

# 閉塞性黄疸肝への流入血行遮断解除時の病態に関する実験的検討 —肝活性酸素生成とエンドトキシン血症の関与を中心に—

東北大学第1外科

大内 清昭 鈴木 正徳 福原 賢治  
三国 潤一 武藤 大成 松野 正紀

閉塞性黄疸犬(閉黄群)に対する肝流入血行遮断後の再還流が肝活性酸素を生成し、それにエンドトキシン(ET)血症が関与するのかを、総胆管下大静脈シャント犬(シャント群)、正常群と比較検討した。3群ともに2回の血行遮断により低下した肝 energy charge は遮断解除後速やかに回復し、肝過酸化脂質量の増加は終始みられなかった。血中 ET 値は正常群では正常域内であり、シャント群では軽度の増加を認めたが、ともに肝 glutathione (GSH),  $\alpha$ -tocopherol ( $\alpha$ -toc) 量に変化はみられなかった。一方、閉黄群では遮断解除後門脈血中高 ET レベルと肝 GSH,  $\alpha$ -toc の減少を認めたことより、活性酸素の生成が推察されたが、肝には脂質過酸化反応によるエネルギー代謝障害はみられず、肝はラジカルの攻撃よりよく防御されていたものと思われた。閉塞性黄疸肝に対する虚血後血流再開は活性酸素を生成し、その一因に ET が関与している可能性が示唆された。

**Key words:** obstructive jaundice, Pringle maneuver, energy charge, endotoxemia, oxygen free radicals

## はじめに

肝切除術に際しての術中出血量の多寡はその直接成績を左右するため、出血量軽減のための一方法として肝十二指腸間膜内で肝動脈、門脈ごと肝流入血行を遮断する Pringle 氏法が広く応用されている。しかし、本法の問題点は肝における虚血と腸管血流のうっ滞の2点に起因するが、元来15分とされていた遮断時間の限界は、Huget ら<sup>1)</sup>によれば30分ないし60分間は安全に可能であると報告されている。

しかし、近年閉塞性黄疸下においても肝切除が積極的に施行されるようになり、その病態下での肝流入血行遮断および解除の肝病態への影響に関する報告はほとんどみられない。閉塞性黄疸では胆道感染や手術侵襲によってエンドトキシン血症が高頻度に認められ<sup>2)</sup>、その機序として胆道内圧の上昇による cholangio-venous reflux、腸管内胆汁酸の欠乏によるエンドトキシン吸収の増加、網内系機能低下などが指摘されている<sup>3)</sup>。また、エンドトキシンによる臓器障害へのさまざまな chemical mediator や活性酸素などの関与が近年注目を集めている<sup>4,5)</sup>。閉塞性黄疸下での

肝流入血行遮断による虚血と腸管のうっ血、その後の再還流による肝病態に、門脈血中エンドトキシンおよび活性酸素の生成が強く関与していることが考えられるところである。

今回、高ビリルビン血症を呈する2つの実験モデル、すなわち肝障害を有するとされる閉塞性黄疸犬および肝障害の軽微な胆管下大静脈シャント犬を用い、肝流入血行遮断と解除の門脈、末梢血中エンドトキシンレベルと活性酸素生成の指標となる肝過酸化脂質量、内在性ラジカル消去剤および抗酸化剤への影響を検討したので報告する。

## 対象および方法

対象は体重9~12kg 雑種成犬であり、正常対照群(正常群 n=5)、閉塞性黄疸群(閉黄群, n=6)、胆管下大静脈シャント群(シャント群, n=5)の3群に分類した。各群ともに pentobarbital sodium 30mg/kg 体重静注全麻下に開腹し、閉黄群では胆摘ならびに総胆管の結紮切離術を、シャント群では4Fr ポリエチレンカテーテルを用いての総胆管下大静脈シャント(右副腎静脈経由)術を施行した。

1週間後に動脈圧モニターおよび採血、補液に用いるため大腿動静脈にカニューレ挿入後再開腹し、門脈にカニューレを挿入した。補液は10%グルコースを10

ml/kg 体重で投与した。閉黄群, シャント群ともに肝十二指腸間膜内で肝動脈および門脈を血管鉗子にて10分間遮断し, 10分間解除する所作を2回くり返した。2回の遮断前後, 2回目の遮断解除10分, 70分後に液体窒素で冷却した圧縮鉗子でそれぞれ異なる肝葉より平均3g ずつ採肝し, 同時に門脈, 末梢血を採血した。採肝後の肝欠損部は速やかに縫合止血を行った。全例において左外側葉, 内側葉, 尾状葉, 方形葉, 右内側葉, 外側葉の順に採肝した。

