

ラット D-ガラクトサミン急性肝不全に対する アプロチニン投与効果と肝細胞障害に対する アプロチニンの抑制作用に関する研究

中 村 利 夫

広島大学医学部内科学第一講座 (主任: 梶山梧朗教授)
広島大学医学部生化学第一講座 (指導: 川崎 尚教授)

受付 平成 3 年 7 月 19 日

受理 平成 3 年 10 月 5 日

従来, 急性肝不全に対するプロテアーゼインヒビター投与の影響に関して多くの報告があるが, 作用機序に関しては不明点が多い。今回, 著者は *in vivo* において D-ガラクトサミン投与により誘導された急性肝不全へのプロテアーゼインヒビター投与の影響を検討した。同時にその作用機序の解明のために *in vitro* の実験系として, D-ガラクトサミン, 四塩化炭素により細胞障害を引き起こした初代培養肝細胞を用いて, 肝細胞障害に対するプロテアーゼインヒビターの影響も検討した。

アプロチニン投与は D-ガラクトサミン投与により誘導されるラット急性肝不全の生存率, 肝機能障害 (血清総ビリルビン, 血清アルブミン) を改善した (*in vivo*)。培地へのアプロチニン添加は D-ガラクトサミンを前投与したラットから分離, 培養した肝細胞の肝細胞障害 (生着細胞数の減少, 培地中 LDH 活性の上昇) を抑制した (*in vitro*)。このアプロチニン添加による肝細胞障害への抑制作用は $0.1 \mu\text{g/ml}$ から認められ, $1 \mu\text{g/ml}$ でほぼ最大であった。他のプロテアーゼインヒビター (ウリナスタチン, メシル酸ガベキセート, メシル酸ナファモスタット) もほぼアプロチニンと同様な肝細胞障害抑制作用を示した。

他の肝障害誘導物質である四塩化炭素を前投与したラットから分離, 培養した肝細胞は D-ガラクトサミンの場合と同様に経時的に肝細胞障害を示し, アプロチニン添加はこの肝細胞障害も抑制した。この *in vitro* における実験結果はプロテアーゼインヒビターが凝固線溶系, 循環系を介することなく, 直接肝細胞に作用して肝細胞障害を改善させる可能性を示唆する。

以上より *in vivo* における急性肝不全へのプロテアーゼインヒビター投与効果の作用機序として, これまで報告されてきた disseminated intravascular coagulation (DIC) を改善する機序以外に, 直接肝細胞に作用し肝細胞障害を抑制する結果, 急性肝不全を改善する可能性が考えられた。

Key words : Protease inhibitor, Aprotinin, Acute liver failure, D-Galactosamine, Hepatocyte

現在, 急性肝不全に対しては各種治療が行われており, プロテアーゼインヒビターも使用されている薬剤の一つである。急性肝不全にしばしば合併する disseminated intravascular coagulation (DIC) に対するプロテアーゼインヒビター投与効果に関しては, 多く報告されており, その作用機構に関する研究も進められてきた^{7,9,10,23,24,26}。しかし, 肝障害自体

へのプロテアーゼインヒビターの影響に関する報告は少ない^{3,5,10}。

最近, 市原らは初代培養肝細胞を使用した研究により, アプロチニンなどのプロテアーゼインヒビターが肝細胞膜のプロテアーゼに作用し, 肝細胞の生存を促進させることを報告した^{1,19,30}。また彼らはこのプロテアーゼが肝細胞障害にも関与している可能性がある

と推測している²⁰。しかし、彼らは *in vitro* において正常肝細胞へのプロテアーゼインヒビターの影響は検討しているが、障害肝細胞への影響は検討していないし、*in vivo* における肝障害へのプロテアーゼインヒビター投与の影響についても検討していない。

著者は市原らの報告よりプロテアーゼインヒビターが直接肝細胞に作用して肝細胞障害を抑制し、急性肝不全を改善する可能性があると考えた。しかしプロテアーゼインヒビターの肝細胞への直接の影響を *in vivo* で検討することは、プロテアーゼインヒビターが循環系、凝固線溶系などを介して肝細胞に影響を与える可能性があり^{9,10,25-27,32}、困難である。したがって肝細胞障害へのプロテアーゼインヒビターの影響を *in vitro* の実験系で検討することが必要である。そこで著者は *in vitro* の実験系として、肝障害誘導物質として知られる D-ガラクトサミン、四塩化炭素をあらかじめ投与したラットから肝細胞を分離培養し、肝細胞障害のモデルを作成する MacDonald らの方法^{14,15} を用いた。

今回、著者はプロテアーゼインヒビターの急性肝不全への有用性を検討するために、*in vivo* において、D-ガラクトサミン急性肝不全ラットにアプロチニンを投与し、その投与効果を生存率、肝機能について検討した。また、その作用機序の解明のために、アプロチニンと他のセリンプロテアーゼインヒビター（ウリナスタチン、メシル酸ガベキサート、メシル酸ナファモスタット）の D-ガラクトサミン、四塩化炭素による肝細胞障害への影響を *in vitro* で検討した。

材料と方法

1) 実験動物

D-ガラクトサミン肝障害ラット、四塩化炭素肝障害ラットの作製およびラット肝実質細胞の採取には、ウイスター系雌性ラット（約200 g）を使用した。食物および水分は、自由に摂取させた。

