<原 著>

肝温虚血再灌流障害のミクロソーム型肝シトクロム

P-450モノオキシゲナーゼ系に及ぼす影響

出石 邦彦 國土 泰孝 若林 久男
壺内泰二郎 前場 隆志 前田 肇*

要 旨：肝温虚血がミクロソーム型肝シトクロム P-450モノオキシゲナーゼ系に及ぼす影響について、肝温虚血前、虚血1時間後、再灌流2, 24時間、3, 6, 10日後に検討した。血清 GPT 値は、再灌流後2時間で著増を示し、以後速やかに正常レベルまで回復した。肝シトクロム P-450含量は、再灌流後24時間に最低となり10日後に回復した。一方、シトクロム b5含量は1時間の温虚血で有意に増加したが、再灌流後2時間で速やかに虚血前のレベルに戻り、以後変化を示さなかった。ミクロソーム型肝シトクロム P-450モノオキシゲナーゼ系によるリドカイン、アミノピリン、パラニトロアニソール代謝活性は、再灌流後24時間で最低となり、10日後に虚血前値まで回復した。以上より虚血再灌流によるミクロソーム型肝シトクロム P-450モノオキシゲナーゼ系の薬物代謝は、肝逸脱酵素である GPT より長期間にわたり障害されることが示唆された。

索引用語： 温虚血 再灌流障害 シトクロム P-450

はじめに

肝臓のシトクロム P-450モノオキシゲナーゼ系は細胞内の局在場所によりミクロソーム型、ミトコンドリア型、細胞質型に分類される。これらのシトクロム P-450モノオキシゲナーゼ系はシトクロム P-450、シトクロム b5、NADPH-cytochrome P-450 reductase 及び NADH-cytochrome b5 reductase の4つの酵素によって構成され、活性胆汁酸の生合成、ビタミン D₃の活性化、レチノイン酸の生合成、各種 xenobiotics の代謝を行っている¹⁾。薬物は肝臓において酸化、還元、加水分解等を受け、その後さまざまな抱合により排泄されていくが²⁾、薬物代謝酵素系の約90%は肝のミクロソームに局在しており、その反応としては酸化反応がよく知られている。それらの酸化反応はミクロソーム型肝シトクロム P-450モノオキシゲナーゼ系による、芳香環やアルキル側鎖の水酸化や脱アミノ化そして N-及び O-脱アルキル化等³⁾に分類される¹⁾。

アミノピリン、リドカインなどもミクロソーム型肝

シトクロム P-450モノオキシゲナーゼ系により代謝される薬物の1つであり、今日、肝移植時の、あるいは肝切除時の肝機能評価として用いられている^{3,4)}。Pringle 法を用いた肝臓切除術後、あるいは肝臓移植後など虚血をとまなう場合の手術において薬物代謝活性は肝機能評価の1つとして用いられているが、虚血再灌流障害がミクロソーム型肝シトクロム P-450モノオキシゲナーゼ系に及ぼす影響について in vivo における詳細な比較検討の報告はない。

今回我々は、温虚血再灌流障害がミクロソーム型肝シトクロム P-450モノオキシゲナーゼ系の構成成分であるシトクロム P-450とシトクロム b5の含量や、ミクロソーム型肝シトクロム P-450モノオキシゲナーゼ系の活性であり、臨床上、肝機能評価として用いられているアミノピリン、リドカインなどの薬物代謝活性に与える影響を、ラットを用いて検討した。

Kunihiko IZUSHI, Yasutaka KOKUDO, Hisao WAKABAYASHI, Taijiro TUBOUCHI, Takashi MAEBA and Hajime MAETA*

*香川医科大学第1外科

<受付日1995年2月15日>

方 法

1. 実験動物および実験群

200～300g の Sprague-Dawley 系雄性ラットを使用した。本学動物実験施設において12時間明暗サイクルならびに温度24°Cの調節飼育下で、餌、水の自由摂取下にて飼育した。

