

## 腎灌流保存における viability に関する研究

— ことに灌流液中の諸酵素について —

奈良県立医科大学泌尿器科学教室

小 原 壮 一

**STUDIES ON THE SIGNIFICANCE OF ENZYMES IN PERFUSATE  
AS A PARAMETER OF VIABILITY IN PERFUSED KIDNEY  
—WITH SPECIAL REFERENCE TO LDH AND ITS ISOZYMES—**

SOICHI OHARA

*Department of Urology, Nara Medical University*

Received March 31, 1989

*Summary:* Based upon a well-acknowledged concept that the viability of a preserved organ exclusively depends upon the maintainance of mitochondrial function, this study was performed using variable damaged dog kidney by warm ischemic intervention from 0 to 120 minutes (warm ischemic time, WIT). The isolated kidney subjected to WIT was perfused with cold fibrinogen-free plasma on the machine for 18 hours and re-autotransplanted for the judgment of the graft function.

During preservation, several common enzymes, such as LDH, GOT, GPT, Al-P and CPK were determined at 3 occasions, e.g. at 3 hrs, 6 hrs and 18 hrs of preservation. With regard to LDH, the isozyme pattern was analysed as well as total activity. All data for each enzyme was surveyed in the relationship with WIT and interpreted focusing on its reliability as a parameter of viability based on a function of re-autotransplanted graft.

Consequently, the following results were confirmed in the work.

LDH and LDH isozyme were the most sensitive according to both preservation time and length of WIT in several enzymes which escaped into the perfusate from preserved kidney after warm ischemia. Though GOT in perfusate was not so sensitive as LDH and LDH isozyme, GOT elevated in proportion to the length of WIT. But the other enzymes in the perfusate did not so elevate remarkably compared to WIT 0 and 120 minutes as control groups.

Comparing the results between the graft function and the LDH activity in wash-out sample, author decided that LDH activity value was 12 I.U/g (graft weight) as the critical value in wash-out sample.

Thus, an analysis of the LDH activity and LDH isozyme in the wash-out sample can provide considerable and precise information about kidney viability as a graft.

## Index Terms

preserved dog kidney, perfusion, warm ischemic time (WIT), LDH activity, LDH isozyme ratio

## 緒 言

腎移植の基礎的研究分野の中で保存腎の viability の判定は腎移植、ことに死体腎移植の普及に直結する重要な課題である。これまで、保存腎の viability の判定の parameter として、lactic dehydrogenase (LDH) をはじめとして glutamic oxaloacetic transaminase (GOT), glutamic pyruvic transaminase (GPT), alkaline phosphatase (Al-P) および  $\beta$ -glucuronidase ( $\beta$ -G) などの逸脱酵素が報告されてきたが<sup>1)~7)</sup>、いずれも諸家により評価は一定せず、臨床応用には至っていない。その理由として死体移植腎の viability が温阻血時間 (warm ischemic time, WIT) および冷阻血時間 (cold ischemic time, CIT) の両者の経過時間に極めて依存度の高いことが知られていること、また臨床の現場では viability 判定のための十分な時間的猶予が許されないことが挙げられるが<sup>1)~5)</sup>、これまでの viability 判定の parameter に関する報告が理論的に組み立てられた基礎的実験に立脚していないためであることも否定できない。

保存臓器の viability は細胞内 ATP 水準の維持を担うミトコンドリアの機能に大きく依存しており、ミトコンドリアの機能は阻血時間の長さに依存して低下することがよく知られている。また、臓器の低温灌流保存はバッチ方式の単純冷却保存に比し、臨床的には長期保存に優れ、かつ実験的にも保存臓器組織内の代謝機能の経時的変動に関する情報を灌流液を介して real time に測定しうる利点を有している<sup>32)</sup>。

そこで著者は温阻血処置を段階的に加え、種々の程度のミトコンドリアの機能を障害させた上で、18時間の灌流保存施行後、戻し同種自家腎移植を行い、灌流液中の GOT, GPT, Al-P, creatinine phosphokinase (CPK), LDH および LDH isozyme を経時的に測定した。その測定結果と WIT との関係および移植後の腎機能とを比較検討するとともに、灌流液中諸酵素の graft viability に関する parameter としての有用性について検討した。

## 実験材料と実験方法

## I. 実験計画

## 1) 実験動物

体重約 16-28 Kg (19.9 $\pm$ 4.2 Kg) の雑種成犬雄12頭、雌8頭の計20頭を用いた。

## 2) 灌流保存液

兩宮<sup>1)</sup>らの報告に従い、灌流液は Toledo-Pereyra et al.<sup>33)</sup> の脱フィブリノーゲン灌流保存液に準じ、次のごとく作成した。即ち、CPD 採血バッグで採血したイヌ血液から血漿を分離し、silica gel (Aerosil 380, 日本ロッシュ株式会社製) を血漿 1000 ml に 20.0 g の割合で加え、6°C の冷温室で2時間攪拌した後、3000 rpm (日立, 05P-22) で10分間遠心、上清を脱フィブリノーゲン血漿として採取した。採取した脱フィブリノーゲンに、トロンビンを加えても凝固しないことを確認した上、脱フィブリノーゲン血漿 1000 ml に対し、純水 154.4 ml, KCL 1号 2.4 ml, マグネゾール 9.5 ml, 20% マニトール 30.0 ml, ソルメドロール 100 mg, レギュラーインスリン 7.1 ml を加え重層除菌フィルター (最終段階 0.2 $\mu$ ) で除菌し、使用時まで 4°C で保存し、使用に際しては約 8°C に調整した。灌流保存液の組成は、Na 137 mEq/l, K 5.5 mEq/l, Cl 62 mEq/l, Mg 4 mEq/l, pH 7.32 (6°C では 7.68), 浸透圧 300 mOsm/l であった。また、灌流液の oxygenation は membrane oxygenator を介して行い、PO<sub>2</sub> 200-250 mmHg に調整した。なお、wash-out には Euro-Collins 液を用い、使用時には 4°C に調整した。

## 3) 灌流保存装置

腎灌流保存装置 ORPH 2000 C (泉工医科機械製作所, 東京)<sup>1)45)</sup>を用いた。

## II. 実験方法

## 1) 実験群の作成と阻血方法

温阻血時間により、以下の5群の実験群を作成した。第I群は温阻血非施行の WIT 0分群4頭、第II群は温阻血30分間の WIT 30分群5頭、第III群は温阻血45分間の WIT 45分群4頭、第IV群は温阻血60分間の WIT 60分群4頭および第V群は温阻血120分間の WIT 120分群3頭の5群に分けて実験を行った。

阻血方法は、チトゾール静脈麻酔下で、呼吸はサーベンチレーター 900 C による mechanical ventilation にて管理し、手術は仰臥位で経腹的に右腎に到る。右腎

