日消外会誌　23（9）：2244～2250，1990年

小腸の阻血と血流再開後の粘膜障害に関する実験的研究

金沢大学第2外科学教室（主任：宮崎逸夫教授）
高　森　　正　人

xanthine oxidase を阻害し free radicals の産生を抑制する allopurinol の投与と灌流の，小腸の阻血と血流再開後の粘膜障害に対する保護効果を，主に，イヌの小腸絨毛の Na^+-K^+ATPase 活性の変化から検討し，次の結論を得た．灌流または superoxide 産生阻害剤を投与しなかった群と灌流または superoxide 産生阻害剤の投与の単独実施群では，control 群より有意（$p<0.05$）に Na^+-K^+ATPase 活性は低下した．superoxide 産生阻害剤を投与し，同時に灌流を実施した群ではその低下が有意（$p<0.05$）に抑制された．したがって，小腸の阻血と血流再開後の粘膜障害として Na^+-K^+ATPase 活性が低下すること，また，その原因として free radicals が関与し，さらに，superoxide 産生阻害剤としての allopurinol の投与は阻血と血流再開後の小腸粘膜の保護に有効であることを明らかにした．

Key words: small intestine, ischemia of small intestine, free radicals, allopurinol, Na^+-K^+ATPase

緒　言

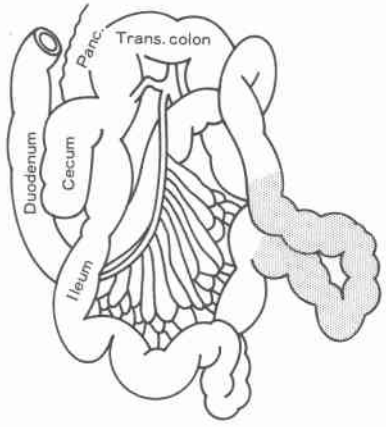
上腸間膜動脈合併切除施行時や小腸移植時の保存の場合には小腸の冷阻血や灌流が実施される．阻血時間が長くなれば小腸粘膜の不可逆性の障害を免れることは出来ない．仮に，阻血時間が短時間でも，血流の再開時に小腸の吸収機能が傷害されることがある．その原因としては，血流再開により xanthine oxidase 系から発生する free radicals が関与するとされるが[1]いまだその詳細と予防方法は十分には解明されていない．

一方，小腸絨毛上皮には Na^+-K^+ATPase が存在し，Na イオンの濃度勾配により吸収物質を細胞内へ能動輸送している[2]．しかし，小腸阻血後の粘膜の Na^+-K^+ATPase 活性の変動を検討した報告はみられない．そこで主にイヌの小腸絨毛の Na^+-K^+ATPase 活性の変動から小腸阻血と血流再開後の小腸粘膜機能の変化を解明し，さらに，灌流と xanthine oxidase 活性を阻害することで free radicals の産生を抑制する allopurinol の投与の粘膜障害に対する保護効果を検討した．

対象および方法

体重10kg 前後の雑種成犬48頭を用い，24時間絶食後，実験直前に硫酸 atropine 0.03mg/kg を投与し，thiopental sodium 20mg/kg の静注による全身麻酔下に開腹した．Tritz 靱帯より回腸終末にいたるまでの全小腸を4等分し，口側から2等分目の1/4長の空腸（**Fig. 1**）を用いて，以下の control 群と4群の実験群（**Table 1**）を作成した．この1/4長の空腸の上腸間膜動静脈の支配分枝を残し，空腸口側・肛門側を切断した群を control 群とした．支配動静脈の根部にてサテンスキー鉗子を用いて血流を30分間遮断し鉗子を外すことで血流を再開させた群を非灌流群とした（**Fig. 2**）．さらに30分間の阻血中に superoxide 産生阻害剤としての allopurinol　50mg/kg を静脈内投与した群を

Fig. 1 Ileum used for the experiment. All the small intestine were equally divided into four parts from the Tritz ligament to the end of the ileum. One quarter from the oral side of one of the two equally divided parts was subjected to ischemic treatment. The oral and annal sides of the ileum were amputated.

