

多臓器障害時の低フィブロンネクチン

血症における活性酸素の病因論的意義

(61570599)

昭和62年度科学研究費補助金〔一般研究(C)〕研究成果報告書

昭和63年3月

研究代表者 葛 西 眞

(旭川医科大学医学部)

近年、患者管理技術や外科治療の進歩発展に伴い、重症外傷患者や高齢者などの、いわゆる high-risk例に対しても、外科手術を含む積極的な治療が施されるようになった。これに伴い、過大侵襲や重症感染症の発症を契機とする多臓器不全(MOF)が重篤な合併症として注目されてきた。このMOFは、従来であれば救命しえなかった例が救命されるようになってきて、前面に出てきた新しい症候群といえる。今日なお、その救命率は極めて低い。その理由のひとつとして、本病態がなお十分に把握されていないことがあげられる。一方、最近損傷組織の治癒機転におけるフィブロネクチンの重要性が指摘されているが、これは損傷組織や細胞膜において産生される活性酸素により強く制御されていることが推定される。そこで本研究では、肝を中心とした種々の実験モデルの病態の解明と、フィブロネクチンの関係を、活性酸素の関わりの面から明らかにすることを目的とした。

研究組織

- 研究代表者： 葛 西 真 一 （旭川医科大学医学部・講師）
研究分担者： 近 藤 啓 史 （旭川医科大学医学部・助手）
研究分担者： 加 藤 一 哉 （旭川医科大学医学部・助手）

研究経費

昭和61年度	1,200千円
昭和62年度	1,000千円
計	2,200千円

研究発表

(1) 学会誌等：

1. 葛西真一，他： 急性肝不全 - 急性肝不全に対する人工肝療法の現況について - . 蘇生，第5巻，1987年 4月.
2. 水戸迪郎，他： 肝腎症候群. 消化器科，第6巻，1987年 3月.

(2) 口頭発表：

1. 小野寺一彦，他： 汎発性腹膜炎、腹腔内膿瘍に対する術式と予後，創傷開についての検討. 日本消化器外科学会，1987年 2月.
2. 近藤啓史，他： 閉塞性黄疸時の交感神経系に関する実験的研究. 日本ショック学会，1987年 4月.

3. 柿坂明俊，他： DBcAMPによる急性肝不全治療の実験的研究。 日本外科学会，1987年 4月。
4. 浅川全一，他： 肝虚血障害に対するXanthine Oxidase Inhibitorの効果。 日本肝臓学会，1987年 7月。
5. 加藤一哉，他： OK-432によるラット肝再生増強効果および作用機序に関する研究。 日本肝臓学会，1987年 7月。

(3) 出版物

1. 仁村泰治： MOF公開ワークショップーその病態と成因ー。 文部省科学研究費補助金 総合研究(B),循環障害の微小循環に関する総合研究班，1987年 1月。
2. 佐藤寿雄： 閉塞性黄疸と多臓器障害。 金原出版，1986年 9月。

研究成果

I. MOFにおける閉塞性黄疸時の交感神経系反応特性の意義.

閉塞性黄疸の存在は、しばしば術後に発生するMOFの病因となることが経験される。その原因としては、併存する感染症および高ビリルビン血症に基く交感神経系の反応特性が、循環系にもたらす影響によることが考えられる。そこで本研究では、動物の閉塞性黄疸モデルを用いて、交感神経系の反応特性を検討した。

1. 方法.

雑種成犬の総胆管を結紮して黄疸を作製し、3週後に実験に供した。交感神経系の反応特異性は、 α 、 β 受容体刺激および遮断実験に対する反応性でみた。パラメーターは、血液生化学、血中カテコラミン、および循環系諸因子（動脈圧、心拍数、心拍出量、心係数、末梢血管抵抗、左室仕事量など）とした（表-1）。

実験（1）では、麻酔安定後の諸検査の後、アトロピンによる副交感神経遮断後、 β -刺激剤としてのイソプロテレノール $0.1\sim 0.25\mu\text{g}/\text{kg}\cdot\text{min}$ 、 β -遮断剤としてのプロプラノロール $0.2\text{mg}/\text{kg}$ 、 α -刺激剤としてのフェニレフリン $1\sim 2.5\mu\text{g}/\text{kg}\cdot\text{min}$ 、 α -遮断剤としてのフェントラミン $0.2\text{mg}/\text{kg}$ を、それぞれ各影響がない時点で投与した。

実験（2）では、アトロピン処置後、イソプロテレノール $2\times 10^{-5}\sim 1$

表 1

実験方法

1. 非黄疸犬, 総胆管結紮3週後黄疸犬
2. 交感神経系の反応特異性
 - a. 黄疸犬の循環動態の特異性
 - b. α, β 受容体刺激, 遮断試験に対する反応性
 - イ. 副交感神経遮断
 - ロ. β 受容体の刺激と遮断
 - ハ. α 受容体の刺激と遮断
 - c. 測定項目
 - イ. 血液生化学, カテコラミン
 - ロ. 動脈圧, 心拍数, 心拍出量,
心係数 = 心拍出量 \div 体重,
末梢血管抵抗 = 平均動脈圧 \div 心係数
左室仕事量
= 1回拍出量 \times 平均動脈圧 \div 1000
 - ハ. β 系: 心拍数
 α 系: 動脈圧

$\times 10^{-3}$ mg/kg を投与し、ドーズレスポンスカーブを作製した。

2. 成績.

黄疸の有無による循環動態の諸測定値を図-1に示す。黄疸の存在によって、平均動脈圧の低下、心拍数の軽度低下、心拍出量の低下、心係数の低下、末梢血管抵抗の軽度低下、左室仕事量の低下などが認められた。

β -受容体をイソプロテレノールで刺激すると、心拍数の変化は黄疸群の方で少なかった。また、 β -受容体遮断剤であるプロプラノロールの投与では、両群とも同程度に心拍数を減少させた(図-2)。

α -受容体をフェニレフリンで刺激すると、両群とも同程度に収縮期血圧を上昇させた。また、 α -受容体をフェントラミンで遮断したところ、両群とも同程度に収縮期血圧を減少させた(図-3)。

β -受容体刺激剤投与による用量反応曲線を見ると、黄疸群において有意に低下していた(図-4)。

血液生化学所見では、黄疸群で高ビ血症、軽度の肝機能障害、高カテコラミン血症などを示していた。

3. 小括

黄疸の存在によって、循環動態は平均血圧の低下、末梢血管抵抗のやや低下、心拍出量の低下という状態を示していた。この黄疸時の交感神経系の反応特異性は、 α 作動系に異常はなく、 β 作動系での低反応を特徴とした。すなわち、閉塞性黄疸時には交感神経とくに β 作動系(β 受容体、心

