

単糖修飾 superoxide dismutase のラット肝移植 再灌流障害におよぼす効果について —肝組織 Na^+ , K^+ -ATPase 活性による評価—

長崎大学医学部第2外科, 同 救急部*

溝江 昭彦 近藤 敏 渡部 幸明
東 尚 藤岡ひかる 田中 公朗
元島 幸一 井沢 邦英* 兼松 隆之

Superoxide dismutase (SOD) 誘導体の mannosylated SOD は肝非実質細胞に, galactosylated SOD は肝実質細胞に取り込まれ, 肝由来の活性酸素の効果的な消去を期待しうる。そこで, ラット肝移植実験でこれらの単糖類で修飾した SOD を使用し再灌流障害に対する効果を検討した。

通常の SOD と修飾型 SOD を肝移植再灌流直前に投与し再灌流30分後に犠牲死させ, 血液および肝組織を採取して血液一般肝機能, 肝組織 Na^+ , K^+ -ATPase 活性, 組織過酸化脂質 (LPO), 組織 SOD 活性を測定した。

移植再灌流によって血中逸脱酵素の上昇と肝組織 Na^+ , K^+ -ATPase 活性の有意の低下, LPO の増加と SOD 活性の低下を認めた。これらの障害は通常の SOD では抑制されず, 単糖類で修飾した SOD, ことに galactosylated SOD により Na^+ , K^+ -ATPase 活性低下は抑制され, 組織 LPO, SOD 活性の改善が認められ, 再灌流時に発生する組織障害の防止に有効と考えられた。

Key words: orthotopic liver transplantation, reperfusion injury, Na^+ , K^+ -ATPase activity, SOD derivatives modified with monosaccharides

I はじめに

肝移植再灌流時の肝障害の一因として, 活性酸素や free radical による組織障害の関与が考えられている^{1)~3)}。虚血再灌流にともなう superoxide の発生とその組織障害を防止する目的で, これまで superoxide dismutase (以下, SOD と略記) の使用が検討されている^{4)~7)}が, 通常の SOD は肝に取り込まれにくいいため, その効果は不十分と考えられる。通常の recombinant SOD に比べ, 単糖類の mannose で修飾した SOD 誘導体の mannosylated SOD は肝非実質細胞に, galactose で修飾した SOD 誘導体の galactosylated SOD は肝実質細胞に取り込まれる特性のあることが正常肝組織を用いた基礎実験で示されており⁸⁾, これらを使用することにより, 肝で発生した活性酸素の効果的な消去を期待しうる。

そこで, ラット肝移植実験において, 通常の SOD および単糖類を付加した修飾型 SOD を移植再灌流時に投与し, 移植肝の組織障害防止効果について検討した。その効果判定の指標として, 肝細胞膜機能の判定に有用である肝組織 Na^+ , K^+ -ATPase 活性の測定⁹⁾¹⁰⁾を用いた。

II 対象と方法

(1) 実験動物: 体重250~300g の雄性 Lewis ラットを使用した。

(2) 手術方法: ラットをエーテル吸入麻酔下に開腹し, Kamada らの方法に準じて^{11)~13)}cuff を用いた同所性全肝移植を施行した。

Donor から摘出した肝 graft は冷却生食水中に浸漬した。Recipient の手術において, 肝上部下大静脈は2点支持による連続縫合にて吻合し, 門脈および肝下部下大静脈の吻合には cuff technique を用い, 肝動脈の再建は行わず, 胆管は stent の挿入により吻合した。

(3) 群別: 全肝摘出後1時間冷却生食水中に浸漬保

<1995年3月8日受理>別刷請求先: 溝江 昭彦
〒852 長崎市坂本1-7-1 長崎大学医学部第2外科

存したものを対照群とした。

SOD を投与せずに肝移植を施行したものを未投与群とし、門脈再灌流直前に頸静脈より、通常の SOD 1 万単位/kg 体重を生食水で溶解し、1ml にして one shot 静注投与したものを S 群、同様に mannosylated SOD, galactosylated SOD を投与したものを M 群、G 群として、グループ分けを行った (各群 n=6)。上記の各種 SOD は、京都大学薬学部橋田 充教授より提供していただいた。

対照群は肝摘出時に動脈血を採取し、1時間保存後に肝組織を採取した。移植群は門脈遮断を解除し再灌流してから30分後に犠牲死させ、おのおの肝組織と動脈血を採取した。肝組織は門脈より冷却したヘパリン生食水で wash out し脱血して、全肝を摘出し採取した。採取した肝組織は液体窒素中で迅速に凍結し、次の生化学分析に供した。

