

Thioacetamide によるラット硬変肝の 虚血耐容能に関する実験的検討

岐阜大学医学部第1外科

松友 寛和 広瀬 一 千賀 省始
伊藤 英夫 林 昌俊 片桐 義文
飯田 辰美 林 勝知 鬼東 惇義

硬変肝の虚血耐容能を肝組織中高エネルギーリン酸化合物、胆汁流量の変動および生存率より正常肝と比較検討した。Wistar系ラットに、thioacetamideを腹腔内投与して作成した硬変肝群(LC群)と正常肝群(N群)において、60分間の肝虚血を行った。肝組織中ATP、TAN(単位: $\mu\text{mol/gdw}$)は、それぞれ再灌流後60分においてLC群(2.40, 7.54)は、N群(4.72, 9.88)に比べ有意($p < 0.05$)に低値であった。TANは再灌流直前においても、LC群(6.36)は、N群(10.77)に比べ、有意($p < 0.01$)に低値であった。虚血後1週間の生存率(%)と再灌流60分後での胆汁流量の回復率(%)は、LC群(0, 5.9)はN群(100, 51.4)に比べ、有意($p < 0.01$)に低値であった。硬変肝では正常肝に比べ、虚血耐容能が低下していた。さらに虚血中にアデニンヌクレオチドプールの減少が高度で、再灌流後のATP合成量が低値になることが示唆された。

Key words: bile flow, high energy phosphates, liver cirrhosis, liver ischemia, thioacetamide-induced liver cirrhosis

目 的

肝硬変は種々の原因による肝障害の終末状態である。本邦においては1988年1月より1989年12月までの2年間に、全国の562施設で経験された原発性肝細胞癌8,398例のうち、66%が肝硬変を合併しており¹⁾、その合併率は高い。したがって、肝硬変を合併した症例に肝切除が行われる機会が少なくないことが予想される。肝切除術に際しては、術中出血量の減少を計るため、一時的肝門部血行遮断、いわゆるPringle法²⁾が用いられることが多い。術後肝不全と術中出血量との関係が指摘され³⁾、Pringle法は肝不全の予防に有用であるが、本法により、必然的に肝臓は虚血状態にさらされることになる。しかし、硬変肝は、正常肝に比べて虚血耐容能が低いとされ、虚血後の肝不全が起りやすいとされている⁴⁾。したがって、硬変肝の肝切除時におけるPringle法は、術後肝不全の予防と促進の二面性を有しているといえる。

そこで、硬変肝の虚血耐容能を検討し、把握するこ

とは、術後の肝不全の発生を防止する上で、きわめて重要であると考えられる。しかし、硬変肝の虚血耐容能を虚血前、虚血中、再灌流後を通して詳細に検討した報告はない。そこで、本研究は虚血-再灌流時において、thioacetamide(以下、TAA)による硬変肝の虚血耐容能を肝組織中高エネルギーリン酸化合物、胆汁流量の変動および生存率より検討した。

方 法

1. 脾臓皮下固着術

体重180g前後のWistar系雄性ラットに、Meredithら⁵⁾の方法に準じて、被膜を一部剝離した脾臓を有茎で左胸壁皮下に固着した。脾臓と皮下静脈の間に新生した血管により門脈体静脈シャントが形成され、全肝虚血時の門脈系の鬱血が防止される。

2. 実験群

硬変肝群(以下、LC群)($n=30$)は脾臓皮下固着1週間後より、滅菌精製した4%TAA水溶液の200mg/kgを週3回、連続10週間腹腔内投与を行い、肝硬変を作成した群とした⁶⁾。正常対照肝群(以下、N群)($n=30$)は生理食塩水を同様に腹腔内投与した。

3. 肝虚血の方法

麻酔は、Pentobarbitalを30mg/kg腹腔内投与することにより行った。ヘパリン1,000U/kgを尾静脈より投与し、10分後に肝門部で肝動脈、門脈を血管用クリップにて遮断することにより全肝虚血を行った。虚血時間は60分間とし、再灌流はクリップを解除することにより行った。なお、肝門部以外から肝臓に流入する血管はすべて結紮した。実験中は6ml/kg/hrの速度で生理食塩水を尾静脈より補液し、また、右総頸動脈より動脈圧を測定した。加温マットを用いてラットの体温を $37 \pm 1^\circ\text{C}$ に保った。

