, 1005 (1975)
- (32) 吉野慎一, 石山 晃夫, 大類正江: 臨床免疫, 8, 221 (1976)
- (33) Lipsky, P.E., Ziff, P.J. : J.Clin.Invest., 65, 1069 (1983)

- (34) Lipsky, P.E. : J.Pneumatol., 8, 69 (1981)
- (35) Jaffe, I.A. : In Penicillamine research in rheumatoid disease ed. by Munthe, E., Oslo, Printed by Fabritius & Sonner, p.11 (1976)
- (36) Ondetti, M.A., Rubin, B., Cushman, D.W. : Science, 196, 441 (1977)
- (37) Cushman, D.W., Cheung, H.S., Sabo, E.F., Ondetti, M.A. : Biochemistry, 61, 5484 (1977)
- (38) 堀内正人, 寺島達雄, 藤村健一, 下河恵子, 磯 正 : 薬学雑誌, 104, 1257 (1984)
- (39) Hanada, K., Tamai, M., Yamagishi, M., Ohmura, S., Sawada, J., Tanaka, I. : Argic.Biol.Chem., 42(3), 523 (1978)
- (40) Barrett, A.J., Kembhavi, A.A., Brown, M.A., Kirschke, H., Knight, C.G., Tamai, M., Hanada, K. : Biochem.J., 201, 189 (1982)
- (41) 花田和紀, 横尾千尋, 村田充男, 小熊清司, 玉井正晴, 大村貞文, 渡辺慶昭, 曾田 馨, 松本和子 : 基礎と臨床, 20, 6295 (1986)
- (42) Wilson, J.E., Vigneud, V. : J.Biol.Chem., 184, 63 (1950)
- (43) Kuchinskas, E.J., Vigneaud, V. : Arch.Biochem.Biophys., 66, 1 (1957)
- (44) Kuchinskas, E.J., Horvath, A., Vigneaud, V. : Arch.Biochem.Biophys., 68, 69 (1957)
- (45) Nimni, M.E., Bavetta, L.A. : Science, 150, 905 (1965)
- (46) Harris, E.Jr., Sjoerdsma, A. : Lancet, 2, 996 (1966)
- (47) Henkin, R.I. : Lancet, 2, 1268 (1967)
- (48) Hewitt, J. : Brit.Med.J., 3, 371 (1975)
- (49) 大内和雄, 渡辺雅子, 平沢典保, 鶴藤 丞 : 薬局, 36, 17 (1985)
- (50) Renoux, G., Renoux, M. : C.R.Acad.Sc.Paris, 349 (1971)
- (51) Abe, C. : Int.J.Clin.Pharm.Res., 1, 225 (1981)
- (52) Ohsugi, Y., Hata, S., Tanemura, M., Nakano, T., Matsuno, T., Takagi, Y.,

- Nishii, Y., Shindo, M. : J. Pharm. Pharmacol., 29, 636 (1977)
- (53) Ohsugi, Y., Nakano, T., Hata, S., Niki, R., Matsuno, T., Nishii, Y., Takagaki, Y. : J. Pharm. Pharmacol., 30, 126 (1978)
- (54) 後藤 真, 渡辺富博 : Medical Immunology, 10, 50 (1985)
- (55) Theofilopoulos, A.N., Dixon, F.J. : Immunol. Rev., 55, 216 (1981)
- (56) Hang, L., Theofilopoulos, A.N., Dixon, F.J. : J. Exp. Med., 155, 1690 (1982)
- (57) 安倍千之 : Exp. Anim., 30, 161 (1981)
- (58) Abe, C., Mitsunaga, K., Shiokawa, Y. : The Ryumachi, 20, 233 (1980)
- (59) Abe, C., Shiokawa, Y., Ohishi, T., Hata, S., Takagaki, Y. : Ryumachi, 21, Suppl, 165 (1981)
- (60) Toivonen, M.L., Lindenl, B., Gripenberg, M., Vapaatalo, H. : Agents Actions, 15, 578 (1984)
- (61) Smith, H.R., Chused, T.M., Steinberg, A.D. : Clin. Immunol. Immunopathol., 30, 51 (1984)
- (62) Shiraki, M., Fujiwara, M., Tamura, S. : Clin. Exp. Immunol., 44, 333 (1984)
- (63) Shiraki, M., Fujiwara, M., : Clin. Exp. Immunol., 55, 519 (1984)
- (64) Ackerman, N.R., Trimble, B., Kowlaski, W.J., Sadakian, J., Miran, L., Terrell, T.G. : Advances in inflammation research, p.277, Raven press, New York (1984)
- (65) 安倍千之, 塩川優一 : 医学のあゆみ, 123, 121 (1982)
- (66) Izui, S., Eisenberg, R.A. : Clin. Immunol. Immunopathol., 15, 536 (1980)
- (67) 塚越 茂 : “癌化学療法・癌免疫療法の効果判定基準と制癌剤開発”, 斉藤達雄編, p.16, サイエンスフォーラム, 東京 (1981)
- (68) 片桐拓也 : “免疫の研究”, 山村雄一編, p.599, 同文書院, 東京 (1986)
- (69) Palacios, R. : Eur. J. Immunol., 14, 599 (1984)

