

AMCoR

Asahikawa Medical University Repository <http://amcor.asahikawa-med.ac.jp/>

薬理と治療 (1984.12) 12巻Suppl.7:1235~1236.

虚血時のLysosome酵素遊出に及ぼすDiltiazemの効果

市原和夫、安孫子保

虚血時の Lysosome 酵素遊出に及ぼす Diltiazem の効果

市原和夫* 安孫子保*

Effect of Diltiazem on Subcellular Redistribution of Lysosomal Enzymes during Ischemia

虚血による心筋傷害が不可逆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¹⁾、脂肪酸代謝中間体の蓄積²⁾、ミトコンドリア呼吸機能の低下³⁾、高エネルギーリン酸化合物含量の減少⁴⁾などがあげられる。心筋細胞内にも lysosome 顆粒が存在する。Lysosome 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 lysosome は細胞内の“清掃屋”として知られる。この lysosome 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、中に含まれる分解酵素が細胞質中に遊出、拡散する。もし、虚血によって、lysosome 顆粒が破裂すると、やはり中の蛋白質分解酵素などが細胞質中に遊出、拡散するので、これらの分解酵素が心筋細胞構造を破壊し、心筋に不可逆的な傷害をもたらすことが、充分に考えられる。したがって、本研究の目的は、虚血時に lysosome 顆粒が破壊され、lysosome 中に含まれる分解酵素が細胞質に遊出して来るか否かを調べ、この虚血時の lysosome 顆粒の変化に、虚血心筋保護作用があるといわれている⁵⁾ diltiazem (Herbesser[®]) 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

雄性 Sprague-Dawley ラット (体重 250~350 g) から摘出した心臓を、Krebs-Henseleit bicar-

bonate buffer を灌流液として、working heart 法⁶⁾で灌流した。Working heart 法で灌流されている心臓にかけられている後負荷を除去することによって虚血心筋標本を作製した⁴⁾。Diltiazem 処置群においては、虚血 5 分前に灌流液を diltiazem (2.2×10^{-6} M, 1.1×10^{-6} M, 2.2×10^{-6} M) を含む buffer に切り換えた。虚血直前あるいは虚血 40 分後に心筋を冷 buffer に採取し、心筋重量測定後、2 つに分けた。心筋の一方 (600~800 mg) を冷抽出液 (0.25 M sucrose, 1 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl, pH7.4) 中、鋏で細切し、次にテフロンホモジナイザーでホモジナイズした。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 (lysosome から細胞質へ遊出した酵素) とし、沈殿には 0.1% Triton X-100 を含む抽出液を加えて可溶化し、“sedimentable enzyme”分画 (無傷の lysosome 顆粒中の酵素) とした。

他の心筋サンプル (200~300 mg) は、0.1% Triton X-100 を含む抽出液でホモジナイズされ、350×g, 5 分間遠心分離された。得られた上清を lysosome 酵素の全活性測定用の試料として用いた。Lysosome 酵素としては、cathepsin D, β -N-acetylglucosaminidase, acid phosphatase の活性を Barrett ら⁹⁾の方法に従い測定した。Lysosome 酵素遊出の指標として、酵素

* 旭川医科大学薬理 : Department of Pharmacology, Asahikawa Medical College

表 1 虚血時の lysosome 酵素遊出に及ぼす diltiazem の作用

Diltiazem (M)	Ischemia	Nonischemia	Difference (Δ%)
Cathepsin D			
0	53.4±1.4	40.2±2.5	13.2
2.2×10 ⁻⁶	44.5±1.4	39.5±5.3	5.0
1.1×10 ⁻⁵	41.8±1.2	37.5±3.0	4.3
2.2×10 ⁻⁵	41.4±1.9	41.2±2.8	0.2
β-N-acetylglucosaminidase			
0	41.4±1.7	33.8±0.5	7.6
2.2×10 ⁻⁶	36.7±1.7	32.8±1.9	3.9
1.1×10 ⁻⁵	35.0±1.8	35.2±2.0	-0.2
2.2×10 ⁻⁵	35.9±1.3	37.0±0.7	-1.1
Acid phosphatase			
0	82.7±0.5	78.5±0.6	4.2
2.2×10 ⁻⁶	77.1±0.7	77.7±0.9	-0.6
1.1×10 ⁻⁵	78.8±0.4	78.9±0.8	-0.1
2.2×10 ⁻⁵	77.4±0.4	79.8±0.6	-2.4

酵素遊出の指標として、各酵素の細胞内分布を計算し、表に示してある。

$$\text{Lysosome 酵素の細胞内分布} = \frac{\text{nonsedimentable}}{\text{nonsedimentable} + \text{sedimentable}} \times 100 (\%)$$

の細胞内分布を次式によって算出した。

$$\text{Lysosome 酵素の細胞内分布} = \frac{\text{nonsedimentable}}{\text{nonsedimentable} + \text{sedimentable}} \times 100 (\%)$$

この数値が大きくなれば、細胞質中に遊出している酵素が増えていることを示す。

実験結果および考察

Diltiazem 処置をしていない、非虚血心筋の cathepsin D, β-N-acetylglucosaminidase, acid phosphatase 活性の 40.2±2.5, 33.8±0.5, 78.5±0.6% が細胞質中に存在していた。

灌流心臓を 40 分間虚血にすると、細胞質中の cathepsin D, β-N-acetylglucosaminidase, acid phosphatase 活性は、それぞれ 13.2, 7.6, 4.2% 上昇した。このとき、各酵素の全活性は変化しなかったため、この事実は虚血によって lysosome が破裂し、中に含まれている分解酵素が細胞質中に遊出、拡散したことを示唆する。虚血 5 分前から灌流液を diltiazem を含む液に切り換えておくと、虚血による lysosome 酵素遊出は、diltiazem の濃度に依存して抑制された(表 1)。2.2×10⁻⁵ M の diltiazem は、cathepsin D, β-N-acetylglucosaminidase, acid phosphatase の虚血による細胞質への遊出を完全に抑えた。虚血時に lysosome が破裂して、中の分解酵素が細胞質中に拡散すれば、これら分解酵素によって心筋細胞は破壊され、虚血による心筋傷害を不可逆的なものにしてしまう。Ca 拮抗薬である diltiazem は虚血心筋を保護する作用があることは広く知られている⁴⁾が、この lysosome 顆粒に対する作用も、本薬剤の虚血心筋保護作用の機序の 1 つにあげられるかもしれない。

文 献

- 1) Ichihara K. & Abiko Y.: *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 222 : 720 (1982)
- 2) Ichihara K., Robishaw J.D., Vary T.C. & Neely J.R.: *Acta Med. Scand.* 210 : 13 (1981)
- 3) Reimer K.A. & Jennings R.B.: *Acta Med. Scand.* 210 : 19 (1981)
- 4) Ichihara K. & Abiko Y.: *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 5 : 745 (1983)
- 5) Neely J.R., Liebermeister H., Battersby E.J. & Morgan H.E.: *Am. J. Physiol.* 212 : 804 (1967)
- 6) Barrett A.J. & Heath M.F.: *Lysosomes* (2nd Ed.), Elsevier/North-Holland Biomedical Press, Amsterdam (1977), p. 19