

阻血・再灌流による肝障害犬の門脈内 endotoxin 投与による 動脈血中 tumor necrosis factor の推移と生存率に 関する実験的研究

角 田 元・板 倉 淳・飯 室 勇 二
井 上 慎 吾・山 本 正 之・松 本 由 朗
山梨医科大学第1外科

抄 録：肝臓手術後の肝不全，多臓器不全（MOF）発生における感染の役割を解明する目的で，イヌ（n=44）を用いて肝阻血モデルを作製し，動脈血中ケトン体比（AKBR），平均動脈血圧（MABP），生存率についてエンドトキシン（Ex）と動脈血中 tumor necrosis factor（TNF）の関与を検討した。30分間肝阻血後解放する条件の実験群において，AKBR，MABPの低下後の回復遅延と24時間生存率50%（4/8）が得られ，本実験群は，臨床例における術後肝不全発生の要因とされている肝血流障害から肝不全へのモデルとして適当であると考えられた。この際門脈血中に内因性 Ex の有意な上昇と動脈血中 TNF の出現は証明されなかった。そこでこのモデルを用いて Lipo-polysaccharide（LPS）100 μg/kg を門脈内に投与した。肝阻血の有無では動脈血中 TNF の動態，ピーク値に差は認められなかったが，24時間後の生存率は肝阻血群0%（0/6），非阻血群100%（6/6）であった。動脈血中 TNF の上昇は死亡率とは相関せず，肝障害の発生にも直接関与していないと考えられた。

キーワード tumor necrosis factor, arterial blood ketone body ratio, 阻血・再灌流障害,
多臓器不全

はじめに

肝臓手術の術後に発生する肝不全は，個々の症例の解析から，術中に生じた肝臓の血流障害，あるいは術後出血による肝虚血が誘発因子であり，さらに感染が加われば，これが重篤な増悪因子となって，ついには術後の重篤な合併症である多臓器不全（multiple organ failure, MOF）を引き起こすことが指摘されている¹⁾²⁾。しかしながら肝虚血によって発生した肝障害が術後の感染の加重によって MOF へと進展して行く

メカニズムについては，いまだ十分解明されていない。

一方，MOF 発生にサイトカインが関与するという報告^{3)~7)}が最近注目されてきた。特に1975年 Carswell ら⁸⁾により腫瘍細胞に出血壊死を引き起こすサイトカインとして報告された tumor necrosis factor（TNF）は，抗腫瘍物質としてのみならず，重要な炎症関連物質として注目されてきた^{9)~11)}。

著者らも動物実験において肝臓の Kupffer 細胞が産生する TNF が，血中 TNF 値の変動に大きく関与することを明らかにした¹²⁾。さらにラット lipopolysaccharide（LPS）ショックモデルにおいて，肝マクロファージ貪食抑制物

質 (gadolinium chloride) を LPS 静注前に投与したところ、動脈血中ケトン体比 (arterial ketone body ratio, AKBR)^{13) - 15)} の低下の抑制および生存率の著明な改善をみた。しかし血中の TNF 活性値の変動に影響はみられず、肝実質細胞障害を表現する AKBR と TNF 活性値との間には直接的な関係は見いだせなかった¹⁶⁾。

そこで本実験では、臨床例にみられる肝血流障害によってひきおこされる重症肝障害のモデル (血流障害改善後24時間後の生存率が約50%) を作成し、肝阻血による内因性エンドトキシンの出現の有無を観察した。さらに術後の感染の加重のモデルとして外因性エンドトキシン投与を行い、その時の肝臓由来の TNF 値の推移と肝機能障害の推移、循環動態および生存率の関係について観察し、肝臓手術における肝血流障害、感染発生時のサイトカインの関与について検索した。

実験材料および方法

実験 I

10分から60分間肝阻血を行うことによって種々の程度の肝障害を発生させ、そのうち24時間目の生存率が約50%となる肝阻血時間を決定することを目的として以下の実験を行った。同時に肝障害の指標として AKBR の測定と、肝門部での脈管遮断に伴う門脈領域のうっ血に伴う内因性エンドトキシン出現の有無および動脈血中 TNF 活性値について検索した。

(1) 前操作

体重10-16 kg の雑種成犬20頭を用いて24時間絶食後、pentobarbital sodium (ダイナボット) 25 mg/kg を静脈内に投与して麻酔し、気管内挿管後、自発呼吸によって麻酔を維持し手術を行った。まず右内頸動脈に12 Fr. カテーテル (テルモ) を挿入留置し、三方活栓を介して血圧測定用トランスデューサー (SPECTRAMED MEDICAL PRODUCTS) に接続した。三方活栓より動脈血を採取するとともに POLY-

GRAPH SYSTEM (日本光電) にて持続的に平均動脈血圧 (mean arterial blood pressure, MABP) を測定した。次に腹部正中切開で開腹し、脾動静脈を脾門部にて結紮切離し脾摘を行い、脾静脈末梢側より12 Fr. カテーテルを挿入、先端部を門脈本幹に留置した。なお肝門部で門脈本幹と固有肝動脈を露出し、肝動脈に流入する腸間膜動脈からの動脈枝をすべて結紮した。

(2) 実験群 (Fig. 1)

Group 1: 肝門部で門脈本幹および固有肝動脈をサティンスキー鉗子で10分間クランプ後解放。(n=4)

Group 2: 同様に20分間クランプ後解放。(n=4)

Group 3: 同様に30分間クランプ後解放。(n=8)

Group 4: 同様に60分間クランプ後解放。(n=4)

(3) 採血

動脈血: 右内頸動脈より1回5 ml 採取。クランプ直前の値を前値 (0 min) とし、クランプ解放までは10分間隔で、解放後はそれぞれ10, 30, 60分後に採血し、Group 3, Group 4 ではさらに120, 180, 240, 300分後にも採血した。血液はヘパリン加滅菌スピッツに採取後、直ちに3,000 rpm×10 min, 4°C で遠沈し上澄みを採取した。動脈血上澄みのうち1 ml は AKBR 測定用とし、4°C で保存し6時間以内に測定した。残量は滅菌した微量遠沈管に分注し TNF 測定時まで-80°C で保存した。

門脈血: 門脈内留置カテーテルより3 ml 採取。

Group 3, 4 においてはクランプ直前 (0 min) とクランプ解放までは15分間隔で、解放後は動脈血と同様の間隔で採血した。血液はヘパリン加滅菌スピッツに採取後、直ちに3,000 rpm×10 min, 4°C で遠沈し上澄みを採取した。門脈血上澄みは滅菌スピッツに採取後、エンドトキシン測定時まで-20°C で保存した。

