

# プロスタグランジンE1添加冷保存前灌流が心停止下 摘出肝グラフトの温阻血再灌流障害に及ぼす効果つ いて

著者	原 康之
学位授与機関	Tohoku University
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10097/53858">http://hdl.handle.net/10097/53858</a>

博士論文

プロスタグランジン E1 添加冷保存前灌流が  
心停止下摘出肝グラフトの温阻血再灌流障害に及ぼす効果について

東北大学大学院医学系研究科医科学専攻  
外科病態学講座先進外科学分野  
原 康之

## 目次

1. 要約	.....	1
2. 研究背景	.....	3
3. 研究目的	.....	7
4. 研究方法	.....	8
5. 研究結果	.....	1 6
6. 考察	.....	2 0
7. 結論	.....	2 8
8. 文献	.....	2 9
9. 図	.....	3 9
1 0. 表	.....	4 8
1 1. Figure legend	.....	4 9

## 1. 要約

【目的】 常温酸素化バッファーによる 30 分間の冷保存前灌流（前灌流）が、心停止下摘出肝グラフトにおいてエネルギーステータスを改善し、温阻血再灌流障害を軽減することが報告されている。しかしながら、前灌流のみでは心拍動下摘出肝グラフトのレベルまでは胆汁産生能の回復や細胞障害の軽減は得られていない。本研究では更なる改善を目的に、様々な肝保護作用があるとされるプロスタグランジン E1（PGE1）の前灌流液への添加効果を、ミトコンドリア機能と細胞死の検討を中心に行なった。

【方法】ラット肝を用い ex vivo の灌流実験を行った。温阻血群では死戦期を経て 30 分の温阻血後直ちに 6 時間冷保存し 1 時間再灌流した。前灌流群では温阻血肝摘出後に 30 分間常温酸素化バッファーで灌流し冷保存した。PGE1 群では前灌流液に PGE1（10ng/ml）を添加した。各群の門脈流量・胆汁産生量・灌流液中肝逸脱酵素・灌流液中炎症性サイトカイン・ミトコンドリア機能・アポトーシス関連蛋白の発現・JNK 活性・病理組織学的所見を比較検討した。

【結果】再灌流時の胆汁産生量・灌流液中の肝逸脱酵素は前灌流群で改善傾向を示し、PGE1 群で有意に改善した。又、PGE1 群では再灌流液中の TNF- $\alpha$  が有意に減少した。再灌流後のプロトン ATPase 活性は前灌流群と PGE1 群で改善傾向を示した。ミトコンドリアの膨潤、及びミトコンドリアからのチトクローム c の放出は前灌流群で抑制傾向を示し、PGE1 群ではどちらも有意に抑制された。細胞死関連蛋白の検討では、温阻血群でミトコンドリアの Bcl-2 の発現が有意に低下し、PGE1 群で細胞質中の JNK の活

性と Bax の細胞質からミトコンドリアへの移行が有意に抑えられていた。病理組織学的検討では、PGE1 群でネクロシス面積比率と TUNEL 陽性細胞数の有意な減少を認め、開存類洞腔面積も温阻血群に比べ有意に改善していた。

**【結論】** 冷保存前灌流のみでも組織・細胞障害は改善傾向を示したが、PGE1 を添加することで心拍動下摘出肝グラフトと同程度まで有意に改善した。PGE1 による微小循環の改善とミトコンドリアを介した細胞死（ネクロシス/アポトーシス）の抑制がその機序であると考えられた。PGE1 添加冷保存前灌流は、心停止下摘出肝グラフトを用いた肝移植において有効な一手段となることが示唆された。

## 2. 研究背景

肝移植は様々な末期肝疾患や急性肝不全などに対する治療法として確立されている。一方で、移植適応の拡大とそれに伴う希望患者数の増加により、世界的にドナー不足と移植待機中の死亡数の増加が問題となっている。これらの問題解決の選択肢のひとつとして、心停止ドナー（non-heart-beating donor：NHBD）からの肝移植が検討されている。

NHBD は Maastricht 分類<sup>1)</sup>により、病院到着時に死亡状態であったもの (category 1)、心肺蘇生が成功しなかったもの (category 2)、生命維持処置の中断 (category 3)、脳死状態下での心停止 (category 4) に分類されており、category 1、2 が uncontrolled NHBD (UNHBD)、category 3、4 が controlled NHBD (CNHBD) とされている。CNHBD からの肝グラフトは摘出までに時間的余裕があるため、グラフトの温阻血時間をコントロールして短縮することが可能である<sup>2)</sup>。しかし、心拍動下ドナー (heart-beating donor：HBD) からの移植と比べて primary non-function (PNF：移植後早期機能不全) や胆管合併症、再移植の頻度が高いとされている<sup>3、4)</sup>。一方、UNHBD は最も多くのドナー数の増加が期待できるドナープールであると考えられているが、移植後合併症が CNHBD より高率に起こることから実際に肝移植を行った報告は CNHBD よりも更に少ないのが現状である<sup>5-7)</sup>。

心停止下摘出肝グラフトの第一の問題点は、心停止後から冷保存液による灌流までの間の温阻血障害である。温阻血後の低酸素状態のため細胞内の ATP が枯渇し、それ

に伴いATPase 依存性ポンプの機能不全から肝細胞の膨化や類洞内皮の脱落を来し、類洞の狭小化から再灌流後の微小循環障害を引き起こす原因となる<sup>2)</sup>。第二の問題点は、移植後の血流再開時に起こる虚血再灌流障害である。つまり、再灌流時のクッパー細胞の活性化に伴う活性酸素種 (reactive oxygen species : ROS) やサイトカインの放出、好中球や補体の活性化などにより細胞障害が引き起こされる<sup>8-10)</sup>。心停止下摘出肝グラフトの移植では、これら微小循環障害と再灌流障害の相互作用が重度の機能低下をもたらす要因と考えられている。

このような背景から、温阻血再灌流障害を克服するために様々な試みが検討されている。心停止前のドナーへの処置として、薬剤投与によるクッパー細胞の機能抑制<sup>11)</sup>、クッパー細胞除去<sup>12)</sup>、選択的 IL-1 $\beta$ ・TNF- $\alpha$  産生阻害剤の投与<sup>13)</sup>、free radical scavenger の投与<sup>14)</sup>など、心停止後の処置としては cardio-pulmonary bypass による re-circulation<sup>5, 15)</sup>や冷保存中や冷保存後の machine perfusion<sup>16-18)</sup>などの有効性が報告されている。しかしながら、UNHBD からの移植の場合、病院到着時死亡例や蘇生失敗例から移植臓器摘出を行うため、心停止前にドナーへの薬剤投与をはじめとする処置を行うことは、薬理効果を発揮するまでの時間的制約と、蘇生を行いながら臓器移植のための準備を行う倫理的問題点がある。又、灌流保存に関しては器械準備・操作における技術的問題・制約もあり臨床応用には多くの課題がある。

これら臨床的問題、技術的問題・制約を克服する方法として、冷保存前に短時間 (30 分間) 常温酸素化バッファーで灌流 (前灌流) する方法が考案され、その有効性が検

討されている<sup>19, 20)</sup>。移植後のグラフトの viability とエネルギーステイタスは関連するため<sup>21, 22)</sup>、冷保存前にグラフトを酸素化させエネルギーステイタスを回復させることで、最終的に温阻血再灌流障害を克服できるのではないかという考えに基づいたものである。又、この方法であれば、酸素含有灌流液をバッグに事前に準備し保温しておけば、ドネーション時に特別な器械を要せず、心停止後 in situ あるいは ex vivo で肝臓を灌流できる。この前灌流による温阻血を被った肝臓の酸素化は、肝組織中のエネルギーステイタス (ATP レベル・エネルギーチャージ) のみならず、再灌流時の胆汁産生能の改善やアポトーシスの減少、MAPKs 活性の抑制をもたらしたと報告されている。しかしながら前灌流のみでは心拍動下ドナーからのグラフトに比べ門脈流量や胆汁産生量が依然として低く、肝細胞障害 (肝逸脱酵素の上昇)・炎症性サイトカインの産出・アポトーシス細胞数及びネクロシス領域も高値を示した。そこで、前灌流には様々な薬剤を前灌流液に添加できるという利点を利用し、Iwane らは内因性の抗酸化物質であるビリベルジンを<sup>20)</sup>、Kobayashi らは free radical scavenger であるエダラボンを<sup>19)</sup>前灌流液へ添加しその有効性を検討した。その結果、前灌流と比較すると、それら薬剤添加によって更なる組織・細胞障害の軽減は得られたものの、やはり心拍動下摘出肝グラフトと同程度の状態までには至らなかった。

プロスタグランジン E1 (PGE1) は、血管拡張作用、抗血小板凝集作用、抗炎症性サイトカイン作用、細胞膜の安定化など様々な肝保護作用をもつと報告されており<sup>23-26)</sup>、過大肝切除後や ABO 不適合肝移植などの周術期管理においても臨床応用されている薬

剤である<sup>27-29)</sup>。そこで本研究では心停止下摘出肝グラフトを心拍動下ドナーからのグラフトと同程度の状態にまで回復させることを目的に、PGE1 を前灌流に添加し、その効果を肝移植に関連する研究において実際の移植後のグラフト機能を推定・評価する方法として広く用いられている *ex vivo* による灌流実験<sup>18, 30)</sup>で評価した。

ミトコンドリアは生体エネルギーやカルシウムの恒常性に深く関与しており、近年ではネクロシスやアポトーシスといった細胞死の中心的役割を担っていると報告されている<sup>31, 32)</sup>。再灌流障害や ROS、MAPKs の活性化等のストレスによりチトクローム c などのミトコンドリア内蛋白が細胞質内に放出されることで、蛋白質分解酵素カスパーゼが活性化され、十分に細胞内の ATP が保たれている状況下ではアポトーシスが誘導される<sup>33-35)</sup>。細胞へのストレスが非常に強く、ATP レベルが十分に維持できない程度まで細胞内のミトコンドリアが障害を受ける場合にはネクロシスが誘導される<sup>32, 36, 37)</sup>。温阻血再灌流障害を被った肝組織の病理組織学的検討では、多発する巣状の壊死と広範な類洞循環障害が認められる<sup>2, 38)</sup>。そこで、本研究では細胞死に深く関与するミトコンドリアの機能に焦点を当て、温阻血再灌流障害の病態とそれに対する PGE1 添加前灌流の改善効果について検討した。

### 3. 研究目的

本研究の目的は、PGE1 添加冷保存前灌流による心停止下摘出肝グラフトに対する温阻血再灌流障害軽減効果と、ミトコンドリア機能を中心とした冷保存前灌流及び PGE1 添加の臓器保護作用の機序を検討する。

#### 4. 研究方法

##### (1) 実験動物

体重 272～314g の雄性 Wistar ラット (Japan SLC Inc., Shizuoka, Japan) を用いて実験を行った。約 1 週間の順応期間をもうけた後に実験を行い、その間水分・食餌摂取の制限は行わなかった。本動物実験は、東北大学環境・安全委員会動物実験専門委員会により承認を受け、国立大学法人東北大学における動物実験等に関する規定に則って施行した。

##### (2) ラット灌流実験プロトコール (図 1)

以下の 4 群で ex vivo の灌流実験を行った。いずれの群でも肝臓の 6 時間冷保存、1 時間再灌流を行った。

- 1) 心拍動群 (Heart-beating 群 ; HB 群) : 心拍動下に肝臓を摘出する群。
- 2) 温阻血群 (Non-heart-beating 群 ; NHB 群) : 温阻血を加えた肝臓を摘出し、直ちに冷保存する群。
- 3) 冷保存前灌流群 (Pre-perfusion 群 ; PRE 群) : 温阻血を加えた肝臓を摘出し、30 分間の冷保存前灌流を施行した後に冷保存する群。
- 4) プロスタグランジン E1 添加前灌流群 (Prostaglandin E1 ; PGE1 群) : 温阻血を加えた肝臓を、プロスタグランジン E1 を添加した灌流液で前灌流した後に冷保存する群。

##### (3) 動物実験手技

ラットは、ペントバルビタール（50mg/kg）腹腔内投与による全身麻酔後、横切開により開腹。総胆管にシリコンチューブ（シラスコン外径1.0mm-内径0.5mm;Kaneka Medix Co., Osaka, Japan）を接続した22Gサーフロー針外套（TERUMO Co., Tokyo, Japan）を挿入した。HB群では、心拍動下で門脈に14Gサーフロー針外套を挿入した後、肝上下部下大静脈を切開し20mlの4°C University of Wisconsin solution（UW液; DuPont Pharmaceuticals, Wilmington, DE, USA）で経門脈的にウォッシュアウトし、4°C UW液中で6時間冷保存した。冷保存中に肝下部大静脈を結紮し、肝上下部下大静脈に14Gサーフロー針外套を挿入した。心停止群（NHB群、PRE群、PGE1群）ではHB群と同様に総胆管へカニューレーションした後、横隔膜切開し呼吸停止から死戦期を経て心停止を誘導し、30分の温阻血を加えた。温阻血の間、腹部臓器の乾燥防止と保温のため開腹部位をラップで被覆した。NHB群では、その後HB群と同様にカニューレーション及びUW液によるウォッシュアウトを行い冷保存した。PRE群・PGE1群では、温阻血中に門脈・肝上下部下大静脈のカニューレーションを行い、30分経過した後に20mlの生理食塩水で経門脈的にウォッシュアウトを行った。その後、肝下部大静脈を結紮切離し肝臓を摘出、体外灌流装置で30分間の冷保存前灌流を行った後、UW液でウォッシュアウトし冷保存した。

#### （4）体外灌流装置

体外灌流は、非循環型灌流装置である Perfusion System（PS-1; HUGO SACHS ELEKTRONIK-HARVARD APPARATUS GmbH, Germany）を用いて行った。摘出した肝臓を

37°Cの moist chamber の上に置き、門脈・肝上部下大静脈をそれぞれ装置のバッファ  
ー流入路・流出路に接続し、バッファー流入路を Pressure Transducer (Research  
Grade Blood Pressure Transducer, 110 VAG/60 Hz; HUGO SACHS ELEKTRONIK-HARVARD  
APPARATUS GmbH, Germany) で計測しながら 7mmHg の定圧で経門脈的に灌流した。冷  
保存前灌流は 30 分、再灌流は 1 時間行った。すべての灌流は 37°Cの 95% O<sub>2</sub> / 5% CO<sub>2</sub>  
飽和クレブス-ヘンゼライト液 (Krebs-Henseliet solution) を用いた。前灌流・再  
灌流時の胆汁及び下大静脈からの排液(灌流液) を採取し、総量を測定し生化学検査  
等の検討まで-80°Cで保存した。

#### (5) 検体採取 (図 3)

灌流実験プロトコールにおいて、冷保存前、冷保存後、再灌流後の時点で、全肝組  
織 (各群 n=5) を用いて後述する各種解析用に分割、検体処理を行なった。まず、全  
肝を冷バッファー内に入れ、病理組織検体用に各肝葉より 5mm の厚さで計 3 辺の組織  
を採取し、4%パラフォルムアルデヒド (PFA) で固定した。そして、残りの肝組織に  
対してミトコンドリア及びサイトゾール抽出処理を行なった。

#### (6) ミトコンドリア・サイトゾール分画の抽出<sup>39, 40)</sup>

冷バッファー内で 2-3mm 大に細切し、Ice-cold isolation buffer (70mM sucrose,  
190mM mannitol, 20mM HEPES, 0.2mM EDTA, pH 7.5) 内でホモジナイズ (700RPM, 5  
strokes) した後、遠心分離 (650g, 10 分間, 2°C) した。上清を更に遠心分離 (7700g,  
10 分間, 2°C) し、分離された上清をチューブに移し遠心分離 (15000 g, 10 分間, 2°C)