2) 実験試薬

D-ガラクトサミン塩酸塩（D-GalN）、インスリンは Sigma Chemical Co. (St. Louis, Mo.) より、四塩化炭素（CCl₄）は半井化学薬品（京都）より、LDH 測定キットはベーリンガー・マンハイム山之内（東京）より、コラゲナーゼタイプ I は和光純薬（大阪）より購入した。アプロチニンはバイエル薬品（大阪）より、ウリナスタチンは持田製薬（東京）より、メシル酸ガベキサートは小野薬品（大阪）より、メシル酸ナファモスタットは鳥居薬品（東京）より提供された。その他の試薬はすべて市販特級品を用いた。

3) *in vivo* における実験方法

a) D-GalN 投与量の検討：24時間の絶食後、ウイスター系雌性ラット（約200 g）に D-GalN を 1,000 (n=5), 1,500 (n=11), 2,000 (n=11), 2,500 (n=4) mg/kg を腹腔内投与し、10日間生存率の推移を観察した。D-GalN は使用直前に生理食塩水に溶解し、6 N 水酸化ナトリウム溶液で pH 7.4 に調節した。

b) D-GalN 急性肝不全ラットの生存率に対するアプロチニン投与の影響：24時間の絶食後、ウイスター系雌性ラット（約200 g）に D-GalN (2,000 mg/kg) を腹腔内投与した。アプロチニン投与群 (n=30) には、D-GalN 投与 8 時間後からアプロチニン (15,000 KIU/kg) を 8 時間毎に腹腔内投与した。アプロチニン 1 KIU (Kallikrein inactivator unit) とは pH 8, 室温 2 時間で 2 単位のカリクレインの効力を半減する量と定義されている。また 1 KIU はアプロチニン 0.14 μg に相当する。アプロチニンは生理食塩水に溶解して使用した。アプロチニンの投与量、投与間隔に関しては末盛らの報告²⁷ を参考にした。アプロチニン非投与群（以下 D-GalN 投与群, n=30）には生理食塩水を投与した。両群の生存率の推移を観察し、検定は Log-Rank test により行った。

c) D-GalN 急性肝不全ラットの肝機能に対するアプロチニン投与の影響：24時間の絶食後、ウイスター系雌性ラット（約200 g）に D-GalN (1,000 mg/kg) を腹腔内投与した。アプロチニン投与群には、D-GalN 投与 8 時間後からアプロチニン (15,000 KIU/kg) を 8 時間毎に腹腔内投与した。アプロチニン非投与群（以下 D-GalN 投与群）には生理食塩水を投与した。両群の血清総ビリルビン、GPT、アルブミンは、D-GalN 投与 1 日後（両群 n=10）、2 日後（両群 n=12）、3 日後（両群 n=13）に測定した。血清中総ビリルビンはアルカリアゾビリルビン法¹⁶、GPT は UV 法²¹、アルブミンは BCG 法² により測定した。検定は Mann-Whitney の U 検定¹¹ によって行った。

4) *in vitro* における実験方法

a) 肝障害ラットの作製：肝障害ラットの作製は MacDonald らの方法^{14,15} に準じて行った。D-GalN 肝障害ラットはウイスター系雌性ラットに D-GalN 1,000 mg/kg を腹腔内投与して作製した。対照のラットには生理食塩水を腹腔内投与した。CCl₄ 肝障害ラットはウイスター系雌性ラットに CCl₄ 0.5 ml/kg を経胃管的に投与して作製した。CCl₄ はオリーブ油で 10% に希釈して使用した。対照のラットにはオリーブ油のみ同容量を経胃管的に投与した。

b) ラット肝実質細胞の分離と培養：ラット肝実質細胞は、Seglen らのコラゲナーゼ灌流法²⁸ で分離した。D-GalN 投与 1 時間後、CCl₄ 投与 30 分後および対照のラットから肝細胞を分離し、それぞれ D-GalN 処理肝細胞、CCl₄ 処理肝細胞、無処理肝細胞とした。分離した肝細胞の生存率はトリパンブルー排除法で判定し、85% 以上の標品を実験に使用した。分離した肝細胞は 10⁻⁸ M インスリン、40 mM L-グルタミン、100 U/ml ペニシリン、100 μg/ml ストレプトマイシンを含む Williams modified essential minimum 培地（WEM 培地）³⁴ に懸濁し、最終的に 2 × 10⁵ 細胞数/ml に調整後、35mm collagen coated dish に 2 ml/dish を加えて肝細胞初代培養を開始した。培養開始 1 時間後に、培養開始時と同じ新鮮培地に変更した。各種プロテアーゼインヒビター（アプロチニンは 0.1, 0.5, 1, 5, 10 μg/ml, ウリナスタチン、メシル酸ガベキサート、メシル酸ナファモスタットは 0.5, 5 μg/ml の濃度）は培養開始時に添加した。培養開始後 2, 6, 12, 18, 24 時間後に生着細胞数、培地中 LDH 活性を測定した。培養は 5% CO₂, 95% 空気、37°C 下で行った。

c) 生着細胞数と培地中 LDH 活性の測定：生着細胞数は 0.05% トリプシン / 0.02% EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid) 液で培養肝細胞を剥離後、トリパンブルー排除法により測定した。培地中 LDH 活性は分光学的に LDH 測定キット（ベーリンガー・マンハイム山之内、東京）で測定した。

