

活性酸素の消長よりみたエンドトキシンショックに対する抗酸化剤

・蛋白分解酵素阻害剤の作用

—in vivo, in vitro での実験的検討—

防衛医科大学校第1外科

田口 順 門田 俊夫 玉態 正悦

Endotoxin ショック時の循環・臓器障害への活性酸素の関与と、これに対する抗酸化剤・蛋白分解酵素阻害剤の効果をラット実験モデルで検討した。Endotoxin 4mg/kg を静注して血圧・肝組織血流をモニターし、好中球 O_2^- 産生能、肝組織過酸化脂質を計測し、肝臓からの化学発光の変化、肝細胞 mitochondria の変化を観察した (n=16)。その結果、一過性の血圧・血流の低下と同時に、好中球 O_2^- 産生能の上昇、肝組織過酸化脂質の増加、肝臓からの化学発光の増強を認めた。また、肝細胞 mitochondria の崩壊が観察され endotoxin ショック時の病態に活性酸素が関与していることが示唆された。さらに superoxide dismutase 1.5万単位+catalase 4mg, CoQ₁₀ 5ml/kg, Solcoseryl 4ml, nafamostat mesilate 10mg/kg, ulinastatin 10万単位/kg (各 n=6) の前投与を開始して同様に実験を行い比較した結果、各薬剤で抑制傾向が認められ抗酸化剤・蛋白分解酵素阻害剤の予防効果を認めた。

Key words: endotoxin shock, active oxygen, antioxidant, protease inhibitor

I. 緒 言

消化器外科領域で遭遇する難治性の多臓器障害症候群 (multiple organ failure 以下 MOF) は細菌性ショックを伴う重症感染症に続発することが多く、複数の臓器に同時あるいは連続的に障害を生じ、死亡率のきわめて高い病態である。一方、細菌性ショックにはグラム陰性桿菌由来の endotoxin (以下 Et.) がしばしば関与していることが知られ多くの研究がなされてきたものの、どのような機序で細胞・組織・臓器障害が発生するかについてはいまだに疑問な点が多い。近年、ショックのような組織の低灌流、低酸素状態において、臓器に過酸化脂質が蓄積することが報告されて以来^{1)~3)}、細菌性ショックを始め各種のショック状態における活性酸素の関与が注目されてきている。

活性酸素は虚血・再灌流、低酸素状態、アラキドン酸カスケードの活性化、補体による白血球凝集・膠着などにより生成される^{4)~7)}。一方、Et. は種々の生物活性を有しており、直接的な細胞の刺激・障害のほかに、補体の活性化、種々の化学伝達物質の産生・放出、凝固・線溶系の活性化、プロスタグランジン代謝系の活

性化等の作用を示し、種々の状況下で活性酸素を産生するものと考えられる。しかし、実際には Et. による活性酸素がどこから生じ、いかなる機序で臓器障害へと進行していくかについてはいまだ不明な点が少なくない。

今回、われわれは Et. により引き起こされる MOF の媒介因子として活性酸素に着目してラットの Et. ショックモデルを用い、MOF の中でも特に重要な役割を担っている肝障害の発生を焦点に実験的検討を行った。さらに活性酸素の抑制ないしは消去の面から抗酸化剤である superoxide dismutase (以下 SOD) と catalase (以下 CAT), coenzyme Q₁₀ (以下 CoQ₁₀), 組織修復作用を有し抗酸化剤類似作用が報告されている⁸⁾⁹⁾ Solcoseryl や、すでに臨床的に播種性血管内凝固症候群 (disseminated intravascular coagulation 以下 DIC) やショックの治療に用いられている蛋白分解酵素阻害剤である nafamostat mesilate (以下 nafamostat), ulinastatin の MOF 予防および治療効果についても実験的に検討を行った。

II. 研究方法

1) 実験 1 : Et. による循環動態、好中球 O_2^- 産生能、肝組織脂質過酸化および肝細胞 mitochondria への影響と各薬剤の抑制効果

(a) 目的

ラット Et. ショックモデルを作成し、(1) ショック状態における活性酸素の関与を知るため活性酸素生成系の1つとして重要視されている好中球の O_2^- 産生能、(2) ショック臓器の1つとみなされる肝臓の組織過酸化脂質の増加の有無、(3) 細胞内器官のうち酸素消費の場として主要な働きを有する mitochondria の電顕像の変化をそれぞれ検討した。さらに、各種薬剤のこれらの変化に対する抑制効果を検討した。

(b) 実験群

Donryu 雄性ラット (300~450g) を以下の6群に分け、実験を行った。

1群：生食群(16匹)、生理食塩水1ml/hを持続注入器にて静脈投与。

2群：SOD+CAT群(6匹)、SOD (Sigma社製 Bovine Erythrocytes) 15,000単位とCAT (Sigma社製) 4mgを4mlの生理食塩水に溶解したものを1ml/hにて持続静注。

