Kobe University Repository : Kernel

PDF issue: 2024-04-28

Inhibition of mitogen-induced response of human peripheral blood mononuclear cells by bucillamine,a new antirheumatic sulfhydryl drug

赤松，俊浩

(Degree)
博士（医学）
(Date of Degree)
1993-12-31
(Resource Type)
doctoral thesis
(Report Number)
甲1242
(URL)
https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1001242

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。

〔26〕

氏名・（本籍）	赤松俊浩（あかまつとしひろ）　（岡山県）
博士の専攻分野の名称	博　士（医　学）
学位記番号	博い第872号
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位授与の日付	平成6年12月31日
学位論文題目	Inhibition of mitogen-induced response of human peripheral blood mononuclear cells by bucillamine, a new antirheumatic sulfhydryl drug　（ブシラミンの抗リウマチ作用の機序について－ＳＨ化合物の人末梢血単核球の増殖に対する抑制効果の検討－）
審査委員	主査　教授　水野耕作 教授　河野通雄　教授　尾原秀史

論文内容の要旨

緒　言

ブシラミン〔N-(2-mercapto-2-methylpropionyl)-L-cysteine〕はd-ペニシラミンと類似した構造を持つ新しい抗リウマチ薬である。D-ペニシラミンの抗リウマチ作用については-ＳＨ基に由来する機序が考えられており、銅イオンの存在下に過酸化水素の産生を介して種々の細胞の増殖を抑制する作用、ヘルパーＴ細胞の機能を抑制する作用、リウマトイド因子分解作用などが知られている。ブシラミンは分子内に二つの-ＳＨ基を有しd-ペニシラミンと類似した抗リウマチ作用の機序が考えられており、ラットのアジュバント関節炎の抑制、Ⅰ、ⅡおよびⅢ型アレルギー反応の抑制、マウスＴ細胞数のサプレッサー／ヘルパー比を調節する作用、マウス脾細胞のナチュラルキラー活性を増強する作用などが報告されている。筆者らはブシラミンの-ＳＨ基を介する機序を解析する目的で人末梢血単核球の増殖に対する抑制効果においてd-ペニシラミンとの差異を検討した。

材料および方法

ブシラミン（ＢＣ）、分子内の-ＳＨ基を-SS-結合で置換した酸化型ブシラミン〔(4R)-7,7-dimethyl-6-oxo-tetrahydro-3H-1,2,5-dithiazepine-4-carboxylic acid、BC-SS〕、d-ペニシラミン（ＤＰ）、および酸化型ｄ-ペニシラミン（d-penicillamine disulfide,DP-SS）により産生される過酸化水素の測定はスコポレチン（7-hydroxycoumarin）の酸化反応により測定した。ＢＣ、BC-ＳＳ、ＤＰ、DP-ＳＳ各々2mg/mlに、4μg/mlのスコポレチン、60units/mlのhorseradish peroxydaseを加え、37℃で反応させ、2μg/mlの銅イオン($CuSO_4$)を反応の途中で加え、励起光波長360nm、放射光波長460nmにおけるスコポレチンの蛍光強度の変化を蛍光光度計で測定した。人末梢血単核球（PBMCs）は、健常人静脈血をFicoll-Hypaque上で遠心分離し採取した。PBMCsはＲＰＭＩ1640に10％の仔牛血清（ＦＣＳ）と抗生物質と共に浮遊させた。Ｔリンパ球は、PBMCsをCOインキュベータ内で1時間処理しガラスディッシュに吸着させ、非吸着細胞を羊赤血球ロゼット法で分離しナイロンウールカラムに通し採取した。得られたＴリンパ球はFACSにて検証したところ

ＣＤ２が93％以上であった。マクロファージ（Ｍφ）は、ディッシュに吸着した細胞を機械的に擦過して採取し実験に供した。

まず１×10^5個のPBMCsを直径6.4mmのマイクロタイターウェル上で、10％のFCS、抗生物質を含む0.2 mlのRPMI 1640に浮遊させ、この培養液中に１μg/mlのphytohemagglutinin(PHA)、および２μg/mlの$CuSO_4$を種々の濃度のＢＣ、BC-ＳＳ、ＤＰ、またはDP-ＳＳとともに加え、CO_2インキュベーター内で72時間刺激した。培養終了18時間前に１μCi/wellのトリチウム標識チミジン(^{3}H-ＴｄＲ)を添加し、培養終了後cell harvesterで細胞を採取した。取り込まれた^{3}H-ＴｄＲの量を液体シンチレーションカウンターで測定し、ＰＢＭＣｓのＤＮＡ合成に対するＢＣ、ＤＰの影響を検討した。

ＢＣ、BC-SS、ＤＰ、またはDP-ＳＳによるＰＢＭＣｓの増殖抑制反応に対するカタラーゼの効果については、ＰＨＡで刺激したＰＢＭＣｓにＢＣ、BC-ＳＳ、ＤＰまたはDP-ＳＳを加え、$CuSO_4$の存在下または非存在下の条件で500 units/mlのカタラーゼを添加し細胞内に取り込まれた^{3}Ｈ-ＴｄＲの量を測定し検討した。

