

肝虚血再灌流時の高エネルギーリン酸化合物の 動態と ulinastatin および CV4151の影響

名古屋大学第2外科

黒川 剛 原田 明生 錦見 満 黒江幸四郎
岸本 若彦 野浪 敏明 中尾 昭公 高木 弘

肝虚血再灌流時における高エネルギーリン酸化合物の代謝動態と、これに対する薬剤の影響をラットを各群5匹ずつ用い実験的に検討した。この結果30分虚血群と15分虚血群の比較では、30分再灌流後の肝ATPレベルはそれぞれ、 2.58 ± 0.23 , $1.93 \pm 0.20 \mu\text{mol/g}$ と30分虚血群で低値であった。ヌクレオチドの終末代謝産物である肝組織中 hypoxanthine, xanthine の増加は、30分虚血後でも微量であった。したがってヌクレオチドの分解は軽微であり、細胞保護作用を有する薬剤により、再灌流後にエネルギーレベルの回復が望めるものと考えられた。Thromboxane A₂合成酵素阻害 (CV4151) および ulinastatin は30分再灌流時における肝ATPレベルをそれぞれ 2.81 ± 0.13 , $2.60 \pm 0.37 \mu\text{mol/g}$ と改善した。この機序として、前者は肝微小循環の改善、後者は cytotoxic factor の消去作用が考えられた。

Key words: liver ischemia and reperfusion, energy metabolism, thromboxane A₂ synthetase inhibitor, ulinastatin

はじめに

肝切除術後の肝不全は有効な治療法が少なく、予後不良な症例も多い。したがって肝不全の発生を予防する目的で、肝切除症例の手術手技、術前後管理にさまざまな工夫がなされている。われわれの施設においても、肝切除術後の全身および肝循環管理を中心に数種類の薬剤の効果を臨床および基礎的に検討してきた^{1)~3)}。

一方、肝切除に際して出血量の減少を目的としてしばしば行われる、肝門部血行遮断の操作は虚血性の肝細胞障害を引き起し、遮断時間によっては術後肝不全につながる要因のひとつであると考えられる。本研究では虚血肝の病態の一部を明らかにする目的で、ラット肝虚血再灌流モデルを用い、虚血時間の差による肝組織高エネルギーリン酸化合物の代謝動態を検討した。また薬剤の効果として、一般的に虚血臓器の循環改善作用あるいは細胞保護作用を有するとされ、臨床例において投与が可能な2剤、すなわち thromboxane A₂合成阻害剤 (CV4151) および多価酵素阻害剤

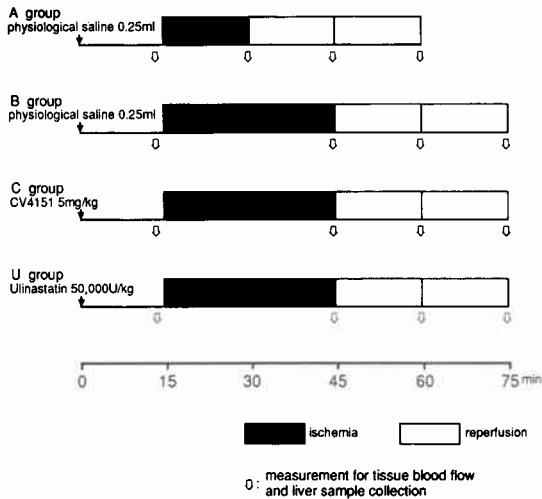
(ulinastatin: Miraclid[®]) の虚血肝保護効果についても検討した。

実験方法

250gのWistar系雄性ラットを用い、まず、肝虚血時間の差による高エネルギーリン酸化合物の代謝動態を検討するために、15分肝虚血群であるA群および30分肝虚血群であるB群を作成した。次に、虚血肝障害に対する薬剤の効果を検討する目的で、thromboxane A₂合成阻害剤であるCV4151を前投与した群(C群)、および多価酵素阻害剤であるulinastatinを前投与した群(U群)を作成した。肝虚血時間が長く、障害がより強いと考えられる30分虚血モデルにおける効果を検討するために、薬剤投与2群の肝虚血時間は30分とした。