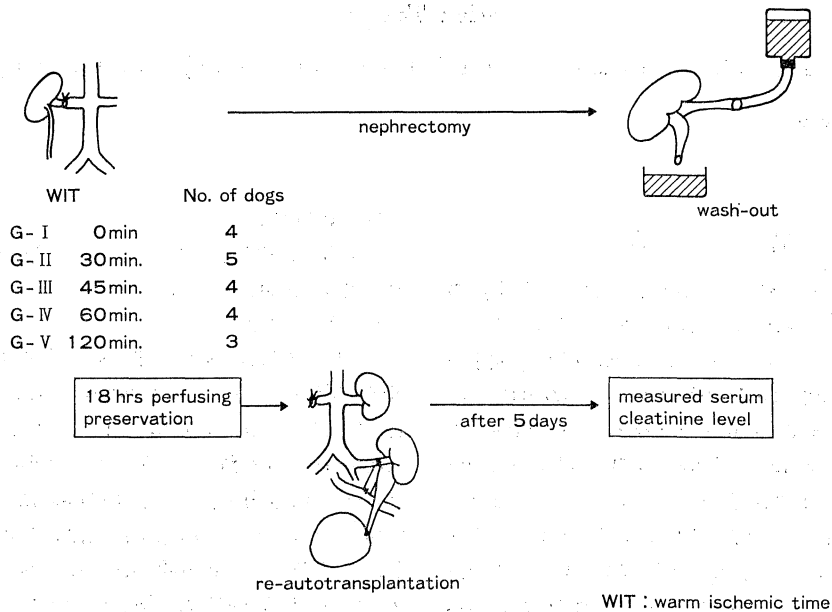


Fig. 1. Experimental design.

WIT : warm ischemic time

動、静脈を大動静脈起始部まで十分に剝離した後、右腎動脈を4号絹糸で結紮し、阻血を開始した。

所定の WIT の後、右腎静脈を結紮し、右腎動静脈を切断した。右尿管は右側総腸骨動脈との交叉部位より遠位側で、戻し自家腎移植時に必要で十分な長さの尿管を残し、結紮、切断した (Fig. 1)。

2) 灌流保存法

摘出した腎の動静脈の口径に合ったベセルチップをそれぞれ腎動静脈に挿入し、Euro-Collins 液約 500ml にて十分洗浄した後、ORPH 2000C による pulsatile mechanical perfusing preservation を施行した。この際の駆出圧は 50 mmHg で、灌流保存液は脱フィブリノーゲン犬血漿を用いた。

3) 戻し自家腎移植と graft 機能の判定

上述の灌流保存液による18時間の灌流保存の後、再度全身麻酔下で仰臥位にて灌流保存した腎を骨盤腔左側へ戻し自家腎移植を行った。その方法は、できるだけ人における腎移植の方法に従い、右腎動脈は左内腸骨動脈に6-0または7-0 Nylon 糸にて端々結節縫合でまた、右腎静脈は左内腸骨静脈に同じく6-0または7-0 Nylon 糸にて端側結節縫合した。

右尿管は Alexsandre の方法<sup>46)</sup>に従い、膀胱に吻合し、戻し自家腎移植を終了し、引き続き左腎を摘出した。手術終了後約5日目に血清クレアチニン値を測定し、血清クレアチニン値 2.0 mg/dl 以上を不良、2.0

mg/dl 以下を良好と判断し、腎機能を評価した (Fig. 1)。

4) 試料の採取と酵素測定方法

灌流経過中0分、15分、3時間、6時間および18時間目において灌流液を腎静脈より経時的に採取し、LDH、GPT、GOT、Al-P および CPK 活性を測定した。GOT、GPT は Harmann 法、Al-P は King-King 法、CPK は Rosalki 法によりそれぞれ測定した。また、LDH は基質としてピルビン酸を用い、NADH から NAD への変化を spectrophotometer にて測定する Wroblewski 法を用いた。

5) LDH isozyme の測定方法

LDH isozyme は Celofilm (Pfeizer Co. Ltd. 製、東京) にて Starkweather et al.<sup>36)</sup> の方法に従い、電気泳動法にて測定した。LDH<sub>4</sub> および LDH<sub>5</sub> 活性は LDH 総活性値および LDH isozyme pattern のパーセント値との積算値から求めた。

LDH isozyme ratio は Burchardt et al.<sup>37)</sup> の報告に従い、LDH<sub>5</sub>+LDH<sub>4</sub>/LDH<sub>1</sub>+LDH<sub>2</sub> で計算した。

結 果

1) WIT と graft 機能

WIT 0分の第I群で1頭が腸重積で、WIT 30分の第II群と WIT 45分の第III群の各群でそれぞれ1頭ずつ肺炎にて、また WIT 60分の第IV群では1頭が戻し自家腎移植後のクレアチニン測定値の欠落のため graft

機能の判定は不可能であった。

WIT と戻し自家腎移植後の graft 機能とは Table 1 に示した如く WIT 0 分の第 I 群および WIT 30 分の第 II 群では graft 機能はすべて良好で、また WIT 120 分の第 V 群のすべてが不良であった。WIT 45 分の第 III 群および WIT 60 分の第 IV 群では良好群と不良群が混在していた。これらの結果から WIT 0 分の第 I 群を機能良好群の対照に、WIT 120 分の第 V 群を機能不良群の対照として、第 II 群から IV 群までの戻し自家移植結果を分析した。

これら第 II 群から第 IV 群までの機能良好群の WIT は  $40.7 \pm 13.2$  分で、機能不良群の WIT は  $52.5 \pm 7.51$  分で両群に差はなかった。

## 2) graft 機能と腎灌流量

実験 I 群から V 群のうち戻し自家腎移植後の graft 機能の判定をなし得た 16 頭について腎重量、生存日数、血清クレアチニン値および腎灌流量について検討した。

灌流の前後における腎重量は機能良好であった 9 頭では、それぞれ  $57.5 \pm 9.19$  g,  $71.0 \pm 14.50$  g ( $P < 0.05$ )、腎機能不良群ではそれぞれ  $63.4 \pm 10.29$  g,  $73.3 \pm 12.21$  g ( $P < 0.05$ ) と灌流後腎重量の増加がみられたが、腎機能の良好群と不良群との間には有意差はみられなかった。

生存日数は機能良好群で、14 日以上であったのに比

し、腎機能不良群の最長生存日数は戻し自家腎移植後 6 日であり、平均  $4.37 \pm 1.77$  日と短かった ( $P < 0.01$ )。

血清クレアチニン値は、腎機能良好群で戻し自家腎移植 4-7 日目で  $1.62 \pm 0.86$  mg/dl, 14 日目で  $1.04 \pm 0.21$  mg/dl と正常値を保ったのに比べ、腎機能不良群では 4-7 日目で  $14.74 \pm 8.50$  mg/dl と有意に高値を示した ( $P < 0.01$ )。

なお、上述の如く、腎機能不良群の戻し自家腎移植 7 日目以後の血清クレアチニン値は、全動物が死亡したので不明であった (Table 2)。

また、腎灌流量を灌流時間別に、第 I 群および第 III-IV 群での機能良好の graft と、第 II-IV 群および第 V 群の機能不良の graft とに分けてみると、第 I 群と第 V 群腎機能不良群との間には灌流経過の 3 時間目、6 時間目、18 時間目のそれぞれで約 2 倍の差がみられたが、第 II-IV 群では機能良好群と不良群での灌流量の差はほとんどみられなかった (Table 3)。

