

## 肝虚血再灌流時の好中球 elastase の変動と 阻害剤投与の意義について

順天堂大学医学部外科学教室第1外科学講座 (主任: 榊原 宣教授)

岡 崎 俊 哉

ラット肝虚血再灌流モデルを用いて虚血再灌流障害における好中球 elastase の影響, および elastase 阻害剤の経門脈的投与の効果について検討した。虚血120分後, elastase 阻害剤を経門脈に投与し, 30分間再灌流した投与群は, 非投与群に比べ7日間生存率において上昇がみられた。投与群の肝組織血流量の低下は抑制され, また電顕的観察でも肝微小循環系の破壊は軽度であった。肝上部下大静脈血中の好中球 elastase 活性値, 血清 TNF 濃度も投与群は非投与群に比べ低値を示した。また, 肝 viability の指標である ketone 体比も投与群は非投与群に比較し改善された。以上の結果より, 肝虚血再灌流障害には好中球 elastase の関与が考えられ, elastase 阻害剤の投与は, その障害を軽減できる可能性が示唆された。

**Key words:** ischemic-reperfusion injury, blood flow of the liver, neutrophil elastase, blood ketone body ratio

### はじめに

肝移植をはじめ肝手術における血行遮断, Shock 時の肝血流量低下など, 虚血およびそれに続く再灌流による肝障害は临床上遭遇する重大な問題である。虚血再灌流によって, 肝組織の微小循環障害が起こり, 肝不全へ進展する<sup>1)</sup>と考えられている。したがって虚血再灌流障害を制御するために, その機序を解明することは重要であると考えられる。最近まで, 虚血再灌流障害の主因は, 虚血となった細胞で産生された free radical が生体膜障害を引き起こすため<sup>2,3)</sup>と考えられてきた。これに対して, 種々の free radical scavenger や膜安定化剤が投与<sup>4)~7)</sup>されてきた。

また Sato ら<sup>8)</sup>や Mavrier ら<sup>9)</sup>, Holman ら<sup>10)</sup>は種々の刺激で活性化された好中球の産生する炎症性 mediator が肝臓を攻撃し, その結果, 肝障害を引き起こすと報告している。しかし, その機序はいまだ十分に解明されていない。そこで虚血再灌流時に好中球の産生する elastase に注目し, その役割について実験的に検討した。

### 方 法

#### I. 実験動物

<1996年7月10日受理>別刷請求先: 岡崎 俊哉  
〒113 文京区本郷2-1-1 順天堂大学第1外科学教室213研究室

体重270~300gのWistar系雄性ラット(三協ラボサービス, 東京)を用いた。飼育にはラット用固形飼料(オリエンタル固形飼料MF)と水道水を自由に与えた。

#### II. 実験方法

##### 1. 肝虚血モデルの作製

エーテル麻酔下に正中切開で開腹, 肝臓を支持する間膜をすべて切離した。まず, 開腹操作そのものの肝組織血流量に対する影響を検討した。単純に開腹操作のみを行いすぐに閉腹した群, および120分開腹しその後閉腹した群の2群間の肝組織血流量を測定したところ有意差はなかった。次に70%肝虚血モデルとして左葉および右葉内側へ流入する肝動脈および門脈を血管クリップ鉗子にて遮断, 温虚血を施行<sup>11)</sup>した(Fig. 1)。最適な虚血時間を設定するために, 虚血時間を30, 60, 90, 120分として肝組織血流量を測定したところ, 120分で有意に血流量が減少したので, 以後虚血時間を120分とした。再灌流直前に非虚血肝葉に流入する肝動脈および門脈を結紮切離, その後遮断を解除し血流を再開, 30分間再灌流を行い実験に供した。

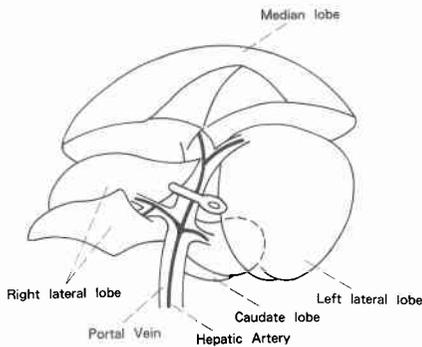
##### 2. 実験群

以下の3群を作製し, 各項目を検討した。

対照群: 単開腹で虚血しなかったもの。

非投与群: 120分虚血後再灌流時に elastase 阻害剤

Fig. 1 Scheme of ischemic model



を投与せず、30分間再灌流したもの。

投与群：120分虚血後再灌流時に elastase 阻害剤 (ONO-5046Na, 小野薬品工業, 東京, より供与) 25mg/kg を経門脈的に投与し, 30分間再灌流したもの。

