

炎症に対する新規アデノシン取り込み阻害剤 KF24345 の
有効性に関する薬理学的研究

2003 年

野地 徹

目次

序論	1
第 1 章 KF24345 のアデノシン取り込み阻害作用	
1-1. 序文	8
1-2. 実験方法	9
1-3. 結果	
➤ In vitro 赤血球アデノシン取り込み阻害	12
➤ In vivo 全血アデノシン取り込み阻害	12
1-4. 考察	16
1-5. 小括	18
第 2 章 リポポリサッカライド (LPS) 誘発腫瘍壊死因子 α (TNF- α) 産生および白血球減少に対する KF24345 の作用ならびに内因性アデノシンの関与	
2-1. 序文	19
2-2. 実験方法	21
2-3. 結果	
➤ LPS 誘発 TNF- α 産生に対する KF24345 の作用	23
➤ LPS 誘発白血球減少に対する KF24345 の作用	23
2-4. 考察	26
2-5. 小括	28
第 3 章 糸球体腎炎に対する KF24345 の作用	
3-1. 序文	29
3-2. 実験方法	31

3-3.	結果	
➤	蛋白尿に対する KF24345 の作用	35
➤	腎の組織学的変化に対する KF24345 の作用	35
➤	副作用の解析	36
3-4.	考察	43
3-5.	小括	46
第 4 章	軽症急性膵炎に対する KF24345 の作用および内因性アデノシンの関与	
4-1.	序文	47
4-2.	実験方法	49
4-3.	結果	
➤	KF24345 の作用	52
➤	KF24345 の作用に対するアデノシン拮抗薬の影響	52
➤	他のアデノシン取り込み阻害剤の作用	52
4-4.	考察	59
4-5.	小括	62
第 5 章	重症急性膵炎に対する KF24345 の作用および内因性アデノシンの関与	
5-1.	序文	63
5-2.	実験方法	65
5-3.	結果	
➤	致死、血清パラメーターおよび膵の組織学的変化に 対する KF24345 の作用	70
➤	血清 TNF- α 濃度に対する KF24345 の作用	71
➤	KF24345 の作用に対するアデノシン受容体拮抗薬の 影響（致死観察）	71
➤	血漿中アデノシン濃度に対する KF24345 の作用	72

5-4. 考察	80
5-5. 小括	84
総括	85
引用文献	87
謝辞	98
主論文目録	99
主査、副査名	100

略語一覽

AMP:	adenosine monophosphate
ATP:	adenosine triphosphate
CCK:	cholecystokinin
CDE diet:	choline-deficient and ethionine-supplemented diet
CNT:	concentrative nucleoside transporter
<i>ei</i> :	<i>equilibrative insensitive</i>
ELISA:	enzyme-linked immunosorbent assay
ENT:	equilibrative nucleoside transporter
<i>es</i> :	<i>equilibrative sensitive</i>
GBM:	glomerular basement membrane
GPT:	glutamic-pyruvic transaminase
H&E:	hematoxylin and eosin
IgG:	immunoglobulinG
KF24345:	3-[1-(6,7-diethoxy-2-morpholinoquinazolin-4-yl)piperidin-4-yl]-1,6-dimethyl-2,4(1 <i>H</i> ,3 <i>H</i>)-quinazolinedione hydrochloride
KW-3902:	8-(noradamantan-3-yl)-1,3-dipropylxanthine
LBP:	lipopolysaccharide binding protein
LDH:	lactate dehydrogenase
LPS:	lipopolysaccharide
MODS:	multiple organ dysfunction syndrome
NBI:	nitrobenzylthioinosine
NECA:	5'-N-ethylcarboxamidoadenosine
PAS:	periodic acid-Schiff
R75231:	2-(aminocarbonyl)- <i>N</i> -(4-amino-2,6-dichlorophenyl)-4-[5,5-bis(4-fluorophenyl)pentyl]-1-piperazineacetamide

SAH:	S-adenosylhomocysteine
SIRS:	systemic inflammatory response syndrome
8-SPT:	8-(<i>p</i> -sulfophenyl)theophylline
TNF- α :	tumor necrosis factor- α
ZM 241385:	4-(2-[7-amino-2-(2-furyl)[1,2,4]triazolo[2,3-a][1,3,5]triazin-5-ylamino]ethyl)phenol

序論

アデノシンは内因性のプリンヌクレオシドであり、細胞表面上の受容体へ結合して様々な生体反応を調節する (1)。現在、アデノシン受容体は A₁、A_{2A}、A_{2B} および A₃ の 4 種に分類されており、全てが 7 回膜貫通型 G 蛋白結合受容体のスーパーファミリーに属する (2)。アデノシン A₁ および A₃ 受容体はアデニレートシクラーゼ抑制型 Gi 蛋白質に共役し、細胞内サイクリック AMP レベルを低下させる。一方、アデノシン A_{2A} および A_{2B} 受容体はアデニレートシクラーゼ活性型 Gs 蛋白質に共役し、細胞内サイクリック AMP レベルを上昇させる (3)。アデノシンの代表的な作用として、A₁ 受容体刺激による心拍数低下や心筋伝導遅延、ならびに A₂ 受容体刺激による血圧低下や血小板凝集抑制等が知られている (4)。アデノシンを *in vivo* で投与すると、A₁ 受容体を介した心拍数低下および A₂ 受容体を介した血圧低下が惹起される (5)。

定常状態においては (Fig. 1A)、アデノシンは主に細胞内で S-アデノシルホモシステイン (S-adenosylhomocysteine ; SAH) から SAH ヒドロラーゼにより産生される (6)。一方虚血、外傷、ストレス、炎症等の侵襲条件下においては (Fig. 1B)、アデノシン三リン酸 (adenosine triphosphate ; ATP) の分解亢進等により、5'-ヌクレオチダーゼを介したアデノシン一リン酸 (adenosine monophosphate ; AMP) からのアデノシン生成経路が優位となる (6)。5'-ヌクレオチダーゼは細胞内のエンド (サイトゾリック) 型より細胞膜上のエクト型の方が AMP に対する親和性が高く、AMP が増加する侵襲条件下においては、エクト型の 5'-ヌクレオチダーゼを介したアデノシンの産生が主となる (7)。この場合アデノシンは細胞外で産生され、細胞外アデノシンの濃度は定常状態の 50 倍程度まで上昇する (7)。増加した細胞外アデノシンは、細胞膜上のアデノシン受容体に結合することにより血管拡張作用や細胞へのカルシウムイオン流入抑制作用、心筋収縮抑制作用、ならびに血小板および炎症細胞活性化の抑制作用等を発現し、生体の恒常性を維持する方向に働く (8)。これにより、アデノシンは細胞、組織等の傷害や機能不全に対して保護的に作用し、

虚血傷害抑制作用や抗炎症作用を発現することが報告されている (9、10)。しかし、アデノシンは後述するヌクレオシドトランスポーターを介して血球細胞や血管内皮細胞等に速やかに取り込まれて代謝されるため、その作用は短時間で消失する (11、12)。また、大量のアデノシンやアデノシンアゴニストの全身性投与により目的とする薬理作用 (虚血傷害抑制作用や抗炎症作用) を得ることは可能であるが、同時に心拍数減少、血圧低下、鎮静等の副作用も発現することから、アデノシン自体やアデノシンアゴニストの疾患治療への臨床応用は制限されている (13)。

ヌクレオシドトランスポーター阻害剤 (アデノシン取り込み阻害剤) は、アデノシンの臨床応用への制限を解決する一手段と考えられる。ヌクレオシドトランスポーターは、受動輸送 (促進拡散) のプロセスをとる拡散型トランスポーター (equilibrative nucleoside transporter ; ENT) と、ナトリウムイオン濃度に依存した濃縮型トランスポーター (concentrative nucleoside transporter ; CNT) に大別される (14、15)。多くの細胞においては ENT がヌクレオシドトランスポーターの主要構成要素であるため、通常アデノシンは濃度勾配に従って細胞内外を移動する (16、17)。虚血や炎症等の侵襲条件下においては、細胞外でアデノシンが産生されて細胞外アデノシン濃度が高まっているため、アデノシンは主としてヌクレオシドトランスポーターを介して細胞外から細胞内へ取り込まれる。従って、この状況下でヌクレオシドトランスポーターの機能を阻害することはアデノシンの細胞内への取り込みおよび代謝を抑制する結果となり、細胞外アデノシン濃度は持続的に高まると予想される (Fig. 2 ; 18)。以上の作業仮説により、アデノシン取り込み阻害剤はアデノシンの産生が高まっている傷害部位において局所的に細胞外アデノシン濃度を上昇させ、組織保護作用を発現すると期待される。アデノシン取り込み阻害剤は必要な部位でのみ細胞外アデノシン濃度を増加させることが可能であり、全身性副作用を発現するアデノシンやアデノシンアゴニストと比較して、より優れた虚血傷害抑制薬や抗炎症薬となる可能性が考えられる。

アデノシンは細胞内へ取り込まれた後にアデノシンキナーゼにより AMP へ、あるいはアデノシンデアミナーゼによりイノシンへそれぞれ代謝され、消失する (Fig.

1)。従って、これらの代謝酵素阻害剤（アデノシンキナーゼ阻害剤、アデノシンデアミナーゼ阻害剤）もまた、細胞外アデノシン濃度を上昇させると考えられる（19）。しかし、アデノシンキナーゼおよびアデノシンデアミナーゼは多くの細胞内に普遍的に存在しており、またアデノシンデアミナーゼは血液中にも存在していることから、これらの代謝酵素阻害剤では局所的に細胞外アデノシン濃度を増加させることは困難であると考えられる。事実、アデノシンキナーゼ阻害剤は敗血症性ショックのような重篤な侵襲動物モデルにおいて有効である一方（20）、中枢神経系を中心とする幅広い作用を発現することも報告されている（21）。以上の知見より、アデノシンやアデノシンアゴニストのみならずアデノシン代謝酵素阻害剤と比較しても、アデノシン取り込み阻害剤はより優れた疾患治療薬となる可能性が考えられる。

アデノシン取り込み阻害剤の治療への応用としては、ジラゼプおよびジピリダモールがそれぞれコメリアン®およびペルサンチン®の商品名で虚血性心疾患に対して臨床応用されている（Fig. 3；22、23）。また、ヤンセン社が開発していた特異的アデノシン取り込み阻害剤 2-(aminocarbonyl)-N-(4-amino-2,6-dichlorophenyl)-4-[5,5-bis(4-fluorophenyl)pentyl]-1-piperazineacetamide (R75231； Fig. 3) も虚血性心疾患が想定適応症であった（24）。虚血傷害抑制作用に加え、アデノシンは抗炎症作用を有することも報告されている（11、25）。虚血状態と同様に、炎症状態においてもエネルギー需要の増加等のために ATP 分解が亢進し、炎症部位におけるアデノシンの産生は亢進する（26、27）。実際に、5'-ヌクレオチダーゼ活性が炎症状態で上昇することが報告されている（28）。また、アデノシンおよびアデノシンアゴニストが動物炎症モデルにおいて有効であることも報告されている（29、30）。従って、アデノシン取り込み阻害剤は虚血傷害抑制作用のみならず抗炎症作用も発現することが期待されるが、現在までに炎症疾患に対するアデノシン取り込み阻害剤の有効性を報告した例はない。

以上の知見より、本研究においては炎症に対するアデノシン取り込み阻害剤の有効性を検討することを目的に、以下の順で新規アデノシン取り込み阻害剤

3-[1-(6,7-diethoxy-2-morpholinoquinazolin-4-yl)piperidin-4-yl]-1,6-dimethyl-2,4(1*H*,3*H*)-quinazolinedione hydrochloride (KF24345 ; Fig. 4) の薬効を解析し、炎症疾患に対する KF24345 の作用を検討した。KF24345 は、協和発酵工業株式会社医薬総合研究所で創生された新規骨格を有するアデノシン取り込み阻害剤である。まず、KF24345 のアデノシン取り込み阻害作用を *in vitro* および *in vivo* にて検討し（第 1 章）、次にアデノシン取り込み阻害剤が *in vivo* で抗炎症作用を発現するか否かを明らかにするため、リポポリサッカライド (lipopolysaccharide ; LPS) で誘発される腫瘍壊死因子 α (tumor necrosis factor- α ; TNF- α) の産生および白血球減少に対する KF24345 の作用をマウスで検討した（第 2 章）。続いてアデノシン取り込み阻害剤が炎症疾患に対して有効であるか否かを検証するため、マウスの糸球体腎炎および急性膵炎に対する KF24345 の作用を検討した（第 3-5 章）。アデノシン取り込み阻害剤の作用における内因性アデノシンおよびアデノシン受容体の関与を検証するため、第 2、4 および 5 章においては、KF24345 の作用に対するアデノシン受容体拮抗薬の影響を併せて検討した。KF24345 が上記モデルにおいて何らかの作用を示し、その作用がアデノシン受容体拮抗薬の併用により消失すれば、KF24345 はアデノシン取り込み阻害により細胞外で増加した内因性アデノシンを介してその作用を発現していると考えられる。

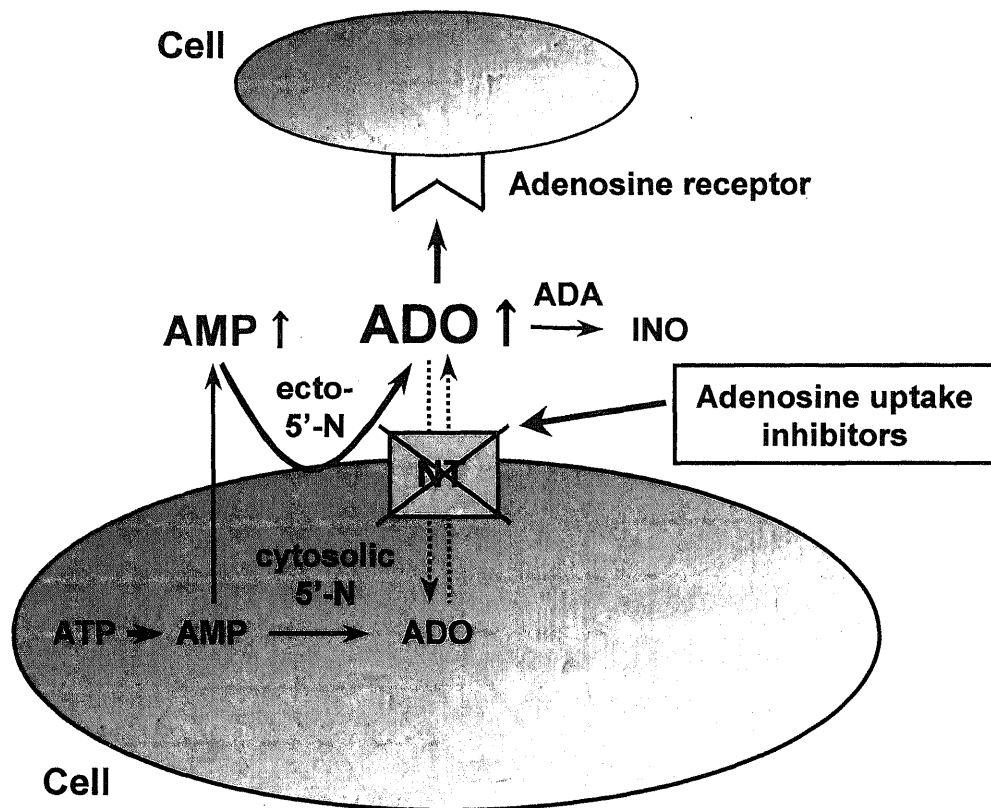


Fig. 2. Effect of adenosine uptake inhibitors on action and metabolism of adenosine in adverse condition. ADA: adenosine deaminase, ADO: adenosine, AMP: adenosine monophosphate, ATP: adenosine triphosphate, INO: inosine, 5'-N: 5'-nucleotidase, NT: nucleoside transporter.

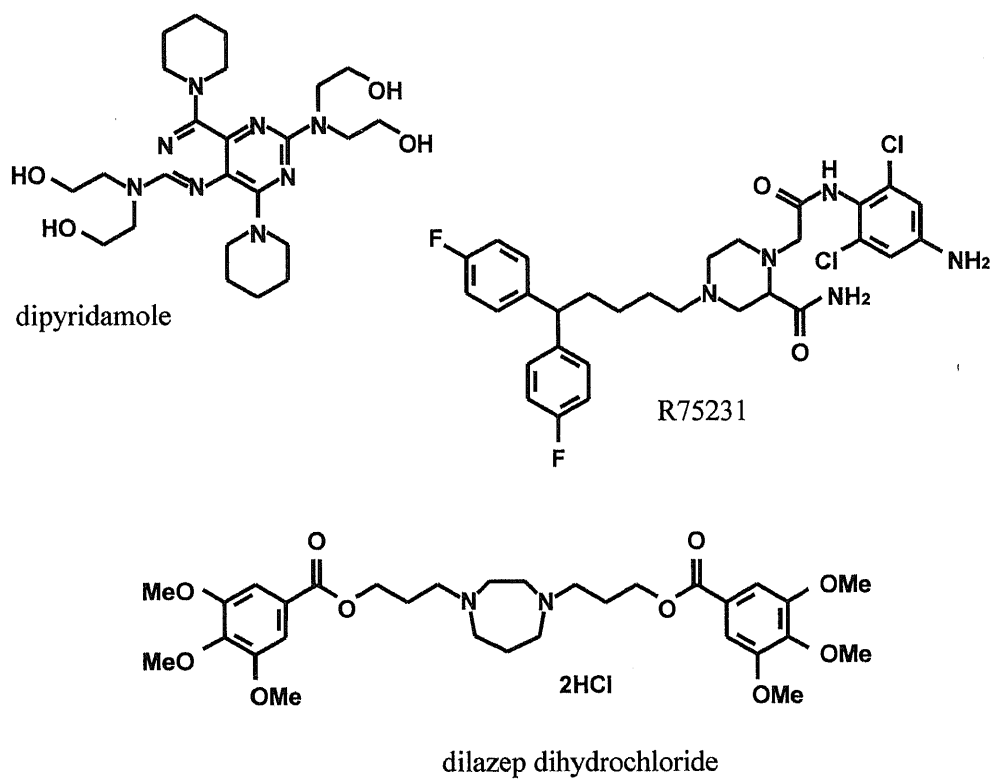


Fig. 3. Adenosine uptake inhibitors.

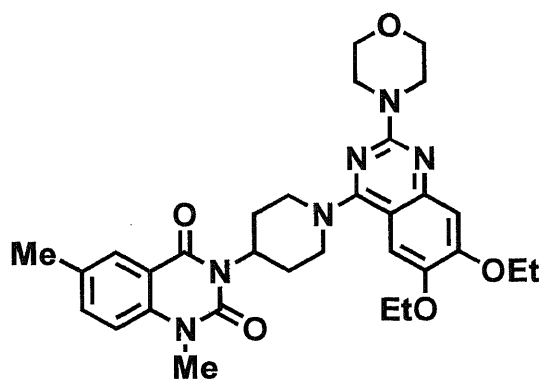


Fig. 4. KF24345.

第 1 章 KF24345 のアデノシン取り込み阻害作用

1-1. 序文

アデノシンは、細胞膜上のヌクレオシドトランスポーター（アデノシントランスポーター）を介して細胞内外を移動する。ヌクレオシドトランスポーターは、11 回細胞膜貫通型蛋白質である受動拡散型トランスポーター ENT と、13 回細胞膜貫通型のナトリウムイオン濃度に依存した濃縮型トランスポーター CNT に大別される（14、15）。ENT はさらにニトロベンジルチオイノシン（nitrobenzylthioinosine ; NBI）に対する親和性の相違に基づき、*es* (equilibrative sensitive) 型（ENT1）および *ei* (equilibrative insensitive) 型（ENT2）の 2 種に分類される（18）。*es* 型は NBI に高親和性の結合部位を有し、nM 単位の濃度の NBI によりその機能（ヌクレオシドトランスポート）がほぼ完全に阻害される。これに対し *ei* 型は、 μ M 単位の NBI でなければ阻害されない。一方 CNT は、トランスポーターに対して親和性を示す基質の種類により 5 種のサブタイプ（N1-N5）に分類される（18）。

虚血、炎症等の侵襲条件下において、増加した細胞外アデノシンを主に取り込んでいる細胞は血球細胞（特に赤血球）や血管内皮細胞等と考えられる。これらの細胞においては ENT1 がヌクレオシドトランスポーターの主要構成要素であるため（17）、アデノシンの産生が高まっている局所で細胞外アデノシン濃度を高めるためには ENT1 を阻害することが有効である。実際に、冠血管拡張薬として用いられているジラゼプおよびジピリダモールは ENT1 を強く阻害する（15）。

KF24345 は、モルモット脳膜画分への NBI 結合を強く阻害することで見出された化合物である。本章においては、KF24345 が機能としてのアデノシン取り込みを阻害するか否かをヒトを含む各種動物（マウス、ウサギ、ハムスター）の洗浄赤血球（in vitro）およびマウス（in vivo）にて検討し、その作用を既存のアデノシン取り込み阻害剤であるジラゼプ、ジピリダモールおよび R75231（31、32）と比較した。

1-2. 実験方法

動物

- 雄性 ddY マウス (20-30 g) … 日本エスエルシー
株式会社 (浜松)
- 雄性 New Zealand White ウサギ (2-3 kg) … 同上
- 雄性 golden Syrian ハムスター (100-200 g) … 同上

化合物

- ジラゼプ (dilazep) … Sigma Chemical Co.
(St. Louis, MO, USA)
- ジピリダモール (dipyridamole) … 同上
- アデノシン (adenosine) … 同上
- [2,8-³H]アデノシン (41 Ci/mmol) … NENTM Life Science Products, Inc.
(Boston, MA, USA)
- KF24345 … 協和発酵医薬総合研究所にて合成
- R75231 … 同上

In vitro の検討においては、アデノシン取り込み阻害剤 (KF24345、ジラゼプ、ジピリダモールおよび R75231) をジメチルスルフォキシドに溶解し、種々濃度を調製した。In vivo の検討においては、アデノシン取り込み阻害剤を 0.5% (w/v) メチルセルロースで溶解あるいは懸濁し、10 mL/kg の容量で経口投与した。

In vitro 赤血球アデノシン取り込み阻害

男性健常人より採血し、血液 : 3.8% (w/v) クエン酸ナトリウム = 9 : 1 の容量比となるようチューブ内で混和した。マウス、ウサギおよびハムスターの血液はエーテル麻酔下で腹部大静脈より採取し、ヒト血液と同様にクエン酸ナトリウムと混和した。遠心 (1000 g、10 分) 後赤血球を 2 倍容量の生理食塩液で 3 回洗浄し、洗浄

した赤血球をアッセイ用培地（10 mM HEPES で pH 7.4 に調整した重炭酸イオンフリーのイーグル培地）中に懸濁した。赤血球浮遊液中の赤血球数を血球カウンター（Celltacα MEK-6158、日本光電工業株式会社、東京）で計測し、細胞濃度が 2.5×10^9 cells/mL となるよう調整した。

赤血球のアデノシン取り込みは、既法（33）に従って測定した。赤血球浮遊液 100 μ L (2.5×10^8 cells、アッセイ用培地中) を反応チューブ内で種々の濃度のアデノシン取り込み阻害剤と 1 時間反応させ（室温）、その後 1 μ M の [2,8- 3 H]アデノシン溶液 100 μ L (100000-150000 dpm) を添加することによりアデノシン取り込みを開始させた。10 秒後、反応停止液 200 μ L (2 mM ジラゼプ溶液) を加えてアデノシンの取り込みを停止させた。直後にフタル酸ジブチル 300 μ L を加えて 15 秒間遠心 (10000 g、4°C) し、赤血球をフタル酸ジブチルの油層の下に沈降させた。吸引により油層上の上清を除去し、1 mL の生理食塩液で反応チューブを洗浄した。その後油層も吸引により除去し、沈降した赤血球を分取した。分取した沈降赤血球塊に 200 μ L の 1% (v/v) Triton X-100 を加えて溶血させ、シンチレーションバイアル中へ移動させた。シンチレーションカクテル 8 mL を加え、液体シンチレーションカウンター (LS6500、Beckman、Fullerton、CA、USA) にて放射活性を測定した。

各アデノシン取り込み阻害剤のアデノシン取り込み阻害率は、以下の式より計算した。非特異的放射活性は、反応停止液存在下で [2,8- 3 H]アデノシンを添加した場合の放射活性とした。

$$\text{阻害率 (\%)} = \frac{(\text{阻害剤非存在下の放射活性} - \text{阻害剤存在下の放射活性})}{(\text{阻害剤非存在下の放射活性} - \text{非特異的放射活性})} \times 100$$

In vivo 全血アデノシン取り込み阻害

既法（34）に従い、アデノシン取り込み阻害剤の in vivo における作用をマウスで検討した。各阻害剤のそれぞれの用量をマウスに経口投与し、その 2、6 および 10（あるいは 2、4 および 8）時間後にエーテル麻酔下で腹部大静脈よりクエン酸採

血した（全血 450 μ L + 3.8% (w/v) クエン酸ナトリウム 50 μ L）。血液サンプルは、0.38% (w/v) クエン酸ナトリウムを含むアッセイ用培地で速やかに 1.5 倍に希釈した。アデノシンの取り込みは、1 μ M の[2,8- 3 H]アデノシン溶液 100 μ L (100000-150000 dpm) を希釈血液サンプル 100 μ L へ添加することにより開始させた。以後の手順は、“in vitro 赤血球アデノシン取り込み阻害” の項に記載の方法と同様に行った。

データ処理および統計解析

データは平均値 $\pm$ 標準誤差で表示した。In vitro アデノシン取り込み阻害実験における各アデノシン取り込み阻害剤の 50%阻害濃度 (IC_{50}) は、probit 法により算出した。In vivo アデノシン取り込み阻害実験における統計学的有意差は一元配置分散分析および Dunnett's test を用いて検定し、危険率 5%未満を有意差ありとした。

1-3. 結果

In vitro 赤血球アデノシン取り込み阻害

KF24345 は既存のアデノシン取り込み阻害剤と同様に、ヒト (Fig. 1-1A) およびマウス (Fig. 1-1B) 洗浄赤血球のアデノシン取り込みを濃度依存的に阻害した。双方の洗浄赤血球において、サブ μ M の KF24345 によりアデノシン取り込みはほぼ完全に阻害された。

