日消外会誌　32（8）：2077～2084，1999年

原　著

肝虚血再灌流時の肝および血中過酸化脂質動態とその測定意義
―大動物からの検討―

東北大学第1外科
八巻　孝之　鈴木　正徳　福原　賢治　海野　倫明
遠藤　公人　竹内　丙午　柿田　徹也　松野　正紀

肝虚血再灌流時の肝および血中過酸化脂質動態とその測定意義を明らかにするため，肝細胞膜主要脂質の第1次過酸化物である phosphatidylcholine hydroperoxide（PCOOH）の肝組織と血中の濃度をCL-HPLC法で検討した．ブタを用いて，肝流入血行路遮断を10, 20, 30分間施行した．肝 energy charge と動脈血中ケトン体比は虚血時間が長いほど著明に低下し，再灌流後に回復したが，alanine aminotransferase と肝組織 PCOOH は再灌流により経時的に上昇し，還元型グルタチオンは経時的に減少した．末梢血 PCOOH は，肝組織および肝静脈血の PCOOH との間に極めて強い正の相関関係が認められた（r=0.978, 0.989）．以上から，肝の再灌流障害発症には活性酸素による膜脂質過酸化が強く関与し，末梢血 PCOOH は再灌流障害を直接的に，かつ鋭敏に把握する有用な指標となる可能性が示唆された．

Key words： hepatic ischemia and reperfusion, reperfusion injury, reoxidation, lipid peroxidation, phosphatidylcholine hydroperoxide（PCOOH）

はじめに

肝切除の際には，肝実質切離時の出血制御を目的として Pringle 氏法[1]に代表される肝の流入血行路遮断が応用されてきた．しかし，肝血流遮断を施行する限り虚血および再灌流にともなう組織障害が引き起こされるため，残存肝機能予備力の回復が，特に傷害肝において顕著に遅延し，術後肝不全発症の一因となることが指摘されてきた[2]．肝の虚血はエネルギー依存性のさまざまな肝細胞機能に傷害をもたらすが，比較的短時間の虚血であれば虚血組織に再酸素化が生じる過程で肝細胞内エネルギーレベルは回復する．虚血組織の viability は，肝 energy charge（EC）[3]の測定から把握可能であり，末梢血レベルにおいても動脈血中ケトン体比（AKBR）[4]を指標として，その良否をリアルタイムで判定することが可能になっている．一方，臨床において問題となるのは，再酸素化により生じる新たな障害，すなわち再灌流障害であり，この障害因子として活性酸素種の関与が示唆されている[5)~7)]．しかし，生体内で産生される活性酸素種を直接的に測定することは極めて困難であり，再灌流障害を鋭敏に反映する新しい血中パラメーターが求められているのが現状である．

生体内の脂質中に局在する多価不飽和脂肪酸は，活性酸素により最も過酸化を受けやすい生体分子であるため，脂質過酸化による生体膜障害が再灌流障害発症の一因として注目されている[8)9)]．しかし，肝組織および血中レベルでの過酸化脂質動態とその測定意義についての詳細はいまだ不明である．そこで，われわれは，肝細胞膜の主要な構成リン脂質である phosphatidylcholine（PC）に着目し，その過酸化1次生成物である phosphatidylcholine hydroperoxide（以下，PCOOH と略記）の肝組織と血中の濃度を経時的に測定する試みから，肝虚血再灌流時の過酸化脂質動態を明らかにするとともに，末梢血レベルでの測定意義について検討した．

対象および方法

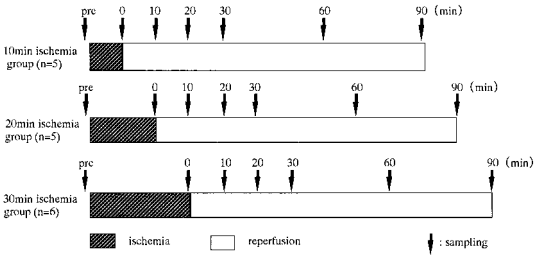
A）実験動物

体重35kg 前後のダイヨークシャー実験用 SPF ミニブタ（生後3か月）を術前12時間絶食させ，本実験に供した．

B）手術方法

＜1999年3月31日受理＞別刷請求先：八巻　孝之
〒980-8574　仙台市青葉区星陵町1―1　東北大学医学部第1外科

Table 1　Experimental protocol



atropine (0.1ml/kg), azaberone (0.1ml/kg), ketaral (2ml/kg) の筋注により麻酔導入し，isozol (6ml/body)の静脈麻酔後に気管内挿管した．従量式レスピレターで調節呼吸（1回換気量10ml/kg，換気回数14回)を行い，フローセン1～1.5%の吸入下に麻酔を維持した．輸液は耳静脈より乳酸化リンゲル液を10ml/kg/h で投与した．剣状突起より恥骨に至る腹部正中切開にて開腹後，右側の外腸骨動静脈および右肝静脈に採血用のカニュレーションを行った．

