

# 肝虚血障害に対する $Ca^{2+}$ 拮抗剤 (塩酸ジルチアゼム) の 防御効果ならびに肝移植への応用に関する実験的研究

奈良県立医科大学第1外科教室

和田 隆 昭

## PROTECTIVE EFFECTS OF A CALCIUM CHANNEL BLOCKER, DILTIAZEM, ON HEPATIC ISCHEMIA AND ITS APPLICATION TO LIVER TRANSPLANTATION IN DOGS

TAKA AKI WADA

*The First Department of Surgery, Nara Medical University*

Received May 15, 1989

*Summary*: The purpose of this study was to investigate the protective effects of a calcium channel blocker, Diltiazem (DZ), on ischemic liver damage.

Adult mongrel dogs were used as experimental animals. Hepatic ischemia was induced by clamping the portal vein and the hepatic artery for 60 minutes with establishment of a porto-jugular bypass. The administration of DZ at a dose of 70  $\mu\text{g}/\text{kg}$  intravenously before hepatic ischemia and thereafter via portal vein at a dose of 10  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$  well restored the hepatic blood flow (HBF:  $92 \pm 5\%$ ) and arterial ketone body ratio (AKBR:  $1.15 \pm 0.16$ ) 1 hour after reperfusion compared with untreated controls (HBF:  $61 \pm 7\%$ , AKBR:  $0.53 \pm 0.09$ ).

Furthermore, it was examined whether or not DZ might prevent primary non-function in liver transplantation. As the model of primary non-function, warm ischemically damaged liver for 20 minutes was transplanted orthotopically. In untreated animals, all five recipients died from massive bleeding caused by liver failure within 24 hours after hepatic grafting. On the other hand, when DZ was administered intravenously at a dose of 70  $\mu\text{g}/\text{kg}$  to the donor just before inducing warm ischemia, and also to the recipient via portal vein at a dose of 10  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$ , three of six recipients (50%) could survive over 48 hours after grafting without liver failure.

In conclusion, these results suggest that DZ has protective effects on liver ischemia and prevents primary non-function in liver transplantation.

### Index Terms

hepatic ischemia, primary non-function, protective effect, liver transplantation, calcium channel blocker (Diltiazem)

### I 緒 言

近年、肝胆臓手術に際して門脈・肝動脈に対する血管外科手法が導入され、より積極的な切除が試みられつつ

ある。しかし、肝臓は虚血により容易に障害を受けるとされ、手術時の肝流入血行遮断は重篤な肝虚血障害を引き起こす可能性がある。また肝移植においても、donor 肝が受ける虚血障害は、移植後の肝機能発現に影響をおよ

ぼすと考えられ、いかにして虚血障害を軽減して、primary non-function を防止するかが重要な課題の一つである。

臓器の虚血障害は、虚血中の障害と血流再開時に発生する障害 (reperfusion injury) とからなるとされている<sup>1)</sup>。これらの障害過程に Ca イオンの細胞内への influx が大きく関与するとの報告<sup>2)</sup>がある。したがって、Ca<sup>2+</sup>拮抗剤を投与することで、肝流入血の一時的な遮断による肝虚血を伴う外科手術をより安全に施行でき、また肝移植においては、移植肝の primary non-function 防止に役立つ可能性が考えられる。

そこで、まず雑種成犬を用いて肝流入血遮断による肝虚血障害モデルを作成し、肝虚血障害に対する Ca<sup>2+</sup>拮抗剤 (塩酸ジルチアゼム以下 DZ) の防御効果を肝代謝機能、全身および肝循環動態の面から検討した。さらに DZ が肝移植において、移植肝の虚血障害による primary non-function を防止できるか否かを検討する目的で屍体肝移植モデルを作成し、DZ の生存期間および死因におよぼす影響を検討した。

## II 実験方法

### [実験 1]

肝虚血障害に対する Ca<sup>2+</sup>拮抗剤 (DZ) の防御効果を検討することを目的に、雑種成犬を用いて肝虚血障害モデルを作成し、無処置群と DZ 投与群とに分けて、虚血前・中・後の肝代謝機能、肝組織血流量、全身循環動態について比較検討した。

#### 1. 実験材料および肝虚血障害モデルの作成

実験前日より絶食とした体重 15 kg 前後の雑種成犬を用いて、硫酸アトロピン 0.03 mg/kg、ペントバルビタールナトリウム 25 mg/kg、バンクロニウムブロマイド 4 mg を静注後、気管内挿管しレスピレーターを用いて room air にて調節呼吸 (15 ml/kg/回, 10 回/min) で維持した。実験開始時より左肘静脈より EL-1 号液を 20 ml/kg/hour 投与した。輸血はヘマトクリット値を測定しながら 30% 前後に維持するように適宜施行した。右大腿動脈にカテーテルを挿入し動脈血採血および圧測定用とした。腸間膜静脈より二本のカテーテルを挿入し、一本は門脈圧測定用、一本は薬剤注入用とした。

肝虚血障害モデルは、肝十二指腸韌帯 (肝動脈・門脈を含む) をサティンスキー血管鉗子を用いて、60 分間肝流入血を遮断することにより作成した。またその際、門脈うっ血による影響を除外することを目的として、内径 4 mm、長さ 90 cm のシリコンチューブを用いて脾静脈一左外頸静脈間に門脈バイパスを設置した。バイパス