(4) 検討項目：各標本につき血液一般肝機能検査、肝組織 Na^+ , K^+ -ATPase 活性、肝組織過酸化脂質 (lipid peroxide: 以下、LPO と略記)、肝組織 SOD 活性を測定し、各群間で比較検討した。

肝組織 Na^+ , K^+ -ATPase 活性は既報¹⁰⁾のように Boyer ら⁹⁾の方法にて測定した。すなわち、採取した肝組織の一部に冷却した buffer を添加して polytron homogenizer にて homogenate にし、ATP を基質として 37°C 15 分間 incubate した後、遊離した無機リンを定量した。さらに Lowry ら¹⁴⁾の方法にて測定した蛋白量で割って単位蛋白当たりの無機リンの量として算出した ($\mu\text{mol Pi}/\text{mg protein}/\text{hr}$)。なお Na^+ , K^+ -ATPase は ouabain sensitive ATPase として判定した。

肝組織 LPO は真杉ら¹⁵⁾の方法で、チオバルビツール酸を用いて malondialdehyde (以下、MDA と略記) の量を測定し、同様に単位蛋白量の値で算出した ($\text{nmol MDA}/\text{mg protein}$)。また、肝組織 SOD 活性は nitroblue tetrazolium 還元法にて測定し、50 倍肝組織 homogenate 液における阻害率として算出した (阻害率%)。

得られたデータは平均値±標準偏差で表し、各群間の統計学的有意差検定は Student's t-test で行い、危険率 5% 以下を有意差ありとした。なお、本実験は長崎大学における動物実験指針に即して長崎大学医学部附属動物実験施設で行った。

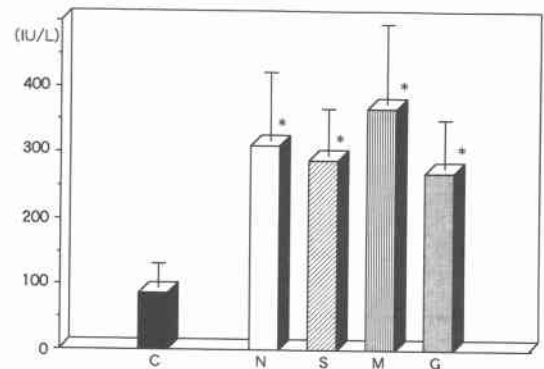
III 結 果

① 犠牲死時に採取した動脈血の血清 GOT、および

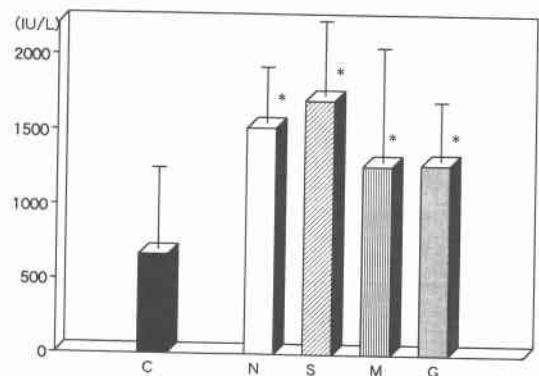
血清 LDH は対照群に比べ、移植未投与群で有意に高値であった。未投与群、S 群、M 群、G 群の各移植群間には有意差はないものの、血清 LDH において M 群、G 群に低値の傾向が認められた (Fig. 1)。

② 肝組織 Na^+ , K^+ -ATPase 活性値 ($\mu\text{mol Pi}/\text{mg protein}/\text{hr}$) は対照群が 3.16 ± 0.46 で、移植未投与群は 1.30 ± 0.43 と、移植再灌流により有意の同酵素活性の低下が認められた ($p < 0.01$)。さらに未投与群に比べ、S 群: 1.45 ± 0.72 , M 群: 1.64 ± 0.25 , G 群: 2.28 ± 0.34 と G 群で有意の改善が認められた ($p < 0.01$)。G

Fig. 1 Levels of serum GOT (A) and serum LDH (B) in recipient rats after orthotopic liver transplantation. Blood samples were collected 30 minutes after reperfusion. Data are expressed as mean \pm SD. C: control group, N: non-injection group, S: native SOD injection group, M: mannosylated SOD injection group, G: galactosylated SOD injection group. * $p < 0.01$ compared with control group



A



B

群はS群, M群と比較しても有意に高値であった (Fig. 2).