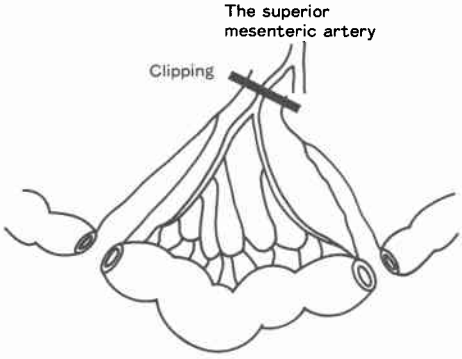


＜1990年5月9日受理＞別刷請求先：高森　正人
〒920　金沢市宝町13－1　金沢大学医学部第2外科

Table 1 Experimental groups

1. Control grop (n=6)
2. Non-perfused group (n=4)
3. Non-perfused group treated with superoxide production inhibitor (n=4)
4. Perfused group (n=4)
5. Perfused group treated with superoxide production inhibitor (n=4)

Fig. 2 Blood flow clipping of the ileum-governing artery and vein. During ischemia, the ileum-governing artery and vein were clipped to stop blood flow.



superoxide 産生阻害剤投与非灌流群とした．また，阻血中に支配動脈に留置計を挿入固定し，支配静脈を切断した後にペリスタポンプを用いて Haltomann 氏液（pH 8.0）を1,000ml/h の速度で動脈側より30分間灌流した群を灌流群とした．さらに，灌流液中に4mg/l の濃度で allopurinol を混じ，同時に50mg/kg を静脈内に投与した群を superoxide 産生阻害剤投与灌流群とした．

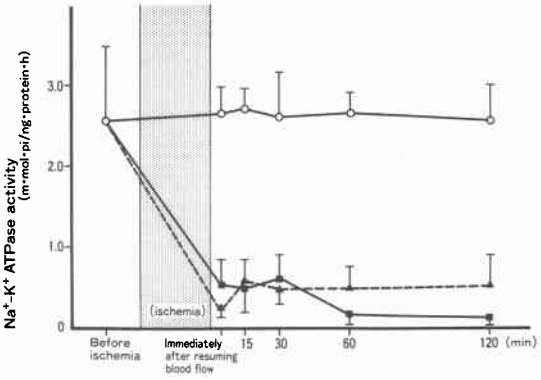
粘膜の Na^+-K^+ATPase 活性は0℃生理食塩水にて洗浄した切除小腸の粘膜を scrapping し，重量測定後 Chudry 法[3]にて測定した．遊離したタンパク量は Lawry 法[4]にて定量した．血中の β-glucuronidase は Tsukamoto 法[5]に準じ測定した．血漿中の総 superoxide dismutase（SOD）活性および Cu-Zn-SOD 活性は亜硝酸法変法[6]にて測定した．また，血流再開後120分の空腸粘膜の組織学的検索を行った．統計学的検討は Student's t test により行い，$p<0.05$をもって統計学的に有意と判定した．

結　果

1. Na^+-K^+ATPase 活性

control 群では阻血前の2.59±0.62（m mol pi/ng protein h；以下略）に比べて120分でも2.59±0.44とほとんど変化を示さなかった．しかし，非灌流群では血流再開直後に0.52±0.38，60分で0.18±0.11，120分で0.10±0.05と control 群に比べ有意に低かった．灌流群でも血流再開直後の0.29±0.15から120分まで control 群に比べ有意に低かった．しかし，非灌流群の血流再開直後から120分までの間とは有意な差を認めなかった（**Fig. 3**）．さらに，superoxide 産生阻害剤投与非灌流群でも，血流再開直後に0.43±0.40，60分で1.26±0.53，120分で1.08±0.41と，control 群に比べ有意な低下を認めた．しかし非灌流群に比べると60分，120分でその低下が有意に抑制されていた（**Fig. 4**）．Superoxide 産生阻害剤投与灌流群では，血流再開直後で1.58±0.51，15分で1.63±0.25と，control 群との間に有意な差を認めなかった．また，30分で0.79±0.57，60分で0.89±0.46と，control 群に比べて有意に低下したが，120分では1.76±0.23と再上昇し control 群との間に有意差を認めなかった．灌流群に比べると血流再開直後，15分ならびに120分でその低下が有意に抑制されていた（**Fig. 5**）．さらに，superoxide 産生阻害剤投与非灌流群に比べると，30分以降では両群間に有意の差は認められなかったが，superoxide 産生阻害剤投与灌流群では血流再開直後と15分で Na^+-K^+ATPase 活性の低下が有意に抑制されていた（**Fig. 6**）．

