

常温肝虚血時の肝エネルギー代謝の検討

—正常肝および硬変肝ラットにおける calmodulin 拮抗剤の効果—

東京大学第1外科

伊豆 稔 住田 敏之 志賀 元 大盛 芳路
長尾 桓 斉藤 英昭 河野 信博 森岡 恭彦

Calmodulin 拮抗剤: elziverine (ELZ) 投与が常温肝虚血後のラットの生存率の改善に与える影響を検討し、さらに ELZ が虚血肝エネルギー動態に与える影響を高速液体クロマトグラフおよび³¹P-NMR を用いて解析した。

1) 对照群の常温肝虚血後の正常肝ラットの生存率1/7, 硬変肝ラットの生存率0/8に対して ELZ 投与群ではおのおの8/9, 8/8と有意に生存率の改善が認められた。

2) 正常肝の energy status は虚血5分後, 对照群で 0.346 ± 0.061 , ELZ 投与群で 0.245 ± 0.036 と ELZ は虚血後の ATP の分解を亢進した。

3) 虚血前の正常肝对照群の肝組織内乳酸量: $0.12 \pm 0.03 \text{mg/g}$ に対し, ELZ 投与群では $0.17 \pm 0.03 \text{mg/g}$ と増加しており, ELZ は解糖系を亢進させている可能性が示唆された。

ELZ は常温肝虚血後の生存率の改善に有用であったが, これは解糖系の亢進と虚血後の ATP の分解亢進によって細胞の potential を維持しているためと考えられた。

Key words: hepatic ischemia, ³¹P-NMR, calmodulin-antagonist, cirrhosis, energy status

はじめに

肝移植に際し、肝虚血は不可避であり、通常の肝切除術時にも出血のコントロールを目的とした肝門部遮断 (Pringle の手技) がしばしば施行される^{1)~4)}。この血流遮断によって、時には肝細胞の壊死がじゃっ起され、これが術後の合併症発生につながると考えられている。細胞壊死が起こる原因の解明はまだ十分ではないものの、虚血の場合は、細胞内遊離 Ca イオン濃度の上昇が契機になるといわれている^{5)~9)}。その機序に関しては2つの説がある。1つは、細胞内に増加した遊離 Ca イオンが直接的に phospholipase A2 を活性化して細胞膜の構成成分である磷脂質を分解するという説である¹⁰⁾。もう1つは遊離 Ca イオンが細胞内の主たる受容体である calmodulin を活性化し、これを介して間接的に phospholipase A2 を活性化するという説である¹¹⁾¹²⁾。いずれにせよ、活性化した phospholipase A2 は、磷脂質を分解し、細胞膜の崩壊を招き¹³⁾¹⁴⁾、再還流時にはフリーラジカルによる過酸化脂

質の産生が細胞障害をさらに促進すると考えられている¹⁵⁾。

このような虚血時の細胞障害に対し Ca 拮抗剤が用いられ、虚血性細胞障害の軽減に有用であるとの報告がある¹⁶⁾。その作用機序は、細胞膜の Ca チャンネルのブロックによって細胞内遊離 Ca イオン濃度の上昇を抑制することにあると考えられている。しかし、細胞内の遊離 Ca イオンの主たる受容蛋白である calmodulin に対する拮抗剤が肝虚血に及ぼす影響に関する報告はない。そこで、本研究は、calmodulin 拮抗剤の虚血に対する効果を検討することを目的とし、以下の実験を施行した。まず、calmodulin 拮抗剤 (elziverine, ロシュ) が肝虚血後の生存率の改善に有効か否かを検討した。次に elziverine がエネルギー動態に与える影響を調べるために HPLC (高速液体クロマトグラフ) を用いて in vitro で adenine nucleotide の測定と³¹P-NMR を用いて in vivo で β ATP, 細胞内 pH などの測定を行った。さらに、elziverine 投与が嫌気性糖代謝に与える影響を調べるために肝組織内乳酸とピルビン酸を測定した。

実 験

<実験1>Ca拮抗剤, calmodulin拮抗剤の虚血に対する効果

SD系の雄性ラットで12週齢前後のものを正常肝ラットとし, 0.05%のthioacetoamideを4~8か月自由飲水させて作成した慢性肝障害ラットを硬変肝ラットとした。calmodulin拮抗剤の虚血性肝障害に対する救命効果を調べるために正常肝ラット, 硬変肝ラットともに予備実験で確かめた虚血許容時間を越える肝門部遮断を施行した。また同時にCa拮抗剤との効果の比較も行った。

I. 方法

1-1: 正常肝ラットにおける救命効果

麻酔方法は, 塩酸ケタミン5mg/100g body weight, ジアゼパム0.5mg/100g body weight, 硫酸アトロピン25 μ g/100g body weightの腹腔内投与によった。その後開腹して, ヘパリンを20U/100g body weight経静脈的に投与し, 内径1mmのシリコンチューブ(クリエートメディック製)で腸間膜静脈-頸静脈シャントを作成して肝門部遮断モデルを作成し, これを以下の3群に分けた。

1群: lactated Ringer液のみを投与した群 (n=8)

2群: nifedipine 10 μ g/100g body weightおよびlactated Ringer液を投与した群 (n=8)

