

侵襲と臓器障害発症との間をつなぐものとその対策

——Protease——

鹿児島大学医学部 麻醉科 小田 利通

はじめに

蛋白分解酵素は組織内、血中に広範に存在しており、蛋白代謝や血液凝固・線溶など生理機能に深く関わっている。蛋白分解酵素は通常ライソゾームをはじめとする細胞内小器官内に内包されるか、または血液凝固因子のように不活性な状態で循環するなど生理的状态では生体に不利益な影響を及ぼさないような状態で存在している。しかし、生体に侵襲が加わると局在部位からの逸脱や活性化が起こり細胞破壊、DIC等の発生により病態の進行を促進する。今回は主として出血性低血圧時のライソゾームおよびライソゾーム酵素の変化をもとに、侵襲時の臓器障害の発生と蛋白分解酵素との係わりについて考えてみたい。

1. 侵襲時のライソゾームの変化とライソゾーム酵素の動態

24時間絶食した7-8週令の200~250gの雄ウィスター系ラットを用いて、動脈血圧を40mmHgに2時間維持した出血性ショックモデルを作製して、ライソゾームの変化をGomori法で染色した肝組織標本を用いて電顕的に観察した(図1)。生理的状态のライソゾームの形状は円形で顆粒の密度も小さかったが、低血圧2時間後にはライソゾームはそのサイズが増大するとともに大小不整が著しくなり、さらに空胞化、膜の断裂等の変性所見を呈するものが増加した。電顕写真上で測定したライソゾームのサイズは約5倍に増大していた⁹⁾。

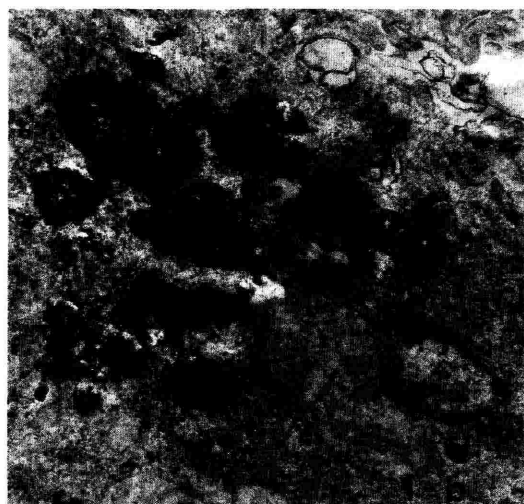
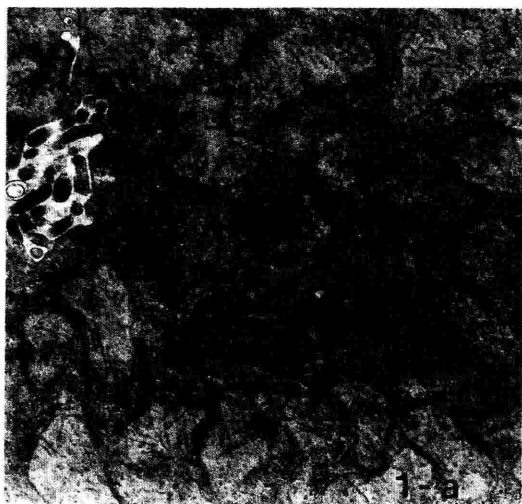


図1 出血性低血圧時の肝ライソゾーム
1-a ; 対照 1-b ; 低血圧2時間後

出血性低血圧2時間後の肝のライソゾーム酵素活性を、ライソゾーム分画で検出される酵素活性即ちライソゾーム内に存在すると考えられる酵素活性と、細胞質で検出される酵素活性即ちライソゾームから細胞質へ遊離したと考えられる酵素活性とに分けて調べてみると(図2)、低血圧後にはライソゾーム分画の酵素活性は有意に低下し、細胞質分画の酵素活性は有意に上昇した。これより出血性ショック時にはライソゾーム酵素がライソゾーム外へ遊離することが明らかである。また肝組織全体の酵素活性は低下する傾向を示し、ライソゾーム外へ逸脱した酵素は臓器外へと移行することが示唆された。