Fig. 3 Time course of Na^+-K^+ ATPase activity in the perfused and non-perfused groups. The open circle represents control group (n=6), the closed triangle perfused group (n=4), and the closed square non-perfused group (n=4).



2. β-glucuronidase 活性

control 群では，阻血前の2,620±462u/g/hr から120分の2,700±358u/g/hr まで著変を示さなかった．非灌

Fig. 4 Time course of Na^+-K^+ ATPase activity in the non-perfused group treated with allopurinol and non-perfused group. The open circle represents control group (n=6), the open square non-perfused group treated with allopurinol (n=4), and the closed square non-perfused group. * $p<0.05$.

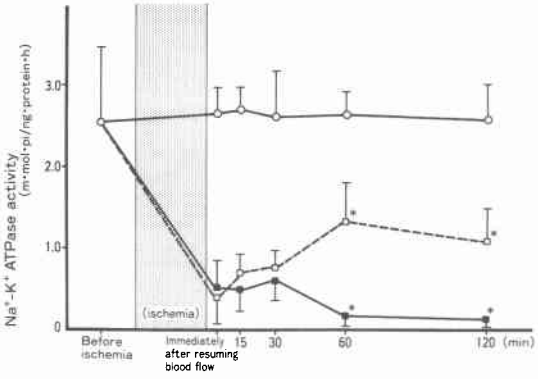
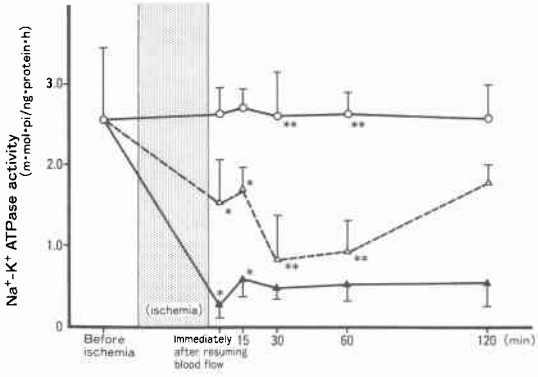
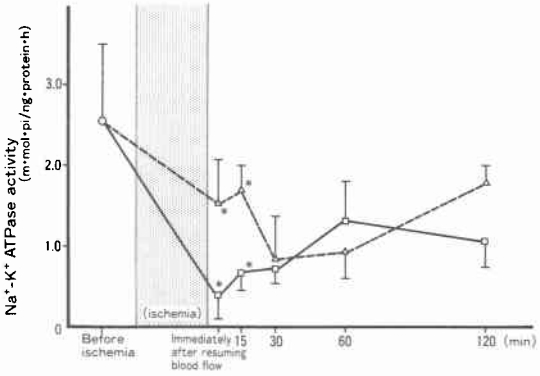


Fig. 5 Time course of Na^+-K^+ ATPase activity in the perfused group treated with allopurinol and perfused group. The open circle represents control group (n=6), the open triangle perfused group treated with allopurinol (n=4), and the closed triangle perfused group (n=4). *, ** $p<0.05$.



