

原 著

阻血加肝切除後の残肝障害に対するカルシウム拮抗剤の効果

大阪医科大学一般・消化器外科

原 均 磯崎 博司 岡島 邦雄

阻血を加えた肝切除後の残肝細胞質内カルシウム濃度の変動と肝細胞障害の関係をしらべる目的で、X線マイクロアナライザー法により肝細胞質内カルシウム濃度を測定した。また、カルシウム拮抗剤の投与効果につき検討した。Wistar系雄ratを用い、肝の右葉と尾状葉への血流を60分間遮断後、左葉を切除する方法で行った。カルシウム拮抗剤投与は阻血直前に門脈よりone shotで行った。拮抗剤投与群は非投与群にくらべ7日生存率は差がなかったが、術後早期死亡例は減少した。肝細胞質内カルシウム濃度は、阻血中より軽度上昇し、再灌流時に著明に上昇するが以後減少した。血清glutamic-oxalocacetic transaminase (GOT)値は阻血解除後2時間まで上昇した。投与群は肝細胞質内カルシウム濃度および血清GOT値の上昇が有意に抑制された。カルシウム拮抗剤投与は残肝細胞質内のカルシウム濃度の上昇を抑制することにより、肝細胞障害を軽減し、術直後の早期死亡例の減少に寄与したものと考えられた。

Key words: effect of calcium antagonist, Ca concentration within the cytoplasm of hepatocyte, X-ray microanalyzer, reperfusion injury

はじめに

肝切除時の出血を制御する方法として、肝門部での血流遮断下(Pringle法¹⁾)に肝切除が行われている。しかし、肝阻血の加わった肝切除後残肝の肝細胞障害については不明な点が多い。さらに、近年、肝障害の一因として阻血再灌流障害がとりあげられ、その原因として、細胞質内カルシウム濃度が大きく関与するといわれている^{2)~4)}。すなわち、細胞質内カルシウム濃度が上昇することにより、phospholipase A2の活性化やlysosome膜障害に伴う細胞内酵素の活性化が引き起こされ、肝細胞膜障害が生じるとされている。そこで、今回、阻血を加えた肝切除後の残肝細胞質内のカルシウム濃度をX線マイクロアナライザー法により測定し、さらに、肝障害の抑制を目的としてカルシウム拮抗剤(Verapamil hydrochloride)を投与し、その効果を検討したので報告する。

対象と方法

1. 実験動物

実験動物はWistar系雄rat(体重300g前後)を用いた。

2. 実験方法

阻血を加えた肝切除のモデルは、rat肝の右葉と尾状葉への血流を60分間遮断し、阻血解除と同時に非阻血葉の中葉と左葉を切除することにより作成した(Fig. 1)。また、阻血直前にカルシウム拮抗剤(Verapamil hydrochloride, 0.3mg/kg)を経門脈的に投与する群(以下、投与群)と投与しない群(以下、非投与群)に分け検討した。肝組織の採取は阻血前、阻血解除直前、阻血解除15分後、阻血解除2時間後に行い、以下の方法で投与群と非投与群の細胞質内カルシウム濃度を測定した。

3. 肝細胞質内カルシウム濃度の測定方法

採取した試料をただちに銅製のチップの先端におき液体窒素(沸点-196℃)中で冷却された銅製の板に押しあて瞬間的に凍結した。次に、-140℃に冷却したultra microtome(Reichert-Nissei社製)にて試料を100~200nmの厚さに薄切し、-100℃で凍結乾燥した。エネルギー分散型X線解析装置(Keve社製5100)を装着した電子顕微鏡(日立H-500)にて観察を行った(Fig. 2-a)。細胞質内カルシウム濃度(mmol/kg·wet weight)は肝細胞質内にスポットをあて測定した。

また、7日生存率および血清glutamic-oxaloacetic

Fig. 1 Method of hepatectomy with induction of ischemia. The right lobe and the caudate lobe are kept ischemic for 60 min, and simultaneously with release of the ischemia, the non-ischemic left and median lobe is resected

