

ヒト羊膜培養細胞の prostaglandin E₂ 産生に及ぼす カルシウム拮抗剤の影響

秋田大学医学部産科婦人科学教室 (主任: 田中俊誠教授)

真 田 広 行

Effects of Calcium Antagonists on Prostaglandin E₂ Production in Cultured Human Amnion Cells

Hiroyuki SANADA

Department of Obstetrics and Gynecology, Akita University School of Medicine, Akita
(Director: Prof. Toshinobu Tanaka)

概要 ヒト羊膜培養細胞の prostaglandin E₂ (PGE₂) 産生に及ぼすカルシウム拮抗剤の影響について検討した。羊膜細胞を interleukin-1 β (IL-1 β) により刺激し、同時にカルシウム拮抗剤ならびに種々の薬剤を添加して培養上清中の PGE₂ 濃度を測定し、以下の成績を得た。

1. dihydropyridine 系カルシウム拮抗剤の nifedipine, nicardipine, nilvadipine は羊膜細胞の PGE₂ 産生を濃度依存性に抑制し、100 μ M においてそれぞれ60%, 80%, 80%抑制した。非 dihydropyridine 系の verapamil, diltiazem は羊膜細胞の PGE₂ 産生を全く抑制しなかった。

2. EGTA 2mM 添加により培養液中の Ca²⁺ をキレートしたところ羊膜細胞の PGE₂ 産生は32%しか抑制されなかった。

3. nifedipine, nicardipine, nilvadipine 100 μ M は phospholipase A₂ (PLA₂) 活性をそれぞれ60.3%, 89.3%, 83.9%抑制し、それぞれの50%抑制濃度は76.2 μ M, 36.7 μ M, 44.6 μ M であった。verapamil, diltiazem は PLA₂ 活性を抑制しなかった。

以上の結果より dihydropyridine 系カルシウム拮抗剤は細胞膜のカルシウムチャンネルとは無関係に羊膜細胞内の PLA₂ を直接抑制することにより PGE₂ 産生を抑制することが示唆された。

Synopsis The purpose of this study was to determine the effects of calcium antagonists on the production of prostaglandin E₂ (PGE₂) in human amnion cells. Primary monolayer cultures of human amnion cells were stimulated by interleukin-1 β (IL-1 β), and PGE₂ in the culture media was measured. Dihydropyridine calcium antagonists nifedipine, nicardipine and nilvadipine inhibited PGE₂ production in a dose-dependent manner with maximal inhibition of 60, 80 and 80%, respectively observed at 100 μ M. However, nondihydropyridine calcium antagonists verapamil and diltiazem did not inhibit PGE₂ production. On the other hand, EGTA reduced PGE₂ production only 32%. In addition, nifedipine, nicardipine and nilvadipine inhibited a cell-free preparation of phospholipase A₂ (PLA₂) activity in a dose-dependent manner, but verapamil and diltiazem failed to reduce PLA₂ activity.

In conclusion, the evidence suggests that dihydropyridines inhibit PGE₂ production in amnion cells by directly inhibiting PLA₂ rather than its actions on calcium channels.

Key words: Amnion • Prostaglandin E₂ • Calcium antagonist • Phospholipase A₂

緒 言

切迫早産管理における子宮収縮抑制剤の第一選択は現在のところ ritodrine hydrochloride を中心とする β_2 刺激剤であるが、最近、平滑筋弛緩薬であるカルシウム拮抗剤が用いられ始めている。

このカルシウム拮抗剤は、平滑筋細胞や神経細胞などの興奮性細胞のカルシウムチャンネルをブロックするだけでなく、非興奮性細胞に対してもさまざまな作用を有することが報告^{1)~3)}されてきており、特に脂質代謝に対する作用が注目されて

いる。そこで、陣痛発来に prostaglandin の供給源として重要な役割を果たすと考えられている羊膜細胞の prostaglandin E₂ (PGE₂) 産生に対するカルシウム拮抗剤の影響について検討したので報告する。

