

閉塞性黄疸肝の虚血再灌流時における組織 adenosine 5'-triphosphate および組織血流量の変動に関する実験的研究

岐阜大学医学部第1外科学教室, 海津郡医師会病院*

渡辺 敬 鬼束 惇義* 千賀 省始 宮田 知幸
飯田 辰美 林 勝知 広瀬 一

閉塞性黄疸(以下OJ)症例に対して肝切除術を施行する際肝門部血行遮断による出血の制御は有効な方法である。肝は虚血に陥るがOJ肝に対する虚血の影響は明らかでない。そこでOJ肝虚血再灌流時の病態を解明する目的で以下の実験を行った。総胆管を結紮し、1, 2, 3, 4週間経過したラット(OJ群)をおのおのbile duct ligation (BDL), BDL-1W群, BDL-2W群, BDL-3W群, BDL-4W群と4群に分け、15分, 60分の虚血実験を行い同時間虚血とした正常肝の対照群と比較検討した。15分虚血実験では、BDL-2W群, BDL-3W群, BDL-4W群においては adenosine 5'-triphosphate(以下ATP)は虚血前すでに対照群より低下していたが、再灌流後の回復率には差がなかった。また組織血流量の再灌流後の回復率にも差がなかった。しかし60分虚血実験ではBDL-4W群においてATP, 組織血流量の回復率とも対照群に比べ有意に低値であった。すなわち、胆管閉塞期間が長期になると、60分間虚血に対する忍容性は対照群より劣るものと考えられた。

Key words: obstructive jaundice, ischemia, changes of adenosine 5'-triphosphate, tissue blood flow

I. はじめに

閉塞性黄疸は手術侵襲あるいは感染により、容易に肝不全、消化管出血、腎不全、播種性血管内凝固症候群などの合併症を引き起こす病態である。われわれはすでに閉塞性黄疸肝における高エネルギー磷酸化合物および組織血流量の変動に関し報告してきた¹⁾。

一方、閉塞性黄疸症例に対して肝切除術を施行する際、一般に出血の制御のために肝門部血流遮断が行われ、肝組織は虚血状態に陥る。臨床例における肝虚血の影響に関しては Huguet²⁾が血液生化学検査の変動の面から報告している。また、虚血肝障害を形態学的、生化学的に検討した報告も多い^{3)~7)}。しかしながら、閉塞性黄疸肝に対する虚血の影響はいまだ解明されておらず、なかでも高エネルギー磷酸化合物あるいは組織血流量の変動の面から検討した報告は認められない。そこで閉塞性黄疸肝の虚血再灌流時における肝障害の病態を解明し、閉塞性黄疸による肝障害の程度

と虚血障害および再灌流後の回復度との関連性を明白にすることは、血流遮断の適応、あるいは許容遮断時間を検討するうえで有用であると思われる。今回、われわれはラットを用いて閉塞性黄疸モデルを作成し15分間と60分間の常温虚血実験を行い、虚血再灌流時の肝組織高エネルギー磷酸化合物なかでも adenosine 5'-triphosphate (以下ATP) および組織血流量の変動について検討したので報告する。

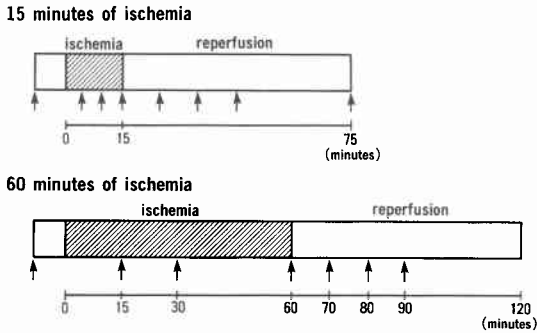
II. 材料および方法

1) 閉塞性黄疸モデルの作成

Pentobarbital sodium (50mg/kg body weight) 腹腔内投与麻醉下に体重180~220gのWistar系雄性ラットの総胆管を結紮切離し、1, 2, 3, 4週間経過後のラット(黄疸群)を実験に用いた。おのおのをbile duct ligation (以下BDL)-1W群(n=7), BDL-2W群(n=7), BDL-3W群(n=7), BDL-4W群(n=7)とした。対照群(n=7)として未処置の同週齢のWistar系雄性ラットを用いた。

ラットは飼育用固形飼料と水を自由摂取させたが実験前夜は12時間絶食とした。なお、実験はモデル完成

Fig. 1 Experimental design. ↑: Small specimen was taken from the liver at this point.