各群とも  $n=8$  とし, 最大, 最小値を除いて測定値とした。測定結果は平均値  $\pm$  標準偏差 (以下,  $M \pm S.D$ ) であらわした。有意差検定には Student's *t* test を用い, 危険率 5% 未満を有意差ありとした。

### 3. 生存期間の観察

生存期間は Kaplan-Meier 法で生存曲線を描き, 有意差を Generalized Wilcoxon test で検定, 危険率 5% 未満を有意差ありとした。

### 4. 肝組織血流量の測定

肝組織血流量を水素 gas clearance 法<sup>12)13)</sup>で測定した。すなわち, 肝右葉内側および左葉の被膜下約 2mm の部位にコイル型白金電極 (ユニークメディカル社, 東京) を刺入し, 水素 gas を経鼻的に 3l/min で吸入させた。電極を組織血流計 (PHG203+DDU101, ユニークメディカル社, 東京) に接続, 測定した。右葉内側および左葉の測定結果を平均し, 肝組織血流量とした。

### 5. 肝組織の電子顕微鏡的観察

再灌流 30 分後にラットを犠牲死させ肝臓を摘出, グルタル固定し, 電子顕微鏡下 (H-7100, 日立製作所, 東京) 倍率 6,000 倍で観察した。

### 6. 血液学的検査

再灌流 30 分後に肝上部下大静脈より採血し, 以下の項目を測定した。

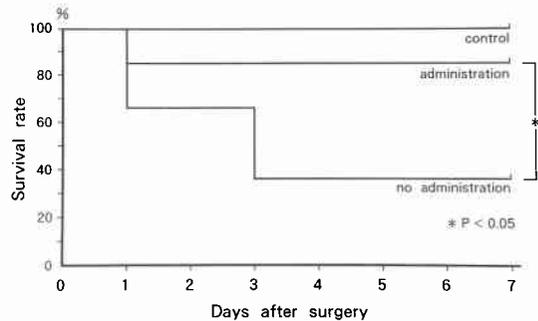
#### (1) 好中球数

白血球数および白血球分画を測定, 好中球数を算出した。

#### (2) 好中球 elastase 活性値

合成基質 S-2484 (Kabi Diagnostica 社, スウェーデ

Fig. 2 Survival curves of the groups (control: simple laparotomy, no administration: 120 min of ischemia followed by 30 min of reperfusion, administration: 120 min of ischemia and trans portal injection of neutrophil elastase followed by 30 min of reperfusion) (Kaplan-Meier)



ン)を用いて酵素活性法<sup>14)</sup>により測定した。採取した血液を 4°C, 3,000rpm で10分間遠沈し血清を分離した。これに pH 8.3 に調整した Tris buffer 加え, 酵素濃度が 0.5~7.5mg/l になるように調整した。この血清に基質液を混和して分光分析機 (UV-2200, 島津製作所, 東京) で吸光度を測定し, initial rate 法<sup>15)</sup>を用いて好中球 elastase 活性値を算出した。

(3) 血清腫瘍壊死因子 (tumor necrosis factor: 以下, TNF と略記) 濃度

採取した血液を 4°C, 3,000rpm で10分間遠沈後血清を分離し, -40°C で凍結保存した。測定時に解凍し, Predicta TNF Kit (Genzyme 社, 米国) を用いて測定した。

#### (4) ketone 体比

採取した血液を 4°C, 3,000rpm で10分間遠沈後血清を分離し, acetoacetate および  $\beta$ -hydroxybutyrate を測定試薬ケトレックス「三和」(三和化学研究所, 名古屋) を用いて酵素法<sup>16)</sup>により測定し, その比を ketone 体比とした。

