

## 5. 腎虚血と生化学的モニタリング (阻血腎の viability と阻血腎の保護手段)

山田 一夫\*

### 1. はじめに

腎血管系は、栄養血管としてよりも機能的血管としての役割が大きい。腎循環は、全身循環の調節、尿生成、体液調節に働く腎機能に密接に関係している。この腎の多様な機能発現のためには腎構築細胞の構造と機能を正常に維持する必要がある、したがって栄養血管の障害は全身に重大な障害を及ぼす。

腎循環障害としては、内科的には心拍出量の低下(心不全、心包炎など)、細動脈収縮(動脈硬化、血漿 argiotensin II の二次の上昇など)、循環血漿量の減少(ショック、出血、肝硬変の腹水など)などの虚血性疾患がある。一方、外科的には腎移植手術、腎結石に対する腎切開術、腎血管性疾患に対する血行再建術、腎腫瘍の腎部分切除などの時に、腎は血行遮断を余儀なくされ、腎虚血に陥る。循環障害が起これば、当然細胞は機能的、構造的細胞障害を受ける。また血行が再開された後にもさらに細胞は障害を受けることが知られている<sup>1)</sup>。虚血時あるいは血流再開後の細胞障害機構については、フリーラジカル説をはじめ多くの説がある<sup>2)</sup>が、その詳細については不明な点が多い。

腎虚血に対する生化学的モニタリングの研究は腎移植、特に死体腎保存の研究の中に多く見られる。ここではわれわれが行ってきた阻血腎の viability の判定とその保護手段の実験を主に紹介したい。

### 2. 阻血腎の viability の判定

現在わが国では生体腎移植が主流であるが、諸

外国のような死体腎移植される例が増加している。

死体腎移植において温阻血時間の長さが移植腎の予後を決定する重要な因子があり、したがって死戦期および死亡より低温灌流冷却を行うまでの期間の温阻血による腎の viability 低下を判定することは臨床的に重要である。摘出腎の viability の判定方法は次の2つに大別される。

#### a. 腎組織の生化学的モニタリング

Calman<sup>3)</sup>は腎組織中のATPを主とする adenine nucleotide (AN) を測定し、温阻血時間とともに腎組織中のAN濃度が低下することを示した。このようにエネルギー代謝と関係した判定方法として細胞内ATP, energy charge, 細胞内酸化還元状態を示す NAD/NADH (あるいは pyruvate/lactate), 代謝産物である xanthine, hypoxanthine の測定がある。われわれはラット腎を用い阻血腎の viability の判定には阻血血流再開後のATP再合成能が良い指標になることを報告した<sup>4)</sup>。これは以下の実験結果による。ラット腎温阻血時間の長さによる生存率(表1)から、ラット腎温阻血許容時間(critical point)は90分であった。温阻血時間と血流再開後の腎組織内ATPレベルの経時的变化を図1に示す。ATPレベルは阻血により急激に減少する。一定時間後に血流を再開させるとATPレベルの回復がみられるが、阻血90分以後でのATP回復速度は遅く、しかも低い値で平衡に達している。この結果から、温阻血腎のATP再合成能からみた腎機能回復の許容時間は90分と指定され、生存率のcritical point 90分とよく一致した。

以上の結果は、血流再開後の酸化的リン酸化によるATP生成に必要な腎ミトコンドリアの機能

\* 広島大学医学部生化学第一教室

表 1. 温阻血腎ラットの生存率<sup>3)</sup>

Warm ischemia time (min)	Survival rate	%
0	5/5	100
30	5/5	100
60	10/10	100
90	11/20	55
120	0/17	0
150	0/10	0