C）実験群の作成および測定検体の採取

Pringle 法[1]に準じて，肝門部の門脈および肝動脈を血管鉗子を用いて一括遮断した．実験群を10分虚血群(n=5)，20分虚血群(n=5)，30分虚血群(n=6)の 3 群に分類した．測定検体の採取は虚血前と再灌流直前，および再灌流後10, 20, 30, 60, 90分において経時的に行った．すなわち，肝組織は液体窒素で冷却した鉗子を用いて繰り返し採取し，直ちに液体窒素にて凍結後，測定まで－80℃で保存した．同時にヘパリン加採血を施行し，直ちに血漿を分離後，－80℃で保存した(**Table 1**)．

D）測定項目および測定方法

1）肝組織血流量（hepatic blood flow：以下，HBF と略記）

レーザードップラー血流計（ADVANCE LASER FLOWMETER, ALF2100）を用い，肝の右葉内側と左葉内側で計測した実測値を平均し，さらに HBF の虚血前値に対する再灌流前後の比率を回復率とした．

2）alanine aminotransferase（以下，ALT と略記）

ALT はスポットケム（京都第一科学）を用いて，ドライケミストリー法で測定した．

3）肝 energy charge（以下，肝 EC と略記）

凍結保存肝約0.2g を粉砕し，過塩素酸処理後，4℃，3,000rpm で10分間遠心分離した．採取した上清を3.75 MK_2CO_3で滴定し，pH 6.5～7.0に調整した後，再度遠心分離した上清を試料とした．ATP, ADP, AMP の定量には high performance liquid chromatography(以下，HPLC と略記)を用い，column には Hiber LiChrosorb NH2 (5μm，関東化学) を，緩衝液には acetate を使用した．Atkinson の式：EC＝(ATP+0.5ADP)/(ATP+ADP+AMP)[3]より肝 EC を算出した．

4）動脈血中ケトン体比（arterial ketone body ratio：以下，AKBR と略記）

ケトレックス™（三和化学），KETO-340(伊原電子)を用いて，血漿1ml から酵素法にて測定した．

5）肝組織の還元型グルタチオン濃度(以下，肝 GSH と略記)

凍結保存肝約0.2g に5%メタリン酸4ml を加えて homogenize し，4℃，3,000rpm で10分間遠心分離した．上清を GSH-400 Colorimetric Assay，日立100-40Spectrophotometer を用いて比色定量した．

6）肝組織，肝静脈血，および末梢血中の PCOOH 濃度

凍結保存肝約0.2g に，0.002% butylated hydroxytoluene（BHT）含有0.15MNaCl 溶液を加え homogenize した．chloroform/methanol 合剤(2：1)を加え振盪攪拌後に4℃，3,000rpm で10分間遠心分離し，chloroform 層を採取する操作を 3 回反復して全脂質を抽出した．採取した chloroform 層は evapolator にて蒸発濃縮し，chloroform（800μl）に再溶解させ試料とした．同時に，血漿1ml を用いて脂質の抽出操作を 3 回反復し，採取した chloroform 層を蒸発濃縮後に chloroform（100μl）に再溶解させ試料とした．PCOOH 測定は宮沢らの方法[10)11)]に準じて，chemiluminescence-HPLC 法（以下，CL-HPLC と略記）により定量した．すなわち，試料の20μl を HPLC(column：Finepak SIL NH2-5　日本分光　東京）で分離した後，cytochrome C と luminol を加えて化学発光させ，専用の検出器(東北電子産業　仙台）で測定した．卵黄より作成した PCOOH 標品（東北大学農学部機能分子解析学教室より提供）との面積比から，各試料中の PCOOH 濃度を算出した．肝組織 PCOOH 濃度はコリンオキシダーゼ・DAOS 法で測定した抽出脂質中のリン脂質総量（mgPL）で補正した．

7）統計学的処理

得られた測定値は平均値±標準偏差で表示した．各群の虚血前値に対する検定には ANOVA test（StatView 4.0）を用い，相関関係の検定には Pearsons correlation coefficient を用いた．いずれも $p<0.05$を有意

Fig. 1　Changes of recovery ratios of hepatic blood flow after hepatic ischemia and reperfusion