Ｍφの機能に対するＢＣの影響について以下の方法で検討した。Ｍφ１×10^5個／mlに種々の濃度のＢＣを添加し、１μｇ／mlの$CuSO_4$の存在下または非存在下に37℃で１時間前処置を行なった。その後洗浄し、前処置を施したＭφ１×10^4個／wellと、なんら前処置を加えなかったT-リンパ球９×10^4個／wellを混合してマイクロタイターウェルに播種し、ＰＨＡにより刺激し72時間培養した。培養終了前18時間の時点で、１μＣｉ／wellの^{3}Ｈ-ＴｄＲを加え取り込まれた^{3}Ｈ-ＴｄＲをＭφの存在下でのＴ-リンパ球の増殖反応の指標とした。

Ｔリンパ球、Ｍφに対するＢＣ、ＤＰの影響の差異について以下の方法で検討した。ＭφおよびＴリンパ球１×10^5個／mlを各々ＲＰＭＩ1640に浮遊させ100μｇ／mlのＢＣあるいはＤＰを加え、１μｇ／mlの$CuSO_4$の存在下または非存在下の条件で、37℃で１時間前処置を行なった。その後洗浄し、マイクロタイターウェルにこれら前処置を行なったＴリンパ球９×10^4個／wellと、前処置を行なったまたは行なわなかったＭφ１×10^4個／wellを混合して播種しＰＨＡにより刺激し72時間培養した。また前処置を行なわなかったＴリンパ球９×10^4個／wellに、前処置を行なったまたは行なわなかったＭφ１×10^4個／wellを混合しＰＨＡにより刺激し培養した。培養終了前18時間の時点で１μＣｉ／wellの^{3}Ｈ-ＴｄＲを加え、取り込まれた^{3}Ｈ-ＴｄＲの量を測定した。

結　果

ＢＣ、ＤＰは$CuSO_4$の添加によりスコポレチンの蛍光光度が減少し過酸化水素が産生されることが確認されたが、BC-ＳＳおよびDP-SSでは過酸化水素の産生は認められなかった。ＢＣは$CuSO_4$の存在下でＰＢＭＣｓの^{3}H-ＴｄＲの取込みを濃度依存性に抑制し、有意な抑制効果は10μｇ／mlの濃度で認められた。BC-ＳＳ、ＤＰでも同様の抑制効果を認めたがDP-SSではこの抑制効果はみられなかった。ＤＰのＰＢＭＣｓに対する抑制効果はカタラーゼを添加することによりコントロールレベルまでの回復がみられた。これに対しＢＣ、BC-ＳＳでも有意な回復がみられたがコントロールレベルまでは回復しなかった。さらに$CuSO_4$の非存在下におけるＢＣ、ＢＣ-ＳＳのＰＢＭＣｓの増殖反応に対する抑制効果は有意に認められ、しかもカタラーゼの添加ではこの抑制効果からの回復は認められなかった。

Ｍφを$CuSO_4$の存在下、非存在下に種々の濃度のＢＣで前処置し、何ら前処置を加えないＴリンパ球と混合して培養を行なった。その結果$CuSO_4$の存在下、非存在下共にＢＣによる前処置を行な

うことによりMφの存在下におけるTリンパ球の増殖反応は濃度依存性に抑制された。次にTリンパ球とMφを $CuSO_4$ の存在下、または非存在下にBC、およびDPで前処置を行ない、その後混合しPHAで刺激し培養したところ、BCで前処置した場合では、$CuSO_4$ の存在下でTリンパ球のみ前処置を行なった群、Mφのみ前処置を行なった群とも有意にTリンパ球のDNA合成阻害効果が認められ、$CuSO_4$ の非存在下に前処置を行なった場合にも有意な抑制効果が認められた。一方DPはTリンパ球を前処置した群で $CuSO_4$ の存在下でその増殖反応を有意に抑制し、TリンパMφの両者とも前処置した場合にも同様の抑制効果が見られた。しかし $CuSO_4$ の非存在下ではこの抑制効果が見られず、またMφのみを前処置した場合にも抑制効果は見られなかった。

考　察

慢性関節リウマチの炎症反応の過程には免疫担当細胞、滑膜細胞、綿維芽細胞、血管内皮細胞などの種々の細胞の関与が考えられており、これらの細胞の機能を抑制することで炎症反応を改善しうると考えられる。今回の実験ではBC、BC-SSとDPはPBMCsのDNA合成を10μg／ml（5×10^{-5}M）の濃度で有意に抑制した。ヒトに対し治療的投与量である300mgのBCを経口投与した場合の最高血中濃度は10^{-5}～10^{-6}Mであり関節軟骨などの組織ではさらに高い組織中濃度が得られる。このことよりBCの抗リウマチ作用の機序の一つとして関節組織中や血漿中におけるPBMCsのDNA合成の抑制効果が考えられる。