成績

1: *in vivo* の実験

a) D-GalN 投与量の検討：D-GalN 1,000, 1,500, 2,000, 2,500 mg/kg 腹腔内投与後 10 日目のラット生存率はそれぞれ、5/5, 9/11, 1/11, 0/4 であった（表 1）。この結果より、D-GalN 急性肝不全の生存率、肝機能の検討には、それぞれ D-GalN を 2,000, 1,000 mg/kg 投与して行った。

b) D-GalN 急性肝不全ラットの生存率に対するアプロチニン投与の影響：2,000 mg/kg D-GalN 投与 2 日目から D-GalN 肝障害ラットの生存率は経時的に減少した。アプロチニン投与により有意に生存率が改善された（Log-Rank test: p < 0.05）（図 1）。

c) D-GalN 急性肝不全ラットの肝機能に対するアプロチニン投与の影響：血清総ビリルビン、GPT は 1,000 mg/kg D-GalN 投与 1 日目から上昇し、2 日目には最高値を呈し、アルブミンは D-GalN 投与 1 日目から低下した。総ビリルビンは 2 日目に D-GalN

Table 1. The dose-dependent effects of D-galactosamine on the survival of rats

	D-Galactosamine (mg/kg)			
	1,000	1,500	2,000	2,500
Survival rate	5/5	9/11	1/11	0/4

Survival rate was measured 10 days after the intraperitoneally administration of D-galactosamine.

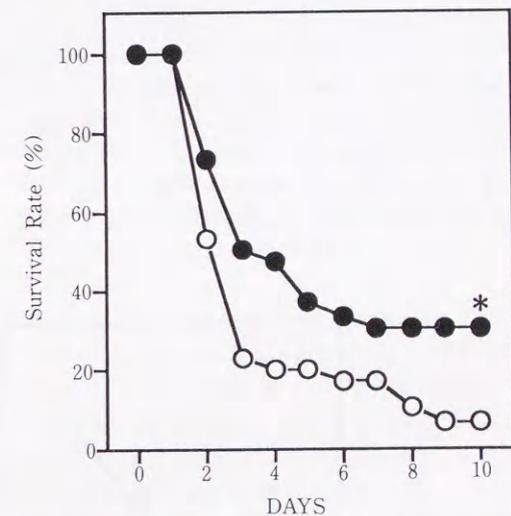


Fig. 1. The effects of aprotinin administration on the survival of rats with acute liver failure induced by galactosamine. The aprotinin (n=30) and galactosamine groups (n=30) received aprotinin and saline respectively by every 8 h from 8 h after the administration of galactosamine (2,000 mg/kg). *p < 0.05 for the aprotinin group compared with galactosamine group (Log-Rank test). ●: aprotinin group, ○: galactosamine group.

投与群 2.0 ± 1.5 mg/dl, アプロチニン投与群 0.7 ± 0.6 mg/dl であり、アプロチニン投与により総ビリルビンの上昇は有意に抑制された（Mann-Whitney の U 検定: p < 0.05）。アルブミンは 2 日目に D-GalN 投与群 2.5 ± 0.4 g/dl, アプロチニン投与群 3.0 ± 0.4 g/dl であり、アプロチニン投与によりアルブミンの低下は有意に抑制された（Mann-Whitney の U 検定: p < 0.05）。GPT は、2 日目に D-GalN 投与群 896 ± 553 U/L, アプロチニン投与群 439 ± 339 U/L であり、アプロチニン投与により GPT の上昇は抑制される傾向があった（表 2）。

Table 2. The effects of aprotinin administration on total bilirubin, GPT and albumin 1,2 and 3 days after the administration of D-galactosamine.

	Days after the administration of D-galactosamine (1,000 mg/kg)						Control
	1 day		2 days		3 days		
	Aprotinin	Saline	Aprotinin	Saline	Aprotinin	Saline	
T. Bilirubin (mg/dl)	0.3±0.1 (10)	0.3±0.1 (9) [#]	0.7±0.6 (12)	2.0±1.5 (10) [#]	0.3±0.2 (9) [#]	0.6±0.4 (13)	0.2±0.0 (6)
GPT (U/L)	283±247 (10)	369±350 (10)	439±399 (12)	896±553 (12)	101±69 (13)	174±139 (13)	17±9 (6)
Albumin (g/dl)	2.8±0.1 (10)	2.7±0.1 (10)	3.0±0.4 (12)	2.5±0.4 (12)	2.7±0.2 (13)	2.5±0.2 (13)	3.0±0.0 (6)

Aprotinin; Rats received D-galactosamine (1,000 mg/kg) and aprotinin injection.

Saline; Rats received D-galactosamine (1,000 mg/kg) and saline injection.

All values are mean ± SD

*p<0.05 compared with Saline.

The number of rats is in parentheses.

#; Hemolytic samples are excluded.