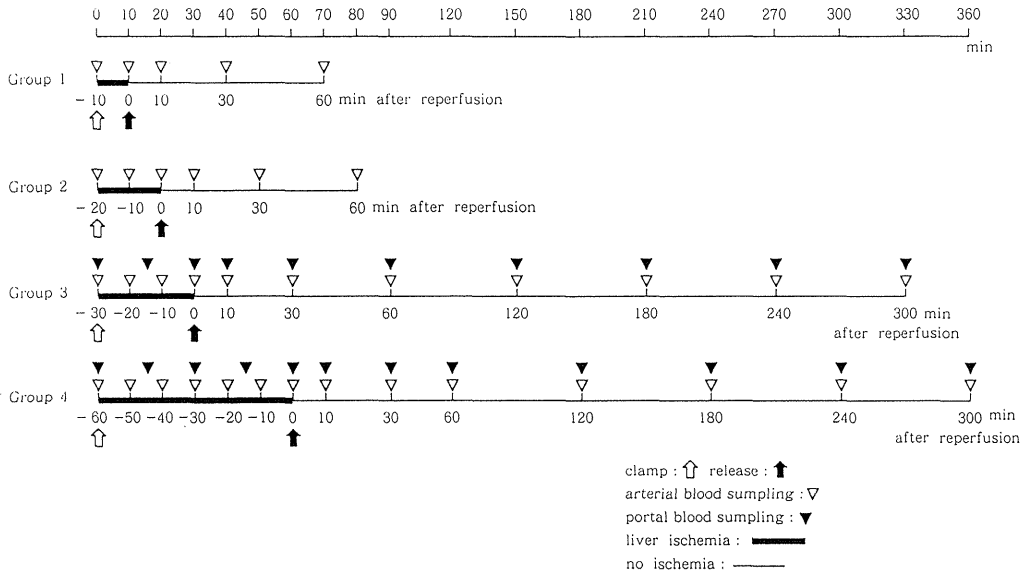


Fig. 1. Procedure of experiment I

実験Ⅱ

肝阻血による重症肝障害発生症例に術後感染が加重し、MOFが発生した場合の機序を解明する目的で、その過程においてTNFの関与の有無を検索した。

実験Ⅰで得られた肝阻血解放後24時間目の生存率が50%の肝阻血時間群のモデルを用いて、門脈血中へ大腸菌由来のエンドトキシンの1種

である lipopolysaccharide (LPS, Sigma E. coli 0111 : B4) を投与し、動脈血中におけるTNF活性の出現などを検索した。

(1) 前操作

実験Ⅰと同様に雑種成犬を用いて、静脈麻酔下に動脈と門脈にカテーテルを挿入留置した。

(2) 実験群 (Fig. 2)

Group A : 前操作後、肝阻血および門脈内

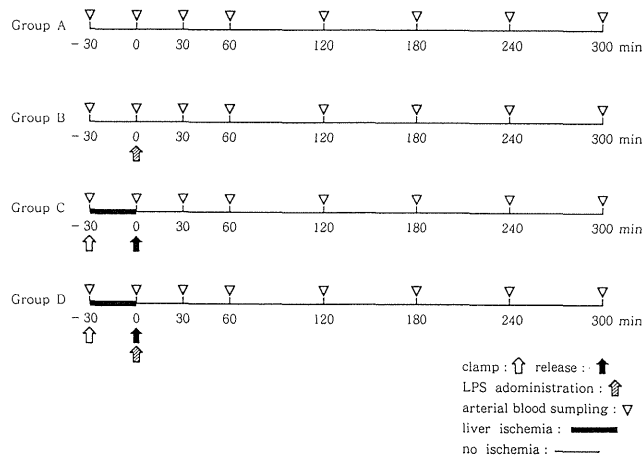


Fig. 2. Procedure of experiment II

LPS投与は行わず、門脈内に生理食塩水0.5 ml/kgを投与し、Group B、C および D の対照群として、Group B 以下と同時間に採血のみ施行。

(clamp (-) · LPS (-), n = 6)

Group B: 前操作終了から30分経過後に、LPSを生理食塩水10 mlに溶解して200 µg/mlとし、その0.5 ml/kg (100 µg/kg) を門脈内留置カテーテルより one shot 投与。

(clamp (-) · LPS (+), n = 6)

Group C: 露出した門脈、肝動脈をサティンスキー鉗子にてクランプし、肝臓を虚血状態とし、30分後に解放し、解放直後に生理食塩水0.5 ml/kgを門脈内に投与した。LPSは非投与。

(clamp (+) · LPS (-), n = 6)

Group D: Group Cと同様に30分間クランプし、開放直後に Group Bと同様な方法で LPS 100 µg/kg を経門脈的に投与。

(clamp (+) · LPS (+), n = 6)

(3) 採血

前操作終了時を前値 (-30 min) とし、30分経過後あるいはクランプ解放直前を0分とし、以後それぞれ30, 60, 120, 180, 240, 300分後に、内頸動脈留置カテーテルより8 ml採血し、ヘパリン加滅菌スピッツに採取、うち1 mlを血液ガス分析に供した。残量は直ちに3,000 rpm×10 min, 4°Cで遠沈、上澄み1 mlは4°Cにて保存後、6時間以内にAKBR測定に供した。さらに残量は滅菌した微量遠沈管に分注後、TNF測定まで-80°Cで凍結保存した。

動脈血中ケトン体比 (AKBR) 測定

AKBRはWilliamson法⁵⁾に従ってacetoacetateと3-hydroxybutyrateを測定し、acetoacetate/3-hydroxybutyrateとして求めた。操作は血中ケトン体測定専用試薬であるケトレックス®(三和化学研究所)と、同じく測定専用

機であるKeto 340®(三和化学研究所)を用いて測定した。

TNF活性の測定

TNF活性の測定はTNF感受性マウス線維芽細胞株であるLP3細胞を用いた細胞障害試験にて行った¹⁷⁾。96 well microtiterplate (Falcon3072®, Becton and Dickinson)のサンプル列にあらかじめ1/4に希釈した検体血清を加え、連続希釈にて1/2,048まで希釈した。そこに 5×10^5 cells/mlに調整した2 µg/mlのactinomycin D (Sigma)を含んだLP3細胞浮遊液を50 µlずつ各wellに加え、5% CO₂インキュベーターで15時間インキュベートした。各well中のplateに静着した生存細胞を0.5% crystal violet (Sigma), 20%メタノール水溶液で固定・染色、automated microplate reader (Titertec Multiskan®, Flow Laboratories Inc.)を使用し、吸光度570nmでその染色性を調べた。同一プレート内でインキュベートした細胞のみのwellの吸光度を100%とし、その50%の吸光度を与える希釈倍率を求めた。そして同様に同一プレート内で既知の濃度のrecombinant human TNF(大日本製薬)を用いて求めた値と比較し検体のTNF活性とした。サンプルの測定は3回繰り返した。