3群：CoQ₁₀群(6匹)、CoQ₁₀ (エーザイ E0216-Z051) 5ml/kgを静注した後、生理食塩水1ml/hを持続投与。

4群：Solcosery 1群(6匹)、Solcoseryl (大鵬薬品) 4mlを1ml/hにて持続注入。

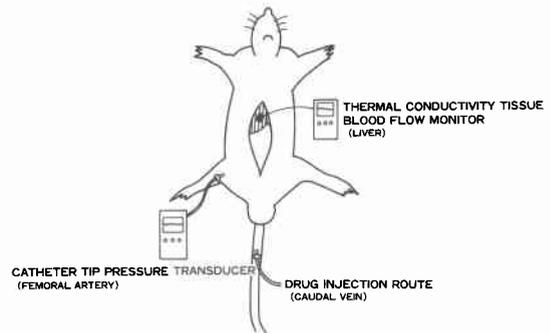
5群：ulinastatin群(6匹)、ulinastatin (持田製薬) 25,000単位/kg/hにて持続注入。

6群：nafamostat群(6匹)、nafamostat (鳥居薬品) 2.5mg/kg/hにて持続注入。

(c) 実験方法

ラットは実験に先立ち12時間飲水以外禁食とした。軽いエーテル吸入麻酔下に尾静脈へ22G 静脈留置計 (テルモ・サーフロー®) にて静脈ルートを確認し、ここより pentobarbital 0.5ml/kg を静注。引き続き腹腔内に0.4ml 注入して麻酔を行った後、股動脈にカテーテルチップ型圧トランスデューサー-持続血圧モニター計 (Gaeltec S7b, England) を装着した。続いて開腹し、肝中間葉に制御差温式組織血流モニター (ユニークメディカル UMV-100, Tokyo) のプローブを装着した (Fig. 1)。血圧、肝組織血流が安定した後各群の薬剤の投与を開始し、15分後に Et. の増感剤である酢酸鉛 Pb(CH₃COO)₂ 5mg/body を側管静注し、さらに15分後に Et. (Difco社製 E. coli 0111:B₄) 4mg/kg を側管静注して、血圧、肝組織血流を210分間持続モニターした。その後、採血 (2ml) と肝右葉の一部を採取した。

Fig. 1 Rat endotoxin-induced experimental shock model

(d) 好中球 O_2^- 産生能と過酸化脂質測定法

好中球 O_2^- 産生能は、まず Rosen ら¹⁰⁾の方法に従って好中球を分離した。すなわち、ヘパリン加血液4mlに6%デキストラン生食1mlを加え、30分静置後上清をとり、700g 10分冷却遠沈し、上澄みを捨て30mlの低張液 (10mM KCl, 1mM MgCl₂を含む10mM Tris・HCl, pH 7.4)を加えて30秒攪拌した。これに10mlの高張液 (8.0g NaCl, 0.2g KCl, 1.15g Na₂HPO₄, 0.2g KH₂PO₄, 0.1g CaCl₂, 0.1g CaCl₂, 0.1g MgCl₂・6H₂Oを蒸留水250mlに溶解)を加えて、700g 10分冷却遠沈し、上澄みを捨てて Hank's Balanced Salt Solution (HBSS) (pH 7.4 adjust with 280mOsm/kg Na₂HPO₄)を40ml加えて攪拌した後、700g 10分冷却遠沈した。

次に、中野ら¹¹⁾の方法に従って、その好中球を10万個/2mlを採取し、ウミホタルルシフェリンアナログの2-methyl-6-[p-methoxyphenyl]-3,7-dihydroimidazo [1,2-a] pyrazin-3-one (以下 MCLA) 1 μ M 100 μ lを加え、オプソニン化ザイモザン (OZ) 100 μ lで刺激して、産生させた O_2^- を Luminescence Reader (アロカ BLR-102, Tokyo)を用いて測定し、最大化学発光強度をもって O_2^- 産生能とした。

OZは、ザイモザン Aを4.0mg/mlになるように pH 7.4のペロナル HCL buffer に溶解した後、100 $^{\circ}$ C、100分間 incubation して膨潤させた。これを3,000rpm 10分遠心分離後、ザイモザン100mg に対して1mlの新鮮ブルー血清を加え、よく攪拌後、37 $^{\circ}$ C 30分間 incubation し、ザイモザンをオプソニン化した。これを HBSS 20ml で2回遠心洗浄し、20mg/ml (HBSS) に調整したものを使用した。

過酸化脂質は八木法¹²⁾に準じ、過酸化脂質の分解で

生じる malon dialdehyde (MDA) を thiobarbiturate (TBA) と縮合させて定量し測定した。

また、採取した肝組織の1部を電顕用の試料とし、2.5%glutaric aldehyde で固定し、1%osmic acid で2次固定をした。その後型通りの標本を作製し、肝細胞の mitochondria の変化を観察した。

結果はすべて mean±SEM で示し、有意差検定は Student's test にて行い、 $p < 0.05$ をもって有意差の指標とした。

2) 実験2: Et. ショック時の生体肝 O_2^- 誘発化学発光の推移と各薬剤の抑制効果

(a) 目的

Et. ショックモデルにおける in vivo での O_2^- 発生動態を観察するとともに各薬剤の抑制効果を検討した。

(b) 実験群

実験1と同じラットを同様に6群に分けて行った。

(c) 実験方法

実験1と同様に麻酔を行った後、もう一方の尾静脈に MCLA 持続投与ルートを確認し、開腹して肝臓を露出した。肝臓以外は黒布で覆い他から発生する光子を遮断して、露出肝を光電子増倍管測定面に向けて光子計測装置(東北電子社製 CL detector, CLD-88)内に固定した。MCLA(生食に溶解し、終濃度を $100\mu M$ としたもの)0.5ml を静注した後、1.5ml/h の速度で持続注入を開始し、発光が安定した後、実験1と同様に各群の薬剤、酢酸鉛、Et. を投与し、肝表面からの化学発光の推移を120分間観察した。なお MCLA 静注後安

