

移植肝細胞の再灌流時における viability の検討

東京医科大学外科学教室 (指導: 小柳泰久主任教授)

山下 晋 矢 青木 達 哉 葦 沢 龍 人

【要旨】 豚を用いた部分肝移植実験において、移植肝細胞の再灌流時における viability を評価するため、本研究は AKBR (動脈血中ケトン体比)、SOD (superoxide dismutase)、LPO (lipid peroxide) を測定し、再灌流後の超微形態学的変化と対比を行った。また Mn-SOD (manganese superoxide dismutase) を指標として臓器自体に内在する内因性 SOD の動態について評価検討を行った。

肝再灌流時における AKBR、SOD、LPO、Mn-SOD の測定結果は肝の viability を反映し、予後及び組織学的変化とも一致した。特に Mn-SOD の変化は移植肝組織中の Mn の動態より考慮して、ミトコンドリア機能を反映しているものと推測され、肝細胞自体で合成された内因性 SOD の動態を示していた。肝再灌流前後の Mn-SOD の変化は、再灌流障害の程度を反映し、肝の viability を示す指標となることが判明した。

緒 言

臨床肝移植は 1963 年に Starzl らにより初めて行われ、臓器保存方法、手術手技、術中・術後管理および免疫抑制療法の進歩とともに、近年では末期肝不全や肝悪性腫瘍等の治療法として定着し、安定した成績をあげている。当教室では 1988 年 12 月より脳死肝移植の開始に備えて、豚を用いた肝移植実験を行い、全肝及び部分肝移植手術手技の向上と術中管理の確立に努めてきた¹⁾。本研究の目的は、これらの実験で得たデータをふまえて、術中循環動態、血液生化学的変動及び病理組織学的変化に検討を加え、小児肝移植を想定した部分肝移植実験 15 例について、移植肝細胞の再灌流時における viability の評価を行うため、AKBR (動脈血中ケトン体比)、SOD (superoxide dismutase)、LPO (lipid peroxide) 等のパラメーターを用いて移植肝の viability を検討し、移植肝再灌流の前後における肝細胞の超微形態学的変化を検討した。また、Mn-SOD (manganese superoxide dismutase) を指標として臓器自体に内在する内因性 SOD の動態について評価検討した。

対象と方法

1) 実験動物

小児肝移植を想定して、体重 25 kg 前後の雑種豚 (生後約 2 カ月) を用いた。

2) 麻酔

ketalar 10 mg/kg を筋注し、pancuronium 0.1 mg/kg を静注したのち気管内挿管を行い、半閉鎖式麻酔器に接続した。麻酔の維持は笑気麻酔に加え、isoflurane または ketalar を用いた。

3) 肝摘出及び肝保存方法

正中切開にて開腹後、総胆管、門脈、肝動脈を剝離し、全身ヘパリン化 (5000 IU) 後、門脈及び肝動脈に cannulation した。4°C ラクテック液 1000 ml を用いて肝を灌流すると共に、crush ice を用いて肝全体を冷却した。この後 4°C UW 液 (University of Wisconsin solution) 500 ml で肝を灌流し、摘出後は UW 液中に 4°C で単純冷却浸漬保存した。

4) 部分肝移植手術

摘出した肝は back table にて 1 例は外側左葉・内側左葉 (A) を切離、他の 14 例は外側左葉 (B) のみを切離し (図 1 a)、残存部をグラフトとして使用した。

1995 年 5 月 25 日受付, 1995 年 6 月 12 日受理

キーワード: 部分肝移植, 移植肝 viability, 再灌流障害, Mn-SOD, 電顕。

(別刷請求先: 〒193 八王子市館町 1163 東京医科大学八王子医療センター外科 山下晋矢)

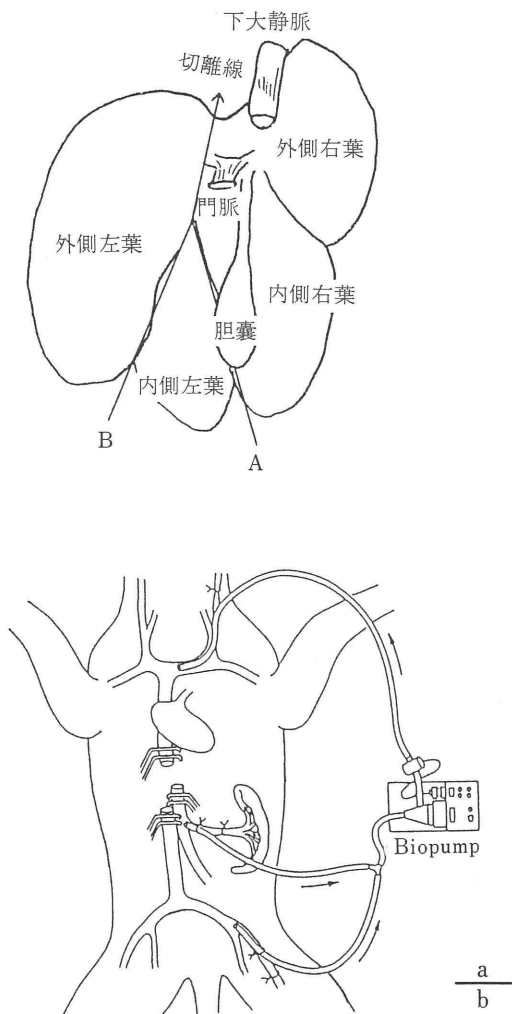


図 1 グラフト作製と V-V バイパス

a: グラフト作製: 外側左葉・内側左葉 (A), または外側左葉のみ (B) 切離し, 残存部をグラフトとした

b: V-V バイパス

レシピエントは左頸部より輸液用カテーテル, 動脈圧用カテーテル, 上大静脈内へ V-V バイパス送血路を挿入する。正中切開にて開腹後, 肝門部で胆管と肝動脈を切離し, 次いで門脈・肝下部下大静脈・肝上部下大静脈の順に剝離し, 門脈切断後, 脾静脈と下大静脈に V-V バイパス脱血路を挿入する。全身へパリン化 (2000 IU) 後, バイオポンプ (Biopump, Bio Medicus Inc.) を用いて V-V バイパスを開始し肝を摘出する (図 1b)。

次いで保存したドナー肝 (保存 4 時間後) を肝上部

下大静脈にて 4-0 polypropylene 糸 (Proline) を用いて吻合後, 門脈より 4°C ラクテック液 500 ml でグラフトを wash out する。門脈及び下大静脈を 4-0 Proline にて吻合した時点で V-V バイパスを終了する。その後肝動脈と胆管をそれぞれ 5-0 Proline にて吻合し手術を終了する。

術中は 15~25 ml/kg/h の輸液を行い, 術中出血は平均 513 g, 術中輸血は平均 925 ml, 無肝期は平均 62.7 分, 手術時間は平均 6 時間 13 分であった。

5) 血液生化学的検討

レシピエントについては術中は開腹前, 無肝期, 再灌流直後, 術後は第 1 病日に採取を行い, 一般生化学, AKBR, SOD, Mn-SOD, LPO を測定し移植肝の viability を検討した。