このモデルを用いて、以下の実験を行った。

(1) 組織学的評価

すべてのラットにおいて虚血前に肝中間葉の一部を採取し、組織学的検索を行った。

(2) 高エネルギーリン酸化合物の変動 (各群 n=10)

虚血前、再灌流直前および再灌流後15, 30, 60分の各時点において微量の肝組織を凍結採取した。採取後直ちに液体窒素内に保存したのち、48時間凍結乾燥した。Kamiikeの方法⁷⁾に準じ、高速液体クロマトグラフィ法を用いて高エネルギーリン酸化合物を測定した。また、total adenine nucleotides (TAN) およびエネルギーチャージはAtkinsonの式⁸⁾により算出した。

(3) 胆汁流量の変動 (各群 n=10)

虚血前、虚血中、再灌流180分後まで胆汁流量を測定した。測定方法は総胆管に24Gサーフロー針を留置し、これにポリエチレンチューブを接続し、この中を進む胆汁を、5分ごとに測定した⁹⁾。

(4) 虚血後1週間の生存率 (各群 n=10)

虚血後1週間の生存率を求めた。

4. 統計処理

2群間の比較には、生存率は χ^2 検定、その他の測定値はunpaired Student t検定を用いた。p<0.05をもって、有意差ありと判定した。

結 果

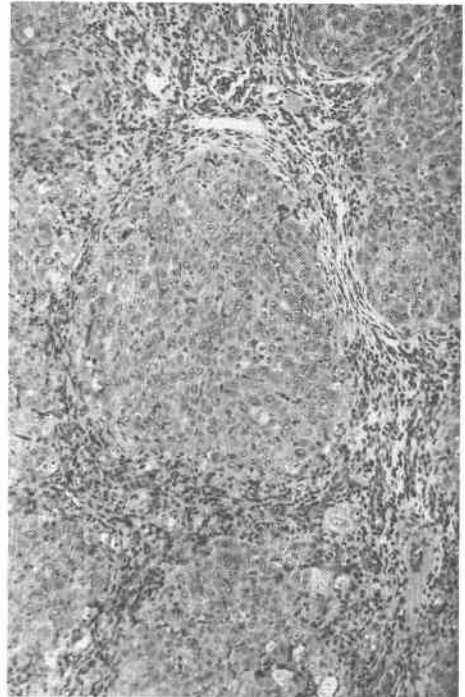
(1) 組織学的評価

N群は正常の肝組織像であった。一方、LC群は小葉構造の改築が確立し、幅の広い線維性間質により、大小不同の偽小葉が形成され、肝細胞は脱落していた。また、細胆管の増生も認められた(Fig. 1)。これらの組織学的所見はLC群のすべてのラットに同様にみられ、差異はなかった。

(2) 高エネルギーリン酸化合物の変動

a) ATP量の変動

Fig. 1 Microscopic findings of thioacetamide-induced liver cirrhosis (Hematoxylin-eosin stain, $\times 400$)



虚血前値はLC群が $6.92 \pm 1.85 \mu\text{mol/gdw}$ 、N群が $8.94 \pm 2.74 \mu\text{mol/gdw}$ であり、有意差は認められなかった。また再灌流30分、および60分後でLC群が $2.26 \pm 0.97 \mu\text{mol/gdw}$ 、 $2.40 \pm 0.95 \mu\text{mol/gdw}$ 、N群が $4.01 \pm 1.10 \mu\text{mol/gdw}$ 、 $4.72 \pm 1.81 \mu\text{mol/gdw}$ であり、いずれもLC群で有意(p<0.05)に低値となった。回復率でも再灌流30分では、LC群が $29.01 \pm 8.80\%$ 、N群が $53.90 \pm 24.18\%$ 、60分後でLC群が $25.57 \pm 11.19\%$ 、N群が $75.95 \pm 18.86\%$ と有意差(p<0.01)が認められた(Fig. 2)。

b) ADP量の変動

虚血前値はLC群が $5.11 \pm 0.89 \mu\text{mol/gdw}$ 、N群が $6.58 \pm 2.14 \mu\text{mol/gdw}$ であり、有意差は認められなかった。また再灌流30分、および60分後でLC群が $2.06 \pm 0.77 \mu\text{mol/gdw}$ 、 $2.26 \pm 1.15 \mu\text{mol/gdw}$ 、N群が $3.27 \pm 0.94 \mu\text{mol/gdw}$ 、 $3.65 \pm 0.90 \mu\text{mol/gdw}$ であり、いずれもLC群で有意(p<0.05)に低値となった。回復率でも再灌流30分では、LC群が $33.80 \pm 10.47\%$ 、N群が $52.74 \pm 17.41\%$ 、60分後でLC群が $31.01 \pm 14.47\%$ 、N群が $61.90 \pm 14.64\%$ と有意差(p<0.05)