BCは $CuSO_4$ の非存在下でも過酸化水素を産生しこれは $CuSO_4$ を添加することにより増加した。BCとBC-SSは $CuSO_4$ の存在下、および非存在下でPBMCsのDNA合成を抑制した。またBCおよびBC-SSによる $CuSO_4$ の存在下でのPBMCsの増殖に対する抑制効果はカタラーゼを添加することにより有意な回復がみられたが、DPの場合ではコントロールレベルまでの回復がみられるのに対しBCとBC-SSでは部分的な回復であった。この結果より-SS-結合を持つ酸化型ではBC-SSとDP-SSに相違があり、分子内に-SS-基をもつBC-SSでは分子内で-SS-基から-SH基への変換が起こっている可能性があり、BCとBC-SSの過酸化水素産生作用がPBMCsの増殖に対する抑制効果の機序の一つであることが示された。

TリンパMφを $CuSO_4$ の存在下または非存在下にBCおよびDPで前処置を行ない、その後混合しPHAで刺激し培養したところ、BCで前処置した場合では、$CuSO_4$ の存在下および非存在下でTリンパ球のみ前処置を行なった群、Mφのみ前処置を行なった群とも有意にDNA合成阻害効果が認められた。これに対しDPはTリンパ球を $CuSO_4$ の存在下で前処置した群でのみその増殖反応を抑制した。この実験結果よりDPが過酸化水素を産生することによりTリンパ球の機能を抑制するのに対し、BCはTリンパ球およびMφ両者の機能を抑制する機序が存在すると考えられる。またMφは、Tリンパ球と異なり胞体内にカタラーゼを豊富に有していることより、BCのMφ機能を抑制する作用には過酸化水素の産生とは異なる機序が存在する可能性が示唆された。

結　語

BCは過酸化水素を産生する機序によりPBMCsの増殖に対する抑制作用を有している。そしてBCの抗リウマチ剤としての作用機序には、DPとは異なり、T-リンパ球のみでなくMφの機能も抑制する機序が存在する可能性が大きい。

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

ブシラミンはｄ－ペニシラミンと類似した構造を持つ新しい抗リウマチ薬である。Ｄ－ペニシラミンは－ＳＨ基に由来する機序が考えられており，銅イオンの存在下に過酸化水素の産生を介して，炎症細胞の増殖抑制，ヘルパーＴ細胞の機能の抑制ならびにリウマトイド因子の分解などの作用を発現し，慢性関節リウマチを治癒せしめようとするものである。ブシラミンはｄ－ペニシラミンと類似した抗リウマチ作用の機序が考えられているが，未だに不明な点が多い。本研究はブシラミンの－ＳＨ基を介する機序を解析する目的で人末梢血単核球を用いてその増殖抑制効果をｄ－ペニシラミンと比較し検討したものである。

材料ならびに方法：過酸化水素の産生はスコポレチンの酸化反応による蛍光強度の変化を蛍光光度計で測定した。単核球は人末梢静脈血を遠心分離して採取し，さらにこれよりＴリンパ球ならびにマクロファージを分離して実験に供した。単核球，Ｔリンパ球ならびにマクロファージをそれぞれ培養し，銅イオンの存在下，非存在下にブシラミンおよびｄ－ペニシラミンを加えてそのＤＮＡ合成に対する影響をトリチウム標識チミジンの取り込み量で測定した。なお，対照薬剤として，－ＳＨ基を－ＳＳ－基で置換した酸化型ブシラミンならびに酸化型ｄ－ペニシラミンを使用した。

結　果：銅イオンの存在下ではブシラミンやｄ－ペニシラミンでは過酸化水素の産生がみられたが，対照薬剤では産生されなかった。単核球に対しては，銅イオンの存在および非存在下でブシラミンと酸化型ブシラミンはＤＮＡ合成を抑制したが，ｄ－ペニシラミンによるＤＮＡ合成の抑制効果は銅イオンの存在下でのみ認められた。又、この効果は酸化型ｄ－ペニシラミンではみられなかった。Ｔリンパ球ならびにマクロファージに対しては，ブシラミンは銅イオンの存在の有無にかかわらず抑制効果を示したが，ｄ－ペニシラミンでは銅イオンの存在下でＴ－リンパ球に対してのみその機能を抑制する効果が認められた。

考　察：Ｄ－ペニシラミンでは過酸化水素の産生によるＴリンパ球の増殖抑制作用が主となっているのに対し，ブシラミンではＴリンパ球ならびにマクロファージの両者の機能を抑制することにより抗リウマチ作用を発現しており，さらに，これらの作用が濃度依存性であることことから，経口投与されたブシラミンが関節組織中に高濃度に蓄積され，単核球の増殖を上記機序により阻害することによって慢性関節リウマチの炎症抑制と鎮痛効果を示している可能性が大きいことが明らかになった。

本研究は慢性関節リウマチの治療薬剤のひとつであるブシラミンに対してその効果発現の機序を解析することを目的としたものであるが，いまだに不明な点の多い慢性関節リウマチの原因究明についても重要な知見を得たものとして価値ある集績であると認める。よって，本研究者は，博士（医学）の学位を得る資格があると認める。