

犬におけるハロセン誘発性肝障害の  
発症機序に関する研究

山 添 和 明

犬におけるハロセン誘発性肝障害の発症機序に関する研究

山添 和明

## 目次

第一章	緒論	1
第二章	門脈動脈血化法による肝濯流系の検討	8
	材料と方法	10
	結果	14
	考察	16
	小括	19
第三章	肝組織中過酸化リン脂質、マロンジアルデヒド、 抗酸化系酵素活性、ヌクレオチドならびにオキ シプリン濃度に及ぼす影響	29
実験 1.	肝組織中過酸化リン脂質、マロンジアルデヒド ならびに抗酸化系酵素活性	31
	材料と方法	31
	結果	33
	考察	37

実験 2. 肝組織中ヌクレオチドおよびオキシブリン濃度	41
材料と方法	41
結果	43
考察	45
小括	48
第四章 培養肝細胞におけるヌクレオチド、アラントイン、チオ バルビツール酸反応物質の濃度と細胞内Ca <sup>2+</sup> の変動	66
材料と方法	68
結果	73
考察	76
小括	79
第五章 総括	92
謝辞	98
文献	99



## 第一章

### 緒論

ハロセン ( $\text{CF}_3\text{CHClBr}$ ) は、1956年Sucklingにより作成され、同年、Johnstoneが臨床例に使用し、現在も広く普及するハロゲン化麻酔薬の一つである。本剤は強力な麻酔作用を有し、導入および覚醒が迅速で麻酔深度の調節性に富むなど多くの利点を持つ [68]。しかしながら、1966年にVirtue [83] らが、ハロセン誘発性と考えられる肝障害を報告するなど、本剤に関連する数多くの肝障害例、とくに術後の急性発熱、胃腸症状、黄疸等に加え好酸球増多、血清トランスアミナーゼ活性の上昇および肝壊死を特徴とする肝障害が報告され、ハロセン麻酔の重要な副作用の一つに上げられている。

ハロセンはその殆どが呼気中に排泄されるが、約10~25%は生体内に分布し、最終的には肝ミクロソームで代謝される。すなわち、臨床的な用量で投与されたハロセンは好氣的条件下ではチトクロームP-450存在下、モノオキシゲナーゼ経路により水酸化され、トリフルオロ酢酸 ( $\text{CF}_3\text{COOH}$ ) と臭化物 ( $\text{Br}^-$ ) に代謝され尿中に排泄される [20、51、66]。一方、嫌氣的条件下では、ハロセンはチトクロームP-450存在下、NADPH依存性に一電子供与を受け還元された後脱ハロゲン化され、最終的にクロロジフルオロエチレン ( $\text{CF}_2\text{CHCl}$ )、クロロトリフルオロエタン ( $\text{CF}_3\text{CH}_2\text{Cl}$ ) およびフッ化物 ( $\text{F}^-$ ) に代謝される。その代謝過程において生ずる中間代謝産物 ( $\text{CF}_3\text{CHBrCl} \cdot$  や  $\text{CF}_3\text{CHCl}$ ) は肝ミクロソームのリン脂質や蛋白と濃度依存的に共有結合し、細胞障害を引き起こすことから、ハロセン誘発性肝障害の原因として考えられていた [5、48、80、84]。

近年、ハロセンの嫌氣的代謝過程で生成されるハロセン中間代謝産物は

フリーラジカルとして生体膜リン脂質の不飽和脂肪酸の二重結合部に共有結合する際にプロトンを引き抜き、さらに生体膜に連鎖的な脂質過酸化反応を誘発させ、肝障害を誘発すると考えられるようになった [29, 65]。実際、Hughesら [37] は肝灌流ラットにおいてハロセンを投与し、スピントラップ法によりフリーラジカル複合体を検出している。フリーラジカルにより生成された過酸化リン脂質は細胞膜に存在するホスホリパーゼ A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) によってマロンジアルデヒド (MDAs) などの低分子化合物に分解され、MDAsはそれ自体あるいは蛋白と結合し細胞膜を障害すると考えられている [23, 35, 52]。一方、生体内にはフリーラジカルを消去する防御機構が存在し、リン脂質過酸化物の産生を防ぐ [9, 59]。すなわち、グルタチオン、ビタミンCやEなどの低分子抗酸化物質やスーパーオキシドデスムターゼ (SOD)、グルタチオンペルオキシダーゼ (GSH-px) およびカタラーゼなどの抗酸化酵素による消去系である。このうちSODは3種のアイソザイムに分類され、Cu,Zn-SODは主に細胞質に、Mn-SODはミトコンドリアマトリックスに局在し、いずれもスーパーオキシド ( $O_2^-$ ) を特異的に消去する。またGSH-pxは肝細胞では主に細胞質に局在し、過酸化水素 ( $H_2O_2$ ) や脂質過酸化物などを広範囲に還元すると考えられている [63, 93]。

ハロセン誘発性肝障害は、低酸素下において頻発し [36, 55, 72]、酸素供給が十分であれば殆ど発症しない [70]。さらに、ハロセン麻酔下において肝血流量を低下させる薬剤を併用すると肝障害を引き起こすことから [36]、ハロセン誘発性肝障害の発症機序には、肝酸素濃度が重要な因子として関与す

ると考えられてきた。しかしながら、ハロセンはそれ自体濃度依存性に直接肝血流量を低下させ、肝低酸素症を誘発させるため、ハロセン誘発性肝障害の原因は肝低酸素症そのものであるとする研究者も多い [74、75、82]。低酸素状態あるいは虚血時に認められるエネルギー代謝の低下、とくにアデノシン三リン酸 (ATP) の低下ならびにヌクレオチドの代謝とこれに伴うプリン代謝に関連してフリーラジカルの産生が増加することが知られている [79]。すなわち、虚血時にはミトコンドリアの電子伝達系は還元状態となるが、キサンチンオキシダーゼ (XOD) 活性の亢進によりヒポキサンチン (HX) やキサンチン (XA) を基質としてフリーラジカル産生が増加することも報告されている [57]。

一方、臨床的に用いられる濃度では認められていないが、高濃度のハロセンはミトコンドリア電子伝達系においてNADHデヒドロゲナーゼを阻害すること [19] や脱共役作用があること [77] から、低酸素に加えてハロセンが酸化的リン酸化を抑制し、直接エネルギー代謝の低下、すなわちATPの枯渇を引き起こす可能性がある [70]。ATPの枯渇が生じると $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase活性の低下や $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ 交換系機能の変化によりミトコンドリアや小胞体への $\text{Ca}^{2+}$ の取り込み低下や、細胞内 $\text{Ca}^{2+}$ の細胞外への排出が阻害される [26]。実際、脱共役剤であるA23187などを投与した場合、ATPの減少後、細胞内 $\text{Ca}^{2+}$ がピークを示し、数分後に細胞死が起こる [12]。in vitroの実験でハロセンも同様に肝細胞のATPの産生を低下させ、細胞内 $\text{Ca}^{2+}$ を持続的に増加させる [89]。実際、モルモットに対し1%ハロセンを吸入させた場合、肝小葉の中心性壊死が

認められる前に肝組織中 $\text{Ca}^{2+}$ の増加が報告されており [27]、ハロセン誘発性肝障害においてもATPの低下による細胞内 $\text{Ca}^{2+}$ の増加が、細胞死を引き起こす可能性がある。また肝低酸素症あるいはハロセン中間代謝物で産生される活性酸素やフリーラジカルは細胞内グルタチオン (GSH) などの可溶性チオールを低下させ、ミトコンドリアからの $\text{Ca}^{2+}$ 放出を促進する。さらにフリーラジカルにより産生される過酸化リン脂質やMDAsは細胞膜を障害し、細胞外 $\text{Ca}^{2+}$ の流入を引き起こすと考えられている [3、13]。したがって、ハロセン誘発性肝障害では肝エネルギー代謝の低下と嫌氣的代謝で産生されるフリーラジカルやリン脂質過酸化物により細胞内 $\text{Ca}^{2+}$ は増加すると考えられ、さらにその結果、 $\text{Ca}^{2+}$ 依存性ホスホリパーゼなどの作用により細胞死に至ると推測される。

一方近年、肝移植、拡大肝切除術および肝門部手術などにおける一時的な肝血流の遮断による肝組織の虚血と、その解除に伴い継発する再灌流障害が報告されている [28、45、63]。再灌流障害は虚血時においてミトコンドリアの電子伝達系が過度の還元状態に陥るため、血流再開によりおもにキサンチンオキシダーゼ (XOD) 活性の亢進により $\text{O}_2^-$ の産生が増加し、脂質過酸化障害を引き起こす [31]。元来、肝への血流は肝動脈と門脈による二重支配を受けているが麻酔や手術侵襲により総肝血流量は減少する [4、32]。すなわち、ハロセン麻酔時に低下していた肝血流が、ハロセン麻酔後に回復した場合、ミトコンドリア呼吸鎖の電子伝達系の還元状態は解除され、活性酸素の産生が増加する。さらにXOD活性の増加によりヒポキサンチン (HX) やキサンチン (XA) を基質として活性酸素が産生される結果となる。

ハロセン誘発性肝障害の発症機序については、以上のように様々な因子が想定されているが、これまでのハロセン誘発性肝障害の研究には、生体の肝循環がそのまま用いられてきた。すなわち従来の実験系では、総肝血流量が制御されず、ハロセンにより総肝血流量が低下するため、ハロセン濃度と酸素供給量を独立して検討することはできなかった [36, 55]。したがって、ハロセン誘発性肝障害の発症機序を検討する上ではその障害がハロセンそのものに起因するか否かを判別しなければならず、ハロセン濃度と酸素供給量を独立して維持できる肝灌流系が必要となる。門脈動脈血化 (PA) 法は肝細胞に対する酸素供給を維持しつつ門脈圧を低下させる外科手術法の一つである [1, 6, 39, 71]。従来ヒトで主に肝硬変および／あるいは食道静脈瘤などで観察される門脈圧亢進を減少させる目的で門脈一下大静脈吻合術 (PVA) が実施されていたが、その際には、門脈血流量減少による肝機能障害が発現する。本法はこの肝障害を防止する目的で行われ [1, 6, 39]、肝機能、特に肝エネルギー代謝を維持するため、肝動脈および門脈血流量を含めた総肝血流量で算出される酸素供給量を門脈を動脈血化することで維持しようとする方法である [21, 49, 67]。このPA法を用いれば総肝血流量に基づき酸素供給量を制御することが可能と考えられる。

そこで、ハロセン誘発性肝障害の発症機序を明らかにするため、

第二章ではまず、ハロセン濃度と酸素供給量を独立して維持できる実験系を確立する目的で門脈動脈血化 (PA) を用いた肝灌流系と、肝動脈のみで血液を供給した灌流系 (PVA) について肝酸素供給量と消費量、エネルギーチ



ヤージおよび形態学的な変化を、比較検討した。

第三章では第二章で作成し、有用と判定された肝実験系を用い、臨床的に用いられるハロセン麻酔濃度を吸入させ、まず肝組織中過酸化リン脂質と主要な脂質過酸化代謝物であるMDAs、さらに抗酸化系酵素であるSODおよびGSH-pxを経時的に測定し、ハロセンそのものの影響を検討するとともに、動脈化門脈血流量を減少させることにより肝酸素供給量を低下させ、酸素供給量や消費量とMDAsとの関係を検索し、肝酸素濃度のハロセン誘発性肝障害に及ぼす影響を検討した。また肝組織ヌクレオチドおよびオキシブリンを経時的に測定し、形態学的な変化とともにハロセン誘発性肝障害におけるエネルギー代謝系の関与について検討した。

さらに、第四章では初代培養肝細胞を用い、ハロセン投与に加え、ミトコンドリアのチトクロームc酸化酵素を阻害するシアン化物を用い酸化的リン酸化を抑制した条件下において、ヌクレオチドやアラントイン、さらに脂質過酸化代謝産物であるTBA反応物質（TBARS）を測定し、ハロセンによる肝エネルギー代謝の変動やハロセンの嫌氣的代謝で産生されるフリーラジカルによる脂質過酸化と、細胞内 $\text{Ca}^{2+}$ の変動について検討した。

## 第二章

### 門脈動脈血化法による肝灌流系の検討



前述したごとく、ハロセン誘発性肝障害は低酸素下において頻発し [36, 55, 72]、酸素供給が十分であれば殆ど発症しない [70] ことから、本症の発症機序には、肝酸素濃度が重要な因子の一つと考えられている。犬の肝への酸素供給は肝動脈と門脈になっており、実際肝動脈を結紮すると酸素供給量低下により肝機能障害を引き起こし [24, 50]、また門脈を結紮した場合にも一過性に肝動脈血流量が増加するものの、その後減少し、肝動脈結紮と同様の肝機能障害を生じる [34, 41, 42]。一方、ハロセンは濃度依存性に心拍出量と末梢血管抵抗を低下させ、肝血流量の減少を引き起こし、肝低酸素症を誘発させる。近年、本症発症の原因の一つとしてフリーラジカルの関与が指摘され、それ以降多くの研究者によりフリーラジカルの重要性を示唆する様々な結果が報告されてきている。フリーラジカルはハロセンの嫌氣的代謝過程で産生されるが [29, 37, 65]、低酸素下でも肝エネルギー代謝の低下に基づいてヌクレオチド代謝ならびにこれに伴うプリン代謝の過程で産生される [79]。したがって、本症の原因を検討する上では酸素供給量を制御しうる肝灌流系で検討することが必要である。

門脈動脈血化法 (PA) は肝細胞に対する酸素供給を維持しつつ門脈圧を低下させる外科手術法の一つである [1, 6, 39, 71]。従来ヒトでは、肝硬変や食道静脈瘤などで観察される門脈圧亢進を減少させる目的で実施される門脈一下大静脈吻合術 (PVA) に伴う門脈血流量減少による肝機能障害を防止する目的で行われる [1, 6, 39]。肝機能、特に肝エネルギー代謝を維持する酸素供給量を門脈を動脈血化することで補充しようとする方法である [21、

49、67]。PAを用いた場合、肝エネルギー代謝を維持するに必要な酸素供給を行う肝血流量は総肝血流量の10~25%とされ[50]、頸あるいは大腿動脈から動脈血を導出し、門脈血を動脈化すれば、肝全体のエネルギー代謝を維持するに十分な酸素供給が可能と考えられている。

そこで、本章では肝酸素供給量を制御できる実験系を確立するため肝酸素供給量と消費量、エネルギーチャージ値ならびに形態学的な変化について、PAを用いた肝灌流系と、肝動脈のみで血液を供給した灌流系(PVA)を比較検討した。

## 材料と方法

### 1) 供試犬

臨床上健康な雑種成犬7頭(約1-3歳、体重10.5-16 kg)を市販のドックフードと自由飲水で1週間以上飼育した後、実験に供した。供試犬は門脈-大腿静脈吻合(PVA)群(3頭)と門脈動脈血化(PA)群(4頭)の2群とした。

### 2) PVAおよびPAの作製

24時間絶食後、それぞれの犬に対しグリコピロレート(5  $\mu$ g/kg, SC)を麻酔前投与し、サイアミラールNa(25 mg/kg, IV)で導入した。気管挿管後N<sub>2</sub>OとO<sub>2</sub>(2:1 v/v)および0.1%ケタミン持続点滴(約50-100 mg/hr, IV)

で麻酔状態を維持した。左大腿動脈と右頸静脈経由で肝静脈に12Frと5Frのカテーテルをそれぞれ留置し、動脈圧と肝静脈圧をモニターした。

腹部正中切開により開腹し、脾摘を実施した後、塩化スキサメトニウム(0.2mg/kg, IV)投与により調節呼吸に移行し、実験終了まで同調節呼吸下で維持した。ついで肝動脈と門脈をそれぞれ露出し、電磁血流計(MVF-3000, 径2,3,5 mm, 日本光電, 東京)を用いて血流量を測定した。その後、ヘパリンNa(100U/kg, IV)を投与し、腸側の門脈に18Frカテーテルを挿入し、流量ポンプ(マイクロプロセッサーポンプドライブ, コールパーマーインストルメント, USA)を用いて静脈血を右大腿静脈に短絡した(図1)。

上記のPVA術を実施した後、PA法を以下の手順で行った。すなわち、肝側の門脈にも同様に18Frカテーテルを挿入し、大腿および頸動脈から導出した動脈血を別の流量ポンプを用いて低流量より門脈に流入させ、流量を増すに従い総肝動脈を結紮し、動脈化門脈血に完全に置換した。さらにハロセンにより末梢血管抵抗が低下し循環血液量が不足するため、約1.5Lの補充血液を他の複数の犬から採取しヘパリン(10U/ml)含有のリザーブチャンバーに用意し、回路外につないだ。流量は灌流前に測定した総肝血流量の50%以上となるように徐々に増加した。灌流血流量は約1時間で安定させ、この時点を灌流前とした。

### 3) 検体採取

PA群では動脈化された門脈と肝静脈から、PVA群では肝動脈と肝静

脈からそれぞれ血液検体を灌流開始0.5、1、2、3時間後に採取した。また血液検体採取時に肝小片を採取し、アデノシン三リン酸(ATP)、アデノシン二リン酸(ADP)およびアデノシン一リン酸(AMP)の測定を行った。

#### 4) 酸素供給量および消費量

各血液検体に対し血液ガス分析を行い肝酸素供給量 ( $\text{HO}_2$  supply) と肝酸素消費量 ( $\text{HO}_2$  consumption) を以下の式に従って算出した [38]。

$$\text{HO}_2 \text{ supply (ml/min 100 g 肝湿重量)} = (\text{動脈化門脈、あるいは肝動脈の血流量}) \\ \times (\text{動脈化門脈、あるいは肝動脈の酸素含量}) \times 1/100$$

$$\text{HO}_2 \text{ consumption (ml/min)} = \text{動脈化門脈、あるいは肝動脈血の流量} \\ \times (\text{動脈化門脈、あるいは肝動脈の酸素含量} - \text{肝静脈の酸素含量}) \times 1/100$$

#### 5) ATP、ADPおよびAMPの測定

約1gの肝小片材料を採取し、冷生理食塩水中で洗浄し、出来る限り脱血した。100 mgの肝組織を秤量後、冷0.6 M過塩素酸2.5mlを加え、Potter-Elvehjemホモゲナイザーを用い、氷中で1分間ホモゲナイズした。ついで、2 M炭酸カリウム0.75 mlでホモジネートを中和した後、3000 rpmで10分間遠心し、上清を採取した。さらに得られた上清を0.45  $\mu\text{m}$ のフィルターでろ過し、測定まで-80  $^{\circ}\text{C}$ で保存した。

ATP、ADP および AMP の検出は Lazzarino らの方法 [46] に準拠し、Gulliver HPLC システム (JASCO, Ltd, 東京) により、4.6 mm x 30 mm のプレカラムを装着した 4.6 mm x 25 cm シリカゲルカラム (いづれも Pegasil, ODS, Senshu, 東京) をカラム温度 40 °C として用い、実施した。移動相は 10 mM テトラブチルアンモニウムヒドロキシド、25 mM リン酸二水素カリウム、1.0 % メタノール (A 液; pH 6.5) と 5 mM テトラブチルアンモニウムヒドロキシド、100 mM リン酸二水素カリウム、30 % メタノール (B 液; pH 4.5) の 2 つの溶液を用い、B 液を 0-100 % まで変化させるリニアグラジエントを 10 分から 50 分まで行った。検体は 50  $\mu$ l を注入し、流速 1.2 ml/min で溶出し、得られた溶出液を 266 nm で検出した。またエネルギーチャージ値 (EC) は Atkinson の方法により  $EC = (ATP + 1/2 ADP) / (ATP + ADP + AMP)$  として算出した [7]。

#### 6) アラニンアミノトランスフェラーゼ (ALT) 活性の測定

肝細胞破壊の指標として肝静脈血中 ALT 活性を酵素法 (ドライケミストリーシステム、富士フィルム、東京) で測定した。

#### 7) 組織学的検査

組織学的検査用の検体は PA ならびに PVA 両群からそれぞれ肝小片を灌流前と、2 時間後に採取した。採取した肝組織はブアン固定を行った後、常法に従いパラフィン包埋し、5  $\mu$ m の厚さで切片を作成し、ヘマトキシリン・

エオジン染色した。

#### 8) 統計処理

統計学的解析は paired  $t$ -test と unpaired  $t$ -test を用いた。

#### 結果

PA およびPVA 各群における動脈化門脈血 (PA群) と肝動脈血 (PVA群)、ならびに肝静脈血中の血液ガス分析、すなわち pH、酸素分圧 ( $pO_2$ )、炭酸ガス分圧 ( $pCO_2$ ) の変動を図2-3に示した。動脈化門脈 (PA群) ならびに肝動脈 (PVA群) の  $pO_2$  は灌流後安定した値を維持し、両者間に差は認められなかった。肝静脈  $pO_2$  では、PA および PVA 各群の平均値±標準偏差は灌流前でそれぞれ  $59.4 \pm 22.8$  mmHg、 $59.4 \pm 35.4$  mmHg と両群に有意差は認められなかったが、灌流開始1、2、3時間後では、PA 群は PVA 群と比較してそれぞれ有意な高値 ( $p < 0.01$ ) を示した。また、pH と  $pCO_2$  には PA と PVA 各群間に有意な差は認められなかった。