6) 移植肝の病理組織学的検討

移植直前 (保存 4 時間後) 及び再灌流直後に肝の辺縁を楔状に切除して肝組織を採取, 光顕ならびに電顕にて観察した。

① 光顕試料作製法

10% formalin にて固定し, hematoxylin-eosin 染色後観察した。

② 電顕試料作製法

2.5% glutaraldehyde で 72 時間固定後, 1% osmium tetroxide にて後固定し, ethanol にて脱水, epon 樹脂 (Epok812) に包埋した。中心静脈周囲を確認後, 超薄切片を作製し, 2% uranyl acetate と lead citrate の二重染色を行った。

③ 電顕試料の観察

肝小葉の zone 1 (中心静脈側) で透過型電顕 (Philips 社製 CM30) を用いて, 加速電圧 150 kv にて肝細胞及び類洞内皮細胞を観察した。

7) 核及びミトコンドリアの計測

作製した電顕標本の, zone 1 で撮影した 4,000 倍の電子顕微鏡写真を, カラー画像解析装置 (Olympus Avia 社製 SP500) を用いて, 核 (n=500) 及びミトコンドリア (n=1,000) の平均面積を定量分析し, 比較検討した。

8) 肝細胞内 Mn 測定

移植直前 (保存 4 時間後) 及び再灌流直後に採取した肝組織を低温灰化処理後 0.5 N 硝酸に溶解し, 肝細胞内 Mn をファーンズ原子吸光法により測定した。

9) ミトコンドリア内 Mn 測定

X 線微量分析電子顕微鏡 (Philips 社製

表 1 体重・肝重量比及び成績

No.	体重 (kg) (Donor/Recipient)	肝重量 (kg) (Donor/Recipient)	Graft (kg) 重量	Graft 比 (%) (Graft/Recipient)	転 帰
1	32/25	630/480	200	42	24 時間以内死亡
2	30/20	600/480	480	100	24 時間以内死亡
3	35/15	720/450	490	108	24 時間以内死亡
4	28/23	580/510	430	85	24 時間以内死亡
5	35/24	700/470	480	102	術中死 (出血)
6	40/20	800/520	650	125	生存
7	40/20	750/500	550	110	生存
8	30/25	620/500	400	80	生存
9	38/22	780/540	600	111	生存
10	40/30	800/600	650	108	生存
11	35/22	750/500	500	100	生存
12	35/25	710/550	500	91	生存
13	40/25	810/530	600	112	生存
14	35/30	800/640	630	98	生存
15	38/22	780/480	550	115	生存

PV9900 EDAX) を用いて、加速電圧 150 kv, 分析時間 100 秒, ビーム系 60 nm にて作製した電顕標本のミトコンドリア内 Mn を測定した。

なお、検定には Student の t-test を用いた。

結 果

1) 移植成績

部分肝移植 15 例の転帰は、24 時間以上生存 (生存群) が 10 例、24 時間以内死亡 (死亡群) が 5 例であった (表 1)。死亡群はいずれも再灌流時にグラフトより胆汁の排泄が不良であり、1 例は肝断端からの出血で術中に、他 4 例は術後早期に死亡するに至り、これらは肝不全 (primary non function) が関与するものと推測された。

2) 血液生化学的検査

① 一般生化学

transaminase, 胆道系酵素は手術時間の経過とともに増加傾向を示し、この変化は GOT が開腹前 40 ± 9 U/l から再灌流後 383 ± 78 U/l と最も著明であったが、生存群と死亡群との間に有意差は認められなかった。また GTP, LDH, ALP 等ではこの変化は軽微であった。T-Bil 及び凝固系検査では、再灌流の前後でむしろ死亡群の方が生存群よりも値の良い場合もあった。以上より、一般生化学検査は肝の viability を示す指標とはなり得なかった (図 2)。

② AKBR

開腹前の AKBR 値は症例による個体差

(0.40~1.25 平均 0.71) が大きいため、開腹前の値を個々の症例の基準値 (100%) とした。無肝期には両群とも 50% 以下に低下したが、生存群では再灌流後に $94 \pm 17\%$ となり、第 1 病日には $124 \pm 22\%$ まで回復した ($P < 0.01$ vs 前値)。一方、死亡群では再灌流後に $33 \pm 8.7\%$ とさらに低下した (図 3)。

③ SOD

開腹前の SOD 値は平均 3.0 ± 1.4 NU/ml であるが、無肝期には変動を認めなかった。再灌流後には、生存群で 35.0 ± 15.0 NU/ml, 死亡群では 7.7 ± 2.5 NU/ml となり、生存群で SOD 値の有意な上昇を認めた ($p < 0.01$ vs 前値)。また、生存群は第 1 病日に 25.2 ± 10.5 NU/ml と SOD 値の低下を認めた (図 3)。

④ Mn-SOD

再灌流前の Mn-SOD 値は生存群及び死亡群とも極めて低値であった。再灌流後には、生存群で 3.625 ± 1.0 NU/ml, 死亡群で 0.825 ± 0.6 NU/ml と生存群で Mn-SOD 値の有意な上昇を認めた ($p < 0.01$ vs 前値)。また生存群ではその後も Mn-SOD 値の高値が持続した (図 3)。

⑤ LPO

開腹前の LPO 値は平均 0.87 ± 0.43 n mol/ml であり、無肝期にやや低下傾向を認めた。死亡群で再灌流後に 1.7 ± 0.36 n mol/ml と LPO 値の有意な上昇を認めたが、生存群では変化を認めなかった ($p < 0.01$ vs 前値)。また、生存群も第 1 病日に軽度