し、上清を分離されたサイトゾール懸濁液として $-80^{\circ}\text{C}$ で保存した。残った沈殿物を Ice-cold washing buffer (70mM sucrose, 190mM mannitol, 20mM HEPES, pH 7.5) に懸濁させ遠心分離 (7700g, 10 分,  $2^{\circ}\text{C}$ ) して洗浄した。上清を捨て、肝重量相当量 (ml / liver weight (g)) のバッファー (250mM sucrose, 2mM HEPES, 0.5mM  $\text{KH}_2\text{P}_4$ , pH7.4) で攪拌・懸濁し、ミトコンドリア懸濁液とし、一部は、直ちにミトコンドリア機能の測定に用い、残りは蛋白解析等まで $-80^{\circ}\text{C}$ で保存した。ミトコンドリア及びサイトゾールの懸濁液は、どちらも分離直後に BCA protein assay kit (Thermo Scientific Pierce, Rockford, IL, USA) を用いて蛋白濃度の測定を行った。

## (6) 検討項目

### 1) 門脈灌流量、胆汁産生量

60 分間の再灌流中に肝静脈から排出した灌流液量を測定し、ラット肝重量当たりの門脈灌流量として算出した。同様に総胆管から排出した胆汁量を測定し、ラット肝重量当たりの胆汁産生量を算出した。

### 2) 灌流液中肝逸脱酵素

再灌流液中の AST・ALT 濃度を、市販キット (AST, ALT; KAINOS Laboratories, Inc, Japan) を用いた酵素比色法で測定した。

### 3) 灌流液炎症性サイトカイン

再灌流液中の tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )、Interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) を市販 ELISA キット (enzyme-linked immunosorbent assay kit; invitrogen

Corporation, Calif, USA) を用いて測定した。

#### 4) プロトン ATPase 活性

ミトコンドリアの ATP 産生能の指標としてプロトン ATPase 活性を Seya ら<sup>41)</sup>の方法を用いて測定した。ミトコンドリアの膜電位に感受性の高い蛍光色素 DiSC3 を用い、分光蛍光光度計 (Jasco FP-777S; Nihon Bunko, Tokyo, Japan) で励起波長 625nm、蛍光波長 670nm で膜電位の変化を経時的に測定した。DiSC3 を加えたミトコンドリア懸濁液の蛍光強度を基準値 (X) とした。アンチマイシン A を加えミトコンドリアの呼吸鎖をブロックした後、0.2mM ATP を加えたことで得られた蛍光強度変化 (Y) を測定した。Y/X をプロトン ATPase 活性 (%) として算出した。

#### 5) ミトコンドリア膨潤測定<sup>39, 42)</sup>

ミトコンドリア懸濁液をバッファー(250mM sucrose, 2mM HEPES, 0.5mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH7.4) で0.2mg/ml に希釈し、5mM コハク酸ナトリウムを加えた後、50mM CaCl<sub>2</sub> を加えミトコンドリアの膨潤を誘導した。分光光度計 (DU640; Beckman Coulter, Inc, Calif., USA) を用いて 540 nm の吸光度を 25° C で 10 分間 経時的に測定した。

#### 6) ミトコンドリア・サイトゾール懸濁液内チトクローム c 濃度

分離したミトコンドリア及びサイトゾール懸濁液内のチトクローム c 濃度を、市販 ELISA キット (enzyme-linked immunosorbent assay kit; R&D systems, Inc, Minneapolis, USA) を用いて測定した。

#### 7) ウェスタンブロッティング

分離したミトコンドリア・サイトゾール懸濁液を、Laemmli サンプルバッファー (62mM Tris-HCl, pH 6.8, 4% SDS、10% glycerol, 5% 2 $\beta$ -mercaptoethanol, 0.025% bromophenol blue) と混和し、最終蛋白濃度を 2.5  $\mu$ g/ $\mu$ l に調整しサンプルとした。サンプルを 95°C で 5 分間ボイルした後、20  $\mu$ l を 12% SDS-polyacrylamide gel で泳動・分離した。PVDF membrane (Immobilon-P; Millipore Corporation, Bedford, MA, USA) にセミドライ法 (Trans-Blot SD Electrophoretic Transfer Cell; Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, USA) で転写し、5% スキムミルク添加 PBS-Tween (PBS-T; 0.05% tween-20 添加 PBS 溶液) を用いて 1 時間室温でブロッキングを行った。各抗体は 5% スキムミルク添加 PBS-T 溶液で適正濃度に希釈し、1 次抗体は 4°C で一晩、2 次抗体は室温で 1 時間反応させた。使用した 1 次抗体は phospho (p)-SAPK/JNK、SAPK/JNK、Bcl-2、Bax、COX、 $\beta$ -Actin (Cell Signaling Technology, Beverly MA, USA)、2 次抗体は Donkey anti-Rabbit IgG (H+L) (Pierce Biotechnology Inc, Rockford, IL, USA) である。各蛋白の Band は、chemiluminescence detection system (ECL-Plus Western Blotting Detection System; GE Healthcare KK, Tokyo, Japan) を用いて化学発光させ、ルミノイメージアナライザー (LAS-1000; Fujifilm, Tokyo, Japan) で検出した。蛋白発現の定量的解析は Image Gauge ソフトウェア ver. 3.45 (Fujifilm, Tokyo, Japan) を用いて band intensity を定量し、目的蛋白 total 量に対する活性型の比、あるいは  $\beta$ -Actin や COX に対する目的蛋白の比として算出した。

## 8) 組織学的検討

各ラットにつき異なる肝葉から1片ずつ計3片の肝組織を採取し、4%PFAで固定し、エタノールで脱水した後、パラフィン包埋した。3  $\mu$ m 厚の切片をヘマトキシリン・エオジン染色し、光学顕微鏡で組織学的検討を行った。

ネクローシス面積比率(%)の算出のため、全自動顕微鏡 (KEYENCE BIOREVO BZ-9000 ; KEYENCE Co., Osaka, Japan) を用いて100倍拡大で切片全体を取り込み、Image-joint soft を用いて画像を結合させた。ネクローシス範囲を組織学的基準(空胞変性、索状構造の破壊、細胞の膨化、核の融解・脱落)に従いマッピングし、ネクローシス範囲の面積/切片全体の面積 $\times$ 100を算出した。

アポトーシス検出のため市販のキット (Apop Tag Plus Peroxidase In Situ Apoptosis Detection Kit; Chemicon International Inc, CA, USA) を用いてTUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end-labeling) 染色を行った。光学顕微鏡下200倍拡大で各切片につき無作為に10視野 $\times$ 3切片の計30視野抽出し、その陽性細胞数を計測し、1  $\text{mm}^2$ あたりの陽性細胞数を算出した。

微小循環の評価のため開存類洞面積比を検討した。光学顕微鏡下200倍拡大で各ラットにつき無作為に10視野抽出し、まず門脈及び中心静脈の内腔面積を計測した(A領域)。その後、白黒二元化し黒色領域(肝構成細胞)の面積を計測し、(全体の面積-黒色領域-A領域) / (全体の面積-A領域)を算出し、開存類洞面積比と

した。

画像処理はすべて NIH Image J ソフトウェアを用いて行った。

#### 9) 統計学的処理

結果は平均値±標準誤差 (SEM) で表記した。多群間比較及び 2 群間比較は Wilcoxon 検定で行い、 $P < 0.05$  を有意差ありとした。統計処理はすべて JMP Pro ソフトウェア (SAS Institute, Cary, NC, USA) を用いて行った。

## 5. 研究結果

### (1) 門脈灌流量、胆汁産生量 (表1)

再灌流中の門脈灌流量は、HB群に比べNHB群で低下しPRE・PGE1群で増加する傾向が見られたが、各群間に統計学的有意差は認めなかった。

再灌流時の胆汁産生量 ( $\mu\text{L/g liver}$ ) は、HB群に比べNHB群で有意に減少していた ( $34.57 \pm 2.93$  vs  $24.07 \pm 1.69$ ,  $p < 0.05$ )。PRE群で増加傾向を認め、PGE1群ではHB群と同程度まで増加し ( $35.30 \pm 2.63$ )、NHB群に対し有意差を認めた ( $p < 0.05$ )。

### (2) 灌流液中肝逸脱酵素 (表1)

再灌流時、NHB群・PRE群ではAST値 (Karmen units) が心拍動群に比べ有意に上昇していた。PGE1群ではNHB群に比べ有意にAST値の上昇が抑えられた ( $4.46 \pm 0.14$  vs  $7.85 \pm 1.1$ ,  $p < 0.05$ )。又、PGE1群ではALT値 (Karmen units) もNHB群に比べ有意に上昇が抑えられた ( $2.59 \pm 0.14$  vs  $4.21 \pm 0.31$ ,  $p < 0.05$ )。

### (3) 灌流液中炎症性サイトカイン (表1)

再灌流液中のTNF- $\alpha$ 濃度 (pg/ml) は、HB群に比べNHB群・PRE群で有意に上昇した。PGE1群ではNHB群に比べ有意に上昇が抑えられており ( $9.77 \pm 3.12$  vs  $22.07 \pm 1.76$ ,  $p < 0.05$ )、HB群 ( $12.59 \pm 0.66$ ) と同程度まで抑制された。

再灌流液中のIL-1 $\beta$ 濃度は、HB群に比べNHB群・PRE群で有意に上昇していた。PGE1群では有意差はないものの上昇が抑えられる傾向にあった。

### (4) プロトンATPase活性 (図2)

30 分間の温阻血によりプロトン ATPase 活性 (%) は著明に低下したが、前灌流により有意に改善した ( $30.41 \pm 3.10$  vs  $53.43 \pm 2.02$ ,  $p < 0.05$ )。PGE1 添加前灌流 ( $66.83 \pm 0.84$ ) により HB 群 ( $66.81 \pm 5.16$ ) と同程度まで改善した。全群で冷保存中に活性は低下したが、再灌流で一様に上昇した。最終的に各群間に統計学的有意差はないものの、他の群に比べて PGE1 群でより高い活性を示す傾向があった。

#### (5) ミトコンドリア膨潤の誘導 (図 3)

NHB 群では、再灌流後ミトコンドリア懸濁液の吸光度の初期値が HB 群の半分まで低下していた ( $0.21 \pm 0.021$  vs  $0.41 \pm 0.057$ ,  $p < 0.05$ )。NHB 群に比べ、PRE 群では吸光度が高い傾向にあり PGE1 群では有意に高値を示していた ( $0.35 \pm 0.025$ ,  $p < 0.05$ )。

ミトコンドリアの懸濁液に塩化カルシウムを添加するとミトコンドリアの膨潤が誘導され吸光度は低下する。添加後の吸光度の低下勾配は、PGE1 群では HB 群と同様の低下勾配を示したが、NHB 群・PRE 群は HB 群に比べ緩やかであった。

#### (6) チトクローム c 濃度 (図 4)

HB 群では、冷保存前のミトコンドリア内のチトクローム c 濃度 (ng/mg) は他の群に比べて高い傾向にあった。全群で冷保存中にはミトコンドリアのチトクローム c 濃度は低下しなかったが、再灌流により一様に低下した。PGE1 群では、再灌流時の濃度低下は最小限であり、最終的に NHB 群に比べて有意に高いチトクローム c 濃度を維持していた ( $1101.46 \pm 77.58$  vs  $728.06 \pm 54.54$ ,  $p < 0.05$ )。

サイトゾール内のチトクローム c 濃度は全群で再灌流時に上昇しており、NHB・PRE

群で高い傾向にあったが統計学的有意差は認めなかった。

## (7) 細胞内蛋白解析 (図 5、6)

### 1) アポトーシス関連蛋白 (Bax・Bcl-2)

PGE1 群では、他の群に比べミトコンドリアでの Bax の発現が有意に抑制されていた ( $p < 0.05$ )。一方、NHB 群では、ミトコンドリアでの Bcl-2 の発現が有意に抑制されていた ( $p < 0.05$ )。サイトゾール内では Bax・Bcl-2 共に全群間でその発現に差はなかった。

### 2) JNK 活性

JNK の活性を、JNK に対する活性型である p-JNK の比 (p-JNK/JNK) で評価した。NHB 群ではサイトゾール内の p-JNK/JNK が上昇し、PRE 群では有意差はないものの上昇は抑えられる傾向にあった。PGE1 群では NHB 群に比べ有意に上昇が抑制されていた ( $p < 0.05$ )。ミトコンドリアにおける p-JNK は検出感度以下であった。

## (8) 組織学的検討

### 1) ネクロシス面積比率 (図 7)

1 時間の再灌流後、NHB 群で肝細胞の空胞変性や索状構造の破壊などの虚血性変化が著明であり、巣状にネクロシスに陥っている部位が多数認められた。PRE 群では、心停止群に比べこれらの変化は軽度であった。

ネクロシス面積比率 (%) の定量化では、前灌流自体で一時的に増加するが、PGE1 を添加することで前灌流の間の増加は有意に抑制された ( $6.75 \pm 0.52$  vs  $3.16 \pm 0.44$ 、

p<0.05)。再灌流により全群で増加するが、PGE1 群では HB 群と同程度まで、NHB 群に比べて有意にその増加が抑制された ( $13.75 \pm 0.48$  vs  $3.66 \pm 0.23$ , p<0.05)。

## 2) TUNEL 染色 (図 8)

TUNEL 陽性細胞数 (個/mm<sup>2</sup>) は全群で冷保存中にわずかに増加し、再灌流で有意に増加した。NHB 群は、再灌流後に TUNEL 陽性細胞数が著明に増加しており、PRE 群ではその約半数に抑えられていた ( $56.26 \pm 5.74$  vs  $31.15 \pm 1.91$ , p<0.05)。PGE1 群では、NHB・PRE 群に比べ再灌流後の増加が有意に抑えられていた ( $18.58 \pm 2.04$ , p<0.05)。

## 3) 開存類洞面積比 (図 9)

NHB 群では冷保存前の開存類洞面積比 (%) が HB 群に比べて約半分まで減少していた ( $8.90 \pm 0.44$  vs  $18.15 \pm 0.28$ , p<0.05)。PRE 群・PGE1 群は共に、冷保存前に NHB 群に比べ有意に高い開存率を示した ( $18.67 \pm 0.35$ ,  $19.42 \pm 0.94$ , p<0.05)。又、PGE1 群では前灌流後・再灌流後も HB 群と同程度の値であった。

## 6. 考察

本研究では、心停止下摘出肝グラフトに対する PGE 1 添加冷保存前灌流の効果とミトコンドリアを中心とした温阻血再灌流障害抑制の機序について検討を行った。その結果、ミトコンドリア機能の保持及び肝組織障害の軽減を認め、心拍動下摘出肝グラフトとほぼ同程度の状態にまで改善された。

本研究では、臨床的な uncontrolled NHBD からの肝移植を想定し、死戦期を経て心停止を誘導するモデルを選択した。移植後にグラフトが十分に機能する温阻血時間の限界は、死戦期を経ない場合では 30-60 分とされるが<sup>38, 43)</sup>、死戦期を経た後に 30 分間の温阻血を加えたグラフトを移植した場合には、24 時間生存例はないと報告されている<sup>44)</sup>。これらを考慮し温阻血時間を 30 分間に設定した。又、本研究では、移植後のグラフトの状態を推定・評価するため、肝移植の研究において広く用いられている ex vivo の灌流モデルである IPRL (isolated perfused rat liver) モデルを採用し、報告例を参考に灌流条件 (門脈圧 : 7mmHg、酸素分圧 : 450-500mmHg) を設定した<sup>18, 30, 45)</sup>。

これまで肝温阻血再灌流障害克服の為、冷保存前に 30 分間常温酸素化バッファーで灌流 (前灌流) する方法が考案され、その有効性が検討されてきた<sup>19, 20)</sup>。検討の結果、無処置の温阻血を被った肝グラフトに比べ、前灌流により肝組織中のエネルギーステイタスが改善し、再灌流時の胆汁産生能の改善、組織障害の軽減やアポトーシスの減少、細胞障害時に活性化される MAPKs 活性の抑制を認めた。しかしながら前灌流

のみでは、組織・細胞障害における改善効果は小さかったため、Iwane ら<sup>20)</sup>は内因性の抗酸化物質であるビリベルジンを、Kobayashi ら<sup>19)</sup>は free radical scavenger であるエダラボンを前灌流液へ添加した。どちらも前灌流単独に比べ改善する点はあるが、ビリベルジン添加では胆汁産生量やアポトーシス細胞数において、エダラボン添加では門脈流量や炎症性サイトカインにおいて、心停止下摘出肝グラフトでの測定値を下回った。

