肝阻血障害に対するアロプリノールの投与径路に関する実験的研究

メタデータ	言語: jpn
	出版者:
	公開日: 2017-10-04
	キーワード (Ja):
	キーワード (En):
	作成者: 大堀, 功
	メールアドレス:
	所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/8335

金沢大学十全医学会雑誌　第101巻　第3号　469－478（1992）

肝阻血障害に対するアロプリノールの投与径路に関する実験的研究

金沢大学医学部外科学第二講座（主任：宮崎逸夫教授）
大　堀　　功

（平成4年3月2日受付）

肝臓は極めて虚血に弱い臓器であり，肝虚血障害の予防は肝移植の成功のために最も重要な問題の一つとなっている．虚血障害においてキサンチンオキシダーゼは重要な役割を果たしていると考えられているが，アロプリノールはキサンチンオキシダーゼを阻害してスーパーオキサイド産生を抑制し，組織を虚血障害から保護すると考えられている．これまで肝の温阻血障害に対するアロプリノールの静脈内投与の効果についての報告はみられるが肝動脈内，あるいは門脈内投与の効果について検討した報告はみられない．本研究では，イヌの90分肝温阻血に対してアロプリノールの静脈内投与，肝動脈内投与，および門脈内投与を行い，その効果の差について検討した．その結果，各群の肝血流再開後の血中アロプリノール＋オキシプリノール濃度では差がみられないにも拘らず，肝組織中 ATP 濃度，総アデニン・ヌクレオチド濃度，エネルギーチャージレベル，動脈血中ケトン体比，および病理組織学的所見におけるアロプリノール投与の効果は肝動脈内投与，門脈内投与，静脈内投与の順に良好であった．しかし，生存時間では肝動脈内投与，門脈内投与，静脈内投与の順に若干延長する傾向がみられたが長期間の生存は得られなかった．本研究におけるこのような各群間の効果の差は肝血流再開以前の要因に基づくと推測された．すなわち第一に，局所投与の方が静脈内投与よりも活性酸素産生準備ないし進行状態にある肝組織にアロプリノールがより確実かつ十分に供給されることである．それゆえアロプリノールは産生されてくるキサンチンオキシダーゼと血流再開前に十分結合することができるので，より大きな効果を発揮すると考えられる．第二に，肝に対する酸素供給において肝動脈は門脈よりも優位にあるので，活性酸素産生においても肝動脈が門脈より大きな比重を占めると考えられる．それゆえアロプリノールは肝動脈内へ投与されたとき，活性酸素産生の抑制が最大になるのではないかと推測された．

Key words ischemic liver damage, active oxygen, allopurinol, prevention of ischemia, administration routes

肝臓移植の成功率は近年著しく向上し，移植後の一年生存率は約75％といわれ，末期肝疾患の治療法として確立しつつある[1]．しかし，肝臓移植には生存力（viability）の高い移植肝の確保（虚血障害の克服，臓器保存法の改良）や手術手技，日和見感染，拒絶反応などの未だ解決されない問題が多く，安全で確実な治療法として確立されるにはさらに改善の余地が残されている．

一方，組織に阻血を加えた後に血流を再開すると，組織中に活性酸素が発生することが知られている．活性酸素によって血流再開後も組織障害は進行し，高度な場合には不可逆性の組織障害を来たすとされ，移植肝の採取保存の際に伴う肝阻血障害でも，活性酸素による組織障害の存在が考えられる．

肝阻血障害においてアロプリノール（allopurinol，ALP）はキサンチンオキシダーゼ（xanthin oxidase，XOD）を阻害しスーパーオキサイド産生を抑制することにより肝組織保護効果を有することが知られている．しかし，肝の阻血障害における ALP による保護効果に関する報告は多いが，局所投与（肝動脈内投与および門脈内投与）の効果を比較検討した報告はみられない．そこで本研究ではイヌの90分肝阻血に対して ALP を静脈内，肝動脈内，門脈内に投与しスーパーオキサイド産生阻害効果をみることにより，肝阻血障害に対する ALP 局所投与の保護効果について比較検討した．

対象および方法

Ⅰ．実験モデルの作成

体重9－15kg の雑種の成熟イヌ25頭を用い，術前24時間は絶食とした．ケタラール 10mg/kg，硫酸アトロピン 0.02mg/kg を筋注後，チオペンタールナトリウム 5 mg/kg の静脈内投与にて導入し，気管内挿管の後，人工呼吸器で酸素濃度50％にて維持した．大腿動脈にカテーテルを留置し，動脈圧，脈拍のモニター及び採血を行った．

開腹後，まず摘脾を行った．次いで，肝動脈および門脈以外の肝流入血管（肝胃間膜および肝腎間膜）を結紮切離した．さらに肝十二指腸間膜内の総胆管，肝動脈，門脈を剝離した後，アンスロンカテーテルを用いて脾静脈と下大静脈間にバイパスを作成した．

以上の準備の後，肝門部で肝動脈および門脈を血管鉗子にて90分間遮断するとともに門脈血バイパス路を開放した．術中輸

Abbreviations: aKBR, arterial blood ketone body ratio; ALP, allopurinol; EC, energy charge; GOT, glutamic oxaloacetic transaminase; GPT, glutamic pyruvic transaminase; OXP, oxypurinol; TAN, total adenine nucleotide; XOD, xanthin oxydase

液を糖質投与量が肝阻血前 0.1g/Kg/hr，阻血中 0.5mg/Kg/hr，阻血解除後 0.2g/Kg/hr となるようにおこなった[3)4)].

実験群は，ALP（田辺製薬，大阪市）の投与方法により以下の4群に分けた．

1．ALP 非投与群 (n=5)

肝動脈と門脈の血流遮断のみを行った．

2．ALP 静脈内投与群 (n=6)

肝動脈と門脈の遮断1時間前に 50mg/Kg body weight の ALP を 20−25ml の生食水に溶解し静注した．

3．ALP 肝動脈内投与群 (n=8)

胃十二指腸動脈よりカテーテルを挿入し，その先端を固有肝動脈内に留置した．肝動脈および門脈の血流遮断後より，カテーテルを介して肝動脈内に ALP 1mg/ml 含有乳酸リンゲル液を 0.5ml/min./Kg body weight，100cm 水注圧で滴下した．

4．ALP 門脈内投与群 (n=6)

左右門脈分岐下部にて，カテーテルを穿刺挿入後留置した．肝動脈および門脈の血流遮断後よりカテーテルを介して経門脈的に ALP 1mg/ml 含有乳酸リンゲル液を 0.5ml/min./Kg body weight，50cm 水注圧で滴下した．なお門脈は挿入部より十二指腸側で遮断した．

Ⅱ．試料の採取と測定

1．血中アロプリノール (allopurinol，ALP)，オキシプリノール (oxypurinol，OXP)

ALP を投与した3群について，経時的（阻血前，阻血中30，60，90分，阻血解除後30，60，120，180分）に採血し，直ちに 3000rpm で10分間冷却遠沈後，上清を−80℃で凍結保存し，ALP および ALP の酸化物である OXP の測定に供した．血漿中の ALP および OXP 濃度を HPLC (high-performance liquid chromatography) 法によって測定した[5)]．尚，各群とも2例ずつ測定しその平均値を求めた．

2．肝組織中 ATP，ADP，AMP，総アデニン・ヌクレオチド (total adenine nucleotide，TAN) 濃度およびエネルギーチャージ (energy charge，EC)