直後に行った。

2) 肝虚血の方法および肝組織 ATP と肝組織血流量の測定

Pentobarbital sodium (50mg/kg body weight) 腹腔内投与による麻酔下にラットを開腹した。虚血は左葉内側葉と外側葉に流入する門脈および肝動脈を血管用クリップを用いて15分間、60分間血流遮断することで行い、血流再開は遮断を解除することで行った。15分虚血実験では虚血前、虚血後5、10、15分、再灌流後10、20、30、60分に微量の肝組織を凍結採取した。60分虚血実験では、虚血前、虚血後15、30、60分、再灌流後10、20、30、60分に微量の肝組織を凍結採取した(Fig. 1)。採取した試料を凍結乾燥したのち高速液体クロマトグラフィー (high pressure liquid chromatography; HPLC) (TOSO 社製) を用いて単位乾燥重量あたりの ATP ($\mu\text{mol/gdw}$) を測定した。カラムは ODS-80TM (TOSO 社製)、緩衝液は磷酸緩衝液 (0.5M, pH 6) を使用した。肝組織血流量はレーザー組織血流計 (AF2100) にて測定した。

なお、実験中、保育器を用いて体温を $37 \pm 1^\circ\text{C}$ に保持した。また開腹直後より 5% グルコース加生理食塩水を15分ごとに 2ml/kg を投与した。

3) 統計学的処理

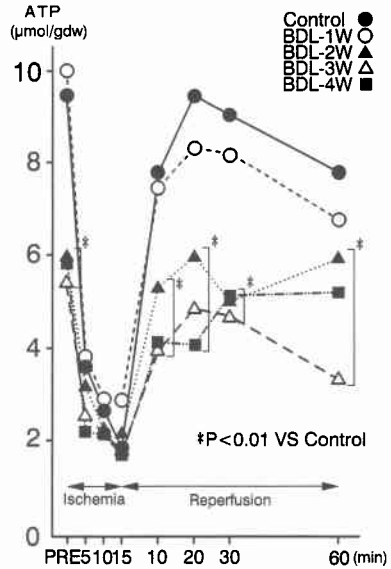
結果はすべて平均値±標準偏差で表示し有意差検定には、一元配置分散分析と Student t-検定を用い、危険率0.05以下を有意差ありとした。

III. 結果

1) 15分間虚血再灌流時における肝組織 ATP の変動

対照群においては虚血前値 $9.4 \pm 0.8 \mu\text{mol/gdw}$ (以下同じ単位) であったが、虚血後は、虚血15分におい

Fig. 2 Changes in ATP induced by occlusion and reflow of portal vein and hepatic artery (15 minutes of ischemia).

