

## ラット小腸の虚血, うっ血およびその解除における 組織障害と活性酸素種の関連

横浜市立大学第2外科, 同 救命救急部\*

森脇 義弘 片村 宏 市川 靖史  
山本 俊郎 杉山 貢\*

ラットの小腸分節の支配動静脈を10分間, 30分間遮断した虚血群と, 灌流静脈のみを遮断したうっ血群とで, 血行遮断解除後の組織障害の程度ならびに障害に対する活性酸素種の関与を比較検討した (n=80)。また, これらの組織障害に対する活性酸素種の scavenger の抑制効果も検討した (n=16)。同一時間の血行遮断であれば虚血群よりもうっ血群の方が組織障害が著しく, また, 遮断時間が長い方が障害が著しかった。障害腸管の組織中過酸化脂質, 灌流静脈の化学発光も, 虚血群よりもうっ血群の方が高値を示したが, うっ血群では, 血行遮断中の組織障害が進行し組織壊死が認められた30分間の血行遮断解除後よりも, 10分間の血行遮断解除後の方が高値を示した。血行遮断解除後の組織中過酸化脂質, 灌流静脈血化学発光の上昇は scavenger の投与で抑制された。

**Key words:** ischemia-reperfusion of small intestine, congestion-reperfusion of small intestine, oxygen derived free radicals, lipid peroxidation

### はじめに

小腸は血栓, 塞栓, 絞扼などの疾患や, 門脈ないしはその分岐の血行遮断などの手術操作によって, 循環障害を起こしやすい臓器である。血行遮断に対し耐性が少なく, 容易に障害を受けやすいとされている。血行障害には流入動脈の遮断によるもの(虚血)と灌流静脈の遮断によるもの(うっ血)があり, 急性の血行障害では後者の方が組織障害が高度である。腸管の虚血-虚血後再灌流時に活性酸素種 (reactive oxygen species, 以下 ROS) による障害が発生することが知られている<sup>1)2)</sup>が, うっ血時の障害に関しては不明な点が多い。そこで著者らは, ラットを用いて小腸の虚血時とうっ血時, さらに解除後の組織障害の推移とこれに対する ROS の関与を検討し, これらの病態への ROS の scavenger の有用性についても検討した。

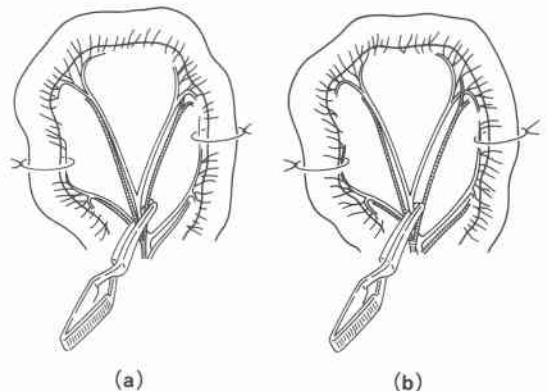
### 対象と方法

1. 小腸の虚血, うっ血の作成: Wistar 系雄性ラット (体重約200~250g) を96匹用いた。実験前24時間から水のみ自由に摂取させた後, Pentobarbital sodium (25mg/kg 体重) 腹腔内麻酔で開腹し, 回腸約10cm の

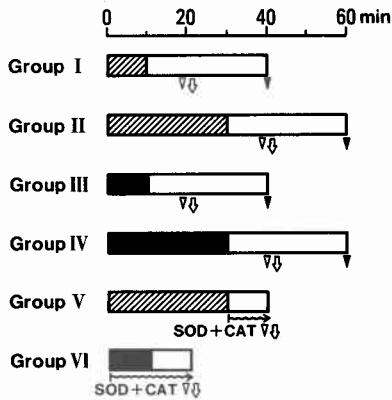
両端を辺縁動静脈を含めて閉塞した。同部回腸の支配動静脈を同時に遮断した虚血群と, 動脈血行を温存し灌流静脈のみ遮断したうっ血群とを作成した (Fig. 1)。

2. 虚血(うっ血)時, 虚血(うっ血)解除後の組織障害に対する ROS の関与: 以下の4群を設定した

**Fig. 1** Operative procedure; (a) ligation of the intestinal segment and clamping of the mesenteric arteries and veins supplying the segment, (b) clamping of the mesenteric veins draining the segment, preserving the arterial flow.