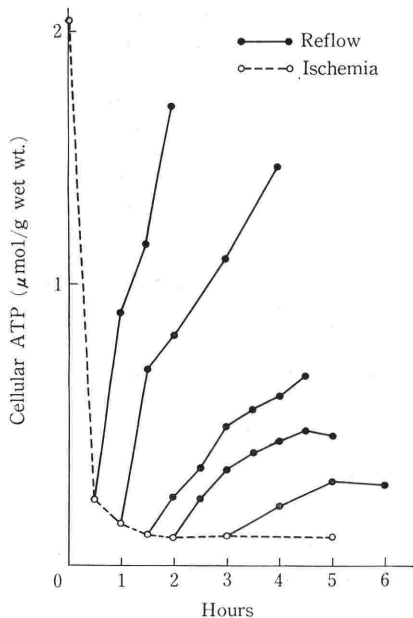


図 1. 温阻血の腎組織ATPの変動<sup>4)</sup>

維持が阻血腎の viability を反映することを示唆する。

**b. 灌流液の生化学的モニタリング**

腎組織自体の採取を必要とする viability の判定法は臨床応用が困難である。そのために摘出腎灌流液を分析する方法が用いられる。灌流液中の NAD/NADH<sup>5)</sup>, 乳酸, グルコース(腎は肝とともに糖新生能力をもつため), 細胞膜障害により逸脱する乳酸脱水素酵素 (LDH)<sup>6)</sup>, alkaline phosphatase, N-acetyl-B-D-glucosamidase (NAG) 酵素活性<sup>7)</sup>, さらに逸脱物質としての myoinositol<sup>8)</sup>, などを測定する。このうち、よく用いられるのはLDH活性の測定である。

腎組織中の AN は, inosine monophosphate, inosine を経て, さらにhypoxanthine (Hx), xanthine に代謝される。そこでわれわれは, この腎

表 2. 温阻血時間と灌流液中のヒポキサンチン+キサンチン濃度<sup>10)</sup>

WIT <sup>a</sup> (min)	Amounts of hypoxanthine and xanthine (μmol/g wet weight)	
	First perfusate <sup>b</sup>	Total perfusate <sup>c</sup>
0 (n = 4)	0.021 ± 0.009	0.074 ± 0.027
30 (n = 6)	0.094 ± 0.012	0.258 ± 0.067
60 (n = 5)	0.146 ± 0.013	0.472 ± 0.155
120 (n = 6)	0.188 ± 0.075	0.509 ± 0.163

<sup>a</sup>Warm ischemic time. <sup>b</sup>0 to 1 ml/g wet weight. <sup>c</sup>0 to 6 ml/g wet weight.

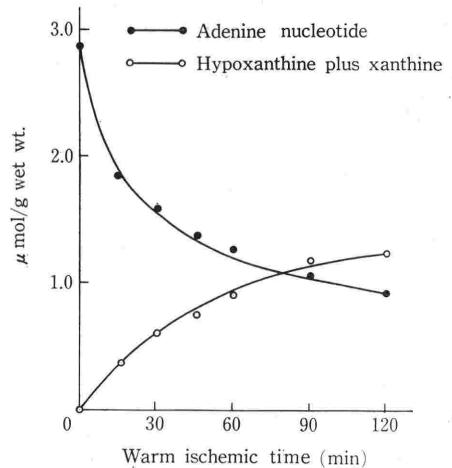


図 2. 温阻血による腎組織中のアデニンスクレンオチドとヒポキサンチン+キサンチン濃度の経時的変化<sup>10)</sup>

灌流液中の Hx, xanthine 濃度測定により温血腎の viability を判定できる可能性を検討した。図 2 に示すように, 腎組織中の AN が温阻血により減少し, ちょうど mirror image の関係において, その分解産物である Hx, xanthine の増量を認めた。この結果を定量的に表 2 に示すと, 間接的ではあるが, 腎 AN の減少と灌流液中の Hx, xanthine 増加がきわめてよく相関することがわかった。特に温阻血腎の初灌流液中の Hx, xanthine 濃度が高く, 正確に測定可能であるので, この測定を腎の viability 判定の指標として利用しうる可能性がある<sup>10)</sup>。

その他, 阻血障害により腎細胞は浮腫に陥り, 末梢血管抵抗が上昇することが知られている。このことを応用した灌流量量, 灌流圧の測定から viability を判定する方法<sup>9)</sup>もある。

