

非ステロイド性抗炎症薬による血漿蛋白質の荷電変化の可能性の検索

高木美和子、鹿取 信

北里大学医学部薬理

azapropazone (AZA) などの非酸性非ステロイド性抗炎症薬が腎炎の蛋白尿を著しく改善するにも拘らず、前回報告¹⁾したように indomethacin (IDM) と異なり、ウシ精囊ミクロゾームによるアラキドン酸からの prostaglandin (PG)_{E2} 生合成をほとんど阻害せず、従って蛋白尿改善を cyclooxygenase 阻害で説明することは困難であった。一方炎症巣における血漿蛋白質の滲出には albumin (Alb) の荷電が関係する可能性が示唆された。²⁾ また糖尿病患者では Alb の glycosylation がおこるため蛋白尿が生ずる可能性を指摘する報告もある³⁾。そこで Alb の電荷に IDM が影響するか否かを次の二つの方法で検索した。

方法

1. 人工 collagen 膜に対する Alb の透過性

図1の円筒の小孔のあいた底に0.45 μm の小孔をもつ Sartorius filter paper を置き、その上にウシ・アキレス腱 (Sigma) または仔ウシ皮膚 (北里大学形成外科吉里助教授により供与されたもの) の可溶性 collagen の溶液をのせ、注射筒で圧力を加え10分間加圧して水分を除去し collagen 層を作り、これを基底膜のモデルとした。上室にウシ Alb 溶液をのせ同様に2気圧の圧力を加え通過した Alb 量を Lowry で測定した。

2. 電気泳動法による移動度の変化

ラット頸動脈よりクエン酸採血した血液より血漿を分離し通常の方法で電気泳動装置 (アトー株式会社) を用いアセート膜上で泳動させ各分画を分離した。しかし buffer は通

常の veronal buffer (pH8.6) の代わりに phosphate buffer pH8.6 及び5.0 を用いた。泳動後、膜上の蛋白質はボンソー 3 R で染色し、デンストメーター (ヘレナ社) を用いて分画毎の面積比を求めた。phosphate buffer (pH5.0) で泳動すると図2のような分画に分かれたので各分画

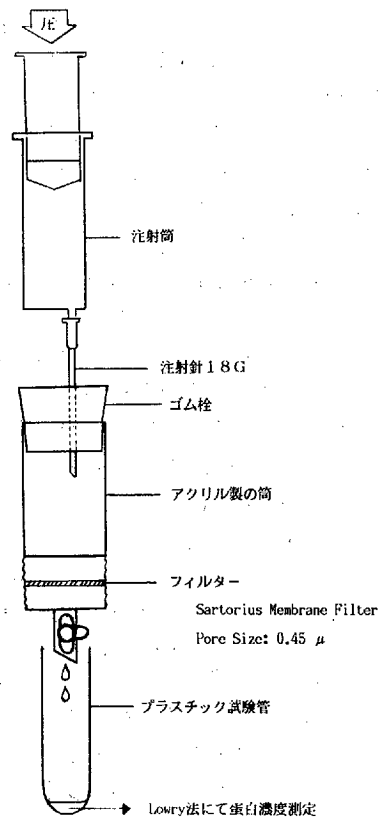


図1. 人工 collagen 膜に対する Alb の透過性を調べる実験装置

を移動度の早い方から a ~ e と名附けた。

蛋白尿 (118mg/dℓ) を有し血漿蛋白量 5.8 g/dℓ の IgA 腎炎患者 (38才、男) 及び健康人 (正常) の血漿を同様に phosphate buffer (pH5.0) で泳動すると図 3 のようになり、健康人血漿では a ~ c' の分画に分かれたが、腎炎患者では c' の分画が不明瞭で c として、まとめて面積比を計算した。

