

Enkephalin分解酵素および Aminopeptidase B に対するSSMの抑制効果について

財団法人東京都臨床医学総合研究所*

羽里 忠彦 小室 朝子 島村真里子
片山 敬

疼痛は有史以前から人々を悩まし続けた病苦の最たるものである。また癌末期の疼痛は耐えがたく、連日にわたる麻薬の投与を余儀なくされる。癌の治療にはimmunopotentiatorが有効であることが知られて、現在数種の薬剤が使用されつつある。これらimmunopotentiatorを使用していると疼痛の軽減がみられることを臨床医は観察しており、その発現機序の解明が求められている。われわれは、最近NK活性増強、インターフェロン誘起能を示し、さらに鎮痛性にも作用するとされる有機ゲルマニウム製剤が、サル脳細胞膜から分離、精製したenkephalin分解酵素の dipeptidyl aminopeptidase (DPP) に対し、抑制作用を示すことを見出した^{1, 2)}。

人型結核菌(青山B株)から抽出された物質³⁾(SSM)もimmunopotentiatorとしての作用を介して制癌に作用する^{4~6)}とされ、注目されている。今回、われわれは、ゼリア新薬工業(株)からSSMの提供を受け、そのenkephalin分解酵素に対する作用を検討した結果、興味ある所見をえたので報告する。

実験材料ならびに方法

使用した酵素は、サル脳の細胞膜から分離したaminopeptidase (AP) およびDPPと、牛小腸縦走筋由来のAP, DPP, dipeptidylcarboxypeptidase (DCP) およびcarboxypeptidase

(CP)である。これら酵素はいずれも既報告に準じて精製した^{7~9)}。また、leucine-aminopeptidase はSigma製のブタ腎臓由来の標品を、aminopeptidase Aはヒト血清を、そして、aminopeptidase Bはラット肝臓よりHopso^ら¹⁰⁾の方法により部分精製したものを用いた。それぞれの酵素活性は、enkephalinを基質にした場合はわれわれが考案した方法^{7, 8)}、アミノ酸-β-NAを基質にした場合はSudaらの方法¹¹⁾、Hip-His-Leu, Hip-pheを基質にした場合は、Hayakariらの方法¹²⁾により測定した。

結 果

サル脳細胞膜から分離精製したAP, DPPおよび牛小腸縦走筋より部分精製したAP, DPP, DCP, CPに対するSSMの作用を検討した結果をTable 1にまとめた。SSM 200 μg/mlの濃度でサル脳中のAP活性は86.3%抑制された。また、牛小腸縦走筋由来の酵素に対しては、SSM 500 μg/mlの濃度で検討したがそのうちDPPに対して54.0%の活性阻害が認められた。以上の結果から、SSMによりその活性が阻害されるとみなされるサル脳由来のAPおよび牛小腸縦走筋由来のDPPに対するSSMのIC₅₀値を求めてみると、それぞれ、8.0および450 μg/mlの値がえられた(Table 2)。

すなわち、enkephalin分解性のaminopeptidaseの一つに対し、SSMが強い抑制効果を

* 文京区本駒込3-18-22 (〒113)

Table 1 Inhibitory effect of SSM on enkephalin degrading enzymes

Enkephalin degrading enzymes	Substrate	SSM ($\mu\text{g/ml}$)	Inhibition (%)
Monkey brain			
Aminopeptidase	Tyr- β NA	200	86.3
Dipeptidylaminopeptidase	Enkephalin	200	0
Longitudinal muscle layer			
Aminopeptidase	Tyr- β NA	500	10.7
Dipeptidylaminopeptidase	Enkephalin	500	54.0
Dipeptidylcarboxypeptidase	Hip-His-Leu	500	32.5
Carboxypeptidase	Hip-phe	500	12.2

Tyr- β NA: Tyrosine β -naphthamide
 Hip-His-Leu: Hippuryl-histidyl-leucine
 Hip-phe: Hippuryl-phenylalanine

Table 2 IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$) of SSM on enkephalin degrading enzymes

Enkephalin degrading enzymes	Substrate	IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)
Monkey brain		
Aminopeptidase	Enkephalin	8.0
Longitudinal muscle layer		
Dipeptidylaminopeptidase	Enkephalin	450.0