### 3. 阻血腎の細胞障害に対する保護手段

腔移植に関して阻血腎の細胞障害に対する保護手段として、次の2つのstepを考える必要がある。すなわち温阻血腎に対する保護手段と摘出腎の保護手段である。

#### a. 温阻血腎の細胞障害に対する保護手段

死体腎移植の場合、死亡直後より腎摘出まで必ず温阻障害が加わる。したがって死体腎移植の成績を向上させるためには、Clarkらの報告<sup>11)</sup>しているように、温阻血時間の短い摘出腎のみを移植するか、あるいは温阻害による組織障害を防御、軽減させる処置が必要となる。この処置は死体腎移植の時のみならず、生体腎移植あるいは血行遮断を伴う外科的手術による阻血の細胞障害の軽減にも役立つ。ある種の手術では血流遮断に伴う腎障害を防ぐ目的で、局所冷却法<sup>12)</sup>による腎低温手術が行われている。一方、温阻血障害を軽減させ、阻血許容時間を延長させる目的で種々の薬剤による前処置の実験が行われている。使用する薬剤の種類により、①利尿剤<sup>13~15)</sup>、②血管作動薬剤<sup>16,17)</sup>、③代謝抑制剤またはエネルギー基質<sup>18~20)</sup>、④生体膜安定剤<sup>21~23)</sup>、⑤その他<sup>24)</sup>、に分類される。このうち現在のところ温阻血障害軽減の有効性があるといわれているのは、利尿剤 mannitol, furosemide, 生体膜安定剤 corticosteroid などである。しかしこれらの薬剤もその作用機序の不明な点が多く、温阻血障害軽減作用の有効性が疑問視されている<sup>25~27)</sup>。

一般的に虚血による組織障害は虚血時よりもむしろ血流再開後に障害が大きいとされている<sup>1,2)</sup>。これは酸素再供給により生成する過酸化脂質による生体膜障害に原因があると考えられ<sup>28)</sup>、われわれも脳、肝虚血について証明した<sup>29,30)</sup>。そこで抗酸化作用を有する  $\alpha$ -tocopherol ( $\alpha$ -Toc), coenzyme Q<sub>10</sub> (CoQ<sub>10</sub>) に注目し、ラット腎温阻血組織障害に対する保護作用について検討した<sup>31)</sup>。表3と4に示すように、 $\alpha$ -Toc, CoQ<sub>10</sub> の前投与は、対照群で生存例が得られなかった阻血120分群の生存率を著明に増加させた。さらに、前述の阻血腎 viability の指標としての血流再開後ATP再合成能を調べると、阻血120分血流再開60分後のATP再合成能を促進した(図3,4)。

表3. 温阻血腎ラット生存率に及ぼす  $\alpha$ -Tocopherol 投与の効果<sup>31)</sup>

Warm ischemia time (min)	Survival rate				
	Placebo group	%	$\alpha$ -Tocopherol group	%	P
90	8/15	53.3	11/16	68.8	NS
120	0/14	0	7/15	46.7	<0.005
150	0/10	0	2/10	20.0	NS

表4. 温阻血腎ラット生存率に及ぼす CoQ<sub>10</sub> 投与の効果<sup>31)</sup>

Warm ischemia time (min)	Survival rate				
	Placebo group	%	CoQ <sub>10</sub> group	%	P
90	6/10	60.0	10/15	66.7	NS
120	0/11	0	7/15	46.7	<0.005
150	0/5	0	0/5	0	NS