肝酸素供給量と消費量、および肝静脈血酸素含量の変動を図4に示した。PA とPVA 各群の酸素供給量は灌流前でそれぞれ  $13.6 \pm 4.38$  ml/min · 100g 肝湿重量、 $8.72 \pm 4.46$  ml/min · 100g 肝湿重量であった。PA 群および PVA 群の酸素供給量は灌流3時間後まで安定しており、有意な変動は認められなかったが、各値は PA 群は PVA 群に比較して高値を維持した。PA と



PVA 各群の酸素消費量は灌流前でそれぞれ  $3.03 \pm 1.05$  ml/min · 100g 肝湿重量、 $1.87 \pm 0.22$  ml/min · 100g 肝湿重量であった。また PA 群では灌流3時間後まで安定しており、経時的な変動を認めなかったが、PVA 群では徐々に増加した。

肝組織中ATP濃度とエネルギーチャージ値 (EC) を図5に示した。PA 群では灌流1時間後まではわずかに減少するものの3時間後には前値に復したが、PVA 群では、ATP 値は2および3時間後に減少し、3時間後には PA 群と比較し有意な低値 ( $p < 0.01$ ) を示した。さらに PA と PVA 両群ともに EC は ATP のそれとほぼ同様に推移し PVA 群の EC は、灌流3時間後で PA 群に比較し有意な低値 ( $p < 0.05$ ) を示した。

両群の肝静脈血中の ALT 活性値の変動を図6に示した。PA 群では有意な変動は認められなかったが、PVA 群では灌流開始時より有意な増加が認められ漸増する傾向が窺われた。

両群の灌流前および2時間後の肝組織所見を図7に示した。PA 群では肝小葉と肝細胞索の構造は、白血球のわずかな浸潤を除けばよく保存され、灌流2時間後においてもわずかに類洞の拡張が認められるのみであった。一方、PVA 群では肝小葉と肝細胞索の構造は崩壊し、類洞の拡張と鬱血が認められ、また灌流2時間後では細胞質に顆粒状変性が認められた。

## 考察

肝静脈血は肝循環における酸素需給動態を反映すると考えられている [50]。血液ガス分析はPA群では pH、 $pO_2$  および  $pCO_2$  いずれも灌流3時間後まで安定した値を維持した。前田ら [50] は本来の門脈血流に動脈血を流入させる部分的PA法を用いた場合でも、肝静脈血中の血液ガス分析値は安定していると報告している。本実験において、PA および PVA 各群の肝への流入血液の  $pO_2$  は、ほぼ一定し、両群間に差は認められないが、肝からの流出部である肝静脈では PA 群が有意な高値を示し、また PVA 群では漸増する傾向が窺われた。したがって、PA 群では肝の酸素需給動態は安定しているが、PVA 群では肝の酸素消費量に対して肝動脈のみによる供給では不足するものと考えられる。

一方、PA 群と PVA 群の肝酸素供給量は灌流前でそれぞれ  $13.6 \pm 4.38 \text{ ml/min} \cdot 100\text{g}$  肝湿重量、 $8.72 \pm 4.46 \text{ ml/min} \cdot 100\text{g}$  肝湿重量の値を示し、また灌流3時間後まで安定していたが、PA群がPVA群に比較して高値を維持した。また、肝酸素消費量は PA 群では酸素供給量と同様に灌流3時間後まで安定し経時的変動を認めなかったが、PVA 群では増加傾向が認められ、酸素の需給バランスは PA 群が PVA 群に比較して安定していると考えられた。肝への酸素供給を規定する肝血流量は、肝動脈と門脈血流量の和として表されるが、その流量は約 1:4 と報告されており [32]、門脈血流量に影響される



部分が多く、肝への酸素供給量は肝動脈を結紮しても、門脈を動脈化すること  
で補充しうるものと考えられる。

PA 法により術前の総肝血流量の10%の流入量で動脈化門脈血を流入  
させた群と25%を流入させた群とを比較すると、25%群では肝組織中 ATP  
量および EC の変動は認められないが、10%群では有意な低下が認められて  
いる [69]。さらに肝組織乳酸量は、25%群では30分後までわずかに増加す  
るもののその後減少するのに対し、10%群では灌流後漸増し、また25%群  
と比較して有意に高値を示すことから、10%の流入量では酸素供給量の不足  
による嫌氣的代謝の亢進が推測されている。本実験においても肝組織中 ATP  
濃度と EC は PA 群では灌流1時間後まではわずかに減少するものの3時間後  
には前値に復した。肝組織中 ATP 濃度の減少は酸素供給量の不足に起因する肝  
エネルギー代謝のペントースリン酸回路への変換を示している。しかしながら  
PA 群では、その後 ATP 濃度は灌流前値に復することから、一時的な酸素不  
足は存在するものの ATP 産生を増加させるに十分な酸素供給量は確保されて  
いるものと考えられた。一方、PVA 群では灌流2時間後より低下し、3時間後  
には PA 群と比較し有意な低値を示し、酸素供給量が不足した結果、好氣的な  
肝エネルギー代謝の低下により嫌氣的代謝の亢進したものと考えられる。

多くの研究者により EC 値が 0.5 以下に低下した場合には、ミトコン  
ドリアにおける不可逆的な障害が生じ肝細胞死を引き起こすと報告されている  
[17, 78, 85]。本実験において、PVA 群の EC 値は灌流2および3時間後に  
0.5 以下の値を示し、不可逆的な肝細胞障害が発現しているものと推測された。

福本 [30] は PA 法では血中トランスアミナーゼ値の増加を認めないのに対し、PVA 法では有意に増加すると報告している。本実験においても PA 群では肝組織中 ALT 活性に変動を認めなかったが、PVA 群では有意な増加を認めた。さらに、PVA 群では組織学的所見からも肝組織に顆粒状変性が確認されたことから、PVA 群では肝障害が引き起こされていることが明らかとなった。

以上のことから、PA 法による肝灌流系は、肝組織のエネルギー代謝を維持するに十分な酸素供給を得られることが明らかとなった。また、肝動脈を結紮することで肝への血流量を一定に制御する、すなわち肝への酸素供給量を制御することも可能で、ハロセン誘発性肝障害の発症機序を解明するために用いる実験系として有用であると考えられた。

ハロセン誘発性肝障害の発症機序には肝酸素濃度が重要な因子と考えられている。従来の実験系では生体が有する本来の肝血行動態に依存するため、ハロセンに起因する肝血流量の減少による肝低酸素症の影響を回避できない。したがって、ハロセン誘発性肝障害の発症機序の詳細を検討する上では、まず酸素供給量を独立して維持できる肝灌流系が必要となる。門脈動脈血化 (PA) 法は肝細胞に対する酸素供給を維持しつつ門脈圧を低下させる外科手術法の一つであり、肝エネルギー代謝を維持するために必要な酸素供給を、門脈血を動脈化することにより得ようとするもので、この血流を制御することで肝の酸素供給を一定に保つことが可能と考えられる。

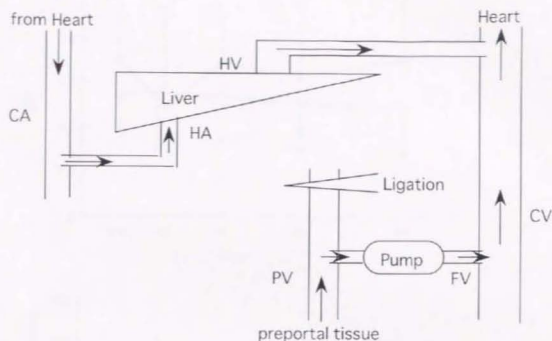
そこで、PA 法を用いた肝灌流系における肝酸素供給量と消費量、エネルギーチャージ値および形態学的な変化を、肝動脈のみで血液を供給した灌流系 (PVA) のそれとを比較検討した。

血液ガス分析では PA 群は pH、 $pO_2$  および  $pCO_2$  いずれも灌流3時間後まで安定した値を維持した。PA と PVA 群でともに肝酸素供給量は、灌流3時間後まで安定していたが、PA 群では PVA 群に比較して高値を維持した。また肝酸素消費量は、PA 群では酸素供給量と同様に灌流3時間後まで安定し経時的変動を示さなかったが、PVA 群では増加傾向を示した。PA 群の肝組織中ATP 濃度と EC 値は灌流1時間後まではわずかに減少するものの3時間後に

は前値に復し、少なくとも ATP 産生を増加させるに十分な酸素供給量は確保されているものと考えられた。一方、PVA 群では、灌流2時間後より低下し、3時間後には PA 群と比較し有意な低値を示し、肝の好氣的エネルギー代謝の低下が推測され、酸素供給は不足していると考えられた。また、PVA 群の EC 値は灌流2および3時間後には0.5以下の値に低下し、PVA 群ではミトコンドリアに不可逆的な重度の肝細胞障害が発現しているものと考えられた。さらに、PA 群では肝静脈血中 ALT 活性値に有意な変動は認められなかったが、PVA 群では灌流開始後より漸増し、組織学的所見からも肝小葉と肝細胞索構造の崩壊、類洞の拡張と鬱血ならびに顆粒状変性が認められ、肝細胞障害の存在が明らかとなった。

以上の結果から PA 法による肝灌流系は、肝組織のエネルギー代謝を維持するに十分な酸素供給が得られ、肝血流量を一定に保持することで酸素供給量を制御できる灌流系であることが明らかとなった。したがって、ハロセン誘発性肝障害の発症機序を解明するため、以下の実験では PA 法を用いることにした。

# Portal vein anastomosis



# Portal vein arterialization

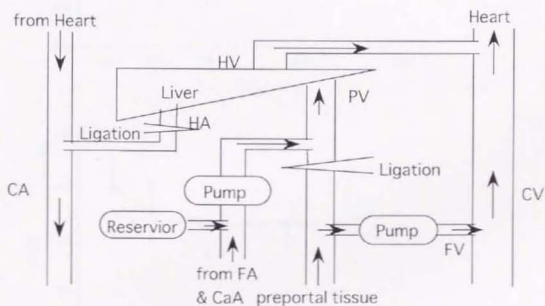


Fig. 1. Schema of portal vein anastomosis(PVA) and portal arterialization(PA).  
 HA: hepatic artery, HV: hepatic vein, PV: portal vein, FA: femoral artery, FV:  
 femoral vein, CaA: carotid artery, CA: caudal artery, CV: caudal vein.

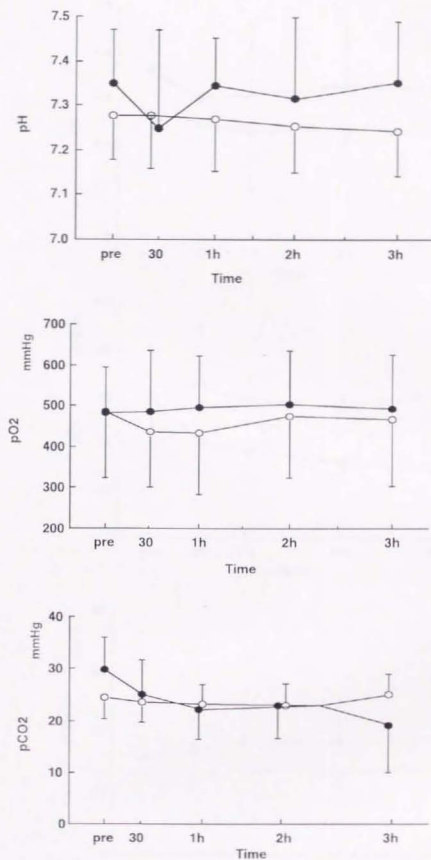


Fig. 2. Changes of pH, pO<sub>2</sub> and pCO<sub>2</sub> levels in arterialized portal vein in PA (○) and hepatic artery in PVA (●).

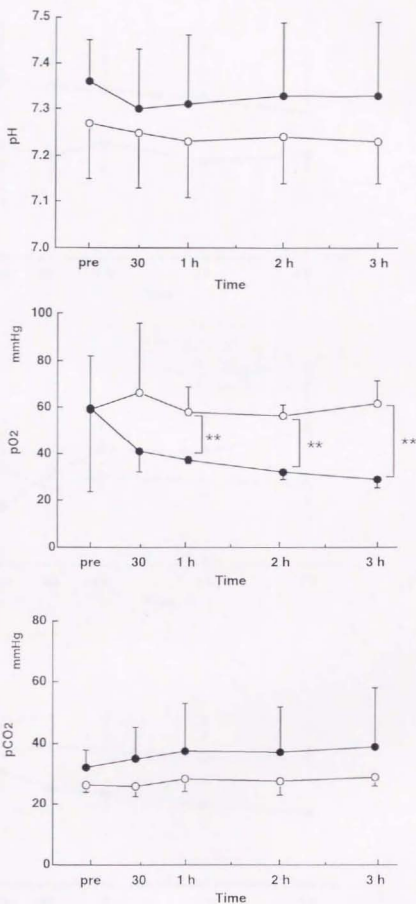


Fig. 3. Changes of hepatic venous pH, pO<sub>2</sub>, and pCO<sub>2</sub> levels in PA (○) and PVA (●).

\*\*p<0.01 by unpaired t-test.



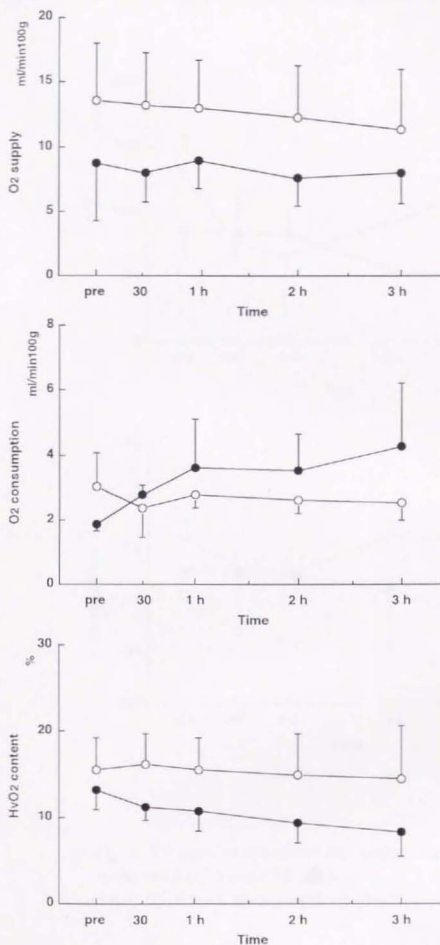


Fig. 4. Changes of oxygen supply, consumption, and hepatic venous oxygen content in PA (○) and PVA (●).



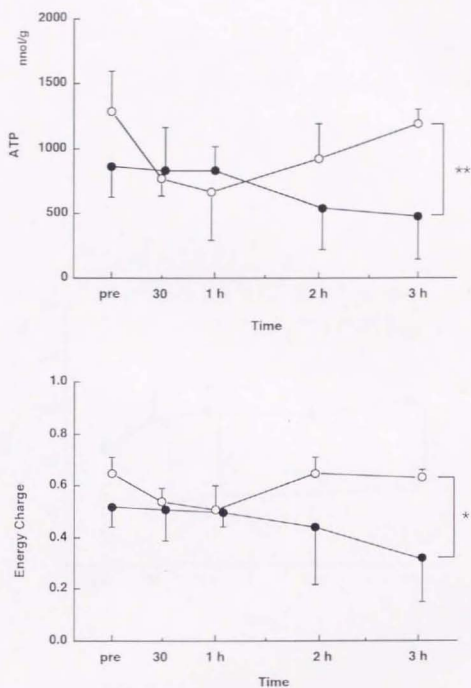


Fig. 5. Changes of adenosine triphosphate and energy charge levels in PA (○) and PVA (●).

\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$  by unpaired  $t$ -test.

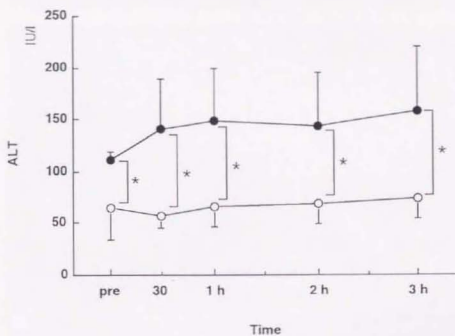


Fig. 6. Changes of alanine aminotransferase activity in PA (○) and PVA (●).

\* $p < 0.05$  by unpaired  $t$ -test.

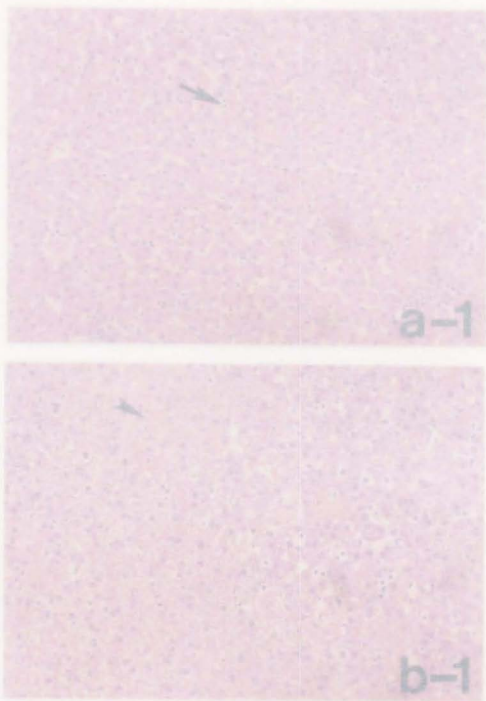


Fig. 7A. Photomicrographs of liver from PA (a-1) and PVA (b-1) at preperfusion.

(a-1) Hepatic cord was well preserved with slight sinusoidal dialation and effusion of exudate cells (arrow).

HE stain. X 200.

(b-1) Hepatic cord was broken down with sinusoidal dialation, severe congestion (arrowhead), and effusion of exudate cells. Granular degeneration were observed in cytoplasm.

HE stain. X 200.

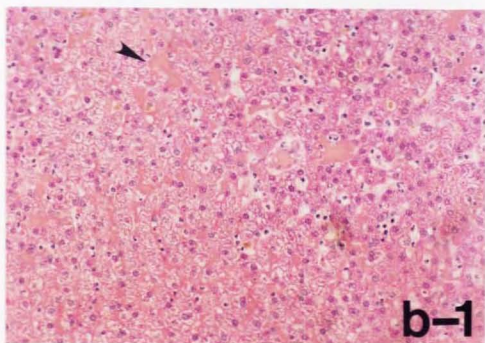
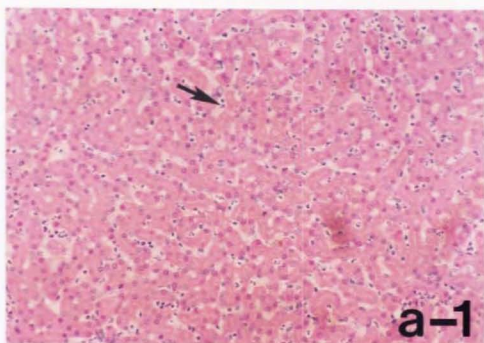


Fig. 7A. Photomicrographs of liver from PA (a-1) and PVA (b-1) at preperfusion.

(a-1) Hepatic cord was well preserved with slight sinusoidal dilation and effusion of exudate cells (arrow).

HE stain. X 200.

(b-1) Hepatic cord was broken down with sinusoidal dilation, severe congestion (arrowhead), and effusion of exudate cells. Granular degeneration were observed in cytoplasm.

HE stain. X 200.

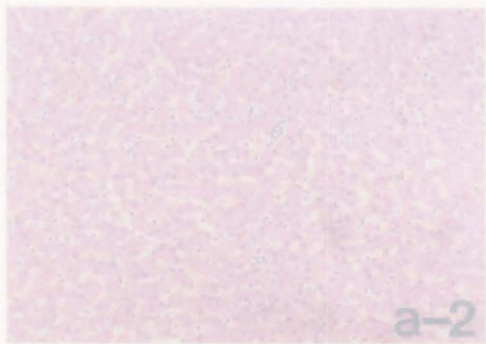


Fig. 7B. Photomicrographs of liver from PA (a-2) and PVA (b-2) 2 hr after perfusion.

(a-2) No remarkable change was observed. HE stain. X 200.

(b-2) Granular and vacuolar degeneration were observed in cytoplasm like as that in preperfusion. HE stain. X 200.