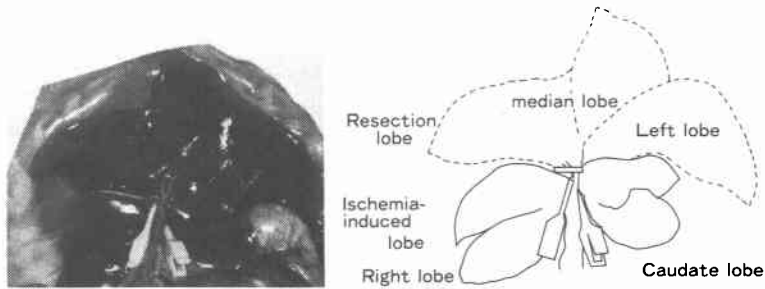
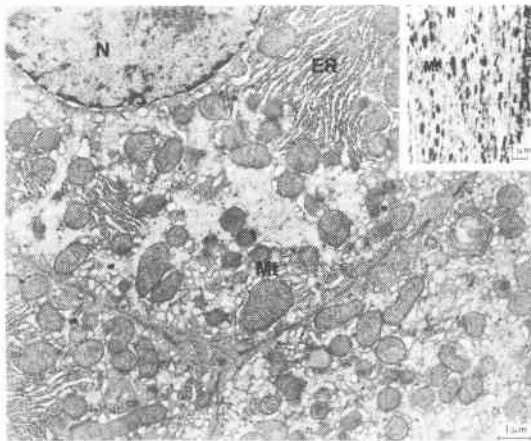


Fig. 2 Electron microscopy (control: before ischemia)

- (a) Unfixed, freshly frozen dried thin section ($\times 5,000$)
 (b) Glutaraldehyde-osmium-fixed, stained and embedded thin section ($\times 9,000$)
 (N: Nucleus, Mt - Mitochondria, ER: Endoplasmic reticulum)

(b) (a)



transaminase (GOT) 値の変動も検討した。有意差検定は χ^2 検定および generalized Wilcoxon 法により行い、危険率 $p < 0.05$ 以下をもって有意とした。

結 果

1) X線スペクトル

各元素の X 線スペクトルは、特性 X 線エネルギー状態にて決定されている。カルシウムのスペクトルは 3.69KeV である。非投与群の X 線スペクトルでは、阻血時と比較して阻血解除後にカルシウムのピークを認

めた (Fig. 3)。投与群では、明らかなカルシウムのピークは認められなかった (Fig. 4)。

2) 肝細胞質内カルシウム濃度の変動

X 線スペクトル法にて測定された阻血前のカルシウム濃度は $2.7 \pm 0.5 \text{ mmol/kg} \cdot \text{wet weight}$ であった。投与群の肝細胞質内のカルシウム濃度は、阻血解除直前 $2.7 \pm 0.7 \text{ mmol/kg} \cdot \text{wet weight}$ 、阻血解除 15 分後 $4.0 \pm 2.8 \text{ mmol/kg} \cdot \text{wet weight}$ 、阻血解除 2 時間後 $3.4 \pm 0.6 \text{ mmol/kg} \cdot \text{wet weight}$ であった。一方、非投与群の肝細胞質内のカルシウム濃度はそれぞれ、 $3.3 \pm 0.3 \text{ mmol/kg} \cdot \text{wet weight}$ 、 $8.2 \pm 1.5 \text{ mmol/kg} \cdot \text{wet weight}$ 、 $5.5 \pm 0.8 \text{ mmol/kg} \cdot \text{wet weight}$ であった (Fig. 5)。

3) 血清 GOT 値の変動

阻血前の血清 GOT 値は $120 \pm 20 \text{ IU/L}$ であった。非投与群では、阻血解除直前 $437 \pm 124 \text{ IU/L}$ 、阻血解除後 15 分 $1,922 \pm 673 \text{ IU/L}$ 、阻血解除後 2 時間 $4,272 \pm 780 \text{ IU/L}$ であった。一方、投与群の GOT 値は阻血解除直前 $341 \pm 91 \text{ IU/L}$ 、阻血解除 15 分後 $1,054.8 \pm 284 \text{ IU/L}$ 、阻血解除 2 時間後 $1,442 \pm 6.17 \text{ IU/L}$ であり、阻血を解除すると非投与群の血清 GOT 値は著明に上昇したが、投与群では血清 GOT 値の上昇が有意に抑制された (Fig. 6)。