は肝血流遮断と同時に開放し、血流再開と同時に閉鎖した。

#### 2. 実験群

I 群: 無処置群 (n = 5)。

II 群: DZ 少量投与群 (n = 5)。

DZ を肝流入血遮断 30 分前から 2 時間 10 μg/kg/min 門脈内持続投与するとともに、肝血流遮断直前に 70 μg/kg 静脈内投与する群。

III 群: DZ 大量投与群 (n = 5)。

DZ を肝流入血遮断 30 分前から 4 時間 20 μg/kg/min 門脈内持続投与するとともに、肝血流遮断直前に 280 μg/kg 静脈内投与する群。

#### 3. 検査項目および方法

肝血流遮断前、血流遮断開始後 30 分、血流再開直前、血流再開 15 分、30 分、60 分、120 分、180 分の各時点で、以下の検査を施行した。

##### 1) 動脈血中ケトン体比 (AKBR) の測定

大腿動脈より 5 ml のヘパリン加採血を行い、直ちに 4°C で 3000 rpm にて 10 分間遠心分離した血漿中の acetoacetate と β-hydroxybutyrate を定量し、動脈血中ケトン体比 (acetoacetate/β-hydroxybutyrate) を算出した。定量には、Williamson の酵素法の原理<sup>3)</sup>に基づいた動脈血中ケトン体測定用試薬 (ケトレックス、三和化学) を用いた。

##### 2) Lactate の測定

大腿動脈よりヘパリン加採血を行い、血漿分離を直ちに行い、Lactate 定量キット (デタミナー LA、協和メディクス) を用いた。Lactate oxidase, peroxidase 系による酵素法にて測定した。

##### 3) 一般生化学検査

一般生化学検査として、血清中の glutamic oxaloacetic transaminase (GOT), glutamic pyruvic transaminase (GPT), creatinine (Cr) を測定した。

##### 4) 肝組織血流量 (HBF) の測定

肝外側右葉被膜下 1 cm に、特殊白金電極 (ワイヤタイプエレメント UHE-201, ユニークメディカル社) 刺入し、水素クリアランス式組織血流計 (ユニークメディカル社 PHG-201) を用い、水素ガス吸入法で Kety の理論式<sup>4)</sup>により水素クリアランス曲線を描き算出した。肝血流遮断前の HBF の値を 100% として換算した。

##### 5) 平均動脈圧 (MAP), 平均門脈圧 (MPVP) の測定

大腿動脈、腸間膜静脈に留置したカテーテルにモニター (マルチスーパー 2F 22 三栄) を接続して測定した。

##### 6) 動脈血中 DZ 濃度の測定

大腿動脈よりヘパリン加採血を行い、血漿分離を直ち

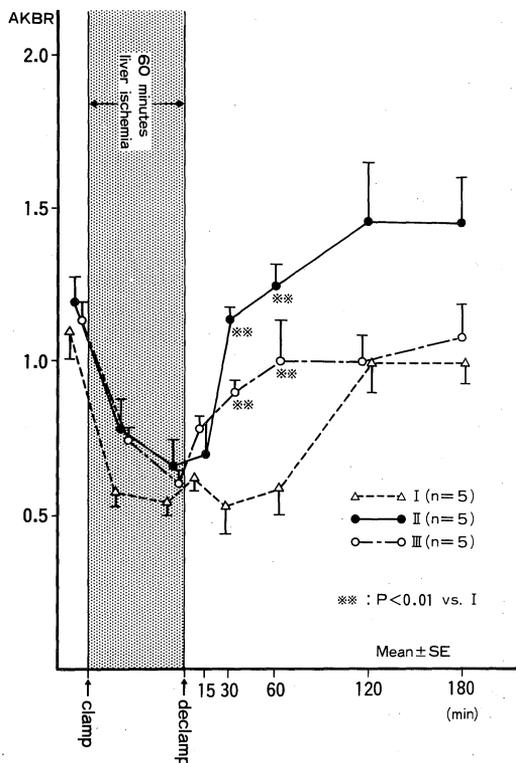


Fig. 1. Time courses of changes in arterial ketone body ratio before and after liver ischemia.

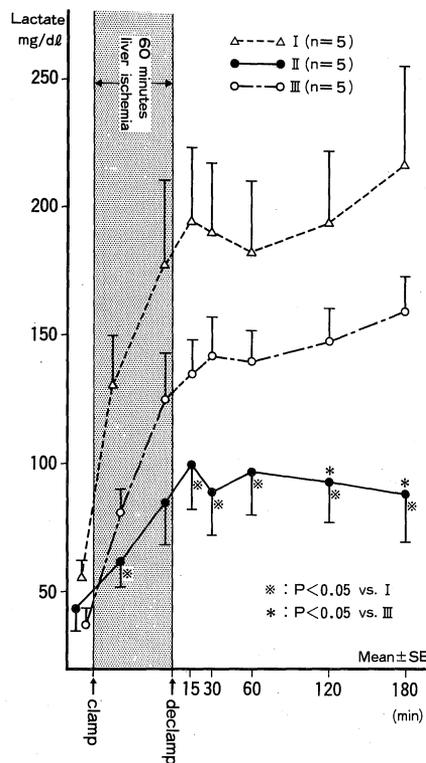


Fig. 2. Time courses of changes in lactate before and after liver ischemia.

に行い、血漿検体 1 ml に蒸留水 0.5 ml, 1M リン酸緩衝液 (1M リン酸二カリウムを 1M リン酸一カリウムで PH 9 に調整) 0.5 ml, およびシクロヘキササン 6 ml を加え 10 分間振盪する。2000 rpm で 5 分間遠心分離した後、シクロヘキササン層の 5 ml を分取し、これを減圧法にて濃縮乾固した。この残渣に内部標準液 (パラヒドロキシン安息酸イソプロピル 500 mg/ml 0.002 N 塩酸溶液) 0.3 ml を加えて溶解し、その 200  $\mu$ l を HPLC (高速液体クロマトグラフ LC-6A 島津製作所) によって分析した。

結果は平均値  $\pm$  標準誤差 (mean  $\pm$  SE) で表した。有意差検定には Student の t 検定を用い、危険率  $P < 0.05$  を有意とした。

#### [実験 2]

Ca<sup>2+</sup>拮抗剤 (DZ) の肝移植における primary non-function 防止効果を検討することを目的に、雑種成犬を用い、心停止後屍体内に放置した温阻血障害肝を同所性に移植する屍体肝移植モデルを作成し、無処置群と DZ 投与群とに分けて、生存期間および死因を比較検討した。