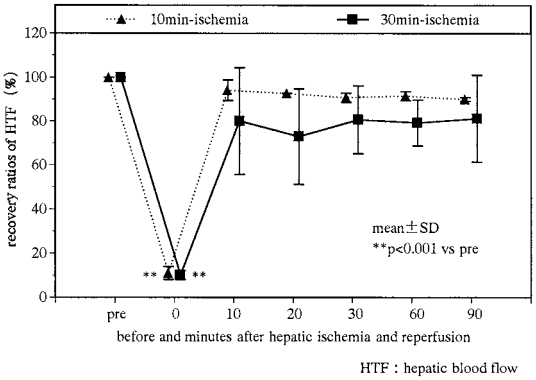


Fig. 2　Changes of ALT values in plasma after hepatic ischemia and reperfusion

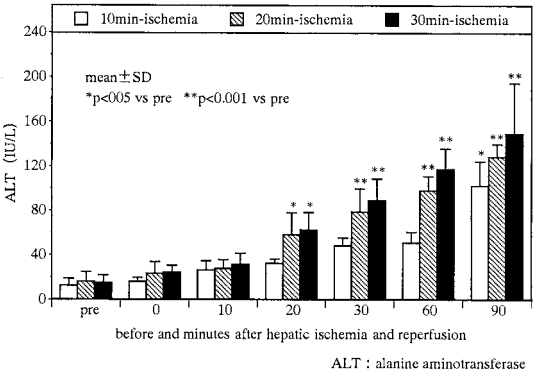


Fig. 3　Changes of hepatic energy charge after hepatic ischemia and reperfusion

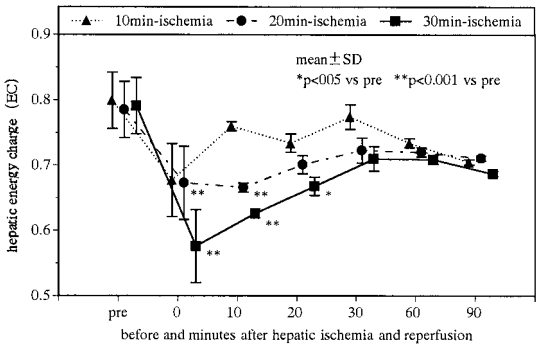
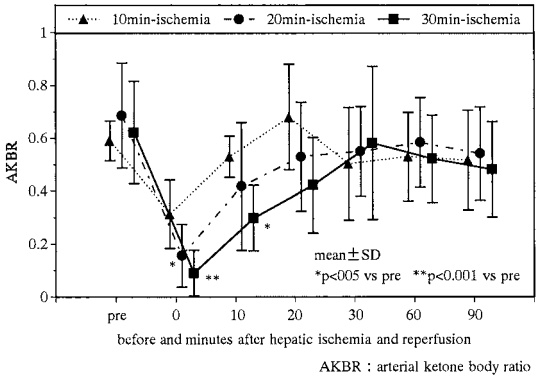


Fig. 4　Changes of AKBR values in plasma after hepatic ischemia and reperfusion



差ありと判定した．

成　績

1）HBF の虚血前値に対する再灌流前後の回復率の変動

肝流入血行路遮断により，10分虚血群は11.067±2.987%，30分虚血群は10.136±1.97%まで減少した．遮断解除により，10分虚血群は再灌流10分後に94.115±4.681まで速やかに改善した．一方，30分虚血群は再灌流後の回復が遅延する傾向を示したが，再灌流30分後に81.229±15.512%まで改善し，90分後まで良好に維持された（**Fig. 1**）．

2）ALT 値（IU/L）の変動

10, 20, 30分虚血群の虚血前値は，12.333±6.429, 16±8.869, 15±6.745であった．肝虚血による ALT 値の上昇は軽度であったが，再灌流90分後には，102.333±21.962, 128.5±11.269, 149.2±45.4まで上昇した．10分虚血群では再灌流90分後に，20, 30分虚血群では再灌流20分後より虚血前値に対し有意差が認められた（**Fig. 2**）．

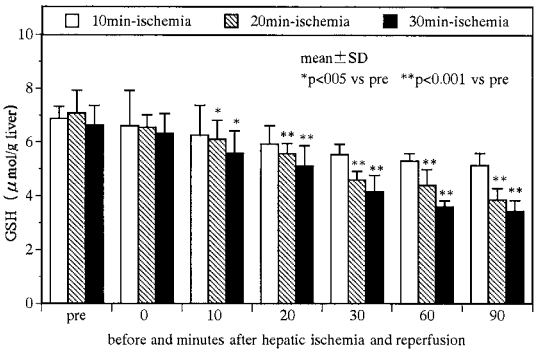
3）肝 EC の変動

各群の虚血前値は，0.799±0.043, 0.785±0.027, 0.791±0.035であった．再灌流直前には，0.677±0.056, 0.673±0.05, 0.576±0.081まで有意に低下した．10分虚血群は再灌流10分後に0.76±0.007まで速やかに改善した．20, 30分虚血群では再灌流後の回復が遅延する傾向を示したが，再灌流30分後には，0.723±0.021, 0.71±0.022まで改善した（**Fig. 3**）．