図1 非黄疸群, 黄疸群の循環動態

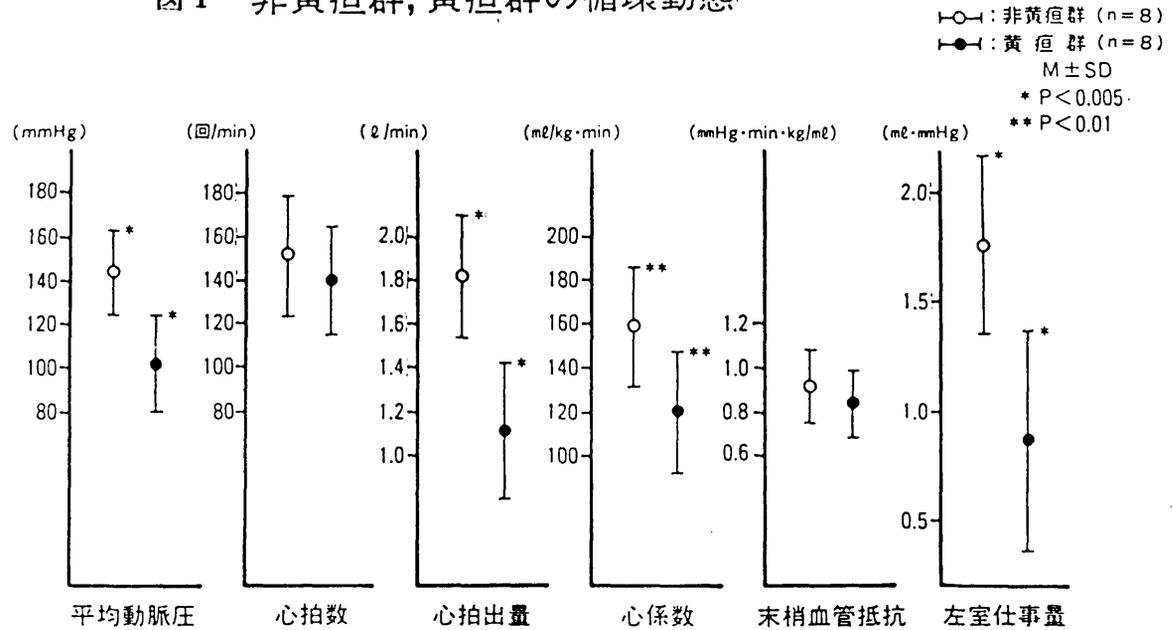


図2 β 受容体刺激剤, 遮断剤投与時の心拍数の変化

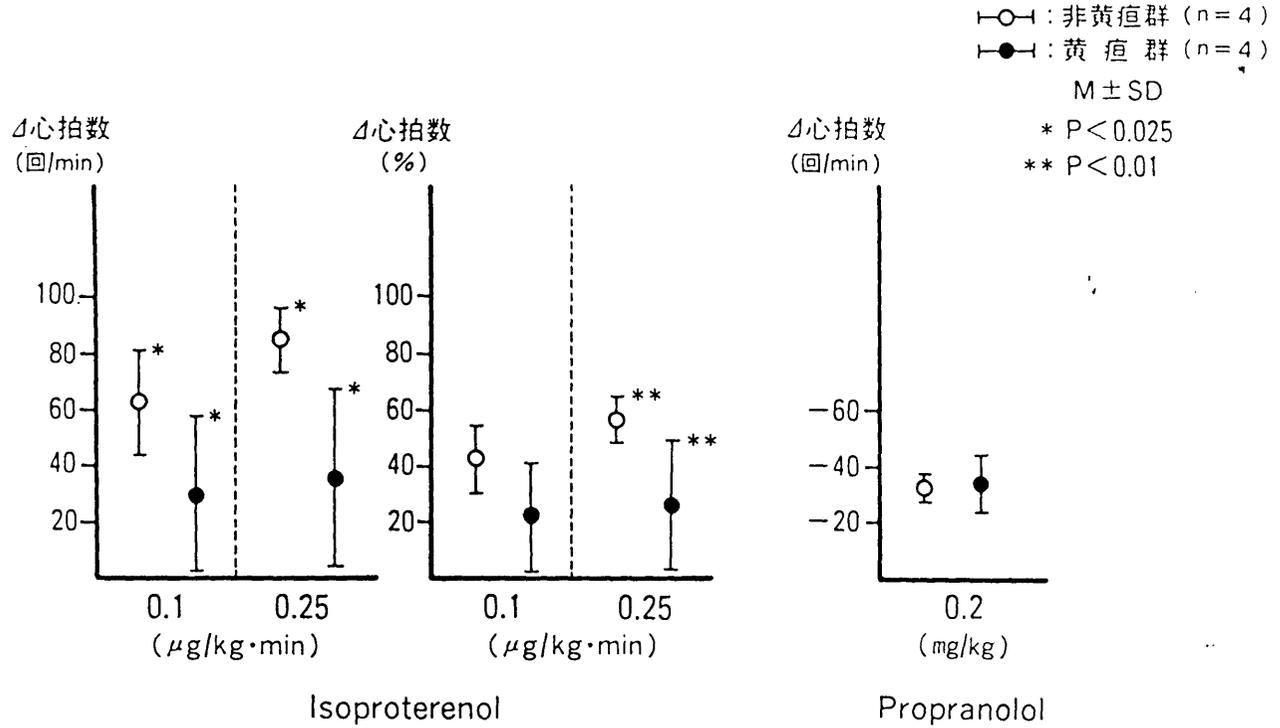


図3 α 受容体刺激剤, 遮断剤投与時の収縮期圧の変化

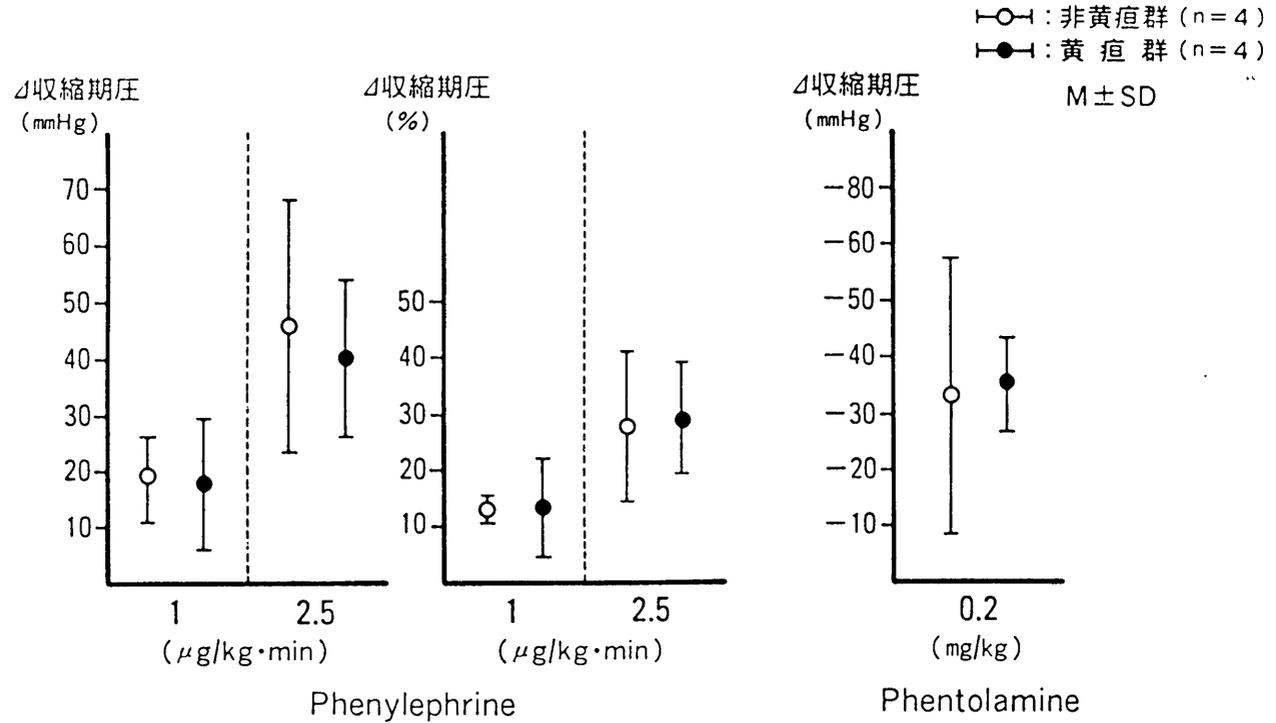
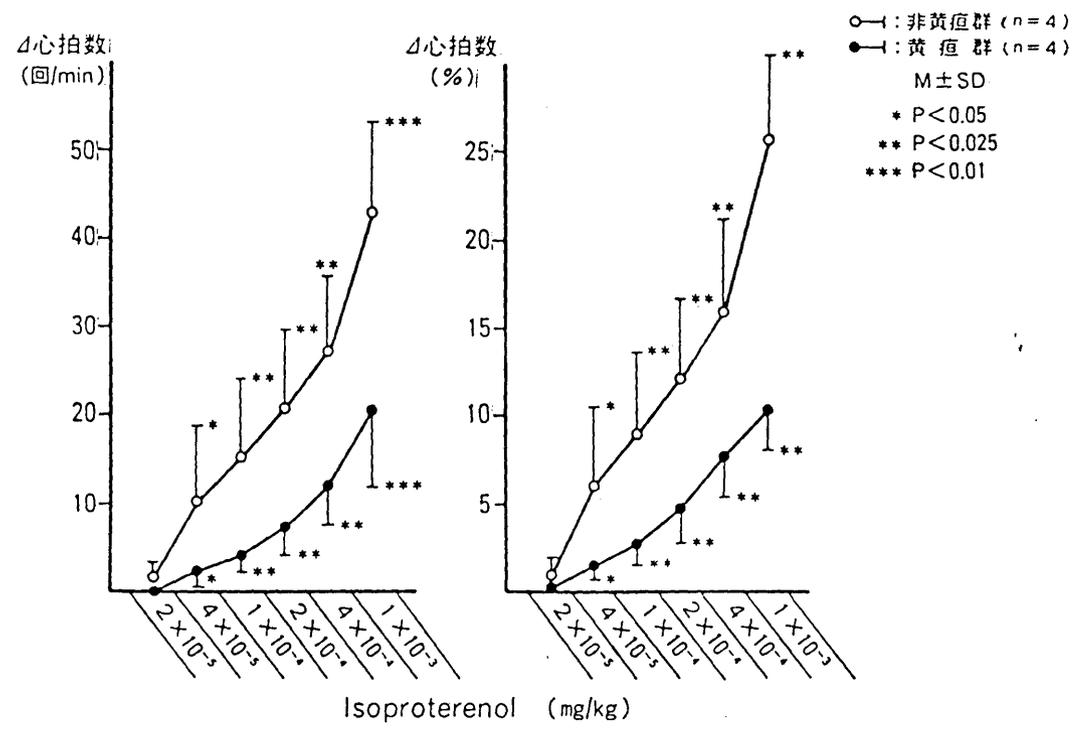