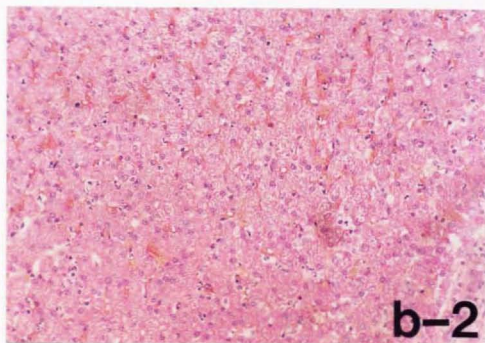
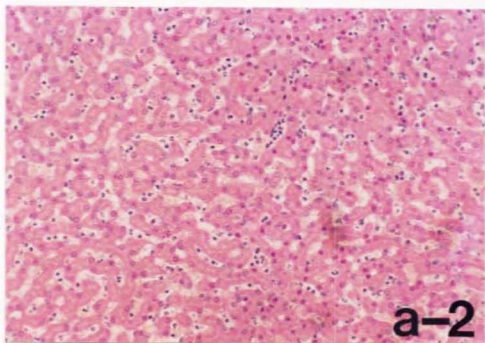


Fig. 7B. Photomicrographs of liver from PA (a-2) and PVA (b-2) 2 hr after perfusion.

(a-2) No remarkable change was observed. HE stain. X 200.

(b-2) Granular and vacuolar degeneration were observed in cytoplasm like as that in preperfusion. HE stain. X 200.

### 第三章

肝組織中過酸化リン脂質、マロンジアルデヒド、抗酸化系酵素活性、  
ヌクレオチドならびにオキシブリン濃度に及ぼす影響



前述した如く、ハロセン麻酔を実施する上で最も重要な副作用の一つであるハロセン誘発性肝障害は、ハロセンの嫌氣的代謝過程で中間代謝産物として生成される、生体膜リン脂質の不飽和脂肪酸に連続的な脂質過酸化を誘起させるフリーラジカルにより引き起こされる [29、65]。しかしながら、低酸素状態あるいは虚血時では、ヌクレオチドの代謝とこれに伴うプリン代謝に関連してフリーラジカルの産生が増加することも知られている [79、88]。一方、生体内にはフリーラジカルを消去する防御機構が存在し、リン脂質過酸化物の産生を防ぐ [9、59]。スーパーオキシドデスムターゼ (SOD) はスーパーオキシド ( $O_2^-$ ) を特異的に消去し、またグルタチオンペルオキシダーゼ (GSH-px)、過酸化水素 ( $H_2O_2$ ) や脂質過酸化物などを広範囲に還元すると考えられている [63、93]。

ハロセン誘発性肝障害の発症機序には肝酸素濃度が重要な因子として関与すると考えられてきた。そこで、第二章で検討した門脈動脈血化法 (PA 法) による、酸素供給量を制御できる肝灌流系を用い、実験1では臨床的に用いられるハロセン麻酔時における肝組織中過酸化リン脂質とマロンジアルデヒド (MDAs)、さらに抗酸化系酵素のうち SOD、GSH-px を経時的に測定し、肝酸素供給量の低下によるハロセン麻酔の影響を検討した。また実験2では肝組織中のヌクレオチドならびにオキシプリン、とくにフリーラジカルの産生を伴う代謝産物であるヒポキサンチン、キサンチンならびに尿酸濃度を経時的に測定し、低酸素下の肝組織エネルギー代謝ならびにプリン代謝におよぼすハロセン麻酔の影響を検討した。



## 実験 1. 肝組織中過酸化リン脂質、マロンジアルデヒド濃度ならびに抗酸化系 酵素活性の変動

### 材料と方法

#### 1) 供試犬

健康な約1-3歳齢の雑種成犬15頭、体重9-15 kg ( $12.7 \pm 2.0$  kg) に市販のドッグフード給餌と自由飲水を1週間以上行って馴致した後、実験に供した。供試犬は第二章の結果に基づき以下の4群に分類した。A群(5頭)は肝酸素供給量が肝エネルギー代謝について不十分な群、低酸素群として総肝血流量を10%以下で灌流し、1.5% ハロセン吸入を行った。B群(4頭)は肝酸素供給量を保持した群として総肝血流量を50%以上で灌流し、1.5% ハロセン吸入を行った。C群(3頭)ならびにD群(3頭)はそれぞれハロセン吸入を行わない対照群とし、それぞれ総肝血流量を10%以下ならびに50%以上で灌流し、ハロセン吸入は行わなかった。

#### 2) 肝灌流系の作成

24時間絶食後、それぞれの犬に対しグリコピロレート( $5 \mu\text{g/kg}$ , SC)とサイアミラルNa ( $25 \text{ mg/kg}$ , IV)を前投与した。気管内挿管し $\text{N}_2\text{O}$ と $\text{O}_2$  (2:1v/v) および0.1% ケタミン持続点滴 (約50-100 mg/hr, IV) で麻酔を維持した。12 Fr と5 Fr のカテーテルを左大腿動脈と右頸静脈にそ

れぞれ留置し動脈圧と肝静脈圧をモニターした。ついで前章で記述したPA法を実施し肝灌流系を作成し、約60分間で総肝血流量を安定させ、この時点を灌流ならびにハロセン吸入前値とした。

### 3) 検体採取

各血液検体は動脈化した門脈ならびに肝静脈から灌流およびハロセン吸入30分、1、2および3時間後に採取した。また、上記同時刻に肝組織小片を得、各測定項目の測定検体として用いた。

### 4) 血液ガス分析

各血液検体について血液ガス分析を行い肝酸素供給量 ( $\text{H}_2\text{O}_2$  supply) と肝酸素消費量 ( $\text{H}_2\text{O}_2$  consumption) を Hughesら [38] の方法で前章の計算式により同様に算出した。

### 5) 過酸化リン脂質と MDAs の測定

約 2 g の肝材料を冷生理食塩水で 4 ~ 5 回洗浄し、可能な限り脱血した。100 mg の肝組織を秤量後、0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.4, 10 mM エチレンジアミン四酢酸含有:EDTA) 2.5 ml を加え、Potter-Elvehjem ホモゲナイザーを用い氷中で1分間ホモゲナイズした。ついで、1.2 ml のホモジネートを Bligh と Dyer [16] の方法に従い総脂質と遊離型 MDA の抽出に用いた。さらに 1.0 ml のホモジネートをアルカリ処理した後、上記と同様の方法で抽出し、

蛋白結合型 MDA の検体とした。過酸化リン脂質の高速液体クロマトグラフィー (HPLC) による分析および MDAs の定量は松木ら [53, 54] の方法に従い実施し、過酸化リン脂質はリン脂質分画中の比率として表した。

#### 6) 抗酸化系酵素活性の測定

スーパーオキシドデスムターゼ (SOD) の測定用検体は50 mgの肝組織を秤量後、0.05 Mリン酸カリウム緩衝液 (pH7.8) 5.0 mlを加えPotter-Elvehjem ホモゲナイザーを用い氷中で1分間ホモゲナイズした。ついで総および Mn-SOD 活性は Oberly と Spitz のニトロブルーテトラゾリウム (NBT) 法を用いて測定した [62]。グルタチオンペルオキシダーゼ (GSH-px) 測定用検体は100 mgの肝組織を秤量後、0.5 mM EDTA を含有した0.05 Mリン酸ナトリウム緩衝液 (pH7.4) を5.0 ml加え、Potter-Elvehjem ホモゲナイザーを用い、氷中で1分間ホモゲナイズした。GSH-px 活性は Jensen ら [40] の方法で測定した。

#### 7) 統計処理

統計学的有意差はpaired  $t$ -testで分析した。

#### 結果

肝組織中の過酸化リン脂質率、MDAs 濃度、抗酸化酵素活性および肝

酸素供給量と消費量を表1-4に示した。さらにそれら数値は、各ハロセン吸入および/あるいは灌流前値を基準とし、変動率(%)として表わした。

## 1) 過酸化リン脂質

肝組織中の過酸化ホスファチジルエタノールアミン (PE) と過酸化ホスファチジルコリン (PC) の変化を図8に示した。酸素供給量を低下させ、ハロセン吸入を行ったA群では過酸化 PE に変化は認められなかったが、PC の過酸化率はハロセン吸入後増加する傾向が認められ、吸入1時間後には前値に比較し有意な高値を示した。しかしながら、酸素供給量を保持し、ハロセン吸入を行ったB群では、過酸化 PC に変動は認められず、また過酸化 PE は吸入開始3時間後に有意な低値を示した。低酸素のみのC群では過酸化 PE に有意な変動は認められず、過酸化 PC は増加する傾向を示したが、A群と比較してその程度は小さかった。またD群では過酸化 PC、ならびに PE いずれも変動を認めることはできなかった。

## 2) MDAs 濃度

図9に肝組織中の遊離型および蛋白結合型の MDAs の変化を示した。A群では遊離型 MDA は吸入1、2時間後に、また蛋白結合型 MDA は吸入1、2および3時間後に前値と比較して有意な増加が認められた。これに対し、B群では遊離型MDAにはわずかな増加傾向が観察されたが、有意な変動は認められなかった。一方、C群では蛋白結合型 MDA は灌流30分および1時間後に有意

な増加が観察されたが、この増加はA群に比較し軽度であった。またD群では遊離ならびに蛋白結合型 MDA いずれも変動は認められなかった。

### 3) SOD および GSH-px 活性

図10に各群の肝組織中の総および Mn-SOD 活性ならびに GSH-px 活性の変化を示した。ハロセン吸入したAおよびB群では肝組織中の総および Mn-SOD 活性ならびに GSH-px 活性いずれについても有意な変動は認められなかった。一方、酸素供給量を低下させたのみのC群では総 SOD 活性に減少傾向が認められ、灌流開始1時間後に前値には比較し有意な低値を示したが、Mn-SOD 活性には特に変動は認められなかった。また GSH-px 活性には減少傾向が認められ、灌流2時間後に有意な低値を示した。

### 4) 肝酸素供給量および消費量と MDAs 濃度の相関

ハロセン麻酔下における肝酸素供給量と MDAs および肝酸素消費量と MDAs の相関をそれぞれ図11および12に示した。酸素供給量と総 MDAs との間に有意な相関( $P<0.01$ )が認められ、また蛋白結合型 MDA との間にも有意な相関( $P<0.01$ )が認められた。また酸素消費量と総 MDAs との間にも同様に相関( $P<0.01$ )が認められ、酸素供給量と同様蛋白結合型 MDA との間に有意な相関( $P<0.01$ )が認められた。一方、ハロセン麻酔を行わなかった群では酸素供給量と MDAs および酸素消費量と MDAs の間に相関は認められなかった。また、図13に示したようにハロセン吸入を行った群の肝酸素供給量および消費量と抗

酸化系酵素活性との間には相関は認められなかった。

## 考察

ハロセン誘発性肝障害は低酸素下において頻発することが報告されている [36, 55, 72]。本実験においても低酸素条件下でハロセン吸入を行った A 群では過酸化 PE の変動は認められなかったが、過酸化 PC が増加傾向を示し、吸入開始 1 時間後には前値に比較して有意な高値を示した。ハロセンは肝ミクロソームのチトクローム P-450 に対し酸素と競合的に作用するため、虚血など低酸素状態ではハロセンの脱ハロゲン化反応が促進され、その中間代謝産物であるハロセンラジカルも増加すると報告されている [2]。また、生体膜リン脂質は不飽和脂肪酸含量が高いため、フリーラジカルにより容易に脂質過酸化を受ける。Miyazawa ら [60] は、ハロセンと同じく肝ミクロソームの P-450 による代謝過程でフリーラジカルを産生する四塩化炭素 ( $\text{CCl}_4$ ) を投与すると、肝組織中過酸化 PE に変動は認められないものの、投与 6 時間後に過酸化 PC 量ならびに PC の過酸化率が有意に増加すると報告している。したがって、肝が低酸素状態にある場合ハロセン麻酔はハロセンの肝ミクロソームの嫌氣的代謝でフリーラジカルの産生が促進するものと考えられる。B 群では過酸化 PC の変動は認められなかったが、過酸化 PE は減少傾向を示し、吸入開始 3 時間後には有意な低下が認められた。ハロセンは好氣的条件下では肝ミクロソームの P-450 によるモノオキシゲナーゼ経路により水酸化され、トリフルオロ酢酸に代謝されるため、嫌氣的代謝の代謝産物であるフリーラジカルは殆ど産生されないと考えられている [74]。一方、低酸素条件下のみの C 群では過酸



化 PE に変動は認められず、過酸化 PC についても増加傾向は示すものの、A 群と比較し軽度であった。したがって、本実験で設定した低酸素条件下のみでは多量のフリーラジカルは産生されないと推測され、ハロセン誘発性肝障害の発症には、ハロセンの嫌気性代謝によるフリーラジカルの産生が関与すると考えられた。

肝組織中 MDAs は A 群では遊離型 MDA が 1 および 2 時間後に増加し、蛋白結合型 MDA が 1、2 および 3 時間後に増加した。脂質過酸化反応の亢進によりホスホリパーゼ A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) が活性化されると、過酸化リン脂質は最終低分子化合物 MDAs に代謝される [73]。実際、松木らは [54] 運動後の馬の骨格筋における過酸化 PE の蓄積は蛋白結合型 MDA の増加をもたらすことを報告している。すなわち、A 群では過酸化 PC の増加により、遊離型および蛋白結合型 MDAs の増加が生じたものと考えられた。B 群では遊離型および蛋白結合型 MDA はいずれも有意な増加を認めなかったが、遊離型 MDA は、吸入開始 2 時間後に増加傾向を示した。生体膜の内膜に豊富な PE の過酸化物は PLA<sub>2</sub> による分解を外膜のそれより一層受けやすいが [22, 81]、ミトコンドリアの酵素によって遊離型 MDA は即座に分解される [15, 76]。すなわち、松木ら [54] は運動後の馬の赤血球における過酸化 PE の減少とともに蛋白結合型 MDAs の増加を報告したが、十分な血流量を確保された B 群においては過酸化 PE の分解により産生された MDA はミトコンドリアで即座に分解されたためと推測される。一方、低酸素のみの C 群では、蛋白結合型 MDA は 30 分および 1 時間後に増加傾向を示した。Yoshikawa ら [87] は、低酸素下で

は肝組織中 MDA はわずかに増加することを認め、さらに Omar らは [64]、低酸素下において肝組織中 MDA は有意に増加し、脂質過酸化反応が亢進すると報告している。しかしながら、本実験では低酸素のみのC群は、脂質過酸化は引き起こされているが、その程度はA群と比較して軽度であり前述したように、ハロセンの嫌氣的代謝によるフリーラジカルの増加が肝障害の重要な因子と推測される。

一方、抗酸化系酵素はA群では、いずれも吸入3時間後まで有意な変動は認められなかったが、C群では総 SOD 活性は灌流1時間後に有意な低下が認められ、Mn-SOD 活性も減少傾向を示した。さらに GSH-px 活性もC群では2時間後に有意に低下した。Marubayashi らは [52]、低酸素条件下で SOD 活性の低下を示し、フリーラジカル産生の増加を示唆しているが、ハロセン吸入時には SOD 活性に変動の認められないことから、低酸素下で産生されるフリーラジカルとハロゲン代謝過程で産生されるフリーラジカルではその消去系の異なる可能性が示唆された。また、ハロセン誘発性肝障害では抗酸化系酵素のうち少なくとも、SOD および GSH-px は関与しないと考えられた。

ついで、肝酸素濃度と MDAs との関係を検索した結果、ハロセン吸入時では酸素供給量と総 MDAs との間に負の相関が認められた。このうち、とくに蛋白結合型 MDA との間に高い相関を示したが、遊離型 MDA との間には相関を認めなかった。酸素とハロセンはミクロソームのチトクローム p-450 に対しは競合的に結合するため、酸素濃度が高い場合には嫌氣的ハロセン代謝は阻害されるが、低い場合には亢進することとなり、肝酸素濃度に反比例

してフリーラジカルの産生されることが示唆されている〔2〕。また、Gut〔33〕は同様に肝細胞において酸素濃度と総 MDA との負の相関を示している。したがって、ハロセン吸入時のフリーラジカルは、ハロセンの嫌氣的代謝過程で産生されるものが主体であると考えられた。また、ハロセン吸入を行わない場合には酸素供給量と MDAs との間に有意な相関が認められなかったことから、肝の低酸素条件のみではフリーラジカルの産生はあるもののラジカルによる膜障害は引き起こされないと考えられた。一方ハロセン吸入時には酸素消費量と MDAs との間にも負の相関が認められ、とくに蛋白結合型 MDA との間に高い相関を示したが、ハロセン吸入を行わない場合には、有意な相関は認められなかった。また、ハロセン吸入時において、酸素供給量と各抗酸化系酵素との間、あるいは酸素消費量とこれら酵素の間にはいずれも有意な相関は認められず、ハロセン誘発性肝障害ではこれらの抗酸化酵素は関与しないと考えられた。

以上の結果から低酸素条件下におけるハロセン吸入では、肝組織中過酸化 PC の増加と、その分解に起因する蛋白結合型および遊離型 MDA の増加が明らかとなった。また、フリーラジカルの産生は低酸素のみの場合よりも亢進していると考えられ、さらに肝酸素濃度と MDAs との間には負の相関が認められ、低酸素条件下のみではこれらの相関が認められないことから、フリーラジカルの産生はハロセンの嫌氣的代謝により産生されるフリーラジカルが重要であることが明らかとなった。したがって、ハロセン誘発性肝障害の発症はハロセンの代謝過程で産生されるフリーラジカルによるものと推測された。

## 実験 2. 肝組織中ヌクレオチドおよびオキシブリン濃度

### 材料と方法

#### 1) 供試犬

健康な約 1 - 3 歳齢の雑種成犬 13 頭、体重 10.5-16.5 kg ( $13.6 \pm 1.6$  kg) に市販のドッグフード給餌と自由飲水を 1 週間以上行って馴致した後、実験に供した。供試犬は肝血流を門脈のみとした PA 法を用い、肝エネルギー代謝に必要な酸素供給量と門脈血流量の関係 [76]、ならびにこれまでの実験結果から、以下の 3 群に分類した。A 群 (6 頭) は門脈血流量を 10 % 以下 (低酸素) として灌流し、1.5 % のハロセン吸入を行った。B 群 (3 頭) はその対照として門脈血流量を 10 % 以下として灌流したが、ハロセン吸入を行わない群とした。また、C 群 (4 頭) は低酸素に対する対照として、門脈血流量を 50 % 以上で灌流し、ハロセン吸入を行わない群とした。

#### 2) 検体

実験 1 と同様に PA 法による肝灌流系を作製した後、約 60 分間で血流を安定させ、この時点灌流あるいは吸入前値とした。灌流時間は、前田 [50] の報告に従い 3 時間とした。肝組織検体は、それぞれの門脈流量で灌流を開始した後 30 分、1、2 および 3 時間とし、肝組織小片を採取した。

### 3) ヌクレオチドならびにオキシブリン濃度の測定

ヌクレオチドならびにオキシブリンの抽出は、第二章で記述した Lazzarino らの方法 [46] に準じて行った。すなわち、約 2 g の肝組織を予め氷冷した生理食塩水で素早く洗浄し、可能な限り脱血した。100 mg の組織を秤量後、0.6 M 過塩素酸 2.5 ml を加え Potter-Elvehjem ホモゲナイザーを用い、氷中で 1 分間ホモゲナイズした。ついでホモジネートをすべてをネジ付褐色試験管に移し、2 M 炭酸カリウム 0.75 ml で中和し、3,000 rpm で 5 分間遠心した。得られた上清を 0.45  $\mu$ m のフィルターでろ過し、測定まで -80 °C で保存した。ヌクレオチド (ATP、ADP、AMP、グアノシン三リン酸 : GTP、グアノシン二リン酸 : GDP、グアノシン一リン酸 : GMP、イノシン一リン酸 : IMP) ならびにオキシブリン 濃度の測定は、第二章の HPLC を用いる、Lazzarino らの方法 [46] に準拠して行った。すなわち、4.6 mm x 30 mm のプレカラムを装着した 4.6 mm x 25 cm シリカゲルカラム (いづれも Pegasil, ODS, Senshu, 東京) を用いて、Gulliver HPLC システム (JASCO, Ltd, 東京) により測定した。また、カラム温度は 40 °C とした。移動相は 10 mM テトラブチルアンモニウムヒドロキシド、25 mM リン酸二水素カリウムならびに 1.0 % メタノールを含有する A 液 (pH 6.5) と 5 mM テトラブチルアンモニウムヒドロキシド、100 mM リン酸二水素カリウムならびに 30 % メタノールを含有する B 液 (pH 4.5) の 2 つの溶液を用い、B 液を 0-100 % まで変化させるリニアグラジエント (10 分から 50 分まで) とした。検体は 50  $\mu$ l を注入し、流速 1.2 ml/min で溶出し、得られた溶出液を

266 nmで検出した。

またエネルギーチャージ値： $(\text{ATP} + 1/2 \text{ADP}) / (\text{ATP} + \text{ADP} + \text{AMP})$ 、を Atkinson の方法 [7] により算出した。