定した時点の発光強度を1.0として発光の変化を比率にて求めた (Fig. 2)。

III. 結果

1) 血圧

生食群では Et. 投与後60分、90分と低下を続け、Et. 投与前の67%まで低下が見られた。これに対し、SOD+CAT 群では60分以降低下は見られず、生食群との間に有意の差を認めた。ulinastatin 投与群では60分、90分で血圧の低下が見られるものの、Et. 投与前の90%までの低下にとどまり、Et. による血圧下降を有意に抑制した。nafamostat 群では生食群と同様に90分で72%まで低下したが、210分後には113%の値に回復し、生食群78%に対し有意の回復が認められた。一方 CoQ₁₀ 群、Solcoseryl 1 群では生食群との間に有意差を認めなかった (Fig. 3)。

Fig. 3 Changes in the systemic blood pressure after endotoxin administration

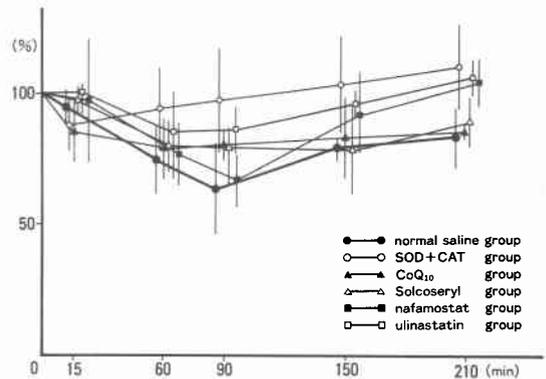


Fig. 2 Single photon counting system and the method for detecting the chemiluminescence from in situ liver surface

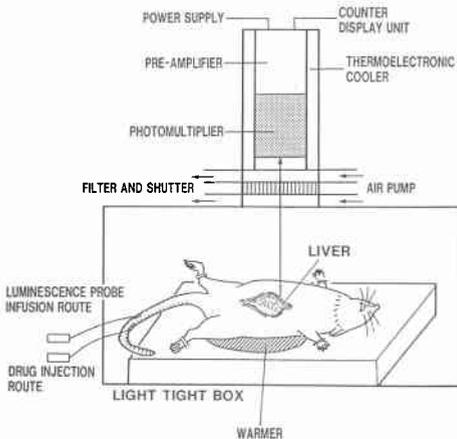
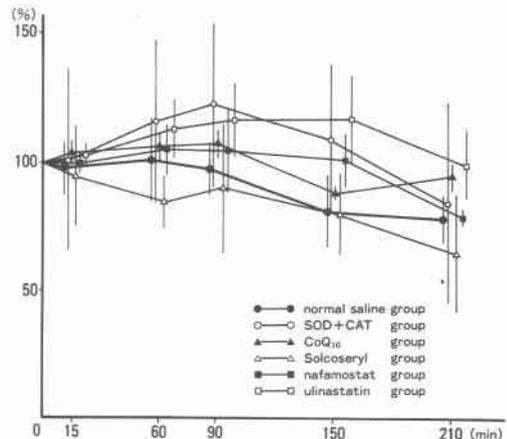


Fig. 4 Changes in the tissue blood flow in the liver after endotoxin administration



2) 肝組織血流

生食群, Solcoseryl 群では Et. 投与後210分間徐々に減少していくのに対し, ほかの4群では90分まで血流の一時的上昇が見られた. さらに CoQ₁₀群, ulinastatin

群では Et. 投与後210分後にも有意な血流維持が認められた (Fig. 4).