経時的（阻血前，阻血中30，60，90分，阻血解除後30，60，120，180分）に肝組織片を約 500mg 採取し，直ちに液体窒素中に凍結保存後，1週間以内に測定に供した．凍結した組織片を液体窒素を満たしたフリーザーミル内で粉末状とし 0.9N 過塩素酸にて除蛋白後，1.8N 水酸化カリウムで中和し抽出液を得，ベーリンガー・マンハイム山之内社製（東京都港区）測定 kit を用いて酵素法で ATP，ADP，AMP を測定した[6)7)]．TAN 値は ATP+ADP+AMP で，EC 値は，ATP+0.5 ADP/ATP+ADP+AMP で求めた[8)9)]．

3．動脈血中ケトン体比 (arterial blood ketone body ratio，aKBR)

各群とも大腿動脈より，経時的に氷冷したヘパリン管に採血し，直ちに 3000rpm で10分間冷却遠沈し，上清を−80℃で凍結保存後，可及的早期に測定に供した．動脈血々清を過塩素酸にて除蛋白後，三和化学所製（名古屋市）測定 kit を用いて，酵素法にて測定した[10)11)]．

4．血清生化学的検査 (glutamic oxaloacetic transaminase，GOT；glutamic pyruvic transaminase，GPT)

経時的に採血し，GOT，GPT にて肝機能を測定した．

5．病理組織学的検討

肝阻血後90分，阻血解除後180分に組織を採取しホルマリンにて固定した．組織標本はヘマトキシリン・エオジン (Hematoxylin-Eosin，H-E) 染色法にて染色を行った．

Ⅲ．統計学的検討

測定値は血中 ALP および OXP 濃度を除いて，全て平均値±標準偏差 (M±SD) で示した．平均値間の差の検定には，Cheffe の多重分析法を用い，危険率5％以下をもって有意とした．

成　　績

Ⅰ．生存率

非投与群では阻血解除後1時間以内に2頭が，3～4時間で2頭が，6～12時間で残る1頭が死亡した．静脈内投与群では阻血解除後3～4時間で4頭が，6～12時間で残る2頭が死亡した．肝動脈内投与群では，阻血解除後3～4時間で3頭が，6～12時間で3頭が，12～16時間で1頭が，24～36時間で残る1頭が死亡した．門脈内投与群では阻血解除後3～5時間で3頭が，6～12時間で残る3頭が死亡した．肝動脈内投与群，門脈内投与群，静脈内投与群の順に生存時間が延長する傾向がみられたが，著明な生存期間の延長は認められなかった．

Ⅱ．血中 ALP，OXP 濃度

ALP を投与した3群について血中 ALP と OXP の和の経時的変化を図1に示した．XOD 阻害効果のある ALP と OXP の和は静脈内投与群では阻血開始直前には 40.5μg/ml であった．また阻血解除後30分では，静脈内投与群36.8，肝動脈内投与群30.3，門脈内投与群41.1であり，さらに阻血解除後180分

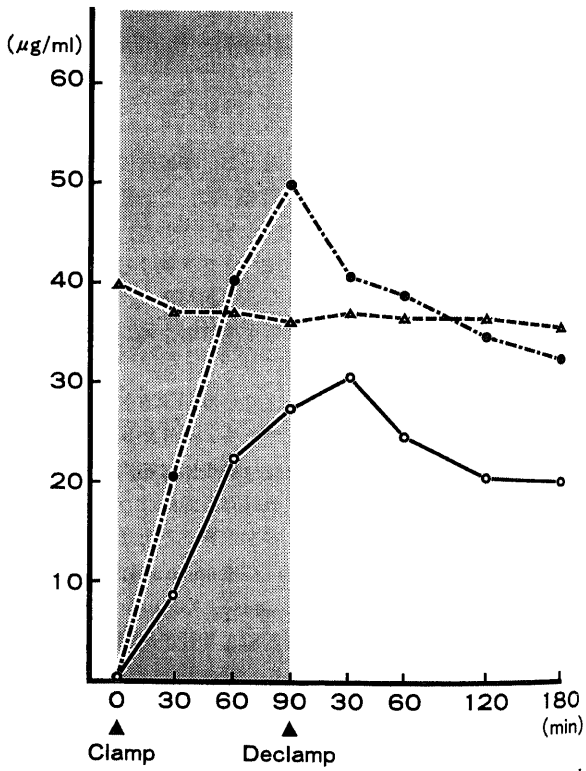

Fig. 1. Changes in serum concentrations of allopurinol and oxypurinol before, during and after clamping the liver blood flow. Data are shown as mean. ALP administration; △, intravenously 60 min before clamping; ○, via the hepatic artery during clamping; ●, via the portal vein during clamping.

まで3群ともほぼ同様の血中濃度を維持し，3群間に差は認められなかった．

Ⅲ．肝組織中 ATP 濃度

各群の肝組織中 ATP 濃度の経時的変化を図2に示した．阻血前の ATP 値は 102.3±23.7mg/100g 湿重量であり，阻血後90分に非投与群29.2±13.6，静脈内投与群29.8±2.8，肝動脈内投与群39.7±12.3，門脈内投与群36.6±17.7となり，各群間に差は認められなかったが，全群で阻血前値よりも有意の(P<0.01) 低下を認めた．肝動脈内投与群では，ATP は阻血解除後30分で92.4±19.7，180分で96.2±18.8と上昇した．また門脈内投与群では阻血解除後60分で75.7±8.5と上昇したが，以後徐々に低下した．静脈内投与群では，阻血解除後30分で62.8±17.4と上昇したが，以後徐々に低下した．非投与群では，阻血解除後120分で52.8±6.0となったが，以後低下した．肝動脈内投与群の ATP 値は，阻血解除後30分，120分で非投与群 (P<0.001) および静脈内投与群 (P<0.05) に対し，また阻血解除後60分，180分で他の3群に対して (P<0.01) 有意に高値であった．また門脈内投与群の ATP 値は，阻血解除後60，180分で非投与群 (P<0.01，0.01) および静脈内投与群 (P<0.01，0.05) に対し，阻血解除後120分で静脈内投与群 (P<0.05) に対し有意に高値であった．しかし非投与群と静脈内投与群の間に有意差はみられなかった．

Ⅳ．肝組織中 TAN 濃度

各群の肝組織中 TAN 濃度の経時的変化を図3に示した．阻血前の TAN 値は，149.1±24.1mg/100g 湿重量であった．阻血開始後より各群において TAN 値は著明に低下し，阻血後90分において非投与群69.4±20.4，静脈内投与群58.8±13.2，肝動脈内投与群74.3±13.4，門脈内投与群72.7±21.0となり，全群で阻血前値よりも有意に低下した．阻血解除後30分では，非投与群80.3±12.4，静脈群104.1±15.7，肝動脈群123.6±15.2，門脈群104.5±8.0となり，肝動脈群および門脈群は非投与群に比し有意に高値であった．阻血解除後60，180分では各々，非投与群83.2±17.0，78.7±10.7，静脈群78.7±10.7，58.1±13.0，肝動脈群135.4±13.5，135.7±21.1，門脈群106.5±17.0，96.1±19.4であり肝動脈群は他の3群に対し，門脈群は静脈群に対し有意に (P<0.05) 上昇した．阻血解除後120分では肝動脈群が他の3群に対し有意 (P<0.05) の上昇を認めた．

