

虚血時の心筋障害における蛋白質分解
酵素の役割と狭心症治療薬の作用

研究課題番号
59570077

昭和60年度科学研究費補助金
(一般研究C) 研究成果報告書

昭和61年3月

研究代表者 市原和夫

(旭川医科大学)

は し が き

虚血になると心筋収縮力は低下し、種々の機能障害が起こる。虚血時間が短い場合は、虚血後再灌流によって障害されていた心臓機能は、ほぼ完全に回復する。しかし、虚血時間が長くなってくると、再灌流をしても心臓機能は回復しなくなり、最終的には心筋に不可逆性の変性が起こって、心筋細胞は死に至る。虚血による心筋障害が不可逆的になる原因については、種々の代謝因子が考えられている。たとえば、虚血心筋には乳酸が蓄積し、組織pHが低下すること (Ichihara and Abiko, 1982)、脂肪酸代謝中間体の蓄積 (Ichihara et al., 1981)、ミトコンドリア呼吸機能の低下 (Reimer and Jennings, 1981)、高エネルギー磷酸化合物の減少 (Ichihara and Abiko, 1983)などが挙げられる。他の臓器組織の細胞と同じように、心筋細胞内にもリソゾーム顆粒が存在する。リソゾーム顆粒内には蛋白質分解酵素、核酸分解酵素などがたくさん含まれており、リソゾームは細胞内の“清掃屋”として知られる。このリソゾーム顆粒は機械的衝撃、浸透圧変化、凍結融解、蛋白質分解酵素、界面活性剤などによって破裂し、中に含まれている分解酵素が細胞質中に遊出、拡散する (図1)。冠動脈を結紮したウサギ心臓の心筋細胞内では、リソゾーム由来の酵素活性がリソゾーム顆粒内よりも細胞質中に高くなる (Wildenthal et al., 1978)。この事実は虚血によって心筋細胞内のリソゾーム顆粒が破裂し、中に含まれていたリソゾーム酵素が細胞質中に遊出、拡散したことを示唆する。虚血時に細

胞質中に遊出、拡散した種々の分解酵素が心筋細胞構造を破壊し、心筋に不可逆的な障害をもたらすことが十分に考えられる。図1にはリソゾーム顆粒の破裂の原因の一つに虚血(Ischemia)も書き加えてある。この考えに基づくと、虚血心筋保護効果のあるような薬物は、虚血によって起こるリソゾーム顆粒の障害あるいは破裂を防ぐことによって、虚血心筋の不可逆的変性を抑制しているのかもしれないと考えることができる。事実、プロプラノロール、プロスタサイクリンやステロイドホルモンは虚血心筋を保護する作用を有することが報告されている(Rovetto, 1977; Ogletree et al., 1979; Ichihara and Abiko, 1983)が、これらの薬物はいずれも、虚血時や無酸素時にリソゾーム顆粒を安定させることが知られている(Lefer et al., 1978; Decker et al., 1978; Welman, 1979)。これらの事を踏まえて、本研究では、灌流ラット心臓標本を用い、虚血時にリソゾーム顆粒が破壊され、リソゾーム中に含まれる分解酵素が細胞質中に遊出してくるか否かを調べ、この虚血時のリソゾーム顆粒の変化に、狭心症治療薬がどのような影響をおよぼすのかを検討する。

研究組織

研究代表者 市原 和夫 (旭川医科大学医学部・助教授)

研究経費

昭和59年度	1,200 千円
昭和60年度	400 千円
計	1,600 千円

研究発表

市原和夫，安孫子保，指田裕子；

虚血心筋障害とlysosome酵素について

第57回日本薬理学会総会 1984年3月26日

羽根田俊，市原和夫，小野寺壮吉，安孫子保；

ジルチアゼムの虚血心筋保護作用—リソゾーム酵素の関与

第7回心筋代謝研究会 1984年9月13日

市原和夫，安孫子保，羽根田俊，小野寺壮吉；

虚血心筋障害とリソゾーム酵素（1）—リソゾーム酵素の細胞内分布—

日本循環器学会第52回北海道地方会 1984年10月6日

羽根田俊，小野寺壮吉，市原和夫，安孫子保；

虚血心筋障害とリソゾーム酵素（2）—ジルチアゼムの効果—

日本循環器学会第52回北海道地方会 1984年10月6日

市原和夫，安孫子保；

心筋虚血時のリソゾーム酵素遊出におよぼすジルチアゼムの効果

第35回日本薬理学会北部会 1984年10月13日

市原和夫，安孫子保；

虚血による心筋リソゾーム顆粒の変化におよぼすNC0-700の効果

第36回日本薬理学会北部会 1985年10月13日

K. Ichihara and Y. Abiko;

Effect of diltiazem and NCO-700 on subcellular redistribution of lysosomal enzymes during ischemia.

XII Congress of International Society for Heart

Research February 13, 1986

羽根田俊，市原和夫，小野寺壮吉，安孫子保；

Diltiazem の虚血心筋保護作用—リソゾーム酵素の関与
心筋の構造と代謝 7 巻 1985年11月1 日

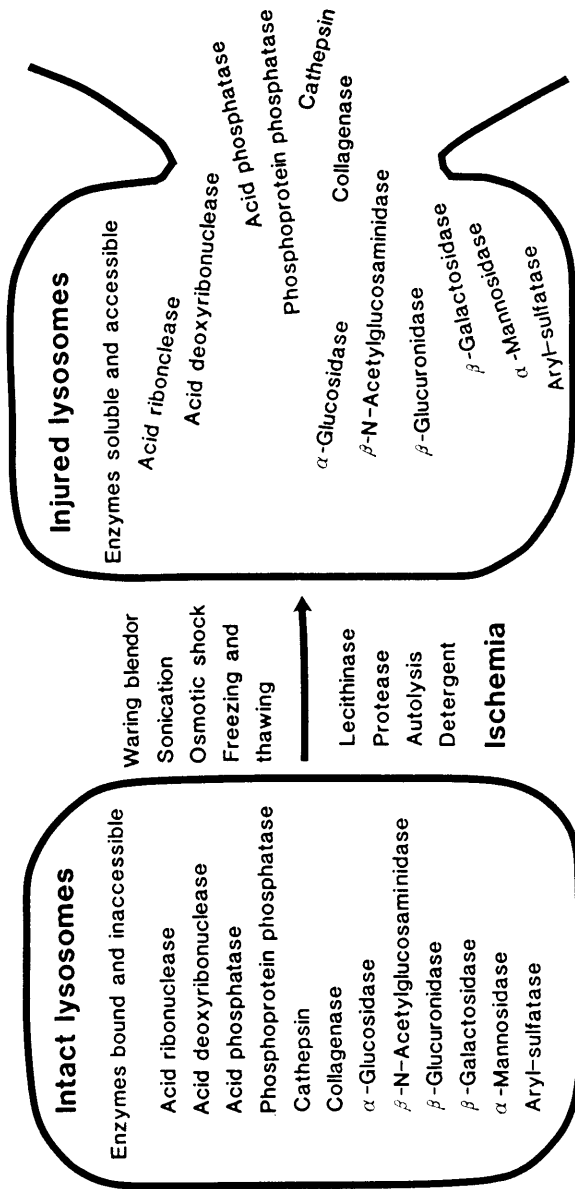


図1 リソゾーム顆粒。

種々の処理によってこのリソゾーム顆粒は壊れ、中に含まれる蛋白質分解酵素や核酸分解酵素が細胞質中に遊出する。虚血(Ischemia)によってもリソゾーム顆粒が破裂すると思われる。

