

Prozime-10 (P-10) の抗炎症作用について

第 1 報

実験的犬歯肉炎に対する P-10 の抗炎症効果

岡山大学歯学部口腔外科学第 1 講座（主任：西嶋克巳教授）

牧 一 雄

（昭和58年 8 月30日受稿）

Key words：歯肉炎，犬
蛋白分解酵素，抗炎症効果
P-10

緒 言

Innerfield ら¹⁾が血栓性静脈炎に使用した trypsin に抗炎症効果を認めて以来，trypsin 以外にも α -chymotrypsin, bromelain²⁾その他の protease, streptokinase³⁾にも抗炎症効果が認められている。しかし，その作用機序には諸説があり明確でない。

伊藤ら⁴⁾は，有田 protease 産生菌の研究中に，*Aspergillus melleus* の一株が強力な protease 産生能を有することを見出した。その *Aspergillus melleus* より抽出された蛋白分解酵素である Prozime-10 (P-10) は，静脈内投与および経口投与で抗炎症効果を発揮することは既に報告されている⁵⁾。

従来，非ステロイド性抗炎症剤や，蛋白分解酵素製剤の抗炎症作用の検定には，副腎摘出動物がしばしば使用されており，副腎が関与しないことを示した成績が発表されている^{6,7)}。しかし，生体内の最も強力な抗炎症性物質である副腎皮質 steroid が，蛋白分解酵素製剤の適用後に，いかに変動するのかについての研究は全く等閑に付されたまま現在に至っている。このような観点から，副腎を摘出していない正常動物に蛋白分解酵素製剤の P-10 を投与し，その抗炎症効果や抗炎症機序の解明を目的として，一連の実験を行った。

蛋白分解酵素製剤は，現在口腔外科領域にお

いても消炎の目的で繁用されているが，その抗炎症効果を動物実験で確認された報告は見当たらない。口腔における代表的な炎症性疾患である歯肉炎を犬に惹起し，蛋白分解酵素製剤の経口投与が果して実験的歯肉炎に対して治癒的效果を発揮しうるか否かを確認する目的で本実験を行った。

実験方法および材料

1) 実験的歯肉炎の作成

Beagle の成犬（体重8—12kg）を pentobarbital-Na (30mg/kg) の静注により麻酔し，上顎の両側第 1 後臼歯の歯頸部 under cut 周囲を waxed silk (Johnson's DENTAL FLOSS, 1800 IN) で固く結紮し，自由に食餌の摂取や，飲水ができる状態で 1 週間放置し，歯肉炎を誘発させた。1 週間後，第 1 後臼歯付近の歯肉の炎症症状を撮影記録して，歯肉囊よりの浸出液量を測定し，歯肉厚の測定および歯肉切片の組織学的観察を行った。水は水道水を自由に摂取させ，犬は，室温 $25 \pm 1^\circ\text{C}$ ，湿度 60% の恒温，恒湿環境で飼育し，飼料には犬用飼料（オリエンタル酵母，DS）を 1 日 1 回 200g 与えた。

2) 浸出液重量の測定

予め充分乾燥させた幅 5 mm の濾紙（東洋濾紙 No. 2）を buccal side の歯肉囊内に挿入して歯肉付着部まで到達させ，3 分間吸収させた後，直ちに重量測定を行った。

3) 歯肉厚の測定

buccal side の歯肉を歯肉付着部より縦方向(深さ)へ2mm, 幅(近遠心方向)7mmにわたって切除した。その後、剔出した歯肉を2枚のスライドグラスにはさみ、全体の厚さをノギスで計測し、予め測定しておいたスライドグラスの厚さを差引いた値を歯肉厚とした。また、対照の歯肉厚として、炎症をおこした歯肉の直前に位置する第4前臼歯の歯肉を同様に剔出し、計測した。

4) 組織標本の作製

歯肉厚を計測した後の歯肉を10%ホルマリン液(PH 7.4)で固定し、脱水、脱脂を行った後パラフィン包埋をし、ミクロトームで4 μ mに薄切した後、hematoxylin-eosin で二重染色した。