Ⅴ．肝組織 EC

各群の肝組織 EC レベルの経時的変化を図4に示した．EC 値は阻血開始後より各群において著明に低下し，阻血前値0.78±0.05から阻血開始後90分では，非投与群0.55±0.10，静脈内投与群0.59±0.13，門脈内投与群0.58±0.10と有意に (P<0.05) 低下した．肝動脈内投与群でも阻血後30，60分で0.55±0.09，0.57±0.08と有意に (P<0.001) 低下し，阻血後90分でも0.61±0.13と低下した．また各群間に有意差は認められなかった．阻血解除後には，肝動脈内投与群では，解除後30分で0.80±0.06となり，以後安定した数値を示し，解除後180分でも0.76±0.04と良好であった．門脈内投与群では，解除後60分で0.80±0.05となり，以後安定した数値を示し，解除後180分で

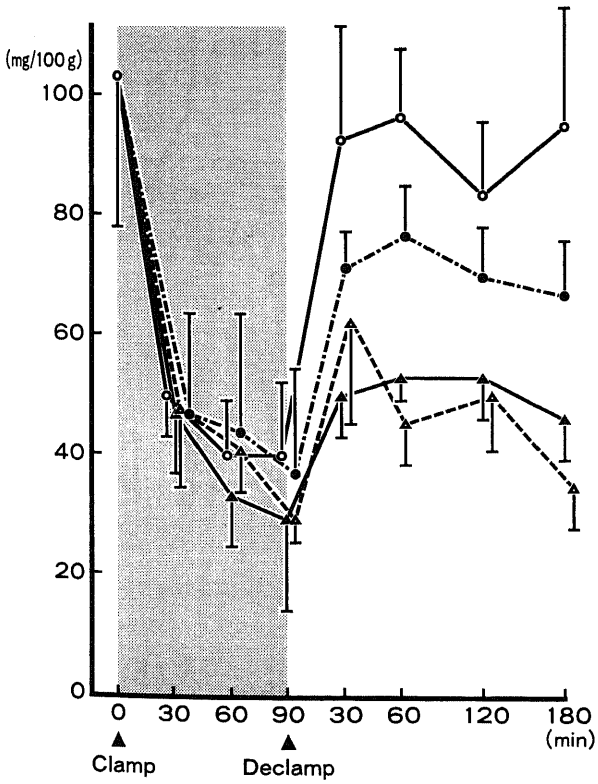

Fig. 2. Changes in ATP concentrations in the liver before, during and after clamping the liver blood flow. Data are shown as mean±SD. ALP administration; ▲, control; △, intravenously 60 min before clamping; ○, via the hepatic artery during clamping; ●, via the portal vein during clamping.

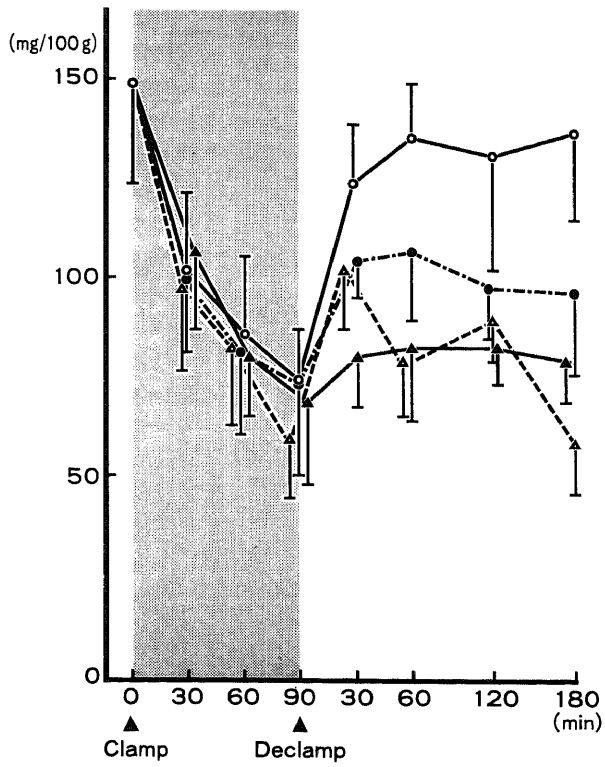

Fig. 3. Changes in total adenine nucleotide concentrations in the liver before, during and after clamping the liver blood flow. Data are shown as mean±SD. ALP administration; ▲, control; △, intravenously 60 min before clamping; ○, via the hepatic artery during clamping; ●, via the portal vein during clamping.

も0.78±0.05と良好な値を示した．一方，静脈内投与群では，解除後30分で0.70±0.03に達したが以後の変動はなかった．非投与群では，解除後120分で0.73±0.05となり，以後の変動はなかった．肝動脈内投与群および門脈内投与群の EC 値は阻血解除後60分，180分で静脈内投与群および非投与群に対して，阻血解除後30分で非投与群に対して有意に（P<0.05）良好であった．阻血解除後120分でも門脈内投与群が静脈内投与群に対して有意に（P<0.05）良好であった．肝動脈内投与群と門脈内投与群間および静脈内投与群と非投与群間には有意差はみられなかった．

Ⅵ．動脈血中ケトン体比（aKBR）

各群の aKBR の経時的変化を図5に示した．阻血開始後より aKBR は各群とも著明な低下を示し，阻血90分後では，非投与群0.11±0.12，静脈内投与群0.10±0.07，肝動脈内投与群0.14±0.12，門脈内投与群0.09±0.09であり，阻血前値0.90±0.34よりも有意に（P<0.01）低下していた．阻血解除後には，肝動脈内投与群では解除後60分で0.91±0.26となり，以後徐々に低下した．また門脈内投与群では解除後60分で0.64±0.13となり，以後徐々に低下した．一方，静脈内投与群では解除後120分で0.59±0.24となり，さらに非投与群では解除後60分で0.41±0.11と低値を示した．肝動脈内投与群の aKBR は，阻血解除後30，60分で他の3群に比して有意に（P<0.05）良好であったが，他の3群間には有意差はみられなかった．

Ⅶ．血液生化学的検査

各群の血清 GOT，GPT 濃度の経時的変化を図6，7に示した．GOT は阻血前値 53±37 IU/l から阻血90分後までは各群とも軽度の上昇を示すにとどまった．しかし，阻血解除後より各群とも著明な上昇を示し，阻血解除後30分では非投与群4818±2210となり，有意に静脈内投与群2392±1580（P<0.05），肝動脈内投与群686±373（P<0.01），門脈内投与群1160±439（P<0.01）よりも高値を示したが，非投与群以外の3群間には有意差はみられなかった．解除後60，120，180分においても同様の結果が得られた．GPT は阻血前値 54±44 IU/l から阻血90分後までは各群とも上昇は軽度であったが，阻血解除後より GOT とほぼ同様の変化を示した．阻血解除後30分では非投与群3218±1706，静脈内投与群2276±1358，肝動脈内投与群1136±399，門脈内投与群1794±1434であり，非投与群は肝動脈内投与群，門脈内投与群よりも有意に（p<0.05）高値であった．肝動脈内投与群，門脈内投与群，静脈内投与群の間には有意差はなかった．阻血解除後60，120，180分でも同様の結果が得られた．

Ⅷ．病理組織学的所見

阻血90分の肝組織所見では，非投与群では小葉中心性の鬱血と血管周囲の浮腫を認めた．一方，肝動脈内投与群では鬱血や浮腫は軽度であり明らかな変化を認めなかった．静脈内投与群および門脈内投与群でも肝動脈内投与群同様に明らかな変化を