エンドトキシン測定

Endospecy®(生化学工業)を用いたエンドトキシン特異テスト(ES法)¹⁸⁾により定量測定した。

統計学的検討

測定値はすべてmean ± SEMで標記し、各種測定値間の検定には、Student's t-testを用い、危険率5%以下を有意差有りとした。

結 果

実験 I

1) 動脈血中ケトン体比 (AKBR)

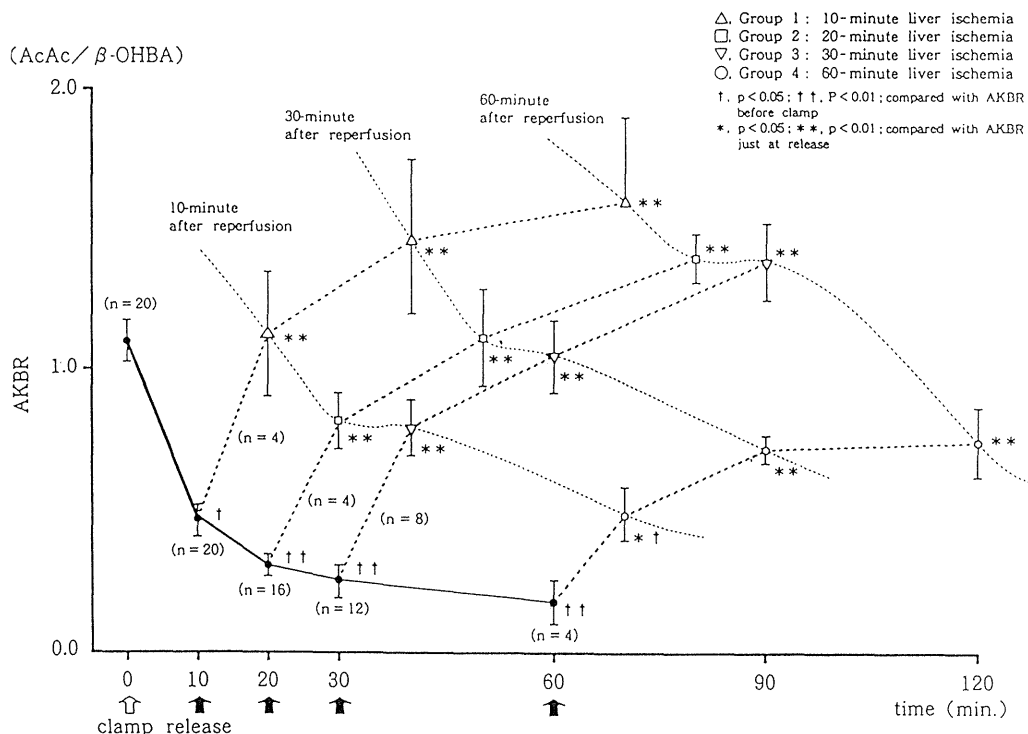


Fig. 3. Changes in arterial ketone body ratio (AKBR) after interruption of hepatic blood supply (—) and following reperfusion (·····).

クランプによる AKBR の推移は Fig. 3 に示したように、前値は 1.08 ± 0.08 で各群ともクランプ10分までは 0.46 ± 0.05 と急激に低下し ($p < 0.05$)、その後もクランプ時間が経過するに従って20分で 0.30 ± 0.03 、30分で 0.26 ± 0.04 、60分で 0.17 ± 0.06 と徐々に低下を示し、解放直前はいずれの群とも前値に比べ有意な最低値 ($p < 0.01$) を示した。

クランプ解放後の AKBR の推移は、クランプ時間によって種々の変動を認めた。すなわち、いずれも解放後10分ですでに解放直前の AKBR に比べ、10分クランプ群で 1.11 ± 0.47 ($p < 0.01$)、20分クランプ群で 0.81 ± 0.12 ($p < 0.01$)、30分クランプ群で 0.76 ± 0.06 ($p < 0.01$)、60分クランプ群で 0.48 ± 0.09 ($p < 0.05$) と有意な上昇を示す ($p < 0.01 \sim p < 0.05$) もクランプ時間が短いほど反跳的に急峻な AKBR の上昇を示した。とくにクランプ10分、

20分、30分の各群 (Group 1, Group 2, Group 3) は解放後10分ですでに解放直前値より有意 ($p < 0.01$) に高値を示し、かつクランプ前値に近い値となり、前値との間には有意差は認められなかった。その後も上昇を示し30分後にはいずれもクランプ前値より高値あるいは近似値を示した。一方クランプ60分の群 (Group 4) は AKBR の回復が遅れ、解放10分後には解放直前値に比べ有意 ($p < 0.05$) な上昇を示したが、クランプ前値よりも有意 ($p < 0.05$) に低値であった。また解放後30分ですでにクランプ前値に近い AKBR を示した。したがって、クランプ60分の群ではクランプ解放後の AKBR の上昇率は他の群に比べて低く、しかもこの群の AKBR は解放後60分でもクランプ前値を越えることがなかった (Fig. 3)。

2) 平均動脈血圧 (MABP)

クランプによる MABP の変動を Fig. 4 に示

した。いずれの群でもクランプ10分後のMABPは前値 139 ± 5 mmHgに比べて 84 ± 5 mmHgと有意 ($p < 0.01$) に低下し、その後もクランプ時間が長くなるに従って20分で 65 ± 5 mmHg, 30分で 50 ± 5 mmHg, 60分で 31 ± 10 mmHgと低下を続け、各群とも解放直前のMABPはクランプ前値に比べ、有意な最低値を示した ($p < 0.01$)。解放によるMABPの変動は、いずれの群とも急峻な上昇を示した。しかしクランプ前値に比べ、解放後10分で前値に復したのは10分間クランプ群 (Group 1) が 124 ± 19 mmHgを示したのみで、他の3群はいずれも解放後10分ではクランプ前値への有意な回復は認められなかった。そしてクランプ20分群 (Group 2) が解放30分後に 113 ± 13 mmHgとクランプ前値にほぼ回復したものの、クランプ30分 (Group 3), クランプ60分 (Group 4) では解放後60分経過してもクランプ前値には復さなかった。