ペントバルビタールの腹腔内投与にて麻酔を行い、開腹した。ヘパリン100U/100g body weight を経静脈的に投与し、腸管の鬱血を防ぐためにシリコンチューブ(内径:1mm)を用い、門脈一頸静脈シャントをおいた。肝門部において血管クリップを用いて門脈、肝動脈、総胆管をクランプし、1時間後再灌流し、閉腹した。虚血前、虚血後1時間、再灌流後2, 24時間、3, 6, 10日後の時点で再開腹し、肝臓を摘出して肝ミクロゾームを調整し、シトクロム P-450モノオキシゲナーゼ系に及ぼす影響について検討をした(n=6)。また、門脈一頸静脈シャントのシトクロム P-450モノオキシゲナーゼ系に及ぼす影響を除外するために、虚血再灌流を行わず門脈一頸静脈シャントのみを行ったラットについて再灌流後24時間、3日後の時点で再開腹し、肝ミクロゾームを調整した(n=5)。

2. 血液生化学的検査

虚血前、虚血後1時間、再灌流2, 24時間、3, 6, 10日後の時点で再開腹を行う時に採血し、血清 GPT 値を UV 法にて測定した。

3. ミクロゾームの調整

ラット肝臓をホモジネートした後、超遠心によりミクロゾームを分離した⁵⁾。

4. 蛋白定量

蛋白定量は Bradford らの方法により⁶⁾、蛋白定量キット (Bio-Rad Lab., Hercules, CA) を用いて測定した。

5. シトクロム P-450とシトクロム b5含量の定量

シトクロム P-450とシトクロム b5含量は分光学的に大村、佐藤らの方法⁷⁾にて測定した。

6. 薬物代謝活性

(肝シトクロム P-450モノオキシゲナーゼ系によるアミノピリン代謝活性、パラニトロアニソール代謝活性、リドカイン代謝活性の測定)

肝シトクロム P-450モノオキシゲナーゼ系によるアミノピリン代謝活性、パラニトロアニソール代謝活性、リドカイン代謝活性は、aminopyrine *N*-demethylase 活性、*p*-nitroanisole *O*-demethylase 活性、lidocaine *N*-deethylase 活性として測定した。

a) aminopyrine *N*-demethylase 活性

Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.4) に肝ミクロゾームを懸濁し (0.5～1.0mg タンパク質) NADPH 生成系 (NADP 0.5mM, Glc-6-P 5.0mM, Mg²⁺ 5.0mM, Glu-6-PDH 1.5U) を加えた。5分間37°Cでインキュベートし、アミノピリン(2mM)を加え反応を開始した。15分間37°Cでインキュベートした後、10%TCAにて反応を止め、2500rpm, 10分間遠心後、上清を取り、Nash らの方法⁸⁾にて測定した。

b) *p*-nitroanisole *O*-demethylase 活性

50mM potassium phosphate 緩衝液 (pH 7.4) に肝ミクロゾームを懸濁し (0.5～1.0mg タンパク質) NADPH 生成系を加えた。5分間37°Cでインキュベートし、パラニトロアニソール (1mM) を加え反応を開始した。15分間37°Cでインキュベートした後、等量の 0.5M NaOH にて反応を止め、10,500rpm, 30分間遠心後、上清を取り、Netter らの方法⁹⁾にて生成した *p*-aminophenol を測定した。

c) lidocaine *N*-deethylase 活性

100mM potassium phosphate 緩衝液 (pH 7.4) に肝ミクロゾームを懸濁し (0.125～0.25mg タンパク質) NADPH 生成系を加えた。5分間37°Cでインキュベートした後、リドカイン (7mM) を加え反応を開始した。15分間37°Cでインキュベートした後、60%の HClO₄ にて反応を止め、10,000rpm, 5分間遠心後、上清を取り、生成物である monoethylglycinexylidide (MEGX) を high performance liquid chromatography (HPLC) を用いて測定した¹⁰⁾。HPLC system (Model 510, 712, 484, Waters Co., Milford, Mass.) には Nucleosil 5-C-18のカラム (Wako Pure Chem, Osaka, Japan) を用い、流量1ml/min で4.2mM acetic acid, 1.7mM *n*-butylamine, 10%acetonitrile の溶液により、205nm で検出分析した。