3群: elziverine 0.5mg/100g body weightおよびlactated Ringer液投与群 (n=9)

lactated Ringer液の投与量は1ml/100g body weight/hとし, シャントチューブより輸液した。いずれも経静脈的に薬剤を全身投与し, 投与10分後に肝門部を血管クリップで遮断し, 常温肝虚血を開始すると同時にシャントを解放した。予備実験で本虚血モデルの肝門部遮断時間のLD50が正常肝ラットでは120分前後であることを確認した。そして, 130分間の肝門部遮断ではほとんどが死亡するため, この実験の遮断時間は本虚血モデルのLD50を越える130分間とした。そして, 3群とも130分間の虚血後, 直ちに肝門部遮断を解除し, 腸間膜静脈-頸静脈シャントを除去して閉腹した。肝門部遮断後7日目の生存率を比較し, 各薬剤の有効性を判定した。

またelziverineは水に難溶性であるため, 0.2%のcarboxy methyl cellulose (CMC)懸濁液として用い, nifedipineはアダラート(バイエル)を用いた。

1-2: 硬変肝ラットにおける効果

硬変肝ラットでは肝虚血実験に先立ちKICG (ICG

血漿消失率)を求めた。まず, 塩酸ケタミン, ジアゼパムは正常肝ラットの半量, 硫酸アトロピンは同量腹腔内投与で麻酔した後, 0.2mg/100g body weightのindocyanine green (ICG)を静脈内に負荷して3, 6, 9分後に頸静脈から採血してKICGを求めた¹⁷⁾。KICGの測定から約1週間の回復期間をおいてから次の虚血実験を行った。正常肝ラットと同様に以下の3群に肝門部遮断モデルを作成して常温肝虚血とした。

1群: lactated Ringer液のみを投与した対照群 (n=8)

2群: nifedipine 10 μ g/100g body weightおよびlactated Ringer液投与群 (n=8)

3群: elziverine 0.5mg/100g body weightおよびlactated Ringer液投与群 (n=8)

なお, lactated Ringer液の投与量は1ml/100g body weight/hとした。また, 硬変肝でのLD50を示す肝門部遮断時間は予備実験から, KICGを用いたTLD₅₀(分)=406×KICG+6.2であらわされた。そこで, 硬変肝ラットでの肝門部遮断時間はKICGから推定されたLD50 (TLD₅₀)の120%に設定した。肝門部解除後はシャントを除去して閉腹し, 1週間後の生存ラットを耐術例とした。なお, 1群のKICGは0.113±0.054, 2群は0.090±0.040, 3群は0.107±0.057でありグループ間の有意差はなかった。

統計学的処理にはt検定, χ^2 検定を用いた。なお平均はすべてMean±S.Dで示し, 以下の実験でも同様の統計方法を用いた。

II. 成績

正常肝ラットでは, 薬剤非投与群で1/8だけが生存したのに対し, nifedipine投与群で7/8, elziverine投与群で8/9が生存し, ともに有意に生存率が向上した。しかし, nifedipine投与群とelziverine投与群間の生存率に有意差はなかった (Table 1)。

Table 1 Improved survival rate after hepatic ischemia by giving each drug

	Group 1 n=8	Group 2 n=8	Group 3 n=9
drug	(-)	Nif	Elz
survive	1 (12.5)	7 (87.5)	8 (88.9)
die	7 (87.5) ^{***}	1 (12.5) [*]	1 (11.1) ^{**}

() indicates percentage. Nif: nifedipine

Elz: elziverine

*: p<0.01, Group 1 vs Group 2

**: p<0.005, Group 1 vs Group 3

Table 2 Improved survival rate of cirrhotic rats after hepatic ischemia by drugs

	Group 1 n=8	Group 2 n=8	Group 3 n=8
drug	control	nifedipine	elziverine
survive	0 (0%)	2 (25%)	8(100%)
die	* ** 8(100%)	** *** 6 (75%)	*. *** 0 (0%)

* : p<0.001, Group 1 vs Group 3

** : N.S. Group 1 vs Group 2

*** : p<0.005, Group 2 vs Group 3

一方、硬変肝ラットでは、nifedipine 投与群は薬剤非投与群と有意差がなかった。しかし、elziverine 投与群では全ラットが生存し (8/8)、非投与群に比較して有意に生存率が向上しただけではなく、nifedipine 投与群 (2/8) に比べても有意に生存率が大きかった (Table 2)。なお、死亡したラットはほとんどが肝門部遮断後24時間以内であった。

III. 小括

Elziverine は肝虚血後に著明な生存率の改善を示し、その救命効果は nifedipine に比較しても遜色なかった。

<実験 2> 虚血肝のエネルギー動態に与える elziverine の影響—in vitro における検討—

I. 方法

2-1: 肝組織の採取

正常肝ラット、硬変肝ラット両群に、肝門部遮断モデルを作成して、elziverine 投与、非投与での虚血時の肝組織 energy charge (EC)、肝組織内乳酸、ピルビン酸の相違を検討した。

1 群: 正常肝ラット (コントロール群) (n=10)

2 群: 正常肝ラットに elziverin 0.5mg/100g body weight を投与した群 (n=9)

3 群: 硬変肝ラット (コントロール群) (n=9)

4 群: 硬変肝ラットに elziverine 0.5mg/100g body weight を投与した群 (n=10)

4 群ともに実験中はシャントチューブから lactated Ringer 液を 1ml/100g body weight/h 輸液した。3 群の KICG は 0.088±0.025、4 群は 0.085±0.024 と有意差がなかった。