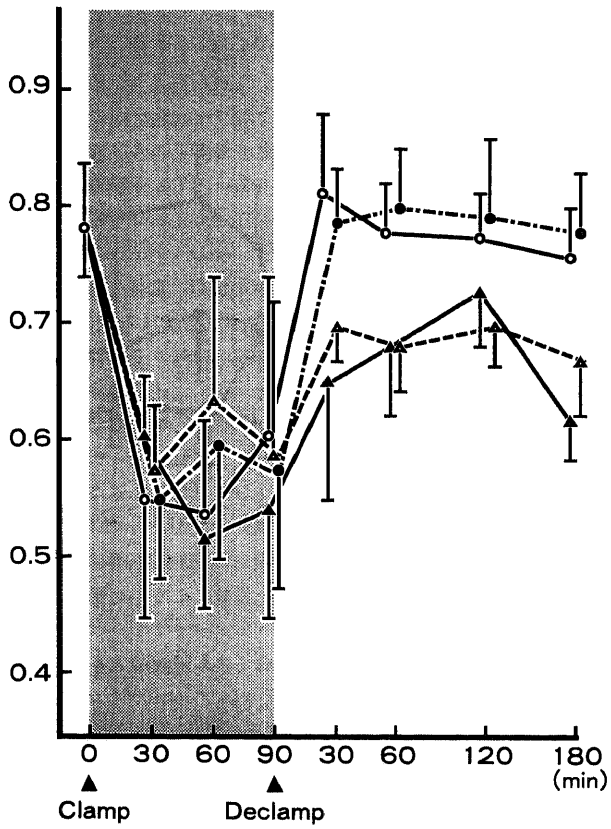

Fig. 4. Changes in energy charge level in the liver before, during and after clamping the liver blood flow. Data are shown as mean±SD. ALP administration; ▲, control; △, intravenously 60 min before clamping; ○, via the hepatic artery during clamping; ●, via the portal vein during clamping.

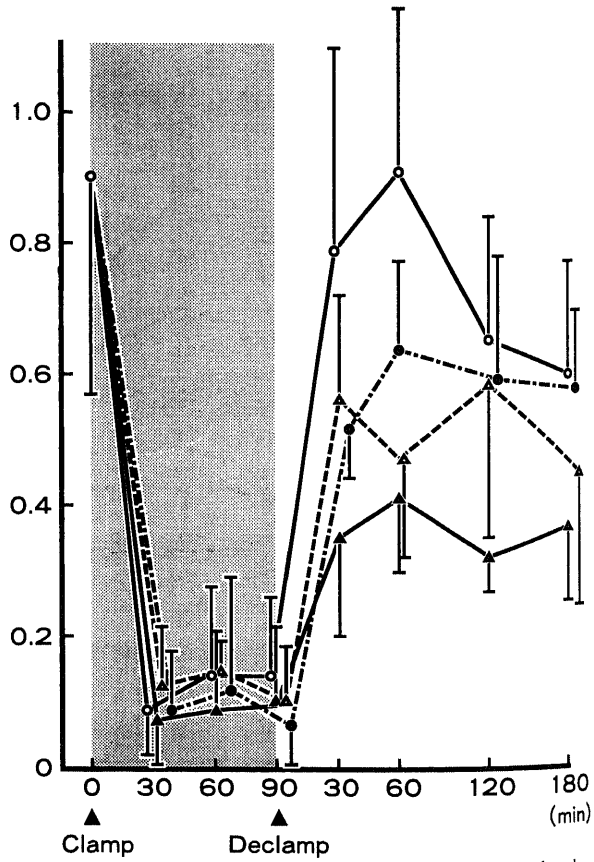

Fig. 5. Changes in arteral blood ketone body ratio levels before, during and after clamping the liver blood flow. Data are shown as mean±SD. ALP administration; ▲, control; △, intravenously 60 min before clamping; ○, via the hepatic artery during clamping; ●, via the portal vein during clamping.

認めなかった．

各群の阻血解除後180分の肝組織所見を図 8a, b, c, d に示した．阻血解除後180分の肝組織所見では，非投与群において広範な出血と肝細胞索構造の破壊や肝細胞の空胞化を認め，広範性 (massive)～亜広範性 (submassive) の出血壊死が見られた (図 8a)．一方，静脈内投与群では高度の血管周囲の浮腫を認め小葉中心部の亜広範性 (submassive) の壊死巣がみられた (図 8b)．肝動脈内投与群では，血管周囲の浮腫が認められたが，肝細胞は小葉中心部に散在性に巣状 (focal) の壊死巣を認めるのみであった (図 8c)．門脈内投与群では小葉中心性に帯状 (zonal) の壊死巣が見られ，静脈内投与群と肝動脈内投与群との中間的組織所見を示した (図 8d)．

考　　察

肝移植は1963年に Starzl らにより開始され，1980年代にはサイクロスポリンの登場を契機として手術成績が飛躍的に向上した．最近では1年生存率74%，5年生存率64%という成績が報告され，末期肝疾患に対する治療手段として確立されつつある[1]．しかし，移植直後に機能を発現しない初期移植片機能不全 (primary graft nonfunction) とよばれる不良な移植肝もみられ，高い生存力 (viability) を有す移植肝の確保が求められている．このためには，肝採取時の虚血障害の克服，臓器保存法の改良が必要である．なかでも，腎などに比べ虚血に弱い臓器である肝臓の移植においては虚血障害は大きな問題である[12][13]．したがって，肝移植の成功率を向上させるには，肝摘出の際の虚血による組織障害を解決することが重要である．

酸素欠乏時の組織障害の発生機序は次のように考えられている．酸素欠乏状態では細胞内 ATP が急速に低下し，細胞膜ポンプ機能が傷害され，細胞質内 Ca^{++} 濃度が上昇する．これにより，活性化されたホスフォリパーゼ A_2 は内膜のリン脂質を分解し，活性酸素が発生して，キサンチン脱水素酵素を XOD に変化させ[14]，酸化的リン酸化の障害により XOD の基質となるヒポキサンチンやキサンチンが増量する．血流再開により酸素が供給されると，ヒポキサンチンやキサンチンが XOD により分解されて活性酸素が発生し，膜の不飽和脂肪酸あるいはリン脂質と反応して過酸化脂質生成反応を促進し，細胞障害が進行すると考えられている[15][16]．

本研究で用いられた ALP は，XOD の基質としてキサンチンおよびヒポキサンチンと競合的に拮抗し，また ALP の酸化物である OXP は ALP に対する XOD の酸化作用を阻害することによって活性酸素の産生を抑制すると考えられている[2][17][18]．また，ALP は組織の阻血時に電子移送作用を有し電子の流れを安定化し，同時に電子の放出を抑制して活性酸素産生を低下させたり[19][20]，ハイドロキシルラジカル (hydroxyl radical, OH·) スカベンジャーとしても作用する[21]．さらに ALP は低濃度ではキサンチンに対する拮抗剤として作用し，高濃度では非拮抗剤として作用するとの報告もあり[22][23]，ALP の作用機序は複雑である．一方，ALP の作用発現には XOD と結合する時間が必要であり，組織障害の予防効果を得るには血流再開以前よ