## 3) 灌流液中諸酵素の経時的変化

第 I 群における各酵素の灌流前値を 100 として灌流保存液中の変動を比較した。その結果、各酵素のうち LDH について GOT, CPK および GPT に著明な経時的上昇が認められ、灌流 18 時間目では灌流液中の LDH 活性は灌流前の 2.73 倍に達した。GOT, CPK および

Table 1. Characteristics and function of graft of experimental group

Experimental group	WIT (min.)	No. of dogs	Effective No. of graft	Graft weight (g)		Purification pressure (mmHg)	Graft function	
				Before	After		Good	Bad
I	0	4*	3	$65.0 \pm 11.2$	$65.3 \pm 19.0$	$44.3 \pm 3.3$	3	0
II	30	5*	4	$56.4 \pm 10.6$	$75.0 \pm 14.3$	$47.2 \pm 3.5$	4	0
III	45	4*	3	$57.3 \pm 8.2$	$69.3 \pm 8.0$	$49.7 \pm 0.5$	1	2
IV	60	4**	3	$59.2 \pm 9.1$	$76.0 \pm 11.8$	$46.3 \pm 3.1$	1	2
V	120	3	3	$71.7 \pm 7.6$	$82.6 \pm 11.0$	$49.3 \pm 0.9$	0	3

\*: One graft was excluded by accidental death.

\*\* : One graft was excluded by loss of creatinine level.

Table 2. Graft function after auto-retransplantation

	Weight of graft (gr.)		Survival (days)	Serum Cr. level (mg/dl)	
	Pre	Post		4-7th day	14th day
Good (n=9)	$57.5 \pm 9.19$	$71.0 \pm 14.50$	<14	$1.62 \pm 0.86$	$1.04 \pm 0.21$
Bad (n=7)	$63.4 \pm 10.29$	$73.3 \pm 12.21$	$4.37 \pm 1.77$	$14.74 \pm 8.50$	

3 grafts were excluded by accidental death.

1 grafts was excluded by loss of data as to creatinine level.

Table 3. Comparative analysis of perfusion rate and graft function

	Graft function			
	Good		Bad	
Experimental group	I	II-IV	II-IV	V
Effective No. of graft	3	6	4	3
Perfusion rate (ml/min.)				
at 3 hrs of preservation	1.05±0.36	0.68±1.80	0.59±0.50	0.46±0.20
at 6 hrs of preservation	0.99±0.33	0.62±0.67	0.61±0.55	0.49±0.24
at 18 hrs of preservation	0.98±0.50	0.62±0.20	0.60±0.50	0.62±0.29
Serum creatinine value (mg/dl)*	1.10±0.25	1.23±0.35	14.74±8.50	N.D.**

\*: Creatinine was measured on 5-8 days after auto-retransplantation.

\*\* : All dogs were dead within 5 days after auto-retransplantation and serum creatinine could not be measured.

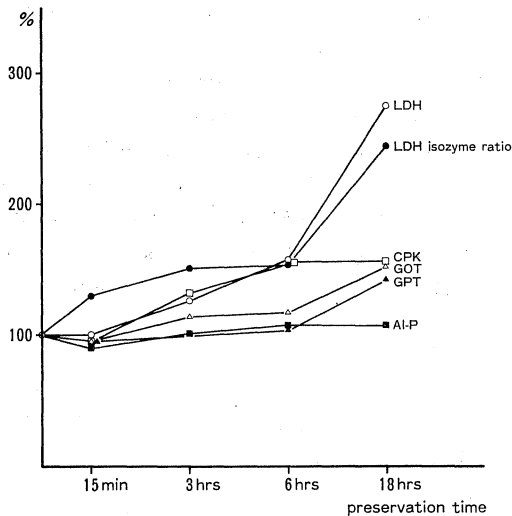


Fig. 2. Relative variation of each enzyme in perfusate during preservation in Group 1. (Activity before perfusion was adjusted for 100% as basal value)

GPT ではそれぞれ1.51倍, 1.56倍および1.42倍の上昇が認められた。しかし, Al-P はほとんど上昇がみられなかった。

また, LDH isozyme ratio も経時的上昇を示し, 灌流18時間目では灌流前の2.51倍の上昇がみられた (Fig. 2)。

4) 灌流液中の諸酵素活性および LDH isozyme ratio に対する WIT の影響について

a) LDH 活性: 実験第 I 群から第 IV 群までの WIT 0-60分群では灌流6時間までは若干の上昇傾向を示すものの, 各群でほとんど差異はみられなかったが, 灌流18時間目では WIT が長くなるに従って LDH 活性値の

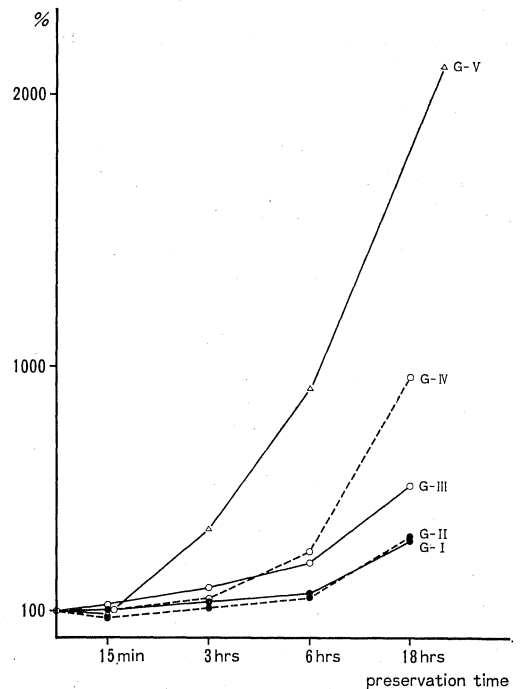


Fig. 3. Relative variation of activity of LDH during perfusion. (Activity before perfusion was adjusted for 100% as basal value)

上昇傾向が強く, 各群それぞれ若干の差が生じた。

一方, 第 V 群の WIT 120分群では灌流6時間目より上昇傾向がみられ18時間目には  $29.8 \pm 18.6$  I.U./g と著しく高値を示した。即ち, LDH 活性はすべての群で灌流保存時間の長さに比例して上昇しており, 灌流保存18時間目の LDH 活性は灌流前に比較して, 第 I 群では

2.7倍, 第Ⅱ群では2.8倍, 第Ⅲ群では6.2倍, 第Ⅳ群では9.4倍, 第Ⅴ群では23.7倍と, WIT の長さとともに灌流保存時間の長さに比例して著明な上昇を示した. ことに, 第Ⅳ群の WIT 60分群と第Ⅴ群の WIT 120分群とではその傾向が著明であった (Fig. 3).

b) LDH isozyme ratio: 第Ⅰ群から第Ⅳ群では灌流保存6時間目までは上昇傾向も低く各群において有意な差はみられなかったが, 灌流保存18時間目では, 第Ⅰ群で1.5倍, 第Ⅱ群で3.6倍, 第Ⅲ群で4.7倍, 第Ⅳ群で7.8倍, 第Ⅴ群は44.4倍と有意に WIT に比例して上昇が認められた (Fig. 4).