4) 電顕像

阻血前の電顕像では、ミトコンドリア膜は明瞭で、クリステの消失および小胞体膜の不鮮明化は認めなかった (Fig. 2-b)。

非投与群における阻血解除直前の電顕像では、ミトコンドリアの膨化、膜の不鮮明化、クリステの消失、小胞体膜の不鮮明化を認めた (Fig. 7)。阻血を解除すると、ミトコンドリアおよび小胞体の障害はさらに悪

Fig. 3 X ray spectra of the cytoplasm of hepatocyte (control group)

Ca : calcium (3.69KeV)

Na : natrium, Mg : magnesium, P : phosphorus, S : sulfur, Cl : chlorine, K : kalium

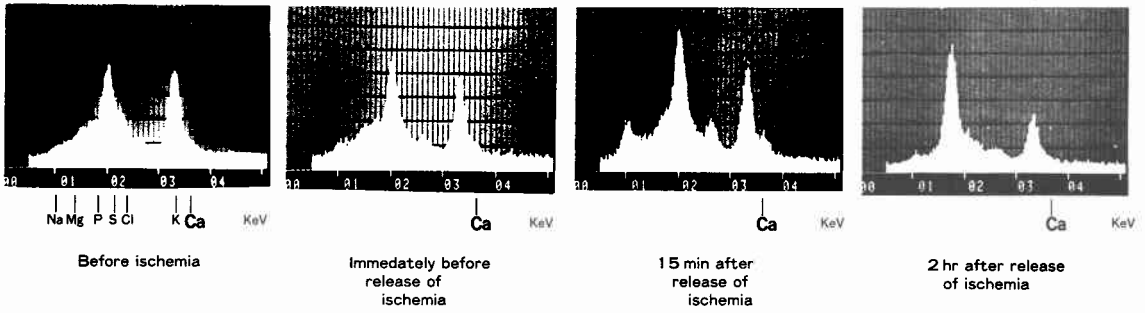


Fig. 4 X ray spectra of the cytoplasm of hepatocyte (Verapamil pretreatment group)

Ca : calcium (3.69KeV)

Na : natrium, Mg : magnesium, P : phosphorus, S : sulfur, Cl : chlorine, K : kalium

