日消外会誌　20（7）：1697～1700，1987年

肝阻血とthromboxaneに関する基礎的研究

名古屋市立大学第1外科
花井　拓美　　由良　二郎　　橋本　　俊

EXPERIMENTAL STUDIES ON THE RELATIONSHIP BETWEEN LIVER ISCHEMIA AND THROMBOXANE

Takumi HANAI, Jiro YURA and Takashi HASHIMOTO
1st. Department of Surgery, Nagoya City University Medical School

肝阻血の病態を知る目的で血液凝固系とくにthromboxaneとの関係に注目し以下の動物実験を行った．方法220～300g SDラット使用．1．シャム群，2．肝阻血群，3．OKY046（thromboxane合成酵素阻害剤）投与肝阻血群に分け実験を行った．各群にて血中thromboxane B_2（TXB_2），血小板凝集能，その他のパラメーターを測定した．

成績：TXB_2は肝阻血群（496±306pg/ml）でシャム群（131±67pg/ml）に比べ高値を示したが，OKY群では正常値となった．血小板凝集能はOKY群で抑制された．OKY群では肝阻血所見が組織学的に改善された．

結論：ラット肝阻血により誘発されたthromboxane上昇は肝阻血時の肝障害に関与していると推察された．

索引用語：肝阻血，血小板凝集能，thromboxane B_2, OKY046

I．はじめに

肝臓外科手術がますます盛んに行われる昨今であるが，手術に伴い種々の程度の肝阻血状態が引き起こされ，肝阻血に伴う肝機能障害が心配される．こういった臓器障害は臓器阻血に伴い，微小血管内の血液凝固が生ずることに起因すると考えられている．一方，thromboxane A_2（TXA_2）は血小板内でアラキドン酸カスケードに伴い産生され血小板凝集をじゃっ起し[1]，血液凝固に関与すると報告され注目をあびつつある．また，イミダゾール誘導体OKY046[2]はTXA_2合成酵素阻害作用をもちTXA_2産生抑制が期待されている．

われわれは肝阻血状態における凝固系の変化を把握するために，ラットにて急性肝阻血モデルを作成し，とくにthromboxaneに注目し凝固系パラメーターの測定を行い，その病態を検討した．また，thromboxane産生抑制剤が肝阻血にいかなる影響をおよぼすかを知るためOKY046（イミダゾール誘導体：thromboxane合成酵素阻害剤）を投与し，その効果を検討した．

＜1986年10月15日受理＞別刷請求先：花井　拓美
〒467　名古屋市瑞穂区瑞穂町川澄1　名古屋市立大学第1外科

II．対象と方法

雄性SDラット（220～300g）を使用し，麻酔はエーテルで導入後ペントバルビタール16～20mg腹腔内投与により維持された．

実験は以下の群に分け行った．1．シャム群（n＝7）―単開腹群，2．肝阻血群（コントロール群）（n＝12）―2ml/kg 0.2Mグリシン緩衝液（pH 10.5）投与，3．OKY046処理肝阻血群（OKY群）（n＝9）―16mg/2ml/kg OKY046溶解グリシン緩衝液．

動物は無菌的に上腹部正中切開により手術された．肝阻血は門脈狭窄を作成90分後，肝動脈，総胆管を1時間クランプして作成された．門脈狭窄はHamilton[3]の変法にて作成された．すなわち，22Gテフロン・チューブを門脈に平行に置き，3-0テフロン糸で肝門部近くで結紮後，チューブを抜きとり作成された．門脈狭窄状態は実験終了時まで維持された．hypovolemiaを防ぐため5％血漿アルブミン1mlが大腿静脈から注入された．グリシン緩衝液，OKY046含グリシン緩衝液は肝動脈，総胆管クランプ10分前に空腸静脈から注入された．OKY046は小野薬品工業から

提供をうけた．肝動脈，総胆管クランプ解除後60分で検体は採取され，動物はすみやかに屠殺された．

血液は大動脈から採血され TB, GPT, 血小板数，血小板凝集能，プロトロンビン時間，TXB_2が測定された．血小板凝集能は6μM アラキドン酸添加により Payton Aggregometer を使用し行われた．TXB_2は前もって冷却したシリコン製の10μg/ml インドメサシン添加のチューブにより採血された．すみやかに遠心後，検体は測定まで－70℃で保存された．TXB_2の測定は New England Nuclear reagent を使用しラジオイムノアサイ法にて測定された．血液検体採取直前に肝臓組織を採取し10%ホルマリン固定後，ヘマトキシリン－エオジン染色により検討した．

データは mean±SD で表され student t-test により統計処理を行った．

III. 結　果

実験途中，死亡する動物はみられなかった．TB は全群1mg/dl 以下の値を示した．GPT はシャム群でほぼ正常値を示したが，肝阻血群，OKY 群では，それぞれ623±465U/l, 752±549U/l と高値を示した（図1）．しかし，肝阻血群と OKY 群との間に有意差は認めなかった．