7. 統計

各測定値は、平均±標準偏差で示し、統計学的検定は、ANOVA 検定を行い $p < 0.05$ を有意差ありとした。

結 果

血清 GPT 値の変化

1時間の温虚血後血清 GPT 値は 37.3 ± 8.4 (U/L) となり、虚血前の 22.5 ± 3.3 (U/L) と比べて有意な上昇が見られた。一方、再灌流後 GPT 値は2時間で著増を示し、 $4,516.7 \pm 1,466.2$ (U/L) となり、以後速やかにその値は低下し、3日後には虚血前のレベルに回

復した (Fig. 1).

シトクロム P-450, シトクロム b5 含量の変化

シトクロム P-450 含量は 1 時間の温虚血後、再灌流後早期の 2 時間後では虚血前値の 0.904 ± 0.031 (nmol/mg protein) と比べ有意な減少をしなかったが、再灌流後徐々に減少し、24 時間後、3 日後、6 日後にはそれぞれ 0.700 ± 0.085 , 0.761 ± 0.123 , 0.778 ± 0.096 (nmol/mg protein) と有意な減少を示し、10 日後に虚血前値に回復した (Fig. 2)。一方、シトクロム b5 含量は 1 時間の温虚血で虚血前の 0.46 ± 0.04 (nmol/mg protein) と比べて有意に増加し 0.51 ± 0.03 (nmol/mg protein) となったが、再灌流後 2 時間で速やかに虚血前のレベルに戻り、以後変化しなかった (Table 1)。

Fig. 1 Changes of GPT activity during and after one-hour warm ischemia. Vertical bars indicate standard deviations. Shaded area represents warm ischemia. *, $p < 0.05$ vs. control by one-way analysis of variance.

Fig. 2 Concentrations of cytochromes P-450 during and after one-hour warm ischemia. Vertical bars indicate standard deviations. Shaded area represents warm ischemia. *, $p < 0.05$ vs. control by one-way analysis of variance.

Fig. 3 Lidocaine *N*-deethylase activity during and after one-hour warm ischemia. Vertical bars indicate standard deviations. Shaded area represents warm ischemia. *, $p < 0.05$ vs. control by one-way analysis of variance.

Table Changes in concentration of Cytochrome b5 and activities of aminopyrine *N*-demethylase and *p*-nitroanisole *O*-demethylase during and after one-hour warm ischemia.

	A	B	C
Before ischemia	0.455 ± 0.035	4.58 ± 0.34	1.83 ± 0.22
After 1 hour ischemia	$0.513 \pm 0.029^*$	4.76 ± 0.48	1.78 ± 0.25
2 hours after reperfusion	0.482 ± 0.061	4.63 ± 0.40	1.66 ± 0.11
24 hours after reperfusion	0.437 ± 0.030	$3.50 \pm 0.32^*$	$1.56 \pm 0.11^*$
3 days after reperfusion	0.442 ± 0.028	$3.84 \pm 0.34^*$	$1.59 \pm 0.16^*$
6 days after reperfusion	0.455 ± 0.037	$3.94 \pm 0.34^*$	1.73 ± 0.19
10 days after reperfusion	0.412 ± 0.033	4.45 ± 0.53	1.75 ± 0.20

A : Cytochrome b5 concentration (nmol/mg protein)

B : Aminopyrine *N*-demethylase activity (nmol/mg protein/min)

C : *p*-nitroanisole *O*-demethylase activity (nmol/mg protein/min)

*, $p < 0.05$ vs. before ischemia by one-way analysis of variance.

Fig. 4 Cytochrome P-450 concentration and aminopyrine N-demethylase activity after one-hour portojugular bypass.