3) 好中球 O₂⁻ 産生能

Fig. 5 Neutrophil derived O₂⁻ after endotoxin administration

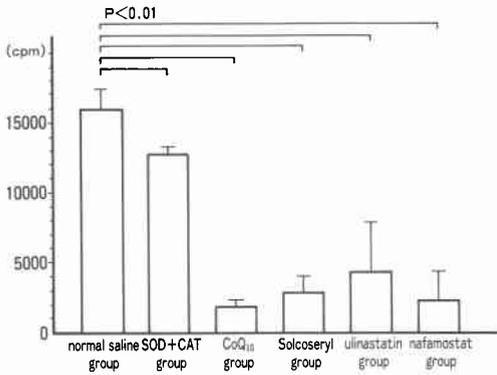


Fig. 6 Lipid peroxide in the liver after endotoxin administration

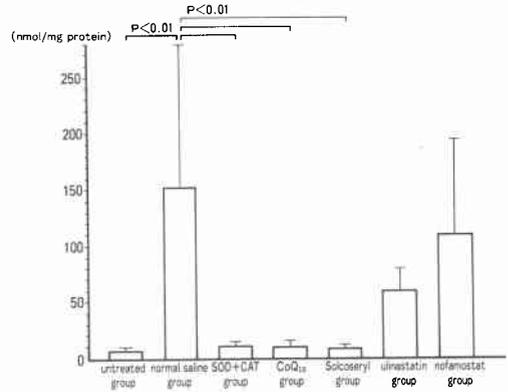
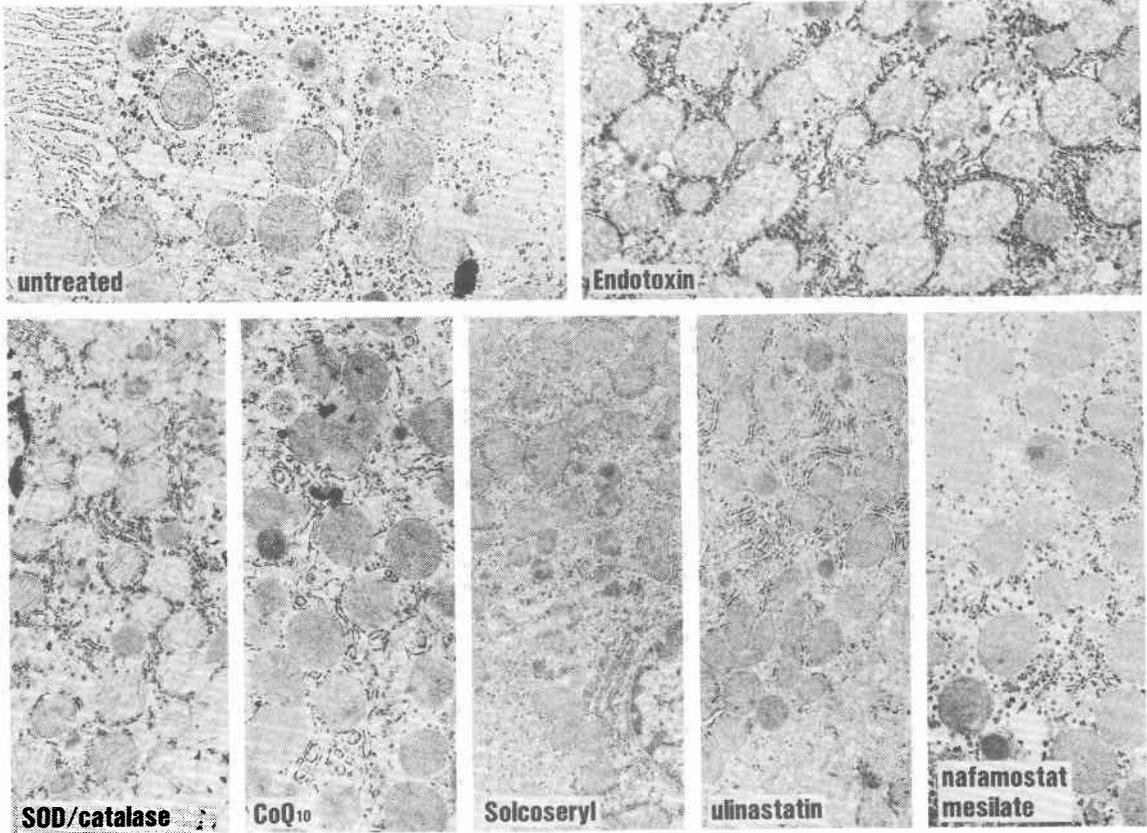


Fig. 7 Electron microscopic view of a liver cell after endotoxin administration. Upper left : No endotoxin. Upper right : No cytoprotective drug



生食群では $16,100 \pm 1,400$ cpmと著明に上昇したのに対し、SOD+CAT群 $12,900 \pm 500$ cpm, CoQ₁₀群 $1,900 \pm 500$ cpm, Solcoseryl群 $2,900 \pm 1,200$ cpm, ulinastatin群 $4,400 \pm 3,600$ cpm, nafamostat群 $2,400 \pm 2,100$ cpmと上昇を認めず、O₂⁻産生に対する抑制効果を認めた (Fig. 5).

4) 肝組織過酸化脂質

無処置ラットでは 7.4 ± 2.7 nmol/mg proteinであるのに対し、生食群では 150 ± 130 nmol/mg proteinと増加が見られた。SOD+CAT群 11 ± 3.5 nmol/mg protein, CoQ₁₀群 9.7 ± 3.9 nmol/mg protein, Solcoseryl群 8.9 ± 3.0 nmol/mg proteinと抗酸化剤および類似剤投与群で有意な抑制効果が認められた。また、ulinastatin群 60 ± 20 nmol/mg protein, nafamostat群 110 ± 84 nmol/mg proteinと蛋白分解酵素阻害剤投与群では有意差は認められないものの抑制傾向がみられた (Fig. 6).

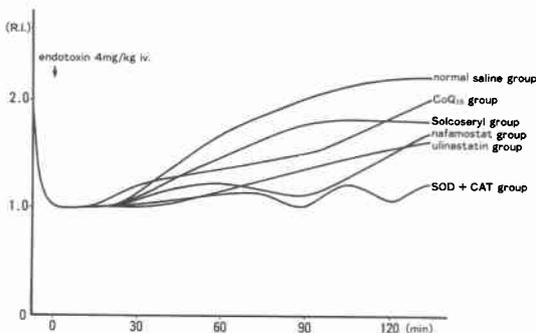
5) 肝細胞 mitochondria 電顕像

無処置ラットの肝細胞では mitochondria の内外膜および crista の構造が保たれているのに対し、生食群では mitochondria の膨化、内外膜、crista の崩壊が著明に認められた。ほかの薬剤投与群では一部に mitochondria の膨化が見られるものの、内外膜および内部構造は比較的温存されていた (Fig. 7).