研 究 成 果

カルシウム拮抗薬であるジルチアゼムは虚血心筋保護効果のあることが知られており(Weishaar et al., 1979; Nagao et al., 1980; Ichihara and Abiko, 1983)、臨床的にも狭心症治療薬として使用されている。また、新規に開発された蛋白質分解酵素抑制薬 NCO-700 も虚血による心筋梗塞域を縮小したという報告があり(Toyo-oka et al., 1982)、狭心症治療薬として期待される薬物の一つである。これらの薬物の虚血による心筋リソゾーム顆粒の変化に対する作用を調べるということは、単に薬物作用を調べることにとどまらず、前者は虚血時のリソゾーム顆粒の安定化のためにカルシウムが関与しているのか否かという点で興味があるし、後者はリソゾーム顆粒外に存在する酵素(CANP; Calcium activated neutral protease) を抑制し(Toyo-oka et al., 1982)、この酵素は名前のとおり、カルシウムによって活性化されるのでやはり、虚血時のリソゾーム顆粒安定化にカルシウムが関係しているかどうかを知るうえでも興味深い。したがって、本研究の目的は、灌流ラット心臓標本を用い、虚血時にリソゾーム顆粒が破壊され、リソゾーム中に含まれる分解酵素が細胞質中に遊出してくるか否かを調べ、この虚血時のリソゾーム顆粒の変化に、ジルチアゼムやNCO-700 がどのように作用するかを検討することである。

実験方法

体重250-350 g の雄性Sprague-Dawleyラットから摘出した心臓を、95% O₂ - 5% CO₂ ガスで平衡にした、11mMグルコースを含むKrebs-Henseleit bicarbonate bufferで灌流した。10分間のランゲンドルフ法による灌流で、心筋内の血液残渣等を洗い流したのち、心臓は左房充満圧 9 mmHg、後負荷静水圧 60 mmHgで、working heart 法で灌流された。灌流装置の概略を図2に示す。心機能を評価する場合は大動脈圧×心拍数を計算した。15分間の working heart法による灌流ののち、後負荷圧を 0 mmHg に下げることによって、虚血心筋標本を作製した(Ichihara et al., 1981)。ジルチアゼム (2.21×10^{-6} M、 1.1×10^{-5} M、あるいは 2.21×10^{-5} M)は虚血作製5分前に、それぞれの濃度のジルチアゼムを含む灌流液に切り換えることによって、灌流心臓に投与した。NC0-700 も同様にして、200 mg/lを含む灌流液に切り換えて投与した。虚血直前(薬物処置の場合は、投与5分後にあたる)、虚血20分後あるいは、虚血40分後に心筋を冷緩衝液に採取し、心筋重量測定後、2つに分けた。心筋サンプルの一方(600-800 mg)を冷抽出液中、はさみで細切し、次にテフロンホモジナイザーでホモジナイズした。抽出液の組成については予備実験を行ない、0.25M sucrose, 0.1 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl (pH 7.4) から成る液を抽出液として用いた(結果の項参照)。350 × g、5分間の遠心分離によって得られた上清を 40,000 × g、20分間遠心分離を行なった。この2回目の遠心分離によって得られた上清を"nonsedimentable enzyme"分画とし、沈澱には0.1% Triton X-100 を含む抽出液を加えて可溶化し、"sedimentable enzyme"分

画とした。"nonsedimentable enzyme" 分画中にはリソゾーム顆粒から細胞質へ遊出した酵素が、"sedimentable enzyme" 分画中には無傷のリソゾーム顆粒中の酵素が存在することになる。残りの心筋サンプル (200-300 mg) は 0.1% Triton X-100 を含む冷抽出液で激しくホモジナイズされ、350 × g、5 分間遠心分離された。得られた上清をリソゾーム酵素の全活性測定用の試料として用いた。これらのサンプルの調製方法を図 3 に示してある。リソゾーム酵素の活性は図 4 に示すように、Barrett ら (1977) の方法に準じた。すなわち、cathepsin D 活性は、pH 3.2、45°C で精製ヘモグロビンを分解して遊離してくるトリクロル酢酸に可溶の小ペプチドの量を Folin 法で定量することによって測定した。β-N-acetyl-glucosaminidase 活性は、pH 4.3、37°C で p-nitrophenyl-β-acetyl-D-glucosaminide を分解して遊離してくる p-nitrophenol を、acid phosphatase 活性は pH 4.5、37 °C で p-nitrophenyl-phosphate を分解して遊離してくる p-nitrophenol をそれぞれ比色定量することによって測定した。

リソゾーム酵素遊出の指標として、リソゾーム酵素の細胞内分布 (Lysosomal Enzyme Distribution; LED) を次式によって計算した。

LED=

$$\{\text{nonsedimentable activity} / (\text{nonsedimentable} + \text{sedimentable}) \text{ activity}\} \times 100 (\%)$$

この数値が大きくなれば、細胞質中に遊出、拡散しているリソゾーム由来の酵素が増えていることを示す。

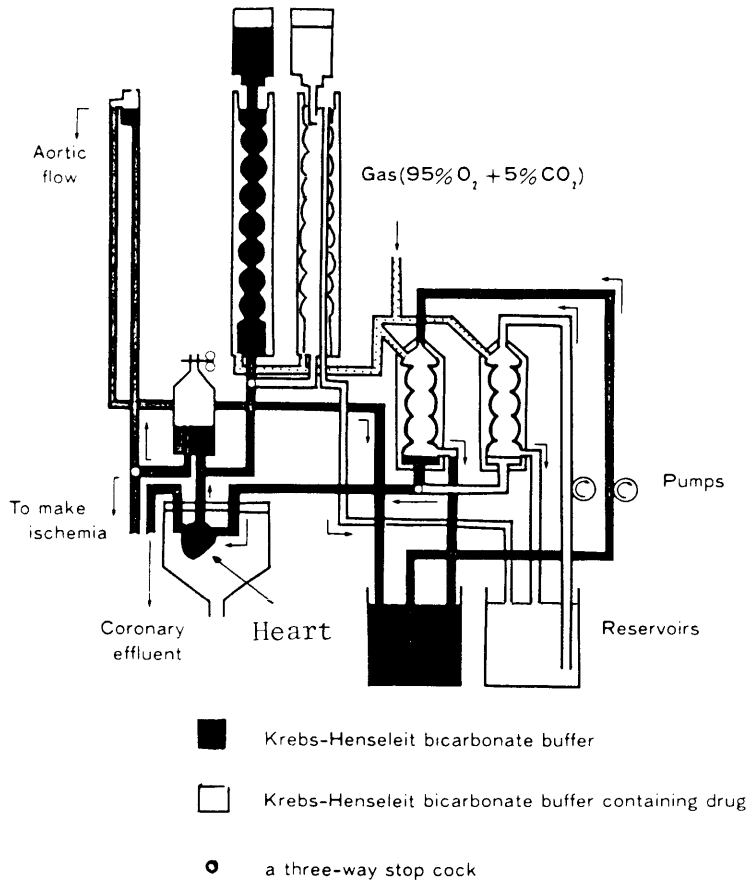
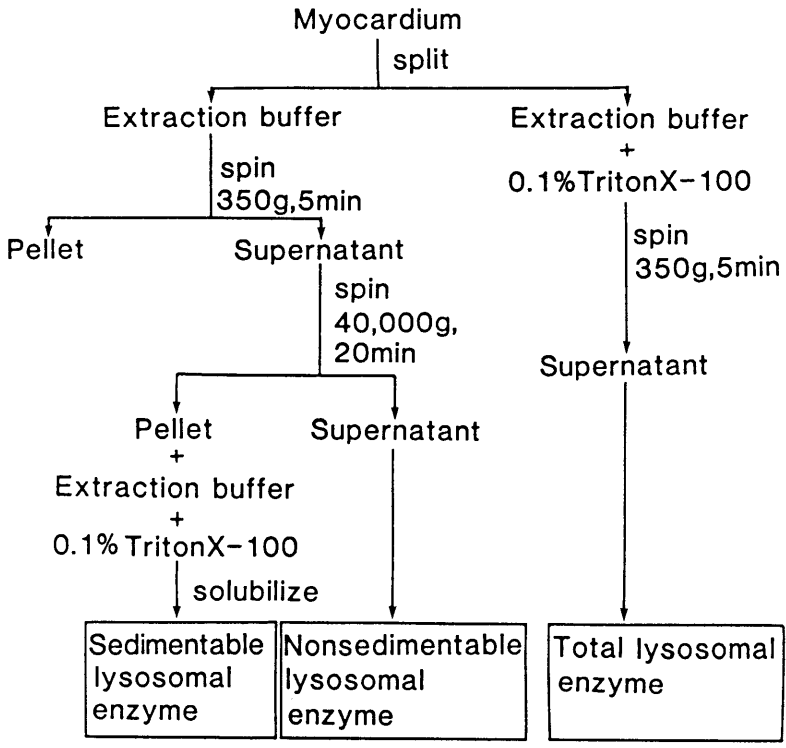