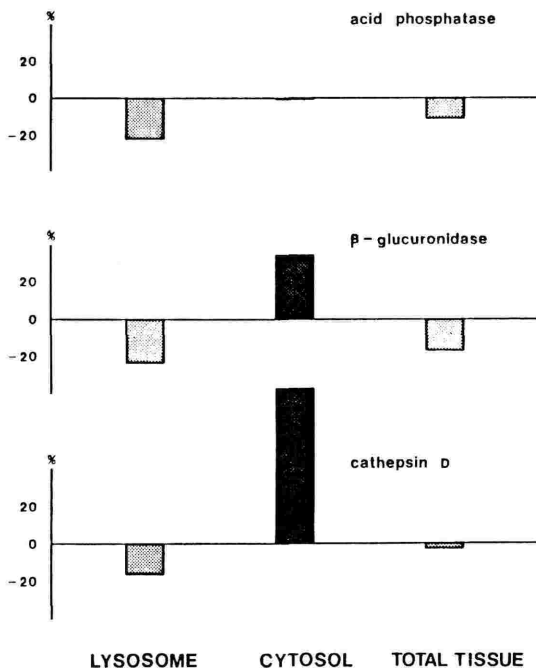


図2 出血性低血圧時の肝内各分画のライソゾーム酵素活性

Glenn らは出血性低血圧時のカテプシン群の変動と組織内ライソゾームの変化との関連を調べている²⁾。カテプシンDについてみてみると、図3に示すように出血性ショックが重症化するにつれて血中における酵素活性が上昇したが、この時内臓領域では組織内酵素活性は著明に低下し、特に脾臓では70%に達する活性の低下が認められたことから出血性ショック時の血中ライソゾーム酵素は主として内臓領域に由来することを示唆している。

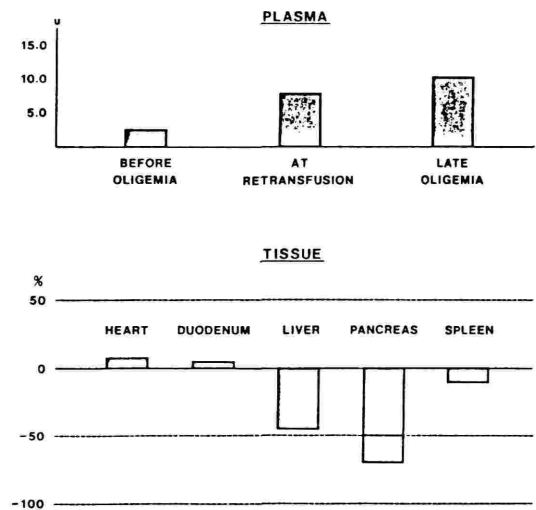


図3 出血性低血圧時の臓器内カテプシンD活性の変動²⁾

2. ライソゾームからの酵素遊離に関する因子

ライソゾームからの酵素遊離には低酸素、アシドーシスなどが関与するとされている。図4は出血性低血圧時の諸量の変動を調べた結果である。肝の組織酸素分圧は、正常では中央値は30mmHg前後でベル型と呼ばれるような分布の型をしているが、脱血すると分布は左方へシフトし平均動脈血圧40mmHgでは酸素分圧は0から5mmHgの範囲に85%前後が分布し、脱血により組織には著明な低酸素状態が発生する。

このとき血液では代謝性アシデミアが進行し、2時間後にはpHは7.00付近までに低下した。ラット肝の細胞内pHを調べたRothe の成績によると³⁾、細胞内pHの変動は細胞外pHの変化分の概ね1/2 ($\Delta pH_i / \Delta pH_e = 0.502$)で、ショック時に細胞外pHが7.40から7.00まで低下すると細胞内pHは6.95から約6.75まで低下するものと考えられる。

このような低酸素状態の発生にともないショック時には代謝が障害され細胞内エネルギーレベルが低下することは周知のことであるが、出血性低血圧を2時間維持すると、肝ATPは脱血前の約20% ($0.5 \times 10^{-6}M$)までに減少し、著しくエネルギーレベルが低下した。