4）AKBR の変動

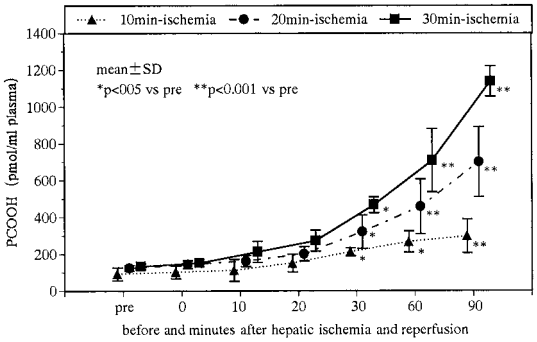
AKBR は肝 EC と類似した変化を示した．各群の虚血前値は，0.59±0.075, 0.686±0.199, 0.622±0.194であった．再灌流直前には，0.313±0.129, 0.156±0.119, 0.09±0.087まで低下し，虚血時間が長いほどその低下は著明であった．10分虚血群では再灌流10分後に0.53

Fig. 5　Changes of GSH values in liver tissue after hepatic ischemia and reperfusion



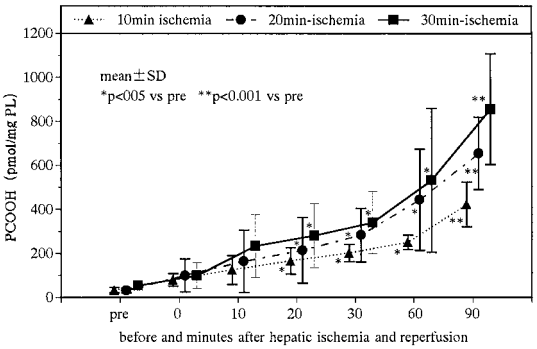
GSH：hepatic glutathione

Fig. 7　Changes of PCOOH values in hepatic vein after hepatic ischemia and reperfusion



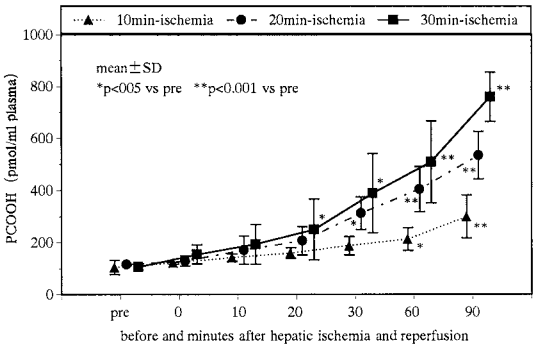
PCOOH：phosphatidylchorine hydroperoxide

Fig. 6　Changes of PCOOH values in liver tissue after hepatic ischemia and reperfusion



PCOOH：phosphatidylchorine hydroperoxide

Fig. 8　Changes of PCOOH values in peripheral vein after hepatic ischemia and reperfusion



PCOOH：phosphatidylchorine hydroperoxide

±0.078まで改善し，20, 30分虚血群では再灌流30分後に，0.55±0.17, 0.582±0.29まで改善した（**Fig. 4**）.

5）肝 GSH 濃度（μmol/g liver）の変動

各群の虚血前値は，6.876±0.445, 7.088±0.845, 6.628±0.738であった．再灌流直前に軽度な減少を示したが，再灌流後さらに経時的に減少し，再灌流90分後は，5.148±0.448, 3.861±0.432, 3.444±0.398であった．10分虚血群では再灌流90分後に，20, 30分虚血群では再灌流10分後より虚血前値に対して有意に低値を示した（**Fig. 5**）.

6）肝組織 PCOOH 濃度（pmol/mgPL）の変動

各群の虚血前値は，33.175±12.737, 31.615±10.737, 54.107±19.295であった．虚血時の増加は軽度であったが，再灌流後に急増した．その経時的増加は虚血時間が長いほど著明であり，再灌流90分後には，422.154±101.803, 654.803±164.735, 856.081±252.48まで増加した．3群とも再灌流20分後より有意に高値を示した（**Fig. 6**）.

7）肝静脈血 PCOOH 濃度（pmol/ml）の変動

肝静脈血 PCOOH 濃度は肝組織濃度と同様な変化を示した．各群の虚血前値は，92.053±33.597，124.355±16.793, 133.726±15.333であり，再灌流90分後は，297.557±91.884, 700.573±190.46, 1,138.531±82.462まで増加した．3群とも再灌流30分後より虚血前値に対して有意差が認められた（**Fig. 7**）.

