

Vitamin E と T-kininogen

坂本 亘^{*1)}, 半田 洋^{*2)}, 上原総一郎^{*3)}

Relationship between vitamin E and T-kininogen It is experimentally known that vitamin E enhances both humoral immune response and protection against micro-organism infection, but the mechanism has not been clarified. On the other hand, T-kininogen, a kinin precursor, cysteine proteinase inhibitor, and acute phase protein, is suggested to be induced by activation of macrophages. In order to clarify the action of vitamin E on the immune response, we investigated the relationship between vitamin E and T-kininogen in rat. T-kininogen level in rat serum was determined by single radial immunodiffusion using specific antiserum against T-kininogen. Vitamin E provides a potent stimulus *in vivo* for the production of T-kininogen, such as seen in lipopolysaccharide (LPS) administration. Namely, T-kininogen level in rat serum, that was given intraperitoneal injection of vitamin E for six days ranging from 1.5 mg to 25 mg per day, increased from 758 ± 218 to $3,220 \pm 263 \mu\text{g protein/ml}$ with an increase of vitamin E level in the serum (12.9 ± 1.1 to $38.8 \pm 6.2 \mu\text{g/ml}$). Whereas normal and vehicle (polyethylene 60-hydrogenated castor oil)-received rats were 452 ± 77 to $483 \pm 82 \mu\text{g/ml}$ of T-kininogen and 7.4 ± 0.7 to $7.2 \pm 0.9 \mu\text{g/ml}$ of vitamin E. In addition, vitamin E enhanced induction of T-kininogen by LPS administration. From these results, the pharmacological action of vitamin E on the immune response was discussed.

Wataru Sakamoto^{*1)}, Hiroshi Handa^{*2)}, Soichiro Uehara^{*3)}

^{*1)} Department of Biochemistry School of Dentistry,

^{*2)} The 2nd Department of Internal Medicine, School of Medicine, Hokkaido University

^{*3)} Internal Medicine, Tonan Hospital

key words: vitamin E, interleukin-1, LPS, T-kininogen, rat

ラット血漿中に存在する T-kininogen は HMW-, LMW-kininogens と同様に、キニン前駆体, thiol protease inhibitors などの機能を有する多機能蛋白質であるが¹⁻³⁾, 炎症に伴って増加する acute phase protein の一種でもある⁴⁾. 最近, この T-kininogen の誘導をめぐる, macrophage 由来の monokines, ヒト表皮細胞や扁平上皮癌細胞 (COLO-16) 培養液由来の cytokine, HSF II (hepatocyte-stimulating factor II) の関係が論じられている^{5,6)}.

一方, vitamin E は macrophage, 抗原抗体反応を介して生体防御に深く関与するとともに, 発癌抑制作用を発揮することが報告されている⁷⁻⁸⁾. しかしながら, vitamin E がどのような作用機構で異物処理能, 免疫応答能に関与しているのかまだ不明な点が多い. 今回, 筆者らは, 生体防御と vitamin E の関連性を調べるために, vitamin E による T-kininogen 産生誘導について調べた.

方 法

(1) 実験動物

体重350~400 g のウイスター系雄ラットを使用した.

(2) 試験薬物

vitamin E(DL- α -tocopheryl acetate, エーザイ)は, その溶媒である HCO-60(polyethylene 60-hydrogenated castor oil, エーザイ)で種々濃度(50 mg/ml, 20 mg/ml, 10 mg/ml, 3 mg/ml)に調整した後, 各 0.5 ml をラット腹腔内に投与した. 対照群(vehicle)は 0.5 ml の HCO-60を投与した.

lipopolysaccharide(LPS)は, *E. coli* よりフェノール抽出された serotype No. 0127 : B 8 (Sigma 社, USA), interleukin-1(IL-1)は, ヒト組換え IL-1 α (大日本製薬)を使用した.

(3) 血中 vitamin E, T-kininogen, 総蛋白質量の測定

心臓穿刺により採血し, 血清を分離した後, vitamin E(α -tocopherol)量を蛍光法⁹⁾, T-kininogen 量は先に報告した T-kininogen の特異抗血清を用いる single radial immunodiffusion 法¹⁰⁾, 総蛋白質量は, Lowry 法¹¹⁾でおのおの測定した.