研究方法

1. 羊膜細胞培養法

合併症のない正常妊婦14例から陣痛発来前の予定帝王切開にて得た胎盤より羊膜を無菌的に剝離し、Bennett et al.⁴⁾の方法に準じて羊膜細胞を分離培養した。すなわち、羊膜を Ca²⁺, Mg²⁺ free phosphate-buffered saline (PBS) で洗浄後細切り、DISPASE II (PBS 希釈, 最終濃度1,000U/ml, 合同酒精) で37°C, 60分間処理して細胞を分散した。細胞を10%牛胎仔血清(FBS, Cistron), penicillin G(100units/ml, Sigma), streptomycin (100μg/ml, Sigma), マイコプラズマ除去剤 MC-210 (500ng/ml, 大日本製薬) を含む M199 (Earle 液, GIBCO) に浮遊させ、3×10⁵cells/ml の濃度で24 well tissue culture plate (Falcon) に播種し、5%CO₂, 95%air, 37°C 下にて静置培養した。細胞は6日目以降に confluent となり、10日目までの間に実験に供した。なお用いた胎盤はすべて組織学的に検討したが、絨毛羊膜炎の所見は認められなかった。

2. 羊膜培養細胞への interleukin-1β (IL-1β) および各種物質の添加実験

1) 羊膜培養細胞の PGE₂ 産生に対する IL-1β の影響

培養液中に human recombinant interleukin-1β (E. coli 由来, 500half-maximal units in 500μl PBS, Cistron) を種々の濃度に添加し、一定時間培養した。培養液を回収後、2,000×g で遠心し、上清中 PGE₂ を PGE₂ RIA Kit (Amersham) にて測定した。培養液回収後各 well の細胞数を計測し、PGE₂ 量は10⁵ cells あたりの値として表した。

2) IL-1β 刺激による羊膜培養細胞の PGE₂ 産生に対する各種物質の影響

カルシウム拮抗剤である nifedipine (アダラート®, バイエル薬品), nilvadipine (ニバジール®, 藤沢薬品) を DMSO に溶解, nicardipine (ペルジ

ピン®, 山之内製薬), verapamil (ワソラン®, エーザイ), diltiazem (ヘルベッサ®, 田辺製薬) を蒸留水に溶解, カルシウムキレート剤である EGTA を PBS に溶解し, また, phospholipase A₂ (PLA₂) 阻害剤である human recombinant calphobindin I (CPB I, 興和) を PBS で透析したものをそれぞれ溶媒の培養液中の濃度が0.1%となるように添加し, 1時間前培養した後 IL-1β (1 U/ml) を添加し, 6時間培養して培養上清中の PGE₂ 濃度を測定した。各実験は, それぞれ triplicate にて2回行い, 統計学的有意性の検討は Student's t test を用いて行った。

3. PLA₂ 活性に対するカルシウム拮抗剤の影響

PLA₂ 活性の測定は Lumb et al.⁵⁾ の方法に従って行った。PLA₂ は Naja naja venom 由来の精製品 (1,880units/mg protein, Sigma) を用い, 0.25% fatty acid free BSA (bovine serum albumin, Sigma) 加100mM Tris-HCl (pH 8.0) で調整して使用した。基質は L-3-phosphatidylcholine, 1-stearoyl-2- [1-¹⁴C] arachidonyl (PC) (specific activity 54mCi/mmol, Amersham) を用い, 0.05% Triton X-100 を含む100mM Tris-HCl (pH 8.0) を加えて125nCi/25nmol/ml とした。カルシウム拮抗剤として nifedipine, nilvadipine を DMSO に溶解し, nicardipine, verapamil, diltiazem を蒸留水に溶解して使用した。反応系には Tris-HCl (100mM, pH 8.0), CaCl₂ 5mM, PC 5nmol, PLA₂ 0.1U, カルシウム拮抗剤を含み, 総量400μl とした。酵素液を加えることにより反応を開始させ, 37°C の恒温槽で30分間インキュベーションした後, 脂肪酸抽出溶媒 (toluene: chloroform: methanol, 1.0:0.5:1.2, v/v/v) 2ml を加え, さらに40μl の1N NaOH を加えて, 充分攪拌した。1,000×g で10分間遠心した後, 上層(水層)から200μl を液体シンチレーション用バイアル瓶にとり, ACS II (Amersham) 5ml を加えて, 遊離したアラキドン酸の放射活性を液体シンチレーションカウンタ (LSC950, Aloka) にて測定した。PLA₂ 活性阻止率はカルシウム拮抗剤を種々の濃度に加えたときの遊離アラキドン酸の