8）末梢血 PCOOH 濃度（pmol/ml）の変動

末梢血 PCOOH 濃度は，肝組織および肝静脈血 PCOOH 濃度と極めて類似した変化を示した．各群の虚血前値は，104.72±27.102, 115.63±11.84, 106.874±11.372であり，再灌流90分後は，299.266±82.564, 534.825±91.294, 760.212±95.48まで増加した．10分虚血群は再灌流60分後より虚血前値に対して有意差が認

Fig. 9　Correlation between PCOOH values in liver and those in peripheral vein after hepatic ischemia and reperfusion

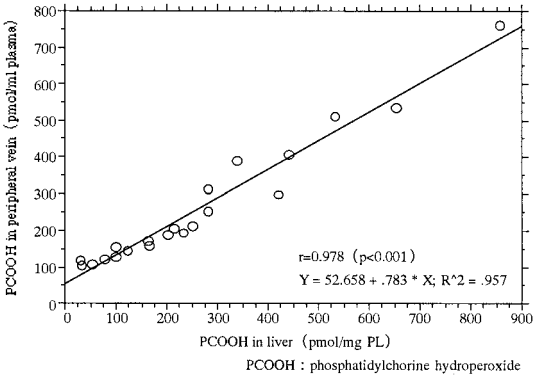
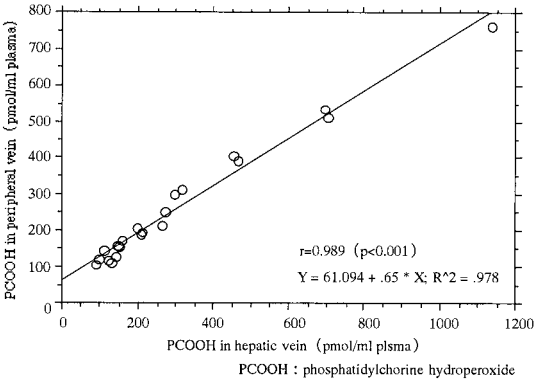


Fig. 10　Correlation between PCOOH values in liver and those in peripheral vein after hepatic ischemia and reperfusion



められた．一方，20分虚血群は再灌流30分後より，30分虚血群は再灌流20分後より有意に高値を示した（**Fig. 8**）．

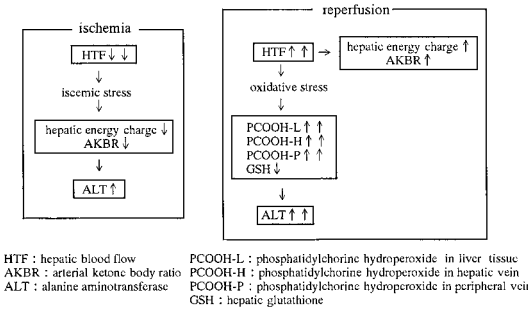
9）PCOOH の肝組織内濃度と血中濃度との相関関係

肝組織と末梢血の PCOOH 濃度の相関関係は相関係数が0.978であった（**Fig. 9**）．また，肝静脈血と末梢血の PCOOH 濃度の間では相関係数が0.989であった（**Fig. 10**）．PCOOH の肝組織内濃度と血中濃度との間には極めて強い正の相関関係が認められた．

考　察

肝の虚血再灌流障害に対処するためには，その発症機序を解明するとともに，再灌流障害の程度を鋭敏に反映する指標が不可欠である．この障害は活性酸素種の各種 scavenger を前投与すると軽減される[5)~7)]ことから，虚血組織の再酸素化によりさまざまな活性酸素種が産生されることは明らかである．これらの活性酸素種は，細胞膜の脂質過酸化[8)9)]など直接的に細胞障害性を発揮するほか，細胞内 Ca^{2+}濃度の上昇や proteases, phospholipases の活性化[12)]，血小板活性化因子（PAF）や細胞接着分子の発現[13)14)]，さらには TNF や IL-1, IL-10などの炎症性サイトカインの放出[15)16)]などの諸反応を誘起するトリガーとしての役割も担っており，再灌流の際には多種多様な障害反応が複合して発生していることが想定される．しかし，実際にどの経路による活性酸素種がどのように細胞障害に関与しているかを明確に示すまでには至っていないのが現状である[17)18)]．

Fig. 11　Connection with each parameter following hepatic ischemia and reperfusion in this study



近年，この活性酸素種による生体膜障害が注目されており，その主要な反応である細胞膜の脂質過酸化[8)9)]は，膜の構造や流動性を変化させ[19)20)]，膜に介在する酵素活性や受容体機能にも障害を及ぼすことが推定されてきた．しかし，一方では，生体膜障害の進行を直接的に，かつ鋭敏に反映する評価法が十分に確立されていないことが活性酸素種による生体反応を明確化させる際の障壁であった．また，その主な要因は，従来から過酸化脂質分析に汎用されてきた TBA 法[21)]が過酸化脂質の最終代謝産物である malondialdehyde（MDA）値を実測しているため，生体内でどの脂質クラスがどの程度過酸化を受けたかについて定量的議論が全く不可能であったことがあげられる[21)]．

われわれの教室では宮沢らの方法[10)11)]に準じて，phosphatidylcholine の特異的過酸化物である PCOOH の肝組織内動態を検討し，肝組織 PCOOH が活性酸素による肝細胞膜障害の鋭敏な指標となることを報告してきた[22)23)]．また最近では，小動物である門脈―体循環シャント形成全肝虚血再灌流ラットを用いて，再灌