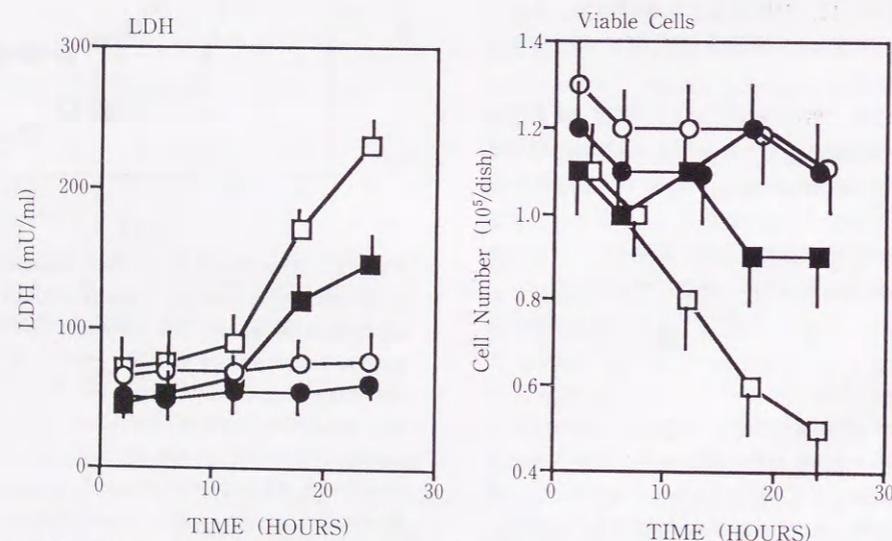


Fig. 2. The effects of aprotinin on the media LDH activities and viable cell numbers of monolayer hepatocyte cultures from galactosamine-treated rats. Points indicate means; bars indicate SD of triplicate cultures. Similar results were obtained in two independent experiments. □: treated cells, ■: treated cells+aprotinin (1 µg/ml), ○: non-treated cells, ●: non-treated cells+aprotinin (1 µg/ml)

2) *in vitro* の実験

a) D-GalN 処理肝細胞へのアプロチニン添加の影響: D-GalN 処理肝細胞 (D-GalN をあらかじめ投与したラットから分離, 培養した細胞) は, 培養開始時には無処理肝細胞と比較して生存率, 位相差顕微鏡上の形態に差は認めなかったが, 生着細胞数は培養開始後12時間後から減少し, 培地中 LDH 活性は培養開始後18

時間後から上昇し, 肝細胞障害が認められた。一方, 無処理肝細胞では, 培養24時間まで生着細胞数, 培地中 LDH 活性は経時的に変動しなかった (図2)。D-GalN 処理肝細胞では, 培地中 LDH 活性は培養開始2時間後に71±15 mU/ml, 24時間後には230±15 mU/ml へ上昇した。D-GalN 処理肝細胞にアプロチニン (1 µg/ml) を添加すると, 培地中 LDH 活性は

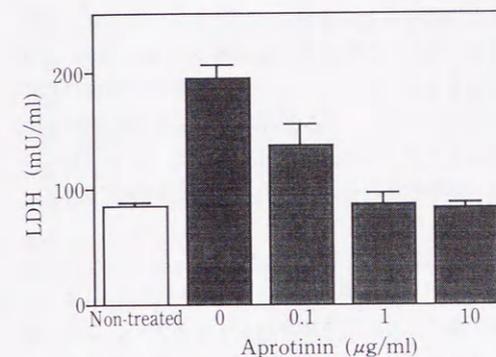


Fig. 3. Concentration-dependent effects of aprotinin on the media LDH activities of monolayer hepatocyte cultures from galactosamine-treated rats at 24 h after plating. The data are expressed as means of triplicate cultures; bars indicate SD. Similar results were obtained in two independent experiments. Closed bar: galactosamine-treated cells, open bar: non-treated cells.

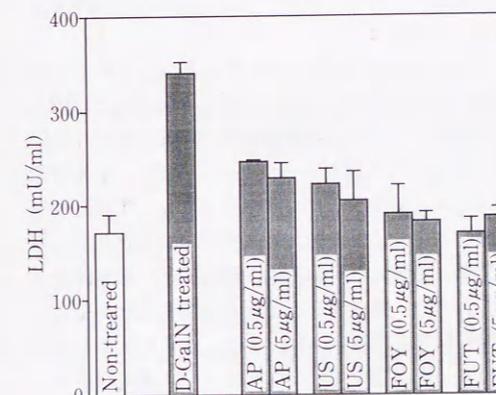


Fig. 4. The effects of various protease inhibitors (0.5 and 5 µg/ml) on the media LDH activities of monolayer hepatocyte cultures from galactosamine-treated rats at 24 h after plating. The data are expressed as the means of triplicate cultures; bars indicate SD. Similar results were obtained in two independent experiments. Closed bar: galactosamine-treated cells, open bar: non-treated cells. AP: aprotinin, US: urinastatin, FOY: gabexate mesilate, FUT: nafamostat mesilate.

培養開始24時間後147±15 mU/ml となり, アプロチニン添加により D-GalN 肝細胞障害が軽減された (図

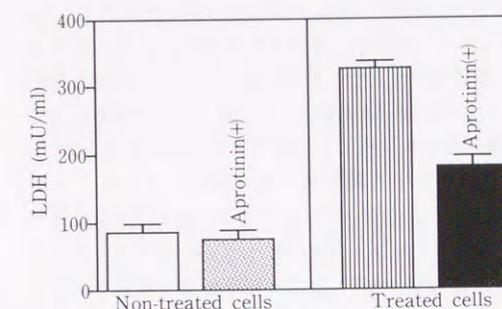


Fig. 5. Effects of aprotinin on the media LDH activities of monolayer hepatocyte cultures from carbon tetrachloride-treated rats at 24 h after plating. The data are expressed as the means of triplicate cultures; bars indicate SD. Similar results were obtained in two independent experiments. □: non-treated cells, ■: non-treated cells+aprotinin (1 µg/ml), ▨: treated cells, ▩: treated cells+aprotinin (1 µg/ml).