薬物代謝活性

リドカイン、アミノピリン、パラニトロアニソールの3剤の薬物代謝活性は1時間の温虚血後、有意な変化を示さなかった。一方、再灌流後、薬物代謝活性は徐々に低下し、2時間後には有意な低下を示さなかったものの、24時間後ではそれぞれ 0.97 ± 0.21 , 3.50 ± 0.32 , 1.56 ± 0.11 (nmol/mg protein/min), また3日後には 1.35 ± 0.37 , 3.84 ± 0.34 , 1.59 ± 0.16 (nmol/mg protein/min) となり、虚血前値の 2.25 ± 0.33 , 4.58 ± 0.34 , 1.83 ± 0.22 (nmol/mg protein/min) と比べて有意な低下が見られた。虚血再灌流後6日目においても、リドカイン、アミノピリン代謝活性はその回復が遅延し、虚血前値と比べて有意な減少を示した。しかしすべての活性は10日後には虚血前のレベルに回復した (Fig. 3, Table 1)。

門脈-頸静脈シャント術のシトクロム P-450モノオキシゲナーゼ系に及ぼす影響

門脈-頸静脈シャント術のみをおこなったラットのシトクロム P-450、シトクロム b5含量およびアミノピリン代謝活性において、シャント前と、シャント後1, 3日目の間には有意差を認められず、門脈-頸静脈シャント術は肝シトクロム P-450モノオキシゲナーゼ系に影響を与えなかった (Fig. 4)。

考 察

今日、末期肝臓疾患に対する肝臓移植術は、確立された治療法として認められ、その成績は近年上昇している。肝臓移植の成否はドナー肝の状態に大きく関わっており、これにはドナー肝に及ぼされる温虚血、冷虚血障害が大きく関与している。

アミノピリン、リドカイン、アンチピリンなどを用いた薬物負荷試験は、従来より肝機能評価の1つとして行われてきた。特に近年、このリドカイン負荷試験は、肝臓移植前後の肝機能の有用な指標として用いられている^{3,10,11)}。リドカインはミクロソーム型シトクロム P-450モノオキシゲナーゼ系により deethylation を受け、monoethylglycinexylidide (MEGX) に代謝される¹²⁾。リドカイン負荷試験は、リドカイン投与後この代謝産物である MEGX を、一定時間後に測定することにより肝機能評価を得る検査である。

Oellerich らはこのリドカイン負荷試験を肝移植を待機中の recipient 候補に施行し、MEGX 濃度の15分値は、移植を受けられない場合の120日後の生存率と関連しており、ICG や、他の肝機能評価法より末期肝硬変患者の予後推定に有用であったと述べている¹¹⁾。さらに、donor 肝の評価にも応用し、MEGX 濃度の15分値が $90 \mu\text{g/l}$ 以上の場合は graft の viability は良好で生着率が高かったと述べており、肝移植の分野での有用性を報告している³⁾。

リドカインの代謝は、様々な要因による肝障害によって影響を受け¹³⁾、薬物代謝能は様々な肝疾患において障害されることが、in vivo において数多く報告されており¹³⁾、このメカニズムについて様々な議論がなされている。この原因として肝血流の低下³⁾、およびミクロソーム型肝シトクロム P-450モノオキシゲナーゼ系における薬物代謝活性の低下が指摘されている¹⁴⁾。しかし、肝虚血再灌流障害時の薬物代謝活性の低下よりみた肝ミクロソームへの障害に関する報告はまだ少ない。

虚血再灌流による肝障害を端的に表わしているのが、血中への GPT の著明な逸脱である。GPT は虚血前に比べ1,000倍以上の高値を示し、重度の肝障害が組織にも及んでいることを示している。このような肝障害は肝ミクロソームの膜タンパクにも起こっているものと思われる。

ミクロソーム型肝シトクロム P-450モノオキシゲナーゼ系によるアミノピリン、パラニトロアニソールやリドカインなどの薬物代謝活性の低下は虚血時よりも再灌流によって著しく抑制を受けた。とりわけ、リドカインは温虚血、再還流による影響を最も強く受けた。これらの薬物代謝活性の低下はシトクロム P-450 の含量の低下とよく相関していた。