流後早期に肝組織のみならず末梢血のPCOOH濃度が著明に上昇することを明らかにしてきた[24]．肝内の過酸化脂質動態を把握するために，その血中濃度の測定意義を解明することは再灌流障害の軽減および治療に直結した重要課題と考えられるが，肝虚血再灌流障害に対する各種抗酸化剤の軽減効果を末梢血PCOOHで検討した報告[25]はあるものの，現在までのところ，その血中動態や測定意義の詳細については明らかではない．そこで今回，われわれは大動物を用いて肝組織と肝静脈血および末梢血のPCOOH濃度の経時的測定を試み，肝組織内で展開される虚血再灌流障害を脂質過酸化反応の面から低侵襲性にモニタリングすることが可能であるか否かについての検討を行った（**Fig. 11**）．

実験に使用したブタの肝容積や分葉形態はヒトに類似しており，必要とされるPringle氏法[1]による確実な肝血流遮断および解除が容易に施行できた．また，全肝虚血を30分間施行しても，再灌流後の循環動態は比較的安定しており，おのおののモデルから頻回にsampling を繰り返すことも十分に可能であった．さらに，再酸素化がもたらす再灌流障害発生には遮断解除後の急峻な酸素負荷が必要であることから[26]，実際に肝血流の途絶・回復が引き起こされているのか否かの指標として肝微小循環の評価に有用な肝組織血流量[27]の経時的変化を検討した．その結果，30分以内の全肝虚血である限り，再灌流後に継続される肝微小循環障害の影響は除外できることが判明した．本実験において認められる再灌流後のALT上昇は，再酸素化がもたらす肝細胞障害を反映したものであり，再灌流障害を評価する適切な実験モデルであることを示唆している．一方，全肝虚血によるEC および AKBR の低下は著明に認められたが，30分以内の肝虚血ではエネルギー代謝不全に陥ることはなかった．肝ミトコンドリアのredox state は，細胞内のエネルギー代謝動態を反映する肝EC[3]の重要な因子であり，AKBR は肝ミトコンドリア機能評価の簡便な指標として現在応用されている[4]．われわれの検討においても，AKBR は肝 EC の変動をよく反映しており，虚血障害の程度をリアルタイムで把握する有用な指標であることが再確認された．

肝組織のPCOOH濃度は，虚血時の変化は極めて軽微であり，虚血時間が長いほど再灌流後に鋭敏な増加を示した．この結果は，再酸素化により肝細胞内のミトコンドリア機能障害が回復する一方で，細胞膜の局所では脂質過酸化反応が連鎖的に膜の周囲へ波及していくことを強く示唆するものであり，肝逸脱酵素の上昇よりも直接的に再灌流依存性の肝細胞障害を反映している．肝組織PCOOH動態の検討から，過酸化脂質の直接的な肝細胞障害機序に関する明確な知見は得られていないが，肝細胞膜における脂質過酸化反応の亢進は再灌流障害の早期病態形成において，極めて重要な役割を果たしているものと考えられる．なお，肝流入血行路遮断は門脈領域の鬱血をきたすため，内因性エンドトキシンが肝内あるいは大循環へ流入する際に脂質過酸化反応を誘起する可能性も考慮されるところであるが，肝虚血再灌流のみの侵襲で血中エンドトキシンの上昇が認められないことをラットで検討した報告[28]があり，その関与は少ないものと予想される．

一方，肝細胞内には多くの抗酸化システムが豊富に存在しており，酸化ストレスには比較的抵抗性と考えられている．そこで，生体内の過酸化水素や親水性過酸化脂質を還元するGSH-Pxの基質である肝GSH[29]の変動についても検討を加えた．肝GSHは，20, 30分虚血群で再灌流10分後より有意な減少を示しており，再酸素化による速やかな活性酸素の生成を示唆する結果であると理解される．また，肝GSHが経時的に減少することから，再灌流障害の発生時には膜脂質過酸化の亢進にともなう肝細胞内抗酸化能の低下が惹起されていることが想定された．

さらに，肝静脈血および末梢血中のPCOOH動態を検討した結果，いずれも肝組織内動態と類似した経時的な増加が認められ，おのおのの実測値には極めて強い相関関係が証明された．この事実は，肝組織内で展開される再灌流障害の程度をPCOOHを指標として低侵襲性に末梢血からモニタリングすることが可能であることを示唆する重要な所見である．また，この血中濃度の鋭敏な変化は，過酸化脂質が肝組織内に蓄積するとともに，比較的速やかに肝静脈を介して末梢血中へ流出していることを強く示唆する結果である．肝細胞膜内で局所的に生成されるPCOOHが血中へ移行する機序については全く不明である．しかし，肝細胞膜脂質の二重層構造とその流動性は，脂質分子内に局在する不飽和脂肪酸鎖の緩やかな疎水性相互作用で維持されているため，その外層に豊富に存在するphosphatidylcholineは比較的自由に拡散運動することが可能である[30]．過酸化脂質が不飽和脂肪酸に比べて親水性であることを考慮すると，膜脂質の外層部で過剰に生成するPCOOHは，膜の基本構造や流動性を

