

部分肝阻血および再灌流時の肝ライソゾーム 膜脆弱性に関する基礎的検討

千葉大学医学部第1外科

宇田川郁夫 宮崎 勝 越川 尚男 伊藤 博
海保 隆 松本 潤 磯野 敏夫 鈴木 裕之
小山 隆史 下田 司 奥井 勝二

部分肝阻血時の肝細胞障害の病態を明らかにする目的でラットに部分肝阻血を施行し、ライソゾーム酵素の変動の面より検討した。その結果、阻血葉では阻血開始とともにライソゾーム酵素の free 活性および fragility index は漸増し、阻血解除後より強い上昇を示した。カテプシン D では、阻血前の free 活性： 0.27 ± 0.04 (units/mg protein), fragility index： 28.5 ± 2.5 (%) に比べ、阻血解除2時間後の free 活性： 0.52 ± 0.05 ($p < 0.001$), fragility index： 41.2 ± 3.7 ($p < 0.01$) と著増した。また血清中ライソゾーム酵素は阻血解除後より上昇し始め、カテプシン D では阻血前 2.20 ± 0.28 より阻血解除2時間後 4.33 ± 0.39 と著明な上昇を認めた ($p < 0.01$)。以上の結果より、部分肝阻血により阻血肝細胞内のライソゾーム膜が障害され、ライソゾーム酵素の血中への遊出が起こったと考えられ、ライソゾーム酵素が肝阻血時の肝細胞障害に強く関与することが示唆された。

Key words: partial liver ischemia, lysosomal enzyme, lysosomal membrane, liver cell injury

I. 緒 言

肝の阻血時の病態を検討することはショック時や外科手術後の肝障害機構の解明にも関連し臨床的意義が深く、古くより研究がなされてきた^{1)~3)}。これに加え、近年の肝切除術の普及に伴ない、肝切除時に出血を制御する目的で部分肝阻血法を試みることも多く、阻血による肝細胞障害の問題は肝再生への影響という面からも臨床的にその重要性が増してきている。しかしながら部分肝阻血時の肝細胞障害に関する詳細な病態は、いまだ明確には示されていないのが現状である。今回著者らは、ラットにて門脈一大循環シャントを置かず、阻血肝を作製しうる肝の部分阻血法を試み、その際の阻血肝葉および非阻血肝葉におのおのどのような肝細胞障害が引き起こされるかをライソゾーム酵素の変動の面より基礎的に検討を行った。