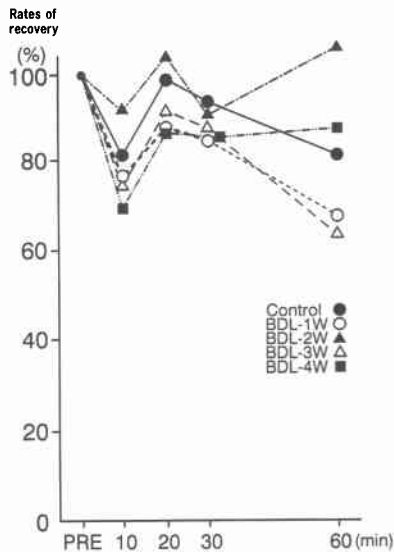


て 1.9 ± 0.6 と低下した。しかし、再灌流後20分で 9.4 ± 1.5 と虚血前値まで回復した。BDL-1W 群では虚血前、虚血中および再灌流後の数値は対照群とほぼ同様で有意差はなかった。BDL-2W 群においては虚血前 5.9 ± 1.5 とすでに対照群に比べ有意 ($p < 0.01$) に低値であった。虚血中は対照群に比べ有意差はなかった。再灌流後はいずれも対照群に比べ有意 ($p < 0.01$) に低かった。BDL-3W 群においては虚血前値が 5.4 ± 0.6 とすでに対照群に比べ有意 ($p < 0.01$) に低かった。虚血中は対照群と比べ有意差はなかった。再灌流後はいずれも対照群に比べ有意 ($p < 0.01$) に低かった。BDL-4W 群においては虚血前値が 5.9 ± 0.4 と対照群に比べすでに有意 ($p < 0.01$) に低値を示した。虚血中は対照群との間に有意差はなかった。再灌流後はいずれも、対照群に比べ有意 ($p < 0.01$) に低かった (Fig. 2)。

2) 15分虚血再灌流後の ATP の前値に対する回復率

虚血前値に対する再灌流後の数値の比率を回復率とした。対照群における回復率は再灌流後10分 $82.6 \pm 15.3\%$ 、20分 $99.8 \pm 11.0\%$ 、30分 $94.3 \pm 15.5\%$ 、60分 $82.7 \pm 16.1\%$ であった。BDL-1W 群における回復率は再灌流後10分 $77.2 \pm 14.3\%$ 、20分 $89.3 \pm 25.6\%$ 、30分 $85.3 \pm 17.9\%$ 、60分 $68.9 \pm 12.1\%$ 、BDL-2W 群の回復率は再灌流後10、20、30、60分後がおのおの $92.9 \pm$

Fig. 3 Comparison of rates of recovery of ATP after reperfusion (15 minutes of ischemia).



21.0%, $104.7 \pm 26.4\%$, $91.1 \pm 29.7\%$, $106.7 \pm 21.0\%$, BDL-3W 群の回復率は再灌流後10, 20, 30, 60分がおのおの $76.0 \pm 17.4\%$, $92.1 \pm 17.5\%$, $88.7 \pm 15.0\%$, $64.5 \pm 11.0\%$, BDL-4W 群の回復率は再灌流後10, 20, 30, 60分がおのおの $70.8 \pm 16.1\%$, $87.8 \pm 27.3\%$, $86.7 \pm 7.2\%$, $88.5 \pm 20.5\%$ であり、いずれの群においても対照群に比べ有意差を認めなかった (Fig. 3).

3) 15分虚血再灌流後の組織血流量の虚血前値に対する回復率

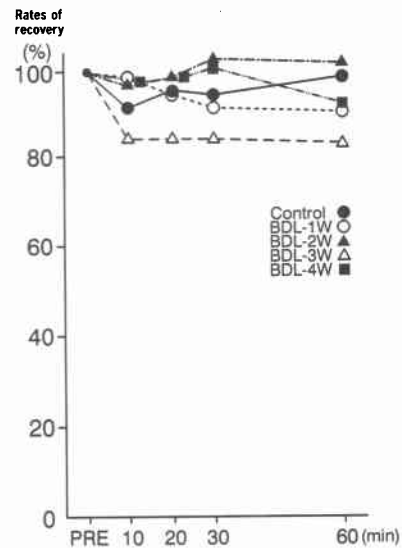
組織血流量の虚血前値に対する再灌流後の数値の割合を回復率とした。

対照群の回復率は再灌流後10, 20, 30, 60分がおのおの $92.8 \pm 16.7\%$, $96.9 \pm 16.7\%$, $95.4 \pm 17.0\%$, $99.4 \pm 19.5\%$ であった。黄疸群においても80~100%の回復率を示し対照群との間に有意差はなかった (Fig. 4).

4) 60分虚血再灌流時における肝組織 ATP の変動

対照群においては虚血前値 $9.3 \pm 1.3 \mu\text{mol/gdw}$ (以下同じ単位)であったが、虚血後は、虚血60分において 1.5 ± 0.2 と低下した。しかし、再灌流後20分で 6.6 ± 2.2 と虚血前値の70%まで回復した。BDL-1W 群においては虚血前、虚血中、再灌流後ともむしろ対照群に比べ高値を示した。BDL-2W 群においては虚血前値が 6.3 ± 1.2 と対照群に比べ有意 ($p < 0.01$)に低値であった。虚血中の数値は対照群に比べ有意差はなかった。

Fig. 4 Comparison of rates of recovery of tissue blood flow after reperfusion (15 minutes of ischemia).