Table 3 Inhibition of SSM on aminopeptidase activity

Aminopeptidase	Substrate (2 mM)	Inhibition (%)
Aminopeptidase A	L-glutamyl- β NA	4.6
Aminopeptidase B	Arg- β NA	87.3 (IC_{50} 220 $\mu\text{g/ml}$)
Leucine-aminopeptidase	L-leucine- β NA	0

SSM final concentration 1 mg/ml

示すことが明らかになったので、さらに各種の aminopeptidase に対する作用を検討してみた (Table 3)。それぞれの酵素に使用した基質特異性ならびにこれら反応系にそれぞれの特異的阻害物質である amastatin, arphameine A または bestatin を作用させた結果から、それぞれの酵

Table 4 Inhibition of SSM on aminopeptidase activity from monkey brain

Inhibitor	IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)
Baestatin	0.07
Amastatin	0.025
SSM	8.0

Substrate: Enkephalin

素活性は aminopeptidase A, aminopeptidase B および leucine-aminopeptidase と考えられる。SSM は aminopeptidase A および leucine-aminopeptidase 活性に対しては、1 mg/ml という高濃度でも阻害活性を示さなかった。一方、aminopeptidase B に対しては、同濃度で 87.3% の阻害活性が認められ、その IC_{50} は 220 $\mu\text{g/ml}$ であった。

考 案

今回の検討結果から、SSM は enkephalin 分解作用を有するサル脳細胞膜由来の aminopeptidase 活性を 8.0 $\mu\text{g/ml}$ という低濃度で抑制することが明らかになった。この結果は、同酵素に対する bestatin, amastatin の抑制効果からみると高濃度ではあるが (Table 4)、おのおの分子量すなわち bestatin の 308.4, amastatin の 474.6 に対し、SSM の分子量は約 10,000 前後

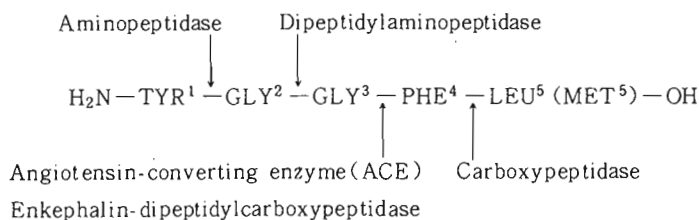


Fig. 1

とかなり高分子であることを勘案すると、モル濃度に換算すればきわめて低濃度といえる。

内因性 opioid peptide である enkephalin (Tyr-Gly-Gly-Phe-Met or Leu) が豚の脳から分離されて¹³⁾、この物質が疼痛の軽減になんらかの役割を果していることが推察されている。一方、生体内に投与された enkephalin はきわめて速やかに Fig. 1 の酵素活性により分解されてその生理活性を失う^{14, 15)}。したがって、enkephalin を分解する酵素活性を抑制すれば、生体内における enkephalin の相対的濃度上昇をもたらす、鎮痛作用の増強およびその持続時間の延長が期待される。この観点から、われわれは、enkephalin 分解酵素の分離精製を試みてきた。さらに、これら酵素に対する抑制物質の鎮痛効果を検討した結果、牛小腸縦走筋から分離した enkephalin 分解酵素活性をすべて抑制する ar-phamenine A が鎮痛性に作用することが明らかになった¹⁶⁾。また鎮痛作用を示す kyotorphin (Tyr-Arg) は、われわれがサル脳細胞膜から分離精製した DPP に対し抑制作用を示す¹⁷⁾。したがって、enkephalin 分解酵素活性を抑制すれば鎮痛効果がえられるというわれわれの作業仮説は実証されつつあるといえる。

SSM が鎮痛性に作用するか否か、まだわれわれは確証をえていないが、SSM と同様にサル脳細胞膜由来の AP に対し強い抑制効果を示す bestatin が morphine の鎮痛作用を増強するとされている¹⁸⁾。したがって SSM も同様に鎮痛性に働く可能性は充分推察される。

一方、amino peptidase B に対する特異的な inhibitor である bestatin は immunopotentiator としての作用があるとされている¹⁹⁾。そこ

で SSM の enkephalin 分解性 amino peptidase 以外の amino peptidase 活性に対する作用をみたところ、SSM はラット肝臓からえられた amino peptidase B 活性に対し抑制作用を示すことが明らかになった。この結果からは、immunopotentiator としての作用機序の 1 つとして amino peptidase B に対する抑制効果を考察することも可能であるが、SSM の組成がなお明らかでない現在速断することはできない。