#### 1. 実験材料

実験前日より絶食とした体重 15 kg 前後の雑種成犬を

用いた。1 回の移植実験に、donor, recipient に各 1 頭、輸血用に 1 頭の計 3 頭の犬を使用した。

#### 2. 実験群

I 群：無処置群 (n=10)。

10-30 分間屍体内に放置した温阻血障害肝を移植する群。

II 群：DZ 投与群 (n=6)。

I 群と同様であるが、donor の心停止前に DZ を 70  $\mu$ g/kg 静注し、肝灌流液中にも 20 mg/l 加えるとともに、さらに recipient に 10  $\mu$ g/kg/min の DZ を門脈内に投与する群。

#### 3. 犬同所性同種屍体肝移植手術

##### 1) Donor の手術手技

Donor は硫酸アトロピン 0.03 mg/kg, ペントバルビタールナトリウム 25 mg/kg を静注後、気管内挿管し、レスピレーターにて維持した。

正中切開にて開腹し、門脈、総肝動脈、肝下部大静脈の剝離処置後、腹部大動脈より急速脱血して心停止させ、心停止後屍体内で室温下 (約 33°C) にて 10-30 分間放置した。その後門脈より、4°C に冷却したヘパリン

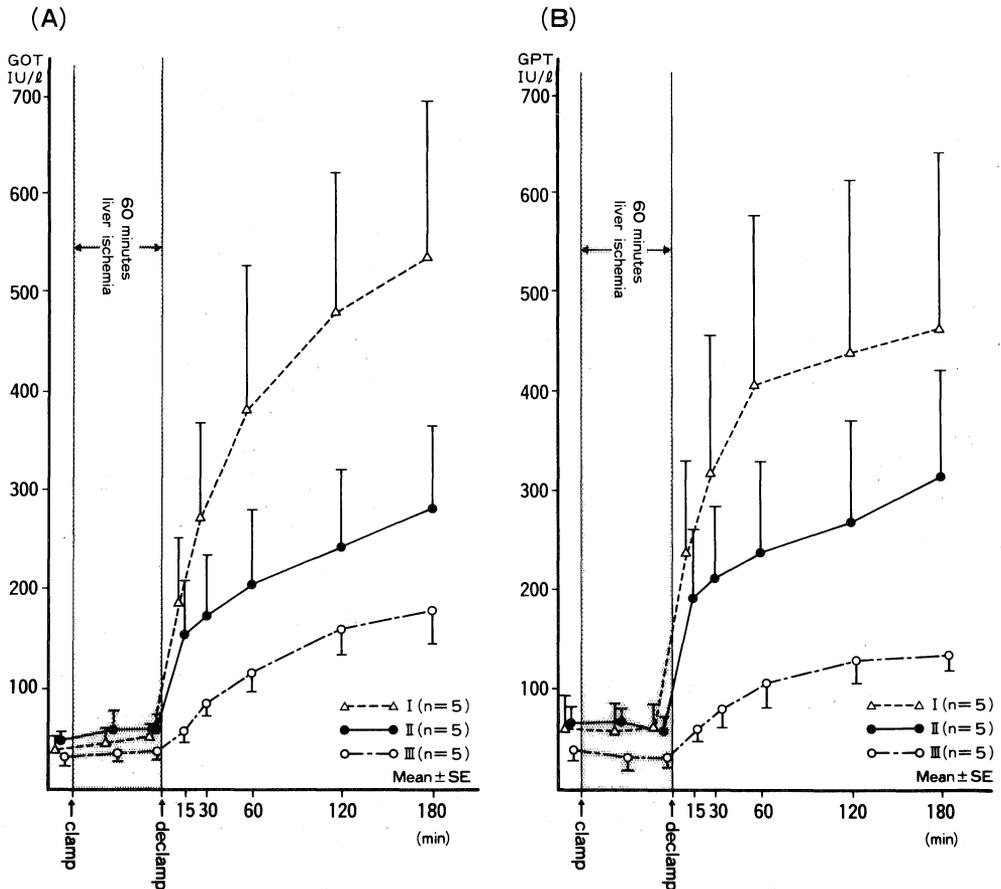


Fig. 3. Time courses of changes in GOT and GPT before and after liver ischemia.

(A) GOT

(B) GPT

5000 単位含有の乳酸加リンゲル液 1000 ml にて、約 1 m の落差で灌流、冷却し、肝を摘出した。摘出後、移植まで 4℃生理食塩水中に単純浸漬した。なお温阻血時間は、心停止後から灌流開始までとした。

## 2) Recipient の手術手技

Donor と同様の麻酔により挿管、レスピレーターにて維持した。無肝期には内径 4 mm、長さ 1 m 前後のシリコンチューブを用い、右大腿静脈—右外頸静脈間バイパス、脾静脈—左外頸静脈間バイパスを設置した。腸間膜静脈にカテーテルを挿入し薬剤注入用とした。肝上部下大静脈、門脈の血管吻合終了後、脾静脈—左外頸静脈間バイパスを閉鎖し、門脈血流を再開した。肝下部下大静脈より graft 内の灌流液を wash out させ、同血管を clamp し、同時に肝上部下大静脈を declamp した。

続いて肝下部下大静脈の血管吻合を行い、総肝動脈を最後に吻合した後、胆嚢十二指腸吻合にて胆道再建を行

った。

## 3) 術後管理

術後は中心静脈より持続点滴を行い、食事摂取可能となった時点で抜去した。

免疫抑制は、シクロスポリンとステロイドの併用療法とした。シクロスポリンは、術翌日より 5 mg/kg 静脈内投与とし、食事摂取可能となれば、15 mg/kg 経口投与とした。ステロイドは、術当日 200 mg 静脈内投与し、術翌日には 40 mg とし、以後 4 mg/日ずつ減量して、4 mg/日を維持量とした。