図4 β 受容体刺激剤投与による用量反応曲線



筋など)の異常が示唆され、これが術後のショック、腎不全、あるいはMOFへの進展に関係するであろうことが推定された。

II. MOFの基礎疾患としての、重症肝機能障害時の肝エネルギー代謝動態.

肝機能障害の重篤な患者に、何らかの負荷が加わってMOFへと発展する症例にしばしば遭遇する。この時の主な病態は、肝機能障害に基づく全身の代謝異常と捉えることができる。生体の物質代謝には、エネルギー動態が関与するところから、本実験では肝臓の阻血時ならびにガラクトサミン負荷時のエネルギー代謝動態を、 ^{31}P -NMRにより検討した。

1. 方法.

装置はJ E O L GX-270WB で、 $40\ \mu\text{sec}$ のパルス幅、 0.5sec の繰返し時間、240回(2分)の積算回数、 $25\text{mm}\phi$ のプロープ、基準物質はHexamethyl phosphoro amide とした。

実験(1)では、ラットにガラクトサミン(1g/kg)投与3~24時間後に肝を摘出し、門脈内カニューレーションによる体外灌流システムで、肝の ^{31}P -NMRスペクトルを測定した。

実験(2)では、ガラクトサミン投与24時間後に肝を摘出し、体外灌流装置に設置し安定した後、30~120分間の阻血とし、再灌流30分後まで ^{31}P -NMRを測定した。

2. 成績.

正常時の³¹P-NMR スペクトルは、図-5最上段の如く、それぞれのリンのピークが観察された。ガラクトサミン投与による変化をみると、直後は著明な無機リンのピークがみられるが、時間経過とともにこのピークは低下し、同時に NAD⁺/NADHと UDP-sugarピークの増大が観察された(図-5)。

ガラクトサミン投与24時間後の摘出肝に対する阻血負荷時のATPの変動をみると(図-6)、ガラクトサミン投与によって、肝内ATPはすでに正常肝の約50%に低下しているが、阻血により両群ともATPは直ちに0レベルになるが、再灌流により比較的速やかな回復を示す。しかしながら、阻血時間が長くなると正常肝のATPも完全には回復しえず、60分以上の阻血で約50%低下し、ガラクトサミン処置肝では一層の低下と回復遅延が認められた。また、この時の細胞内pHの変動を連続的に記録すると、図-7の如く正常肝では阻血により直ちに肝内pHは低下するが、ガラクトサミン投与群ではむしろその変動は軽度であった。

3. 小括.

³¹P-NMRは、急性虚血肝のエネルギー代謝および細胞内pHの経時的観察に極めて有用であったガラクトサミン投与によって、数時間の早期より肝内ATP量の低下が認められ、虚血によりさらに著しく低下することが判明した。温阻血60~90分群が、回復のための時間的限界と一般的に言われているが、³¹P-NMR上では、正常肝では60分阻血後のATPの回復は約50%であり、その後数10分間の観察でも再低下がみられなかったことより、

