原 著

感染症動物モデルにおける臓器障害に対するメシル酸
ガベキサート (FOY®) とアナログ (ONO-3307)
の予防的効果

田 中 利 一* 上 林 純 一* 辻 仲 利 政*
左 近 賢 人* 森 武 貞*

Prevention of organ failure in sepsis model by gabexate
mesilate (FOY®) and its analogue (ONO-3307)

Toshikazu TANAKA*, Jun-ichi KAMBAYASHI*,
Toshimasa TSUJINAKA*, Masato SAKON*
and Takesada MORI*

Key words: sepsis, animal model, MOF, ONO 3307,
gabexate mesilate

We have established a novel sepsis model with reproducible manifestations of multiple organ failure (MOF) and disseminated intravascular coagulation (DIC). In the present study, attempts were made to modify MOF and DIC by intravenous administration of synthetic protease inhibitors [gabexate mesilate (FOY) and its newly developed analogue (ONO-3307)]. Among abnormal hematological parameters seen in an untreated model such as decrease in platelet and leukocyte count and value of prothrombin and fibrinogen, and prolongation of APTT, only the decrease in platelet count was significantly ($p < 0.01$) prevented by administration of ONO-3307 (1 mg/kg/hr) or FOY (10 mg/kg/hr). However, the parameters of liver and kidney failure (elevation of bilirubin and creatinine) was significantly improved by the administration of the respective inhibitor. The favorable results were also confirmed by the histological evaluation of liver.

From these observations, it was suggested that the occurrence of organ failure in sepsis is mediated by proteases, the true nature of which has yet to be elucidated. And also the newly developed ONO-3307 is at least 10 times potent in terms of the prevention of organ failure in sepsis.

* 大阪大学医学部第二外科〔〒553 大阪市福島区福島 1-1-50〕; The Second Department of Surgery, Osaka University Medical School, Fukushima 1-1-50, Fukushima-ku, Osaka, Japan. 受付: 1989. 5. 2 受理: 1989. 6. 29.

はじめに

私達は 1979 年以来, 外科重症感染症における多臓器障害 multiple organ failure (MOF) と汎発性血管内凝固症候群 disseminated intravascular coagulation syndrome (DIC) の関係について検討を続けてきた。その結果より, MOF が DIC に伴って生じる過凝固状態 hypercoagulable state (HS) を介して発症するとの仮説を立てた。この仮説を立証するために DIC と MOF を合併発症する胆道感染症動物モデルを家兎を用いて作成し¹⁾, このモデルに抗凝固剤 (ヘパリンと MD 805) を投与し, MOF 発症が抑制されること, すなわち MOF 発症に HS が関与している可能性を明らかにした²⁾。

今回, 私達は MOF 発症における蛋白分解酵素の関与について検討するため, トリプシン, カリクレイン, プラスミン, トロンビン, C1-エステラーゼなどの生体のキニン系, 凝固系, 線溶系, 補体系に対しての広範な阻害作用を持つ薬剤を用いて, この重症感染症時の MOF 発症に対する効果を調べた。

蛋白分解酵素阻害剤として, 藤井ら³⁾により開発され DIC の治療に応用されている⁴⁾ メシル酸ガベキサート (FOY) とともに最近開発された FOY の analogue である 4-sulfamylphenyl 4-quanidinobenzoate methanesulfonate (ONO-3307)⁵⁾ を用いた。この新しい analogue は FOY に比べ, 抗トリプシン作用で約 8.3 倍, 抗トリプシン作用で約 1.4 倍強力である。

I. 方 法

平均体重 2.3 kg の雄の日本白色家兎を用い, ネブタール (30 mg/kg 静注) 麻酔下で, 大腿静脈に採血ルートとしてポリエチレンチューブ (PE-50) をカニューレションし, 耳静脈より生理食塩水 4 ml/kg/時間にて輸液しながら, 上腹部を正中切開し, 総胆管を確認, 遊離したのち, 遠位側で結紮したのち, つぎのごとく 4 群 (いずれも n=6) に分け, 各薬剤の効果を比較検討した。