6) 肝表面からの化学発光

生食群では Et. 投与後20~30分後より化学発光の増加が起こり、120分後には投与前の約2.2倍の発光量が認められた。ほかの薬剤投与群では発光量の増加を抑制する傾向がみられ、SOD+CAT群では120分まで発光の増大がほとんど見られなかった (Fig. 8).

Fig. 8 Changes in the chemiluminescence from in situ liver surface after endotoxin administration



IV. 考 察

ショックの基本的病態として末梢循環不全に基づく組織ならびに細胞の低酸素状態が重要視されてきたが、ショック症例の中には、血流の回復した時点で急に重篤化する事例もあり、単に低酸素状態のみではショックの病態をすべて説明することはできない。近年、組織や細胞、臓器の各障害発生に、ショックに伴う各種の媒介因子の関与の重要性が指摘されている¹³⁾。すなわち、各臓器間の自律神経系の関連、paraneuron や一連の消化管ホルモン、各種血管作動性アミン、myocardial depressant factorなどがまず提唱された¹⁴⁾。一方、著者らがとりあげた活性酸素も、1980年代に入ってショック時の臓器に過酸化脂質が蓄積するとの関連から注目され¹¹⁻³⁾、さらに McCord¹⁵⁾により虚血・再灌流時の活性酸素による組織障害の概念が明確になるにつれ、ショック時の重要な媒介因子と考えられるようになった¹⁶⁾¹⁷⁾。また、細菌性ショックにおいては食細胞からの活性酸素も重要な役割を果たすことが明らかにされつつあり、特に Et. はそれ自身が食細胞の活性酸素生成を刺激すると同時に、補体系分解産物である C5a, platelet-activating factor, tumor necrotizing factor, lysosomal enzymes, leukotriene等を介して食細胞の活性酸素の生成を刺激することが報告されている¹⁸⁾⁻²⁰⁾。

元来、生体内にはさまざまな活性酸素産生系が存在している。多核白血球や macrophage の膜に存在する NADPH 酸化酵素, myeloperoxidase によるもの、細胞質に存在する hypoxanthine-xanthine oxidase 系を介するもの、核膜、粗面小胞体膜、糸粒体膜の cytochrome P-450により産生されるもの、アラキドン酸カスケードを介するものなどが知られており¹¹⁾¹⁶⁾、また mitochondria では、電子伝達系の semiquinone が1電子を基底状態の酸素に渡して O₂⁻を作る。一方、これに対し消去系も生体内に存在している。すなわち O₂⁻消去作用を有する SOD を始めとして、H₂O₂除去に働く CAT, peroxidase, H₂O₂及び脂質過酸化物除去作用を有する glutathione peroxidase などの酵素系の他に、vitamin E, 還元型 glutathione, quinone, transferin, uric acid 等の非酵素系のもも存在し、活性酸素の除去、ラジカルの電子補足、金属イオンの補足により scavenger として作用している。これらの活性酸素産生系と消去系のバランスが何らかの機序で全体ないし局所において破綻をきたした際、過剰に産生された活性酸素とその反応物質である過酸化物質により脂質膜

の損傷、蛋白質の変性、白血球や血小板の凝集と沈着、プロスタノイドの産生、結合織の破壊と間質浮腫形成といった組織毒性が出現することになる¹⁶⁾。これらの組織毒性がショックに続発する各臓器の障害、しいては多臓器障害の一因となると考えられる。

今回の酢酸鉛5mg/body, Et. 4mg/kg 静注によるラット Et. ショックモデルにおける活性酸素の検討では、好中球 O_2^- 産生能の上昇、肝組織過酸化脂質の増加、肝細胞 mitochondria 崩壊を認めた。さらに中野ら²¹⁾が開発した *in vivo* での組織からの O_2^- の検出法を用いた実験では、生体肝からの化学発光の増大を認め、*in vivo*, *in vitro* 双方で、Et. ショック時における細胞・臓器障害への活性酸素の関与が強く示唆された。Et. は多核白血球自体の活性酸素産生能を上昇させると同時に、血管内皮への多核白血球の膠着、補体（特に C5a）の活性化と相伴って多核白血球の活性酸素産生をさらに増大させる²²⁾²³⁾。このようにして発生した大量の活性酸素は、血管内皮細胞を障害し、種々の化学媒介物質の放出を促し、脂質過酸化反応が生じやすくするものと考えられる。また、ショックに対し生体では、血圧が低下してもそれを上昇させる機構があり、実際には、循環不全と改善が交互に出現しているものと考えられる。したがって、凝固・線溶系にも影響する Et. においては、臓器の微小循環系で凝固・線溶状態が繰り返されることも推察され、虚血状態あるいは虚血・再灌流状態が出現し、組織及び多核白血球からの活性酸素の産生増大、各種の媒介物質の放出が助長されることとなる²⁴⁾。これらの positive feedback mechanism が互に関連して悪循環が増幅されて、Et. ショックの病態を形成していくものと考えられる。

一方、元来生体の組織内に存在する活性酸素消去系酵素、抗酸化物に関しては、活性酸素の増加に反応してその生成が生じ、生体防御機構が発動されるものと考えられており、すでに、種々の病態において組織 SOD が増加するとの報告がなされている^{25)~27)}。しかし、細胞内には本来 O_2^- を消去するのに十分量の SOD がすでに存在しており、SOD 活性が上昇するのになぜ活性酸素・過酸化脂質の増加が生じるのかについては疑問がもたれている。細胞・臓器障害への進行が、本来 SOD がほとんど存在しない細胞外で増加した活性酸素の影響を強く受けるのか、障害をうける局所において消去系を上回る活性酸素が常に生成されているのか、さらに、細胞・臓器障害への悪循環が発動し活性

