

学位論文題名

Dipyridamole protects the liver against warm ischemia and reperfusion injury

(肝温虚血再灌流障害に対するジピリダモールの保護作用)

学位論文内容の要旨

<背景>肝虚血・再灌流障害は肝切除術、肝移植術において術後経過に多大な影響を及ぼしうる。そのメカニズムの一つとして微小循環障害がある。adenosine triphosphate (ATP)の代謝産物の一つである adenosine は、血管拡張作用、組織血流増加作用にて虚血・再灌流障害を軽減する。ジピリダモール(DYP)は nucleoside transport inhibitor の一つとして、組織中の adenosine 濃度を高める一方、phosphodiesterase inhibitor としても虚血・再灌流障害を軽減すると言われている。

<目的>臨床に即したモデルとしてビーグル犬を使った 2 時間の完全肝虚血モデルを用い、DYP の肝の温虚血再灌流障害に対する保護作用を検討する。

<方法>体重 8~12kg の雌性ビーグル犬を用い、全身麻酔下、動脈圧、心電図、深部体温、門脈圧のモニターを行い、実験を施行した。

手術手技：肝臓は周囲組織から完全に剥離。肝上下の下大静脈、肝門部を 2 時間クランプし、その後クランプ開放した。肝血流遮断中は左大腿静脈、脾静脈、左内径静脈間に静脈-静脈バイパスを用いて腸管膜、下肢鬱血を回避した。肝組織、血液サンプルは再灌流後 3 時間まで採取。その後閉腹し、2 週間観察した。

実験群：30 頭のビーグル犬を、虚血のみ行った無治療群(CT 群, n=12)、low dose dipyridamole 群(low-DYP 群：投与量；0.05mg/kg, n=6)、medium dose dipyridamole 群 (medium-DYP 群：投与量；0.1mg/kg, n=6)、high dose dipyridamole 群(high-DYP 群：投与量；0.25mg/kg, n=6)の 4 群に無作為に分けた。治療群では薬物を虚血開始 1 時間前から虚血直前までの 1 時間、持続静脈投与した。

<結果>生存率：CT 群 12 頭中 9 頭は手術後 24 時間以内に急性肝不全にて死亡した。2 週間の観察期間中に low-DYP 群と high-DYP 群のそれぞれ 6 頭中 5 頭が低血圧を伴った急性肝不全にて死亡した。一方 medium-DYP 群は 6 頭全頭が 2 週間生存した。2 週間生存率は CT 群 25%、high-DYP 群 17%、medium-DYP 群 100%、low-DYP 群 17%。

平均動脈圧：CT 群では虚血前後にてほぼ変化がないのに対し、全治療群で薬物投与 50 分から平均動脈圧が 20%~30%低下し、虚血終了まで持続した。再灌流後、CT 群では虚血前値の 70%まで血圧低下を認めた一方、治療群では 40%~50%まで低下した。再灌流後 3 時間までに CT 群と medium-DYP 群の血圧は緩やかに回復したが、low-DYP 群と high-DYP 群の血圧は有意に低値のままであった。

肝組織血流(HTBF, laser Doppler flowmeter を用い、肝の異なる 3 点で測定した平均値を算出)：全治療群で薬物投与開始後、肝は鮮赤色を示し、特に high-DYP 群では HTBF

は初期値の125%まで上昇した。再灌流後、CT群の肝臓はすべて鬱血し、暗赤色に腫大し、HTBFは初期値の25%に留まった。これに対し、治療群では再灌流後のHTBFは初期値より高値となり、特にhigh-DYP群、medium-DYP群の肝は腫大することもなく鮮赤色を示した。しかしlow-DYP群の肝は徐々に鬱血、腫大した。

肝逸脱酵素(alanine aminotransferase ALT) : CT群のALTは再灌流後6時間でピーク値 $12,309 \pm 1,327$ U/Lまで上昇した。これに対して治療群のALTのピーク値はhigh-DYP群 $11,301 \pm 7,214$ U/L、medium-DYP群 $2,262 \pm 258$ U/L、low-DYP群 $7,233 \pm 1,770$ U/Lであった。さらにmedium-DYP群のALT値はその他の治療群と比較し、再灌流後1時間から24時間まで有意に低値を示した。一方、CT群、high-DYP群、low-DYP群の3群では再灌流後12時間以降のALT値に差はなかった。