Fig. 2 Changes in ATP and its recovery rate

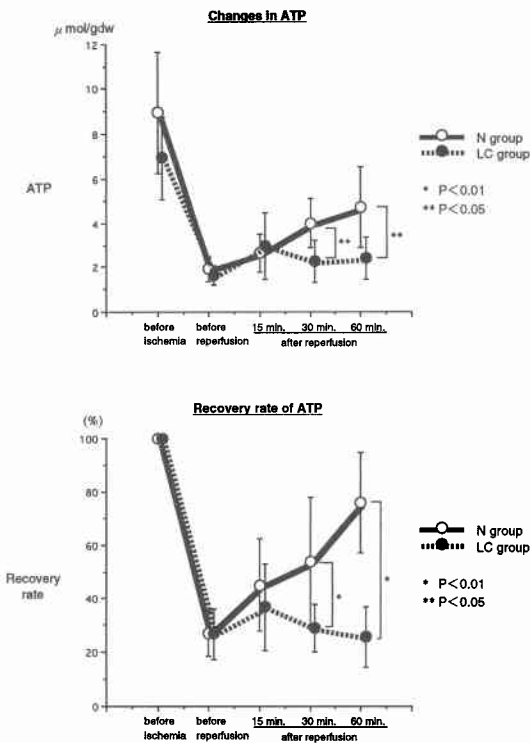
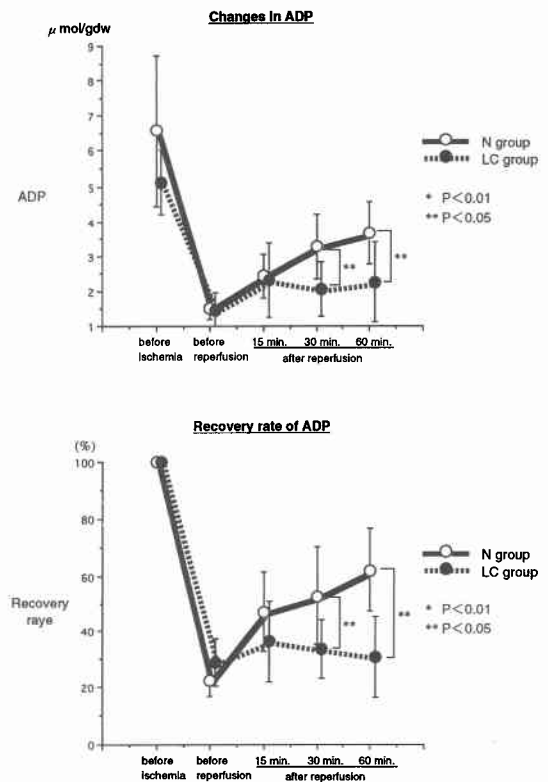


Fig. 3 Changes in ADP and its recovery rate



が認められた (Fig. 3).

c) AMP 量の変動

虚血前値は LC 群が $2.28 \pm 0.96 \mu\text{mol/gdw}$, N 群が $2.08 \pm 0.99 \mu\text{mol/gdw}$ であり, 有意差は認められなかった。また再灌流直前では, LC 群が $3.29 \pm 1.56 \mu\text{mol/gdw}$, N 群が $7.34 \pm 1.45 \mu\text{mol/gdw}$ であり, LC 群で有意 ($p < 0.01$) に低値となった。回復率でも再灌流直前で, LC 群が $130.86 \pm 71.91\%$, N 群が $317.53 \pm 205.29\%$ と有意差 ($p < 0.05$) が認められた (Fig. 4).