結 果

(1) LPS と血中 T-kininogen

免疫学的に定量した正常ラット血中の T-kininogen 量は $437 \pm 45 \mu\text{g/ml}$ であった. 一方, ラット腹腔内に 100

^{*1)} 北海道大学歯学部生化学教室

^{*2)} 同 医学部第二内科学教室

^{*3)} 斗南病院内科

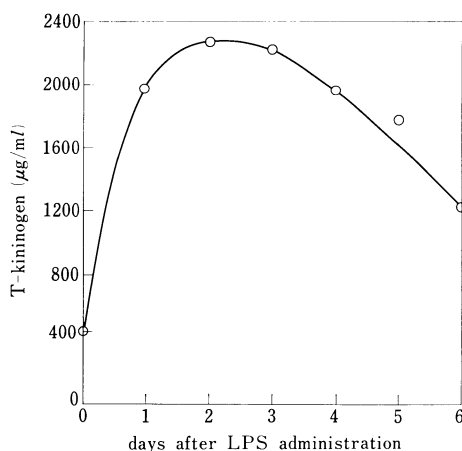


図1 changes with time in T-kininogen concentration in rat serum after administration of LPS

Four rats were used per time and analyzed individually. T-kininogen concentrations are indicated for the mean values of rats on each day after administration of 100 µg LPS.

µg LPS を投与すると、血中 T-kininogen 量は図1に示すように、いちじるしく増加した。すなわち、投与後1日目で1,950、2日目で2,300、3日目で2,250、4日目で1,900、6日目で1,200 µg/ml となった。

(2) vitamin E と血中 T-kininogen

正常ラット血中の vitamin E 量は 7.4 ± 0.7 µg/ml であったが、1.5 mg, 5 mg, 25 mg/日の vitamin E 6日間連続投与群ではおのおの 12.9 ± 1.1 , 15.5 ± 2.3 , 38.8 ± 6.2 µg/ml となり、血中 vitamin E 量は投与量とともに有意に増加した。一方、T-kininogen 量は、血中 vitamin E 量の上昇に伴い増加した。すなわち、1.5 mg 6日間連続投与のラット血中 T-kininogen 量は 758 ± 218 , 5.0 mg で 1823 ± 613 , 25 mg で 3220 ± 263 µg/ml と正常群に比して有意に増加した。なお、50 µg IL-1, 50, 100 µg 各 LPS 1回投与後3日目の血中 T-kininogen 量はおのおの 1620 ± 241 , 1392 ± 470 , 2220 ± 435 µg/ml であった(表1)。

(3) LPS, vitamin E と血中 T-kininogen

表1に示したように、vitamin E は LPS と同様に血中 T-kininogen 量を増加させることが明らかになった。そこでつぎに、血中 vitamin E 量の上昇が LPS の T-kininogen 誘導上昇作用にどのように影響するのか調べた。vitamin E は図2に示したように、50 µg LPS 投与3日前から屠殺前日まで6日間連続投与した。その結果、対照群である LPS+生食群、LPS+vehicle 群の血中 T-kininogen 量はおのおの 1214 ± 213 , 1222 ± 306 µg/ml であるのに対し、5.0 mg, 10.0 mg, 25.0 mg/日 vitamin E 投与群ではおのおの 2379 ± 262 , 3221 ± 263 ,

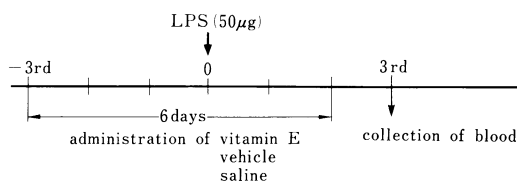


図2 experimental procedure for determining the effect of vitamin E on T-kininogen-induction by LPS administration

3690 ± 311 µg/ml と有意に増加した。しかし、1.5 mg/日投与群では血中 vitamin E 量が 13.1 ± 2.1 µg/ml と正常群(7.7 ± 1.1 µg/ml)より有意に増加しているにもかかわらず、LPS の T-kininogen 誘導作用に対する相加効果は観察することができなかった(表2)。

考 察

vitamin E は、生体の免疫反応を賦活化し、感染防御や発癌抑制に関与すると報告されている^{7,8)}。すなわち、マウス脾細胞免疫活性に関する研究から、Hoffeld¹²⁾ は、vitamin E の免疫活性増強効果は vitamin E が細胞膜の脂質過酸化を防止するためであると説明し、津田ら¹³⁾ は、vitamin E がリンパ球の幼若化能を促進するためであるとしている。

事実、Yasunaga et al¹⁴⁾ は、マウス腹腔内に vitamin E を14日間投与すると、リンパ球の幼若化転換が促進されること、また、Corwin et al¹⁵⁾ は、LPS によるリンパ球幼若化反応が vitamin E により増強されることを立証している。一方、Schwartz et al⁸⁾ は、vitamin E の発癌抑制作用は vitamin E が macrophage を刺激するためであろうと説明している。このように vitamin E はなんらかの形で免疫応答に関与していることは明らかであるが、monokine, cytokine の産生亢進を介して vitamin E が作用しているかどうか明確でない。