A 群 (sepsis 群) は感染群として, 家兎便よ

り作成した菌浮遊液 (家兎新鮮便 1 g を生理食塩水 10 ml に溶解した上澄液) を 0.5 ml 逆行性に胆道内へ注入した。この菌浮遊液中には平均して, *Pseudomonas* (1.5×10^6 個/ml), *Bacillus* (6.0×10^5 個/ml), *Bacteroides* (2.5×10^5 個/ml) が同定された。

B 群 (ONO-3307 1 mg/kg/hr 群) では, A 群と同じ処置を行い, かつ菌浮遊液注入 5 分前より, 耳静脈からの輸液している生理食塩水とともに, ONO-3307 を 1 mg/kg/hr にて持続的に静脈内に投与した。C 群 (ONO-3307 10 mg/kg/hr 群) はさらに 10 倍量の ONO-3307 (10 mg/kg/hr) を投与した。D 群 (FOY 10 mg/kg/hr 群) は A 群と同じ処置を行った上, メシル酸ガベキサート (FOY) を 10 mg/kg/hr にて持続投与した。

それぞれ, 前, 3, 6, 9 時間後にクエン酸採血し, 以下の血液検査を行った。

血小板数と白血球数はウノペットにより希釈し, 位相差顕微鏡下で目視測定した。ヘマトクリットはマイクロキャピラリーにて遠沈し測定した。PT 値は試薬として Simplastin (国際試薬, general diagnostic) を用い, APTT は試薬として automated APTT (国際試薬, general diagnostics) を用い, クロテック (ハイランド社) にて測定した。血中のフィブリノゲン

Fig. 1

Table 1 Effects of ONO-3307 and FOY on changes in value of hematological parameters

Laboratory examinations	Group		Pre-operative period	Post-operative period		
				3 hour	6 hour	9 hour
platelet count (%)	(A) sepsis		100	70± 7	57± 9	33± 5
	(B) ONO-3307	1mg/kg/hr	100	75± 7	55± 7	62±11**
	(C) ONO-3307	10mg/kg/hr	100	50± 8	51±12	46±10
	(D) FOY	10mg/kg/hr	100	76± 9	67±10	75± 9**
leukocyte count (%)	(A) sepsis		100	69±13	103±22	70±12
	(B) ONO-3307	1mg/kg/hr	100	109±17**	165±29	208±36**
	(C) ONO-3307	10mg/kg/hr	100	129±15**	163±15*	169±11**
	(D) FOY	10mg/kg/hr	100	88±27	257±90	271±85*
PT value (%)	(A) sepsis		100	68± 6	43± 6	41± 5
	(B) ONO-3307	1mg/kg/hr	100	49± 4*	33± 4	30± 4
	(C) ONO-3307	10mg/kg/hr	100	81± 5	57± 7	50± 6
	(D) FOY	10mg/kg/hr	100	81± 8	55±11	46± 9
APTT elongation (%)	(A) sepsis		100	240±22	271±20	275±16
	(B) ONO-3307	1mg/kg/hr	100	249±14	275±14	280±13
	(C) ONO-3307	10mg/kg/hr	100	162±12**	245±30	271±29
	(D) FOY	10mg/kg/hr	100	151± 9**	228±35	224±31
fibrinogen concentration (%)	(A) sepsis		100	100± 8	67± 8	68± 7
	(B) ONO-3307	1mg/kg/hr	100	89± 6	65± 8	54± 7
	(C) ONO-3307	10mg/kg/hr	100	94± 2	68± 8	63±10
	(D) FOY	10mg/kg/hr	100	93± 7	69±10	64±10

Values given are mean±SEM (n=6)

* p<0.05 (vs group A)

** p<0.01 (vs group A)

Pre-operative data was taken as 100 % at each experiment. Differences of pre-operative data between each group were negligible.