PGE1 は、細胞膜上の EP2・EP4 受容体に結合し、細胞内の cAMP を上昇させ、血管平滑筋を弛緩することで血管拡張作用をもたらす<sup>46)</sup>。又、細胞内のカルシウム濃度上昇を抑え、細胞膜の安定化やミトコンドリアの保護作用をもたらす事も知られている<sup>23, 25, 46)</sup>。更に、過大肝切除後や ABO 不適合肝移植などにおいても臨床応用され、その有用性が報告されている<sup>27-29)</sup>。肝虚血再灌流障害の研究においても、Izuishi らは 24 時間冷保存後の ex vivo の灌流実験において、PGE1 の冷保存液・灌流液内投与が 5ng/ml 以上で門脈流量や胆汁産生量の増加が認められたと報告している<sup>47)</sup>。肝臓の温阻血再灌流障害においては、血栓や脱落した類洞内皮及び膨化した肝細胞により類洞が狭小化及び閉塞し循環障害が引き起こされる<sup>2, 12, 13)</sup>。我々は、PGE1 が肝温阻血再灌流障害時の類洞循環障害にもその血管拡張作用や細胞保護作用により効果を示すとの仮説を立て、Izuishi らの実験結果を参考に、PGE1 を 10ng/ml (約 1.3  $\mu$ g/kg/min) の濃度で前灌流液に添加してその効果を検討した。

心停止下摘出肝グラフトに対し PGE1 添加冷保存前灌流を行なう事により、再灌流

液中の肝逸脱酵素 (AST/ALT) や再灌流後のネクロシス/アポトーシスが有意に減少し、病理組織学的検討において細胞の空胞変性や膨化が抑えられ、開存類洞面積も心拍動下摘出肝グラフトと同程度まで改善した。つまり、PGE1 の血管拡張作用や細胞保護作用により、類洞すなわち微小循環の血流改善そして肝グラフト組織障害の著明な改善が得られた。それと共に、ミトコンドリアプロトン ATPase 活性の増加やミトコンドリア膨化の抑制が認められ、細胞 viability の改善・維持につながったと考えられた。細胞の viability 改善、つまり細胞死の抑制は、肝細胞や類洞内皮細胞の膨化・脱落を抑制し更なる微小循環の改善につながると考えられ、グラフト障害軽減の好循環が起こっていたと推察された。一方、PGE1 はマクロファージの細胞質内のカルシウム濃度を抑えることで炎症性サイトカイン (TNF- $\alpha$ ・IL-1) の産生を抑制すると報告されている<sup>48)</sup>。PGE1 添加により先の微小循環の改善～細胞 viability の改善～細胞死の抑制～微小循環の改善という好循環に加え、類洞内マクロファージであるクッパー細胞からの細胞障害をもたらす TNF- $\alpha$  の産生抑制効果も細胞死軽減に関与していたと考えられた。

ミトコンドリアは主な ATP 産生場であると同時に、更にネクロシス/アポトーシスといった細胞死においても中心的役割を果たしている<sup>31, 32)</sup>。そのため本研究では細胞死とミトコンドリア機能を中心に、PGE1 添加冷保存前灌流によるグラフト機能改善の機序についても検討を行なった。

ミトコンドリアプロトン ATPase 活性は、ミトコンドリア内膜にある呼吸鎖のうち

のV型呼吸鎖複合体であるATP合成酵素の分子モーター部の回転能を測定することで、ミトコンドリアのATP合成能を評価するものである<sup>41)</sup>。心停止下に摘出された肝グラフトでは、プロトンATPase活性は30分間の温阻血の間に低下し、前灌流により冷保存前にほぼ正常化した。再灌流後のプロトンATPase活性は、有意差はないものの冷保存前に回復させた前灌流群やPGE1群において高い傾向にあり、PGE1群では心拍動群と同程度の値を示した。ATP合成能が、PGE1添加前灌流により回復し得ることが示された。

虚血再灌流障害やROS等の刺激により、ミトコンドリア内膜の透過性の変化(mitochondrial permeability transition:MPT)が誘導されると、ミトコンドリアの膜電位が低下し、膨潤や膜の崩壊といった形態学的変化が起こり機能不全に陥る<sup>32, 37)</sup>。MPTの誘導が多数のミトコンドリアに及ぶと細胞内のATPレベルが維持できなくなり、ネクローシスが誘導される<sup>36)</sup>。又、障害を受けたミトコンドリアは、カルシウム負荷に対する閾値が低く速やかにMPTが誘導される<sup>39)</sup>。本研究におけるMPTの検討では、温阻血群の再灌流後でのミトコンドリア懸濁液の吸光度の初期値が他の群と比較して有意に低く、カルシウム負荷によるMPTは緩やかであった。これらは、温阻血群では1時間の再灌流が終了した時点ですでに多くのミトコンドリアが膨潤・破裂していたためであると推察された。前灌流によって再灌流後のミトコンドリア膨潤は若干改善傾向にあったが、カルシウム負荷による膨潤誘導は温阻血グラフトと同様に緩やかであった。しかし、PGE1を添加することで再灌流後のミトコンドリア膨潤が有意

に改善され、カルシウム負荷による膨潤も心拍動下摘出グラフと同様に誘導された。

ミトコンドリアにおけるプロトン ATPase 活性及び膨潤の検討結果から、30 分という比較的短い時間の PGE1 添加前灌流により、温阻血により著しく低下した ATP 産生能を冷保存前に改善させ、再灌流開始時から良好なミトコンドリア機能を有する事が、MPT の誘導を抑制しネクロシスを減少させる効果につながったと考えられた。

更に、冷保存前灌流にはアポトーシスの抑制効果が認められ、PGE1 によりその効果は一層高められた。そこで、PGE1 添加によるアポトーシス抑制効果に関し、アポトーシス関連蛋白についての検討を行った。Bcl-2 は通常ミトコンドリア外膜上においてアポトーシス抑制作用を有する<sup>33, 34)</sup>。一方 Bax は、通常不活性型で細胞質に存在し、アポトーシス刺激が加わると活性化されミトコンドリアに移行し外膜上に局在している Bak と二量体を形成し、外膜の開孔を促進する。これにより膜間スペースに存在するチトクローム c 等のアポトーシス誘導蛋白が細胞質に漏出する<sup>33, 34)</sup>。漏出したチトクローム c は ATP が十分に存在する状況下で、ATP や Apaf-1 と Apoptosome と呼ばれる複合体を形成し、蛋白質分解酵素カスパーゼを活性化させアポトーシスを誘導する<sup>33-35)</sup>。虚血再灌流障害の際には、ミトコンドリアでの Bcl-2 の発現が低下し細胞質からのミトコンドリアへの Bax の移行が増加すると報告されている<sup>49)</sup>。本研究の検討では、温阻血再灌流障害によって、ミトコンドリア外膜上の Bcl-2 発現の低下が引き起こされ、前灌流や PGE1 添加前灌流は、その発現の低下を抑制する効果を示した。一方、Bax の解析では、PGE1 を添加した群のみの細胞質からミトコンドリアへの移

行が抑制されていた。温阻血に伴う ATP 減少は、ATPase 依存性ポンプの機能不全、続いて細胞内カルシウムの上昇を引き起こし、様々な細胞障害の原因となりうる<sup>2)</sup>。その細胞内カルシウムの上昇は、ミトコンドリアへのカルシウム負荷につながり、Bax のミトコンドリアへの移行と相関すると報告<sup>50, 51)</sup>されている。PGE1 の添加により、微小循環の改善により細胞内の ATP が回復し細胞内カルシウムの上昇が抑えられたことに加え、PGE1 自体による cAMP の上昇を介した細胞内カルシウム上昇抑制効果<sup>25, 46)</sup> という薬理作用も Bax のミトコンドリアへの移行を抑制した可能性がある。これらから PGE1 添加前灌流は、ミトコンドリア外膜上での Bcl-2 発現の保持、外膜への Bax 移行の抑制をもたらし、外膜の開口を抑制してチトクローム c の漏出を防ぎ、その事が細胞死、特にアポトーシスの抑制に大きく寄与したと考えられた。

c-Jun N-terminal protein kinases (JNK) は、様々な細胞外刺激により活性化される mitogen-activated protein kinase (MAPK) ファミリーの一つであり、肝虚血再灌流障害において炎症性サイトカインや活性酸素等により活性化され、細胞障害や細胞死に関与することが知られている<sup>52, 53)</sup>。活性化された JNK 蛋白は、細胞質内の Bax の活性化とミトコンドリアへの移行をもたらす<sup>54, 55)</sup>。又、その一部はミトコンドリア内に移行し MPT や重度のミトコンドリア機能の障害をもたらす<sup>54)</sup>。本研究の検討では、細胞質内での JNK の活性は冷保存前灌流で抑制傾向を示し、PGE1 を添加することで有意に抑制された。PGE1 による温阻血再灌流後の JNK 活性化抑制効果は、肝グラフトの循環障害軽減及び TNF  $\alpha$  産生抑制によりもたされた可能性や、Bax のミトコンドリア

移行の抑制に寄与した可能性が考えられた。他方、ミトコンドリア内の JNK については、心停止群においても活性化はほとんど見られなかった。Shinohara ら<sup>56)</sup>の Acetaminophen (APAP) による肝障害モデルによる検討では、JNK のミトコンドリアへの移行と活性化は APAP 投与後 4 時間に最大となり、JNK の活性が最大になると同時にミトコンドリアのエネルギー産生能も最大限障害されていた。このことから活性化された JNK は、再灌流時間が一時間と短いためにミトコンドリアへ移行せず、温阻血肝グラフトでの細胞死やミトコンドリア機能障害には、活性化 JNK のミトコンドリア移行は関与しなかったと考えられた。

冷保存前において、前灌流群では温阻血群に比べてアポトーシス及びネクローシスといった細胞死が高値を示したものの、再灌流後には、温阻血群の細胞死が急激に増加して、前灌流群の細胞死を大きく上回った。その理由として、温阻血を受けた肝臓には不可逆的障害を受けた細胞群と可逆的障害を受けた細胞群が混在しており、そのまま冷保存及び再灌流を行うと、不可逆的障害を受けた細胞群のみならず可逆的障害を受けた細胞群も再灌流障害に耐えられずに細胞死へ移行する。前灌流を施行する事により、不可逆的障害を受けた部分の細胞死や前灌流自体の灌流障害で細胞死が前倒しで起こるものの、酸素化されることで可逆的障害を受けた細胞群が回復したため再灌流障害に耐える事ができたと考えられた。更に、PGE1 の添加によって前灌流時の障害が軽減されると同時に細胞の viability もより向上し、再灌流障害に対する耐性が一層強化され、細胞死からの救済につながった事が示唆された。

以上より、肝グラフトの *ex vivo* 灌流実験において、30 分間の PGE1 添加冷保存前灌流がネクロシスやアポトーシスといった細胞死を軽減させることで心停止下摘出肝グラフトの温阻血再灌流障害を有意に軽減し、最終的に心拍動下摘出肝グラフトとほぼ同程度の状態まで改善させることができた。その機序として、微小循環の改善によりミトコンドリア機能の改善や細胞質内の JNK 活性化抑制がもたらされ、MPT の誘導等のネクロシスをもたらす要因の抑制やチトクローム c 等のアポトーシス刺激の漏出の抑制が関与していると考えられた。本研究は、*ex vivo* の灌流実験であり、再灌流障害早期におけるグラフト因子のみの検討となっている。そのためレシピエント由来の白血球や血小板などの血球成分による影響は反映されていない。特に、再灌流後 6 時間以降では、レシピエント由来の好中球と接着分子の発現による障害が主になるといわれている<sup>8, 9)</sup>。この点に関しても、PGE1 は血小板の凝集や接着分子の発現を抑制するとされており<sup>23, 24)</sup> 更なる効果が期待できる。その効果を検証する為にも、肝移植モデルを用いた更なる検討が必要であると考えられた。

## 7. 結論

心停止下摘出肝グラフトに対する PGE1 添加冷保存前灌流は、微小循環の改善によりミトコンドリア機能の改善や細胞質内の JNK 活性抑制をもたらし、MPT の誘導やチトクローム c 等の漏出を抑え、ネクローシスやアポトーシスといった細胞死を軽減することでグラフト障害を軽減し、心拍動下摘出肝グラフトと同程度の状態にまで改善することが示された。

## 8. 文献

1. Kootstra G, Daemen JH, Oomen AP. Categories of non-heart-beating donors. *Transplant Proc* 1995;27(5): 2893-4.
2. Reddy S, Zilvetti M, Brockmann J, McLaren A, Friend P. Liver transplantation from non-heart-beating donors: current status and future prospects. *Liver Transpl* 2004;10(10): 1223-32.
3. de Vera ME, Lopez-Solis R, Dvorchik I, Campos S, Morris W, Demetris AJ, Fontes P, Marsh JW. Liver transplantation using donation after cardiac death donors: long-term follow-up from a single center. *Am J Transplant* 2009;9(4): 773-81.
4. Foley DP, Fernandez LA, Levenson G, Anderson M, Mezrich J, Sollinger HW, D'Alessandro A. Biliary complications after liver transplantation from donation after cardiac death donors: an analysis of risk factors and long-term outcomes from a single center. *Ann Surg* 2011;253(4): 817-25.
5. Jimenez-Galanes S, Meneu-Diaz MJ, Elola-Olaso AM, Perez-Saborido B, Yiliam FS, Calvo AG, Usera MA, Gonzalez MC, Gonzalez JC, Gonzalez EM. Liver transplantation using uncontrolled non-heart-beating donors under normothermic extracorporeal membrane oxygenation. *Liver Transpl* 2009;15(9): 1110-8.

6. Fondevila C, Hessheimer AJ, Ruiz A, Calatayud D, Ferrer J, Charco R, Fuster J, Navasa M, Rimola A, Taura P, Gines P, Manyalich M, Garcia-Valdecasas JC. Liver transplant using donors after unexpected cardiac death: novel preservation protocol and acceptance criteria. *Am J Transplant* 2007;7(7): 1849-55.
7. Quintela J, Gala B, Baamonde I, Fernandez C, Aguirrezabalaga J, Otero A, Suarez F, Fernandez A, Gomez M. Long-term results for liver transplantation from non-heart-beating donors maintained with chest and abdominal compression-decompression. *Transplant Proc* 2005;37(9): 3857-8.
8. Dogan S, Aslan M. Hepatic ischemia-reperfusion injury and therapeutic strategies to alleviate cellular damage. *Hepatol Res* 2011;41(2): 103-17.
9. Bahde R, Spiegel HU. Hepatic ischaemia-reperfusion injury from bench to bedside. *Br J Surg* 2010;97(10): 1461-75.
10. Jaeschke H. Molecular mechanisms of hepatic ischemia-reperfusion injury and preconditioning. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2003;284(1): G15-26.
11. Shibuya H, Ohkohchi N, Seya K, Satomi S. Kupffer cells generate superoxide anions and modulate reperfusion injury in rat livers after cold preservation. *Hepatology* 1997;25(2): 356-60.
12. Tsukamoto S, Ohkohchi N, Fukumori T, Orii T, Asakura T, Takayama J,

Shibuya H, Kato H, Satomi S. Elimination of Kupffer cells and nafamostat mesilate rinse prevent reperfusion injury in liver grafts from agonal non-heart-beating donors. *Transplantation* 1999;67(11): 1396-403.

13. Miyagi S, Ohkohchi N, Oikawa K, Satoh M, Tsukamoto S, Satomi S. Effects of anti-inflammatory cytokine agent (FR167653) and serine protease inhibitor on warm ischemia-reperfusion injury of the liver graft. *Transplantation* 2004;77(10): 1487-93.

14. Nakamura A, Akamatsu Y, Miyagi S, Fukumori T, Sekiguchi S, Satomi S. A free radical scavenger, edaravone, prevents ischemia-reperfusion injury in liver grafts from non-heart-beating donors. *Transplant Proc* 2008;40(7): 2171-4.