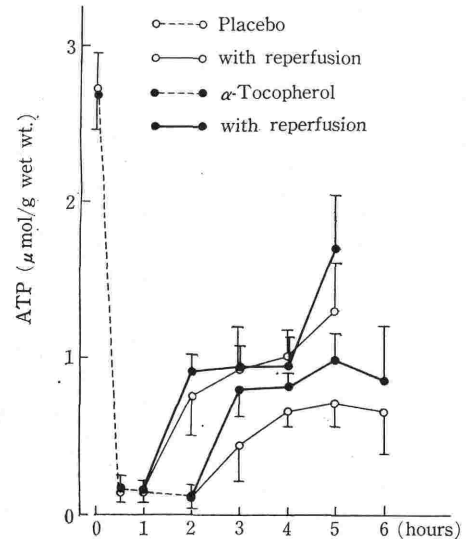


図3. 温阻血の腎組織ATPの変動に及ぼす  $\alpha$ -Tocopherol 投与効果<sup>31)</sup>

温阻血120分後の腎機能の指標として生存ラットにおける血清 creatinine (S-Cr) 値の術後変動をみると、対照群は術後2日目まで3/13 (23.1%) のみが生存し、この生存3例の平均 S-Cr 値はきわめて高い、一方  $\alpha$ -Toc, CoQ<sub>10</sub> 投与群では術後2日目で生存率はそれぞれ6/10 (60%), 5/10 (50%) であり、S-Cr 値も対照群に比し有意に低値であった。その後も投与群の約半数が生存し、S-Cr

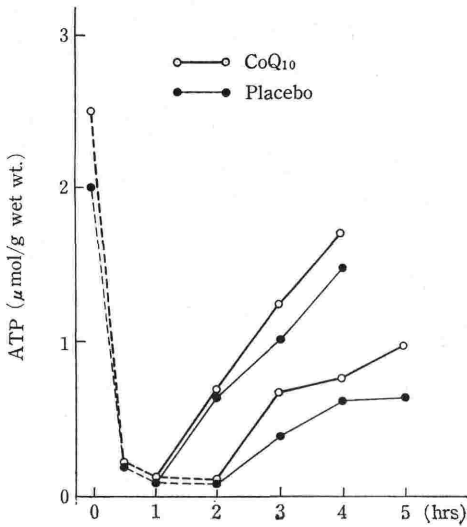


図 4. 温阻血の腎組織ATPの変動に及ぼす CoQ<sub>10</sub> 投与効果

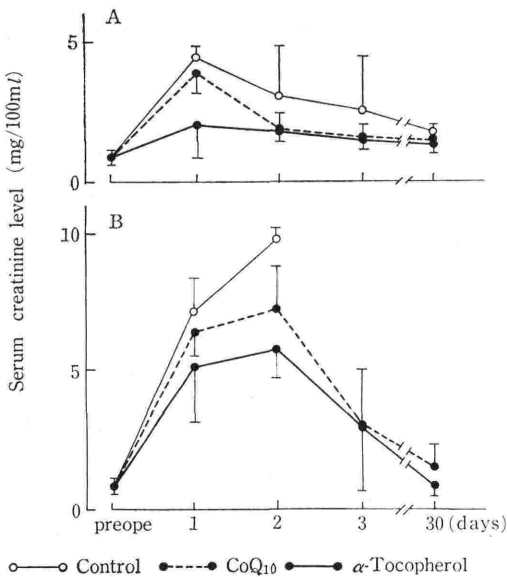


図 5. 温阻血腎ラットの血清クレアチンの変動<sup>31)</sup>  
A: 温阻血60分ラット B: 温阻血120分ラット

値も術後30日ではほぼ正常値まで復している (図5). すなわち α-Toc, CoQ<sub>10</sub> 投与は有意の差で温阻血につづく血流再開に伴う腎機能障害を軽減させ、温阻血腎ラット生存率を増大させることが判明した.