Ignarro ら⁴⁾は細胞内 cAMP 濃度の低下、cGMP/cAMP 比の低下がライソゾーム膜の不安定化をもたらすことを

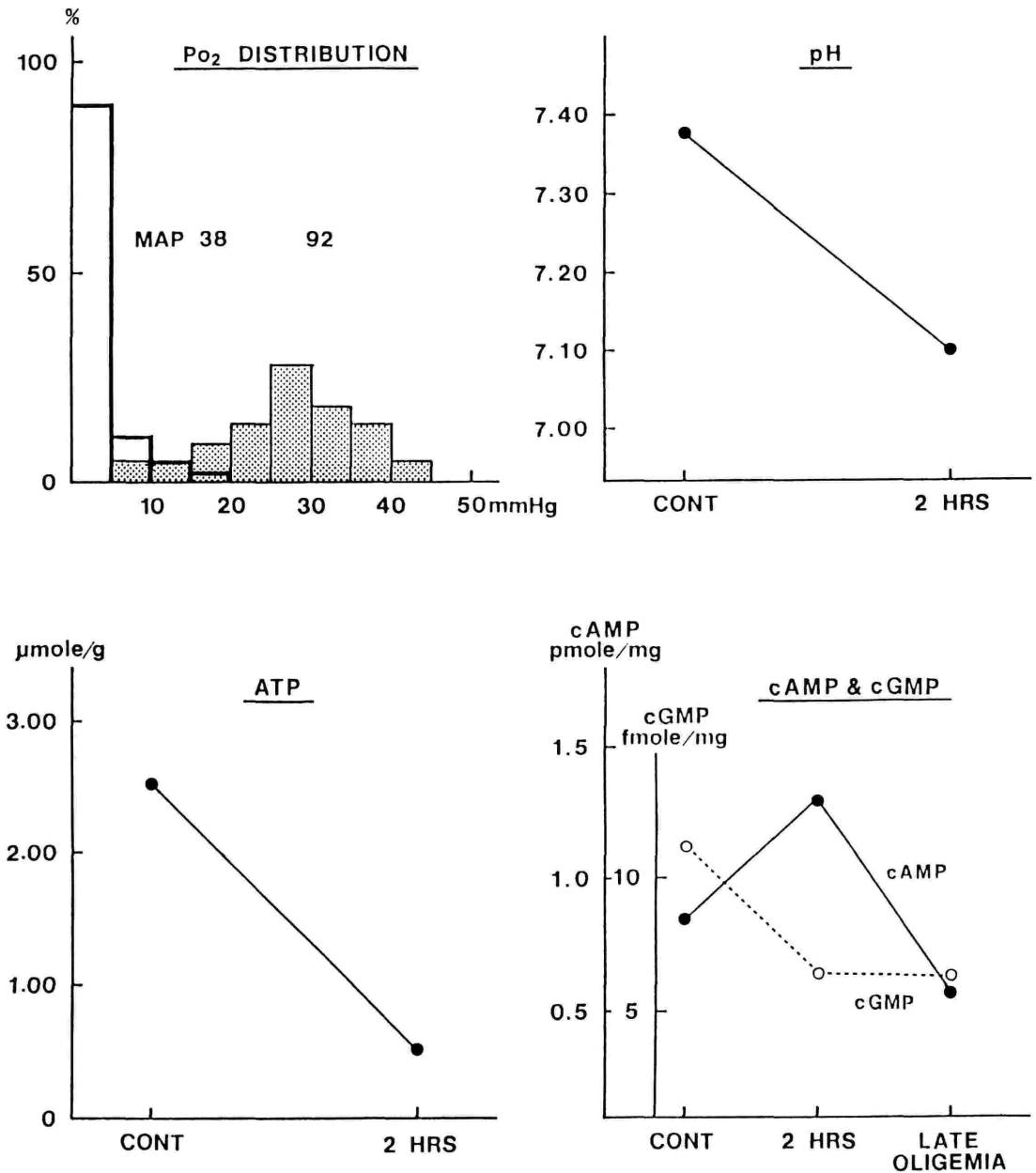


図4 出血性低血圧時の諸量の変動

報告している。Cyclic nucleotidesは2nd messengerとして細胞機能の調節に関与しているが、ライソゾームからの酵素遊離においても大きな役割を演じている。即ち、cGMPが増加するとcGMP依存性蛋白質キナーゼが活性化され、その結果微小線維がリン酸化されて収縮を起しライソゾームが細胞膜へと移動し、ライソゾーム酵素が