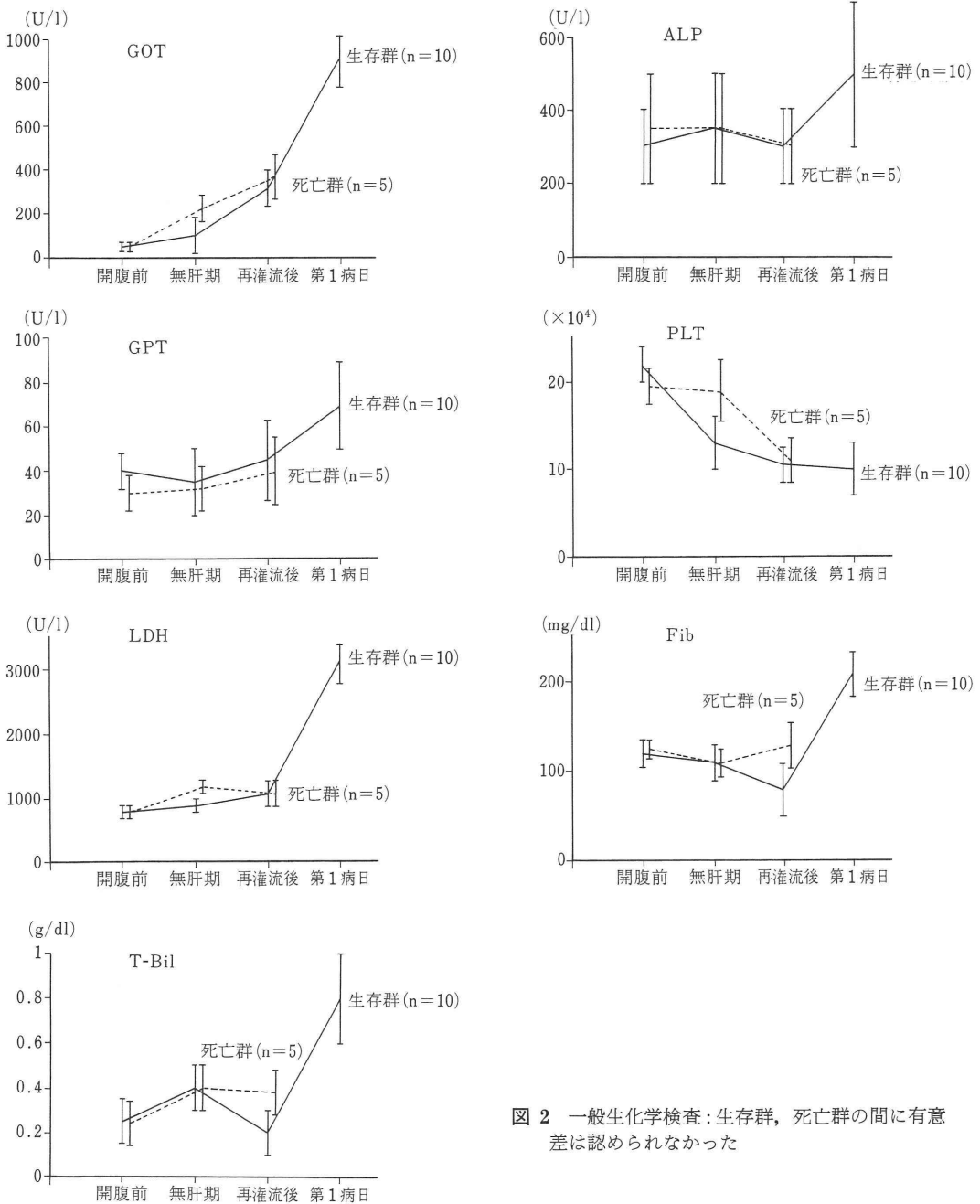


図 2 一般生化学検査: 生存群, 死亡群の間に有意差は認められなかった

の LPO 値の上昇を認めたが, 全経過を通じて生存群の LPO 値は 1.0 nmol/ml 以下であった (図 3).

3) 病理組織学的所見

① 光顕像

移植直前 (保存 4 時間後) では組織の形態はよく保たれており, 生存群と死亡群の間に差異は認めら

れなかった (図 4 a). 再灌流直後では, 生存群は類洞内にうっ血の所見を認めるが, 肝組織の形態はよく保たれていた (図 4 b). 一方, 死亡群では類洞内に広範なうっ血を認め, 一部に肝細胞の空胞変性及び肝細胞壊死の所見を認めた (図 4 c).

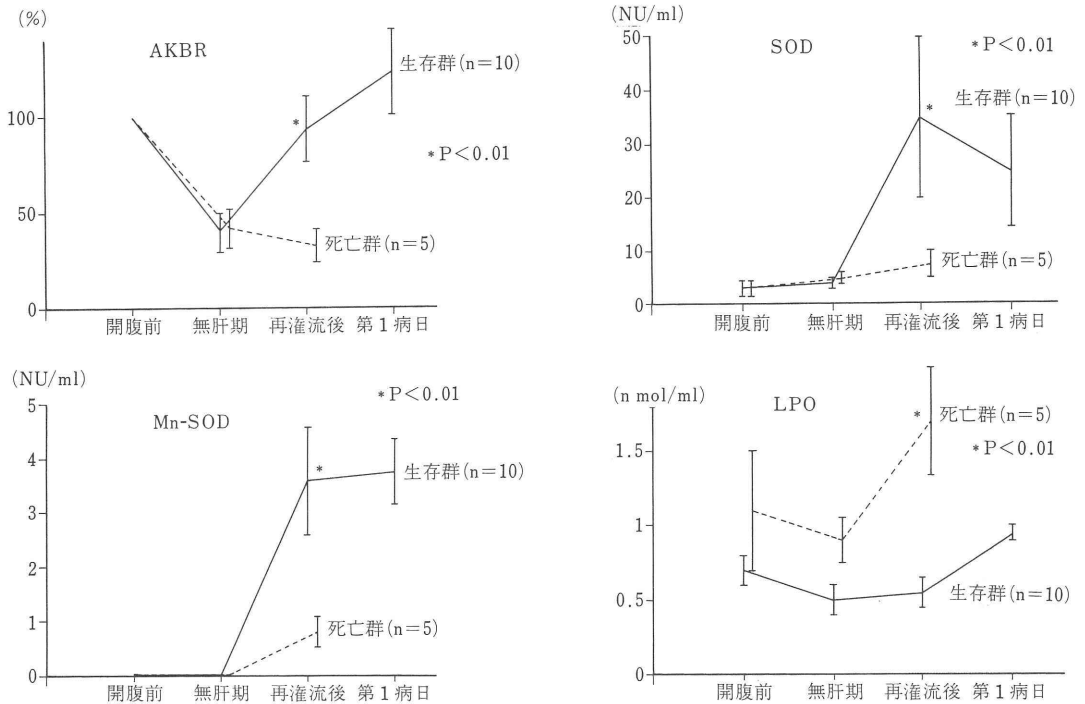


図 3 AKBR, SOD, Mn-SOD, LPO の変動

② 電顕像

移植直前では生存群及び死亡群とも、核、ミトコンドリア、小胞体など細胞内小器官の形態はほぼ正常に保たれており、形質膜の異常も認められなかった。また、類洞は軽度の開大を認めるものの内皮細胞はよく保たれていた(図 5a)。再灌流直後では生存群は、小胞体、ミトコンドリアの一部に軽度の障害を認めるものの、肝細胞の構築はよく保たれていた。類洞には、内皮細胞の一部に破綻を認め、Disse腔内に赤血球の侵入を認めた。類洞の障害に比較すると、肝細胞の障害は軽度であった(図 5b)。一方、死亡群の核は、縮小・変形し、ミトコンドリアの障害が顕著であった。小胞体も変形・開大・空胞化を呈し、類洞側形質膜の破綻が著明であった。また、類洞の内皮細胞の破綻も高度で、Disse腔は開大し、腔内に多形核白血球等の血球の侵入及び接着を認め、生存群と比べて、類洞・肝細胞とともに障害が高度であった(図 5c)。

4) 核及びミトコンドリアの計測

核の平均面積は、生存群では再灌流後に変化を認めなかった(41.2±2.41 → 40.7±2.22 μm²)。死亡群では再灌流後に縮小傾向を認めたが(39.7±3.15

→ 34.7±2.22 μm²)、両群間に統計学的な有意差は認められなかった(図 6)。

ミトコンドリアの平均面積は、再灌流後に、生存群ではやや減少傾向を示し(0.78±0.052 → 0.62±0.10 μm²)、死亡群ではやや増加傾向を示したが(0.79±0.066 → 0.81±0.13 μm²)、やはり両群間に統計学的な有意差を認めなかった(図 6)。