## 4. 生存期間とその死因

生存期間は、門脈血流再開時から死亡時までとした。死亡時、全例、病理解剖を行い、死因を確認し比較検討した。

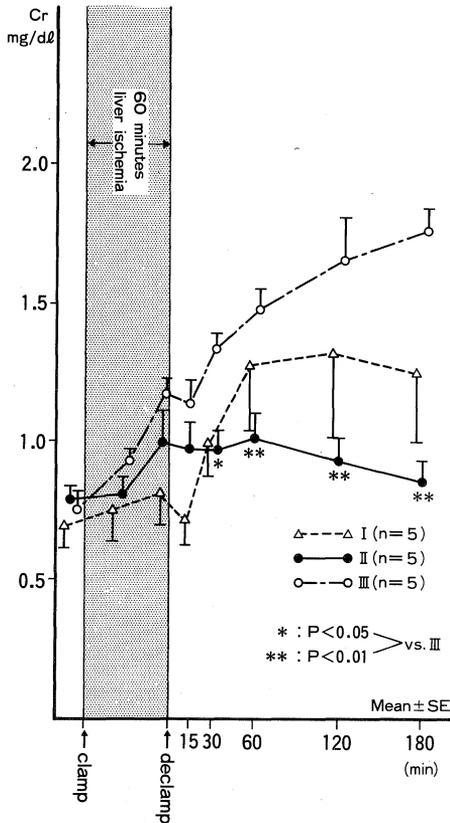


Fig. 4. Time courses of changes in creatinine before and after liver ischemia.

### III 実験結果

#### [実験 1]

#### 1. 動脈血中ケトン体比 (AKBR)

AKBR は, Fig. 1 に示すごとく肝血流遮断前に 1.1 前後であったが, 肝血流遮断により三群とも 0.6 前後と著明に低下した. その後 I 群では血流再開 120 分後までは前値に回復しないのに比べて, II 群・III 群では I 群に比較して回復は有意に促進され ( $P < 0.01$ ), 血流再開 30 分後には各々  $1.2 \pm 0.14$  ( $n=5$  mean  $\pm$  SE),  $0.9 \pm 0.04$  ( $n=5$ ) と前値に回復した.

#### 2. Lactate

Lactate は Fig. 2 に示すごとく, I 群・III 群とも肝血流遮断により急激に増加した. 血流再開後もさらに増加し, 180 分後には I 群  $217 \pm 37$  mg/dl ( $n=5$  mean  $\pm$  SE), III 群  $161 \pm 13$  mg/dl ( $n=5$ ) となった. しかし II 群では, 肝血流遮断による増加の程度は軽度で, 血流再開 60 分後より低下し始め, 180 分後には,  $89 \pm 19$  mg/dl ( $n=5$ ) と I 群・III 群に比べて有意に低値を示した ( $P <$

0.05).

#### 3. 一般生化学検査

GOT は Fig. 3(A) に示すごとく, 三群とも肝血流遮断時には上昇を認めなかった. I 群では血流再開 15 分後すでに  $192 \pm 58$  IU/l ( $n=5$  mean  $\pm$  SE), 180 分後  $535 \pm 159$  IU/l ( $n=5$ ) と急激に上昇するのに対し, II 群および III 群では血流再開 15 分後  $155 \pm 46$  IU/l ( $n=5$ ),  $64 \pm 9$  IU/l ( $n=5$ ), 180 分後  $283 \pm 80$  IU/l ( $n=5$ ),  $180 \pm 32$  IU/l ( $n=5$ ) と増加は軽度である傾向を示したが, 三群間に有意差を認めなかった.

GPT も GOT と同様, Fig. 3(B) に示すごとく, I 群は血流再開 15 分後に  $241 \pm 87$  IU/l ( $n=5$  mean  $\pm$  SE), 180 分後  $463 \pm 176$  IU/l ( $n=5$ ) と急激に上昇するのに対し, II 群および III 群では血流再開 15 分後  $197 \pm 62$  IU/l ( $n=5$ ),  $61 \pm 9$  IU/l ( $n=5$ ), 180 分後  $317 \pm 102$  IU/l ( $n=5$ ),  $134 \pm 15$  IU/l ( $n=5$ ) と増加は軽度である傾向を示したが, やはり三群間に有意差を認めなかった.

Cr は Fig. 4 に示すごとく, 三群とも肝血流遮断により増加した. I 群・III 群では血流再開後もさらに増加して, 180 分後には I 群  $1.26 \pm 0.26$  mg/dl ( $n=5$  mean  $\pm$  SE), III 群  $1.76 \pm 0.08$  mg/dl ( $n=5$ ) となった. しかし II 群では, 血流再開 60 分後には低下し始め, 180 分後には  $0.86 \pm 0.07$  mg/dl ( $n=5$ ) と前値に回復した.

#### 4. 肝組織血流量 (HBF)

Fig. 5 は肝血流遮断前の HBF を 100% として, HBF の変動を示したものである. I 群では血流再開後も低値を持続し, 180 分後でも  $59 \pm 5\%$  ( $n=5$  mean  $\pm$  SE) と回復しないのに対して, II 群では回復は有意に促進され ( $P < 0.01$ ), 血流再開 60 分後には  $92 \pm 5\%$  ( $n=5$ ) とほぼ前値にまで回復した. III 群では回復はさらに速く, 血流再開 15 分後すでに  $85 \pm 9\%$  ( $n=5$ ) となり, 30 分後には  $105 \pm 9\%$  と前値に回復した.

#### 5. 平均動脈圧 (MAP), 平均門脈圧 (MPVP)

MAP は Fig. 6 に示すごとく, 三群とも肝血流遮断により低下した. I 群・III 群では血液再開後 MAP は上昇し始めるが, 30 分後より再度低下し, 180 分後には I 群  $62 \pm 8$  mmHg ( $n=5$  mean  $\pm$  SE), III 群  $67 \pm 6$  mmHg ( $n=5$ ) となった. しかし II 群では低下せず, 180 分後には  $93 \pm 6$  mmHg ( $n=5$ ) と I 群・III 群に比べて有意に高値を示した ( $P < 0.05$ ).

MPVP は Fig. 7 に示すごとく, 三群とも肝血流遮断により上昇した. 血流再開後は直ちに低下し始め, 全経過を通じて三群間に有意差を認めなかった.