一般に、シトクロム P-450は小葉中心部に最も多く存在しているといわれており¹⁵⁾、また肝臓の虚血再還

流にともなう障害は、門脈周辺域に強く現われると言われている¹⁶⁾。我々の結果は、虚血再灌流障害が、門脈周辺域から小葉中心部にまで及んだことを示すものと考えられる。

このような虚血再灌流が細胞内器官に及ぼす影響について、丸林らのミトコンドリア機能についての報告がある¹⁷⁾。彼等はその中で虚血再灌流により過酸化脂質の生成が起こりその結果、ミトコンドリア機能の低下が起こることを報告している。我々の実験においても、同様の虚血再灌流による膜脂質の変化がミクロソームに起こっているものと思われる。虚血再灌流によって、膜中の過酸化脂質の生成がシトクロム P-450 の変性をもたらすという報告がある¹⁸⁾。また、シトクロム P-450 のような膜タンパクの安定化に膜脂質である phospholipid は重要であるとされ、虚血再灌流後には膜中の phospholipid の減少が起こると報告されており¹⁹⁾、phospholipid の減少もシトクロム P-450 含量の減少の 1 つの原因と考えられる。これら膜中の過酸化脂質の生成や phospholipid の減少がシトクロム P-450 の変性をもたらす、アミノピリン、パラニトロアニソールやリドカインなどの薬物代謝活性の低下をもたらしたものと考えられる。

しかし、逸脱酵素の上昇は再灌流後、約 2 時間で最も影響を受け、3 日後に正常に回復したのに対し、シトクロム P-450 モノオキシゲナーゼ系は、再灌流後、約 24 時間で最も影響を受け 10 日後に虚血前値に回復した。この結果から虚血再灌流障害は、肝ミクロソームの膜タンパクであるシトクロム P-450 モノオキシゲナーゼ系に対しては、比較的後期に起こり、再灌流後長い期間続くものと考えられた。また菅沢らは、ラット肝部分切除モデルを用いてアミノピリンの代謝能の回復には約 4 週間を要することを報告しており²⁰⁾、我々と同様に肝ミクロソーム機能低下は他の肝機能評価と比べ遅延することを示していた。

以上より、Pringle 法を用いた肝臓切除術後、あるいは肝臓移植後など虚血再灌流操作をともなう場合には、再灌流後、薬物代謝能の低下が我々の想像以上に長期間続くものと思われ、虚血後の薬物投与量について、注意を払わなければならないと思われた。

結 語

虚血再灌流障害による逸脱酵素の上昇は再灌流後、約 2 時間で最も強くなり、3 日後に正常に戻ったのに対し、シトクロム P-450 含量は、再灌流後、約 24 時間で最も減少し、10 日後で虚血前値に回復した。アミノピ

リン、パラニトロアニソール、リドカイン代謝活性も同様な傾向を示した。以上の結果より、虚血再灌流のミクロソーム型肝シトクロム P-450 モノオキシゲナーゼ系への障害は、GPT の回復よりかなり遅延することが示唆された。