15. Otero A, Gomez-Gutierrez M, Suarez F, Arnal F, Fernandez-Garcia A, Aguirrezabalaga J, Garcia-Buitron J, Alvarez J, Manez R. Liver transplantation from Maastricht category 2 non-heart-beating donors. *Transplantation* 2003;76(7): 1068-73.

16. de Rougemont O, Breitenstein S, Leskosek B, Weber A, Graf R, Clavien PA, Dutkowski P. One hour hypothermic oxygenated perfusion (HOPE) protects nonviable liver allografts donated after cardiac death. *Ann Surg* 2009;250(5): 674-83.

17. Dutkowski P, de Rougemont O, Clavien PA. Machine perfusion for 'marginal'

liver grafts. *Am J Transplant* 2008;8(5): 917-24.

18. Dutkowski P, Furrer K, Tian Y, Graf R, Clavien PA. Novel short-term hypothermic oxygenated perfusion (HOPE) system prevents injury in rat liver graft from non-heart beating donor. *Ann Surg* 2006;244(6): 968-76; discussion 76-7.

19. Kobayashi Y, Akamatsu Y, Iwane T, Nakamura A, Satomi S. Signaling pathway on the effect of oxygenated warm perfusion prior to cold preservation of the liver grafts from non-heart-beating donors, and the additive effect of edaravone. *Transplant Proc* 2009;41(1): 49-51.

20. Iwane T, Akamatsu Y, Narita T, Nakamura A, Satomi S. The effect of perfusion prior to cold preservation and addition of biliverdin on the liver graft from non-heart-beating donors. *Transplant Proc* 2006;38(10): 3358-61.

21. Kamiike W, Burdelski M, Steinhoff G, Ringe B, Lauchart W, Pichlmayr R. Adenine nucleotide metabolism and its relation to organ viability in human liver transplantation. *Transplantation* 1988;45(1): 138-43.

22. Kamiike W, Nakahara M, Nakao K, Koseki M, Nishida T, Kawashima Y, Watanabe F, Tagawa K. Correlation between cellular ATP level and bile excretion in the rat liver. *Transplantation* 1985;39(1): 50-5.

23. Ishibe A, Togo S, Kumamoto T, Watanabe K, Takahashi T, Shimizu T, Makino

H, Matsuo K, Kubota T, Nagashima Y, Shimada H. Prostaglandin E1 prevents liver failure after excessive hepatectomy in the rat by up-regulating Cyclin C, Cyclin D1, and Bclxl. *Wound Repair Regen* 2009;17(1): 62-70.

24. Hafez T, Moussa M, Nesim I, Baligh N, Davidson B, Abdul-Hadi A. The effect of intraportal prostaglandin E1 on adhesion molecule expression, inflammatory modulator function, and histology in canine hepatic ischemia/reperfusion injury. *J Surg Res* 2007;138(1): 88-99.

25. Kishimoto S, Sakon M, Umeshita K, Miyoshi H, Taniguchi K, Meng W, Nagano H, Dono K, Ariyosi H, Nakamori S, Kawasaki T, Gotoh M, Monden M, Imajoh-Ohmi S. The inhibitory effect of prostaglandin E1 on oxidative stress-induced hepatocyte injury evaluated by calpain- $\mu$  activation. *Transplantation* 2000;69(11): 2314-9.

26. Natori S, Fujii Y, Kurosawa H, Nakano A, Shimada H. Prostaglandin E1 protects against ischemia-reperfusion injury of the liver by inhibition of neutrophil adherence to endothelial cells. *Transplantation* 1997;64(11): 1514-20.

27. Sato Y, Kurosaki I, Yamamoto S, Nakatsuka H, Oya H, Shirai Y, Tanaka K, Hatakeyama K. Postoperative management for donor safety in living related donor liver transplantation. *Hepatogastroenterology* 2003;50(49): 196-200.

28. Tanabe M, Shimazu M, Wakabayashi G, Hoshino K, Kawachi S, Kadomura T,

Seki H, Morikawa Y, Kitajima M. Intraportal infusion therapy as a novel approach to adult ABO-incompatible liver transplantation. *Transplantation* 2002;73(12): 1959-61.

29. Sugawara Y, Kubota K, Ogura T, Esumi H, Inoue K, Takayama T, Makuuchi M. Protective effect of prostaglandin E1 against ischemia/reperfusion-induced liver injury: results of a prospective, randomized study in cirrhotic patients undergoing subsegmentectomy. *J Hepatol* 1998;29(6): 969-76.

30. Itasaka H, Suehiro T, Wakiyama S, Yanaga K, Shimada M, Sugimachi K. The mechanism of hepatic graft protection against reperfusion injury by prostaglandin E1. *Surg Today* 1999;29(6): 526-32.

31. Borutaite V. Mitochondria as decision-makers in cell death. *Environ Mol Mutagen* 2010;51(5): 406-16.

32. Lemasters JJ, Theruvath TP, Zhong Z, Nieminen AL. Mitochondrial calcium and the permeability transition in cell death. *Biochim Biophys Acta* 2009;1787(11): 1395-401.

33. Lindsay J, Esposti MD, Gilmore AP. Bcl-2 proteins and mitochondria--specificity in membrane targeting for death. *Biochim Biophys Acta* 2011;1813(4): 532-9.

34. Tsujimoto Y. Cell death regulation by the Bcl-2 protein family in the

mitochondria. *J Cell Physiol* 2003;195(2): 158-67.

35. Soeda J, Miyagawa S, Sano K, Masumoto J, Taniguchi S, Kawasaki S. Cytochrome c release into cytosol with subsequent caspase activation during warm ischemia in rat liver. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2001;281(4): G1115-23.

36. Abu-Amara M, Yang SY, Tapuria N, Fuller B, Davidson B, Seifalian A. Liver ischemia/reperfusion injury: processes in inflammatory networks--a review. *Liver Transpl* 2010;16(9): 1016-32.

37. Kim JS, He L, Lemasters JJ. Mitochondrial permeability transition: a common pathway to necrosis and apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;304(3): 463-70.

38. Monbaliu D, Crabbe T, Roskams T, Fevery J, Verwaest C, Pirenne J. Livers from non-heart-beating donors tolerate short periods of warm ischemia. *Transplantation* 2005;79(9): 1226-30.

39. Zeng T, Zhang CL, Zhu ZP, Yu LH, Zhao XL, Xie KQ. Diallyl trisulfide (DATS) effectively attenuated oxidative stress-mediated liver injury and hepatic mitochondrial dysfunction in acute ethanol-exposed mice. *Toxicology* 2008;252(1-3): 86-91.

40. Waldmeier PC, Feldtrauer JJ, Qian T, Lemasters JJ. Inhibition of the

mitochondrial permeability transition by the nonimmunosuppressive cyclosporin derivative NIM811. *Mol Pharmacol* 2002;62(1): 22-9.

41. Seya K, Ohkohchi N, Watanabe N, Shibuya H, Taguchi Y, Mori S. Rapid fluorometric assay for mitochondrial proton adenosine triphosphatase activity for assessment of viability of liver graft tissue. *J Clin Lab Anal* 1994;8(6): 418-23.

42. Pastorino JG, Tafani M, Rothman RJ, Marcinkeviciute A, Hoek JB, Farber JL. Functional consequences of the sustained or transient activation by Bax of the mitochondrial permeability transition pore. *J Biol Chem* 1999;274(44): 31734-9.

43. Takada Y, Taniguchi H, Fukunaga K, Yuzawa K, Otsuka M, Todoroki T, Iijima T, Fukao K. Hepatic allograft procurement from non-heart-beating donors: limits of warm ischemia in porcine liver transplantation. *Transplantation* 1997;63(3): 369-73.

44. Miyagi S, Okada A, Kawagishi N, Fujimori K, Satomi S. The new strategy of liver transplantation from marginal donors using serine protease inhibitor. *Transplant Proc* 2009;41(1): 36-9.

45. Ferrigno A, Rizzo V, Boncompagni E, Bianchi A, Gringeri E, Neri D, Richelmi P, Freitas I, Cillo U, Vairetti M. Machine perfusion at 20 degrees C reduces preservation damage to livers from non-heart beating donors. *Cryobiology* 2011;62(2): 152-8.

46. Le M, Krilov L, Meng J, Chapin-Kennedy K, Ceryak S, Bouscarel B. Bile acids stimulate PKC $\alpha$  autophosphorylation and activation: role in the attenuation of prostaglandin E1-induced cAMP production in human dermal fibroblasts. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2006;291(2): G275-87.
47. Izuishi K, Fujiwara M, Hossain MA, Okano K, Usuki H, Maeta H. Protective effect of intraportal prostaglandin E1 on prolonged cold preserved rat liver. *Transplant Proc* 2003;35(1): 130-1.
48. Sakuma F, Miyata M, Kasukawa R. Suppressive effect of prostaglandin E1 on pulmonary hypertension induced by monocrotaline in rats. *Lung* 1999;177(2): 77-88.
49. Varela AT, Simoes AM, Teodoro JS, Duarte FV, Gomes AP, Palmeira CM, Rolo AP. Indirubin-3'-oxime prevents hepatic I/R damage by inhibiting GSK-3 $\beta$  and mitochondrial permeability transition. *Mitochondrion* 2010;10(5): 456-63.
50. Anderson CD, Belous A, Pierce J, Nicoud IB, Knox C, Wakata A, Pinson CW, Chari RS. Mitochondrial calcium uptake regulates cold preservation-induced Bax translocation and early reperfusion apoptosis. *Am J Transplant* 2004;4(3): 352-62.
51. Anderson CD, Pierce J, Nicoud I, Belous A, Knox CD, Chari RS. Modulation of mitochondrial calcium management attenuates hepatic warm ischemia-reperfusion injury. *Liver Transpl* 2005;11(6): 663-8.

52. Uehara T, Bennett B, Sakata ST, Satoh Y, Bilter GK, Westwick JK, Brenner DA. JNK mediates hepatic ischemia reperfusion injury. *J Hepatol* 2005;42(6): 850-9.
53. Clerk A, Fuller SJ, Michael A, Sugden PH. Stimulation of "stress-regulated" mitogen-activated protein kinases (stress-activated protein kinases/c-Jun N-terminal kinases and p38-mitogen-activated protein kinases) in perfused rat hearts by oxidative and other stresses. *J Biol Chem* 1998;273(13): 7228-34.
54. Hanawa N, Shinohara M, Saberi B, Gaarde WA, Han D, Kaplowitz N. Role of JNK translocation to mitochondria leading to inhibition of mitochondria bioenergetics in acetaminophen-induced liver injury. *J Biol Chem* 2008;283(20): 13565-77.
55. Kim BJ, Ryu SW, Song BJ. JNK- and p38 kinase-mediated phosphorylation of Bax leads to its activation and mitochondrial translocation and to apoptosis of human hepatoma HepG2 cells. *J Biol Chem* 2006;281(30): 21256-65.
56. Shinohara M, Ybanez MD, Win S, Than TA, Jain S, Gaarde WA, Han D, Kaplowitz N. Silencing glycogen synthase kinase-3beta inhibits acetaminophen hepatotoxicity and attenuates JNK activation and loss of glutamate cysteine ligase and myeloid cell leukemia sequence 1. *J Biol Chem* 2010;285(11): 8244-55.

## 9. Figure legend



















## 1 1. Figure legend

### 図1 ラット灌流実験プロトコール・検体採取

冷保存前・冷保存後・再灌流後の時点で各群 n=5 ずつ全肝組織を検体として採取した (計 n=60)。

### 図2 プロトン ATPase 活性

30 分間の温阻血で著明に低下し、前灌流により有意に改善した。PGE1 添加前灌流により HB 群と同程度まで改善した。最終的に各群間に有意差はないものの、他の群に比べて PGE1 群でより高い活性を示す傾向があった。

### 図3 再灌流後ミトコンドリア懸濁液 膨潤測定

NHB 群では、初期値が HB 群の半分まで低下し、NHB 群に比べ PGE1 群では有意に高値を示していた。吸光度の低下勾配は、PGE1 群では HB 群と同様の低下勾配を示し、NHB 群・PRE 群は HB 群に比べ緩やかであった。

### 図4 ミトコンドリア・サイトゾール懸濁液内チトクローム c 濃度

ミトコンドリア内のチトクローム c 濃度は、全群で再灌流により一様に低下した。PGE1 群は、再灌流後 NHB 群に比べて有意に高いチトクローム c 濃度を維持していた。サイトゾール内のチトクローム c 濃度は統計学的有意差を認めなかった。

### 図5 ミトコンドリア懸濁液内蛋白測定 (ウェスタンブロッティング法)

PGE1 群では、他の群に比べ Bax の発現が有意に抑制され、NHB 群では、Bcl-2 の発現が有意に抑制されていた。ミトコンドリア内に p-JNK は検出しなかった。

#### 図6 サイトゾール懸濁液内蛋白測定（ウェスタンブロッティング法）

Bax・Bcl-2共に全群間で発現に差はなかった。NHB群でp-JNK/JNKが上昇し、PRE群では抑えられる傾向にあり、PGE1群ではNHB群に比べ有意に抑制されていた。

#### 図7 ネクロシス面積比率測定

1時間の再灌流後、NHB群で肝細胞の空胞変性や索状構造の破壊などの虚血性変化が著明であり、巣状にネクロシスに陥っている部位が多数認められた。ネクロシス範囲は、前灌流自体で一時的に増加するが、PGE1を添加することで前灌流の間の増加は有意に抑制された。再灌流後、PGE1群ではHB群と同程度まで、NHB群に比べて有意にその増加が抑制された。

#### 図8 TUNEL陽性細胞数

TUNEL陽性細胞数は全群再灌流により有意に増加した。NHB群は、再灌流後にTUNEL陽性細胞数が著明に増加しており、PRE群ではその約半数に抑えられ、PGE1群では、PRE群に比べ更に増加が有意に抑えられていた。

#### 図9 開存類洞面積比

NHB群では冷保存前の開存類洞面積比がHB群に比べて約半分まで減少していた。PRE群・PGE1群は共に、冷保存前にNHB群に比べ有意に高い開存率を示した。又、PGE1群では前灌流後・再灌流後もHB群と同程度の値であった。

