阻止効果

武田 諭 司* 吉川 敏 一* 内藤 裕 二*

杉 野 成* 近 藤 元 治* 松 岡 昌 三**

inhibitor on endotoxin-induced disseminated

Satoshi TAKEDA*, Toshikazu YOSHIKAWA*, Yuji NAITO*,

Shigeru SUGINO*, Motoharu KONDO* and

Shozo MATSUOKA**

Key words: Disseminated intravascular coagulation.

Rats. Endotoxin. ONO-3307.

The effects of ONO-3307 (4-sulfamoylphenyl 4-guanidinobenzoate methanesulfonate), a new synthetic protease inhibitor, on endotoxin-induced experimental disseminated intravascular coagulation (DIC) were studied in rats. Experimental DIC was induced by 4 hour sustained infusion of endotoxin at a dose of 100 mg/kg. The rats were infused continuously with ONO-3307 at 1, 10, 100 μ g/kg/h into a femoral vein for 4 hour. Simultaneously with the agent infusion, endotoxin was administered into the contralateral femoral vein. A protective effect against DIC was noted in the rats treated with 10 or 100 μ g/kg/h of ONO-3307 in the following parameters: fibrinogen and fibrin degradation products, platelet count, fibrinogen level, prothrombin time, partial thromboplastin time and the number of renal glomeruli with fibrin thrombi. These results demonstrated that ONO-3307 reduces the extent of changes of the coagulation parameters caused by DIC.

* 京都府立医科大学第一内科 [〒602 京都市上京区河原町広小路上ル梶井町 465], First Department of Internal Medicine, Kyoto Prefectural University of Medicine, Kamigyo-ku, Kyoto, 602 Japan.

** 小野薬品工業(株)水無瀬研究所〔〒618 大阪府三島郡島本町桜井三丁目一番一号〕, Minase Research Institute, Ono Pharmaceutical Co. Ltd., Osaka, Japan. 受付:1989.2.2 受理:1989.9.12.

緒 言

播種性血管内凝固症候群 (Disseminated intravascular coagulation: DIC) は、種々の原因によって、血管内で凝固系が活性化され、全身に微小血栓が起こる一方で、各種凝固系因子および血小板が消費されて減少し、難治性の出血傾向を呈する病態である^{1,2)}。

DIC の治療としては、基礎疾患の改善と同時に、凝固亢進状態による微小血栓の形成・進展の防止および溶解が重要で、ヘパリンや各種プロテアーゼインヒビターが、臨床的にも用いられている。

われわれは、エンドトキシンの持続注入により、DIC モデルをラットに作成し³⁾、これを用いて種々の薬剤の DIC 防御作用について検討している^{4~7)}。

そこで、新たに開発された凝固・線溶・カリクレインなどを強力に阻害するプロテアーゼインヒビターである4-sulfamoylphenyl 4-guanidinobenzoate methanesulfonate (ONO-3307) (図1)⁸⁾が、DIC の発症、増悪を防止しうるかどうかを検討した。

I. 材料および方法

対象動物として体重約 200 g の Wistar 系雌ラットを用いた。

エンドトキシンは Difco 社製の *Escherichia coli* 055:B5 lipopolysaccharide B を用いた。実験的 DIC は、ラットの大腿静脈よりポリエチレンチューブを通して 11.4 ml の生理食塩水に溶解したエンドトキシン 100 mg/kg を、4 時間持続注入して作成した。

注入終了後、腹部大動脈より採血し、各種測定に供し、腎臓を組織学的に検討した。

この実験的 DIC に対する ONO-3307 (4-sulfamoylphenyl 4-guanidinobenzoate methanesulfonate: 小野薬品工業) の各量 1, 10, 100 $\mu\text{g/kg/h}$ を 1.76 ml の生理食塩水に溶解し、エンドトキシン注入開始と同時に、反対側の大腿静脈より同様に 4 時間持続注入した。