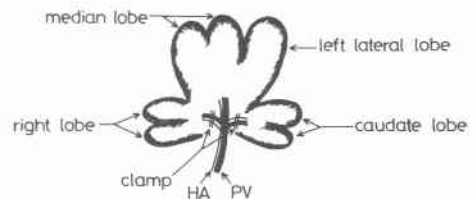
II. 実験材料と方法

1) 実験動物

実験動物はウイスター系雄性ラット (体重200~250g)を用いた。千葉大学医学部中央動物舎(室温: 25℃,

<1990年6月13日受理>別刷請求先: 宇田川郁夫
〒280 千葉市亥鼻1-8-1 千葉大学医学部第1外科

Fig. 1 Partial liver ischemic model

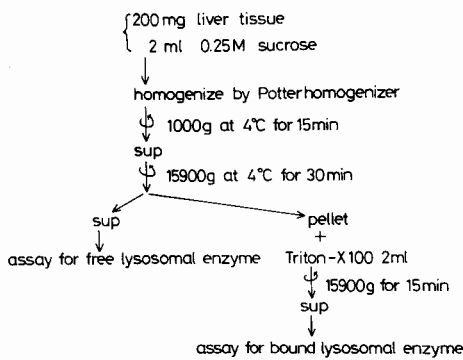


照明; 午前5時~午後7時)にて餌、水の自由摂取下に一定期間飼育後、実験に供した。

2) 部分肝阻血法および実験方法

Fig. 1に示すようにラットをエーテル麻酔下に開腹、肝門部の脈管を剥離し、肝の right lobe と caudate lobe の全肝の32%領域の脈管(門脈、肝動脈、胆管)のみをクランプし、残りの68%領域の脈管は温存した。阻血中の変動を見る目的では阻血開始前、15分後、30分後、45分後、60分後と経時的にラットをそれぞれ4匹ずつ屠殺し、肝組織を阻血葉、非阻血葉に分けて採取した。また末梢血も同時に採取した。30分間の阻血後、ただちにクランプを解除し、阻血解除後の変化を見る目的で同様にラットを4匹ずつ用いて肝組織および血液を解除後24時間にわたり採取し、以下に示す項

Fig. 2 Fractionation of liver tissue



total enzyme activity = free + bound enzyme activity

$$\text{Fragility Index} = \frac{\text{free enzyme activity}}{\text{total enzyme activity}} \times 100 (\%)$$

目につき検索を行った。すべての実験群において、sham群として同様に全麻下で開腹を行い、肝門部の脈管を剥離し、30分間放置した群を設置した。

3) 肝ライソゾームの preparation

Carlson ら⁴⁾の方法に準じ採取した肝組織を洗浄後ただちに homogenize し、10%homogenate を作製し、1,000g および15,900g の遠沈後、上清を free ライソゾーム分画とし、また沈渣を Triton X-100にて処理、遠沈した上清を bound ライソゾーム分画とした。また total enzyme activity は free + bound enzyme activity とし、ライソゾーム膜の脆弱性を示す fragility index は free activity を total activity で除した値とし%で表示した (Fig. 2)。

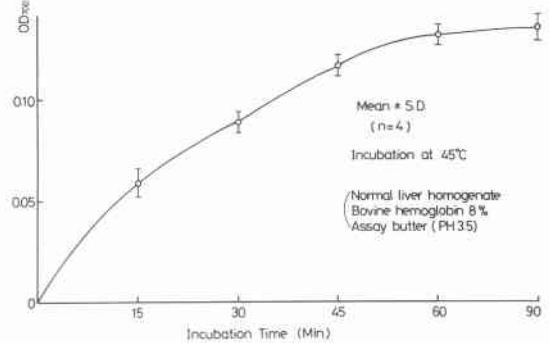
4) ライソゾーム酵素の測定法

ライソゾーム酵素はカテプシン D, β グルクロニダーゼ, 酸フォスファターゼを肝組織中、血清中両者において測定した。カテプシン D の測定は Anson ら⁵⁾の方法に準じて行ったが、まず incubation 時間を決定する目的で preliminary study を行った。すなわちラット正常肝組織において incubation 時間とカテプシン D の free 活性との関係を検討した。

β グルクロニダーゼは β グルクロニダーゼ測定用キット (Sigma 社), 酸フォスファターゼは Acid phosphatase test WAKO (和光純薬) により測定した。また肝組織中蛋白含量は Folin-Lowry 法⁶⁾により測定し、肝組織中ライソゾーム酵素はこの蛋白含量で除した値とし units/mg protein で表示した。

5) 血清 GOT, GPT, albumin, total bilirubin の測定

Fig. 3 Incubation time course of cathepsin D assay



血清中の GOT, GPT, albumin, total bilirubin を STA-test, albumin B test, Bilirubin B II test WAKO (和光純薬) により測定した。結果は GOT, GPT は Karumen 単位, albumin は g/dl, total bilirubin は mg/dl で表示した。

6) 統計学的処理

数値は mean ± S.D. で表記し、統計学的処理は Student's t-test により行い、 $p < 0.05$ を有意とした。

III. 結果

1) カテプシン D の incubation 時間

45°C の incubation において60分にてその活性がほぼ一定となったため、incubation 時間を60分間と設定した (Fig. 3)。

2) 部分肝阻血

32%領域の肝葉に流入する脈管をクランプすると阻血肝葉はただちに灰色に変化し、クランプ解除によりただちに色調は回復した。また部分肝阻血中に腸管のうっ血による色調変化や静脈怒張の所見はまったく認められなかった。開腹より阻血開始までに要した時間は全例10分以内であった。

