

プロトポルフィリンの抗炎症作用 (I)

実験的肝硬変・肉芽腫・発痘におよぼす影響

金沢大学医学部第二病理学教室(主任: 石川大刀雄教授)

須山 忠 和
松 本 剛

(昭和39年7月20日受付)

ポルフィリン体の生体におよぼす影響を研究中、たまたま実験的肝炎ないし肝硬変動物にプロトポルフィリンを投与してその効果をしらべ、興味ある所見をつかんだ。ポルフィリンに関しては神前教授の一連の研究があるが、筆者らは実験的炎症に対する影響をコルチコステロイドとの対比において検索し、プロトポルフィリンの抗炎症作用がかなり著しいことを確認した。ここではそれらに関する基礎実験から得られた若干の知見について報告する。

実験材料および実験方法

1. 投与薬物:

プロトポルフィリン・ナトリウム塩(以下 NAPP と略記)は日本ブラッド・バンクより提供を受け、これを5%ブドウ糖に0.5~1%の割合に溶解し、滅菌後静脈内投与した。コルチコステロイドとしては市販のプレドニソロンを使用し筋肉内注射した。また対照としては NAPP の溶媒すなわち5%ブドウ糖のみを静脈内注射した。

2. 肝硬変に関する実験:

実験的肝硬変の作成は、卵黄感作をくり返す Campbell¹⁾の方法に従った。体重 200g 前後の Wister 系白色雄ラット60匹について、2週間の予備飼育後、エーテル麻痺下に左腎結紮を行なった。その約1週後より卵黄感作を開始し、1~2日おきに週3回、4~5週間感作を続けた。卵黄は新鮮鶏卵よりとり出し、1:1.5の割合に生理的食塩水で稀釈し、無菌的にガーゼで濾過したものをを用いた。投与量は 20ml/kg とし、尾静脈より注射した。

これらのラットは予め10匹ずつ6群に分け、5%ブドウ糖、NAPP およびプレドニソロンをそれぞれ週3回、表1のように投与した。すなわち、

表1 肝硬変実験に対する薬物投与方法

群	投与薬物	処置							
		腎結紮				卵黄感作開始			
		1W	2W	3W	4W	5W	6W	7W	8W
1	5%ブドウ糖		△△△	△△△	△△△	△△△	△△△	△△△	△△△
2	NAPP 1mg/kg		●●●	●●●	●●●	●●●	●●●	●●●	●●●
3	NAPP 2.5mg/kg		●●●	●●●	●●●	●●●	●●●	●●●	●●●
4	NAPP 2.5mg/kg				●●●	●●●	●●●	●●●	●●●
5	NAPP 2.5mg/kg				○●○	○●○	○●○	○●○	○●○
6	プレドニソロン 2mg/kg				▲▲▲	▲▲▲	▲▲▲	▲▲▲	▲▲▲

○ 卵黄投与
● NAPP 投与
▲ プレドニソロン投与
△ ブドウ糖投与

第1群・5%ブドウ糖投与(対照)

第2群・NAPP 1mg/kg/日 を週3回1~2日おきに連続静注。投与は卵黄感作開始の2週前よりはじめ総計19回にいたる。

第3群・NAPP 2.5mg/kg/日 を週3回1~2日おきに連続静注。投与は卵黄感作開始の2週前よりはじめ総計19回にいたる。

第4群・NAPP 2.5mg/kg/日 を週3回1~2日おきに連続静注。投与は卵黄感作開始と同時にはじめ総計13回にいたる。

第5群・NAPP 2.5mg/kg/日 を週3回1~2日おきに連続静注。投与は卵黄感作開始2週後よりはじめ総計7回にいたる。

第6群・プレドニソロン 2mg/kg/日 を週3回1日おきに連続静注。投与は卵黄感作開始と同時にはじめ総計13回にいたる。

Anti-inflammatory Effects of Protoporphyrin (I)—Effects on Experimental Cirrhosis of the Liver, Granuloma, and Eruptibility of Small-Pox Vaccine. **Tadakazu Suyama & Tsuyoshi Matsumoto**, Department of Pathology (Director: Prof. T. Ishikawa), School of Medicine, Kanazawa University.