## 成績

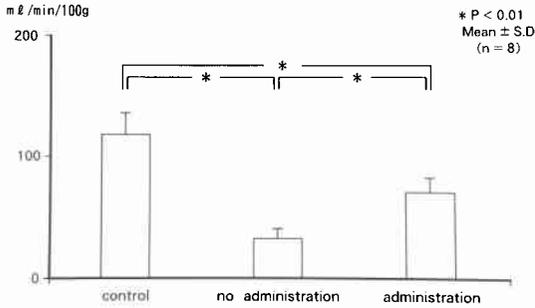
### 1. 7日間生存率

対照群は全例生存した。非投与群の生存率は 37.5%, 投与群は 87.5% と投与群の生存率は非投与群に比較し有意 ( $p < 0.05$ ) に高かった (Fig. 2)。

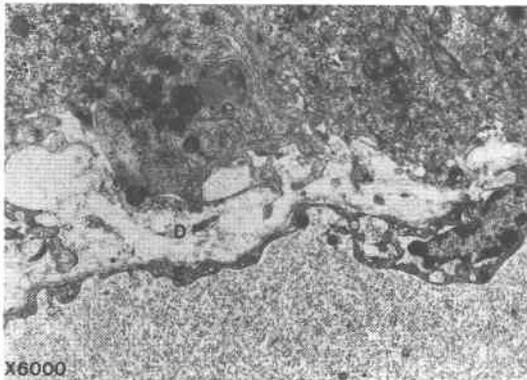
### 2. 肝組織血流量

肝組織血流量は対照群  $104.6 \pm 13.8$  ml/min/100g, 非投与群  $33.0 \pm 7.7$  ml/min/100g, 投与群  $69.8 \pm 11.6$  ml/min/100g で非投与群, 投与群は対照群に比べ有意

**Fig. 3** Local blood flow of the liver in the groups (control : simple laparotomy, no administration : 120 min of ischemia followed by 30 min of reperfusion, administration : 120 min of ischemia and trans portal injection of neutrophil elastase followed by 30 min of reperfusion)



**Fig. 4** An electron micrograph (×6,000) of the rat liver experimental model (M : mitochondria, E : hemangio endothelial cell, D : Disse's spaces)



( $p < 0.01$ ) に低値であった。しかし、投与群は非投与群と比べ有意 ( $p < 0.01$ ) に高値であった (Fig. 3)。

3. 電子顕微鏡による肝組織像

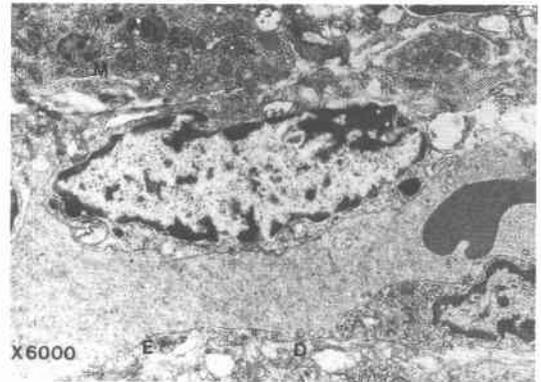
対照群には特記すべき変化はなかった。非投与群では血管内皮細胞の変形, Disse 腔の破壊, 肝細胞の micro villi の消失, mitochondria の crista の不鮮明化が認められた (Fig. 4)。これに対し投与群では血管内皮細胞の変形や Disse 腔の破壊は軽度で, 肝細胞の micro villi は保たれており, mitochondria の crista も鮮明に認められた (Fig. 5)。

4. 肝上部大静脈血での血液学的検査

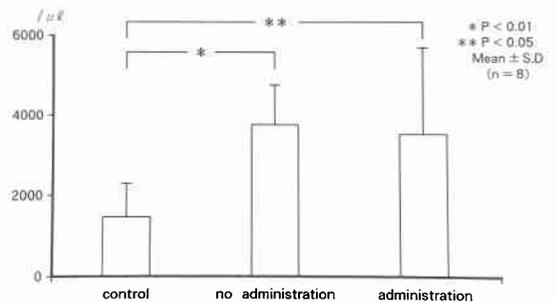
(1) 好中球数

好中球数は対照群  $1,491.4 \pm 710.5/\mu\text{l}$ , 非投与群  $3,831.2 \pm 1,042.3/\mu\text{l}$ , 投与群  $3,597.4 \pm 2,231.5/\mu\text{l}$  で

**Fig. 5** An electron micrograph (×6,000) of the rat liver experimental model after injection of neutrophil elastase inhibitor via portal vein (M : mitochondria, E : hemangio endothelial cell, D : Disse's spaces)