DIC の状態は、fibrinogen and fibrin degradation products (FDP)、血小板数、フィブリ

M. W. 430. 46

Fig. 1 Structure of ONO-3307

ノーゲン、プロトロンビン時間 (Prothrombin time: PT)、部分トロンボプラスチン時間 (partial thromboplastin time: PTT) および腎糸球体のフィブリン血栓により判定した。FDP は、ラテックス凝集反応 (帝國臓器社製、東京) を用い、ヒト・フィブリノーゲン $\mu\text{g/ml}$ に換算して表示した。PT は、Quick 一段法⁹⁾で、PTT は Langdell 法¹⁰⁾で、フィブリノーゲンはトロンビン時間法で、それぞれ測定した。腎糸球体のフィブリン血栓の程度は、腎組織標本をヘマトキシリン・エオジン染色で染色後、顕微鏡下で腎糸球体 100 個を数え、その内フィブリン血栓を有する糸球体の占める割合 (% glomerular fibrin deposits: %GFD)¹¹⁾で表現した。

なお、すべての測定値は mean $\pm$ SE で表示した。有意差は、11.4 ml の生理食塩水に溶解したエンドトキシン 100 mg/kg と生理食塩水 1.76 ml とを両側大腿静脈よりそれぞれ 4 時間にわたり持続注入した control 群と比較した。また、生現食塩水 11.4 ml のみを 4 時間注入したラットを normal 群とした。

II. 結 果

(1) FDP に対する影響 (図2)

実験的 DIC における FDP の上昇が、ONO-3307 を投与することにより、どのように阻止されるかを検討した。生理食塩水のみを持続注入した normal rat 群では、FDP 値は、 $4.1 \pm 0.8 \mu\text{g/ml}$ であるが、エンドトキシンを投与すると、 $42.6 \pm 3.8 \mu\text{g/ml}$ まで上昇した。1.76 ml の生理食塩水に溶解した ONO-3307, 1, 10, 100 $\mu\text{g/kg/h}$ を、エンドトキシンと同時に注入すると、それぞれ FDP 値は、 35.2 ± 3.6 , 24.5 ± 4.4 , $14.6 \pm 3.0 \mu\text{g/ml}$ と低値を示し、control 群と比較して、10, 100 $\mu\text{g/kg/h}$ 投与群で、その増加が有意に阻止された。

Fig. 2 Effect of ONO-3307 on FDP in endotoxin-induced DIC

Fig. 3 Effect of ONO-3307 on platelet counts in endotoxin-induced DIC

(2) 血小板に対する影響 (図 3)

生理食塩水のみを注入した normal 群において、血小板数は $84.7 \pm 6.7 \times 10^4/\text{mm}^3$ であったが、エンドトキシンの注入により、 $7.3 \pm 1.0 \times 10^4/\text{mm}^3$ まで低下した。しかし、ONO-3307 を、1, 10, 100 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{h}$ 投与することにより、それぞれ、 19.8 ± 4.1 , 17.2 ± 2.7 , $14.8 \pm 2.0 \times 10^4/\text{mm}^3$ となり、その減少は、1 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{h}$ で $p < 0.05$, 10, 100 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{h}$ で $p < 0.01$ の危険

率で有意に阻止された。

(3) フィブリノーゲンに対する影響 (図 4)

normal 群では、フィブリノーゲン量は $114.4 \pm 5.8 \text{ mg}/\text{dl}$ であったが、control 群のフィブリノーゲン量は、 $22.9 \pm 5.3 \text{ mg}/\text{dl}$ まで低下した。この低下は、10, 100 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{h}$ の ONO-3307 持続注入により、それぞれ $p < 0.05$, $p < 0.01$ で有意に阻止された。

(4) PT に対する影響 (図 5)