また, 正常群では同様に30分間遮断, 30分間解除する所作を2回くり返し, 2回の遮断前後, 2回目の遮断解除30分, 90分後にそれぞれ採肝, 採血した。

肝アデニンヌクレオチド濃度は既報<sup>6)</sup>のごとく処理した後酵素法にて測定し, energy charge (EC) は以下の式にて求めた。

$$EC = \frac{ATP + 1/2ADP}{ATP + ADP + AMP}$$

肝過酸化脂質量は真杉<sup>8)</sup>の方法に準じチオバルビツール酸 (TBA) 法によって測定した。肝総グルタチオン濃度(GSH)は GSH reductase 存在下に NADPH 酵素還元法にて,  $\alpha$ -tocopherol ( $\alpha$ -toc) 濃度は高速液体クロマトグラフィにて測定した。末梢血および門脈血中エンドトキシン濃度は過塩素酸処理の後リムス法 (トキシカラートスト, 生化学工業社) にて測定した。

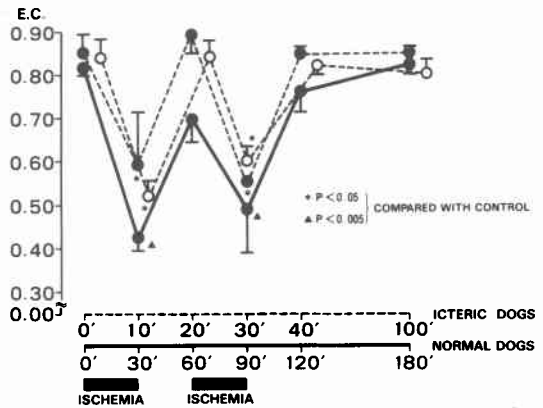
統計学的処理に関し, 測定値はいずれも平均値±標準偏差で示した。群内における前値との比較は paired Student-t test にて, 多群間における比較は一元配置分散分析により行い,  $p < 0.05$  を有意と判定した。

結 果

閉塞性黄疸 1 週間の閉塞群における肝機能は総ビリルビン  $6.8 \pm 2.0 \text{mg/dl}$ , GPT  $331 \pm 124$  カルメン単位, アルカリフォスファターゼ  $231 \pm 82 \text{K-A}$  であった。一方, シャント群では総ビリルビン値は  $17.0 \pm 6.6 \text{mg/gl}$  と高値であり, GPT  $260 \pm 78$  カルメン単位, アルカリフォスファターゼ  $308 \pm 120 \text{K-A}$  であった。しかし, 肝の組織学的検討では閉黄群において胆汁うっ滞, グリソン鞘, 胆管周囲の線維化, 肝細胞壊死の所見を認めた。一方, シャント群では頰洞内に多数の Kupffer 細胞を認める以外肝細胞障害の所見は著明ではなかった。

正常群は30分間の肝流入血行遮断中は血圧は80 mmHg 前後に低下し経過するが遮断解除により速やかに血圧は回復し, 2回の遮断操作に問題はみられなかった。一方, 閉黄群, シャント群では30分間の遮断

Fig. 1 Changes of hepatic energy charge (EC) after occlusion of the hepatic inflow and reperfusion. All groups showed similar changes of EC values after occlusion and reperfusion. ●—● normal dogs, ●---● dogs with obstructive jaundice, ○---○ dogs with cholecho-caval shunt. \*  $p < 0.05$ , ▲  $p < 0.005$  vs control value.