ウサギおよびハムスターの洗浄赤血球においても同様の検討を行い、各種動物の洗浄赤血球における各々のアデノシン取り込み阻害剤の IC_{50} 値をまとめた (Table 1-1)。検討された化合物の中では、ジラゼブのアデノシン取り込み阻害作用が全ての動物種において最も強力であった。他の取り込み阻害剤と比較して、KF24345 はジラゼブより若干弱活性であったが、R75231 とほぼ同程度の活性を示した。検討された全動物種の赤血球間で、KF24345 の阻害活性に大きな相違は認められなかった。

In vivo 全血アデノシン取り込み阻害

KF24345 は、マウスに経口投与後の全血のアデノシン取り込みを阻害した (Fig. 1-2A)。10 mg/kg の KF24345 は、経口投与 2 時間後から 10 時間後にわたりほぼ完全にアデノシン取り込みを阻害した。ジピリダモール (Fig. 1-2C) および R75231 (Fig. 1-2D) もアデノシンの取り込みを阻害したが、これらの化合物によるアデノシン取り込み阻害作用はその経口投与 8 時間後あるいは 10 時間後には消失した。さらに、KF24345 10 mg/kg による阻害作用と同等の阻害作用を達成するために、ジピリダモールおよび R75231 は KF24345 と比較してより多くの投与量を必要とした。ジラゼブは *in vitro* で KF24345 より強活性であったが、経口投与では 300 mg/kg までマウス全血のアデノシン取り込みを阻害しなかった。

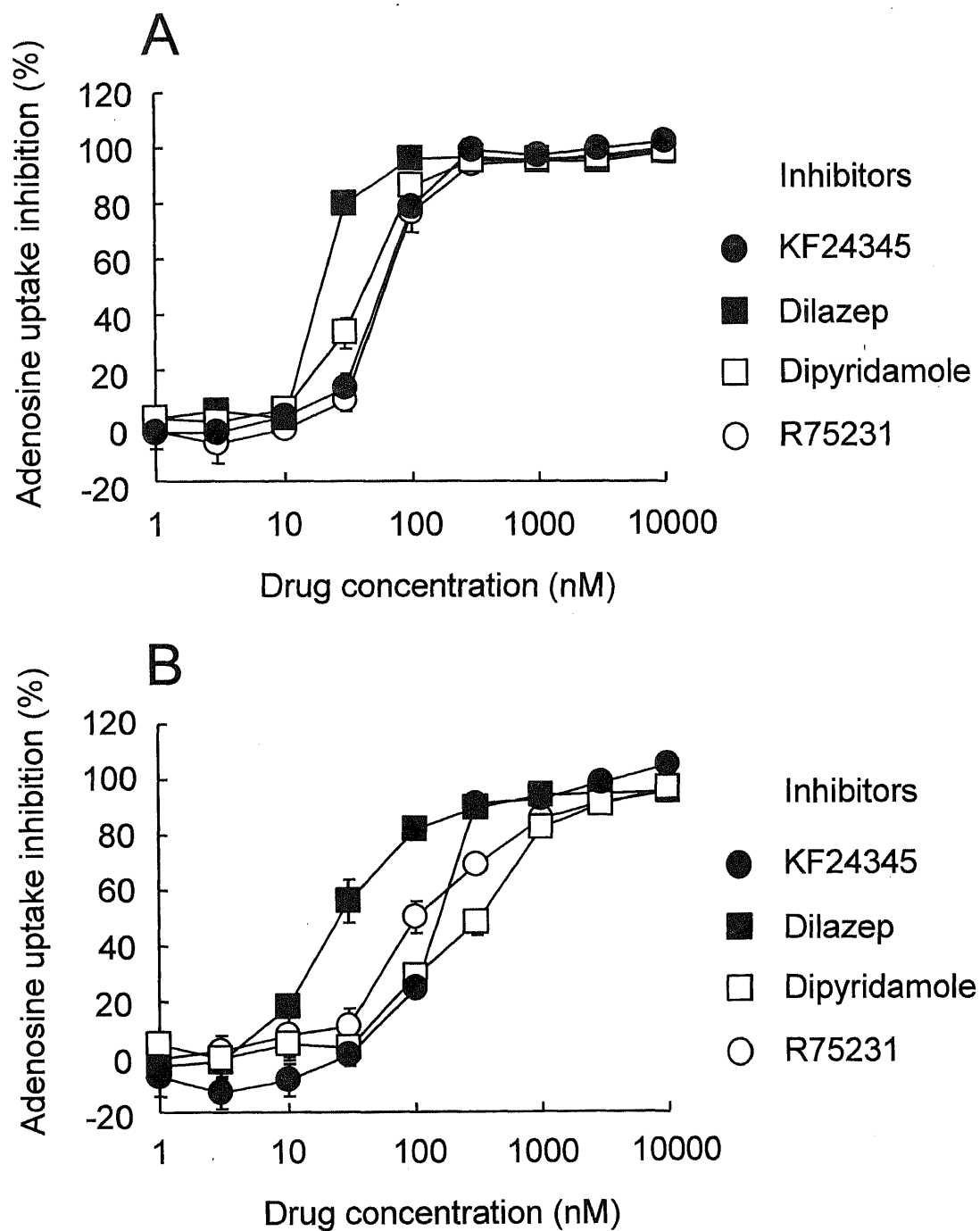


Fig. 1-1. Representative inhibition curves with various adenosine uptake inhibitors in isolated erythrocytes from human (A) and mouse (B). Erythrocytes were incubated with 1 μ M of [3 H]adenosine for 10 sec in the presence of various concentrations of adenosine uptake inhibitors. Values are means $\pm$ S.E. of 5 separate experiments. IC₅₀ values are given in Table 1-1.

TABLE 1-1

IC₅₀ values for various adenosine uptake inhibitors in erythrocytes from human, mouse, rabbit and hamster

Inhibitors	Human	Mouse	Rabbit	Hamster
KF24345	59.5 ± 9.8	130.1 ± 13.2	104.2 ± 11.6	30.9 ± 2.2
Dilazep	27.8 ± 3.9	33.3 ± 8.5	22.4 ± 2.5	7.9 ± 0.3
Dipyridamole	44.8 ± 5.3	274.1 ± 30.2	27.7 ± 3.2	113.3 ± 21.8
R75231	76.2 ± 14.1	118.3 ± 19.1	39.4 ± 4.6	33.4 ± 5.0
				(nM)

Values are means ± S.E. of 5 separate experiments.

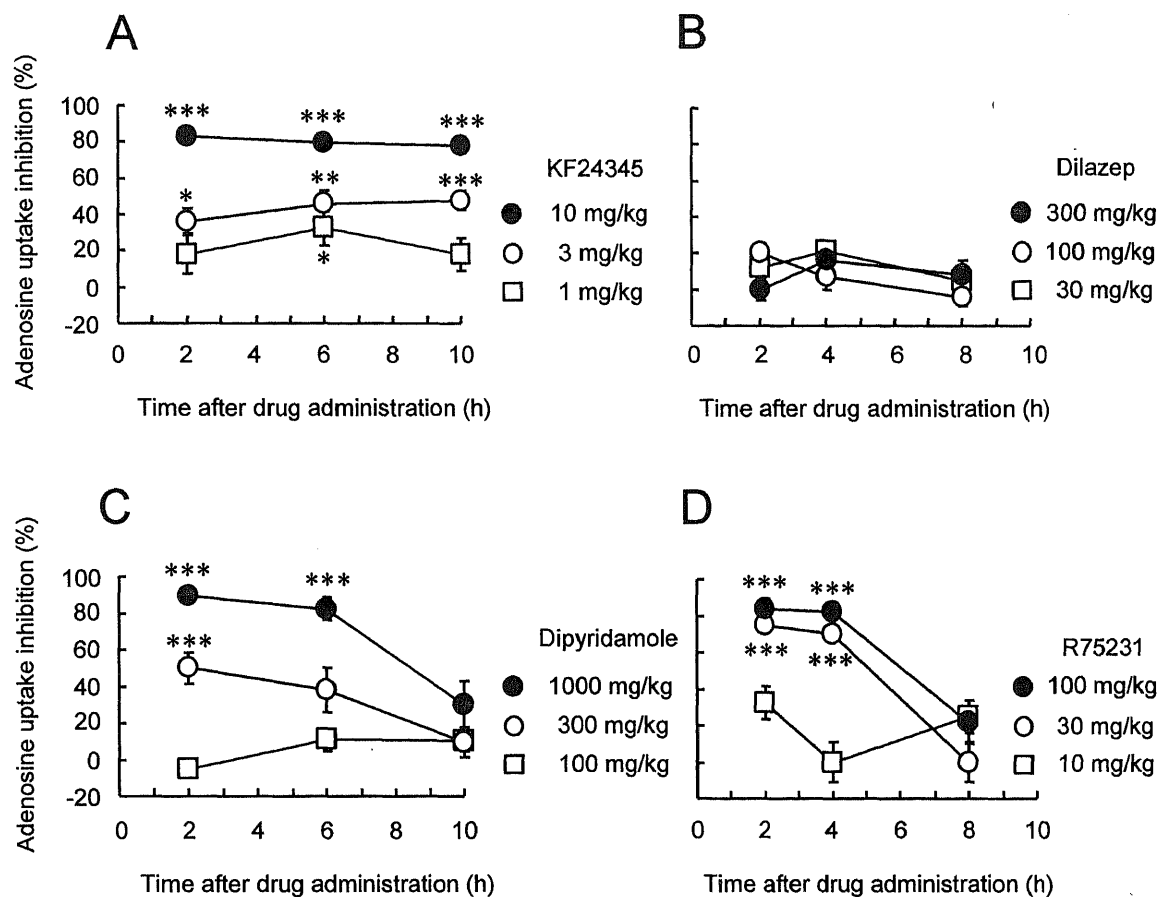


Fig. 1-2. Time course of adenosine uptake inhibition in sampled blood cells after oral administration of KF24345 (A), dilazep (B), dipyridamole (C) and R75231 (D) in mice. Blood was sampled at various time intervals and incubated with 1 μ M of [3 H]adenosine for 10 sec. Adenosine uptake inhibition was expressed as percentage of inhibition compared with the vehicle-treated group, and values represent means $\pm$ S.E. of 5 animals. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, significantly different from the vehicle-treated group.

1-4. 考察

洗浄赤血球を用いた *in vitro* の検討系において、KF24345 は検討された全動物種の赤血球へのアデノシンの取り込みを濃度依存的に阻害した。KF24345 のアデノシン取り込み阻害活性はジラゼプより若干弱く、R75231 と同程度であった。本検討におけるジラゼプの IC_{50} 値は、既報 (33) における IC_{50} 値と同程度であった。また本検討系において、NBI もヒト、マウス、ウサギおよびハムスター洗浄赤血球のアデノシン取り込みを強く阻害した ($IC_{50} = 4-33$ nM ; 未発表データ)。多くの細胞においては、ENT1 および ENT2 双方のヌクレオシドトランスポーターが発現している可能性が考えられる。ENT1 を阻害するジラゼプや NBI が本検討系においてアデノシンの取り込みを強く阻害したことより、赤血球のアデノシン取り込みにおいて主に機能しているヌクレオシドトランスポーターは ENT1 であり、本検討系において KF24345 が主に阻害しているヌクレオサイドトランスポーターも ENT1 であると考えられた。今回の結果より、KF24345 がモルモット脳膜画分への NBI 結合を阻害するだけでなく、機能的にもアデノシンの取り込みを阻害することが明らかとなった。

マウスへ化合物を経口投与し、その後採血した全血サンプルのアデノシン取り込みを測定する系は、*in vivo* で化合物の経口活性や持続性を検討するのに優れた実験系であると考えられる。*In vitro* における KF24345 のアデノシン取り込み阻害活性が他の取り込み阻害剤と大きく異ならなかったにも関わらず、マウスにおける *in vivo* の検討においては、試験された全ての阻害剤の中で KF24345 は最も強力かつ長時間持続するアデノシン取り込み阻害活性を示した。KF24345 1、3 および 10 mg/kg 経口投与 2 時間後の血漿中化合物濃度はそれぞれ 77、292 および 1277 nM であり、また KF24345 10 mg/kg 経口投与時には、投与 12 時間後においても血漿中薬物濃度が 252 nM を保っていた (未発表データ)。加えて KF24345 によるアデノシン取り込み阻害活性 (*in vitro*) は、KF24345 を処置した赤血球を生理食塩液で洗浄した後、もほとんど変化しなかった (未発表データ)。以上の知見より、KF24345 の良好な

吸収、経口投与後長く高レベルで持続する血漿中薬物濃度、ならびに赤血球膜上のヌクレオシドトランスポーターへの強力な結合が、in vivo で長時間持続するKF24345 のアデノシン取り込み阻害作用に寄与していると考えられる。今回の検討において、マウス in vivo における KF24345 のアデノシン取り込み阻害作用が検知できたことから、以後の試験ではマウスの各種炎症モデルを用いて炎症に対する KF24345 の有効性を検討することとした。

1-5. 小括

1. 新規骨格を有する KF24345 は、in vitro でヒト、マウス、ウサギおよびハムスターの洗浄赤血球のアデノシン取り込みを濃度依存的に阻害した。KF24345 のアデノシン取り込み阻害作用は既存のアデノシン取り込み阻害剤であるジラゼブより若干弱く、R75231 と同程度であった。
2. KF24345 は、in vivo でマウスに経口投与後の全血のアデノシン取り込みを阻害した。KF24345 の経口活性は他のアデノシン取り込み阻害剤と比較して強力で、かつその作用は長時間持続した。また炎症モデルにおける KF24345 の作用を、マウスを用いて評価可能であることが明らかとなった。
3. 経口投与後長時間持続する KF24345 の強力なアデノシン取り込み阻害作用には、KF24345 の良好な吸収、長時間にわたり維持される血漿中薬物濃度、ならびに赤血球膜上のヌクレオシドトランスポーターへの KF24345 の強力な結合等が寄与すると考えられる。

第2章 LPS 誘発 TNF- α 産生および白血球減少に対する KF24345 の作用ならびに内因性アデノシンの関与

2-1. 序文

エンドトキシン（菌体内毒素）はグラム陰性菌の外膜に存在する物質で、コアとなる糖鎖に長鎖の脂肪酸アンカー（リピド A）が結合した LPS の構造を有する。リピド A の部分は外膜の外葉を構成しており、多糖の部分は外膜より外部に伸びている。エンドトキシンショックの誘発や致死毒性等の生物活性は、リピド A の部分にある。血中に入った LPS は LPS 結合蛋白（lipopolysaccharide binding protein ; LBP）と結合し、この複合体が単球やマクロファージの表面にある CD14 受容体と結合する。その結果、LPS 刺激は LPS 受容体と考えられている Toll 様受容体を介して細胞内へ伝達され、TNF- α 等の炎症性サイトカインの産生や遊離を促進する（35）。CD14 を持たない血管内皮細胞等においては、LPS は LBP の働きにより血清中の可溶性 sCD14 蛋白に結合し、LPS 受容体に認識されて炎症性サイトカインの遊離や接着因子の発現を促進する（35）。炎症性サイトカイン遊離や血管内皮細胞活性化の結果、接着分子 ICAM-1 等を介した内皮細胞と白血球との接着が惹起され（36）、循環血中の白血球数は減少すると考えられる。LPS を実験動物に投与した際の血清 TNF- α の上昇および循環血中の白血球数減少に対する薬物の作用を試験する系は、生体の炎症反応に対する薬物の作用を検討するのに優れた実験系であると考えられる。

アデノシンは、主として細胞表面上のアデノシン受容体の活性化を介して種々の炎症性細胞の機能を抑制することが報告されている。アデノシンは好中球の活性酸素産生、血管内皮への接着および貪食を抑制し（37-39）、またマクロファージの TNF- α 産生も抑制する（40、41）。さらにアデノシンおよびそのアゴニストが、*in vivo* で抗炎症作用を発現することも報告されている（29、30）。本章においては、アデノシン取り込み阻害剤が *in vivo* で抗炎症作用を発現するか否かを検証するた

め、LPS で誘発される TNF- α 産生および白血球減少に対する KF24345 の作用をマウスで検討した。KF24345 の作用における内因性アデノシンおよびアデノシン受容体の関与を検証するため、KF24345 の作用に対するアデノシン受容体拮抗薬の影響も併せて検討した。アデノシン受容体拮抗薬としては、A₁ 受容体選択的拮抗薬 8-(noradamantan-3-yl)-1,3-dipropylxanthine (KW-3902 ; 42) 、A_{2A} 受容体選択的拮抗薬 4-(2-[7-amino-2-(2-furyl)[1,2,4]triazolo[2,3-a][1,3,5]triazin-5-ylamino]ethyl)phenol (ZM 241385 ; 43) および受容体非特異的拮抗薬 8-(*p*-sulfophenyl)theophylline (8-SPT ; 44) を使用した。

2-2. 実験方法

動物

- 雄性 ddY マウス (20-30 g) … 日本エスエルシー

化合物

- LPS (*Escherichia coli* 055:B5) … Difco Laboratories Inc.
(Detroit, MI, USA)
- ZM 241385 … Tocris Cookson Ltd. (Bristol, UK)
- 8-SPT … Research Biochemicals Inc.
(Natick, MA, USA)
- KF24345 … 協和発酵医薬総合研究所にて合成
- KW-3902 … 同上 (45)

KF24345 は 0.5% (w/v) メチルセルロースで溶解し、10 mL/kg の容量で経口投与した。第 1 章の *in vivo* アデノシン取り込み阻害の結果より、KF24345 の用量は 10 mg/kg を選択した。LPS および 8-SPT は、生理食塩液に溶解して使用した。KW-3902 および ZM 241385 は、0.1% (v/v) *N,N*-dimethylacetamide および 1 mM の水酸化ナトリウムを含む生理食塩液に溶解して用いた。

LPS 誘発 TNF- α 産生に対する KF24345 の作用

KF24345 (10 mg/kg) あるいは溶媒 (0.5%メチルセルロース) をマウスへ経口投与し、その 1 時間後に LPS (1 mg/kg) を尾静脈内投与した。LPS 投与の 1 時間後にマウスをエーテル麻酔し、腹部大静脈から血液サンプルを採取した。血液サンプルは 1200 g、4°C で 10 分間遠心して血清を分取し、血清 TNF- α 濃度を enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) キット (Amersham Biosciences UK, Ltd., Little Chalfont, Buckinghamshire, UK) にて測定した (感度 > 10 pg/mL)。レコンビナントマウス TNF- α (Amersham Biosciences) を用いて作成した標準曲線より、血清 TNF- α 濃度

を算出した。

KW-3902 (0.3 mg/kg) あるいは ZM 241385 (3 mg/kg) は、LPS 投与の 10 分前に尾静脈内投与した。KW-3902 は 5'-N-ethylcarboxamidoadenosine (NECA) で誘発されるラットの血圧低下には影響せずに、心拍数低下に対して顕著に拮抗した (KW-3902 0.1 mg/kg 静脈内投与時; 未発表データ)。また ZM 241385 はアデノシンで誘発される心拍数低下には影響を与えずに、アデノシンの降圧反応を 1 mg/kg (静脈内投与) の用量で約 70%抑制した (46、47)。以上の知見より、本検討で選択されたアデノシン拮抗薬の用量は、それぞれアデノシン A₁ あるいは A_{2A} 受容体を十分かつ選択的に拮抗していると考えられる。

LPS 誘発白血球減少に対する KF24345 の作用

KF24345 (10 mg/kg) あるいは溶媒 (0.5%メチルセルロース) をマウスへ経口投与し、その 1 時間後に LPS (3 µg/kg) を尾静脈内投与した。LPS 投与の 2 時間後にマウスをエーテル麻酔し、腹部大静脈より 2 mM EDTA 採血を行った。細胞数を血球カウンター (Celltacα MEK-6158、日本光電) で測定した。

8-SPT (20 mg/kg) は、LPS 投与の 10 分前に尾静脈内投与した。本検討で用いた 8-SPT の用量は、アデノシンの心筋保護効果を十分に抑制することが報告されている (48)。

データ処理および統計解析

データは平均値±標準誤差で表示した。統計学的有意差は Student's *t*-test あるいは一元配置分散分析および Dunnett's test を用いて検定し、危険率 5%未満を有意差ありとした。

2-3. 結果

LPS 誘発 TNF- α 産生に対する KF24345 の作用

KF24345 (10 mg/kg) は、LPS 処置の対照群で認められた血清 TNF- α 濃度の上昇を有意に抑制した。ZM 241385 (3 mg/kg) は、KF24345 の血清 TNF- α 濃度上昇抑制作用をほぼ完全に消失させた。一方 KW-3902 (0.3 mg/kg) は、KF24345 の作用に影響を与えなかった (以上 Fig. 2-1A)。KW-3902 および ZM 241385 は、共に単独では LPS 誘発 TNF- α 産生に影響を与えなかった (Fig. 2-1B)。

LPS 誘発白血球減少に対する KF24345 の作用

LPS の尾静脈内投与は血中白血球数の顕著な減少を惹起し (対照群)、KF24345 (10 mg/kg) は白血球数の減少を有意に抑制した。8-SPT (20 mg/kg) は、LPS 誘発白血球減少に対する KF24345 の抑制作用をほぼ完全に消失させた (以上 Fig. 2-2A)。8-SPT は、単独では LPS 誘発白血球減少に影響を与えなかった (Fig. 2-2B)。

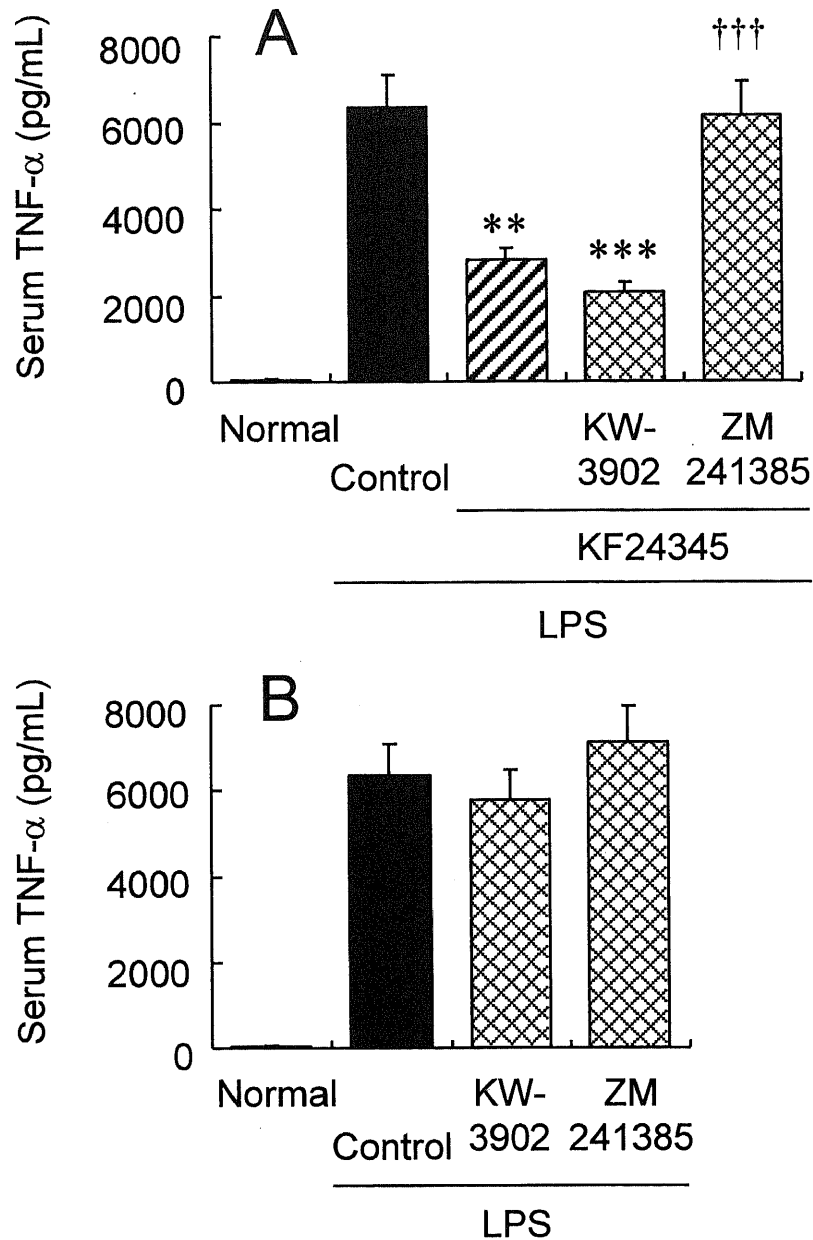


Fig. 2-1. A, suppression by KF24345 of LPS-induced TNF- α production and the effects of selective adenosine receptor antagonists on the suppression by KF24345. B, the effects of selective adenosine receptor antagonists on LPS-induced TNF- α production. Mice were pretreated with KF24345 (10 mg/kg p.o.) 1 h before intravenous injection of LPS (1 mg/kg). KW-3902 (a selective adenosine A₁ receptor antagonist; 0.3 mg/kg) or ZM 241385 (a selective adenosine A_{2A} receptor antagonist; 3 mg/kg) was intravenously administered 10 min before the LPS injection. Blood samples were collected 1 h after the LPS injection, and serum TNF- α concentrations were measured by enzyme-linked immunosorbent assay. Values are means $\pm$ S.E. of 6 animals. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, significantly different from the LPS-treated group; ††† $P < 0.001$, significantly different from the KF24345 + LPS-treated group. LPS: lipopolysaccharide, TNF- α : tumor necrosis factor- α .