phosphate buffer pH 5.0

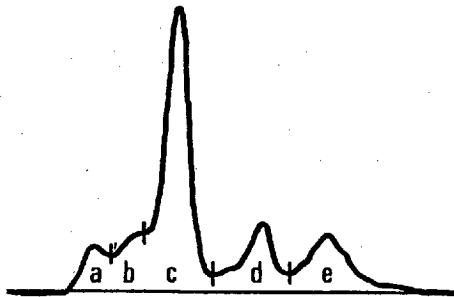


図 2. ラット血漿の電気泳動パターン

phosphate buffer pH 5.0

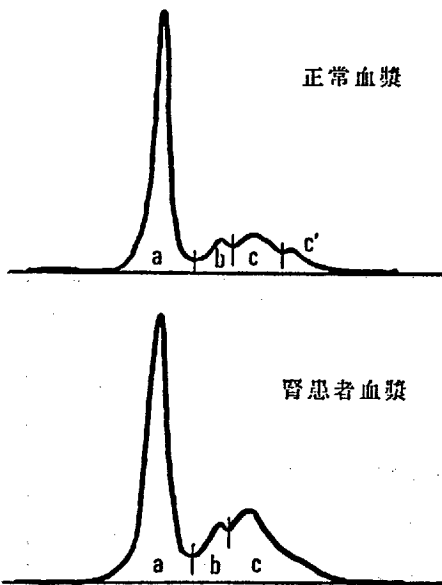


図 3. 健康人 (正常) 血漿及び IgA 腎炎患者血漿の電気泳動パターン

結果

1. 人工 collagen 膜に対する Alb の透過性

表 1 に示すようにウシ・アキレス腱 collagen で作成した人工膜の上室に saline を入れ加圧した後の漏出蛋白質量 (0.2mg/ml) に比べ、Alb を加えて 1 時間加圧した時は 30mg/ml と増量した。そこで予め collagen に IDM (28mM) を加えて同様の実験を行うと漏出蛋白質量は 30.5mg/ml と差がなかった。次に新鮮な仔ウシ皮膚 collagen (20mg) を用いて 2 時間加圧すると 4.20mg/ml の漏出があったが、予め IDM (28mM) を加えた Alb では 16.5mg/ml と却って増大した。後者は 60 時間加圧放置したので厳密な比較はなし得ないが、少なくとも抑制は認められなかった。collagen を 2.5mg と少量にして同様の実験を行ったが、結果はやはり同様であった。

2. 電気泳動法による移動度の変化

Alb に酸性、青色色素 pontamine sky blue (PS) を加え veronal buffer (pH8.6) で泳動するとこの PSB は原点に残るので、IDM も同様であると推測された。phosphate buffer (pH5.0) で泳動すると PSB は Alb (図 2 の c) と一致して

表 1. 人工 collagen 膜の Alb 透過性に対する IDM の効果

[1] 1K-signal 型 collagen

membrane solution	collagen	collagen + indomethacin
saline	0.20	1.10
albumin	30.0	30.5

(mg/ml)

[2] 0.5%-calf skin collagen

membrane solution	A (20mg)	B (2.5mg)
Tyrode	0.01	0.03
albumin	4.20 (56)	---
albumin + indomethacin	16.5 (59)	17.1

(mg/ml)

移動したのでこの条件で IDM を血漿に加えて移動度を検討した。ラット血漿に IDM 10^{-3} ~ 10^{-5} M を加えても各ピークの移動度は全く変わらず、各分画の面積比も全く同じであった(表 2)。

そこで蛋白尿を有する IgA 腎炎患者血漿に IDM 10^{-3} 、 10^{-4} M を加えて同様に泳動を行ったが、各分画の移動度は全く変わらず、面積比も不変であった(表 3)。プールした健常人血漿においても同様に不変であった(表 3)。AZA 10^{-3} 、 10^{-4} M を血漿に加えても腎炎患者でも健常人でも Tyrode 液を加えた対照と差がなかった。

考察

蛋白尿の改善に著しい効果があるとされる AZA はウシ精囊ミクロゾームの PGE₂ 生合成にはほとんど抑制を示さず、アラキドン酸による血小板凝集も 10mM までほとんど抑制しないことは、PG が蛋白尿発現に関与しないことを示唆する。ウサギに AZA を経口投与した後でも同様の結果が得られるので、吸収後に産出される AZA の代謝物による可能性も否定された¹⁾。90% 以上の AZA がヒト血