以上各群は卵黄感開始後、3週および4週目にエーテル麻酔下で心臓穿刺によつて失血死に至らしめ、肝の肉眼的、組織学的検索および肝組織プラスミン活性の測定を行ない、NAPPの効果を判定した。

なお、プラスミン活性の測定は広島ら²⁾の方法に従い、新鮮肝0.5gを細砕して10等分し、Astrupら³⁾のフィブリン平板法により、その溶解積をもつて示した。

3. 抗炎症作用に関する実験:

ホルマリン濾紙法 (FFP 法)⁵⁾ による炎症性肉芽腫と痘瘡ワクチンによる発疹とを実験的炎症の代表としてえらび、これらに対するNAPPの効果について検討した。

i) 肉芽腫抑制実験: Meierら⁴⁾の肉芽腫試験と同一の原理に基づくTanakaら⁵⁾のFFP法に準じて行なつた。すなわち、体重約180gのドンリウ・ラッデ80匹を用い、各ラッテの両側胸部皮下に、7%ホルマリン0.4mlを浸した濾紙円板(直径10mm, 東洋濾紙No. 126)を1個ずつ埋没し、懸濁プロカイン・ペニシリンG 10,000IUを注射、縫合した。以上の操作は無菌的に行なつた。

濾紙埋没の日より、NAPP、プレドニソロンおよび5%ブドウ糖をそれぞれ1週間毎日投与した。投与量はNAPP・0.5, 1.0, 2.5, 5mg/kg/日の各群、プレドニソロン・0.5, 1.0, 2.0mg/kg/日の各群とした。

1週後に埋没濾紙をとり囲んで生ずる肉芽腫を剔出し、その湿重量および組織所見をしらべた。

ii) 発疹抑制実験: 痘瘡ワクチンの発疹力を薬物が阻止する程度をもつて抗炎症作用の示標とした。ワクチンは生ワクチニア・ウィルスより製した市販品(北里研究所製)を使用し、発疹力試験はGroth法⁶⁾に準じて行なつた。すなわち、約2kgの白色の家兎40匹の背部の毛を注意深くかつた後、それぞれワクチンの 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , および 10^{-7} 稀釈液各0.2mlずつを、頭部の方に最高稀釈液を配するようにし、2.2cmの間隔をおいて皮内に注射した。これら家兎を5群に分け、ワクチン接種の日より、薬物を10日間連日投与し、5%ブドウ糖投与群との間の発疹力を比較観察した。投与量はNAPP・1.0, 2.5, 5.0mg/kg/日およびプレドニソロン2.0mg/kg/日の各群とした。ワクチンの 10^{-6} 稀釈の接種によつて、硬結をともなつた直径8mm以上の丘疹が発生した場合を発疹陽性とした。

4. 50%致死量 (LD₅₀):

マウス、ラッテ、モルモットを使用し、それぞれに100mg/kg~500mg/kg, NAPPの階段稀釈液を1回静

注を行なつた。プレドニソロンは50~200mg/kgの階段稀釈液を1回筋注を行なつた。2週後の動物死亡数よりBlissのプロビット図解法⁷⁾からLD₅₀を求めた。

実験結果

1. 肝硬変におよぼす影響:

腎基結紮後、卵黄感作を続け、5%ブドウ糖のみを投与した第1群(対照)では、卵黄感作開始後3週でほとんど全例において肝表面は微細顆粒状となり、プラスミン活性は、平均861mm²を示した。4~5週で肝は淡褐色、表面微細顆粒状、硬度増加したが、プラスミン活性は平均942mm²であつた。

組織学的検索において、肝小葉周辺帯に細胞浸潤を伴う小壊死巣がかなり多く、小葉間結合織の増生が著明で、索状の間質が小葉を区切り、大小不同の小葉を形成している。グリソン氏鞘には結合織の増生、細胆管の増生傾向が認められ、形質細胞や好酸球等の浸潤が強い。肝細胞は核の大小不同、核分裂像が認められ、細胞質は粗大顆粒状化して空虚になるが、またしばしば好酸性化・濃染したものが出現する(写真1, 2)。