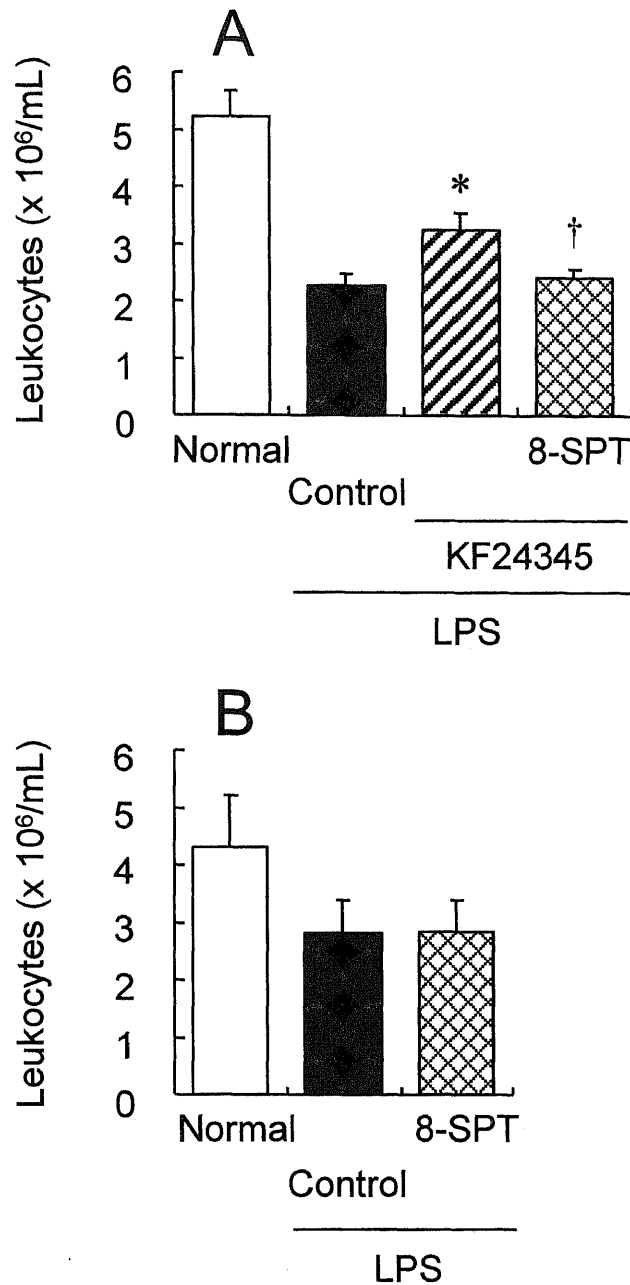


Fig. 2-2. A, inhibition by KF24345 of LPS-induced leukopenia and the effect of 8-SPT (a non-selective adenosine receptor antagonist) on the inhibition by KF24345. B, the effect of 8-SPT on LPS-induced leukopenia. Mice were pretreated with KF24345 (10 mg/kg p.o.) 1 h before intravenous injection of LPS (3 μ g/kg). 8-SPT (20 mg/kg) was intravenously administered 10 min before the LPS injection. Blood samples were collected 2 h after the LPS injection, and total leukocyte counts were obtained. Values are means $\pm$ S.E. of 5-10 animals. * $P < 0.05$, significantly different from the LPS-treated group; † $P < 0.05$, significantly different from the KF24345 + LPS-treated group. LPS: lipopolysaccharide.

2-4. 考察

本検討において、KF24345 は LPS により惹起される血清 TNF- α の上昇を抑制し、また血中白血球数の減少を抑制した。KF24345 による LPS 誘発白血球減少の抑制は、非選択的アデノシン受容体拮抗薬である 8-SPT によりほぼ完全に拮抗された。加えて KF24345 による LPS 誘発血清 TNF- α 上昇の抑制も、選択的アデノシン A_{2A} 受容体拮抗薬である ZM 241385 によりほぼ完全に拮抗された。以上の結果より、KF24345 が内因性のアデノシンおよびアデノシン受容体、特に A_{2A} 受容体を介して *in vivo* で抗炎症作用を発現することが初めて明らかとなった。

アデノシンは、単球およびマクロファージからの TNF- α 産生を抑制する (*in vitro* ; 40、41)。従って本検討で認められた KF24345 による LPS 誘発血清 TNF- α 上昇の抑制は、KF24345 の投与により細胞外で増加した内因性アデノシンによる単球およびマクロファージ活性化の抑制に基づく作用と考えられる。またアデノシンは白血球および血管内皮細胞の活性化を阻害し (39、49)、接着分子の発現等を減弱させて血管内皮細胞と白血球の接着を抑制する。本検討において、LPS をマウスに静脈内投与した際に認められた血中白血球数の減少は、生体内で白血球が血管内皮に接着して集積した結果であると考えられる。以上の知見より、本検討で認められた KF24345 による LPS 誘発白血球減少の抑制は、TNF- α 産生抑制の場合と同様に KF24345 の投与により細胞外で増加した内因性アデノシンが白血球および血管内皮細胞の活性化を抑制し、白血球の血管内皮細胞への接着を減弱させた結果と考えられる。

細胞内ヒポキサンチン生成の抑制も、KF24345 の抗炎症作用発現に寄与した可能性がある。KF24345 がアデノシンの細胞内への取り込みを阻害した結果として細胞内イノシン濃度の増加が抑制され、これに伴いイノシンより産生されるヒポキサンチンの細胞内濃度も低下する。ヒポキサンチンは活性酸素の産生酵素であるキサンチンオキシダーゼの基質であり、その細胞内濃度を低下させることは活性酸素の産生抑制につながる。活性酸素は好中球の遊走、接着の一促進因子と考えられている

ため(50)、細胞内ヒポキサンチン濃度の低下も本検討で認められた KF24345 の抗炎症作用に寄与した可能性が考えられる。

マウスにおける全身血圧は、KF24345 の経口投与 1 時間後から 8 時間後にわたり変動しなかった(未発表データ)。従って、KF24345 はアデノシン、アデノシンアゴニストおよびアデノシン代謝酵素阻害剤等と異なり、血圧低下や中枢作用等の副作用を伴うことなく抗炎症作用を発現し得ると期待される。

2-5. 小括

1. 経口活性を有する新規アデノシン取り込み阻害剤 KF24345 が、マウスにおいて LPS で誘発される TNF- α 産生および白血球減少を抑制することが明らかとなった。
2. KF24345 の LPS 誘発 TNF- α 産生および白血球減少の抑制作用はアデノシン受容体拮抗薬によりほぼ完全に抑制され、KF24345 の作用が内因性アデノシンおよびアデノシン受容体を介したものであることが示された。
3. 今回の結果より、アデノシン取り込み阻害剤が *in vivo* で内因性のアデノシンを介して抗炎症作用を発現することが初めて明らかとなり、アデノシン取り込み阻害剤が種々の炎症疾患の予防あるいは治療に有用である可能性が示された。

第 3 章 糸球体腎炎に対する KF24345 の作用

3-1. 序文

糸球体腎炎は、傷害された腎臓内への細胞外マトリクスの集積、濾過機能の悪化および蛋白尿等の特徴を伴う腎の炎症性疾患である (51)。糸球体内での免疫複合体形成の他、白血球、補体系、血小板活性化因子、ケモカインおよびサイトカイン等が本病態の発症、進展に関与することが報告されている (52、53)。加えて初期の傷害により惹起されるネフロン単位の喪失が残存ネフロンでの糸球体内圧の上昇や過剰な濾過につながり、糸球体硬化の悪化やネフロン単位のさらなる喪失 (糸球体濾過機能の悪化) を招く可能性がある (54)。

アデノシンは抗炎症作用を発現することに加えて、種々の腎機能も調節する (54)。腎の微小循環において、アデノシンは A₁ 受容体を介して腎輸入細動脈を収縮させ、A₂ 受容体を介して輸出細動脈を弛緩させる (55-57)。アデノシンの腎の微小循環におけるこの作用は糸球体内圧の低下につながり、腎炎の糸球体にとって有益と考えられる。以上の知見より、アデノシン取り込み阻害剤が、炎症および糸球体内圧の上昇で特徴付けられる糸球体腎炎の病態を改善し得る可能性が考えられた。

第 2 章において、アデノシン取り込み阻害剤 KF24345 が内因性アデノシンを介して *in vivo* で抗炎症作用を発現することが示された。本章においては、アデノシン取り込み阻害剤が抗糸球体腎炎作用を発現するか否かを検証するため、抗糸球体基底膜 (glomerular basement membrane ; GBM) 抗体によりマウスに惹起した実験糸球体腎炎 (58) に対する KF24345 の作用を検討した。抗 GBM 抗体は、GBM に存在する IV 型コラーゲン NC1 ドメインに対する自己抗体である。抗 GBM 抗体腎炎は抗 GBM 抗体が GBM に結合することにより補体の活性化、マクロファージの浸潤、各種炎症性、増殖性メディエーターや活性酸素の産生等が惹起され、糸球体腎炎が発症、進展する免疫疾患であり、ヒトでは Goodpasture 症候群と呼ばれる病態が抗 GBM 型腎炎に相当する (59)。本検討においては、ウサギにおいて作製された抗

マウス GBM 抗血清を用いてマウスに糸球体腎炎を惹起し、KF24345 の作用を検討した。併せて KF24345 の作用をプレドニゾロンおよびシクロフォスファミドの作用と比較し、これらの薬物処置による副作用も同時に比較検討した。

3-2. 実験方法

動物

- 雄性 ddY マウス (20-30 g) … 日本エスエルシー
- 雄性 New Zealand White ウサギ (2-3 kg) … 同上

化合物

- Complete Freund's adjuvant … 株式会社ヤトロン (東京)
- ウサギ immunoglobulinG (IgG) … Sigma
- プレドニゾロン (prednisolone) … ナカライテスク株式会社 (京都)
- シクロフォスファミド … 同上

(cyclophosphamide)

- KF24345 … 協和発酵医薬総合研究所にて合成

KF24345、プレドニゾロンおよびシクロフォスファミドは 0.5% (w/v) メチルセルロースで溶解し、10 mL/kg の容量でマウスへ 1 日 1 回経口投与した。

ウサギ抗マウス GBM 抗血清

既法 (60) に従い、ddY マウスの腎臓から GBM を調製した。マウス腎臓のスライスを 150 mesh のステンレス製篩で強制濾過し、篩を通過したものをカルシウムイオンおよびマグネシウムイオンフリーの phosphate buffered saline (pH 7.4) 中で採取した。遠心 (400 g、4°C、10 分) 後、残渣を GBM 画分として採取した。

GBM に対する抗血清は、既法 (61) に従いウサギで作製した。生理食塩液にマウス GBM 画分を 5% (w/v) の濃度となるように溶解して GBM 溶液とし、GBM 溶液および complete Freund's adjuvant を 1:1 の容量比で混合してエマルジョンを調製した。エマルジョン 1 mL を 1 週間毎に計 4 回、ウサギの背部皮内に投与した。最後のエマルジョン投与の 1 週間後にウサギより採血し、抗血清を採取した。血清は補体系を不活化するために 56°C で 30 分間処理し、以後 -70°C で保存した。

マウスにおける糸球体腎炎の惹起

既法 (62) に若干の変更を加え、マウスに実験糸球体腎炎を惹起した。

ウサギ IgG を生理食塩液に 2% (w/v) となるように溶解し、IgG 溶液および complete Freund's adjuvant を 1 : 1 の容量比で混合してエマルジョンを調製した。マウス 1 匹あたり 250 μ L のエマルジョンを腹腔内投与し、予備免疫した。予備免疫の 4 および 11 日後の 2 回、マウス 1 匹あたり 50 μ L のウサギ抗マウス GBM 抗血清を尾静脈内投与した。正常マウスには、抗 GBM 抗血清の代わりに生理食塩液を投与した。

KF24345、プレドニゾンおよびシクロフォスファミドの作用

第 1 章の in vivo アデノシン取り込み阻害の結果より、KF24345 の用量は 3 および 10 mg/kg を選択した。実験群は次の通りとした。

- 第 1 群 正常群
- 第 2 群 対照群 (溶媒処置)
- 第 3、4 群 KF24345 3、10 mg/kg 処置
- 第 5、6 群 プレドニゾン 0.3、3 mg/kg 処置
- 第 7、8 群 シクロフォスファミド 10、30 mg/kg 処置

最初の抗 GBM 抗血清投与 2 週間後に各群の尿中蛋白排泄量が等しくなるようにマウスを 7 グループ (第 2-8 群) に群分けし、群分けの翌日より薬物の治療的投与を開始した。KF24345 (3、10 mg/kg)、プレドニゾン (0.3、3 mg/kg)、シクロフォスファミド (10、30 mg/kg) あるいは溶媒 (0.5%メチルセルロース) の何れかを、最初の抗 GBM 抗血清投与 2 週間後から 7 週間後にわたり 1 日 1 回経口投与した。

実験最終日、エーテル麻酔下で各マウスの腹部大静脈よりヘパリン採血し、併せて腎臓、脾臓および胸腺を摘出した。

糸球体傷害の機能的評価

最初の抗 GBM 抗血清投与 2 週間から 7 週後の間、週に 1 度マウスを絶食下で個別採尿ケージに入れて 24 時間尿を採取した。採尿開始時と採尿開始 12 時間後の 2 回、各マウスに 50 mL/kg の容量で蒸留水を経口投与した。採取した尿は 800 g、4°C で 5 分間遠心し、上清を蛋白測定に使用した。尿中蛋白濃度をオートアナライザー（AU-510、オリンパス光学工業株式会社、東京）にて測定し、尿中蛋白濃度および 24 時間の尿量から 24 時間尿中蛋白排泄量を算出し体重で補正した。

糸球体傷害の病理組織学的評価

腎臓摘出後、直ちに腎杯を中心とした約 5 mm 厚の横断組織片を切り出し、10% (v/v) 中性緩衝ホルマリン液中にて浸漬固定した。固定終了後パラフィン抱埋して厚さ 2-3 μ m の切片を作製し、光学顕微鏡的観察のため periodic acid-Schiff (PAS) 染色を施した。各セクションで 80-120 の糸球体を盲検法にて検討し、個々の糸球体における PAS 陽性範囲の割合に基づいて糸球体傷害を評価した。PAS 陽性範囲は次の基準で算出し、その平均値を各個体のスコアとした。1 = 25%未満、2 = 25-50%、3 = 50-75%、4 = 75%以上（個々の糸球体における PAS 陽性範囲の割合）。

加えて正常群、対照群および KF24345 10 mg/kg 処置群においては、PAS 染色を施したものは別の腎臓切片に hematoxylin and eosin (H&E) 染色を施し、糸球体内半月体形成、蛋白柱形成および間質への炎症細胞浸潤を検討した。

薬物処置後の副作用の評価

赤血球数を血球カウンター（Celltac α MEK-6158、日本光電）で測定し、その後血液サンプルを 1200 g、4°C で 10 分間遠心して血漿を分取した。血漿ビリルビンおよび glutamic-pyruvic transaminase (GPT) をオートアナライザー（AU-510、オリンパス）で測定した。また第 1、2、4、6 および 8 群においては、各マウスより摘出した脾臓および胸腺の重量を測定した。

データ処理および統計解析

データは平均値±標準誤差で表示した。統計学的有意差は Student's *t*-test あるいは一元配置分散分析および Dunnett's test を用いて検定し、危険率 5%未満を有意差ありとした。

3-3. 結果

蛋白尿に対する KF24345 の作用

尿中蛋白排泄量の増加は糸球体からの蛋白漏出の結果と考えられ、糸球体傷害の指標として尿中蛋白排泄量が測定される。抗 GBM 抗血清を処置した対照群のマウスにおいては、最初の抗血清投与 2 週間後に顕著な尿中蛋白排泄量の増加が認められた。尿中蛋白排泄量の増加は対照群の全てのマウスで認められ、この蛋白尿は実験全期間を通してほぼ同レベルで持続した (Fig. 3-1)。KF24345 (3 および 10 mg/kg) は、尿中蛋白排泄量を減少させた (Fig. 3-1A)。特に、KF24345 10 mg/kg 投与群においては尿中蛋白排泄量減少作用が顕著かつ持続的であり、検討終了時の尿中蛋白排泄はほぼ正常化した。プレドニゾロンおよびシクロフォスファミドも尿中蛋白排泄量減少作用を示した (Fig. 3-1B、3-1C)。シクロフォスファミド 30 mg/kg の作用は、KF24345 10 mg/kg の作用とほぼ同程度であった。一方、プレドニゾロンの作用は用量依存的でなく、また KF24345 の作用と比較しても弱いものであった。

腎の組織学的変化に対する KF24345 の作用

糸球体内 PAS 陽性範囲の拡大は、糸球体硬化の指標と考えられる。実験終了時の光学顕微鏡的観察において、対照群のマウスでは糸球体内 PAS 陽性範囲の拡大が認められた (Figs. 3-2、3-3)。KF24345 処置群においては、対照群と比較して糸球体の PAS 陽性範囲が低値を示した (Figs. 3-2、3-3)。またプレドニゾロンおよびシクロフォスファミド処置群においても、対照群と比較して糸球体の PAS 陽性範囲が低値を示した (Fig. 3-2)。特に KF24345 10 mg/kg 処置群 (PAS 陽性範囲スコアグレード 2.32 ± 0.18)、プレドニゾロン 3 mg/kg 処置群 (同 2.29 ± 0.13) およびシクロフォスファミド 30 mg/kg 処置群 (同 2.03 ± 0.03) の糸球体 PAS 陽性範囲は、対照群 (同 2.99 ± 0.20) と比較して有意に低値であった (Fig. 3-2)。

H&E 染色による検討においては、対照群のマウスで糸球体内半月体形成、蛋白柱形成および間質への炎症細胞浸潤が認められた (Fig. 3-4)。KF24345 10 mg/kg

処置群においては、糸球体内半月体形成、蛋白柱形成および間質への炎症細胞浸潤の軽減が認められた (Fig. 3-4)。

副作用の解析

シクロfosファミド 30 mg/kg 処置群においては、対照群と比較して赤血球数の有意な低下が認められた (Fig. 3-5A)。一方、プレドニゾン 3 mg/kg 処置群においては、血漿ビリルビンおよび GPT レベルの顕著な上昇が認められた (Fig. 3-5B、3-5C)。血漿ビリルビンは、プレドニゾン 0.3 mg/kg 処置群においても対照群と比較して有意に高値であった (Fig. 3-5B)。KF24345 処置群においては、これらの血液、血漿パラメーター変化は認められなかった (Fig. 3-5)。

プレドニゾン 3 mg/kg およびシクロfosファミド 30 mg/kg は、脾臓および胸腺重量の有意な減少を惹起した (Fig. 3-6)。KF24345 10 mg/kg の処置は、これらの臓器重量に影響を与えなかった (Fig. 3-6)。対照群および全ての薬物処置群間において、体重の相違は認められなかった。

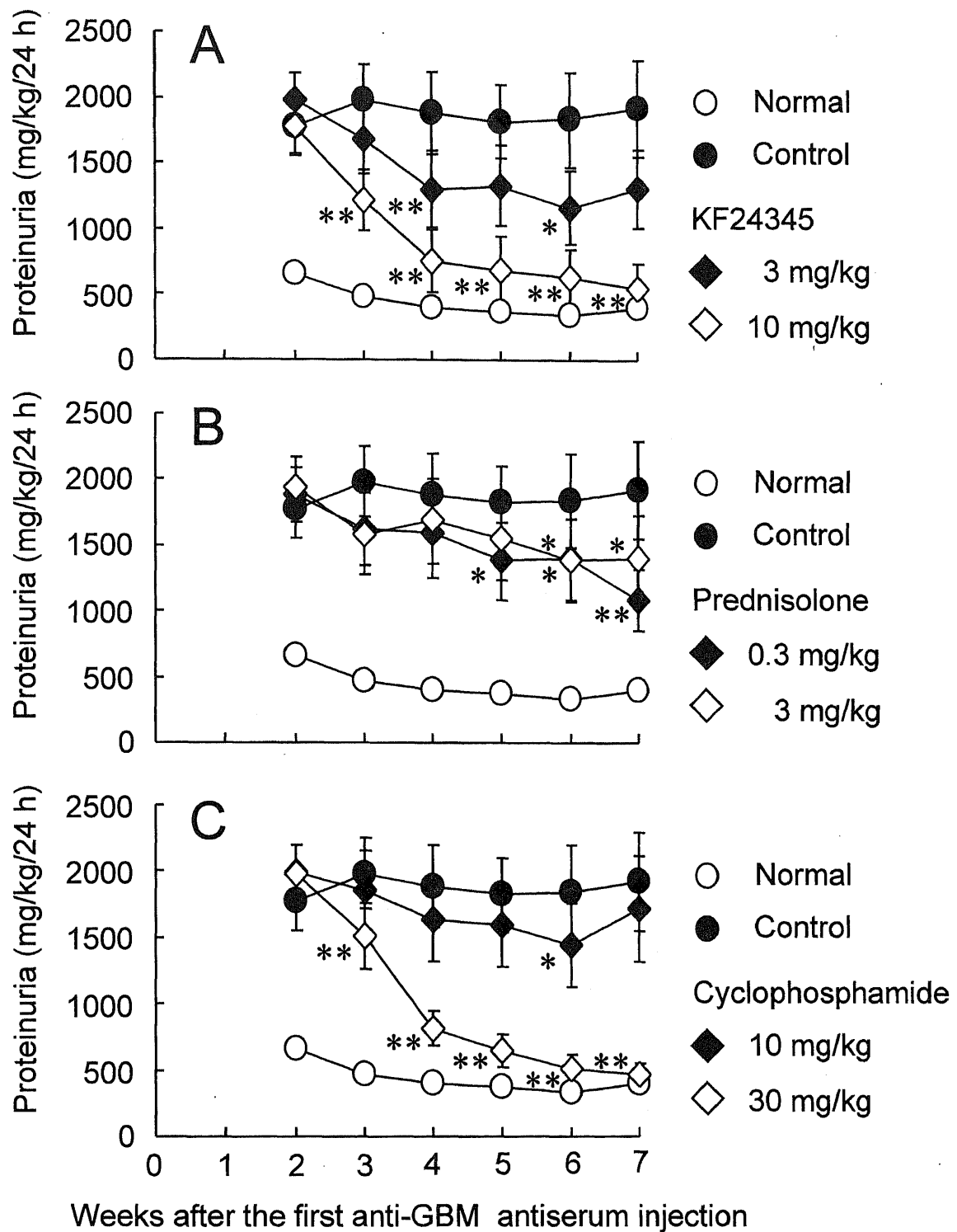


Fig. 3-1. Therapeutic effects of KF24345 (A), prednisolone (B) and cyclophosphamide (C) on proteinuria in mice with anti-GBM antiserum-induced glomerulonephritis. Drugs were orally administered once a day from 2 to 7 weeks after the first anti-GBM antiserum injection. Values are means $\pm$ S.E. of 7-10 animals. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$, significantly different from the vehicle-treated control group. GBM: glomerular basement membrane.

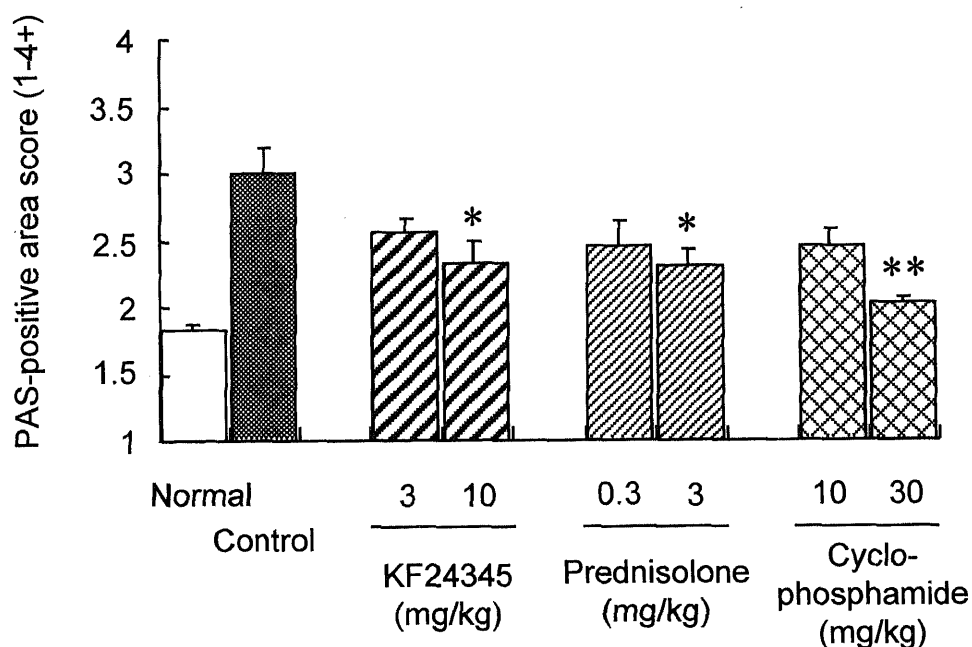


Fig. 3-2. Therapeutic effects of KF24345, prednisolone and cyclophosphamide on the PAS-positive area in glomerulus in mice with anti-GBM antiserum-induced glomerulonephritis. Drugs were orally administered once a day from 2 to 7 weeks after the first anti-GBM antiserum injection, and PAS-positive area was histopathologically evaluated in arbitrary units of the glomerulus. Values represent means $\pm$ S.E. of the indices. Each group contains 7-10 animals. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, significantly different from the vehicle-treated control group. PAS: periodic acid-Schiff, GBM: glomerular basement membrane.