細胞外へと放出される。cGMPはcAMPと拮抗的に作用すると考えられている。出血性低血圧時の肝組織内cyclic nucleotidesを調べてみると、図に示すようにcAMPは低血圧の発生とともに上昇し、以後高いレベルに保たれ、死亡直前になって低下した。これに対しcGMP濃度は動揺は示すが全般的には低血圧初期より低下し、このため

cAMP/cGMP 比は低血圧中は高く保たれ死亡直前になって低下した。

そこでラットの肝からライソゾーム分画を分離して、0.25M ショ糖液中で37°Cで60分間、pH, PO_2 , ATP, cAMP の異なる条件でインキュベートし、メディウム中に遊離してくる酵素の活性を測定することによりこれらがライソゾーム膜にどのような影響を及ぼすかを検討した(図5)。

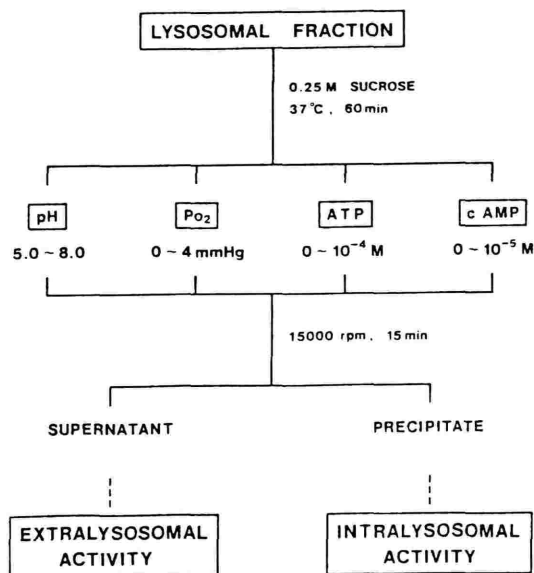


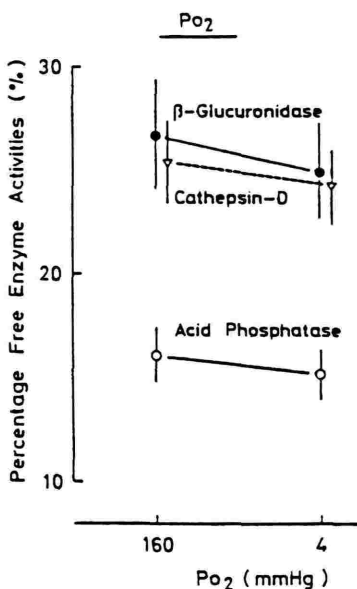
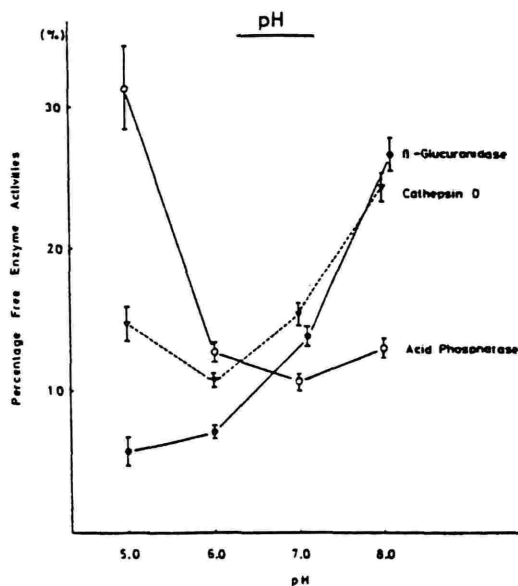
図5 ライソゾーム膜に対する pH、 PO_2 、ATP、cAMP の影響—実験方法

その結果⁵⁾(図6)，①pHは7.0付近で最も酵素遊離の程度が軽度で、それ以上または以下のpHでは酵素遊離が増したことより、ライソゾーム膜は正常の細胞質pHと考えられるpH7.0付近で最も安定しており、ショック時に細胞質pHが低下するとライソゾーム膜は不安定化し、ライソゾーム酵素がライソゾーム外へ遊離することが示唆された。