9. 図

図1 ラット灌流実験プロトコール・検体採取

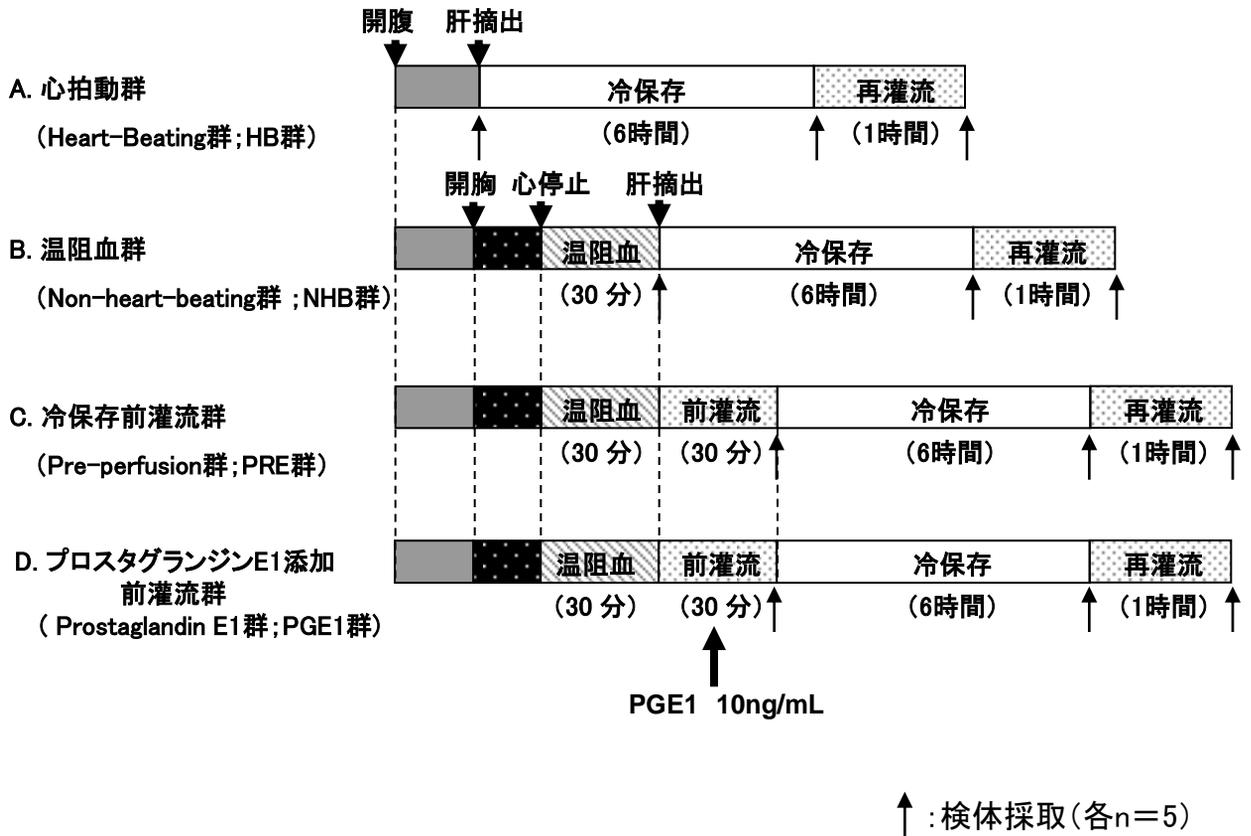
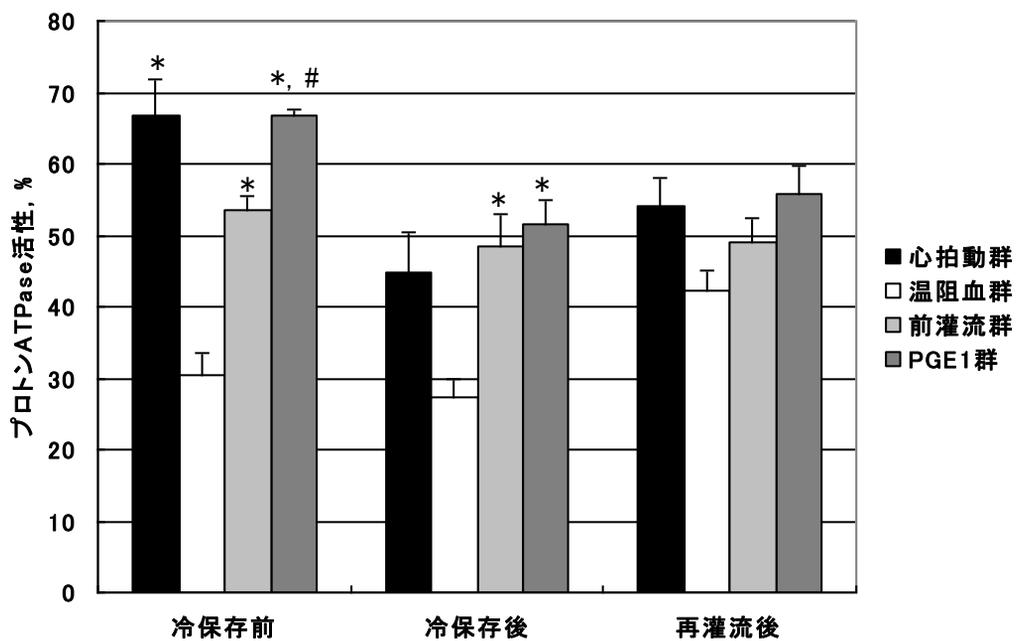


図2 プロトンATPase活性



Data are shown as the mean  $\pm$  SEM. (n=5).

\* P<0.05 vs 温阻血群, # P<0.05 vs 前灌流群

図3 再灌流後ミトコンドリア懸濁液 膨潤測定

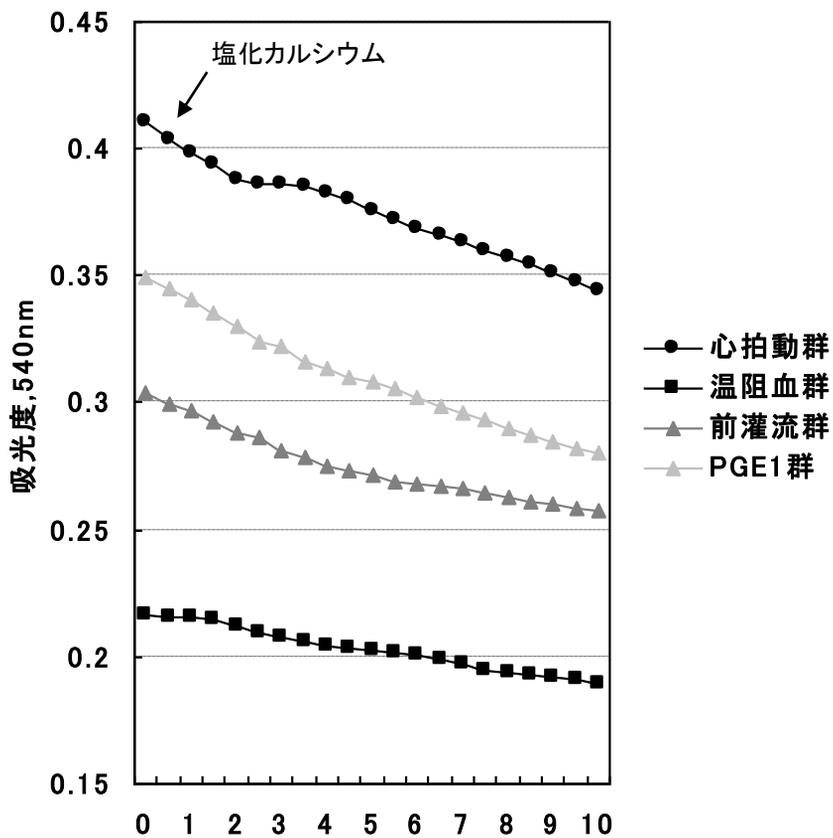
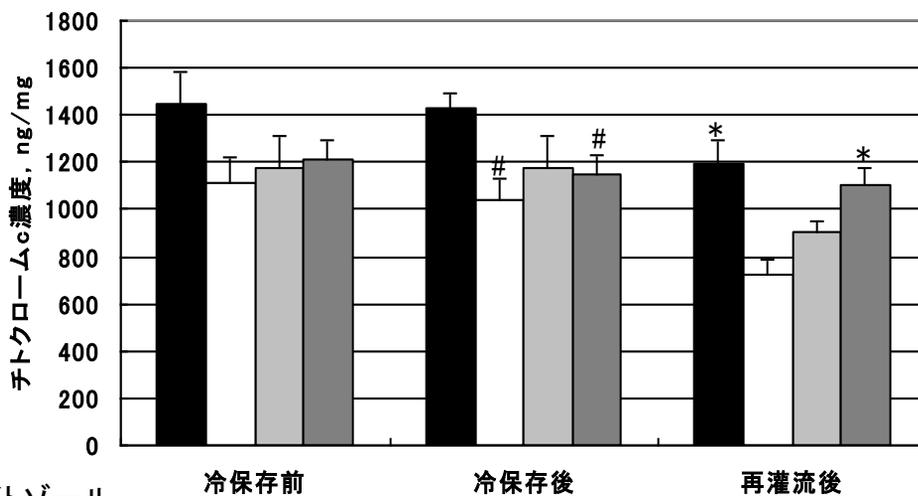
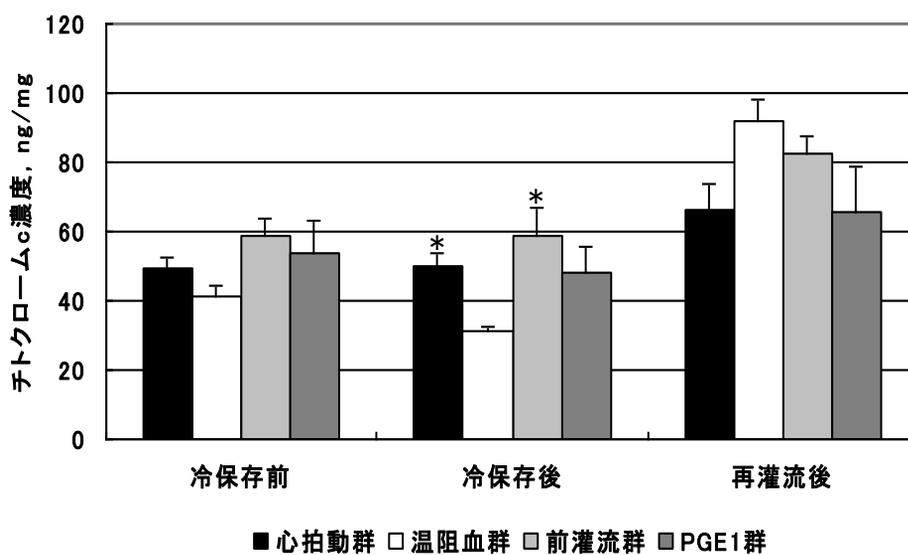


図4 ミトコンドリア・サイトゾール懸濁液内チトクロームc濃度

ミトコンドリア



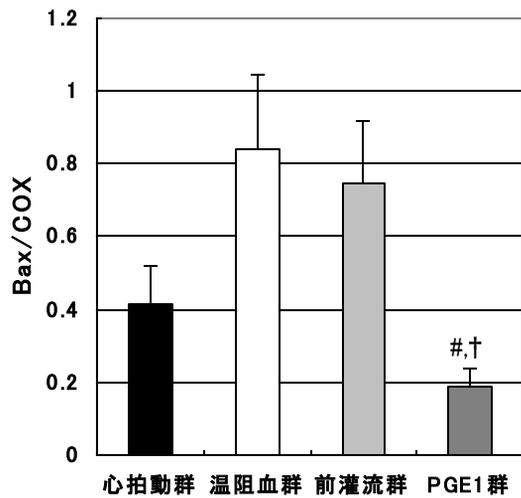
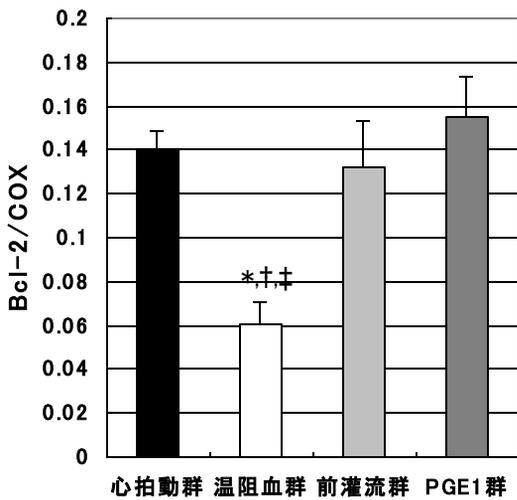
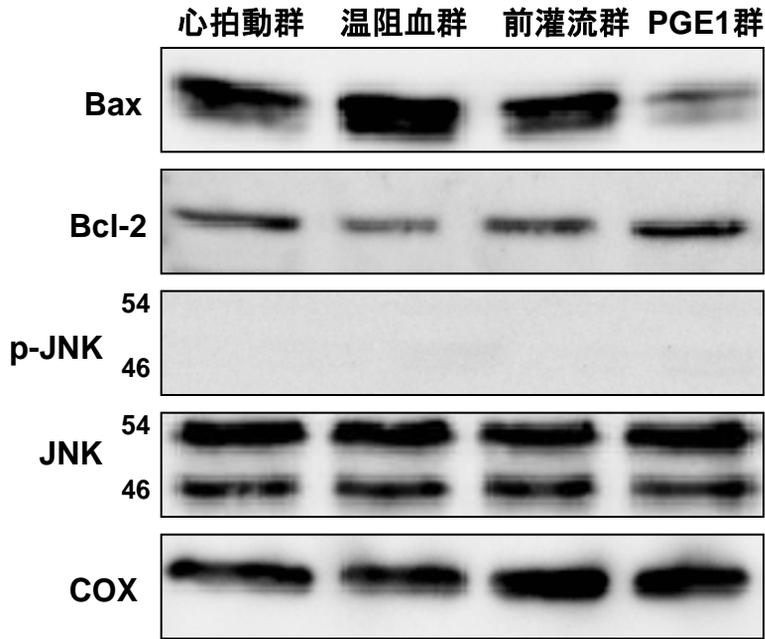
サイトゾール



Data are shown as the mean ± SEM. (n=5).

\* P<0.05 vs 温阻血群, # P<0.05 vs 心拍動群

図5 ミトコンドリア懸濁液内蛋白測定(ウェスタンブロッティング法)

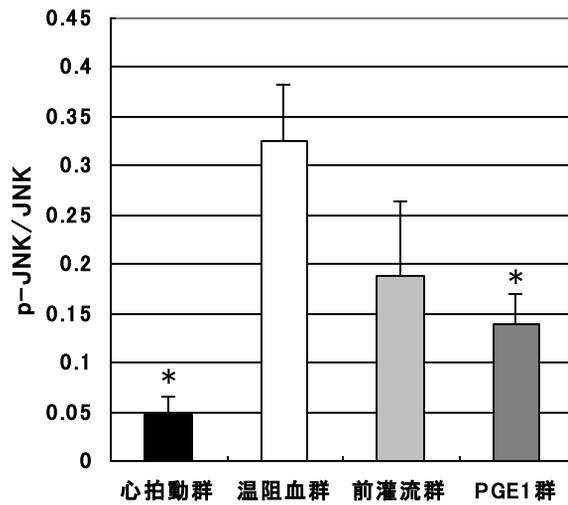
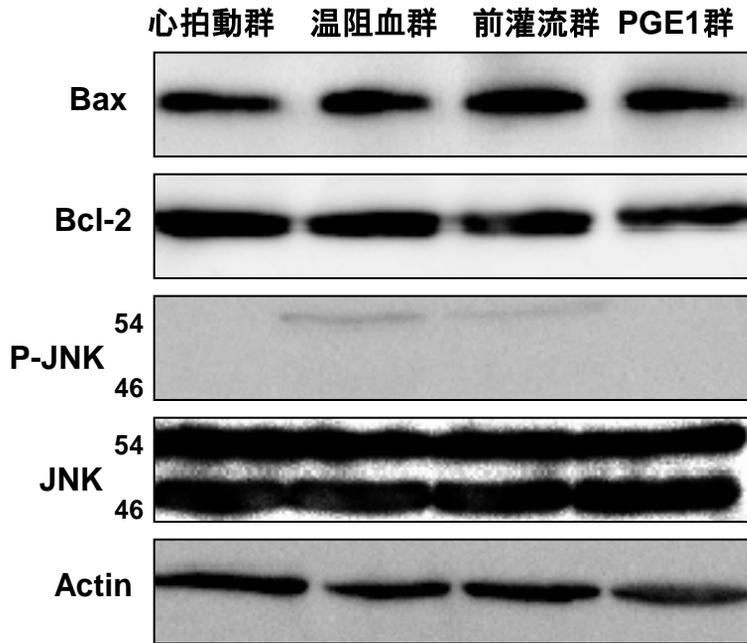


Data are shown as the mean ± SEM. (n=5).