5) 肝細胞内 Mn 測定

再灌流前の肝細胞内 Mn 値は平均 3.3735±0.655 μg/wet.g で生存群と死亡群との間に有意差を認めなかった。再灌流後では生存群で 3.39±0.29 μg/wet.g と軽度の低下傾向と認めるのみであったが、死亡群では 1.93±0.48 μg/wet.g と Mn 値の有意な低下を認めた(p<0.01 vs 前値)(図 7)。

6) ミトコンドリア内 Mn 測定

ミトコンドリアのクリステを中心にして、EDAXを用いて random に点分析を行ったところ、Cu, Os, Pb, U, Mn 等の元素が検出された(図 8a, b)。Mn は図の白色分画に相当し、再灌流の前後で生存群と死亡群との間に有意差を認めなかったが、生存群(図 8a)では死亡群(図 8b)に比べ、再灌流後にミトコンドリア内 Mn 値の増加傾向がみられた。

表 2 部分肝移植後の血流量

	移植前の血流量 (ml/kg/min)	移植後の血流量 (ml/kg/min)	
		肝重量比 80~125% (n=14)	肝重量比 42% (n=1)
門脈血流量	21.3±2.1	18.0±5.3	5.4
肝下部下大静脈血流量	41.2±2.4	34.7±9.7	9.8

考 案

近年、末期肝不全状態にある胆道閉鎖症の患児に対する治療法として、肝移植手術は確立された治療法となっている。しかし、我が国においては、脳死に対する社会的コンセンサスが未だ得られず、脳死ドナーからの臓器提供は困難な状況であるため、生体部分肝移植手術が1989年より開始され、良好な成績をあげている。しかし、ドナー手術の危険性、再移植のための臓器確保の困難、社会的倫理的問題点など今後の課題となる点も多いのが実状である。

当教室では、臨床肝移植に備えて、1988年より豚を用いた肝移植実験を行い、現在までに全肝移植及び部分肝移植実験から術中循環動態、血液生化学的変動、病理組織学的変化に対して検討を行い、SOD、LPO等のパラメータにて移植肝のviabilityについて報告を行ってきた¹⁾。

本研究では小児肝移植手術を想定して行った豚の部分肝移植実験モデルにおいて、肝のエネルギーチャージに関与するAKBR、再灌流時のfree radicalの動態に関与するSOD、LPOに加え、内因性SODとしてMn-SODを用いて移植肝細胞のviabilityと、電子顕微鏡を用いて移植肝細胞の超微形態学的変化に関してviabilityの比較検討を行った。

移植肝体積について: 真島ら²⁾により、ビーグル犬を用いた同所性肝移植実験において、viabilityの良いレシピエント肝であれば、全肝の25~30%のvolumeを有するグラフトで、十分な肝機能が維持され良好な結果が期待できたと報告されている。自験例ではグラフト/レシピエントの肝重量比は42~125% (平均99.1%)であったが、42%のグラフトは24時間以内に死亡した(表1)。肝移植前後の血流動態を電磁血流計を用いて、門脈及び肝下部下大静脈で測定すると、移植前の平均門脈血流量は21.3±2.1 ml/kg/min、平均肝下部下大静脈血流は41.2±2.4 ml/kg/minであった。部分肝移植後の平

均門脈血流量は、肝重量比を80~125%と高値に作製した群では、18.0±5.3 ml/kg/minと術前の80%以上の血流量を保ったが、肝重量比42%の症例では5.4 ml/kg/minと術前の約25%と著明に低下した。同様に平均肝下部下大静脈血流量は、肝重量比80~125%の群では37.4±9.7 ml/kg/minと術前の90%以上であったが、肝重量比42%の症例では9.8 ml/kg/minとやはり25%以下と低値であった(表2)。これより肝重量比42%のグラフトでは肝血管床が不足して、肝血流量の減少と門脈圧の上昇、venous returnの減少をきたし、再灌流の前後で循環動態が維持できなかったものと推測された。一方肝重量比80~125%のグラフトでは循環動態の安定を得ることができ、肝重量比80~125%のグラフトは豚部分肝移植手術における適正なグラフト重量比であることが示唆された。また、肝重量比が小さく再灌流後に血流量の保持が困難な症例では耐術不能となることが予想され、以後の症例ではグラフト重量比を大きくすることとした。

一般生化学検査について: 移植肝のviabilityを評価するパラメーターとしては、輸血及び無肝期におけるバイパスによる溶血の影響もあり、一般生化学検査では再灌流の前後で生存群と死亡群の間に有意差を認めず(図2)、諸家の報告のように³⁾⁴⁾一般生化学検査では肝のviabilityを評価することは困難であった。

AKBRについて: 小沢⁵⁾は、ミトコンドリアの酸化的リン酸化におけるエネルギー基質として脂肪酸とグルコースに注目し、肝臓が障害をうけるとNADHの蓄積によってクエン酸合成酵素が阻害されてTCA回路の回転阻害が発生し、肝ミトコンドリアは脂肪酸のβ酸化によってのみATPを生成するようになり、その最終産物であるケトン体が蓄積してくるにより、AKBRが肝ミトコンドリア機能を鋭敏に反映することを明らかにしている。このようにAKBRは酸化的リン酸化の過程を反映して

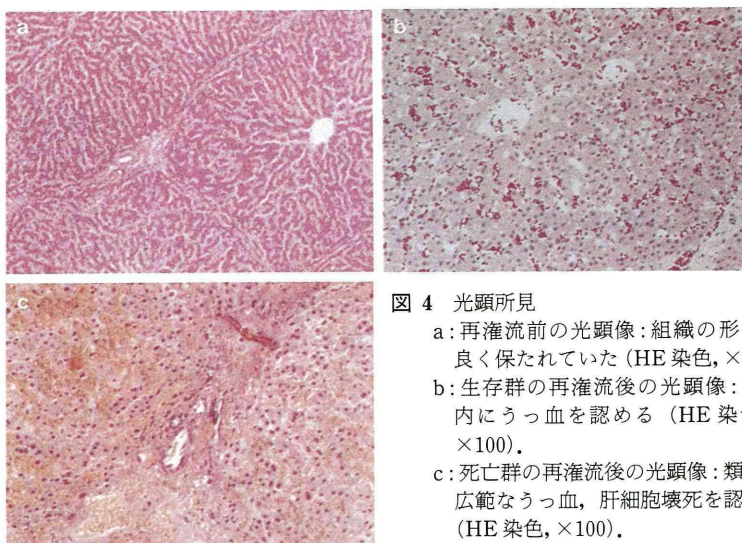


図 4 光顕所見

- a: 再灌流前の光顕像: 組織の形態は良く保たれていた (HE 染色, $\times 40$).
- b: 生存群の再灌流後の光顕像: 類洞内にうっ血を認める (HE 染色, $\times 100$).
- c: 死亡群の再灌流後の光顕像: 類洞の広範なうっ血, 肝細胞壊死を認める (HE 染色, $\times 100$).