流群では血流再開直後の5,682±619u/g/hr から120分まで漸減し，control 群に比べると血流再開直後，15分ならびに30分で有意に高値を示した．また灌流群では，血流再開直後で5,193±922u/g/hr と上昇し，以後低下傾向を示したが，control 群との間には有意差を認めなかった．しかし，15分と30分で非灌流群に比べて有意に低かった．superoxide 産生阻害剤投与非灌流群でも血流再開直後で4,090±804u/g/hr と上昇し，以後低

Fig. 6 Time course of Na^+-K^+ ATPase activity in the perfused group treated with allopurinol and non-perfused group. The open triangle represents perfused group treated with allopurinol (n=4), and the open square non-perfused group treated with allopurinol (n=4). * $p<0.05$.



下傾向を示したが，control 群，非灌流群および灌流群との間には有意差を認めなかった．superoxide 産生阻害剤投与灌流群では，前3群とは異なり，血流再開直後の2,434±266u/g/hr から120分まで著明な増減を示さず，control 群との間に有意差を認めなかった．非灌流群に対しては血流再開直後と15分および30分で，灌流群に対しては血流再開直後で，superoxide 産生阻害剤投与非灌流群に対しては血流再開直後と15分でその上昇が有意に抑制されていた（**Fig. 7**）．

3．血漿中総 SOD 活性

control 群では阻血前の21.0±3.6NU/ml から120分の19.8±2.5NU/ml まで著変を認めなかった．非灌流群と灌流群では control 群との間に有意な差を認めなかった．superoxide 産生阻害剤投与非灌流群では control 群，非灌流群および灌流群に比べ常に高値を示したが，有意差を認めなかった．superoxide 産生阻害剤投与灌流群では阻血前に比べ血流再開直後より上昇し，control 群，非灌流群，灌流群および superoxide 産生阻害剤投与非灌流群に比べて高値を示したが，有意差は認めなかった（**Fig. 8**）．

4．血漿中 Cu-Zn-SOD 活性

control 群では阻血前の13.4±1.3NU/ml から120分の14.5±4.8NU/ml まで著変を示さなかった．非灌流群では血流再開直後には5.8±1.1NU/ml と，control 群に比べ有意に低下した．灌流群でも血流再開直後には control 群に比べ有意に低下したが非灌流群との間には有意差を認めなかった．superoxide 産生阻害

Fig. 7 Time course of β-glucuronidase. The open circle represents control group (n=6), the closed square non-perfused group (n=4), the closed triangle perfused group (n=4), the open square non-perfused group treated with allopurinol (n=4), and the open triangle perfused group treated with allopurinol (n=4). *, ** $p<0.05$.

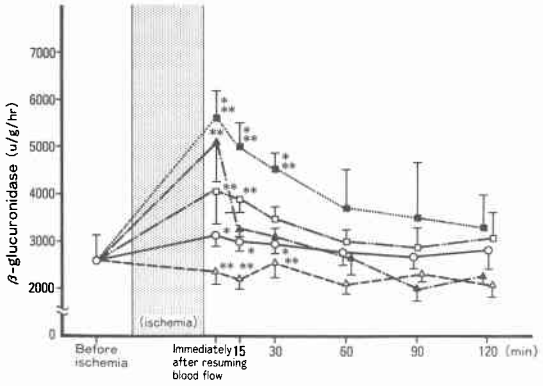
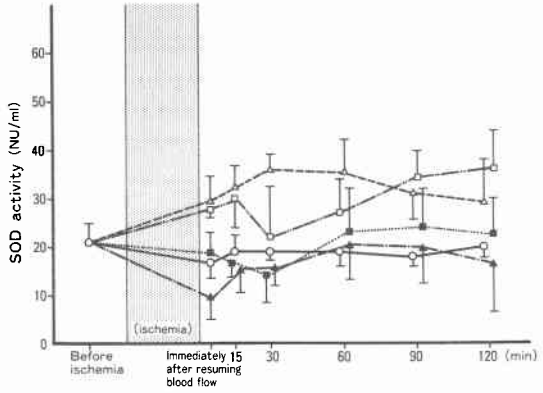


Fig. 8 Time course of total plasma superoxide dismutase (SOD) activity. The open circle represents control group (n=6), the closed square non-perfused group (n=4), the closed triangle perfused group (n=4), and the open triangle perfused group treated with allopurinol (n=4).