c) GOT 活性: LDH 活性と同様, 第Ⅰ群および第Ⅱ群では灌流保存18時間目までほとんど上昇は認められず, また灌流前との比較では, 第Ⅲ群および第Ⅳ群は灌流保存6時間目ならびに18時間目に上昇傾向がみられ, 灌流保存18時間目の GOT 活性値は第Ⅰ群および第Ⅱ群とのあいだに若干の差がみられた. 第Ⅴ群では灌流保存3時間目より上昇がみられ, 6時間目および18時間目ではそれぞれ3.6倍および24.5倍と著明な上昇が認められた (Fig. 5).

d) その他の酵素活性: GPT 活性および Al-P 活性は第Ⅴ群を除いて, WIT による影響は認められず (Fig. 6, 7), また, CPK 活性も第Ⅴ群ではかなりの上昇を認めるも, その他の群では灌流経過に伴う変化は WIT の

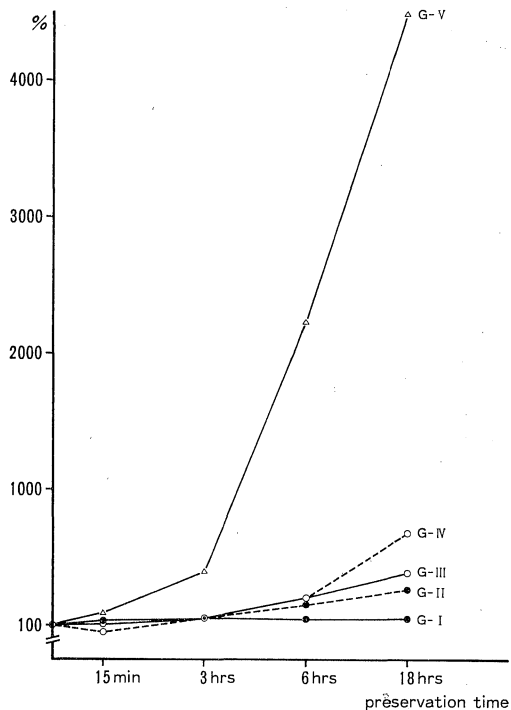


Fig. 4. Relative variation of LDH isozyme ratio during perfusion. (Activity before perfusion was adjusted for 100% as basal value)

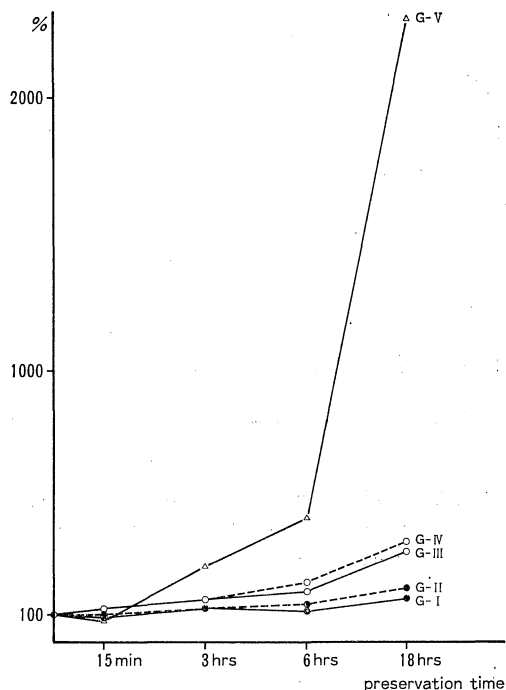


Fig. 5. Relative variation of activity of GOT during perfusion. (Activity before perfusion was adjusted for 100% as basal value)

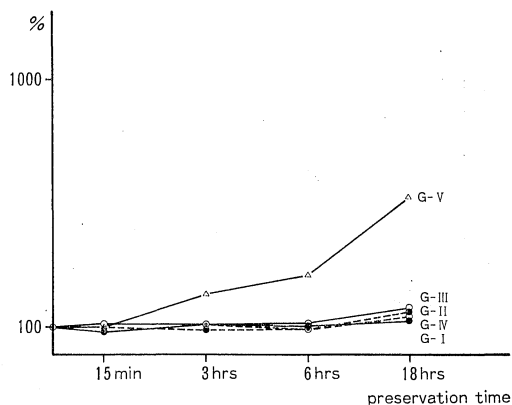


Fig. 6. Relative variation of activity of GPT during perfusion. (Activity before perfusion was adjusted for 100% as basal value)

長さに比例しておらず、WIT と灌流保存の長さには相関はみられなかった (Fig. 8).

5) 戻し自家腎移植後 graft 機能と灌流終了時の LDH 活性、LDH isozyme ratio と LDH<sub>4+5</sub> 活性との関係について

第 I 群を機能良好群の対照とし、また第 V 群を機能不

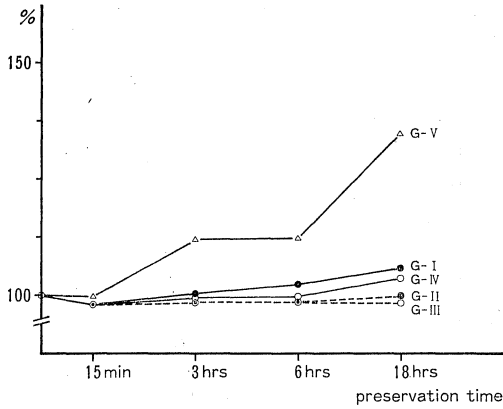


Fig. 7. Relative variation of activity of Al-P during perfusation. (Activity before perfusation was adjusted for 100% as basal value)

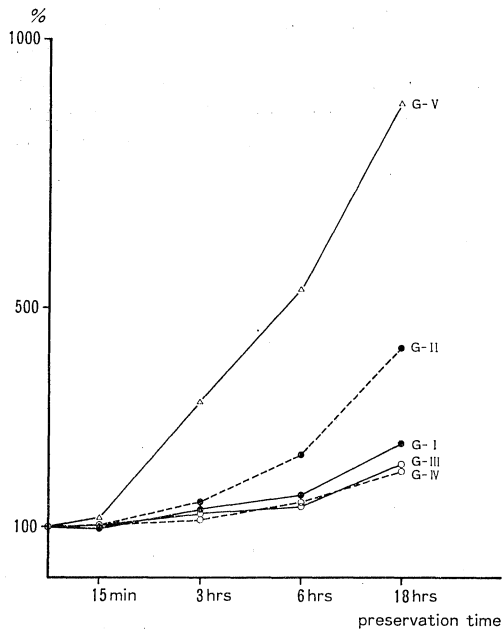


Fig. 8. Relative variation of activity of CPK during perfusation. (Activity before perfusation was adjusted for 100% as basal value)

良群の対照として、経時的変動および WIT の影響について LDH 活性、LDH isozyme ratio および LDH<sub>4+5</sub> 活性について戻し自家腎移植後の graft 機能との対比を retrospective に検討した。

a) LDH 活性: 第 I 群の LDH 活性は  $3.58 \pm 1.33$  I.U./g で第 II 群から第 IV 群のうち機能良好群では  $3.35 \pm 2.74$  I.U./g と対照とした第 I 群とほぼ同程度の値を示したが、機能不良群は  $5.11 \pm 3.26$  I.U./g と著明な上昇がみられた (Fig. 9).

b) LDH isozyme ratio: LDH isozyme ratio も LDH 活性と同様に、第 I 群での LDH isozyme ratio は  $4.07 \pm 2.13$  で第 II 群から第 IV 群のうち機能良好群では  $5.92 \pm 1.61$  と対照とした第 I 群とほぼ同程度の値を示したが、機能不良群は  $13.58 \pm 8.67$  と著明な上昇がみられた (Fig. 10).

c) LDH<sub>4+5</sub> 活性: LDH<sub>4+5</sub> 活性も LDH 活性や LDH isozyme ratio と同様に、第 I 群での LDH<sub>4+5</sub> 活性は  $2.26 \pm 0.84$  I.U./g で第 II 群から第 IV 群のうち機能良好群では  $2.37 \pm 1.49$  I.U./g と対照とした第 I 群とほぼ同程度の値を示したが、機能不良群は  $8.47 \pm 5.26$  I.U./g と著明な上昇がみられた (Fig. 11).