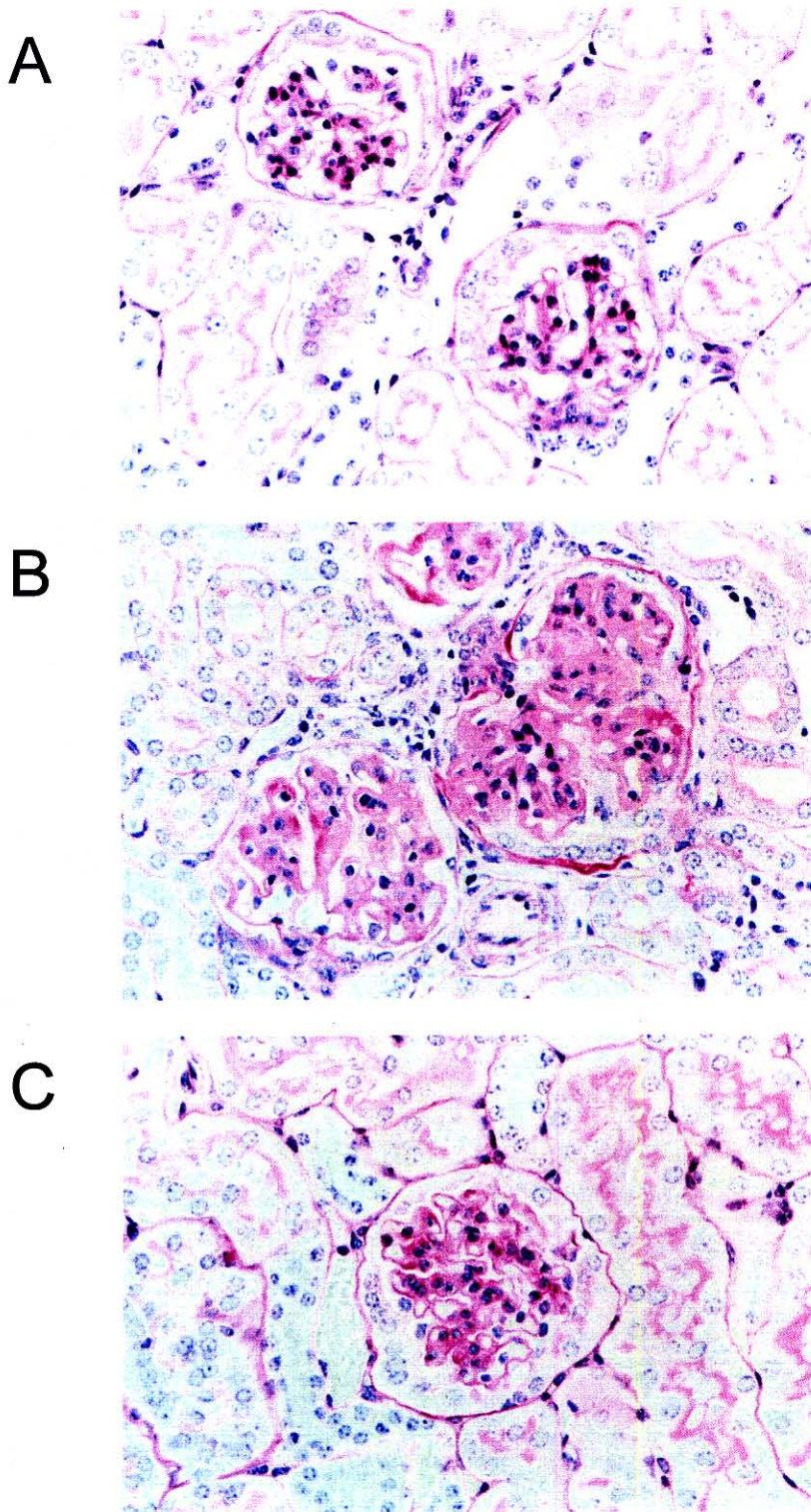


Fig. 3-3. Photomicrographs of glomeruli from mice of the normal group (A; PAS-positive scoring grade 1), the control group treated with anti-GBM antiserum (B; grade 4) and the KF24345 (10 mg/kg)-treated group (C; grade 2). The mice were examined 7 weeks after the first anti-GBM antiserum injection. Note that attenuation of the PAS-positive area following treatment with KF24345 was observed (PAS stain, original magnification $\times 400$). PAS: periodic acid-Schiff, GBM: glomerular basement membrane.

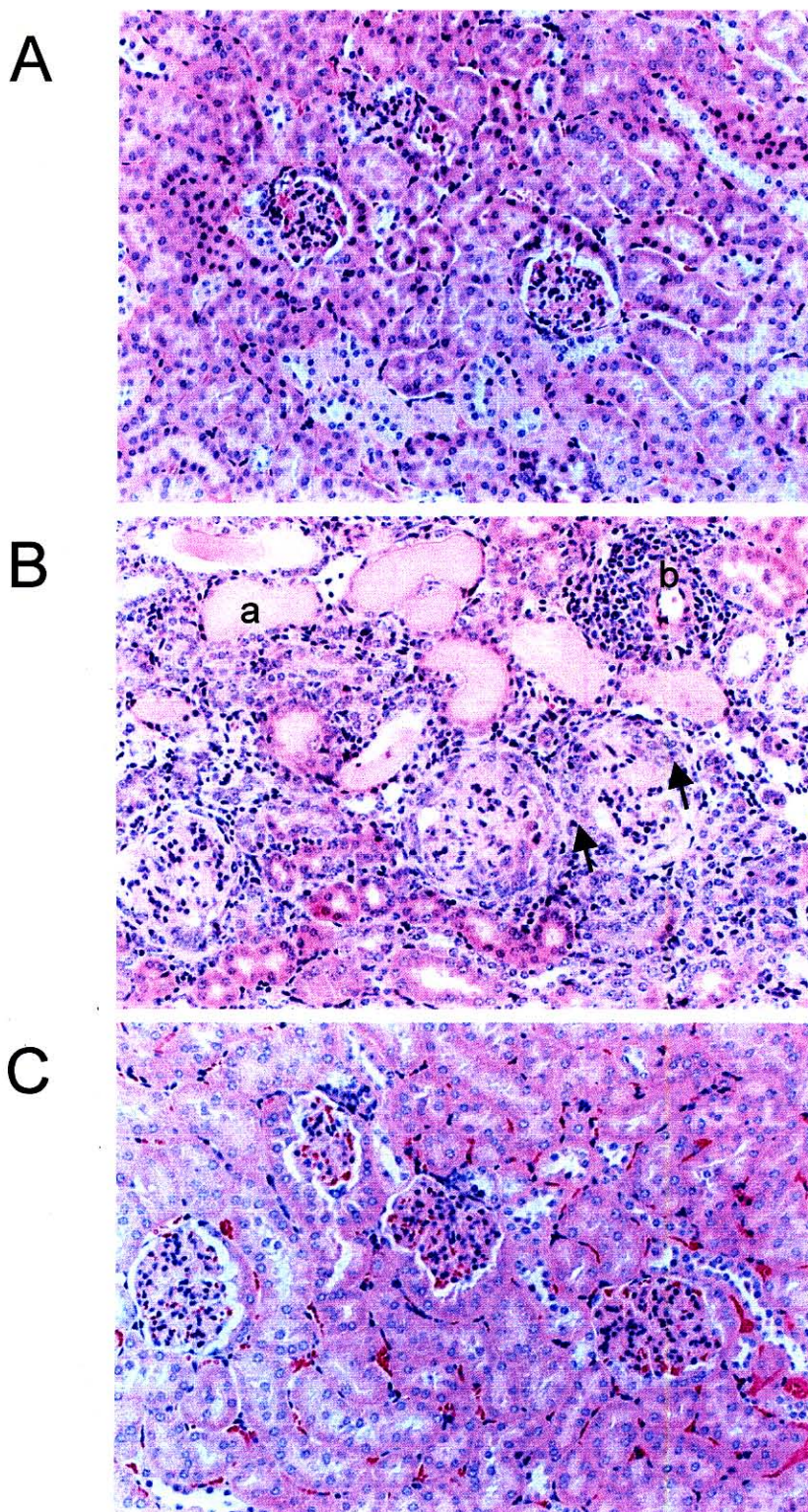


Fig. 3-4. Photomicrographs of glomeruli and tubules from mice in the normal group (A), the control group treated with anti-GBM antiserum (B) and the KF24345 (10 mg/kg)-treated group (C). The mice were examined 7 weeks after the first anti-GBM antiserum injection. The control mice (B) showed beginning crescent formation in the glomeruli (arrow), protein cast formation (a) and diffuse and perivascular interstitial inflammatory cell infiltration (b). These changes were attenuated in the KF24345-treated mice (hematoxylin and eosin stain, original magnification x 200). GBM: glomerular basement membrane.

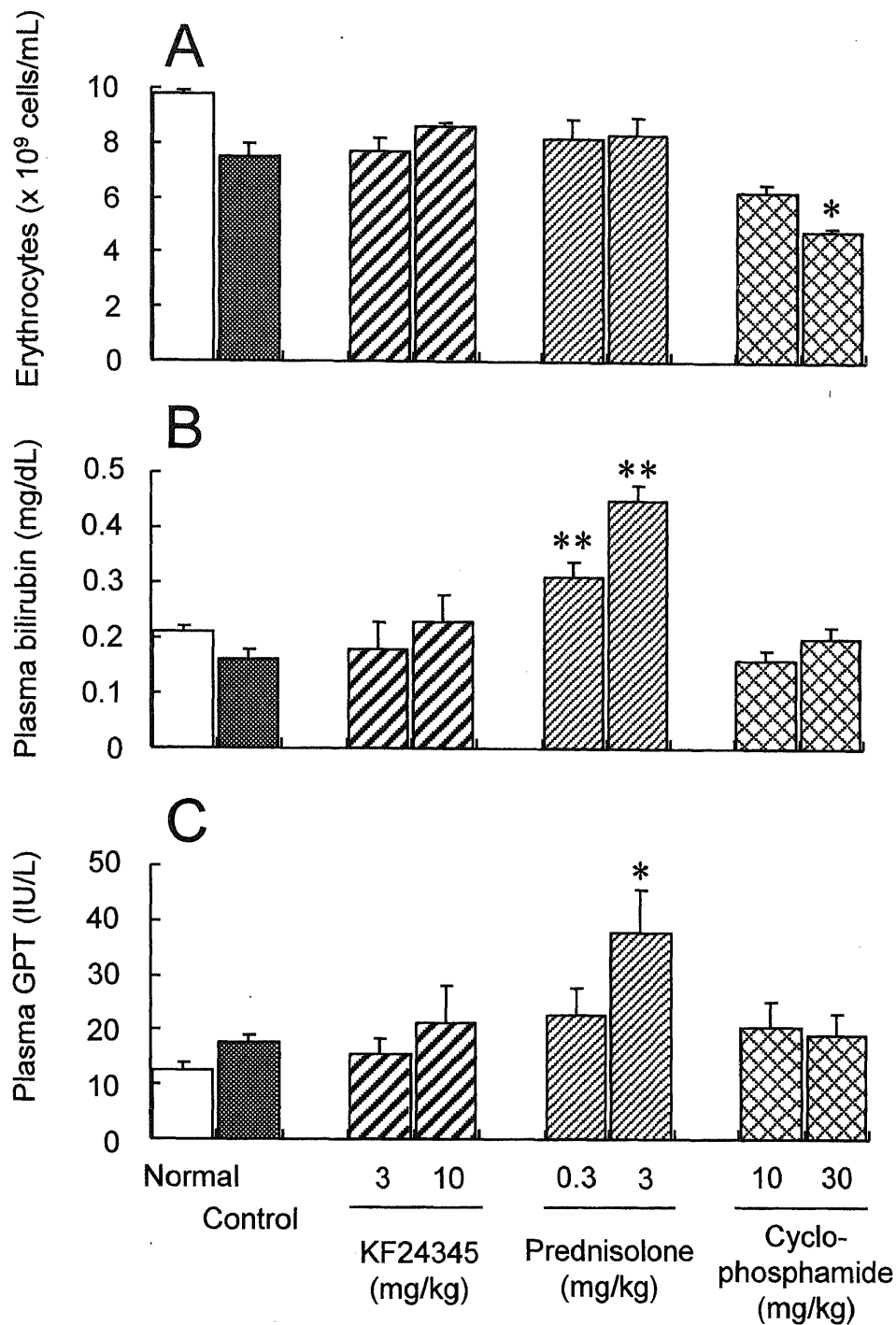


Fig. 3-5. Influences of 5-week treatments with KF24345, prednisolone and cyclophosphamide on erythrocyte counts in blood (A), plasma bilirubin (B) and GPT (C) levels in mice with anti-GBM antiserum-induced glomerulonephritis. Drugs were orally administered once a day from 2 to 7 weeks after the first anti-GBM antiserum injection, and then the parameters were examined. Values are means $\pm$ S.E. of 7-10 animals. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, significantly different from the vehicle-treated control group. GPT: glutamic-pyruvic transaminase, GBM: glomerular basement membrane.

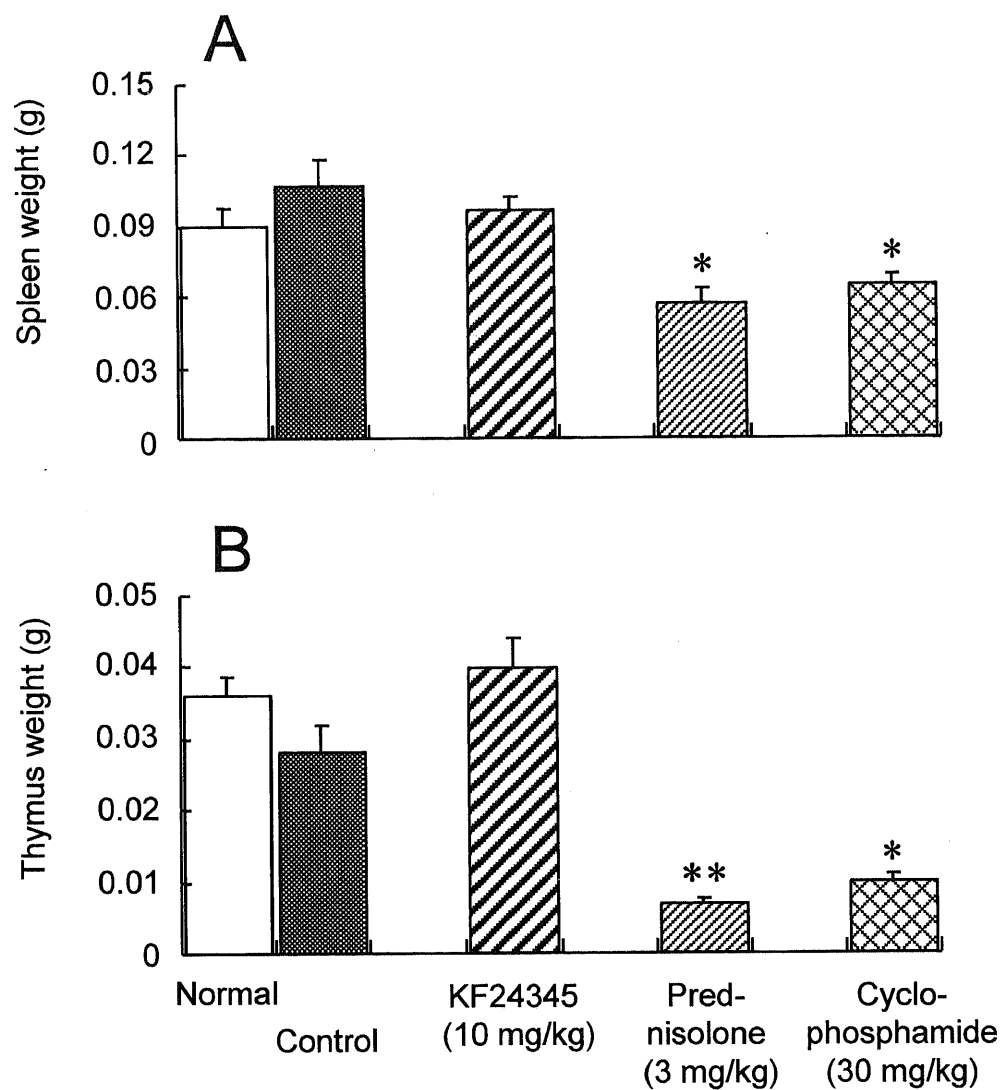


Fig. 3-6. Influences of 5-week treatments with KF24345, prednisolone and cyclophosphamide on spleen (A) and thymus (B) weights in mice with anti-GBM antiserum-induced glomerulonephritis. Drugs were orally administered once a day from 2 to 7 weeks after the first anti-GBM antiserum injection, and then the parameters were examined. Values are means $\pm$ S.E. of 7-10 animals. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, significantly different from the vehicle-treated control group. GBM: glomerular basement membrane.

3-4. 考察

本検討において、KF24345 はプレドニゾロンおよびシクロフォスファミドと同様に抗 GBM 抗体誘発糸球体腎炎マウスの尿中蛋白排泄量減少作用を示し、糸球体傷害を改善した。KF24345 10 mg/kg の抗糸球体腎炎作用はプレドニゾロン 3 mg/kg の作用と比較して強力であり、シクロフォスファミド 30 mg/kg の作用とほぼ同程度であった。しかし、プレドニゾロン 3 mg/kg の 5 週間の経口投与後には血漿ビリルビンおよび GPT レベルの上昇ならびに脾臓および胸腺重量の減少が認められ、胆管、肝臓あるいは免疫系の障害が示唆された。またシクロフォスファミド 30 mg/kg 処置群においても、5 週間の経口投与後に赤血球数の低下ならびに脾臓および胸腺重量の減少が認められ、造血系および免疫系の障害が示唆された。これらの副作用は、KF24345 処置群では認められなかった。以上の結果より、KF24345 が重篤な副作用を伴わずに抗糸球体腎炎作用を発現することが明らかとなり、アデノシン取り込み阻害剤 KF24345 が糸球体腎炎の治療に有用である可能性が示された。

アデノシンアゴニスト 2chloro-adenosine が、ラット糸球体腎炎において蛋白尿を抑制することが報告されている (63、64)。加えて、アデノシン取り込み阻害剤ジピリダモールも、実験糸球体腎炎の病態を改善する (65)。以上の知見より、KF24345 の抗糸球体腎炎作用も内因性のアデノシンを介していると考えられる。KF24345 は腎炎で産生の高まっている内因性アデノシンの細胞内への取り込みを阻害することにより細胞外のアデノシンを増加させ、細胞膜上のアデノシン受容体へのアデノシンの結合およびその作用発現を可能にしていると推定される。

本モデルにおいて KF24345 が抗糸球体腎炎作用を示した機作として、内因性アデノシンによる抗炎症作用の他にアデノシンの腎血行動態への作用が考えられる。即ち、以下の機序により内因性アデノシンは糸球体内圧を減少させる可能性がある。

- 1) 腎の微小循環において、アデノシンは A_1 受容体を活性化することにより輸入細動脈を収縮させ、また A_2 受容体を活性化することにより輸出細動脈を弛緩させる (55-57)。この結果、糸球体内圧は下降する。
- 2) アデノシンは A_1 受容体を介して

tubuloglomerular feedback system を仲介することが報告されており、この作用は単ネフロン糸球体濾過量の減少につながる (66)。3) アデノシンは、 A_1 受容体を介して糸球体近接細胞からのレニン分泌を抑制する (67、68)。アンジオテンシン II は輸出細動脈の収縮因子であるため、レニン・アンジオテンシン系の阻害は糸球体内圧の減少につながる可能性が考えられる。腎炎の発症、進展には糸球体内圧の上昇が関与することが報告されており (54)、アデノシンによる糸球体内圧低下作用は糸球体腎炎病態の改善に有益であると考えられる。内因性アデノシンによる抗炎症作用および糸球体内圧低下作用が、KF24345 による抗糸球体腎炎作用に寄与した可能性が推定される。

アンジオテンシン II は、腎の繊維化および増殖にも寄与することが報告されている (69、70)。従ってアデノシンによるレニン分泌の抑制は、腎繊維化進展および増殖性変化の抑制にもつながる可能性が考えられる。実際に本検討において、KF24345 は増殖性変化の指標である糸球体内半月体の形成を抑制した。以上の知見より、レニン分泌の抑制およびアンジオテンシン II の阻害を介したアデノシンによる抗繊維化および抗増殖作用もまた、KF24345 の抗糸球体腎炎作用に寄与した可能性が考えられる。

KF24345 による抗糸球体腎炎作用の想定機作を Fig. 3-7 にまとめた。

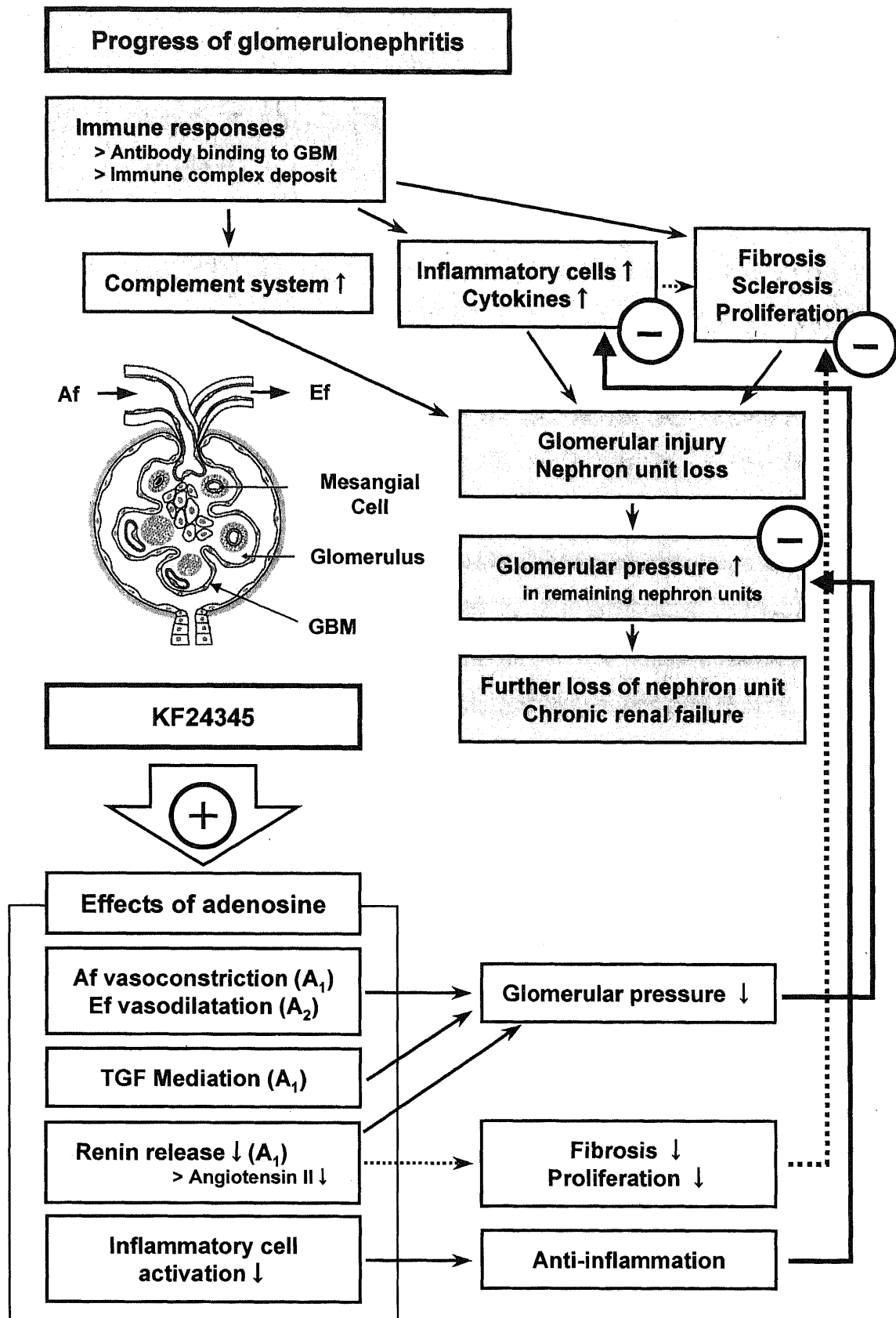


Fig. 3-7. Possible mechanisms of anti-glomerulonephritis effects by KF24345.
 GBM: glomerular basement membrane, TGF: tubuloglomerular feedback system.