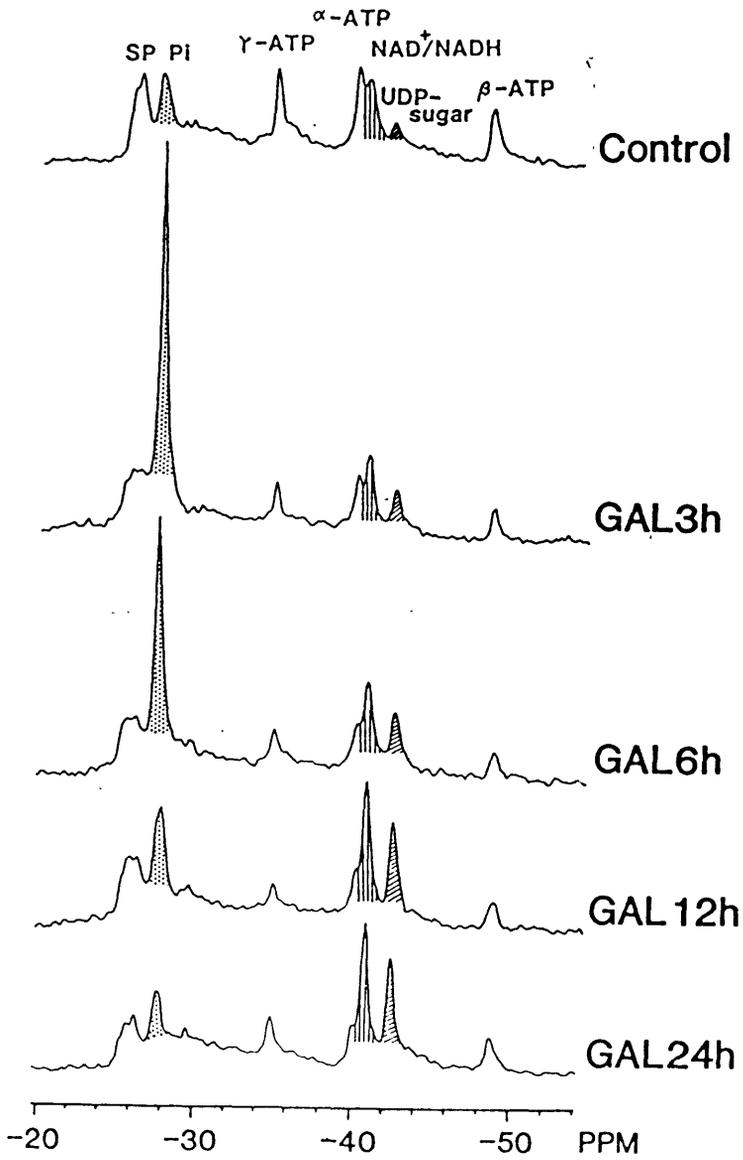


図5 GAL投与後の ^{31}P -NMRスペクトルの変化

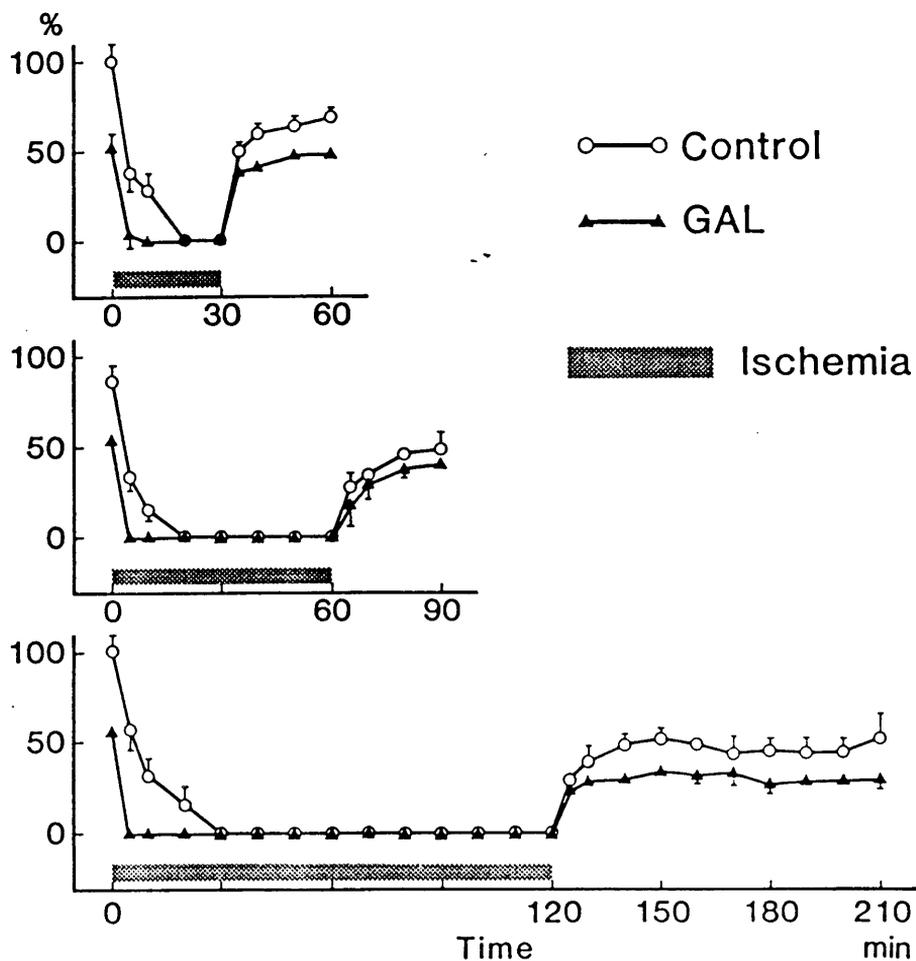


図6 虚血と再灌流におけるATPの変動

いわゆる reperfusion injury はもっと長時間後でなければ出現しないのか、あるいはこのような実験モデルでは出現してこないのか、大変興味のある点である。もし、reperfusion injury (活性酸素による障害が強く示唆されている) が、in-vitroでは認められず、in-vivoでのみ認められる現象とすれば、何らかの別の要因を考える必要があり、今後の検討を必要としよう。

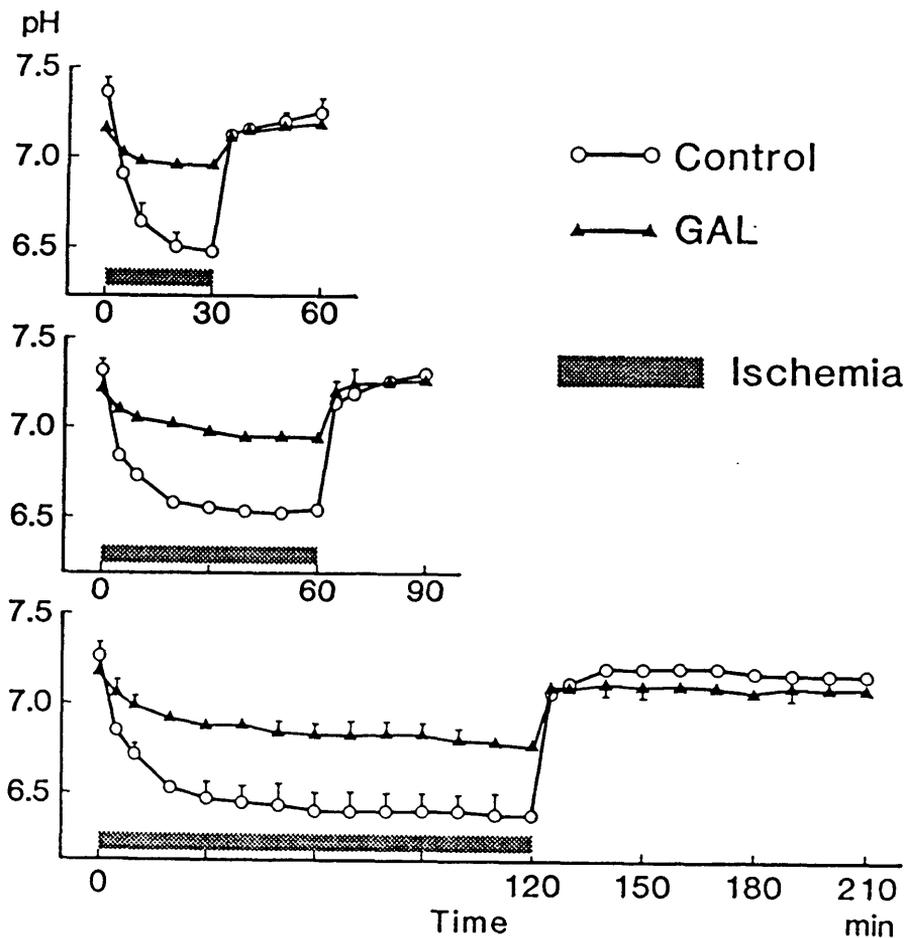


図7 虚血と再灌流における細胞内pHの変動

Ⅲ. 肝切除後残存肝の再生における活性酸素と網内系機能の影響.

肝切除は、それ自体が肝に対する、あるいは生体に対するひとつの侵襲である。一般的に、損傷組織部位には活性酸素の上昇があるとされるが、この減少は残存肝にどのように作用するであろうか。また、肝の網内系（

RES)も直接的、機能的に影響を受けるので、このRESの機能は残存肝にどのような影響を与えるであろうか。本研究では、これらの点に注目して検討を行なった。

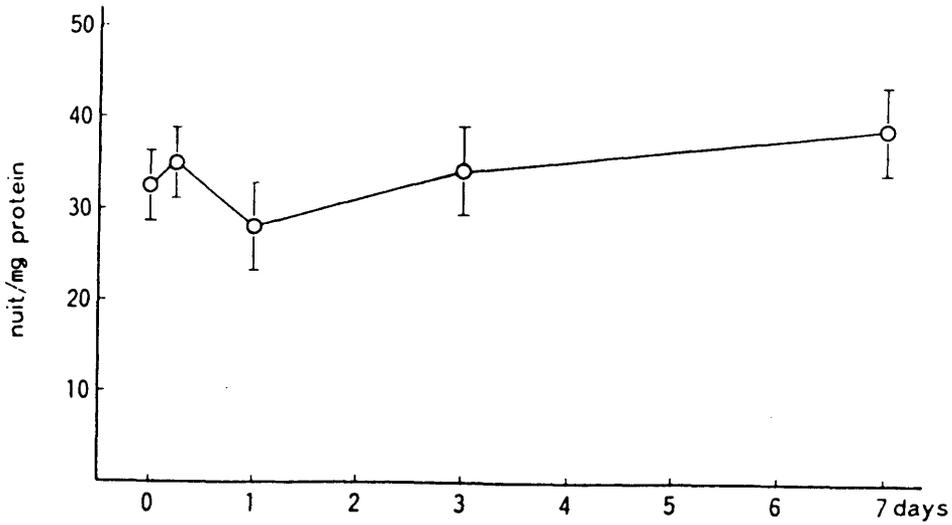
1. 方法.