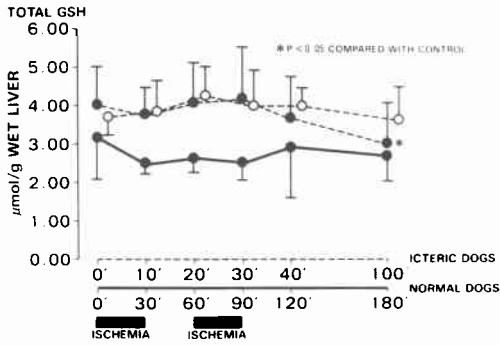


には耐術せず, 不可逆性ショックに陥り死亡した。そこでこれら両群では正常群30分間遮断と同程度の可逆的な血圧変動を呈する10分間を遮断時間とした。

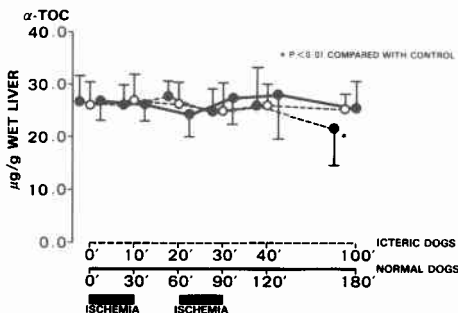
正常群, 閉黄群, シャント群ともに術前の肝 EC に差は認められなかった。3群ともに肝 EC は血行遮断により有意に低下したが, 遮断解除により速やかに回復した (Fig. 1)。正常群における30分間の血行遮断による肝 EC の低下は閉黄群, シャント群での10分間の遮断とほぼ同等であった。正常群では実験開始180分後 (2回目の遮断解除90分後), 閉黄群, シャント群では100分後 (2回目の遮断解除70分後) においても EC に低下は認められなかった。肝 GSH 濃度は正常群, シャント群ともに全経過を通じて変化はみられなかったが, 閉黄群では実験開始100分後において前値の  $4.08 \pm 0.93 \mu\text{mol/g}$  肝より  $3.08 \pm 0.99 \mu\text{mol/g}$  肝と有意の低下を認めた (Fig. 2)。肝  $\alpha$ -toc 濃度も同様に, 正常群, シャント群には変化はみられなかったが, 閉黄群では100分後において前値の  $26.54 \pm 4.81 \mu\text{g/g}$  肝より  $24.52 \pm 6.19 \mu\text{g/g}$  肝へと有意の低下を認めた (Fig. 3)。肝脂質過酸化濃度には3群ともに全経過を通じて有意の変化は認められなかった (Fig. 4)。

門脈血中エンドトキシン濃度は正常群では全経過を通じて  $10 \text{pg/ml}$  以下と増加は認められなかった。シャント群では2回目の遮断解除10分後より増加がみられ, 実験開始100分後には  $13.8 \pm 4.4 \text{pg/ml}$  と前値およ

**Fig. 2** Changes of hepatic total glutathione (GSH) after occlusion of the hepatic inflow and reperfusion. GSH in dogs with obstructive jaundice decreased at the end of the experiments. ●—● normal dogs, ●---● dogs with obstructive jaundice, ○---○ dogs with choledocho-caval shunt. \* $p < 0.05$  vs control value.

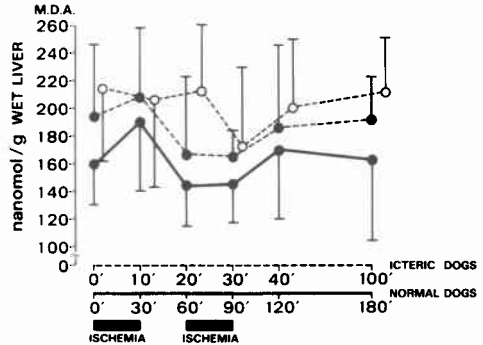


**Fig. 3** Changes of hepatic  $\alpha$ -tocopherol ( $\alpha$ -toc) after occlusion of the hepatic inflow and reperfusion.  $\alpha$ -toc in dogs with obstructive jaundice decreased at the end of the experiments. ●—● normal dogs, ●---● dogs with obstructive jaundice, ○---○ dogs with choledocho-caval shunt. \*  $p < 0.05$  vs control value.

