

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 1 日現在

機関番号：	34401
研究種目：	基盤研究(C)
研究期間：	2009～2011
課題番号：	21591760
研究課題名（和文）	肝虚血再灌流前後の肝組織内ヒドロキシラジカルのリアルタイム定量の臨床的意義
研究課題名（英文）	Real time measurement of Hydroxylradical following ischemia-reperfusion injury model using rabbit liver.
研究代表者	
	内山 和久 (Uchiyama Kazuhisa)
	大阪医科大学・医学部・教授
研究者番号：	80232867

研究成果の概要（和文）：肝虚血再灌流傷害の病態生理を解明するために、生体肝組織における最も酸化作用の強いヒドロキシラジカル（ $\cdot\text{OH}$ ）がどのように関与しているかを検討した。ウサギ肝虚血再灌流モデルにおいて肝組織内 $\cdot\text{OH}$ を測定するために、Microdialysis法を応用し、 $\cdot\text{OH}$ のサリチル酸との特異反応生成物である2,5-dihydroxybenzoic acid (DHBA)と2,3-DHBAを電気化学検出器装備のHPLCを用いてリアルタイムに定量測定した。再灌流後の肝組織内ヒドロキシラジカルは、阻血していない対照例と比較して、再灌流直後と7時間以後に二相性の上昇を示すことが判明した。

研究成果の概要（英文）：The aim of this study was to investigate the generation of the hydroxyl radical ($\cdot\text{OH}$) in hepatic tissue in vivo after ischemia/reperfusion (I/R) injury by using a microdialysis technique. Hepatic ischemia was induced in the male rabbit liver by clamping the hepatic artery and portal vein for 20 minutes. Microdialysis probes were placed into the liver perfused with salicylate prior to, during, and after the period of clamping. In anesthetized male rabbits (n=45), ischemia was produced by the selective vascular (hepatic artery and portal vein without caudal lobe branch) occlusion for 20 min, the $\cdot\text{OH}$ -specific products of salicylate hydroxylation (2,3- and 2,5-dihydroxybenzoic acid : DHBA) in the perfusion fluid from microdialysis into the liver were measured by HPLC equipped with electrochemical detector 9 hours afterwards. There was a significant increase (p<0.05) in the intrahepatic $\cdot\text{OH}$ concentrations, compared to the non-ischemic control group, immediately after and seven hours after reperfusion.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医師薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・消化器外科学

キーワード：Microdialysis, フリーラジカル, 虚血再灌流, 肝切除術

1. 研究開始当初の背景

近年、手術手技の進歩により広範肝切除や肝移植が安全に施行されるようになった。しかし、その手術操作上、肝の虚血再灌流を繰り返すことは必要不可欠となる。虚血再灌流障害による細胞傷害に対する研究の中で、いわゆる活性酸素などのフリーラジカル連鎖反応が虚血再灌流時に起こる細胞レベルでの組織傷害に重要なファクターであると考えられるようになった。しかし、肝の虚血再灌流時の肝障害の原因として、最も毒性の強いフリーラジカルであるヒドロキシルラジカル($\cdot\text{OH}$)による傷害が考えられるが、この動態をリアルタイムに明らかにした報告はない。

2. 研究の目的

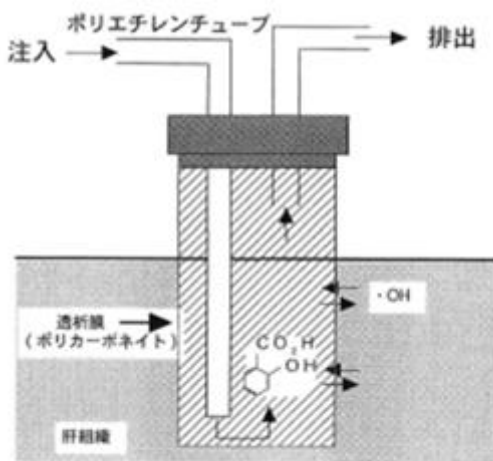
従来の肝におけるフリーラジカル発生に関する研究の多くは、酸化還元反応や酸塩基平衡の緩衝を受けた後の血中や尿中代謝物を測定する研究にとどまっていた。本研究では、肝の虚血再灌流時においてウサギを実験動物に用い、*in vivo*における肝組織内に発生するヒドロキシルラジカル($\cdot\text{OH}$)の動態をリアルタイムに定量し、その意義を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 肝虚血再灌流モデルの作成