再灌流後の数値はいずれも、対照群に比べ有意 ($p < 0.01$)に低値であった。BDL-3W 群においては虚血前値が 6.0 ± 1.1 と対照群に比べ有意 ($p < 0.01$)に低値であった。虚血中の数値は対照群に比べ有意差はなかった。再灌流後の数値はいずれも、対照群に比べ有意 ($p < 0.01$)に低値であった。BDL-4W 群においては虚血前値が 5.5 ± 1.2 と対照群に比べ有意 ($p < 0.01$)に低値を示した。虚血中の数値は対照群との間に有意差はなかった。再灌流後の数値はいずれも、対照群に比べ有意 ($p < 0.01$)に低値であった (Fig. 5).

5) 60分虚血再灌流後の ATP の前値に対する回復率

虚血前値に対する再灌流後の数値の比率を回復率とした。対照群における回復率は再灌流後10分 $69.3 \pm 16.5\%$, 20分 $68.6 \pm 21.5\%$, 30分 $64.3 \pm 9.7\%$, 60分 $67.3 \pm 4.7\%$ であった。BDL-1W 群, BDL-2W 群, BDL-3W 群における回復率はいずれも、対照群との間に有意差はなかった。しかし、BDL-4W 群の回復率は再灌流後10, 20, 30, 60分がおのおの $45.2 \pm 12.0\%$, $43.6 \pm 13.4\%$, $42.0 \pm 10.3\%$, $35.1 \pm 11.5\%$ であり、再灌流後10, 20, 30分 ($p < 0.05$), 60分 ($p < 0.01$)において有意に低値であった (Fig. 6).

6) 60分虚血再灌流後の組織血流量の虚血前値に対する回復率

Fig. 5 Changes in ATP induced by occlusion and reflow of portal vein and hepatic artery (60 minutes of ischemia).

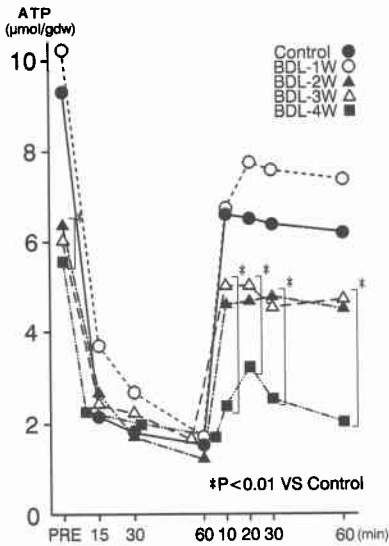
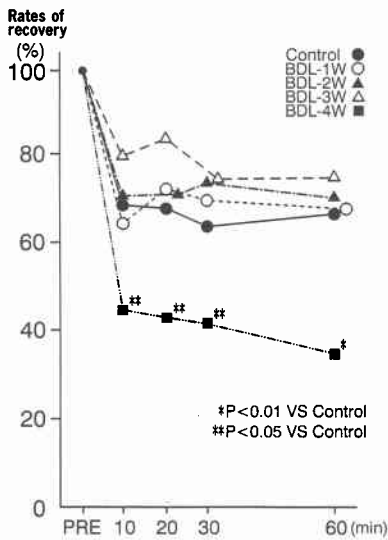


Fig. 6 Comparison of rates of recovery of ATP after reperfusion (60 minutes of ischemia).



組織血流量の虚血前値に対する再灌流後の値の割合を回復率とした。

対照群の回復率は、再灌流後10, 20, 30, 60分がおのおの23.4±2.7%, 43.8±7.8%, 50.0±2.9%, 39.8±12.1%であった。BDL-1W群, BDL-2W群, BDL-3W群の回復率には対照群との間に有意差はなかった。

BDL-4W群の回復率は、再灌流後30分の数値が対照群に比べ有意 ($p < 0.01$) に低値であった (**Fig. 7**)。

7) 対照群とBDL-4W群の15分虚血再灌流後および60分虚血再灌流後におけるATPの回復率

2)および5)で示したATPの回復率のうち対照群とBDL-4W群を併せて示した。さきに示したように15分

Fig. 7 Comparison of rates of recovery of tissue blood flow after reperfusion (60 minutes of ischemia).