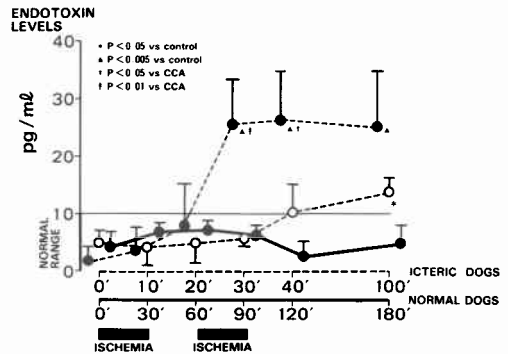


び正常群に比較して有意の高値を認めた。また、閉黄群では2回目の遮断解除直後よりエンドトキシン値は著明に増加し(25.3±8.3pg/ml)、以後100分まで正常群、シャント群に比較して有意の高値を持続した(Fig. 5)。末梢血中エンドトキシン値の推移は門脈血中とはほぼ同様であり、閉黄群は実験開始40分および100分後において前値に比較して有意の高値を示した。また、シャント群では100分後に軽度ながら有意の高値を示した(Fig. 6)。

**Fig. 4** Changes of hepatic lipoperoxide (malondialdehyde content; MDA) after occlusion of the hepatic inflow and reperfusion. No significant variations were observed throughout the experiments in all groups. ●—● normal dogs, ●---● dogs with obstructive jaundice, ○---○ dogs with choledocho-caval shunt.



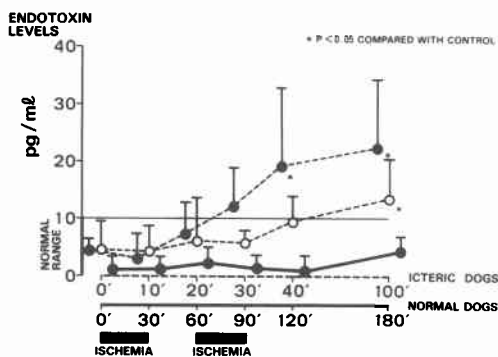
**Fig. 5** Portal endotoxin levels after occlusion of the hepatic inflow and reperfusion. Levels in dogs with obstructive jaundice increased after reperfusion of the second ischemic maneuver; levels in dogs with choledocho-caval shunt increased only at the end of the experiments. ●—● normal dogs, ●---● dogs with obstructive jaundice (BDL dogs), ○---○ dogs with choledocho-caval shunt (CCA dogs). \* $p < 0.05$ ,  $\Delta p < 0.005$  vs control value; † $p < 0.05$ , ‡ $p < 0.01$  vs CCA values of the same time point.



考 察

正常犬は30分間の肝流入血行遮断に十分耐術したのに対し、黄疸犬は耐術不能であり10分間の遮断に止めた。高ビリルビン血症時に認められる左心室仕事量の低下や循環血漿量不足がその原因と考えられた<sup>9)10)</sup>。閉黄群とシャント群間のGPT, アルカリフォスファ

**Fig. 6** Systemic endotoxin levels after occlusion of the hepatic inflow and reperfusion. Levels in dogs with obstructive jaundice increased 10min after reperfusion of the second ischemic maneuver; levels in dogs with choledocho-caval shunt became elevated only at the end of the experiments. ●—● normal dogs, ●---● dogs with obstructive jaundice, ○---○ dogs with choledocho-caval shunt. \* $p < 0.05$  vs control value.



ターゼ値に有意差はなく、総ビリルビン値はむしろシャント群で有意の高値を示した。しかし閉塞性黄疸では肝ミトコンドリア呼吸能<sup>11)</sup>やアンモニア処理能の低下<sup>12)</sup>など明らかな肝機能障害が認められるのに対し、総胆管下大静脈シャントでは胆汁の血中への排泄による高ビリルビン血症は著明なもの肝機能障害は軽微とされており<sup>13)</sup>、そのことは今回の組織学的検討によっても明らかであった。

虚血後血流再開時に過酸化障害が起きることは周知のごとくであり、以下の理由が考えられる。①虚血中に細胞内に還元物質が増加し、血流再開による酸素添加時これが酸素と反応しラジカルの大量発生がある<sup>14)</sup>。②虚血中ATPは分解しキサンチン、ヒポキサンチンとして虚血組織に蓄積し、これを代謝するキサンチン脱水素酵素はキサンチン酸化酵素に変換される。酸素添加時にキサンチン酸化酵素が働き $O_2$ が産生される。③虚血中にスーパーオキシドジスムターゼ(SOD)などの酵素活性が低下したり、GSH再生系が障害される<sup>15)</sup>。しかし、細胞はラジカルの生成に対し防御機構を有しており、臓器中肝臓が最大の容量を有するGSHは細胞内フリーラジカル消去作用を有し<sup>16)</sup>、 $\alpha$ -tocは細胞膜の抗酸化作用を有する<sup>17)</sup>。ラジカルの生成に対し、これら抗酸化物質が動員され減少し、ラジカルの生成がそれを上回って生ずる過酸化脂質反応