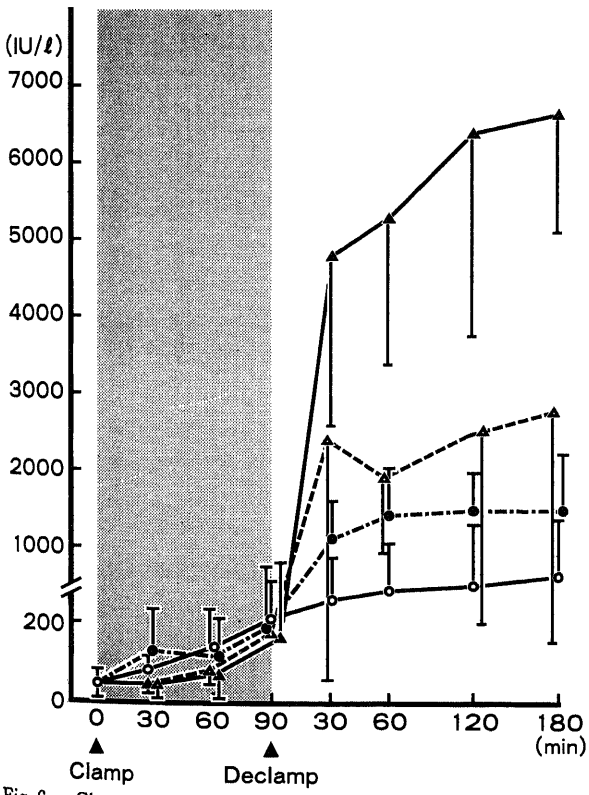

Fig. 6. Changes in serum GOT concentrations before, during and after clamping the liver blood flow. Data are shown as mean±SD. ALP administration; ▲, control; △, intravenously 60 min before clamping; ○, via the hepatic artery during clamping; ●, via the portal vein during clamping.

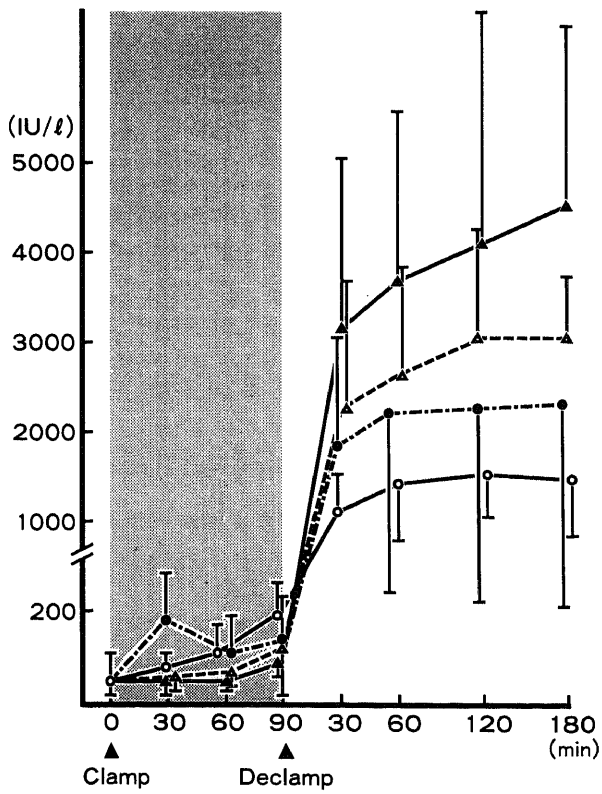

Fig. 7. Changes in serum GPT concentrations before, during and after clamping the liver blood flow. Data are shown as mean±SD. ALP administration; ▲, control; △, intravenously 60 min before clamping; ○, via the hepatic artery during clamping; ●, via the portal vein during clamping.

り投与することが必要である[24)25)]．また，ヒポキサンチンがXOD による作用を受ける以前に組織内に酸素が充足されると細胞はヒポキサンチンを ALP の方向へ逆転換する[26)]．したがって，阻血時に ALP で XOD 作用を抑制することにより，血流再開後の活性酸素による組織障害を予防し得ると考えられる．

これまで ALP の阻血障害保護効果については，肝や腎で報告されている[27)28)]．しかし肝阻血に対する ALP の投与方法や投与径路の違いによる保護効果についての検討はなされていない．本研究ではイヌで門脈－大静脈シャント下に90分肝温阻血を行い，ALP の投与効果をみるために，投与方法として肝阻血前の静脈内投与，肝阻血中の肝動脈および門脈内持続投与を行い，非投与群を含め肝の生存力について比較検討した．イヌでの肝阻血に関する研究では90分以上の阻血では長期間の生存は得られず[29)~32)]，90分肝阻血は極めて臨界点 (critical point) に近いモデルと言える．本研究では ALP の効果，とくに投与径路による効果の差を検討するために，より厳しい阻血モデルでの検討が必要と考え，肝阻血90分モデルを作成した．

生存率では肝動脈内投与，門脈内投与，静脈内投与の順に生存時間の延長はみられたものの，全群とも36時間以上の生存犬は得られず，ALP 投与方法の違いと生存率との間には差は認められなかった．90分の阻血時間は ALP を投与しても不可逆的な肝組織障害をもたらすものと推測された．Marubayashi らはラットの肝阻血解除後1時間の ALP 値の阻血前値に対する比率を検討し，比較的良好な生存率を示した60分阻血ではその比率は59％だったのに対し90分阻血では34％のレベルまで低下したと報告し[33)]，34％と59％の間に不可逆的レベルの存在を示唆している．本研究では阻血解除後1時間の ATP 値は非投与群で52％と低レベルであったが，肝動脈群では94％と良好なレベルにあったにも拘らず生存率の向上は得られなかった．本研究では各群とも阻血解除後に汎発性血管内凝固症候群 (disseminated intravascular coagulation, DIC) 様の出血傾向を認めて死亡する例が多く見られ，これが ALP 投与によっても生存率向上が得られない理由と考えられた[29)]．Handin らは活性酸素の存在下では血小板の凝集能が10倍になると報告し[34)]，活性酸素による凝固線溶系の異常の発生を指摘している．したがって，生存率の改善には活性酸素による肝組織障害の克服だけでなく血液凝固線溶系の管理などの要素についての十分な治療が必要と考えられた．

本研究では，肝組織の ATP, TAN, EC レベルの回復は肝阻血中肝動脈内投与，肝阻血中門脈内投与，肝阻血前静脈内投与の順に良好であった．ATP は濃度そのものより酸素供給再開に際しての回復能が無酸素状態による臓器の生死判定の決定的指標になるといわれている[7)]．本研究では ATP 値が阻血90分で各群とも阻血前値の40％以下まで低下した．非投与群では阻血解除後120分で52％まで回復したが以後低下した．静脈内投与群では阻血解除後30分で61％まで回復したがその後徐々に低下した．肝動脈内投与群では阻血解除後30分で90％に回復し以後