各群ともに20匹を用い Pentobarbital sodium (50 mg/kg, 腹腔内投与) による麻醉下に、A群、B群では0.25mlの生理食塩水を陰茎背静脈より静注した。C群ではCV4151を5mg/kg (0.25ml/匹に調整)、U群ではulinastatinを50,000U/kg (0.25ml/匹に調整)を静注した。なお、両薬剤の投与量は過去の報告を参考に決定した⁴⁾⁵⁾。麻醉開始後15分後の時点で開腹し、Has-selgrenらの方法⁶⁾にしたがって、肝左葉および中間葉

Fig. 1 Diagram of the experimental procedures.



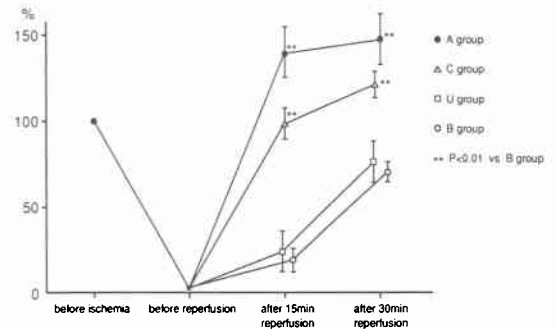
のみの全肝の約70%への血行を前記の虚血時間にしたがい遮断した。その後遮断を解除し、解除後30分まで実験を行った(Fig. 1)。虚血操作前、遮断解除直前、15分間および30分間の再灌流後の各段階で5匹ずつ開腹、まず水素ガスクリアランス法(model RBF-2 biomedical science)により肝組織血流量を測定し、つづいて肝組織を採取した。採取した肝組織は既報のとおり⁷⁾液体窒素にて freezclamp し、過塩素酸を加えて homogenize し除蛋白した。KOHにてpHを7とし、測定に供した。高エネルギーリン酸化合物の全体の動態を検討する目的で、これらの大部分をしめるアデニンヌクレオチド(adenosine triphosphate: ATP, adenosine diphosphate: ADP, adenosine monophosphate: AMP)とグアニンヌクレオチド(guanosine triphosphate(GTP), guanosine diphosphate(GDP), guanosine monophosphate (GMP))さらにA群、B群ではこれらの代謝産物である hypoxanthine, xanthine を高速液体クロマトグラフィーを用いて測定した。

統計学的解析は unpaired Student-t test を用い $p < 0.05$ を有意とした。

結果

肝組織血流量: 肝組織血流量の変動を遮断前を100%とした場合の変化率で示した。15分虚血群であるA群では15分再灌流の時点ですでに肝組織血流は前値を上回る回復を示した。一方、30分虚血群であるB群では15分再灌流時、 $20.4 \pm 5.6\%$ 、30分再灌流時、

Fig. 2 Changes in tissue blood flow of the liver in each group. Data were standardized for each group so that pre-occlusion values were considered 100%.



$70.4 \pm 6.0\%$ とA群に比較して肝組織血流量は有意に($p < 0.01$)低値であった。

薬剤の効果ではCV4151投与群であるC群で、15分再灌流時、 $98.0 \pm 9.3\%$ 、30分再灌流時、 $118.5 \pm 8.0\%$ とB群に比較して肝組織血流は有意に($p < 0.01$)高値であった。しかし ulinastatin 投与群であるU群とB群の間には肝組織血流量の変動に差を認めなかった(Fig. 2)。

肝組織アデニンヌクレオチドの変動: 15分虚血群であるA群では30分虚血群であるB群に比較して再灌流後の肝組織アデニンヌクレオチドのレベルは高値をとり、30分再灌流後ATPはA群 2.58 ± 0.23 、B群 $1.93 \pm 0.20 \mu\text{mol/g}$ であった。薬剤投与群のC群、U群では再灌流後の肝組織アデニンヌクレオチドのレベルは、30分再灌流後のATPがそれぞれ 2.81 ± 0.13 、 $2.60 \pm 0.37 \mu\text{mol/g}$ とともにB群に比較して有意に($p < 0.01$)高値であった。ATP、ADP、AMPの総和である、総アデニンヌクレオチド(total adenine nucleotide: TAN)の変動についてもATPと同様の傾向であった(Table 1)。