#### 4) 統計処理

統計学的解析は paired  $t$ -test および unpaired  $t$ -test を用いた。

#### 結果

##### 1) ヌクレオチドならびにオキシブリン濃度

各群の肝組織中の各種ヌクレオチドならびにオキシブリンの濃度を表5に示した。

A 群の ATP 濃度はハロセン吸入 30 分後に有意に低下し、その後も低値を推移した。低酸素のみの B 群では吸入 2 時間後以降には有意な減少が認められたが、吸入 30 分ならびに 1 時間後の値は A 群に比較して高かった。一方、肝エネルギー代謝に十分な酸素供給を行った C 群では灌流 1 時間後まで低下傾向を示すものの、3 時間後では灌流前値に復し、A および B 群に比較して有意な高値を示した。また、ADP 濃度では灌流 3 時間後を除き 3 群間に差は認められず、また A 群の AMP 濃度が増加傾向を示すものの、3 群間に差は観察されなかった。一方、GTP 濃度は、ATP 濃度と同様な変動を示したが、GDP 濃度に 3 群間の差は認められなかった (図 14)。図 15 に EC 値とヌクレオチド



総量の変動を示した。A ならびに B 群の EC 値は 30 分後から減少し、以後低値を持続したが、C 群では 1 時間後まで減少したものの、以後増加し、3 時間後には前値に復した。また総ヌクレオチド濃度は灌流 3 時間後を除き 3 群間に差は認められなかったが、A 群は B 群に比較して低値を示す傾向が窺われた。

各群におけるオキシプリンの変動を図 16 に示した。A 群ではハロセン吸入後の時間経過に伴ってオキシプリン総量が増加し、また、ヒポキサンチンならびに尿酸濃度の増加が著明であった。B 群では灌流 2 時間後にキサンチンならびに尿酸濃度が増加したが、その程度は A 群に比較して軽度であった。一方、C 群では尿酸はほとんど検出されず、オキシプリン総量は減少する傾向を示した。



## 考察

ヌクレオチドならびにオキシプリンのプリン代謝経路における位置を図17に示した。低酸素下では、ATPの産生はペントースリン酸回路へ移行し、相対的に産生が低下するため、ATPならびにGTPなどヌクレオチドの脱リン酸化による高エネルギーリン酸を産生することでエネルギー代謝を維持することになる。この結果産生されたイノシンーリン酸（IMP）はイノシンを経て、ヒポキサンチンに代謝される。産生したヒポキサンチンは、キサンチンオキシダーゼ（XOD）により、キサンチンさらには尿酸に代謝されるが、この過程でフリーラジカルを産生する。

ハロセンは高濃度ではミトコンドリア電子伝達系を阻害し、ATP産生を低下させるが[10]、臨床的に用いられる濃度では、ATP産生の減少は認められず、肝エネルギー代謝には影響を及ぼさないと報告されている[14、58]。したがって、ハロセン誘発性肝障害の最も重要な因子の一つと考えられているフリーラジカルの産生は、嫌氣的なハロセン代謝の過程で産生される代謝物[25、33]によるものではなく、むしろ低酸素による肝エネルギー代謝の低下に基づく産生によると考えられており[79、88]、本症の発症が低酸素下で頻発する理論的な根拠として上げられている。

しかしながら、実験1の結果からも明らかな様に、低酸素条件下ではハロセンの嫌氣的な代謝が促進しフリーラジカルの産生増加が明らかである。一方、Beckerら[11]は、ラット肝細胞を低酸素条件下で、1%ハロセンを

添加して培養したところ、ハロセン添加群の ATP / ADP 比は低酸素のみの群に比較し低値を示し、ハロセンは低酸素時に認められる肝エネルギー代謝の低下を相加的に増悪すると推測している。また同時に、ハロセン添加群で乳酸値の有意な増加の認められることから、ハロセンは好氣的なミトコンドリアの酸化的リン酸化経路を阻害する可能性を示唆している。本実験結果においても、A 群の ATP ならびに GTP 濃度とくに ATP 濃度は、ハロセン吸入 30 分以降有意な低値を推移し、低酸素のみの B 群に比較しても低値を示した。また、各群における各ヌクレオチド濃度の平均値から計算したヌクレオチド総量も A ならびに B 群で減少したが、その程度は A 群で著明であった。したがって、臨床的に用いられる低用量であっても、ハロセンの吸入は、少なくとも本実験で用いた低酸素条件下では、おそらくミトコンドリアの酸化的リン酸化経路を阻害することで、低酸素下における肝エネルギー代謝の低下を増悪するものと考えられる。

一方、各群におけるオキシブリンの変動から考えてみると、A 群ではハロセン吸入後の時間経過に伴ってオキシブリン総量が増加し、また、キサンチンならびに尿酸濃度の増加が著明であった。また、B 群でも灌流 2 時間後にキサンチンならびに尿酸濃度が増加したが、その程度は A 群に比較して軽度であった。Muller ら [61] はハロセンと同じハロアルカン類に属する 1mM CBrCl<sub>3</sub> 投与において、ヌクレオチドの有意な減少、尿酸値の有意な増加、またその際認められる乳酸脱水素酵素の増加ならびに肝細胞生存率の低下から、CBrCl<sub>3</sub> 投与による肝細胞障害は XOD を介したフリーラジカル産生亢進に起因

すると報告している。したがって、本実験で認められた低酸素条件下のハロセン投与におけるキサンチンと尿酸値の有意な増加は、XODのハロセンによる活性化が起こるか否か不明であるが、XODを介したフリーラジカル産生増加を示すものと考えられる。

以上のように、低酸素下におけるハロセン麻酔は、低酸素に基づく肝エネルギー代謝の低下を増悪するとともに、フリーラジカルの産生を亢進させると考えられる。したがって、ハロセン誘発性肝障害の発症には、ブリン代謝系を介したフリーラジカルが重要な因子の一つと推測される。

ハロセン誘発性肝障害の発症機序には、肝酸素濃度が重要な因子として上げられているが、ハロセン自体が濃度依存性に肝血流量を低下させ、肝低酸素症を引き起こすため、その原因の詳細は不明である。ハロセンは低酸素条件下における嫌氣的代謝過程で生ずるフリーラジカルにより、細胞障害を引き起こされると考えられるが、フリーラジカルの産生は低酸素状態あるいは虚血時に認められるヌクレオチドの代謝とこれに伴うプリン代謝に関連することも知られている。したがってハロセン誘発性肝障害の発症機序を明らかにする上では肝血流量を制御しうる肝灌流系を用いて検討する必要がある。

そこで、第二章で検討した PA 法による灌流系を用いて、実験1では臨床的に用いられるハロセン濃度で吸入させ、肝組織中の過酸化リン脂質と脂質過酸化代謝物の1つであるマロンジアルデヒド (MDAs)、さらに抗酸化系酵素のうち SOD、GSH-px 活性を経時的に測定し、肝酸素濃度とハロセン吸入の影響を検討した。

低酸素条件下でハロセンを吸入させたA群では吸入開始1時間後に過酸化 PC が有意に増加したが、十分な酸素供給下でハロセン吸入したB群では過酸化 PE が減少した。また低酸素のみのC群では過酸化 PC が増加傾向を示すものの、A群のそれと比較して軽度であった。したがって、低酸素条件下におけるハロセン吸入時にはフリーラジカルの産生が低酸素条件のみと比較して亢進していると考えられた。一方、肝組織中 MDAs はA群では遊離型 MDA が吸

入開始1、2時間後に増加し、蛋白結合型MDAも吸入1、2および3時間後に増加した。これに対し、B群ではMDAの有意な増加は認められなかった。低酸素のみのC群では蛋白結合型MDAの増加傾向は認められたものの、A群と比較し、その程度は軽度であった。一方、抗酸化系酵素はSODおよびGSH-pxいずれもA群では有意な変動は認められなかった。肝酸素濃度とMDAsとの関係を検索した結果、ハロセン吸入時には肝酸素供給量および消費量と総MDAsとは負の相関を示し、とくに蛋白結合型MDAとの間に有意な相関が認められ、低酸素下におけるハロセン吸入はフリーラジカルの産生を亢進させることが明らかとなった。また、ハロセン麻酔を行わない場合には肝酸素供給量とMDAsとの間には相関の認められないことから、低酸素条件のみではフリーラジカルの産生は著明でなく、ハロセン吸入時に認められるフリーラジカルはハロセンの嫌氣的代謝により産生されるものと考えられた。したがって、ハロセン誘発性肝障害の原因は、ハロセンの嫌氣的代謝により産生されるフリーラジカルによるものと考えられた。

実験2では、肝組織中ヌクレオチドならびにオキシブリン濃度を経時的に測定し、低酸素時の肝エネルギー代謝ならびにブリン代謝に及ぼすハロセン麻酔の影響を検討した。

低酸素下でハロセン吸入を行ったA群のATPならびにGTP濃度、とくにATP濃度は、ハロセン吸入30分以降有意な低値を推移し、低酸素のみのB群に比較しても低値を示した。また、各群における各ヌクレオチド濃度の平均値から計算したヌクレオチド総量もAならびにB群で減少したが、その

程度は A 群で著明であった。したがって、臨床的に用いられる低用量であっても、ハロセンの吸入は、少なくとも本実験で用いた低酸素条件下では、おそらくミトコンドリアの酸化リン酸化経路を阻害することで、低酸素下における肝エネルギー代謝の低下を増悪するものと考えられる。

一方、各群におけるオキシブリンの変動から考えてみると、A 群ではハロセン吸入後の時間経過に伴ってオキシブリン総量が増加し、また、キサンチンならびに尿酸濃度の増加が著明であった。また、B 群でも灌流 2 時間後にキサンチンならびに尿酸濃度が増加したが、その程度は A 群に比較して軽度であった。すなわち、低酸素条件下のハロセン吸入におけるキサンチンと尿酸値の有意な増加は、XOD のハロセンによる活性化が起こるか否か不明であるが、XOD を介したフリーラジカル産生増加を示すものと考えられる。したがって、低酸素下におけるハロセン麻酔は、低酸素に基づく肝エネルギー代謝の低下を増悪するとともに、フリーラジカルの産生を亢進させると考えられる。したがって、ハロセン誘発性肝障害の発症には、ブリン代謝系を介したフリーラジカルが重要な因子の一つと推測される。

以上の結果、低酸素条件下におけるハロセン吸入ではハロセンの嫌氣的代謝によるフリーラジカルの産生に加えて、肝のエネルギー代謝の低下を増悪し、ブリン代謝に基づくフリーラジカルの産生をも促進させていることが明らかとなった。



Table 1. Changes of peroxidized phospholipids ratio (%) in hepatic tissue.

class	group	pre	0.5	1	2	3	(hr)
PE	A	1.13±0.33	1.25±0.31	1.33±0.34	1.22±0.47	1.27±0.39	
	B	1.62±0.61	1.33±0.17	1.20±0.48	1.46±0.55	1.14±0.41	
	C	1.27±0.52	1.30±0.55	1.13±0.38	1.23±0.44	1.03±0.45	
	D	1.84±0.86	1.60±1.14	1.36±0.82	1.54±0.88	1.68±1.20	
PC	A	0.95±0.24	1.40±0.45	1.29±0.21	1.42±0.36	1.35±0.25	
	B	1.68±0.42	1.57±0.39	1.56±0.25	1.76±0.55	1.78±0.45	
	C	0.93±0.28	1.17±0.03	1.05±0.11	0.97±0.18	1.12±0.08	
	D	1.81±0.43	1.83±0.37	1.82±0.44	1.72±0.51	1.81±0.59	

Each value is the ratio of peak area detected at 233 nm and 206 nm and given as mean±SD.

Group A : 1.5% halothane inhalation under the hepatic blood flow volume less than 10% of pre-operation value. Group B : 1.5% halothane inhalation under the hepatic blood flow volume more than 50%. Group C : non-halothane inhalation under the volume less than 10%.

Group D : non-halothane inhalation under the volume more than 50%.



Table 2. Changes of the total, free and protein-bound MDA concentration (nmol/g wet tissue) in hepatic tissue.

	group	pre	0.5	1	2	3	(hr)
total MDA	A	19.2±7.96	18.3±6.50	25.0±12.5	27.5±12.8	25.4±11.5	
	B	16.5±7.20	16.9±7.74	16.3±6.70	19.0±7.92	17.7±6.16	
	C	20.2±5.23	21.3±5.27	23.8±4.52	21.3±2.58	23.8±2.72	
	D	13.1±1.21	14.7±2.77	18.0±4.33	16.1±1.85	14.4±2.48	
free MDA	A	7.09±3.88	6.47±2.55	9.67±6.12	11.0±6.40	10.2±8.78	
	B	5.11±2.68	5.41±2.82	5.32±2.19	6.78±2.63	6.22±3.84	
	C	8.78±2.95	8.69±1.81	9.55±1.51	9.77±3.33	10.2±0.78	
	D	5.22±1.84	5.01±1.17	6.65±1.12	5.70±0.90	5.15±2.40	
protein-bound MDA <sup>a)</sup>	A	12.1±4.65	11.8±4.69	15.4±6.84	16.4±7.17	20.1±12.1	
	B	11.4±5.67	11.5±5.92	11.0±4.85	12.2±5.52	11.6±5.18	
	C	11.4±3.13	12.6±3.80	14.2±3.07	11.5±2.42	13.6±2.39	
	D	7.91±1.18	9.73±1.86	11.4±3.28	10.4±2.50	9.43±1.41	

Each value is given as mean±SD.

a) : Calculated from (total MDA) - (free MDA).

The treatment of each group was described in table 1.

Table 3. Changes of total SOD, Mn SOD and GSH-px activities (U/mg protein) in hepatic tissue.

	group	pre	0.5	1	2	3	(hr)
total SOD	A	30.0±10.7	25.6±7.33	24.6±9.07	22.8±3.44	26.2±13.4	
	B	37.0±17.7	37.7±22.3	35.9±16.7	33.8±6.75	31.9±16.5	
	C	29.5±4.23	23.9±3.10	16.5±2.63	21.8±3.33	26.4±4.96	
	D	49.0±11.5	39.1±6.49	43.3±8.71	30.5±4.08*	46.9±14.0	
Mn SOD	A	16.8±8.76	15.6±5.70	15.6±5.87	13.4±2.72	12.9±2.83	
	B	21.8±14.3	19.4±11.2	19.9±8.62	19.1±5.63	22.2±10.1	
	C	15.9±5.48	15.2±2.87	12.1±2.51	15.6±2.93	21.9±2.84	
	D	21.2±6.21	23.7±10.0	18.5±3.57	20.0±9.33	24.5±13.2	
GSH-px	A	16.6±8.10	17.8±11.9	19.2±10.6	14.7±6.84	13.6±6.79	
	B	37.6±13.1	49.5±21.1	43.9±21.0	45.1±40.0	45.1±26.7	
	C	38.8±7.68	34.6±1.31	28.8±6.35	24.0±3.39*	35.5±5.52	
	D	30.5±9.70	32.6±7.23	23.7±6.35	30.0±0.58	40.0±11.1	

Each value is given as mean±SD.

\* : Significant difference compared with pre value by paired t-test ( $p < 0.05$ ).

The treatment of each group was described in table 1.

Table 4. Changes of oxygen supply and consumption (ml/min · 100g tissue) in hepatic tissue.

	group	pre	0.5	1	2	3	(hr)
O <sub>2</sub> supply	A	6.80±3.35	1.96±0.91*	2.07±0.90*	1.92±0.96*	1.64±0.98*	
	B	9.39±3.15	10.2±4.64	10.7±5.39	10.5±5.38	10.0±5.32	
	C	11.2±2.01	1.55±0.26*	1.57±0.11*	1.58±0.17*	1.44±0.11*	
	D	18.2±6.02	18.7±6.84	18.4±6.17	17.8±4.61	16.5±3.21	
O <sub>2</sub> consumption	A	1.97±0.80	1.04±0.61*	1.01±0.66**	0.91±0.58**	0.84±0.54*	
	B	3.01±2.65	3.15±2.68	3.38±2.15	3.39±2.37	3.06±2.12	
	C	2.63±0.85	0.64±0.07	0.44±0.21	0.65±0.34	0.58±0.29	
	D	5.11±1.24	5.39±0.75	4.73±0.11*	5.05±0.82	4.06±1.14	

Each value is given as mean±SD.

\* and \*\*: Significant difference compare with each pre value by paired t-test ( $p < 0.05$  and  $p < 0.01$ , respectively).

The treatment of each group was described in table 1.

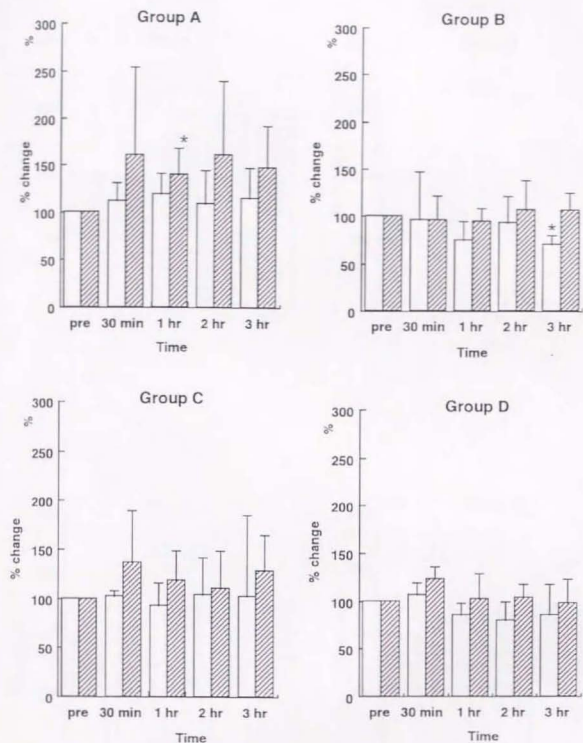


Fig. 8. Changes of peroxidized phospholipids in hepatic tissue. The treatment of each group was described in Table 1. □ : percent change of peroxidized phosphatidylethanolamine ratio, ▨ : percent change of peroxidized phosphatidylcholine ratio. \*: significant difference ( $p < 0.05$ ) compared with each pre value by paired  $t$ -test.

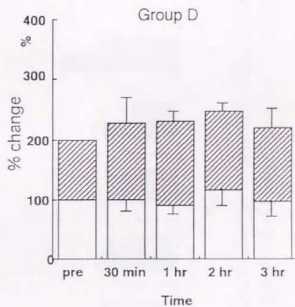
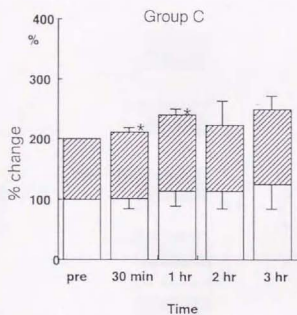
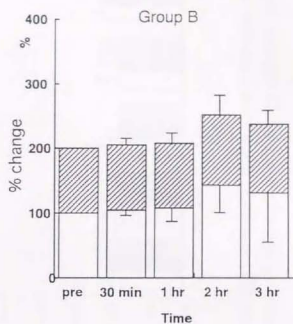
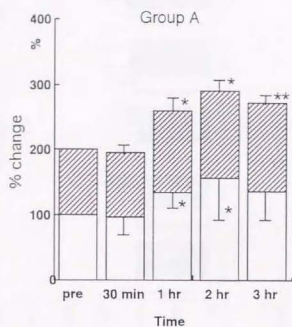


Fig. 9. Percent changes of free (□) and protein-bound MDA (▨) in hepatic tissue. The treatment of each group was described in Table 1. \* and \*\*: significant difference compared with each pre value by paired  $t$ -test. ( $p < 0.05$  and  $p < 0.01$ , respectively).

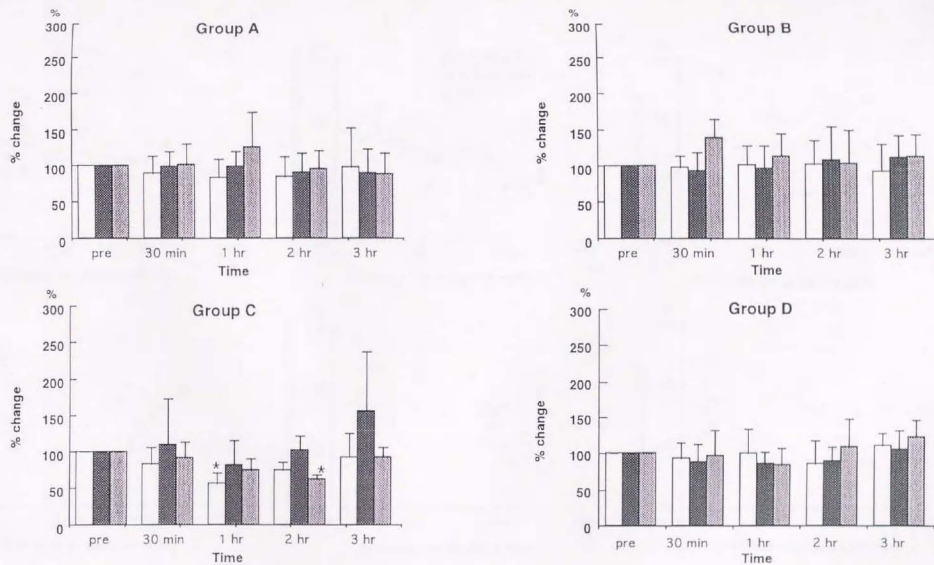


Fig. 10. Percent changes of total SOD ( $\square$ ), Mn-SOD ( $\blacksquare$ ), and GSH-px ( $\hatchedbox$ ) in hepatic tissue. The treatment of each group was described in Table 1. \*: significant difference ( $p < 0.05$ ) compared with each pre value by paired  $t$ -test.