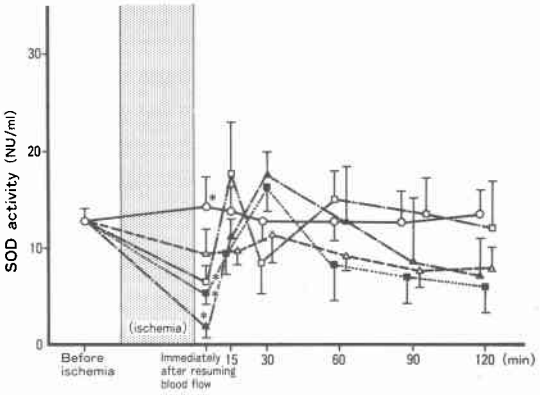


剤投与非灌流群でも control 群に比べ血流再開直後で有意に低下した．しかし，非灌流群ならびに灌流群との間には有意差を認めなかった．さらに，superoxide 産生阻害剤投与灌流群では阻血前に比べ血流再開直後には9.6±2.3NU/ml とやや低下したが，control 群との間に有意差を認めなかった（**Fig. 9**）．

5．組織学的所見

Superoxide 産生阻害剤投与非灌流群と非灌流群の

Fig. 9 Time course of plasma Cu-Zn superoxide dismutase (SOD) activity. The open circle represents control group (n=6), the closed square non-perfused group (n=4), the closed triangle perfused group (n=4), the open square non-perfused group treated with allopurinol (n=4), and the open triangle perfused group treated with allopurinol (n=4). * $p<0.05$.



血流再開後120分での組織所見（HE 染色）では絨毛上皮の出血性変化および絨毛の膨化と短小化を認めたが両群間に相違は認められなかった．一方，superoxide 産生阻害剤投与灌流群と灌流群では前2群にみられたような出血性変化や，絨毛の状態・形態に変化を認めなかった（**Fig. 10a, b, c, d**）．

考　察

Free radicals による組織障害は，1970年代前半より注目され，心[7]，肺[8]，腎[9]，脳[10]などの臓器に虚血性変化が生じた場合にその関与が論じられてきた．消化管の虚血による組織障害に関する報告は1954年の Wilson ら[11]の報告に始まり，1982年には Parks ら[12]が小腸の虚血性障害に対する free radicals の関与を指摘した．しかし，free radicals により生じた小腸阻血後の組織障害を粘膜機能の見地から検討した報告はない．

Free radicals は多核球を中心とした血球成分のみならず，阻血後の生体細胞自身からも産生され，その細胞に対し阻害的に動き組織障害を助長すると考えられている[13]．また，allopurinol は xanthine oxidase の活性を阻害することで細胞内における O_2^- の産生を抑制する．さらに，Na^+-K^+ATPase は小腸では小腸絨毛の吸収上皮の側基底膜に存在し[14]，基底膜の内側で ATP を加水分解する際に遊離されるエネルギーを用

Fig. 10a Histological findings of the villi of non-perfused group treated with superoxide production inhibitor (hemorrhagic changes in the villous epithelium and shortening with edema of the villi were seen).

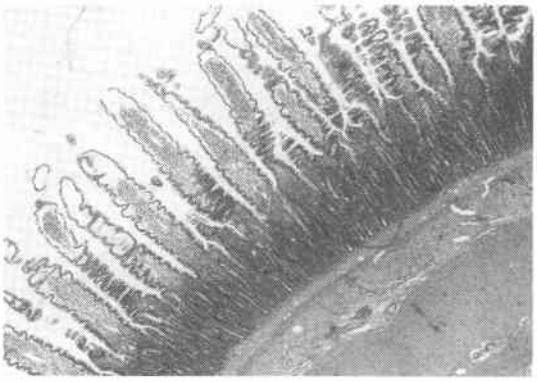
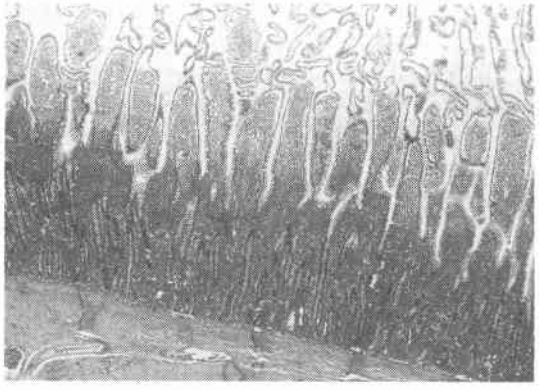