5) 薬物投与

P-10 は、0.2—0.5%になるように生理食塩液に溶解して静脈内に投与したり、あるいは腸溶カプセル(信越化学製)に粉末のまゝ充填し、更に硫酸バリウムを添加して比重1.2になる様に調整したものを経口投与した。indomethacin は、P-10 と同様に腸溶カプセルに充填して経口投与したり、または皮下注射した。各用量ごとに、1群5匹の beagle 犬を使用した。

投与期間は、歯頸部結紮の1週間後に炎症症状の発現を確認した後、静注および皮下注の場合は1日1回、経口投与では1日2回(朝、夕)に1週間連続して投与した。

薬物の効果判定は、Student's t 検定法により行い、危険率5%以下のものを有効と判定した。

6) 使用薬物

実験に使用した薬物のうち indomethacin の純末は山之内製薬より、P-10 の精製粉末はミナト製薬より提供されたものを使用した。pentobarbital-Na は大日本製薬より購入したものを使用し、その他の試薬についてはいずれも市販の特級試薬を使用した。

実 験 結 果

1) 実験的歯肉炎の発症

両側の第1後臼歯の歯頸部周囲を waxed silk で結紮した1週間後の局所歯肉は、結紮前(写

写真1

a

b

c

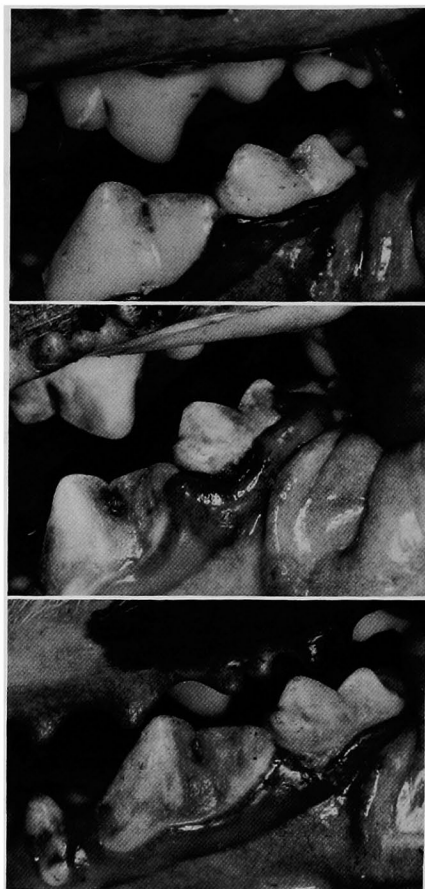


写真1. waxed silk を結紮した部位の歯肉腫脹(×3)

a: 対照 b: 結紮後7日目

c: 賦形剤単独投与群

真1—4(a))と比較して著明な発赤及び腫脹が観察された(写真1—4(b)). buccal side の歯肉囊の浸出液重量は、対照時 $1.28 \pm 0.2\text{mg}$ であったが、1週間後には $3.4 \pm 0.5\text{mg}$ に増加した($P < 0.01$) (図1). また、歯肉の厚さは対照時 $0.8 \pm 0.01\text{mm}$ であったものが、 $1.1 \pm 0.02\text{mm}$ と有意に増大した($P < 0.05$) (図1).

1週間後に切除した歯肉の組織像は、写真5(b)に示してある。waxed silk の結紮面より離れた外縁上皮層では少数の小円形細胞の浸潤を認めるのみで殆んど異常所見は認められなかった。しかし、結紮糸の存在する内縁上皮層では結紮部位に接近するにつれて個々の細胞腫大が著明になり、円形浸潤細胞の数も増加した。