**b. 摘出腎保存手段**

腎組織の代謝を抑制する種々の方法のなかで、低温法がもっとも有効かつ生理的に代謝を抑制す

る. したがって摘出腎保存の手段としては、Belzer ら<sup>32)</sup>による高流量の低温持続灌流保存、Collins ら<sup>33)</sup>による低温浸漬保存が中心である. 長時間保存法としては灌流保存法が優るが特別な装置を必要とする難点がある. いずれの方法も初灌流を行う. そのため初灌流、維持灌流液の組成は Collins' 液<sup>33)</sup>に代表される細胞内類似電解質組成のものなど、種々の工夫がなされている. すなわち、保存腎の生存期間を延長させるために、灌流液の電解質組成、pH、浸透圧などの検討、血漿成分 (cryoprecipitated plasma, plasma protein fraction, albumin solution, silica gel fraction) を利用する各種灌流液の生成、各種薬物の添加 (citrate, inosine, hydrocortisone)、酸素運搬能を高める工夫 (酸素飽和, fluorocarbon 添加) など試みられている. さらに保存腎の循環系に留意しての灌流液量および灌流圧も検討されているが、その効果は報告者によって一定でなく、現在でも確立された方法はないといえる. なお現在、保存腎の許容時間は3~5日とされている.

**4. おわりに**

腎虚血について腎移植を中心に述べてきたが、その生化学的モニタリングは他の虚血臓器のモニタリングと共通している部分が多い. すなわち、虚血によるエネルギー代謝障害程度を知るための組織 ATP レベルの測定、ミトコンドリア機能の測定、灌流液中の代謝中間産物の測定や、血清中への逸脱酵素の測定などである. しかし、他の臓器と比べ腎は構造的にも機能的により不均一性のある臓器であるために、他の虚血臓器で得られた実験結果がそのまま腎虚血で得られない場合もある<sup>35)</sup>点を留意すべきである. なお、腎臓器全体機能を非侵襲的に知ることができ NMR がモニタリングとして有望視されている<sup>34)</sup>、臨床応用には装置の開発を含めて検討すべき点が多い.

虚血による細胞障害機構を明らかにすることはその予防と治療に役立つ、しかし現在のところ、その詳細は不明であるが、自験例 (肝, 脳)<sup>29, 30)</sup>を含めフリーラジカル障害説が有力である. 逆に虚血臓器を保護する薬物からその機構を知ることでも可能であり、種々の臓器の細胞障害機構が同じだとすれば、脂溶性抗酸化剤である CoQ<sub>10</sub>, α-Toc の虚血腎<sup>4, 31)</sup>, 肝<sup>29)</sup>, 心<sup>36, 37)</sup>, 脳障害<sup>30, 38)</sup>保

護作用は、臨床応用上の可能性から考え、非常に興味深い。また作用点は異なるが、ATP-MgCl<sub>2</sub>が腎<sup>20)</sup>、肝<sup>39)</sup>、sepsis<sup>40)</sup>、などの虚血障害を保護するという事も臨床応用上重要であろう。