いずれにせよ、現在用いられている SSM に enkephalin 分解性および肝抽出物中の amino peptidase に対する抑制効果がみられたことは興味ある事実で、SSM のさまざまな作用機序の 1 部を解明する手掛りを与えるものと考えられる。

おわりに

SSM の enkephalin 分解酵素に対する作用を検討し、サル脳細胞膜から分離精製した amino peptidase に対し IC₅₀ 8.0 μg/ml の阻害活性を示すことを明らかにした。また、同様に SSM はラット肝抽出物由来の amino peptidase B に対し IC₅₀ 220 μg/ml の抑制作用を示した。以上の結果から、SSM が鎮痛効果を示す可能性を考察した。

文 献

- 1) 羽里忠彦ほか：エンケファリン分解酵素に対する Ge-132 の効果，医学と薬学，9，1479～1500，1983
- 2) 羽里忠彦ほか：エンケファリン分解酵素に対するゲルマニウム Ge-132 誘導体の阻害効果，医学と薬学，12，479～485，1984
- 3) 小島 寛ほか：人型結核菌体熱水抽出物質に関

- する研究(第一報)多糖成分の化学構造, 薬学雑誌, 101, 713~722, 1981
- 4) 柳 忠道ほか: In vitro および In vivo におけるSSMの免疫賦活効果について, J. Jap. Soc. Cancer Ther. 15, 972~979, 1980
- 5) 鈴木直人ほか: SSM療法が有効であったと考えられる肝細胞癌の一例——Natural Killer Cell活性の変化と治療効果との関係——, 癌の臨床, 27, 67~70, 1981
- 6) 東海地区SSM共同研究班: 胃癌非治癒切除および切除不能症例に対する人型結核菌体抽出物質(SSM)の臨床比較対照試験成績, 基礎と臨床, 17, 293~309, 1983
- 7) Shimamura, M. et al.: A membrane-bound aminopeptidase isolated from monkey brain and its action on enkephalin. BBA., 756, 223~229, 1983
- 8) Hazato, T. et al.: Separation and characterization of a dipeptidyl aminopeptidase that degrades enkephalins from monkey brain. BBRC, 105, 470~475, 1982
- 9) Hazato, T. et al.: Separation of enkephalin-degrading enzymes from longitudinal muscle layer of bovine small intestine and the enzyme inhibition activity effect of arphamenine A. Biochem. Pharmacol. (Submitted)
- 10) Hopsu, V. K., Purification of a mammalian peptidase selective for N-terminal arginine and lysine residues: aminopeptidase B. ABB., 114, 557~566, 1966
- 11) Suda, H. et al.: Inhibition of aminopeptidase B and Leucine aminopeptidase by bestatin and its stereoisomer. ABB., 177, 196~200, 1976
- 12) Hayakari, H. et al.: A rapid and simple spectrophotometric assay of angiotensin converting enzyme. Anal. Biochem., 83, 36~369, 1978
- 13) Hughes, J. et al.: Identification of two related pentapeptides from the brain with potent opiate agonist activity. Nature, 258, 577~579, 1975
- 14) Hambrook, J. M. et al.: Mode of deactivation of the enkephalins by rat and human plasma and rat brain homogenates. Nature, 262, 782~783, 1976
- 15) Altstein, M. et al.: The effect of barbiturates on the degradation of enkephalin by brain enzymes. Life Sci., 28, 185~191, 1981
- 16) 羽里忠彦ほか: Enkephalin 分解酵素阻害物質とその鎮痛作用の検討, 第4回鎮痛薬とオピオイドペプチド研究会要旨集, 1983, pp.51~54
- 17) 羽里忠彦ほか: Enkephalin 分解酵素 dipeptidyl aminopeptidase の生体内における生理的役割の考察, 生化学(第57回日本生化学会大会抄録号)
- 18) Hachisu, M. et al.: Relationship between enhancement of morphine analgesia and inhibition of enkephalinase by 2S, 3R-3-amino-2-hydroxy-4-phenylbutanoic acid derivatives. Life Sci., 30, 1739~1746, 1982
- 19) 石塚雅章: 細胞表面酵素阻害物質の免疫応答への影響およびその制癌への応用, 癌と化学療法, 5 (Supplement), 165~174, 1979

*

*

*