以上の 4 群において肝門部遮断前、肝門部遮断 5 分、10 分、20 分、30 分後に肝外側左葉の一部を約 0.3~0.5 g 採取して即時に液体窒素にて凍結し、nucleotide の測定、乳酸、ピルビン酸の測定に用いた。

2-2: Adenine nucleotide 測定法

Adenine nucleotide の測定は HPLC 法によった。すなわち、肝組織を 10% の TCA 液でホモジネートして除蛋白した後、10,000G、0℃ の条件で 15 分間遠沈して上清を得た。この上清を約 5ml、0℃ のエーテルと攪拌し、上層のエーテルを除去するという操作を 6 回繰り返した。こうして TCA を除去した後、凍結乾燥して脱イオン水に溶解し HPLC (島津製作所: LC-6A, SPD-6A, カラム: WAX1) で測定した。

2-3: 肝組織内乳酸、ピルビン酸測定法

凍結した肝組織を約 3 倍容の 0.8 規定過塩素酸でホモジネートして除蛋白した後、3,000rpm、0℃ の条件で 15 分間遠沈し上清を回収した。これを用い、乳酸は、乳酸オキシダーゼ、パーオキシダーゼ系による酵素法を用いて比色定量で測定した。また、ピルビン酸の測定はピルビン酸オキシダーゼ、パーオキシダーゼ系による酵素法を用いた。

II. 成績

2-1: Elziverine のエネルギー動態に与える影響

Energy charge (ATP+0.5×ADP/ATP+ADP+AMP) は虚血によって自然対数的に減少するが、虚血後の変化が重要と思われるため次のように比をとって比較した。

$\Delta \ln (EC_x) = \ln (\text{PreEC}/EC_x)$ PreEC: 遮断前の energy charge

EC_x: 遮断 x 分後の energy charge

PreEC に関しては、正常肝、硬変肝ともに elziverine 投与、非投与間に有意差はなかった。

正常肝の $\Delta \ln (EC_5)$ は elziverine 投与群の方が非投与群よりも有意に大きかった。また、正常肝の 10、20、30 分値は elziverine 投与群の方が非投与群よりも大きい傾向はあったものの有意差はなかった。硬変肝ではいずれの時点でも elziverine 投与群と非投与群間に有意差は認められなかった (Table 3)。

2-2: Elziverine 投与による肝組織内乳酸、ピルビン酸の変化

肝組織内乳酸は、4 群とも虚血後、遮断前値に比べて急激に増加した。Elziverine 非投与群をみると、正常肝の肝組織内乳酸は虚血後早期に硬変肝よりも急激に増加したが、虚血後 30 分では増加の傾向が弱まった。一方、硬変肝の肝組織内乳酸は虚血直後の増加の程度が正常肝よりも緩徐なもの、虚血後 30 分でもまだ増加の傾向にあった。

次に elziverine 投与、非投与群間で比較してみると、正常肝では elziverine 投与群の肝組織内乳酸は、非投

Table 3 Changes of decreasing rate of the hepatic energy charge in ischemia [$\Delta \ln(EC)$] by elziverine

	Group 1	Group 2	Group 3	Group 4
PreEC	0.810± 0.053	0.804± 0.032	0.807± 0.044	0.814± 0.020
5 min	0.720± * 0.142	0.815± * 0.093	0.545± 0.120	0.578± 0.031
10 min	1.171± 0.119	1.181± 0.087	0.690± 0.108	0.637± 0.077
20 min	1.435± 0.130	1.506± 0.100	0.825± 0.161	0.863± 0.142
30 min	1.646± 0.271	1.681± 0.250	0.976± 0.171	1.103± 0.250

There is no significant difference among 4 groups before ischemia. After hepatic ischemia, there is significant difference between Group 1 and Group 3 in all times.

*: $p < 0.05$, Group 1 vs Group 2.

There is no difference between Group 3 and Group 4.

Table 4 The changes of lactic acid in hepatic tissue after hepatic ischemia

	Group 1	Group 2	Group 3	Group 4
Pre ischemia	0.12± **●0.03	0.17± * 0.03	0.26± ●● 0.08	0.22± 0.05
5 min	1.18± **●0.13	1.31± ** 0.12	1.01± ● 0.09	0.98± 0.05
10 min	1.52± ** 0.23	1.77± ** 0.15	1.55± 0.15	1.48± 0.12
20 min	2.00± * 0.27	2.33± * 0.08	2.23± 0.23	2.05± 0.20
30 min	2.07± ● 0.33	2.11± 0.13	2.59± ● 0.35	2.50± 0.29

Unit: mg/g, wet liver weight

*: $p < 0.01$, **: $p < 0.05$ (Group 1 vs Group 2)

●: $p < 0.01$, ●●: $p < 0.001$ (Group 1 vs Group 3)

N.S.: Group 3 vs Group 4

与群に比較して虚血前に既に有意に増加しており、虚血後の肝組織内乳酸量も elziverine 投与群の方が非投与群に比べて有意に大きかった (Table 4)。しかし、硬変肝の肝組織内乳酸量は、elziverine 投与、非投与群間に有意差がなかった。

肝組織内ピルビン酸に関しては、4群間の遮断前値に有意差はなく (Table 5)、4群とも遮断後5分間で遮断前値に比べて有意に低下した。正常肝、硬変肝ともに非投与群では、その後、大きな変化を示さずに推移したのに対して、elziverine 投与正常肝では10分から20分にかけて再び有意に増加した。また、elziverine 投与硬変肝でも5分から10分にかけて有意な再増加が認められた。