#### 6. 動脈血中 DZ 濃度

動脈血中 DZ 濃度は Fig. 8 に示すごとく, 肝血流遮断

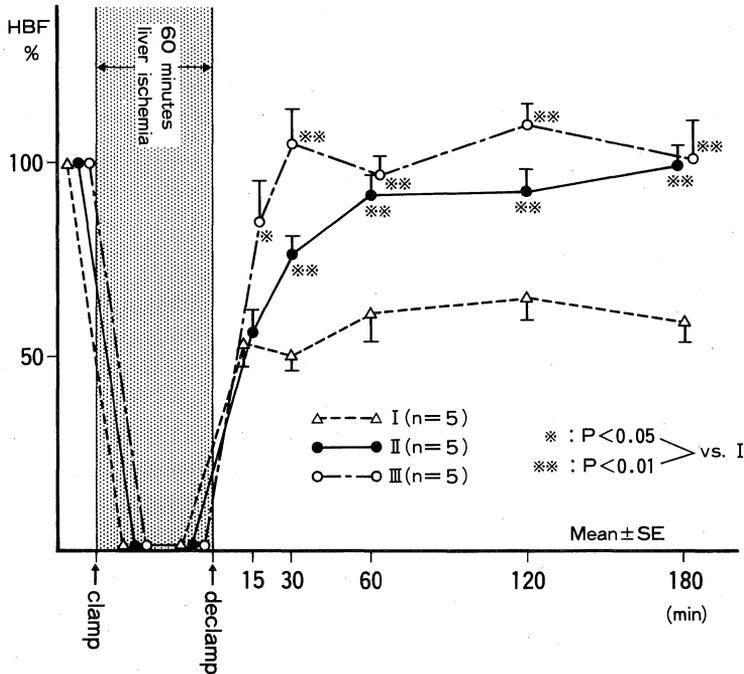


Fig. 5. Time courses of changes in hepatic blood flow before and after liver ischemia.

直前の静脈内投与と門脈内持続投与により肝血流遮断 60 分後にはII群 270±76 ng/ml (n=5 mean±SE), III群 610±182 ng/ml (n=5) と上昇し, III群でより高値を示した. 血流再開後は直ちに低下して, 15 分後にはII群 133±30 ng/ml, III群 278±79 ng/ml となり, 以後は 180 分後までほとんど変動しなかった.

[実験 2]

同所性同種屍体肝移植犬の生存期間とその死因におよぼす DZ の影響

生存期間とその死因は, Table 1 に示すごとく, 無処置群である I 群では, 温阻血時間が 10 分の 2 例は, それぞれ 34 日, 5 日間と長期生存し, その死因は肺炎 (34 日), 腹膜炎 (5 日) であった. 温阻血時間が 15 分の 2 例中 1 例は, 肝不全にて死亡したものの 4 日間生存した. 温阻血時間が 20 分以上になると, 全例が 24 時間以内に肝不全による出血にて死亡した. しかし, DZ を投与した II 群では, 20 分の温阻血障害肝移植であるにも関わらず 6 例中 3 例 (50%) は, それぞれ, 10 日, 5 日, 3 日と 48 時間以上生存した. しかもその 3 例の死因を見ると, それぞれ, 肝動脈血栓 (10 日), 腸重積症 (5 日), 腸重積症 (3 日) と, 移植肝の primary non-function による肝不全死ではなかった.

IV 考 察

近年, 肝胆膵領域における外科学の進歩に伴い, いままで切除不能であった肝癌, 胆管癌および膵癌に対して積極的に血管合併切除を施行し切除可能症例が増加してきている. しかし肝流入血行を遮断することによる手術時の肝虚血障害が問題となる. また肝移植においても, 技術の向上した今日でも避けて通ることができないのは移植肝の虚血障害であり, いかにして虚血障害を防御し viability の良い移植肝を recipient に提供できるか, すなわち primary non-function を防止するかが大きな問題である.

以前より肝臓の虚血障害に関する研究<sup>5),6)</sup>が行われ, 肝臓は虚血によって容易に障害を受けるとされている. 虚血障害の機序<sup>7)</sup>は大きく二つに大別されると考えられる. 一つは虚血中の無酸素下で進行する過程であり, いま一つは虚血後血流再開により不可避的に起こる活性酸素による障害である.

虚血中の無酸素によりミトコンドリアの ATP 合成が止まり急速に細胞内 ATP 含量が低下するのにもない, イオンの能動輸送が阻害され細胞内へ Ca イオンが流入する<sup>7)</sup>. その結果 phospholipase A2 が活性化され, リン脂質や蛋白の分解が生じ細胞膜障害を起こすと考えられ

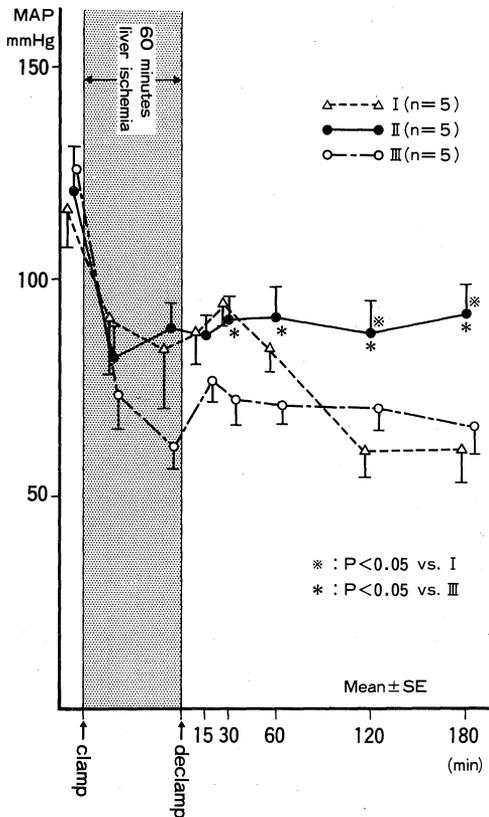


Fig. 6. Time courses of changes in mean arterial pressure before and after liver ischemia.