図2 Working heart 灌流装置。

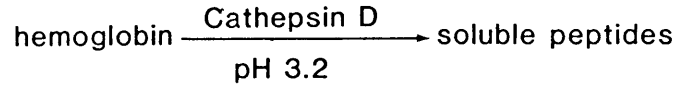
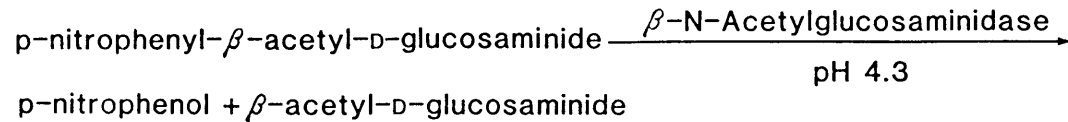
二系統の装置を三方コックで接続し、薬物を含まない灌流液から薬物を含む灌流液へと切り換えられるようになっている。長いカラムはランゲンドルフ法による灌流、あるいはWorking heart に後負荷をかけるために使用され、短いカラムはWorking heart 法による灌流において灌流液を酸素化するためおよび前負荷をかけるために用いられた。虚血心筋は大動脈弁上にかかる後負荷を取り除くことによって作製した。



Extraction buffer
 [0.25M Sucrose
 1mM EDTA
 50mM Tris
 pH 7.4

図3 リソゾームサンプル調製法。

○ Cathepsin D

○ β -N-Acetylglucosaminidase

○ Acid phosphatase

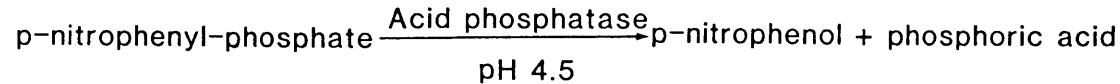


図4 リソゾーム酵素の活性測定法。

リソゾーム酵素の代表としてcathepsin D, β -N-acetylglucosaminidase, acid phosphatase活性を測定したが、これらの酵素が虚血時に重要な役割を果たしているという訳ではない。

実験結果

リソゾーム顆粒抽出液についての検討

正常灌流液で灌流したラット心臓を次に示す組成の抽出液でホモジナイズし、リソゾーム顆粒を抽出してCathepsin D, β -N-Acetylglucosaminidase, acid phosphatase 活性を測定し、LED 値を計算した。

- (1) 0.25 M KCl, 1 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl (pH 7.4)
- (2) 0.25 M Sucrose, 0.2 M KCl, 0.1 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl (pH 7.4)
- (3) 0.25 M Sucrose, 0.06 M KCl, 10 mM EDTA, 40 mM Imidazole-propionate (pH 7.0)
- (4) 0.21 mM Mannitol, 0.07 M Sucrose, 0.1 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl (pH 7.4)
- (5) 0.25 M Sucrose, 0.1 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl (pH 7.4)

図5に示すように、どの抽出液でリソゾーム顆粒を抽出しようとも、acid phosphataseに関するLED 値は 77.5%~79.7% であり、あまり大きな差は認められなかった。しかし、 β -N-acetylglucosaminidase, cathepsin D に関するLED 値は、各抽出液で差が認められ、特に KClを含む液で抽出した場合は LED値が大きくなる傾向を示した。 β -N-acetylglucosaminidaseの LED値は抽出液(1)で抽出した時最大(44.4%)となり、抽出液(5)で抽出した時、最小(24.9%)となった。LED 値が小さいということは、リソゾーム顆粒中に存在する酵素活性が高く、細胞質中に遊出している酵素の活性は少ないということであるから、抽出液(1)よりも抽出液(5)の方

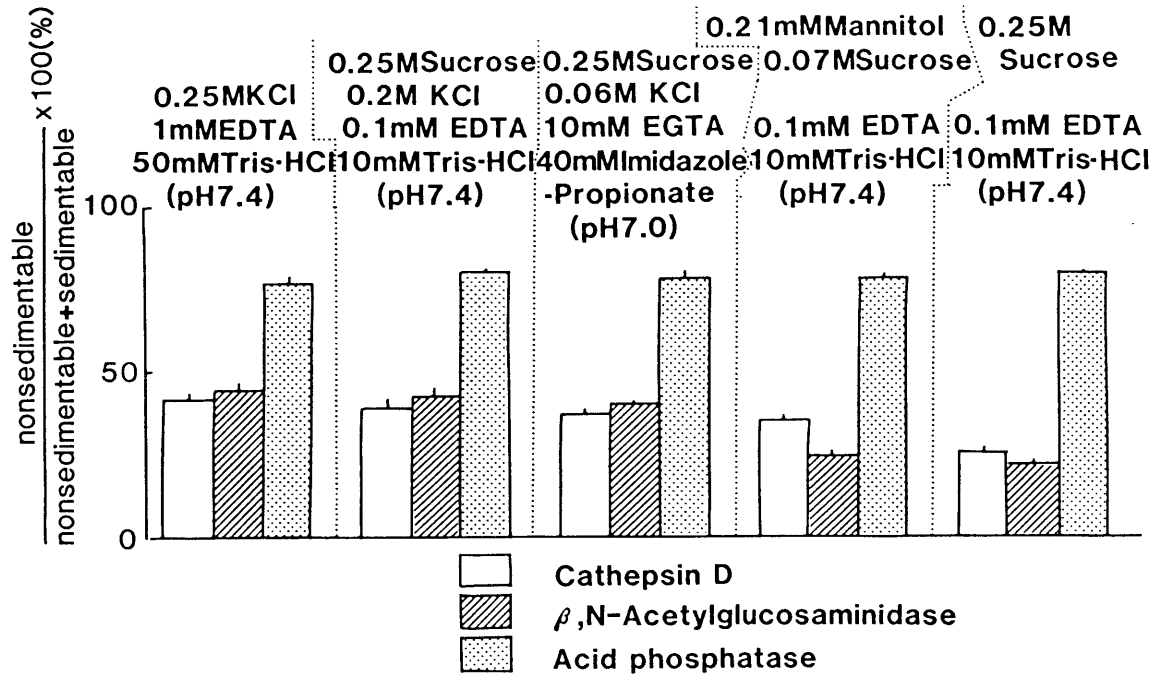


図5 リソゾーム顆粒抽出液についての検討。

KCl を含む抽出液では、cathepsin D, β -N-acetylglucosaminidaseのLED 値が高くなる傾向にあった。

がリソゾーム顆粒を無傷の状態に抽出できることを示す。したがって以後の実験では全て、抽出液(5)を用いた。

虚血によるリソゾーム酵素の心筋細胞内分布の変化

虚血による cathepsin D, β -N-acetylglucosaminidase, acid phosphatase のLED 値の変化を図6に示す。虚血直前の cathepsin D, β -N-acetylglucosaminidase, acid phosphatase の LED 値は、それぞれ 40.2 ± 2.5 , 33.8 ± 0.5 および $78.5 \pm 0.6\%$ であった。灌流心臓を20分間虚血にすると、これらLED値は次第に増加する傾向を示し、虚血後40分には、すべての酵素のLED値は虚血前のLED値と較べて有意に増加していた。