変化させながら容易に血中へ移行する可能性が十分に推測される．

PCOOH はアルコキシルラジカルやペルオキシラジカルなどの脂質ラジカルよりも安定した過酸化物であるため，末梢血レベルでの経時的測定は，肝流入血行路遮断を用いた肝切除術において残肝再生の良否や肝不全発症を予測する手段として臨床応用が期待される．また，PCOOH は遊離金属の存在下で脂質ラジカルに変化し，新たな過酸化障害を引き起こす[31]ことから，肝臓以外の遠隔臓器の障害因子となる可能性も予想される．今後は，再灌流時間を延長して PCOOH の血中動態をさらに追跡する必要があり，臨床症例での詳細な検討も重要な課題と考えられる．現在の PCOOH 測定システムは半自動であり，1検体の処理には少なくとも約60分を要する．周術期における短時間の末梢血 PCOOH モニタリングを可能とする全自動化測定システムの開発と普及も強く望まれるところである．

稿を終えるにあたり，終始，御協力ならびに御指導いただいた東北大学第1外科肝臓疾患研究班の諸兄，および実験室の渋谷恵美子女史に深く感謝いたします．また，PCOOH 標品を提供いただいた東北大学農学部機能分子解析学教室の諸兄に対し，深く感謝いたします．

なお，本稿の要旨は第97回日本外科学会総会，第33回日本肝臓学会総会，および第9回日本肝胆膵外科学会において発表した．

文　献

1) Pringle JH：Notes on the arrest of hepatic hemorrhage due to trauma. Ann Surg **48**：541, 1908
2) Huguet C, Nordlinger B, Bloch P et al：Tolerance of the human liver to prolonged normothermic ischemia. Arch Surg **113**：1448—1451, 1987
3) Atkinson DE：The energy charge of the adenylate pool as a regulatory parameter. Interaction with feedback modifiers. Biochemistry **7**：4030, 1968
4) Yamamoto M, Ozawa K, Isselhard W et al：Acetoacetate／β-hydroxybutyrate ratio in arterial blood and liver during and after ischemia-A clue to detect the viability of ischemic liver-. Arch Jpn Chir **52**：508, 1983
5) Marubayashi S, Dohi K, Ezaki H et al：Preservation of ischemic rat liver mitochondrial function and liver viability with CoQ 10. Surgery **91**：631—637, 1982
6) Nordstrom G, Seeman T, Hasselgren P：Benefical effect of allopurinol in liver ischemia. Surgery **97**：679—684, 1985
7) Marubayashi S, Dohi K, Ochi K et al：Role of free radicals in ischemic rat liver cell injury：Prevention of damage by α-tocopherol administration. Surgery **99**：184, 1986
8) Silver EH, Szab S：Role of lipid peroxidation in tissue injury after hepatic ischemia. Exp Mol Pathol **38**：69—76, 1983
9) Tribble DL, Aw TK, Jones DP：The pathophysiological significance of lipid peroxidation in oxidative cell injury. Hepatology **7**：377—387, 1987
10) Miyazawa T：Determination of phospholipid hydroperoxide in human blood plasma by a Chemiluminescence-HPLC assay. Aree Radic Biol Med **7**：209—217, 1989
11) Miyazawa T, Suzuki T：Chemiluminescent simultaneous determination of phosphatidylcholine hydroperoxide and phosphatidylethanolamine hydroperoxide in the liver and brain of the rat. J Lipid Res **33**：1992
12) Rosser BG, Gores GJ：Liver cell necrosis：Cellular mechanism and clinical implications. Gastroenterology **108**：252—275, 1995
13) Lewis MS, Whatley RE, Cain P et al：Hydrogen peroxide stimulates the synthesis of platelet activating factor by endothelium and induces endothelial cell-dependent neutrophil adhesion. J Clin Invest **82**：2045—2055, 1988
14) Lo SK, Janakidevi K, Lai L et al：Hydrogen peroxide-induced increase in endothelial adhesiveness is dependent on ICAM-1 activation. Am J Physiol **264**：L406—L412, 1993
15) Moine OL, Louis H, Stordeur P et al：Role of exygen intermediates in interleukin 10 release after cold liver ischemia and reperfusion in mice. Gastroenterology **113**：1701—1706, 1997
16) Shito M, Wakabayashi G, Ueda M et al：Interleukin 1 receptor blockade reduces tumor necrosis factor production, tissue injury, and mortality after hepatic ischemia-reperfusion in the rat. Transplantation **63**：143—148, 1997
17) Metzger J, Dore SP, Larterburg BH et al：Oxidant stress during reperfusion of ischemic liver：No evidence for a role of xanthine oxidase. Hepatology **8**：580—584, 1988
18) Jaeschke H, Bautista AP, Spolarics Z et al：Superoxide generation by neutrophils and kupffer cells during in vivo reperfusion after hepatic ischemia in rat. J Leukoc Biol **52**：377—382, 1992
19) Galeotti T, Borrello S, Palombini G et al：Lipid peroxidation and fluidity of plasma membranes from Morris hepatoma 3924A. FEBS Lett **169**：169—173, 1984