\* P<0.05 vs 心拍動群, # P<0.05 vs 温阻血群

† P<0.05 vs 前灌流群, ‡ P<0.05 vs PGE1群

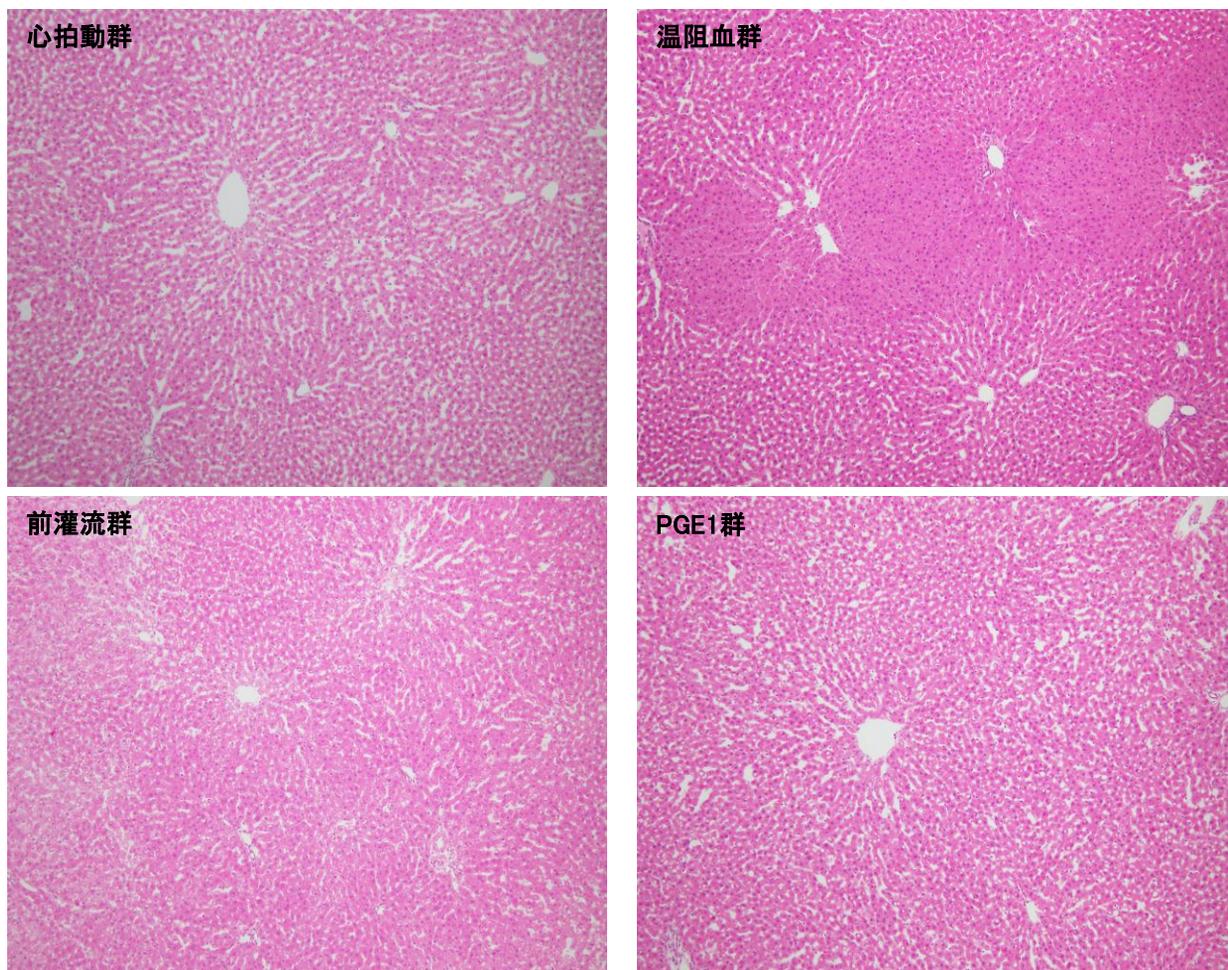
図6 サイトゾール懸濁液内蛋白測定(ウェスタンブロッティング法)



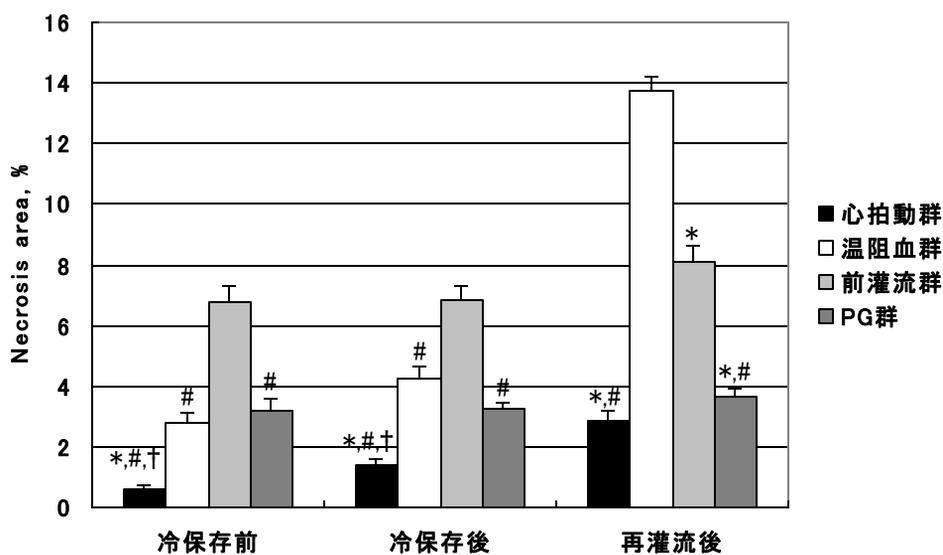
Data are shown as the mean  $\pm$  SEM. (n=5).

\* P<0.05 vs 温阻血群

図7 ネクロシス面積比率測定



再灌流後 HE染色 ×100

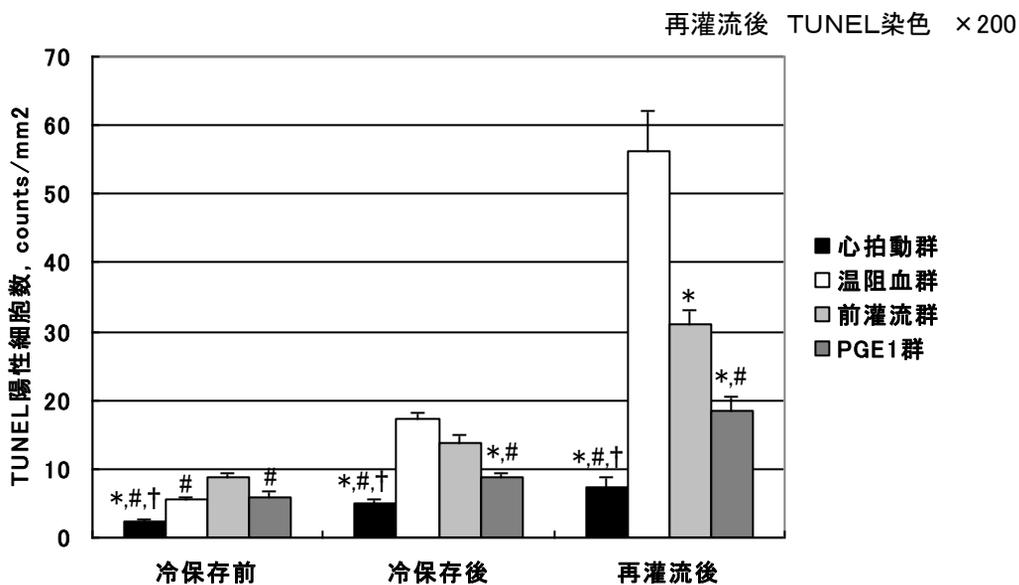
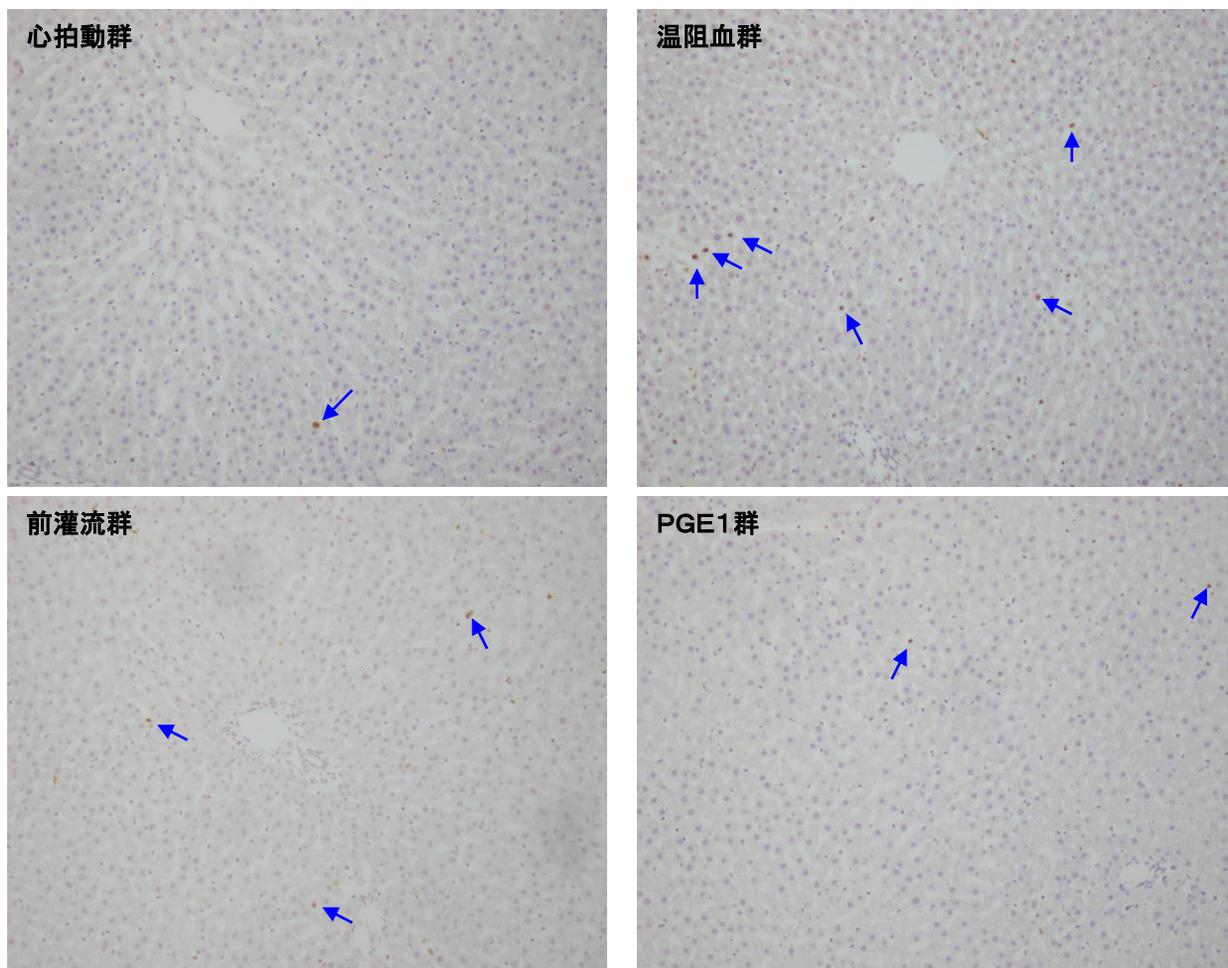


Data are shown as the mean ± SEM. (n=5).

\* P<0.05 vs 温阻血群, # P<0.05 vs 前灌流群

† P<0.05 vs PGE1群

図8 TUNEL陽性細胞数

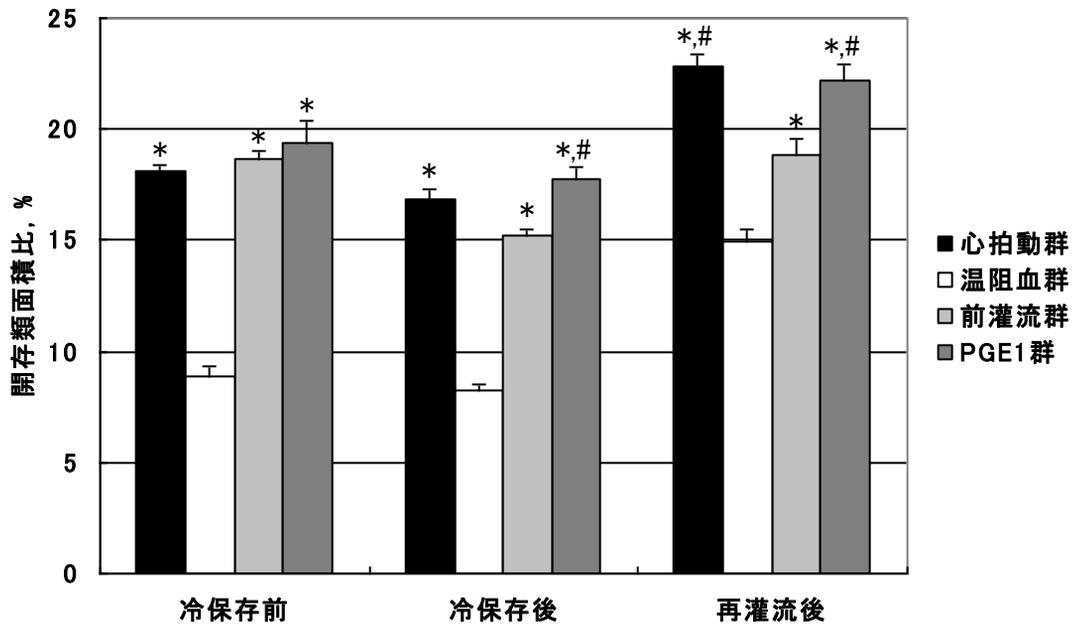


Data are shown as the mean  $\pm$  SEM. (n=5).

\* P<0.05 vs 温阻血群, # P<0.05 vs 前灌流群

† P<0.05 vs PGE1群

図9 開存類洞面積比



Data are shown as the mean  $\pm$  SEM. (n=5).

\* P<0.05 vs 温阻血群, # P<0.05 vs 前灌流群

## 10. 表

表1 再灌流中の門脈流量・胆汁産生量及び再灌流液分析結果

群	心拍動群	温阻血群	前灌流群	PGE1群
門脈灌流量 (ml/g liver)	289.53 ± 25.49	211.59 ± 13.44	236.86 ± 9.64	263.21 ± 15.86
胆汁産生量 ( $\mu$ L/g liver)	34.57 ± 2.93*	24.07 ± 1.69	30.05 ± 1.14	35.30 ± 2.63*
AST (Karmen units)	3.91 ± 0.26*#	7.85 ± 1.10	6.43 ± 0.55	4.46 ± 0.45*
ALT (Karmen units)	2.96 ± 0.15*	4.20 ± 0.31	3.55 ± 0.42	2.59 ± 0.14*
TNF- $\alpha$ (pg/ml)	12.59 ± 0.66*#	22.07 ± 1.76	21.51 ± 1.44	9.77 ± 3.12*
IL-1 $\beta$ (pg/ml)	8.62 ± 1.15*#	16.38 ± 1.17	13.05 ± 1.11	11.60 ± 1.91

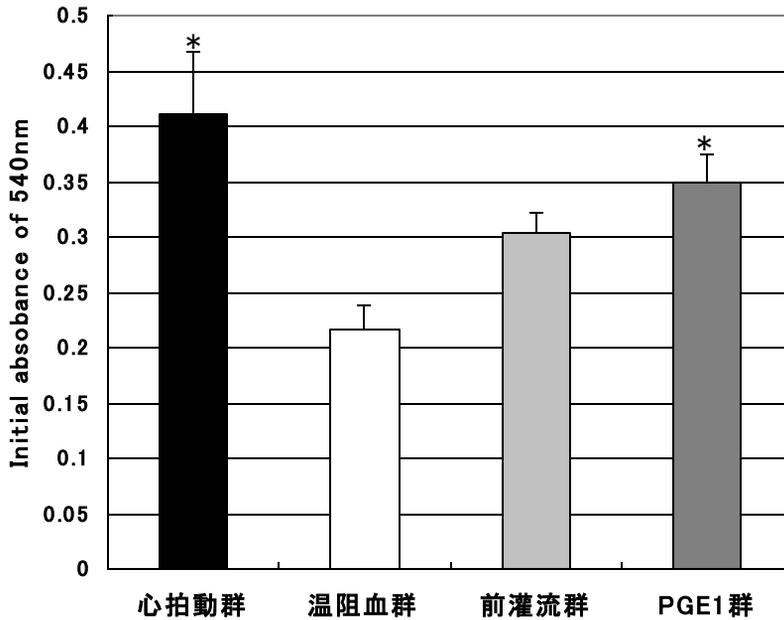
Data are shown as the mean  $\pm$  SEM. (n=5).  
\* P<0.05 vs 温阻血群, # P<0.05 vs 前灌流群