実験(1)では、ラットに70%肝部分切除を行ない、肝切直後に活性酸素を選択的に減少させるスーパーオキシドディスムターゼ(SOD)を投与し、経日的に血液生化学検査、肝内c-AMP濃度、肝DNA合成能、肝SOD値の変化を測定した。

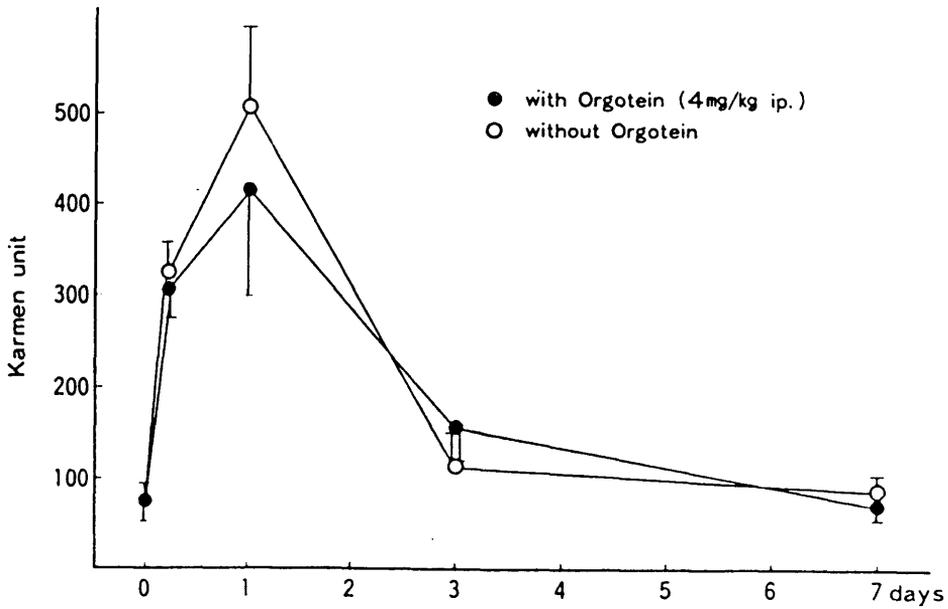
実験(2)では、70%肝切後の肝RES機能の変化をカーボン・インクのクリアランス法によって経日的に測定し、またRESの賦活剤であるOK-432を投与した場合のRESクリアランスならびに肝DNA合成能を検討した。

2. 成績.

肝切後の残存肝のSOD量は、図-8に示す如く、肝切直後軽度上昇し、1日目で逆に最低となり、以後少しづつ上昇を示した。血清のGOT値は、SOD投与の有無に関わりなく1日目にピークを示し、以後急減した(図-9)。残存肝のc-AMP濃度をみると、SOD(-)群では肝切直後急上昇を示し、以後漸減するが、SOD(+)群では全く逆の変化を示した(図-10)。DNA合成に与える影響をみると、SODを投与した群では有意にDNA合成が抑制されていた(表-2)。



☒ 8 SOD Concentration in Rat Liver following Partial Hepatectomy



☒ 9 Serum GOT following Partial Hepatectomy

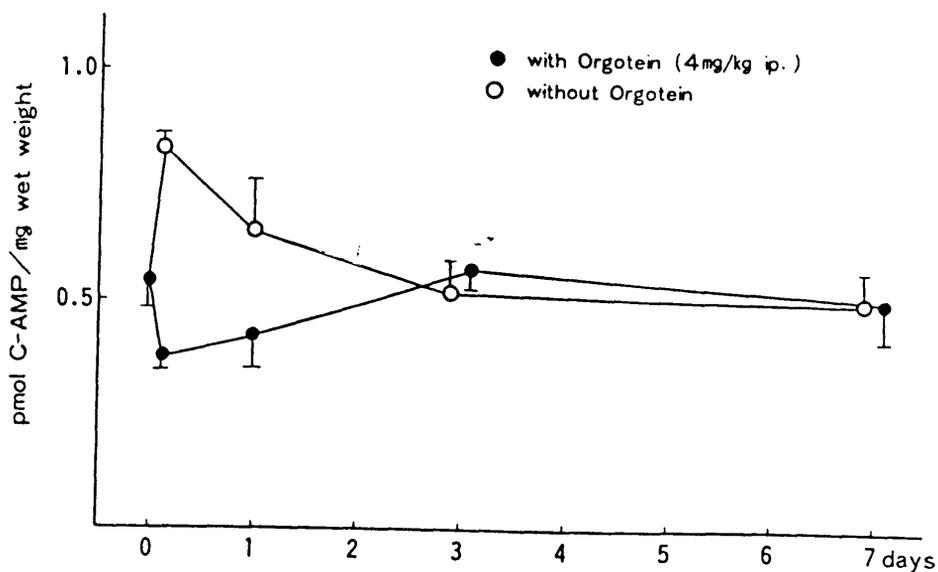


图10 C-AMP Concentration in Rat Liver following Partial Hepatectomy

表2 Effect of Orgotein (SOD) on DNA Synthesis

Addition	Partial hepatectomy	n	DNA Synthesis (cpm/mg DNA)
None	-	4	$8.02 \pm 2.14 \times 10^2$
None	+	7	$11.1 \pm 2.95 \times 10^4$
Orgotein (4 mg/kg)	+	9	$7.46 \pm 1.48 \times 10^4$ (P < 0.01)

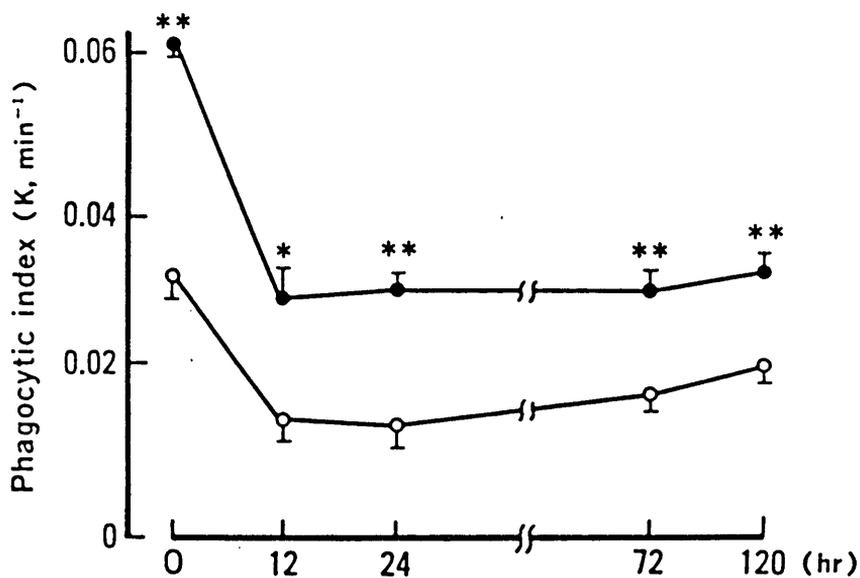


図11 Hours after 70% partial hepatectomy

一方、70% 肝切除後の残存肝RES機能の変化をみると、図-11の○印の如く、肝切12時間後には正常値の約50%に低下し、以後徐々に上昇を示す。この場合、あらかじめOK-432でRESを活性化しておくと、●印の如く正常値も既に2倍となっているが、肝切後でもOK-432を投与しない正常値と同じ程度に高値を示し、その値を持続するのがわかる。OK-432の使用の有無で肝のc-AMP値を比較すると、RESの活性化によってc-AMP値が著増することが判明した(図-12)。OK-432によるRESの活性化の有無により、70%肝切除後の残存肝DNA合成は、同じtime-lagをもった後活性化群の合成能は著増することがわかった(図-13)。