血小板数はシャム群，肝阻血群，OKY 群それぞれ76±9×10^4/mm^3, 76±11×10^4/mm^3, 74±7×10^4/mm^{3}であり群間に差を認めなかった．プロトロンビン時間は正常人血清の測定値との比（×100）で表されたが，シャム群，肝阻血群，OKY 群それぞれ85±3%，81±8%，80±7%であり群間に差はなかった．血小板凝集能では反応時間，最大凝集率において肝阻血群（110±45秒，97±6%）に比べ，OKY 群（263±168秒，86±13%）とともに有意に抑制された（図2，3）．

血中 TXB_2値はシャム群131±67pg/ml に対し肝阻血では496±306pg/ml と有意に上昇した．一方，OKY 群では肝阻血群に比べ131±87pg/ml と有意に低値となった（図4）．

図1　血中 SGPT 値

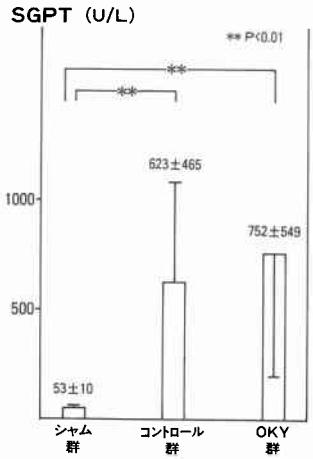

図2　アラキドン酸誘発血小板凝集能（反応時間）

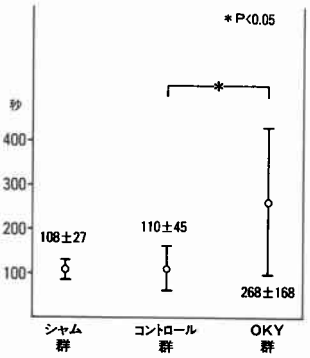

図3　アラキドン酸誘発血小板凝集能（最大凝集率）

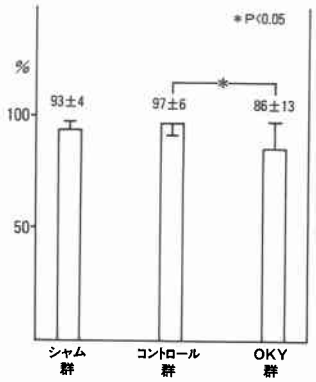

図4　血中 TXB_2値

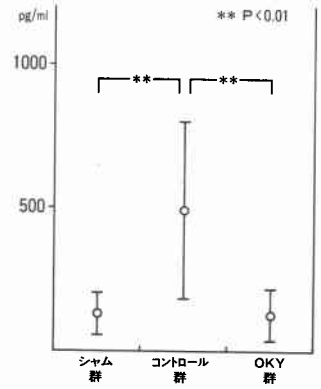

表1　肝臓の組織学的所見

		シャム群	コントロール群	OKY群
肝細胞の空胞変性	+	0	8	4
	−	7	0	4
Statistical probability ☆			*0.00078	*0.041

☆：Fisher exact probability test
＊：P<0.05

組織学的所見：シャム群では正常肝の像を呈したのに対し，阻血肝の主要な所見は肝細胞空胞変性であり，種々の程度の肝細胞壊死の像も認めた．一方，OKY群ではこれらの所見が改善され，特に肝空胞変性において明らかであった(**表1**)．また，肝動脈のクランプ解除に伴う肝細胞萎縮もしくは肝細胞膨化は認めなかった．胆管クランプに伴う胆汁うっ滞像も認められなかった．

IV. 考　察

van der Meer ら[4]はWAG/Rijラットにおいて門脈完全遮断により50分後，hypovolemiaのため，すべてのラットが死亡したと報告している．そこで，われわれは腸管のうっ血を防止するため，肝阻血モデルとして門脈完全遮断ではなく門脈の狭窄を作成した．また，hypovolemiaを防止するため5％アルブミン1mlを全身投与した．肝臓外科手術でよく行われるように肝動脈クランプと同時に一時的胆管クランプも行った．肝動脈遮断および門脈狭窄を実験開始時から同時に行ったラットでは3時間30分以前に死亡するラットが出現し，肝動脈遮断を門脈狭窄下1時間とし肝阻血モデルを作成した．われわれのモデルにおいて実験途中，腸管うっ血，明らかな腹水貯留は認めず全例生存した．

Trump ら[5]は肝阻血に伴う肝の組織学的所見を標準化するのは難しいと報告しているが，われわれのモデルにおいても肝阻血の所見の1つである肝細胞壊死の程度は個々の動物により異なっていた．一方，Bassi ら[6]が肝のhypoxiaにおいて肝細胞の空胞変性を報告しているように，われわれのラット肝阻血モデルにおいても肝空胞変性を一様に認めた．これらの事実にもとづき，われわれの肝阻血モデルは実験モデルとして適していると判定した．