3) 血清 GOT, GPT, albumin, total bilirubin 値の変動

血清 GOT 値は阻血解除直後より著増し (380 ± 100 , $p < 0.05$), 2 時間でピークとなり ($1,410 \pm 328$, $p < 0.01$), 24 時間では下降傾向を示すものの、前値 (82 ± 8.0) に比べまだ有意に高い値を示した (503 ± 98 , $p < 0.05$)。血清 GPT 値も阻血解除直後より著増し (196 ± 87 , $p < 0.05$), 1 時間でピークを示し、24 時間でほぼ前値 (42 ± 8.4) に復した (Fig. 4)。血清 albumin, total bilirubin 値は阻血解除後、有意な変動は認められなかった (Table 1)。

Table 1 Changes in serum albumin, total bilirubin after a period of liver ischemia

Parameter	Group	Pre	0*	0.5	1	2	6	24
Albumin (g/dl)	Ischemia	3.4±0.2	3.5±0.2	3.0±0.1	3.2±0.1	3.0±0.1	3.1±0.1	3.0±0.3
	Sham	3.5±0.1	3.5±0.2	3.0±0.2	3.1±0.2	3.0±0.2	3.0±0.3	3.2±0.2
Total bilirubin (mg/dl)	Ischemia	0.5±0.2	0.7±0.2	0.8±0.2	0.5±0.2	0.5±0.3	0.8±0.3	0.6±0.1
	Sham	0.6±0.3	0.6±0.3	0.7±0.3	0.7±0.1	0.6±0.3	0.8±0.2	0.7±0.3

*Time after a period of liver ischemia (hour)
Means of four animals, with SD are given

Fig. 4 Changes in serum GOT, GPT after a period of liver ischemia
P value; compared to sham group

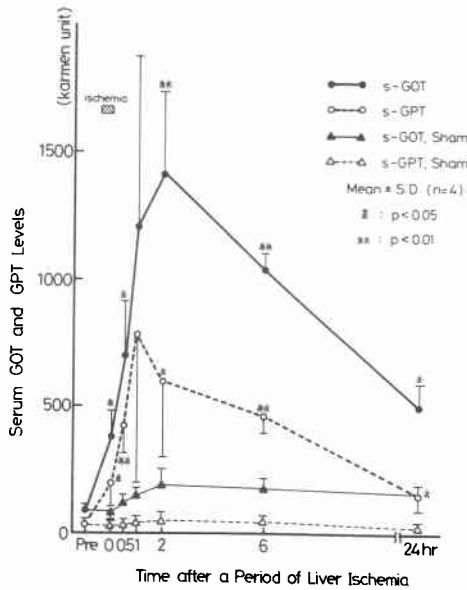
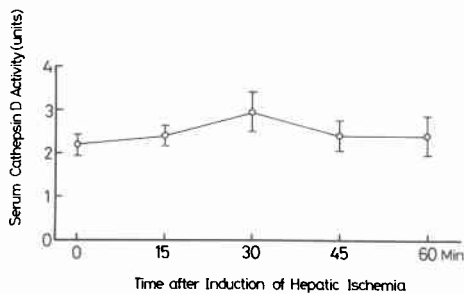
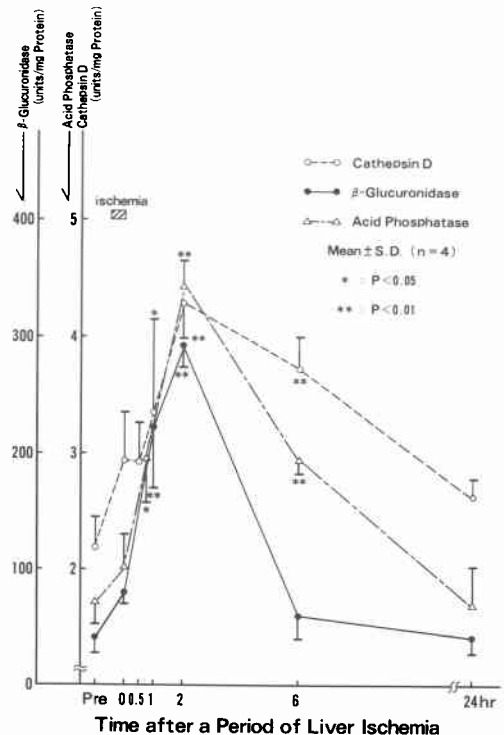