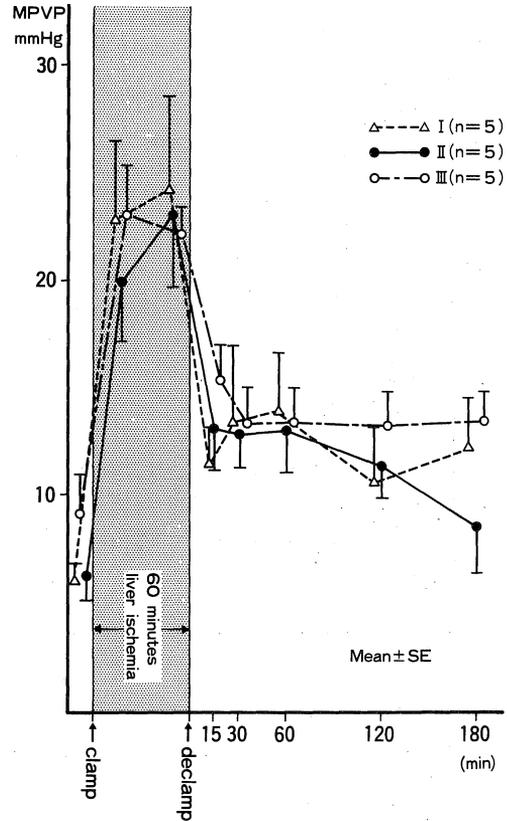


Fig. 7. Time courses of changes in mean portal venous pressure before and after liver ischemia.

る。また血管内皮細胞障害を伴う血管攣縮と血液 Sludge 形成も合併して肝微小循環をも障害する<sup>8),9)</sup>と考えられる。

さらに虚血後血流を再開すると、虚血中細胞内に増加した還元物質およびキサンチン脱水素酵素からキサンチン酸化酵素への転換により活性酸素が発生する<sup>10)</sup>。この活性酸素によりリン脂質や蛋白が過酸化障害を受け細胞膜障害を起こすと考えられる。また活性酸素は、小胞体 Ca ポンプも不活化し、細胞内 Ca イオン濃度の蓄積をさらに助長し、ひいてはミトコンドリアの酸化的リン酸化を抑制する。この活性酸素発生にも Ca イオンが関与するとの説<sup>2)</sup>がある。すなわち、細胞内 Ca イオンの増加により Ca<sup>2+</sup>-activated neutral protease が活性化され<sup>11)</sup>、キサンチン脱水素への転換を助長し、活性酸素の発生をもたらすものと考えられている。

したがって細胞内への Ca イオンの influx の増加を抑制することで虚血障害を軽減できる可能性が考えられる。心筋虚血障害や腎虚血障害に対する Ca<sup>2+</sup>拮抗剤の防御効果については現在多数報告されている<sup>12),13),14)</sup>。しか

し肝虚血障害に対する Ca<sup>2+</sup>拮抗剤の防御効果に関する報告<sup>15)</sup>は少ない。そこで、雑種成犬を用いて肝流入血行遮断による肝虚血障害モデルを作成し、虚血前・中・後の肝代謝機能、肝および全身循環動態を中心に Ca<sup>2+</sup>拮抗剤 (DZ) の防御効果を検討した。

水素クリアランス法により測定した肝組織血流量は、無処置群では肝虚血後の回復が不良で、血流再開 180 分後でも前値に回復しないのに対して、DZ 投与群では血流再開後 60 分以内にほぼ前値にまで回復した。Flaim ら<sup>16)</sup>は、DZ が肝血管抵抗を減少させ肝血流量を増加させると報告している。本実験でも I 群と III 群の平均動脈圧・平均門脈圧・肝組織血流量の変動をみると、両群間に平均動脈圧および平均門脈圧に有為な差を認めなかったにも関わらず、I 群に比較して III 群では肝組織血流量が有意に増加していた。このことは、DZ が肝虚血後の肝血管抵抗を減少させる作用を有することを示唆するものと考えられる。この肝血管抵抗減少は、DZ の血管拡張作用によるものだけなのか、あるいは虚血による血管内皮

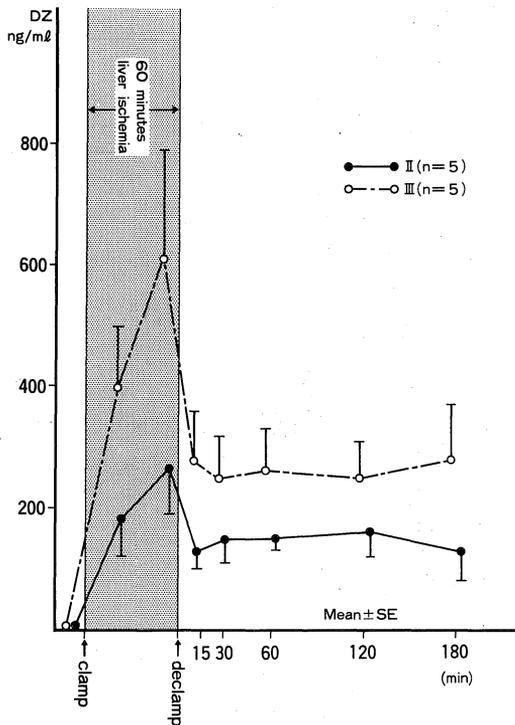


Fig. 8. Time courses of changes in DZ concentration in serum before and after liver ischemia.