さらに、クランプ解放後のMABPの回復状態を詳細に検討するために、解放直前のMABPと比較した。クランプ10分 (Group 1), クランプ20分 (Group 2), クランプ30分 (Group 3) の3群は、いずれも解放後10分でそれぞれ 124 ± 19 mmHg, 89 ± 10 mmHg, 80 ± 7 mmHgとすでに有意 ($p < 0.01$, $p < 0.05$, $p < 0.01$) に解放直前のMABPより高値を示し、30分後にはそれぞれ 131 ± 11 mmHg, 113 ± 13 mmHg, 100 ± 6 mmHgといずれも有意 ($p < 0.01$) な上昇傾向を示して回復した。しかしクランプ60分のGroup 4ではMABPは上昇するものの、解放後30分で、 71 ± 12 mmHgとようやく解放直前より有意に高値を示した ($p < 0.05$) (Fig. 4)。

3) 生存率

Table 1に各群の肝阻血解放後24時間目の生存率を示した。クランプ時間が10分と20分のGroup 1, Group 2では、全例24時間以上生存

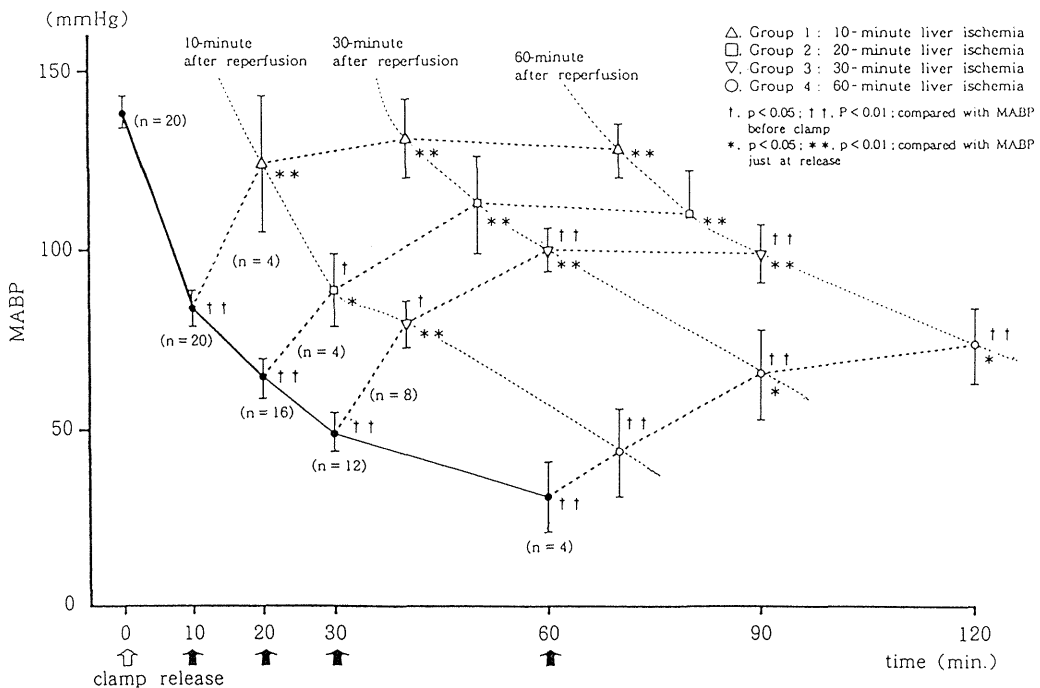


Fig. 4. Changes in mean arterial blood pressure (MABP) after interruption of hepatic blood supply (—) and following reperfusion (·····).

Table 1. Twenty-four-hour survival rate after reperfusion in each interrupted time of hepatic blood supply

	Liver ischemic time	24-hour survival rate
Group 1 (n=4)	10 minutes	100% (4/4)
Group 2 (n=4)	20 minutes	100% (4/4)
Group 3 (n=8)	30 minutes	50% (4/8)
Group 4 (n=4)	60 minutes	0% (0/4)

したが、クランプ30分の Group 3 では半数 (4/8, 50%) のみが術後24時間以上生存したにすぎなかった。クランプ60分の Group 4 では全例が24時間以内に死亡した。

4) 門脈血中エンドトキシン

内因性エンドトキシンを各群のクランプ前から解放後300分まで測定した。

肝阻血時間10分, 20分の Group 1, Group 2 ではクランプ中および解放後60分までに門脈血中にエンドトキシンは証明されなかった。肝阻血30分, 60分の Group 3, Group 4 では Table 2 のような結果を得た。Group 3, Group 4 ではそれぞれ2頭においてクランプ中の門脈血中エンドトキシンをわずかに証明できた。解放後は Group 3 の2頭では門脈血中エンドトキシ

ンはすべて消失したが、Group 4 の2頭では一旦低下するものの、解放後300分で再上昇を示したが、いずれも個体差が大きく有意差は認められなかった。

5) TNF 活性

Group 1 から Group 4 ではクランプ中ならびにクランプ解除60分後までの間では、いずれの群でも動脈血中に TNF 活性は認められなかった。

実験 II

実験 I の結果から、臨床において、術後肝障害から MOF に移行しやすい病態に最も類似した実験群は、肝流入血流遮断が30分の肝阻血群 (Group 3) と判定した。そこで実験 I の Group 3 の30分間肝阻血群を用いて実験 II を施行した。

1) 動脈血中ケトン体比 (AKBR)

麻酔の影響が考慮される前値 (-30 min, クランプ直前値) では、A, B, C, D いずれの Group 間にも AKBR に有意差は認めず、Group A, B, C, D 全体の平均値は0.82 ± 0.08であった。clamp (+) 群 (Group C, D) のクランプ解除直前 (0 min) の平均値は0.19 ± 0.05で、clamp (-) 群 (Group A, B) 全

Table 2. Endotoxin levels (pg/ml) in the portal vein at each time during liver ischemia and after reperfusion

		liver ischemia					no ischemia						
		-60	-45	-30	-15	0	10	30	60	120	180	240	300
Group 3 (30-minute liver ischemia)	31			-	7.2	9.3	-	-	-	-	-	-	-
	32			-	3.1	5.6	-	-	-	-	-	-	-
	33			-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	34			-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	35			-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	36			-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	37			-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	38			-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Group 4 (60-minute liver ischemia)	41	6.1	5.4	3.7	5.2	3.7	3.9	3.6	4.2	4.9	4.2	5.2	9.5
	42	-	-	7.6	3.9	3.0	-	-	-	-	-	-	3.1
	43	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	44	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	died	-

(-): not detectable (below 3.0 pg/ml)

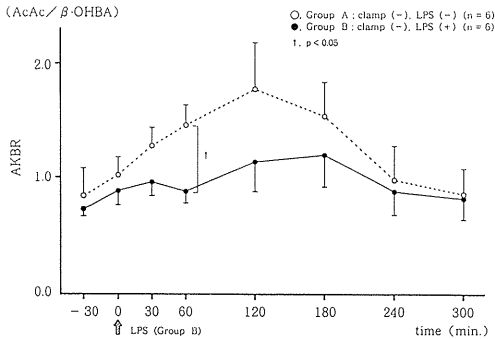


Fig. 5a. Changes in AKBR after lipopolysaccharide (LPS) administration into the portal vein without interruption of hepatic blood supply.