NAPP投与群の中、2.5mg/kgを卵黄感作2週前より投与した第3群および卵黄感作開始と同時に2.5mg/kgを投与開始した第4群とでは、肝は殆んど全例において暗褐色、表面平滑で、硬度の増加は認められず、プロトポルフィリンとり込みによる色調の変化以外は正常肝と大差がなかつた(写真3, 5)。

組織学的には、肝細胞質の粗大顆粒状化、Kupffer細胞の軽度肥大とNAPPのとり込みが見られる以外、炎症性細胞浸潤は殆んど見られず、小葉間質、グリソン氏鞘に著変は認められなかつた(写真4, 6)。

肝組織プラスミン活性は3週目には0~160, 78mm²平均を示し、4~5週で平均561mm²を示した。

卵黄感作後2週よりNAPP 2.5mg/kg投与を開始した第5群では、肝は暗赤色で、表面はわずかに粒状であり(写真7)、硬度の増加はわずかに認められた。

組織学的には小葉間結合織が索状にのびて、小葉を区分している。グリソン氏鞘には細胞浸潤が若干見られる。肝細胞は細胞質が軽度に粗大顆粒状化し、核の肥大がわずかに見られる。Kupffer細胞はNAPPをとり込んでいる。炎症性細胞浸潤は殆んど認められない(写真8)。

プラスミン活性は3週で平均245mm²、4~5週で626mm²であつた。

プレドニソロン投与の第6群では途中で死亡するも

表 2 薬物投与後の肝所見
(-), (±), (÷), (+), (++) の順に強くなる。

群	投与薬物	肉眼所見	組織学的所見					肝組織プラスミン活性 平均値 (mm ²)		
			肝細胞所見	小葉死巣	小葉間結合織生	グリソン氏鞘		3週	4~5週	
						結合織生	細胞浸潤			
1	対照 (5%ブドウ糖)	淡褐色, 表面微細顆粒状, 硬度増加	細胞質粗大顆粒化, 核不同, 核分裂像, 好酸性細胞散在	÷	++	+	+~++	±~÷	861	942
2	NAPP 1mg/kg (卵黄注前2Wより)	赤褐色, 表面やや顆粒状, 硬度やや増加	細胞質粗大顆粒化	-	+~++	+	+	±	688	821
3	NAPP 2.5mg/kg (卵黄注前2Wより)	暗赤褐色, 表面平滑	同上	-	-	-	±~÷	-	0	389
4	NAPP 2.5mg/kg (卵黄注と同時に)	同上	同上	-	±	±	±~÷	-	78	561
5	NAPP 2.5mg/kg (卵黄注後2Wより)	赤褐色, 表面わずかに粒状	同上	-	+	±~÷	÷~+	±	245	626
6	プレドニソロン 2mg/kg (卵黄と同時に)	淡褐色, 表面平滑	細胞質粗大顆粒化高度, 核不同	-	±	-	÷~+	-	42	86

のがかなりあり, 第5週には10匹中3匹が生き残つた。肝は淡褐色, 表面平滑(写真9), 硬度の増加は見られない。

組織学的には, うつ血の像があり, 結合織の増生傾向は認められず, グリソン氏鞘はわずかに細胞浸潤が認められる程度であつた。

しかし肝細胞は微細空胞形成が高度で, 細胞質は粗大顆粒状化して空虚となり, 細胞核は大小不同であつた(写真10)。

プラスミン活性は3週目 42mm², 4~5週目で 86mm² であつた。

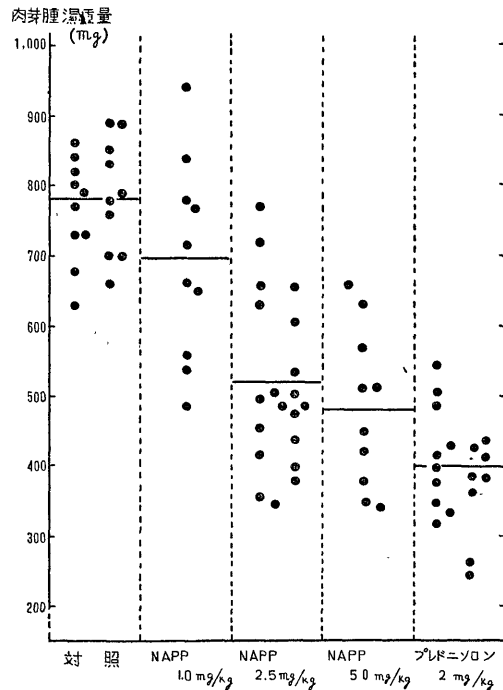
以上の結果ををまとめて表2に示す。

2. 実験的肉芽腫におよぼす影響:

i) 肉芽腫の大きさ: 埋没濾紙をとり囲んで生ずる肉芽腫の剔出後の大きさは写真11に示す如くで, NAPP 1mg/kg 投与群では対照に比し著明な差は認め難いが, 2.5mg/kg 投与群においてはその大きさは対照に比して明らかに小さかつた。

ii) 肉芽腫の湿重量: 剔出肉芽腫の湿重量を比較すると図1に示すように, NAPP 2.5mg/kg および 5mg/kg 投与群においては, 平均重量はそれぞれ 519mg および 482mg で, 対照の平均 778mg に比し明らかに低い値を示した。なお雌雄の差は認められなかつた。プレドニソロン投与群においては体重の減少が

図1 肉芽腫抑制実験 (FFP 法)

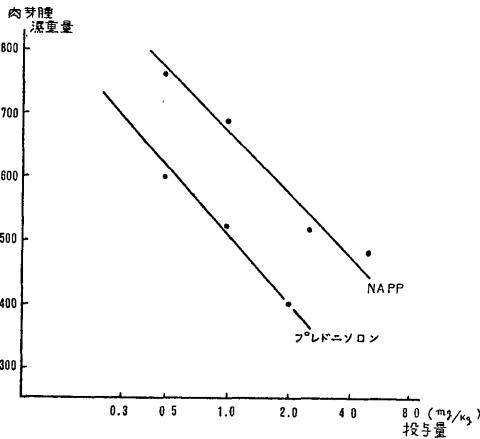


各カラムの横線は平均値を示す。

全例にわたつて見られた。

iii) “抗炎症指数” (毒性と効果との関係): 同一の response (肉芽腫湿重量) を与える薬物の投与量を M とし, LD_{50} との比 $=LD_{50}/M$ をかりに抗炎症指数 i とすれば, NAPP の抗炎症効果はプレドニソロンと比較して相対的に表現し得るであろう。いま肉芽腫湿重量と NAPP, プレドニソロン投与量との関係を比較すれば図 2 のようでありプレドニソロンの M を 1 とす

図 2 Dose-Response Relationship



Dose-response regression lines of NAPP and Prednisolone

表 3 NAPP, プレドニソロンの LD_{50}

薬物	動物	マウス	ラット	モルモット
NAPP		347.3	240.3	240.0
プレドニソロン		76.0	106.0	—

- 単位は mg/kg Body Weight
- 薬物 1 回投与後 2 週目の動物死亡数より Bliss のプロビット図解法から求めた。
- NAPP は静注, プレドニソロンは筋注。

れば NAPP のそれはほぼ 3 となる。一方毒性実験より両者の LD_{50} を求めた結果は表 3 に示す通りで, ラットのそれは NAPP 240.3mg/kg, プレドニソロン 106.0mg/kg である。これらからそれぞれの “抗炎症指数” を求めれば,

$$i_{NAPP}=80.1, i_{Pred.}=106.0$$

となり, プレドニソロンとの対比において NAPP の相対指数を求めれば,

$$i_{NAPP}/i_{Pred.}=0.76$$

となる。

iv) 組織所見: 対照群では中心部の濾紙層週辺に多

数の多核白血球, リンパ球を主とする細胞浸潤が見られ, 膿瘍状となつている。それをとりまいて滲出性変化を示す層があり, 漿液の滲出, フィブリンの析出および若干の細胞浸潤が見られる。さらにその外側には幅広く厚い肉芽層が見られるが, 結合織線維の配列は粗で, 方向はいり乱れている (写真12)。NAPP 1mg/kg 投与群においてもほぼ同様の所見を認め得る。NAPP 2.5 mg/kg および 5 mg/kg 投与群では中心部濾紙周辺の炎症像はやや弱く, その周辺の滲出性変化は乏しいか, または認められない。形成された肉芽層は幅狭く, 結合織線維は密で層状に並んでいる (写真13)。プレドニソロン投与群においてもほぼ同様の所見が見られる (写真14)。