細胞障害を伴う血管攣縮が起こるのを防御したためなのかはさらに今後の検討を要する。いずれにせよ、DZが肝虚血後の肝組織血流量を増加させたことは肝機能回復にとって重要な意義を有するものと考えられる。

事実、肝ミトコンドリアの  $NAD^+/NADH$  を的確に反映し、肝の energy charge level とよく相関すると言われている動脈血中ケトン体比<sup>17)</sup>が、DZ 投与群では無処置群に比して回復が有意に促進されていた。この動脈血中ケトン体比の回復促進は、逸脱酵素である GOT, GPT が DZ 投与群で無処置群に比して低値を示したことから、たんに肝組織血流量が増加した結果によるものだけでなく、さらに DZ が虚血肝細胞障害を直接防御している可能性も考えられる。

以上のごとく、DZ を投与することにより肝虚血後の肝組織血流量および動脈血中ケトン体比が良好に回復し、逸脱酵素が低値であったことから、DZ は肝虚血障害に対する防御効果を有するものと考えられた。

しかしながら、GFR (腎糸球体濾過率) と密接な関係があり腎機能障害の指標としての Cr の変動をみると、DZ の投与量が多い III 群では I 群に比べて高値である傾向を示した。また末梢循環動態により影響を受け易い lactate の変動をみても両群とも増加し続け回復しなかった。これは、平均動脈圧が III 群において、I 群と比較して低値を示す傾向を認めたことと考え合わせて、III 群

Table 1. Survival time and cause of death in canine orthotopic liver transplantation with warm ischemically damaged liver

Group	Warm ischemic time	Dog. No.	Survival time	Cause of death
Control	10 minutes	17	34 days	Pneumonia
		19	5 days	Peritonitis
	15 minutes	21	4 days	Liver failure
		20	6.5 hours	Bleeding
	20 minutes	22	19 hours	Bleeding
		54	9.5 hours	Bleeding
26		7.5 hours	Bleeding	
43		7.5 hours	Bleeding	
30 minutes	59	6 hours	Bleeding	
	27	6.5 hours	Bleeding	
DZ	20 minutes	55	10 days	Hepatic arterial thrombus
		52	5 days	Intussusception
		62	3 days	Intussusception
		58	2 days	Bleeding
		51	19 hours	Bleeding
		53	18 hours	Bleeding

では前述したごとく、肝虚血障害に対する防御効果はあるものの、末梢血障害を引き起こしているものと考えられた。これは DZ の投与量が影響している可能性が考えられる。

そこで III 群に比べて DZ の投与量が少ない II 群を III 群と比較してみると、平均門脈圧には有意差を認めなかったが、平均動脈圧は II 群では III 群に比して肝虚血中・後を通じて有意に高値を示した。また Cr および lactate の変動に関しても II 群では III 群に比べて有意に低値を示した。しかし肝組織血流量の回復は、II 群では III 群に比べて遅れた。このことは、III 群では肝末梢レベルまで充分血管抵抗が減少して肝組織血流量が増加したが、全身の末梢血管抵抗減弱作用も強く、平均動脈圧が II 群に比べ有意に低値となり、末梢循環障害が著明に出現したことによるものと考えられた。逆に II 群では全身の末梢血管抵抗の減少は III 群に比べ軽度であるために平均動脈圧は高値を維持し得たが、肝血管抵抗の減少もやはり III 群に比べて軽度であるために、平均動脈圧が高値を示すのにも関わらず肝組織血流量の回復が III 群より遅れたものと推察された。

Warltier ら<sup>18)</sup>は、犬を用いての冠血流量に関する実験で、DZ を 15 または 30  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$  で静脈内投与すると冠血流量が増加したと報告している。平川ら<sup>19)</sup>は犬を用いての実験で、DZ を 10~30  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$  で点滴静注すると投与開始とともに腎血流量は増加するが、0.1 mg/kg 以上 one shot 静注すると逆に腎血流量は減少したと報告しており、やはり投与量が問題になるものと考えられた。

血流再開後の動脈血中 DZ 濃度は II 群では 150 ng/ml 前後、III 群では 250 ng/ml 前後であった。Morselli らは、臨床において冠血管拡張作用を示し、心虚血障害を防止できる至適血中濃度は 100~200 ng/ml と報告<sup>20)</sup>している。本実験結果でも全身循環動態に影響を及ぼさないで肝虚血障害を防御できる DZ の至適血中濃度は 150 ng/ml 前後と考えられ、臓器は異なるが至適血中濃度は、ほぼ一致すると推測できた。

以上より肝流入血行遮断による肝虚血障害に対して  $Ca^{2+}$ 拮抗剤である DZ を適切な濃度で投与することにより全身循環動態に影響をおよぼさないで肝虚血障害を軽減できる可能性が示唆された。

そこで DZ が肝移植における移植肝の虚血障害保護効果を有するか否か、いかにえれば primary non-function の防止に有効かどうかをさらに検討した。Primary non-function のモデルとして、急速脱血により心停止させ、室温下にて屍体内に放置した温阻血障害肝を同所性に移

植した。屍体肝移植後の機能発現を期待することはきわめて困難で、Van Syk<sup>21)</sup>らは豚屍体肝移植では室温保存で 30 分が限界であると報告している。犬屍体肝移植の阻血限界はさらに短く、宮武ら<sup>22)</sup>によれば 15 分とされている。本実験でも温阻血時間 10 分、15 分、20 分、30 分間の犬同所性屍体肝移植を施行したが、温阻血時間が 10~15 分間では生存例も認めるものの、温阻血時間が 20 分以上になると、全例が移植後 24 時間以内に肝不全による出血にて死亡した。死亡時肝組織学的所見では広範囲に肝細胞壊死を認め、小葉内に高度の出血巣が存在し、primary non-function による肝不全と考えられた。

しかし、DZ 投与群における 20 分温阻血障害肝移植では、6 例中 3 例は移植後 48 時間以上生存した。死因は肝動脈血栓、腸重積で、死亡時の肝組織学的所見をみても一部に軽度の肝細胞壊死を認めるのみで、いずれも primary non-function によるものとは考えられなかった。

以上より、DZ は肝流入血行の一時的な遮断を伴う外科手術における肝虚血障害の防御効果を有し、また肝移植における primary non-function の防止にも有効である可能性が示唆された。

## V 結 語

肝虚血障害に対する  $Ca^{2+}$ 拮抗剤 (DZ) の防御効果を検討することを目的に、雑種成犬を用いて 60 分間肝流入血行を遮断して肝虚血障害モデルを作成し、虚血前・中・後の肝代謝機能、肝組織血流量、全身循環動態について比較検討した。さらに DZ が肝移植において、移植肝の虚血障害による primary non-function を防止できるか否かを屍体肝移植モデルを作成し、その生存期間および死因について検討して以下の結果を得た。