3-5. 小括

1. アデノシン取り込み阻害剤 KF24345 が、マウスにおいて糸球体腎炎の病態を改善することが明らかとなった。KF24345 の糸球体腎炎改善作用は、プレドニゾロンおよびシクロフォスファミドの作用と比較して同等以上であった。一方 KF24345 は、プレドニゾロンおよびシクロフォスファミドの処置で認められた重篤な副作用を発現しなかった。
2. 内因性アデノシンによる抗炎症作用および糸球体内圧低下作用が、主に KF24345 の抗糸球体腎炎作用に寄与していると考えられる。
3. 本検討結果はアデノシン取り込み阻害剤が重篤な副作用を伴うことなく糸球体腎炎の病態を改善することを明らかにした最初の報告であり、アデノシン取り込み阻害剤が糸球体腎炎の治療に有用である可能性が示唆された。

第4章 軽症急性膵炎に対するKF24345の作用および内因性アデノシンの関与

4-1. 序文

急性膵炎は膵の浮腫、出血および壊死、ならびに血清アミラーゼおよびリパーゼの上昇を特徴とする炎症性の臓器疾患である(71)。病態の本体は膵外分泌不全による膵組織内での膵消化酵素の活性化および膵の自己消化であり(72)、膵の虚血も病態の進展に関与する(73)。他にケモカイン、サイトカイン、転写因子、血小板活性化因子および活性酸素等の因子が本病態に関与するとされるが(74-76)、急性膵炎の発症および進展の詳細な機作は複雑で、充分解明されていない。

種々の侵襲条件下と同じく、急性膵炎においてもATPの分解等によりアデノシンの産生は増加し、内因性アデノシンレベルは上昇する(77、78)。抗炎症作用の発現に加え、アデノシンは膵機能にも影響を及ぼすことが報告されている。膵血管床にはアデノシン受容体が存在し(79)、アデノシンは主にA₂受容体を介して膵血流を増加させる(80)。急性膵炎の病態には膵の虚血も関与するとされるため、アデノシンによる血流増加作用は急性膵炎の病態改善に有益であると推察される。従って、急性膵炎において産生の増加している内因性アデノシンの細胞内への取り込みをKF24345により阻害して細胞外アデノシンの薬理作用を増強することは、急性膵炎病態の改善に有効である可能性が考えられる。

本章においては、アデノシン取り込み阻害剤が抗急性膵炎作用を発現するか否かを検証するため、セルレイン誘発マウス急性膵炎に対するKF24345の作用を検討した。セルレインは、膵外分泌を調節するコレシストキニン(cholecystokinin; CCK)のアナログペプチドである。生理的濃度のCCKは迷走神経経路を介して膵外分泌を刺激するが、非生理的高濃度のセルレインは膵腺房細胞に直接作用して膵外分泌の不全を惹起する(81)。セルレインにより誘発される膵外分泌不全の本態は、膵腺房細胞内のゴルジ装置から分離して輸送されるべきライソゾーム酵素と消化酵

素の分離の不全である。分離できない両酵素は共に空胞内に詰められて巨大空胞を形成し、これにより膵腺房細胞内での消化酵素の活性化が惹起される（82）。セルレイン誘発急性膵炎は膵の浮腫や血清膵酵素の上昇を主徴とし、一般的に致死は伴わず、時間経過と共に自然治癒の過程をたどる軽症急性膵炎モデルである。

KF24345 の作用における内因性アデノシンおよびアデノシン受容体の関与を検証するため、本検討においては KF24345 の作用に対する受容体非特異的アデノシン拮抗薬 8-SPT の影響も併せて検討した。加えて、KF24345 以外のアデノシン取り込み阻害剤である R75231 およびジピリダモールのセルレイン誘発マウス急性膵炎に対する作用も検討した。

4-2. 実験方法

動物

- 雌性 BALB/c マウス (15-22 g) … 日本チャールス・リバー株式会社
(横浜)

化合物

- セルレイン (cerulein) … Sigma
- ジピリダモール (dipyridamole) … 同上
- 8-SPT … Research Biochemicals Inc.
- KF24345 … 協和発酵医薬総合研究所にて合成
- R75231 … 同上

KF24345、R75231 およびジピリダモールは 0.5% (w/v) メチルセルロースで溶解あるいは懸濁し、10 mL/kg の容量で経口投与した。セルレインおよび 8-SPT は、生理食塩液で溶解した。

セルレイン誘発急性膵炎の惹起

既法 (83) に従い、マウスにセルレイン誘発急性膵炎を惹起した。マウスを 16 時間絶食後、セルレイン (50 μ g/kg) を 1 時間に 1 回、5 時間にわたり計 6 回 (0 時間後に採血、分析するものについては 0 回、同じく 3 時間後のものについては 2 時間にわたり 3 回) 腹腔内投与して膵炎を惹起した。

セルレイン誘発急性膵炎に対する KF24345 の作用

第 1 章の in vivo アデノシン取り込み阻害の結果より、KF24345 の用量は 10 mg/kg を選択した。最初のセルレイン投与の 1 時間前に、KF24345 (10 mg/kg) あるいは溶媒 (0.5%メチルセルロース) をマウスに経口投与した。最初のセルレイン投与の 3、6 および 9 時間後にそれぞれエーテル麻酔下でマウスの腹部大静脈より血液サン

プルを採取し、血清アミラーゼおよびリパーゼ活性を測定した。加えて病理組織学的検討のため、膵臓を速やかに摘出した。予備的な病理組織学的検討において膵臓の傷害は最初のセルレイン投与の6時間後に最も顕著であったことより、今回の検討においても病理組織学的検討は最初のセルレイン投与の6時間後に摘出した膵臓で実施した。正常マウスには、セルレインの代わりに生理食塩液を1時間間隔で3または6回腹腔内投与した。

KF24345 の作用に対するアデノシン拮抗薬の影響

最初のセルレイン投与の1時間前に、KF24345 (10 mg/kg) あるいは溶媒 (0.5% メチルセルロース) をマウスに経口投与した。非選択的アデノシン受容体拮抗薬 8-SPT (20 mg/kg) は、最初のセルレイン投与の10分前に尾静脈内投与した。最初のセルレイン投与の9時間後にエーテル麻酔下でマウスの腹部大静脈より血液サンプルを採取し、血清アミラーゼおよびリパーゼ活性を測定した。

セルレイン誘発急性膵炎に対する他のアデノシン取り込み阻害剤の作用

最初のセルレイン投与の1時間前に、R75231 (300 mg/kg)、ジピリダモール (1000 mg/kg) あるいは溶媒 (0.5% メチルセルロース) をマウスに経口投与した。最初のセルレイン投与の9時間後にエーテル麻酔下でマウスの腹部大静脈より血液サンプルを採取し、血清アミラーゼおよびリパーゼ活性を測定した。

生化学的分析

血液サンプルは 1200 g、4°C で 10 分間遠心し、血清を分取した。血清アミラーゼおよびリパーゼ活性は、測定キット (Liqui Tech series、Roche Diagnostics GmbH、Mannheim、Germany) およびオートアナライザー (AU-510、オリンパス) を使用して発色法あるいは比濁法にて測定した。結果は international units per liter (IU/L) の型で表示した。8-SPT、R75231 およびジピリダモールの作用の検討においては、結果はセルレイン処置された対照群のマウスで得られた値からの変化率で表示した。

病理組織学的分析

光学顕微鏡による検討のため、各動物からの脾臓の組織片を 10% (v/v) 中性緩衝ホルマリンで浸漬固定した。その後パラフィン抱埋して切片を作製、作製した切片を H&E 染色した。既報の基準 (84、85) に従って各サンプルの浮腫、多型核白血球浸潤および腺房細胞壊死の程度を盲検法により検討し、以下の通りスコア化した。0 = no change、1 = very slight、2 = slight、3 = moderate、4 = severe。

データ処理および統計解析

病理組織学的スコア以外のデータは、平均値±標準誤差で表示した。統計学的有意差は Student's *t*-test を用いて検定し、危険率 5%未満を有意差ありとした。

4-3. 結果

KF24345 の作用

セルレインを処置した対照群のマウスでは、血清アミラーゼおよびリパーゼ活性の顕著な上昇が認められた。これらの変化は最初のセルレイン投与 3 時間後に既に認められ、9 時間後に向けて悪化した (Fig. 4-1)。最初のセルレイン投与 6 時間後の病理組織学的検討においては、対照群の膵臓で浮腫、多型核白血球の浸潤および腺房細胞壊死が認められた (Table 4-1、Fig. 4-2)。

KF24345 (10 mg/kg) は、全ての分析時点において上昇した血清アミラーゼおよびリパーゼ活性を有意に低下させた (Fig. 4-1)。加えて膵臓の病理組織学的検討においては、KF24345 は対照群で認められた浮腫、多型核白血球の浸潤および腺房細胞壊死を軽減させた (Table 4-1、Fig. 4-2)。

KF24345 の作用に対するアデノシン拮抗薬の影響

セルレインの処置により、対照群において血清アミラーゼおよびリパーゼ活性の上昇が認められた。KF24345 (10 mg/kg) は、最初のセルレイン投与 9 時間後におけるこれらの血清膵酵素活性の上昇を有意に抑制した (Table 4-2)。8-SPT (20 mg/kg) は KF24345 の血清アミラーゼ活性上昇抑制作用をほぼ完全に消失させ、同じく血清リパーゼ活性上昇抑制作用を消失させる傾向を示した (Table 4-2)。8-SPT は、セルレインで誘発される血清アミラーゼおよびリパーゼ活性の上昇に対し単独では影響を与えなかった (Table 4-2)。

他のアデノシン取り込み阻害剤の作用

セルレインを処置した対照群のマウスでは、最初のセルレイン投与 9 時間後の血清アミラーゼおよびリパーゼ活性が上昇した (Table 4-3)。R75231 (300 mg/kg) は血清リパーゼ活性の上昇に影響を与えなかったが、血清アミラーゼ活性の上昇は有意に抑制した (Table 4-3)。ジピリダモール (1000 mg/kg) は血清アミラーゼ活性

の上昇を抑制し、また上昇した血清リパーゼ活性を低下させる傾向を示した (Table 4-3)。

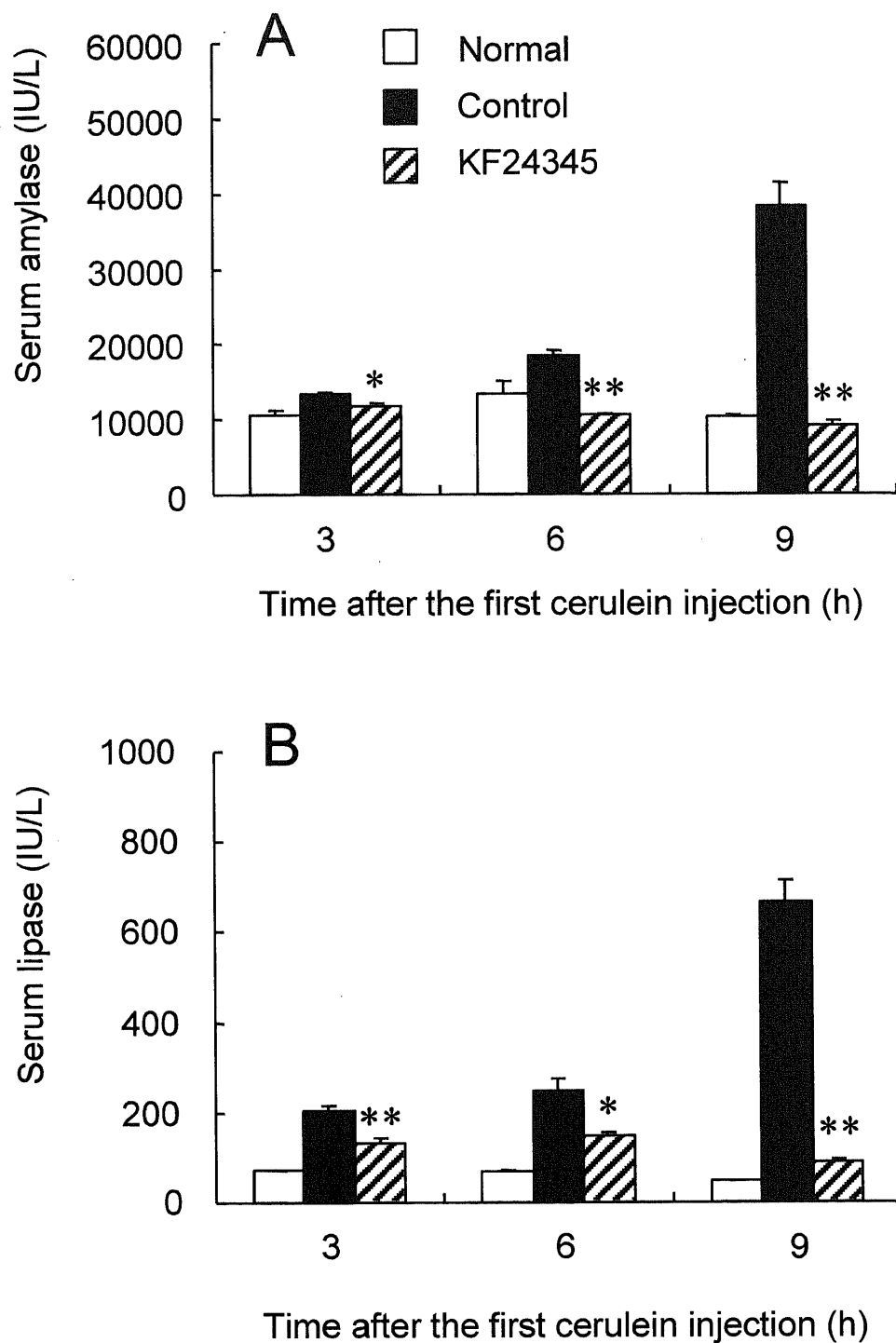


Fig. 4-1. Effect of KF24345 on serum amylase (A) and lipase (B) activity during cerulein-induced acute pancreatitis in mice. Mice were orally treated with KF24345 at 10 mg/kg 1 h before the first intraperitoneal injection of cerulein (50 μ g/kg). Values are means $\pm$ S.E. of 6 animals. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, significantly different from the cerulein-treated control group.

TABLE 4-1

Effect of KF24345 on the histologic findings of cerulein-induced acute pancreatitis in mice

Group	Interstitial edema	PMN cell infiltration	Acinar cell necrosis
Normal	0	0	0
Control	2-3	2	3
KF24345	1-2	1	2

Pancreatic histology was evaluated 6 h after the first cerulein injection. Histological alterations are graded from 0 = absent to 4 = maximal. Mice were orally treated with KF24345 (10 mg/kg) 1 h before the first intraperitoneal injection of cerulein (50 µg/kg). The values represent the means of scoring grade of 6 mice. PMN: polymorphonuclear.

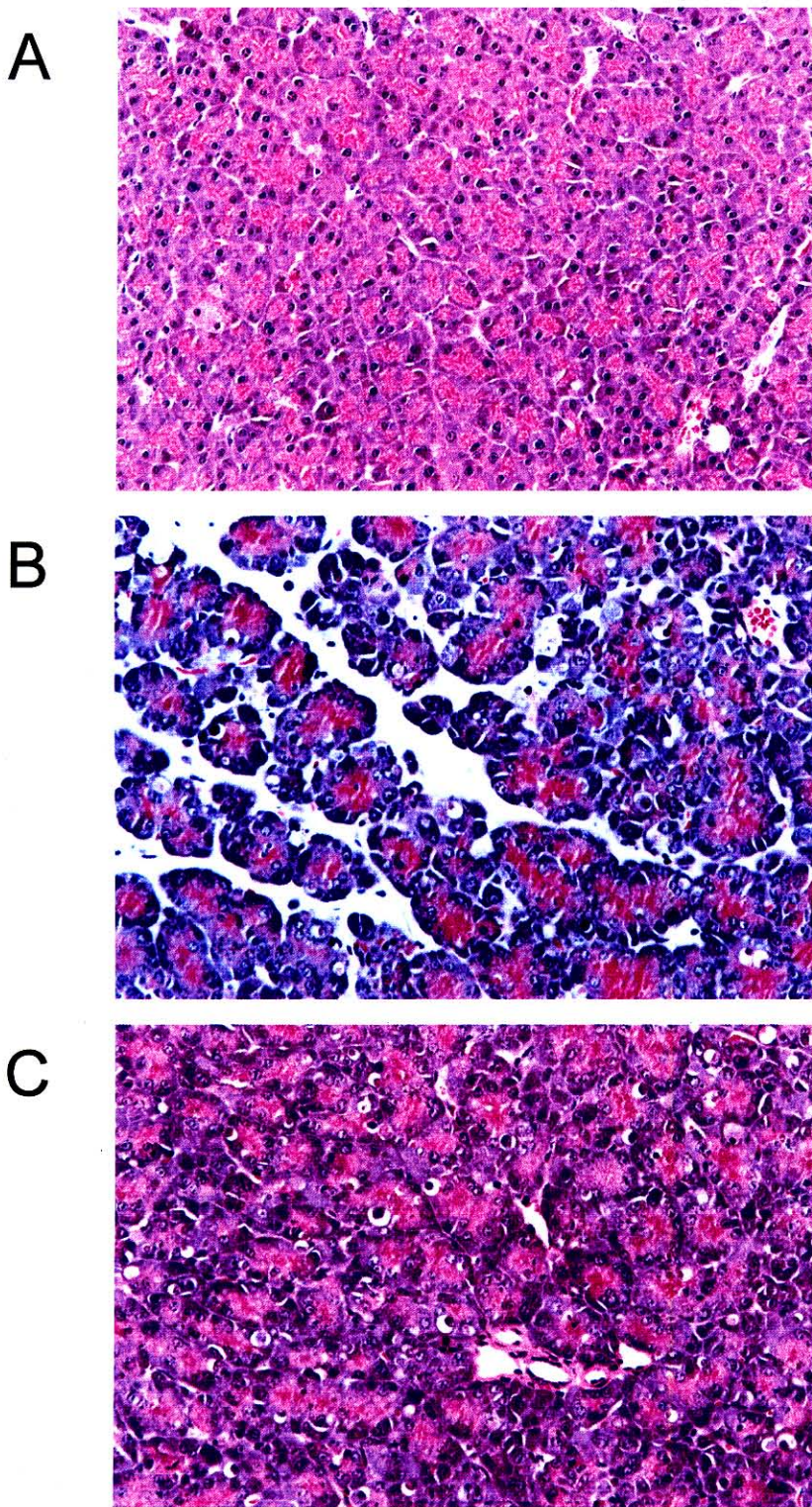


Fig. 4-2. Effect of KF24345 on the histologic alternations during cerulein-induced acute pancreatitis in mice (hematoxylin and eosin stain, original magnification x 400). The pancreas was removed 6 h after the first cerulein (50 $\mu\text{g/kg}$) injection, and histologically examined. A, pancreas from a normal mouse. B, pancreas from a control mouse treated with cerulein. Edema, PMN cell infiltration and acinar cell necrosis were observed. C, KF24345 (10 mg/kg) decreased edema, infiltration and necrosis when compared with the control pancreatitis mouse. PMN: polymorphonuclear.

TABLE 4-2

Effect of 8-SPT on the suppression by KF24345 of elevated activities of serum amylase and lipase during cerulein-induced acute pancreatitis in mice

Group	Pancreatitis	Serum activity (% of the control)	
		Amylase	Lipase
Normal		14.1 ± 0.8	2.8 ± 0.1
Control	cerulein	100.0 ± 8.0	100.0 ± 6.3
8-SPT	cerulein	99.4 ± 5.0	99.6 ± 5.7
KF24345	cerulein	64.1 ± 7.8 ^a	63.2 ± 8.8 ^a
KF24345 + 8-SPT	cerulein	93.9 ± 9.5 ^b	79.5 ± 8.5

Mice were orally treated with KF24345 (10 mg/kg) 1 h before the first intraperitoneal injection of cerulein (50 µg/kg). 8-SPT (20 mg/kg) was intravenously administered 10 min before the first cerulein injection. Blood samples were collected 9 h after the first cerulein injection to determine activities of serum amylase and lipase. Data are expressed as percent changes from the values obtained for the control mice treated with cerulein, and results are shown as means ± S.E. of 10 animals in each group. ^a $P < 0.05$, significantly different from the cerulein-treated control group; ^b $P < 0.05$, significantly different from the KF24345 + cerulein-treated group.

TABLE 4-3

Effects of R75231 and dipyridamole on activities of serum amylase and lipase during cerulein-induced acute pancreatitis in mice

Group	Pancreatitis	Serum activity (% of the control)	
		Amylase	Lipase
Normal		23.2 ± 0.8	12.2 ± 0.6
Control	cerulein	100.0 ± 6.3	100.0 ± 8.8
R75231	cerulein	62.8 ± 7.5 ^a	99.5 ± 19.7
Normal		16.5 ± 1.9	4.0 ± 0.1
Control	cerulein	100.0 ± 11.3	100.0 ± 18.2
Dipyridamole	cerulein	41.6 ± 5.0 ^a	50.0 ± 11.1

Mice were orally treated with R75231 (300 mg/kg) or dipyridamole (1000 mg/kg) 1 h before the first intraperitoneal injection of cerulein (50 µg/kg). Blood samples were collected 9 h after the first cerulein injection to determine activities of serum amylase and lipase. Data are expressed as percent changes from the values obtained for the control mice treated with cerulein, and results are shown as means ± S.E. of 6 animals in each group. ^a $P < 0.05$, significantly different from the cerulein-treated control group.

4-4. 考察

本検討において、セルレイン処置により認められた血清アミラーゼ活性の上昇に対する KF24345 の抑制作用は、アデノシン受容体拮抗薬 8-SPT によりほぼ完全に消失した。また KF24345 による血清リパーゼ活性上昇の抑制作用も、8-SPT 処置により消失する傾向を示した。加えて KF24345 以外のアデノシン取り込み阻害剤である R75231 およびジピリダモールも、セルレイン誘発急性膵炎の血清アミラーゼ活性の上昇を抑制した。以上の結果より、KF24345 は内因性アデノシンおよびアデノシン受容体を介してセルレイン誘発マウス急性膵炎の病態を改善すると考えられる。これまでアデノシン取り込み阻害剤の急性膵炎に対する作用を検討した報告はなく、本検討においてアデノシン取り込み阻害剤が抗急性膵炎作用を発現することが初めて明らかとなった。

本検討で認められた KF24345 の抗急性膵炎作用には、アデノシンの抗炎症作用に加え膵血流増加作用および膵外分泌不全の是正作用が寄与している可能性が考えられる。アデノシンは A_2 受容体を介して膵血管床において血管を弛緩させ、膵血流を増加させることが報告されている (79, 80)。膵の虚血は急性膵炎の病態を増悪させることが示されており (86)、アデノシンの膵血流増加作用は急性膵炎で虚血状態になっている膵臓に有益であると推察される。加えてアデノシンによる膵外分泌不全の是正作用も、KF24345 の抗急性膵炎作用に関与している可能性がある。膵の腺房および外分泌細胞にはアデノシン受容体の存在が示唆されており、アデノシンは *in vitro* でラット膵腺房からのアミラーゼの遊離を促進し (87)、また主に A_2 受容体を介してセクレチンで刺激されたイヌの膵外分泌を増強することが報告されている (88)。急性膵炎の病態には、膵外分泌の不全および膵腺房細胞内での消化酵素の活性化が関与するとされている (89)。アデノシンによる膵外分泌の促進作用は急性膵炎で認められる膵外分泌不全の是正につながり、病態の改善に有益である可能性が考えられる。以上の知見より、アデノシンによる膵血流増加作用および膵外分泌不全の是正作用は、その抗炎症作用と共に急性膵炎病態の改善に有益

であり、KF24345 による抗急性膵炎作用にも寄与している可能性が考えられる。

セルレイン誘発マウス急性膵炎における KF24345 の抗急性膵炎作用の想定機作を Fig. 4-3 にまとめた。

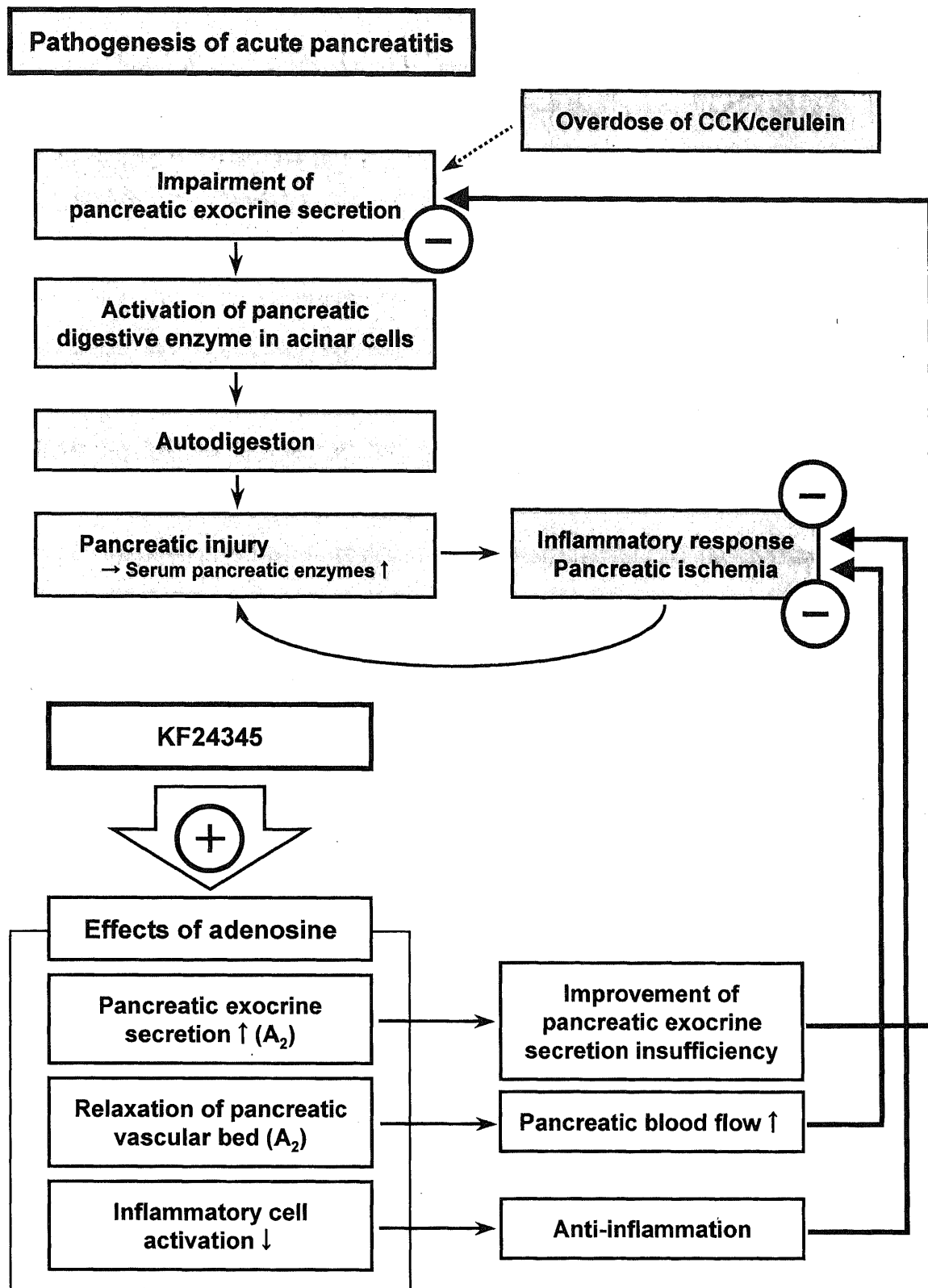


Fig. 4-3. Possible mechanisms of anti-pancreatitis effects by KF24345.
CCK: cholecystokinin.