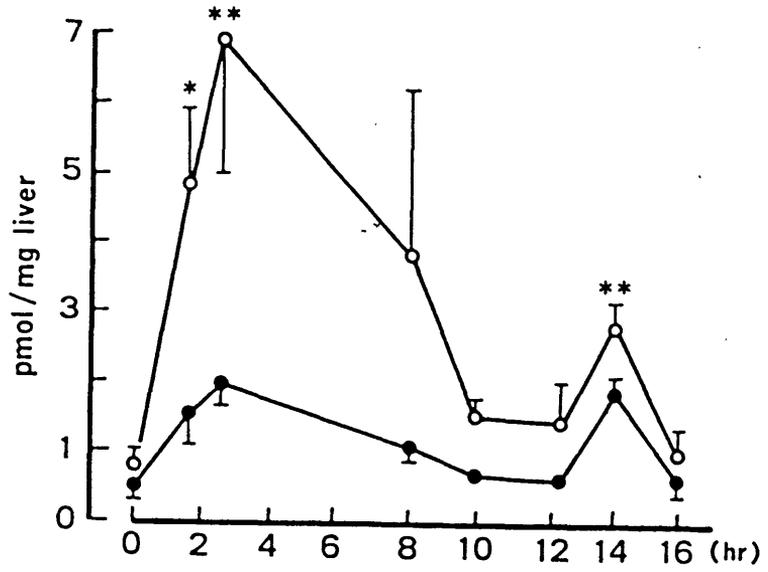


Figure 12: Hours after partial hepatectomy

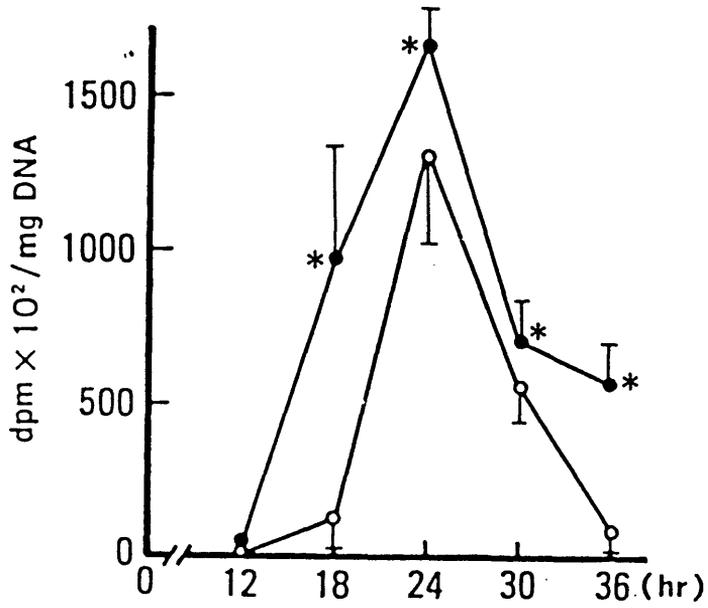


Figure 13: Hours after partial hepatectomy

3. 小括.

肝切後の残存肝には軽度の活性酸素の上昇がみられ、これをSODで抑制すると、肝再生率が低下するという現象は、活性酸素があたかも肝再生の initiation を演じているごとくである。活性酸素は、ミトコンドリアにおけるエネルギー産生系において重要な役割を担うが、逆に細胞障害性に働くことが大きな問題である。この活性酸素は、細胞膜のアラキドン酸回路の活性化を通して、プロスタグランジン系に関わっていくのかもしれない。RESを活性化させたときのSODの動きは、ひとつの大変興味ある問題点であり、今後の研究が待たれる。

IV. 外因性 c-AMPの肝細胞障害時における意義.

肝切後の肝再生は、c-AMPの急上昇という現象を伴う。前述の実験を活性酸素により活性化されたプロスタグランジン合成系の増幅に引き続き起こる c-AMPの動態として捉えることが可能ならば、外因性 c-AMPも肝の障害あるいは再生に何らかの影響を与えるはずである。この点を明らかにすべく、本研究を行なった。

1. 方法.

1) ガラクトサミン肝不全モデルによる検討.

ガラクトサミン 1.5g/kg体重をラットに腹腔内投与し、各種条件にてDB

cAMPを腹腔内投与した。DBcAMPの効果判定は、動物の生存率、肝機能、肝組織血流、肝組織ATP値、肝組織所見などにより行なった。

2) 阻血肝不全モデルによる検討.

雑種成犬に脾・大腿静脈間にアングスロンチューブにて門脈・下大静脈バイパスを作製し、肝門部を一括遮断する方法によって、阻血肝不全モデルを作製した。予備実験の結果、遮断時間は90分間とし、実験群には遮断前後にわたり DBcAMP 0.1mg/kg/minを持続静注した。効果判定は、生存率、血液生化学検査、肝組織血液量、肝エネルギーチャージ、肝組織所見などによった。

2. 成績.

1) ガラクトサミン肝不全モデルの検討.

動物の生存率でみると、図-14の如く、DBcAMPをGal投与1時間前後に投与した群では100%、1時間前に投与した群では90%、1時間後に投与した群では32%、非投与群では10%であった。

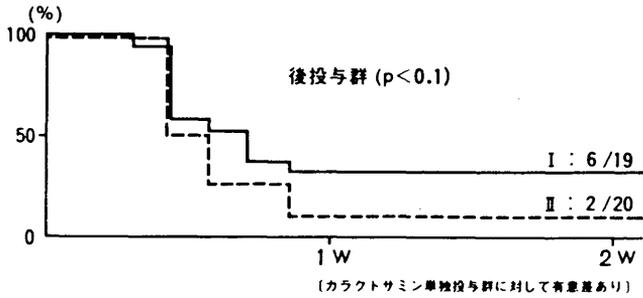
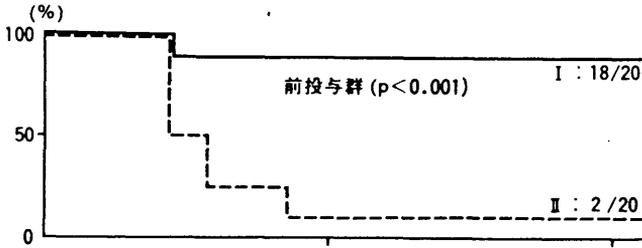
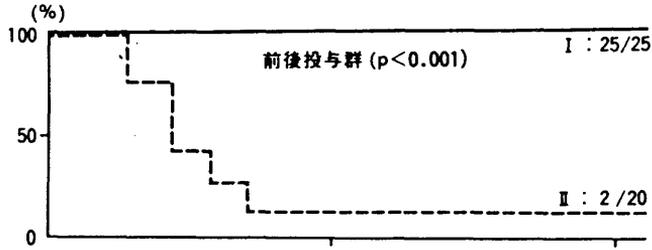
GOTの推移を見ると(図-15)、前投与群では72時間目には低下を示した。

肝血流量の変化をみると(図-16)、前投与群では48時間目には上昇傾向に転じたが、後投与・非投与両群では低下するのみであった。

肝組織中のATP値をみると、DBcAMP使用によりいずれもGal単独群よりは有意に高い値を示していた(図-17)。

図14 生存率

(I : Gal+DBcAMP 投与群
 II : Gal 単独投与群)



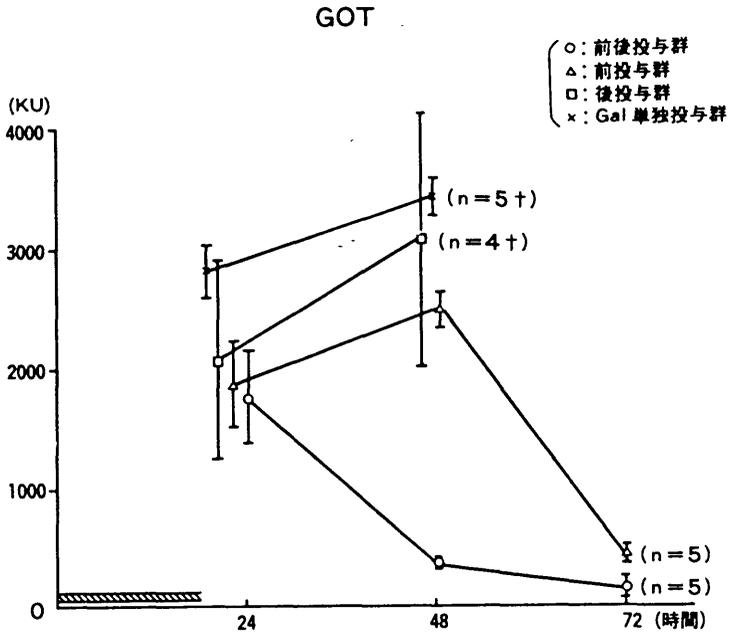


図15 肝機能検査の経時的变化

2) 阻血肝不全モデルによる検討.