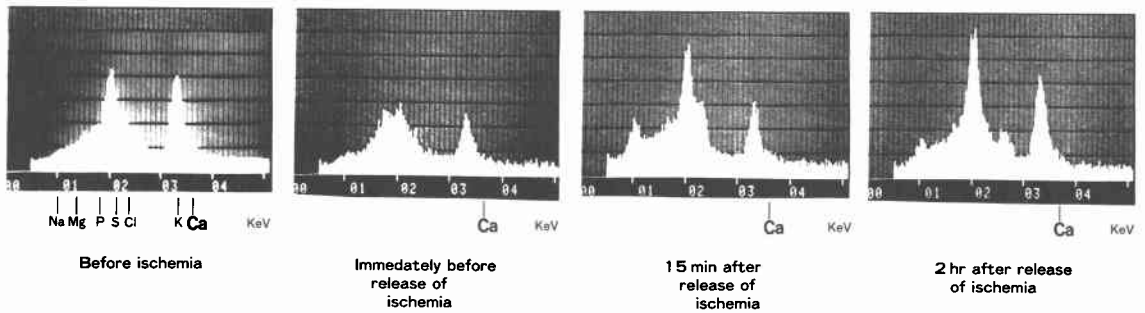


Fig. 5 Changes in Ca concentration within the cytoplasm of hepatocyte

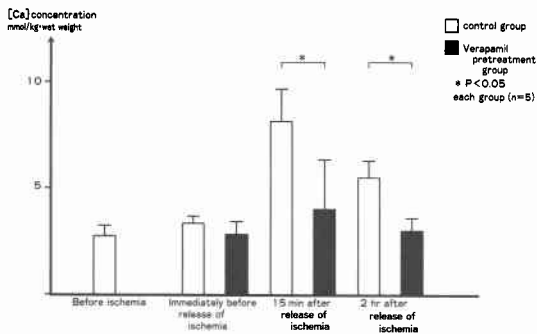
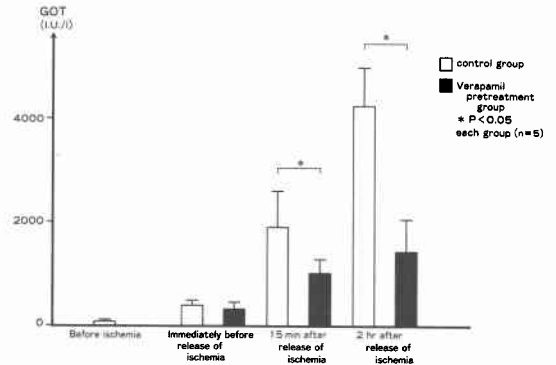


Fig. 6 Changes in serum GOT



化した(Fig. 8)。投与群ではミトコンドリアおよび小胞体膜の障害は比較的軽度であった。

5) 生存率

7日生存率は投与群40%、非投与群30%と差はなかった。しかし、投与群では非投与群に比べて術直後の早期死亡は有意に減少した (Fig. 9)。

考 察

1. 肝細胞質内カルシウム濃度の測定について
 虚血肝細胞における細胞障害は虚血後再灌流時に生じる肝細胞質内カルシウム濃度の上昇によりもたらされると考えられている²⁾³⁾。現在、行われている肝細胞内カルシウム濃度の測定方法には多くの方法がある。

Fig. 7 Electron microscopy ($\times 18,000$) (control group: before release of ischemia)

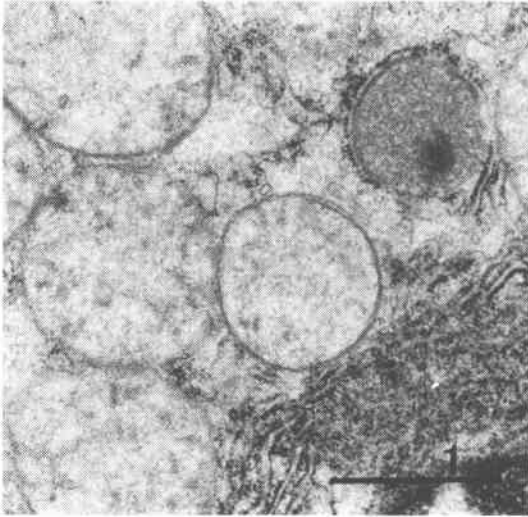
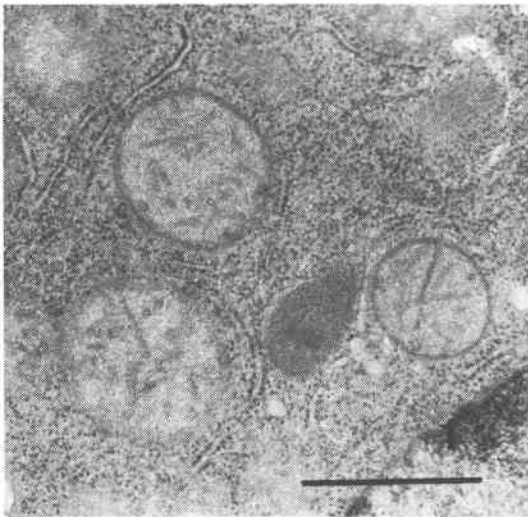


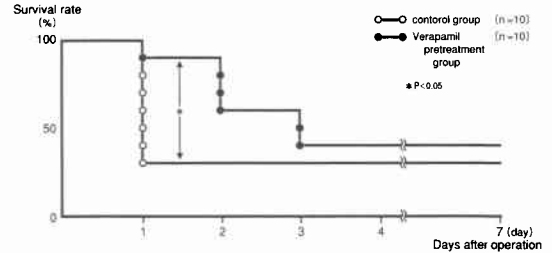
Fig. 8 Electron microscopy ($\times 18,000$) (control group: 15 min after release of ischemia)