虚血心筋からの蛋白質の遊離

虚血前、あるいは虚血後の灌流心臓から蛋白質がどのくらい遊離してくるかを図7に示す。ランゲンドルフ法による灌流でも、Working heart 法による灌流でも、冠流出液中の蛋白質濃度に差は認められなかった。しかし、Working heart 法による灌流心臓の方が冠流量が多いので、心臓の灌流方法をランゲンドルフ法からWorking heart 法に切換えると、1分間あたりに心臓から遊離してくる蛋白質量は増加した。虚血にすると確かに冠流出液中の蛋白質濃度は虚血前値の約2倍に増加したが、冠流量がほとんどないため、虚血心筋からの蛋白質の遊離もほとんど観察されなかった。虚血40分後に心筋を再灌流すると、初めの数分間の冠流出液中の蛋白質濃度は、一過性に急上昇し、その後減少した。しかし、この再灌流初期の1～2分の時も冠流量が少ないので、心臓からの蛋白質流出量が虚血前値を越えることはなかった。

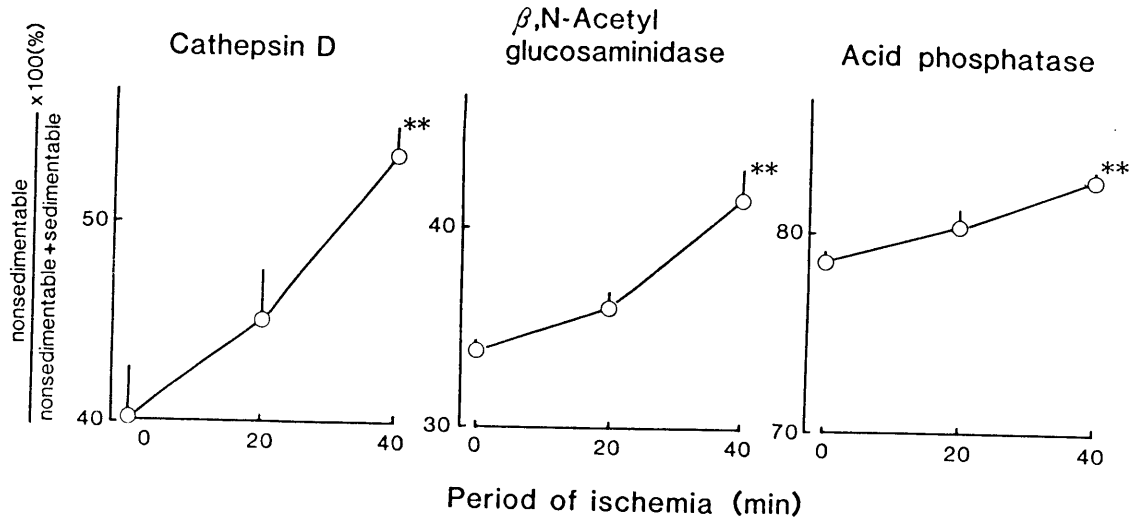


図6 虚血によるリソゾーム酵素の心筋細胞内分布の変化。

** P<0.01, 非虚血心筋(0 min) との比較。

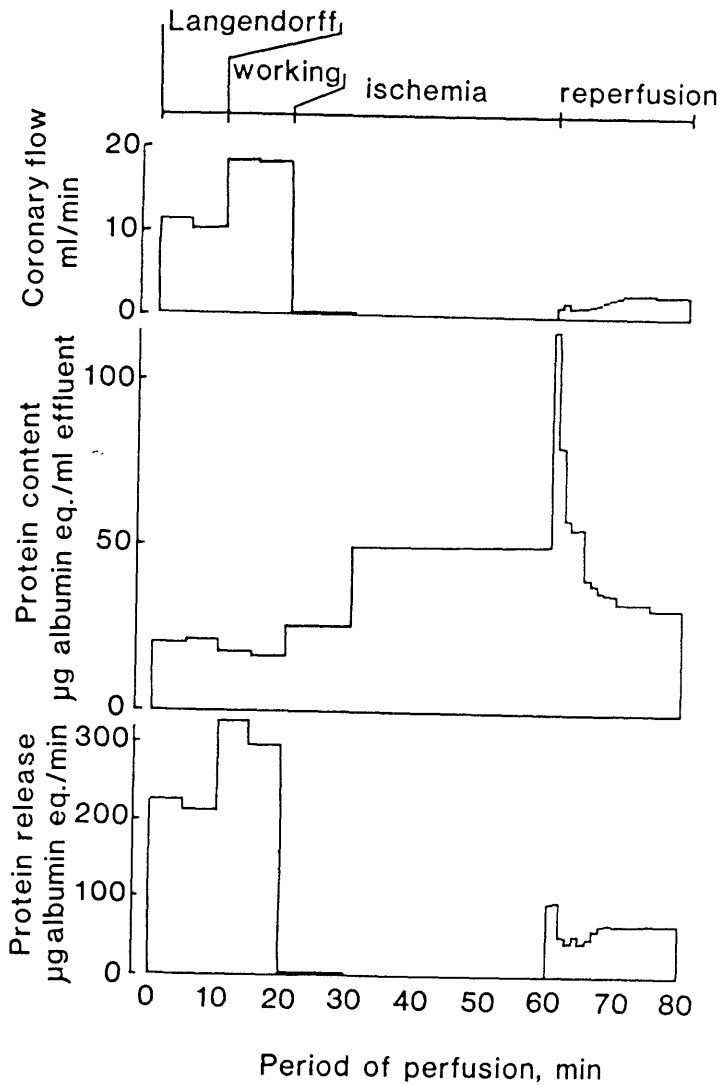


図7 虚血心筋からの蛋白質の遊離。

冠流出液中の蛋白質濃度を測定した。虚血の間は冠流量が少ないため、虚血0～10分間および10～40分間の冠流出液を集めた。

ジルチアゼムの作用

図8には、ジルチアゼム $2.21 \times 10^{-5} \text{M}$ で処置した時の結果を示してある。ジルチアゼム処置により、 β -N-acetylglucosaminidase の LED 値のみが、未処置群より高値を示したが、残りの二種類の酵素の LED 値はほぼ同じであった。ジルチアゼム $2.21 \times 10^{-5} \text{M}$ で処置をしておくこと、虚血による LED 値の上昇、すなわち、リソゾーム顆粒から細胞質への酵素の遊出が、ほぼ完全に抑制され、虚血40分後の LED 値はジルチアゼム未処置群と較べて、すべて有意に低い値であった。ジルチアゼムで処置していない心筋と $2.21 \times 10^{-5} \text{M}$ ジルチアゼムで処置した心筋における cathepsin D, β -N-acetylglucosaminidase, acid phosphatase の全活性におよぼす虚血の影響を表1に示してある。ジルチアゼムの有無にかかわらず、40分間の虚血を通じて各酵素の全活性が変化することはなかった。

低濃度 $2.21 \times 10^{-6} \text{M}$, $1.11 \times 10^{-5} \text{M}$ のジルチアゼムでも同様の実験を行った。Cathepsin D, β -N-acetylglucosaminidase, acid phosphatase の虚血前の LED 値は、 $2.21 \times 10^{-6} \text{M}$ ジルチアゼム処置群では、それぞれ 39.5 ± 5.3 , 32.8 ± 1.9 および $77.7 \pm 0.9\%$ であり、 $1.11 \times 10^{-5} \text{M}$ ジルチアゼム処置群では、それぞれ 37.5 ± 3.0 , 35.2 ± 2.0 および $78.9 \pm 0.8\%$ であった。これらの値はジルチアゼム未処置群の虚血前値とほぼ同じであった。虚血前の LED 値と虚血40分後の LED 値の差を図9に示す。この差は虚血40分間で各酵素の LED 値が何%増加したか、すなわち、虚血によるリソゾーム酵素の遊出がどのくらいあったかを示す。ジルチアゼムで処置していない心筋に