90分遮断群の生存率は約10%であったが、DBcAMP使用群では75%が生存した。

血液生化学検査値をみると、24時間後に肝機能の悪化を示したものの、実験群ではコントロール群に比し良好であった。

肝組織血流量をみると、実験群では解除後もほぼ正常値と同様の血流を維持していた。

エネルギーチャージをみると、コントロール群では解除後著明に低下したのに比し、実験群ではほぼ正常値を維持していた。

肝組織所見をみると、コントロール群では広汎壊死像を呈していたが、

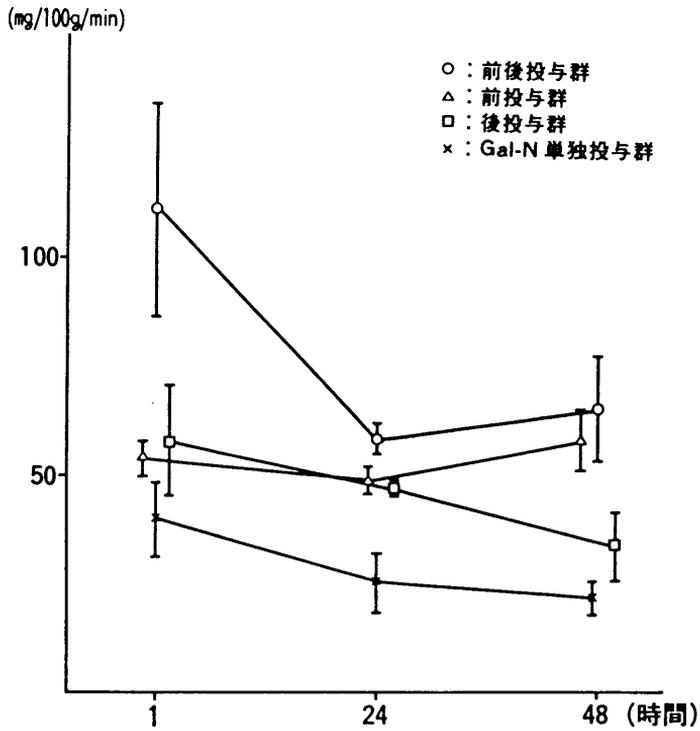


図16 肝血流量の経時的变化

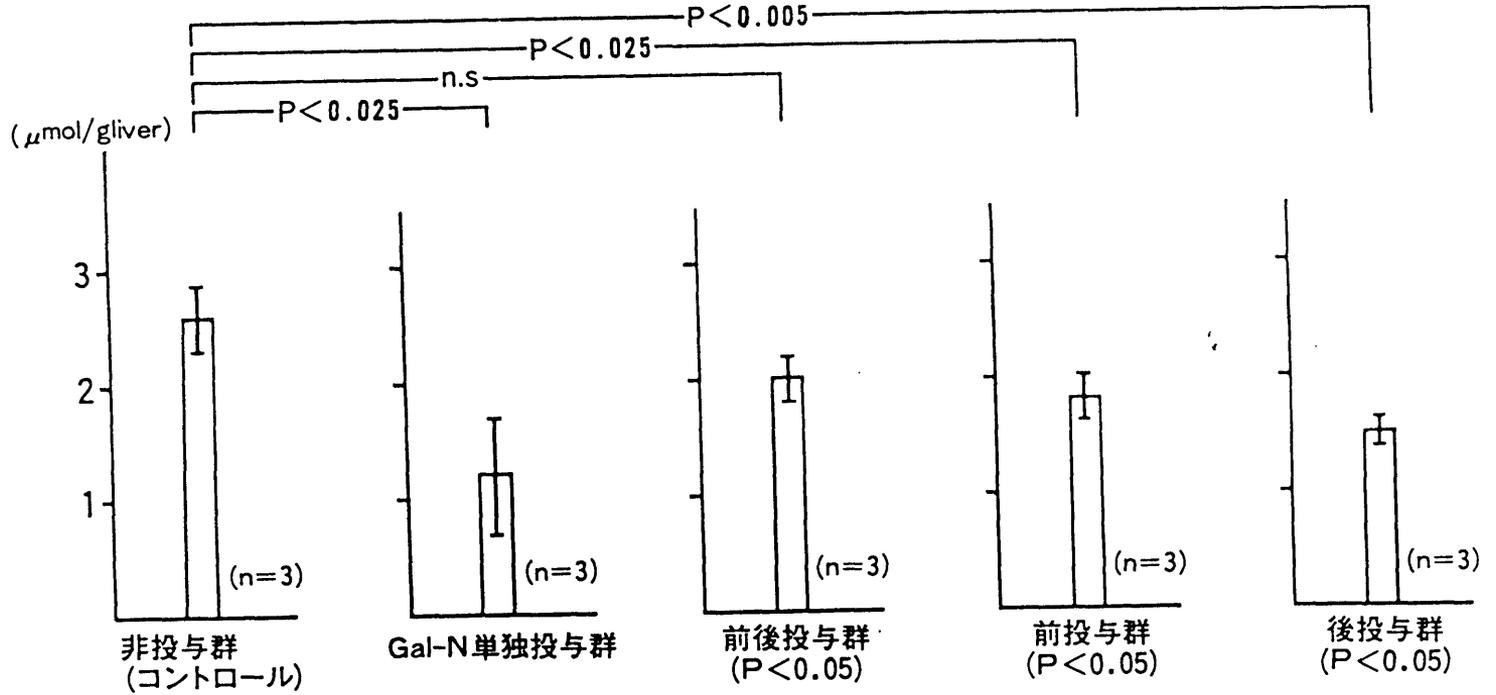
実験群の変化は軽度にとどまっていた。

血液中の過酸化脂質の変動をTBA法により測定し検討したところ、いずれの群も阻血により過酸化脂質は増加したが、DBcAMP使用の有無や生死とは直接的な関係は見出しえなかった。

3. 小括.

DBcAMPは、細胞内透過性を有する cAMP として注目され、循環系薬剤として主に使用されているが、セカンドメッセンジャーとして肝再生にも関

図17 肝組織ATP値



[ガラクトサミン単独投与群に対して有意差あり]

係していることが知られている。しかしながら、肝細胞障害に対しての効果ははまだ知られていない。今回われわれは、障害の機序の異なる二つの方法、つまり直接的な肝細胞毒性作用としての Gal と、間接的な肝細胞障害作用としての阻血を用いて検討したところ、いずれの障害に対しても有用であることが判明した。cAMP は肝再生を促進させる作用を有するが、組織所見や障害からの回復の時間経過からみても、再生が直接生存率を向上させた要因とは考えられない。Gal の実験から、組織血流の維持作用がひとつの大きな要因であることが推定されるが、肝の阻血実験では血流の要因はむしろ少ないものと考えられ、細胞に対する保護作用が主と推定される。膜に対する障害をみる目的で過酸化脂質に注目したが、今回の成績ではいずれにも障害の発生するものと考えられ、両法による障害群でもエネルギーチャージが良好に維持されているところから、DBcAMP はミトコンドリア機能を良好に維持させるものと判断された。

V. 肝虚血障害と活性酸素に関する研究。

虚血肝障害時の mediator として、活性酸素が注目されその発生源としてキサンチンオキシダーゼがあげられる。そこで、この阻血剤であるアロプリノールを用い、虚血肝障害に対する効果と活性酸素の関与につき検討した。

1. 方法.

虚血肝不全ラットは、70% 肝葉阻血 100分後に残り30% の非虚血部を切除する方法で作製した。G-I はアロプリノールを阻血前3回投与、G-II は阻血前1回のみ、G-III は生食コントロールとした。

効果判定は、肝機能検査、肝組織所見、虚血肝組織中の過酸化脂質含量をMDA法により測定した。

2. 成績.

生存率をみると(図-18)、G-I では50%、G-II, IIIでは90%であった。

虚血負荷経過中のMDA量を、アロプリノール投与の有無でみると、図-19にみられる如く、reperfusionにより著増するMDA量はアロプリノール使用により有意に抑制されていた。

3. 小括.