III. 小括

Elziverine は正常肝では虚血後の EC の低下を促進した。正常肝では elziverine の投与によって虚血前、

Table 5 Changes of pyruvic acid in the hepatic tissue after hepatic ischemia

	Group 1	Group 2	Group 3	Group 4
Pre ischemia	0.74± 0.30	0.83± 0.13	0.50± 0.16	0.48 0.11
5 min	0.47± 0.08	0.49± 0.08	0.33± 0.09	0.34± ** 0.11
10 min	0.45± 0.12	0.48± * 0.08	0.39± 0.09	0.40± ** 0.11
20 min	0.50± 0.08	0.54± * 0.06	0.45± 0.22	0.44± 0.21
30 min	0.46± 0.08	0.45± 0.06	0.39± 0.11	0.42± 0.10

Unit: 10^{-2} mg/g, wet liver weight

*: $p < 0.05$, Significant increase from 10min to 20min in Group 2.

** : $p < 0.01$, Significant increase from 5min to 10min in Group 4.

虚血後ともに肝組織内乳酸量が増加しており解糖系の亢進が考えられた。硬変肝では elziverine 投与によるエネルギー状態の明らかな変化は観察できなかった。

<実験3>肝虚血時のエネルギー動態に与える elziverine の影響— ^{31}P -NMR による検討—

I. 方法

^{31}P -NMR spectroscopy を用いて肝門部遮断時の肝細胞内 pH, Pi (無機磷酸), phosphomonoester (PME), β ATP の変化を観察するために、以下の4群に肝門部遮断モデルを作成し、30分間の肝門部遮断を施行した。測定には ^{31}P -NMR (BEM 250/80, 2.0 Tesla, 大塚電子) を用いた。測定条件は、リン共鳴周波数: 34.5MHz, パルス幅: 30 μ sec, パルス繰り返し時間: 0.24sec, 積算回数: 300回, 測定コイル: 15mm surface coil とした。

1群: 正常肝ラット (コントロール群) (n=10)

2群: 正常肝ラットに elziverine を投与した群 (n=8)

3群: 硬変肝ラット (コントロール群) (n=13)

4群: 硬変肝ラットに elziverine を投与した群 (n=11)

4群ともに実験中はシャントチューブから lactated Ringer 液を 1ml/100g body weight/h 輸液し、elziverine の投与量は 0.5mg/100g body weight とした。また、3群の KICG は 0.079 ± 0.026 (Mean \pm S.D.) で、4群は 0.076 ± 0.021 であり、有意差はなかった。

1, 3群は、虚血前5分間測定後、そのままの状態に肝門部遮断を施行し、虚血後の変化を連続的に観察した。2, 4群では、まず elziverine 投与前の状態に5分間測定し、投与後10分間変化を観察した後、直ち

Table 6 The changes of ES (β ATP/Pi) in hepatocyte after hepatic ischemia

	Group 1	Group 2	Group 3	Group 4
Pre inject		1.448±0.189		1.494±0.242
Pre clamp	1.477±0.131	1.528±0.306	1.417±0.342	1.414±0.328
5 min	0.346±* 0.061	0.245±* 0.036	0.514±0.140	0.433±0.068
10 min	0.200±**0.022	0.169±**0.027	0.352±0.092	0.322±0.068
20 min	0.130±0.033	0.120±0.016	0.245±0.068	0.220±0.045
30 min	0.085±0.017	0.083±0.026	0.165±0.068	0.150±0.033

* : p<0.001. ** : p<0.05. Group 1 vs Group 2
 N.S. : Group 3 vs Group 4
 There is significant difference (p<0.001) in all times after hepatic ischemia between Group 1 and Group 3.

Table 7 Changes of β ATP in hepatocyte after hepatic ischemia

	Group 1	Group 2	Group 3	Group 4
Pre inject		96.8±8.2		106.0±9.3
Pre clamp	100	100	100	100
5 min	45.5± ◻ 6.7	35.4± ○ 6.3	59.3± ■ 9.9	58.2± 8.3
10 min	30.5± △ 2.0	26.1± △ 4.8	48.5± ● 9.1	47.7± 10.3
20 min	24.1± ● 4.4	20.7± 3.0	41.4± ● 6.3	38.5± 9.2
30 min	17.7± ● 3.6	15.8± 3.7	30.8± ● 6.6	31.0± 6.1

All data were indicated by percentage based on each pre ischemic value.
 ○ : p<0.01. Group 1 vs Group 2.
 △ : p<0.05. Group 1 vs Group 2.
 ■ : p<0.01. Group 3 vs Group 4.
 ● : p<0.001. Group 3 vs Group 4.

