

A Novel Hydroxyl Radical Scavenger, Nicaraven, Protects The Liver From Warm Ischemia And Reperfusion Injury

(ハイドロキシルラディカルスカベンジャー：
ニカラベンによる肝温虚血再灌流障害の軽減)

学位論文内容の要旨

背景

現在、肝移植は生体肝移植及び脳死肝移植が行われているが、心停止後ドナーの肝臓は温虚血時間が長く使用できない。心停止後ドナーからの肝移植実現には、虚血再灌流障害の強力な軽減が必要である。肝虚血再灌流障害においては、活性酸素種が深く関与し、なかでもハイドロキシルラディカルは生体内に消去系がなく、強い障害性を持つため、その制御が虚血再灌流障害を軽減するためには重要と考えられる。新しいハイドロキシルラディカルスカベンジャー、ニカラベンは水溶性と脂溶性の2つの媒性を持ち、細胞内外に速やかに到達し、ハイドロキシルラディカルを効果的に消去することができる。ニカラベンの虚血再灌流障害における効果は、脳、心臓、腎臓では報告されているが、肝臓では報告されていない。

方法

雌性ビーグル犬を用い、肝門部及び肝静脈を2時間遮断し、門脈血は内頸静脈にバイパスする完全肝温虚血モデルを作成した。コントロール群(n=12)と治療群(n=6)の2群とした。ニカラベンは、虚血前60分間と再灌流30分前より3時間、2mg/kg/minにて静脈内持続投与した。検討項目は、循環動態、レーザードップラー法による肝組織血流量、肝逸脱酵素(ALT)、肝組織過酸化脂質(Phosphatidylcholinehydroperoxide (PCOOH) / phosphatidylcholine (PC), phosphatidyl-ethanolamine (PE)、組織学的肝障害、肝組織好中球浸潤、肝エネルギー代謝産物、2週生存率である。

結果

2週生存率はコントロール群で25% (3/12)、治療群では100% (6/6)であった。(P<0.01) 治療群では、肝組織での過酸化脂質生成が抑制され、肝組織血流量と循環動態が改善し、ALTとET-1の上昇、組織学的肝障害と肝組織好中球浸潤が抑制された。

考察

心停止後ドナーのモデルとして、リングル法では肝静脈血の流入が問題となり適切ではなく、肝門部及び肝静脈をクランプする完全肝温虚血モデルを作成した。クランプの完全性はICG残存率が虚血中90%以上であることで確認した。ハイポキサンチン-キサンチン系による再灌流後のスーパーオキシドによる生体膜の損傷は肝虚血再灌流障害の重要な因子

と考えられている。スーパーオキシドはヒドロゲンペルオキシドとなり、フェントン反応によりヒドロキシルラジカルが生成する。ヒドロキシルラジカルは非常に反応性が高く、生体膜蛋白や脂質を過酸化する。また、スーパーオキシドには消去系のスーパーオキシドジスムターゼが存在するのに対して、ヒドロキシルラジカルには特異的な消去系が存在しない。これらのことから、ヒドロキシルラジカルを消去することが障害を軽減するために重要であると考えられ、消去剤を用いた多くの実験が報告されている。しかしこれらは、*in vitro* では効果が認められても、*in vivo* では効果が一定していない。この矛盾は生体内での薬剤の分布と関係があると考えられ、この点でニカラベンは両媒性であることから、生体内で細胞内外に分布し有効に作用すると考えられる。ニカラベンの有効性は、ラットの心臓虚血再灌流、脳外科領域ではネコの脳虚血、人のくも膜下出血での報告があるが、同様にヒドロキシルラジカルが重要な働きをしていると考えられる肝虚血再灌流障害における報告はなく、これがはじめての報告である。ニカラベン投与量については、脳、心臓の報告から 10^{-5} ~ 10^{-3} M の血中濃度が必要と考えられ、これを得るために $1\sim 5\text{mg/kg/min}$ で予備実験を行った。その結果、 1mg/kg/min では十分な効果が得られず、 2mg/kg/min では副作用なしに効果が得られ、 5mg/kg/min では徐脈が出現したことから 2mg/kg/min を至適投与量と決定した。