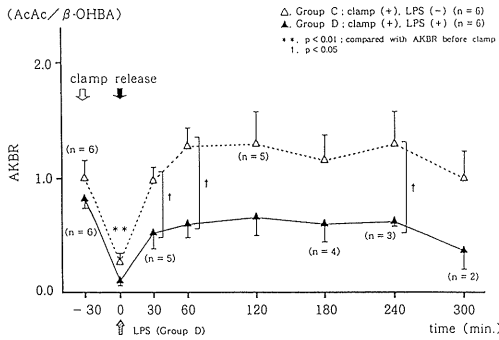


Fig. 5b. Changes in AKBR after 30 minute-interruption and release of hepatic blood supply following LPS administration into the portal vein.

体の平均値 0.88 ± 0.11 に比べ有意に低値を示した ($p < 0.05$) (Fig. 5-a, b)。

LPS 投与の AKBR への影響について観察した。Fig. 5-a のごとく clamp (-) 群のうち、まず門脈内に生理食塩水のみを投与した Group A では 120 分をピークに緩やかな上昇カーブを描き、30 分で 1.17 ± 0.38 、60 分で 1.36 ± 0.48 と、前値 (-30 min) に比べて有意に高値を示した ($p < 0.05$)。これに比べて LPS 単独投与の Group B では、LPS 注入後は Group A と比較して上昇は低く、60 分では 0.81 ± 0.20 と Group A の AKBR よりも有意に低値を示した ($p < 0.05$)。しかし 240 分以降は Group A とほぼ同様の経過を示した (Fig. 5-a)。

次に clamp (+) 群における LPS 投与の影響をみると (Fig. 5-b), LPS (-) 群 (Group C) では実験 I の Group 3 と同様で、クランプ解除時 (0 min) は 0.33 ± 0.10 で前値 (-30 min) 1.03 ± 0.16 よりも AKBR は有意 ($p < 0.01$) に低下し、クランプ解除後は 30 分までにほぼ前値まで急激に回復し、以後はクランプ前の AKBR のレベルで推移している。一方、LPS (+) 群 (Group D) では、クランプ解放後の AKBR の回復が緩やかで、Group C と比較して低値で推移し、解放後 30 分、60 分、240 分で Group C との間で有意差を認めた ($p < 0.05$)。しかしその後は徐々に下降し解放後 8 時間以内に全例死亡した (Fig. 5-b)。

2) 平均動脈血圧 (MABP)

処置前値 (-30 min) では個体差があるものの各 Group 間の MABP に有意差を認めず、Group A, B, C, D 全体の平均値は 147 ± 5 mmHg であった。その後、クランプ解放直前 (0 min) では clamp (-) 群 (Group A, B) 全体の平均値が 162 ± 4 mmHg、clamp (+) 群 (Group C, D) 全体の平均値が 59 ± 4 mmHg で、clamp (-) 群に比べて clamp (+) 群が有意 ($p < 0.05$) に低値を示した (Fig. 6-a, b)。

また非肝阻血、LPS 非投与 (生理食塩水単独投与) の Group A では、ほぼ一定の値で経過したが、clamp (-) 群・LPS (+) 群 (Group B) では LPS 注入後、30 分で 140 ± 5 mmHg、60 分で 110 ± 9 mmHg、120 分で 88 ± 3 mmHg、180 分で 107 ± 8 mmHg、240 分で 120 ± 8 mmHg、300 分で 124 ± 8 mmHg と 120 分を最低値として緩やかな下降を示し、次いで再上昇を示したものの、Group A のそれぞれ 163 ± 7 mmHg、 165 ± 6 mmHg、 169 ± 7 mmHg、 176 ± 5 mmHg、 168 ± 5 mmHg、 176 ± 8 mmHg と比較していずれの時点でも MABP は有意に低値で推移した ($p < 0.05$, $p < 0.01$, $p < 0.01$, $p < 0.01$, $p < 0.05$, $p < 0.05$) (Fig. 6-a)。

clamp (+) 群・LPS (-) 群 (Group C) では Fig. 6-b に示したようにクランプ解放直前 (0 min) に 55 ± 4 mmHg の最低値をとり、軽

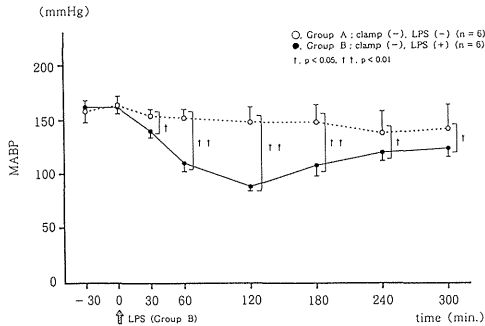


Fig. 6a. Changes in MABP after lipopolysaccharide (LPS) administration into the portal vein without interruption of hepatic blood supply.

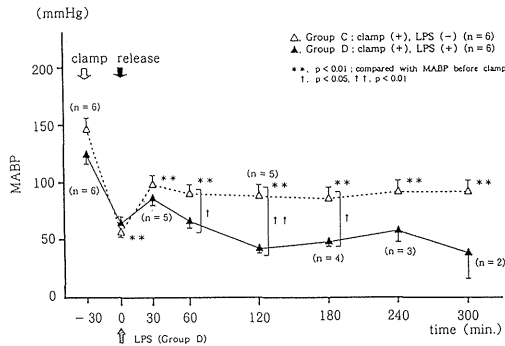


Fig. 6b. Changes in MABP after 30 minute-interruption and release of hepatic blood supply following LPS administration into the portal vein.