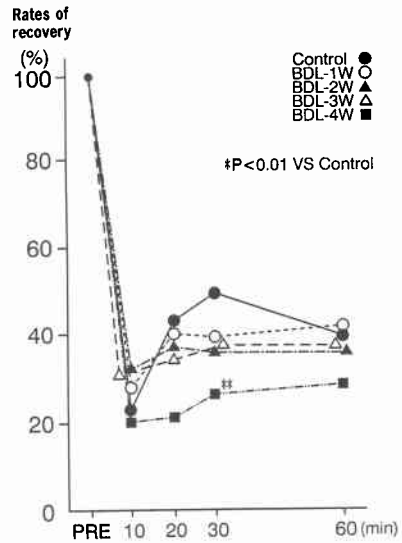
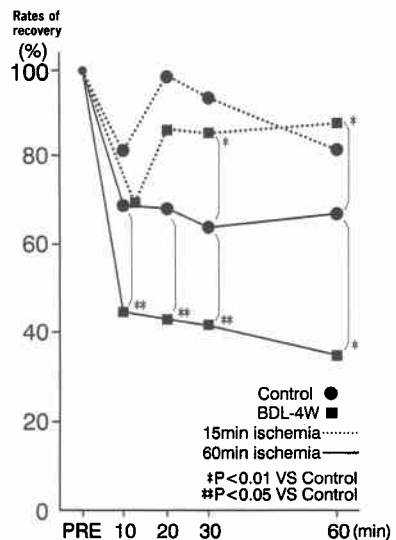


Fig. 8 Comparison of rates of recovery of ATP in BDL-4W group (15 minutes of ischemia, 60 minutes of ischemia).



虚血再灌流後の ATP の回復率は対照群と BDL-4W 群の間で差はなかったが、60分虚血再灌流後の ATP の回復率は BDL-4W 群において有意に低値であった。また再灌流後30分、60分においては、15分虚血再灌流後の BDL-4W 群における ATP の回復率は、60分虚血再灌流後の対照群における ATP の回復率よりも有意 ($p < 0.05$) に高値であった (Fig. 8)。

IV. 考 察

われわれは、ラットを用いて閉塞性黄疸モデルを作成し、それらの閉塞期間により BDL-1W 群, BDL-2W 群, BDL-3W 群, BDL-4W 群に分類した。これらのモデルについての検討はすでに報告している⁹⁾。すなわち病理組織学的には、閉塞期間とともに胆管増生、線維化の所見が進行性に高度となり、BDL-4W 群においては肝硬変の組織像を呈した。肝組織 ATP は BDL-2W 群, BDL-3W 群, BDL-4W 群で有意に低値であり、また組織血流量は BDL-3W 群, BDL-4W 群で有意に低値であった。したがって黄疸肝においては進行性に組織学的な変化が高度になるとともにエネルギー代謝、組織血流量の低下が認められた。

ATP は高エネルギー磷酸化合物中、エネルギー蓄積量が最も多く、特に ATP の残存量が虚血障害時における臓器の viability の判定に有用であると報告されている^{8)~10)}。肝の虚血時間が15分、60分のいずれにおいても BDL-2W 群, BDL-3W 群, BDL-4W 群では、虚血前、再灌流後とも肝組織 ATP は正常肝を同時間虚血にした対照群に比べ有意に低値であった。したがって閉塞性黄疸肝においては、虚血前よりすでにエネルギー代謝の悪化がみられ、再灌流後も対照群に比べ、エネルギー代謝状態は悪化していると考えられた。しかし、虚血中の組織 ATP は15分虚血実験、60分虚血実験のいずれにおいても対照群、黄疸群の間に差はなかったことから、虚血中の ATP を測定することによって、閉塞性黄疸肝に対する虚血障害の程度を推定することはできないと考えられた。