d) TAN 量の変動

虚血前値は LC 群が $14.30 \pm 2.86 \mu\text{mol/gdw}$, N 群が $17.60 \pm 5.77 \mu\text{mol/gdw}$ であり, 有意差は認められなかった。再灌流直前では LC 群が $6.36 \pm 2.40 \mu\text{mol/gdw}$, N 群が $10.77 \pm 1.90 \mu\text{mol/gdw}$ であり, LC 群で有意 ($p < 0.01$) に低値となった。また, 再灌流30分, および60分後では LC 群が $6.44 \pm 1.51 \mu\text{mol/gdw}$, $7.54 \pm 1.91 \mu\text{mol/gdw}$, N 群が $9.02 \pm 2.57 \mu\text{mol/gdw}$, $9.88 \pm 2.45 \mu\text{mol/gdw}$ であり, LC 群で有意 ($p < 0.05$) に低値となった。一方, 回復率ではいずれの時点においても LC 群で有意 ($p < 0.05$) に低値となったが, 経時的な変動はほとんど認められなかった (Fig. 5).

e) エネルギーチャージの変動

虚血前値は LC 群が 0.66 ± 0.06 , N 群が 0.70 ± 0.03 であり, 有意差は認められなかった。再灌流直前のエネルギーチャージは N 群が有意 ($p < 0.01$) に低値となり, また再灌流30分後では LC 群が 0.50 ± 0.11 , N 群が 0.63 ± 0.03 であり, LC 群で有意 ($p < 0.05$) に低値となった。一方, 回復率でも再灌流直前のエネルギーチャージは N 群が有意 ($p < 0.01$) に低値となった。また再灌流30分, 60分後では LC 群が 75.34 ± 11.43 , $69.74 \pm 15.81\%$, N 群が 89.83 ± 10.32 , $93.41 \pm 14.13\%$ であり, LC 群で有意 ($p < 0.05$) に低値となった (Fig. 6).

(3) 胆汁流量の変動

虚血前の胆汁流量は LC 群 $7.70 \pm 1.82 \mu\text{l/min/100g B.W.}$, N 群 $6.44 \pm 0.60 \mu\text{l/min/100g B.W.}$ で LC 群が高値の傾向があったが有意差は認められなかった。一方, 再灌流後15分, 30分, 60分の胆汁流量は, LC 群でそれぞれ 0.44 ± 0.34 , 0.39 ± 0.43 , $0.12 \pm 0.35 \mu\text{l/min/100g B.W.}$, N 群ではそれぞれ 1.78 ± 0.69 , 2.80 ± 0.78 , $3.30 \pm 0.58 \mu\text{l/min/100g B.W.}$ であり,

Fig. 4 Changes in AMP and its recovery rate

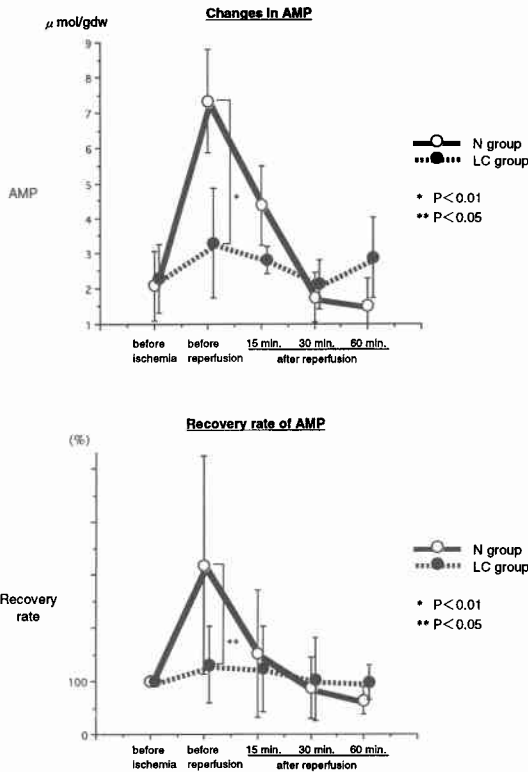
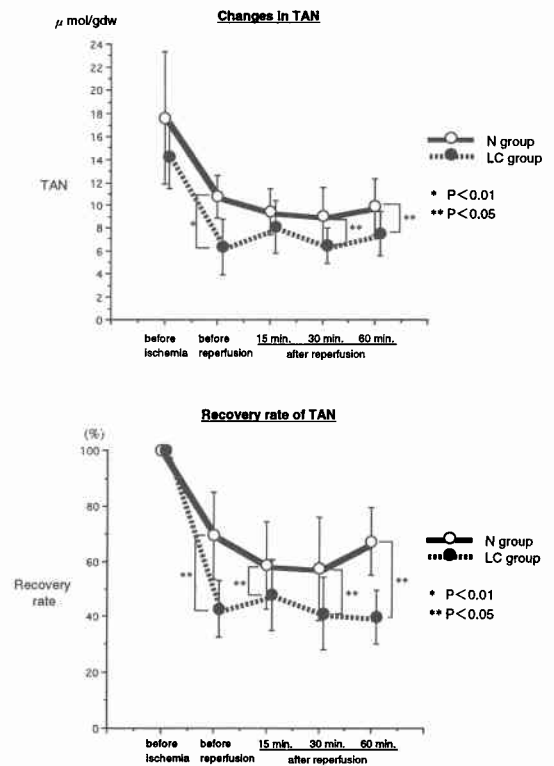