②インキュベーションメディウムの PO_2 を0~4mmHgまで低下させて、遊離する酵素の活性を測定したが、酵素遊離は増加しなかった。従って、低酸素自体はライソゾーム膜を不安定化しないと考えられた。③インキュベーションメディウム中のATP濃度が 10^{-7} M以上で有意に酵素遊離が抑制され、細胞内エネルギーレベルが低下する

とライソゾームからの酵素遊離が促進されることが示唆された。④ cAMP は 10^{-8} M以上の濃度で酵素遊離が抑制された。

以上のことより、出血性低血圧においてライソゾームから酵素が遊離する機序としては細胞内エネルギーレベルの低下、アシドーシスが大きく関与し、病態が進行してから cAMP の低下も関与すると考えられた。ライソゾームからの酵素遊離にはこの他細胞内カルシウム濃度の



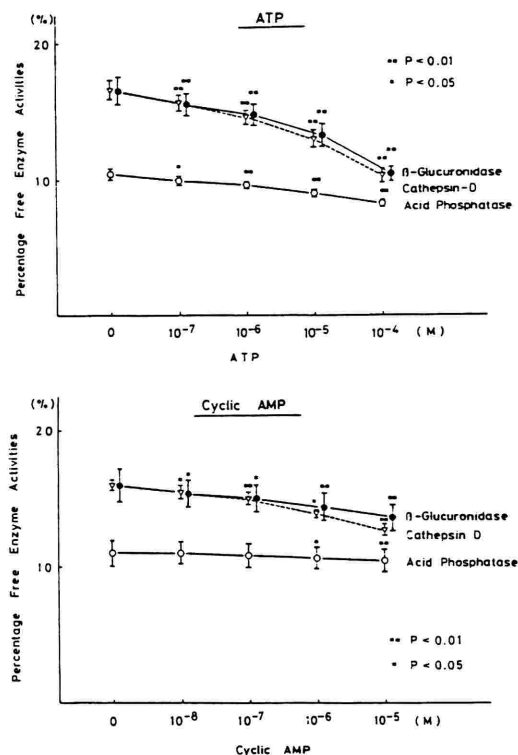


図6 ライソゾーム膜に対する pH、P_{O2}、ATP、cAMP の影響

上昇、遊離基によるライソゾーム膜の攻撃等多くの因子が関与すると考えられている。

ライソゾーム酵素の局在や存在様式は多様であるが、ライソゾーム酵素の多くは包膜と結合し“構造的に組み込まれた”潜在性を示し、一般にはライソゾーム包膜が壊れないと、その内部の酵素は活性を示さない。ショック時には細胞内pHの低下、イオン分布の異常、エネルギーレベルの低下等により酵素の包膜との結合に異常が生ずるとともに、ライソゾームの膨化、空胞化、膜破壊等の構造的な乱れが起り、これに伴いライソゾーム酵素の活性化が誘導されるとともに、活性化された酵素のライソゾーム外への遊離が引き起こされると考えられる。また細胞内に取り込まれた物質を分解するには、酵素と基質が特定の位置関係を保ち、各段階を触媒する酵素が決まった配列をしていることが必要であるが、ショック時に起こるライソゾームの膜構造の乱れによりライソゾーム本来の機能も著しく障害されると考えられる。

3. 蛋白分解酵素による障害

分離したライソゾームを用いたin vitroの研究や静脈内投与した研究で、ライソゾーム酵素は循環障害、エネルギー代謝障害、毒性因子の産生、血液凝固障害、肺障害等、侵襲時に種々の病態の発現に関与することが示唆されている^{8) - 9)}。

図7はLefer¹⁰⁾によって提唱された MDFの産生機序であるが、蛋白分解酵素により細胞構成蛋白質が分解され MDFが産生される。蛋白分解酵素は心収縮性の低下をもたらす MDFの産生等を通じ生体機能障害をもたらすが、その過程で細胞構成蛋白質が分解されることは、細胞構築を破壊という観点から細胞障害を不可逆的にする大きな要因になるものと考えられる。