**Fig. 2** Experimental protocol; ■ : clamping of the mesenteric arteries and veins, ■ : clamping of the mesenteric veins only, ▽ : blood sampling from the draining vein, ▼ : blood sampling from peripheral vessel, ↓ : excision of the involved small bowel.



(Fig. 2).

I 群 : 10分間の虚血後に虚血を解除 (n=18)

II 群 : 30分間の虚血後に虚血を解除 (n=22)

III 群 : 10分間うっ血後にうっ血を解除 (n=22)

IV 群 : 30分間うっ血後にうっ血を解除 (n=18)

各群とも遮断解除後10分に障害腸管の辺縁静脈から微量採血 (300 $\mu$ l) し, 全血中の化学発光 (chemiluminescence, 以下 CL) を測定した。同時に障害腸管を摘出し, 組織中過酸化脂質 (lipid peroxide, 以下 LPO) を測定し, 一部をホルマリン固定し, hematoxylin-eosin 染色を行い, 障害の程度を組織学的に検討した。また, 解除後30分に末梢血を採血し血中エンドトキシン (以下 ETX) を測定した。さらに, 虚血 (うっ血) 解除後閉腹した群で, 生存期間を求めた。

3. 虚血 (うっ血) 時, 虚血 (うっ血) 解除後の障害に対する scavenger の抑制効果: 以下の 2 群を設定した (Fig. 2)。

V 群 : 30分間の虚血後に虚血を解除し, 解除直前から10分間 superoxide dismutase (SOD) 3,000u/kg, catalase (CAT) 2,600u/kg を持続静注 (n=8)

VI 群 : 10分間のうっ血後にうっ血を解除し, うっ血開始時から SOD, CAT を同様に持続静注 (n=8)

各群とも遮断解除後10分に, 障害腸管辺縁静脈血の CL, 障害腸管の組織中 LPO を測定し, 組織学的検討を行った。

4. 対照: 無処置のラット (n=18) を用いた。

5. 試薬ならびに測定法: SOD, CAT は SIGMA 社製のものを用いた。全血 CL は既報<sup>3)</sup>のごとく測定した。すなわち, ヘパリン加全血200 $\mu$ l を Eagle MEM Earle (阪大微生物研究会) 800 $\mu$ l で希釈し, luminol, opsonized zymosan をおのおの終濃度8 $\mu$ g/ml, 125  $\mu$ g/ml となるように添加し, Biolumat LB9500T を用いて37 $^{\circ}$ C で化学発光をカウントし, 最大発光までの発光総量を求め, 対照群の末梢血の CL に対する比で表わした。組織中 LPO は腸管全層を1.15% cold KCl 溶液でホモジェナイズし, 内山ら<sup>4)</sup>の方法に従い TBA 反応物質として測定し, 湿重量あたりで表した。血中 ETX は Toxicolor test<sup>5)</sup>を用いて測定した。

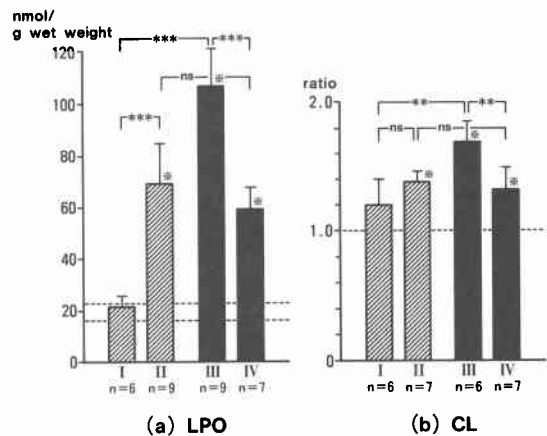
6. 統計学的処理: 測定値は, mean $\pm$ S.D. で表し, 検定は student t-test で行い, 危険率 5% 以下を有意差ありとした。

**結 果**

1. 生存期間: I 群, II 群, III 群は全例 7 日以上生存し, 腸管壊死を起こしたものはなかった (各 n=6) が, IV 群は 50% (n=6) が腸管壊死のため 48 時間以内に死亡した。

2. 障害腸管組織中 LPO 量: 対照では 19.1 $\pm$ 3.4 nmol/g (n=9) であった。I 群, II 群の解除後10分の障害腸管組織中 LPO 量は 21.5 $\pm$ 4.3, 69.0 $\pm$ 15.5 nmol/g と II 群で有意に高値であった (p<0.001)。III 群, IV 群では 107.1 $\pm$ 14.3, 59.1 $\pm$ 8.3nmol/g と共に有

**Fig. 3** (a) LPO of the involved bowel tissue and (b) CL of the draining venous blood; ... : control group, \* : significant difference (p<0.05) from the control group, \*\* : p<0.01, \*\*\* : p<0.001, ns : not significant.