**Fig. 6** Numbers of neutrophil in the groups (control : simple laparotomy, no administration : 120 min of ischemia followed by 30 min of reperfusion, administration : 120 min of ischemia and trans portal injection of neutrophil elastase followed by 30 min of reperfusion)



あった。非投与群および投与群は対照群に比べ有意 ( $p < 0.01$ ,  $p < 0.05$ ) に多かった。しかし、非投与群、投与群との間に差はみられなかった (Fig. 6)。

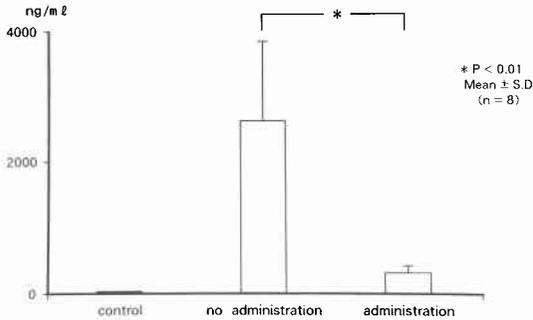
(2) 好中球 elastase 活性値

好中球 elastase 活性値は非投与群  $2,646.0 \pm 1,236.0 \text{ ng/ml}$ , 投与群  $326.0 \pm 89.6 \text{ ng/ml}$  で投与群は非投与群に比べ有意 ( $p < 0.01$ ) に低かった。なお、対照群では elastase 活性値は検出値以下であった (Fig. 7)。

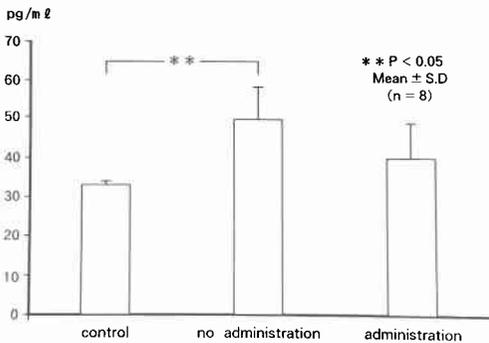
(3) 血清 TNF 濃度

血清 TNF 濃度は対照群  $33.6 \pm 1.3 \text{ pg/ml}$ , 非投与群  $49.6 \pm 8.2 \text{ pg/ml}$ , 投与群  $40.0 \pm 8.7 \text{ pg/ml}$  であった。非投与群は対照群に比べ有意 ( $p < 0.05$ ) に高値であっ

**Fig. 7** Neutrophil elastase activities in the groups (control : simple laparotomy, no administration : 120 min of ischemia followed by 30 min of reperfusion, administration : 120 min of ischemia and trans portal injection of neutrophil elastase followed by 30 min of reperfusion)



**Fig. 8** Serum TNF levels in the groups (control : simple laparotomy, no administration : 120 min of ischemia followed by 30 min of reperfusion, administration : 120 min of ischemia and trans portal injection of neutrophil elastase followed by 30 min of reperfusion)



た。投与群は対照群に比べ高い傾向であったが有意差はなく、また非投与群に比べ低値であったが、有意差は認められなかった (Fig. 8)。

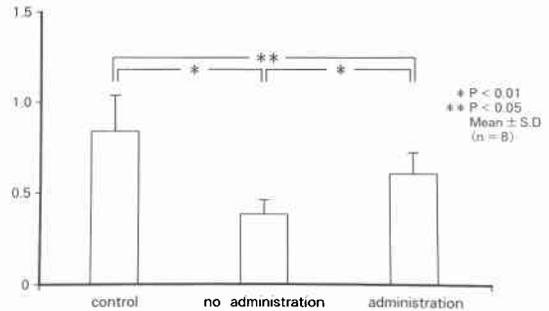
(4) ketone 体比

肝静脈血の ketone 体比は対照群  $0.85 \pm 0.15$ 、非投与群  $0.39 \pm 0.06$ 、投与群  $0.62 \pm 0.12$  であった。非投与群は対照群に比べ有意 ( $p < 0.01$ ) に低値であった。また、投与群も対照群に比べ有意 ( $p < 0.05$ ) に低値であったが、非投与群に比べ有意 ( $p < 0.01$ ) に高値であった (Fig. 9)。