4-5. 小括

1. アデノシン取り込み阻害剤 KF24345 はセルレイン誘発マウス急性膵炎の病態を改善した。KF24345 以外のアデノシン取り込み阻害剤も抗急性膵炎作用を示し、アデノシン取り込み阻害剤が急性膵炎の病態を改善することが初めて明らかとなった。
2. 本検討系における KF24345 の作用がアデノシン拮抗薬の併用により消失したことより、KF24345 の抗急性膵炎作用は内因性アデノシンを介していると考えられる。
3. 内因性アデノシンによる抗炎症作用、膵血流増加作用および膵外分泌不全の是正作用等が、KF24345 の抗急性膵炎作用に寄与した可能性が考えられる。

第 5 章 重症急性膵炎に対する KF24345 の作用および内因性アデノシンの関与

5-1. 序文

炎症性の臓器疾患である急性膵炎は、軽症から重症まで幅広い病態を呈することが特徴である (90)。軽症例の病態は一過性かつ可逆性であり、時間経過と共に自然治癒の方向に向かい、死亡することはほとんどない。これに対し重症例では、高度の炎症状態が全身に波及して全身性炎症反応症候群 (systemic inflammatory response syndrome ; SIRS) の状態となり、最終的に膵臓以外の遠隔重要臓器が傷害されて多臓器不全 (multiple organ dysfunction syndrome ; MODS) に進展する可能性がある (91)。この場合、重症急性膵炎は高い死亡率を伴う (92)。SIRS の本体は高サイトカイン血症であり、遠隔重要臓器の傷害には活性化好中球が主要な役割を担うとされる (93)。重症急性膵炎における MODS 等の全身性合併症は現在でも深刻な問題であり、急性膵炎から MODS への進展抑制が治療のポイントとなっている。

第 4 章において、アデノシン取り込み阻害剤 KF24345 が内因性アデノシンを介して軽症急性膵炎であるセルレイン誘発マウス急性膵炎の病態を改善することが明らかとなった。アデノシンはマクロファージの炎症性サイトカイン産生を抑制し、また好中球の活性化を抑制することが報告されている (10、25)。従って、KF24345 は急性膵炎の病態自体を改善することに加え、急性膵炎の全身性合併症への進展も抑制する可能性が期待される。本章においては、重篤な合併症を伴う重症急性膵炎に対してもアデノシン取り込み阻害剤が有効であるか否かを検証するため、コリン欠乏エチオニン含有食 (choline-deficient and ethionine-supplemented diet ; CDE diet) によりマウスに誘発される実験急性膵炎に対する KF24345 の作用を検討した。エチオニンは必須アミノ酸であるメチオニンの代謝アナログであり、膵腺房細胞内のホスホリパーゼ C の活性化を阻害することにより膵外分泌の不全を惹起する。エチオ

ニンにより誘発される膵外分泌不全の本態は、分泌顆粒中の消化酵素と膵腺房細胞内でライソゾームから逸脱したライソゾーム酵素との融合であり、これにより膵腺房細胞内での消化酵素の活性化が惹起される（82）。CDE diet 誘発急性膵炎は、以上のエチオニンの性質を利用して惹起される代表的な重症急性膵炎モデルである。セルレイン誘発急性膵炎が一過性の膵の浮腫病変を主体とした軽症の急性膵炎モデルであるのに対し、CDE diet 誘発急性膵炎は高い致死率を伴う非侵襲性の重症急性膵炎モデルである（94）。

KF24345 の作用における内因性アデノシンおよびアデノシン受容体の関与を検証するため、本検討においては KF24345 の作用に対する受容体選択的アデノシン拮抗薬（A₁ 拮抗薬 KW-3902、A_{2A} 拮抗薬 ZM 241385）の影響も併せて検討した。

5-2. 実験方法

動物

- 雌性 CD-1 マウス (15 g 前後) … 日本チャールス・リバー

化合物

- ZM 241385 … Tocris Cookson
- エチオニン (DL-ethionine) … Sigma
- KF24345 … 協和発酵医薬総合研究所にて合成
- KW-3902 … 同上

KF24345、KW-3902 および ZM 241385 は 0.5% (w/v) メチルセルロースで溶解あるいは懸濁し、10 mL/kg の容量で経口投与した。静脈内投与の場合は、塩酸で pH 3.5 に調整した 5% (w/v) グルコース液に KF24345 を溶解し、5 mL/kg の容量で尾静脈内投与した。

餌

急性膵炎の惹起には CDE diet を用いた。コリン欠乏食をオリエンタル酵母工業株式会社（東京）より購入し、エチオニンを 0.5%の重量比で添加混合して CDE diet とした。CDE diet の対照として CDE diet と同様の性状の standard diet（コリン含有、エチオニン不含）をオリエンタル酵母より購入し、使用した。

急性膵炎の惹起

既法（95、96）に従い、マウスに CDE diet 誘発急性膵炎を惹起した。マウスを 24 時間絶食し、その後致死の検討では 72 時間、その他の検討では 48 時間 CDE diet を摂取させて急性膵炎を惹起した。正常群のマウスは 24 時間絶食し、その後実験期間を通して standard diet を摂取させた。

致死、血清パラメーターおよび膵の組織学的変化に対する KF24345 の作用

第 1 章の in vivo アデノシン取り込み阻害の結果より、KF24345 の用量は 3 および 10 mg/kg を選択した。

致死観察： マウスに CDE diet を 72 時間摂取させ、その時点で生存しているマウスは standard diet 飼育下に戻してさらに 72 時間致死を観察した。

KF24345 (3、10 mg/kg p.o.) の予防的投与は CDE diet の摂取開始と同時に開始し、その後 CDE diet 摂取開始 120 時間後まで 24 時間毎に実施した。一方、KF24345 (10 mg/kg p.o.) の治療的投与は CDE diet の摂取開始 32 時間後より開始し、その後 CDE diet 摂取開始 128 時間後まで 24 時間毎に実施した。KF24345 治療的投与の開始時間は、本モデルにおいて CDE diet の摂取開始 32 時間後には組織学的にも生化学的にも急性膵炎が発症、確立しているとする既報 (97) の内容を基に決定した。

各群のマウス 5 匹単位で摂餌量を測定し、対照群と KF24345 処置群の CDE diet 消費量に相違が生じないように、予め設定された範囲内 (11 ± 3 g/5 mice/24 h) に最初の 24 時間の摂餌量が収まったマウスのみを解析に使用した。

膵湿重量、血清アミラーゼおよび lactate dehydrogenase (LDH)： マウスに CDE diet を 48 時間摂取させた。本実験条件において、CDE diet 摂取開始 48 時間後にはほぼ全てのマウスが生存していた。48 時間後にエーテル麻酔下で腹部大静脈より血液サンプルを採取し、膵臓を摘出して重量を測定した。血清アミラーゼおよび LDH 活性を測定し、摘出した膵臓を病理組織学的に検討した。

KF24345 (3、10 mg/kg p.o.) の予防的投与は、CDE diet 摂取開始 0 および 24 時間後に実施した。一方 KF24345 (10 mg/kg p.o.) の治療的投与は、CDE diet の摂取開始 32 時間後に実施した。

各群のマウス 5 匹単位で摂餌量を測定し、対照群と KF24345 処置群の CDE diet 消費量に相違が生じないように、予め設定された範囲内 (11 ± 3 g/5 mice/24 h) に最初の 24 時間の摂餌量が収まったマウスのみを解析に使用した。

血清 TNF- α 濃度に対する KF24345 の作用

マウスを CDE diet 摂食下で 48 時間飼育し、CDE diet 摂取開始 0 および 24 時間後に KF24345 (10 mg/kg) あるいは溶媒 (0.5%メチルセルロース) を経口投与した。CDE diet 摂取開始 48 時間後に腹部大静脈より血液サンプルを採取し、血清 TNF- α 濃度を測定した。

KF24345 の作用に対するアデノシン受容体拮抗薬の影響(致死観察)

マウスに CDE diet を 72 時間摂取させ、その後 standard diet 飼育下に戻してさらに 72 時間致死を観察した。CDE diet 摂取開始 0、24、48、72、96 および 120 時間後に KF24345 (10 mg/kg) を経口投与した。

選択的アデノシン A₁ 受容体拮抗薬 KW-3902 (0.3 mg/kg) あるいは同 A_{2A} 拮抗薬 ZM 241385 (3 mg/kg) は、CDE diet 摂取開始 1 時間前にマウスに経口投与した。これらの拮抗薬の経口投与は、以後 CDE diet 摂取開始 131 時間後まで 12 時間毎に実施した。KW-3902 0.1-1 mg/kg の経口投与は、NECA で誘発されるラットの血圧低下に影響することなく心拍数低下を顕著に抑制した (98)。ZM 241385 10 mg/kg はアデノシンによる心拍数低下に影響を与えなかったが、その 3-10 mg/kg の経口投与はアデノシンで誘発される血圧低下を抑制した (46、47)。以上の知見より、本検討で用いられた KW-3902 および ZM 241385 の各用量は、それぞれ A₁ および A_{2A} アデノシン受容体を選択的かつ十分に拮抗すると考えられた。

以下の通り群を構成した。

- 第 1 群 正常群 (standard diet)
- 第 2 群 対照群 (CDE diet)
- 第 3 群 KW-3902 (KW) 単独投与群 (CDE diet + KW-3902)
- 第 4 群 ZM 241385 (ZM) 単独投与群 (CDE diet + ZM 241385)
- 第 5 群 KF24345 単独投与群 (CDE diet + KF24345)
- 第 6 群 KW + KF 併用群 (CDE diet + KW-3902 + KF24345)
- 第 7 群 ZM + KF 併用群 (CDE diet + ZM 241385 + KF24345)

各群のマウス 5 匹単位で摂餌量を測定し、対照群と KF24345 処置群の CDE diet

消費量に相違が生じないように、予め設定された範囲内 (11 ± 3 g/5 mice/24 h) に最初の 24 時間の摂餌量が収まったマウスのみを解析に使用した。

血漿中アデノシン濃度に対する KF24345 の作用

マウスを CDE diet 摂食下で 48 時間飼育し、CDE diet 摂取開始 48 時間後に KF24345 (1.5 mg/kg) を 1 回尾静脈内投与した。KF24345 投与の直前および 10 分後に腹部大静脈より 3 mM EDTA 採血し、血漿中アデノシン濃度を測定した。

測定

各マウスからの血液サンプルは 1200 g、4°C で 10 分間冷却遠心し、血清あるいは血漿を分取した。血清アミラーゼおよび LDH 活性は、オートアナライザー (AU-600、オリンパス) および測定キットを使用して、自動化された発色法にて測定した。血清 TNF- α 濃度は ELISA キット (Amersham Biosciences) にて測定し、マウスレコンビナント TNF- α (Amersham Biosciences) を用いて作成した標準曲線より算出した。血漿中アデノシン濃度は、アデノシン測定キット「ヤマサ」(ヤマサ醤油株式会社、東京) を用いたラジオイムノアッセイ法により測定した。

組織学的検討

光学顕微鏡による検討のため、各マウスから摘出した膵臓の組織片を 10% (v/v) 中性緩衝ホルマリンで浸漬固定した。その後膵臓を単パラフィンブロック中に抱埋し、5 μ m に切断、切片を作製して H&E で染色した。各サンプルにおける膵腺房細胞のチモーゲン顆粒の増加、空胞化および核変性の程度を盲検法により検討し、次の基準に従ってスコア化した。0 = no change、1 = very slight、2 = slight、3 = moderate、4 = severe。

データ処理および統計解析

致死の検討においては、Fisher's exact probability test を用いて生存率のデータを

統計学的に分析した。その他の検討におけるデータは平均値±標準誤差で表示し、統計学的有意差は Student's t-test または Wilcoxon rank sum test、あるいは Kruskal-Wallis test および Steel test を用いて検定した。いずれの場合も危険率 5%未満を有意差ありとした。

5-3. 結果

致死、血清パラメーターおよび脾の組織学的変化に対する KF24345 の作用

致死観察：CDE diet 摂取開始 144 時間後には、対照群で 90%の致死が観察された。30 匹のマウスの内 27 匹が 144 時間後までに死亡した。

KF24345 (3 および 10 mg/kg) の予防的投与は、生存率を有意に改善した (Fig. 5-1A)。3 および 10 mg/kg 処置群において、それぞれ 30 匹中 10 および 18 匹のマウスが CDE diet 摂取開始 144 時間後まで生存した。

一方、CDE diet 摂取開始 32 時間後に開始した KF24345 (10 mg/kg) の治療的投与もまた生存率を有意に改善した (Fig. 5-1B)。CDE diet 摂取開始 144 時間後の時点において、KF24345 治療的処置群のマウス全 30 匹中 13 匹が生存していた。

CDE diet 摂取開始 144 時間後以降は、何れの群においてもマウスのさらなる死亡は認められなかった。Standard diet を摂取させた正常群のマウスは、全て実験全期間を通して生存した。

脾湿重量、血清アミラーゼおよび LDH：CDE diet で 48 時間飼育された対照群のマウスでは、standard diet で飼育された正常群のマウスと比較して脾湿重量および血清アミラーゼ活性がそれぞれ 1.5 および 2 倍以上に増加した。非特異的な細胞傷害の指標である血清 LDH 活性もまた、対照群のマウスで顕著に上昇した。

KF24345 10 mg/kg の予防的投与は、脾湿重量の増加 (Fig. 5-2A)、血清アミラーゼ (Fig. 5-2B) および LDH (Fig. 5-2C) 活性の上昇を有意に抑制した。KF24345 3 mg/kg の予防的投与は、対照群の血清 LDH 活性の上昇のみを抑制した。

一方 KF24345 (10 mg/kg) の治療的投与は脾湿重量の増加および血清 LDH 活性の上昇を有意に抑制したが (Fig. 5-2A、5-2C)、血清アミラーゼ活性の上昇に対しては影響を及ぼさなかった (Fig. 5-2B)。

脾の組織学的変化：CDE diet 摂取開始 48 時間後の分析において、対照群のマウスでは脾臓房細胞のチモーゲン顆粒の増加、空胞化および核変性が認められた。

KF24345 10 mg/kg の予防的投与は、チモーゲン顆粒の増加 (Fig. 5-3A) および空

胞化 (Fig. 5-3B) を有意に改善した (Fig. 5-4)。KF24345 3 mg/kg の予防的投与は、膵炎惹起群で認められた組織学的変化に対して有意な影響を及ぼさなかった。

KF24345 (10 mg/kg) の治療的投与は、膵腺房細胞のチモーゲン顆粒の増加、空胞化および核変性に対して有意な影響を及ぼさなかった (Fig. 5-3)。

血清 TNF- α 濃度に対する KF24345 の作用

CDE diet 摂取開始 48 時間後の分析において、対照群のマウスでは血清 TNF- α 濃度の上昇が認められた。KF24345 (10 mg/kg) の予防的投与は、血清 TNF- α 濃度の上昇を有意に抑制した (Fig. 5-5)。

KF24345 の作用に対するアデノシン受容体拮抗薬の影響(致死観察)

CDE diet 摂取開始 144 時間後には、対照群において 80%の致死が観察された。25 匹中 20 匹のマウスが 144 時間後までに死亡した。

KF24345 (10 mg/kg) は、対照群で認められたマウスの致死を有意に抑制した (Fig. 5-6B)。KF24345 処置群では、30 匹 20 匹のマウスが実験全期間を通して生存した。

KW-3902 (0.3 mg/kg) は致死に対する KF24345 の作用に影響を与えなかったが、ZM 241385 (3 mg/kg) は KF24345 の致死抑制作用をほぼ完全に消失させた (Fig. 5-6B)。KW-3902 + KF24345 および ZM 241385 + KF24345 処置群において、それぞれ 20 匹中 16 匹および 25 匹中 1 匹のマウスが実験全期間を通して生存した。

KW-3902 は、単独で CDE diet により誘発される致死を中程度だが有意に減少させた。一方 ZM 241385 は、単独で対照群のマウスで認められた致死を増悪させる傾向を示した (Fig. 5-6A)。KW-3902 単独処置群では 30 匹中 14 匹のマウスが実験全期間を通して生存し、ZM 241385 単独処置群では 25 匹のマウス全てが CDE diet 摂取開始 144 時間後までに死亡した。

CDE diet 摂取開始 144 時間後以降は、何れの群においてもマウスのさらなる死亡は認められなかった。Standard diet を摂取させた正常群のマウスは、全て実験全期間を通して生存した。

血漿中アデノシン濃度に対する KF24345 の作用

CDE diet 摂取開始 48 時間後の時点において、対照群マウスの血漿中アデノシン濃度は standard diet で飼育された正常群マウスの血漿中アデノシン濃度の 2 倍程度であり、有意に高値であった。正常群のマウスにおいては KF24345 (1.5 mg/kg) の静脈内投与は血漿中アデノシン濃度に影響を与えなかったが、対照群マウスにおける KF24345 静脈内投与 10 分後の血漿中アデノシン濃度は KF24345 の投与前と比較して有意に高値を示した (Fig. 5-7)。

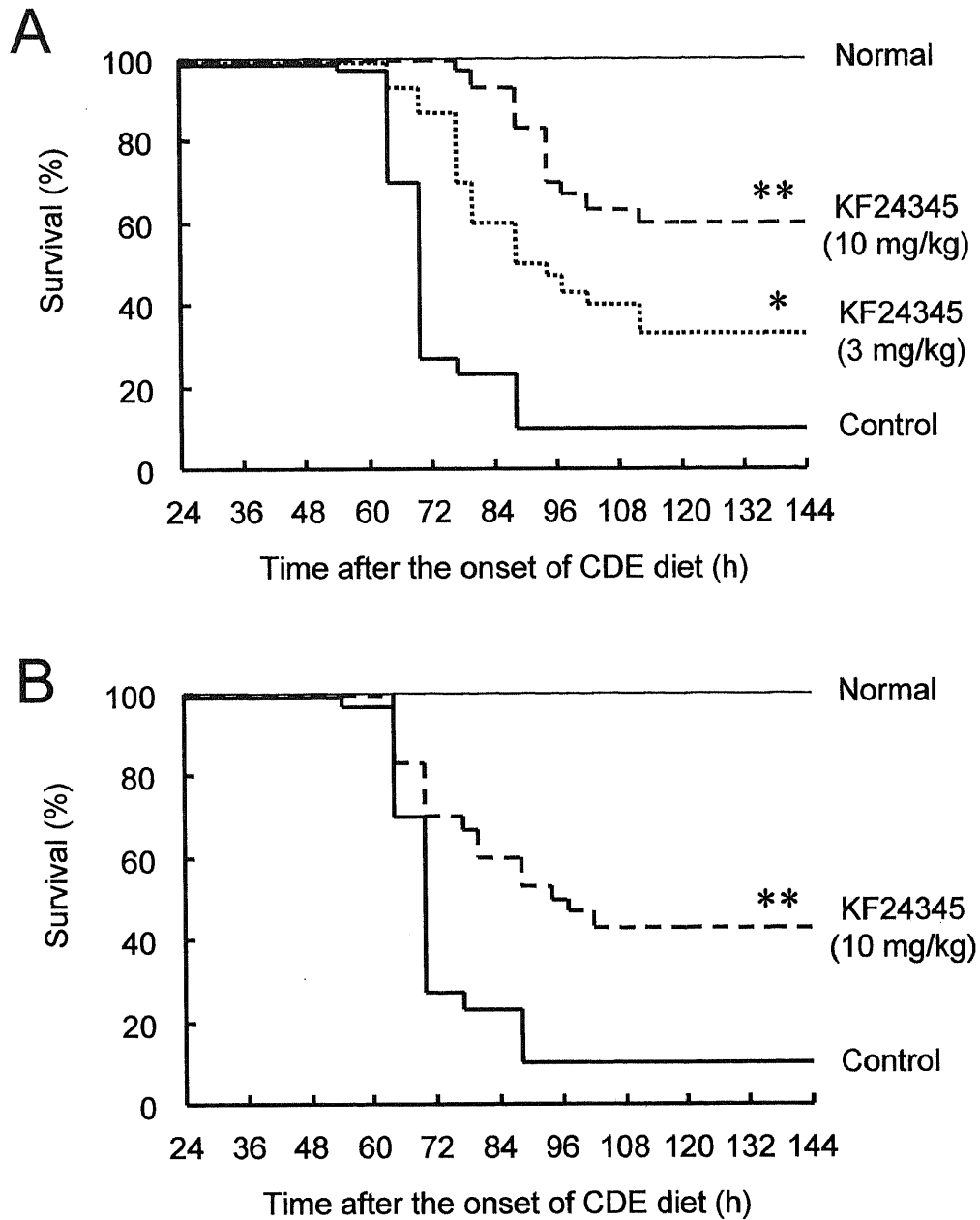


Fig. 5-1. Effect of prophylactic (A) and therapeutic (B) treatment with KF24345 on the mortality in mice with CDE diet-induced acute pancreatitis. Mice were exposed to CDE diet for 72 h, and observed up to 144 h. Prophylactic treatment with KF24345 (3 and 10 mg/kg p.o.) was started with the onset of CDE diet, and therapeutic treatment with KF24345 (10 mg/kg p.o.) was started 32 h after the onset of CDE diet. KF24345 or the vehicle, as control, was administered every 24 h thereafter. Values are percentages of the survived out of 20-30 animals. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, significantly different from the control group exposed to CDE diet. CDE diet: choline-deficient and ethionine-supplemented diet.

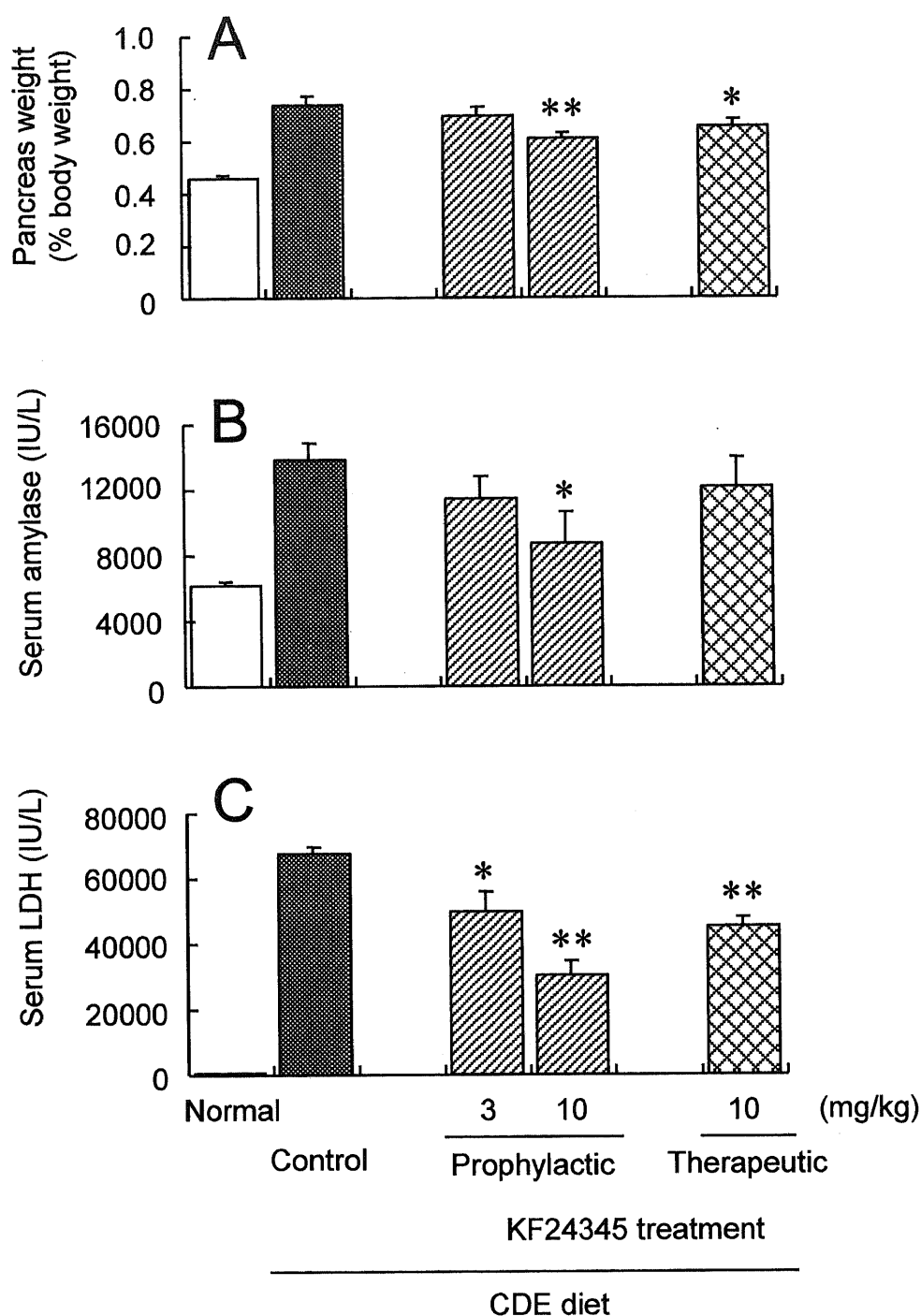


Fig. 5-2. Effect of KF24345 on pancreas weight (A) and activities of serum amylase (B) and LDH (C) in mice with CDE diet-induced acute pancreatitis. Mice were exposed to CDE diet for 48 h. KF24345 was orally administered 0 and 24 h after the onset of CDE diet prophylactically (3 and 10 mg/kg), or 32 h after the onset of CDE diet therapeutically (10 mg/kg). Values are means $\pm$ S.E. of 5-15 animals. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, significantly different from the control group exposed to CDE diet. CDE diet: choline-deficient and ethionine-supplemented diet, LDH: lactate dehydrogenase.