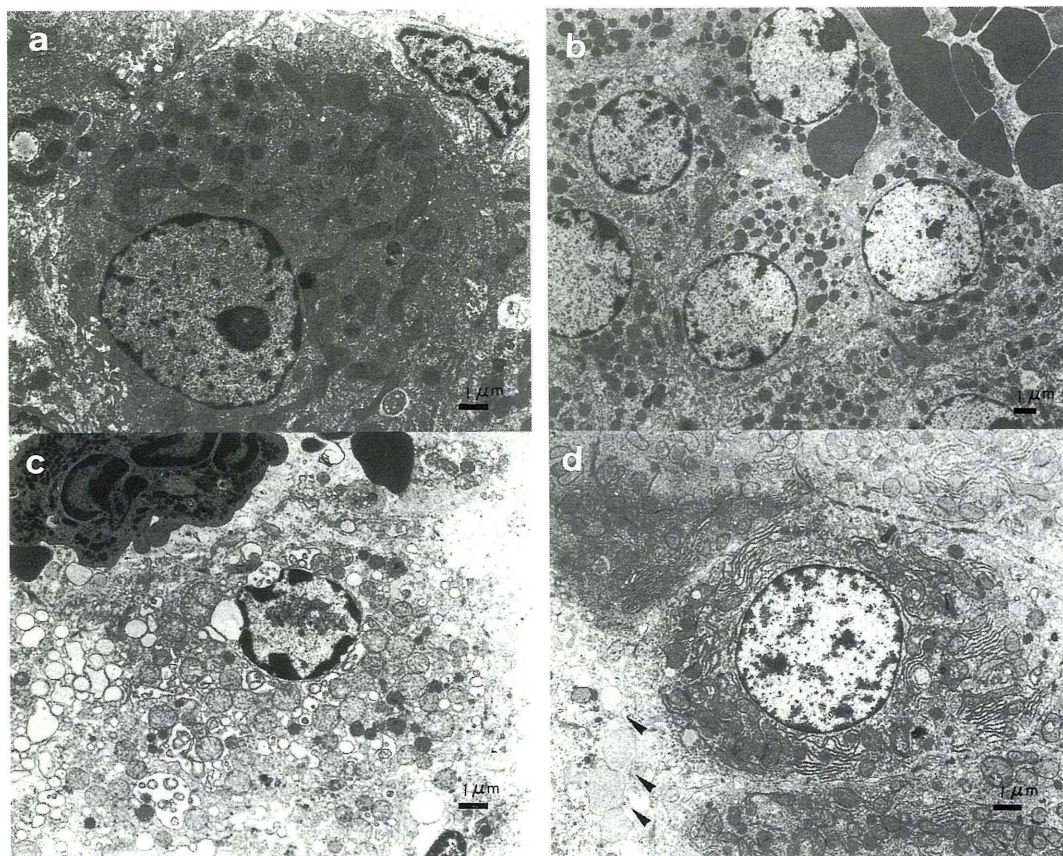


図 5 電顕所見

- a: 再灌流前の電顕像: 細胞内小器官, 類洞の形態は良く保たれている ($\times 4400$).
- b: 生存群の再灌流後の電顕像: 類洞内皮細胞に障害を認めるが, 肝細胞の障害は軽度であった ($\times 3000$).
- c: 死亡群の再灌流後の電顕像: 類洞, 肝細胞ともに障害が高度であった ($\times 4400$).
- d: 死亡群の再灌流前の電顕像の一例: 類洞内皮細胞に bleb 形成を認める ($\times 4400$).

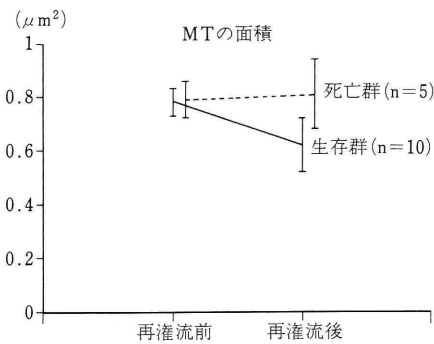
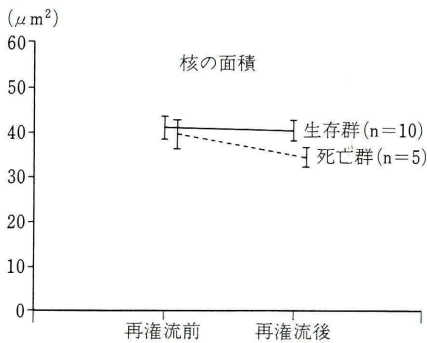


図 6 核, ミトコンドリアの面積の変動

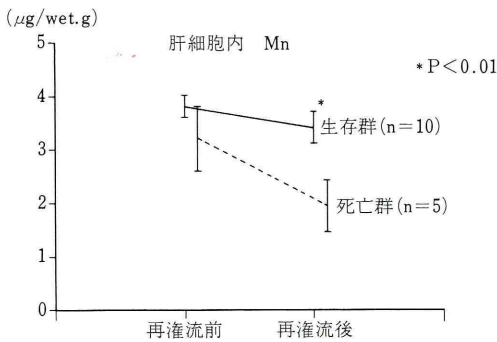


図 7 肝細胞内 Mn の変動

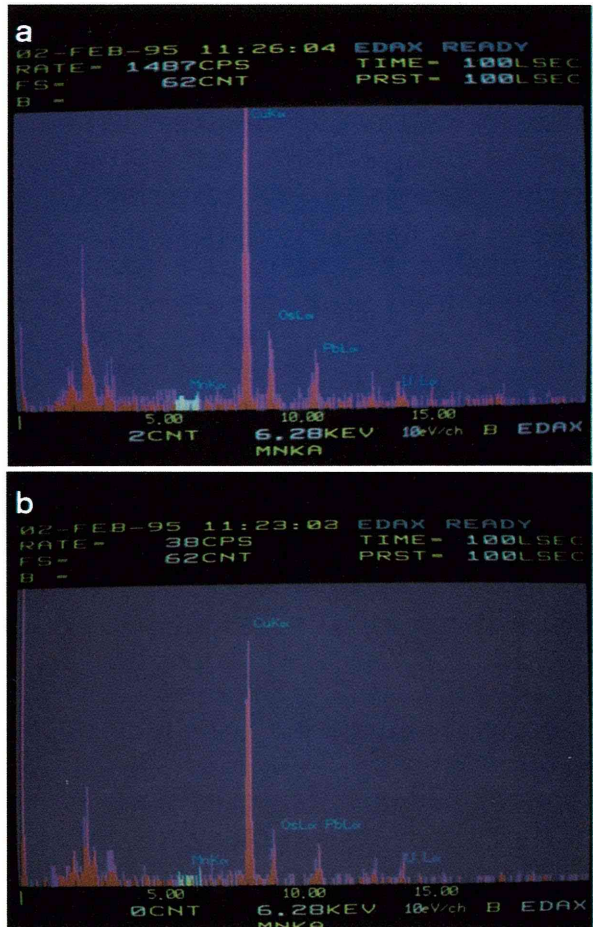


図 8 ミトコンドリア内 Mn の変動: EDAX を用いた分析で Cu, Os, Pb, U, Mn 等の元素が検出され, Mn は白色分画に相当する。

a: 生存群のミトコンドリア内 Mn の変動
b: 死亡群のミトコンドリア内 Mn の変動

いるため, グラフト肝機能に加え, 栄養状態, 肝血流量, 酸素濃度, 代謝負荷の増大等の全身状態も総合的に real time に反映し, エネルギー代謝における肝の viability を表しているといえる. このため小沢らは肝移植手術において AKBR を中心とした術中・術後管理を行い, AKBR 低値の際には graft failure や肝動脈血栓等の合併症の発生が示唆され, AKBR はグラフトの予後を反映すると報告してい

る⁴⁾⁵⁾. 自験例でも AKBR は, 開腹前の値を 100% として比較すると, 生存群では再灌流後に前値まで回復したが, 死亡群では有意に低下し, グラフトの予後を良く反映していた (図 3).