意に高値であったが(各  $p < 0.01$ ,  $p < 0.001$ ), IV群よりもIII群の方が有意に高値であった( $p < 0.001$ ). さらに, 虚血群とうっ血群とを比べると, 10分遮断でうっ血群の方が有意に高値であった ( $p < 0.01$ , Fig. 3a).

3. 障害腸管灌流静脈血 CL: 対照群では  $0.30 \pm 0.08 \times 10^2$  counts/cell ( $n=12$ ) であった. I群, II群の解除後10分の障害腸管の灌流静脈血 CL は  $1.21 \pm 0.21$ ,  $1.39 \pm 0.07$  と, II群で対照群に比べ有意に上昇していた ( $p < 0.001$ ). III群, IV群では  $1.69 \pm 0.16$ ,  $1.32 \pm 0.16$  と両群とも対照群に比べ有意に上昇しており(各  $p < 0.001$ ,  $p < 0.001$ ), III群がIV群よりも有意に上昇していた ( $p < 0.01$ , Fig. 3b).

4. 末梢血 ETX 値: 対照群では  $1.63 \pm 0.98$  pg/dl ( $n=5$ ) であった. I群, II群では  $5.37 \pm 2.49$ ,  $6.53 \pm 5.47$  pg/ml と, 正常範囲とされている  $10$  pg/ml を越えて上昇したのは1例だけであった. III群, IV群では  $9.69 \pm 9.08$ ,  $29.60 \pm 6.08$  pg/ml と虚血群に比べ, うっ血群の方が高値の傾向にあった (Fig. 4).

5. SOD, CAT による影響: V群, VI群をおのおのII群, III群と比較した. 解除後10分の障害腸管の組織中 LPO 量は V群, VI群で  $42.8 \pm 17.2$ ,  $43.8 \pm 0.87$  nmol/g とおのおのII群, III群に比べ有意に低値となった(各  $p < 0.02$ ,  $p < 0.001$ , Fig. 5a). 障害腸管灌流静脈値 CL は V群, VI群で  $0.89 \pm 0.17$ ,  $1.22 \pm 0.12$  とおのおのII群, III群よりも有意に低下した (各  $p < 0.001$ ,  $p < 0.001$ , Fig. 5b).

6. 組織学的検討: I群では絨毛の構造, 粘膜上皮細胞にほとんど変化は見られなかった. II群, III群では絨毛間質の著しい浮腫と上皮細胞の空胞変性が認めら

Fig. 4 ETX of peripheral blood; ---: control group, \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , ns: not significant.

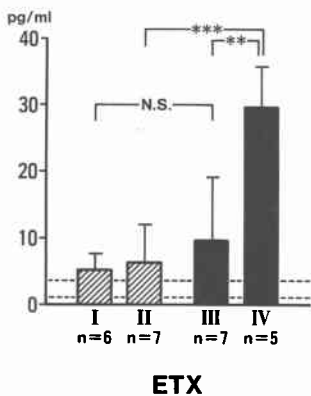
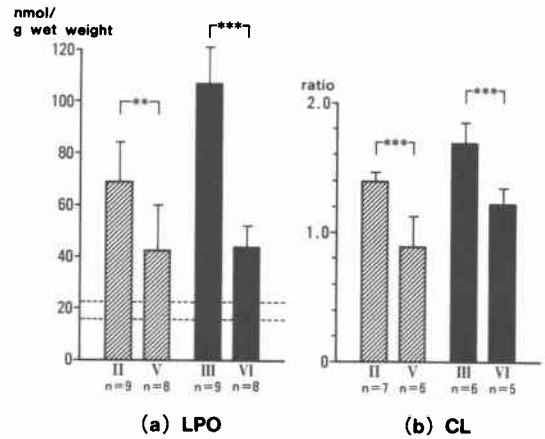


Fig. 5 (a) LPO of the involved bowel tissue and (b) CL of the draining venous blood, presenting the effect of radical scavenger; \*\* $p < 0.02$ , \*\*\* $p < 0.001$