- (70) Kofler, R., Schreiber, R.D., Dixon, F.J., Theofilopoulos, A.N. : Cell Immunol., 87, 92 (1984)
- (71) Sawada, S., Talal, N. : Arthritis Rheum., 22, 655 (1979)
- (72) Theofilopoulos, A.N., Shawler, D.L., Eisenberg, R.A., Dixon, F.J. : J. Exp. Med., 151, 446 (1980)
- (73) Izui, S., McConalhe, P.J., Dixon, F.J. : J. Immunol., 121, 2213 (1978)
- (74) Nakaike, S., Tanaka, C., Otomo, S., Aihara, H. : Int. J. Immunotherapy 1, 227 (1985)
- (75) Altman, K., Tobin, M.S. : Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 118, 554 (1965)
- (76) Schumacher, K., Maerker-Alzer, G., Schaaf, W. : Arznei-Forsch. Drug. Res., 25, 600 (1975)
- (77) Trentham, D.E., Thowmes, A.S., Kang, A.H. : J. Exp. Med., 146, 857 (1977)
- (78) Trentham, D.E. : Arthritis Rheum., 25, 911 (1982)
- (79) 宇高奎二, 山口典子 : 感染・炎症・免疫, 13, 17 (1983)
- (80) Probert, A.W., Schrier, D.J., Gilbertsen, R.B. : Arch. int. Pharmacodyn., 269, 167 (1984)
- (81) Jones, S.A., Kennedy, A.J. : Agents and Actions, 12, 650 (1982)
- (82) Phadke, K., Carroll, J., Nanda, S. : Clin. Exp. Immunol., 47, 579 (1982)
- (83) Sloboda, A.E., Birnbaum, J.E., Oronsky, A.L., Kerwar, S.S. : Arth. Rheum., 24, 616 (1981)
- (84) Stuart, J.M., Myers, L.K., Townes, A.S., Kang, A.H. : Arth. Rheum., 24, 790 (1981)
- (85) Kerwar, S.S., Sloboda, A.E., Birnbaum, J.E., Oronsky, A.L. : J. Rheumatol. (Suppl. 7), 84 (1981)
- (86) McCune, W.J., Trentham, D.E., David, J.R. : Arth. Rheum., 23, 932 (1980)
- (87) Duncan, I.B., Gill, J., Hawkes, J., Kennedy, A.J. : J. Pharmacol., 74, 203

(1981)