SOD について: SOD は生体内で発生する oxygen free radical を消去する代表的な酵素 ($O_2^- + O_2^- \rightarrow O_2 + H_2O_2$) であり, 移植肝の再灌流障害に関与するものと考えられているが, 中村ら⁶⁾ は豚を用

いた生体部分肝移植実験において、12 時間以上生存例のうち胆汁流出が良好な症例の SOD は増加傾向にあり、不良例では減少傾向にあると報告している。また彌宜田ら⁷⁾は豚肝移植モデルにおける肝組織中 SOD 活性と生存期間との関係で、長期生存群では SOD 活性の変化は軽度であったが、短期生存群では再灌流後に SOD 活性が低下したと報告している。一方、桜田ら⁸⁾によると肝移植における再灌流時の過酸化障害には free radical の関与は少なく SOD 活性の変化は認められないとの報告もある。自験例ではグラフトの再灌流後に、生存群で再灌流前値と比較して、有意な SOD 値の増加を認めたが、死亡群では再灌流後も SOD 値の上昇を認めず、また、生存群では再灌流直後から第 1 病日まで SOD 高値が継続した (図 3)。これは、SOD の半減期が約 15 分と極めて早いこと、SOD の分子量が腎糸球体濾過限界値よりも小さく速やかに血中から尿中へと排泄されること等より考慮して、単に細胞内より逸脱したのではなく、グラフト内での合成、あるいは細胞内より積極的な動員が行われ、SOD の上昇を生じたことが示唆され、SOD 活性は肝の viability を良く反映するものと推察された。

Mn-SOD 及び肝細胞内 Mn について:再灌流障害を防止する目的で、再灌流の前後に外因性の SOD を投与し、再灌流障害を軽減させる実験モデルは多数報告されている⁹⁾¹⁰⁾が、臓器自体に内在する内因性 SOD の検討はあまりなされていない。また各種肝疾患では、Mn-SOD が Cu, Zn-SOD と比較して高い診断的意義を有する¹¹⁾との報告もある。そこで SOD の isozyme である Mn-SOD 及び肝細胞内 Mn を内因性 SOD のパラメーターとして再灌流時の変動に関し検討を加えた。SOD は各組織別活性を比較すると、肝臓が約 60%以上を占め、次いで副腎、腎臓が約 10~15%を占めていることが知られている¹²⁾。またその isozyme として Cu・Zn-SOD, Mn-SOD, extracellular-SOD (EC-SOD) があり、これらの isozyme は細胞内に局在が認められ、Cu・Zn-SOD は細胞質に、Mn-SOD はミトコンドリアのクリステに、EC-SOD は細胞外の体液中に大部分含まれることが知られている¹³⁾¹⁴⁾。また微量元素の一つである Mn は酵素の補酵素 (cofactor) として存在するが、これを含む酵素は限られ、Mn-SOD, アルギナーゼ (arginase), ピルビン酸カルボキシラーゼ (pyruvate carboxylase) であることが明らかとな

っている。これらのことより、Mn-SOD 活性が移植肝のミトコンドリア機能を反映することが予想され、Mn-SOD 活性の測定と肝細胞内 Mn の測定を行った。新沢¹⁵⁾によると、SOD 活性は、肝硬変群では正常群より有意に低値を示し、また肝細胞内 Mn は、Mn-SOD 活性と相関し肝硬変群で低下したとの報告がある。しかし肝移植時の阻血・再灌流に伴うこれらの変動を検討した報告はなされていない。本研究では生存群において、再灌流後に Mn-SOD の有意な上昇を認めたが、死亡群ではこの変化は認められなかった (図 3)。またグラフトの肝細胞内 Mn は、再灌流前の値と比較して、死亡群では再灌流後に有意な低下を認めたが、生存群ではこの変化は軽微であった (図 7)。Mn-SOD は、肝細胞内においてミトコンドリアのクリステに局在が認められることより、再灌流後の Mn-SOD 値の上昇は、正常に機能しているミトコンドリアの総和を表し、グラフトの viability を良く反映しているものと判断された。

ミトコンドリア内 Mn について:再灌流前後のミトコンドリア内 Mn を、電顕標本よりエネルギー分散微量元素解析装置 (EDAX) を用いて測定した。ミトコンドリア内 Mn は極めて僅かであり、また EDAX による測定も目的元素を周囲の background と比較した半定量測定であり、このため電顕標本作製の際に使用した osmium, uranium, lead 等の重金属や銅メッシュによるピークの影響を考慮しなければならないが、再灌流後に生存群では死亡群と比較して、有位差は見られないものの軽度の Mn 分画の増加傾向を認めた (図 8)。これらのことより、血漿中 Mn は Mn-SOD の合成と連動して血漿中よりミトコンドリア内へと誘導された可能性が示唆された。

LPO について:Paynter¹⁶⁾はラットを用いた実験系にて、肝の SOD 活性の低下にともない二次的に脂質の過酸化が亢進することを報告し、丸林ら¹⁷⁾はラットを用いた虚血実験モデルにて、LPO が血流再開後に著明に増加することは、この過程に活性酵素が関与し、虚血に続く血流再開に伴って生じる過酸化脂質生成が、細胞障害を起こすと報告している。Kunimoto ら¹⁸⁾によると、活性酵素で惹起される形質膜障害は、形質膜に結合、密着して存在する鉄イオンを触媒として、形質膜の脂質過酸化反応が瞬時のうちに進行して生じると報告している。自験例の生存群では、再灌流の前後で LPO 値の変動を認め

なかったが、死亡群では再灌流後に LPO 値の有意な上昇を認めた (図 3)。これらより、free radical が形質膜に作用した結果生じる LPO の変動は、SOD の動態に反比例し、結果としてグラフトの viability を反映することが推測された。

組織学的所見について: 病理組織学的に組織の viability を検討すると、当実験で用いた UW 液は、一般的に 24 時間保存が可能と言われている。Momii, Koga¹⁹⁾ はラットを用いた UW 液による保存肝実験で、保存 8 時間頃より類洞の開大や bleb 形成を認めるが、肝細胞自体の変化は保存 24 時間頃までは軽微であったと報告している。