筆者らは、vitamin E のこの薬理学的作用を実証する一つの手懸りとして、monokines や cytokines により誘導される T-kininogen^{5,6)} を指標にして、vitamin E の作用について研究した。その結果、1.5 mg/日から 25 mg/日の vitamin E 6日間連続投与による血中 vitamin E 量の上昇は、血中 T-kininogen 量の上昇を誘導した。そして、その誘導は macrophage の活性化を介して行われている可能性を示唆した。事実、macrophage 活性化因子の一つ、LPS は血中 T-kininogen をいちじるしく上昇させるとともに、この上昇作用が vitamin E により相加的に増強させることがわかった。Kageyama et al.¹⁶⁾ は、すでに mRNA レベルで LPS の T-kininogen 誘導が肝臓で行われていることを証明している。それゆえに、vitamin E による T-kininogen 上昇作用は肝臓での T-kininogen 合成亢進を反映していることになる。

表 1 effect of vitamin E, IL-1 and LPS on total protein and T-kininogen levels in rat serum

		protein (mg/ml)	T-kininogen (μ g/ml)	vitamin E (μ g/ml)
normal	(n = 8)	66 $\pm$ 2	437 $\pm$ 45	7.4 $\pm$ 0.7
vehicle* ¹⁾	(n = 8)	67 $\pm$ 1	483 $\pm$ 82	7.2 $\pm$ 0.9
vitamin E* ¹⁾	1.5 mg (n = 8)	67 $\pm$ 2	758 $\pm$ 218	12.9 $\pm$ 1.1
	5.0 mg (n = 8)	67 $\pm$ 2	1,823 $\pm$ 617	15.5 $\pm$ 2.3
	25.0 mg (n = 8)	66 $\pm$ 3	3,220 $\pm$ 263	38.8 $\pm$ 6.2
IL-1* ²⁾	50.0 μ g (n = 8)	64 $\pm$ 3	1,620 $\pm$ 241	ND* ³⁾
LPS* ²⁾	50.0 μ g (n = 8)	63 $\pm$ 3	1,392 $\pm$ 470	ND
	100.0 μ g (n = 8)	62 $\pm$ 2	2,220 $\pm$ 435	ND

*¹⁾ Each group of 8 male Wistar rats (350~400 g) received vitamin E or vehicle by intraperitoneal injection for 6 days. On 7th day, rat blood was obtained by cardiac puncture under light ethyl ether anesthesia, in order to measure T-kininogen in the serum.

*²⁾ T-kininogen in rat serum was measured on the 3rd day after a single intraperitoneal injection of LPS or IL-1.

*³⁾ ND: not determined.

表 2 effect of vitamin E on T-kininogen induced by LPS administration in rat serum

		protein (mg/ml)	T-kininogen (μ g/ml)	vitamin E (μ g/ml)
normal	(n = 8)	66 $\pm$ 2	452 $\pm$ 77	7.7 $\pm$ 1.1
LPS (50 μ g)	+saline* (n = 8)	61 $\pm$ 2	1,214 $\pm$ 213	7.0 $\pm$ 0.9
	+vehicle* (n = 8)	63 $\pm$ 3	1,222 $\pm$ 306	6.9 $\pm$ 0.9
	+vitamin E*			
	1.5 mg (n = 8)	66 $\pm$ 2	1,292 $\pm$ 413	13.1 $\pm$ 2.1
	5.0 mg (n = 8)	64 $\pm$ 1	2,379 $\pm$ 262	13.9 $\pm$ 2.2
	10.0 mg (n = 8)	68 $\pm$ 2	3,221 $\pm$ 263	16.7 $\pm$ 3.2
	25.0 mg (n = 8)	65 $\pm$ 3	3,690 $\pm$ 311	33.6 $\pm$ 3.8

* Each group of 8 male Wistar rats (350~400 g) received saline, vehicle or vitamin E by intraperitoneal injection for 6 successive days, and on the 4th day the rat were subjected to 50 μ g of intraperitoneal injection of LPS, as shown in Fig. 2. T-kininogen in rat serum was measured on the 3rd day after injection of LPS.

最近, Itoh et al.⁵⁾ は, Freund's complete adjuvant をラット腹腔内に投与して調整した macrophage 実験から, 肝臓での T-kininogen 合成が macrophage を介して, それも macrophage が産生する monokines により誘導されることを示唆している. 事実, 筆者らも本研究において, monokine の一つ, ヒト組換え IL-1 の T-kininogen 誘導作用を観察することができた.