MDAを特異的に抑制するアロプリノールの使用により、reperfusion injuryの発生が有意に抑制され、このことは活性酸素の発生を抑制することによることを示唆した。

18 SURVIVAL CURVES OF LIVER FAILURE RATS

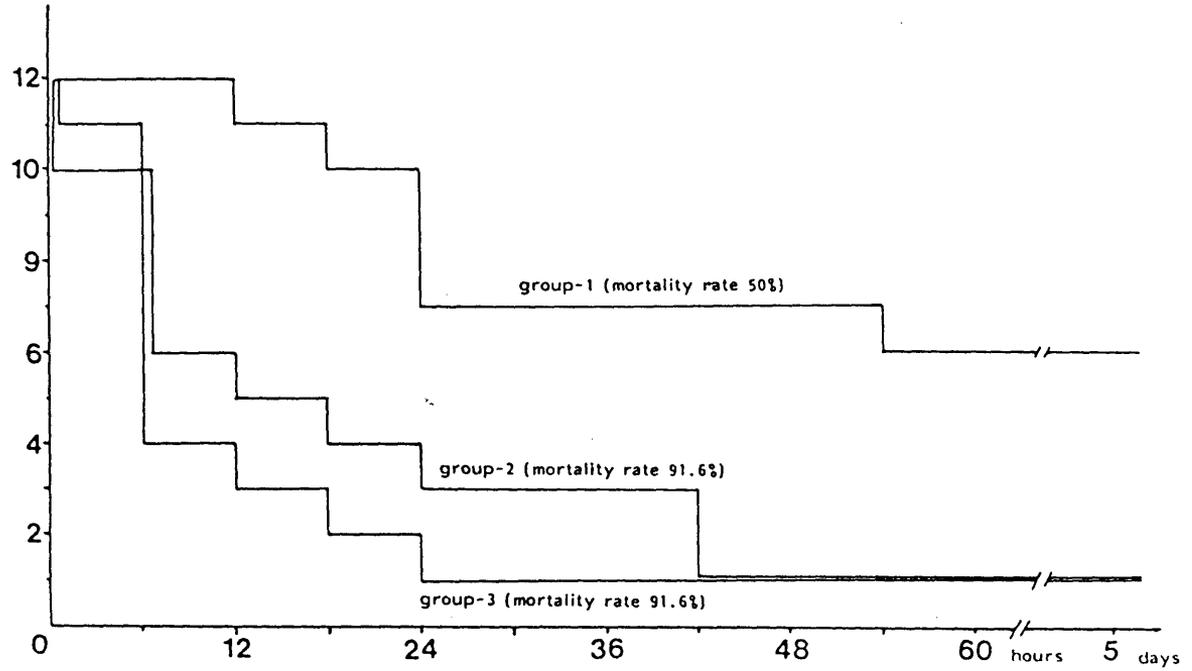
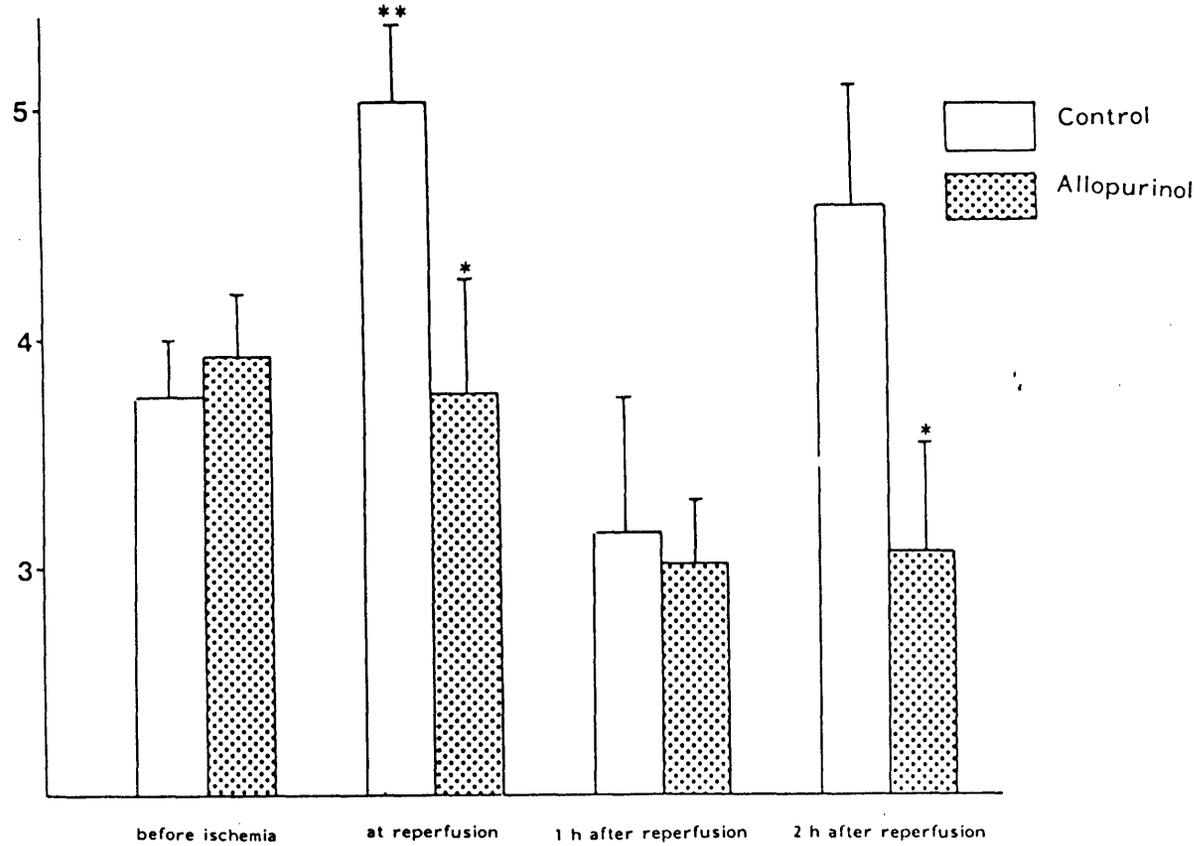


図19 アプリノール投与時のMDA

malondialdehyde
(nmol/mg.protein)



Ⅶ. 臨床例におけるフィブロネクチンの動態.

消化器外科手術後症例の、術前、中、後の経過中における血中フィブロネクチンの動態を検討した。

サンプルは、血漿として測定まで凍結保存し、測定は免疫比濁法によった。

G-I : 術前後を通じ他臓器障害の認められなかった群.

G-II : 何らかの肝機能障害のあった群.

G-III : 肝硬変症の存在した群.

	術前	1	3	5	7	10 日
G-I	406±99	290±32	346±83	376±48	374±53	347±64
G-II	247±68	189±26	286±78	242±46	254±114	299±130
G-III	214±27	195±23	206±29	190±21	201±12	

単位 $\mu\text{g/ml}$

フィブロンネクチン値はG-I群で最も高く、肝機能障害が強まるにつれ低値を示していた。一般的に、術直後よりフィブロンネクチンは低値を示すも3～5日目で術前値に回復する傾向を示した。

また、肝機能障害の他に、重症腹部感染症症例に低フィブロンネクチン血症が認められたが、凍結ヒト新鮮血漿の補給により修飾され、真の変動は明らかではない例も散見された。

VII. 総括.

重度外傷患者や high-risk例に対する過大な術侵襲を契機として発症した、あるひとつの organの障害が、それを引き金として次々と他臓器の障害を来す病態を多臓器障害 (MOF) として、近年注目してきた。本症候群が包含する病態は極めて複雑であるが、臨床例を検討したところ、背景因子として重症感染症あるいは septic shock の重要性がクローズアップされた。そして、臓器相関あるいは医原性要因が加味されて、進行するものと考えられるに至った。一方、色々な組織損傷あるいは障害を引き起す因子として、最近各種のラディカルが注目され、活性酸素や過酸化脂質などがとくに重要視されている。これとは反対に、組織の修復機転としての蛋白フィブロンネクチンが、各病態における病勢の進行との関連で検討されてきている。

われわれは、これらの関連を明らかにすべく、各種の動物実験モデルを用いて検討を加えた。腹部外科、とくに消化器外科領域で問題になるのは

閉塞性黄疸を含めたところの重症肝機能障害であり、とくにこの点を中心に病態解明と治療法について検索した。その結果、これらの病態の最も基礎となるのは、肝のエネルギー代謝障害であろうことが推定され、細胞内のセカンドメッセンジャーであるcAMPを外因性に投与することで、かなりの病態が改善される可能性が確認された。また、低下したフィブロンectinは、新鮮凍結血漿として補充可能であることが臨床例で確かめられた。

今後の課題として、現時点では活性酸素の測定法にはなお限界があるところから、短時間内の変化をより正確に測定する方法の開発が必要と思われる。