次に、虚血前値に対する再灌流後の ATP の数値の比率を回復率として検討したところ、15分虚血実験では対照群と閉塞性黄疸群との間には、有意差が認められなかった。このことは局所の循環障害を伴った閉塞性黄疸肝であっても、15分の虚血ならば、組織の ATP は、再灌流後に虚血前のレベルに対照群と同程度に回復しうること示唆している。しかし60分虚血実験においては、BDL-1W 群, BDL-2W 群, BDL-3W 群においては対照群との間に有意差を認めなかったのに対し

て、BDL-4W 群は有意に低値を示した。閉塞性黄疸肝の病理組織学的検討⁹⁾によれば、BDL-4W 群では bridging fibrosis、胆管増生が認められ肝硬変の像を呈していた。したがって、病理組織学的変化が高度になると ATP が対照群に比べ低値を示すのみならず、60分虚血再灌流後の回復率も不良であると考えられた。また15分虚血再灌流後の BDL-4W 群と60分虚血再灌流後の対照群の ATP の回復率の比較でも、15分虚血再灌流後の BDL-4W 群が有意に高値を示し、病理学的変化の高度な BDL-4W 群においても15分虚血再灌流ならば比較的良好な ATP の回復率を示すと考えられた。

また組織血流量の虚血前値に対する再灌流後の回復率も、15分虚血実験においては対照群と黄疸群の間に有意差はなかったが、60分虚血実験においては、BDL-4W 群において有意に低値を示した。BDL-4W 群における組織血流量の再灌流後の回復率の低値も高度な組織病理学的変化を反映しているものと思われる^{11)~14)}。

虚血障害の機序については西田ら¹⁵⁾の詳細な報告がある。このなかで虚血中の細胞障害について、無酸素による ATP レベルの低下、イオン分布の変化、カルシウムの増加をあげている。今回の研究はこのうち、ATP レベルの低下に関連するものであるが、閉塞性黄疸肝と正常肝に及ぼす虚血の影響の差異は、組織血流量の低下を反映し、局所循環の悪化の程度により変化してくるものと思われる。15分虚血実験では黄疸肝においても組織血流量は再灌流後、対照群と同程度に虚血前の値に回復しうることから、病理学的には明らかな変化を認める⁹⁾にもかかわらず、15分間の虚血による影響は、正常肝、閉塞性黄疸肝の間に差はないものと考えられた。しかし、60分虚血による影響は組織学的変化の高度な BDL-4W 群において有意に表われると考えられた。

今回の検討から、臨床的に頻用されている15分間1回の血流遮断ならば、ATP、組織血流量の回復率に関して閉塞性黄疸肝と正常肝との間に差はなく、虚血に対して同程度に耐えうるものと考えられた。しかしながら、60分間の血流遮断では、閉塞期間が長期に及んだ BDL-4W 群において虚血に対する忍容性が対照群に比べ低下しているものと考えられた。

本論文の要旨は第37回日本消化器外科学会総会 (1991年2月, 名古屋), 第38回日本消化器外科学会総会 (1991年7月, 東京), 第91回日本外科学会総会 (1991年4月, 京都)