2)。アプロチニン添加培養時間を一定 (24時間) にして, アプロチニンの濃度の影響を調べた (図3)。アプロチニンは0.1 µg/ml から D-GalN 肝細胞障害を用量依存的に抑制した。このアプロチニン0.1-1 µg/ml は, ヒトにおいて, アプロチニンを治療量投与した場合の血中濃度範囲内に相当する。

b) D-GalN 処理肝細胞への各種セリンプロテアーゼインヒビター添加の影響: アプロチニン以外のセリンプロテアーゼインヒビター (ウリナスタチン, メシル酸ガベキサート, メシル酸ナファモスタット) の D-GalN 肝細胞障害への抑制効果を検討した。0.5, 5 µg/ml 濃度のウリナスタチン, メシル酸ガベキサート, メシル酸ナファモスタット添加による D-GalN 肝細胞障害への抑制効果はアプロチニンの抑制効果とほぼ同様であった (図4)。

c) CCl₄ 処理肝細胞へのアプロチニン添加の影響: CCl₄ 処理肝細胞の培地中 LDH 活性は, 培養開始後経時的に上昇した。無処理肝細胞の培地中 LDH 活性は変動しなかった。CCl₄ 処理肝細胞にアプロチニン (1 µg/ml) を添加すると, 培地中 LDH 活性は, 培養開始24時間後対照の329±9 mU/ml から181±16 mU/ml に抑制され, アプロチニンは CCl₄ 肝細胞障害においても肝細胞障害抑制効果を示した (図5)。

考 察

現在, 急性肝不全に対して各種治療が行われており, プロテアーゼインヒビターも使用されている薬剤の一

つである。急性肝不全はしばしば DIC を合併するが、DIC では、血管内で凝固系が活性化し全身の微小血管に多数の微小血栓が形成され、二次的に線溶亢進が生じひいては凝固障害が生じ、著しい出血傾向が生じる。凝固系は生体内の代表的プロテアーゼ系であるが、DIC 時における凝固系亢進の制御のためにプロテアーゼインヒビターが投与される。急性肝不全に合併する DIC に対するプロテアーゼインヒビターの投与効果とその作用機序に関する研究は多く報告されている^{23,24)}。例えばメシル酸ガベキサート^{9,10)}、アンチトロンビン III^{7,26)} などの投与効果が報告されている。しかし、肝障害自体へのプロテアーゼインヒビターの影響に関しては報告が少ない。

Galvin ら⁸⁾ は灌流肝を用いた実験において、低酸素による肝障害がアプロチニン投与により抑制されることを報告し、その作用機序としてプロテアーゼインヒビターによる細胞膜崩壊の抑制の可能性を挙げている。Ferreira ら^{4,5)} は *in vivo* において CCl₄肝障害が 1-1-chloro-3-tosylamido-7-amino-2-heptanone (TLCK) 投与で抑制されることを報告し、プロテアーゼやエラスターゼが CCl₄肝障害において重要な役割を果たしている可能性を示唆している。岩城ら³⁾ は抗補体作用を有するプロテアーゼインヒビターであるメシル酸ナファモスタットが D-GalN 急性肝不全を改善することを報告した。

しかし、こうした報告においてもプロテアーゼインヒビターが肝障害を改善させる機序に関しては不明な点が多い。特にプロテアーゼインヒビターが肝細胞に直接作用して、肝細胞障害自体に如何なる影響を与えるかについてはほとんど不明である。今回の *in vivo* の実験において D-GalN 急性肝不全ラットの生存率、肝機能障害がアプロチニン (3,000 KIU×3/day) 投与により改善された (図 1, 表 2)。その作用機序としては、急性肝不全に高頻度に DIC, 循環不全が合併することから、従来より報告されているアプロチニンの抗凝固抗線溶作用、抗ショック作用^{17,25,27,32)} が関与している可能性が考えられる。

最近、市原らはアプロチニンなどのプロテアーゼインヒビターが肝細胞膜のトリプシン様プロテアーゼに作用して、初代培養肝細胞の生存を促進することを報告している^{1,19,30)}。同時に彼らはこのプロテアーゼが肝細胞障害に関与している可能性があるとして推測しているが²⁰⁾、*in vivo* の肝障害や *in vitro* の肝細胞障害に対するプロテアーゼインヒビターの影響は検討していない。著者が D-GalN 急性肝不全ラットにアプロチニンを投与したところ、生存率、肝機能障害が改善した。

その作用機序として著者はアプロチニンが DIC, 循環障害を改善して急性肝不全を改善させる以外に、市原らの報告よりアプロチニンが直接肝細胞に作用して肝細胞障害を抑制し、その結果生存率、肝機能障害を改善させる可能性があると考えた。しかし、*in vivo* の実験では凝固線溶系、循環系への影響を除外できないことから、*in vitro* で検討した。