考 察

臓器が虚血に陥り一定の時間をこえると、血流が再開してもより大きな障害が起こることが知られてい

**Fig. 9** Ketone body ratios (acetoacetate/ $\beta$ -hydroxybutyrate) in the hepatic vein blood of the groups (control : simple laparotomy, no administration : 120 min of ischemia followed by 30 min of reperfusion, administration : 120 min of ischemia and trans portal injection of neutrophil elastase followed by 30 min of reperfusion)



る。これは虚血再灌流障害<sup>17)18)</sup>とよばれ、臨床上大きな問題となっている。Ide ら<sup>19)</sup>は虚血再灌流後の肺組織には好中球の著明な浸潤が認められ、好中球を除去した血液を再灌流させると組織障害が軽減されると報告した。

小川<sup>20)</sup>は、好中球が産生する elastase は生体防御因子の1つで、強力な蛋白分解作用を持ち、しかも基質特異性がきわめて低いため生体の組織を容易に分解しようと報告している。一方、血中や組織液中には強力な elastase 阻害因子が大量に存在し、組織の破壊を制御している<sup>20)</sup>と考えられてきた。しかし、最近、好中球 elastase が、特に侵襲下において細胞や生体の構成組織を障害し、生体侵襲に続発する臓器障害の発生に大きな役割を演じている<sup>21)</sup>と報告された。その機序として好中球が elastase を放出する際に、活性酸素などを産生して elastase inhibitor を不活化する<sup>22)</sup>と考えられているが、生体内における elastase の役割については議論のある<sup>23)</sup>ところである。

そこで、好中球 elastase が虚血再灌流時の組織障害に関与しているかどうか、elastase 阻害剤を用いて検討した。阻害剤には、各種動物由来の好中球 elastase に対して特異的に強力な阻害作用を有する ONO-5046 Na<sup>24)</sup>を用いた。

まず、肝虚血再灌流後の7日間生存率を検討した。対照群は全例生存した。投与群の生存率は非投与群と比較して有意に高く、ONO-5046Na は生存率を上昇させることが示された。そこで、この生存率の上昇が肝組織障害の軽減によるものかどうか検討を進めた。

肝臓は多彩な機能を有しているため、その viability の評価についてはさまざまな方法がある。本研究では、肝組織血流量、電子顕微鏡所見、静脈血 ketone 体比によって肝 viability を評価することにした。肝組織血流量は虚血再灌流によって低下したが、elastase 阻害剤を投与すると血流の低下が抑制された。すなわち、虚血再灌流後の血流量低下は好中球 elastase が関与している可能性が示唆された。そこで肝虚血再灌流後の血流量の低下が肝内門脈血管抵抗の変化によるものかを電子顕微鏡による形態学的変化から検討した。非投与群には血管内皮細胞の変形、Disse 腔の破壊や肝細胞の micro villi の消失、mitochondria の crista の不鮮明化がみられた。しかし、投与群では血管内皮細胞の変形や Disse 腔の破壊は軽度で、肝細胞の micro villi は保たれており、mitochondria の crista も鮮明に認められた。類洞内皮細胞の変形や活性化された好中球の内皮細胞への接着は、類洞径の狭小化をもたらす肝内門脈血管抵抗を上昇させ血流量を低下させる原因<sup>25)</sup>とされている。これに対して elastase 阻害剤を投与すると、肝類洞の破壊が抑制され、微小循環系が保持され、その結果、肝組織血流量が維持されたと考えられた。

つぎに虚血再灌流後、好中球の肝臓への集積を肝静脈血中の好中球数の測定より検討した。虚血再灌流をした非投与および投与群は対照群より好中球数が有意に多く、再灌流時に肝臓に好中球が多く集積した。しかし、投与群、非投与群の間に有意差はなかった。さらに、活性化好中球より放出される elastase は、対照群の elastase 活性は最低検出値以下で、非投与群は高かったが、投与群は非投与群に比べ有意に低値であった。つまり虚血再灌流障害により肝臓に好中球が集積し、活性化され、elastase 放出量が増加した。ONO-5046Na は好中球の集積そのものには関与せず、放出された elastase を阻害したと考えられた。これは ONO-5046Na の酵素そのものを拮抗阻害するという特性<sup>24)</sup>からみて、合理性があると考えられた。