Fig. 5 Changes in serum cathepsin D following induction of liver ischemia
Means of four animals, with SD are given



4) 血清ライソゾーム酵素の変動
60分間にわたり部分肝阻血を続けた場合の血清中カ

Fig. 6 Changes in serum liver lysosomal enzyme activity after a period of liver ischemia
P value; compared to preischemia



テプシン D の変動を見てみると (Fig. 5), 血清カテプシン D の上昇は阻血中には全く認められなかった。また阻血解除後の血清中のライソゾーム酵素の変動は Fig. 6 に示すごとくであり, 3 酵素ともに阻血解除後より著明に増加し, 2 時間でピークとなり (p < 0.01), 24 時間でほぼ前値に復した。

5) 肝組織中ライソゾーム酵素の変動

Fig. 7 は60分間まで部分肝阻血を続けた場合の肝組織中カテプシン D の free 活性の変動を示している

Fig. 7 Changes in free cathepsin D activity of lysosomal fraction following induction of liver ischemia
P value; compared to non-ischemic region

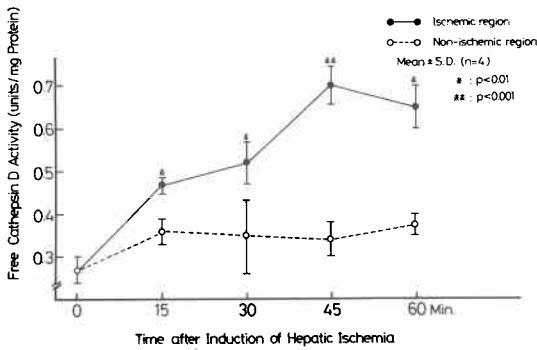
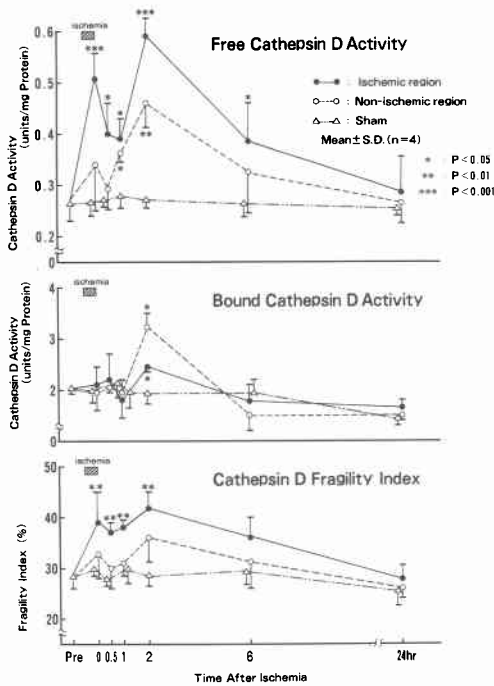
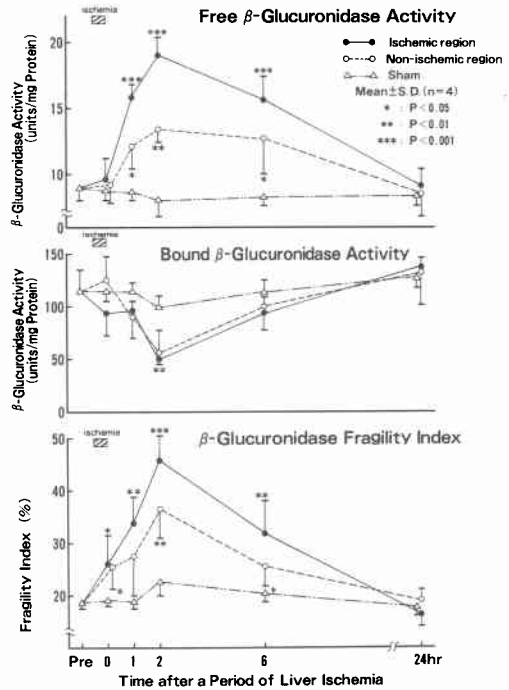