値はトロンビン凝固時間法にて測定した。血中ビリルビン濃度は Michaelsson 変法 (ビリルビンキット S, 日本商事), クレアチニン濃度は Folin-Wu 法 (クレアチニンワコー, 和光純薬) を用い測定した。

統計学的検討は student t-test を用いて行い, $p<0.05$ 以下を有意差ありとした (図 1 に実験モデルを示した)。

II. 結 果

このモデルにおいて A 群 (sepsis 群) を放置すると 16~24 時間で全例致死となった。個体差が大きいため, 凝血学的データはいずれも前値を 100% として比較検討した。ヘマトクリット値は A~D 群でいずれも大きな変動はなく, 血液濃縮による測定値の変動は否定できた。

A 群 (sepsis 群) は, 菌浮遊液のかわりに生理食塩水 0.5 ml を注入した対照 (n=6) に対して, sepsis の所見として血圧降下, 血糖上昇, 有意な白血球の減少と共にエンドトキシン値の有意な上昇を認めた。さらに HS または DIC の所見として血小板数の有意な減少, PT 値の有意な低下, フィブリノゲン値の有意な低下, APTT の延長とともに, AT-III 活性の低下, アンチプラスミン活性の低下とパラコアギュレーションテスト (プロタミン法) の陽性化を認めた。さらに臓器障害の発症の所見として, 血中ビリルビン値およびクレアチニン値の有意な上昇と肝臓での組織学的所見の悪化 (肝臓での多発性の局所壊死とともに sinusoid 内への好中球浸潤) を認めた。

血液学的検査値の結果を表 1 に総括する。

Table 2 Effects of ONO-3307 and FOY on changes in plasma bilirubin and creatinine

Laboratory examination	Group		Pre-operative period	Post-operative period		
				3 hour	6 hours	9 hour
bilirubin concentration (mg/dl)	(A) sepsis		0.6±0.1	1.5±0.2	2.6±0.4	3.6±0.4
	(B) ONO-3307	1mg/kg/hr	0.4±0.1	1.0±0.1*	1.4±0.2**	1.6±0.2**
	(C) ONO-3307	10mg/kg/hr	0.7±0.2	1.1±0.2	1.6±0.2*	1.8±0.1**
	(D) FOY	10mg/kg/hr	0.4±0.1	1.1±0.2	1.7±0.3*	2.1±0.4*
creatinine concentration (mg/dl)	(A) sepsis		1.0±0.1	1.4±0.1	1.9±0.2	2.4±0.2
	(B) ONO-3307	1mg/kg/hr	1.1±0.1	1.3±0.1	1.6±0.1	1.7±0.2**
	(C) ONO-3307	10mg/kg/hr	1.2±0.1	1.4±0.2	1.6±0.1*	1.7±0.1**
	(D) FOY	10mg/kg/hr	1.1±0.1	1.3±0.1	1.4±0.1*	1.5±0.2**

Values given are mean±SEM (n=6)

* p<0.05 (vs group A)

** p<0.01 (vs group A)

Differences of pre-operative data between each group were negligible.

血小板数に関しては、A群(sepsis群)では、3時間後、6時間後と経時的に前値に対し減少し、9時間後には前値の33±5%となった。これに対し、B群(ONO-3307 1mg/kg/hr群)とD群(FOY 10mg/kg/hr群)では9時間後には、それぞれ前値の62±11%、75±9%と減少が有意に(p<0.01)抑制された。C群(ONO-3307 10mg/kg/hr群)においても9時間後では前値の46±10%と有意ではなかったが、減少の度合は低かった。

次に、白血球数に関しはB群、C群、D群ともに、白血球数はいずれも蛋白分解酵素阻害剤投与により有意に増加していた。

PT値の低下、APTTの延長、血中フィブリノゲン濃度の低下に対しては、これらの蛋白分解酵素阻害剤投与による効果は認められなかった。

臓器障害の指標とした血中ビリルビン濃度、血中クレアチニン濃度の変動は表2に総括した。

血中ビリルビン濃度は、A群(sepsis群)は経時的に上昇し、前値0.6±0.1mg/dlより3時間後、6時間後、9時間後には、それぞれ1.5±0.2mg/dl、2.6±0.4mg/dl、3.6±0.4mg/dlと上昇した。一方、これらの蛋白分解酵素阻害剤はいずれもこの血中ビリルビン濃度の上昇を明らかに有意に抑制した。

C群(ONO-3307 10mg/kg/hr群)とD群

(FOY 10mg/kg/hr群)においては6時間後と9時間後のみ有意な抑制を示した。B群(ONO-3307 1mg/kg/hr群)においては、3時間後1.0±0.1mg/dl(p<0.05)、6時間後1.4±0.2mg/dl(p<0.01)、9時間後1.6±0.2mg/dl(p<0.01)とより早期から抑制がみられた。