TNF の作用には、好中球の遊走や活性化、各種組織に対する障害などが報告<sup>26)</sup>されている。そこで血清 TNF 濃度を測定したところ非投与群は対照群に比較し有意に高値を示した。また投与群も対照群に比し高い傾向にあったが、有意差はなかった。投与群は虚血再灌流をしたのに対照群と有意差がなかった理由は明らかではないが、ONO-5046Na が好中球 elastase を阻害し、組織障害を抑制したため、macrophage や好中

球から産生される TNF が抑制された可能性が考えられた。また、TNF は自身の組織障害性だけでなく、各種の細胞から IL-1, IL-6, IL-8 などの炎症性サイトカインを誘導し、サイトカインネットワークを活性化してさらに TNF, その他のサイトカイン産生を惹起し、各種のメディエーターを介して組織障害性に働く<sup>27)</sup>と考えられている。したがって、elastase 阻害剤は TNF などのサイトカイン誘導を抑制することから結果的に組織障害を防ぐものと考えられた。

肝静脈血の ketone 体比は、肝細胞の energy を維持する上で重要な肝 mitochondria 機能を反映している<sup>28)</sup>といわれている。本研究において、投与群の肝静脈血の ketone 体比は非投与群に対し有意に高かった。つまり、elastase 阻害剤を経門脈に虚血再灌流された肝臓へ投与することで、その viability が保たれることが示された。

以上より、肝虚血再灌流による肝組織障害の機序として、まず好中球が活性化され、elastase が放出、TNF が誘導されそして微小循環系が破壊され、肝組織血流量が低下、肝 viability も低下することがわかった。これに対して、elastase 阻害剤を経門脈に投与すると、好中球の血管壁への接着、活性化は抑制しないものの、elastase を阻害することによって肝組織障害を防ぎ、肝 viability を保ち、ひいては生存率を上昇させることが示された。

以上のことから、特に肝臓外科において重大な問題である虚血再灌流障害の機序が明らかになり、さらに elastase 阻害剤の臨床的有用性も示唆された。

稿を終えるに当たり、ご指導、ご校閲いただいた榊原 宣教授に深甚なる謝意を表す。また、終始、ご指導、ご助言いただいた渡邊英章講師をはじめとする研究室諸兄に深謝する。

本論文の要旨は第29回日本移植学会総会および第80回日本消化器病学会総会において発表した。

## 文 献

- 1) Thurman RG, Marzi I, Seitz G et al: Hepatic reperfusion injury following orthotopic liver transplantation in the rat. *Transplantation* 46: 502-506, 1988
- 2) Parks DA, Bulkley GB, Granger DN: Role of oxygen free radicals in shock, ischemia, and organ preservation. *Surgery* 94: 428-432, 1983
- 3) Silver EH, Szabo S: Role of lipid peroxidation in tissue injury after hepatic ischemia. *Exp Mol Pathol* 38: 69-76, 1983.
- 4) Marubayashi S, Dohi K, Ochi K et al: Role of