に肝門部を遮断し、常温肝虚血とした。いずれの群も、虚血後5分、10分、20分、30分を中心とした1分間の積算によって得られたデータを用いて総計処理を行った。また、外部標準を用いていないためにおのおのデータの絶対値だけでは個体間の比較が不可能であり、 β ATP/Piの様に各データ間の比あるいは、遮断前値との百分率を用いて各個体間の比較を行った¹⁸⁾。正常肝と硬変肝の常温肝虚血時の相違に関しては別報での報告を予定しているため、今回は主として elziverine 投与の有無による相違を中心に検討した。

II. 成績

3-1 : Energy status (β ATP/Pi : ES) の変化

個体間のエネルギー状態を比較するために β ATP/Pi を energy status とした。elziverine 非投与の正常群と硬変肝との比較では、遮断前の ES (PreES) に関しては有意差がなく、遮断後の ES は有意に正常肝の方が小さかった (Table 6)。2群の正常肝、4群の硬変肝において、虚血前に elziverine を投与してその後の変化を観察したが、この投与のみでは有意の変化は認められなかった。

また、正常肝の elziverine 投与群では虚血後の ES の低下が非投与群に比べて急速であるのに対して、硬変肝の elziverine 投与群では虚血後も非投与群との有意差は認められなかった。

ここで β ATP のみの変化に注目し、遮断 x 分後の β ATP と遮断前値との比をとって、その変化率を

$$R_{ATP}(x) = \beta ATP(x) / Pre(\beta ATP)$$

とした (Table 7)。Elziverine 非投与の正常肝と硬変肝を比較すると $R_{ATP}(x)$ は虚血後、正常肝の方が急速

に低下した。また、正常肝での虚血後の β ATP の減少は、elziverine 非投与群よりも elziverine 投与群の方が速く、elziverine によって ATP の消失が加速されたと考えられた。しかし、硬変肝では虚血前後ともに elziverine 投与群、非投与群間に有意差は観察できなかった。

3-2 : PME の変化

PME は、AMP の分画も含むものの、ほとんどがグルコース 6 磷酸、フルクトース 6 磷酸であるといわれている¹⁹⁾。Elziverine 非投与の場合、虚血前の硬変肝の PME は正常肝のそれに比べて有意の増加が認められた。しかし、正常肝、硬変肝ともに虚血前に elziverine を投与しただけでは有意の変化は認められなかった。

また、PME の虚血後の経時的変化を考察するために増加率を

$$R_{PME}(x) = PME(x) / PrePME$$

とした (Table 8)。すると elziverine 非投与の場合、正常肝の方が硬変肝よりも有意に増加率が大きかった。正常肝では、elziverine 投与群の方が非投与群に比べて虚血後20分、30分の PME の増加率が有意に小さかった。すなわち、正常肝ラットでは elziverine 投与によって虚血後の PME の増加が抑制された。しかし、硬変肝では elziverine 投与群の増加率が非投与群のそれよりも小さい傾向があるものの有意差はなかった。

3-3 : 無機磷酸の変化

正常肝、硬変肝ともに elziverine 投与だけで虚血を負荷する前は Pi の変化は観察できなかった。PME と同様に遮断前値を基準として増加率を

Table 8 Changes of PME in hepatocyte after hepatic ischemia

	Group 1	Group 2	Group 3	Group 4
Pre inject	/	96.6± 9.2	/	98.9± 12.0
Pre clamp	100	100	100	100
5 min	163.5± ● 14.4	163.1± 18.5	137.9± ● 18.9	139.4± 20.3
10 min	202.4± ● 15.4	189.4± 15.8	166.7± ● 29.7	163.1± 28.8
20 min	238.8± ○ ● 18.5	206.6± ○ 20.0	192.9± ● 40.0	181.1± 35.0
30 min	268.0± △ ● 36.5	224.3± △ 23.6	209.2± ● 47.9	296.3± 34.7

All data were indicated by percentage based on the values of Pre clamp.

△: p<0.05, Group 1 vs Group 2.

○: p<0.01, Group 1 vs Group 2.

●: p<0.01, Group 1 vs Group 3.

PME: phosphomonoester

Table 9 Changes of Pi in hepatocyte after hepatic ischemia

	Group 1	Group 2	Group 3	Group 4
Pre inject	/	102.7± 17.7	/	99.3± 11.9
Pre clamp	100	100	100	100
5 min	190.9± ○ 22.8	207.3± 35.7	166.6± ○ 29.2	184.5± 31.8
10 min	232.7± ○ 21.0	247.0± 37.9	208.5± ○ 27.6	212.8± 36.2
20 min	286.1± ○ 28.4	271.6± 46.4	251.8± ○ 39.4	241.3± 34.7
30 min	313.1± 31.2	307.2± 47.7	290.0± 46.8	297.0± 42.5

All data were indicated by percentage based on the data of Pre clamp.

○: p<0.05, Group 1 vs Group 3.

Pi: inorganic phosphate

$$R_{Pi}(x) = Pi(x) / PrePi$$

とした。Elziverine 非投与の正常肝, 硬変肝を比較すると $R_{Pi}(x)$ は虚血前も虚血後も有意に正常肝の方が大きかった (Table 9)。Elziverine 投与, 非投与群間の比較では, 正常肝, 硬変肝ともに, 虚血前も虚血後も $R_{Pi}(x)$ に有意差は認められなかった。

3-4: 肝細胞内 pH の変化

^{31}P -NMR で測定された, Pi の α ATP を基準とした chemical shift から肝細胞内 pH を求めた (Table 10)。Elziverine 非投与の場合は, 虚血前の肝細胞内 pH も虚血後のそれも正常肝の方が有意に硬変肝よりも大きかった。そして, 正常肝では elziverine 投与群の方が非投与群に比較して虚血早期の細胞内 pH の低

Table 10 Changes of intracellular pH in liver tissue after hepatic ischemia.