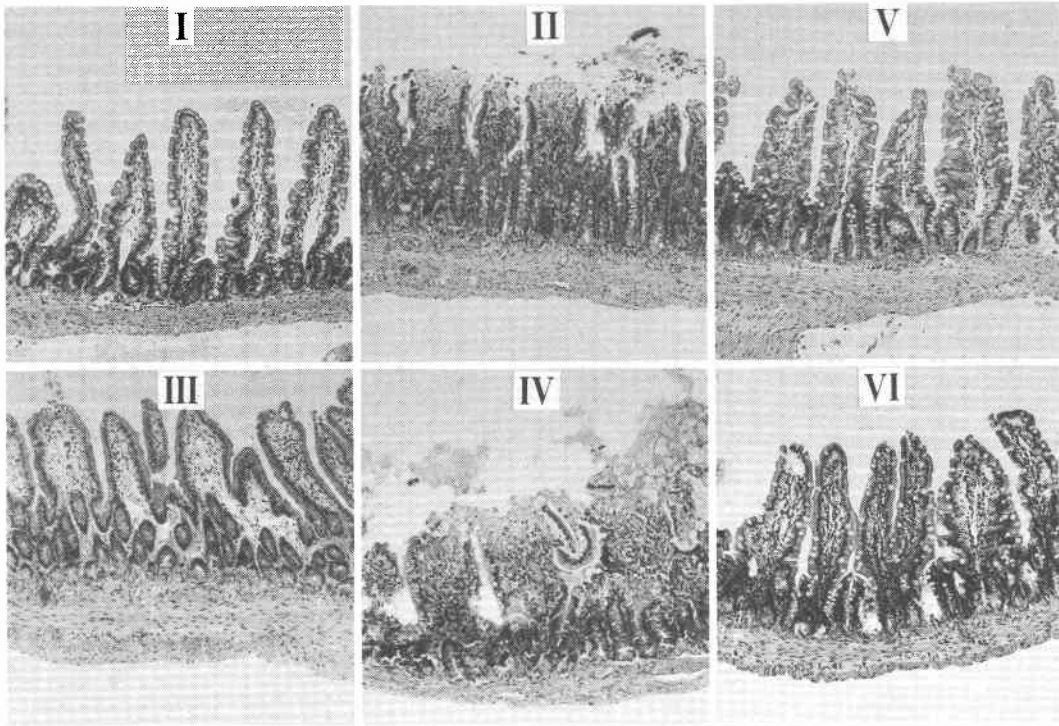
れ, III群では絨毛間質内の出血も見られた. IV群では絨毛構造の破壊, 間質の浮腫, 出血, 上皮の剝離, 漿膜下出血が認められた. V群, VI群ではII群, III群で認められた変化は軽減していた (Fig. 6).

#### 考 察

これまで, 虚血一再灌流障害と ROS の関係については多くの報告があるが, そのほとんどは臓器への流入動脈の遮断—遮断解除を用いた実験である<sup>6)~9)</sup>. 一方, 実際の臨床で経験される血行障害には, 静脈の灌流障害も少なくない. しかし, 静脈の灌流障害と ROS との関係について言及した報告は少なく, 灌流静脈の遮断—遮断解除時の障害に関しては不明な点が多い. 灌流静脈の遮断は, 静脈圧の急激な上昇をもたらす, 物理的圧力で組織の微小循環系を障害するとされている<sup>10)</sup>. しかし, 微小循環系での好中球の停滞, 内皮細胞への接着がおこれば, ROS が発生し組織障害を引き起こす可能性がある<sup>11)</sup>.

小腸の血行障害では, 疾患によるものでも手術操作によるものでも, 静脈の灌流障害から始まり動脈の血行停止へと至るものが多い. 門脈本幹の急激な遮断はショックを引き起こすことが知られており, 門脈本幹の遮断実験に関しては報告が散見される<sup>12)~14)</sup>. ROS との関連を示したもの<sup>10)</sup>もあるが, 門脈本幹の遮断は肝臓など全身への影響が大きく, 小腸局所の変化だけをとらえるには侵襲が大きすぎる. そこで著者らは, 小腸のうっ血による灌流障害を, 局所において検討するため, 短い小腸分節を用いて実験した.