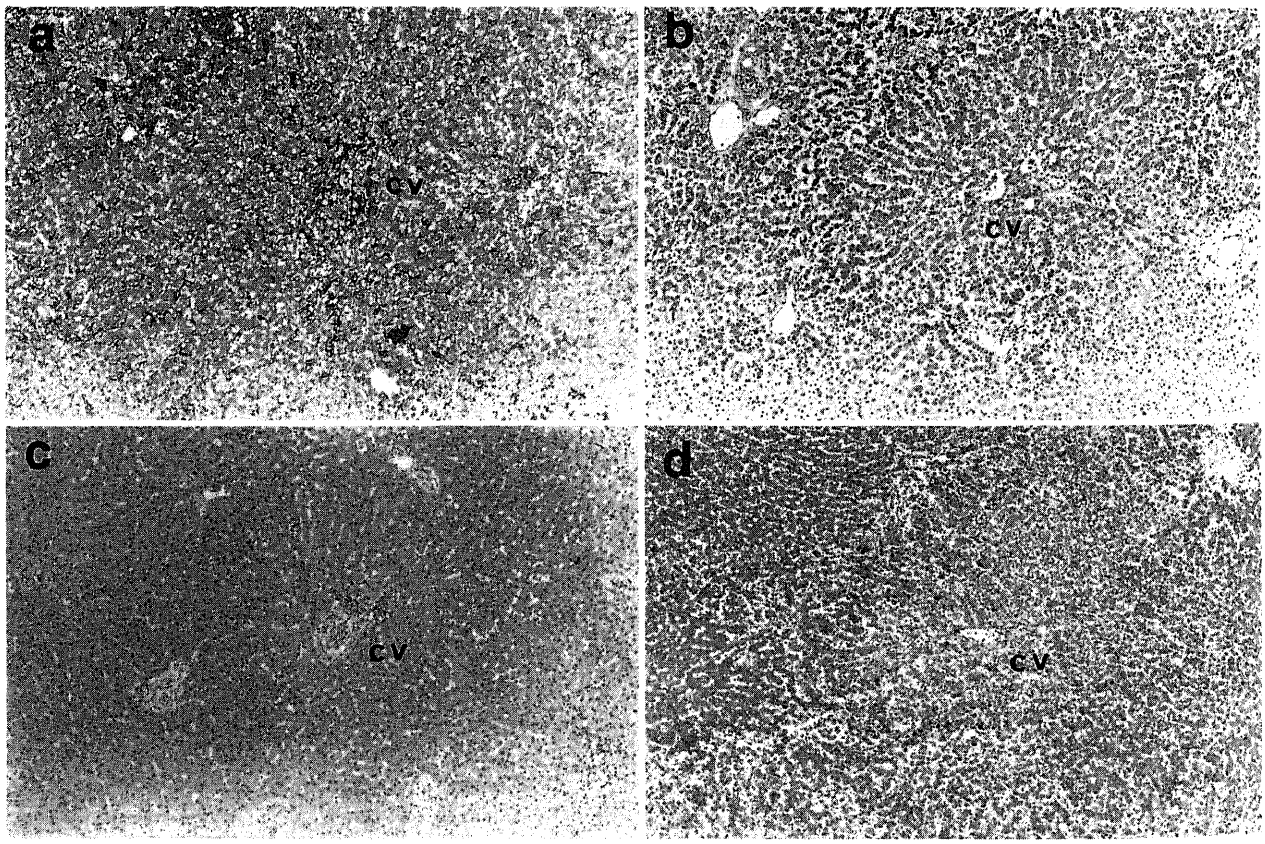

Fig. 8. Histopathological findings in the livers 3 hr after blood reflow of 90-min ischemia (HE-stain ×100). (a) Massive necrosis was seen in the controls. (b) Massive～submassive necrosis was seen in the animals administered ALP intravenously. (c) Focal necrosis was seen in those administered ALP via the hepatic artery. (d) Zonal necrosis was seen in the dogs adnimistered ALP via the portal vein. "cv" stands for central vein.

そのレベルを維持した．門脈内投与群では阻血解除後30分で74%まで回復したが以後徐々に低下した．以上より，90分阻血後では各群間に ATP レベルの差を認めなかったが，阻血解除後においては肝動脈内投与群，門脈内投与群，静脈内投与群の順に ATP レベルが良好に維持された．また，TAN レベルは ATP レベルよりも一層臓器の生存力に相関するとの報告がある[35]．本研究では TAN 値が阻血90分で各群とも阻血前値の50%以下まで低下した．非投与群では阻血解除後30分で54%まで回復したものの，その後は回復がみられなかった．また静脈内投与群では阻血解除後30分で70%まで回復したが，その後徐々に低下した．これに対して肝動脈内投与では解除後30分で83%に回復しそのまま良好なレベルを維持した．門脈内投与では解除後30分で70%に回復しそのレベルを維持した．以上より，90分阻血後において各群間に TAN レベルの差を認めなかったが，阻血解除後においては肝動脈内投与群，門脈内投与群，静脈内投与群の順に TAN レベルが良好に回復し維持された．一方，EC は細胞のエネルギー産生系と消費系のバランスを示し，細胞の機能的予備能を反映し，生存力判定には血流再開後の回復の程度が有用である[8,9]．本研究での阻血解除後の肝組織 EC 値の回復は，静脈内投与群に比し肝動脈内投与群と門脈内投与群が有意に良好であり ALP 投与の効果が認められた．

ミトコンドリアの酸化還元能（遊離 NAD+/NADH 比）をそのまま反映する aKBR は生存力の指標として有用ではあるが，回復程度がよりその指標として重要であり，回復のみられないものでは予後不良である[3,10,11]．本研究では肝動脈内投与群，門脈内投与群，静脈内投与群，非投与群の順に良好な値を示し，肝動脈内投与群が他の3群に対して有意に良好な回復を示した．また，GOT，GPT は肝実質細胞障害の指標と考えられているが，本研究では肝動脈内投与群，門脈内投与群，静脈内投与群，非投与群の順に良好な値を示し，肝動脈内投与群，門脈内投与群では非投与群に比し有意の効果がみられた．

病理組織学的所見では，阻血90分の肝は全群において鬱血や浮腫を認める程度であった．それに対し，阻血解除後180分の肝組織を見ると，非投与群では広範性（massive）～亜広範性（submassive）の，静脈内投与では亜広範性の，門脈内投与では帯状（zonal）の，肝動脈内投与では巣状（focal）の壊死の所見が認められた．Frederiks らはラットの肝阻血実験で阻血24時間後の肝の壊死について検討し，阻血時間の延長とともに壊死の範囲が拡大し，60分阻血で10～20%，90分阻血で約40%，120分阻血で80～90%の壊死を認めるようになると報告している[36]．篠原らはイヌの90分阻血後の肝組織では類洞内皮細胞の変性脱落・肝細胞変性が認められ，阻血解除後1時間では肝細胞索構築の乱れ・肝細胞の空胞変性・類洞内皮細胞の変性脱落が認められたと報告している[29]．本研究では ALP の肝動脈内および門脈内投与によって明らかに非投与および静脈内投与よりも肝の壊死は抑制されており ALP の肝局所への投与が有効であったと考えられる．

ところで，本研究では肝動脈または門脈内へ ALP 含有乳酸リンゲル液を持続投与したが，この方法では ALP 投与の効果だけではなく ALP 溶解液による灌流の効果も含まれる可能性がある．高森は小腸阻血実験で，乳酸リンゲル液の灌流単独では阻血障害保護効果は極く軽度しか得られないのに対し，灌流液に ALP を添加すると良好な効果が得られたと報告している[37]．したがって肝動脈内，門脈内 ALP 投与による良好な肝の生存力の維持は肝灌流効果よりも肝局所での ALP の作用によるものと推測される．

また本研究では阻血解除後での血中 ALP+OXP 濃度が静脈内投与群と肝動脈内または門脈内投与群との間に差がみられないにも拘らず，ALP の肝動脈内または門脈内投与では，静脈内投与に比し肝の生存力の維持が良好であった．これは XOD が産生される阻血中の肝局所への投与である肝動脈内あるいは門脈内投与では，静脈内投与よりも肝組織内へ取りこまれ XOD と結合し効果を発揮し得る ALP の濃度が高いためではないかと推測される．荒井らは，実験的に ^{99m}Tc でラベルした赤血球を静注，肝動注して肝への取りこみを測定すると，肝動注では静注の約10倍になると報告している[38]．また岡本はアドリアマイシンの肝動脈内投与，門脈内投与の動物実験を行い，静注に比べ肝動注，門注の方が肝組織への取りこみが優位であると報告している[39]．したがって，ALP の肝動脈内または門脈内投与では静脈内投与に比し肝組織へ取りこまれた ALP 濃度が高く XOD と有効に結合してスーパーオキサイド産生を抑制し，肝の生存力を良好に維持したと考えられる．ただし，本研究では肝の組織中 XOD[40] や ALP 濃度を測定していないので，今後の検討が必要と思われた．