## 文 献

- 1) Vogt, M. T. and Farber, E. : On the molecular pathology of ischemic renal cell death. *Amer. J. Path.* **53** : 1~26, 1968.
- 2) 早石 修, 八木国夫, 五島雄一郎 監修: 虚血と細胞障害—活性酸素, フリーラジカル—. 医歯薬出版, 東京, 1980.
- 3) Calman, K. C. : The prediction of organ viability. I. An hypothesis. *Cryobiology*, **11** : 1~6, 1974.
- 4) Tatsukawa, Y., Dohi, K., Yamada, K., Kawasaki, T. : The role of coenzyme Q<sub>10</sub> for preservation of the rat kidney. A model experiment for kidney transplantation. *Life Sci.* **24** : 1309~1314, 1979.
- 5) 雨宮 浩, 松尾好祥, 本宮善煇, 新谷 聡, 岡島英五郎, 金子佳照, 伊集院眞澄, 榊原 泉, 笹木英幹, 鈴木盛一: 腎保存の研究 (5)—酸化還元状態(NAD/NADH値)による保存腎 viability 判定の試み—. 移植 **18** : 32~36, 1983.
- 6) Kohn, M., Ross, H. : Lactate dehydrogenase output of the excised kidney as an index of acute ischemic renal damage. *Transplantation*. **11** : 461~464, 1971.
- 7) Price, P. G. : Urinary enzymes, nephrotoxicity and renal disease. *Toxicology* **23** : 99~134, 1982.
- 8) 葛原敬八郎, 武藤 直, 杉本久之, 他: Myoinositolによる保存腎 viability 判定法, I. 犬腎体内温阻血時間とwashout液中free myoinositolの変化. 第15回日本移植学会, 東京, 1979.
- 9) Belzer, F. O., Kountz, S. L. : Preservation and transplantation of human cadaver kidneys: A two-year experience. *Ann. Surg.* **172** : 394~403, 1970.
- 10) Takenaka, M., Tatsukawa, Y., Yamane, Y., Tanaka, I., Dohi, K., Ezaki, H., Yamada, K., Kawasaki, T. : An experimental model to test the viability of ischemic kidney. *Transplantation* **30** : 311~312, 1980.
- 11) Clark, E. A., Terasaki, P. I., Opelz, G., Mickey, M. R. : Cadaver-kidney transplant failures at one month. *N. Engl. J. Med.* **291** : 1099~1102, 1974.
- 12) Metzner, P. J., Boyce, W. H. : Simplified hypothermia: An adjunct to conservative renal surgery. *Brit. J. Urol.* **44** : 76~85, 1972.
- 13) Nosowsky, E. E., Kaufman, J. J. : The protective action of mannitol in renal artery occlusion. *J. Urol.* **89** : 295~299, 1963.
- 14) Chatterjee, S. N., Berne, T. V. : The effect of furosemide on 24-hours hypothermic renal preservation. *J. Surg. Res.* **19** : 357~359, 1975.
- 15) Green, R. D., Boyer D., Halasz, N. A., Collins, G. M. : Pharmacological protection of rabbit kidneys from normothermic ischemia. *Transplantation* **28** : 131~134, 1979.
- 16) Dhabuwala, C. B., Michelle, M., Salaman, J. R. : Relative importance of warm ischemia, hypotension, and hypercarbia in producing renal vasospasm. *Transplantation* **27** : 238~241, 1979.
- 17) Vasko, K. A., Dewall, R. A., Riley, A. M. : Effect of allopurinol in renal ischemia. *Surgery* **71** : 787~790, 1972.
- 18) Toledo-Pereyra, L. H., Najarian, J. S. : Effective treatment of severely damaged kidneys prior to transplantation. I. Preliminary results. *Transplantation* **16** : 79~80, 1973.
- 19) Fernando, A. R., Armstrong, D. M. G., Griffiths, J. R., Hendry, W. F., O'Donoghue, E. P. N., Perret, D., Ward, J. P. Wickam, J. E. A. : Enhanced preservation of the ischemic kidney with inosine. *Lancet* **1** : 555~557, 1976.
- 20) Osias, M. B. Siegel, N. J., Chaudly, I. H., Lytton, B., Baue, A. E. : Postischemic renal failure. Accelerated recovery with adenosine triphosphate-magnesium chloride infusion. *Arch. Surg.* **112** : 729~731, 1977.
- 21) Lotke, P. A. : Lysosome stabilizing agents for hypothermic kidney preservation. *Nature* **212** : 512~513, 1966.
- 22) Dahlager, J. I., Bilde, T. : The effect of chlorpromazine pretreatment on tubular function in kidney preservation. *Scand. J. Urol. Nephrol.* **10** : 126~129, 1976.
- 23) Miller, H. C., Alexander, J. W. : Protective effect of methylprednisolone against ischemic injury to the kidney. *Transplantation* **16** : 57~60, 1973.
- 24) Godfrey, A. M., Salaman, J. P. : Trasylol (Aprotinin) and kidney preservation. *Transplantation* **25** : 167~168, 1978.
- 25) Flores, J., Dibona, D. P., Beck, CH., Leaf, A. : The role of cell swelling in ischemic renal damage and the protective effect of hypertonic solute. *J. Clin. Invest.* **51** : 118~126, 1972.
- 26) Cohn, HE., Moses, M. : The critical interval in cadaver kidney transplantation. Function of canine renal autotransplants after variable periods of ischemia. *Surgery* **60** : 750~753, 1966.
- 27) Woods, J. E., Fleisher, G. A., Hirshe, B. L. : Five-day perfusion of canine kidney. A postulated effect of steroids. *Transplant, Proc.* **6** : 255~260, 1974.
- 28) Tappel, A. L. : Vitamin E and free radical peroxidation of lipids. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **203** : 12~28, 1972.
- 29) Kawasaki, T., Hayashi, K., Marubayashi, S., Dihi, K. : Preservation of Mitochondrial dysfunctions, Energy metabolism and viability of ischemic liver by coenzyme Q<sub>10</sub> pretreatment, Folkers, K.