- (88) Avrameas, S., Taudou, B., Chuilon, S. : *Immunochemistry*, 6, 67 (1969)
- (89) Trentham, D.E., Townes, A.S., Kang, A.H., David, J.R. : *J.Clin.Invest.*, 61, 89 (1978)
- (90) Morgan, K., Claque, R.B., Shaw, M.H., Holt, P.J.L. : *Ann.Rheum.Dis.*, 39, 85 (1980)
- (91) Trentham, D.E., Dynesius, R.A., David, J.R. : *J.Clin.Invest.*, 62, 359 (1978)
- (92) Smith, M.J.H. : *Gen.Pharmacol.*, 12, 211 (1981)
- (93) Nagy, L., Lee, T.H., Goetzl, E.J., Pickett, W., Kay, A.B. : *Clin.Exp. Immunol.*, 47, 541 (1982)
- (94) Palmer, R.M.J., Stephney, R.J., Higgs, G.A., Eakins, K.E. : *Prostaglandins*, 20, 411 (1980)
- (95) Ford-Hutchinson, A.W., Bray, M.A., Doig, M.V., Shipley, M.E., Smith, M.J.H. : *Nature*, 289, 264 (1980)
- (96) Hoover, R.L., Karmovsky, M.L., Austern, K.F., Corey, E.J., Lewis, R.A. : *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, 81, 219 (1984)
- (97) Rae, S.A. : *Lancet II*, 1122 (1982)
- (98) Pastermak, R.D., Marks, R.L., Hubbs, S.J., Dipasquale, G. : *Res.Comm. Chem.Pathol.Pharmacol.*, 48, 353 (1985)
- (99) Highton, J., Panayi, G.S., Shepherd, P., Griffin, J., Gibson, T. : *Ann. Rheum.Dis.*, 40, 254 (1981)
- (100) Sakane, T., Green, I. : *J.Immunol.*, 119, 1169 (1977)
- (101) Dutton, R.W. : *J.Exp.Med.*, 136, 1445 (1972)
- (102) Rich, R.R., Poerce, C.W. : *J.Exp.Med.*, 137, 649 (1973)
- (103) Rich, R.R., Rich, S.S. : *Immunol.*, 117, 1112 (1975)

- (104) Peavy, D.L., Pierce, C.W. : J. Exp. Med., 140, 356 (1974)
- (105) Abdou, N.I., Pascual, E., Racela, L.S. : Arthritis Rheum., 22, 586 (1976)
- (106) Keyston, E.C., Gladman, D.D., Buchanan, R., Cane, D., Poplondki, L. :
Arthritis Rheum., 23, 1246 (1980)
- (107) Tosato, G., Steinberg, A.D., Blaese, R.N. : New Engl. J. Med., 19, 1238
(1981)
- (108) Mota, I., Wong, D. : Life sciences, 8, 813 (1969)
- (109) 安部千之 : リウマチ, 19, 529 (1979)
- (110) 小友 進, 竹下紀美代, 国府田寿子, 大関正弘 : 日薬理誌, 78, 45 (1981)
- (111) 小友 進, 中池司郎, 辻 郁子, 大関正弘 : 日薬理誌, 77, 313 (1981)
- (112) Kienecker, B. : Med. Welt., 25, 1540 (1974)
- (113) Nakaike, S., Takeshita, K., Siono, M., Tomita, N., Otomo, S., Aihara, H. :
Agents Actions, 16, 514 (1985)
- (114) Gershon, R.K., Maurer, P.H., Merryman, C.F. : Proc. Natl. Acad. Sci. USA,
70, 250 (1973)
- (115) Kameo, K., Ogawa, K., Tomisawa, K., Takeshita, K., Nakaike, S., Sota, K.
: Chem. Pharm. Bull., in press (1988)
- (116) Cunningham, A.J., Szenberg, A. : Immunology, 14, 599 (1968)
- (117) Jones, M.G., Harris, G. : Clin. Exp. Immunol., 59, 1 (1985)
- (118) Walker, S.E., Anver, M.R., Schechter, S.L., Bole, G.G. : Kidney Int.,
14, 151 (1978)
- (119) Gerber, N.L., Powell, D., Steinberg, A.D. : Arthritis Rheum., 20, 1263
(1977)
- (120) 沢田滋正, 天木一太 : “免疫治療学”, 堀内淑彦, 松橋 直, 橋本嘉幸,
(121) 矢田純一編, p.14, 理工学社, 東京 (1980)
- (121) Lambert, P.H., Dixon, F.J. : J. Exp. Med., 127, 507 (1968)