しかしながら, 今回の投与量が 50 μ g protein(1.5 $\times$ 10⁶ units)と生理的には考えられない濃度であること, また最近, Baumann et al.⁶⁾ は, ラット肝細胞の培養系において, 1000 units/ml の IL-1 ではそのような誘導作用が認められず, ヒト表皮細胞や扁平上皮癌細胞由

来の cytokine, HSF II で強力な T-kininogen 誘導作用が認められたと報告していることから, T-kininogen をめぐって vitamin E と cytokines, monokines の関係を今後さらに検討する必要がある. いずれにしても, 今回明らかにされた vitamin E の T-kininogen 誘導作用がヒトの連用安全投与量(200~600 mg/日)¹⁷⁾でも, その作用を発揮していることから, 生体防御に対する vitamin E の新しい薬理的作用が期待される.

vitamin E の供与ならびにその測定に際し, ご援助を賜ったエーザイ株式会社に深謝致します.

文 献

- 1) Okamoto, H., Greenbaum, L.M.: Isolation and structure of T-kinin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 112: 701-708, 1983.
- 2) Sakamoto, W., Satoh, F., Gotoh, K., Uehara, S.: Ile-Ser-bradykinin (T-kinin) and Met-Ile-Ser-bradykinin (Met-T-kinin) are released from T-kininogen by an acid proteinase of granulomatous tissues in rats. *FEBS Lett.* 219: 437-440, 1987.
- 3) Sueyoshi, T., Enjyoji, K., Shimada, T., Kato, H., Iwanaga, S., Bando, Y., Kominami, E., Katunuma, N.: A new function of kininogens as thiol-proteinase inhibitors: inhibition of papain and cathepsin B, H and L by bovine, rat and human plasma kininogens. *FEBS Lett.* 182: 193-195, 1985.
- 4) Cole, T., Inglis, A.S., Roxburgh, C.M., Howlett, G.J., Schreiber, G.: Major acute α_1 -protein of rat is homologous to bovine kininogen and contains the sequence for bradykinin. *FEBS Lett.* 182: 57-61, 1985.
- 5) Itoh, N., Toyohara, T., Okamoto, H., Kawano, H., Mayumi, T., Hama, T.: Involvement of inflammatory leucocytes in hepatic induction of T-kininogen in rat. *Inflammation* 11: 345-353, 1987.
- 6) Baumann, H., Onorato, V., Gualdies, J., Jahreis, G.P.: Distinct sets of acute phase plasma proteins are stimulated by separate human hepatocyte-stimulating factors and monokines in rat hepatoma cells. *J. Biol. Chem.* 262: 9756-9768, 1987.
- 7) Tenerdy, R.P., Methias, M.M., Nockels, G.L.: Vitamin E, immunity and disease resistance. *Adv. Exp. Med. Biol.* 135: 27-42, 1981.
- 8) Schwartz, J., Odukoya, O., Stoufi, E., Shklar, G.: Alpha tocopherol alters the distribution of Langerhans cells in DMBA-treated hamster cheek pouch epithelium. *J. Dent. Res.* 64: 117-121, 1985.
- 9) 阿部皓一, 勝井五一郎: 血清中のトコフェロールの螢光定量. *栄養と食糧* 28: 277-280, 1975.
- 10) Sakamoto, W., Yoshikawa, K., Handa, H., Uehara, S., Hirayama, A.: T-kininogen in rats with carrageenin-induced inflammation. *Biochem. Pharmacol.* 35: 4283-4290, 1986.
- 11) Lowry, D.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.: Protein measurement with folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275, 1951.
- 12) Hoffeld, J.T.: Agents which block membrane lipid peroxidation enhance mouse spleen cell immune activities *in vitro*: Relationship to the enhancing activity of 2-mercaptoethanol. *Eur. J. Immunol.* 11: 371-376, 1981.
- 13) 津田忠昭, 辻本真人, 大田喜一郎, 大畑雅洋, 竹中 徹, 前田治郎: リンパ球機能に及ぼすビタミンの影響. *医学のあゆみ* 124: 764-766, 1983.
- 14) Yasunaga, T., Ohgaki, K., Inamoto, T., Hikasa, Y.: Effect of vitamin E as an immunopotential agent and its influence on tumor growth in mice. *Arch. Jpn. Chir.* 53: 312-323, 1984.
- 15) Corwin, L.M., Schloss, J.: Influence of vitamin E on the mitogenic response of murine lymphoid cells. *J. Nutr.* 110: 916-923, 1980.
- 16) Kageyama, R., Kitamura, N., Ohkubo, H., Nakanishi, S.: Differential expression of the multiple forms of rat prekininogen mRNA after acute inflammation. *J. Biol. Chem.* 260: 12060-12064, 1985.
- 17) Bieri, J.G., Corash, L., Hubbard, V.S.: Medical use of vitamin E. *New Eng. J. Med.* 308: 1063-1071, 1983.