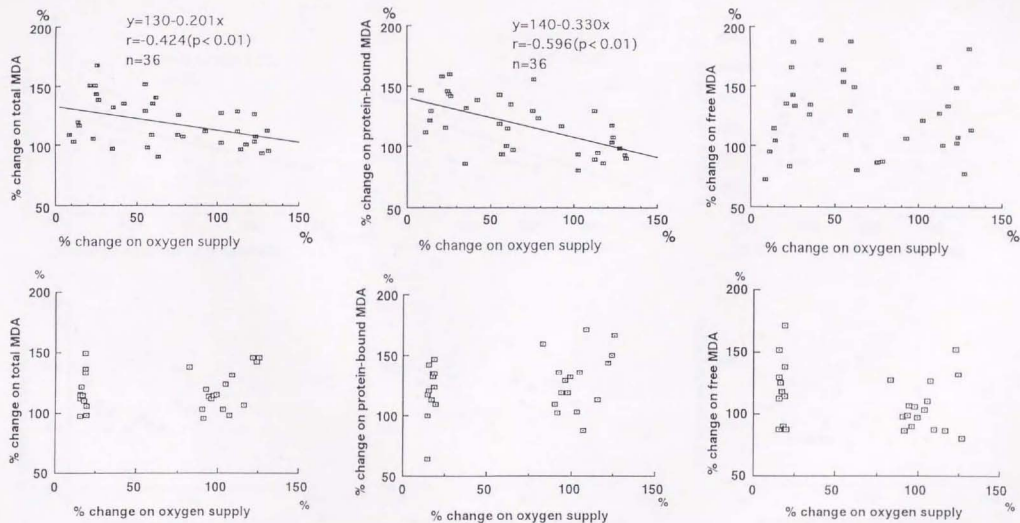


Fig. 11. The relationship between percent change of oxygen supply and MDAs with (upper side) and without (lower side) halothane anesthesia.



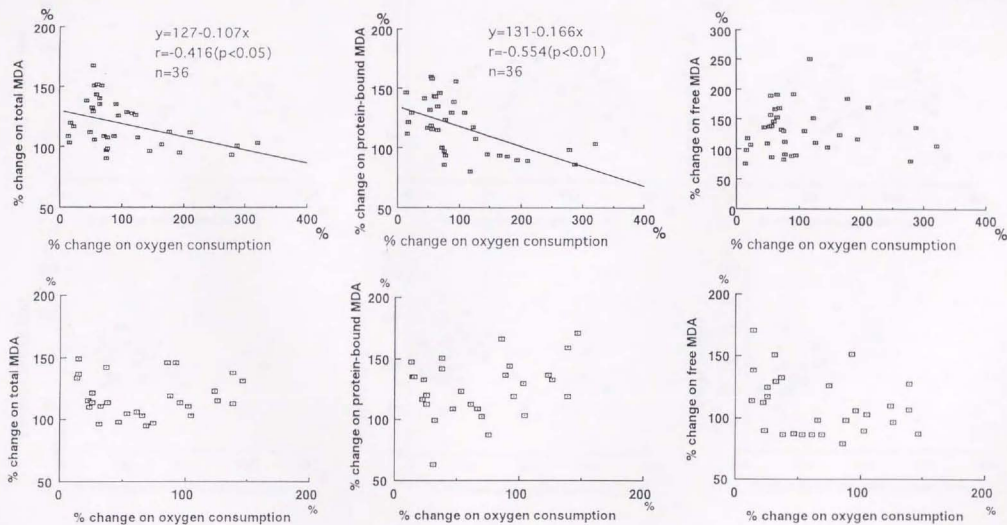


Fig. 12. The relationship between percent change of oxygen consumption and MDAs with (upper side) and without (lower side) halothane anesthesia.

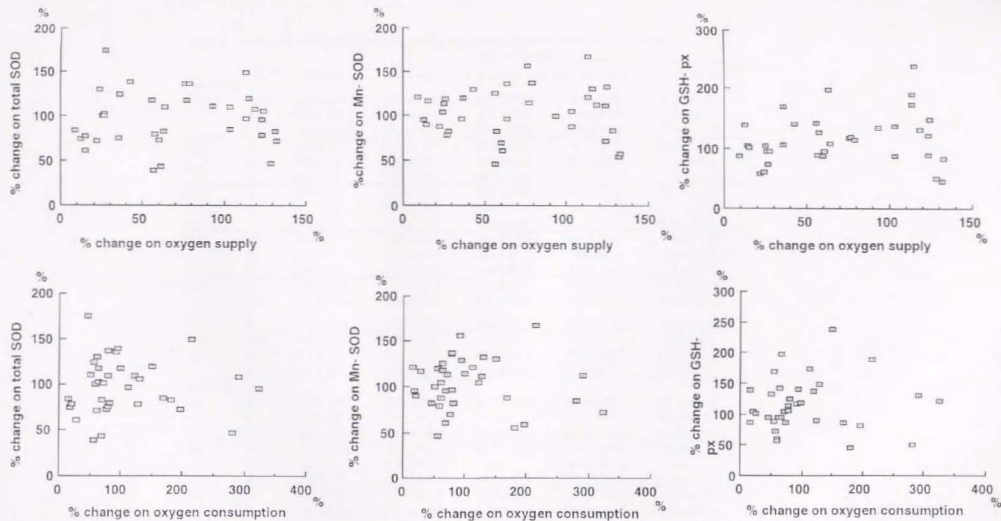


Fig. 13. The relationship between percent change of oxygen supply and antioxidants (SOD and GSH-px), and between percent change of oxygen consumption and antioxidants with halothane anesthesia.

Table 5. Nucleotide and oxypurine levels (nmol/g wet tissue) in hepatic tissue in 3 dog groups.

nucleotide	group	pre	after perfusion				(hr)
			0.5	1	2	3	
ATP	A (n=6)	907±326	462±294**	461±271*	483±358*	302±156**	
	B (n=3)	930±395	705±274	679±17.0	348±84.9	298±55.0	
	C (n=4)	1300±345	773±138	663±378	747±438	1198±119	
ADP	A	684±189	602±181	626±317	499±281	399±233	
	B	763±235	830±261	892±44.8	664±259	512±64.4	
	C	988±385	897±273	907±190	672±73.2	1122±251	
AMP	A	356±204	657±495	698±363*	444±263	632±518	
	B	527±427	655±195	791±113	1046±332	756±145	
	C	498±309	654±279	995±558	642±620	689±377	
GTP	A	360±161	282±196	263±130	207±110*	175±71.6*	
	B	254±63.7	253±44.4	273±49.5	164±83.8	134±17.5	
	C	296±75.3	245±17.2	268±65.3	259±147	324±41.4	
GDP	A	101±33.4	105±49.3	113±65.8	91.0±48.5	98.0±44.6	
	B	116±23.6	101±26.3	109±23.6	110±34.7	86.4±8.13	
	C	115±52.6	108±12.6	116±29.6	90.7±22.1	128±42.5	
GMP+	A#	168±108	226±155	203±92.4	187±118	193±148	
IMP	B	214±173	181±89.2	212±35.7	303±137	205±53.8	
	C	154±55.6	258±92.9	432±170*	214±221	263±92.7	
oxypurine							
HX	A	109±153	36.7±53.1	49.3±37.5	30.0±33.2	32.0±36.1	
	B	47.7±82.6	73.0±62.5	5.60±9.70	51.4±72.2	0.39±0.68	
	C	159±198	60.8±24.5	94.1±21.4	61.9±46.8	64.8±44.2	
XA	A	58.7±144	89.0±163	45.6±72.5	131±306	105±114	
	B	N.D.	5.40±9.35	N.D.	43.3±61.7	N.D.	
	C	65.8±132	29.2±47.1	68.3±82.4	12.7±25.3	N.D.	
UA	A	7.25±9.65	23.9±21.9	39.7±40.6	53.3±54.1	176±322	
	B	4.43±7.68	15.1±22.7	8.07±14.0	36.0±32.0	12.9±22.4	
	C	3.50±7.00	N.D	4.53±9.05	N.D.	N.D.	

Each value is given as mean±SD. N.D.: not detected. #: n=4. The dogs were treated with (Group A) and without (Group B) halothane inhalation under the liver blood flow volume less than 10% of preoperative value, and without halothane under the volume more than 50% (Group C). Statistical significance is analyzed using paired t-test. \*: Significant difference compared with each pre value (\*p<0.05, \*\*p<0.01).

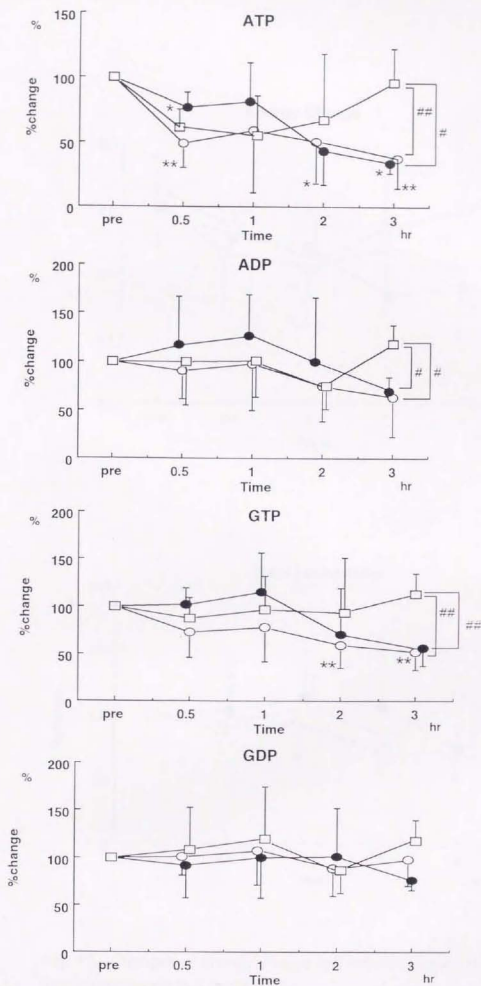


Fig. 14. Changes of hepatic tissue nucleotide levels in 3 groups.

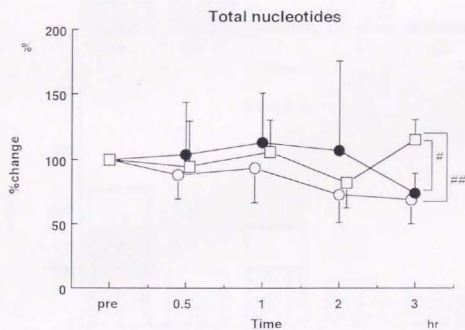
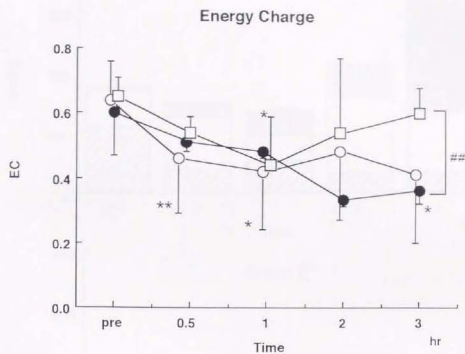


Fig. 15. Changes of Energy charge and hepatic tissue total nucleotide levels in 3 groups.

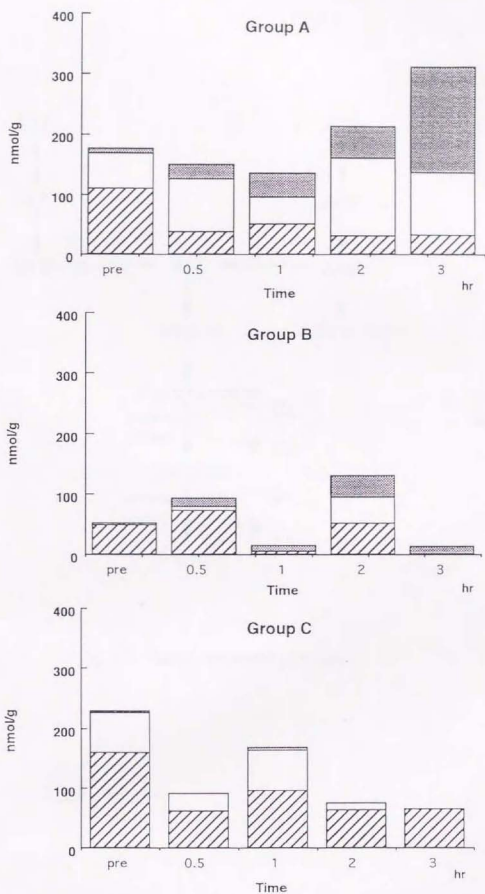


Fig. 16. Changes of hepatic tissue oxypurine levels in groups.

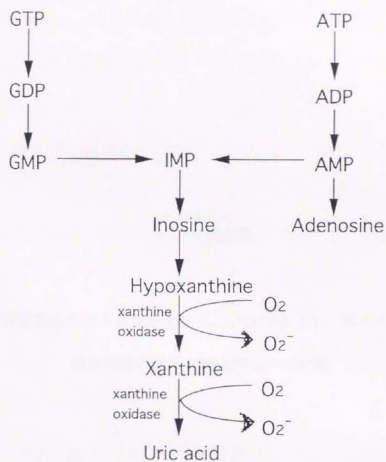


Fig. 17. Purine metabolic pathway.



#### 第四章

培養肝細胞におけるヌクレオチド、アラントイン、チオバルビツール酸  
反応物質の濃度と細胞内 $\text{Ca}^{2+}$ の変動

ハロセン誘発性肝障害は肝低酸素状態において発症する [36, 55, 72]。

第三章の結果から、ハロセン麻酔は、低酸素状態ではハロセンの嫌氣的代謝で生ずるフリーラジカルに加えてエネルギー代謝の低下を増悪させ、プリン代謝で生ずるXOD由来のフリーラジカル産生を亢進させ、肝障害を引き起こす。

一方、ハロセンによるエネルギー代謝の低下の増悪、すなわちATPの枯渇は、 $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 活性の低下や  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  交換系機能の変化により、ミトコンドリアや小胞体へのカルシウムイオンの取り込み低下、細胞内 $\text{Ca}^{2+}$ の細胞外への排出を阻害することで細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  の増加を引き起こす [26]。実際、脱共役剤である A23187 を投与した場合、ATP が減少した後、細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  が増加し、その数分後に細胞死が起こる [12]。ハロセンも同様に *in vitro* 細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  を持続的に増加させることが観察されている [89]。また、モルモットに対し1%ハロセンを吸入させた場合、肝低酸素症とともに肝小葉の中心性壊死が認められるが、壊死の発現前に肝組織中  $\text{Ca}^{2+}$  の増加が報告されており [27]、ハロセン誘発性肝障害においても細胞内 $\text{Ca}^{2+}$ の増加により、細胞死が引き起こされる可能性がある。また低酸素症あるいはハロセン中間代謝物で産生される活性酸素やフリーラジカルはグルタチオン (GSH) などの可溶性チオールを低下させ、ミトコンドリアからの  $\text{Ca}^{2+}$  放出を促進する。さらにフリーラジカルにより産生される過酸化リン脂質や MDAs は細胞膜を障害し、細胞外  $\text{Ca}^{2+}$  の流入を引き起こすと考えられている [3, 13]。したがって、ハロセン誘発性肝障害では肝エネルギー代謝の低下と嫌氣的代謝で産生されるフリーラジカルやリン脂質過酸化物により細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  が増加すると考え

られ、さらにその結果、 $\text{Ca}^{2+}$  依存性ホスホリパーゼなどの作用により細胞死に至ると推測される。

そこで、初代培養肝細胞を用い、ハロセン投与に加え、ミトコンドリアのチトクロームc酸化酵素を阻害するシアン化合物を用い、酸化的リン酸化を抑制した実験的虚血条件下において、ヌクレオチドやアラントイン、さらに脂質過酸化代謝物であるチオバルビツール酸反応物質 (TBARS) を測定し、ハロセンによる肝エネルギー代謝や脂質過酸化および細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  の変動について検討した。

## 材料と方法

### 1) 肝細胞の分離

前日から絶食させた健常ビーグル犬 (9-10.5kg) を用い、全身麻酔下で肝 (左葉) 組織を約 50 g 採取した。得られた肝組織はコラゲナーゼ法により消化し、肝細胞を分離した。すなわち、得られた肝小片に対し肝切断面に表在する肝血管断端よりあらかじめ冷却した  $\text{Ca}^{2+}$  (-) Hanks' buffer (10 mM HEPES, 0.5 mM EGTA, 200 U/ml penicillin を含有, pH 7.4) を注入し、十分に脱血した後、37°C に加温した同 buffer 約 150ml を同断端より注入し灌流した。ついで 37°C に加温した約 150ml の 0.05 % collagenase Hanks' buffer (0.05 % collagenase, 4 mM  $\text{CaCl}_2$ , 0.05 g/l trypsin inhibitor, 10 mM HEPES, 200 U/ml penicillin 含有, pH 7.5) を同様に注入し前灌流

液を置換し、シャーレに移して静置した。ついで10 mlの冷 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Gibco Lab, U.S.)を加え、軟化した肝組織をメスで細切した。分散した肝を 200  $\mu$ m のナイロンメッシュにより氷上でろ過し、さらに残渣に 20 mlの DMEMを加え再ろ過した。つぎに、ろ過されずに残った肝組織をピーカーに移し、約 50 ml の前述したcollagenase Hanks' buffer を加え、37  $^{\circ}$ C、15分間攪拌した。再度ナイロンメッシュにより氷上でろ過し、最初に回収した分散肝細胞浮遊液と合わせ、500 rpm, 4  $^{\circ}$ C で1分間遠心した。ついで沈殿した肝細胞をDMEMに再懸濁させた後、500 rpm, 4  $^{\circ}$ C で1分間遠心した。同様の操作を 2-3 回繰り返し、肝細胞を洗浄した。得られた肝細胞に100 nM インスリンと10 nM デキサメタゾンおよび10 %牛胎児血清 (FCS)を含有するWilliams E medium(WE; Gibco Lab, U.S.)を加えて再懸濁し、500 rpm, 4  $^{\circ}$ C で間遠心した。同様の操作を 2-3 回繰り返し、肝細胞を洗浄した。得られた肝細胞についてトリパンブルー排泄試験を行い85 %以上の生存率を確認した後実験に用いた。

## 2) 肝細胞の培養

ヌクレオチドおよび TBARSの測定用 には分離・洗浄した肝細胞を市販のコラーゲン (セルマトリックス I-C、新田ゼラチン、東京) でコートしたカバースリップ (Φ25mm coverslip, NUNC, U.S.) を7枚配置した細胞培養用シャーレ (Φ 90 mm) に $5 \times 10^5$  細胞/mlの濃度で播き、37  $^{\circ}$ C、5 % CO<sub>2</sub> 環境下で初代培養した。細胞内 Ca<sup>2+</sup> の測定には同肝細胞をコラーゲンコ

ートしたカバーガラス（φ 25 mm, Matsunami, 東京）を配置した細胞培養用シャーレに  $1.5 \times 10^5$  細胞/ml の濃度で播き、37 °C、5 % CO<sub>2</sub> 環境下で培養した。また、実験に用いた細胞は TBARS 測定あるいは細胞内 Ca<sup>2+</sup> 測定、いずれの場合でも 3 時間後に培養液を交換し、付着していない細胞を除去した。また、さらに 12-36 時間培養した肝細胞を用いた。

### 3) 実験群

低酸素条件下におけるハロセン投与による影響を *in vitro* で再現するため、ミトコンドリアのチトクロム c 酸化酵素を阻害するシアン化合物を用い、実験群を次の 4 群に分類した。すなわち、0.5 mM ハロセンおよび 7.5 mM NaCN 投与群（A 群）、0.5 mM ハロセン投与群（B 群）、7.5 mM NaCN 投与群（C 群）、無添加対照群（D 群）とした。

### 4) ヌクレオチドの測定

肝細胞が confluent な状態になったカバースリップを 6 穴プレート（6 ウエルマルチディッシュ, NUNC, U.S.）に移し、2.0 ml の Krebs-Henseleit Buffer（KHB ; pH7.4）液中で 37 °C、95% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub> 環境下でさらに 1 時間培養した。培養後上述のカバースリップ 1 枚を取り出し、あらかじめ冷却した KHB 液で数回洗浄した後、500 μl の 0.6 M HCO<sub>4</sub> をあらかじめ含有したマイクロチューブに挿入した。ついで 1 分間激しく攪拌し、15,000 g で 2 分間遠心した。さらに 150 μl の 2.0 M K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> を加えた後 15,000 g で 2 分間遠

心し、得られた上清を検体とした。つぎにハロセンおよび／あるいはNaCNをそれぞれ0.5 ml ずつ加え、上記環境下で以後30、60、90、120、150および180分後に同様の検体処理を行い測定検体を得た。なお、ヌクレオチドの検出は第一章で用いた方法に従い測定した。