臓器阻血後機能障害の要因の1つとして組織内微小血栓が注目される．そこで，臓器阻血状態下における凝固系の変化を知ることは，その機能障害改善法をもとめる上でも有意義である．血液凝固系の調節は血管内皮細胞で産生され，血小板凝集抑制作用を持つといわれているprostacyclin (PGI_2)[7]と，血小板から産生されるといわれているTXA_2の2つのprostanoidにより行われているといわれている．TXA_2[1]は血中半減期が30秒と短く測定不可能のため，その安定代謝産物としてTXB_2が測定され，TXA_2値を反映するとされている．

Lelcuk ら[8]が腎阻血による腎不全ラットにおいてTXB_2が高値となることを報告し，Kansaki ら[9]はTXB_2は肝臓切除後の再生肝で発見されたと報告している．われわれは肝阻血ラットにおいて血中TXB_2値が高値となることを確認し，TXA_2の増加が推測された．TXA_2は強い血小板凝集作用がある[1]とされているが，われわれの実験的阻血肝において肝内の血栓は認められなかった．これはTXA_2に血液凝固作用上，拮抗するPGI_2の濃度に関係があるのかもしれない．しかし，別のイミダゾール誘導体，thromboxane合成酵素阻害剤OKY1581はthromboxane産生を抑制し，血小板凝集能も抑制した[10]と報告しているが，本実験においてもOKY046はアラキドン酸誘発血小板凝集能を抑制した．

肝阻血において肝の予備力を比較的敏感に反映するとされているプロトロンビン時間に変化がなかったのは，われわれのモデルの阻血時間3.5時間はプロトロンビン時間に影響をあたえるには短かったと推察される．

Needleman ら[11]はイミダゾールはthromboxaneの選択的阻害剤であると報告しているが，OKY046はthromboxane合成酵素阻害剤として開発された化学物質である．OKY046 2mg/kg投与により腎阻血病変が高TXB_2値の低下とともに改善された[8]と報告され，ラット，エンドトキシンショックにおいても血中TXB_2値は上昇したが，OKY046 10mg/kg投与によりTXB_2値は有意に低下しショックによる死亡率が改善された[2]と報告されている．われわれも肝阻血時，肝病変を選択的に改善するのを目的としてOKY046　16 mg/kgを門脈内投与することにより，血中TXB_2値の正常化とともに肝空胞変性の改善を認めた．

OKY046は血小板凝集を抑制し，肝阻血により生じた血中TXB_2値上昇を有意に低下させ肝病変を改善したものと考えられた．

今後，さらにこの方面の研究が望まれる．

VI. ま と め

ラット肝阻血モデルを作成し，thromboxaneとの関

係を中心に，肝阻血の病態を検討し以下の結論を得た．

① OKY046は血中thromboxane上昇を抑え肝阻血病変を改善する可能性が推察された．②肝阻血により招来されたthromboxane上昇は肝阻血下の肝細胞障害に関与することが示唆された．

稿を終えるにあたり，御指導を頂いたG.H. Mahour MD南カリフォルニア大学外科学教授に感謝いたします．

本文の要旨は第28回日本消化器外科学会総会，第32回国際外科学会日本部会総会において発表した．

文　献

1) Hamberg M, Svenson J, Samuelson B: Thormboxanes: A new group of biologically active compounds derived from prostaglandin endoperoxides. Proc Natl Acad Sci USA 72: 2994—2998, 1975

2) 福本純雄，田中健蔵：エンドトキシンショックの発生機序におけるトロンボキサンA_2の関与についての実験的研究．血と脈管　13：229—231, 1982

3) Hamilton G, Phing RCF, Hutton RA et al: The relationship between prostacyclin activity and pressure in the portal vein. Hepatology 2: 236—242, 1982

4) Van der Meer C, Van der Kley CA, Valkenburg PW: Studies on th cause of death after permanent and temporary occlusion of the portal vein in rats. Circ Shock 3: 191—202, 1976

5) Trump BF, Berezesky IK, Collan Y et al: Recent studies on the pathophysiology of ischemic cell injury. Beitr Path Bd 158: 363—388, 1976

6) Bassi M, Zazzera AB, Cassi E: Electron microscopy of rat liver cells in hypoxia. J Path Bact 79: 179—183, 1960

7) Moncada S, Gryglewski R, Bunting S et al: An enzyme isolated from arteries transforms prostaglandin endoperoxides to an unstable substance that inhibits platelet aggregation. Nature (London) 263: 663—665, 1976

8) Lelcuk S, Alexander F, Kobzik L et al: Prostacyclin and thromboxane A_2 moderate postichemic renal failure. Surgery 98: 207—212, 1985

9) Kansaki Y, Mahmud I, Asanaga M et al: Thromboxane as possible trigger of liver regeneration. Cell Mol Biol 25: 147—152, 1979

10) 林　謙宏，金山春洋，長村吉郎ほか：Thromboxane A_2合成酵素阻害剤OKY-1581の血小板機能に及ぼす影響．血と脈管　13：440—443, 1982

11) Needleman P, Raz A, Ferrendelli JA et al: Application of imidazole as a selective inhibitor of thromboxane synthetase in human platelets. Proc Natl Acad Sci USA 74: 1716—1720, 1977