写真2

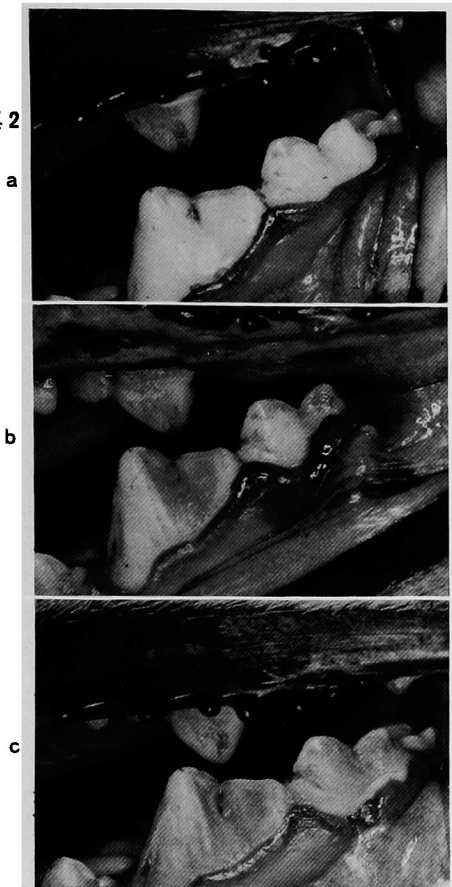


写真2. P-10 12.5mg/kg (p.o.) 投与の
抗炎症効果 (×3)
a: 対照 b: 結紮後7日目
c: P-10 12.5mg/kg (p.o.) 7日間投与群

写真3



写真3. Indomethacin 1.25mg/kg (p.o.) 投与の
抗炎症効果 (×3)
a: 対照 b: 結紮後7日目
c: Indomethacin 1.25mg/kg (p.o.)
7日間投与群

顕著な病変を示したのは、絹糸に接触する粘膜固有層で、小円形細胞、好中球の混存する浸潤細胞の集団が肉芽組織を形成しているのが観察された。浸潤した細胞間には、浮腫も認められた。結紮糸より離れた固有層で、しかも肉芽組織に近接した部位には細静脈の著明な拡張が観察され、細胞間隙も開裂して浮腫が認められた。

2) P-10 および indomethacin 投与による炎症治癒効果

歯頸部結紮の1週後に局所の発赤及び腫張を確認した後、P-10 (12.5mg/kg, 25mg/kg) および indomethacin (1.25mg/kg) を1日2回、1週間経口投与した。対照として賦形剤である硫酸バリウムのみを経口投与した群では、写真

1に示したように (b) の結紮7日目の局所の症状と賦形剤投与後 (c) との間の症状にはほとんど差がなく、結紮14日後でも発赤、腫張などの炎症症状が持続していた。P-10 の12.5mg/kg投与群では、写真2 (c) のように7日目の炎症症状 (b) と比較して明らかに14日目では炎症症状が消退し、腫張は対照時 (a) とほとんど同じ程度にまで回復している。P-10 が著明な抗炎症効果を発揮していることがわかる。写真3は、indomethacin 投与群の歯肉像を示している。(c) に明らかな如く、歯肉底部では腫張はほぼ完治しているが、歯肉縁にはなお発赤および腫張が認められている。indomethacin も歯肉炎に対し治癒傾向を示している。しかし、この用量

写真4

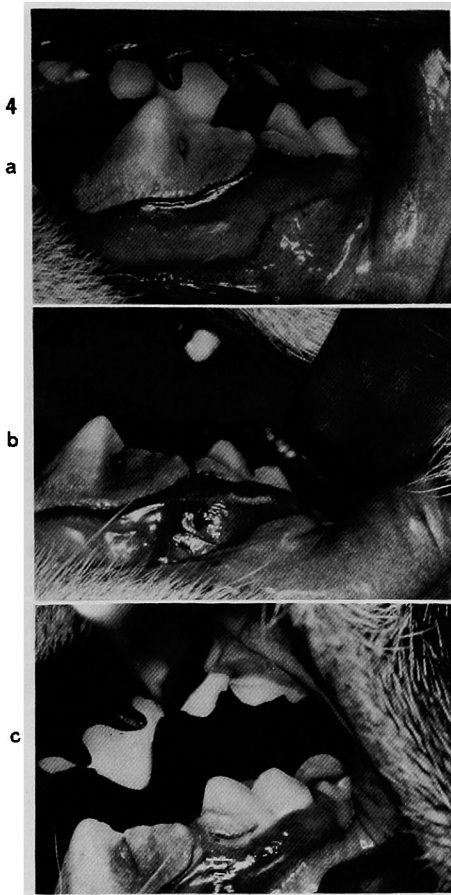


写真4. P-10 1mg/kg (i.v.) 投与の抗炎症効果 (×3)