肝障害誘導物質を使用した *in vitro* における肝細胞障害のモデルには種々の報告がある^{6,14,15,31)}。しかし、細胞培養には血清が使用されることが多く、この血清中には各種プロテアーゼ、プロテアーゼインヒビターが存在する。したがってプロテアーゼインヒビターの影響を検討する場合、無血清の実験系の方がより適している。しかし、無血清で初代培養肝細胞を培養した場合、長期間肝細胞を維持することが困難であり、培養早期に障害が生じる肝細胞障害モデルが必要となる。MacDonald ら^{14,15)} は D-GalN, CCl₄を前投与したラットから分離、培養した初代培養肝細胞を用いて肝細胞障害モデルを作製した。このモデルでは培養早期から肝細胞障害が生じるため、著者はこのモデルを使用して、プロテアーゼインヒビターの肝細胞障害への影響を検討した。

D-GalN, CCl₄を前投与したラットから分離した肝細胞は、無処理のラットから分離した肝細胞と比較して、分離時の生存率、培養開始時の生着率や位相差顕微鏡上の形態に差はなかったが (未発表)、培養時間の経過と共に培地中 LDH 活性が上昇し、生着肝細胞数は減少した。すなわち、肝障害誘導物質投与ラットから分離、培養した肝細胞は、経時的に肝細胞障害を生じる。一方、無処理ラットから分離した肝細胞では培養24時間まで培地中 LDH 活性、生着肝細胞数は変化しなかった (図 2)。このモデルでは凝固線溶系、循環系等の影響を受けずに、薬剤の肝細胞障害への直接効果を検討することが可能である。D-GalN を前投与したラットから分離、培養した肝細胞における培地中 LDH 活性の上昇、生着肝細胞数の減少は、アプロチニン (1 µg/ml) の添加によって抑制された (図 2)。CCl₄を前投与した肝細胞障害のモデルにおいてもほぼ同様にアプロチニンにより肝細胞障害が抑制された (図 5)。また、この肝細胞障害へのアプロチニンの障害抑制効果は 0.1 µg/ml から生じ、1 µg/ml でほぼ最大に達している (図 3)。この濃度はアプロチニンを *in vivo* またはヒトに使用した場合の血中濃度に相当する濃度であり、アプロチニンが *in vivo* またはヒトにおいても、肝細胞に直接作用して、肝細胞障害を抑制する可能性を示す。

アプロチニン以外の臨床で使用されているセリンプロテアーゼインヒビターであるウリナスタチン、メシル酸ガベキサート、メシル酸ナファモスタットもほぼ同様の肝細胞障害への抑制効果を示した (図 4)。このようにプロテアーゼインヒビターが *in vitro* において直接肝細胞に作用し、肝障害誘導物質による肝細胞障害を抑制することを見いだしたのは著者が初めてである。また、現在臨床で使用されているセリンプロテアーゼインヒビターのなかで特にアプロチニンに注目した理由は、上記のように *in vitro* において肝細胞の生存を促進するという報告¹⁹⁾ と灌流肝における低酸素による肝障害を抑制するという報告⁸⁾ があるためである。また、他のプロテアーゼインヒビターに関しては同様の報告はない。

次に、このプロテアーゼインヒビターの肝と細胞障害への抑制効果の機序に関して考察する。*in vitro* 肝細胞障害のモデルにおいて著者は D-GalN, CCl₄を使用したラットから分離、培養した初代培養肝細胞を用いて肝細胞障害モデルを作製したが、プロテアーゼインヒビターはこの両肝障害誘導物質による肝細胞障害を共に抑制した。この両肝障害誘導物質の肝障害を引き起こす機序は異なる。D-GalN は肝細胞においてウリジン三リン酸-ガラクトサミン生成によるウリジン三リン酸の減少から RNA 合成抑制、タンパク合成抑制を引き起こし、さらに糖、脂質代謝障害も加わり膜障害を起こすとされている^{3,6,12,13,22)}。CCl₄は肝細胞において NADPHチトクロム P₄₅₀系で代謝されて、高い反応性を有するトリクロロメチルラジカルとなる。このラジカルが連鎖反応的にフリーラジカルを形成して、膜に過酸化脂質を形成することにより膜障害を起こす^{18,29,33)}。共に最終的には肝細胞膜障害が生じるので、両肝障害誘導物質に共通な細胞膜障害の段階でプロテアーゼインヒビターが作用している可能性があると思われる。

また前記のように、市原らはラット肝細胞膜よりアプロチニン等のトリプシンインヒビターに感受性のあるトリプシン様のプロテアーゼを分離、精製し、このプロテアーゼが肝細胞の生存に深い関与をしていることを報告^{1,19,30)} し、更に肝障害時にもこのトリプシン様プロテアーゼが重要な役割を演じている可能性を推測している²⁰⁾。以上のことより、プロテアーゼインヒビターが肝細胞膜に存在するプロテアーゼに作用して、肝細胞障害を抑制している可能性が考えられる。しかし、肝細胞障害に関与する肝細胞膜プロテアーゼの分離同定、活性測定に関する報告はなく、今後更に検討する必要がある。