以上の組織学的所見を総括すれば, NAPP は肉芽層を緻密にし, 滲出性変化を抑制するものといひ得よう。

3. 痘瘡ワクチンによる発痘におよぼす影響:

ワクチン接種後 4~9 日の観察結果は, 表 4 のよう

表 4 痘瘡ワクチンによる発痘におよぼす影響

投与薬物	ワクチン接種後の日数					
	4	5	6	7	8	9
5%ブドウ糖(対照)	3	4	4	4	4	4
NAPP 1mg/kg	1	2	5	3	3	3
NAPP 2.5mg/kg	1	3	4	4	2	1
NAPP 5mg/kg	0	0	0	0	0	1
プレドニソロン 2mg/kg	0	0	0	0	0	1

- 100万倍 (10^{-6}) 稀釈のワクチンを 1 群 8 匹の家兎に接種し, その中発痘陽性の家兎の匹数を数字で示した。
- 直径 8mm 以上の硬結を伴う丘疹の発生をもつて発痘陽性とした。

で, 1 群 8 匹の家兎中, 発痘 “陽性” となつた家兎数を示してある。NAPP 2.5mg/kg ではやや発痘を抑制するが, 5mg/kg 投与では殆んど “陰性” であつた。

総 括

片腎結紮後, 卵黄感作をくり返して肝硬変をおこさせたラットに, NAPP を投与してその効果を検討し, 肝肉眼所見および組織学的所見から, NAPP が肝硬変の抑制効果において, かなりすぐれた結果を示すことがわかつた。肝線維化の示標としての肝組織プラスミン活性値は組織学的所見とは必ずしも一致しなかつたが, NAPP 大量投与群は, 少量投与群ないし無投与群に比して平均値が多少, 少ない傾向を示した。

NAPP の投与量および投与方法において, 2.5mg/

kg を卵黄感作開始 2 週前より、週 3 回ずつ計 19 回連続投与した群が最もすぐれた肝硬変抑制効果を示し、ついで 2.5mg/kg を卵黄感作と同時に投与開始して計 13 回連続投与した群が、ほぼ同じ程度の抑制効果を示した。2.5mg/kg を卵黄感作開始 2 週後より投与開始して計 7 回連続投与した群は、投与総量が他の群に比べて少なかったのであるが、それでも肝線維化ないし肝硬変を多少抑制していた。

プレドニソロン 2 mg/kg 投与群では肝硬変抑制効果は著明であつたが、肝細胞の変性像がかなり強く認められ、実験途中でラットの死亡するものが見られた。

卵黄感作による肝硬変抑制効果の観察から、一般に炎症に対する NAPP の影響を検討するための基礎実験をこころみた。実験的炎症としては、ラットを用いてのホルマリン濾紙法による肉芽腫と、家兎を用いての痘瘡ワクチンによる発痘とをその代表として選び、これらに対する NAPP の影響について観察、プレドニソロンの効果と比較した。

肉芽腫実験の結果は、NAPP 投与群では剔出した肉芽腫の大きさ、湿重量および組織所見において対照に比し明らかに抑制効果を認め、抗炎症作用の著しいことを示し得た。投与量では 1mg/kg では効果はさほど著しくなく、2.5mg/kg~5mg/kg 投与で著明であつた。プレドニソロン投与群では同様に著明な抗炎症作用を観察し得たが、ラットの体重減少が認められ、投与量により途中で死亡するものも見られた。

この肉芽腫に対する抗炎症効果を薬物の Dose-response regression lines より相対力価として求めれば、NAPP はプレドニソロンの 1/3 となる。しかし投与物質の LD₅₀ を考慮した“抗炎症指数”を指標として相対指数を求めれば、NAPP はプレドニソロンの

約 3/4 となる。

痘瘡ワクチンの発痘も同様に NAPP 投与によつて抑制されている。すなわち 10⁻⁶ 稀釈ワクチンの発痘は NAPP 5mg/kg の投与においてプレドニソロン 2mg/kg 投与と匹敵すべき効果を認めた。