エネルギー代謝(肝組織中adenine nucleotide, purine catabolites (PC)をHPLCにて測定) : 2時間の虚血にてCT群ではATPは虚血前値の10%まで低下、adenosine以外のPCは570%にまで増加した。これに対して治療群ではそのいずれも有意に抑制された。虚血中のadenosineの値は治療群で増加傾向にあった。再灌流後もCT群と比し、治療群のATP値はより急速に回復した。

肝組織cyclic AMP濃度(肝組織中cyclic AMP濃度をRIAにて測定) : 再灌流直後、CT群では肝組織cyclic AMP濃度は低下したが、治療群では低下が抑制される傾向にあった。特にCT群の再灌流後15分値は 221 ± 22 pmol/gに対してhigh-DYP群、medium-DYP群、low-DYP群それぞれ 362 ± 16 , 348 ± 19 , 320 ± 38 pmol/gと有意差を認めた。

浸潤多核好中球数(hematoxylin-eosin染色を施行し、肝細胞1000個当たりの多核好中球数を算出) : CT群での再灌流後1時間での浸潤多核好中球数は 63.6 ± 7.1 であり、治療群ではlow-DYP群を除いて、high-DYP群、medium-DYP群の再灌流後1時間での浸潤多核好中球数がそれぞれ 44.6 ± 4.2 , 41.0 ± 4.1 と有意に低値を示した。

肝静脈Thromboxane (TX)B2、6-keto PGF1 α 濃度(CT群、medium-DYP群のみ肝静脈中のTXB2、6-keto PGF1 α をELISAにて測定) : CT群でのTXB2濃度は再灌流にて 0.12 ± 0.02 ng/mlから 1.33 ± 0.32 ng/mlまで急上昇し、その後も高値を維持するのに対しmedium-DYP群では再灌流早期のTXB2濃度の上昇が有意に抑制された。また6-keto PGF1 α 濃度は両群とも再灌流直後に急上昇を示し、再灌流早期に両群間に有意な差は認めなかった。

末梢血血小板数(CT群、medium-DYP群のみ測定) : 2時間の虚血にて血小板数は再灌流後徐々に低下するが、medium-DYP群ではほとんど低下することなく推移した。

<考察>DYPの肝虚血再灌流障害に対する保護作用として、

1. 虚血中にATP再合成の基質としてのadenosine濃度を上昇せしめ、cyclic AMP濃度の減少を抑制することによりATP消費を抑制し、その結果虚血中のエネルギー代謝を保持さらには、再灌流後のエネルギー代謝の回復を促進させた。
2. 虚血肝におけるpurine catabolitesの産生を抑制することによりxanthine oxidase系によるsuperoxide anionの産生を抑制し、oxidative stressに対して内皮細胞を保護した。
3. 組織中のcyclic AMP濃度の減少を抑制することにより、肝類洞の収縮を抑制、さらに再灌流後の血小板凝集を抑制し、かつ再灌流後早期のTXB2の産生を抑制したことにより、肝組織血流を増加させ、微小循環障害を軽減した。
4. 虚血肝への多核好中球の浸潤を抑制することにより細胞保護効果を発揮し得た。

<結論>ジピリダモールはビーグル犬を用いた2時間の完全肝虚血モデルにおいて、肝の虚血再灌流障害に対して強力な保護作用を示した。特に投与量が0.1mg/kgであったmedium-DYP群では2週間生存率を100%まで改善させ得た。ジピリダモールは肝切除術、肝移植術において安全性を高める効果を十分に期待できる。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 安 田 慶 秀
副 査 教 授 浅 香 正 博
副 査 教 授 藤 堂 省

学 位 論 文 題 名

Dipyridamole protects the liver against warm ischemia and reperfusion injury

(肝温虚血再灌流障害に対するジピリダモールの保護作用)