Fig. 8 Changes in cathepsin D of liver tissue after a period of liver ischemia
P value; compared to sham group



が、阻血葉では阻血開始と共に free 活性は漸増するのに対し、非阻血葉では、free 活性の変動はほとんど認められなかった。部分肝阻血解除後の肝組織中カテプシンDの変動はFig. 8に示すごとく、阻血解除直後より阻血葉の free 活性および fragility index のより著明な上昇が見られ、その上昇は2時間後に最高値を

Fig. 9 Changes in β -glucuronidase of liver tissue after a period of liver ischemia
P value; compared to sham group

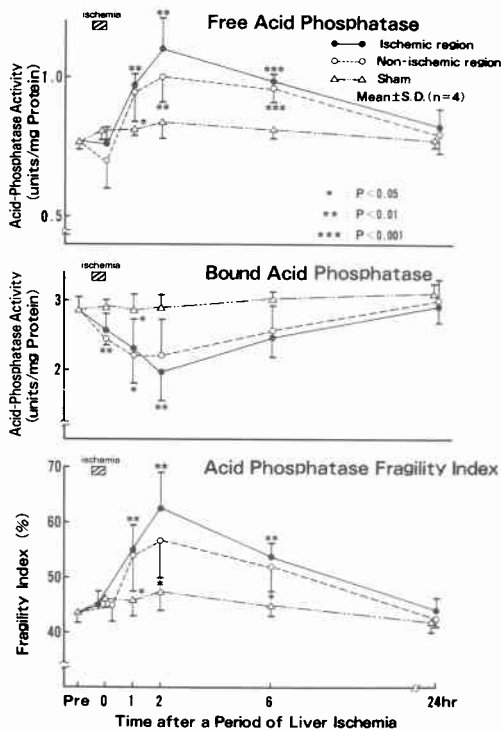


示し (free 活性: 0.52 ± 0.05 , $p < 0.01$, fragility index: 41.2 ± 3.7 , $p < 0.01$), その後漸減し、24時間ではほぼ前値に復した。一方非阻血葉では、カテプシンDの free 活性は阻血解除直後には上昇を認めないが、解除1時間後 (0.37 ± 0.02 , $p < 0.05$), 2時間後 (0.46 ± 0.04 , $p < 0.01$) において阻血葉より程度は弱い有意の上昇を示した。同様に β グルコニダーゼの変動を見ると (Fig. 9), 阻血葉の free 活性および fragility index とも阻血解除直後より上昇、2時間でピークを示し、その後徐々に低下し、24時間で回復した。非阻血葉では free 活性, fragility index はカテプシンDと同様に阻血解除後より軽度の上昇を示した。酸フォスファターゼの変動もカテプシンD, β グルコニダーゼとほぼ一致した変動を示した (Fig. 10)。

IV. 考 察

古くより肝動脈、門脈遮断による肝阻血の実験は種々の肝阻血モデルで試みられているが^{1)~3)7)}, 全肝阻血モデルの場合には、腸管のうっ血および出血にて実験動物は短時間で死亡するといわれており⁸⁾, 肝阻血時の肝細胞の影響を阻血効果にのみ限って検討するには門脈血を大循環へバイパスする方法を付加せねばな

Fig. 10 Changes in acid phosphatase of liver tissue after a period of liver ischemia
P value; compared to sham group