酸素消去のみでは対応できない段階で初めて内因性 SOD の増加が生じるのかについては不明である。また、過剰に産生された SOD 全てが生体防御に働くか、適量があるのかについても諸家で意見が異なる^{25)~27)}。しかし、少なくとも SOD 活性の上昇が細胞・臓器障害の指標の1つととらえることは可能と考えられる。

今回の実験では、SOD 15,000単位と CAT 4mg の持続投与により、Et. による血圧低下、好中球 O_2^- 産生能上昇、肝組織過酸化脂質の増加、生体肝よりの化学発光の増強、肝細胞 mitochondria の崩壊の抑制を認めた。分子量3万の SOD は細胞内に移行しないと考えられているにもかかわらず有効であった理由は、細胞外液中の濃度を上昇させておくことにより、Et. で活性化された多核白血球からの O_2^- を速やかに消去すると同時に、白血球の血管内皮への粘着凝集を防ぎ、各媒介物質の産生を抑え、微小循環を維持したためと考えられる。一方、CAT は O_2^- の不均化反応により生じた H_2O_2 を H_2O と O_2 とに分解して hydroxyl radical の生成を抑制する酵素であり、Et. ショック時に単独に投与しても脂質過酸化を抑制せず、したがって H_2O_2 ・hydroxyl radical 系の反応は脂質過酸化に関与しないと推測されるが²⁸⁾、ただ SOD の投与により産生された H_2O_2 を分解することは可能であり、ゆえに SOD の効果を高める方向へ導くものと考えられる。

Et. による活性酸素生成が、前述のように細胞外液中での活性酸素生成系だけで生じているのではないため、SOD, CAT を大量に投与しても細胞内外の完全な抑制効果を得ることはできない。しかし、生体肝からの化学発光を他剤に比べかなり抑制していることから、少なくとも Et. ショック初期においては、細胞外液中での活性酸素生成が cytotoxicity に重要な役割を演じているものと考えられる。

次に、CoQ 類は呼吸鎖電子伝達系の成分として ATP 合成に働くだけでなく、最近その抗酸化作用が注目されている薬剤である。CoQ₁₀ の抗酸化作用の機構はまだ十分に解明されていないが、CoQ₁₀ 自体には抗酸化作用はなく、投与した CoQ₁₀ が組織内に移行し、細胞内で還元された CoQ₁₀H₂ により、リポソーム膜内で生成する lipid peroxy radical を消去し、抗酸化作用を発現すると考えられている²⁹⁾³⁰⁾。これに関しては、Et. 血症、虚血再灌流の実験系での検討からも、CoQ 類は酸化から特に mitochondria を保護していることが示唆されている^{31)~33)}。今回の肝臓を中心とした実験で

も、CoQ₁₀はEt.による肝組織過酸化脂質の増加を抑制し、肝細胞 mitochondria の崩壊を防御しており、同様のことが推察された。

一方、Solcoseryl は仔ウシ血液抽出物の混合物であり、消化管をはじめ種々の細胞に保護作用を有することが報告されているが、蛋白成分を含む混合物であるためにその作用機序はいまだに不明である。近年、O₂⁻消去剤類似の作用を有することが報告されて以来^{31)34)~36)}、抗酸化天然物質としても注目されている。Et.による血圧、肝組織血流低下に対する抑制効果は認められなかったが、好中球 O₂⁻産生能、肝組織過酸化脂質、肝細胞 mitochondria の Et. 投与による変化などに対しては SOD 類似の抑制効果が認められた。これが、albumin をはじめとする含有成分の消去作用によるものか、膜の安定化作用によるものかは不明であるが、重篤な副作用を持たない天然物であることからこの方面での応用と有効成分の解明が期待される薬剤と言える。

各種のショック状態に、trypsin, plasmin などの血中蛋白分解酵素活性が上昇すると同時に血清 plasmin inhibitor が減少することなどから、実際の臨床では治療薬として各種蛋白分解酵素阻害剤が用いられることが多い。また、ショックの病態に活性酸素の関与が知られてから、この方面での蛋白分解酵素と活性酸素産生との関連、蛋白分解酵素阻害剤の効果についての研究も多い^{37)~39)}。しかし in vivo, in vitro 双方の面からの報告はいまだ少ない。今回、nafamostat と ulinastatin の2種類の蛋白分解酵素阻害剤を検討したが、双方ともに Et. による血圧および肝組織血流変化の抑制傾向を認め、好中球 O₂⁻産生能の上昇、肝組織過酸化脂質の増加、肝細胞 mitochondria の崩壊、生体肝からの化学発光の増強等を抑制する効果がみられ、ショック状態における活性酸素消去ないしは抗酸化作用の面においても有用性が示唆された。蛋白分解酵素阻害剤は、セリン様蛋白分解酵素の阻害作用に起因する活性酸素産生抑制³⁸⁾だけでなく、nafamostat は抗補体作用を有し⁴⁰⁾、また ulinastatin は酸素ラジカル自体の消去作用を有している可能性もあり⁴¹⁾、補体や多核白血球による活性酸素の産生に抑制効果を示すものと考えられる。各種蛋白分解酵素の阻害作用、凝固系および線溶系への作用、膜安定化作用等のほかに、活性酸素、脂質過酸化にも影響し、多方面の作用を有するという点でショックに対する治療薬としての有効性が理解される。