さらに NAPP のアレルギー性炎症に対する影響をも含めての抗体産生抑制効果との関連性は現在追求中である。

結 論

プロトポルフィリン・ナトリウム塩 (NAPP) の投与によつて、実験的ラット肝硬変が強く抑制されることを肉眼的および組織学的検索により確かめた。

また、実験的肉芽腫および痘瘡ワクチンによる家兎の発痘に対する NAPP の効果を検索して、その抗炎症作用を明らかにし得た。

終りに御指導を頂いた石川大刀雄教授および倉田自章助教授に感謝致します。

文 献

- 1) Campbell, J. A. H. : Brit. J. Exp. Path. 42, 209 (1961).
- 2) 広島義勉 : 大阪市大医誌, 12, 81 (1963).
- 3) Astrup, T. & Müllertz, S. : Arch. Biochem. Biophys., 40, 346 (1952).
- 4) Meier, R., Schuler, W. & Desaulles, P. : Experientia, 6, 469 (1950).
- 5) Tanaka, A., Kobayashi, F. & Miyake, T. : Endocrinol. Jap., 7, 357 (1960).
- 6) 厚生省 : 生物学的製剤基準, p. 6 (1963).
- 7) Bliss, C. I. : Statistics of Bioassay, Academic Press (1953).

Abstract

Experimental cirrhosis of the liver in rats were inhibited or improved with intravenously administered protoporphyrin. This was examined at autopsy and histologically.

The inhibitory effect of protoporphyrin on inflammation was found by means of the granuloma inhibition test in rats (Formalin filterpaper pelet method). This anti-inflammatory effect was also confirmed by suppression of exanthem of small-pox vaccine in rabbits.

写真 1

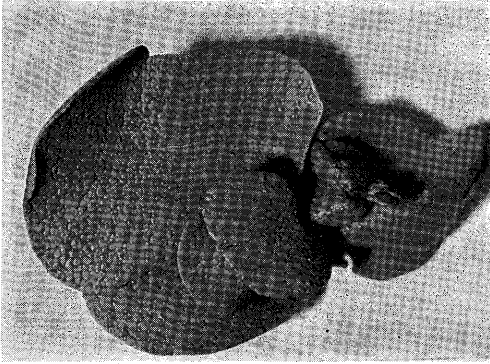
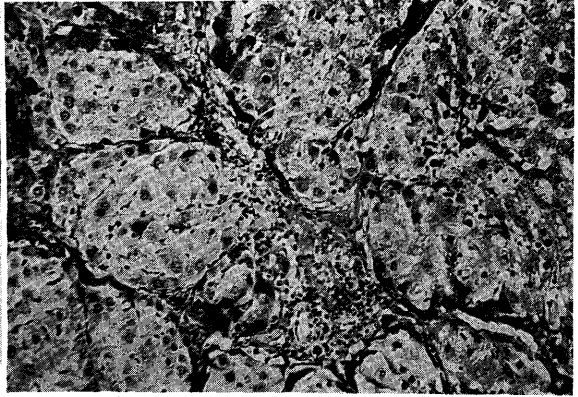


写真 2



第1群: 5%ブドウ糖投与 (Positive control)

写真 3

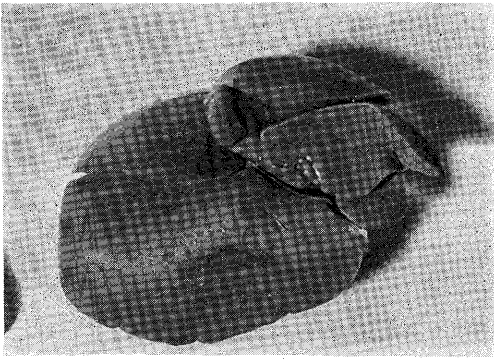
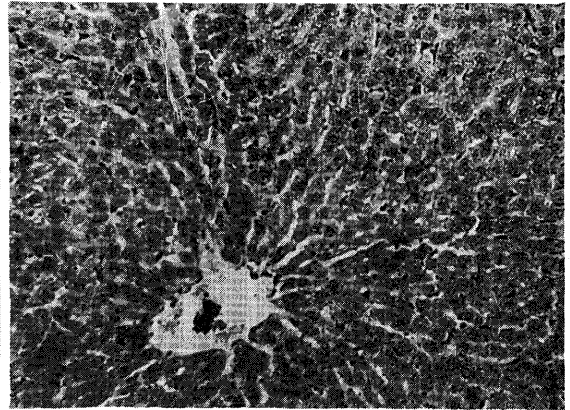