Fig. 10b Histological findings of the villi of non-perfused group (villous hemorrhagic changes and shortening with edema were slightly more advanced than those in Fig. 10a).



いて細胞内のNaイオンを細胞外に排出し細胞外のKイオンを細胞内に取り入れるNaポンプ機能を果たしている[15]．この結果作り出されたNaイオンの濃度勾配により物質が能動輸送される．したがって，Na^+-K^+ATPase活性は吸収上皮の透過性と吸収機能の一端を反映するものであると考えられる．そこで本研究ではallopurinolによる小腸阻血と血流再開後の粘膜保護効果を，灌流の有無別に，小腸絨毛上皮のNa^+-K^+ATPase活性の変化の面から検討した．

灌流群と非灌流群のNa^+-K^+ATPase活性には有意差を認めず，阻血中にHartmann氏液（pH 8）を用いて灌流するだけでは粘膜の保護効果は認められなかった．ただし，60分以降では非灌流群のNa^+-K^+ATPase活性がさらに低下し，120分ではほぼ0に近い値を示したのに対し，灌流群ではわずかながら上昇傾向を示したことから，灌流によってNa^+-K^+ATPaseの可逆性が不十分ながら残存する可能性が考えられた．

Fig. 10c Histological findings of the villi of perfused group treated with superoxide production inhibitor (no abnormality was seen).

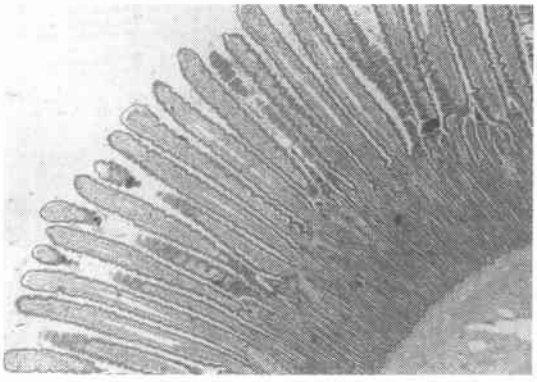
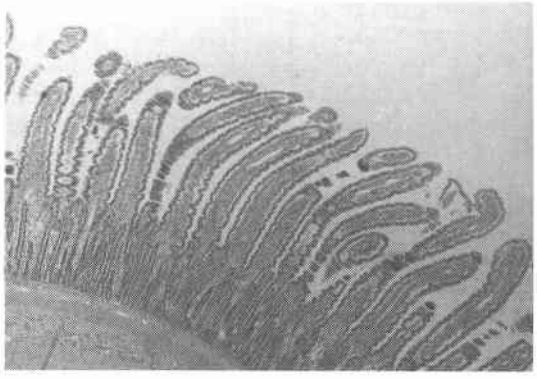


Fig. 10d Histological findings of the villi of perfused group (mild interstitial edema was seen).



allopurinolを全身投与施したsuperoxide産生阻害剤投与非灌流群は非灌流群に対し，60分値と120分値で有意にNa^+-K^+ATPaseの低下が抑制された．すなわちallopurinolの全身投与は血流再開後free radicalsの産生を抑制したと考えられる．さらに，allopurinolの全身投与と局所投与を同時に実施したsuperoxide産生阻害剤投与灌流群では他の3群に認められた血流再開直後から30分までのNa^+-K^+ATPase活性の著明な低下は認められなかった．したがって，阻血中にallopurinolを灌流液中に加えて灌流することにより，

血流再開後全身投与単独よりさらに早期からの粘膜障害を防止しえると考えられた.