血中クレアチニン濃度に関しては、A群(sepsis群)は血中ビリルビン濃度同様に経時的に増加し、前値1.0±0.1mg/dlより3時間後、6時間後、9時間後には、それぞれ1.4±0.1mg/dl、1.9±0.2mg/dl、2.4±0.2mg/dlと上昇していた。一方、この上昇はこれらの蛋白分解酵素阻害剤投与により、ビリルビン濃度上昇の抑制と同じように、有意に抑制された。

3時間後では、B群(1.3±0.1mg/dl)、C群(1.4±0.2mg/dl)、D群(1.3±0.1mg/dl)ともにA群との間に有意の差はなかった。

しかし、6時間後にはC群、D群(p<0.05)で有意の抑制効果を認め、9時間後にはB群(1.7±0.2mg/dl)、C群(1.7±0.1mg/dl)、D群(1.5±0.2mg/dl)となり、すべての蛋白分解酵素阻害剤投与により有意な(p<0.01)上昇抑制を認めた。

III. 考 察

重症感染症に対する蛋白分解酵素阻害剤の効果については多くの検討がなされている。メシ

ル酸ガベキサート (FOY) 投与により、血中ライソゾーム酵素活性の上昇の抑制⁶⁾、ショック時の血小板の凝集抑制⁷⁾、エンドトキシン持続投与時の FDP 産生、フィブリノゲン値低下、PT 延長、APTT 延長、血小板数減少、腎糸球体内へのフィブリン沈着の抑制⁸⁾ などが認められている。

今回用いた蛋白分解酵素阻害剤は血中のトリプシン、カリクレイン、プラスミン、トロンビン、C1-エラスターゼなどの生体内の凝固系、線溶系、補体系のセリンプロテアーゼに対して広範な阻害活性を持つため、これらの効果がどのような機序を中心としているかは判断が難しく、相加的あるいは相乗的な効果もあるとともに、至適な量を越えると逆に生体に対して悪影響を与えていることも充分に考えられる。

今回の検討にて、各種凝血学パラメーターのうち FOY または ONO-3307 の持続投与により明らかに改善が認められたのは血小板数についてのみであったが、肝、腎の臓器不全はほぼ完全に抑制できた。従って臓器不全の改善には、FOY または ONO-3307 の抗凝固作用によるもの、すなわち臓器不全の発症に HS が関与していると考えerには無理がある。しかしながら、すでに報告したようにヘパリンも臓器不全を予防するが、凝血学的パラメーターの改善は今回検討した阻害剤とほぼ同様であった。さらに検討を加えこのヘパリンの効果は抗凝固活性によるものであることを明らかにしており、必ずしも全ての凝血学的パラメーターが正常化しなくても説明は可能と思われる。しかしながら、今回検討した阻害剤およびヘパリン+AT III 複合体は他のプロテアーゼも阻害するので他のプロテアーゼが関与している可能性も否定できない。

今回検討した ONO-3307 は新たに開発された蛋白分解酵素阻害剤で、今までのメシル酸ガベキサート (FOY) に比べ、抗トロンビン作用で約 8.3 倍、抗トリプシン作用で約 1.4 倍、抗プラスミン作用で約 6.3 倍、抗カリクレイン作用で約 12.3 倍強力である⁹⁾。

このことより *in vivo* においては ONO-3307 はメシル酸ガベキサートに比べ数倍の効力を持

つと考えられる。ONO-3307 の臨床あるいは *in vivo* での検討についての報告はいまだほとんどない。

今回の検討により、この新しい蛋白分解酵素阻害剤である ONO-3307 が現在広く使われているメシル酸ガベキサート (FOY) と同様に、重症感染症時の臓器障害の進展の防止に対して有効であることが確認された。