写真 4



第3群: NAPP 2.5mg/kg/日を週3回1~2日おきに連続静注. 投与は卵黄感作開始の2週間よりはじめ総計19回にいたる.

写真 5

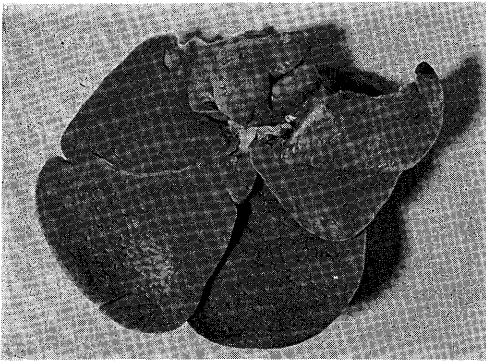
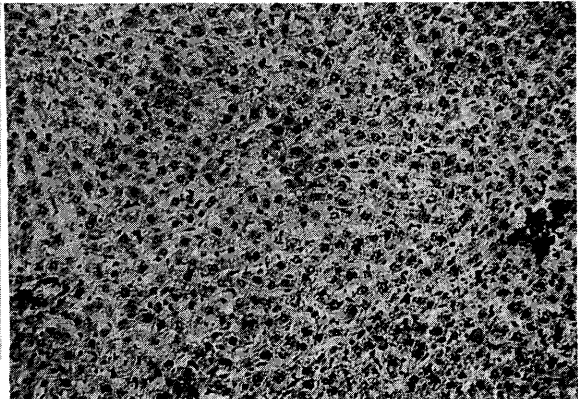


写真 6



第4群: NAPP 2.5mg/kg/日を週3回1~2日おきに連続静注. 投与は卵黄感作開始と同時にはじめ総計13回にいたる.

写真 7

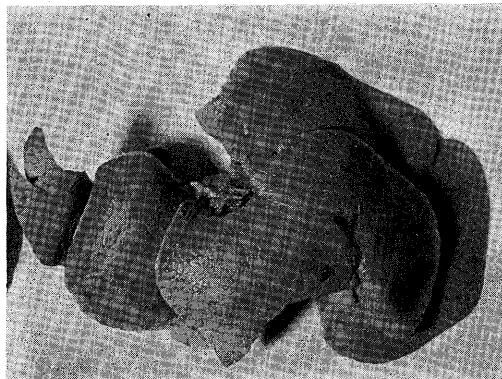
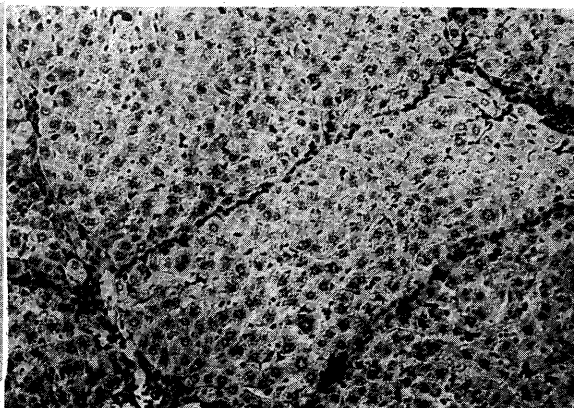


写真 8



第5群: NAPP 2.5mg/kg/日を週3回1~2日おきに連続静注. 投与は卵黄感作開始2週後よりはじめ総計7回にいたる.