#### 5) アラントインの測定

Chen ら [18] の方法に従い、各培養上清500  $\mu$ l をあらかじめ等量の10%トリクロロ酢酸を入れたマイクロチューブに分取し、攪拌後、15,000gで20分遠心した後、その上清 500  $\mu$ l をネジ付マイクロチューブに分取した。ついで 50  $\mu$ l の 0.04 % チモールブルーを添加し、さらに300  $\mu$ l の 0.6 M NaOHを加え、85℃で60分間加温した。さらに、200  $\mu$ l の 3.5 mM ジニトロフェニルヒドラジン溶液を加え、85℃で20分間加温した。室温に冷却した後、15,000gで15分間遠心し、その上清を HPLC 用検体とした。アラントインの検出は4.6 mm x 30 mm のプレカラムを装着した4.6 mm x 25 cm シリカゲルカラム (いづれもPegasil ODS, Senshu, 東京) をカラム温度30℃で用いた。移動相は10 mM 酢酸 (pH 6.1) : アセトニトリル (85:15v/v) (A液)と100%アセトニトリル(B液)によるグラジエント溶出を行った。グラジエントはB液を0-82 % まで変化させる直線グラジエントを0から7分まで行い、さらに10分まで 82 % の比率を維持した。検体は10  $\mu$ l を注入し、移動相の流速は1.0 ml/min とし、得られた溶出液を360 nmで検出した。



#### 6) TBARSの測定

肝細胞が confluent な状態となったカバースリップを上記の6穴プレートに移し、2.0 ml の KHB 液中で37 °C、95 % O<sub>2</sub>、5 % CO<sub>2</sub> 環境下でさらに1時間培養した。培養後、カバースリップ1枚を取り出しあらかじめ冷却した KHB 溶液で数回洗浄し、Kikugawa ら [43] の方法に従い測定した。すなわち洗浄したカバースリップを 0.2 ml の8.1 % SDS、1.5 ml の20% 酢酸緩衝液 および50  $\mu$ l の0.8% BHT 液 をあらかじめ含有した褐色試験管内に移した。激しく攪拌した後、1.5 ml の0.8 % Thiobarbituric acid (TBA) 液 と0.7 ml の蒸留水 を加え95 °Cで60分間加温した。ついで流水中で冷却後、蒸留水 1.0 ml とブタノール/ピリジン混液 (15:1 v/v) 5.0 ml を加え上清の蛍光強度を励起波長 532 nm、蛍光波長 553 nm で測定した。標準物質としてテトラエトキシプロパンを用い上記の処理を行った後同様に測定した。

#### 7) 細胞内 Ca<sup>2+</sup> の測定

肝細胞を1.3 mM CaCl<sub>2</sub> および5.6 mM glucose を含有したKHB液で数回洗浄した後、2.0 ml の KHB 液中で37 °C、95 % O<sub>2</sub>、5 % CO<sub>2</sub> 環境下で1時間培養した。ついで10  $\mu$ l の1 mM Fluo-3/AMを含有する KHB 液 2.0 mlに置換した後、同環境下でさらに30分間培養した。培養後取り込まれなかった Fluo-3/AM を十分洗浄、除去した後、肝細胞が付着したカバースリップを直ちに37 °Cに加温したチャンバーに移動させ顕微鏡ステージに乗せた。チャンバー内には10  $\mu$ M に調整したヨウ化プロピジウム (PI) を含有する KHB



液を95 % O<sub>2</sub>、5 % CO<sub>2</sub> 存在下でバブリングしながら灌流させた。蛍光画像は共焦点レーザー顕微鏡 (CSLM) を用い蛍光波長530nm (Fluo-3) および605nm (PI) により得た。

## 8) 統計処理

統計学的解析はpaired  $t$ -test およびunpaired  $t$ -test を用いた。

## 結果

### 1) ヌクレオチド濃度

表6に各群のヌクレオチド濃度を示した。さらにこれらの変動のうちATP、ADP、GTP および GDP 値についてについて前値を基準とし各時刻の数値をパーセントで表した(図18)。ATP値はハロセンと NaCN を添加したA群では反応30分後から前値と比較して有意に低下し、180分後まで低値を推移した。また、対照とした無添加群のD群と比較して有意な低値であった。ハロセンのみのB群では30分後にやや減少傾向を示すものの、120分後までは殆ど変動せず、その後150分後には有意に低下したが、その減少はA群に比較して軽度であった。一方、NaCN のみを添加したC群では30分後に有意に低下したが、60分後にはいったん前値に復し、その後徐々に低下した。ADP 値はA群では殆ど変動を認めなかったが、C群では60分後より増加傾向を示した。一方、GTP、GDP は4群間に殆ど差は認められなかった。エネルギーチャージ値 (EC) およ

びヌクレオチド総量を図19に示した。EC 値にはいずれの群についても有意な変動を認めることはできなかった。

## 2) アラントイン濃度

細胞上清中のアラントイン濃度はA群では反応60分後以降、有意な増加が認められ、180分後には対照のD群と比較して有意な高値を示した。CならびにD群ではアラントイン濃度はいずれも増加傾向を示したが、両群に殆ど差は認められなかった(図20)。

## 3) TBARS 濃度

肝細胞中の TBARS 濃度はA群では30分後以降、有意に低下し、180分後まで低値を推移した(表7、図21)。またB群では30分後に増加し、その後徐々に減少した。さらにC群では60分後より減少傾向が認められたが、A群に比較し軽度であった。一方、細胞上清中の TBARS はA群では30分後に増加し、その後も増加傾向が認められ、B群においても60分後より増加傾向が認められた。しかしながら、B群とD群との間に差は殆ど認められなかった。

## 4) 細胞内 $\text{Ca}^{2+}$ の変動

各群の測定結果を図22から25に示した。また、それぞれの細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  ピーク時間、細胞死時間および細胞死率を表8に示した。A群の細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  は前値の相対蛍光強度を上回る細胞が数多く認められた。また細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  が漸

増しピーク値を示し後、数分後に細胞死を示すヨウ化プロビジウム (PI) 取り込みの増加が認められた。B群では、細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  の増加はA群と比較して軽度ではあるものの、細胞死に先だって細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  の増加を示した。一方、C群では細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  の増加は殆ど認められず、PIの蛍光増加は認められなかった。また対照としたD群でも、 $\text{Ca}^{2+}$  の増加の後PIの蛍光の増強が認められた。また細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  のピーク値および細胞死それぞれの平均時間は、C群を除く各群で有意差は認められないものの、A、B、D群の順に早い傾向が認められた。さらに、細胞死率はAおよびB群がD群に比較し高値を示した (表4)。

## 考察

本実験では、ヌクレオチドのうち ATP は、A群において30分後より有意に低下し、それ以降低値を推移したが、ハロセンのみ投与したB群では150分までは殆ど変動は認められず、また NaCN のみのC群では30分後に一過性の低下を示したが、その後前値に復し、その減少はA群に比較して軽度であった。ハロセンは臨床的な濃度ではミトコンドリアの電子伝達系を阻害することはない [16, 87]。また NaCN は電子伝達系のチトクロームc酸化酵素を阻害することが知られているが、肝細胞では十分なグリコーゲンの蓄積のため ATP は殆ど減少しないと報告されている [8, 47]。本実験においても NaCN のみを投与したC群に認められた ATP 減少は一過性で軽度であり、また ADP、GTP および GDP についてもC群でわずかに増加傾向を示すものの、4群間に差は認められなかった。また、ヌクレオチド総量やエネルギーチャージ値は経時的に殆ど変動せず、4群間にも差が認められないことから、NaCN のみを投与した群には肝エネルギー代謝は維持されていると推測された。したがって、ハロセンは臨床的な濃度であってもその作用機序は不明であるがハロセン自体が直接ミトコンドリアの電子伝達系を阻害しATP産生を低下させるものと推測された。

ブリン代謝の最終産物であるアラントインはA群では60分後より増加し180分後にはD群と比較して有意な高値を示した。またCおよびD群について

も経時的な増加傾向を示したが、両群間に差は認められず、第三章の結果と同様、*in vitro* においてもXODを介したフリーラジカルの産生はハロセンにより増強されていると考えられた。一方、低酸素条件下においてはキサンチンデヒドロゲナーゼ (XDH) から XOD への変換が起こる [57]。McCord ら [56] は ATP の減少による  $\text{Ca}^{2+}$  依存性プロテアーゼが XDH から XOD への変換に関与すると報告しているが、これに従えば ATP 減少の著しいA群で XDH から XOD への変換が増加した結果CおよびD群に比較しアラントインへの代謝が亢進したものと考えられる。

フリーラジカルにより生成される脂質過酸化物は  $\text{Ca}^{2+}$  依存性ホスホリパーゼにより TBARS などに代謝される [73]。本実験では NaCN に加えてハロセンを投与したA群で TBARS は、30分後以降、細胞中では有意な低下を示し、180分後まで低値を推移した。また、上清中においてA群では30分後より増加が認められ、TBARS が肝細胞より漏出していると推測された。またハロセン単独投与のB群でもA群とほぼ同程度の増加が認められ、ハロセン投与を行ったAおよびB群ではフリーラジカルの産生が増加していると考えられた。一方、C群では細胞中および上清中とも TBARS の増加は殆ど認められず、NaCN 投与のみではフリーラジカルの産生は少ないものと考えられた。

A群の細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  は投与約100分後より増加し、ピークを示した後減少した。またこの減少時期に細胞死を示すPIの蛍光が増加した。またB群ではA群に比較して細胞内の  $\text{Ca}^{2+}$  の増加時期は遅れるもののA群と同様の経過を示した。B群ではエネルギー代謝、とくに ATP の変動が認められないこと、ま

た TBARS の増加が認められることからこの細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  増加ならびに細胞死はフリーラジカルが関与しているものと推測される。Kinugawa ら [44] は 95 %  $\text{O}_2$ , 5 %  $\text{CO}_2$  の好氣的な条件下において 0.75 % ハロセンを投与した場合、細胞内へ流入する  $\text{Ca}^{2+}$  に対して、取り込み量の限界を超えた小胞体に代りミトコンドリアへの取り込みが亢進し、さらに 1 % 以上の濃度ではミトコンドリアの  $\text{Ca}^{2+}$  取り込み量が限界を超え、細胞死が発現すると推測している。したがって、ハロセンのみを投与した B 群ではハロセン自体の作用で細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  の増加を引き起こし、細胞死に至ったと推測される。

一方、低酸素下では ATP の枯渇が生じ、それに伴う  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 活性の低下や  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  交換系機能の変化によりミトコンドリアや小胞体への  $\text{Ca}^{2+}$  取り込み低下ならびに細胞外への  $\text{Ca}^{2+}$  排出が阻害される [26]。NaCN に加えてハロセン投与では ATP の低下が著明で、ATP 枯渇に基づく細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  の増加も引き起こされているものと考えられる。以上の様に、ハロセン誘発性肝障害は、臨床的な濃度においてもハロセン自体が酸化的リン酸化を抑制し、エネルギー代謝系を抑制するとともに、ハロセンの嫌氣的代謝で産生するフリーラジカルに加えて XOD を介して産生されるフリーラジカルの産生をも増加させる一方、これらを介した細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  の増加をもたらし、細胞死に至るものと考えられる。また低酸素はこれらの作用を増強する結果となり、本症の発症頻度が高まると推測される。



## 小括

ハロセン投与ではエネルギー代謝の低下により、 $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 活性の低下や  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  交換系が変化し、細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  増加が推測されている。さらに低酸素あるいはハロセンの代謝過程で産生されるフリーラジカルによる脂質過酸化反応やその代謝物は生体膜を障害し、細胞外  $\text{Ca}^{2+}$  を流入させ、細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  の増加を引き起こす。したがって、ハロセン誘発性肝障害では肝エネルギー代謝の低下とフリーラジカルによる脂質過酸化により細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  は増加すると考えられ、さらにその結果  $\text{Ca}^{2+}$  依存性ホスホリパーゼなどの作用により細胞死に至ると推測される。

そこで、初代培養肝細胞にハロセンやミトコンドリアの酸化的リン酸化を阻害するシアン化合物を投与し、エネルギー代謝や脂質過酸化が細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  の増加に及ぼす影響について検索した。

ヌクレオチドのうち、ATP 濃度は NaCN に加えてハロセンを投与した A 群では30分後に有意に低下し、180分後まで低値を推移した。一方、ハロセンのみを投与した B および NaCN のみを投与した C 群においても ATP 濃度は経時的に減少したが、その減少率は A 群が大きかった。したがって、NaCN に加えてハロセンを投与すると、ハロセンあるいは NaCN のみを投与した場合に比較してエネルギー代謝の抑制を増強させることが明らかとなった。アラントイ



ン値はA群では60分後以降において有意に増加し、プリン代謝に伴うフリーラジカル産生はハロセン投与により亢進していると考えられた。また、A群のTSARS濃度は投与30分以降、細胞中では有意な低値を示し、上清中では増加傾向を示すことから、TSARsは細胞外へ流出していると推測された。ハロセンのみを投与したB群でも同様の結果が認められ、ハロセン自体によるフリーラジカル産生の起こることが明らかとなった。

細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  はA群では投与約100分後に増加し、その後減少した。また、同時に細胞死を示すPIの蛍光が増加した。またハロセンのみを投与したB群でも細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  の増加が認められた。したがって、ハロセンによるエネルギー代謝の低下ならびにフリーラジカル産生による脂質過酸化により細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  の増加ならびに、細胞死が引き起こされると考えられた。

Table 6. Nucleotides levels (nmol/5x10<sup>5</sup> cell) in primary cultured hepatocytes in 4 groups.

	group	0	30	60	90	120	150	180	(min)
ATP	A (n=3)	343±77.9	242±57.6*	271±93.3	246±116*	242±108*	222±66.6**	237±39.3	
	B (n=3)	372±85.1	317±44.8	353±63.1	348±92.1*	360±99.2	319±74.6*	317±36.2	
	C (n=3)	323±93.6	240±53.4	326±106	304±74.2	256±35.2	258±55.0	246±38.4	
	D (n=3)	357±84.3	348±99.4	356±76.0	298±82.3	283±34.4	277±29.6	297±36.1	
ADP	A	113±20.0	113±34.0	120±41.5	109±38.1	123±48.8	114±40.3	109±29.0	
	B	114±36.6	108±29.5	124±25.1	139±56.9	150±58.0	133±55.1	137±57.4	
	C	102±44.0	99±29.8	139±38.8	143±36.4	126±47.5	130±45.9	124±60.2	
	D	109±25.7	117±37.7	125±48.8	102±34.9	92.1±9.6	98.5±26.8	107±31.8	
AMP	A	9.4±9.3	18.2±15.4	20.7±17.7	19.1±7.6	21.9±12.3	22.8±18.0	23.2±11.0	
	B	15.5±14.5	21.1±16.7	24.2±16.0	30.2±24.9	33.9±32.6	36.2±23.3	31.4±29.1	
	C	14.5±10.9	15.6±10.7	26.0±15.9	30.9±20.4	33.6±31.4	31.8±20.4	32.0±30.0	
	D	17.1±13.9	23.2±18.3	29.7±22.9	20.4±12.2	22.7±14.3	24.7±22.6	29.1±23.0	
GTP	A	153±12.7	143±28.6	144±30.7	139±32.8	141±29.5	133±24.1	133±22.6	
	B	178±26.9	161±5.5	169±3.2	162±10.5	163±11.0	152±10.5	147±13.3	
	C	152±5.1	150±12.7	161±7.5	148±12.7	144±10.5	131±21.2	129±14.5	
	D	191±71.8	190±31.0	161±7.4	153±15.1	144±16.1	142±11.2	141±12.7	
GDP	A	34.7±2.0	35.3±1.5	36.2±4.1	40.2±9.5	39.9±5.7	35.7±1.3	34.8±0.8	
	B	33.2±1.2	34.2±0.9	36.0±1.8	38.6±4.2	42.8±11.2	36.5±3.7	36.2±1.3	
	C	32.5±0.8	34.6±2.3	35.2±1.7	39.5±6.7	40.1±3.3	34.5±2.1	35.4±1.4	
	D	32.9±1.1	34.3±0.7	34.8±0.8	37.4±3.3	37.2±3.6	36.5±6.3	34.2±1.8	
IMP	A	143±52.7	163±88.2	174±113	166±165	151±132	216±215	206±188	
	B	148±44.4	134±18.4	150±47.5	150±65.0	160±64.9	198±150	192±105	
	C	125±47.4	131±59.6	203±118	196±88.3	146±41.7	159±135	190±152	
	D	112±51.9	123±59.4	146±34.9	108±52.1	108±16.8	271±297	189±137	

Each value is given as mean±SD. Group A: the exposure of both 0.5 mM halothane and 7.5 mM NaCN. Group B: the exposure of 0.5 mM halothane without 7.5 mM NaCN. Group C: the exposure of 7.5 mM NaCN without 0.5 mM halothane. Group D: without exposure of both 0.5 mM halothane and 7.5 mM NaCN. Statistical significance is analyzed using paired t-test.

\* and \*\*: Significant difference compared with each value at 0 min. (p<0.05 and p<0.01, respectively).

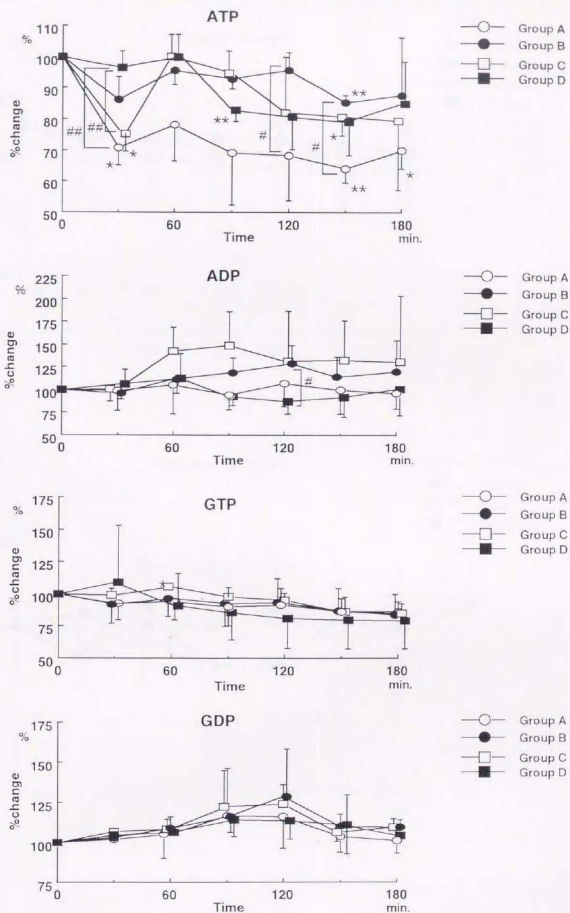


Fig. 18. Changes of ATP, ADP, GTP, and GDP after incubation.

\* and \*\*: Significant difference compared with pre value by paired t-test ( $p < 0.05$  and  $p < 0.01$ , respectively). # and ##: Significant difference analyzed by unpaired t-test ( $p < 0.05$  and  $p < 0.01$ , respectively).

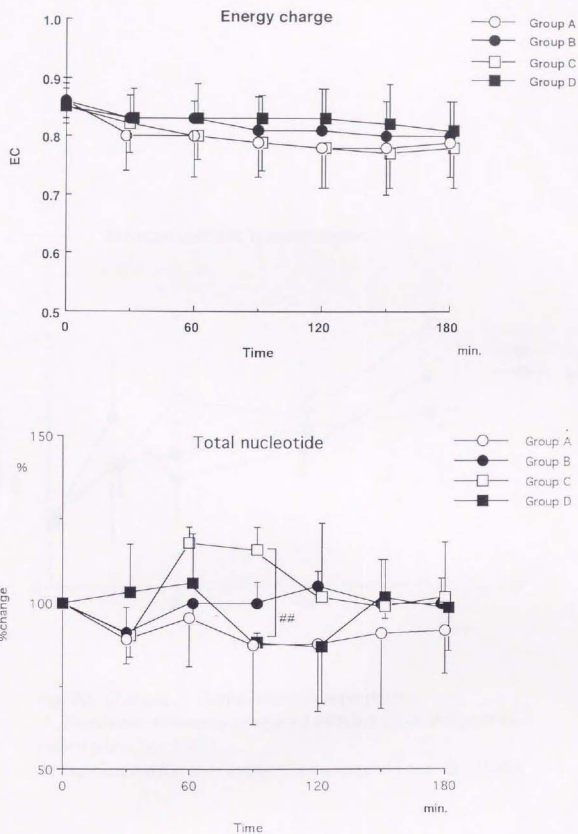


Fig. 19. Changes of energy charge and total nucleotide after incubation.  
## : Significant difference analyzed by unpaired t-test ( $p < 0.01$ ).

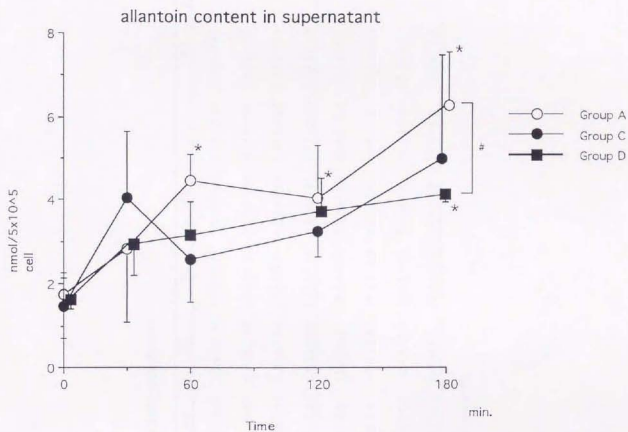


Fig. 20. Changes of allantoin level in supernatant.