度の再上昇を認めるものの30分で95 ± 7 mmHg, 60分で85 ± 10 mmHg, 120分で81 ± 12 mmHg, 180分で80 ± 12 mmHg, 240分で86 ± 11 mmHg, 300分で86 ± 11 mmHgと、クランプ前値の141 ± 10 mmHgに比較して有意に低値 ($p < 0.01$) のまま推移した。clamp (+) ・

LPS (+) 群 (Group D) ではクランプ解放、LPS 投与後は軽度の上昇ののち漸減し、Group Cと比較して60分, 120分, 180分ではそれぞれ69 ± 5 mmHg, 46 ± 3 mmHg, 48 ± 3 mmHgと有意に低値をとり ($p < 0.01 \sim p < 0.05$), 解放後8時間までに全例死亡した (Fig. 6-b)。

3) TNF 活性

非肝阻血, LPS 非投与 (生理食塩水単独投与) の Group A では各測定点で TNF の活性は証明されなかった。Group C (clamp (+), LPS (-)) で, 1頭のみ解放後60分で動脈血中に TNF 活性が768 JRU/mlと測定された。

LPS 投与群 (Group B, D) では Fig. 7 に示したようにクランプの有無にかかわらず, TNF 活性はほぼ同様の値を示して推移した。すなわち LPS 投与後30分で TNF 活性が発現し, 60分で Group B では1253 ± 158 JRU/ml, Group D では1256 ± 110 JRU/mlといずれも最

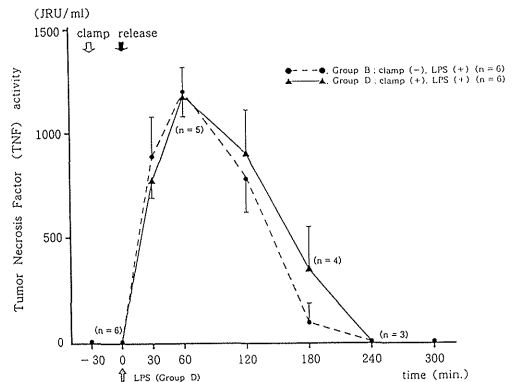


Fig. 7. Tumor Necrosis Factor (TNF) activity (mean ± SEM) in arterial blood.

Table 3. Twenty-four-hour survival rate after reperfusion in each interrupted time of hepatic blood supply or LPS administration

	Liver ischemic time; LPS administration	24-hour survival rate
Group A (n=6)	clamp, 0 minutes; LPS, 0 μg/kg	100% (6/6)
Group B (n=6)	clamp, 0 minutes; LPS, 100 μg/kg	100% (6/6)
Group C (n=6)	clamp, 30 minutes; LPS, 0 μg/kg	50% (3/6)
Group D (n=6)	clamp, 30 minutes; LPS, 100 μg/kg	0% (0/6)

高値を示し, 120分以後急減し, 240分までに動脈血中から消失した。

4) 生存率

Table 3 に示したように非肝阻血群の Group A, Group B では, LPS 投与の有無にかかわらず全例24時間以上生存した。一方クランプ後生理食塩水投与の Group C では半数 (3/6, 50%) のみが術後24時間を越えて生存したが, クランプ30分後に解放し LPS を投与した Group D では全例が8時間以内に死亡した。

考 察

肝臓の手術では術中の操作によって, 肝血流障害が起こり, これが術後に発生する肝不全発生の要因の1つとなることが指摘されている¹⁾²⁾。またこの血流障害はその程度によって術後の病態が異なり, 高度な場合には hypovolemic shock が発生し早期に死亡する。しかし肝臓に一時的な循環障害が発生しても, 早期に改善を図れば, 術後早期の腎機能障害や肝性脳症が引き続き出現しても, 現在の術後管理技術では回復させることが可能である。しかしながら肝臓手術の対象となる症例のなかには, 肝予備能の低い肝硬変, 慢性肝炎の症例が含まれ, これらの症例では術中に軽度の肝血流障害が加わった場合でも, 肝臓のマクロファージ機能の低下と術後感染が結びつきやすい状態が容易に発生する。一般に重篤な感染症に対しては, 全身の代謝の中核である肝細胞のミトコンドリアが, energy charge を増加させて対応する機構が存在するが, 肝硬変症では energy charge を十分に増加させられないため, 軽度の感染症でも重篤化の方向に進み, さらに MOF の発生が生じやすくなるといわれている^{14) - 16), 19) - 21)}。

このように肝細胞内ミトコンドリアの酸化還元能 (oxide-reduction potential : NAD^+/NADH) が術後に発生する肝不全の予後をよく表現することが知られている^{14) 19) 20)}が, これを検索するためには肝組織を直接採取する必要がある。しかし血液中のパラメーターとして

は, 動脈血中ケトン体比 (arterial ketone body ratio, AKBR) が, 肝ミトコンドリアの酸化還元能とよく相関し, この経時的測定が臨床的に有用である^{15) 16) 21)}。そこで著者らは, 動脈血中ケトン体比 (AKBR) をパラメーターとして, 肝細胞のミトコンドリアの酸化還元能を把握し, 術後の重症感染症例の栄養管理を行い, MOF への移行防止, ならびに MOF からの離脱に役立てている²¹⁾。

今回, 著者らの実験モデル作成の目的は, 1) 肝流入血行の遮断を行い, 肝臓組織の低灌流状態をつくることにより肝障害を発生させ, 2) 同時に消化器領域の血管床内に血流のうっ滞を起こし, それによって発生すると考えられる腸管漏出エンドトキシン (内因性エンドトキシン) の門脈血中での上昇をもたらす, 3) そして肝内で TNF を産生させ, 4) この TNF がさらに肝障害を増幅させるか否か, そして肺, 腎臓などにも作用して MOF を発生させる最も重要な因子となるのではないか, という点を本研究で検索しようとした。

TNF 産生機構に関する著者らの成績¹²⁾では, 全身の mononuclear phagocyte system からみると, 肝臓の Kupffer 細胞は量的にも最も多く, 全身の細菌貪食機能における中枢臓器であると考えられる。すなわち血中 TNF 活性の変動は肝マクロファージより産生される TNF に最も依存していることを明らかにしており, MOF 発生過程に肝産生 TNF の関与が大きいことが示唆されている。

今回実験 I では, 1) 肝阻血時間は AKBR ならびに末梢動脈血圧と相関し, かつ生存率とも直接的な関係を認めた。そして, 2) 肝血流障害がもたらす肝不全に最も近い肝細胞機能障害のモデルは, 肝門部で肝流入血行 (肝動脈と門脈本幹) を, 30分間遮断後に解除した群であった。つまり, この条件下では AKBR の急激かつ有意な低下が認められ, 血流再開後にその反発的な上昇が認められたにもかかわらず, 末梢動脈血圧の回復は, Group 1, 2 (血流遮断時間10分および20分) に比べて遅れ, 血流再開24

時間後の生存率は50%であった。しかし、このような条件下では期待したような内因性エンドトキシンの、門脈血中への有意な出現は認められなかった。そして動脈血中への TNF の出現も皆無であった。このことは、中等度の肝血流障害によって引き起こされる肝細胞の機能障害下では、門脈領域のうっ滞を伴っても消化管からの内因性エンドトキシンの有意な上昇はなく、TNF 活性の上昇も起こらないことを示している。