ALP の阻血中肝動脈内あるいは門脈内投与法によって，肝の生存力が有意に良好に保たれ，肝阻血障害に対して ALP の肝動脈または門脈への投与法が有効な保護効果を有することが示されたが，肝動脈内投与法において門脈内投与法に比べて肝の生存力は有意に良好であった．これは，肝動脈は栄養血管であり門脈は機能血管であるという両者の機能の差に起因すると推測される．伊関らは，肝動脈遮断30分後で，肝組織内 pO_2 は20%，pCO_2 は200%と著明な異常を示すのに対し，門脈遮断30分後では，組織内 pO_2 は一旦低下しても回復し，また pCO_2 も一旦上昇した後に回復するとした．さらに，肝動脈・門脈同時遮断では，遮断30分後には pO_2 10%，pCO_2 453%になると報告し[41]，肝への酸素供給に関して肝動脈は門脈より優位にあることが示されている．さらに Drapanas らは，体外肝灌流の実験で肝動脈および門脈から血液で灌流したときの酸素消費量は最高であり，門脈のみからの灌流では十分な酸素消費量は得られないと述べ[42]，酸素供給における肝動脈の優位性を示している．このように酸素供給において肝動脈は門脈よりも優位にあり，活性酸素産生の面でも門脈よりも重要な役割を果たしていると推測される．したがって，活性酸素の除去に有効である ALP を肝阻血中に肝動脈から投与することが門脈内あるいは静脈内投与よりも肝の生存力維持に有効であると推測される．本研究の結果はそれを示唆すると考えられた．

結　　論

肝阻血障害時におけるキサンチンオキシダーゼ阻害剤であるアロプリノールの効果を阻血前静脈内投与，阻血中肝動脈内あるいは門脈内投与法について比較検討したところ次のような結果が得られた．

1．血流再開後の ALP+OXP 血中濃度には3群間に差はなかった．

2．肝組織の ATP レベル，TAN レベル，EC レベル，動脈血中ケトン体比の回復，血清 GOT，GPT 値の推移は，肝動脈内投与，門脈内投与，静脈内投与の順に良好であった．

3．病理組織学的所見では，肝組織障害は肝動脈内投与，門脈内投与，静脈内投与の順に軽度であった．

以上の結果より，肝阻血障害に関してアロプリノールによる組織障害保護効果は肝動脈投与，次いで門脈内投与が静脈内投与よりも効果的で，活性酸素産生において肝動脈は門脈よりもより重要な役割を果たしていると推測することができる．

本論文の要旨は第23回（1987年横浜）および第24回（1988年福岡）日本移植学会総会，第22回日本肝臓学会西部会（1987年高知），第12回国際移植学会（1988年シドニー）において発表した．

謝　　辞

本論文の稿を終えるにあたり，御指導，御校閲を賜わった恩師宮崎逸夫教授，また終始直接御指導頂きました泉良平講師，組織学的検討に御指導頂きました病理学第二教室の斎藤勝彦助手に深甚の謝意を表します．

文　　献

1） **Iwatsuki, S., Starzl, T. E., Todo, S., Gordon, R. D., Esquivel, C. O., Tzakis, A. G., Mokowka, L., Marsh, J. W., Koneru, B., Stieber, A., Klintmalm, G. & Husberg, B.**: Experience in 1000 Liver transpalnts under Cyclosporin--Steroid therapy: A survival report. Transplant. Proc., **20**, 498-504 (1988).

2） **van Waeg, G., Burman, P., Groth, T., Loof, L., Niklasson, F. & de Verdier, C. H.**: Kinetics of allopurinol turnover after i. v. injection in man and its use as a means to assess liver function. Adv. Exp. Med. Biol., **195**, 461-464 (1986).

3） **Taki, Y., Ukikusa, M., Morimoto, T., Yokoo, N., Koizumi, K., Noguchi, M., Tanaka, A., Yamamoto, S., Nitta, N., Kamiyama, Y., Shimahara, Y., Yamaoka, Y. & Ozawa, K.**: Short-term changes in blood ketone body ration in the phase immediately after liver transplantation. Transplantation, **43**, 350-353 (1987).

4） **Lampe II, E. W., Simmons, R. L. & Najarian, J. S.**: Hyperglycemic nonketotic coma after liver transplantation. Arch. Surg., **105**, 774-776 (1972).

5） **Boulieu, R., Bory, C. & Baltassat, P.**: Simultaneous determination of allopurinol, oxipurinol, hypoxanthin and xanthin in biological fluid by high-performance liquid chromatography. J. Chromatogr., **307**, 469-474 (1984).

6） 中野昭一，吉岡利忠，清水隆介，斎藤喜好，成井陽子：ATP，ADP および AMP の酵素的定量法と各臓器組織の含有量について．診断と治療，**59**，174-181 (1971).

7） **Sells, R. A., Bore, P. J., McLaughlin, G. A., Johnson, J. N. & Tyrrell, I.**: A predictive test of renal viability. Transplantat. Proc., **9**, 1557-1560 (1977).

8） **Atkinson, D. E.**: The energy charge of the adenylate pool as a regulatory parameter. Interaction with feedback modifiers. Biochemistry, **7**, 4030-4034 (1968).

9） **Kono, Y., Ozawa, K., Tanaka, J., Ukikusa, M., Takeda, H. & Tobe, T.**: Significance of mitochondrial enhancement in restoring hepatic energy charge after revascularization of isolated ischemic liver. Transplantation, **33**, 150-155 (1982).

10） **Ozawa, K., Fujimoto, T., Nakatani, T., Asano, M., Aoyama, H. & Tobe, T.**: Changes in hepatic energy charge, blood ketone body ratio, and indocyanine green clearance in relation to DNA synthesis after hepatectomy. Life Sci., **31**, 647-653 (1982).

11） **Williamson, D. H., Mellanby, J. & Krebs, H. A.**: Enzymic determination of D (−)-β-hydroxy-butyric acid and acetoacetic acid in blood. Biochem. J., **82**, 90-96 (1962).

12） **D'Alessandro, A. M., Southard, J. H., Karayoglu, M. & Belzer, F. O.**: The viability of preserved livers as judged by a tissue slice technique. Transplant. Proc., **18**, 588-591 (1986).

13） **D'Alessandro, A., Southard, J. H., Karayoglu, M. & Belzer, F. O.**: Effect of drug treatment on liver-slice function following 72-hour hypothermic perfusion. Cryobiology, **23**, 415-421 (1986).

14） **Trump, B. F., Berezesky, I. K. & Cowley, R. A.**: The cellular and subcellular characteristics of acute and chronic injury with emphasis on the role of calcium. In A. Cowley & B. Trump (eds.), Pathophysiology of Shock, Anoxia and Ischemia. 1st ed. p6-46, Williams & Wilkins, Baltimore, 1982.

15） **van der Vusse, G. J., Roemen, T. H. M., Prinzen, F. W., Coumans, W. A. & Reneman, R. S.**: Uptake and tissue content of fatty acids in dog myocardium under normoxic and ischemic conditions. Circ. Res., **50**, 538-546 (1982).

16） 住元一夫，川崎　尚：虚血と活性酸素．治療学，**19**，59-63 (1987).

17） **Erion, G. B.**: Enzymatic and metabolic studies with allopurinol. Ann. Rheum. Dis., **25**, 608-614 (1966).