- free radicals in ischemic rat liver cell injury: Prevention of damage by  $\alpha$ -tocopherol administration. *Surgery* 99: 184—192, 1986
- 5) Marubayashi S, Dohi K, Ezaki H et al: Preservation of ischemic rat liver mitochondrial functions and liver viability with CoQ10. *Surgery* 91: 631—637, 1982
  - 6) Hirasawa H, Chaudry IH, Baue AE: Improved hepatic function and survival with adenosine triphosphate-magnesium chloride after hepatic ischemia. *Surgery* 83: 655—662, 1978
  - 7) Nordström G, Seeman T, Hasselgren P: Beneficial effect of allopurinol in liver ischemia. *Surgery* 97: 679—684, 1985
  - 8) Sato T, Tanaka J, Kono Y et al: Hepatic cellular injury following lethal escherichia coli bacteremia in rats. *Lab Invest* 47: 304—310, 1982
  - 9) Mavier P, Preaux AM, Guigui B et al: In vitro toxicity of polymorphonuclear neutrophils to rat hepatocytes: Evidence for a proteinase-mediated mechanism. *Hepatology* 8: 254—258, 1988
  - 10) Holman JM, Saba T: Hepatocyte injury during postoperative sepsis: Activated neutrophils as potential mediators. *J Leukoc Biol* 43: 193—203, 1988
  - 11) Nauta RJ, Tsimoyannis E, Uribe M et al: The role of calcium ions and calcium channel entry blockers in experimental ischemia-reperfusion-induced liver injury. *Ann Surg* 213: 137—142, 1991
  - 12) 牧野隆光, 石田 博, 常岡健二ほか: 水素 gas clearance 法の肝組織血流量測定への応用—理論面からの検討. *病態生理* 2: 1049—1052, 1983
  - 13) 柿本隆生: 水素 gas clearance 法による肝局所血流量の研究. *日消病会誌* 79: 2267—2276, 1982
  - 14) 金山尚裕, 寺尾俊彦: 切迫早産例における S-2484 を用いた頸管内顆粒球エラスターゼ活性と予後との関連. *クリニカルニュース* 10: 15—17, 1989
  - 15) 小川喜資, 中 甫, 山館周恒: 酵素活性測定法. *検査と技術* 21: 257—278, 1993
  - 16) 安原正喜, 西 功, 井山 茂ほか: 新しい血中 ketone 体 (アセト酢酸) 測定試薬の評価. *機器・試薬* 9: 519—524, 1986
  - 17) Nayler WG, Elz JS: Reperfusion injury: Laboratory artifact or clinical dilemma? *Circulation* 74: 215—221, 1986
  - 18) Cheung JY, Bonventre JV, Malis CD et al: Calcium and ischemic injury. *N Engl J Med* 314: 1670—1676, 1986
  - 19) Ide H, Ino T, Hasegawa T et al: The role of leukocyte depletion by in vivo use of leukocyte filter in lung preservation after warm ischemia. *Angiology* 41: 318—327, 1990
  - 20) 小川道雄: 好中球エラスターゼ. *救急医* 17: 955—958, 1993
  - 21) Weiss SJ, Curnutte JT, Regiani S: Neutrophil-mediated solubilization of the subendothelial matrix: Oxidative and non-oxidative mechanisms of proteolysis used by normal and chronic granulomatous disease phagocytes. *J Immunol* 136: 636—641, 1986
  - 22) Matheson NR, Wong PS, Travis J: Enzymatic inactivation of human alpha-1-proteinase inhibitor by neutrophil myeloperoxidase. *Biochem Biophys Res Commun* 88: 402—409, 1979
  - 23) 小川道雄: 好中球 elastase と臓器不全. *救急医* 13: 945—956, 1989
  - 24) Kawabata K, Suzuki M, Sugitani M: ONO-5046, a novel inhibitor of human neutrophil elastase. *Biochem Biophys Res Commun* 177: 814—820, 1991
  - 25) 木村 達, 森安史典: 門脈血行動態. *肝・胆・膵* 22: 595—603, 1991
  - 26) 山崎正利: 腫瘍壊死因子 (TNF $\alpha$ ). 笠倉新平編. サイトカイン基礎から最新情報まで. 日本医学館, 東京, 1991, p73—80
  - 27) 笠倉新平: 炎症とサイトカイン. 笠倉新平編. サイトカイン基礎から最新情報まで. 日本医学館, 東京, 1991, p121—127
  - 28) Tanaka J, Ozawa K, Tobe T: Significance of blood ketone body ratio as an indicator of hepatic cellular energy status in jaundiced rabbits. *Gastroenterology* 76: 691—696, 1979

**The Changes of Neutrophil Elastase in Liver Ischemic-reperfusion and  
the Implication of Administration of an Elastase Inhibitor**

Toshiya Okazaki

First Department of Surgery, Juntendo University School of Medicine

The influence of neutrophil elastase on ischemic reperfusion injury and the effect of an elastase inhibitor administered via the portal vein were investigated by using a rat experimental model. One hundred and twenty minutes after warm-ischemia, trans-portal injection of a neutrophil elastase inhibitor was followed by reperfusion for 30 minutes. The treated group showed increased seven-days survival rate and increased local hepatic blood flow than the untreated group. No significant destruction of the liver micro-circulation was detected by electron microscopy in the treated group. In the suprahepatic inferior vena cava, both the activity of neutrophil elastase and TNF were detected at lower levels in the treated group. The ketone body ratio, which shows hepatic viability, was found in the treated group. These results demonstrate the influence of neutrophil elastase on ischemic reperfusion injury and the possibility of improvement of ischemic reperfusion injury when a neutrophil elastase inhibitor is injected.

**Reprint requests:** Toshiya Okazaki First Department of Surgery, Juntendo University School of  
Medicine  
2-1-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo, 113 JAPAN

---