6) wash-out 灌流液中 LDH 活性と graft 機能について

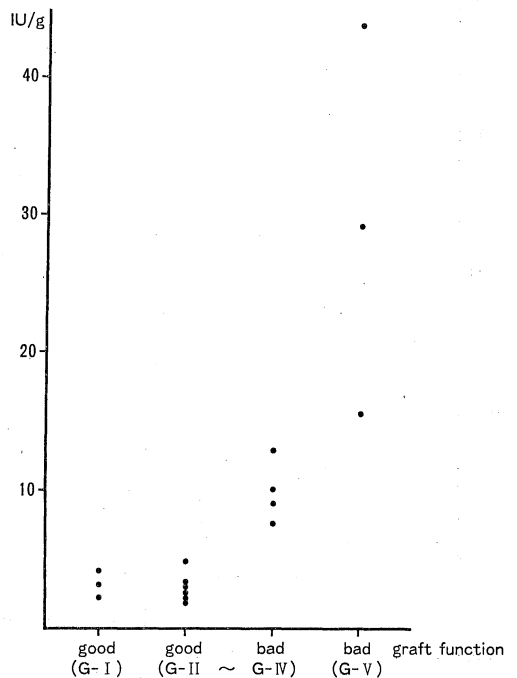


Fig. 9. Comparative study of LDH activity at 18 hours of preservation and graft function.

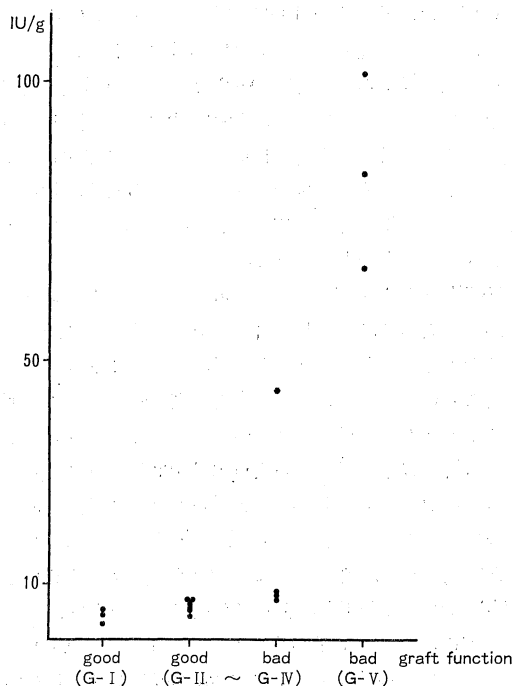


Fig. 10. Comparative study of LDH isozyme ratio at 18 hours of preservation and graft function.

第 I 群, 第 II 群より第 IV 群および第 V 群の graft 機能良好群と不良群での wash-out 灌流液中の LDH 活性について検討したが, 第 II 群から第 IV 群のうち機能良好群は  $11.37 \pm 7.29$  I.U./g と第 I 群の  $10.00 \pm 8.49$  I.U./g とほぼ同程度の活性を示し, 反対に機能不良群では  $40.72 \pm 33.47$  I.U./g と約 4 倍の値を示した。

以上より, 灌流保存腎での graft 機能の判定の閾値は LDH 活性で約 12 I.U./g と設定しうる結果であった (Fig. 12)。

## 考 案

Belzer et al.<sup>42)43)</sup> らは腎の灌流保存を行う上で灌流障害を惹起せしめる原因として lipoprotein による血管内凝固を挙げ, その lipoprotein を除去した cryoprecipitated plasma を用い 24-72 時間の灌流保存が可能であると報告している。さらに, Toledo-Pereyra et al.<sup>33)</sup> は fibrinogen も灌流障害の大きな原因であると指摘し, Silica gel を用いて血漿中の cholesterol,  $\alpha$ -lipoprotein,  $\beta$ -lipoprotein や fibrinogen を完全に除去した血漿で 48-120 時間の灌流保存が可能であると報告している。この Silica gel による脱フィブリノーゲン血漿の利点は,

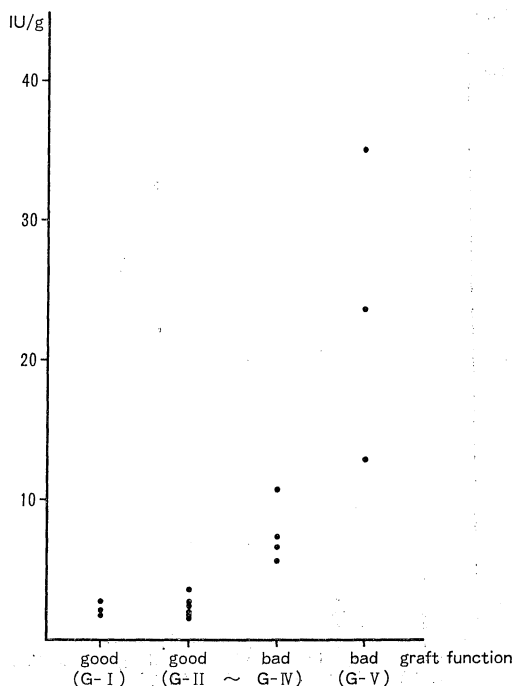


Fig. 11. Comparative study of LDH<sub>4+5</sub> activity at 18 hours of preservation and graft function.