さらにlysosome enzymeの一種であるβ-glucuronidase活性を経時的に測定することより脂質過酸化に伴う小腸の粘膜障害の程度を検討することが可能である.非灌流群,灌流群,superoxide産生阻害投与非灌流群の3群のいずれにおいてもβ-glucuronidese活性は血流再開直後に最高値を示した後漸減した.これは脂質過酸化反応が血流再開直後に最大となりその後減衰していくためと考えられる.非灌流群では血流再開直後の上昇の程度が他群に比べて大きかったが,Na^+-K^+ATPase活性の経時的変化はきわめて緩慢で血流再開後120分までは低値であった.したがって,非灌流群ではNa^+-K^+ATPase活性の回復は非常に緩慢であると考えられた.同様に灌流群でもNa^+-K^+ATPase活性の経時的変化は一定であったが,β-glucuronidase活性は血流再開後60分ではすでに阻血前の値に復していた.

superoxide産生阻害剤投与非灌流群では非灌流群に比べ血流再開後60分から120分までのNa^+-K^+ATPase活性が有意に高かったのに対しβ-glucuronidase活性には差を認めなかった.これらのことより,脂質の過酸化とNa^+-K^+ATPase活性の変化は同時期に生じるものではなく,後者の変化がより早期に生じるものと考えられた.さらに,superoxide産生阻害剤投与灌流群では血流再開後のβ-glucuronidase活性の変化は認められず,脂質の過酸化は軽微であったと推測される.

一方,生体内のSODは細胞内に取り込まれることなく,細胞外においてO^{2-}の消去作用を促進する.SODには真核細胞の細胞質で働くCu-Zu SODとミトコンドリアに存在するMn-SODとがある[16].本研究では両者を合わせた総SODと,Cu-Zu SODを測定し検討した.superoxide産生阻害剤投与灌流群では総SOD活性の血流再開後30分での低下は認められず,総SOD活性の変化からも,allopurinol投与の有効性は明かであった.superoxide産生阻害剤投与非灌流群,非灌流群および灌流群の血流再開直後でのCu-Zu-SOD活性は,control群に対して有意に低下し,superoxide産生阻害剤投与灌流群が灌流群より高値を示したことから,血流再開後きわめて早期にO^{2-}が産生され,その消去に組織中のSODが作用していると推測される.また,内因性scavengerであるSODの組織内濃度の低下とともに相対的にfree radicalsが過剰となり,一部が細胞膜リン脂質と容易に反応する結果細胞膜輸送系の破綻をきたすと考えられる.

以上,小腸の阻血と血流再開後の粘膜障害をNa^+-K^+ATPase活性の面から明らかにした.その発生機序としては次の経路が考えられる.すなわち阻血中の小腸粘膜上皮のATPの嫌気性代謝の亢進によりhypoxanthineが上昇する.血流再開後には好気性代謝が回復するため,小腸粘膜に豊富に存在するxanthine oxidaseによりhypoxanthineはxanthineに分解され,その際にfree radicalsが産生される.また,このようにして発生したfree radicalsにより脂質が過酸化されるためにlysosome膜が破壊され,組織障害性を有するlysosome enzymeが遊離されることにより粘膜障害がさらに進行する.また,xanthine oxidaseの活性を阻害することによってfree radicalsの産生を抑制するallopurinolを投与することでNa^+-K^+ATPase活性の低下が抑制されたことから,allopurinolの投与が阻血と血流再開後の小腸粘膜の保護に有効であることを明らかにした.

稿を終えるにあたり,御指導,御校閲を賜りました金沢大学第2外科宮崎逸夫教授に深甚なる感謝の意を表します.また,直接御指導をいただいた八木雅夫博士ならびに御協力をいただいた教室諸兄に感謝いたします.

本論文の要旨の一部は第31回日本消化器外科学会総会(1988年2月東京)および第88回日本外科学会総会(1988年4月東京)にて発表した.