減少率として表した。実験はすべて duplicate で行った。

研究成績

1. 羊膜培養細胞の PGE₂ 産生に対する IL-1 β の影響

種々の濃度の IL-1 β を添加し、6 時間培養したところ、IL-1 β の濃度依存性に PGE₂ 産生量が増加し、対照群の $94.58 \pm 26.32 \text{ pg}/10^5 \text{ cells}/6\text{h}$ に対し、1U/ml で $1,894.25 \pm 501.38 \text{ pg}/10^5 \text{ cells}/6\text{h}$ とピークに達した (図1)。次に IL-1 β 1U/ml の濃度で羊膜培養細胞の PGE₂ 産生量の経時的变化を測定したところ PGE₂ 産生量は時間依存性に増加した (図2)。

2. IL-1 β 刺激による羊膜培養細胞の PGE₂ 産生に対する各種物質の影響

nifedipine, nicardipine, nilvadipine は濃度依存性に羊膜培養細胞の PGE₂ 産生を抑制し、100

μM でそれぞれ60%, 80%, 80%抑制した。50%抑制濃度は nifedipine $50.4 \mu\text{M}$, nicardipine $40.6 \mu\text{M}$, nilvadipine $38.2 \mu\text{M}$ と PGE₂ 産生抑制の強さは nicardipine \approx nilvadipine $>$ nifedipine の順であった (図3)。一方 diltiazem, verapamil には全く抑制効果がみられなかった。Ca²⁺濃度1.5mM である培養液中に EGTA 2mM を添加したところ PGE₂ 産生量は32%抑制された。また、in vitro において PLA₂ を80%以上阻害する濃度の CPB I $5 \mu\text{M}$ を添加しても全く抑制効果がみられなかった (図4)。

3. PLA₂ 活性に対するカルシウム拮抗剤の影響

nifedipine, nicardipine, nilvadipine は濃度依存性に PLA₂ 活性を抑制し、100 μM における阻止率はそれぞれ60.3%, 89.3%, 83.9%であった。またそれぞれの50%抑制濃度は $76.2 \mu\text{M}$, 36.7

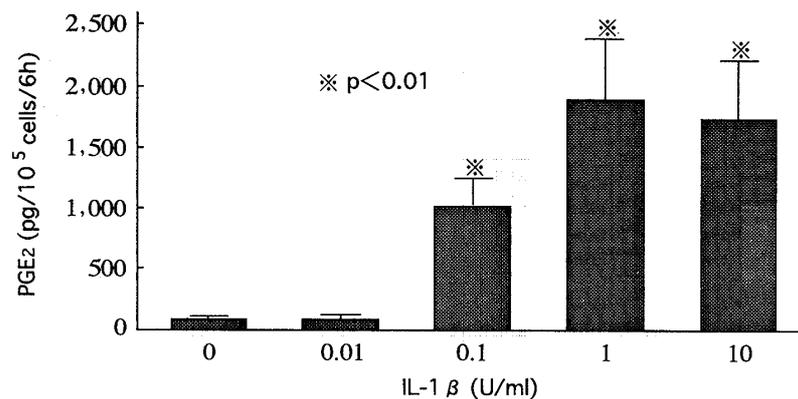


図1 羊膜培養細胞の PGE₂ 産生に対する IL-1 β 濃度の影響 (mean \pm S.D., n=6)

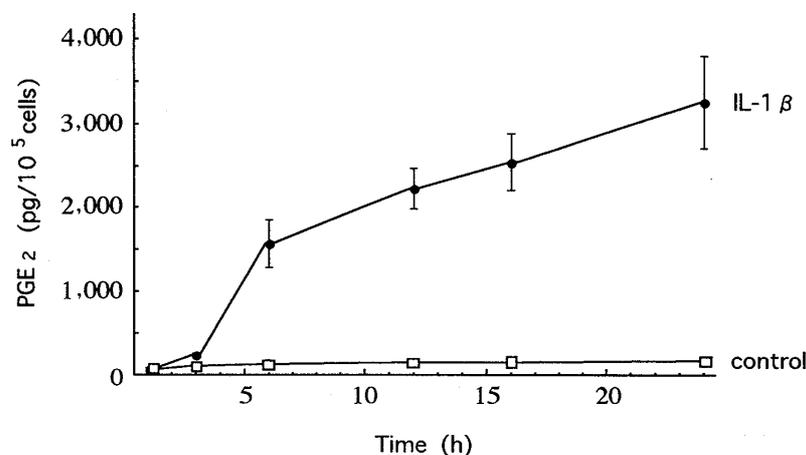


図2 羊膜培養細胞の PGE₂ 産生に対する IL-1 β (1U/ml) 刺激時間の影響 (mean \pm S.D., n=4)