において発表した。

文 献

- 1) 渡辺 敬, 鬼束惇義, 千賀省始ほか: 閉塞性黄疸肝における高エネルギー磷酸化合物及び組織血流量の変動に関する実験的研究. 岐阜大医紀 40: 16-22, 1992
- 2) Huguet C, Nordlinger B, Bloch P et al: Tolerance of the human liver to prolonged normothermic ischemia. Arch Surg 113: 1448-1451, 1978
- 3) Bassi M, Bernelli-Zazzera A: Ultrastructural cytoplasmic change of liver cells after reversible ischemia. Exp Mol Pathol 3: 332-350, 1964
- 4) Frederiks WM, Myagkaya GL, Van Veen HA et al: Biochemical and ultrastructural changes in rat liver plasma membranes after temporary ischemia. Virchows Arch 46: 269-282, 1984
- 5) Hockerstedt K, Korsback C, Lehto VP: Liver hilus dearterialization. A histological and electron microscopical study in the dog. Ann Chir Gynaecol 68: 23-32, 1979
- 6) Marzella L, Glaumann H: Effects of in vivo liver ischemia on microsomes and lysosomes. Virchows Arch 36: 1-25, 1981
- 7) Yamauchi H, Mittmann U, Geisen HP et al: Postischemic liver damage in rats amino acid analysis and morphometric studies. Tohoku J Exp Med 138: 49-61, 1982
- 8) 村川真司, 鬼束惇義, 渡辺 敬ほか: ^{31}P -NMR法を用いた肝虚血障害時のリン化合物の変動の検討. Cyto-prot biol 8: 255-262, 1990
- 9) 田辺 博: ^{31}P -NMR法を用いた保存心 Viabilityの判定. 日胸外会誌 34: 862-872, 1986
- 10) 村川真司, 森 義雄, 山田 拓ほか: ^{31}P -NMR法よりみたラット摘出心低温虚血におけるUW液の効果. 外科治療 62: 584-585, 1990
- 11) Hunt DR: Changes in liver blood flow with development of biliary obstruction in the rat. Aust NZ J Surg 49: 733-737, 1979
- 12) 川崎俊彦: In vivo ^{31}P -MRS (磁気共鳴スペクトロスコピー)を用いた閉塞性黄疸ウサギ肝におけるエネルギー代謝の観察. 日消病会誌 84: 1244-1250, 1987
- 13) Reuter SL, Chuang VP: The location of increased resistance to portal blood flow in obstructive jaundice. Invest Radiol 11: 54-59, 1976
- 14) 藤谷恒明, 大内清明, 大和田康夫: 閉塞性黄疸における肝腎組織血流量及びエネルギー代謝について. 肝臓 29: 1389-1396, 1988
- 15) 西田俊明, 川島康生, 田川邦夫: 虚血障害の分子機作. 代謝 24: 379-387, 1987

Changes of Adenosine 5'-triphosphate and Tissue Blood Flow in Ischemia and Reperfusion of Jaundiced Rat Liver

Kei Watanabe, Atsuyoshi Onitsuka*, Shoshi Senga, Tomoyuki Miyata, Tatsumi Iida,
Masatomo Hayashi and Hajime Hirose
First Department of Surgery, Gifu University School of Medicine
*Kaizu Medical Association Hospital

This study was focused on the changes in adenosine 5'-triphosphate (ATP) levels and tissue blood flow in ischemia and reperfusion, in jaundiced rat liver. Bile ducts of male Wistar rats were ligated to induce jaundice. Rats were divided into five groups by the time (1, 2, 3 and 4 weeks) after bile duct ligation (BDL) (BDL-1W, 2W, 3W, 4W, respectively) and a control (no ligation). Ischemia was induced by clamping the portal vein and hepatic artery for 15 minutes and 60 minutes. The ATP level in BDL-2, 3, 4W (jaundiced) group was already lower than that in the control group before ischemia was induced and remained lower during reperfusion. No significant differences in the ATP level were found after 15 minutes of ischemia between the control and jaundiced groups. The rates of recovery of the ATP level after reperfusion preceded by 15 minutes of ischemia ranged from 70-100% among the various groups and no significant differences in the rates of recovery were seen between the control and jaundiced groups. The rates of recovery of tissue blood flow after reperfusion preceded by 15 minutes of ischemia ranged from 80-100%, and there were no significant differences in the rates of recovery between the control and jaundiced groups. The rate of recovery of the ATP level after reperfusion preceded by 60 minutes of ischemia in the BDL-4W group was significantly lower than that in the control. The rate of recovery of tissue blood flow 30 minutes after reperfusion preceded by 60 minutes of ischemia in the BDL-4W group was significantly lower than in the control.

From these results, we concluded that there were no significant differences in the rates of recovery of the ATP level and tissue blood flow after reperfusion preceded by 15 minutes of ischemia between the control and jaundiced groups, but the rates of recovery of the ATP level and tissue blood flow after reperfusion preceded by 60 minutes of ischemia were significantly lower in the BDL-4W group than those in the control.

Reprint requests: Kei Watanabe First Department of Surgery, Gifu University School of Medicine
40 Tsukasa-machi, Gifu, 500 JAPAN