**Fig. 6** Histological findings of involved bowel ; (I) Group I, (II) Group II, (III) Group III, (IV) Group IV, (V) Group V, (VI) Group VI (HE stain, ×40)



不飽和脂肪酸から radical 反応により生じる LPO は、測定法にまだ問題を残す<sup>19)</sup>が、現在のところ ROS による組織障害の指標として最も一般的に用いられている。また、好中球の NADPH oxidase から生成される O<sub>2</sub><sup>-</sup>は、myeloperoxidase により OHCl へと変換されるが、今回用いた luminol 依存性 CL は、主にこの OHCl を測定していると考えられており<sup>16)17)</sup>、CL の亢進は好中球の ROS 産生能を反映すると考えられる。SOD, CAT は O<sub>2</sub><sup>-</sup>を H<sub>2</sub>O と O<sub>2</sub> にまで変換する酵素である。生体内、細胞内における局在の問題もあるが、これらの酵素による障害の抑制が、その障害が活性酸素に由来するものであることの根拠のひとつと考えられている<sup>18)</sup>。

今回の結果で、灌流静脈の血行遮断解除後に腸管組織中 LPO が増加していたことから、局所的な要因による灌流障害にも radical 反応が関与することが示された。また、この際、灌流静脈血 CL が亢進しており、radical 反応の原因として好中球に由来する ROS が関与するものと思われた。さらに、LPO の上昇、CL の亢進が SOD, CAT の投与により抑制されたことも、こ

の障害が O<sub>2</sub><sup>-</sup>ないしはこれから派生する ROS による障害であることを裏付けるものである。逆に、この事実は、うっ血解除時の障害にも、ROS の scavenger の投与が有効となる可能性を示唆するものと思われる。

また、灌流静脈の血行遮断解除後の障害と支配動静脈の血行遮断解除後の障害を比べると、障害腸管の組織中 LPO、灌流静脈血 CL とともに、灌流静脈の血行遮断の方が高値となっており、同一時間の遮断であれば、灌流静脈の血行遮断の方が ROS の発生が多く、ROS による組織障害が著しいものと思われた。逆にこの結果から、種々の理由で腸管の灌流静脈を遮断せざるをえない場合に、組織障害を軽減するために支配動脈を同時に遮断する操作が、ROS の面からみても妥当であることが裏付けられる。

静脈の灌流障害では、ROS による障害は腸管壊死を起した30分間のうっ血よりも、10分間のうっ血で著しかった。著者らは、支配動静脈の同時遮断で遮断時間を延長し、遮断中の障害が進行すると、遮断解除後の LPO の新たな生成は少なくなることを報告してきたが<sup>19)</sup>、今回の灌流静脈遮断でも同様であった。これ

は, 血行遮断中に組織障害が進行し, 細胞が壊死に至ってしまった場合は, 遮断中に形成された過酸化脂質が粘膜絨毛の脱落とともに腸管壁から逸脱することに加え, 遮断を解除しても, 好中球や酸素が局所へ有効に到達できず, 障害されるべき組織と NADPH oxidase などの ROS の発生系酵素との相互反応がむしろ少なく, 解除後の LPO の新たな生成は少なくなるためではないかと思われる。しかし, 動静脈の同時遮断よりも灌流静脈遮断の方が傷害自体が大きいだけでなく傷害の進行も早く, 活性酸素種が傷害に関与する時間も短くなる傾向にあった。したがって, 静脈の灌流傷害に scavenger を用いるのであれば, 傷害発生後早期でなければならぬものと思われた。

一方, ETX も同一時間の遮断では, 流入動脈の遮断解除後よりも, 灌流静脈の遮断解除後の方が高値となったが, 灌流静脈の遮断で10分よりも30分の遮断解除後の高が高値となっていた。すなわち, ETX は組織の進行した障害を反映するものであって, 血行再開に伴って組織障害がさらに進行する—いわゆる再灌流障害とは関係ないものと思われた。また, ETX が上昇してくるのは, 組織が壊死に陥った場合など組織障害が非常に進行した場合だけであり, 腸管の阻血障害時には, 従来考えられてきたほど簡単には ETX は上昇しないものと思われた。