a: 対照 b: 結紮後7日目
c: P-10 1mg/kg (i.v.) 7日間投与群

の indomethacin を連続投与した場合, 全例で粘液の混った軟便ないしは下痢便が観察され, 少数例では時に血便の混入を認めた。

図1は, 浸出液と歯肉厚に対する P-10 と indomethacin の効果を示している。対照と比較して P-10 は, 12.5mg/kg, 25mg/kg と用量に依存して治癒効果は強くなっており, indomethacin 1.25mg/kg も有意に浸出液重量及び歯肉厚を減少させている。写真4は, P-10 1mg/kg の連続静注を行った後の所見であるが, この場合も投与後 (c) の歯肉像は対照時 (a) と全く差がなく, (b) で見られた強度の炎症症状は完全に治癒しているのがわかる。写真5の組織像でも明らかな如く, (b) の炎症時に見られた顕著な細

写真5

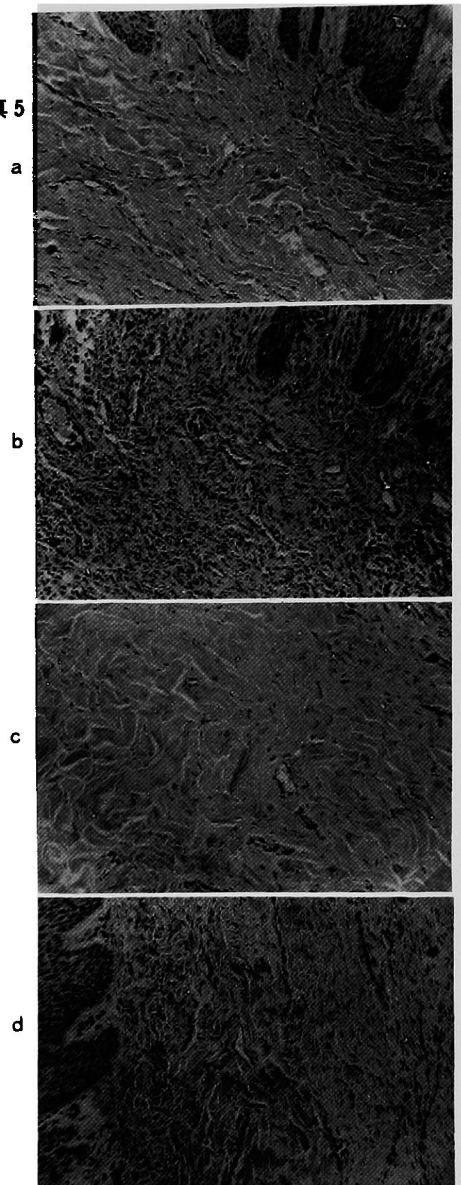


写真5. P-10 1mg/kg (i.v.) 及び
Indomethacin 1mg/kg (s.c.)
投与群の歯肉組織像 (×75).
a: 対照 b: 結紮後7日目
c: P-10 1mg/kg (i.v.) 7日間投与後の
組織像
d: Indomethacin 1mg/kg (s.c.)
7日間投与後の組織像

胞浸潤は P-10 1mg/kg 静注により完全に消失し, 歯肉の厚さも薄くなっている。外縁上皮はもちろん, 内縁上皮にも全く細胞浸潤は認められなかった。特記すべきは, 結紮糸に面した粘膜固