	Group 1	Group 2	Group 3	Group 4
Pre inject	/	7.32± 0.06	/	7.18 0.05
Pre clamp	7.28± ● 0.05	7.32± 0.06	7.14± ● 0.10	7.13± 0.05
5 min	6.75± + 0.09	6.87± + 0.16	6.79± 0.09	6.76± 0.05
10 min	6.59± 0.08	6.68± 0.17	6.61± 0.06	6.61± 0.04
20 min	6.51± 0.09	6.59± 0.13	6.47± 0.06	6.52± 0.07
30 min	6.45± ▲ 0.08	6.52± 0.14	6.38± ▲ 0.06	6.41± 0.08

*: p<0.05, Group 1 vs Group 2.

●: p<0.001, Group 1 vs Group 3.

▲: p<0.05, Group 1 vs Group 3.

下が有意に小さかった。しかし, 硬変肝では elziverine 投与, 非投与群間に細胞内 pH の有意差は認められなかった。

III. 小括

正常肝ラットでは elziverine 投与によって虚血後の肝 ATP の分解が加速された。また, elziverine は虚血後の PME の増加を抑制しており, 虚血後の解糖系を亢進している可能性が示された。一方, 硬変肝では正常肝と同様の傾向があるものの有意差は認められなかった。

考 察

今回の実験で, 1) elziverine は常温肝虚血後の生存率の改善に有用であった。2) elziverine の投与によって正常肝では虚血後の肝細胞内で ATP の分解が亢進した。3) elziverine は正常肝において虚血前および虚血後の肝組織内乳酸量を有意に増加させ, 虚血後の肝細胞の PME の増加を抑制した。4) 硬変肝ラットでは elziverine 投与によって生存率は向上したが, in vitro および in vivo の肝エネルギー状態の測定結果には有意差が得られなかった。

虚血細胞内に増加した遊離 Ca イオンは直接的に phospholipase A2 を活性化すると説があるものの²⁰⁾, 一方では細胞内の増加した遊離 Ca イオンは, calmodulin を活性化し, これを介して間接的に phospholipase A2 を活性化するとされている。そして, いずれにしても, 活性化された phospholipase A2 は細胞膜の構成成分である磷脂質を分解し, free fatty acid (FFA) とリソ磷脂質を産生すると考えられている。これに対し, 作用機序は不明であるが, calmodulin 拮抗

Fig. 1 Consumption of ATP in ischemic cells, and the function of elziverine.

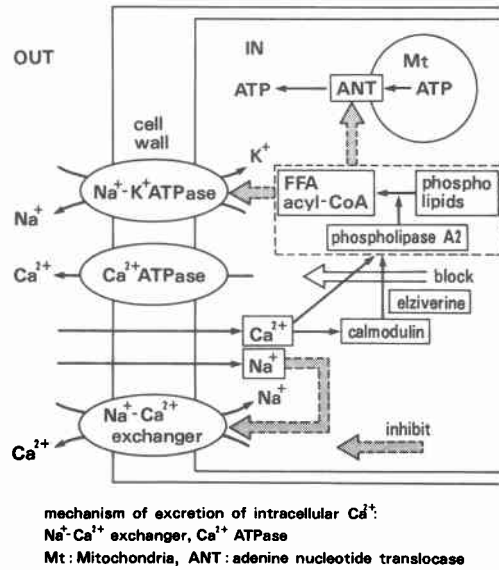
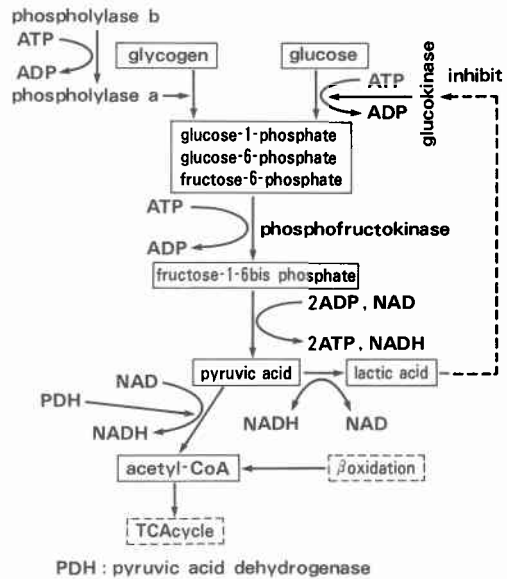


Fig. 2 The system of glycolysis



剤が phospholipase A2の活性化を抑制することも確認されている¹¹⁾¹²⁾。したがって、calmodulin拮抗剤は、calmodulinを介して phospholipase A2を抑制するにせよ、あるいは、直接的に phospholipase A2の活性を抑制するにせよ、磷脂質の分解による FFA の増加を抑制することで効果を発揮していると考えられた (Fig. 1)。

虚血後に細胞内に増加する FFA, acyl-CoA¹⁴⁾²¹⁾は細胞内外の potential の維持を司る Na^+-K^+ ATPase を抑制する²²⁾²³⁾。したがって、程度の多少はあるものの、elziverine 非投与の正常肝、および硬変肝の Na^+-K^+ ATPase は虚血後に細胞内に増加した FFA, acyl-CoA によって抑制を受ける。これに対して calmodulin 拮抗剤である elziverine は phospholipase A2の活性化を抑制して磷脂質の分解から生じる FFA の増加を抑制し、 Na^+-K^+ ATPase の機能低下を防ぐと考えられた。このため、elziverine は虚血後の ATP の利用率を改善し、本実験でみられたように ATP の分解を亢進していると思われた。そして、ATP を利用した Na^+-K^+ ATPase が回転するほど細胞内外の Na イオン濃度勾配が維持され、細胞の potential が確保される。と同時に、Na イオン濃度勾配をエネルギー源とする Na^+-Ca^{2+} 交換体も機能して細胞内の Ca イオンの排除がより円滑に行われる。このことが elziverine が虚血時に肝細胞を保護し、虚血に対する耐性を