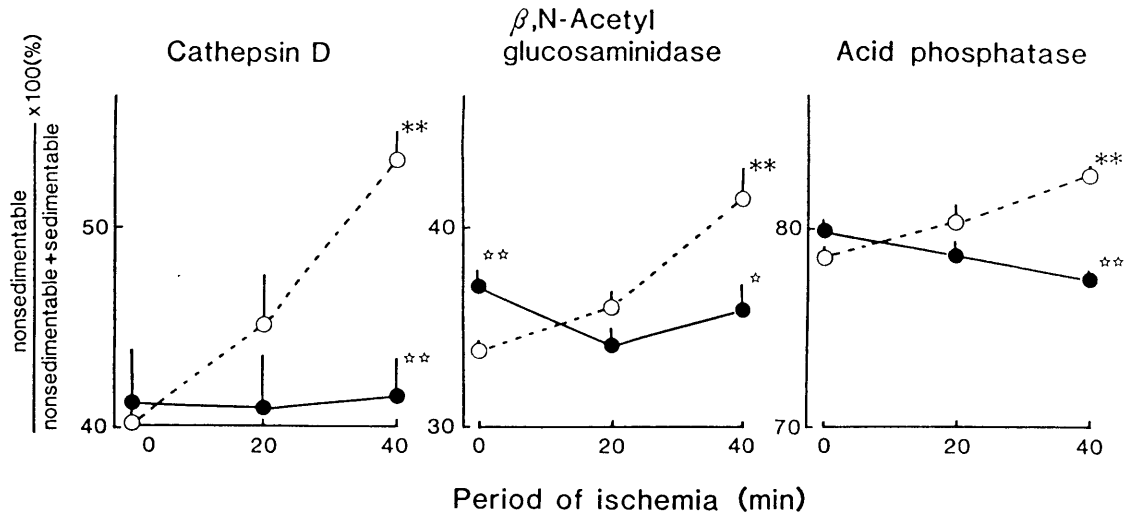


図8 虚血によるリソゾーム酵素遊出におよぼすジルチア

ゼムの作用。

ジルチアゼム (2.21×10^{-5} M) は虚血開始の5分前に灌流液を切り換えることによって心臓に投与された。

** P<0.01, 非虚血心筋(0 min) との比較。

☆ P<0.05; ☆☆ P<0.01, 同一虚血時間のジルチアゼム非投与群との比較。

表1 リソゾーム酵素の全活性と蛋白質濃度におよぼす
虚血の影響およびジルチアゼムの作用。

Period of ischemia (min)	Diltiazem	β ,N-Acetyl		Acid	Protein
		Cathepsin D	glucosaminidase	phosphatase	
		$\mu\text{mol substrate hydrolyzed/mg protein/h}$			mg/g
0	-	154.2 \pm 4.0	0.56 \pm 0.03	1.99 \pm 0.09	52.4 \pm 1.7
	+	150.3 \pm 16.4	0.56 \pm 0.02	1.81 \pm 0.06	55.3 \pm 2.2
20	-	169.5 \pm 9.3	0.60 \pm 0.02	2.09 \pm 0.08	52.2 \pm 1.8
	+	136.2 \pm 11.2	0.51 \pm 0.02	1.79 \pm 0.04	54.7 \pm 1.7
40	-	176.5 \pm 8.0	0.58 \pm 0.03	2.16 \pm 0.08	52.4 \pm 0.9
	+	147.5 \pm 13.2	0.52 \pm 0.03	1.92 \pm 0.10	54.2 \pm 2.2

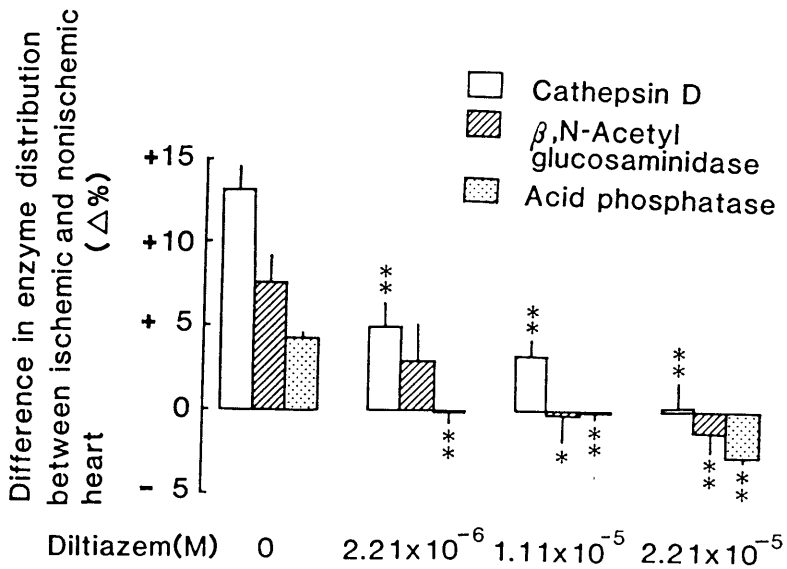


図9 虚血によるリソゾーム酵素遊出におよぼすジルチアゼムの作用。

虚血5分前にジルチアゼム(2.21×10^{-6} M, 1.11×10^{-5} M, 2.21×10^{-5} M)を含む灌流液に切り換えた。虚血40分後の心筋のLED値と非虚血心筋のLED値の差で示してある。

* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$, ジルチアゼム非投与群(0 M)との比較。

おける虚血40分後の LED増加は、cathepsin D, β -N-acetylglucosaminidase, acid phosphataseで、それぞれ13.2, 7.6 および 4.2 % であったが、ジルチアゼム 2.21×10^{-6} M 処置群では、5.0, 3.0 および -0.6 %, 1.11×10^{-5} M 処置群では、3.3, -0.2 および -0.1 %, 2.21×10^{-5} M 処置群では、0.2, -1.3 および -2.8 % とジルチアゼムの濃度に依存して漸減した。

虚血後再灌流の心機能回復におよぼすジルチアゼムの作用

もし、ジルチアゼムはリソゾーム酵素の遊出、拡散を抑制することによって、虚血心筋の不可逆的障害を防いでいるのであれば、虚血後再灌流で心機能が回復しないような不可逆的障害に陥った心臓でもジルチアゼムで処置しておくことによって、再灌流で心機能が回復するようになるかもしれない。結果を図10に示す。虚血20分後に再灌流をしても、ジルチアゼムで処置されていない場合(0M)は心機能が全く回復しなかった。一方、ジルチアゼム 2.21×10^{-6} M, 1.11×10^{-5} Mあるいは、 2.21×10^{-5} Mで虚血の間処置をしておいて再灌流すると、虚血により停止していた心機能はジルチアゼムの濃度に依存して回復した。再灌流20分後の心機能の回復率は、ジルチアゼム 2.21×10^{-6} M, 1.11×10^{-5} M, 2.21×10^{-5} Mで、それぞれ虚血前値の 19, 54, 75 % であった。

NC0 - 700 の作用

NC0-700 の虚血40分間で変化する cathepsin D, β -N-acetylglucosaminidase, acid phosphatase の LED値におよぼす効果を図11に示す。NC0-700 処置群における虚血前の各酵素の LED値は、そ