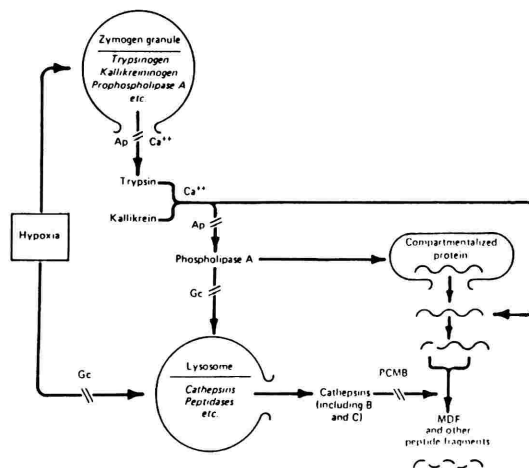


図7 MDFの産生機序¹⁰⁾

さらに蛋白分解酵素による臓器障害の発生機序として細胞間マトリックスの障害に目を向ける必要がある。臓器は細胞と、細胞間を連結する組織より成立っている。細胞間は、コラーゲン、グリコプロテイン、プロテオグリカン等で結合されているが、この細胞間マトリックスは単に細胞間の結合のみならず、細胞増殖、物質輸送、分泌等に関与し、細胞相互の機能調節に深く係わっていることが示されている^{11) 12)}。澁谷¹³⁾は培養した線維芽細胞を用い、これに白血球ホモジネートを加えると細胞間のフィブロネクチンが分解されることより、侵襲時に白血球由来の蛋白分解酵素により細胞間マトリックスが破壊される可能性を示唆している。このような細胞

間の異常は侵襲時の病態の進行を決定する要因になると考えられている¹⁴⁾。

以上のように侵襲時には蛋白分解酵素は循環、代謝等機能面の障害を起こすが、さらに細胞構成蛋白質や構造蛋白質を破壊し、細胞および細胞間マトリックスの構造的破壊を引き起こすことにより、臓器不全発症をもたらす大きな要因になると考えられる。

4. 蛋白分解酵素による障害に対する治療

(1) 治療開始の時期

侵襲時に蛋白分解酵素に由来する病態がどのような時期に発生するかを知ることは、蛋白分解酵素に対する治療を開始する時期を決定する上で重要であると考えられる。このような観点から侵襲が加わった後、細胞内でライソゾームの変化がどのくらいして起こるかを検討した。図8は平均動脈圧40mmHgの出血性低血圧を導入した後の肝ライソゾームのサイズの経時変化を調べた結果であるが、電顕上で計測したライソゾームの断面積は低血圧導入30分後にはすでに 1.7倍に有意に増大していた。

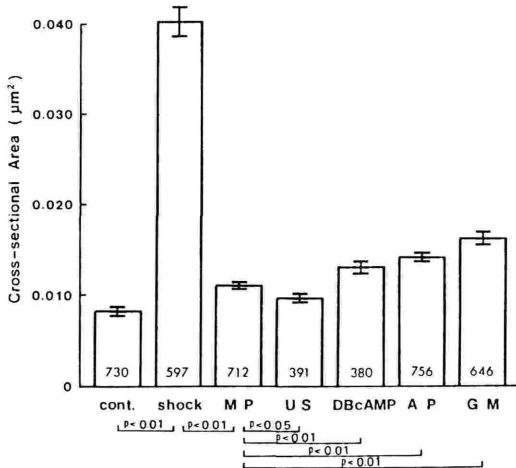


図8 抗ショック薬の肝ライソゾームに対する効果
MP: methylprednisolone US: urinastatin
DBCAMP: dibutyl cAMP AP: aprotinin
GM: gabexate mesilate

ライソゾームはショックの病態の悪化を促進する因子としてとらえられており、一般にショックがかなり進行してから病態の進行に関与するものと考えられている。

しかし、このようにライソゾームの形態学的な変化が早期から起こり、また前述したように形態の異常が酵素遊離等の機能的異常を伴うと考えられることから、蛋白分解酵素に由来する病態は、生体に侵襲が加わると早い時期から発生することが示唆された。従って蛋白分解酵素に対する治療、特に細胞内局在部位における安定化を図ることは早期に開始する必要があるものと考えられた。