McKeown ら²⁰⁾ はラット肝を用い 4°C と 37°C 保存液中での形態変化を比較し、温保存では肝細胞の障害が類洞内皮細胞の変化に比べ早期に出現し、その程度も強く、一方冷保存では類洞の内皮細胞や微絨毛の変化が肝細胞の変化に先行し強く現れると報告している。Belzer ら²¹⁾ は灌流保存肝において肝細胞自体の変化が起こる前に、Kupffer 細胞の壊死及び Disse 腔の開大の所見が認められることを報告している。本研究では冷却単純浸漬保存 4 時間後に移植手術を施行したが、UW 液で保存されたグラフトは、移植時に生存群、死亡群間で生化学的、組織学的に有意差を認めず、この点に関してはグラフトの摘出、保存状態は両群間で差がみられないものと思われた。しかし再灌流後には、生存群と死亡群との間に組織学的に有意な変化を認めた。この変化は肝細胞内小器官よりも類洞系に著明であり、死亡群においては、類洞内皮細胞破綻が高度で、Disse 腔は著明に開大し、腔内に多形核白血球や Kupffer 細胞の侵入を認めた (図 5)。

再灌流障害について: 肝移植における ischemic injury とこれに続く reperfusion injury の問題は、ischemia 時における ATP の不可逆性の崩壊と reperfusion 時における oxygen free radical の発生が、それぞれ ischemic injury 及び reperfusion injury の発生の主たる原因であり、これらが重要な細胞障害をもたらすものと考えられている²²⁾。reperfusion injury を生じる際に、free radical の平均寿命は、 $10^{-6} \sim 10^{-8}$ sec. で、移動距離は 4.5~45 nm と考えられている²³⁾ ことと、実際の生体内では、脂質、蛋白質の濃度が高いことより、free radical の拡散距離は極めて短いと推定される。これらのことから reperfusion injury において free radical が産生

され、細胞障害を生じるためには、標的細胞と free radical が接触反応を起こしていることが障害発生に不可欠である。再灌流後の組織障害は、血流に接した類洞が free radical の産生の場となり、強い障害が発生すると推測された。中村ら²⁴⁾ によると、肝細胞の冷保存後と温虚血後では障害発生機序は異なり、前者では TNF 産生を主とする Kupffer cell の活性化、類洞内凝固、Ca の influx、ICAM-1 発現増加の関与が示唆されている。すなわち冷保存肝では、Kupffer cell の TNF 産生能は亢進し、再灌流障害は抗 TNF 抗体で抑制され、また肝類洞内皮細胞をみると ICAM-1 発現及び好中球接着、肝障害は増強したが、これらは Kupffer cell ブロックあるいは抗 ICAM-1 抗体にて抑制されている。これらより肝冷却保存・再灌流障害には活性化した Kupffer cell と類洞内皮細胞の変化に好中球接着が関与していると報告している。また、Takei ら²⁵⁾ によると、PNF (primary non function) では、類洞内の血流速度の低下と白血球膠着数の増加を認めたという報告がある。実際、自験例でも再灌流後の類洞障害は、肝細胞障害と比較して著明であった。また生存群と死亡群の再灌流後の電顕像を比較検討すると、生存群の類洞障害は軽度であったが、死亡群では類洞内皮細胞の破綻が高度となり、著明に開大した Disse 腔内に多形核白血球や Kupffer cell の侵入及び接着している所見が散見された (図 5)。

Coldwell ら²⁶⁾ によると、冷却単純浸漬保存の肝細胞自体の障害は軽度であっても、類洞内皮細胞及び微絨毛など類洞側の変化が移植・血行再開後の微小循環障害を惹起し、それが早期の移植肝機能を規定する因子であると報告している。自験例でも生存群と死亡群の生化学的所見と組織学的所見を比較して検討すると、再灌流前に両群間に生化学的差異を認めないが、電顕所見上死亡群の一例において、類洞内皮細胞の bleb 形成を早期に認めた (図 5 d)、これは生化学的所見を生じていないが、冷保存後にすでに類洞細胞の障害が生じ始めていることを示唆している。一方、再灌流後には、死亡群は生化学的及び組織学的に著明な変動を生じた。AKBR, SOD 低値、LPO 高値を認め (図 3)、類洞系細胞の破壊、血球の侵入・接触が著明に認められ、障害は類洞から肝細胞自体にまで及んでいる (図 5)。これは、グラフトの冷保存状態の差 (preservation injury) が、再灌流時における Kupffer cell の活性化と類洞内皮細胞の

ICAM-1 発現を誘導して、好中球の接着を促進し、類洞の再灌流障害 (reperfusion injury) を増強し、予後に反映したものと推測された。一方生存群においては、グラフトの冷保存状態が良好 (preservation injury が軽微) であるため、再灌流時における Kupffer cell の活性化と類洞内皮細胞の ICAM-1 発現を抑制し、再灌流後グラフト内で合成された SOD の働きにより、free radical を有効的に消去し、類洞及び肝細胞障害を最小限に抑えた結果、グラフトの viability が保たれたものと推測された。これらのことより、再灌流前にグラフトの viability を生化学的に判定することは困難であるが、再灌流後には、SOD をパラメーターすると、グラフトの viability は生化学的にも組織学的にも一致するため、SOD はグラフトの予後を判定する指標となり得るものと考えた。

グラフト viability の保持について：肝移植の成績を向上させるためには、血流再開時における循環動態を安定させるために、必要にして十分な大きさの適正サイズのグラフトを移植するとともに、グラフトの viability の保持が重要な問題であり、肝摘出、肝保存、肝移植、血流再開と続く一連の過程の中で、preservation injury と reperfusion injury が肝移植におけるグラフトの viability を障害する大きな要因となっている。これらの障害を最小限に抑えるため、保存液中に glucose, ATP 等のエネルギー物質を添加することは既に臨床で用いられている。また、再灌流の直前に free radical を除去する外因性の free radical scavenger を投与すること、冷保存時に Kupffer cell の活性化の阻止、類洞への血球の接着の抑制を、抗 Kupffer cell 抗体や、抗 ICAM-1 抗体の投与により行うこと等も臨床応用されつつあり、これらのものにより、肝移植時におけるグラフトの viability を良好に保つことが可能になることが示唆された。

結 語

豚を用いた同所性部分肝移植実験 15 例を行い以下の成績を得た。

- 1) 肝再灌流時における SOD の変化は、AKBR, LPO などと同様に再灌流障害の程度をよく反映していた。
- 2) 肝再灌流前後の組織変化は、肝細胞障害よりも類洞細胞障害が主体であることが判明した。

3) 肝再灌流時における Mn-SOD の変化は、ミトコンドリアの機能を反映しているものと推測され、肝細胞自体で合成された内因性 SOD の動態をよく反映していた。

4) 肝再灌流後の Mn-SOD の変化は、電顕所見と一致し、再灌流障害の程度を反映し、肝の viability を示す指標となることが示唆された。

謝辞：稿を終えるにあたり、御懇篤な御指導と御校閲を賜りました東京医科大学外科第三講座小柳泰久教授、木村幸三郎名誉教授に深甚なる謝意を捧げます。また終始御援助を賜った日本鋼管病院内科米井嘉一博士に心より感謝の意を表すとともに、本研究に終始御指導、御鞭撻下さいました諸教室員各位に感謝します。