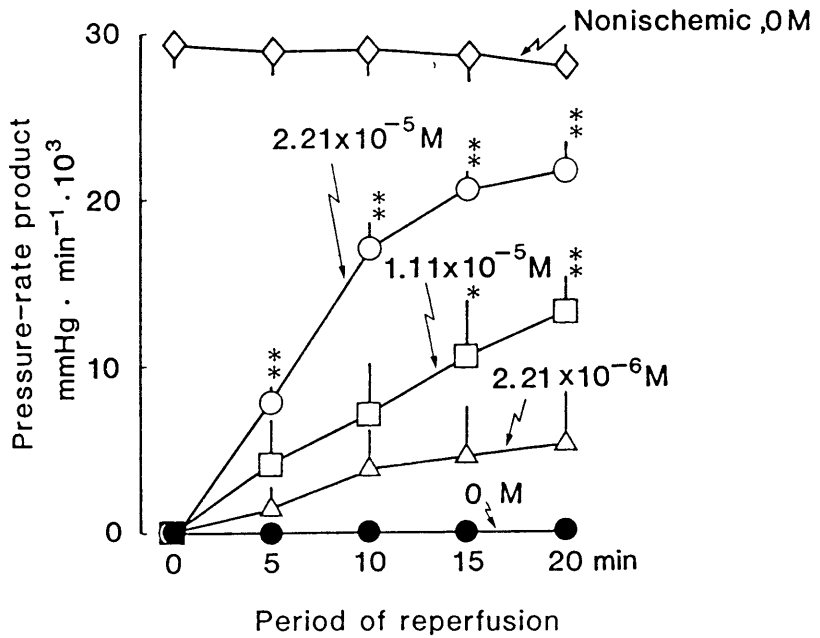


図 10 虚血後再灌流による心機能回復におよぼすジルチアゼムの作用。

虚血20分後に再び後負荷をかけて心臓を再灌流した。心機能は大動脈圧に心拍数を乗じた値で示した。いずれの場合も虚血により心臓の拍動は停止していた。

* P<0.05; **P<0.01, 同一再灌流時間のジルチアゼム非投与群(0 M)との比較。

れぞれ 44.5 ± 3.2 , 43.5 ± 2.3 および 75.8 ± 0.9 % であり、未処置群の虚血前 LED値 37.8 ± 1.2 , 39.3 ± 1.7 および 73.7 ± 1.7 % と較べてみて有意な差は認められなかった。図11に示すように、虚血40分間で増加するcathepsin D, β -N-acetylglucosaminidase, acid phosphatase の LED値は、それぞれ 8.9, 5.5 および 2.8 % であったが、NC0-700 で処置しておくで、その増加分は、それぞれ 5.8, 3.3 および -1.9 % に減少した。この時、NC0-700 の有無にかかわらず、非虚血心筋と虚血心筋のリソゾーム酵素の全活性は同じであった(表2)ので、ここで得られた結果はNC0-700 が虚血によるリソゾーム顆粒の破裂を防止し、リソゾーム酵素の細胞質内への遊出、拡散を抑制する傾向があることを示す。

もし、心筋組織に混在した微量のNC0-700 がリソゾーム酵素の活性を測定する試験管の中に存在すると、その微量のNC0-700 が酵素活性を抑制するかもしれない。しかし、図12に示すようにNC0-700 をCathepsin D 活性を測定する試験管内に加えても、その値はほとんど影響を受けなかった。この事実はNC0-700 はやはり、虚血時のリソゾーム酵素遊出を抑えることによってLED の上昇を抑制したものと考えられる。

リソゾーム顆粒の安定性におよぼすカルシウムの影響

虚血によって、細胞内に異常に蓄積したカルシウムイオンがリソゾーム顆粒の破裂、もしくはリソゾーム酵素の細胞質内への遊出を引き起こしたのか否かを調べるために次の実験を起なった。結果を表3に示す。抽出液を $350 \times g$, 5分間で遠心分離して得られた上清を高濃度のカルシウム(2.4または15 mM)存在下でインキュベートし、

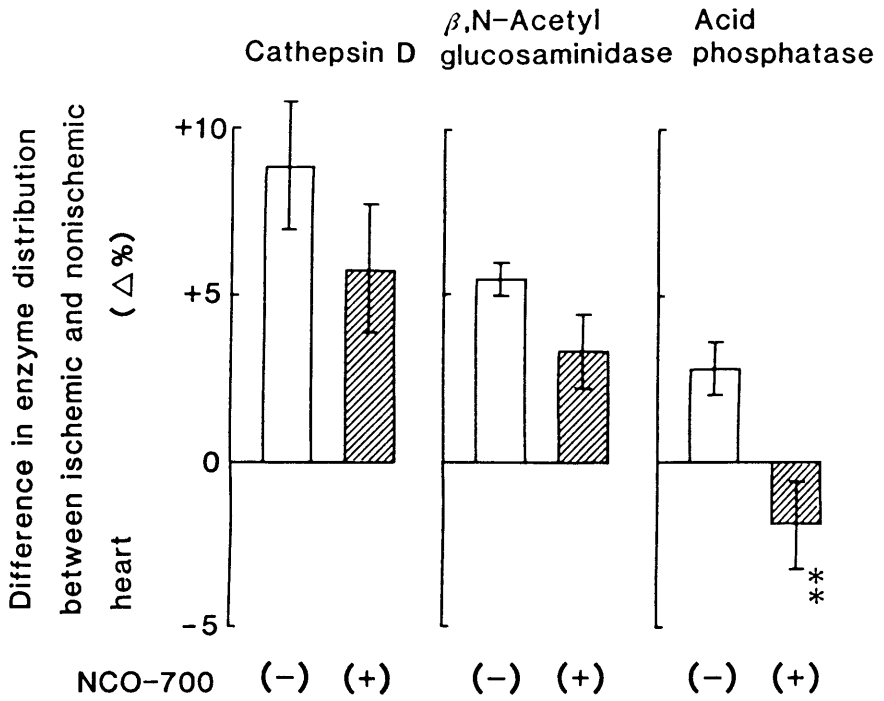


図 1 1 虚血によるリソゾーム酵素遊出におよぼすNCO-700の作用。

虚血5分後にNCO-700(200 mg/l)を含む灌流液に切り換えた。虚血40分後の心筋のLED値と非虚血心筋のLED値の差で示してある。

** $P < 0.01$, NCO-700非投与群(-)との比較。

表 2 非虚血心筋と虚血心筋のリソゾーム酵素全活性に
 およぼす NCO-700 の作用。

Period of ischemia (min)	NCO-700	β ,N-Acetyl Cathepsin D glucosaminidase Acid phosphatase		
		μmol substrate hydrolyzed/mg protein/h		
0	-	121.7 \pm 13.6	0.56 \pm 0.05	1.74 \pm 0.07
	+	128.6 \pm 9.5	0.54 \pm 0.04	1.67 \pm 0.08
40	-	136.3 \pm 8.3	0.59 \pm 0.04	1.91 \pm 0.06
	+	120.0 \pm 7.7	0.49 \pm 0.04	1.69 \pm 0.11