### 1. 肝虚血障害モデルにおいて

1) 動脈血中ケトン体比は、肝血流遮断により全例著明に低下した。無処置群では、血流再開後 120 分後まで前値に回復しないのに対して、DZ を投与することにより回復は有意に促進され、血流再開 30 分後にはほぼ前値に回復した。

2) 肝組織血流量は、無処置群では血流再開 180 分後でも前値の  $59 \pm 5\%$  と回復しないのに対して、DZ を投与することにより血流再開 60 分以内に前値に回復した。

3) GOT, GPT は血流再開後無処置群では急激に増加したのに対して、DZ を投与することにより増加の程度を軽減した。

4) lactate は、無処置群では血流再開後、急激に増加し、血流時間 180 分後には  $217 \pm 37 \text{ mg}/\text{dl}$  と高値を示したのに対して、DZ 少量投与群では、血流再開後 60 分よ

り低下しはじめ、180分後には $89 \pm 19$  mg/dlと有意に低値を示した。しかしDZ大量投与群では血流再開後も高値であり、180分後も $161 \pm 13$  mg/dlと高値を示した。

5) Crは、肝血流遮断により全例増加した。無処置群およびDZ大量投与群では血流再開後もさらに増加した。しかしDZ少量投与群では血流再開60分後より低下しはじめ、180分後には前値に回復した。

6) 平均動脈圧は、肝血流遮断により全例低下した。無処置群およびDZ大量投与では、血流再開180分後低値を示したが、DZ少量投与群では高値を維持した。平均門脈圧は、DZを投与しても変化を認めなかった。

7) 血流再開後の血中DZ濃度は、DZ少量投与群では150 ng/ml前後、DZ大量投与群では250 ng/ml前後であった。

以上より、DZは肝虚血障害に対する防御効果を有しており、全身循環動態に影響をおよぼさずに肝虚血障害を防御できるDZの至適血中濃度は150 ng/ml前後と考えられた。

## 2. 屍体肝移植モデルにおいて

無処置群では温阻血時間が20分以上になると、全例24時間以内に肝不全で死亡したのに対して、DZを投与することにより50%の例に移植肝のprimary non-functionの発生はみられず、48時間以上の生存例が得られた。

以上より、DZは肝移植におけるprimary non-functionの防止や肝保存に役立つ可能性が示唆された。

本論文の要旨は、第24回日本移植学会総会(1988年9月、福岡)および第89回日本外科学会総会(1989年3月、東京)において発表した。

稿を終えるに臨み、御指導、御校閲を賜りました第1外科学教室中野博重教授、ならびに御校閲、御助力を賜りました生化学教室神谷知彌教授、第3外科学教室北村惣一郎教授に深謝致します。さらに、直接の御指導、御教示を賜りました中島祥介講師、ならびに御助力を頂いた教室の諸兄に感謝致します。

## VI 文 献

- 1) 西田俊郎, 川島康生, 田川邦夫: 代謝 24: 379, 1987.
- 2) John, L. F.: Progress in liver disease. chapter 20, Grune and Stratton, New York, p347, 1982.
- 3) Williams, D. H., Mellanby, J. and Krebs, H. A.: Biochem. J. 82: 90, 1962.
- 4) Kety, S. S.: Pharmacol. Rev. 3: 1, 1953.
- 5) Raffuci, F. L., Lewis, J. L. and Wangenteen, O. H.: Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 83: 639, 1953.
- 6) Goodall, R. G. V., Hyndman, W. W. B. and Gund, F. N.: Arch. Surg. 75: 1011, 1957.
- 7) Kamiike, W., Watanabe, F., Hashimoto, T., Tagawa, K., Ikeda, Y., Nakao, K. and Kawashima, Y.: Biochem. J. 91: 1349, 1982.
- 8) Otto, G., Wolff, H. and David, H.: Transplant. Proc. 16: 1247, 1984.
- 9) Swenson, O., Grana, L. and Inouye, T.: Arch. Surg. 95: 451, 1967.
- 10) Granger, D. N., Rutili, G. and McCord, J. M.: Gastroenterology 81: 22, 1981.
- 11) Sasaki, T., Kikuchi, T., Yumoto, N., Yoshimura, N. and Murachi, T.: J. Biol. Chem. 259: 12489, 1984.
- 12) Zamanis, A., Verdeti, J. and Leiris, J. D.: J. Molecul. Cell. Cardiol. 14: 53, 1982.
- 13) Richard, B. W., George, W. and John, H. D.: Surgery 94: 276, 1983.
- 14) Thomas, J. B., Particia, E. A., Joel, A. G., Ruth, E. B., Dennis, C. D. and Robert, W. S.: J. Clin. Invest. 74: 1830, 1984.
- 15) Peck, R. C. and Lefer, A. M.: Agents. Act. 11: 421, 198.
- 16) Flaim, S. F. and Zelis, R. F.: Chest 78: 187, 1980.
- 17) 小澤和恵: 日外会誌. 84: 753, 1982.
- 18) Wartier, D. C. and Gross, G. J.: Nitrendipine (Scriabine, eds.). Urban and Schwarzenberg, Baltimore, p365, 1984.
- 19) 平川方久, 塩飽善友, 安治敏樹, 小坂二度見: 麻醉と蘇生 11: 159, 1975.
- 20) Morselli, P. L., Rovei, V., Mitchard, M., Durand, A., Gomeni, R. and Larribund, J.: New Drug Therapy with a Calcium Antagonist (Bing, R. J., ed.). Excerpta Medica, Amsterdam, p152, 1979.
- 21) Van Syk, J., Tait, I. and Eiseman, B.: Surgery 58: 374, 1965.
- 22) 宮武実, 伊藤福太郎, 小西陽一, 豊川三郎, 中嶋日出雄, 大下征夫, 島野吉裕, 伊藤信行, 杉原誠一: 移植 8: 57, 1973.