以上のように Et. ショックでは、種々の媒介因子を介して悪循環を形成し、細胞・組織障害、しいては MOF の病態を招来するものと考えられる。したがって、その治療にはこの悪循環の遮断が不可欠で、その達成には、循環動態の安定化や感染巣の治療、Et. 産生の抑制などを行うと同時に種々の媒介因子に対する効果的薬剤の投与が必要である。著者らは Et. ショックの病態を活性酸素の消長面から検討し、各種薬剤の消去効果を実験的に確かめて、そのショック治療上の意義を考察したが、それらが果たして実際の臨床上どの程度役立つかは、投与時期や量、副作用など今後検討を要する問題の多いことを最後に指摘したい。

文 献

- 1) 守田敏洋, 国元文生, 小川 龍: ショック時の臓器過酸化脂質の変化とその意義. 1. 出血性ショックにおける血液および肝臓過酸化脂質. 麻酔 20: 227-280, 1980
- 2) 守田敏洋, 国元文生, 小川 龍: ショック時の臓器過酸化脂質の変化とその意義. 2. エンドトキシンショック時の肝臓過酸化脂質と SOD 活性. 麻酔 30: 281-284, 1981
- 3) Nordstrom G, Seeman T, Hasselgren P et al: Beneficial effect of allopurinol in liver ischemia. Surgery 97: 679-684, 1985
- 4) Granger DN, Rutili G, McCord JM: Superoxide radicals in feline intestinal ischemia. Gastroenterology 81: 22-29, 1981
- 5) Yoshikawa T, Furukawa Y, Wakamatsu Y et al: Experimental hypoxia and lipid peroxide in rats. Biochem Med 27: 207-213, 1982
- 6) Lefer AM, Araki H, Okamoto S et al: Beneficial actions of a free radical scavenger in traumatic shock and myocardial ischemia. Circ Shock 8: 273-282, 1981
- 7) Goldstein IM, Roos D, Kaplan HB et al: Complement and immunoglobulins stimulate superoxide production by human leukocytes independently of phagocytosis. J Clin Invest 56: 1155-1163, 1975
- 8) 内海耕造, 高橋聖一, 山本博文ほか: 多核白血球の O₂⁻生成に対するソルコセリルの作用. Cyto-prot Biol 1: 131-139, 1983
- 9) 高橋久雄, 石井裕正, 永田茂之ほか: 実験的四塩化炭素肝障害における過酸化脂質および関連酵素の検討. Cyto-prot Biol 2: 27-33, 1984
- 10) Rosen H, Klebanoff SJ: Chemiluminescence and superoxide production by myeloperoxidase deficient leukocytes. J Clin Invest 58: 50-60, 1976