すなわち、バイオアッセイ法、化学定量法（キレート滴定法、原子吸光法、炎光分析法）、トレーサー法、カルシウム電極法、細胞内カルシウム指示薬法（蛍光色素法、Quin2, fura-2, Indo-1, エクオリン法）、X線マイクロアナライザー法などであるが、各測定法にはそれぞれの問題点が残されている⁵⁾⁷⁾

最近、カルシウム細胞内指示薬法が、1982年、Teienら⁸⁾により開発され、よく使用されている。しか

Fig. 9 Survival rate after hepatectomy with induction of ischemia (Kaplan-Meier's method)



し、指示薬が容易に細胞内に取り込まれなかったり、細胞機能を変化させたりする問題点を残している⁹⁾。また、in vivoでの測定は困難である。

本研究で用いたX線マイクロアナライザー法は、電子顕微鏡を用いて生体組織内の微小部の観察を行いながら、同時に電子ビームを投射し、その結果生じるX線を分析してカルシウム濃度を測定する電子顕微鏡的な手法であり、これは細胞を破壊することなく測定できるという特徴を有している¹⁰⁾。また、この方法は細胞生物学的分野で分泌細胞の生理機能解析¹¹⁾を行う際の手法として発展したものであり、最近、心筋細胞への応用も報告されている¹²⁾¹³⁾。しかし、in vivoにて肝細胞質内カルシウム濃度を測定した報告はなく、本研究が最初であると思われる。

2. 肝細胞質内カルシウム濃度の変動と肝細胞障害について

心筋細胞においては、阻血中、心筋細胞内のカルシウム濃度は軽度上昇し、さらに、阻血解除後再灌流時に著明に上昇するという報告がみられる¹⁴⁾¹⁵⁾。しかし、肝細胞においては、阻血後再灌流時における肝細胞質内カルシウム濃度の変動についての報告はほとんどない。

Hochachka¹⁶⁾は、細胞虚血とカルシウムについて、次のように報告している。すなわち、細胞が虚血状態に陥ると、ミトコンドリアにおけるATPの産生が低下する。つづいて、Na-K ATPaseが低下し、膜の脱分極がおこり、カルシウムチャンネルが開き、カルシウムイオンが細胞内に流入する。細胞質内カルシウム濃度が上昇することにより、phospholipase A2の活性化やlysosome膜障害が引き起こされ、細胞膜障害がおこる。細胞膜障害が引き起こされている状態で、再灌流すると、細胞外カルシウムがさらに細胞質内に流入し、細胞障害を悪化させる報告している。

今回の阻血を加えた肝切除後の肝細胞質内カルシウムの変動の検索に際して、まず、肝阻血時にもわずか肝細胞質内カルシウムの上昇がみられた。阻血時の細胞質内カルシウム濃度の上昇機序としては、カルシウムの貯蔵器官である小胞体¹⁷⁾、あるいはミトコンドリアからの細胞質内への流入および流出機構の破綻²⁾と報告されている。本研究においても、阻血中の電顕像で、ミトコンドリアにおけるミトコンドリアの膨化、膜の不鮮明化、クリステの消失、小胞体の膨化および膜の不鮮明化などの障害が認められることより、阻血中の肝細胞質内カルシウム濃度の上昇は細胞内カルシウムの貯蔵器官に由来するものと考えられる。

つづいて再灌流時における肝細胞質内カルシウム濃度は著明に上昇したが、これは、阻血状態時に引き起こされた細胞膜障害のため、細胞外カルシウムが大量に細胞内に流入したためと考えられる。阻血解除後の電顕像では lysosome の出現がみられ、細胞膜障害をさらに悪化させ、血清 GOT 値の上昇をもたらしたものと考えられた。