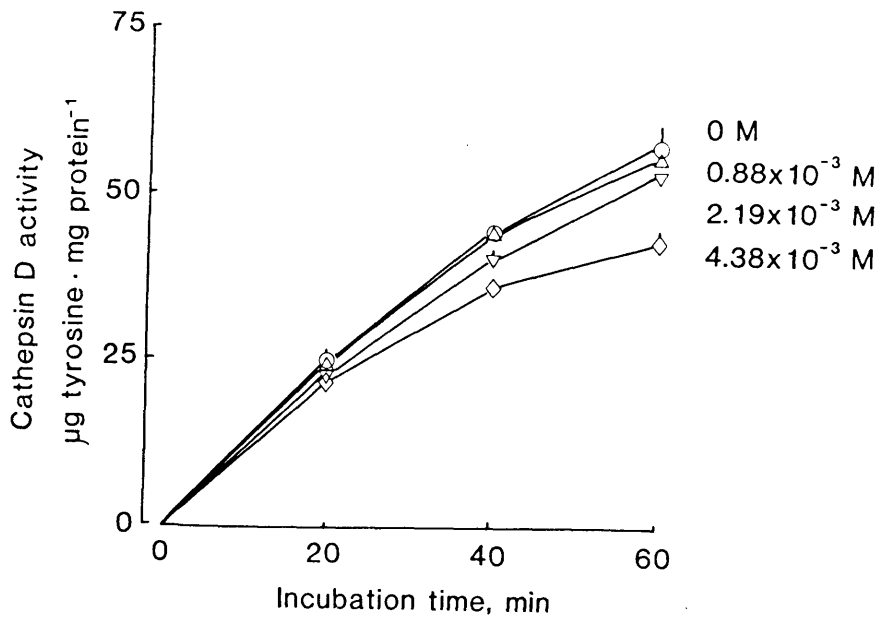


図 1 2 Cathepsin D 活性におよぼす NCO-700 の作用。
 Cathepsin D 活性を測定する試験管内に NCO-700 を加えた。

その後40,000×g, 20分間遠心分離をしてLEDを測定した。虚血心筋では組織pHが低下することも知られているので、この時pH7.4の他にpH6.7でも実験を行なった。確かに、高濃度のカルシウムとインキュベートするとCathepsin DのLED値は増加する傾向にあり、特に低pHで顕著に見られた。しかし、 β -N-glucosaminidase, acid phosphatase 活性に関してははっきりとした差は認められなかった。

表3 リソゾーム顆粒の安定性におよぼすカルシウムとpHの影響。

pH7.4				pH6.7			
2.4mM Ca ⁺⁺		15mM Ca ⁺⁺		2.4mM Ca ⁺⁺		15mM Ca ⁺⁺	
Incubation 0min	40min	Incubation 0min	40min	Incubation 0min	40min	Incubation 0min	40min
Cathepsin D							
31.7	33.4	34.3	38.7	32.6	38.9	33.4	41.9
β ,N-Acetylglucosaminidase							
34.7	35.2	34.2	35.3	34.6	36.1	38.8	36.9
Acid phosphatase							
78.9	78.8	78.2	75.9	76.8	76.9	77.0	75.7

40,000×g の遠心分離で nonsedimentable enzyme と sedimentable enzyme に分ける前にサンプルを上にも示す条件で30℃, 40分間インキュベートした。

考 察

リソゾーム顆粒について研究する場合はその抽出液および抽出法がたいへん重要になる。収率が悪くても無傷のリソゾーム顆粒を抽出するには、たくさんの操作段階を経なければならないが、最終的に目的は達成され得る。しかし、取り出した心筋細胞中に存在するそのままの割合で無傷のリソゾーム顆粒を取り出すことは非常に困難である。なぜなら、リソゾーム顆粒の膜は非常に不安定で、抽出液の組成や、ホモジナイズの条件によって容易に破壊される。通常、リソゾーム顆粒を抽出するには、KCl を含む緩衝液が使用される (Wildenthal et al., 1978)。また、0.25 M sucrose, 0.06 M KCl, 10 mM EGTA, 40 mM imidazolepropionate (pH 7.0) という緩衝液が、無傷のリソゾームが豊富に抽出できるという報告もある (Baxter and Suelter, 1983)。しかし、本研究の実験結果によると、組成として KCl を含む抽出液はすべて、cathepsin D, β -N-acetylglucosaminidase の LED は高値を示した (図 5)。すなわち、KCl を含まない液で抽出したほうが、リソゾームの抽出操作による破壊が少ないということになる。Mannitol と sucrose からなる抽出液はミトコンドリアを抽出するための緩衝液であるが、sucrose のみで等張にした Tris-HCl 緩衝液と比べて、なんの利点も認められなかった。したがって、本研究では 0.25 M Sucrose, 0.1 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl (pH 7.4) の緩衝液を抽出液として用いた。

ウサギ心臓を用いた in vivo 実験では、冠動脈結紮 15 分後から LED 値の有意な増加が観察され、結紮 45 分後における LED 値の増加分は cathepsin D は 9%, β -N-acetylglucosaminidase は 8%, acid

phosphatase は3%であったと報告されている(Wildenthal et al., 1978)。この結果は、本研究で得られた灌流ラット心臓における in vitro の結果と非常によく一致している。表1と表2に示すように各酵素の全活性は虚血によってほとんど変化しなかったので、LED値の上昇は虚血によってリソゾーム顆粒内の酵素が細胞質中へ遊出してリソゾーム酵素の細胞内分布が変わったことを意味する。一方、虚血時に心臓から遊離してくる蛋白質量を測定すると、虚血であるため冠流量が極端に少なく、冠流出液に含まれる蛋白質量は多いにもかかわらず、1分間あたりの蛋白質遊離量が虚血によって増加するということは観察されなかった(図7)。この実験事実は、虚血時にリソゾーム顆粒が破裂して中に含まれている蛋白分解酵素が細胞質に出てきて、細胞構成蛋白を分解するという考えと矛盾する。しかし、リソゾーム酵素で分解された蛋白質が冠流出液中に出てくるかどうかわかっていない。むしろ蛋白質のような巨大分子はリンパ液中に排出されるという(Michael et al., 1985)。また、虚血時に遊離してくるリソゾーム酵素は、特にその初期において、細胞の蛋白質全てを分解しなくても、細胞にとって重要な蛋白質を攻撃している可能性もある。

虚血の間、ジルチアゼムで処置しておく濃度依存的に、虚血時におこる各酵素のLED値上昇が抑制された(図9)。この事実は、虚血によってリソゾーム顆粒が破裂し、中に含まれていた一群の分解酵素が細胞質中に遊出、拡散するのをジルチアゼムが抑制することを示唆する。虚血時に遊出した分解酵素が細胞質で、種々の細胞構造や他の酵素、たとえばクレアチン磷酸キナーゼ(CPK)などを変

性失活させてしまうので、細胞は不可逆的障害を受ける。ジルチアゼムがリソゾーム酵素の遊出を抑えるとすると、この薬物が虚血後再灌流による心臓のポンプ機能を回復させることともよく符合する（図10）。しかし、ここで問題になるのは、ジルチアゼム自身が細胞内に入り込んで、直接リソゾーム顆粒を安定化させるのであろうか？ たぶん、答えは“No”であろう。ではなぜ、どのような機構でジルチアゼムは虚血心筋障害を防ぐのか？

NC0-700 は最近開発された蛋白質分解酵素阻害薬で、とくにCANP活性を抑制するという（Toyo-oka et al., 1982）。このNC0-700 も虚血による心筋梗塞領域を縮小するという報告があり、本実験でも虚血によるリソゾーム顆粒の破裂を抑制するということが示された（図11）。CANPは細胞質や筋線維周辺に存在し、基質としては主に筋線維成分や細胞質中の酵素phosphorylase kinaseなどが知られる（Obinata et al., 1981）。CANPがリソゾーム膜自身を基質にし得るか否か不明であるが、もし虚血によって細胞内カルシウム濃度が上昇しCANPが活性化されてリソゾーム顆粒を破壊すると本研究の一連の実験は全て説明がつく。図13にその仮説を示す。虚血によって細胞内カルシウム量が増加し、CANPが活性化される。活性化されたCANPは筋線維成分の分解と同時にリソゾーム顆粒の膜成分を分解し、リソゾーム顆粒を破裂させ、中の分解酵素群が細胞質中に遊出、拡散する。これら分解酵素が細胞を破壊し、最終的に細胞死をもたらす。ジルチアゼムはカルシウム拮抗薬であるので、細胞内カルシウム量を増加させず、CANPも活性化されないので、以下の反応は起こり得ない。NC0-700 は細胞内に入って直接CANPを抑制すると、この