Fig. 4 Effect of ONO-3307 on fibrinogen in endotoxin-induced DIC

Fig. 5 Effect of ONO-3307 on PT in endotoxin-induced DIC

生理食塩水のみを注入した normal 群では、PT が 12.7 ± 2.1 sec. であるのに対して、エンドトキシンを注入した control 群では、 165.2 ± 40.0 sec. まで延長した。ONO-3307 の投与により、 $1 \mu\text{g/kg/h}$ では、 62.1 ± 23.8 sec. と $p < 0.05$ の危険率で、また、 $10, 100 \mu\text{g/kg/h}$ 投与群ではそれぞれ、 $27.1 \pm 4.4, 19.2 \pm 2.7$ sec. と $p < 0.01$ の危険率で有意に PT の延長が阻止された。

(5) PTT に対する影響 (図 6)

normal 群では、PTT は 56.1 ± 3.3 sec. であるが、エンドトキシン注入により、control 群では、 296.4 ± 44.8 sec. と延長した。ONO-3307 の $1 \mu\text{g/kg/h}$ の投与で、PTT は、 254.9 ± 44.1 sec. と $p < 0.05$ の危険率で、また、 $10, 100 \mu\text{g/kg/h}$ の投与で、それぞれ $155.7 \pm 34.5, 92.0 \pm 29.7$ sec. と $p < 0.01$ の危険率で、有意に阻止された。

Fig. 6 Effect of ONO-3307 on PTT in endotoxin-induced DIC

Fig. 7 Effect of ONO-3307 on GFD in endotoxin-induced DIC

(6) 腎糸球体のフィブリン血栓形成に対する影響 (図7)

normal 群では %GFD は 0% で、腎糸球体のフィブリン血栓は全く形成されていなかった。control 群では %GFD は $76.1 \pm 1.7\%$ と高率に、フィブリン血栓を有する腎糸球体が存在した。一方、ONO-3307 の 10, 100 $\mu\text{g/kg/h}$ 投与群では、それぞれ 45.9 ± 1.9 , $40.0 \pm 2.1\%$ と $p < 0.001$ の危険率で有意にフィブリン血栓形成

を阻止した。

III. 考 察

1, 10, 100 $\mu\text{g/kg/h}$ の濃度の ONO-3307 をエンドトキシンと同時に、それぞれ左右大腿静脈より 4 時間持続注入した。ONO-3307 を投与せず、生理食塩水とエンドトキシンを同時注入したラットと比較し、10 および 100 $\mu\text{g/kg/h}$ の ONO-3307 を投与したラットにおいて、測定し

たすべての数値に対して有意差を認め、実験的 DIC の阻止効果を示した。

今回検討した濃度では、FDP, フィブリノーゲン, PT, PTT, %GFD において濃度依存性に、DIC に対して阻止効果を認めた。血小板においては、平均値は $1\mu\text{g/kg/h}$ の投与群が最も高値であったが、同群の各数値は、 4.2×10^3 から 35.5×10^3 と偏差が大きく、統計的には 10 および $100\mu\text{g/kg/h}$ 投与群の方が、より危険率の低い有意差が検定された。

われわれはこれまでも、gabexate mesilate や nafamostat mesilate などの各種プロテアーゼインヒビターにおいても、同モデルを用いて DIC の阻止効果を検討しているが^{5,6)}、これらは、DIC に対して、投与量が多くても少なくとも効果が最大とならず、適当量が必要であることが示唆されている。これら薬剤と同様に、抗トロンビン作用と、抗プラスミン作用をあわせもつ、新しい合成プロテアーゼインヒビターである ONO-3307 も、その作用から、適当量が存在すると考えられたが、今回検討した三つの濃度では、濃度依存性に DIC に対する阻止効果を認めた。ONO-3307 を、より高濃度で投与した場合での DIC に対する阻止効果については、今後の検討が待たれる。

in vitro での ONO-3307 の血液凝固線溶系に対する作用は、gabexate mesilate と比較して、human plasma に対する IC_{50} 値が、PT で約 5 倍、PTT で約 17 倍、フィブリン溶解時間で約 33 倍と、より強力な阻害作用を有し、親和性に関しても、その K_i 値は ONO-3307, Gabexate mesilate が、おのおの、thrombin に対して $0.18\mu\text{M}$ と $1.5\mu\text{M}$, plasmin に対して $0.37\mu\text{M}$ と $1.9\mu\text{M}$ と後者より強く、また plasmin より thrombin に対して高い親和性を有している⁸⁾。その強力な阻害作用により、低濃度で、DIC に対する阻止効果が出現するものと考えられる。