カルシウム拮抗剤である Verapamil を投与すると、阻血時の細胞質内カルシウム濃度の上昇抑制はわずかで、Verapamil は、主として細胞膜を保護し、再灌流時のカルシウム細胞質内への異常カルシウム流入を防止することにより、肝細胞質内カルシウム濃度の上昇を抑制し、細胞膜障害を軽減した結果、血清の肝逸脱酵素の上昇が抑制されたものと考えられた。

3. カルシウム拮抗剤 (Verapamil hydrochloride) の投与方法と虚血障害の保護効果

肝阻血障害に対するカルシウム拮抗剤の肝保護効果についてはすでに報告されているが、その投与方法と効果については異なった報告がみられる。すなわち、カルシウム拮抗剤投与方法に①虚血開始前より虚血中および虚血解除後まで投与する方法、②術前に one shot で投与する方法、③虚血解除直前から投与する方法などである^{18)~21)}。

Russell ら¹⁸⁾は虚血前内頸静脈より one shot にて投与し、阻血葉は左葉のみで、虚血時間90分で投与群は非投与群に比べて術後肝機能障害は軽度であり組織学的にも障害は軽度であったと報告している。

本実験では、門脈から虚血開始前に one shot で投与する方法を用いた。しかし、カルシウム拮抗剤投与群は非投与群に比べて術後の虚血肝細胞障害は軽減しえたが生存率を改善するには至らなかった。

Shinohara ら¹⁹⁾は門脈より、虚血前30分間と虚血解

除後30分間、 $10\mu\text{g}/\text{kg min}$ でカルシウム拮抗剤を持続投与し、阻血時間が120分でカルシウム拮抗剤投与群の生存率は非投与群に比べて有意に良好であったと述べ、術前からの持続投与の有効性を報告している。また、吉見ら²⁰⁾は虚血前15分に $5\mu\text{g}/\text{kg}$ を静注し、さらに、虚血中および虚血解除後20分まで $0.2\mu\text{g}/\text{kg min}$ 点滴持続静注で行い、虚血時間60分で、カルシウム拮抗剤投与群は非投与群に比べ有意に生存率が良好であったと述べている。

本実験の投与量は、Russell ら¹⁸⁾の報告にしたがったものであるが、今後、さらに、肝細胞障害を減少させ、生存率を向上させるためには、血圧低下、心室性期収縮などの副作用²²⁾に注意しつつ、阻血解除直後より Verapamil の有効濃度を維持する持続投与も考慮する必要があると思われる。

なお、本論文の要旨は第28回日本肝臓学会総会(1992. 6. 東京)において発表した。

稿を終えるにあたり、御協力いただいた大阪医科大学第1生理中垣育子氏、兵庫医科大学第1生理佐々木貞雄助教授に謝意を表します。

文 献

- 1) Pringle JH: Notes on the arrest of hepatic hemorrhage due to trauma. *Ann Surg* 48: 541-549, 1908
- 2) 井上 徹, 田川邦夫: 虚血による細胞機構. *外科と代謝・栄* 25: 433-441, 1991
- 3) 加藤隆一: 細胞内カルシウムと肝障害. *トキシコロジーフォーラム* 11: 610-620, 1988
- 4) 神坂和明: 肝細胞障害とカルシウム. *代謝* 26: 1107-1112, 1989
- 5) 唐木英明: 細胞内カルシウムの測定法とその問題点. *Clin Calcium* 1: 122-123, 1991
- 6) 北澤俊雄, 小川靖男: 筋細胞内 Ca^{2+} 調節とミトコンドリアの Ca とりこみ. *総合臨* 34: 1407-1410, 1985
- 7) 岡田泰伸, 坂間章博, 老木成稔: 細胞内イオン濃度測定法 Ca 選択性微小電極法. *生体の科学* 39: 352-354, 1988
- 8) Tsien RY, Pozzan T, Rink TJ: Calcium homeostasis in intact lymphocyte: Cytoplasmic free calcium monitored with anew, intracellularly trapped fluorescent indicator. *J Cell Biol* 94: 325-334, 1982
- 9) 唐木英明: 蛍光カルシウム指示薬の実験基礎. *実験医* 7: 26-31, 1989
- 10) Gupta BL, Hall TA: Electron microprobe X-ray analysis of calcium. *Ann NY Acad Sci* 307: 28-51, 1978