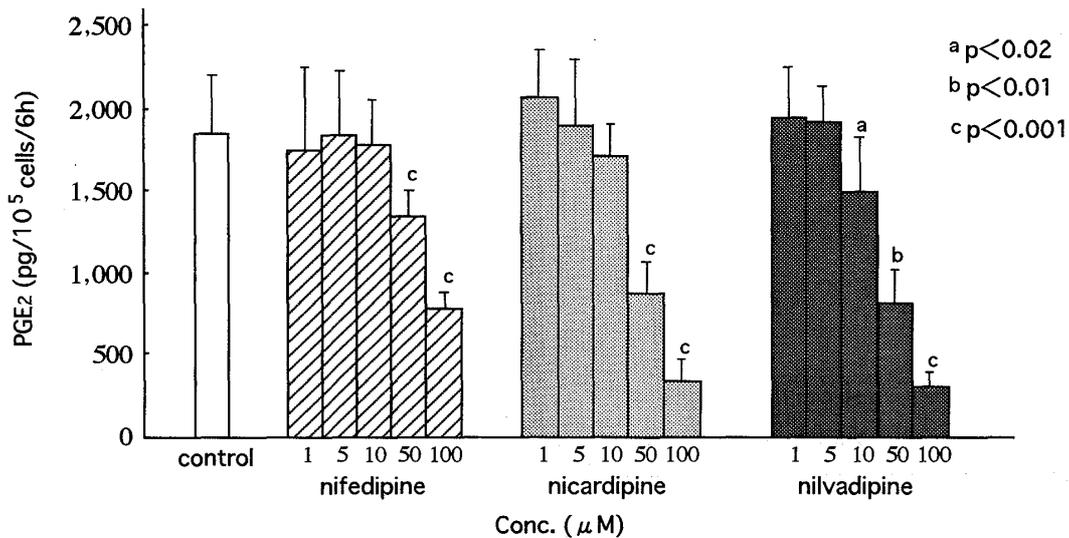


図3 IL-1 β (1U/ml) 刺激による羊膜培養細胞の PGE₂ 産生に及ぼすカルシウム拮抗剤の影響 (mean \pm S.D., n=6)

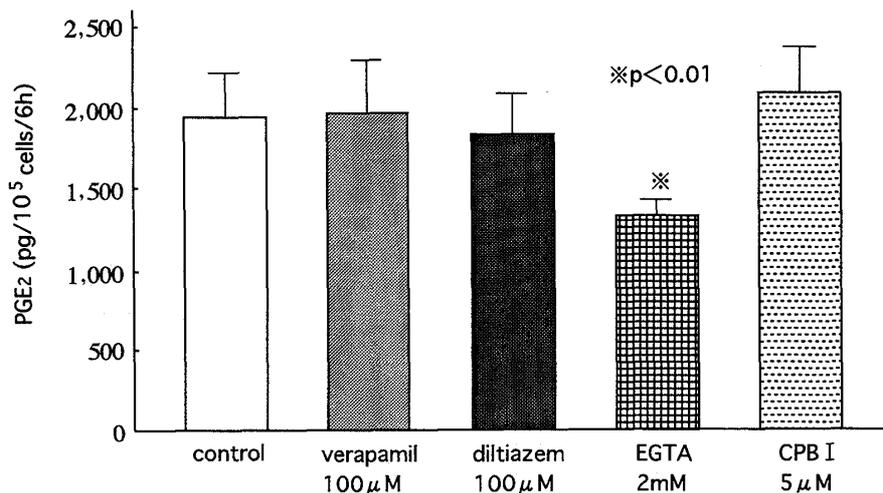


図4 IL-1 β (1U/ml) 刺激による羊膜培養細胞の PGE₂ 産生に及ぼす各種薬剤の影響 (mean \pm S.D., n=6)