- ・ 門脈灌流量は、統計学的有意差を認めなかった。
- ・ 胆汁産生量は、HB群に比べNHB群で有意に減少し、PRE群で増加傾向を認め、PG群ではHB群と同程度まで、NHB群に対し有意に増加した。
- ・ AST値は、NHB群・PRE群では心拍動群に比べ有意に上昇していた。PG群ではNHB群に比べ有意にAST/ALT値の上昇が抑えられていた。
- ・ TNF- $\alpha$ 濃度は、HB群に比べNHB群・PRE群で有意に上昇し、PGE1群ではHB群と同程度まで、NHB群に比べ有意に上昇が抑えられていた。
- ・ IL-1 $\beta$ 濃度は、HB群に比べNHB群・PRE群で有意に上昇していた。





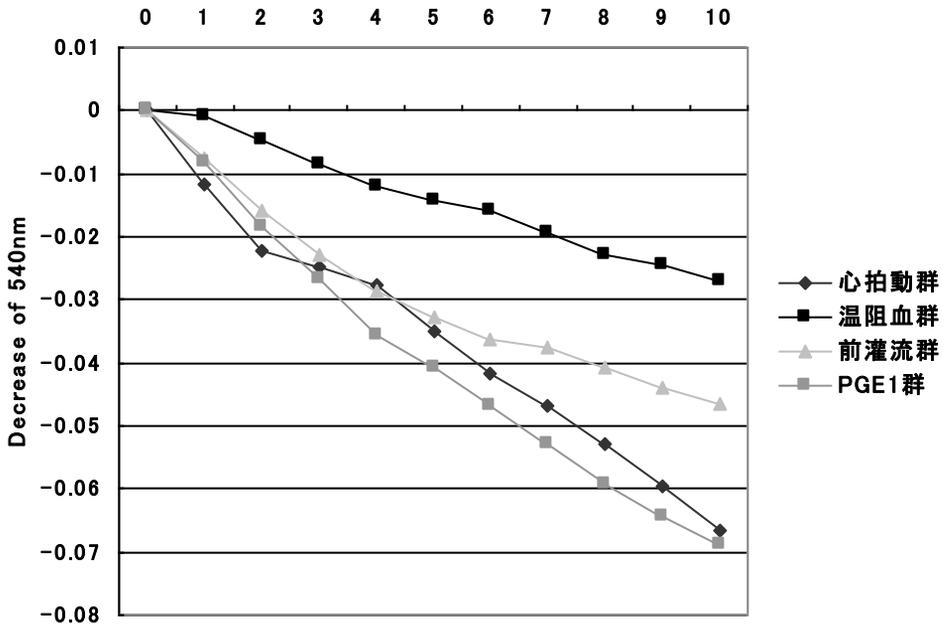
図3-1 再灌流後ミトコンドリア懸濁液 吸光度初期値



Data are shown as the mean ± SEM. (n=5).

\* P<0.05 vs 温阻血群

図3-2 再灌流後ミトコンドリア懸濁液 膨潤測定結果



Prots are shown as the mean. (n=5).

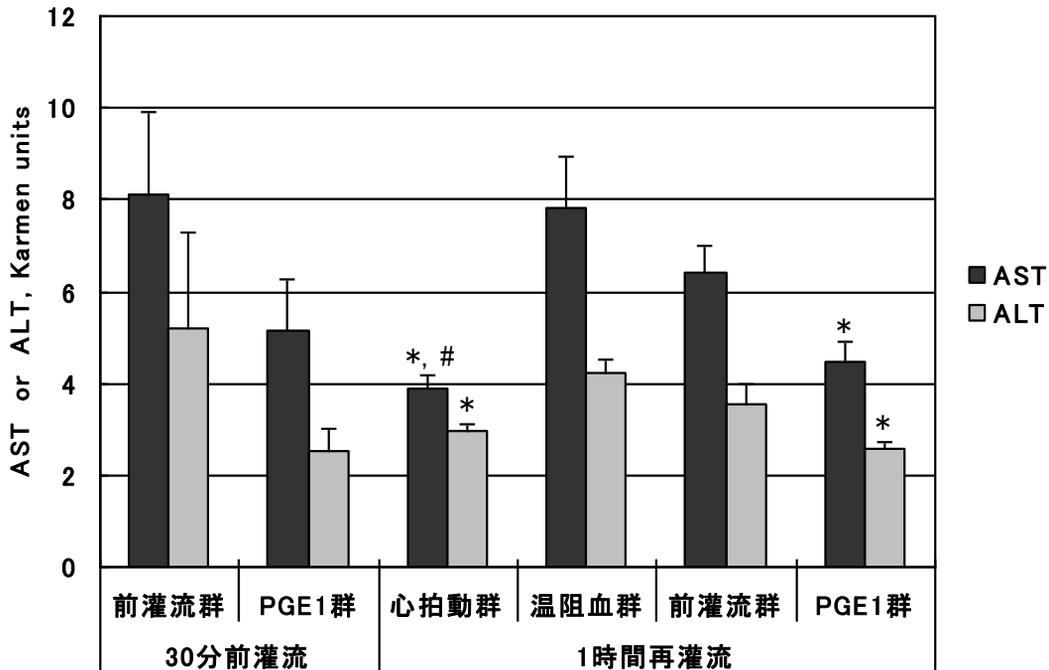
## 10. 表

表1. 門脈灌流量, 胆汁產生量

	Group	門脈灌流量 (ml/g liver)	胆汁產生量 ( $\mu\text{L/g liver}$ )
30分前灌流	前灌流群	101.51 $\pm$ 7.68	11.79 $\pm$ 1.84
	PGE1群	124.64 $\pm$ 10.62	14.19 $\pm$ 1.17
1時間再灌流	心拍動群	289.53 $\pm$ 25.49	34.57 $\pm$ 2.93 *
	溫阻血群	211.59 $\pm$ 13.44	24.07 $\pm$ 1.69
	前灌流群	236.86 $\pm$ 9.64	30.05 $\pm$ 1.14
	PGE1群	263.21 $\pm$ 15.86	35.30 $\pm$ 2.63 *

Data are shown as the mean  $\pm$  SEM. (n=5). \* P<0.05 vs 溫阻血群

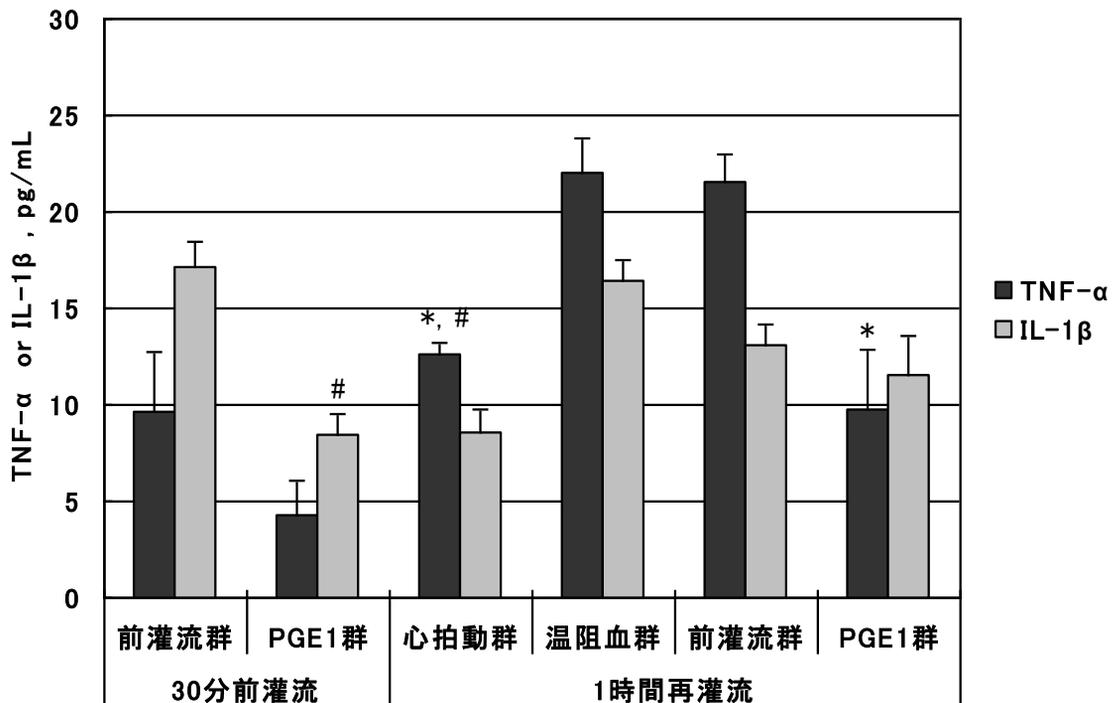
図2 灌流液中肝逸脱酵素



Data are shown as the mean  $\pm$  SEM. (n=5).

\* P<0.05 vs 温阻血群, # P<0.05 vs 前灌流群

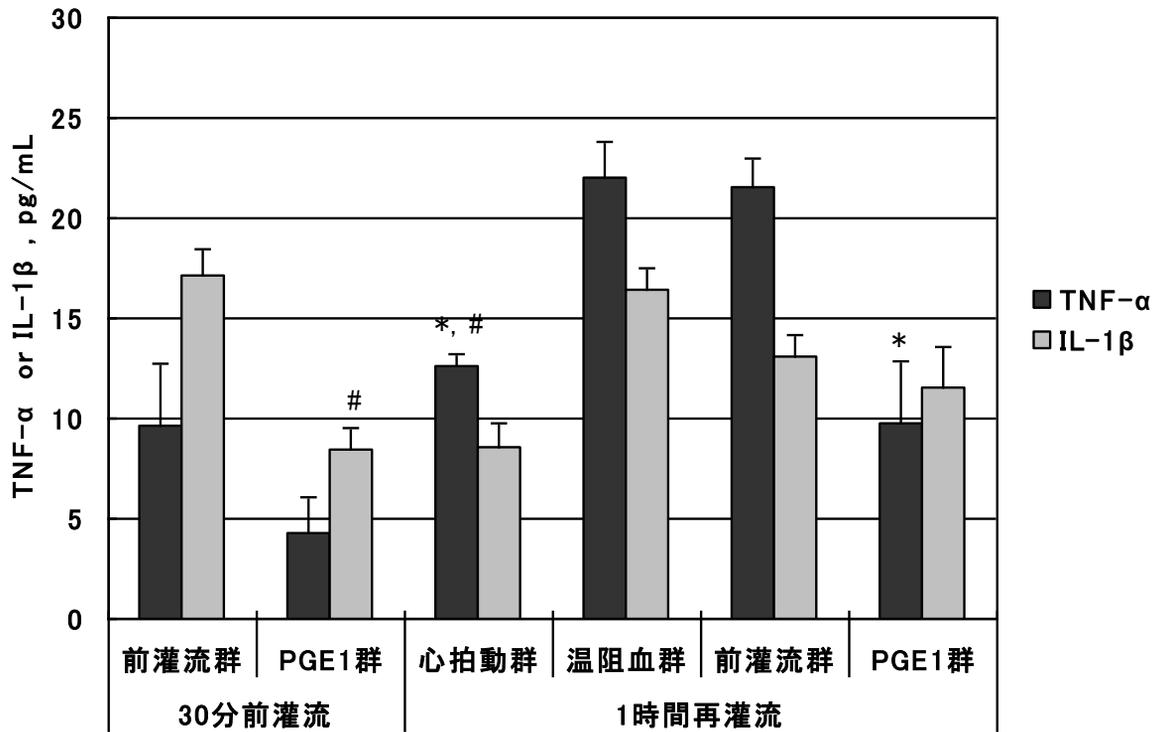
図3 灌流液中炎症性サイトカイン



Data are shown as the mean  $\pm$  SEM. (n=5).

\* P<0.05 vs 温阻血群, # P<0.05 vs 前灌流群

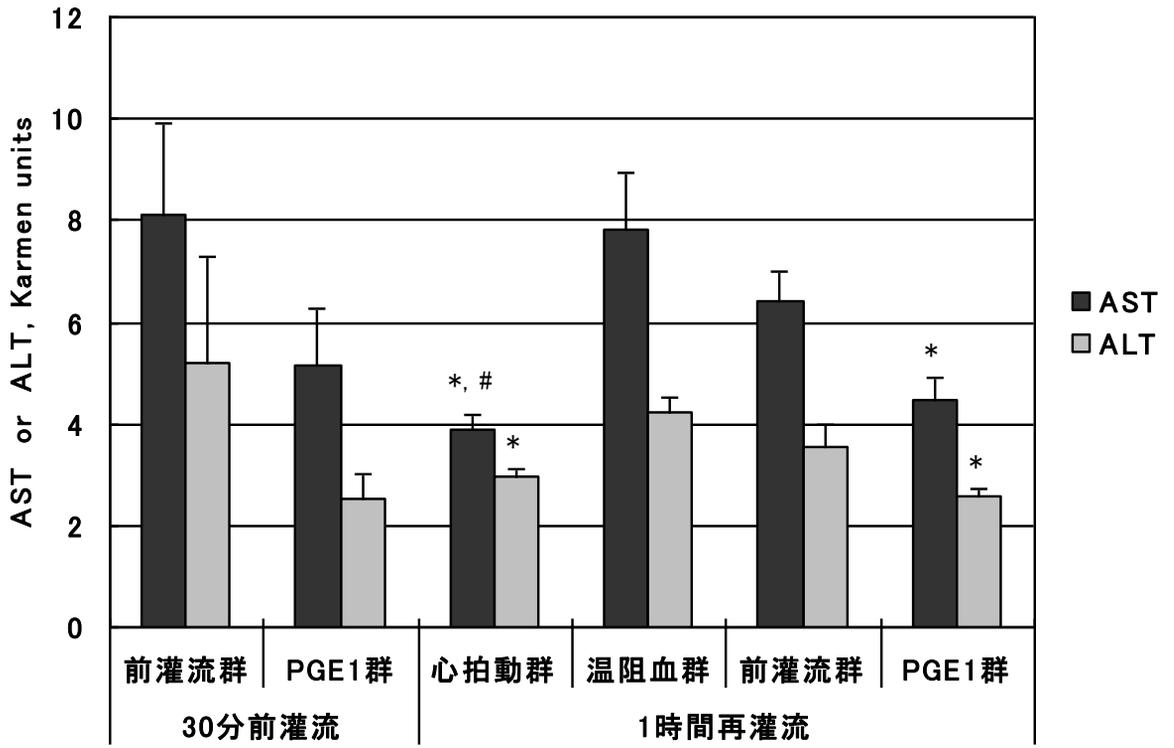
図3 灌流液中炎症性サイトカイン



Data are shown as the mean  $\pm$  SEM. (n=5).

\* P<0.05 vs 温阻血群, # P<0.05 vs 前灌流群

図2 灌流液中肝逸脱酵素



Data are shown as the mean  $\pm$  SEM. (n=5).