このような広範な作用を持つ蛋白分解酵素阻害剤の効果判定には常に至適投与量を考えることが重要である。至適投与量に対しては、メシル酸ガベキサートを用いたエンドトキシンショック時の微小血栓の形成抑制において、FOY 5 mg/kg/hr では抑制が認められず、20 mg/kg/hr では早期に実験動物は死亡し、もっとも有効であったのは 10 mg/kg/hr であった⁷⁾。ラットの外傷性ショック防御効果においてもメシル酸ガベキサート (FOY) の 1 mg/kg、10 mg/kg で有効であったが、大量投与群 (70~200 mg/kg) では無効であったとの報告⁹⁾ もある。また腹腔内投与時でも量依存性でない効果が報告されている⁸⁾。今回の私達の検討でも ONO-3307 投与量を 1 mg/kg/hr と 10 mg/kg/hr で比較した。血中ビリルビン濃度、血中クレアチニン濃度の上昇抑制に対しては差はなかったが、血小板数の減少抑制の面では、少量の 1 mg/kg/hr の方が 10 mg/kg/hr 投与より有効であった。

さらに旧来のメシル酸ガベキサート (FOY) 10 mg/kg/hr 投与との比較からは、ほぼ ONO-3307 1 mg/kg/hr がこの動物モデルにおける臓器障害抑制においてほぼ同効力であることが確認された。

このことは、ONO-3307 の *in vitro* でのメシル酸ガベキサート (FOY) との比較では前述のごとく数倍強力であるが、*in vivo* での効力と臨床面での効果に対しての比較は難しいが、今回の検討より新しい蛋白合成阻害剤 ONO-3307 はメシル酸ガベキサート (FOY) に対して 10 分の 1 の量でほぼ同じ効果をあげることが示唆された。

しかし、一方至適量を越えるようなあまり多量の蛋白分解酵素阻害剤投与では、逆に効果が

減じていることも確認でき、臨床面での応用には常に至適投与量を考える必要も示唆された。

文 献

- 1) Tanaka, T., Tsujinaka, T., Kambayashi, J., Higashiyama, M., Sakon, M. and Mori, T.: Sepsis Model with reproducible manifestation of multiple organ failure (MOF) and disseminated intravascular coagulation (DIC). *Thromb. Res.*, **54**; 53~61, 1989.
- 2) 田中利一, 東山聖彦, 横田雅之, 辻仲利政, 左近賢人, 上林純一, 大城 孟, 森 武貞: 家兎感染症モデルによる DIC・MOF 発症病態の解析—抗凝固剤投与による DIC・MOF の修飾. 血液と脈管, **19**; 305~308, 1988.
- 3) Ohno, H., Kosaki, G., Kambayashi, J., Imakawa, S. and Hirata, F.: FOY [Ethyl p-(6-quanidinohexanoyloxy)benzoate] methanesulfonate as a serine protease inhibitor. I. Inhibition of thrombin and factor Xa *in vitro*. *Thromb. Res.*, **19**; 579~588, 1980.
- 4) 神前五郎, 他: DIC に対する FOY の治療効果に関する研究. 医学のあゆみ, **124**; 143~154, 1983.
- 5) Matsuoka, S., Futagami, M., Ohno, H., Imaki, K., Okagawa, T. and Kawasaki, A.: Inhibitory effects of ONO-3307 on various proteases and tissue thromboplastin *in vitro* and on experimental thrombosis *in vivo*. *Jpn. J. Pharmacol.* (in press)
- 6) 小田利通, 宮脇武徳, 鮫島照子, 宮尾純子: 出血性ショックに対するメシル酸ガベキサート (FOY) の効果. 麻酔, **30**; 270~276, 1981.
- 7) 斎藤公男, 荒木悦子, 黄 宗人, 鈴木美保子, 奥秋 晟, 外崎敬和, 伊藤 晶: Endotoxin ショック時の microaggregate 形成に及ぼすメシル酸ガベキサート (FOY) の影響. 救急医学, **5**; 195~200, 1981.
- 8) 吉川敏一, 古川泰正, 村上正志, 竹村周平, 近藤元治: エンドトキシン持続注入によるラット DIC に対する Gabexate mesilate の効果. 日本血液学会雑誌, **45**; 633~640, 1982.
- 9) 井上喜恵, 木村義民: FOY に関する基礎的検討—各種ショック防御効果と PCA 抑制作用—. 現代医療, **7**; 53~60, 1975.