μ M, 44.6 μ Mであった。diltiazem, verapamil は全く PLA₂活性を抑制しなかった (図5)。

考 案

カルシウム拮抗剤は興奮性細胞の電位依存性カルシウムチャンネル, 中でも L 型チャンネルを抑制する薬剤であるが, 近年, 非興奮性の細胞に対しても種々の作用を有することが明らかにされてきている。その例を挙げると, 好中球のライソゾーム酵素の放出, 貪食能の抑制⁶⁾, 活性酸素産生の抑制⁷⁾⁸⁾, 血管内皮細胞からのプロスタサイクリン¹⁾, 血小板からのトロンボキサン A₂²⁾, ヒト好中球からの platelet-activating factor とロイコトリエ

ン³⁾, などの脂質メディエーターの放出の抑制などである。これらの異なった脂質代謝への影響よりカルシウム拮抗剤はアラキドン酸代謝の初期のステップに働くことが示唆される。

今回の実験では IL-1 β 刺激による羊膜培養細胞の PGE₂ 産生を dihydropyridine 系カルシウム拮抗剤の nifedipine, nicardipine, nilvadipine が濃度依存性に抑制したが, 他の phenylalkylamine 系の verapamil, benzothiazepine 系の diltiazem は全く抑制効果を示さなかった。dihydropyridines (DHP) のなかでは nicardipine, nilvadipine の作用が同定度強力で, nifedipine はこれに比べ

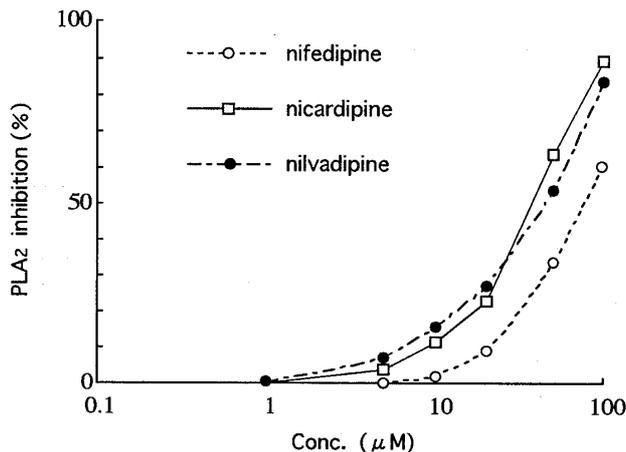


図5 PLA₂活性に対するカルシウム拮抗剤の抑制効果 PLA₂ 0.1IU, [¹⁴C] phosphatidylcholine 5nmol CaCl₂ 5mM, pH 8.0

るとやや弱かった。verapamil, diltiazem が PGE₂ 産生を全く抑制しなかったこと、細胞外の Ca²⁺ を EGTA でキレートしても、DHP ほどには羊膜培養細胞の PGE₂ 産生を抑制しなかったことは、DHP が細胞膜のカルシウムチャンネルを介して PGE₂ 産生を抑制したのではないことを示唆する。DHP は cell-free の条件下において濃度依存性に PLA₂ 活性を抑制し、抑制の強さは nicardipine ≥ nilvadipine > nifedipine の順であり、羊膜培養細胞での PGE₂ 産生抑制の結果とよく一致していることより、これらの薬剤は直接 PLA₂ を抑制することにより羊膜細胞の PGE₂ 産生を抑制することが強く示唆される。

Chang et al.⁹⁾ は nifedipine と nisoldipine が直接 PLA₂ を抑制し、その抑制効果はこれら薬剤に UV を照射してそのカルシウムチャンネル拮抗作用を失わせても、変わらなかったと報告しており、この作用は DHP の中でも phenyl 環の NO₂ 基が ortho 位にある薬剤に特異的な作用であると述べているが、今回の実験で NO₂ 基が meta 位にある nicardipine, nilvadipine にも同様の作用があることが明らかになった。

当教室で胎盤より分離、精製され、内海¹⁰⁾によりその PLA₂ 抑制活性が明らかにされた CPB I が羊膜細胞の PGE₂ 産生を抑制しなかったことは予想外であった。CPB I は in vitro において PLA₂ 活性を 1.3 μM で 80% 抑制することが示されてい