文 献

- 1) 市川佳幸：シトクロム P-450 の機能と構造。蛋
核酵 32 : 783—751, 1988
- 2) Brodie BB, Gilette JR, La Du BN : Enzymatic
metabolism of drugs and other foreign com-
pounds. *Ann Rev Biochem* 27 : 427—454, 1958
- 3) Oellerich M, Burdelski M, Ringe B, et al :
Lidocaine metabolite formation as measure of
pre-transplant liver function. *Lancet* 25 : 640—
642, 1989
- 4) Gill RA, Goodman MW, Golfus GR, et al :
Aminopyrine breath test predicts surgical risk
for patients with liver disease. *Ann Surg* 198 :
701—704, 1983
- 5) Mitoma C, Posner HS, Reitz HC, et al : En-
zymatic hydroxylation of aromatic compounds.
Arch Biochem Biophys 61 : 431—441, 1956
- 6) Bradford MM : A rapid and sensitive method
for the quantitation of microgram quantities of
protein utilizing the principle of protein-dye
binding. *Anal Biochem* 72 : 248—254, 1976
- 7) Omura T, Sato R : A new cytochrome in liver
microsome. *J Biol Chem* 237 : 1375—1376, 1962
- 8) Nash T : Colorimetric estimation of formalde-
hyde by means of the Hantzsch reaction. *Bio-
chem J* 55 : 416—421, 1953
- 9) Netter KJ, Seidel G : An adaptively stimulat-
ed o-demethylating system in rat liver mi-
crosomes and its system in rat liver microsomes
and its kinetic properties. *J Pharmacol Exp
Ther* 146 : 61—65, 1964
- 10) Oellerich M, Burdelski M, Lautz H, et al :
Lidocaine metabolite formation as a measure
of liver function in patients with cirrhosis. *Ther
Drug Monit* 12 : 219—226, 1990
- 11) Chindavijak B, Belpaire FM, Bogaert MG :
In-vitro biotransformation of antipyrine and
propranolol in the liver of rats with turpentine-
induced inflammation. *J Pharm Pharmacol* 39 :
883—886, 1987
- 12) Bargetzi MJ, Aoyama T, Gonzalez F :

- Lidocaine metabolism in human liver microsomes by cytochrome P450III A4. Clin Pharmacol Ther 46 : 521—527, 1989
- 13) McLean TS, Wilkinson GR, Jonson RF, et al : Effect of acute viral hepatitis on the disposition and elimination of meperidine. Gastroenterology 68 : 775—780, 1975
 - 14) Schenker S, Hoyumpa AM, Wilkinson GR : The effect of parenchymal liver disease on the disposition and elimination of sedatives and analgesics. Med Clin North Am 59 : 887—896, 1975
 - 15) Traber PG, Chianale J, Gumucio JJ : Physiologic significance and regulation of hepatocellular heterogeneity. Gastroenterology 95 : 1130—1143, 1978
 - 16) Lemasters JJ, Thurman RG : Centrilobular injury following hypoxia in isolated, perfused rat liver. Science 213 : 661—663, 1981
 - 17) Marubayashi S, Dohi K, Ochi K, et al : Role of free radicals in ischemic rat liver cell injury : Prevention of damage by α -tocopherol administration. Surgery 99 : 184—192, 1986
 - 18) 江頭 亨, 永井敬之, 金馬義平, 他 : 実験的ラット肝臓の虚血—再循環モデルにおける肝障害. 日薬理誌 97 : 339—350, 1991
 - 19) Chien KR, Abrams J, Serooni A, et al : Accelerated phospholipid degradation and associated membrane dysfunction in irreversible, ischemic liver cell injury. J Biol Chem 253 : 4809—4817, 1978
 - 20) 菅沢寛健, 宮崎 勝, 神野弥生, 他 : D-ガラクトサミン障害肝, 肝切除におけるアミノピリン呼吸テストによる肝 microsomal functional mass 測定の意義. 日消病会誌 82 : 2049—2057, 1985

Prolonged effects of warm ischemia and reperfusion on the hepatic microsomal cytochrome P-450 monooxygenase system

Kunihiko IZUSHI, Yasutaka KOKUDO, Hisao WAKABAYASHI,
Taijiro TSUBOUCHI, Takashi MAEBA and Hajime MAETA*

The effect of warm ischemia and reperfusion on the hepatic microsomal Cytochrome P-450 monooxygenase system was examined. Serum GPT decreased to control level on 3 days after reperfusion. Cytochrome P-450 concentration decreased at 24 hours after reperfusion and recovered to control level on 10 days after reperfusion. Activities of lidocaine *N*-deethylase, aminopyrine *N*-demethylase and *p*-nitroanisole *O*-demethylase showed significant decrease on 1 and 3 days after reperfusion and recovered to control level on 10 days after reperfusion. The activities in hepatic microsomal cytochrome P-450 monooxygenase system had been inhibited during 10 days after reperfusion.

* First Department of Surgery, Kagawa Medical School (Kagawa)