従来、急性肝不全へのプロテアーゼインヒビターの効果に関する研究は、急性肝不全に合併する DIC へ

のプロテアーゼインヒビターの効果に関するものが主であった。しかし、以上述べてきたように、プロテアーゼインヒビターが肝細胞に直接作用して、肝細胞障害を抑制する可能性を示唆する結果を得たので報告した。

謝 辞

稿を終るに臨み、終始懇切なる御指導、御校閲を賜った恩師・梶山悟朗教授、川崎尚教授に深甚なる謝意を表します。また直接の御指導を賜った広島大学医学部生化学第一教室・山田一夫助教授、同放射線部中西敏夫副部長、同内科学第一教室末盛彰一助手に深く感謝の意を表します。また終始御協力を頂きました両教室の方々厚く御礼申し上げます。

本論文の要旨は第29回日本消化器病学会大会 (甲府, 1987), 第32回日本消化器病学会大会 (奈良, 1990) において発表した。

参 考 文 献

1. Asami, O., Nakamura, T., Mura, T. and Ichihara, A. 1984. Identification of Trypsin Inhibitor in Bovine Pituitary Extracts as a Survival Factor for Adult Rat Hepatocytes in Primary Culture. *J. Biochem.* 95: 299-309.
2. Doumas, B. T., Watson, W. A. and Biggs, H. G. 1971. Albumin Standards and the Measurement of Serum Albumin with Bromocresol Green. *Clin. Chim. Acta* 31: 87-96.
3. 岩城義博, 野口和典, 安倍弘彦, 谷川久一, 津田和矩 1988. D-ガラクトサミン肝障害の発生機序に関する研究. *肝臓* 29: 1043-1050.
4. De Ferreira, E. C., De Fenos O. M. and Castro, J. A. 1983. Late Preventive Effects on Dimethylnitrosamine, Thioacetamide or Galactosamine-Induced Liver Necrosis of the Inhibitor of Proteases, Phenylmethylsulfonyl Fluoride. *Research Communications in Chemical Pathology and Pharmacology* 42: 505-508.
5. De Ferreira, E. C., De Fenos, O. M. and Castro, J. A. 1984. Late Preventive Effects on Carbon Tetrachloride-Induced Necrosis of the Inhibitor of Proteases 1-1-Chloro-3-tosylamido-7-amino-2-heptanone (TLCK). *Research Communications in Chemical Pathology and Pharmacology* 46: 289-292.
6. Eisenmann, A., Phillips, J. E., Schulze-Specking, A. and Decker, K. 1984. On the Mechanism of Lactate Dehydrogenase Leakage from Normal and D-Galactosamine-Treated Hepatocytes in Monolayer