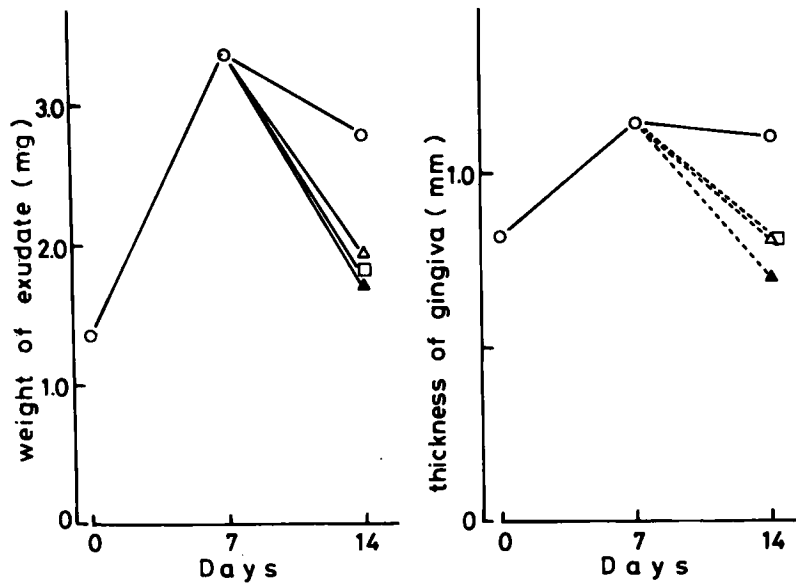


図1. P-10 及び Indomethacin 経口投与の浸出液量及び歯肉厚に及ぼす影響

- : 対照
- △—△ : P-10 12.5mg/kg
- ▲—▲ : P-10 25mg/kg
- : Indomethacin 1.25mg/kg

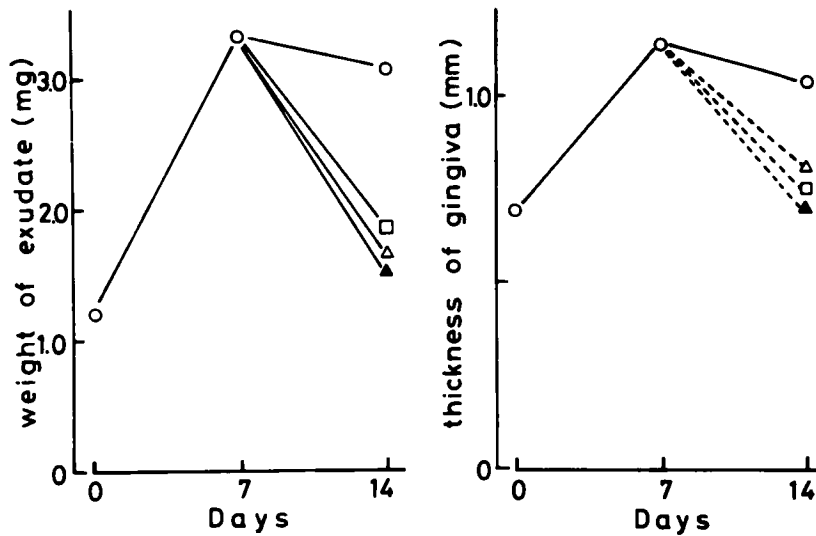


図2. P-10 及び Indomethacin 非経口投与の浸出液量及び歯肉厚に及ぼす影響

- : 対照
- △—△ : P-10 1mg/kg (i.v.)
- ▲—▲ : P-10 5mg/kg (i.v.)
- : Indomethacin 1mg/kg (s.c.)

有層で観察された厚い肉芽組織は全く観察されず、固有層は対照時よりもより軽度の少数の円形細胞の浸潤を認めたのにすぎない。P-10 の

12.5mg/kgや indomethacin 1.25mg/kgを経口投与した群のいずれにおいても、組織像はほぼ正常に近く、炎症症状は殆んど認められなかつ

た。ただし、結紮糸に接した部位には、少数の細胞浸潤が認められた。P-10の25mg/kg経口投与群の組織像には、炎症症状は全く認められなかった。

indomethacin 1mg/kgを連続皮下投与した場合、結紮7日目の組織像に比較して白血球の浸潤も減少し、肉芽組織の形成は阻止されている。

しかし、P-10 1mg/kgを静注した場合に比較してより多数の細胞浸潤が明瞭に認められ、その効果はP-10に劣った。P-10を静注した場合も1mg/kg、5mg/kg共に用量に依存してその効果は増大し、浸出液量及び歯肉厚の増加を有意に抑制し、経口投与と同様の結果が得られた(図2)。また、indomethacin 1mg/kgの皮下投与も有意な抗炎症効果を示した。