により細胞は障害されるとされている<sup>18)</sup>。

エンドトキシンによる臓器障害の原因の一つにフリーラジカルが指摘されている<sup>9)</sup>。閉塞性黄疸時のエンドトキシン血症発生の機序についてはさまざまな報告がみられ、またBailey<sup>19)</sup>は24例の閉塞性黄疸患者中門脈血中エンドトキシン陽性が16例、末梢血陽性が12例と報告している。2回の肝血行遮断をくり返す本実験モデルにおいて、正常群はまったくエンドトキシン値の上昇を示さず、肝障害の軽微なシャント群で2回目の遮断解除70分後に軽度の上昇を認めただけであった。一方、閉黄群では2回目の遮断解除直後より著明なエンドトキシン血症を継続し、門脈血中での増加は末梢血中よりも著明であった。閉塞性黄疸によるエンドトキシンの腸粘膜通過防御機構の破綻、Kupffer細胞機能の低下<sup>3)</sup>に腸管のうっ血と肝虚血操作が加わり、エンドトキシン血症を呈したものと考えられる。

閉黄群において2回目の遮断解除70分後に細胞内フリーラジカル消去剤として働く内在性GSH、 $\alpha$ -tocの有意の減少を認めたことは、この時期のフリーラジカルの生成を示唆し、逆にこの消去のためにGSH、 $\alpha$ -tocが消費されたことが推察される。虚血と血流再開操作に加え、門脈血中エンドトキシンがフリーラジカル産生に関与している可能性も十分に考えられるところである。川崎<sup>20)</sup>はマウスにリポ多糖類(LPS)を投与したところ肝ATPレベルは減少し、GSH、 $\alpha$ -tocの減少に伴ない肝脂質過酸化量は著増し、これらの反応はCoQ<sub>10</sub>、 $\alpha$ -toc投与により抑制されたことから、エンドトキシンによる細胞障害の一部は過酸化脂質生成によると指摘している。また、Arthurら<sup>21)</sup>はエンドトキシンにより活性化されたマクロファージより生成されたフリーラジカルが肝細胞障害を引き起こす可能性を指摘している。しかし、今回の閉黄群においても2回目の遮断解除後最後まで肝脂質過酸化量に有意の変化はみられず、肝ECに低下は認められなかった。このことにより、生成されたフリーラジカルは内在性消去剤および抗酸化剤により消去され、過酸化脂質生成による肝エネルギー代謝障害は惹起されず、閉塞性黄疸肝といえどもラジカルの攻撃よりよく防御されていたものと推察された。

閉黄群よりも肝病変の軽微なシャント群では2回目の遮断解除後70分で軽度の上昇を認めただけであった。その機序は不明なものビリルビン血症と網内系機能の低下などに関し今後の検討が必

要である。また、肝 GSH,  $\alpha$ -toc レベルに有意の変化はみられず、フリーラジカルが生成された可能性は否定的であるが、ビリルビンは  $\alpha$ -toc よりもさらに強力な抗酸化作用を有している<sup>18)</sup>ことから、肝臓はラジカルの攻撃よりよく防御されていたことが十分に考えられるところである。