肝虚血・再灌流障害は肝切除術、肝移植術において術後経過に多大な影響を及ぼしうる。adenosine triphosphate (ATP)の代謝産物の一つである adenosine は、血管拡張作用、組織血流増加作用にて虚血・再灌流障害を軽減する。ジピリダモール(DYP)は nucleoside transport inhibitor の一つとして組織中の adenosine 濃度を高める一方、phosphodiesterase inhibitor としても虚血・再灌流障害を軽減する。臨床に即したモデルとしてビーグル犬を使った2時間の完全肝虚血モデルを用い、DYP を3doseに分け、DYPの肝の温虚血再灌流障害に対する保護作用を検討した。dipyridamoleは肝組織血流量を増大、肝酵素の逸脱を抑制し、肝組織内ATP量、adenosine量を増大、purine catabolites産生量を減少、cyclic AMP量の減少を抑制、さらには浸潤好中球数を減少させた。特にmedium-DYP群は上記効果以外にも、再灌流後の血小板凝集を抑制し、かつ再灌流後早期のTXB₂の産生を抑制したことにより、肝組織血流を増加させ、微小循環障害を軽減した。その結果、副作用が生じることなく2週間生存率を著明に改善した。一方、high-DYP群では過剰な組織内 adenosine 増大により血圧低下等の副作用が生じ、結果的に2週間生存率を改善させることはできなかった。low-DYP群は不十分な adenosine 増大効果にて2週間生存率を改善させることはできなかった。DYPの肝虚血再灌流障害に対する保護作用の機序は、Nucleoside transport inhibitorとして、(1)虚血中にATP再合成の基質としての adenosine 濃度を上昇せしめ、その結果虚血中のエネルギー代謝を保持さらには、再灌流後のエネルギー代謝の回復を促進させる。(2)虚血肝における purine catabolites の産生を抑制することにより xanthine oxidase系による superoxide anionの産生を抑制し、oxidative stressを軽減させる。(3)Adenosine A₂ receptorを介して微小循環を改善させる。また phosphodiesterase inhibitorとして、(1)cyclic AMP濃度の減少を抑制することによりATP消費を抑制する。(2)肝類洞の収縮を抑制する。(3)再灌流後の血小板凝集を抑制し、かつ再灌流後早期のTXB₂の産生を抑制することにより、肝組織血流を増加させ、微小循環障害

を軽減する。(4)肝への好中球浸潤を抑制し、elastase, protease 等による細胞障害を軽減すること、などによるものと思われた。以上の効果から判断し、ジピリダモールは臨床における肝切除術、肝移植術での安全性を高める効果を十分に期待できると考えられた。

公開發表後、副査の浅香教授より 1) 本実験における薬剤の dose 設定、2) 活性酸素抑制以外の adenosine の効果発現の機序、3) 臨床における本薬剤の具体的使用方法についての質問があった。それに対して、1) 犬の実験で 0.2mg/kg の dose で冠血管拡張作用があり、 $1 \times 10^{-7} M$ の濃度で内因性 adenosine の増加と冠血管の血流増加を認めたとの報告があることより preliminary で 0.1mg/kg の投与量を試したところ、肝で $1 \times 10^{-7} M$ の濃度であったことから、0.05, 0.1, 0.25 の 3 つの dose を施行したこと、2) ATP 再合成の基質としてエネルギー代謝を保持し、また、adenosine A2 receptor を介して微小循環を改善させたこと、3) 肝切除術時の使用(pharmacologic ischemic preconditioning)、脂肪肝に対する肝切除術時の使用、脳死肝移植でのドナー手術時、移植後の微小循環障害予防等の回答があった。次に主査の安田教授より、1) high dose 群での副作用の機序、2) 他臓器での adenosine、nucleoside transport inhibitor の効果、3) 保存液での可能性についての質問があった。それに対して、1) 過剰な adenosine が細胞内に増大したことによる apoptosis の誘導、AMP \rightarrow IMP への代謝経路増大による xanthine oxidase 系での superoxide anion の産生増加、再灌流後の極端な血圧低下による臓器の虚血状態の延長などが挙げられること、2) 腎では A1 receptor により輸入細動脈血流低下が起こる結果 GFR の低下を引き起こし、心では A1 receptor で心筋保護効果をもたらすこと、血管平滑筋、脳・脊髄では A2 receptor により組織血流増大させるなど臓器毎に adenosine receptor の distribution に違いがあり、その効果も一様ではないこと、3) adenosine 自体の保存液での効果が懐疑的であることから保存液への応用は期待できないこと等の回答がなされた。最後に副査の藤堂教授より adenosine、nucleoside transport inhibitor の効果は bell shape であり治療域が狭い反面、preconditioning 等臨床応用が期待できるとの追加のコメントがあった。

本論文は、ジピリダモールが肝の虚血再灌流障害に対して強力な保護作用を示した世界で初めての報告であり高く評価され、肝切除術、肝移植術での臨床応用されることが期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、申請者が博士(医学)の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。