1) fibrinogen のみならず lipoprotein をも完全に除去できること, 2) 60 日間の室温貯蔵が可能なこと, 3) 細菌やヘルペスウィルスなどを除去でき, 感染予防も可能であること, 4) 血球の遺残物を除去できること, さらに 5) LDH や GOT などの酵素濃度に変化がなく, IgG などの免疫グロブリンにも影響がないことを挙げている。最近, 細胞内組成とほぼ同様の Euro-Collins 液が腎灌流保存に広く用いられているが, 著者らは両宮<sup>1)45)</sup>らとの共同開発にて Silica gel による脱フィブリノーゲン血漿による灌流保存を行い, 十分満足する結果を得ているので, 今回の実験にも脱フィブリノーゲン血漿を用いた。

両宮<sup>1)45)</sup>らが開発した灌流保存装置である泉工医科株式会社製 ORPH 2000G の特性は平常流を用い, 灌流圧の変動に伴い自動的に調節することにより灌流圧を一定に保つことができ, また温度や pH も一定に保つことができることである。今回, 著者はこの装置を用いて実験を行ったが, 結果で記載したごとく灌流量は Grundmann et al.<sup>44)</sup> が報告している至適灌流量の 0.8 ml/g/min. に近い  $0.76 \pm 0.41$  ml/g/min. で, ほぼ同程度の結果であった。



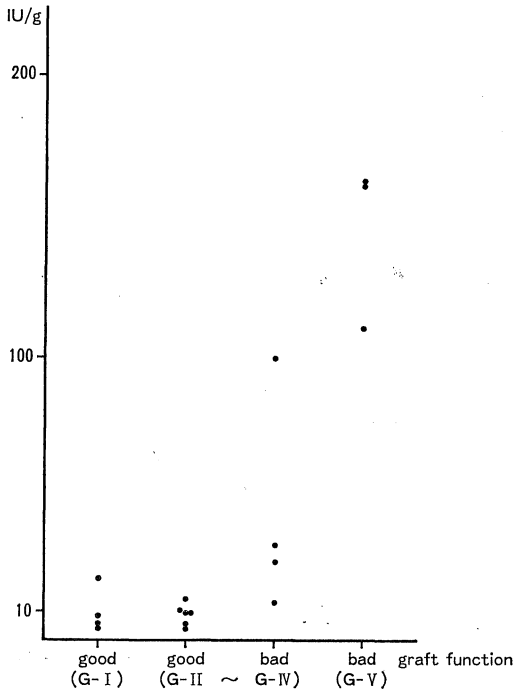


Fig. 12. Comparative study of LDH activity in wash-out sample at 18 hours of preservation and graft function.

さて、他の臓器同様、保存腎の viability は細胞内での重要なエネルギー供給源である TCA-cycle を内包するミトコンドリア機能の温存状態に依存していると考えられ<sup>8)~10)</sup>、Trump et al.<sup>11)</sup> は電顕的にミトコンドリア内に多数の small flocculent density が観察される stage IV b あたりが“point of no return”であろうと推察している。腎は代謝特性の異なる皮質、髄質外層、髄質内層より構成され<sup>12)13)</sup>、しかも各組織の含有するミトコンドリアの量が大きく異なっている。その中でも腎の生理学的機能の大半を担う皮質および髄質外層はミトコンドリアの豊富な近位尿細管および遠位尿細管を内包しているため、hypoxia 障害には極めて鋭敏である。

従来より温阻血処置は、hypoxia を惹起する最も単純かつ確実な方法としてミトコンドリア機能に関する parameter の検索に優れた実験モデルとして広く一般に用いられてきた<sup>14)~16)</sup>。Grundmann et al.<sup>17)</sup> はイヌ腎において15分から60分の温阻血処置を加え、灌流液中逸脱酵素活性の変動と不可逆性組織障害の限界について述べているが、文献的には60分を“point of no return”とする報告が多い<sup>18)~22)</sup>。

今回の、著者の実験では、WIT の灌流液中逸脱酵素

への影響は、灌流液中 LDH 活性、ついで GOT 活性の経時的変動に認められ、GPT 活性にもわずかながらその傾向が認められたが、Al-P および CPK 活性では認められなかった。元来、Al-P、CPK はそれぞれ細胞膜および血管壁平滑筋の構成蛋白質として存在し、ミトコンドリア機能と直接の関連性は考えられず、従って今回の実験結果でも WIT および灌流保存の影響がみられなかったものと思われる。

GOT および GPT はともに可溶画分とミトコンドリア画分の両画分に存在し、可溶画分中ではアミノ酸からの糖新生をつかさどる酵素として、また、ミトコンドリア内においては、アンモニア産生の調整酵素として重要な酵素であることが知られている。従って、ミトコンドリア機能を強く障害せしめる WIT 120分処置により認められた灌流液中の逸脱酵素活性の上昇には単なる可溶画分以外にミトコンドリア画分からの逸脱が加わったものと考えられる。今回の実験で GOT 活性に比較して GPT 活性には WIT の影響が軽微であった点は、腎での GPT 活性が近位尿細管および遠位尿細管のいずれにおいても GOT 活性の約 1/5~20 程度しか存在しないことによるものと思われる<sup>29)</sup>。

一方、灌流液中 LDH 活性および LDH isozyme の変動は極めて著しく、しかもその上昇程度は明かに WIT に依存した変動を認めたが、ことに戻し自家腎移植後、graft 機能別の結果での LDH<sub>4</sub> および LDH<sub>5</sub> にみられた graft 機能良好群と不良群の差は著明であった。Grundmann et al.<sup>17)</sup> および諸家ら<sup>25)27)34)35)43)</sup> もほぼ同様の結果を報告しており、これまで LDH と graft の viability に関する報告は比較的多く<sup>24)~28)</sup>、実験のみならず臨床的報告もみられるが、isozyme pattern に関しての報告は少なく<sup>5)17)39)</sup>、また、isozyme の有用性を明示した報告はほとんどみられない。

LDH は細胞内可溶画分中に存在し、TCA-cycle と呼応して、好氣的条件下では TCA-cycle へのピルビン酸提供酵素として直接的あるいは間接的に働き、また嫌氣的条件下では TCA-cycle に代わる ATP 産生代謝系の終末段階の酵素として働いており、従ってその変動はミトコンドリア機能に関連している。本宮<sup>23)</sup>らは長期灌流保存で灌流液中の LDH 活性の上昇は isozyme pattern の変動も伴っていることを報告しているが、今回の研究は isozyme pattern の変動がより明確に viability と関連していることを示した。

in-vitro においてもミトコンドリア機能の障害による細胞質内のピルビン酸および NADH 濃度の上昇は LDH<sub>1</sub> および LDH<sub>2</sub> などの H 型 LDH isozyme との

複合体の形成を来し、H型 LDH isozyme の活性を抑制する一方、ミクロゾーム膜と結合している LDH<sub>4</sub> および LDH<sub>5</sub> などの M 型 LDH isozyme を遊離させ、M 型 LDH isozyme の活性化および細胞外への逸脱を増強すると考えられている<sup>40)</sup>。従って、本研究での M 型 LDH isozyme の灌流液中濃度の上昇は組織内でのミトコンドリア機能障害の強さを反映するものと考えられる。

腎を構成する皮質、髓質外層、髓質内層はそれぞれ LDH isozyme pattern を異にしているが<sup>41)42)</sup>、最も重要な機能成分である皮質および髓質外層は H 型 LDH isozyme 優位であり、従って、これらの組織からの灌流液中への M 型 LDH isozyme 遊出は、組織内の酸素濃度に依存している代謝系の異常に関する情報を real time に伝えるものと考えられる。

臨床においては、最近では40時間以上の保存死体腎の移植が行われ、かつ、その長期成績は従来の臨界時間と考えられていた24時間以内<sup>30)</sup>の保存腎と変わらないことが報告されている<sup>31)</sup>。今回、臨床での死体腎移植条件にほぼ類似した機能回復可能な条件的腎障害である WIT 30-60分の実験群である第II-IV群で得られた LDH<sub>4</sub> と LDH<sub>5</sub> の成績は死体腎の viability 判定に有用な資料を提供したものと考えられる。