るが、抑制活性発現のためには 10 mM 以上の Ca²⁺ を必要とする。また、細胞膜の内側に存在する PLA₂ を抑制するためには細胞内に入り込まなければならないが、分子量 35,000 の CPB I が細胞膜を通過することはあり得ないと考えられる。以上の理由により、羊膜細胞の PGE₂ 産生を抑制できなかったと思われる。これに対して DHP は細胞内に入って cyclic AMP phosphodiesterase を抑制することが示されており¹¹⁾、細胞内で PLA₂ を抑制することは十分にあり得ることである。

早産の陣痛発来機序はいまだ不明な部分が多いが、早産に絨毛羊膜炎の合併が多い¹²⁾、また絨毛羊膜炎の羊水中に PGE₂ 濃度が高値である¹³⁾ ことなどより感染と prostaglandin が関与している可能性が高い。prostaglandin 産生の機序としては以下のようなことが考えられている。絨毛羊膜炎に関与している細菌自体が PLA₂ を放出し、卵膜においてアラキドン酸代謝を活性化する⁴⁾¹⁴⁾。好中球が PLA₂ を有しこれを放出するか、あるいは好中球自身が活性化された PLA₂ によりアラキドン酸を放出し、卵膜において prostaglandin が産生される¹⁵⁾。また、切迫早産患者の羊水中には非常に高濃度の interleukin-1 (IL-1) が検出される場合が多く、IL-1 の濃度と羊水中の PGE₂, PGF_{2α} の濃度には強い相関があること¹⁶⁾ が示されているが、今回の実験で示したのと同様に IL-1β が羊膜培養細胞の PGE₂ 産生を促進することが報告¹⁷⁾ されており、IL-1 が直接卵膜の prostaglandin 産生を活性化して早産陣痛を発来させる可能性もある。

絨毛羊膜炎の羊水中には prostaglandin だけではなく、リポキシゲナーゼ経路の産生物であるロイコトリエンも増加¹³⁾ しているが、ロイコトリエンにも強力な子宮収縮作用があることが報告¹⁸⁾ されており、早産陣痛の原因のひとつかもしれない。

現在、切迫早産治療の主流は β₂ 刺激剤であるが、前期破水、絨毛羊膜炎等の感染を伴う症例では無効のことが多い¹⁹⁾。Ulmsten et al.²⁰⁾ の報告以来、カルシウム拮抗剤が用いられることも多くなってきたが、カルシウム拮抗剤は ritodrine よりも有効であるという報告²¹⁾ と ritodrine と効果に差がないという報告²²⁾ があり、単剤では rito-

drine よりも優れているとはいえない。しかし、今回の実験によりカルシウム拮抗剤、特に DHP は直接子宮筋の収縮を抑制するだけでなく、PLA₂ 活性を抑制することにより羊膜における PGE₂ 産生を抑制することが強く示唆された。この PLA₂ 抑制作用は羊水中に放出される細菌由来の PLA₂、あるいは好中球の PLA₂ に対しても発揮されると考えられ、prostaglandin のみならず、ロイコトリエン産生も抑制されることが期待される。

以上より DHP は切迫早産の理想的な治療薬といえる。ただし、これらすべての機能を発揮するためには現在用いられているような経口投与 30~60mg/day 程度では血中濃度が数百 nM にしかならず、肝心の羊水腔内ではさらに低濃度であることが予想され、羊膜細胞、あるいは羊水中の細菌、好中球由来の PLA₂ を標的とする量的には全く不足である。薬剤を羊膜腔内に直接投与することによって、よりその作用が発揮されることが期待でき、今後の切迫早産治療に関する研究の新しい方向となる可能性がある。

稿を終えるにあたり、直接御指導、御校閲を賜りました恩師真木正博前教授に深甚なる謝意を表します。

なお、本論文の要旨の一部は第43回ならびに第44回日本産科婦人科学会学術講演会において発表した。

文 献

1. *Crutchley DJ, Ryan JW, Ryan US, Fisher GH.* Bradykinin-induced release of prostacyclin and thromboxanes from bovine pulmonary artery endothelial cells. *Biochem Biophys Acta* 1983; 751: 99-107
2. *Davi G, Novo S, Fiore M, Fodera A, Kattina A, Mazzola A, Strano A.* Effects by nifedipine on thromboxane synthesis in vitro and in vivo. *Thromb Res* 1982; 28: 837-842
3. *Mehta JL.* Influence of calcium channel blockers on platelet function and arachidonic acid metabolism. *Am J Cardiol* 1985; 55: 158B-164B
4. *Bennett PR, Rose MP, Myatt L, Elder MG.* Preterm labor: Stimulation of arachidonic acid metabolism in human amnion cells by bacterial products. *Am J Obstet Gynecol* 1987; 156: 649-655
5. *Lumb MR, Roseblade CK, Helmig R, Ulbjerg N, Sullivan MHF, Elder MG.* Use of a new simplified assay for phospholipase A₂ to mea-