増大させる主要な機序であると考えられた (Fig. 1)。

Elziverine の虚血前の解糖系への影響についてみると、正常肝ラットで elziverine は虚血前にすでに肝組織内乳酸を有意に増加させるという成績が得られた。この肝組織内乳酸の増加の原因としては解糖系からのピルビン酸の産生亢進、その結果としての乳酸産生の亢進がまず考えられた。すなわち、ピルビン酸から acetyl-CoA への変換を司るピルビン酸デヒドロゲナーゼ (PDH) が律速段階となるために、ピルビン酸から acetyl-CoA が産生されるよりも乳酸が生じやすくなると考えられた。解糖系を亢進する機序について、Ca 拮抗剤である Diltiazem は phosphofructokinase の活性化を介して行っているとされている²⁴⁾。Elziverine の作用機序に関する詳細は不明だが、Diltiazem と同様の作用で解糖系を亢進させている可能性が強い (Fig. 2)。

虚血後の解糖系の変化についてみると、肝虚血後の細胞内の酸素濃度の急速な減少は、電子伝達系の機能低下を招き、その結果、電子伝達系による NAD^+ 産生は停止する。しかしその NAD^+ 供給の代償機構として、ピルビン酸から乳酸への変換が行われるために虚血後の急激な乳酸の増加が生じ、ピルビン酸は有意に減少する¹⁰⁾²²⁾。ここで得られた NAD^+ は TCA 回路に用いられ、ATP の産生に寄与している。本実験における正常肝ラットで、虚血後も elziverine 投与群の肝組

織内乳酸は非投与群に比較して有意に増加しており、ピルビン酸から乳酸への変換によってTCA回路に必要なNAD⁺の供給が、より円滑に行われていると考えられた。

一方、正常肝、硬変肝ともにTCA回路自体も虚血によって機能低下をきたしていると考えられた。すなわち、elziverineを投与した正常肝、硬変肝ともに、虚血後に有意なピルビン酸の再上昇が認められた。このピルビン酸の再上昇はNAD⁺の需要の低下、つまり、TCA回路の機能低下を意味している可能性がある。Elziverine非投与の正常肝、硬変肝でも有意差はないものの、このピルビン酸の再上昇の傾向は投与群と同様に認められた。Elziverine投与群では、非投与群に比べ、解糖系が亢進してピルビン酸から乳酸への変換が急速であったために、このような有意差が生じたと考えられた。

しかしながら、この血行遮断後のピルビン酸再上昇の時期は、elziverine投与群でも非投与群でも、正常肝では虚血後10~20分の間に、硬変肝では虚血後5~10分の間にあった。これは、硬変肝では正常肝に比べてより早期にTCA回路の機能低下が生じている可能性を示唆した。

さらに虚血後のPMEに注目すると、正常肝ではelziverine投与群の方が非投与群に比べ増加率が小さかった。これには2つの理由が考えられた。第1の理由はグリコーゲンからグルコース1-6-リン酸への交換の抑制であり、いま1つはフルクトース1-6-リン酸からフルクトース1-6-二リン酸への変換の亢進である。しかし、elziverine投与群では非投与群に比べて虚血後の肝組織乳酸量が増加していることからフルクトース1-6-リン酸からフルクトース1-6-二リン酸、さらにピルビン酸への変換がスムーズに行われていると考える方が合理的であり、elziverineは虚血後も解糖系を亢進させていると考えられた (Fig. 2)。

硬変肝においてはelziverineによって虚血後の生存率の向上はみたもののin vivoの β ATP、PME、Piなどの測定結果やin vitroの肝ATP、肝組織内乳酸、ピルビン酸などの測定結果には有意差が認められなかった。その原因としてthioacetamide投与によって作成した肝硬変の程度が一樣でないことが大きく関わっていると考えられる。今回の硬変肝ラットでのKICGは0.04前後から0.18前後までとその値は幅広く、このためin vivoの β ATP、PME、Piなどの測定結果やin vitroの肝ATP、肝組織内乳酸、ピルビン酸などの測

定値もKICGの程度に対応して広範囲にわたっていた。したがって、このことが、これらの測定結果に有意差が生じなかった大きな原因と考えられた。もし、硬変の程度が均一なラットを厳密に選択できればelziverine投与による有意差が確認できる可能性が強く、これは、今後に残された課題であると思われる。

稿を終えるにあたり、NMRの測定に御協力をいただいた大塚輸液開発研究所の藤原氏、桑波田氏、上平氏をはじめ薬理研究室の諸氏に深く感謝致します。また、elziverineの提供など御協力をいただいた日本ロシユ臨床開発本部の諸氏に厚く御礼申し上げます。