肝組織グアニンヌクレオチドの変動: 肝組織中の総グアニンヌクレオチド(total guanine nucleotide: TGN)は虚血操作前で $1.19 \pm 0.31 \mu\text{mol/g}$ と総アデニンヌクレオチド $4.44 \pm 0.30 \mu\text{mol/g}$ の約3分の1であった。虚血再灌流時の4群間の比較ではアデニンヌクレオチドと同様であり、本実験で使用した2剤ともグアニンヌクレオチドに対しても有効であった(Table 2)。

肝組織 hypoxanthine および xanthine の変動: アデニンヌクレオチド、グアニンヌクレオチドの代謝産

Table 1 Changes in adenine nucleotide levels in the liver tissue in each group

	μ mol/g (wet liver)	
	ATP	TAN
A group		
before ischemia	2.88 \pm 0.22	4.44 \pm 0.30
before reperfusion	0.54 \pm 0.17	2.82 \pm 0.18
after 15 min reperfusion	1.96 \pm 0.30	2.98 \pm 0.21
after 30 min reperfusion	2.58 \pm 0.23	3.86 \pm 0.28
B group		
before ischemia	2.88 \pm 0.22	4.42 \pm 0.36
before reperfusion	0.14 \pm 0.05	1.50 \pm 0.12
after 15 min reperfusion	1.18 \pm 0.25	2.08 \pm 0.19
after 30 min reperfusion	1.93 \pm 0.20	2.82 \pm 0.28
C group		
before ischemia	2.95 \pm 0.15	4.83 \pm 0.33
before reperfusion	0.18 \pm 0.08	1.60 \pm 0.16
after 15 min reperfusion	2.41 \pm 0.32**	3.18 \pm 0.33**
after 30 min reperfusion	2.81 \pm 0.13**	3.72 \pm 0.41**
U group		
before ischemia	2.85 \pm 0.28	4.62 \pm 0.39
before reperfusion	0.17 \pm 0.08	1.60 \pm 0.19
after 15 min reperfusion	1.48 \pm 0.10*	2.95 \pm 0.22**
after 30 min reperfusion	2.60 \pm 0.37**	3.69 \pm 0.37**

mean \pm SD n=5

* : p<0.05 ** : p<0.01 vs B group

ATP : adenosine triphosphate

TAN : total adenine nucleotide

物である肝組織 hypoxanthine, xanthine 濃度は15分間, 30分間虚血中漸増した。しかし, 30分間の虚血後であっても hypoxanthine が $0.05\mu\text{mol/g}$, xanthine が $0.37\mu\text{mol/g}$ とアデニンヌクレオチド, グアニンヌクレオチドの総量の減少に比較して増加の程度はわずかであった (Table 3)。

考 察

肝の虚血性障害は外科領域では肝切離の際の出血のコントロールを目的とした肝門部血行遮断, あるいは肝移植時のドナー肝などにみられる。またこれ以外にも術後の全身循環の悪化にともなう肝循環障害などの際に発生し, それぞれに肝障害を軽減する努力が行われている。

また虚血性肝障害の成因および対策について実験的に検討した報告も多くみられる。肝の虚血性障害の発生の最大の因子は酸素の供給障害であることはいうまでもなく⁹⁾, われわれも肝虚血障害時に血行動態, 酸素需給動態を改善することの意義を強調してきた¹⁰⁾¹¹⁾。今回検討した高エネルギーリン酸化化合物は, 細胞内の