- sure bacterial enzyme levels. *Clinica Chimica Acta* 1990; 189: 39-46
6. *Elferink JGR.* Interference of the calcium antagonists verapamil and nifedipine with lysosomal enzyme release from rabbit polymorphonuclear leukocytes. *Arzneim -Forsh/Drug Res* 1982; 32: 1417-1420
7. *Simchowicz L, Spilberg I.* Generation of superoxide radicals by human peripheral neutrophils activated by chemotactic factor. Evidence for the role of calcium. *J Lab Clin Med* 1979; 93: 583-593
8. *Stocker R, Richiter C.* Involvement of calcium, calmoduline and phospholipase A in the alteration of membrane dynamics and superoxide production of human neutrophils stimulated by phorbol myristate acetate. *FEBS Lett* 1982; 147: 243-246
9. *Chang J, Blazek E, Carlson RP.* Inhibition of phospholipase A₂(PLA₂) activity by nifedipine and nisoldipine is independent of their calcium-channel-blocking activity. *Inflammation* 1987; 11: 353-364
10. 内海 透. Calphobindins による phospholipase A₂ 及び phospholipase C 阻止活性に関する研究. *日産婦誌* 1992; 44: 793-799
11. *Godfraind T, Miller R, Wibo M.* Calcium antagonism and calcium entry blockade. *Pharmacol Rev* 1986; 38: 321-416
12. *Guzick DS, Wink K.* The association of chorioamnionitis with preterm delivery. *Obstet Gynecol* 1985; 65: 11-16
13. *Lopez BA, Hansell DJ, Canete SR, Keeling JW, Turnbull AC.* Prostaglandins, chorioamnionitis and preterm labour. *Br J Obstet Gynecol* 1987; 94: 1156-1158
14. *Bejar R, Curbelo V, Davis C, Gluck AL.* Premature labor. II. Bacterial sources of phospholipase. *Obstet Gynecol* 1981; 57: 479-482
15. *Bry K, Hallman M.* Prostaglandins, inflammation, and preterm labor. *J Perinatol* 1989; 9: 60-65
16. *Romero R, Brody DT, Oyarzun E, Mazor M, Wu YK, Hobbins JC, Durum SK.* Infection and labor III. Interleukin-1: A signal for the onset of parturition. *Am J Obstet Gynecol* 1989; 160: 1117-1123
17. *Romero R, Durum S, Dinarello CA, Oyarzun E, Hobbins JC, Mitchell MD.* Interleukin-1 stimulates prostaglandin biosynthesis by human amnion. *Prostaglandins* 1989; 37: 13-22
18. 秋山直道. 子宮内微生物感染と流・早産. *Medical*

- Tribune 1989 ; 42—44
19. *Hameed C, Tejani N, Verma UL, Archbald F.* Silent chorioamnionitis as a cause of preterm labor refractory to tocolytic therapy. *Am J Obstet Gynecol* 1984 ; 149 : 726—730
20. *Ulmsten U, Andersson K-E, Wingerup L.* Treatment of premature labor with the calcium antagonist nifedipine. *Arch Gynecol* 1980 ; 229 : 1—5
21. *Read MD, Wellby DE.* The use of a calcium antagonist (nifedipine) to suppress preterm labor. *Br J Obstet Gynaecol* 1986 ; 93 : 933—937
22. *Ferguson JE, Dyson DC, Schutz T, Stevenson DK.* A comparison of tocolysis with nifedipine or ritodrine : Analysis of efficacy and maternal, fetal, and neonatal outcome. *Am J Obstet Gynecol* 1990 ; 163 : 105—111
- (No. 7437 平 5 ・ 9 ・ 17 受付)
-