\* : Significant difference compared with pre value analyzed by paired  $t$ -test ( $p < 0.05$ )

# : Significant difference analyzed by unpaired  $t$ -test ( $p < 0.05$ ).

Table 7. TBARS content of hepatocytes and supernatant.

	group	0	30	60	90	120	150	180	(min)
hepatocytes	A	2.62±1.05	1.58±0.77	1.59±0.99	1.70±0.79	1.41±0.91	1.51±0.90	1.70±0.98	
	B	2.85±1.39	3.71±0.97	2.95±1.43	2.78±1.20	2.03±1.32	2.14±1.77	2.29±1.62	
	C	2.56±1.22	2.68±2.15	2.32±1.17	1.43±0.70	1.57±0.64	1.41±0.80	2.15±1.18	
	D	3.00±1.77	2.53±1.07	2.65±1.40	2.45±1.34	2.61±1.88	3.11±2.43	2.57±1.80	
supernatant	A	16.2±12.4	10.8±6.6	21.6±6.9	18.5±10.0	19.2±11.6	23.6±19.3	15.3±10.3	
	B	18.7±17.0	20.3±1.8	12.1±7.4	12.8±13.9	19.1±7.0	17.8±1.4	23.6±2.4	
	C	20.3±7.9	7.52±11.2	12.1±10.4	20.2±19.8	10.6±7.3	17.1±4.8	15.2±3.3	
	D	17.2±14.1	28.0±12.1	9.45±6.6	10.8±10.6	17.8±3.7	11.9±8.4	17.0±10.2	

unit: nmol/5x10<sup>5</sup>cells Each value is given as mean±SD.

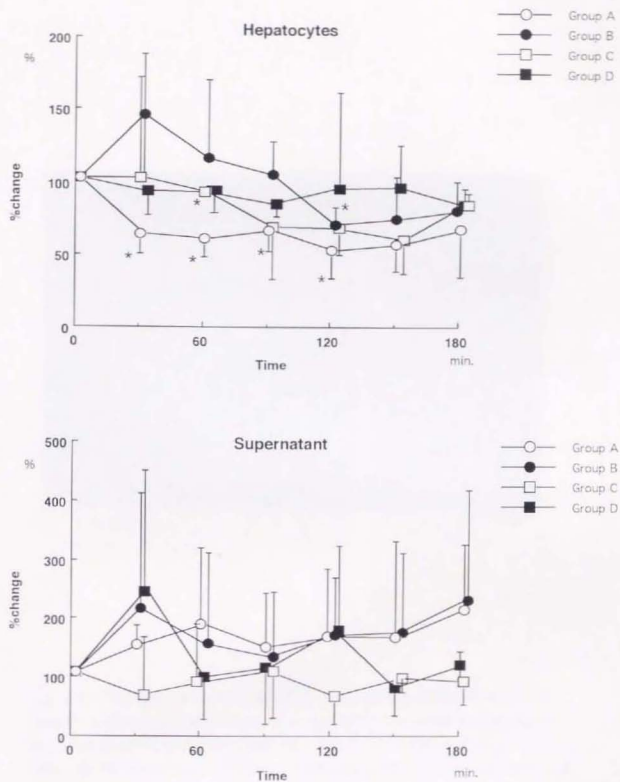


Fig. 21. Change of MDAs in hepatocytes and the supernatant.  
 \*: Significant difference compared with pre value analyzed by paired t-test ( $p < 0.05$ ).



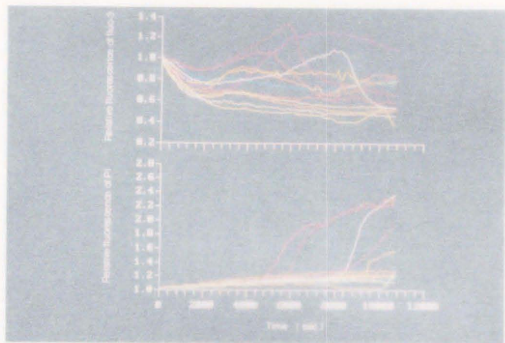


Fig. 22. Changes of fluo-3 ( $\text{Ca}^{2+}$  indicator) and propidium iodide (nuclei indicator) fluorescence in primary cultured hepatocytes exposed to both 0.5 mM halothane and 7.5 mM NaCN. Y axes are relative fluorescence of fluo-3 and propidium iodide (PI) to their initial values. Both halothane and NaCN were added at 0 sec. The colored line represents the changes of fluo-3 and PI fluorescence in the single cell. Note the increase of PI fluorescence after the decrease of fluo-3 fluorescence.

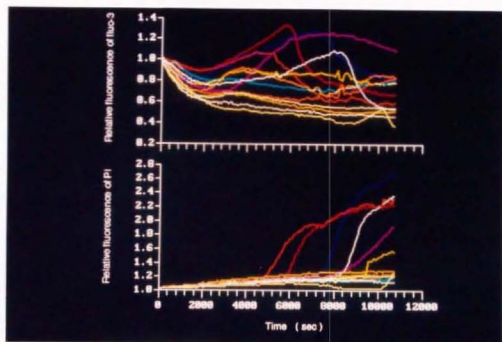


Fig. 22. Changes of fluo-3 ( $\text{Ca}^{2+}$  indicator) and propidium iodide (nuclei indicator) fluorescence in primary cultured hepatocytes exposed to both 0.5 mM halothane and 7.5 mM NaCN. Y-axes are relative fluorescence of fluo-3 and propidium iodide (PI) to their initial values. Both halothane and NaCN were added at 0 sec. The colored line represents the changes of fluo-3 and PI fluorescence in the single cell. Note the increase of PI fluorescence after the decrease of fluo-3 fluorescence.

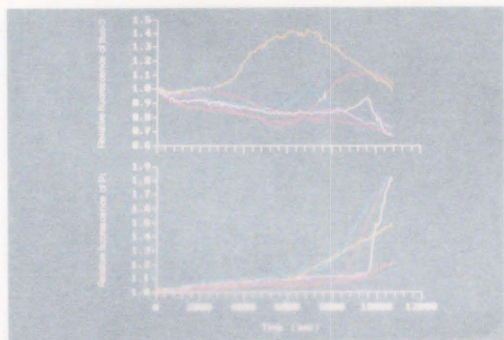


Fig. 23. Changes of fluo-3 ( $\text{Ca}^{2+}$  indicator) and propidium iodide (nuclei indicator) fluorescence in primary cultured hepatocytes exposed to 0.5 mM halothane without 7.5 mM NaCN. Y-axes are relative fluorescence of fluo-3 and propidium iodide (PI) to their initial values. Halothane was added at 0 sec. The colored line represents the changes of fluo-3 and PI fluorescence in the single cell. Note the increase of PI fluorescence after the decrease of fluo-3 fluorescence.

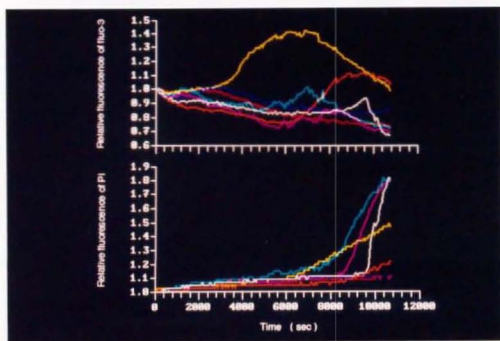


Fig. 23. Changes of fluo-3 ( $\text{Ca}^{2+}_i$  indicator) and propidium iodide (nuclei indicator) fluorescence in primary cultured hepatocytes exposed to 0.5 mM halothane without 7.5 mM NaCN. Y-axes are relative fluorescence of fluo-3 and propidium iodide (PI) to their initial values. Halotnane was added at 0 sec. The colored line represents the changes of fluo-3 and PI fluorescence in the single cell. Note the increase of PI fluorescence after the decrease of fluo-3 fluorescence.

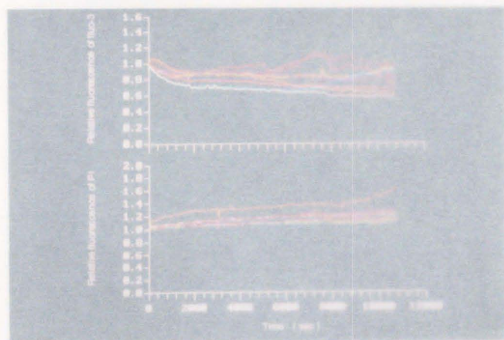


Fig. 24. Changes of fluo-3 ( $\text{Ca}^{2+}$  indicator) and propidium iodide (nuclei indicator) fluorescence in primary cultured hepatocytes exposed to 7.5 mM NaCN without 0.5 mM halothane. Y-axes are relative fluorescence of fluo-3 and propidium iodide (PI) to their initial values. NaCN was added at 0 sec. The colored line represents the changes of fluo-3 and PI fluorescence in the single cell. Note that fluo-3 fluorescence was gradually increased except for PI fluorescence almost not changed.

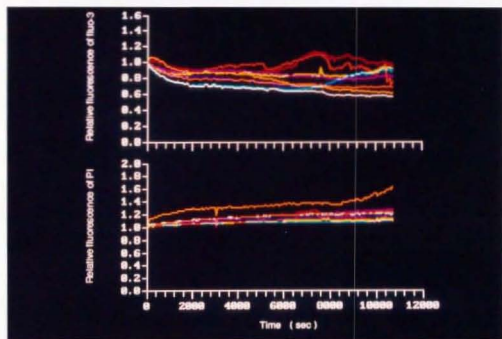


Fig. 24. Changes of fluo-3 ( $\text{Ca}^{2+}$ i indicator) and propidium iodide (nuclei indicator) fluorescence in primary cultured hepatocytes exposed to 7.5 mM NaCN without 0.5 mM halothane. Y-axes are relative fluorescence of fluo-3 and propidium iodide (PI) to their initial values. NaCN was added at 0 sec. The colored line represents the changes of fluo-3 and PI fluorescence in the single cell. Note that fluo-3 fluorescence was gradually increased except for PI fluorescence almost not changed.



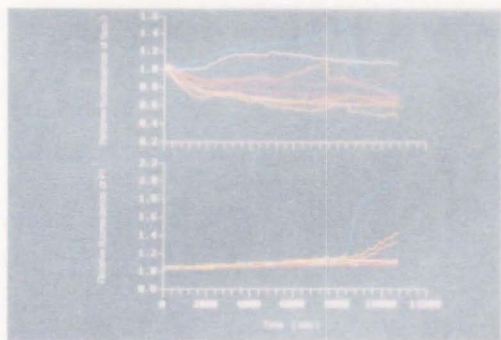


Fig. 25. Changes of flow  $Ca^{2+}$  indicators and propidium iodide (nuclei indicator) fluorescence in primary cultured hepatocytes exposed to without  $Ca^{2+}$ -ionophores and  $1.5 \times 10^{-6}$  M  $NaCl$ . Y axes are relative fluorescence of flow  $Ca^{2+}$  and propidium iodide (PI) to their initial values, fluorescence added at 0 min. The colored line represents the changes of flow  $Ca^{2+}$  fluorescence in the single cell. Note that flow  $Ca^{2+}$  fluorescence has not almost changed except for the first short increase in response of PI fluorescence.

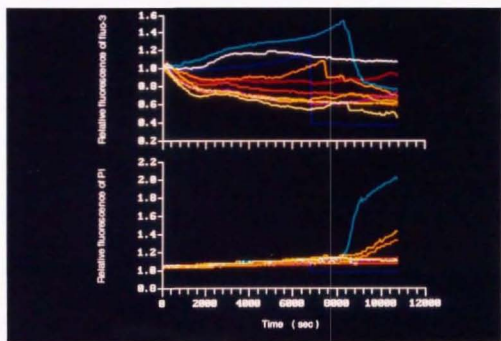


Fig. 25. Changes of fluo-3 ( $\text{Ca}^{2+}$  indicator) and propidium iodide (nuclei indicator) fluorescence in primary cultured hepatocytes exposed to without both 0.5 mM halothane and 7.5 mM NaCN. Y-axes are relative fluorescence of fluo-3 and propidium iodide (PI) to their initial values. NaCN was added at 0 sec. The colored line represents the changes of fluo-3 and PI fluorescence in the single cell. Note that fluo-3 fluorescence was not almost changed except for few cells shown the increase of PI fluorescence.

Table 8. Mean time on maximum cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  and cell death.

group	peak $[\text{Ca}^{2+}]$ (min)	cell death (min)	rate of cell death (%)
A	$125.8 \pm 31.1$	$132.9 \pm 33.3$	57
B	$134.6 \pm 25.3$	$139.6 \pm 23.1$	63
C	N.D.	N.D.	—
D	$133.1 \pm 9.9$	$144.4 \pm 6.0$	25

Each value is given as mean  $\pm$  S.D. N.D.: not detected. Group A: treatment with both 0.5 mM halothane and 7.5 mM NaCN. Group B: treatment with 0.5 mM halothane alone. Group C: treatment with alone 7.5 mM NaCN. Group D: non-treatment.

## 第五章

### 総括

ハロセン誘発性肝障害は、ハロセン麻酔の合併症として重要な疾患の一つで、肝血流量を低下させる薬剤を併用するなど低酸素下において頻発し、酸素供給が十分であれば殆ど発症しないとされている。したがって、本症の発症機序には、肝酸素濃度が重要な因子として関与すると考えられているが、ハロセンがそれ自体濃度依存性に直接肝血流量を低下させ、肝低酸素症を誘発させるため、その詳細は不明である。ハロセンは低酸素条件下における嫌氣的代謝過程でフリーラジカルを生じ、肝細胞障害を引き起こすと考えられるが、フリーラジカルの産生は低酸素状態あるいは虚血時に認められるヌクレオチドの代謝とこれに伴うプリン代謝に関連して産生されることも知られている。したがってハロセン誘発性肝障害の発症機序を明らかにする上では肝血流量を制御しうる肝灌流系を用いて検討する必要がある。そこでまず、門脈動脈血化（PA）法を用いた肝灌流系を、肝動脈のみで血液を供給した灌流系（PVA）と比較検討し、その有用性を確認した後、PAを用いて、ハロセン誘導性肝障害の発症機序を検討した。

PA法による肝灌流系の検討：血液ガス分析はPA群ではpH、 $pO_2$ および $pCO_2$ いずれも灌流3時間後まで安定した値を維持し、これらの数値を基に算定される肝酸素供給量および消費量は、灌流3時間後まで安定していた。一方、PVA群では $pO_2$ は1時間後よりPA群と比較し有意に低下し、肝酸素消費量は増加傾向を示したことから、酸素需給バランスは安定しないと考えられた。またPA群の肝組織中ATP濃度とEC値は灌流1時間後まではわずかに減少するものの3時間後には前値に復し、少なくともATP産生を増加させるに十分な酸素供

給量は確保されているものと考えられた。一方、PVA 群では、灌流2時間後より低下し、3時間後にはPA群と比較し有意な低値を示し、肝の好氣的エネルギー代謝の低下が推測され、酸素供給は不足していると考えられた。また、PVA 群のEC値は灌流2および3時間後には0.5以下の値に低下し、PVA群ではミトコンドリアに不可逆的な重度の肝細胞障害が発現しているものと考えられた。さらに、PA群では肝静脈血中ALT活性値に有意な変動は認められなかったが、PVA群では灌流開始後より漸増し、組織学的所見からも肝小葉と肝細胞索構造の崩壊、類洞の拡張と鬱血ならびに顆粒状変性が認められ、肝細胞障害の存在が明らかとなった。

以上の結果からPA法による肝灌流系は、肝組織のエネルギー代謝を維持するに十分な酸素供給が得られ、肝血流量を一定に保持することで酸素供給量を制御できる灌流系であることが明らかとなった。ついで、臨床的に用いられるハロセン麻酔濃度を吸入させ、肝組織中過酸化リン脂質と主要な脂質過酸化代謝物であるマロンジアルデヒド (MDAs)、さらに抗酸化系酵素であるスーパーオキシドデスムターゼ (SOD) およびグルタチオンペルオキシダーゼ (GSH-px) 活性を経時的に測定し、ハロセンの影響を検討するとともに、酸素供給量、消費量とMDAsとの関係を検索し、肝酸素濃度のハロセン誘発性肝障害に及ぼす影響を検討した。ついで肝組織マクロオチドおよびオキシブリン濃度を測定し、ハロセン誘発性肝障害におけるエネルギー代謝系の関与について検討した。さらに、初代培養肝細胞を用い、ハロセン投与に加え、ミトコンドリアのチトクロームc酸化酵素を阻害するシアン化合物を用い酸化的リン酸



化を抑制した条件下において、ヌクレオチド、アラントイン、脂質過酸化代謝産物ならびに細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度の変動を検討した。

肝組織中の過酸化リン脂質、マロンジアルデヒド(MDAs)ならびに抗酸化酵素活性の変動：低酸素条件下でハロセンを吸入させた A 群では吸入開始 1 時間後に過酸化 PC が有意に増加し、また低酸素のみの C 群では過酸化 PC が増加傾向を示すものの、A 群のそれと比較して軽度であった。また、肝組織中 MDAs は A 群では遊離型および蛋白結合型 MDA ともに吸入開始 1、2 時間後に増加した。これに対し、十分な酸素供給下でハロセンを吸入させた B 群では MDA の有意な増加は認められなかった。以上の結果ならびにハロセン吸入時には肝酸素供給量および消費量と総 MDAs とは負の相関を示し、とくに蛋白結合型 MDA との間に有意な相関が認められる結果から、低酸素条件下におけるハロセン吸入はフリーラジカルの産生を亢進させることが明らかとなった。また、低酸素条件のみではフリーラジカルの産生は著明でなく、ハロセン吸入時に認められるフリーラジカルはハロセンの嫌氣的代謝により産生されるものと考えられた。

肝組織中ヌクレオチドならびにオキシブリン濃度：低酸素条件下でハロセン吸入を行った A 群の ATP ならびに GTP 濃度、とくに ATP 濃度は、ハロセン吸入 30 分以降有意な低値を推移し、低酸素のみの B 群に比較しても低値を示した。したがって、臨床的に用いられる低用量であってもハロセンの吸入は、おそらくミトコンドリアの酸化的リン酸化経路を阻害することで、低酸素条件下における肝エネルギー代謝の低下をさらに増悪するものと考えられた。

一方、各群におけるオキシブリンの変動から考えてみると、A 群ではハロセン吸入後の時間経過に伴ってオキシブリン総量が増加し、また、キサンチンならびに尿酸濃度の増加が著明であった。また、低酸素条件のみのB 群でも灌流 2 時間後にキサンチンならびに尿酸濃度が増加したが、その程度は A 群に比較して軽度であった。低酸素条件下におけるハロセン吸入ではハロセンの嫌氣的代謝によるフリーラジカルの産生に加えて、肝のエネルギー代謝の低下をさらに増悪することで、プリン代謝に基づくフリーラジカルの産生をも促進させていることが明らかとなった。

初代肝培養細胞のエネルギー代謝と脂質過酸化が細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  に及ぼす影響：初代培養肝細胞にハロセンやミトコンドリアの酸化的リン酸化を阻害するシアニ化合物を投与し、エネルギー代謝や脂質過酸化が細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  の増加に及ぼす影響について検索した。

ヌクレオチドのうち、ATP 濃度は NaCN 投与に加えてハロセンを投与した A 群では30分後に有意に低下し、180分後まで低値を推移した。一方、ハロセンのみを投与したB および NaCN のみを投与したC 群においても ATP 濃度は経時的に減少したが、その減少率はA 群が大きかった。したがって、NaCN の投与に加えてハロセンの投与は、ハロセンあるいは NaCN のみを投与した場合に比較してエネルギー代謝の抑制を増強させることが明らかとなった。アラントイン値はA 群では60分後以降に有意に増加し、プリン代謝に伴うフリーラジカル産生はハロセン投与により亢進していると考えられた。細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  はA 群では投与約100分後に増加し、その後減少した。また、同時に細胞死を示す

PIの蛍光が増加した。またハロセンのみを投与したB群でも細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  の増加が認められ、ハロセンによるエネルギー代謝の低下ならびにフリーラジカル産生による脂質過酸化により細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  の増加ならびに、細胞死が引き起こされと考えられた。

以上のことから、ハロセン誘発性肝障害は、ハロセン投与によるエネルギー代謝の抑制に伴うプリン代謝に基づくフリーラジカルの産生増加とハロセンの嫌氣的代謝で産生されるフリーラジカルに起因し、細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  の増加をもたらしことで発症することが明らかとなった。また、低酸素下では低酸素によるエネルギー代謝の低下をハロセンが増強させ、本症の発症頻度が高まるものと考えられた。