そこで実験Ⅱでは、30分間肝流入血行遮断と解除により肝細胞機能障害を発生させ、さらに感染の加重として、外因性のエンドトキシンを門脈内に投与し、それによって引き起こされる肝産生 TNF の動態を観察した。1) 肝流入血行非遮断群では、エンドトキシンの投与によって末梢動脈血圧は有意に低値を示したが、著しい肝細胞機能障害は起こらなかった。2) 肝流入血行遮断群では、AKBR は LPS 投与後30分、60分、240分で有意な低値が認められ、また末梢動脈血圧も60分、120分、180分の時点で有意に低値を示した。そして300分以内に60%が、8時間以内に全例死亡した。3) 動脈血中 TNF は肝血行遮断の有無にかかわらず、LPS 投与後はいずれの群でも60分で同じピーク値を示し、240分で同様に血中から消失した。

この現象の解釈として単純には LPS 投与による全身血圧の低下が、さらに肝血流量の低下に連なり、AKBR の著明な低下を招き死亡に至ったのではないかと推測された。しかし本研究の結果からは全身血圧の低下が、この実験時間内では AKBR の低下を直ちに招くものではないと考えられた。また肝不全症例に感染が加わり MOF へ移行する過程を時間的経過から考察しても TNF が直接作用して、呼吸不全、腎不全をも引き起こすことを説明することはできない。

そこで動脈血中 TNF の動態に注目すると、肝産生の TNF は肝血行遮断の有無には関係なく、しかも生存率とも直接結びついていないことが明らかとなった。しかし肝マクロファージ

において産生される TNF, interleukin-1 (IL-1) などのサイトカインは、chemical mediator として肝障害、敗血症の増悪、MOF への進展に関与することが報告されており²²⁾、一方 prostaglandin などの mediator を介した interaction があるとするなどの報告^{7) 23) 24)}や、これらの変化が肝障害の発現・増悪に関与しているとの報告もある^{25) - 29)}。また TNF 単独またはエンドトキシンの併用により、その投与量に比例してショックが誘発されやすいことが知られている¹⁵⁾。したがって術後の肝血流障害によって引き起こされた肝細胞の機能障害に感染が加重した場合、MOF への移行には肝産生の TNF が直接関係するのではなく、mediator としての役割を果たす可能性が示唆される。これに類似した現象としては、superoxide が強い肝細胞障害を示すことが知られている^{30) - 32)}。著者らの大腸菌生菌静注ラットモデルを用いた実験³³⁾で、分離 Kupffer 細胞の superoxide 産生能をみたところ、sublethal dose では肝臓自体のエネルギーレベルを表現する energy charge および AKBR の両者の値の低下は軽度で、しかも肝機能障害からの回復の可能性が維持されたレベルにあり、しかも superoxide 産生能の亢進が認められた。しかし lethal dose ではこの両者が不可逆的レベルへ低下し、superoxide の産生能の亢進は認められなかった。したがって、この場合でも肝臓のエネルギー代謝の変化と Kupffer 細胞から産生される superoxide の推移との間には直接的関係が認められず、また lethal dose では逆に superoxide の産生能の亢進は認められないという現象がみられた。したがって TNF により誘導される他の mediator, あるいは TNF と同時に発現する他の mediator による間接的な作用^{34) - 39)}に関する検索が今後の課題となる。

文 献

- 1) Ozawa K. Biological significance of mitochondrial redox potential in shock and

- multiple organ failure —Redox theory—. *In: Lefer AM, Schumer W, eds. Molecular and Cellular Aspects of Shock and Trauma. New York: Alan R. Liss Inc., 1983: 39–66.*
- 2) 山本正之, 井上慎吾, 菅原克彦, ほか. 術後非閉塞性高度黄疸肝不全より発生する多臓器不全の病態. 日消外会誌 1987; **20**: 2455–2459.
 - 3) Buetler B, Cerami A. Tumor necrosis, cachexia, shock and inflammation: A common mediator. *Annu Rev Biochem* 1988; **57**: 505–518.
 - 4) Beutler B, Milsark IW, Cerami A. Cachectin/tumor necrosis factor: Production, distribution and metabolic fate *in vivo*. *J Immunol* 1985; **135**: 3972–3977.
 - 5) Buetler B, Cerami A. Cachectin: More than a tumor necrosis factor. *N Engl J Med* 1987; **316**: 379–385.
 - 6) Hesse DG, Tracey KJ, Fong Y, *et al.* Cytokine appearance in human endotoxemia and primate bacteremia. *Surg Gynecol Obstet* 1988; **166**: 147–153.
 - 7) Tracey KJ, Beutler B, Lowry SF, *et al.* Shock and tissue injury induced by recombinant human cachectin. *Science* 1986; **234**: 470–474.
 - 8) Carswell EA, Old LJ, Kassel RL, *et al.* An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1975; **72**: 3666–3670.
 - 9) Ciancio MJ, Hunt J, Jones SB, *et al.* Comparative and interactive *in vivo* effects of tumor necrosis factor α and endotoxin. *Circ Shock* 1991; **33**: 108–120.
 - 10) Le J, Vilcek J. Tumor necrosis factor and interleukin 1: Cytokines with multiple overlapping biological activities. *Lab Invest* 1987; **56**: 234–248.
 - 11) Darlington GJ, Wilson DR, Lachman LB. Monocyte-conditioned medium, interleukin-1, and tumor necrosis factor stimulate the acute phase response in human hepatoma cells *in vitro*. *J Cell Biol* 1986; **103**: 787–793.
 - 12) 井上慎吾, 飯室勇二, 山本正之, ほか. 大腸菌静注敗血症ラットモデルにおける肝, 脾, 肺胞マクロファージ産生 tumor necrosis factor (TNF) から解析した肺水腫発生メカニズムの解明. 日外会誌 1991; **92**: 913–920.
 - 13) Ozawa K. Biological significance of mitochondrial redox potential in shock and multiple organ failure, redox theory. *Prog Clin Biol Res* 1983; **111**: 39–66.
 - 14) Yamamoto M, Tanaka J, Ozawa K, *et al.* Significance of acetoacetate/ β -hydroxybutyrate ratio in arterial blood as an indicator of the severity of hemorrhagic shock. *J Surg Res* 1980; **29**: 124–131.
 - 15) Tanaka J, Yamamoto M, Ozawa K, *et al.* Significance of blood ketone body ratio as an indicator of hepatic energy status in jaundiced rabbits. *Gastroenterology* 1980; **76**: 691–696.
 - 16) 飯室勇二, 山本正之, 角田 元, ほか. 肝マクロファージ食能抑制物質, GdCl₃ 投与によるラットエンドトキシンショックモデルにおける生存率の改善. 消と免疫 1992; **26**: 186–191.
 - 17) Yabusaki N, Komatsu H, Ueno A, *et al.* *In vitro* production of tumor necrosis factor (TNF α /cachectin) from human peripheral blood monocytes stimulated with bacillus calmette-guerin. —a possible mechanism of BCG therapy. *Yamanashi Med J* 1989; **4**: 173–178.
 - 18) 大林民典, 田村弘志, 田中重則, ほか. エンドトキシンに特異的な新しい比色定量法の開発. 臨病理 1985; **33**: 639–644.
 - 19) Atkinson DE. The energy charge of the adenylate pool as a regulatory parameter in interaction with feedback modifiers. *Biochemistry* 1968; **7**: 4030–4034.
 - 20) Williamson DH, Lund PA, Krebs HA. The redox state of free nicotinamide-adenine dinucleotide in the cytoplasm and mitochondria of rat liver. *Biochem J* 1967; **103**: 514–527.
 - 21) 山本正之, 藤井秀樹, 菅原克彦. 術後急性肝不全. 肝・胆・膵 1984; **9**: 237–246.
 - 22) Duncan RL, Hoffman J, Tesh VL, *et al.* Immunologic activity of lipopolysaccharides released from macrophages after the uptake of intact *E. coli in vitro*. *J Immunol* 1986; **136**: 2924–2929.
 - 23) Ruggiero V, Johnson SE, Baglioni C. Protection from tumor necrosis factor cytotoxicity by protease inhibitors. *Cell Immunol* 1987; **107**: 317–325.
 - 24) LeMay DR, LeMay LG, Kluger MJ, *et al.* Plasma profiles of IL-6 and TNF with fever-inducing doses of lipopolysaccharide in dogs. *Am J Physiol* 1990; **259**: R126–R132.
 - 25) 江頭 享, 永井敬之, 金馬義平, ほか. 実験的ラット肝臓の虚血—再循環モデルにおける肝障害. 日薬理誌 1991; **97**: 339–350.
 - 26) 嶋田 紘, 新本修一, 中川原儀三, ほか. エンドトキシンの肝細胞障害機序—特にクッパー細胞の役割—. 肝臓 1990; **31**: 741–748.
 - 27) Thomas CE, Reed DJ. Current status of calcium in hepatocellular injury. *Hepatology* 1989; **10**: 375–384.
 - 28) Myers SI, Small J. Prolonged hemorrhagic