らない。本実験において著者らはラットを用い、門脈一大循環シャントを置かず、門脈のうっ滞を来すことなく阻血肝を作る部分肝阻血モデルを作製した。この部分肝阻血法はバイパスを作製する必要がなく、手技的にも簡便であり、長時間の阻血にも耐えうる優れた方法である⁹⁾¹⁰⁾。また阻血肝葉と非阻血肝葉が同一ラットにおいて比較検討できるのも本法の利点の1つであると言え、臨床においても肝切除の際にしばしば用いる部分肝阻血時の病態を知る上での有用なモデルと考えられた。今回著者らはこの部分肝阻血モデルを用い、部分肝阻血時の肝細胞障害の機序に関しライソゾーム膜の面より検討を行った。一般に細胞が虚血状態におかれると低酸素状態により酸化的リン酸化能が低下し、それと共に電子伝達が阻害されてATPの減少が起こり、エネルギーに依存する細胞機能は障害される。虚血による細胞障害が軽度であれば、これらの機能障害は回復するが、この障害が不可逆的となる場合、ChienらはATP再合成および細胞内Ca²⁺濃度の調節が回復せず、細胞膜のphospholipidの崩壊は細胞

内Ca²⁺濃度上昇により活性化されたphospholipase Aによると述べている^{10)~12)}。この様に虚血による細胞障害機構において細胞膜障害は非常に重要な問題であると考えられるが、その細胞膜障害における増悪因子として以前よりライソゾーム酵素の重要性がいられている。ライソゾームは1955年にde Duveら¹³⁾によりラットの肝細胞で発見されたが、この顆粒内には至適pHを酸性側を持つ種々の水解酵素が含有されている。正常の状態においては、ライソゾーム膜に透過性がないため、このライソゾーム酵素は顆粒内に隔離されているが、組織が虚血状態におかれると、ライソゾーム膜が脆弱化し、ライソゾーム酵素が細胞内cytosol中、あるいは細胞外に遊出し種々の細胞障害をもたらすと考えられている。de Duveらはラットの肝左葉への脈管を結紮し、その後の肝組織中ライソゾームの変動を見ているが、ライソゾーム酵素の遊出は結紮肝葉で直後より著明な上昇を示したと報告している。また彼らはこの虚血によるライソゾーム酵素の遊出は細胞の低酸素状態それ自身よりもむしろ低酸素により引き起こされるPHの低下などの変化が重要であると述べている¹⁴⁾。

Galvin¹⁵⁾¹⁶⁾、Arakiら¹⁷⁾はperfused cat liverにて150分のperfusion後の肝組織中のfreeカテプシンD activityは低酸素血症の群でsham群に比ベ有意に高値を示し、また灌流液中のカテプシンDも時間と共に漸増したと報告している。

またGoldfarb, Carrら¹⁸⁾¹⁹⁾はイヌを使った心筋虚血の実験で、阻血心筋組織中のbound acid phosphatase activityが非阻血部のそれに比ベ有意に低下していることを示し、ライソゾーム膜の脆弱性が亢進していることを示した。またその機序として、虚血によりphospholipase Aが活性化し、アラキドン酸よりプロスタグランジンが合成され、このプロスタグランジンによりcyclic AMP/cyclic GMPの低下が起こり、これによりライソゾーム酵素の遊出が刺激されるのではないかと述べている。

虚血時にライソゾーム酵素の遊出がどのような機序により引き起こされるのかに関してはいまだ議論の多い点であるが、虚血による肝細胞障害において、ライソゾーム酵素の遊出が起こり、またライソゾーム酵素の遊出が虚血肝細胞障害の進展に重要な関わりを持つと思われる。しかしながら阻血解除、血流再開後のライソゾーム酵素の変動に関する報告は少なく、今回の検討においては阻血肝葉では阻血開始よりライソゾー