DIC の病態と補体は密接な関連性を有している^{12,13)}。また、本動物モデルにおける血小板の減少は、高濃度のエンドトキシンによる補体の活性化による可能性も強く、今回の実験の血小板減少抑制は、必ずしも ONO-3307 の止血

機構活性化抑制だけによるものではないと考えられる。今回の結果や、他のプロテアーゼインヒビターとの構造の類似性からも ONO-3307 に抗補体作用があるものと予想されるが、その詳細な検討は、未だなされていない。

ONO-3307 の投与方法で、われわれが用いたのは持続注入である。この ONO-3307 の代謝はかなり速く、半減期が約 50 分で、作用時間も短いこととなる。したがって、実際臨床的に投与する場合などにも、持続的あるいは頻回なる投与方法を用いる方がより効果的であると思われる。

以上のように、ONO-3307 は低濃度の投与で、実験的 DIC に対して、著明な阻止効果を示し、臨床的にもこの薬剤が DIC 予防や治療に有効である可能性が示唆された。

文 献

- 1) Minna, J. D., Robboy, S. I., et al.: Disseminated intravascular coagulation in man. pp. 3-18, Charles, C. Thomas, Springfield 1974.
- 2) 松田 保: 改訂版 DIC. pp. 1-9, 中外医学社, 東京, 1979.
- 3) Yoshikawa, T., Furukawa, Y., et al.: Experimental model of disseminated intravascular coagulation induced by sustained infusion of endotoxin. Res. Exp. Med., **179**; 223~228, 1981.
- 4) Yoshikawa, T., Murakami, M., et al.: Prevention by methylprednisolone of disseminated intravascular coagulation induced by sustained infusion of endotoxin in rats. Haemostas, **13**; 268~273, 1983.
- 5) Yoshikawa, T., Furukawa, Y., et al.: Protective effect of gabexate mesilate against experimental disseminated intravascular coagulation in rats. Haemostas, **13**; 262~267, 1983.
- 6) Yoshikawa, T., Murakami, M., et al.: Effects of FUT-175, a new synthetic protease inhibitor on endotoxin-induced disseminated intravascular coagulation in rats. Haemostas, **13**; 374~378, 1983.
- 7) Yoshikawa, T., Murakami, M., et al.: Effects of ticlopidine and aspirin on endotoxin-indu-

- ced disseminated intravascular coagulation in rats. *Thromb. Haemostas*, **49**; 190, 1983.
- 8) Matsuoka, S., Futagami, M., et al.: Inhibitory effects of ONO-3307 on various proteases and tissue thromboplastin in vitro and on experimental thrombosis in vivo. *Japan J. Pharmacol.* (印刷中).
- 9) Quick, A.J., Stanly, B.M. et al.: A study of the coagulation defect in hemophilic and in jaundice. *Am. J. Med. Sci.*, **190**; 501~511, 1935.
- 10) Langdell, R.D., Wagner, R.H., et al.: Effect of antihemophilic factor on one-stage clotting time. *J. Lab. Clin. Med.*, **47**; 637~647, 1953.
- 11) Schoendorf, T. H., Rosenberg, M., et al.: Endotoxin-induced disseminated intravascular coagulation in nonpregnant rats. *Amer. J. Path.*, **65**; 51~58, 1971.
- 12) Muller-Berghaus, G., Lohmann, E.: The role of complement in endotoxin-induced disseminated intravascular coagulation. Studies in congenitally C6-deficient rabbits. *Br. J. Haemat.*, **28**; 403, 1974.
- 13) 近藤元治, 古川泰正, 吉川敏一: DIC と補体, 臨床免疫, **14**; 295, 1982.
-