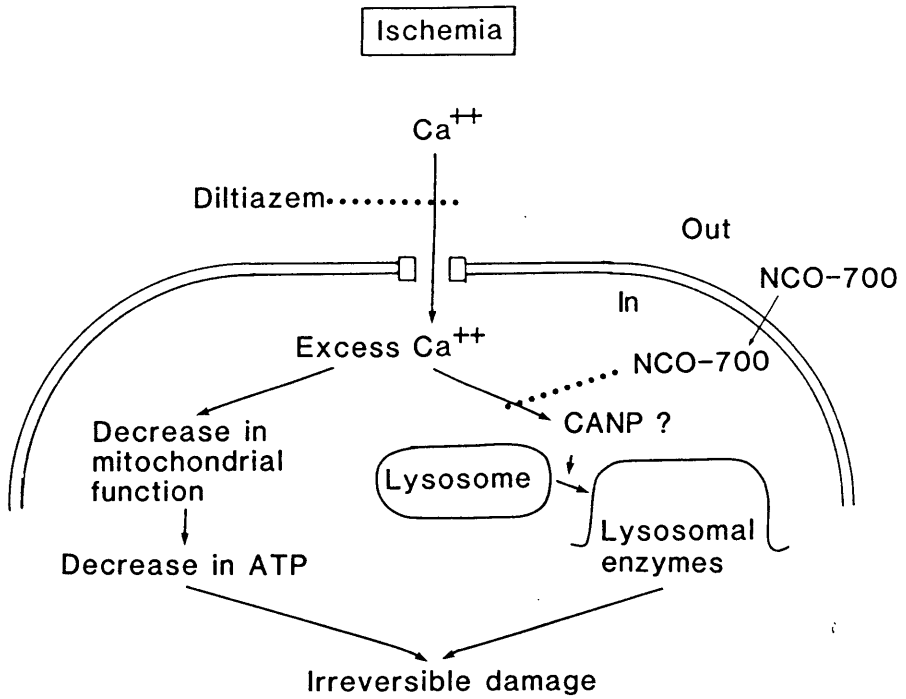


図 1 3 虚血による心筋細胞障害におけるリソゾーム顆粒の役割。

虚血時に細胞内に過剰に流入するカルシウムがミトコンドリアの機能を障害してATP産生を低下させ、リソゾーム顆粒から蛋白質分解酵素を遊出させて細胞構造を破壊する。

時も以下の反応は起こらない。したがって、これら二種類の作用機序の異なる薬物が、ともに、虚血によるリソゾーム顆粒破裂を防ぎ、虚血障害から心筋細胞を保護するということが矛盾なく説明できる。しかし、この仮説にはあまりにも仮定が多いことも否めない。また、リソゾーム顆粒の安定性にカルシウムがどのように作用するかについても調べたが、いま一つはっきりした結果は得られなかった(表3)。いずれにしても、虚血時にリソゾーム顆粒が重要な働きをしていることは間違いない。

結 論

虚血になると心筋細胞内に存在するリソゾーム顆粒が破裂して、中に含まれる種々の分解酵素が細胞質中に遊出、拡散する。これらの分解酵素は細胞構成成分を分解し、虚血心筋の障害を不可逆的にする。カルシウム拮抗薬であるジルチアゼムや蛋白質分解酵素抑制薬であるNC0-700は、虚血時のリソゾーム顆粒破裂を抑制した。今後、虚血時のカルシウム蓄積とリソゾーム顆粒の関係、また、虚血心筋障害におけるリソゾーム酵素の役割について詳しく調べることによって、将来リソゾーム酵素や他の蛋白質分解酵素が働かないようにする薬物が、心筋梗塞等の治療薬として使用できるようになるかもしれない。

謝 辞

本研究に深い御理解を示して下さり、また、多くの有益な御助言を頂きました旭川医科大学薬理学教室の安孫子保教授に深謝致します。

引用文献

Barrett, A.J. and Heath, M.F.: Lysosomal enzymes. In: Lysosomes, a laboratory handbook (2nd edition), edited by Dingle, J.T., pp. 19-145. Amsterdam, Elsevier/North-Holland Biomedical Press, 1977.

Baxter, J.H. and Suelter, C.H.: Skeletal muscle lysosomes: comparison of lysosomes from normal and dystrophic avian pectoralis muscle as a function of age. Muscle and Nerve 6: 187-194, 1983.

Decker, R.S. and Wildenthal, K.: Sequential lysosomal alterations during cardiac ischemia. II. Ultrastructural and cytochemical changes. Lab. Invest. 38: 662-673, 1978.

Ichihara, K. and Abiko, Y.: Effect of diltiazem, a calcium antagonist, on myocardial pH in ischemic canine heart. J. Pharmacol. Exp. Ther. 222: 720-725, 1982.

Ichihara, K. and Abiko, Y.: Effects of diltiazem and propranolol on irreversibility of ischemic cardiac function and metabolism in the isolated perfused rat heart. J. Cardiovasc. Pharmacol. 5: 745-751, 1983.

Ichihara, K., Robishaw, J.D., Vary, T.C. and Neely, J.R.: Protection of ischemic myocardium from metabolic products. Acta Med. Scand. 210: 13-18, 1981.

Lefer, A.M., Ogletree, M.L., Smith, J.B., Silver, M.J., Nicolaou, K.C., Barnette, W.E. and Gasic, G.P.: Prostacyclin : A potentially valuable agent for preserving myocardial tissue in acute myocardial ischemia. Science 200: 52-54, 1978.

Michael, L.H., Hunt, J.R., Weilbaecher, D., Perryman, M.B., Roberts, R., Lewis, R.M. and Entman, M.L.: Creatine kinase and phosphorylase in cardiac lymph: coronary occlusion and reperfusion. Am. J. Physiol. 248: H350-H359, 1985.

Nagao, T., Matlib, M.A., Franklin, D., Millard, R.W. and Schwartz, A.: Effect of diltiazem, a calcium antagonist, on regional myocardial function and mitochondria after brief coronary occlusion. J. Mol. Cell. Cardiol. 12: 29-43, 1980.

Obinata, T., Maruyama, K., Sugita, H., Kohama, K. and Ebashi, S.: Dynamic aspects of structural proteins in vertebrate skeletal muscle. Muscle and Nerve 4: 456-488, 1981.

Ogletree, M.L., Lefer, A.M., Smith, J.B. and Nicolaou, K.C.: Studies on the protective effect of prostacyclin in acute myocardial ischemia. Eur. J. Pharmacol. 56: 95-103, 1979.

Reimer, K.A. and Jennings, R.B.: Energy metabolism in the reversible and irreversible phases of severe myocardial

ischemia. Acta Med. Scand. 210: 19-27, 1981.

Rovetto, M.J.: Effect of hyaluronidase and methylprednisolone on myocardial function, glucose metabolism, and coronary flow in the isolated ischemic rat heart. Circ. Res. 41: 373-379, 1977.

Toyo-oka, T., Kamishiro, T., Masaki, M. and Masaki, T.: Reduction of experimentally produced acute myocardial infarction size by a new synthetic inhibitor, NCO-700, against calcium-activated neutral protease. Japan. Heart J. 23: 829-834, 1982.

Weishaar, R.E., Ashikawa, K. and Bing, R.J.: Effect of diltiazem, a calcium antagonist, on myocardial ischemia. Am. J. Physiol. 43: 1137-1143, 1979.

Welman, E.: Stabilization of lysosomes in anoxic myocardium by propranolol. Br. J. Pharmacol. 65: 479-482, 1979.

Wildenthal, K., Decker, R.S., Poole, A.R., Griffin, E.E. and Dingle, J.T.: Sequential lysosomal alterations during cardiac ischemia. I. Biochemical and immunohistochemical changes. Lab. Invest. 38: 656-661, 1978.