尚、本研究の要旨は第 29 回日本小児外科学会総会及び第 94 回日本外科学会総会にて報告した。

文 献

- 1) 小柳泰久, 木村幸三郎, 青木達哉, 葦沢龍人, 土田明彦, 吉松昭彦, 青木利明, 小澤 隆, 山下晋矢, 宇田治, 川口 実: 豚を用いた同所性部分肝移植の実験的研究 (第一報). 東医大誌 49: 883~884, 1991
- 2) 真島 奨, 寺嶋宏明, 井ノ本琢也, 白潟義晴, 陳孟鳳, 粟根雅章, 菅野元喜, 徳家敦夫, 西澤文男, 森本泰介, Stefano Saad, 森敬一郎, 山岡義生: 同所性部分肝移植に於ける graft volume の限界. 日外会誌 95(臨時増刊号): 290, 1994
- 3) 植松武史: 肝移植のための viability assay 法. 日外会誌 90: 1765~1773, 1989
- 4) Asonuma K, Takaya S, Okamoto R, Yamamoto Y, Yokoyama T, Toda S, Ozawa K, Starzl TE: The clinical significance of the arterial ketone body ratio as an early indicator of graft viability in human liver transplantation. Transplantation 51: 164~171, 1991
- 5) 小沢和恵: 肝臓の外科 肝切除から肝移植へ. へるす出版: 171~173, 1992
- 6) 中村 司, 橋本 俊, 音部好宏, 清水保延, 南 宋人, 田中守嗣, 林 周作, 花井拓美, 品川長夫, 由良二郎, 長谷川良平, 箱井加津夫, 岡田陽介: プタを用いた生体部分肝移植の検討. 移植 25 (総会臨時号): 228, 1990
- 7) 禰宜田政隆, 横山逸男, 林 衆治, 大塚聡樹, 佐藤栄作, 小林孝彰, 安富元彦, 小池千裕, 高木 弘: プタ同所性肝移植モデルに於ける生存期間と肝組織中 superoxide dismutase 活性の変化. 日外会誌 95 (臨時増刊号): 286, 1994
- 8) 桜田正寿, 大河内信弘, 加藤博孝, 小山田尚, 里見進, 田口喜雄, 森 昌造, 渡辺伸之: 肝移植における

- 過酸化障害の関与. 移植 **25** (総会臨時号): 319, 1990
- 9) Minor T, Isselhard W: Role of the hepatovasculature in free radical mediated reperfusion damage of the liver. *Eur. Surg. Res.* **25**: 287~293, 1993
 - 10) 溝江昭彦, 近藤 敏, 田中公朗, 渡部幸明, 東 尚, 井沢邦英, 伊藤俊哉, 兼松隆之: 単糖修飾 SOD の肝移植再灌流障害に及ぼす効果について. *日外会誌* **95** (臨時増刊号): 289, 1994
 - 11) 稲垣孝雄, 沢木春二: 血清 Superoxide dismutase (SOD) 各種疾患に対する診断的意義. *医薬ジャーナル* **20**: 71~78, 1984
 - 12) Marklund SL: Superoxide dismutase in human tissues, cells, and extracellular fluid. *Clinical implications, Free Radical, Aging, and Degenerative Disease*: Alan R Liss Inc. New York, 509~526, 1986
 - 13) Kawaguchi T, Noji S, Uda T, Nakashima Y, Takeyasu A, Kawai Y, Takagi H, Tohyama M, Taniguchi N: A monoclonal antibody against COOH-terminal peptide of human liver manganese superoxide dismutase. *J. Biol. Chem.* **264**: 5762~5767, 1989
 - 14) Marklund SL, Holme Hellner L: Superoxide dismutase in extracellular fluid. *Chin. Chim. Acta.* **126**: 41~51, 1982
 - 15) 新沢陽英: 肝組織中微量元素濃度と SOD 活性の比較検討. *日消病誌* **84** (臨時増刊号): 160, 1987
 - 16) Paynter DI: *Biol. Trace Element Res.* **2**: 121~135, 1980
 - 17) Marubayashi S, Dohi K, Ezaki H, Yamada K, Kawasaki T: Preservation of ischemic liver cell prevention of damage by Coenzyme Q10. *Transplantation proceedings* **15**: 1297~1299, 1983
 - 18) Kunimoto M, Inoue K, Nojima S: Effect of ferrous iron and ascorbate-induced lipid peroxidation on liposomal membranes. *Biochem. Biophys. Acta.* **646**: 169~178, 1981
 - 19) Momii S, Koga A: Time-related morphological changes in cold-stored rat livers. *Transplantation* **50**: 745~750, 1990
 - 20) McKeown CMB, Edwards V, Phillips MJ, Harvey PRC, Petrunka CN, Strasberg SM: Sinusoidal lining cell damage: The critical injury in cold preservation of liver allografts in the rat. *Transplantation* **46**: 178~191, 1988
 - 21) Belzer FO, May R, Berry MN, Lee JC: Short term preservation of porcine livers. *J. Surg. Res.* **10**: 55~61, 1970
 - 22) Adkinson D, Hollwarth ME, Benoit JN, Parks DA, McCord JM, Granger DN: Role of free radicals in ischemia-reperfusion injury to the liver. *Acta physiol. Scand, Suppl.* **548**: 101~107, 1986
 - 23) 浅田浩二: 活性酸素の生成. *活性酸素*: 53, 1987
 - 24) 中村敏夫, 有井滋樹, 門田一宣, 藤田真一, 原田富嘉, 今村正之: 肝の冷保存再灌流障害と温虚血再灌流障害の発生機序に関する検討. *日外会誌* **95** (臨時増刊号): 286, 1994
 - 25) Takei Y, Marzi I, Gao W, Gores GJ, Lemasters JJ, Thurman RG: Leukocyte adhesion and cell death following orthotopic liver transplantation in the rat. *Transplantation* **51**: 959, 1991
 - 26) Coldwell JC, Currin RT, Tanaka Y, Thurman RG, Lemasters JJ: Reperfusion injury to endothelial cells following cold ischemic storage of rat livers. *Hepatology* **10**: 292~299, 1989

A Study of Graft Viability after Reperfusion in Porcine Orthotopic Partial Liver Transplantation

Shinya YAMASHITA, Tatsuya AOKI and Tatsuto ASHIZAWA

Department of Surgery, Tokyo Medical College
(Director : Prof. Yasuhisa KOYANAGI)

The viability of hepatocytes after reperfusion was evaluated experimental porcine orthotopic partial liver transplantation. In the present study, graft viability after reperfusion was evaluated based on arterial ketone body ratio (AKBR), superoxide dismutase (SOD), and lipid peroxide (LPO), and was compared with ultrastructural changes. The kinetics of endogenous SOD were also studied using manganese superoxide dismutase (Mn-SOD) as an index.

Changes in AKBR, SOD, LPO and Mn-SOD after reperfusion reflected the viability of the liver, and corresponded to prognosis as well as histological changes. Based on the kinetics of Mn in transplanted hepatocytes, changes in Mn-SOD, in particular, were thought to reflect the mitochondrial functions and endogenous SOD that was synthesized in hepatocytes. This study demonstrated that changes in Mn-SOD before and after the reperfusion of the liver could be an index of graft viability, as it reflected the severity of reperfusion injuries.

<Key words> Orthotopic partial liver transplantation, Graft viability, Reperfusion injury, Manganese superoxide dismutase, Electron microscopy.