考 察

P-10は、ラットに誘発させた種々な実験的炎症に対して著明な抗炎症効果を示している⁵⁾。adjuvant注射後6-7日目に観察される口唇部の腫張に対してもP-10は著効を示している⁵⁾。また、P-10の十二指腸内投与後、血中のP-10濃度が上昇したことより、P-10が腸管より吸収されることが明らかになった⁵⁾。以上の知見は、P-10をはじめ、種々な消炎蛋白分解酵素製剤が経口投与された場合でも、口腔内炎症に対して治癒的に作用しうる可能性がある事を示唆している。

本実験の初期には、雑犬を使用した。しかし、年令差や飼育条件の差より歯肉の厚さや歯肉嚢よりの浸出液量に差があり、また、歯石の付着に起因すると考えられる歯肉炎を多数の犬で見出した。可及的実験条件を統一するために、ほぼ年齢及び飼育条件の一定したbeagle犬を本実験では使用した。また、P-10の2mg/kg静注は、indomethacin 5mg/kgの皮下注にほぼ匹敵する抗炎症効果を有する事がラットで報告されている⁵⁾。本実験でもreference drugとしてindomethacinを使用した。但し、その用量はP-10 1mg/kgに対し、indomethacinは1mg/kg投与した。

P-10の至適pHは弱アルカリ(pH 8.0)であるため、水溶液にして経口投与しても胃の酸性条件下で変性し、活性の低下や分解する可能

性が大であることが想定された。この点は、腸溶カプセルに粉末のまゝ充填して投与すれば、胃を通過した後十二指腸より吸収されることが期待される。問題は、犬の胃内腔の酸性条件に抵抗しうる腸溶カプセルが入手可能か否かという点と、この条件を充たす腸溶カプセルが得られたとしても、P-10の比重が軽いためにP-10を充填させた腸溶カプセルが胃内腔に長時間滞留し、十二指腸へ移行し難いのではないかという点が疑問点として浮び上った。信越化学製の腸溶カプセルを0.1N塩酸溶液中で振盪させながら放置した所、このカプセルは5時間後でも原形のまゝ存在したので、第1の疑問点については問題ないと考えられたので、このカプセルを使用することにした。

第2の問題を解決するため、腸管より吸収されず、反応性も低く、一方で比重の重い化合物として硫酸バリウムを賦形剤として使用することを試みた。雑犬を使用した予備実験では、P-10のみを充填したカプセルは、服用させた後、5時間経過した時点でも幽門を通過しなかったのに、比重を1.2に調整したカプセルは、服用させた1-2時間後には十二指腸へ移行することがわかった。以上の予備実験によりP-10の経口投与法が確立した。

waxed silkを臼歯に結紮した際、肉眼所見で腫張は歯肉全体にわたって観察されたが、発赤は歯肉縁に特に著明に認められた。また、組織像で最も特異的であったのは、結紮糸に接触する部位の粘膜固有層における著明な肉芽形成であった。P-10およびindomethacinはいずれもこの肉芽形成を完全に抑制した。この成績は、ラットに実験的に作成したgranuloma pouchの肉芽形成に対する抑制効果よりもすぐれていた⁵⁾。また、P-10は肉芽組織に隣接する粘膜固有層における細胞浸潤を完全に抑制し、非常に強力な抗炎症効果を発揮した。このような炎症組織像の改善と一致して炎症部位における肉眼的所見も非常に著明に改善されており、P-10の強力な抗炎症効果は実験的歯肉炎でも確認された。浸出液量や歯肉の肥厚もP-10投与後、完全に抑制されたことから、本酵素製剤が口腔領域の炎症疾患に経口的に使用されても治療効果を発揮す