## 結 語

雑種成犬を用いて右腎動脈結紮による WIT を15分、30分、45分、60分および120分の実験群を作成し、灌流液に脱イヌフィブリノーゲン血漿を用いて腎灌流装置にて18時間灌流し経時的に灌流液中の LDH, GOT, GPT, Al-P および CPK 活性、さらには LAH isozyme を測定し、WIT の影響について検討するとともに、各 graft の戻し自家腎移植を行い、graft 機能との相関性についても検討した。

1) 灌流保存腎での灌流諸酵素の中で LDH と GOT 活性に明かな経時変化がみられ、しかもこれらの変化は WIT に依存している。ことに、LDH においてその傾向が著明にみられた。また、LDH isozyme ratio も LDH 活性と同様に、WIT の長さおよび灌流保存時間の長さに比例して上昇した。ことに WIT 120分の群で著明であった。

2) GPT 活性では経時変化は軽度であり、WIT による影響も軽度であった。

3) Al-P 活性は経時変化は認められず、また、WIT の影響もみられなかった。

4) CPK 活性は経時変化は明かであったが、WIT

による影響はみられなかった。

5) 戻し自家腎移植後の graft 機能については、LDH 活性、LDH isozyme ratio さらに LDH<sub>4+5</sub> 活性のすべてで、WIT 30分から WIT 60分の群のうち機能良好群での対照とした WIT 0分の群とほぼ同程度の値を示したが、機能不良群は著明な上昇がみられた。

6) LDH 活性における wash-out 灌流液と graft 機能について、臨床応用可能な段階的腎障害実験群である WIT 30-60分群の第II-IV群で wash-out 灌流液中の LDH 活性について検討したが、機能良好群は機能良好の対照とした第I群である WIT 0分の値に近似しており、反対に機能不良群は有意に上昇していた。

従って、灌流保存腎での graft 機能の判定の閾値は LDH 活性で 12 I.U./g と設定しうる結果が得られた。

以上の結果から、灌流保存腎の viability 判定の parameter として腎灌流保存灌流液中の LDH 活性および LDH isozyme の測定が臨床的に有用性のあることが示唆された。

稿を終えるに臨み、懇切なる御指導と御校閲を賜りました恩師岡島英五郎教授に深甚なる謝意を捧げるとともに、御校閲を頂きました本学生化学教室神谷知彌教授と第1外科学教室中野博重教授に深謝致します。また本研究に終始、直接御指導を賜った国立循環器病センター研究所実験開発治療部雨宮浩部長並びに本学本宮善恢講師に感謝の意を表するとともに、ご協力下さいました教室の諸兄に厚く御礼申し上げます。

本論文の要旨は第29回日本腎臓学会総会、第75回日本泌尿器科学会総会にて報告した。

## 文 献

- 1) 雨宮 浩, 中島伸之, 本宮善恢, 松尾好祥, 松山正経, 岡島英五郎, 宮島哲也, 樋口玲子, 新谷 聰: 腎保存の研究(1)ヒト腎灌流保存時の諸変化について. 移植 15: 166-169, 1980.
- 2) Belzer, F.O., Ashby, B.S. and Downes, G.L.: Lactic acid dehydrogenase as an index of future function of cadaver kidneys during isolated perfusion. Surg. Forum 19: 205-206, 1968.
- 3) 松尾好祥, 雨宮 浩, 松山正経, 宮島哲也, 新谷 聰, 樋口玲子, 渡辺一男, 本宮善恢, 伊集院真澄, 岡島英五郎: 腎保存の研究(2)犬腎灌流保存時の諸酵素の変化について. 移植 15: 261-264, 1980.
- 4) Abouna, G.M., Lim, F., Cook, J.S., Grubb, W., Craig, S.S., Siebel, H.R. and Hume, D.M.:

- Three-day canine kidney preservation. *Surgery* 71: 436-444, 1972.
- 5) **Kemp, E., Jacobsen, I.A. and Amtrup, F.:** LDH release into perfusates of preserved kidneys. *Scand. J. Urol. Nephrol.* 10: 142-146, 1976.
  - 6) **Grundmann, R. and Pichlmaier, H.:** LDH-release in various experimental conditions as criterion for viability of the hypothermic perfused kidney. *Res. Exp. Med.* 159: 298-305, 1973.
  - 7) **Ogden, D.A., Zukoski, C.F., Cazee, C.R. and Chvapil, M.:** Kinetics of the release of zinc and some enzymes from canine kidney during isolated perfusion (39872). *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 156: 46-51, 1977.
  - 8) 雨宮 浩, 松尾好祥, 本宮善恢, 新谷 聡, 岡島英五郎, 金子佳照, 伊集院真澄, 榊原 泉, 笹木英幹, 鈴木盛一: 腎保存の研究(5)酸化還元状態 (NAD/NADH 値) による保存腎 viability 判定の試み. *移植* 18: 32-36, 1983.
  - 9) **Kahng, M.W., Trifillis, A.L., Hall-Craggs, M., Regec, A. and Trump, B.F.:** Biochemical and morphological studies on human kidneys preserved for transplantation. *Am. J. Clin. Pathol.* 80: 779-785, 1983.
  - 10) **Marubayashi, S., Dohi, K., Ezaki, H., Hayashi, K. and Kawasaki, T.:** Preservation of ischemic rat liver mitochondrial functions and liver viability with CoQ<sub>10</sub>. *Surgery* 91: 631-637, 1982.
  - 11) **Trump, B.F., Mergner, W.J., Kahng, M.W. and Saladino, A.J.:** Studies on the subcellular pathophysiology of ischemia. *Circulation* 53: 17-26, 1976.
  - 12) **Guder, W.G., Wagner, S. and Wirthensohn, G.:** Metabolic fuels along the nephron. Pathways and intracellular mechanisms of interaction. *Kidney Int.* 29: 41-45, 1986.
  - 13) **Ross, B.D., Espinal, J. and Silva, P.:** Glucose metabolism in renal tubular function. *Kidney Int.* 29: 54-67, 1986.
  - 14) **Vogt, M.T. and Farber, E.:** On the molecular pathology of ischemic renal cell death. Reversible and irreversible cellular and mitochondrial metabolic alterations. *Am. J. Pathol.* 53: 1-26, 1968.
  - 15) **Glaumann, B., Glaumann, H., Berezsky, I.K. and Trump, B.F.:** Studies on the pathogenesis of ischemic cell injury. II. Morphological change of the pars convoluta (p1 and p2) of the proximal tubule of the rat kidney made ischemic in vivo. *Virchows arch B Cell Pathol.* 19: 281-302, 1975.
  - 16) **Trump, B.F. and Laiho, K.U.:** Studies of cellular recovery from injury. I. Recovery from anoxia in Ehrlich ascites tumor cells. *Lab. Invest.* 33: 706-711, 1975.
  - 17) **Grundmann, R., Eichmann, J., Keckstein, J., Meusel, R.E. and Pichlmaier, H.:** Relationship between the prolongation of warm ischemia and the maximum available preservation period. *Surgery* 81: 542-550, 1977.
  - 18) **Venkatachalam, M.A., Kreisberg, J.I., Stein, J.H., and Lifschitz, M.D.:** Editorial. Salvage of ischemic cells by impermeant solute and adenosinetriphosphate. *Lab. Invest.* 49: 1-3, 1983.
  - 19) **Johnson, R.W.G.:** The donor kidney. in *Scientific Foundations of Urology*. Williams, D. William Heineman Medical Books LTD, London, p 150-171, 1982.
  - 20) **Reimer, K.A., Ganote, C.E. and Jennings, R.B.:** Alterations in renal cortex following ischemic injury. III. Ultrastructure of proximal tubules after ischemia or autolysis. *Lab. Invest.* 26: 347-363, 1972.
  - 21) **Aydin, G., Okiye, S.E. and Zincke, H.:** Successful 24-hour preservation of the ischemic canine kidney with Euro-Collins solution. *J. Urol.* 128: 1401-1403, 1982.
  - 22) **Siegel, N.J., Glazier, W.B., Chaudry, I.H., Gaudio, K.M., Lytton, B., Baue, A.E. and Kashgarian, M.:** Enhanced recovery from acute renal failure by the postischemic infusion of adenine nucleotides and magnesium chloride in rats. *Kidney Int.* 17: 338-349, 1980.
  - 23) 本宮善恢, 松尾好祥, 伊集院真澄, 岡島英五郎, 雨宮 浩, 松山正経, 宮島哲也, 樋口玲子, 新谷 聡: 腎保存の研究(3) LDH について. *移植* 15: 291-294, 1980.
  - 24) **Jensen, E.H. and Kemp, E.:** Kidney preservation. II. Liberation of enzymes and urea from preserved kidneys. *Scand. J. Urol. Nephrol.* 6: 280-283, 1972.
  - 26) **Modgill, V.K., Wiggins, P.A. and Giles, G.R.:** Perfusion characteristics of preserved canine kidneys