- and Yamamura, Y. eds. : Biomedical and clinical aspects of coenzyme Q. Vol. 3. Elsevier/North-holland Biochemical Press, Amsterdam, p. 337~348, 1981.
- 30) Yamamoto, M., Shima, T., Uozumi, T., Sogabe, T., Yamada, K., Kawasaki, T. : A possible role of lipid peroxidation in cellular damage caused by ischemia. *Stroke*, in press. 1983.
- 31) Takenaka, M., Tatsukawa, Y., Dohi, K., Ezaki, H., Matsukawa, K., Kawasaki, T. : Protective effects of  $\alpha$ -tocopherol and coenzyme Q<sub>10</sub> on warm ischemic damages of rat kidney. *Transplantation* **32** : 137~141, 1981.
- 32) Belzer, E. O., Ashby, B. S., Aunphy, J. E. : 24 Hour and 72 Hour Preservation of canine kidneys. *Lancet* **2** : 536~539, 1967.
- 33) Collins, G. M., Bravo-Shugarman, M. : Kidney preservation for transplantation initial perfusion and 30 hours storage. *Lancet* **2** : 1219~1222, 1969.
- 34) Bore, P. J., Sehr, P. A., Chan, L., Thulborn, K. R., Ross, B. D., Radda, G. K. : The importance pH in renal preservation. *Transplan. Proc.* **13** : 707~708, 1981.
- 35) 山田一夫, 丸林誠二, 福田 誠, 竹中正治, 土肥雪彦, 川崎 尚 : 阻血腎の細胞障害に対する CoQ<sub>10</sub> の保護作用機構とその問題点——阻血肝との対比——, 浅野献一, 曲直部壽夫 監修 : 手術侵襲と Coenzyme Q<sub>10</sub>. 医歯薬出版, 東京, p. 317~327, 1983.
- 36) Guarnier, C., Ferrari, R., Visioli, O., Calderera, C. M., Nayler, W. G. : Effect of  $\alpha$ -tocopherol on hypoxic-perfused and reoxygenated rabbit heart muscle. *J. Mol. Cell. Cardiology* **10** : 893~906, 1978.
- 37) Nayler, W. G. : The uses of coenzyme Q<sub>10</sub> to protect ischemic heart muscle. Yamamura, Y., Folker, K., Jto, Y. eds. : Biomedical and clinical aspects of coenzyme Q<sub>10</sub>, Vol. 2. Elsevier North Holland Biomedical Press, Amsterdam, p. 409~425, 1980.
- 38) Yamada, K., Tatsukawa, Y., Takenaka, M., Iguchi, T., Yamamoto, M., Kawasaki, T. : Coenzyme Q and the restoration of functions in the ischemic kidney and brain. Yamamura, Y., Folker, K., Ito, Y. eds. : Biomedical and clinical aspects of coenzyme Q<sub>10</sub>, Vol. 2. Elsevier North Holland Biomedical Press, Amsterdam, p. 123~132, 1980.
- 39) 大川昌雄 : ATP-MgCl<sub>2</sub>による虚血性急性肝不全の治療. 日外会誌 **82** : 149~160, 1981.
- 40) 平沢博之, 田畑陽一郎, 大川昌雄 : ATP-MgCl<sub>2</sub>および glucose 投与による sepsis の治療——特に肝細胞内 ATP level および細胞内皮系機能の変化を中心に——. 日外会誌 **80** : 164~172, 1979.

\*

\*

\*