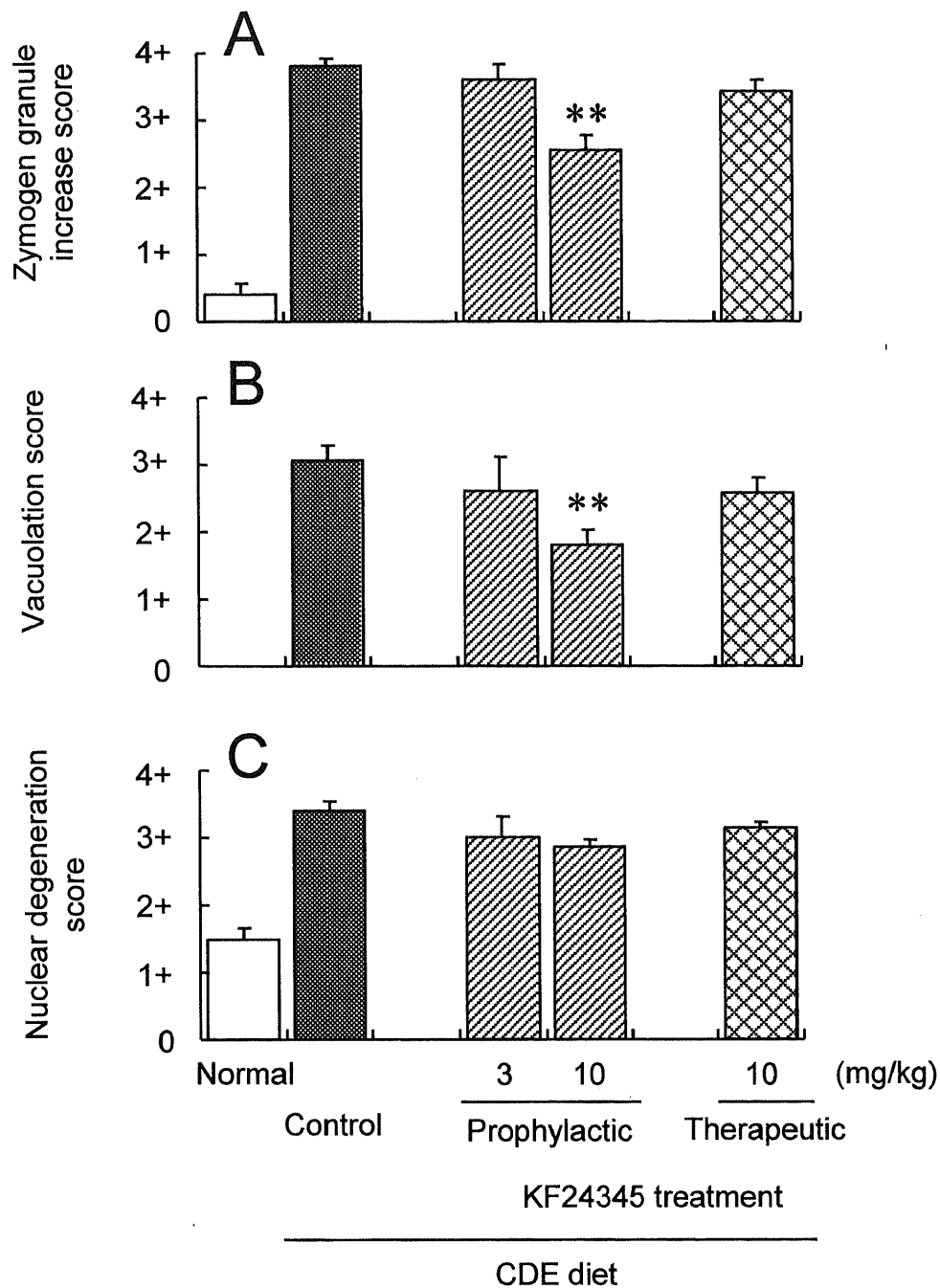
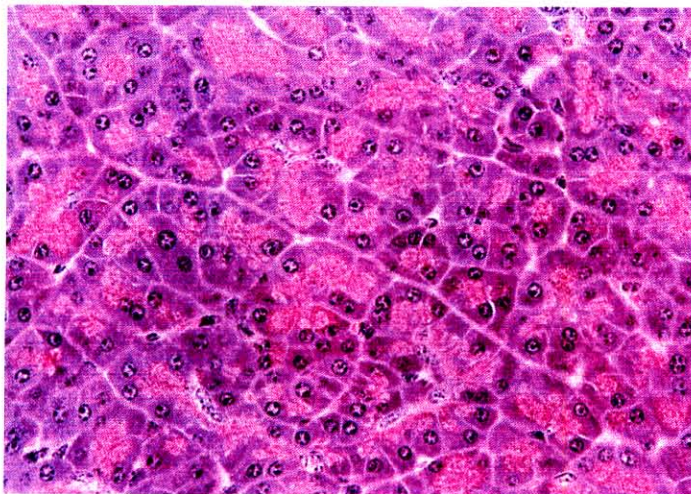
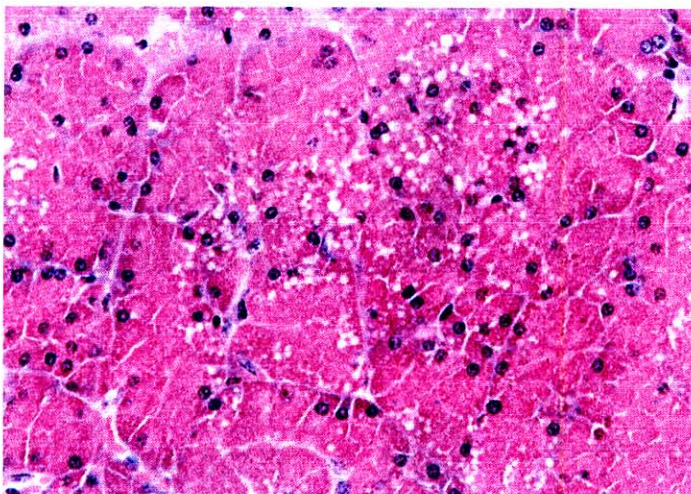


Fig. 5-3. Effect of KF24345 on zymogen granule increase (A), vacuolation (B) and nuclear degeneration (C) of acinar cells in mice with CDE diet-induced acute pancreatitis. Mice were exposed to CDE diet for 48 h, and pancreas was histologically examined and scored as follows: 0 = no change, 1 = very slight, 2 = slight, 3 = moderate, and 4 = severe. Prophylactic or therapeutic treatment with KF24345 was the same as in Fig. 5-2. Values are means $\pm$ S.E. of 5-15 animals. ** $P < 0.01$, significantly different from the control group exposed to CDE diet. CDE diet: choline-deficient and ethionine-supplemented diet.

A



B



C

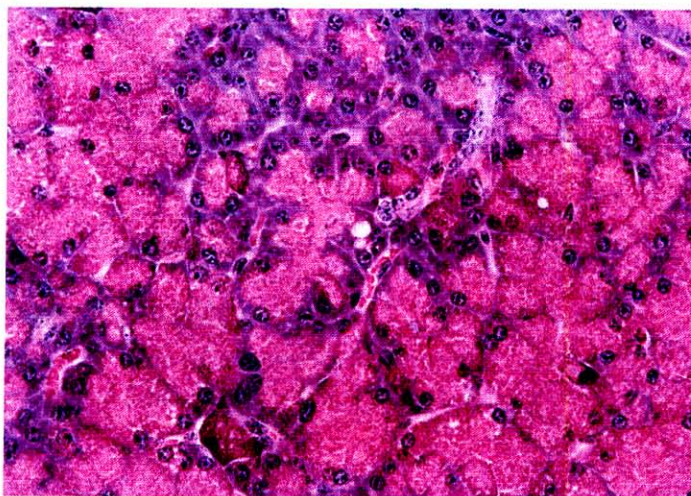


Fig. 5-4. Effect of KF24345 on histological changes in mice with CDE diet-induced acute pancreatitis: 48 h after the onset of CDE diet. A, pancreas from a normal mouse. B, pancreas from a control mouse exposed to CDE diet. Zymogen granule increase, vacuolation and nuclear degeneration of acinar cells were observed. C, pancreas from a mouse treated with KF24345 (10 mg/kg p.o.), showing marked amelioration in zymogen granule increase and vacuolation (hematoxylin and eosin stain, original magnification $\times 400$). CDE diet: choline-deficient and ethionine-supplemented diet.

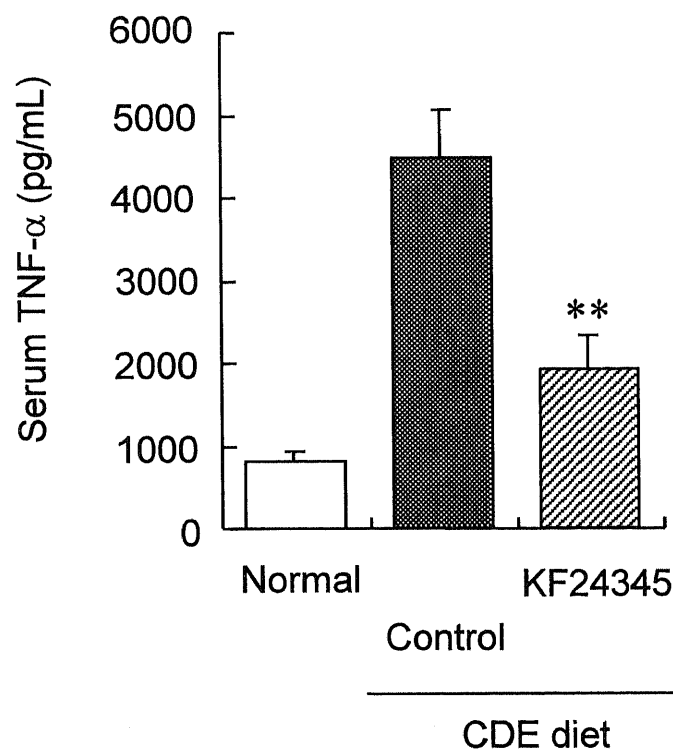


Fig. 5-5. Effect of KF24345 on serum TNF- α concentrations in mice with CDE diet-induced acute pancreatitis. Mice were exposed to CDE diet for 48 h, and serum TNF- α concentrations were measured as described in the text. KF24345 (10 mg/kg) was orally administered 0 and 24 h after the onset of CDE diet. Values are means $\pm$ S.E. of 7-8 animals. ** $P < 0.01$, significantly different from the control group exposed to CDE diet. CDE diet: choline-deficient and ethionine-supplemented diet, TNF- α : tumor necrosis factor- α .

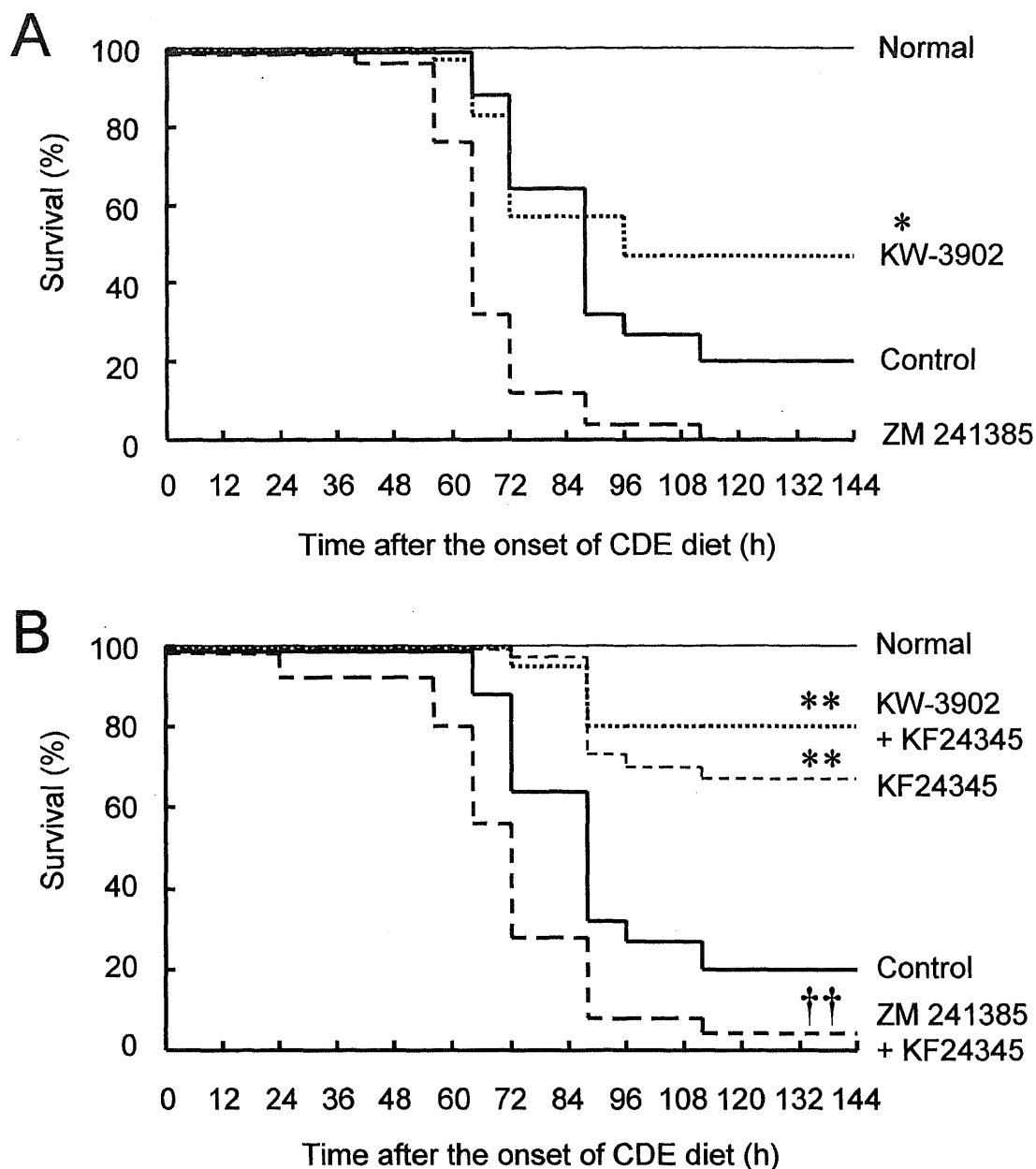


Fig. 5-6. Effects of selective adenosine receptor antagonists on the mortality (A), and effects of selective adenosine receptor antagonists on the attenuation of the mortality by KF24345 (B) in mice with CDE diet-induced acute pancreatitis. Mice were exposed to CDE diet for 72 h, and observed up to 144 h. KF24345 (10 mg/kg) or the vehicle, as control, was orally administered with the onset of CDE diet, and every 24 h thereafter. KW-3902 (a selective adenosine A_1 receptor antagonist; 0.3 mg/kg) or ZM 241385 (a selective adenosine A_{2A} receptor antagonist; 3 mg/kg) was orally administered 1 h before the CDE diet onset and every 12 h thereafter. Values are percentages of the survived out of 20-30 animals. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, significantly different from the control group exposed to CDE diet ; †† $P < 0.01$, significantly different from the KF24345-treated group with CDE diet-induced acute pancreatitis. CDE diet: choline-deficient and ethionine-supplemented diet.

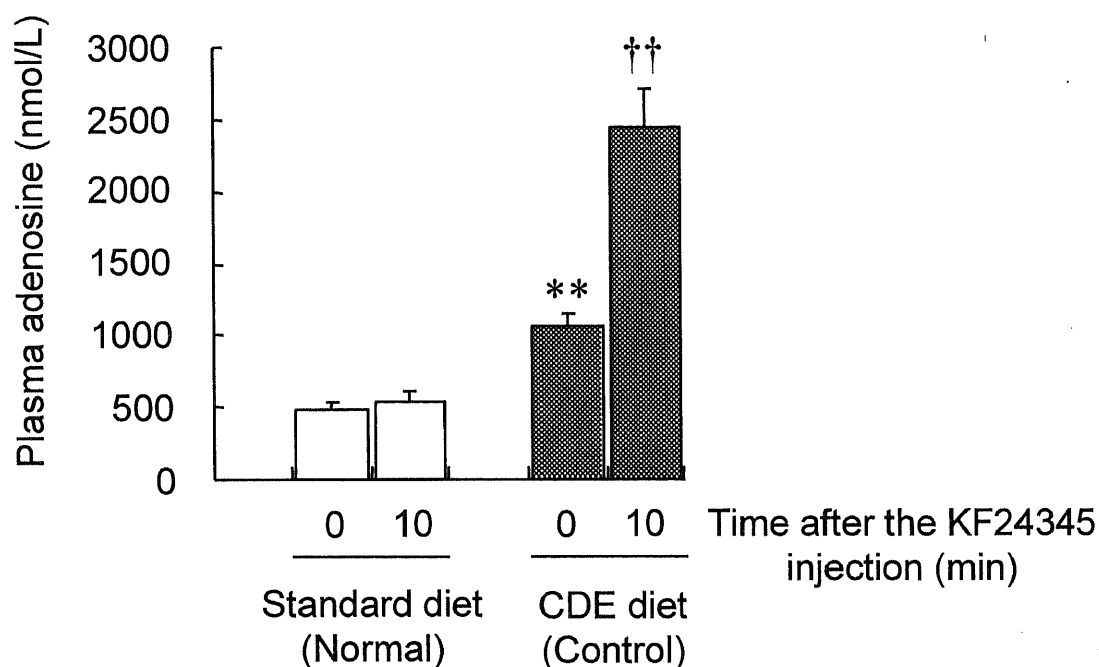


Fig. 5-7. Effect of KF24345 on plasma adenosine concentrations in mice with or without CDE diet-induced acute pancreatitis. Mice were exposed to the standard or CDE diet for 48 h, and then KF24345 (1.5 mg/kg) was intravenously injected. Blood samples were collected from the abdominal vein immediately before and 10 min after the injection of KF24345, and were processed for measurement of plasma adenosine concentrations. Values are means $\pm$ S.E. of 5 animals. ** $P < 0.01$, significantly different from the normal group exposed to the standard diet; †† $P < 0.01$, significantly different from the value immediately before the KF24345 injection in mice with CDE diet-induced acute pancreatitis. CDE diet: choline-deficient and ethionine-supplemented diet.

5-4. 考察

本検討において、KW-3902 の単独投与は対照群の致死を中程度だが有意に抑制した。一方 ZM 241385 の単独投与は、CDE diet 摂取開始 64-96 時間後において対照群の致死を有意に悪化させ、最終的には対照群の致死を悪化させる傾向を示した。アデノシン A₁ 受容体拮抗薬 KW-3902 が致死を抑制した機作として、KW-3902 による血管収縮や心拍数低下 (A₁ 受容体刺激に基づく作用) の改善の可能性が考えられる。またアデノシン A_{2A} 受容体拮抗薬 ZM 241385 が致死を増悪させた機作としては、ZM 241385 によるマクロファージ、好中球および血小板の活性化抑制 (A₂ 受容体拮抗に基づく作用) の可能性が考えられる。加えて CDE diet 摂取開始 48 時間後の分析において、急性膵炎を惹起した対照群の血漿中アデノシン濃度は正常群と比較して有意に高値を示した。以上の結果より、内因性アデノシンが本モデルにおける急性膵炎の発症および進展、特に致死に関与する可能性が示された。

KF24345 の予防的投与は急性膵炎の惹起に伴う膵湿重量の増加、血清アミラーゼ活性の上昇、ならびに膵腺房細胞のチモーゲン顆粒の増加および空胞化を有意に抑制し、膵臓の傷害を軽減させた。また KF24345 は急性膵炎惹起群で認められた血清 LDH 活性の上昇も抑制し、最終的に致死を有意に抑制した。血清 LDH 活性は、広範な臓器、組織傷害の指標と考えられる。以上の結果より、KF24345 は急性膵炎における膵臓の傷害を抑制し、これに伴い膵臓以外の臓器障害や全身状態の悪化を改善する可能性が示された。KF24345 の膵保護作用には、主に A₂ 受容体を介したアデノシンの抗炎症作用、膵血流増加作用および膵外分泌不全の是正作用等が寄与した可能性が考えられる (第 4 章参照)。KF24345 の致死抑制作用は KW-3902 の併用では有意な影響を受けず、ZM 241385 の併用によりほぼ完全に消失した。以上の結果より、KF24345 は内因性アデノシンおよびアデノシン A_{2A} 受容体を介して CDE diet 誘発マウス急性膵炎の致死を改善することが示された。即ち KF24345 のアデノシン取り込み阻害作用により細胞外の内因性アデノシンが増加して主にアデノシン A_{2A} 受容体へ作用した結果、本モデルにおいて膵傷害および致死を抑制した可能

性が考えられる。

予防的投与とは対照的に、本検討において KF24345 の治療的投与は脾臓の組織学的変化や血清脾酵素の上昇を改善しなかったが、致死は有意に抑制した。従って、KF24345 は急性脾炎発症後の全身性合併症への進展も抑制する可能性が考えられる。急性脾炎の重症例は SIRS および MODS 等の重篤な全身性合併症に進展し易く、高い死亡率を呈する (99、100)。SIRS の本体は侵襲（組織の破壊、自己消化等）に伴うマクロファージ活性化等による高サイトカイン血症であり、これにより活性化された好中球が遠隔重要臓器の傷害に主要な役割を担う (93)。アデノシンはマクロファージによる炎症性サイトカインの産生を抑制し (25)、また好中球上のアデノシン受容体に結合することにより直接好中球の活性化を抑制する (10)。従って、KF24345 により細胞外の内因性アデノシンを増加させてその薬理作用を増強することは、急性脾炎の SIRS および MODS への進展の抑制につながる可能性が考えられる。実際に本検討において、KF24345 は急性脾炎を発症したマウスにおける血清 TNF- α 濃度の上昇を抑制した。以上の結果より、KF24345 が急性脾炎の SIRS および MODS への進展を抑制し、全身性合併症の発症を抑えて致死を抑制する可能性が示された。

急性脾炎惹起群で認められた血漿中アデノシン濃度の上昇は、急性脾炎の進展に伴い広範に傷害された臓器や組織からアデノシンが遊離した結果と推察される (77)。侵襲条件下にある臓器、組織では、ATP の分解亢進等によりアデノシンの産生が増加する。本実験モデルにおいては脾臓の傷害に加えて肺傷害（好中球浸潤、微小血管の透過性亢進）および肝傷害（肝細胞の空胞化、壊死）が認められており（未発表データ）、これらの臓器が本検討において増加した血漿中アデノシンの供給源である可能性が考えられる。KF24345 の静脈内投与は急性脾炎を惹起した対照群のマウスにおいて血漿中アデノシン濃度を有意に上昇させたが、正常群のマウスでは血漿中アデノシン濃度を上昇させなかった。以上の結果より、定常状態においては細胞外アデノシンの基礎レベルが低く、KF24345 の投与は血漿中アデノシン濃度に影響を与えないと考えられる。これに対し急性脾炎の状態においてはアデノシ

ンの産生が増加しており、KF24345 の投与により周辺細胞へのアデノシン取り込みが抑制された結果、血漿中のアデノシンが上昇したと推察される。血漿中アデノシン濃度と同様に、KF24345 の処置により傷害された臓器や組織においても細胞外アデノシンレベルが上昇して保護作用を発現し、この作用が KF24345 による MODS 進展の抑制に寄与する可能性が考えられる。

第 4 章の結果と併せ、KF24345 が軽症および重症双方の急性膵炎病態を改善する可能性が示された。CDE diet 誘発マウス急性膵炎における KF24345 の病態改善作用の想定機作を Fig. 5-8 にまとめた。

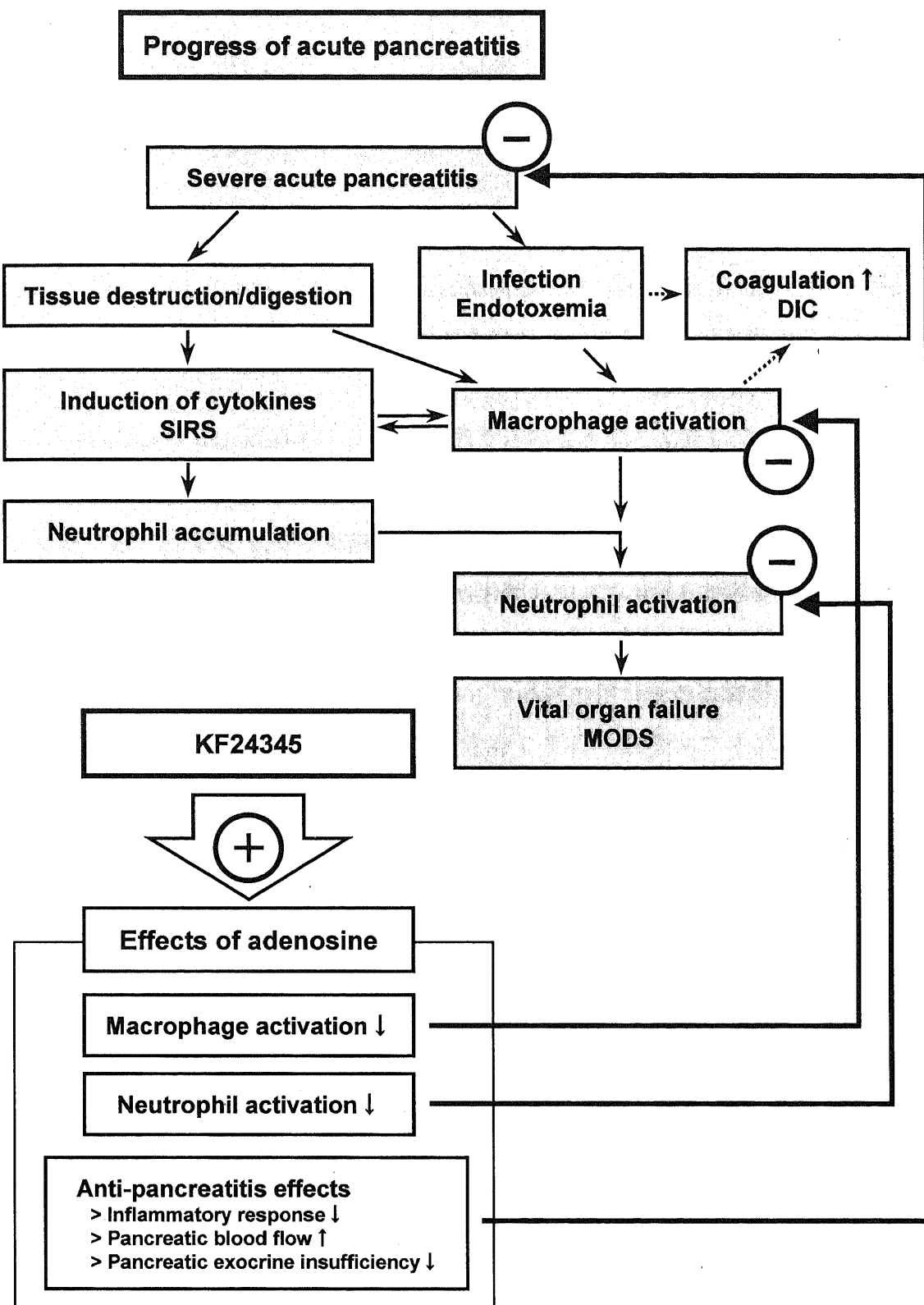


Fig. 5-8. Possible mechanisms of inhibitory effects by KF24345 on the development of acute pancreatitis to systemic complications. DIC: disseminated intravascular coagulation, MODS: multiple organ dysfunction syndrome, SIRS: systemic inflammatory response syndrome.