③ 肝組織 LPO (nmol MDA/mg protein) は対照群が 0.55 ± 0.02 で, 移植未投与群は 0.57 ± 0.03 と有意差はないものの移植未投与群で増加が認められた。さらに未投与群に比べて, S群: 0.54 ± 0.03 , M群: 0.51 ± 0.02 ($p < 0.01$), G群: 0.52 ± 0.03 ($p < 0.05$)とM群, G群で有意のMDA値の低下が認められた (Fig. 3).

④ 肝組織 SOD 活性 (阻害率%) は対照群が 46.8 ± 4.0 で, 移植未投与群が 46.3 ± 1.0 と低下の傾向が認め

Fig. 2 Na^+ , K^+ -ATPase activities of liver tissues procured 30 minutes after reperfusion in recipient rats. Data are expressed as mean \pm SD.

C: control group, N: non-injection group, S: native SOD injection group, M: mannosylated SOD injection group, G: galactosylated SOD injection group. * $p < 0.01$ compared with control group

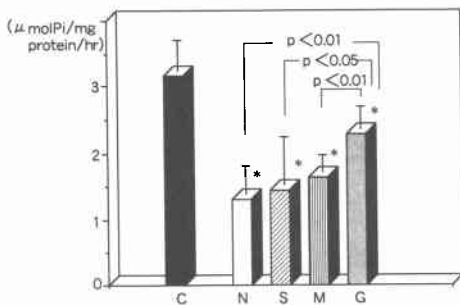


Fig. 3 Lipid peroxides of liver tissues procured 30 minutes after reperfusion in recipient rats. Data are expressed as mean \pm SD.

C: control group, N: non-injection group, S: native SOD injection group, M: mannosylated SOD injection group, G: galactosylated SOD injection group

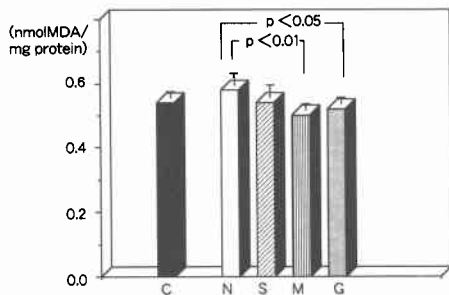
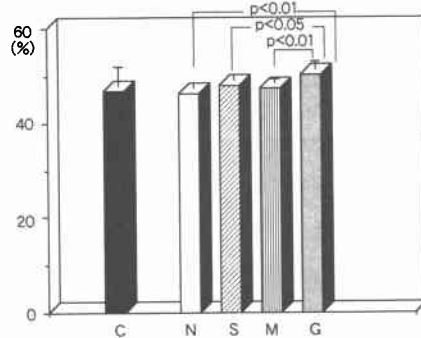


Fig. 4 SOD activities of liver tissues procured 30 minutes after reperfusion in recipient rats. Data are expressed as mean \pm SD.

C: control group, N: non-injection group, S: native SOD injection group, M: mannosylated SOD injection group, G: galactosylated SOD injection group



られた。さらに未投与群に比べて, S群: 47.8 ± 1.2 , M群: 47.3 ± 0.8 , G群: 50.1 ± 1.8 とG群で有意の高値が認められた ($p < 0.01$)。G群はS群, M群と比較しても有意に高値であった (Fig. 4).

IV 考察

同所性肝移植は現在末期肝疾患患者に対する最終的かつ根本的治療法として, 欧米各施設においては確固とした地位を有し, 日常の医療手段としてかなりの成功率で施行されている¹⁶⁾。それでもなお primary graft non-function (以下, PNF と略記) をはじめとした種々の移植肝機能障害が併発し, graft の生着を妨げ再移植が必要となる¹⁷⁾など問題となっている。特に移植再灌流に伴う肝組織障害については, その原因として superoxide を代表とする活性酸素や free radical の関与が考えられている¹⁾⁻³⁾。

McCord¹⁸⁾は小腸, 肺とともに肝組織には xanthine oxidase が豊富に存在し, 虚血再灌流時に活性酸素が発生して, 組織障害が起こることを説明している。Kooij ら¹⁹⁾は xanthine oxidase の肝小葉内分布について類洞内皮細胞と, 終末肝細胞静脈域の肝実質細胞に高い活性が存在することを示しており, これまでの摘出肝灌流実験³⁾⁴⁾²⁰⁾からも肝実質細胞が活性酸素源となり, oxidative stress をきたすことが考えられる。