- subjected to warm ischemia. *Brit. J. Urol.* **50**: 1-7, 1978.
- 26) **Kemp, E.**: Kidney preservation. I. Evaluation of perfusion and ischemic damage *Scand. J. Urol. Nephrol.* **6**: 273-279, 1972.
- 27) **Modgill, V.K., Wiggins, P.A., Rosenberg, I.L., Humphrey, C.S. and Giles, G.R.**: An evaluation of viability tests of human cadaveric kidneys. *Brit. J. Surg.* **64**: 548-553, 1977.
- 28) **Codd, J.E., Garvin, P.J., Morgan, R., Jelinek, M. and Newton, W.T.**: Allograft viability determined by enzyme analysis. *Transplantation* **28**: 447-450, 1979.
- 29) **Burch, H.B.**: Quantitative histochemistry of defined parts of rat nephron. *in* biochemistry of kidney functions, INSERM Symposia, 21, Elsevier, Biochemical Press, Amsterdam, p 297-318, 1982.
- 30) **Barry, J.M., Lieberman, S., Wickre, C., Lieberman, C., Fischer, S. and Craig, D.**: Human kidney preservation by intracellular electrolyte flush followed by cold storage for over 24 hours. *Transplantation* **32**: 485-487, 1981.
- 31) **Barry, J.M., Norman, D.J., Fischer, S.M. and Bennett, W.M.**: Human kidney preservation by intracellular electrolyte flush followed by cold storage. *Amer. J. kid. diseases* **3**: 293-296, 1984.
- 32) 高橋公太: 腎保存の研究. 第1編, 持続低温灌流保存と単純冷却保存との比較検討. *日腎誌.* **23**: 431-443, 1981.
- 33) **Toledo-Pereyra, L.H., Condie, R.M., Malmberg, R., Simmons, R.L. and Najarian, J.S.**: A fibrinogen-free plasma perfusate for preservation of kidneys for one hundred and twenty hours. *Surg. Gyn. Obst.* **138**: 901-905, 1974.
- 34) **Buhl, M.R., Kemp, G. and Kemp, E.**: Hypoxanthine excretion during preservation of rabbit kidneys for transplantation. *Transplantation* **21**: 460-467, 1976.
- 35) **Fischer, J.H., Armbruster, D., Grebe, W., Czerniak, A. and Isselhard, W.**: Effects of differences in substrate supply on the energy metabolism of hyperthermically perfused canine kidneys. *Cryobiology* **17**: 135-147, 1980.
- 36) **Starkweather, W.H., Spencer, H.H., Schwarz, E.L. and Schoch, H.K.**: The electrophoretic separation of lactate dehydrogenase isozymes and their evaluation in clinical medicine. *J. Lab. Clin. Med.* **67**: 329-343, 1966.
- 37) **Burchardt, U., Mantel, E. und Krebbel, I.**: Die diagnostische Aussagefähigkeit von LDH-Isoenzymbestimmungen im Harn. *Zschr. Inn. Med.* **32**: 285-288, 1977.
- 38) **Glaumann, B. and Trump, B.F.**: Studies on the pathogenesis of ischemic cell injury. III. Morphological changes of the proximal pars recta tubules (P<sub>3</sub>) of the rat kidney made ischemic *in vivo*. *Virchows Arch B Cell Pathol.* **19**: 303-323, 1975.
- 39) **Everse, J., Barnett, R.E., Thorne, C. Jr. and Kaplan, N.O.**: The formation of ternary complexes by diphosphopyridine nucleotide-dependent dehydrogenases. *Arch. Biochem. Biophys.* **143**: 444-460, 1971.
- 40) **Thiele, K.G. and Mattenheimer, H.**: The isoenzymes of lactate dehydrogenase in the nephron of the healthy human kidney. *Z. Klin. Chem. u. Klin. Biochem.* **6**: 132-138, 1968.
- 41) **Smith, C.H. and Kissane, J.M.**: Distribution of forms of lactic dehydrogenase within the developing rat kidney. *Dev. Biol.* **8**: 151-164, 1963.
- 42) **Belzer, F.O., Ashby, B.S. and Dunphy, J.E.**: 24-hour and 72-hour preservation of canine kidneys. *Lancet* **2**: 536-539, 1967.
- 43) **Belzer, F.O.**: Role of preservation in clinical renal transplantation. *Transpl. Proc.* **3**: 268-273, 1971.
- 44) **Grundmann, R., Raab, E., Meusel, E., Kirckhoff, R. and Picklmaier, H.**: Analysis of the optimal perfusion pressure and flow rate of the renal vascular resistance and oxygen consumption in the hypothermic perfused kidney. *Surgery* **77**: 451-461, 1975.
- 45) **Ozaki, A., Asano, T., Amemiya, H., Ochiai, T., Sato, H., Iwasaki, Y., Okamura, T., Fukao, K. and Yokoyama, T.**: Successful 96-hour Preservation canine kidneys using a new machine. *Transpl. Proc.* **9**: 247-249, 1977.
- 46) 丸山良夫, 妻谷憲一, 林 美樹, 松木 尚, 金子佳照, 窪田一男, 大園誠一郎, 脇岡 隆, 平尾佳彦, 岡島英五郎, 鈴木誠一, 雨宮 浩: 腎移植における Alexandre 法による尿管膀胱新吻合の検討. *移植* **21**: 135-139, 1986.