ム膜の脆弱性を示すといわれる fragility index および free 活性の上昇が認められた。またこの上昇は阻血解除後においてはさらに著明な上昇を示し、2時間でピークとなり、24時間後に前値に復した。この事は阻血中にライソゾーム膜の脆弱性は徐々に亢進し、阻血解除すなわち血流再開によりこの膜の脆弱化はより一層進行することを意味する。近年虚血肝細胞障害に関してフリーラジカルおよび過酸化脂質が reperfusion injury の要因として重要視されてきているが⁹⁾²⁰⁾²¹⁾、この事を考え合わせると本実験における阻血解除後のライソゾーム膜の脆弱性の急速な亢進は、血液再灌流により生成された過酸化脂質がライソゾーム膜の脆弱化をさらに進行させたためであると推測される。すなわち阻血中の低酸素状態におけるライソゾーム膜の脆弱性の亢進はある程度見られるが、その程度はむしろうっ滞のない門脈血の流入後のほうが顕著であり低酸素や pH 低下といった要因によるものよりはるかに再灌流障害の方がライソゾーム膜の脆弱化に強く働いているものと考えよう。

一方非阻血葉では、阻血中には fragility index および free 活性の上昇は認められないが、阻血解除後に軽度ながら上昇を認めた。血清中の3種のライソゾーム酵素は阻血中には全く上昇を示さず、阻血解除後著増し、2時間後でピークを示し、24時間後に前値に復した。このような非阻血葉と阻血葉のライソゾーム膜の脆弱化の発現において時間のずれを認めた点およびそのずれに一致して血清中のライソゾーム活性の上昇を認めた事より阻血により阻血肝細胞のライソゾーム膜の脆弱性が亢進し、ライソゾーム酵素が細胞内外および血中に遊出し、2次的に非阻血葉の肝細胞に障害を及ぼした可能性が考えられる。この様に部分肝阻血時には阻血葉ばかりでなく非阻血葉にもライソゾーム酵素の変動より見るかぎり少なからず肝細胞障害が出現することは、すでに肝障害を持ち肝細胞の脆弱性の亢進している症例の肝切除に際し部分肝阻血を行う場合、この様な影響も考慮して用いるべきかと思われた。今後部分肝阻血の切除後再生に与える影響についてもさらに検討する予定である。

文 献

- 1) Battersby C, Hickman R, Saunders SJ et al: Liver function in the pig: 1. The effect of 30 minutes' normothermic ischemia. *Br J Surg* 1: 27-32, 1974
- 2) Olcay I, Kitahara A, Miller RH et al:

Reticuloendothelial dysfunction and endotoxemia following portal vein occlusion. *Surgery* 75: 64-70, 1974

- 3) Nordlinger B, Douvin D, Javaudin L et al: An experimental study of survival after two hours of normothermic hepatic ischemia. *Surg Gynecol Obstet* 150: 859-864, 1980
- 4) Carlson RP, Lefer AM: Hepatic cell integrity in hypodynamic states. *Am J Physiol* 231: 1408-1414, 1976
- 5) Anson ML: Estimation of cathepsin D with hemoglobin and the partial purification of cathepsin. *J Gen Physiol* 20: 565-574, 1936
- 6) Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr AL et al: Protein measurement with the Forin phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265-271, 1951
- 7) Kono Y, Ozawa K, Tanaka J et al: Significance of mitochondrial enhancement in restoring hepatic energy charge after revascularization of isolated ischemic liver. *Transplantation* 33: 150-155, 1982
- 8) Hirasawa H, Chaudy IH, Bane AE et al: Improved hepatic function and survival with adenosine triphosphate-magnesium chloride after hepatic ischemia. *Surgery* 83: 655-662, 1978
- 9) 志村賢範, 宮崎 勝, 高橋 修ほか: 部分阻血肝モデルにおける肝切除後阻血肝 DNA 合成能に及ぼす CoQ₁₀ の効果. *日外会誌* 86: 1586, 1987
- 10) Chien KR, Abrams J, Pfau RG et al: Prevention by chlorpromazine of ischemic liver cell death. *Am J Pathol* 88: 539-557, 1977
- 11) Chien KR, Abrams J, Serroni A et al: Accelerated phospholipid degradation and associated membrane dysfunction in irreversible, ischemic cell injury. *J Biol Chem* 253: 4809-4817, 1978
- 12) Farber JR, Chien KR, Mittnacht S et al: The pathogenesis of irreversible cell injury in ischemia. *Am J Pathol* 102: 271-281, 1981
- 13) de Duve C, Pressman BC, Ginetto R et al: Tissue fractionation studies 6. Intracellular distribution patterns of enzymes in rat-liver tissue. *Biochem J* 60: 604-617, 1955
- 14) de Duve C, Beaufay H: Tissue fractionation studies 10. Influence of ischemic on the state of some bound enzymes in rat liver. *Biochem J* 73: 610-616, 1959
- 15) Galvin MJ, Lefer AM: Preservation of hepatic cell integrity by aprotinin in hypoxia. *Life Sci* 20: 1969-1978, 1977
- 16) Galvin MJ, Lefer AM: Prevention of hypoxia-induced liver damage by three-day