一方, Clavien ら²¹⁾, Takei ら²²⁾は冷保存とそれに続く移植再灌流時に, 類洞内皮系への白血球粘着現象が起こり白血球-類洞内皮系で活性酸素種が発生して,

graft の障害が起こることを報告し、Jaeschke ら²³⁾は活性化した Kupffer 細胞が活性酸素の主な発生源であることを示している。島津ら²⁴⁾は虚血再灌流時に肝を通過した肝静脈血中の好中球に活性酸素の産生増加を認めている。

上記のように肝移植再灌流時の活性酸素の発生源として、xanthine-xanthine oxidase 系を介する肝実質細胞に由来する場合と、白血球や、Kupffer 細胞を介した類洞内皮系に由来する場合が考えられる。

SOD は superoxide を不活性化させる酵素であり、虚血再灌流時の superoxide の産生とそれに伴う活性酸素種による組織障害を防止する目的で従来より SOD の使用が試みられている^{4)~7)}。しかし、通常の recombinant SOD は肝組織に取り込まれにくく、迅速に腎より尿中へ排泄されるため、その効果は不十分と考えられる。また、superoxide をはじめとする活性酸素種は寿命が極めて短く、その消去酵素が同じ代謝区画に集積分布していなければ酵素の生物作用はうまく発現しないと考えられる²⁵⁾²⁶⁾。さらに培養内皮細胞を用いた実験で、SOD を liposome に封入したり²⁷⁾polyethylene glycol²⁸⁾を結合させることにより、SOD の細胞内取り込みが増加して活性酸素による障害の抑制に有効であったとの報告もある。

Fujita ら⁸⁾は、radio isotope を用いた正常肝における基礎実験で、SOD に単糖類である mannose, galactose を修飾させることにより、血中からの迅速な消失と肝への集積を認めている。特に mannosylated SOD は内皮細胞などの肝非実質細胞に、galactosylated SOD は肝実質細胞に、細胞膜表面のレセプターを介した endocytosis によって著明に取り込まれる。

そこで、単糖類で修飾した SOD を肝移植実験に用いて移植再灌流時に投与することにより、移植肝の組織障害を抑制できるのではないかと考えられた。また、肝実質細胞と非実質細胞に分かれて、SOD が特異的に取り込まれることから、活性酸素の産生と組織障害に関する病態の解明にも役立つと考えられる。

これまでの著者らのラットを用いた保存肝および移植肝実験¹⁰⁾で graft 肝の組織 Na^+ , K^+ -ATPase 活性は保存終了時まではほとんど低下しないが、移植再灌流直後には有意に低下することが認められた。したがって graft の障害は冷保存に引き続く温阻血、再灌流時に起こると考えられ、肝組織 Na^+ , K^+ -ATPase 活性の測定はその障害の良い指標になることが判明し

た。この肝組織 Na^+ , K^+ -ATPase 活性を指標とし、さらに肝組織 LPO および肝組織 SOD 活性を基にして単糖類で修飾した SOD の投与効果を総合的に判断した。

今回の肝移植再灌流実験でも、対照群に比べて移植群において、血中逸脱酵素の上昇、肝組織 Na^+ , K^+ -ATPase 活性の有意の低下、肝組織 LPO の増加と肝組織 SOD 活性の低下の傾向が認められた。これらの障害は通常の SOD では抑制されなかったが、単糖類で修飾した SOD を投与することにより有意の改善が認められた。ことに galactosylated SOD は、mannosylated SOD に比べ、肝組織 Na^+ , K^+ -ATPase 活性および肝組織 SOD 活性においてさらに有意の障害抑制効果が認められた。

これは、移植時に投与した galactosylated SOD が肝実質細胞に取り込まれ、再灌流に伴い発生した superoxide の消去に効果的に作用したことにより、肝細胞の障害が軽減し、肝組織 LPO が減少したと考えられる。このことは、単に血中の SOD 濃度を増加させるのみでは組織障害の抑制が得られず、実際に SOD が肝組織に取り込まれなければならないことを示している。しかも、移植再灌流に伴って発生した superoxide の主な target も肝実質細胞であると考えられる。しかし一方、再灌流前の冷保存と移植手技に伴う温阻血のために内皮細胞をはじめとする非実質細胞が再灌流前に既に障害を受けてしまい²⁹⁾³⁰⁾、再灌流直前に投与した mannosylated SOD が十分に非実質細胞に取り込まれなかったため、効果が不十分であった可能性も否定できない。