5-5. 小括

1. アデノシン取り込み阻害剤KF24345はマウス CDE diet誘発急性膵炎の病態を改善し、最終的に致死を抑制した。アデノシン取り込み阻害剤が、軽症急性膵炎に加えて重症急性膵炎に対しても有効であることが初めて明らかとなった。
2. KF24345 の致死抑制作用がアデノシン A_{2A} 拮抗薬で消失したことより、KF24345 の急性膵炎病態改善作用は内因性アデノシンおよびアデノシン A_{2A} 受容体を介している可能性が示唆された。内因性アデノシンによる急性膵炎の SIRS および MODS 等全身性合併症への進展の抑制が、KF24345 の急性膵炎改善作用に寄与する可能性が考えられる。
3. 本検討において、アデノシン取り込み阻害剤が致死性の重症急性膵炎の進展と合併症を抑制する可能性が初めて示された。重症急性膵炎の治療におけるアデノシン取り込みの阻害剤の有用性が期待される。

総括

1. 炎症に対するアデノシン取り込み阻害剤の有効性を検討することを目的として新規アデノシン取り込み阻害剤 KF24345 の作用を解析し、以下の結果および考察を得た。
2. KF24345 は、既存のアデノシン取り込み阻害剤と比較して経口投与後長時間持続する強力なアデノシン取り込み阻害活性を示した。KF24345 の良好な経口吸収および細胞膜上のヌクレオシドトランスポーターに対する強力な結合が、長時間持続する強力なアデノシン取り込み阻害作用に寄与した可能性が考えられる。
3. KF24345 は、内因性のアデノシンを介して LPS 誘発マウス TNF- α 産生および白血球減少を抑制した。内因性アデノシンによるマクロファージ、血管内皮細胞および白血球の活性化の抑制が、KF24345 の作用に寄与した可能性が考えられる。本検討において、アデノシン取り込み阻害剤が内因性アデノシンを介して *in vivo* で抗炎症作用を発現することが初めて明らかとなった。
4. KF24345 は、重篤な副作用を伴うことなくマウス糸球体腎炎の病態を改善した。内因性アデノシンによる抗炎症作用の他、アデノシンの腎血行動態に対する作用（糸球体内圧低下作用等）が KF24345 の抗糸球体腎炎作用に寄与した可能性が考えられる。
5. KF24345 は内因性アデノシンを介して軽症、重症双方の急性膵炎病態を改善し、特に重症急性膵炎では致死を抑制した。内因性アデノシンによる抗炎症作用や膵血流増加作用の他、重症急性膵炎ではアデノシンによる全身

性合併症への進展抑制作用等がKF24345の急性膵炎病態改善作用に寄与した可能性が考えられる。本検討において、アデノシン取り込み阻害剤が抗急性膵炎作用を発現することが初めて明らかとなった。

6. 以上の結果より、アデノシン取り込み阻害剤 KF24345 が糸球体腎炎や急性膵炎等、臓器血行動態の変化を伴う炎症性の臓器疾患に対して有効である可能性が示された。
7. KF24345 の作用の大部分はアデノシン受容体拮抗薬により抑制され、その作用は内因性アデノシンおよびアデノシン受容体を介していると考えられる。従って、KF24345 以外のアデノシン取り込み阻害剤も今回検討した疾患に対して有効である可能性が推定される。
8. 本研究を通じて、これまで示されてこなかったアデノシン取り込み阻害剤の抗炎症作用が明らかとなり、アデノシン取り込み阻害剤が種々の炎症性臓器疾患の治療に有用である可能性が示された。

引用文献

1. Olah ME and Stiles GL: Adenosine receptor subtypes: characterization and therapeutic regulation. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 35, 581-606 (1995)
2. Stiles GL: Adenosine receptor subtypes: new insights from cloning and functional studies. In: Jacobson KA and Jarvis MF eds. *Purinergic approaches in experimental therapeutics* pp. 29-37, Wiley-Liss, Inc., New York (1997)
3. Fredholm BB, Abbracchio MP, Burnstock G, Daly JW, Harden TK, Jacobson KA, Leff P and Williams M: Nomenclature and classification of purinoceptors: a report from the IUPHAR subcommittee. *Pharmacol Rev* 46, 143-156 (1994)
4. Collis MG and Hourani SMO: Adenosine receptor subtypes. *Trends Pharmacol Sci* 14, 360-366 (1993)
5. Fredholm BB and Sollevi A: Cardiovascular effects of adenosine. *Clin Physiol* 6, 1-21 (1986)
6. Geiger JD, Parkinson FE and Kowaluk EA: Regulators of endogenous adenosine levels as therapeutic agents. In: Jacobson KA and Jarvis MF eds. *Purinergic approaches in experimental therapeutics* pp. 55-84, Wiley-Liss, Inc., New York (1997)
7. Latini S and Pedata F: Adenosine in the central nervous system: release mechanisms and extracellular concentrations. *J Neurochem* 79, 463-484 (2001)
8. Ralevic V and Burnstock G: Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacol Rev* 50, 413-492 (1998)
9. Liu GS, Downey JM and Cohen MV: Adenosine, ischemia, and preconditioning. In: Jacobson KA and Jarvis MF eds. *Purinergic approaches in experimental therapeutics* pp. 153-172, Wiley-Liss, Inc., New York (1997)
10. Cronstein BN: Adenosine regulation of neutrophil function and inhibition of inflammation via adenosine receptors. In: Jacobson KA and Jarvis MF eds.

- Purinergic approaches in experimental therapeutics* pp. 285-299, Wiley-Liss, Inc., New York (1997)
11. Arch JR and Newsholme EA: The control of the metabolism and the hormonal role of adenosine. *Essays Biochem* 14, 82-123 (1978)
 12. Moser GH, Schrader J and Deussen A: Turnover of adenosine in plasma of human and dog blood. *Am J Physiol* 256, C799-C806 (1989)
 13. Williams M: Progress towards purinoceptor based therapeutics. *Curr Opin Invest Drugs* 2, 1105-1117 (1996)
 14. Griffith DA and Jarvis SM: Nucleoside and nucleobase transport systems of mammalian cells. *Biochim Biophys Acta* 1286, 153-181 (1996)
 15. Hyde RJ, Cass CE, Young JD and Baldwin SA: The ENT family of eukaryote nucleoside and nucleobase transporters: recent advances in the investigation of structure/function relationships and the identification of novel isoforms. *Mol Membr Biol* 18, 53-63 (2001)
 16. Buolamwini JK: Nucleoside transport inhibitors: structure-activity relationships and potential therapeutic applications. *Curr Med Chem* 4, 35-66 (1997)
 17. Baldwin SA, Mackey JR, Cass CE and Young JD: Nucleoside transporters: molecular biology and implications for therapeutic development. *Mol Med Today* 5, 216-224 (1999)
 18. Thorn JA and Jarvis SM: Adenosine transporters. *Gen Pharmacol* 27, 613-620 (1996)
 19. IJzerman AP and Van der Wenden NM: Modulators of adenosine uptake, release, and inactivation. In: Jacobson KA and Jarvis MF eds. *Purinergic approaches in experimental therapeutics* pp. 129-148, Wiley-Liss, Inc., New York (1997)
 20. Firestein GS, Boyle D, Bullough DA, Gruber HE, Sajjadi FG, Montag A, Sambol B and Mullane KM: Protective effect of an adenosine kinase inhibitor in septic shock. *J Immunol* 152, 5853-5859 (1994)

21. Kowaluk EA, Bhagwat SS and Jarvis MF: Adenosine kinase inhibitors. *Curr Pharm Design* 4, 403-416 (1998)
22. Ibba GV, Terrosu P, Franceschino V and Contini GM: Cardiovascular effects of a single high dose of dilazep by oral route. *Int J Cardiol* 11, 337-348 (1986)
23. Schwartz WW: An evaluation of dipyridamole (Persantine) in angina pectoris and ischemic heart disease. *J Am Osteopath Assoc* 67, 68-78 (1967)
24. Martin BJ, Lasley RD and Mentzer RM Jr: Infarct size reduction with the nucleoside transport inhibitor R-75231 in swine. *Am J Physiol* 272, H1857-H1865 (1997)
25. Rosengren S and Firestein GS: Purinergic modulation of septic shock and systemic inflammation response syndrome. In: Jacobson KA and Jarvis MF eds. *Purinergic approaches in experimental therapeutics* pp. 301-313, Wiley-Liss, Inc., New York (1997)
26. Cronstein BN: A novel approach to the development of anti-inflammatory agents: adenosine release at inflamed sites. *J Invest Med* 43, 50-57 (1995)
27. Eigler A, Greten TF, Sinha B, Haslberger C, Sullivan GW and Endres S: Endogenous adenosine curtails lipopolysaccharide-stimulated tumour necrosis factor synthesis. *Scand J Immunol* 45, 132-139 (1997)
28. Johnson SM, Patel S, Bruckner FE and Collins DA: 5'-Nucleotidase as a marker of both general and local inflammation in rheumatoid arthritis patients. *Rheumatology (Oxford)* 38, 391-396 (1999)
29. Le Vraux V, Chen YL, Masson I, De Sousa M, Giroud JP, Florentin I and Chauvelot-Moachon L: Inhibition of human monocyte TNF production by adenosine receptor agonists. *Life Sci* 52, 1917-1924 (1993)
30. Schrier DJ, Lesch ME, Wright CD and Gilbertsen RB: The antiinflammatory effects of adenosine receptor agonists on the carrageenan-induced pleural inflammatory response in rats. *J Immunol* 145, 1874-1879 (1990)

31. Van Belle H and Janssen PAJ: Comparative pharmacology of nucleoside transport inhibitors. *Nucleos Nucleot* 10, 975-982 (1991)
32. Beukers MW, Kerkhof CJM, IJzerman AP and Soudijn W: Nucleoside transport inhibition and platelet aggregation in human blood: R75231 and its enantiomers, draflazine and R88016. *Eur J Pharmacol* 266, 57-62 (1994)
33. Baer HP, Haq A, El-Soofi A, Serignese V and Paterson ARP: Potencies of mioflazine and its derivatives as inhibitors of adenosine transport in isolated erythrocytes from different species. *J Pharm Pharmacol* 42, 367-369 (1990)
34. Baer HP, Serignese V, Moorji A and Van Belle H: In vivo effectiveness of several nucleoside transport inhibitors in mice and hamsters. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 343, 365-369 (1991)
35. Ulich TR, Watson LR, Yin SM, Guo KZ, Wang P, Thang H and del Castillo J: The intratracheal administration of endotoxin and cytokines. I. Characterization of LPS-induced IL-1 and TNF mRNA expression and the LPS-, IL-1-, and TNF-induced inflammatory infiltrate. *Am J Pathol* 138, 1485-1496 (1991)
36. Smedly LA, Tonnesen MG, Sandhaus RA, Haslett C, Guthrie LA, Johnston RB, Henson PM and Worthen GS: Neutrophil-mediated injury to endothelial cells. Enhancement by endotoxin and essential role of neutrophil elastase. *J Clin Invest* 77, 1233-1243 (1986)
37. Cronstein BN, Rosenstein ED, Kramer SB, Weissmann G and Hirschhorn R: Adenosine: a physiologic modulator of superoxide anion generation by human neutrophils. Adenosine acts via an A₂ receptor on human neutrophils. *J Immunol* 135, 1366-1371 (1985)
38. Salmon JE and Cronstein BN: Fcγ receptor-mediated functions in neutrophils are modulated by adenosine receptor occupancy: A₁ receptors are stimulatory and A₂ receptors are inhibitory. *J Immunol* 145, 2235-2240 (1990)
39. Cronstein BN, Levin RI, Philips M, Hirschhorn R, Abramson SB and

- Weissmann G: Neutrophil adherence to endothelium is enhanced via adenosine A₁ receptors and inhibited via adenosine A₂ receptors. *J Immunol* 148, 2201-2206 (1992)
40. Parmely MJ, Zhou WW, Edwards CK 3rd, Borchering DR, Silverstein R and Morrison DC: Adenosine and a related carbocyclic nucleoside analogue selectively inhibit tumor necrosis factor- α production and protect mice against endotoxin challenge. *J Immunol* 151, 389-396 (1993)
 41. Bouma MG, Stad RK, van den Wildenberg FAJM and Buurman WA: Differential regulatory effects of adenosine on cytokine release by activated human monocytes. *J Immunol* 153, 4159-4168 (1994)
 42. Nonaka H, Ichimura M, Takeda M, Kanda T, Shimada J, Suzuki F and Kase H: KW-3902, a selective high affinity antagonist for adenosine A₁ receptors. *Br J Pharmacol* 117, 1645-1652 (1996)
 43. Poucher SM, Keddie JR, Singh P, Stoggall SM, Caulkett PWR, Jones G and Collis MG: The *in vitro* pharmacology of ZM 241385, a potent, non-xanthine, A_{2a} selective adenosine receptor antagonist. *Br J Pharmacol* 115, 1096-1102 (1995)
 44. Cushing DJ, Brown GL, Sabouni MH and Mustafa SJ: Adenosine receptor-mediated coronary artery relaxation and cyclic nucleotide production. *Am J Physiol* 261, H343-H348 (1991)
 45. Shimada J, Suzuki F, Nonaka H and Ishii A: 8-polycycloalkyl-1,3-dipropylxanthines as potent and selective antagonists for A₁-adenosine receptors. *J Med Chem* 35, 924-930 (1992)
 46. Keddie JR, Poucher SM, Shaw GR, Brooks R and Collis MG: In vivo characterization of ZM 241385, a selective adenosine A_{2A} receptor antagonist. *Eur J Pharmacol* 301, 107-113 (1996)
 47. Poucher SM, Keddie JR, Brooks R, Shaw GR and McKillop D:

Pharmacodynamics of ZM 241385, a potent A_{2a} adenosine receptor antagonist, after enteric administration in rat, cat and dog. J Pharm Pharmacol 48, 601-606 (1996)

48. Toombs CF, McGee DS, Johnston WE and Vinten-Johansen J: Myocardial protective effects of adenosine: infarct size reduction with pretreatment and continued receptor stimulation during ischemia. Circulation 86, 986-994 (1992)
49. Bouma MG, van den Wildenberg FAJM and Buurman WA: Adenosine inhibits cytokine release and expression of adhesion molecules by activated human endothelial cells. Am J Physiol 270, C522-C529 (1996)
50. Gasic AC, McGuire G, Krater S, Farhood AI, Goldstein MA, Smith CW, Entman ML and Taylor AA: Hydrogen peroxide pretreatment of perfused canine vessels induces ICAM-1 and CD18-dependent neutrophil adherence. Circulation 84, 2154-2166 (1991)
51. Stratta P, Canavese C, Sandri L, Ciccone G, Santi S, Barolo S, Messuerotti A, Quaglia M, Mazzucco G, Fop F, Segoloni GP and Piccoli G: The concept of 'glomerulonephritis'. Am J Nephrol 19, 83-91 (1999)
52. Brady HR: Leukocyte adhesion molecules and kidney diseases. Kidney Int 45, 1285-1300 (1994)
53. Camussi G: Interactive effects of tumor necrosis factor and platelet-activating factor in the pathogenesis of glomerular injury. Lab Invest 70, 435-436 (1994)
54. Jackson EK: Renal actions of purines. In: Jacobson KA and Jarvis MF eds. *Purinergic approaches in experimental therapeutics* pp. 217-250, Wiley-Liss, Inc., New York (1997)
55. Haas JA and Osswald H: Adenosine induced fall in glomerular capillary pressure. Effect of ureteral obstruction and aortic constriction in the Munich-Wistar rat kidney. Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol 317, 86-89 (1981)
56. Murray RD and Churchill PC: Concentration dependency of the renal vascular

- and renin secretory responses to adenosine receptor agonists. *J Pharmacol Exp Ther* 232, 189-193 (1985)
57. Agmon Y, Dinour D and Brezis M: Disparate effects of adenosine A₁- and A₂-receptor agonists on intrarenal blood flow. *Am J Physiol* 265, F802-F806 (1993)
 58. Feith GW, Bogman MJT, Assmann KJM, van Gompel APM, Schalkwijk J, van Rooijen N and Koene RAP: Decreased PMN accumulation and glomerular damage by clodronate liposome treatment in PMN-dependent anti-GBM nephritis in mice. *Exp Nephrol* 5, 301-304 (1997)
 59. Hudson BG, Reeders ST and Tryggvason K: Type IV collagen: structure, gene organization, and role in human diseases. Molecular basis of Goodpasture and Alport syndromes and diffuse leiomyomatosis. *J Biol Chem* 268, 26033-26036 (1993)
 60. Spiro RG: Studies on the renal glomerular basement membrane. *J Biol Chem* 242, 1915-1922 (1967)
 61. Nagai H, Takizawa T, Nishiyori T and Koda A: Experimental glomerulonephritis in mice as a model for immunopharmacological studies. *Jpn J Pharmacol* 32, 1117-1124 (1982)
 62. Wakayama H, Hasegawa Y, Kawabe T, Hara T, Matsuo S, Mizuno M, Takai T, Kikutani H and Shimokata K: Abolition of anti-glomerular basement membrane antibody-mediated glomerulonephritis in FcR γ -deficient mice. *Eur J Immunol* 30, 1182-1190 (2000)
 63. Poelstra K, Heynen ER, Baller JFW, Hardonk MJ and Bakker WW: Modulation of anti-Thy1 nephritis in the rat by adenine nucleotides. *Lab Invest* 66, 555-563 (1992)
 64. Poelstra K, Brouwer E, Baller JFW, Hardonk MJ and Bakker WW: Attenuation of anti-Thy1 glomerulonephritis in the rat by anti-inflammatory

- platelet-inhibiting agents. *Am J Pathol* 142, 441-450 (1993)
65. Izumino K, Iida H, Asaka M, Mizumura Y and Sasayama S: Effect of the antiplatelet agents ticlopidine and dipyridamole on experimental immune complex glomerulonephritis in rats. *Nephron* 43, 56-61 (1986)
 66. Osswald H, Nabakowski G and Hermes H: Adenosine as a possible mediator of metabolic control of glomerular filtration rate. *Int J Biochem* 12, 263-267 (1980)
 67. Osswald H, Schmitz HJ and Kemper R: Renal action of adenosine: effect on renin secretion in the rat. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 303, 95-99 (1978)
 68. Churchill PC and Bidani A: Renal effects of selective adenosine receptor agonists in anesthetized rats. *Am J Physiol* 252, F299-F303 (1987)
 69. Wolf G and Neilson EG: Angiotensin II as a renal growth factor. *J Am Soc Nephrol* 3, 1531-1540 (1993)
 70. Guo G, Morrissey J, McCracken R, Tolley T, Liapis H and Klahr S: Contributions of angiotensin II and tumor necrosis factor- α to the development of renal fibrosis. *Am J Physiol* 280, F777-F785 (2001)
 71. Steinberg W and Tenner S: Acute pancreatitis. *New Engl J Med* 330, 1198-1210 (1994)
 72. Leach SD, Modlin IM, Scheele GA and Gorelick FS: Intracellular activation of digestive zymogens in rat pancreatic acini. Stimulation by high doses of cholecystokinin. *J Clin Invest* 87, 362-366 (1991)
 73. Kyogoku T, Manabe T and Tobe T. Role of ischemia in acute pancreatitis. *Dig Dis Sci* 37, 1409-1417 (1992)
 74. Denham W, Yang J, Fink G, Denham D, Carter G, Ward K and Norman J: Gene targeting demonstrates additive detrimental effects of interleukin 1 and tumor necrosis factor during pancreatitis. *Gastroenterology* 113, 1741-1746 (1997)
 75. Konturek SJ, Dembinski A, Konturek PJ, Warzecha Z, Jaworek J, Gustaw P,

- Tomaszewska R and Stachura J: Role of platelet activating factor in pathogenesis of acute pancreatitis in rats. *Gut* 33, 1268-1274 (1992)
76. Niederau C, Niederau M, Borchard F, Ude K, Luthen R, Strohmeyer G, Ferrell LD and Grendell JH: Effects of antioxidants and free radical scavengers in three different models of acute pancreatitis. *Pancreas* 7, 486-496 (1992)
 77. Luthen RE, Niederau C and Grendell JH: Intrapancreatic zymogen activation and levels of ATP and glutathione during caerulein pancreatitis in rats. *Am J Physiol* 268, G592-G604 (1995)
 78. Satoh A, Shimosegawa T, Satoh K, Ito H, Kohno Y, Masamune A, Fujita M and Toyota T: Activation of adenosine A₁-receptor pathway induces edema formation in the pancreas of rats. *Gastroenterology* 119, 829-836 (2000)
 79. Gross R, Hillaire-Buys D, Bertrand G, Ribes G and Loubatieres-Mariani MM: Diabetes and impaired response of glucagon cells and vascular bed to adenosine in rat pancreas. *Diabetes* 38, 1291-1295 (1989)
 80. Quere I, Hillaire-Buys D, Brunschwig C, Chapal J, Janbon C, Blayac JP, Petit P and Loubatieres-Mariani MM: Effects of homocysteine on acetylcholine- and adenosine-induced vasodilatation of pancreatic vascular bed in rats. *Br J Pharmacol* 122, 351-357 (1997)
 81. Li Y and Owyang C: Vagal afferent pathway mediates physiological action of cholecystokinin on pancreatic enzyme secretion. *J Clin Invest* 92, 418-424 (1993)
 82. Steer ML and Meldolesi J: The cell biology of experimental pancreatitis. *New Engl J Med* 316, 144-150 (1987)
 83. Nonaka A, Manabe T, Kyogoku T, Tamura K and Tobe T: Evidence for a role of free radicals by synthesized scavenger, 2-octadecylascorbic acid, in cerulein-induced mouse acute pancreatitis. *Dig Dis Sci* 37, 274-279 (1992)
 84. Fu K, Tomita T, Sarras MP Jr, De Lisle RC and Andrews GK: Metallothionein

- protects against cerulein-induced acute pancreatitis: analysis using transgenic mice. *Pancreas* 17, 238-246 (1998)
85. Neuschwander-Tetri BA, Ferrell LD, Sukhabote RJ and Grendell JH: Glutathione monoethyl ester ameliorates a cerulein-induced pancreatitis in the mouse. *J Clin Invest* 89, 109-116 (1992)
 86. Bassi D, Kollias N, Castillo CF, Foitzik T, Warshaw AL and Rattner DW: Impairment of pancreatic microcirculation correlates with the severity of acute experimental pancreatitis. *J Am Coll Surg* 179, 257-263 (1994)
 87. Rodriguez-Nodal F, San Roman JI, Lopez-Novoa JM and Calvo JJ: Effect of adenosine and adenosine agonists on amylase release from rat pancreatic lobules. *Life Sci* 57, PL253-PL258 (1995)
 88. Yamagishi F, Homma N, Haruta K, Iwatsuki K and Chiba S: Adenosine potentiates secretin-stimulated pancreatic exocrine secretion in the dog. *Eur J Pharmacol* 118, 203-209 (1985)
 89. Steer ML: The early intraacinar cell events which occur during acute pancreatitis. *Pancreas* 17, 31-37 (1998)
 90. Wilson C, Heath DI and Imrie CW: Prediction of outcome in acute pancreatitis: a comparative study of APACHE II, clinical assessment and multiple factor scoring systems. *Br J Surg* 77, 1260-1264 (1990)
 91. Steer ML: Etiology and pathophysiology of acute pancreatitis. In: Go VLW, DiMagno EP, Gardner JD, Lebenthal E, Reber HA and Scheele GA eds. *The pancreas: biology, pathobiology, and disease* pp. 581-592, Raven, New York (1993)
 92. Banks PA: Medical management of acute pancreatitis and complications. In: Go VLW, DiMagno EP, Gardner JD, Lebenthal E, Reber HA and Scheele GA eds. *The pancreas: biology, pathobiology, and disease* pp. 593-611, Raven, New York (1993)

93. Ogawa M: Mechanisms of the development of organ failure following surgical insult: the 'second attack' theory. Clin Intensive Care 7, 34-38 (1996)
94. Bhatia M, Saluja AK, Hofbauer B, Lee HS, Frossard JL and Steer ML: The effects of neutrophil depletion on a completely noninvasive model of acute pancreatitis-associated lung injury. Int J Pancreatol 24, 77-83 (1998)
95. Niederau C, Liddle RA, Ferrell LD and Grendell JH: Beneficial effects of cholecystokinin-receptor blockade and inhibition of proteolytic enzyme activity in experimental acute hemorrhagic pancreatitis in mice. J Clin Invest 78, 1056-1063 (1986)
96. Silverman M, Ilardi C, Bank S, Kranz V and Lendvai S: Effects of the cholecystokinin receptor antagonist L-364,718 on experimental pancreatitis in mice. Gastroenterology 96, 186-192 (1989)
97. Norman JG, Fink GW, Messina J, Carter G and Franz MG: Timing of tumor necrosis factor antagonism is critical in determining outcome in murine lethal acute pancreatitis. Surgery 120, 515-521 (1996)
98. Mizumoto H, Karasawa A and Kubo K: Diuretic and renal protective effects of 8-(noradamantan-3-yl)-1,3-dipropylxanthine (KW-3902), a novel adenosine A₁-receptor antagonist, *via* pertussis toxin insensitive mechanism. J Pharmacol Exp Ther 266, 200-206 (1993)
99. Norman JG, Franz MG, Fink GS, Messina J, Fabri PJ, Gower WR and Carey LC: Decreased mortality of severe acute pancreatitis after proximal cytokine blockade. Ann Surg 221, 625-634 (1995)
100. Ogawa M: Acute pancreatitis and cytokines: "second attack" by septic complication leads to organ failure. Pancreas 16, 312-315 (1998)

謝辞

本論文の作成および発表にあたり、終始ご懇篤なるご指導とご鞭撻を賜りました千葉大学薬学部教授 矢野眞吾先生に深甚なる謝意を表します。

また、本研究の機会を与えて下さると共に過分のご配慮を賜りました協和発酵工業株式会社 常務執行役員医薬企画管理本部長 鈴木文夫博士、同医薬総合研究所医学生物学研究所長 唐沢啓博士、同医薬総合研究所主任研究員 日下英昭博士および同医薬総合研究所主席研究員 大森健守博士に厚く御礼申し上げます。

また本研究の遂行にあたり、共同研究者として数々のご指導とご助言を賜りました協和発酵工業株式会社 安全性研究所主任研究員 佐野純一博士、鈴木一生博士、同東京研究所主任研究員 高井春樹博士、同医薬総合研究所 水谷未来氏、高山真氏、同安全性研究所 佐藤均氏、南谷賢一郎氏、高田千絵さん、同本社臨床開発センター 片桐知佳子さんおよび協和メデックス株式会社 富士工場主任研究員 西川智博士に深く感謝いたします。

最後に、労苦を厭わず終始実験にご協力いただきました協和発酵工業株式会社 医薬総合研究所 川合美可さん、永井麻弥さんおよび三田保代さんに心より感謝申し上げます。

主論文目録

本学位論文内容は、下記の発表論文による。

1. Noji T, Takayama M, Mizutani M, Okamura Y, Takai H, Karasawa A and Kusaka H: KF24345, an adenosine uptake inhibitor, suppresses lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor- α production and leukopenia via endogenous adenosine in mice. *J Pharmacol Exp Ther* 300, 200-205 (2002)
2. Noji T, Nan-ya K, Katagiri C, Mizutani M, Sano J, Nishikawa S, Karasawa A and Kusaka H: Adenosine uptake inhibition ameliorates cerulein-induced acute pancreatitis in mice. *Pancreas* 25, 387-392 (2002)
3. Noji T, Sato H, Sano J, Nishikawa S, Kusaka H and Karasawa A: Treatment with an adenosine uptake inhibitor attenuates glomerulonephritis in mice. *Eur J Pharmacol* 449, 293-300 (2002)
4. Noji T, Nan-ya K, Mizutani M, Katagiri C, Sano J, Takada C, Nishikawa S, Karasawa A and Kusaka H: KF24345, an adenosine uptake inhibitor, ameliorates the severity and mortality of lethal acute pancreatitis via endogenous adenosine in mice. *Eur J Pharmacol* 454, 85-93 (2002)

主査、副査名

本学位論文の審査は、千葉大学大学院薬学研究院で指名された下記の審査委員により行われた。

主査	千葉大学教授（薬学研究院）	薬学博士	矢野眞吾
副査	千葉大学教授（薬学研究院）	医学博士	上田志朗
副査	千葉大学教授（薬学研究院）	薬学博士	上野光一
副査	千葉大学教授（薬学研究院）	薬学博士	北田光一
副査	千葉大学教授（薬学研究院）	薬学博士	村山俊彦