- 11) 中野 稔: 活性酸素およびフリーラジカル種の測定とその臨床的意義. 大柳善彦, 吉川敏一 編. フリーラジカルの臨床. 第2巻. 日本医学館, 東京, 1987, p1-29
- 12) Yagi K: Assay for blood plasma and serum. *Methods Enzymol* 159: 363-369, 1984
- 13) 玉熊正悦: ショック. 中外医学社, 東京, 1984, p32-47
- 14) 玉熊正悦: 急性臓器不全. *救急医* 7: 1188-1195, 1983
- 15) McCord JM: Oxygen derived free radicals in postischemic tissue injury. *N Engl J Med* 312: 159-162, 1974
- 16) 小川 龍: ショック時の細胞損傷とフリーラジカル. 大柳善彦, 吉川敏一 編. フリーラジカルの臨床. 第2巻. 日本医学館, 東京, 1987, p161-167
- 17) 門田俊夫, 玉熊正悦: 活性酸素とSOD. *救急医* 12: 17-21, 1988
- 18) Curnutte JT, Babior BM: Biological defense mechanism. The effect of bacteria and serum on superoxide production by granulocytes. *J Clin Invest* 3: 1662-1672, 1974
- 19) 吉川敏一, 高野裕久, 近藤元治: 食細胞の活性酸素と疾患. *活性酸素・フリーラジカル* 1: 212-229, 1990
- 20) 末松 誠, 鈴木秀和, 鈴木雅之ほか: 活性酸素生成機構. *活性酸素・フリーラジカル* 1: 269-276, 1990
- 21) 中野 稔, 高橋 篤: 生きた動物組織からの O_2^- の検出. 大柳善彦, 吉川敏一 編. フリーラジカルの臨床. 第5巻. 日本医学館, 東京, 1990, p23-28
- 22) Goldstein IM, Feit F, Weissman G: Enhancement of nitroblue tetrazolium dye reduction by leukocytes exposed to a component of complement in the absence of phagocytosis. Part II. *J Immunol* 114: 516-518, 1975
- 23) Karen M, Toth DP, John ER: Intact human erythrocytes prevent hydrogen peroxidemediated damage to isolated perfused rat lungs and cultured bovine pulmonary artery endothelial cells. *J Clin Invest* 74: 292-295, 1984
- 24) 吉川敏一, 市川 寛, 近藤元治: 虚血一再灌流障害とフリーラジカル. *活性酸素・フリーラジカル* 1: 258-262, 1990
- 25) Scott MD, Meshnick SR, Eaton JW: Superoxide dismutase-rich bacteria. *J Biol Chem* 262: 3640-3645, 1987
- 26) Kelner MJ, Bagnell R: Alteration of endogenous glutathione peroxidase, manganese superoxide dismutase, and glutathione transferase activity in cells transfected with copper-zinc superoxide dismutase expression vector. *J Biol Chem* 265: 10872-10875, 1990
- 27) 山倉文幸: O_2^- 消去系酵素 a.Cu, Zn-SOD. *活性酸素・フリーラジカル* 2: 56-65, 1991
- 28) 国元文生: エンドトキシン血症に対する脂質過酸化抑制の効果. *麻酔* 35: 84-90, 1986
- 29) Frei B, Kim MC, Ames BN: Ubiquinol-10 is an effective lipid-soluble antioxidant at physiological concentrations. *Proc natl Acad Sci USA* 87: 4879-4883, 1990
- 30) Kagan V, Serbinova E, Packer L: Antioxidant effects of ubiquinones in microsomes and mitochondria are mediated by tocopherol recycling. *Biochem Biophys Res Commun* 169: 851-857, 1990
- 31) Sugino K, Dohi K, Yamada K et al: The role of lipid peroxidation in endotoxin-induced hepatic damage and the protective effect of antioxidants. *Surgery* 101: 746-752, 1987
- 32) Sugino K, Dohi K, Yamada K et al: Changes in the levels of endogenous antioxidants in the liver of mice with experimental endotoxemia and the protective effects of the antioxidants. *Surgery* 105: 200-206, 1989
- 33) Marubayashi S, Dohi K, Yamada K et al: Changes in the levels of coenzyme Q homologs, α -tocopherol, and glutathione in rat liver after hepatic ischemia and reperfusion, and the effect of pretreatment with coenzyme Q_{10} . *Biochem Biophys Acta* 797: 1-9, 1984
- 34) 伊東 亨, 川上正夫, 吉田誠一郎ほか: 虚血 SHR の再灌流時のエネルギー代謝およびMDAに及ぼす影響. *医と薬学* 17: 1509-1514, 1987
- 35) 門田俊夫, 入江敏之, 佐藤敬文ほか: ラット肝虚血モデルにおけるエンドトキシンならびに oxygen free radical の検討. *Cyto-prot Biol* 5: 193-199, 1987
- 36) 門田俊夫, 田口 順, 大崎裕子ほか: エンドトキシンによる肝並びに胃粘膜障害の発生と活性酸素. *Cyto-prot Biol* 6: 409-416, 1988
- 37) 宇都宮高賢, 山本哲郎, 田中順子ほか: Protease inhibitor の人多核白血球機能におよぼす影響一特に呼吸不全の多核白血球 superoxide 活性との関連性について. *現代医療* 18: 1262-1266, 1986
- 38) 織田 実, 荻原まどか, 佐藤拓夫ほか: Nafamostat mesilate (FUT-175) のラット多核白血球におけるスーパーオキシサイド (O_2^-) 産生抑制作用. *日薬理誌* 87: 521-526, 1986
- 39) 吉川敏一, 村上正志, 瀬戸 治ほか: 蛋白分解酵素阻害薬ウリナスチチンのエンドトキシンショック防御効果と酸素ラジカル消去作用. *麻酔* 37: 969-974, 1988

- 40) Yoshikawa T, Murakami M, Furukawa Y et al: Effects of FUT-75, a new synthetic protease inhibitor on endotoxin-induced disseminated intravascular coagulation in rats. *Haemostasis* 13 : 374—378, 1983
- 41) 吉田憲正, 吉川敏一, 谷川 徹ほか: ヒト多形核白血球ウミホタルシフェリン誘導体—依存性化学発光に対するプロテアーゼインヒビターの影響. *医のあゆみ* 140 : 765—766, 1987

Protective Effects of Antioxidants and Protease Inhibitors on Endotoxin Shock and Their Scavenging Effects on Oxygen-derived Free Radicals —Experimental Investigations of the Active Oxygen Species In Vivo and In Vitro—

Jun Taguchi, Toshio Kadota and Syoetsu Tamakuma
First Department of Surgery, National Defense Medical College

The role of active oxygen species in the process of organ failure was investigated and protective effects of antioxidants and protease inhibitors against endotoxin shock were experimentally studied in rats. Experimental shock was induced by a single intravenous injection of endotoxin at a dose of 4 mg/kg. After the injection, systolic blood pressure and hepatic tissue blood flow were reduced. Furthermore neutrophil-derived superoxide and lipoperoxide levels in the liver were markedly elevated. Severe destruction of the mitochondrial structure of hepatocytes was seen. Superoxide-induced chemiluminescence from in situ liver surface was increased after endotoxin injection. On the other hand, all these changes were prevented by pretreatment with superoxide dismutase and catalase, coenzyme Q₁₀, solcoseryl, nafamostat mesilate, and ulinastatin. These results indicate that active oxygen species, such as superoxide and hydrogen peroxide, are involved in the pathogenesis of organ failure following endotoxin shock, and suggest that antioxidants and protease inhibitors may exert some protective effects against organ failure in endotoxin shock.

Reprint requests: Jun Taguchi Self Defense Force Etajima Hospital
73-21 Etajima-cho, Aki-gun, Hiroshima, JAPAN