肝移植において、graft の組織障害を抑制し viability を保持させることは、PNF を抑え生着率を改善させ、移植成績の向上をもたらすうえで重要である。本研究において単糖類で修飾した SOD、ことに肝実質細胞に取り込まれる galactosylated SOD を使用することにより、graft の状態が良好に保持され移植再灌流時の組織障害の抑制に有効と考えられた。

稿を終えるにあたり、薬剤を提供していただいた京都大学薬学部橋田 充教授に厚く御礼申し上げます。

なお、本論文の内容の一部は第11回肝移植研究会(1993年7月、旭川)、第29回日本移植学会総会(1993年9月、金沢)にて発表した。

文 献

- 1) Thurman RG, Marzi I, Seitz G et al: Hepatic reperfusion injury following orthotopic liver

- transplantation in the rat. *Transplantation* 46 : 502-506, 1988
- 2) Clavien PA, Harvey PRC, Strasberg SM: Preservation and reperfusion injuries in liver allografts. An overview and synthesis of current studies. *Transplantation* 53 : 957-978, 1992
 - 3) 末松 誠, 土屋雅春: 虚血性肝障害と oxidative stress—肝微小循環構築と機能の特殊性に関連して—, 医のあゆみ 157 : 305-309, 1991
 - 4) Atalla SL, Toledo-Pereyra LH, MacKenzie GH et al: Influence of oxygen-derived free radical scavengers on ischemic livers. *Transplantation* 40 : 584-590, 1985
 - 5) 渡辺 仁, 恩田昌彦, 源河敦史ほか: 肝臓の虚血—再灌流障害における Ca^{2+} -ATPase と活性酸素の役割. 日外会誌 94 : 1269-1276, 1993
 - 6) 水田哲明, 石原敬夫: ラット肝虚血再灌流障害に対する Superoxide Dismutase の効果. 肝臓 31 : 1131-1132, 1990
 - 7) 竹川節男: 肝虚血時の細胞障害の発生機序における活性酸素の役割についての実験的検討. 肝臓 30 : 459-467, 1989
 - 8) Fujita T, Nishikawa M, Tamaki C et al: Targeted delivery of human recombinant superoxide dismutase by chemical modification with mono- and polysaccharide derivatives. *J Pharmacol Exp Ther* 263 : 971-978, 1992
 - 9) Boyer JL, Reno D: Properties of $(Na^{+}+K^{+})$ -activated ATPase in rat liver plasma membranes enriched with bile canaliculi. *Biochim Biophys Acta* 401 : 59-72, 1975
 - 10) 東 尚, 渡部幸明, 溝江昭彦ほか: ラット肝保存および移植再灌流時の肝組織 Na^{+}, K^{+} -ATPase 活性の変動. 移植 29 : 363-368, 1994
 - 11) Kamada N, Calne RY: Orthotopic liver transplantation in the rat. Technique using cuff for portal vein anastomosis and biliary drainage. *Transplantation* 28 : 47-50, 1979
 - 12) Miyata M, Fischer JH, Fuhs M et al: A simple method for orthotopic liver transplantation in the rat. Cuff technique for three vascular anastomoses. *Transplantation* 30 : 335-338, 1980
 - 13) 蓮池康徳, 門田守人, Valdivia L ほか: ラット同所性肝移植に関する研究—移植手技を中心に—. 移植 20 : 623-627, 1985
 - 14) Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL et al: Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193 : 265-275, 1951
 - 15) 真杉文紀, 中村哲也: Sodium dodecylsulphate 可溶化による肝チオバルビツール酸値とビタミン E, 薬物による変動. ビタミン 51 : 21-29, 1977
 - 16) Gordon RD, Bismuth H: Liver transplant registry report. *Transplant Proc* 23 : 58-60, 1991
 - 17) Todo S, Fung JJ, Tzakis A et al: One hundred ten consecutive primary orthotopic liver transplants under FK 506 in adults. *Transplant Proc* 23 : 1397-1402, 1991
 - 18) McCord JM: Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury. *N Engl J Med* 312 : 159-163, 1985
 - 19) Kooij A, Frederiks WM, Gossrau R et al: Localization of xanthine oxidoreductase activity using the tissue protectant polyvinyl alcohol and final electron acceptor tetranitro BT. *J Histochem Cytochem* 39 : 87-93, 1991
 - 20) Suematsu M, Suzuki H, Ishii H et al: Early midzonal oxidative stress preceding cell death in hypoperfused rat liver. *Gastroenterology* 103 : 994-1001, 1992
 - 21) Clavien PA, Morgan GR, Sanabria JR et al: Effect of cold preservation on lymphocyte adherence in the perfused rat liver. *Transplantation* 52 : 412-417, 1991
 - 22) Takei Y, Marzi I, Gao W et al: Leukocyte adhesion and cell death following orthotopic liver transplantation in the rat. *Transplantation* 51 : 959-965, 1991
 - 23) Jaeschke H, Farhood A: Neutrophil and Kupffer cell-induced oxidant stress and ischemic-reperfusion injury in rat liver. *Am J Physiol* 260(Gastrointest Liver Physiol 23) : G355-G362, 1991
 - 24) 島津元秀, 白杉 望, 若林 剛ほか: Hepatic vascular exclusion におけるフリーラジカルの産生と IL-1 の関与. 日腹部救急医学会誌 13 : 783-789, 1993
 - 25) 井上正康: SOD の臨床応用, その理論的背景. 近藤元治編. フリーラジカル. メジカルビュー社, 東京, 1992, p148-155
 - 26) Kyle ME, Nakae D, Sakaida I et al: Endocytosis of superoxide dismutase is required in order for the enzyme to protect hepatocytes from the cytotoxicity of hydrogen peroxide. *J Biol Chem* 263 : 3784-3789, 1988
 - 27) Freeman BA, Young SL, Crapo JD: Liposome-mediated augmentation of superoxide dismutase in endothelial cells prevents oxygen injury. *J Biol Chem* 258 : 12534-12542, 1983
 - 28) Beckman JS, Minor RL, White CW et al: Superoxide dismutase and catalase conjugated to polyethylene glycol increases endothelial enzyme activity and oxidant resistance. *J Biol*