Fig. 5 Changes in TAN and its recovery rate



いずれの時点においても LC 群で有意 ($p < 0.01$) に低値であった。胆汁流量の回復率でみると再灌流後15分、30分、60分において LC 群はそれぞれ 3.42 ± 1.61 , 6.90 ± 10.34 , $5.93 \pm 11.83\%$ 、一方 N 群では、 28.01 ± 10.94 , 43.74 ± 12.22 , $51.41 \pm 9.12\%$ であり、LC 群はいずれの時点においても有意 ($p < 0.01$) に低値であった (Fig. 7)。

(4) 虚血後 1 週間の生存率

N 群は100%であった。これに比べて LC 群は 0% であり、LC 群は N 群に比べ、虚血後 1 週間の生存率が有意 ($p < 0.01$) に低値であった。LC 群は再灌流後、24時間から48時間の間に死亡した。死亡後の剖検で、病理組織学的に肝細胞の広範な壊死を認めたが、他臓器には異常を認めなかった。したがって死因は肝不全と考えられた。なお、虚血前の平均総頸動脈圧は N 群が $102 \pm 4\text{mmHg}$ 、LC 群が $98 \pm 6\text{mmHg}$ であり、虚血中および再灌流後も両群間に差はなく 80mmHg 以上が維持されていた。

考 察

硬変肝モデルとしては、TAA¹⁰⁾、四塩化炭素¹¹⁾など

の薬剤投与による薬剤性肝硬変、また、コリン欠乏食投与による脂肪性硬変肝¹²⁾や胆管の結紮による胆汁うっ滞性硬変肝¹³⁾などがある。今回、われわれは TAA 投与により作成した薬剤性硬変肝モデルを用いたが、本モデルは、実験的硬変肝のなかで最もヒトの肝硬変に類似していると報告されている¹⁴⁾。また、実験に供するすべてのラットに脾臓皮下固着術を施行したが、この脾臓皮下固着モデルでは、脾臓と皮下静脈の間に、血管が新生され、門脈系と体静脈シャントが形成されることにより全肝虚血時の門脈血のうっ滞をきたさない⁵⁾。さらに、肝硬変においては臨床的に肝内門脈の狭小化にともなう門脈圧の上昇により側副血行路の発達が認められるが、本モデルにおいては、門脈-体静脈シャントが形成されており、肝硬変の病態に類似したモデルと考えられる。

千賀ら¹⁵⁾は同じ脾臓皮下固着モデルを用いて正常肝で60、90分間の温虚血を行い、その生存率がそれぞれ100、38%であったと報告している。また、本実験において硬変肝の60分間の温虚血後の生存率は0%であった。そこで正常肝と硬変肝の虚血耐容能の差異を明ら