- (122) 安部千之：“疾患モデル動物ハンドブック No.2”，川俣順一，松下 宏編，
p.296，医歯薬出版，東京，(1982)
- (123) Eisen, H.N., Belman, S., Casten, M.E. : J. Am. Chem. Soc., 74, 4583 (1953)
- (124) Ovary, Z., Cazza, S.S., Kojima, S. : Int. Arch. Allergy Appl. Immun., 48,
16 (1975)
- (125) Andersson, P., Brattsand, R. : Br. J. Pharmac., 76, 139 (1982)
- (126) Andersson, P. : Allergy, 35, 65 (1980)
- (127) Andersson, P. : Int. Archs. Allergy Appl. Immunol., 64, 249 (1981)
- (128) Andersson, P., Bergstrand, H. : Br. J. Pharmac., 74, 601 (1981)
- (129) Watanabe, N., Ovary, Z. : J. Immunol. Methods, 14, 581 (1977)
- (130) Komatsu, M. : Allergy, 27, 67 (1978)
- (131) Shore, P.A., Burkhalter, A., Cohn, V.H. : J. Pharmac. Exp. Ther., 127,
182 (1959)
- (132) Ishizaka, K., Ishizaka, T. : J. Immunol., 88, 1187 (1967)
- (133) Revoltella, R., Ovary, Z. : Immunology, 17, 45 (1969)
- (134) Ishizaka, K., Ishizaka, T. : Immunology Rev., 41, 133 (1978)
- (135) King, T.P., Kochoumian, L., Chiorazzi, N. : J. Exp. Med., 149, 424 (1979)
- (136) Katz, D.H., Hamaoka, T., Benacerraf, B. : J. Exp. Med., 139, 1464 (1974)
- (137) Takeshita, K., Otomo, S., Aihara, H., Oguma, K., Amamoto, T. : Int. J.
Immunotherapy, 2, 137 (1986)
- (138) Tamura, S., Ishizaka, K. : J. Immunol., 120, 837 (1978)
- (139) Taniguchi, M., Tada, T. : J. Immunol., 107, 579 (1971)
- (140) Takatsu, K., Ishizaka, K. : J. Immunol., 117, 1211 (1976)
- (141) 岩田 誠：“免疫の研究”，山村雄一編，p.431，同文書院，東京（1986）
- (142) 石坂照子：“アレルギーと炎症”，石坂公成，林 秀男編，p.1，岩波書店，
東京（1985）

- (143) Eyre, P. : *Vet. Res. Commun.*, 4, 83 (1983)
- (144) Ogunbiyi, P.O., Eyre, P. : *Agents Actions*, 17, 158 (1985)
- (145) Payne, G.B., Williams, P.H. : *J. Org. Chem.*, 24, 54 (1959)
- (146) Miller, M.W. : *J. Med. Chem.*, 6, 233 (1963)
- (147) Tamai, M., Hanada, K., Adachi, T., Oguma, K., Kashiwagi, K., Omura, S.,
Ohzeki, M. : *J. Biochem.*, 90, 255 (1981)
- (148) Tamai, M., Yokoo, C., Murata, M., Oguma, K., Sota, K., Kanaoka, Y. :
Chem. Pharm. Bull 35, 1098 (1987)
- (149) Hanada, K., Tamai, M., Morimoto, S., Adachi, T., Oguma, K., Omura, S.,
Ozeki, M. : "Peptide Chem.", ed by Yonehara, H. Protein Research
Found., p.31 (1980)
- (150) Hanada, K., Tamai, M., Morimoto, S., Asahi, T., Omura, S., Sawada, J.,
Tanaka, I. : *Agroc. Biol. Chem.*, 42, 537 (1978)
- (151) Hanada, K., Tamai, M., Yamagishi, M., Ohmura, S., Sawada, J., Tanaka, I. :
Agric. Biol. Chem., 42, 523 (1978)
- (152) Barrett, A.J., Kumbhavi, A.A., Brown, M., Kirsxhke, H., Knight, C.G.,
Tamai, M., Hanada, K. : *Biochem. J.*, 201, 189 (1982)
- (153) Tamai, M., Adachi, T., Oguma, K., Morimoto, S., Hanada, K., Ohmura, S.,
Ohzeki, M. : *Agric. Biol. Chem.*, 45, 675 (1981)
- (154) Tamai, M., Matsumoto, K., Omura, S., Koyama, I., Ozawa, Y., Hanada, K. :
J. Pharmacobio-Dyn., 9, 672 (1986)