なお, 本論文の要旨は第15回日本過酸化脂質・フリーラジカル学会(京都), 第40回日本消化器外科学会総会(横浜)において発表した。

#### 文 献

- 1) Graner DN, Rutili G, McCord JM: Superoxide radicals in feline intestinal ischemia. *Gastroenterology* 81: 22—29, 1981
- 2) Grisham MB, Hernandez LA, Granger DN: Xanthine oxidase and neutrophil infiltration in intestinal ischemia. *Am J Physiol* 251: G251—G267, 1986
- 3) 森脇義弘: ラット腸管の虚血および再灌流による組織障害と活性酸素に関する研究. *横浜医* 41: 275—282, 1990
- 4) Uchiyama M: Determination of malondialdehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test. *Anal Biochem* 86: 271—278, 1978
- 5) Tamura H, Obayashi T, Takagi K et al: Perchloric acid treatment of human blood for quantitative endotoxin assay using synthetic chromogenic substrate for horseshoe crab clotting enzyme. *Thromb Res* 27: 51—57, 1982
- 6) Itoh M, Guth PH: Role of oxygen-derived free radicals in hemorrhagic shock—induced gastric lesion in rats. *Gastroenterology* 88: 1162—1167, 1985
- 7) Perry MA, Wadhwa S, Parks DA et al: Role of oxygen radicals in ischemia-induced lesions in the cat stomach. *Gastroenterology* 90: 362—367, 1986
- 8) Adkinson D, McCord JM, Granger DN et al: Role of free radicals in ischemia-reperfusion injury to the liver. *Acta Physiol Scand Suppl* 548: 101—107, 1976
- 9) 吉川敏一, 小山田裕一, 市川 寛ほか: 肝の虚血再灌流障害に対する活性酸素および過酸化脂質の関与. *日消病会誌* 87: 199—205, 1990
- 10) 上田重春: 急性門脈遮断時および解除後の小腸組織障害に関する実験的研究—第1編. *日外会誌* 90: 1238—1244, 1989
- 11) Suematsu M, Kuroe I, Asako H et al: In vivo visualization of oxyradical—dependent photoemission during endothelium-granulocyte interaction in microvascular beds treated with platelet activating factor. *J Biochem* 106: 355—360, 1989
- 12) Elman R, Cole WH: Hemorrhage and shock as causes of death following acute portal occlusion. *Arch Surg* 28: 1166, 1934
- 13) 宮川秀一: 門脈遮断時の腸間膜微小循環に関する実験的研究. *日外会誌* 85: 719—727, 1984
- 14) 上田重春: 急性門脈遮断時および解除後の小腸組織障害に関する実験的研究—第2編. *日外会誌* 90: 1722—1731, 1989
- 15) 小島 尚, 菊川清見, 小杉弘子: 肝ホモジェネートおよび血漿の TBA 試験で測定される本体は何か? *過酸化脂質研究* 13: 26, 1989
- 16) DeChatelet LR, Long GD, Cohen MS et al: Mechanism of luminol-dependent chemiluminescence of human neutrophils. *Infect Immun* 129: 1589—1593, 1982
- 17) 中野 稔, 牛島義雄: 好中球の殺菌作用と活性酸素. *炎症* 4: 191—200, 1984
- 18) 中野 稔: 抗酸化酵素の細胞内(外)局在性とその意義. *J Act Oxyg Free Rad* 2: 6—10, 1991
- 19) 森脇義弘, 杉山 貢, 土屋周二: 絞扼性イレウスにおける絞扼時間と絞扼中, 解除後の障害に関する実験的検討. *日消病会誌* 87: 503, 1990

**The Intestinal Tissue Damages and the Changes of Reactive Oxygen Species due to Ischemia, Congestion and Reperfusion**

Yoshihiro Moriwaki, Hiroshi Katamura, Yasushi Ichikawa, Toshiroh Yamamoto and Mitsugi Sugiyama\*  
Second Department of Surgery and The Department of Critical Care and Emergency\*,  
Yokohama City University, School of Medicine

Tissue damage after declamping and the role of reactive oxygen species in this damage was compared in an ischemia group in which the intestinal segment and the vessels supplying this segment were clamped for 10 and 30 minutes, and a congestion group in which the segment and its draining veins were clamped for 10 and 30 minutes (n=80). The effect of radical scavengers on the damage due to ischemia, congestion and reperfusion was also investigated (n=16). The tissue damage was severer in the congestion group than in the ischemia group with the same clamping time, and when the time of clamping was longer, the damage after declamping was severer. The level of lipid peroxide (LPO) in the involved bowel and chemiluminescence (CL) of the vein draining from the involved bowel were also higher in the congestion group when the clamping time was the same. But in the congestion group, the level of LPO and CL was higher after the release of 10 minute's clamping than after 30 minute's clamping, in which the tissue damage during congestion was too severe to result in tissue necrosis. The increments in LPO and CL were suppressed by treatment with radical scavengers.

**Reprint requests:** Yoshihiro Moriwaki Second Department of Surgery, Yokohama City University School of Medicine  
3-46 Urafune-chou, Minami-ku, Yokohama, 232 JAPAN

---