## 謝辞

本研究を行うにあたり、ご指導、御助言を頂いた東京大学大学院農学生命科学研究科獣医臨床病理学教室 小野憲一郎教授に深謝致します。本研究の実施にあたり適切にかつ貴重な御助言を戴きました岐阜大学農学部獣医学科家畜外科学講座 工藤忠明教授に深謝致します。また、多大な御助言と励ましを頂いた岐阜大学農学部獣医学科家畜病理学講座 柳井徳磨助教授、東京大学大学院農学生命科学研究科獣医臨床病理学教室 稲葉 睦助教授および 松木直章助手に深謝致します。また実験遂行にあたりご協力戴いた岐阜大学農学部獣医学科家畜外科学講座ならびに東京大学大学院農学生命科学研究科獣医臨床病理学教室の教職員各位に深く感謝の意を表します。

# 参考文献

1. Adamsons, R., Arif, S., Babich, A., Butt, K., Lam, A., and Minkowitz, S. 1975. Arterialization of the liver in combination with a portacaval shunt in the dog. *Surg. Gynecol. & Obstet.* 140: 594-600.
2. Ahr, H. J., King, L. J., Nastainczyk, W., and Ullrich, V. 1982. The mechanism of reductive dehalogenation of halothane by liver cytochrome P450. *Biochem. Pharm.* 31:383-390.
3. Albano, E., Bellomo, G., Parola, M., Carini, R., and Dianzani, M. U. 1991. Stimulation of lipid peroxidation increases the intracellular calcium content of isolated hepatocytes. *Biochim. Biophys. Acta* 1091: 310-316.
4. Andreen, M. 1982. Inhalation versus intravenous anaesthesia. Effects on the hepatic and splanchnic circulation. *Acta anaesth. scand. suppl.* 75: 25-31.
5. Andreen, M. and Irestedt, L. 1978. Hepatic release of fluoride from halothane under hypoxic and non-hypoxic conditions in the dog. *Acta Anaesth. scand.* 22: 519-526.
6. Asakawa, H., Kasai, S., and Mito, M. 1985. Flow- and pressure-adapted portal arterialization in dogs. *Jap. J. Surg.* 15: 291-

7. Atkinson, D., E. 1968. The energy charge of the adenylate pool as a regulatory parameter. Interaction with feedback modifiers *Biochem. J.* 7: 4030-4034.
8. Aw, T. Y. and Jones, D. P. 1987. Cyanide toxicity in hepatocytes under aerobic and anaerobic conditions. *Am. J. Physiol.* 252: C349-C355.
9. Barnard, M. L., Snyder, S. J., Engerson, T. D., and Turrens, J. F. 1993. Antioxidant enzyme status of ischemic and postischemic liver and ischemic kidney in rats. *Free Radical Bio. Med.* 15: 227-232.
10. Becker, G. L. 1990. Fatty acid lessens halothane's inhibition of energy metabolism in isolated hepatocytes. *Anesth. Analg.* 70: 22-28.
11. Becker, G. L., Hensei, P., Holland, A. D., Miletich, D. J., and Albrecht, R. F. 1986. Energy deficits in hepatocytes isolated from phenobarbital-treated or fasted rats and briefly exposed to halothane and hypoxia in vitro. *Anesth.* 65: 379-384.
12. Bellomo, G., Fulceri, R., Albano, E., Gamberucci, A., Pompella, A., Parola, M., and Benedetti, A. 1991.  $Ca^{2+}$ -dependent and independent mitochondrial damage in hepatocellular injury.



Cell Calcium 12: 335-341.

13. Bellomo, G. and Orrenius, S. 1985. Altered thiol and calcium homeostasis in oxidative hepatocellular injury. *Hepatology* 5: 876-882.
14. Biebuyck, J. F., Lund, P., and Krebs, H. A. 1972. The effect of halothane (2-bromo-2-chloro-1,1,1-trifluoroethane) on glycolysis and biosynthetic processes of the isolated perfused rat liver. *Biochem. J.* 128: 711-720.
15. Bird, R. P. and Draper, H. H. 1982. Uptake and oxidation of malondialdehyde by cultured mammalian cells. *Lipids* 17: 519-523.
16. Bligh, R. P. and Dyer, W. J. 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* 37: 911-917.
17. Chapman, A.G., Fall, L., and Atkinson, D. E. 1971. Adenylate energy charge in *Escherichia coli* during growth and starvation. *J. Bacteriol.* 108: 1072-1086.
18. Chen, X. B., Kyle, D. J., and Oskov, E. R. 1993. Measurement of allantoin in urine and plasma by high-performance liquid chromatography with pre-column derivatization. *J. Chromatogr.* 617: 241-247.

19. Cohen, P. J. 1973. Effect of anesthetics on mitochondrial function. *Anesth.* 39: 153-164.
20. Cohen, E. N. and Hood, N. 1969. Application of low-temperature autoradiography to studies of the uptake and metabolism of volatile anesthetics in the mouse. *Anesth.* 31: 553-559.
21. Cohn, R. and Herrod, C. 1952. Some effects upon the liver of complete arterialization of its blood supply. *Surg.* 32: 214-218.
22. Corliss, G. A. and Dugan, Jr. L. R. 1971. Phospholipid oxidation in emulsions. *Lipids* 5: 846-853.
23. Crawford, D. L., Yu, T. C., and Sinnhuber, R. O. 1967. Reaction of malonaldehyde with protein. *J. Food Sci.* 32: 332-335.
24. Crook, J. N., Paris, M. F., and Nance, F. C. 1970. Studies of hepatic blood flow and hepatic function after ligation of the hepatic artery and portal vein. *Amer. Surg.* 36: 724-727.
25. de Groot, H. and Noll, T. 1984. The crucial role of hypoxia in halothane-induced lipid peroxidation. *Biochim. & Biophys. Res. Commun.* 119: 139-143.
26. Farber, J. L. 1990. The role of calcium in lethal cell injury. *Chem. Res. Toxicol.* 3: 503-508.
27. Farrell, G. C., Mahoney, J., Bilous, M., and Frost, L. 1988.

- Altered hepatic calcium homeostasis in guinea pigs with halothane-induced hepatotoxicity. *J. Pharm. Exp. Therap.* 247: 751-756.
28. Foschi, D., Castoldi, L., Lesma, A., Musazzi, M., Benevento, A., and Trabucchi, E. 1993. Effects of ischemia and reperfusion on liver regeneration in rats. *Eur. J. Surg.* 159: 393-398.
  29. Fujii, K., Morio, M., Kikuchi, H., 1984. In vivo spin trap study on anaerobic dehalogenation of halothane. *Life Sci.* 35: 463-468.
  30. Fukumoto, T. 1989. The effect of porto-intrahepatic portal bypass on the ischemic liver during clamping the hepatic inflow. *Jap. J. Surg.* 90: 837-846. (in Japanese)
  31. Gonzalez-Flecha, B., Cutrin, J. C., and Boveris, A. 1993. Time course and mechanism of oxidative stress and tissue damage in rat liver subjected to in vivo ischemia-reperfusion. *J. Clin. Invest.* 91: 456-464.
  32. Greenway, C. V. and Stark, R. D. 1971. Hepatic vascular bed. *Physiol. Rev.* 51: 23-65.
  33. Gut, J. and Huwyler, J. 1994. Leukotriene B4 formation upon halothane-induced lipid peroxidation in liver membrane fractions under low O<sub>2</sub> concentrations in vitro. *Eur. J. Biochem.* 219: 287-295.

34. Hanna, S. S. and Maheshwari, Y. 1986. Effect of portal vein occlusion on liver blood flow in normal and cirrhotic dogs. *J. Surg. Res.* 41: 293-300.
35. Hochstein, P. and Jain, S. K. 1981. Association of lipid peroxidation and polymerization of membrane proteins with erythrocyte aging. *Fed. Proc.* 40: 183-188.
36. Hori, T., Nagasaka, H., and Matsumoto, N. 1988. Halothane hepatotoxicity and hepatic circulation. *Jap. J. Anesth.* 37: 268-279. (in Japanese)
37. Hughes, H. M., George, I. M., Evans, J. C., Rowlands, C. C., Powell, G. M., and Curtis, C. G. 1991. The role of the liver in the production of free radicals during halothane anesthesia in the rat. *Biochem. J.* 277: 795-800.
38. Hughes, R. L., Mathie, R. T., Campbell, D., and Fitch, W. 1979. Effect of hypercarbia on hepatic blood flow and oxygen consumption in the greyhound. *Br. J. Anaesth.* 51: 289-296.
39. Jenkins, S. A., Baxter, J. N., Devitt, P., Shimirty, S. K., and Shields, R. 1986. The effects of arterialization of the portal stump on liver function and hepatic haemodynamics in cirrhotic rats with a portacaval shunt. *Digest.* 33: 161-167.
40. Jensen, G. E. and Clausen, J. 1981. Glutathione peroxidase

activity in vitamine E and essential fatty acid-deficient rats.

Ann. Nutr. Metab. 25: 27-37.

41. Kasahara, K. and Fukumoto, T. 1993. Effect on liver and splanchnic circulation of graded flow rates through portal-systemic bypass during acute portal occlusion. J. Surg. Res. 55: 273-281.
42. Kerr, J. C., Reynolds, D. G., and Swan, K. G. 1975. Hemodynamics of experimental portal venous occlusion in dogs. Amer. Surg. 41: 198-202.
43. Kikugawa, K., Kojima, T., Yamaki, S., and Kosugi, H. 1992. Interpretation of the thiobarbituric acid reactivity of rat liver and brain homogenates in the presence of ferric ion and ethylenediaminetetraacetic acid. Anal. Biochem. 202: 249-255.
44. Kinugawa, H., Kawahara, M., Amakata, Y., and Maeda, T. 1993. Halothane-induced cytotoxicity in isolated rat hepatocytes: An electron microscopic study. In Vivo 7: 497-502.
45. Kusumoto, K., Morimoto, T., Minor, T., Uchino, T., and Isselhard, W. 1995. Allopurinol effects in rat liver transplantation on recovery of energy metabolism and free radical-induced damage. Eur. Surg. Res. 27: 285-291.
46. Lazzarino, G., Vagnozzi, R., Tavazzi, B., Pastore, F. S., Di Pierro,

- D., Siragusa, P., Belli, A., Giuffre, R., and Giardina, B. 1992. MDA, oxypurines, and nucleosides relate to reperfusion in short-term incomplete cerebral ischemia in the rat. *Free Rad. Biol. & Med.* 13: 489-498.
47. Lemasters, J. J., DiGuiseppi, J., Nieminen, A-L., and Herman, B. 1987. Blebbing, free  $Ca^{2+}$  and mitochondrial membrane potential preceding cell death in hepatocytes. *Nature* 325: 78-81.
48. Lind, R. C., Gandolfi, A. J., Sipes, I. G., Brown, Jr., B. R., and Waters, S. J. 1986. Oxygen concentrations required for reductive defluorination of halothane by rat hepatic microsomes. *Anesth. Analg.* 65: 835-839.
49. Lutz, J., Henrich, H., and Bauereisen, E. 1975. Oxygen supply and uptake in the liver and the intestine. *Pflügers Arch.* 360: 7-15.
50. Maeda, K. 1991. Experimental study of partial arterialization of the portal vein on the dearterialized liver. *J. Jap. Surg. Soc.* 92: 697-706. (in Japanese)
51. Malleant, Y., Siproudhis, L., Tanguy, M., Clerc, C., Chesne, C., Saint-Marc, C., and Guillouzo, A. 1990. Effects of halothane on human and rat hepatocyte cultures. *Anesth.* 72: 526-534.
52. Marubayashi, S., Dohi, K., Sumimoto, K., Oku, J., Ochi, K., and



- Kawasaki, T. 1989. Change in activity of oxygen free radical scavengers and in levels of endogenous antioxidants during hepatic ischemia and subsequent reperfusion. *Transplant. Proc.* 21: 1317-1318.
53. Matsuki, N., Tamura, S., Ono, K., Watari, T., Goitsuka, R., Takagi, S., and Hasegawa, A. 1991. The high-performance liquid chromatographic analysis for the peroxidized phospholipids in equine erythrocytes and skeletal muscle. *J. Vet. Med. Sci.* 53: 717-719.
54. Matsuki, N., Tamura, S., Ono, K., Watari, T., Goitsuka, R., Yamanobe, A., Hiraga, A., Kubo, K., Takagi, S., Hasegawa, A., and Suzuki, N. 1991. Exercise-induced phospholipid degradation in the equine skeletal muscle and erythrocytes. *J. Vet. Med. Sci.* 53: 1001-1007.
55. Matsumoto, N., Hori, T., Nagasaka, H., Yoshizawa, M., Aikawa, K., Ota, Y., Goto, T., and Sato, I. 1982. Effects of changing Fio<sub>2</sub> or halothane concentration on liver circulation and liver function tests during halothane anesthesia. *Jap. J. Anesth.* 31: 1204-1210. (in Japanese)
56. McCord, J. M. 1985. Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury. *N. Engl. J. Med.* 312: 159-163.



57. Mckelvey, T. G., Holwarth, M. E., Granger, D. N., Engerson, T. D., Landler, U., and Jones, H. P. 1988. Mechanisms of conversion of xanthine dehydrogenase to xanthine oxidase in ischemic rat liver and kidney. *Am. J. Physiol.* 254: G753-G760.
58. Miller, R. N. and Hunter, Jr., F. E. 1970. The effect of halothane on electron transport, oxidative phosphorylation, and swelling in rat liver mitochondria. *Mol. Pharm.* 6: 67-77.
59. Minor, T., Isselhard, W., Yamamoto, Y., Obara, M., and Saad, S. 1993. The effects of allopurinol and SOD on lipid peroxidation and energy metabolism in the liver after ischemia in an aerobic/anaerobic persufflation. *Surg. Today* 23: 728-732.
60. Miyazawa, T., Suzuki, T., Fujimoto, K., and Kaneda, T. 1990. Phospholipid hydroperoxide accumulation in liver of rats intoxicated with carbon tetrachloride and its inhibition by dietary  $\alpha$ -tocopherol. *J. Biochem.* 107: 689-693.
61. Muller, K., Grune, T., Klee, S., Jochmann, C., Ungemach, F., and Siems, W. 1993. Trichlorobromomethane-induced changes of purine nucleotides in hepatocytes. *Biochem. Mol. Biol. Int.* 31: 405-412.
62. Oberley, L. W. and Spitz, D. R. 1984. Assay of superoxide dismutase activity in tumor tissue. pp. 457-464. In: *Methods in*

- Enzymology Vol. 105 ( ed.), Academic Press, Inc. San Diego.
63. Ogura, Y., Takagi, K., Kawarada, Y., and Mizuno, R. 1996. Pathophysiological effect of hepatic ischemia and reperfusion after hepatectomy in dogs with obstructive jaundice, focusing on the effect of coenzyme Q10 and styrene-co-maleic acid superoxide dismutase. *J. Gastroent.* 31: 379-386.
64. Omar, R., Nomikos, I., Piccorelli, G., Savino, J., and Agarwal, N. 1989. Prevention of postischaemic lipid peroxidation and liver cell injury by iron chelation. *Gut* 30: 510-514.
65. Plummer, J. L., Beckwith, A. L. J., Bastin, F. N., Adams, J. F., Cousins, M. J., and Hall, P. 1982. Free radical formation in vivo and hepatotoxicity due to anesthesia with halothane. *Anesth.* 57: 160-166. 100. Rehder, K., Forbes, J., Alter, H., Hessler, O., and Stier, A. 1967. Halothane biotransformation in man: A quantitative study. *Anesth.* 28: 711-715.
66. Rehder, K., Forbes, J., Alter, H., Hessler, O., and Stier, A. 1967. Halothane biotransformation in man: a quantitative study. *Anesthesiology* 28: 711-715.
67. Richardson, P. D. I. and Withrington, P. G. 1981. Liver blood flow. Intrinsic and nervous control of liver blood flow. *Gastroenterology* 81: 159-173.

68. Sabiston, D. C. (石川浩一, 草間悟 監訳). クリストファー外科学. 11ed. pp.191-212. 第10章 麻酔. 医学書院.
69. Sakata, T. 1991. Experimental study on the maintenance of sufficient hepatic circulation with arterial blood during the temporary occlusion of the hilar hepatic circulation. *J. Jap. Surg. Soc.* 92: 331-338. (in Japanese)
70. Sameshima, T. 1994. Hepatotoxicity of halogenated inhalational anesthetics studied in rats hepatocytes. *Jap. J. Anesth.* 43: 454-466. (in Japanese)
71. Saric, J., Faugon, H., Beliard, R., Perissat, J., Balabaud, C., Dubuisson, L., and Bioulac, P. 1981. Liver arterialization improves hepatocytes ultrastructure in rats with portacaval shunts. *Dig. Dis. Sci.* 26: 225-231.
72. Sato, N., Fujii, K., Yuge, O., and Morio, M. 1990. The association of halothane-induced lipid peroxidation with the anaerobic metabolism of halothane: An in vitro study in guinea pig liver microsomes. *Hiroshima J. Med. Sci.* 39: 1-6.
73. Sevanian, A., Muakkassah-Kelly, S. F., and Montestruque, S. 1983. The influence of phospholipase A2 and glutathion peroxidase on the elimination of membrane lipid peroxides. *Arch. Biochem. Biophys.* 223: 441-452.

74. Shingu, K., Eger, E. I., and Johnson, B. H. 1982. Hypoxia per se can produce hepatic damage without death in rats. *Anesth. Analg.* 61: 820-823.
75. Shingu, K., Eger, E. I., and Johnson, B. H. 1982. Hypoxia may be more important than reductive metabolism in halothane-induced hepatic injury. *Anesth. Analg.* 61: 824-827.
76. Siu, G. M. and Draper, H. H. 1982. Metabolism of malonaldehyde in vivo and in vitro. *Lipids* 17: 349-355.
77. Snodgrass, P. J. 1966. The effect of halothane on rat liver mitochondria. *Biochem.* 5: 1140-1149.
78. St. Cyr, J. A., Bianco, R. W., Ascher, N. L. 1985. Consequences of ischemia on organ energy metabolism. *Transplant. Proc.* 17: 1468-1470.
79. Suematsu, M., Suzuki, H., Ishii, H., Kato, S., Yanagisawa, T., Asako, H., Suzuki, M., and Tsuchiya, M. 1992. Early midzonal oxidative stress preceding cell death in hypoperfused rat liver. *Gastroenterology* 103: 994-1001.
80. Trudell, J. R., Boterling, B., and Trevor, A. 1981. 1-chloro-2,2,2-trifluoroethyl radical: Formation from halothane by human cytochrome P-450 in reconstituted vesicles and binding to phospholipids. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 102: 372-

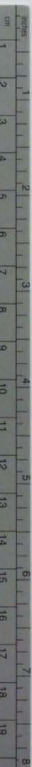
81. Tsai, S. and Smith, L. M. 1972. Role of the bases and phosphoryl bases of phospholipids in the autoxidation of methyl linoleate emulsions. *Lipids* 6: 196-202.
82. Van Dyke, R. A. 1982. Hepatic centrilobular necrosis in rats after exposure to halothane, enflurane, or isoflurane. *Anesth. Analg.* 61: 812-819.
83. Virtue, R. W., Lund, L. O., Phelps, M. Jr., Vogel, J. H., Beckwitt, H., and Heron, M. 1966. Difluoromethyl 1,1,2-trifluoro-2-chloroethyl ether as an anaesthetic agent: results with dogs, and a preliminary note on observation with man. *Canad. Anaesthetis. Socie. J.* 13(3): 233-241.
84. Widger, L. A., Gandolfi, A. J., and Van Dyke, R. A. 1976. Hypoxia and halothane metabolism in vivo. *Anesth.* 44: 197-201.
85. Yamamoto, M., Sato, M., Ida, T., Ukigusa, M., and Ozawa, K. 1978. Obstructive jaundice and hemorrhagic shock. *Circ. Shock* 5: 235-249.
86. Yamazoe, K., Yanai, T., Matsuki, N., Bonkobara, M., Ono, K., and Kudo, T. 1997. Hepatic oxygen supply, energy charge, and histological findings in dogs with portal vein arterialization. *J. Vet. Med. Sci.* (in press).

87. Yoshikawa, T., Furukawa, Y., Wakamatsu, Y., Takemura, S., Tanaka, H., and Kondo, M. 1982. Experimental hypoxia and lipid peroxide in rats. *Biochem. Med.* 27: 207-213.
88. Younes, M. and Styubelt, O. 1988. The involvement of reactive oxygen species in hypoxic injury to rat liver. *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.* 59(3): 369-381.
89. Zucker, J. R., Diamond, E. M., and Berman, M. C. 1982. Effect of halothane on calcium transport in isolated hepatic endoplasmic reticulum. *Br. J. Anaesth.* 54: 981-985.









# Kodak Color Control Patches

© Kodak, 2007 TM Kodak

Blue    Cyan    Green    Yellow    Red    Magenta    White    3/Color    Black



## Kodak Gray Scale



© Kodak, 2007 TM Kodak

A    1    2    3    4    5    6    M    8    9    10    11    12    13    14    15    B    17    18    19