る可能性は大であると考えられる。

要 約

Beagle の成犬を pentobarbital-Na の静注により麻酔し、上顎の両側第 1 後臼歯の歯頸部周囲を waxed silk で固く結紮し、歯肉炎を惹起した。術後 7 日目より Prozime-10 (P-10) および indomethacin の経口投与および非経口投与（静注または皮下注）を 1 週間連続して行った。術前、術後 7 日目および投薬終了後に歯肉厚、歯肉囊よりの浸出液重量および歯肉の組織学的検索を行った。術後 7 日目の第 1 後臼歯の歯肉には著明な発赤、腫大が認められた。しかし、P-10 の 12.5mg/kg や indomethacin 5 mg/kg の経口投与 1 週間後には、これらの炎症症状は殆んど消退した。indomethacin 投与の全例で粘液便を認めたが、P-10 投与後には消化管症状は全く認

められなかった。また、術後 7 日目の組織学的所見では、結紮糸に接する歯肉粘膜固有層に層状の肉芽組織が形成され、それと隣接する部位には浮腫が顕在した。P-10 および indomethacin 投与後の全症例で、肉芽形成は全く認められず、細胞浸潤および浮腫も著明に軽減しているのを認めた。

以上の所見より、P-10 の経口投与は、実験的歯肉炎に対して顕著な治癒効果を発揮しうる事がわかった。

謝 辞

本稿を終るにあたり、御指導、御校閲を賜った岡山大学歯学部西嶋克巳教授ならびに薬学部田坂賢二教授に深謝致します。

本論文の要旨は、第 37 回日本口腔科学会総会において発表した。

文 献

1. Innerfield, I., Angrist, A. and Schwartz, A.: Parenteral administration of trypsin. *J. A. M. A. (J. Am. Med. Assoc.)* **152**, 597—605, 1953.
2. Moss, J.N., Fraizer, C.V. and Martin, G.J.: Bromelains. The pharmacology of the enzymes. *Arch Int. Pharmacodyn.* **145**, 166—189, 1963.
3. Christensen, L.R.: Streptococcal fibrinolysis: a proteolytic reaction due to a serum enzyme activated by streptococcal fibrinolysin. *J. Gen. Physiol.* **28**, 363—383, 1954.
4. 伊藤万蔵, 杉山 衛: Aspergillus melleus に関する研究。(第 1 報) aspergillus melleus の産生するアルカリプロテイナーゼの精製結晶化ならびに酵素化学的性質について。薬学雑誌 **88**, 1576—1582, 1968.
5. Tasaka, K., Meshi, T., Akagi, M., Kakimoto, M., Saito, R., Okado, I. and Maki, K.: Anti-inflammatory activity of a proteolytic enzyme, Prozime-10. *Pharmacology* **21**, 43—52, 1980.
6. Cohen, H., Graff, M. and Kleinberg, W.: Inhibition of dextran edema by proteolytic enzymes. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **88**, 517—519, 1955.
7. 辻 秀憲: Serratia 属細菌の産生する抗炎症作用成分に関する研究。日薬理誌 **65**, 245—259, 1969.

Anti-inflammatory effect of Prozime-10 (P-10), a proteolytic enzyme

I. Anti-inflammatory effect of P-10 on experimental gingivitis

Kazuo MAKI

The First Department of Oral and Maxillofacial Surgery,

Okayama University Dental School

(Director : Prof. K. Nishijima)

Beagle dogs were anesthetized with pentobarbital-Na, and waxed silk was tightened around the under cut area of the dental necks of both postmolar teeth in the upper jaw. One week later, remarkable signs of gingivitis became apparent, and gingivitis was confirmed histologically. Prozime-10 (P-10, a proteolytic enzyme) and indomethacin were given either orally in enteric-coated capsules or parenterally (intravenously or subcutaneously) for 7 consecutive days. The thickness of gingiva and the volume of exudate in the gingival pocket were measured before the operation, 7 days after silk ligation and after the completion of the drug administration.

The effect of test drugs was evaluated in relation to these changes. Oral administration of 12.5mg/kg P-10 was quite effective in alleviating the inflammatory signs. Indomethacin (5mg/kg, p.o.) was slightly less effective, but significantly effective. In all cases of indomethacin administration, mucous diarrhoea was observed, and in some cases a visible amount of blood was mixed in the stool. No such sign was noted with P-10. The formation of granular tissue in the lamina propria of mucosa facing the waxed silk was noted characteristically in histological examinations of swollen gingiva. However, neither granular tissues nor any signs of inflammation were observed after P-10 administration.