- 11) 佐々木貞雄：新生理学体系5，分泌の生理学，菅野富夫，今井雄介編，X線マイクロアナライザーによる元素分析，医学書院，東京，1987，p243—252
- 12) Hagler HK, Lopez LE, Murphy ME et al: Quantitative X-ray microanalysis of mitochondrial calcification in damaged myocardium. *Lab Invest* 45: 241—247, 1981
- 13) Buja LM, Burton KP, Hagler HK et al: Quantitative X-ray microanalysis of the elemental composition of individual myocytes in hypoxic rabbit myocardium. *Circulation* 68: 872—882, 1983
- 14) 小池 龍：細胞内電解質環境の解析からみたカルシウム拮抗剤の効果—diltiazemの心筋保護効果，日胸外会誌 38: 358—369, 1990
- 15) Hirata M, Fukui H, Shimamoto N et al: Inhibition of myocardial calcium accumulation during ischemia and reperfusion by reserpine in isolated guinea pig heart. *Jpn J Pharmacol* 32: 573—576, 1982
- 16) Hochachka PW: Defense strategies against hypoxia and hypothermia. *Science* 231: 234—241, 1986
- 17) 渡辺純夫，宮崎招久，伴野昌厚ほか：肝細胞障害と細胞内カルシウム，肝・胆・膵 19: 185—189, 1989
- 18) Russell JN, Evangelos T, Mario U et al: The role of calcium ions and calcium channel entry blockers in experimental ischemia-reperfusion-induced liver injury. *Ann Surg* 213: 137—142, 1991
- 19) Shinohara M, Kayashima K, Konnomi K: Protective effect of verapami on ischemic-induced hepatic damage in the rat. *Eur Surg Res* 22: 256—262, 1990
- 20) 吉見富洋，長島郁雄，石丸生寛ほか：肝臓の阻血障害に対するカルシウム拮抗剤の効果，医のあゆみ 137: 643—644, 1986
- 21) 和田隆昭：肝虚血障害に対するCa²⁺拮抗剤（塩酸ジルチアゼム）の防御効果からびに肝移植への応用に関する実験的研究，奈良医誌 40: 271—280, 1989
- 22) 河合忠一，小西興承，勝目 紘，他：塩酸ベラパミル（Ea-0103）静脈内投与に発作性上室性頻脈性不整脈に対する効果，臨と研 61: 231—237, 1982

Effect of Calcium Antagonists on the Liver Remaining after Hepatectomy Following Ischemia

Hitoshi Hara, Hiroshi Isozaki and Kunio Okajima
Department of Surgery, Osaka Medical College

To examine the relation between variations in the calcium level in the cytoplasm of liver remaining after hepatectomy following the application of ischemia and hepatocellular damage, we measured the calcium level in the cytoplasm of the liver with an X-ray microanalyzer. the effect of administration of a calcium antagonist was also examined. Using male Wistar rats we blocked the blood flow to the right lobe and caudate lobe of the liver for 60 min and then resected the left lobe in this experiment. The calcium antagonist was slowly administered in one shot through the portal vein before ischemia. There was no difference in the 7-day survival rate between animals given the antagonist and those not receiving it, but postoperative early deaths were decreased. The calcium level of the cytoplasm of liver, which had risen slightly during ischemia, was increased markedly during re-prefusion, but decreased thereafter. The serum GOT level was increased up to 2 hr after the release of ischemia. In the animals receiving the drug, the rise in the calcium level in the cytoplasm of liver and that in serum GOT were inhibited significantly. It was considered that administration of a calcium antagonist relieved hepatocellular damage by inhibiting the rise in the calcium level in the cytoplasm of the remaining liver and contributed to the decrease in postoperative early deaths.

Reprint requests: Hitoshi Hara Department of Surgery, Osaka Medical College
2-7 Daigaku-cho, Takatsuki City, 569 JAPAN