#### 文 献

- 1) Huget C, Nordlinger B, Bloch P et al: Normothermic hepatic vascular exclusion for extensive hepatectomy. *Surg Gynecol Obstet* 147: 689—693, 1978
- 2) Nakagawa K, Matsubara T, Ouchi K et al: Endotoxemia after abdominal surgery. *Tohoku J Exp Med* 150: 273—280, 1986
- 3) 玉熊正悦: 閉塞性黄疸とエンドトキシン. 佐藤寿雄編. 閉塞性黄疸と多臓器障害. 金原出版, 東京, 1986, p23—30
- 4) 西川浩平: エンドトキシンショックのメディエーター. *代謝* 26: 453—463, 1989
- 5) Keller GA, Barke R, Harty JT et al: Decreased hepatic glutathione levels in septic shock. *Arch Surg* 120: 941—945, 1985
- 6) Ouchi K, Okabe Asanuma Y et al: Effects of homologous plasma cross-circulation on liver function in galactosamine-induced hepatic necrosis in rats. *Artif Organs* 8: 179—185, 1984
- 7) Atkinson DE: The energy charge of the adenylate pool as a regulatory parameter. Interaction with feedback modifiers. *Biochemistry* 7: 4030—4034, 1968
- 8) 真杉文紀, 中村哲也: Sodium dodecylsulphate 可溶化による肝チオバルピツール酸値とビタミン E, 薬物によるその変動. *ビタミン* 51: 21—29, 1977
- 9) Aylward TD, Schowengerdt CG, Bove K: Experimental hyperbilirubinemia. Effect on glomerular filtration. *J Surg Res* 15: 1—3, 1973
- 10) Green J, Beyar R, Sideman S et al: The “jaundiced heart” A possible explanation for postoperative shock in obstructive jaundice. *Surgery* 100: 14—19, 1986
- 11) 佐藤寿雄, 小山研二: 閉塞性黄疸の病態生理—肝障害を中心として—. *外科* 36: 426—433, 1974
- 12) 大和田康夫, 小山研二, 高木 靖ほか: 閉塞性黄疸肝におけるアンモニア代謝について. *肝臓* 18: 333—340, 1977
- 13) Green J, Beyer R, Bomzon L et al: Jaundice, the circulation and the kidney. *Nephron* 37: 145—152, 1984
- 14) Chance B, Sies H, Boveris A: Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol Rev* 59: 527—605, 1979
- 15) Guarnieri C, Flamigni F, Caldarella C: Role of oxygen in the cellular damage induced by reoxygenation of hypoxic heart. *J Mol Cell Cardiol* 12: 797—808, 1980
- 16) Kaplowitz N, Aw TY, Ookhtens M: The regulation of hepatic glutathione. *Ann Rev Pharmacol Toxicol* 25: 714—744, 1985
- 17) Weiss SJ: Oxygen, ischemia and inflammation. *Acta Physiol Scand* 48: 9—37, 1986
- 18) Slater TF: Overview of methods used for detecting lipid peroxidation. *Methods Enzymol* 105: 283—293, 1984
- 19) Bailey ME: Endotoxin, bile salts and renal function in obstructive jaundice. *Br J Surg* 63: 774—778, 1976
- 20) 川崎 尚: 臓器虚血障害の保護. *代謝* 24: 389—399, 1987
- 21) Arthur MJP, Bentley IS, Tanner AR et al: Oxygen-derived free radicals promote hepatic injury in the rat. *Gastroenterology* 89: 1114—1122, 1985

### An Experimental Study on the Liver Pathophysiology after the Pringle Maneuver in Obstructive Jaundice —Liberation of Oxygen Free Radicals and Endotoxemia—

Kiyooki Ouchi, Masanori Suzuki, Kenji Fukuhara, Junichi Mikuni,  
Taisei Muto and Seiki Matsuno

The First Department of Surgery, Tohoku University School of Medicine

Hepatic oxidative damage can be detected after ischemia-reperfusion and abnormal endotoxin levels. We have investigated the effects of the Pringle maneuver (temporal occlusion of the hepatic blood inflow) on normal dogs, dogs with obstructive jaundice and dogs with hyperbilirubinemia without obstructive cholestasis which was induced by cholangio-caval shunt. The Pringle maneuver only transiently altered the hepatic energy charge and

increased lipid peroxide was not found in all three groups of dogs. After the maneuver endotoxemia was not detected in normal dogs and the delayed onset of slightly increased endotoxin level was found in dogs with cholangio-caval shunt. Hepatic total glutathione and  $\alpha$ -tocopherol concentrations in both groups of dogs were within control ranges. However, in dogs with obstructive jaundice, this maneuver produced increased systemic and portal endotoxin levels with a decrease in hepatic total glutathione and  $\alpha$ -tocopherol content. In conclusion, the Pringle maneuver in dogs with obstructive jaundice appears to trigger the liberation of free radicals by means of an increased absorption of enteric endotoxins. However, oxidative damage, measured as an increment in the content of lipid peroxides, was not detected.

**Reprint requests:** Kiyooki Ouchi The First Department of Surgery, Tohoku University  
1-1 Seiryō-cho, Aoba-ku, Sendai, 980 JAPAN

---