Chem 263 : 6884—6892, 1988

- 29) Marzi I, Zhong Z, Lemasters JJ et al: Evidence that graft survival is not related to parenchymal cell viability in rat liver transplantation. The importance of nonparenchymal cells.

Transplantation 48 : 463—468, 1989

- 30) Caldwell-Kenkel JC, Thurman RG, Lemasters JJ: Selective loss of nonparenchymal cell viability after cold ischemic storage of rat livers. Transplantation 45 : 834—837, 1988

**Effect of Superoxide Dismutase Derivatives Modified with Monosaccharides on Reperfusion Injury of Orthotopic Liver Transplantation in Rats
—Evaluation by Liver Na⁺, K⁺-ATPase Activity—**

Akihiko Mizoe, Satoshi Kondo, Yukiaki Watanabe, Takashi Azuma, Hikaru Fujioka,

Kimiro Tanaka, Koichi Motojima, Kunihide Izawa* and Takashi Kanematsu

Second Department of Surgery and *Department of Emergency, Nagasaki University School of Medicine

Reactive oxygen and oxygen radical scavenger superoxide dismutase (SOD) derivatives were examined in rat orthotopic liver transplantation. We used SOD derivatives modified with monosaccharides such as mannosylated SOD and galactosylated SOD which are rapidly eliminated from the blood circulation and taken up by parenchymal and nonparenchymal cells of the liver, respectively, after intravenous administration. And we determined the effect on reperfusion injury of liver grafts with or without these SOD derivatives. Orthotopic liver transplantation in Lewis male rats was performed under ethyl ether anesthesia. During the operation, native SOD and SOD derivatives were administered by intravenous injection before reperfusion of the graft. Animals were sacrificed 30 minutes after reperfusion, and then their blood samples and liver tissues were procured and analyzed for tissue Na⁺, K⁺-ATPase activities, lipid peroxides (LPO) and SOD activities, and serum biochemical tests were performed. After reperfusion, the levels of serum GOT and LDH were markedly increased and tissue Na⁺, K⁺-ATPase activities were decreased significantly, compared to those in the control rat livers. Tissue LPO were elevated and tissue SOD activities were decreased after reperfusion. The use of SOD derivatives, particularly galactosylated SOD, before reperfusion prevented the depression of tissue Na⁺, K⁺-ATPase activities and improved the levels of tissue LPO and SOD activities. In conclusion, reperfusion of the liver graft led to the production of oxygen free radicals and reperfusion injury was not prevented by native SOD, but SOD derivatives, particularly galactosylated SOD, had a significant effect on reperfusion injury of the liver graft.

Reprint requests: Akihiko Mizoe Second Department of Surgery, Nagasaki University School of Medicine

1-7-1 Sakamoto, Nagasaki, 852 JAPAN