Table 2 Changes in guanine nucleotide levels in the liver tissue in each group

	μ mol/g (wet liver)	
	GTP	TGN
A group		
before ischemia	0.77 \pm 0.14	1.19 \pm 0.31
before reperfusion	0.12 \pm 0.02	0.44 \pm 0.06
after 15 min reperfusion	0.41 \pm 0.06	0.80 \pm 0.11
after 30 min reperfusion	0.42 \pm 0.06	1.00 \pm 0.25
B group		
before ischemia	0.77 \pm 0.10	1.18 \pm 0.30
before reperfusion	0.11 \pm 0.07	0.41 \pm 0.05
after 15 min reperfusion	0.19 \pm 0.06	0.44 \pm 0.11
after 30 min reperfusion	0.32 \pm 0.02	0.62 \pm 0.18
C group		
before ischemia	0.67 \pm 0.08	1.18 \pm 0.40
before reperfusion	0.07 \pm 0.04	0.36 \pm 0.04
after 15 min reperfusion	0.36 \pm 0.05**	0.63 \pm 0.10*
after 30 min reperfusion	0.57 \pm 0.04**	1.04 \pm 0.22*
U group		
before ischemia	0.72 \pm 0.14	1.19 \pm 0.32
before reperfusion	0.07 \pm 0.02	0.39 \pm 0.07
after 15 min reperfusion	0.32 \pm 0.03**	0.62 \pm 0.11*
after 30 min reperfusion	0.54 \pm 0.06**	0.97 \pm 0.23

mean \pm SD n=5

* : p<0.05 ** : p<0.01 vs B group

GTP : guanosine triphosphate

TGN : total guanine nucleotide

Table 3 Increases of hypoxanthine and xanthine levels in the liver after 15 and 30 minutes ischemia

	μ mol/g (wet liver)	
	Hypoxanthine	Xanthine
before ischemia	0.13 \pm 0.01	0.03 \pm 0.01
15min ischemia	0.15 \pm 0.02	0.21 \pm 0.02
30min ischemia	0.18 \pm 0.01	0.40 \pm 0.02

膨大な化学反応に対してエネルギーを供給している重要な生体内化合物である。組織の hypoxia に伴ってこの組織内レベルが低下することが細胞障害の発生の大きな要因とされ¹²⁾, したがって肝細胞の viability の有力な指標となる¹³⁾。このなかでも最も重要な, ATP の産生はその大部分をミトコンドリアの酸化的リン酸化に依存しておりミトコンドリアへの速やかな酸素供給の改善が肝細胞の viability を早期に回復する手段となる。

また, 細胞のエネルギーレベルを保持する上で他の重要な因子はヌクレオチドの総量を維持することであ

る。虚血時間が延長するとヌクレオチドの分解が進行する上に¹⁴⁾、膜透過性の亢進のためヌクレオチドの細胞外への流出がおこり、これらが再灌流時のエネルギーレベルの回復を遅延させる¹⁵⁾。これらの点に注目してわれわれの実験結果について考察する。なお、本実験では、肝虚血の作成には70%部分肝虚血のモデルを用いた。この方法は簡便で、門脈系のうっ血を起こさず、全身の循環動態を著しく変化させることのない有用な方法である¹⁶⁾。したがって虚血肝の代謝をより純粋な状態で検討でき、肝虚血実験に広く用いられている。

まず15分間および30分間という虚血時間の差による検討では、15分の差であっても再灌流後の肝組織中の高エネルギーリン酸化合物の回復には明らかな差を認めた。ミトコンドリアは60分間の肝虚血を行っても再灌流後早期に機能が回復される¹³⁾。一方、本実験から30分程度の虚血ではヌクレオチドの分解は軽度であり、30分虚血モデルにおけるエネルギーレベルの回復障害は、肝組織血流すなわち細胞に対する酸素供給の回復の遅延が原因のひとつであると考えられる。実際に両群で肝組織血流量の変動を比較すると著明な差が認められた。さらに最近、肝臓においても虚血再灌流に関わる障害因子として注目されている、活性酸素などの cytotoxic factor の産生も虚血時間の延長にともなって亢進し¹⁵⁾、エネルギーレベルの回復障害にこれらの因子が関与している可能性がある。