- glucocorticoid administration. *J Reticuloendothel Soc* 25 : 61—72, 1979
- 17) Araki H, Lefer AM: Cytoprotective actions of prostacyclin during hypoxia in the isolated perfused cat liver. *Am J Physiol* 238 : 176—181, 1980
- 18) Goldfarb RD, Glenn TM: Regulation of lysosomal membrane stabilization via cyclic nucleotides and prostaglandins: The effect of steroids and indomethacin. Molecular and cellular aspects of shock and trauma. Alan R Liss Inc, New York, 1983, p147—166
- 19) Carr FK, Goldfarb RD: Ischemia-induced canine myocardial lysosomal labilization: The role of endogenous prostaglandins and cyclic nucleotides. *Exp Mol Pathol* 33 : 36—42, 1980
- 20) Marubayashi S, Dohi K, Ochi K et al: Role of free radicals in ischemic rat liver cell injury: Prevention of damage by α -tocopherol administration. *Surgery* 99 : 184—192, 1985
- 21) Marubayashi S, Dohi K, Ezaki H et al: Preservation of ischemic liver cell-prevention of damage by Coenzyme Q₁₀. *Transplant Proc* 15 : 1297—1299, 1983

An Experimental Study of the Liver Lysosomal Membrane Fragility During a Period of Partial Liver Ischemia and Following Blood Reperfusion

Ikuro Udagawa, Masaru Miyazaki, Hisao Koshikawa, Hiroshi Ito, Takashi Kaiho,
Jun Matsumoto, Toshio Isono, Hiroyuki Suzuki, Takashi Koyama,
Tsukasa Shimoda and Katsuji Okui
First Department of Surgery, School of Medicine, Chiba University

To examine the pathogenesis of liver ischemia more objectively, the change in liver lysosomal enzymes in a partial liver ischemic model in rats was studied. The free activity of the liver lysosomal enzyme and the lysosomal fragility index obtained from the ischemic lobe gradually increased after induction of ischemia and markedly increased after release of the clamp. There was a significant increase in free activity and fragility index of cathepsin D after two hours of reperfusion (0.52 ± 0.05 units/mg protein and $41.2 \pm 3.7\%$ respectively) compared to the preischemic values (0.27 ± 0.4 units/mg protein and $28.5 \pm 2.5\%$ respectively). In addition, serum lysosomal enzyme activity was markedly increased from 2.20 ± 0.28 units/mg protein (preischemia) to 4.33 ± 0.39 (after two hours of reperfusion). These results suggest that lysosomal labilization occurred in the ischemic lobe and that the lysosomal enzyme was released from the ischemic lobe into the serum. It is concluded that the lysosomal enzyme plays an important role in liver ischemic injury.

Reprint requests: Ikuro Udagawa First Department of Surgery, School of Medicine Chiba University
1-8-1 Inohana, Chiba, 280 JAPAN