(2) 抗ショック薬による治療

蛋白分解酵素に対する治療としては、大きく分けてライソゾームをはじめとする細胞内小器官からの酵素遊離を抑制する方法と、活性化された酵素を阻害する方法即ち蛋白分解酵素阻害薬の使用とに分けられるが、局在部位から遊離した酵素が直ちに細胞障害を起こすことを考えると、細胞内における治療を優先させる必要があろう。

図9は平均動脈圧を40mmHgに2時間維持した出血性低血圧のラット肝ライソゾームの変化に対する、各種抗ショック薬の効果を調べたものである¹⁵⁾。出血性低血圧では、図1に示したようにライソゾームの断面積は約5倍に増大したが、いずれの薬剤でもライソゾームの膨化は有意に抑制されており、これらの薬剤は細胞内においてライソゾームを安定化し、蛋白分解酵素をはじめとする酵素の攻撃から細胞を防護する役割を果たすものと期待される。

これらの薬剤が細胞内でライソゾームを安定化させる機序として、methylprednisoloneはライソゾーム膜安定化作用に負うところが大きいと考えられるが、これ以外の抗ショック薬についてはurinastatin¹⁶⁾、aprotinin、gabexate mesilate¹⁷⁾も膜安定化作用を有するほか、dibutyl cAMPに関しては、cAMP/ cGMP 比の低下はライソゾーム膜の脆弱性に関与し、その低下はライソゾーム酵素の遊離を促進すると考えられることから、dibutyl cAMP 投与により cAMP/ cGMP 比が上昇し、ライソゾーム膜が安定化することを期待しうる等、これらの薬剤は細胞内で直接ライソゾームを安定化させる作用を有すると考えられる。

澁谷らが侵襲時に白血球由来の蛋白分解酵素により細胞間マトリックスが破壊される可能性を示唆したことは

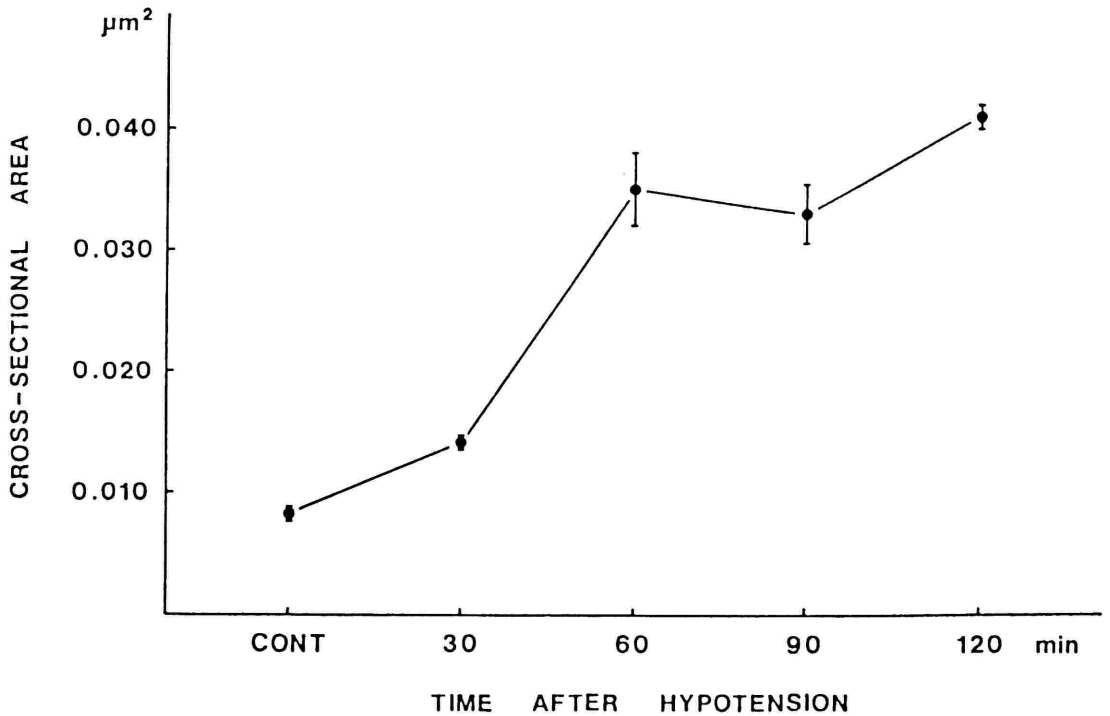


図8 出血性低血圧時の肝ライソゾームのサイズの経時変化

すでに述べたが¹³⁾、彼等はさらにこの破壊はelastase, collagenase, hyaluronidase阻害作用を有するurinastatinにより防止できることから、蛋白分解酵素阻害薬により細胞間マトリックスの破壊を防止できることを示している。このような観点からも、細胞障害から臓器障害の防止という方向で蛋白分解酵素阻害薬の応用が広がると考えられる。