- Culture. Hoppe-Seyer's Z. Physiol. Chem. 365 : 427-436.
7. Fujiwara, K., Ogata, I., Ohta, Y., Hirata, K., Oka, Y., Yamada, S., Sato, Y., Masaki, N. and Oka, H. 1988. Intravascular Coagulation in Acute Liver Failure in Rats and its Treatment with Antithrombin III. Gut 29 : 1103-1108.
 8. Galvin, M. J. and Lefer A. M. 1977. Preservation of Hepatic Cell Integrity by Aprotinin in Hypoxia. Life Science 20 : 1969-1978.
 9. 平田公一, 齊藤哲夫, 吉武英子, 白松幸爾, 早坂ひろし 1986. 肝疾患に合併した血管内凝固症候群の治療. 現代医療 18 : 2895-2901.
 10. 柏原紀文, 滝川康裕, 井上義博, 黒沢照男, 紫桃正裕, 加藤章信, 村上晶彦, 吉田俊巳, 鈴木一幸, 佐藤俊一 1984. 劇症肝炎に対する FOY の効果に関する実験的・臨床的検討. 現代医療 16 : 1919-1923.
 11. 石居 進 1975. Mann-Whitney の U 検定法, p. 109-116. 石居進 (編), 生物統計学入門. 培風館, 東京.
 12. Keppler, D., Lesch, R., Reutter, W. and Decker, K. 1968. Experimental Hepatitis Induced by D-Galactosamine. Experimental and Molecular Pathology 9 : 279-290.
 13. Liehr, H., Grun, M., Seelig, H. P., Seeling, R., Reutter, W. and Heine, W.D. 1978. On the Pathogenesis of Galactosamine Hepatitis. Virchows Archiv B 26 : 331-344.
 14. MacDonald, J. R., Thayer, K. J. and White, C. 1987. Inhibition of Galactosamine Cytotoxicity in an *in vivo/in vitro* Hepatocellular Toxicity Model. Toxicology and Applied Pharmacology 89 : 269-277.
 15. MacDonald, J. R., Thayer, K. J. and Smuckler, A. 1987. Isolation and Maintenance of Monolayer Hepatocytes from the Liver of Toxin-Treated Rats. Experimental and Molecular Pathology 46 : 64-77.
 16. Mallory, H. T. and Evelyn, K. A. 1937. The Determination of Bilirubin with the Photoelectric Colorimeter. J. Biol. Chem. 119 : 481-490.
 17. Massion, W. H., Blumel, G. and Peschl, L. 1972. The Role of Proteolytic Enzymes in Refractory Hypotension. New Aspects of Trasylol Therapy 5 : 73-80.
 18. Mico, B. A. and Pohl, L. R. 1983. Reductive Oxgenation of Carbon Tetrachloride: Trichloromethylperoxy Radical as a Possible Intermediate in the Conversion of Carbon Tetrachloride to Electrophilic Chlorine. Arch. Biochem. Biophys. 225 : 596-609.
 19. Nakamura, T., Asami, O., Tanaka, K. and Ichihara, A. 1984. Increased Survival of Rat Hepatocytes in Serum-free Medium by Inhibition of Trypsin-like Protease Associated with Their Plasma Membranes. Exp. Cell Res. 154 : 81-91.
 20. 中村敏一 1987. 肝細胞の無血清培養と細胞膜プロテアーゼ, p. 239-245. 中村敏一 (編), 初代培養肝細胞実験法. 学会出版センター, 東京.
 21. 日本消化器病学会肝機能研究班 1969. 血清トランスアミナーゼ測定標準操作法補遺. 医学のあゆみ 69 : 577-579.
 22. 野村健一, 沖田 極, 武波俊彦, 児玉隆浩, 原田俊則, 竹本忠良 1978. D-galactosamine 肝炎における細胞膜障害とその修復. 肝臓 19 : 339-345.
 23. Rake, M. O., Flute, P. T., Pannel, G. and Williams, R. 1970. Intravascular Coagulation in Acute Hepatic Necrosis. Lancet 1 : 535-537.
 24. Rake, M. O., Flute, P. T., Shilkin, K. B., Lewis, M. L., Winch, J. and Williams, R. 1971. Early and Intensive Therapy of Intravascular Coagulation in Acute Liver Failure. Lancet 2 : 1215-1218.
 25. 桜川信男, 高橋 薫, 星山真理, 芹沢 健, 高橋芳右, 松岡松三 1977. 蛋白分解酵素阻害剤 (Aprotinin) の作用. 臨床と研究 54 : 2668-2674.
 26. Sato, S., Murakami, A., Yoshida, T., Kashiwabara, T., Suzuki, K. and Kaito, I. 1983. Usefulness of Antithrombin III and α_2 Plasmin Inhibitor in Early Differentiation of Fulminant Hepatitis and Sever Form of Acute Hepatitis. Gastroenterologia Japonica 18 : 128-136.
 27. 末盛郁男, 吉武潤一 1976. Trasylol の抗ショック作用と開心術症例に対する効果. 呼と循 24 : 441-446.
 28. Seglen, P.O. 1979. Preparation of Isolated Rat Liver Cells. Methods. Cell. Biol. 13 : 29-83.
 29. Slater, T. F. 1968. The Inhibitory Effects *in vitro* of Phenothiazines and Other Drugs on Lipid Peroxidation System in Rat Liver Microsomes, and their Relationship to the Liver Necrosis Produced by Carbon Tetrachloride. Biochem. J. 106 : 155-160.
 30. Tanaka, K., Nakamura, T. and Ichihara, A. 1986. A Unique Trypsin-like Protease Associated with Plasma Membranes of Rat Liver. J. Biol. Chem. 261 : 2610-2615.
 31. Tran-Thi, T. A., Phillips, J., Falk, H. and Decker K. 1985. Toxicity of D-Galac-

- tosamine for Rat Hepatocytes in Monolayer Culture. Experimental and Molecular Pathology 42 : 89-116.
32. 前仏郁夫, 井村勝之, 西村 亘, 川山照夫, 早坂ひろし 1972. Protease Inhibitor と Endotoxin Shock. 診断と治療 60 : 127-134.
 33. Weddle, C. C., Hornbrook, K. R. and McCay, P. B. 1976. Lipid Peroxidation and Alteration of Membrane Lipids in Isolated Hepatocytes Exposed to Carbon Tetrachloride. J. Biol. Chem. 251 : 4973-4978.
 34. Williams, G. M., Weisburger, E. K. and Weisburger, J. H. 1971. Isolation and Long Culture of Epithelial-like Cells from Rat Liver. Exp. Cell. Res. 69 : 106-112.

Protective Effect of Aprotinin in D-Galactosamine-Induced Rat Acute Liver Failure and in Hepatocyte Injury

Toshio NAKAMURA

The First Department of Internal Medicine, Hiroshima University School of Medicine
(Director: Prof. Goro KAJIYAMA)

The First Department of Biochemistry, Hiroshima University School of Medicine
(Director: Prof. Takashi KAWASAKI)

In the present study, the effect of aprotinin administration on galactosamine-induced liver failure in rats was investigated *in vivo*. Furthermore, the effects of various protease inhibitors on cultured hepatocytes isolated from galactosamine or carbon tetrachloride-treated rats were investigated *in vitro*. Aprotinin administration improved significantly the survival rate and liver damage of the treated rats. Cultured hepatocytes from galactosamine-treated rats began to show galactosamine-induced injury after 18 h of culture, and the dose-dependent suppression of the injury was observed when aprotinin was added to the medium. Aprotinin demonstrated a similar protective effect against carbon tetrachloride-induced hepatocyte injury. The direct protective effect of the protease inhibitors against galactosamine or carbon tetrachloride-induced hepatocyte injury shown in the *in vitro* experiment suggests that *in vivo* the protease inhibitors may also act on hepatocytes directly to suppress the injury, although the effects on the circulation and/or blood coagulation can not be ruled out.