20）Wratten ML, Gratton E, Van de Ven M et al：DFH lifetime in vesicles containing phospholipid hydroperoxide. Biochem Biophys Res Commun **164**：169―175, 1989
21）松下雪郎：過酸化脂質測定のための TBA テストの有用性とその限界．栄養と食糧　**34**：523―529, 1981
22）Rahman MM, Ouchi K, Matsuno S et al：Increased hepatic phosphatidylcholine hydroperoxide（PCOOH）and hepatic energy metabolism in rats with endotoxemia. Dig Surg **10**：171―175, 1994
23）武藤大成, 鈴木正徳, 福原賢治ほか：初代培養肝細胞のエンドトキシンに対する膜脂質過酸化反応―特に Kupffer 細胞の関与について―．肝臓　**35**：601―608, 1994
24）福原賢治, 鈴木正徳, 海野倫明ほか：細胞膜脂質過酸化物 phosphatidylcholine hydroperoxide 血中濃度による肝虚血再潅流障害の評価．日外会誌　**98**：470, 1997
25）Takayama F, Egashira T, Kudo Y et al：Effect of anti-free redical interventions on phosphatidylcholine hydroperoxide in plasma after ischemia-reperfusion in the liver of rats. Biochem Pharmacol **46**：1749―1757, 1993
26）Perry M, Wadhwa SS：Gradual reintroduction of oxygen reduces reperfusion injury in cat stomach. Am J Physiol **254**：G366―G372, 1988
27）大塚健二：温阻血肝の viability 判定における肝組織血流量測定の意義と Lipo-Prostaglandin E1の効果．移植　**28**：685―692, 1993
28）大内清昭, 松原修二, 武藤大成ほか：肝流入血行遮断下での閉塞性黄疸肝切除後早期の病態―エンドトキシン血症と肝脂質過酸化の関与について―．日消病会誌　**88**：1216―1220, 1991
29）kaplowitz N, Aw TY, Ookhtens M：The regulation of hepatic glutathione. Annu Rev Pharmacol Toxicol **25**：9―37, 1986
30）野澤義則，大木和夫：生体膜の機能とダイナミクス．一戸裕子編．生体膜のバイオダイナミクス．羊士社，東京，1993, p44―62
31）島崎弘幸：過酸化脂質の生成と消去．二本鋭雄, 島崎弘幸, 美濃　真編．抵酸化物質―フリーラジカルと生体防御―．学会出版センター，東京，1994, p45―57

Changes in the Tissue and Plasma Lipid Peroxides, and Significance of Mesurment of Lipid Peroxides Following Hepatic Inchemia and Reperfusion

Takayuki Yamaki, Masanori Suzuki, Kenji Hukuhara, Michiaki Unno, Kogin Endo,
Heigo Takeuchi, Tetuya Kakita and Seiki Matuno
The First Department of Surgery, Tohoku University School of Medicine

The purpose of this study was to investigate the changes in the tissue and plasma lipid peroxides, and to determine their significance following hepatic ischemia and reperfusion. Using CL-HPLC assay, we quantified phosphatidylcholine hydroperoxide（PCOOH）, which is a primary peroxidative product of the most important functional lipid in the hepatocellular membrane. This experimental study divided subjects into three groups according to the duration of hepatic ischemia induced as follows：10, 20, and 30 minutes by occlusion of the hepatic inflow of the hepatic artery and portal vein. Hepatic energy charge and arterial ketone body ratio decreased significantly as the duration of ischemia increased, and recoverd after reperfusion. alanine aminotransferase and hepatic PCOOH levels showed marked increases, and hepatic glutathione levels showed decreases following reperfusion. Also, a close correlation between the PCOOH levels in peripheral vein and liver was observed as well as in peripheral vein and hepatic vein. These results suggest that membrane lipid peroxidation induced the production of oxidative radical formation and is involved in the pathogenesis of the reperfusion injury, and furthermore, that the plasma PCOOH levels are a useful index, which can indicate the reperfusion injury process directly and sensitively.

Reprint requests：Takayuki Yamaki　The First Department of Surgery, Tohoku University School of Medicine
1-1 Seiryo-machi, Aoba-ku, Sendai, 980-8574 JAPAN