Fig. 6 Changes in energy charge and its recovery rate

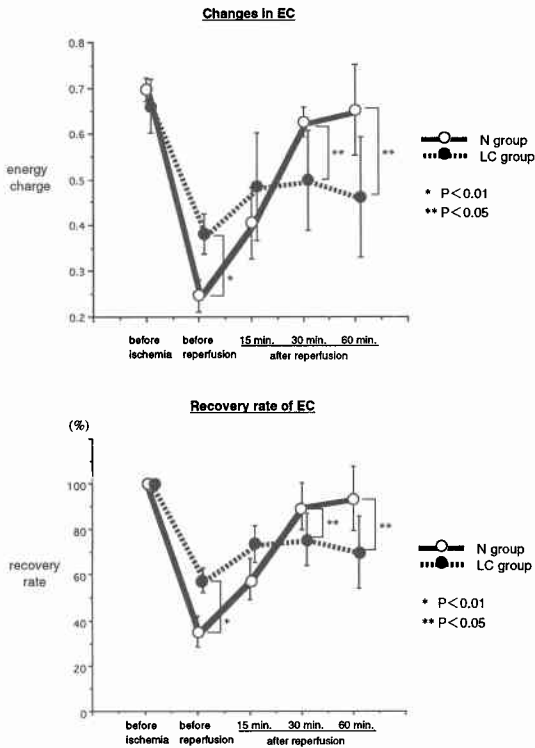
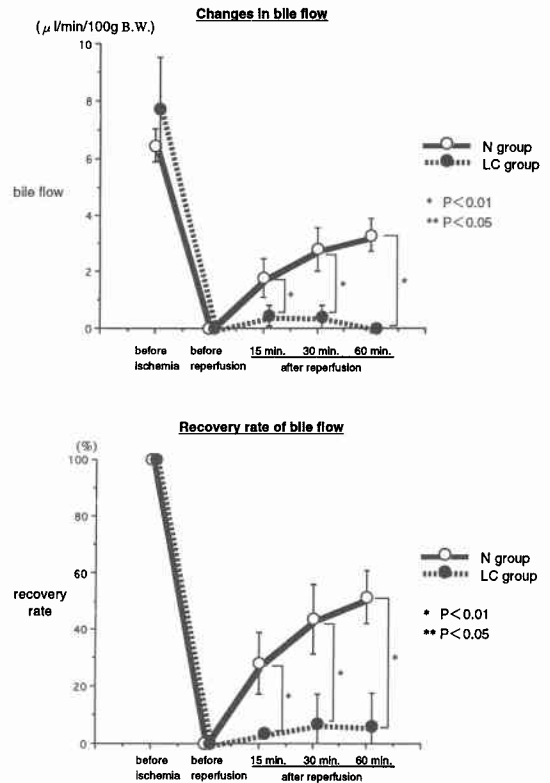


Fig. 7 Changes in bile flow and its recovery rate



かにするため肝虚血時間を60分間とした。

肝組織中高エネルギーリン酸化合物の変動に関しては、肝虚血により急速に分解されるといわれ⁷⁾¹⁶⁾、また伊豆ら¹⁷⁾は、その速度は、硬変肝では正常肝に比較して緩徐であったと述べている。本実験では虚血前 ATP、ADP、および AMP 値は、正常肝と硬変肝との間で有意差は認められなかった。また、再灌流直前の両群の ATP 量にも差は認めなかった。再灌流後は ATP、TAN 量およびその回復率は硬変肝で有意に低値であった。これは、虚血再灌流後の硬変肝の viability の低さを表していると考えられた。虚血中に、ATP および ADP 値は低下し、また AMP は上昇したが、再灌流直前での肝組織中高エネルギーリン酸化合物の量を、正常肝、硬変肝でそれぞれ比較すると ATP および ADP では両者間に有意差を認めなかったが、AMP は硬変肝で有意に低値となった。虚血前値に対する変動率でも、同様に AMP でのみ有意に低値であった。アデニンヌクレオチドのプールである TAN も、虚血中は硬変肝において有意に低値であり、これは前述のごとく、主として AMP 量の差であると考えられた。す

なわち、硬変肝では正常肝に比較して、虚血により、AMP の分解が進み、アデニンヌクレオチドのプールが減少したものと考えられた。したがって再灌流後の ATP の再合成が正常肝に比べて行い難い環境になっていたことが推察された。

エネルギーチャージは肝臓の viability の指標とする意見も多い¹⁸⁾¹⁹⁾。本実験においても虚血前には差がなかったが、再灌流後には硬変肝では正常肝に比べて有意に低値となった。したがって、硬変肝は正常肝に比べて再灌流後の viability が低いと考えられた。一方、虚血中再灌流直前では硬変肝、正常肝とも低下したが、硬変肝では低下が軽度で正常肝に比べて有意に高値であった。これは、前述のごとく、ATP 量、ADP 量は両群間で差がなく、TAN 量は硬変肝において正常肝に比べて有意に低下していることにより、Atkinson の式⁸⁾より算出されるエネルギーチャージは高値となった。すなわち、虚血中に硬変肝で正常肝よりエネルギーチャージが高く保たれていることは、上式で分子となる ATP 量、ADP 量に差がなく、分母となる