本実験では thromboxane A₂ 合成酵素阻害剤 (CV4151) および多価酵素阻害剤 (ulinastatin) が、肝エネルギーレベルの回復が遅延する30分虚血モデルに対して有効であるかを検討した。Thromboxane A₂ はアラキドン酸カスケード系の代謝産物で、きわめて強力な血小板凝集作用を有する。本実験で使用した CV4151 は従来の薬剤に比較して血中減期が長く、特異的な thromboxane A₂ 合成阻害剤である⁴⁾。本薬剤の前投与により再灌流後の肝微小循環は著しく改善された。篠原ら¹⁷⁾ は肝流入血行遮断の際には肝内門脈枝あるいは類洞内に微小血栓が形成されるとしており、これが再灌流後の微小循環を障害すると考えられる。したがって、本剤の効果にはこの血栓形成の抑制が関与しているものと推定された。

一方、ulinastatin の投与も肝組織高エネルギーリン酸化合物の代謝に対して有効であり、30分間の虚血であっても ATP、TAN とともに15分間の虚血群に近い回復が得られた。この点については唐仁らも^{31P-NMR}

spectrometry を用いて肝細胞の ATP レベルにおいて同様の結果を報告している⁵⁾。一方、山本らは雑種成犬を用いて脱血モデルを作成し、ulinastatin 投与が肝血流の維持に対して有効であったとしている¹⁸⁾。しかし、われわれの肝組織血流の結果からは ulinastatin 投与群と非投与群で有意な差がなく、肝循環に対する ulinastatin の効果は証明されなかった。したがって本剤の効果には血流以外の因子が考えられる。文献的には ulinastatin は endotoxin、活性酸素、細胞障害性のサイトカインなどからの細胞保護効果を有するとされており^{19)~21)}、これらの機序が関与している可能性があるが、本実験の結果からは詳細は不明である。

今後、さらに肝臓外科手術が積極的に行われ、術中術後の肝細胞保護に関わる問題はさらに重要性を増すものと考えられる。したがって、肝虚血再灌流障害に対する一層の基礎的な研究が望まれる。また本研究に使用した薬剤は、他の領域で臨床レベルの投与が実際に行われており、肝保護作用についても臨床的に検討されるべきであると考えられた。

文 献

- 1) 原田明生：肝切除後の全身血行動態に関する臨床的研究—特に硬変肝併存症例について—。日外会誌 86：62—72, 1985
- 2) 野浪敏明：肝切除後の全身血行動態および酸素需給動態に関する研究—術後管理における hyperdynamic state の意義について—。日外会誌 86：148—159, 1985
- 3) 朝日憲治, 野浪敏明：肝切除後における肝循環動態および肝酸素需給動態に関する実験的研究。日外会誌 90：228—242, 1989
- 4) Shibouta Y, Teranishi Z, Inada Y et al: Delay of the initiations of hypertension in spontaneously hypertensive rats by CV4151, a specific thromboxane A₂ synthetase inhibitor. Eur J Pharmacol 129：134—144, 1985
- 5) 唐仁原全, 洲之上昌平, 金網友木子ほか：ラット温阻血肝における細胞内高エネルギーリン酸代謝。磁気共鳴と医 1：40—43, 1990
- 6) Hasselgren PO, Hellman A, Jennische E et al: Failure of an increased dose of ATP-MgCl₂ to improve protein synthesis and transmembrane potential in the posts ischemic liver. J Surg Res 37：409—414, 1984
- 7) 黒川 剛, 野浪敏明, 黒江幸四郎ほか：肝切除後の残存肝ヌクレオチド代謝に関する実験的検討—特に硬変肝における病態について—。日外会誌 91：994—1000, 1990
- 8) Kurokawa T, Nonami T, Harada A et al:

- Effect of prostaglandin E₁ on ischemia-induced liver mitochondrial dysfunction in rats with cirrhosis. *Scand J Gastroenterol* 26 : 269-274, 1991
- 9) Farber JL, Young EE: Accelerated phospholipid degradation in anoxic rat hepatocyte. *Arch Biochem Biophys* 211 : 312-320, 1981
- 10) 星野澄人, 野浪敏明: 急性門脈遮断時および解除後の全身血行動態と酸素需給動態に関する実験的研究. *日外会誌* 86 : 738-751, 1985
- 11) Kurokawa T, Nonami T, Kuroe K, et al: Effect of hyperbaric oxygen therapy on ischemic liver injury. *J Hyperbaric Med* 4 : 197-204, 1990
- 12) Marubayashi S, Takenaka M, Dohi K et al: Adeninenucleotide metabolism during hepatic ischemia and subsequent blood reflow periods and its relation to organ viability. *Transplantation* 30 : 294-296, 1980
- 13) Kobayashi H, Nonami T, Kurokawa T et al: Effects of preceding ischemic time on the recovery course of energy metabolism in rat liver. *Biochem Int* 22 : 227-233, 1990
- 14) 黒川 剛, 野浪敏明, 小林裕幸ほか: 硬変肝における虚血障害時のエネルギー代謝異常とその対策. *Shock* 5 : 51-54, 1990
- 15) Kobayashi H, Nonami T, Kurokawa T et al: Mechanism and prevention of ischemia-reperfusion-induced liver injury in rats. *J Surg Res* 51 : 240-244, 1991
- 16) Fornander J, Hellman A, Hasselgren PO: Effect of methylprednisolone on protein synthesis and blood flow in the postischemic liver. *Circ Shock* 12 : 287-290, 1984
- 17) 篠原正彦, 中尾昭公: 肝阻血の血液凝固線溶系に及ぼす影響に関する実験的研究. *日外会誌* 86 : 544-554, 1985
- 18) 山本保博, 小関一英, 安田和宏ほか: 実験的出血性ショックにおけるウリナスタチンの門脈, 肝動脈血流量に対する影響. *最新医* 42 : 2190-2196, 1987
- 19) 遠藤重厚, 井上義博, 山田裕彦ほか: ウリナスタチンによるサイトカイン産生の抑制-敗血症性ショックに対する予防効果の基礎的検討-. *救急医* 14 : 341-342, 1990
- 20) 池田正規, 柴 忠明, 林 明照ほか: エンドトキシンショックにおけるヒト尿中トリプシン阻害物質投与の主要臓器に及ぼす効果. *薬理と治療* 14 : 4679-4685, 1986
- 21) 吉川敏一, 村上正志, 瀬戸 治ほか: 蛋白分解酵素阻害剤ウリナスタチンのエンドトキシンショック防御効果と酸素ラジカル消去作用. *麻酔* 37 : 969-974, 1988

Changes in Tissue Levels of High Energy Phosphate in Ischemia-reperfusion Injury to Liver and Influences of Ulinastatin and CV4151 on Energy Metabolism of the Liver

Tsuyoshi Kurokawa, Akio Harada, Mitsuru Nishikimi, Koushiro Kuroe, Wakahiko Kishimoto, Toshiaki Nonami, Akimasa Nakao and Hiroshi Takagi
Department of Surgery II, Nagoya University School of Medicine

Dynamic changes in adenine and guanine nucleotide levels of rat liver during ischemia and reperfusion were investigated. The effects of thromboxane A₂ synthetase inhibitor (CV4151) and protease inhibitor (Ulinastatin) on the recovery of the liver energy status were also studied. Recovery of adenine nucleotide levels after 30-min reperfusion was markedly disturbed in the 30-min ischemia group compared with the 15-min ischemia group. Changes in guanine nucleotide levels were similar to those in adenine nucleotide levels. Increases in catabolites of the nucleotides, i.e. hypoxanthine and xanthine, were not marked even after 30-min ischemia. Recovery of liver tissue blood flow was more disturbed in the 30-min ischemia group than in the 15-min ischemia group. CV4151 improved the recovery of liver tissue blood flow and liver energy level after reperfusion. Ulinastatin also improved the liver energy level, though it did not increase the blood flow. Ulinastatin has protective effects against free radicals, endotoxin and other of cytotoxic agents the effects of this drug might be associated with its cytoprotective properties.

Reprint requests: Tsuyoshi Kurokawa Department of Surgery II, Nagoya University School of Medicine
65 Tsurumaicho, Showa-ku, Nagoya, 466 JAPAN