\* P<0.05 vs 温阻血群, # P<0.05 vs 前灌流群

図6-1 ミトコンドリア内チトクロームc

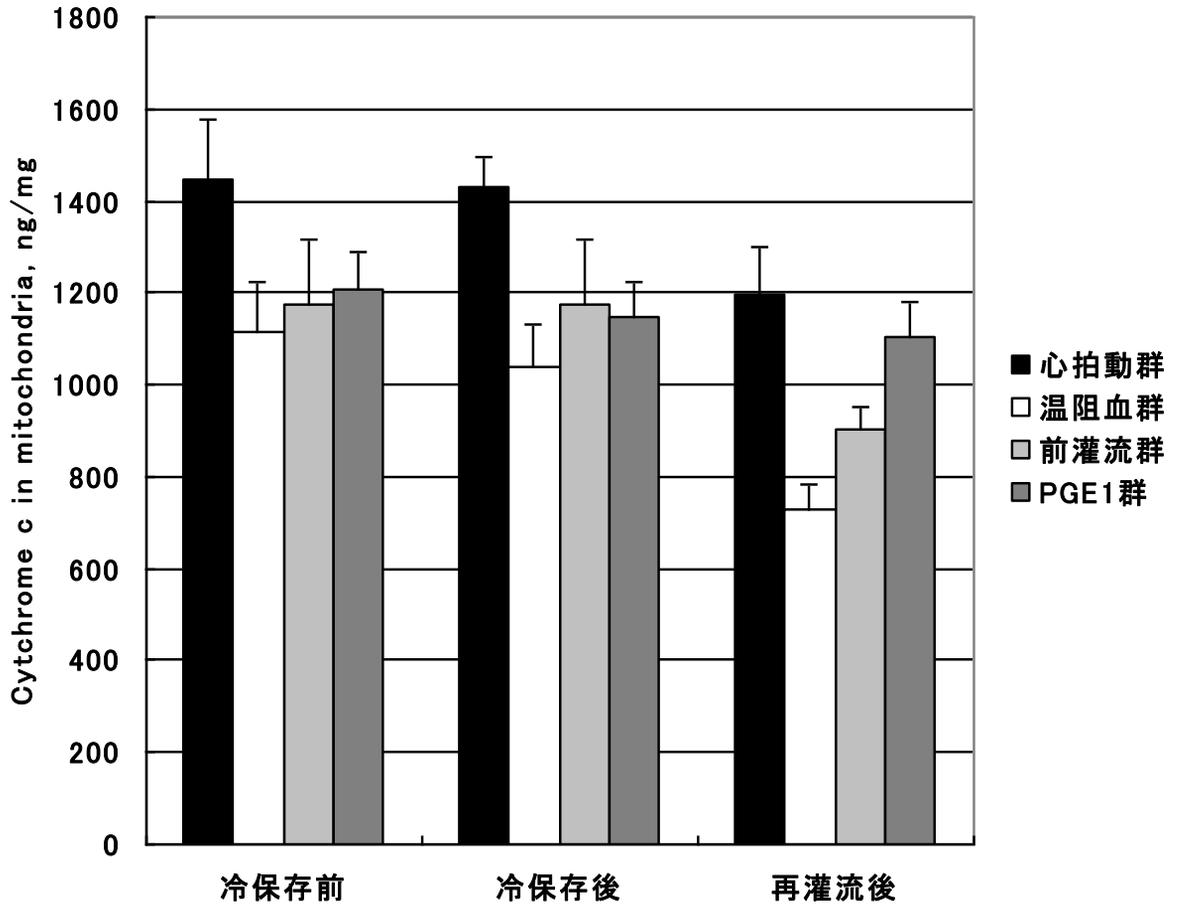


図6 - 2 サイトゾール内チトクロームc

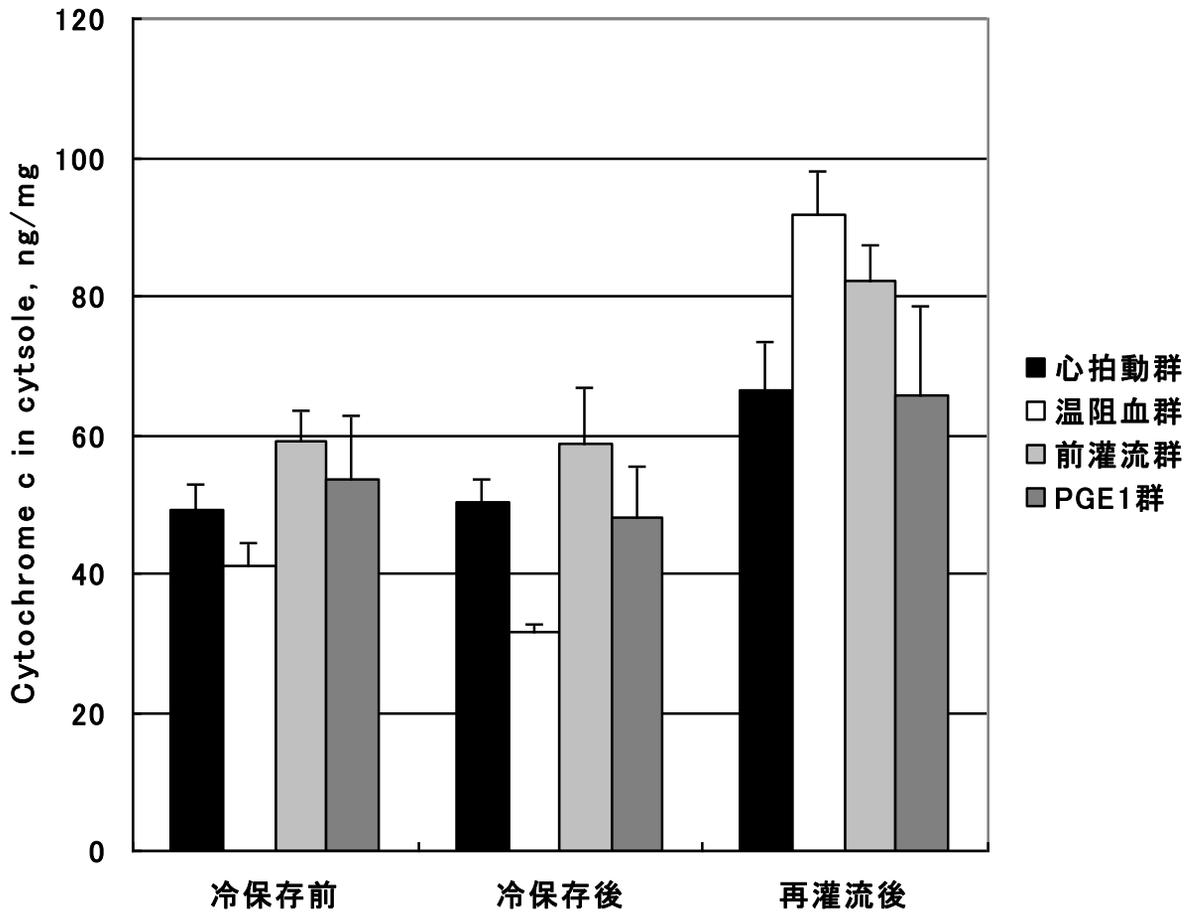


图7 TUNEL陽性細胞数

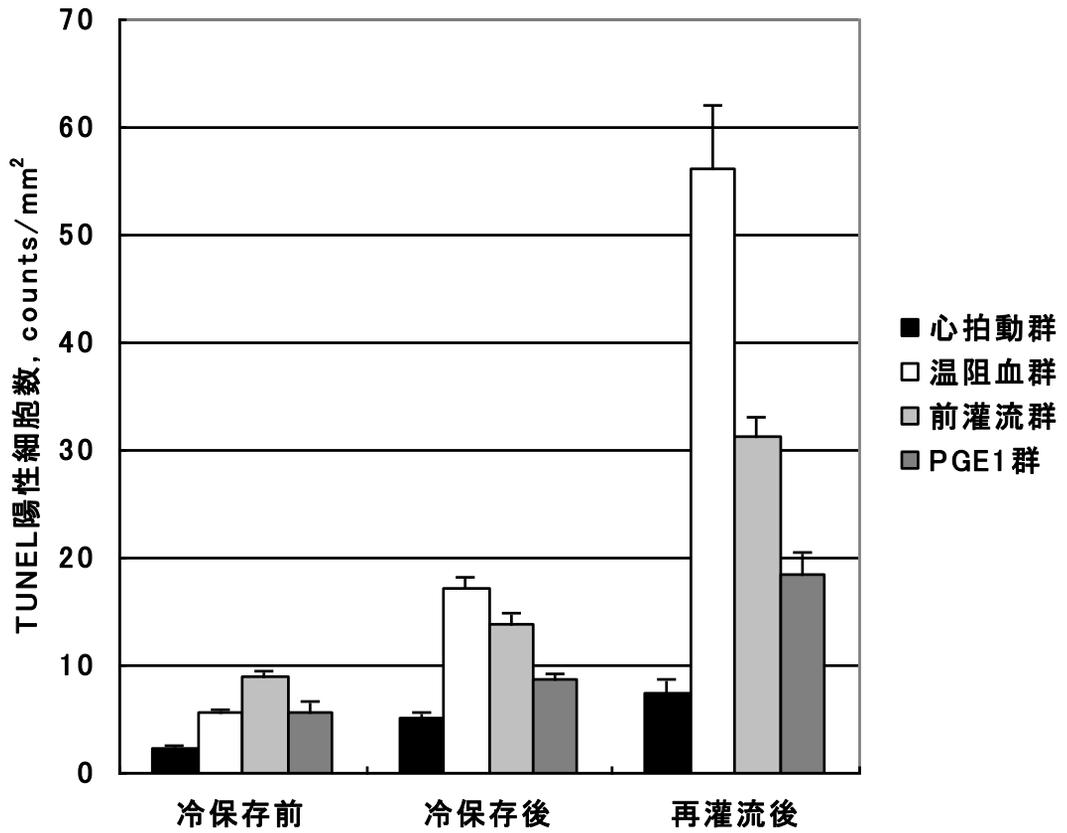


圖8 Necrosis範圍測定結果

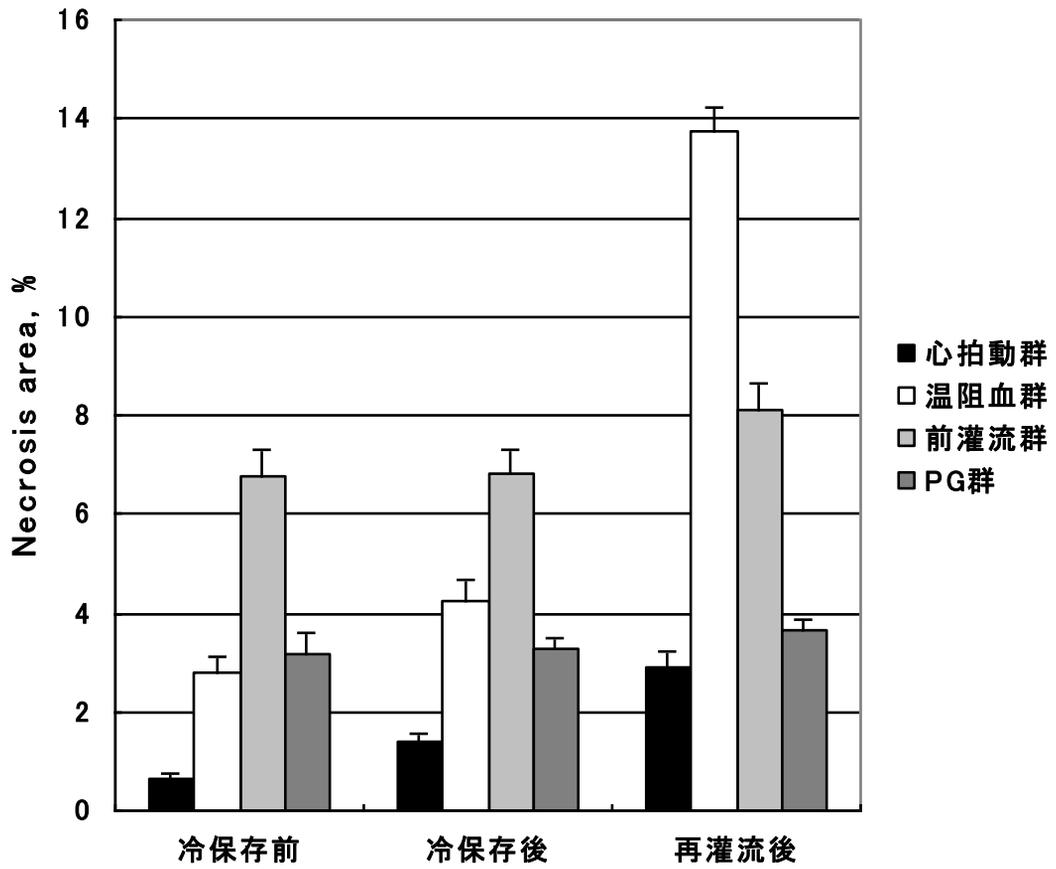
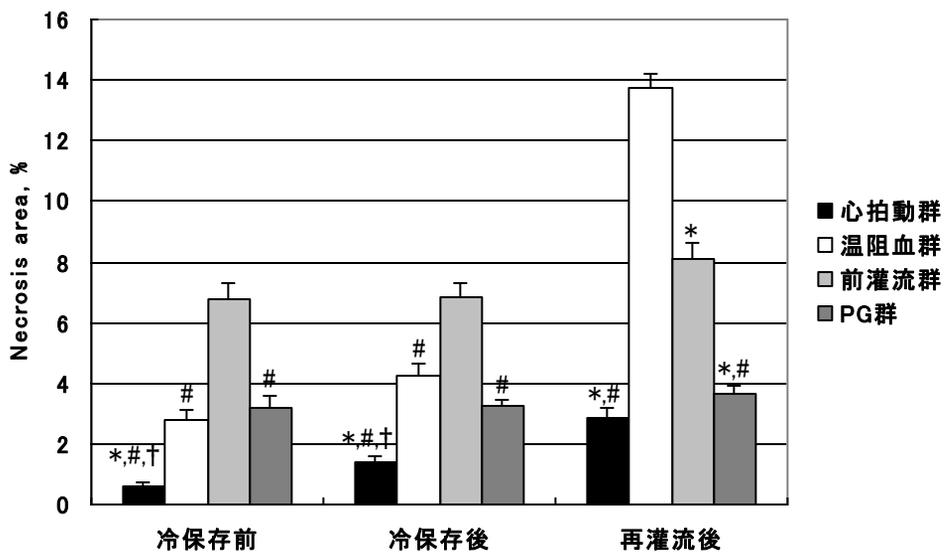
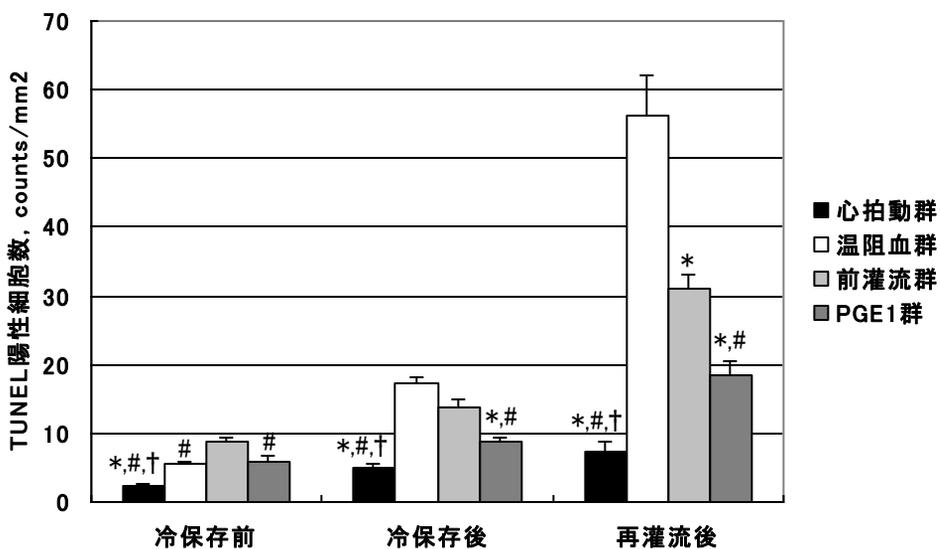


图7 Necrosis範圍測定結果



Data are shown as the mean  $\pm$  SEM. (n=5).  
 \* P<0.05 vs 温阻血群, # P<0.05 vs 前灌流群  
 † P<0.05 vs PGE1群

图8 TUNEL陽性細胞数



Data are shown as the mean  $\pm$  SEM. (n=5).  
 \* P<0.05 vs 温阻血群, # P<0.05 vs 前灌流群  
 † P<0.05 vs PGE1群