アデニンヌクレオチドのプールの減少を反映するものであると考えられた。

次に、硬変肝群では、正常肝群に比べて生存率が有意に低値であったことより、硬変肝の虚血耐容能は正常肝に比べて著しく低下していると考えられた。再灌流後の胆汁流量や虚血前値に対する回復率は硬変肝群で正常肝群に比べて有意に低値であった。肝臓は本来、多くの機能を有しているため、ある1つの機能のみの評価では肝臓の viability を表わすことは不可能であり、種々の検査を総合して判断されている。一方、肝灌流実験、肝移植実験において胆汁流量は肝臓の総合的な機能を反映し、肝臓の viability の良い指標とする報告がなされている²⁰⁾²¹⁾。千賀ら²²⁾は脾臓皮下固着モデルを用いた正常肝での肝虚血実験において血流再開後の胆汁流量の回復率と生存率との関係を検討し、その結果、胆汁流量の回復率が、虚血傷害肝の viability を示す指標として適切であったと報告している。本実験結果より硬変肝群では再灌流後60分まで、胆汁流量は正常肝群に比べて有意に低値であった。一方、生存率をみると同様に硬変肝群では正常肝群に比べて有意に低値であった。したがってこれらの結果は千賀らの報告した結果と矛盾しない。一方、硬変肝においては、胆汁流量は正常肝と同様に、あるいは正常肝よりむしろ多量の胆汁が産生されるとも報告されている²³⁾。本実験においても、硬変肝群の虚血前の胆汁流量は正常肝群に比べて有意差はないものの多い傾向であった。もかかわらず、再灌流後の生存率は正常肝群に比べて硬変肝群では有意に低下した。したがって、虚血前の胆汁流量の値から、虚血後の viability を推測することはできないと考えられた。

本論文の要旨は第44回日本消化器外科学会総会(富山)において発表した。

文 献

- 1) 日本肝癌研究会編：第10回全国原発性肝癌追跡調査報告(1988—1989)。日本肝癌研究会事務局，京都，1992。
- 2) Delva E, Camus Y, Nordlinger B et al: Vascular occlusions for liver resections. Operative management and tolerance to hepatic ischemia: 142 cases. *Ann Surg* 204: 211—218, 1989
- 3) Nagao T, Inoue S, Maizuta T et al: One hundred hepatic resections. Indications and operative results. *Ann Surg* 202: 42—49, 1985
- 4) Huguet C, Nordlinger B, Bloch P et al: Tolerance of the human liver to prolonged normo-

ermic ischemia. A biological study of 20 patients submitted to extensive hepatectomy. *Arch Surg* 113: 1448—1451, 1978

- 5) Meredith CG, Duffield PH, Dougan DFH et al: The concentration in brain of octopamine and tyramine after portal-systemic bypass in rats: Neuroamine concentrations determined simultaneously by methane chemical ionization gas chromatography mass spectrometry. *Life Sci* 38: 1701—1705, 1986
- 6) 中谷正史, 今中洋子, 石田常之ほか: 実験ラット肝硬変モデル。輸液栄ジャーナル 7: 683—687, 1986
- 7) Kamiike W, Watanabe F, Hashimoto T et al: Changes in cellular levels of ATP and its catabolites in ischemic rat liver. *J Biochem* 91: 1349—1356, 1982
- 8) Atkinson DE, Walton GM: Adenosine triphosphate conversion in metabolic regulation. *J Biol Chem* 242: 3239—3271, 1967
- 9) 千賀省始, 鬼束惇義, 伊藤英夫ほか: ラット肝虚血再灌流障害に対する liposomal encapsulated superoxide dismutase 投与の意義について。移植 27: 461—467, 1992
- 10) Goldberg HI, Moss AA, Stark DD et al: Hepatic cirrhosis: Magnetic resonance imaging. *Radiology* 53: 737—739, 1984
- 11) 石井公道, 土方英史, 山田伸夫ほか: 四塩化炭素長期投与肝障害に対する安息香酸エストラジオールの作用。肝臓 25: 617—621, 1984
- 12) 芝山雄老, 中田勝次: 肝硬変症における門脈圧亢進の発生要因に関する研究—結合織増殖の意義について。肝臓 22: 690—700, 1981
- 13) Kountouras J, Billing BH, Scheuer PJ: Prolonged bile duct obstruction: a new experimental model for cirrhosis in the rat. *Br J Exp Pathol* 65: 305—311, 1984
- 14) Schweitzer CH, Schaetz G: Die Erzeugung experimenteller Lebercirrhose durch Thiocetamid. *schriftleitung Kuhn HA: Pathologie Diagnostik und Therapie der Leberkrankheiten. Springer-Verlag, Berlin, 1957, p163—170*
- 15) 千賀省始, 鬼束惇義, 松波英寿ほか: 脾臓皮下固着ラットを用いた全肝虚血モデルの検討。Cyto-prot Biol 7: 443—450, 1989
- 16) 石川直幸: 肝ヌクレオチドにおよぼす肝流入血遮断の影響。日外会誌, 6: 793—804, 1976
- 17) 伊豆 稔: 肝組織 pH による常温肝虚血限界の予測。日外会誌, 7: 831—836, 1991。
- 18) Hochachka PW, Mommsen TP: Protons and anaerobiosis. *Science* 219: 1391—1397, 1983