清に結合すること⁴⁾から血漿蛋白質の糸球体基底膜通過に Alb の電荷が関係し、AZA や IDM がその電荷を変化させることにより蛋白尿を改善する可能性が考えられた。事実糖尿病患者では、血糖値上昇により Alb が非酵素的に glycosylation を受け電荷が変化し、尿中 Alb も同様であることから蛋白尿をこれに求める報告もある³⁾。一方炎症巣ではメディエーターにより細静脈内皮細胞間に間隙が形成され、血漿蛋白質が滲出するが、カラゲニンのラット胸腔内注射により起した胸膜炎では、同じ分子半径をもつ FITC-dextran 40 (半径約 45 Å) に比し、Alb の方がより多く胸腔内に滲出する事実があり²⁾、基底膜通過に Alb の電荷が関与する可能性を示唆する。そこで予備実験として人工 collagen 膜を作り、IDM を collagen 膜あるいは Alb に加えて膜通過をみたが、IDM によりその通過が制限される傾向はなかった。また血漿蛋白質の電荷をより簡単に測定出来ると思われる電気泳動法を用いて移動度及び各分画の面積比より IDM の効果をみたが、ラット血漿では変化がみられなかった。さらに IgA 腎炎患者 1 例についても IDM ばかりでなく AZA についても試み

表 2. ラット血漿の各分画に対する IDM の 効果

phosphate buffer (pH5.0) による電気泳動の結果		(rat plasma) n=3 %				
		a	b	c	d	e
plasma		10.1±0.2	8.2±0.6	53.0±0.6	14.6±0.4	14.2±0.8
plasma + Tyrode		8.9±0.3	8.4±0.5	52.5±0.9	15.1±0.7	15.1±0.3
plasma + IDM.	10^{-5} M	9.7±0.3	7.8±0.8	52.2±0.4	14.5±0.2	14.4±0.9
	10^{-4} M	10.0±0.6	8.1±0.8	52.7±0.6	14.2±0.6	15.0±0.9
	10^{-3} M	9.3±0.2	7.9±1.2	53.9±0.5	14.5±0.5	14.5±0.6

IDM.: indomethacin

たが影響はみられなかった。本実験では予備実験ということもあり例数が少なく、早急に結論を出すことの危険性はあるが、少なくとも用いた方法では差を検出することは出来ず、今後例えば等電点電気泳動法など別な方法を用いる必要はあろう。

結論

1. 人工 collagen 膜で IDM (28mM) を collagen あるいは Alb に加えても Alb の透過性は変化しなかった。
2. phosphate buffer (pH5.0) を用いて血漿の電気泳動を行ったが、ラット、健常人、IgA

腎炎患者のいずれの血漿も IDM、AZA (10^{-3} 、 10^{-4} M) で影響されなかった。

文献

- (1) 鹿取信：厚生省心身障害研究小児慢性腎炎疾患の予防・管理・治療に関する研究、昭和60年度研究報告書、P. 11、1986。
- (2) 田中邦男：日胸疾会誌 17、452、1979。
- (3) G.M. Ghiggeri et al. : Kidney Int. 28,168, 1985。
- (4) U.J. Reller et al. : Arzneim-Forsch, 23, 660, 1973。

表3. 健常人(正常)及びIgA腎炎患者血漿の各分画に対するIDM、AZAの効果
(phosphate buffer (pH5.0)で電気泳動)。

<正常血漿> %

		a	b	c	c'
plasma		69.0	9.5	16.5	5.5
plasma + Tyrode		70.8	9.7	12.8	6.7
plasma + IDM.	10^{-4} M	68.9	9.3	14.5	7.3
	10^{-3} M	69.2	8.7	14.4	7.7
plasma + AZA.	10^{-4} M	69.6	8.8	14.4	7.7
	10^{-3} M	69.7	9.7	13.7	7.4

<腎患者血漿> %

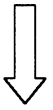
		a	b	c	
plasma		62.3	11.2	26.8	
plasma + Tyrode		62.3	11.9	25.8	
plasma + IDM.	10^{-4} M	62.3	11.3	26.5	
	10^{-3} M	62.0	12.0	26.2	
plasma + AZA.	10^{-4} M	62.4	11.8	25.8	
	10^{-3} M	62.0	11.8	26.4	

IDM.: indomethacin

AZA.: azapropazone



検索用テキスト OCR(光学的文字認識)ソフト使用
論文の一部ですが、認識率の関係で誤字が含まれる場合があります



結論

- 1.人工 collagen 膜で IDM(28mM)を collagen あるいは Alb に加えても Alb の透過性は変化しなかった。
- 2.phosphate buffer (pH5.0)を用いて血漿の電気泳動を行ったが、ラット、健常人、IgA 腎炎患者のいずれの血漿も IDM、AZA(10⁻³、10⁻⁴M)で影響されなかった。