文献

1) Granger DN, Rutili G, McCord JM: Superoxide radicals in feline intestinal ischemia. Gastroenterology 81: 22—29, 1981
2) Kawakami K, Noguchi S, Noda M et al: Primary structure of the alphasubunit of Torpedo kalifornica (Na^+-K^+) ATPase deduced from cDNA sequence. Nature 316: 733—736, 1985
3) Charney AN, Donowitz M: Functional significance of intestinal Na^+-K^+ ATPase in vivo ouabain inhubition. Am J Physiol 234: 629—636, 1978
4) Oliver H, Lowry NJ, Rosebrough A et al: Protein measurement with the folin phenol reagent. J Biol Chem 193: 265—275, 1951
5) Kato K, Yoshida K, Tsukamoto H et al: Synthesis of p-Nitorophenyl β-D-Glucopyranosiduronic acid and its utilization as a substrate for the assay of β-glucuronidase activity. Chem Pharm Bull 8: 239—242, 1960

6) 大柳善彦：Establishment of Nitritekit for SOD activity determination. 炎症 4：63—73, 1984
7) Dewll RA, Vasko KA, Stanley EL et al: Responses of the ischemic myocardium to allopurinol. Am Heart J 82：362—370, 1971
8) Flick MR, Hoeffel J, Stanb NC: Superoxide dismutase prevents increased lung vascular permeability after air emboli in unanesthetized sheep. Fed Proc 40：405, 1981
9) Vasko KA, Dewall RA, Riley AM: Effect of allopurinol in renal ischemia. Surgery 71：787—790, 1972
10) Flamm ES, Demopoulos HB, Seligman ML et al: Free radicals in cerebral ischemia. Stroke 9：445—447, 1978
11) Willson R, Qualheim QE: A from of acate hemorrhagic enterocolitis afflicting cheonically ill individuals. A description of twenty cases. Gastroenterology 27：431—444, 1954
12) Parks DA, Bulkley GB, Granger DN et al: Ischemic injury in the cat small intestine: Role of superoxide radicals. Gastroenterology 82：9—15, 1982
13) Johnson KJ, Fantone JC III, Kaplan J et al: In vivo damage of rat lungs by oxygen metabolites. J Clin Invest 67：983—993, 1981
14) Post RL: A prespective on sodium and potassium ion transport adenosine triphosphatase. Cation Flux Across Biomembranes 19：3—19, 1979
15) Noguchi S, Noda M, Takahashi H et al: Primary structure of the β-subunit of Torpedo california (Na^+-K^+)-ATPase deduced from the DNA sequence. Fed Eur Biochem Soc 196：315—320, 1986
16) Oberley LW, Buetner GR: Role of superoxide dismutase in cancer: A review. Cancer Res 39：1141—1149, 1979

An Experimental Study for Mucosal Ischemia and Reperfusion Injuruy in the Small Intestine

Masato Takamori
Department of Surgery II, School of Medicine, Kanazawa Univeristy
(Director: Prof. Itsuo Miyazaki)

We studied the protective effect of perfusion of allopurinol, an inhibitor of xanthine oxidase and suppresser of production of free radicals, on mucosal damage of the small intestine after ischemia and resumption of blood flow. Conclusions were drawn particularly from the changes in Na^+-K^+ ATPase actvity observed in the intestinal villi of the canine. Na^+-K^+ ATPase activity was significantly lower in the groups perfused and treated with or without the superoxide production inhibitor than in the control group ($p<0.05$). In the group given the superoxide production inhibitor in conjunction with perfusion, the reduction in Na^+-K^+ ATPase activity was significantly suppressed ($p<0.05$). The results show that Na^+-K^+ ATPase activity in the small intestine declines as a result of mucosal damage after ischemia and resumption of blood flow. Furthermore, the decline is caused by the involvement of free radicals, and that the administration of allopurinol as a superoxide production inhibitor is effective in protecting the mucous membrane of the small intestine after ischemia and resumption of blood flow.

Reprint requests: Masato Takamori Department of Surgery, II, School of Medicine, Kanazawa University
13-1 Takaramachi, Kanazawa, 920 JAPAN