文 献

- 1) Huguet C, Nordlinger B, Bloch P et al: Tolerance of the human liver to prolonged normothermic ischemia. Arch Surg 113: 1448-1451, 1978
- 2) Delva E, Camus Y, Nordlinger B et al: Vascular occlusions for liver resections. Ann Surg 204: 211-218, 1989
- 3) Bismuth H, Castaing D, Garden J et al: Major hepatic resection under total vascular exclusion. Ann Surg 210: 13-19, 1989
- 4) Nagasue N, Yukasa H, Suehiro S et al: Tolerance of the cirrhotic liver to normothermic ischemia. Am J Surg 147: 772-775, 1984
- 5) Steenbergen C, Murphy E, Levy L et al: Evaluation in cystosolic free calcium concentration early in myocardial ischemia in perfused rat heart. Circ Res 60: 700-707, 1987
- 6) 増田 達, 山崎光章, 伊藤祐輔ほか: 虚血時の脳内Caイオンおよび代謝動態. 北陸麻誌 22: 3-13, 1988
- 7) Penniston J: Plasma membrane Ca²⁺-ATPase as active Ca²⁺ pumps. Calcium Cell Function 4: 99-149, 1983
- 8) Exton JH: Mechanisms involved in calcium-mobilizing agonist responses. Adv Cyclic Nucleotide Protein Phosphorylation Res 20: 211-262, 1986
- 9) 板野俊文, 松井秀樹, 畠瀬 修ほか: 細胞内カルシウム濃度の調節系. 蛋・核・酵 31: 1771-1783, 1986
- 10) Siesjo BK: Cell damage in the brain. J Cereb Blood Flow Metab 1: 155-185, 1981
- 11) Ralph J: Effects of calmodulin inhibitors on rabbit synovocyte phospholipase A₂. Prostaglandins Leukotrienes Med 29: 61-69, 1987
- 12) Nakagawa Y, Waku K: Selective inhibition of free arachidonic production in activated alveolar macrophages by calmodulin antago-

- nist. *Biochem Biophys Res Commun* 156 : 947—953, 1988
- 13) Kako KJ: Membrane damage caused by lipid peroxidation in myocardial ischemia. *Jikeikai Med J* 32 : 609—639, 1985
 - 14) Chien KR, Han A: Accumulation of unesterified fatty acid in ischemic canine myocardium. Relationship to a phosphatidylcholine deacylation-reacylation cycle and the depletion of membrane phospholipids. *Circ Res* 54 : 313—322, 1984
 - 15) Freeman BA, Craps JD: Biology of disease, free radical and tissue injury. *Lab Invest* 47 : 412—426, 1982
 - 16) Yoshimi F, Ishimaru M, Sodeyama M et al: The effect of nifedipine, a calcium channel blocker, on liver ischemia in dogs. *Jpn J Surg* 18 : 84—92, 1988
 - 17) 水田哲明: 肝硬変の外科的治療に関する実験的研究. *日外会誌* 82 : 1236—1247, 1981
 - 18) Desmoulin F, Cozzone PJ, Canioni P et al: Phosphorus-31-nuclear-magnetic-resonance study of phosphorylated metabolites compartmentation, intracellular pH and phosphorylation state during normoxia, hypoxia and ethanol perfusion, in the perfused rat liver. *Eur J Biochem* 162 : 151—159, 1987
 - 19) Cohen SM: Simultaneous ^{13}C and ^{31}P NMR studies of perfused rat liver. Effect of insulin and glucagon and a ^{13}C NMR assay of free Mg^{2+} . *J Biol Chem* 258 : 14294—14308, 1983
 - 20) Withnall MT, Brown TJ, Diocce BK et al: Calcium regulation of phospholipase A_2 is independent of calmodulin. *Biochem Biophys Commun Res* 121 : 507—513, 1984
 - 21) Suzuki Y, Kamikawa T: Effects of L-carnitine on tissue levels of acyl carnitine, acyl-Co A and high energy phosphate in ischemic dog hearts. *Jpn Circ J* 45 : 687—694, 1981
 - 22) 永野 充, 高橋 薫: 心筋虚血の生化学的变化, 呼吸と循環 36 : 145—150, 1988
 - 23) Prinzen FW: Accumulation of nonesterified fatty acids in ischemic canine myocardium. *Am J Physiol* 247 : H264—272, 1984
 - 24) Weishaar R, Ashikawa K, Bing RJ: Effect of diltiazem, a calcium antagonist, on myocardial ischemia. *Am J Cardiol* 43 : 1137—1143, 1979

Investigation of Hepatic Energy Metabolism in Normothermic Hepatic Ischemia —The Effect of Calmodulin Antagonist on Normal and Cirrhotic Rat Liver—

Minoru Izu, Toshiyuki Sumita, Hajime Shiga, Yoshimichi Omori, Takeshi Nagao,
Hideaki Saitou, Nobuhiro Kawano and Yasuhiko Morioka
First Department of Surgery, University of Tokyo

We investigated whether the calmodulin antagonist, elziverine was effective in improving the survival rate after hepatic ischemia in normal and cirrhotic rats. We measured ATP in hepatocytes by HPLC and ^{31}P -NMR to observe the effect of elziverine on the hepatic energy status during ischemia. ATP in hepatocytes of the elziverine-treated group disappeared more rapidly after hepatic ischemia than in those of the untreated group. Therefore, the potential of the hepatocytes was maintained, and the survival rate for normal and cirrhotic rats after hepatic ischemia was improved. Lactic acid in hepatic tissue increased before hepatic ischemia in the elziverine treated group, and elziverine inhibited elevation of phosphomonoester in hepatocytes during ischemia. It is possibly that elziverine promoted the system of glycolysis during hepatic ischemia. Elziverine was effective in improving the survival rate after hepatic ischemia, through promoting glycolysis and resolution of ATP in hepatocytes after hepatic ischemia.

Reprint requests: Minoru Izu First Department of Surgery, University of Tokyo
7-3-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo, 113 JAPAN