- 19) Hochachka PW: Defense strategies against hypoxia and hypothermia. *Science* 231: 234-241, 1986
- 20) Jamieson NV, Sundberg R, Lindell S et al: A comparison of cold storage solutions for hepatic preservation using the isolated perfused rabbit liver. *Cryobiology* 25: 300-310, 1988
- 21) Sumimoto K, Inagaki K, Yamada K et al: Reliable indices for the determination of viability of grafted liver immediately after orthotopic transplantation. Bile flow rate and cellular adenosine triphosphate level. *Transplantation* 46: 506-509, 1988
- 22) 千賀省始, 鬼束惇義, 伊藤英夫ほか: ラット肝虚血障害の胆汁流量の回復率と生存率の関係に関する実験的検討. *移植* 29: 6-12, 1994
- 23) Taillandier J, Dumont M, Mesa V et al: L'augmentation de la choleresse au cours de la cirrhose biliaire secondaire chez le rat est due a une secretion par les voies biliaires. *Gastroenterol Clin Biol* 14: 313-318, 1990

An Experimental Study on Tolerance to Ischemic Injury of Thioacetamide-induced Liver Cirrhosis in Rats

Hirokazu Matsutomo, Hajime Hirose, Shoshi Senga, Hideo Itoh,
Masatoshi Hayashi, Yoshihumi Katagiri, Tatsumi Iida,
Masatomo Hayashi and Atsuyoshi Onitsuka
First Department of Surgery, Gifu University School of Medicine

We studied the tolerance to ischemic injury of thioacetamide-induced cirrhotic liver and normal liver in rats. Wistar rats were divided into an LC group (n=30): thioacetamide-induced liver cirrhosis, and an N group (n=30): normal. Ischemic injury was inflicted for sixty minutes, and bile was collected to determine bile flow and its recovery rate after reperfusion. High energy phosphates were measured before ischemia, before reperfusion, and 15, 30 and 60 minutes after reperfusion. ATP and TAN levels in the liver tissue (unit: $\mu\text{mol/gdw}$) 60 minutes after reperfusion were significantly ($p < 0.05$) lower in the LC group (2.40 and 7.54, respectively) than in the N group (4.72 and 9.88, respectively). The TAN level immediately before reperfusion was also significantly ($p < 0.01$) lower in the LC group (6.36) than in the N group (10.77). The survival rate one week after ischemic injury and the recovery rate of bile flow 60 minutes after reperfusion were significantly ($p < 0.01$) low in the LC group (0% and 5.9%, respectively), compared with those in the N group (100% and 51.4%, respectively). Tolerance to ischemic injury was much lower in the cirrhotic liver than in the normal liver. Furthermore, remarkable reduction in the adenine nucleotide pool occurred in the course of ischemia, suggesting low ATP synthesis after reperfusion.

Reprint requests: Hirokazu Matsutomo First Department of Surgery, Gifu University School of Medicine
40 tsukasa-cho, Gifu, 500 JAPAN