- shock decreases splanchnic prostacyclin synthesis. *J Surg Res* 1991; **50**: 417-420.
- 29) Besse T, Gustin T, Claeys N, *et al.* Effect of PGI₂ and thromboxane antagonist on liver ischemic injury. *Eur Surg Res* 1989; **21**: 213-217.
- 30) Adkison D, Hollwarth ME, Benoit JN, *et al.* Role of free radicals in ischemia-reperfusion injury to the liver. *Acta Physiol Scand Suppl* 1986; **548**: 101-107.
- 31) 丸林誠二, 土肥雪彦, 川崎 尚. 虚血肝とフリーラジカル. *肝・胆・膵* 1988; **16**: 231-237.
- 32) Yoshikawa T, Ueda S, Naito Y, *et al.* Role of oxygen-derived free radicals in gastric mucosal injury induced by ischemia or ischemia-reperfusion in rats. *Free Radic Res Commun* 1989; **7**: 285-291.
- 33) Iimuro Y, Aoyama H, Yamamoto M, *et al.* Lung water accumulation in rats after repeated challenges of a sublethal dose of *E. coli* and its relation to the hepatic energy charge. *Jpn J Surg* 1991; **21**: 412-422.
- 34) Benedetti A, Casini AF, Ferrali M, *et al.* Studies on the relationships between carbon tetrachloride-induced alterations of liver microsomal lipids and impairment of glucose-6-phosphatase activity. *Exp Mol Pathol* 1977; **27**: 309-323.
- 35) 那谷賢治. 諸種化学物質中毒時のマウス肝小葉内に於ける障害部位と毛細血管の態度との関係についての生体顕微鏡的研究. *日消病会誌* 1958; **55**: 859-871.
- 36) Decker K, Keppler D. Galactosamine hepatitis: Key role of the nucleotide deficiency period in the pathogenesis of cell injury and cell death. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 1974; **71**: 77-106.
- 37) 山下智省. 肝細胞壊死発現における tumor necrosis factor- α の関与. *肝臓* 1991; **32**: 384-392.
- 38) Tiegs G, Wolter M, Wendel A. Tumor necrosis factor is a terminal mediator in galactosamine/ endotoxin-induced hepatitis in mice. *Biochem Pharmacol* 1989; **38**: 627-631.
- 39) Wang J, Wendel A. Studies on the hepatotoxicity of galactosamine/endotoxin or galactosamine/TNF in the perfused mouse liver. *Biochem Pharmacol* 1990; **39**: 267-270.

**Experimental Studies on Survival Rate and Changes in Tumor Necrosis Factor
in Arterial Blood Following Portal Administration of Endotoxin
in Dogs with Ischemia-reperfusion Injury of the Liver**

**Hajime Tsunoda, Jun Itakura, Yuuji Iimuro, Shingo Inoue, Masayuki Yamamoto,
and Yoshiro Matsumoto**

The First Department of Surgery, Yamanashi Medical College

This study investigated the role of infection in hepatic failure and multiple organ failure (MOF) following hepatic surgery. Since tumor necrosis factor (TNF) is produced mainly in the liver macrophages, the relationships between arterial TNF levels and the arterial ketone body ratio (AKBR, acetoacetate/ β -hydroxybutyrate), mean arterial blood pressure (MABP), endotoxin (Etx.) levels and survival rate were investigated in dogs with ischemia-reperfusion injury of the liver. No significant amounts of portal Etx. or TNF were detected at any interval following ischemia (10, 20, 30 and 60 min) but the recovery of AKBR and MABP after reperfusion was delayed relative to the duration of ischemia. Since LD₅₀ was shown in this study by 30-min-ischemia, lipopolysaccharide (LPS, 100 μ g/kg) was injected into the portal vein of the 30-min-ischemia models at the beginning of reperfusion. In both the ischemia and the non-ischemia (control) groups, TNF appeared within 30 min after LPS administration, reached the maximum level at 60 min and disappeared by 240 min. No significant difference in TNF levels between the two groups were observed. However, all animals in the ischemia group died within 8 hr, while all animals in the non-ischemia group survived for more than 24 hr. In conclusion portal inoculation of LPS after ischemia-reperfusion liver injury induced irreversible damage to the liver mitochondrial energy state with no effect on peripheral TNF levels, and TNF expression does not seem to be a primary factor in inducing MOF.

Key words: tumor necrosis factor (TNF), arterial blood ketone body ratio (AKBR), ischemia-reperfusion injury of the liver, multiple organ failure (MOF)