おわりに

侵襲時には蛋白分解酵素が活性化されるとともに、各区画より遊離し細胞機能の障害に加え、組織の構造的破壊をもたらす臓器不全へと導く大きな要因となるものと考えられる。従って侵襲時には細胞内、細胞間マトリックス、血中等広範な領域の蛋白分解酵素をターゲットにした治療を組み立てる必要があろう。

文 献

- 1) 宮脇武徳, 鮫島照子, 宮尾純子ほか
出血性低血圧ラット肝ライソゾームに対するFOY
(メシル酸ガベキセート)の効果—組織学的方法
による検討
麻酔 33:263-268, 1984.
- 2) Glenn TM, Lefer AM.
Significance of splanchnic proteases in the
production of a toxic factor in hemorrhagic
shock
Circ Res 24:338-349, 1971.
- 3) Rothe KF.
Regulation of intracellular acid-base equi-
librium in rats
Acta Anaesthesiol Scand 27:443-450, 1983.
- 4) Ignarro LJ, Krassikoff N, Slywka J.
Release of enzymes from a rat liver lysosome
fraction: Inhibition by catecholamines and -

- cyclic 3',5'-adenosine monophosphate, stimulation by cholinergic agents and cyclic 3',5'-guanosine monophosphate
J Pharmacol Exp Ther 186:86-99, 1973.
- 5) 鮫島照子, 小田利通, 宮尾純子ほか
ショック時のライソゾーム膜の不安定化機序について
麻酔 34:560, 1985.
- 6) Glenn TM, Lefer AM, Beardsley AC et al.
Circulatory response to splanchnic lysosomal hydrolases in the dog
Ann Surg 176:120-127, 1972.
- 7) Mellors A, Tappell AL, Sawant PL, et al.
Mitochondrial swelling and uncoupling of oxidative phosphorylation by lysosomes
Ann Surg 178:727-735, 1973.
- 8) Gazzaniga AB, O'Connor NE.
Effects of intravenous infusion of autologous kidney lysosomal enzymes in the dog
Ann Surg 172:804-812, 1970.
- 9) Toomasian JN, Pezzlo F, Gazzaniga AB.
Pulmonary changes following infusion of hepatic lysosomal enzymes in the rat
J Surg Res 29:488-496, 1980.
- 10) Lefer AM.
Properties of cardioinhibitory factors produced in shock Fed Proc 37:2734-2740, 1978.
- 11) 大平敦彦
細胞表層に存在するヘパラン硫酸プロテオグリカンの構造と機能
代謝 21:305-313, 1984.
- 12) Martin GR, Kleinman HK.
The extracellular matrix in development and in disease
Semin Liver Dis 5:147-156, 1985
- 13) 澁谷靖義, 国広靖之
ウリナスタチンの組織崩壊防御作用
薬理と治療 14:6057-6072, 1986.
- 14) Heine H, Domann M.
Fibronectin-a plasmin-sensitive glycoprotein of the transit
zone: Protection by aprotinin
Arzneim.-Forsch./Drug Res 34:696-698, 1984.
- 15) 宮脇武徳, 小田利通, 鮫島照子ほか
抗ショック薬のライソゾームに及ぼす効果について
麻酔 37:815-822, 1988.
- 16) 小田利通, 鮫島照子, 宮脇武徳ほか
ヒト尿中トリプシン阻害物質 (MR-20) の抗ショック作用について
麻酔 33:137-142, 1984.
- 17) Oda T, Miyawaki T, Sameshima T, et al. :Antishock effects of gabevate mesilate (FOY).
in Molecular and Cellular Aspects of Shock and Trauma
Lefer AM, Schurer W. (eds) p.293 1983.
Alan R. Liss, New York