18） **Erion, G. B., Kovensky, A. & Hitchings, G. H.**: Metabolic studies of allopurinol, an inhibitor of xanthin oxidase. Biochem. Pharmacol., **15**, 863-880 (1966).

19） **Peterson, D. A. & Gerrard, J. M.**: A hypothesis for a role for unsaturated fatty acids in electron transport and its potential application to understanding the mitochondrial respiratory chain. Med. Hypotheses, **6**, 491-499 (1980).

20） **Peterson, D. A., Kelly, B. & Gerrard, J. M.**: Allopurinol can act as an electron transfer agent: Is this relevant during reperfusion injury? Biochem. Biophys. Res. Commun., **137**, 76-79 (1986).

21） **Moorhouse, P. C., Grootveld, M., Halliwell, B., Quinlan, J. G. & Gutteridge, J. M. C.**: Allopurinol and oxypurinol are hydroxyl radical scavengers. FEBS Lett., **213**, 23-28 (1987).

22） **Watts, R. W. E., Watts, J. E. M. & Seegmiller, J. E.**: Xanthin oxidase activity in human tissues and its inhibition by allopurinol (4-hydroxypyrazolo [3,4-d] pyrimidine). J. Lab. Clin. Med., **66**, 688-697 (1968).

23） **Chalmers, R. A., Kromer, H., Scott, J. T. & Watts, R. W. E.**: A comparative study of the xanthin oxidase inhibitors allopurinol and oxipurinol in man. Clin. Sci., **35**,

353-362 (1968).

24) **Koyama, I., Bulkley, G. B., Williams, G. M. & Michael, J. I.**: The role of oxygen free radicals in mediating the reperfusion injury of cold-preserved ischemic kidneys. Transplantation, **40**, 590-595 (1985).

25) **Castillo, M., Toledo-Pereyra, L. H., Prough, D., Sharpiro, E., Gordon, D. & Choudhury, S.**: Effective timing of allopurinol administration in the ischemic liver. Transplantation, **47**, 727-730 (1988).

26) **Crowell, J. W., Jones, C. E. & Smith, E. E.**: Effect of allopurinol on hemorragic shock. Am. J. Physiol., **216**, 744-748 (1969).

27) **Vasco, K. A., DeWall, R. A. & Riley, A. M.**: Effect of allopurinol in renal ischemia. Surgery, **71**, 787-790 (1972).

28) **Merion, R. M., Campbell, D. A., Averill, J. D. R., Dafoe, J. D. C., Fantone, J. C. & Turcotte, J. G.**: Improved liver preservation with Euro-Collins and donor allopurinol. Transplant. Proc., **18**, 582-587 (1986).

29) 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).

30) **Kahn, D., Hickman, R., Dent, D. M. & Terblanche, J.**: For how long can the liver tolerate ischemia? Eur. Surg. Res., **18**, 277-282 (1986).

31) **Farkough, E. F., Daniel, A. M., Beaudoin, J. G. & MacLean, L. D.**: Predictive value of liver biochemistry in acute hepatic ischemia. Surg. Gynecol. Obstet., 832-838 (1971).

32) 豊嶋國彦：犬屍体肝移植に関する研究－Coenzyme Q_{10} 前投与による屍体肝保護効果－．大阪大医誌，**35**, 21-28 (1985).

33) **Marubayashi, S., Takenaka, M., Dohi, K., Ezaki, H. & Kawasaki, T.**: Adenine nucleotide metabolism during hepatic ischemia and subsequent blood reflow periods and its relation to organ viability. Transplantation, **30**, 294-296 (1980).

34) **Handin, R. I., Karabin, R. & Boxer, G. J.**: Enhancement of platelet function by superoxide anion. J. Clin. Invest., **59**, 959-965 (1977).

35) **Warnick, C. T. & Lazarus, H. M.**: Adenine nucleotides during organ storage. Transplant. Proc., **9**, 1575-1577 (1977).

36) **Frederiks, W. M., Fronik, G. M. & Hesseling, J. M. G.**: A method for quantitative analysis of the extent of necrosis in ischemic rat liver. Exp. Mol. Pathol., **41**, 119-125 (1984).

37) 高森正人：小腸の阻血と血流再開後の粘膜障害に関する実験的研究．日消外会誌，**23**, 2244-2250 (1990).

38) 荒井保明，木戸長一郎：間歇的少量反復動注法．癌と化療，**12**, 1922-1929 (1985).

39) 岡本信也：アドリアマイシン大量肝動注療法および門脈注入療法における心毒性の実験的検討．昭和医会誌，**48**, 327-333 (1988).

40) **Im, M. J., Shen, W. H., Pak, C. J., Manson, P. N., Bulkley, G. B. & Hoopes, J. E.**: Effect of allopurinol on the survival of hyperremic island skin flaps. Plast. Reconstr. Surg., **73**, 276-278 (1984).

41) 伊関文治，柴山和夫，牛山孝樹，和田達夫，須藤憲一，古瀬　彰：肝内ガス分圧の実験的検討－吸入酸素濃度変化および肝流入血遮断の及ぼす影響について－．日外会誌，**86**, 304-317 (1985).

42) **Drapanas, T., Zemel, R. & Vang, J. O.**: Hemodynamics of the isolated perfused pig liver: Metabolism according to routes of perfusion and rates of flow. Ann. Surg., **164**, 522-537 (1966).

An Experimental Study on the Routes of Administration of Allopurinol for Prevention of Ischemic Liver Damage

Isao Ohhori, Department of Surgery II, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920 — J. Juzen Med Soc., **101**, 469 — 478 (1992)

Key words ischemic liver damage, active oxygen, allopurinol, prevention of ischemia, administration routes

Abstract

Since the liver is highly susceptible to ischemia, the prevention of ischemic liver damage is one of the most important factors for successful liver transplantation. Whereas xanthin oxidase (XOD) is thought to play an important role in ischemic damage, allopurinol (ALP), an effective XOD inhibitor, is thought to suppress superoxide production and thus to protect liver tissue from ischemic damage. The effect of intravenous administration of ALP on ischcmic liver damage has already been reported. However, there have been no reports on the effect of administration via the hepatic artery or portal vein. In this study we performed intravenous, intra-hepato-arterial and intraportal administration of ALP to 90-minute liver ischemia in dogs and examined the different effects of the individual administration methods. The results showed that, whereas no diffrence in serum allopurinol+oxypurinol levels were seen after hapatic blood reflow in the three groups, in other aspects there were noticeable differences. With regard to the effects of ALP on the ATP concentration, total adenine nucleotide concentration, energy charge level in the hepatic tissues, arterial blood ketone body ratio and histopathological findings, all were significantly more favorable when administration was via the hepatic artery and via the portal vein than when administration was intravenous. However, although survival tissue was prolonged more by administration of ALP via the hepatic artery, via the portal vein and intravenously, in that order, long-term survival was not obtained by any of the methods. Such diffrences in the effect of ALP between the individual groups in this study were presumed to be attributable to factors occurring before hepatic blood reflow. Firstly, localized administration can supply ALP more surely and more sufficiently to the hepatic tissues where production of active oxygen is under way, or proceeding this, than can intravenous administration. Consequently, since ALP can bind to XOD when there is sufficient production before blood reflow, localized administration was presumed to exhibit greater effects. Secondly, since the hepatic artery is superior to the portal vein in supplying oxygen to the liver, the former is also presumed to play a more important role in production of active oxygen than the latter. Thus when ALP is administered via the hepatic artery, a greater suppression of production of active oxygen can be obtained.