写真 9

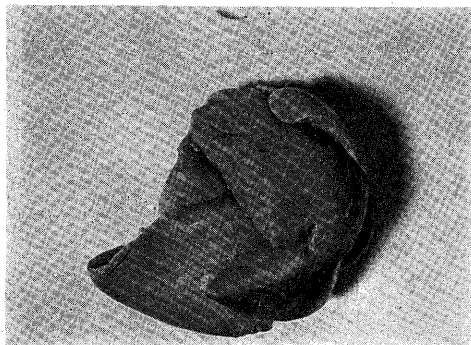
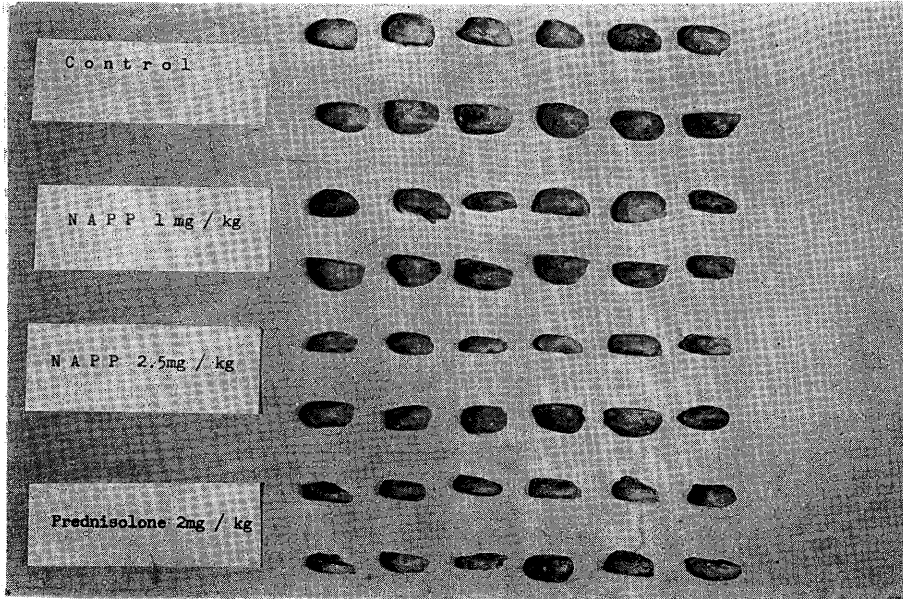


写真 10



第6群: プレトニソロン 2mg/kg/日を週3回1日おきに連続筋注. 投与は卵黄感作開始と同時にはじめ総計13回にいたる.

写真11: 剔出肉芽腫の大きさ比較



剔出肉芽腫の組織像

写真12: 対照

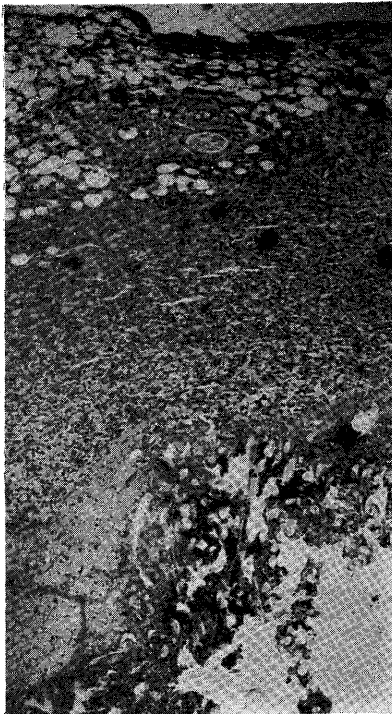


写真13: NAPP 2.5mg/kg 投与

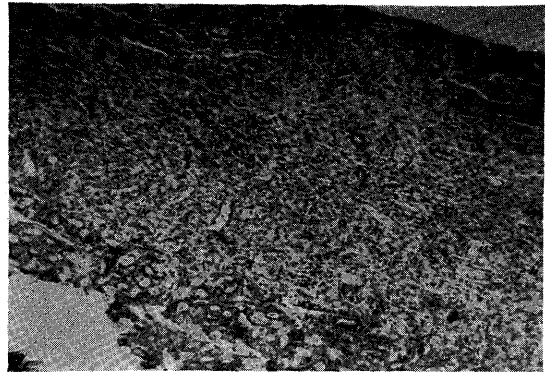


写真14: プレドニソロン 2mg/kg 投与