我々は、再灌流直後にスーパーオキシド、ヒドロキシルラジカルが大量に発生し、生体膜の脂質過酸化を起こすとの仮説で研究を行っている。実際にラジカルスカベンジャーであるラザロイドの実験では、肝臓へ虚血前に薬剤を到達させ虚血中に保つための前投与と再灌流直後から発生するスーパーオキシドを消去するための後投与の両方を行った群が最も効果的であった。このため、ニカラベンは虚血前 60 分間と再灌流 30 分前から 3 時間の前後投与とした。

ニカラベン 1 分子は π -dimerization により 2 分子のヒドロキシルラジカルを消去する。ニカラベンがヒドロキシルラジカルを消去することによって脂質過酸化を抑制することは、CL-HPLC 法により過酸化脂質の定量を行い確認した。過酸化脂質測定は、マロンジアルデヒドの測定を行った報告が多いが、感度と特異性の点で問題性が指摘されている。我々は、最近確立され、生体膜脂質の主要構成成分である PC、PE とその一次過酸化物である PCOOH、PEOOH を測定する方法を行い、その比である PCOOH/PC、PEOOH/PE を脂質過酸化の指標とした。PCOOH/PC、PEOOH/PE は再灌流 15 分後にピークとなり、コントロール群では前値の 15 及び 6 倍となったが、治療群では 4 及び 1.5 倍とその増加は有意に抑制された。

肝組織血流量は再灌流後 15 分で、コントロール群では虚血前値の 27% に対して、治療群では 105% と有意に高値であった。これは、肝実質細胞と異なり活性酸素種からの防御系が発達していない類洞内皮細胞が、その攻撃から守られた結果、微小循環が保たれたためと考えられる。類洞内皮細胞が障害されると 1) エンドセリン、エイコサノイド、NO などの血管作動性物質が活性化、2) 接着分子の発現と好中球活性化、3) PAF、サイトカイン活性化、が起きる。その結果、微小循環は低下すると考えられる。エンドセリンは強力な内因性血管収縮物質であり、活性酸素種により上昇するとの報告があるが、コントロール群に比べて治療群では再灌流後有意に上昇が抑制された。様々な接着分子を発現した類洞内皮細胞へ浸潤した好中球も、さらに活性酸素種を産生し微小循環障害を起こす。治療群では再灌流後の肝組織への好中球浸潤が抑制された。

虚血前投与により虚血中の高エネルギー代謝産物の減少及びハイポキサンチン、キサンチンの蓄積が抑制された。脂質過酸化は虚血中にも起きるとの報告がある。虚血中に細胞膜が障害を受けると、細胞内 Ca を汲み出す ATP を消費することになる。ニカラベンは虚血中、生体膜の脂質過酸化を防ぐために、ATP 低下とハイポキサンチン、キサンチン蓄積を抑制、ひいては再灌流後のヒドロキシルラジカルの産生を抑制している可能性もある。

結論

ニカラベンは肝組織脂質過酸化を抑制し、肝温虚血再灌流障害を軽減した。ニカラベンは、心停止後ドナーからの肝移植を可能にする有力な候補薬剤になりうると考えられる。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 浅 香 正 博
副 査 教 授 藤 堂 省
副 査 教 授 加 藤 紘 之

学 位 論 文 題 名

A Novel Hydroxyl Radical Scavenger, Nicaraven, Protects The Liver From Warm Ischemia And Reperfusion Injury

(ハイドロキシルラディカルスカベンジャー：
ニカラベンによる肝温虚血再灌流障害の軽減)

本邦においても脳死肝移植が施行されているが、ドナー数は不足し、その解決策の一つとして心停止後ドナーからの肝臓移植があげられる。その実現には、肝温虚血再灌流障害（以下同障害）の強力な軽減が必要である。再灌流後のスーパーオキシド、さらにフェントン反応から生成するハイドロキシルラディカルは、生体内に消去系がなく生体膜を過酸化し同障害の重要な因子とされる。ハイドロキシルラディカルの消去が同障害を軽減するために重要であると考えられ、実際これを消去する薬剤を用いた多くの実験が報告されているが、未だ臨床応用可能な薬剤はない。両親媒性の新しいハイドロキシルラディカルスカベンジャー、ニカラベンは細胞内外に速やかに到達し、ハイドロキシルラディカルを効果的に消去すると考えられ、同障害に対する軽減効果を検討した。雌性ビーグル犬を用いた2時間完全肝温虚血モデルで、ニカラベンを虚血前60分間と再灌流30分前より3時間、頸静脈より投与した。治療群では、有意に生存率、肝組織血流量、循環動態が改善、肝過酸化脂質生成、肝逸脱酵素増加、肝静脈血中エンドセリン-1上昇、肝組織障害と好中球浸潤が抑制された。肝実質細胞と異なり活性酸素種からの防御系が発達していない類洞内皮細胞が、その攻撃から守られ、肝脂質過酸化が抑制、肝静脈血中エンドセリン-1上昇を抑制、微小循環が保たれ、その後の肝実質細胞障害を軽減したためと考えられた。ニカラベンは肝温虚血再灌流障害を軽減した。また、肝温虚血時間の長い心停止後のドナーからの肝移植のための有力な薬剤となる可能性があると考えられた。

審査にあたって、加藤教授から全身の血圧への影響について、ニカラベンは肝臓に特異的に有効なのか、薬剤使用量の設定について、前投与の意義、ハイポキサンチン蓄積抑制の機序、過酸化脂質の経時的変化、虚血再灌流障害におけるニカラベンの意義について質問があった。申請者は、ハイドロキシルラディカルおよびニカラベンに関する文献、申請者自身の実験データを用いて、全身の血圧に対する直接作用はないこと、血圧維持はハイドロキシルラディカルを消去し虚血再灌流障害軽減の結果と考えられること、投与量は文献と予備実験から決定したこと、前投与は虚血中の障害を抑制するためであること、ハイポキサンチン蓄積抑制については、機序は明らかではなく今後の研究が必要であること、脂質過酸化は再灌流15分後にピークを認めその後低下すること、100%の生存を得たことからニカラベンの重要性は高いと考えられることを回答した。次いで、浅香教授からハイドロキシルラディカルの測定と証明、SODよりも有効なのか、虚血再

灌流障害における好中球の重要性、虚血中のATP低下の抑制について、四塩化炭素、エンドトキシンなどによる活性酸素の障害で用いたか、肝冷保存に有用かについて質問があった。申請者は、フリーラジカルとヒドロキシルラジカル、SOD、好中球に関する文献、申請者自身の実験データを用いて、ヒドロキシルラジカルの *in vivo* での直接の測定は困難であり、従来より鋭敏な脂質過酸化の指標を用いてこれを証明したこと、SODについては評価が一定していないこと、スーパーオキシドよりもヒドロキシルラジカルの方が障害性が高いことからニカラベンの方が有効と考えられること、好中球は再灌流後期で肝組織に浸潤し重要であると考えられること、ATP低下の抑制については今後の研究が必要と考えられること、四塩化炭素、エンドトキシン投与モデルにニカラベンは用いていないこと、冷保存にも応用可能でその実験も期待されることを回答した。最後に、藤堂教授から活性酸素による障害とエンドセリン産生の関係について、心停止後ドナーからの肝移植に向けて、今後どのような実験系を検討すべきかについて質問があった。申請者は、ヒドロキシルラジカルおよびニカラベン、エンドセリン、内皮細胞障害に関する文献、申請者自身の実験データを用いて、ヒドロキシルラジカルによる血管内皮障害によってエンドセリンが産生されること、灌流液での使用、臓器保存液での使用が期待されると回答した。

この論文はニカラベンが肝温虚血再灌流障害を軽減し、今後の心停止後ドナーからの肝移植の可能性を示唆したことで高く評価され、その臨床応用へ向けて更なる研究が期待される。

審査員一同は、ニカラベンによる肝温虚血再灌流障害の軽減という新しい知見を明らかにした本研究の成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士（医学）学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。