10週齢、体重 $2,200 \pm 200\text{g}$ の雄性ウサギ ($n=45$) を 5%ペントバルビタール全身麻酔下に上腹部正中切開にて開腹し、腸管うっ滞を回避するために肝尾状葉枝のみを避ける方法で肝動脈および門脈に阻血用ターニケットをかけ、20分間の温阻血後、ターニケットを解放し、肝虚血再灌流モデルを作成した。

(2) 生体肝組織における Microdialysis



ウサギの肝組織内に CMA/20 プローブ (シ

ャフト 14mm, 膜長 10mm, CMA/Microdialysis 社) を刺入留置した (図 1)。

プローブ内を Microdialysis Pump (Carnegie Medicine CMA/102) にてサリチル酸を $0.5\text{nmol}/\mu\text{l}$ の濃度に含む Ringer 液 ($\text{Na}^+ 147$, $\text{K}^+ 4$, $\text{Ca}^{2+} 5$, $\text{Cl}^- 156\text{mEq}/\text{l}$, $\text{pH} 5.0\sim 7.5$, 浸透圧比約 1, 大塚製薬) を灌流液として、まず $1.5\mu\text{l}/\text{min}$ の速度で 1 時間灌流して、プローブを安定させた。

温阻血解放後は 30 分ごとに 9 時間後まで、この灌流液から $45\mu\text{l}$ を採取して検体とした。また、プローブ周囲に生じた凝血による測定障害を防止するために、ヘパリン (生理食塩水にて $100\text{U}/\text{ml}$ に溶解) を前処置として初回 $200\text{U}/\text{kg}$, その後 1 時間ごとに $100\text{U}/\text{kg}$ を静脈内投与した。

なお、実験中はウサギの安静を保つために 5%ペントバルビタールの静脈内投与を適宜追加した。

(3) ヒドロキシルラジカルの定量

検体 $20\mu\text{l}$ を用いて、ヒドロキシルラジカルの定量を、電気化学検出器 ECD (ESA Coulochem MODEL 5100A, Analytical cell 5010, Guard cell 5020) を装備した高速液体クロマトグラフィーにて、サリチル酸とヒドロキシルラジカルの反応生成物である 2,5-DHBA (dihydroxybenzoic acid) と 2,3-DHBA を測定し、*in vivo*におけるヒドロキシルラジカル産生量を測定した。

分析条件としては、送液ポンプ：島津製作所 LC-10AT, 分離カラム：ODS 120T (東ソー) $150 \times 2.4\text{mm}$ I.D., 送液流速： $1\text{ml}/\text{min}$ を用いて移動相は 1L 中に, heptane sulfonic acid salt 1.5g, Na_2EDTA 0.1g, triethylamine 3ml, acetonitrile 125ml (すべて Wako 純薬) を含みリン酸にて pH を 2.8 に調整したものを使用した。

電気化学検出器の第 1 作用電極を -0.25V に、第 2 作用電極の電圧を $+0.40\text{V}$ に設定した。

ラット肝マイクロゾームを用いて、*in vivo*におけるサリチル酸の代謝産物のうち、2,5-dihydroxybenzoic acid (DHBA) と 2,3-DHBA の代謝比率の測定を行った。

4. 研究成果

(1) ヒドロキシルラジカルの測定結果

2,5-DHBA と 2,3-DHBA の標品を用いた $\cdot\text{OH}$ による反応生成物の検量線は、 2.5pmol から 10pmol までの間、 $r=0.999$ と $r=0.998$ の原点を通る直線を示した。

電気化学検出器の第 1 作用電極を -0.25V , 第 2 作用電極を $+0.40\text{V}$ に設定することで、2,5-DHBA と 2,3-DHBA が電解効率 100% で測定できることを確認した。

直流最中の2,5-DHBAと2,3-DHBAのCV値(coefficient of variation) (n=5)は、2.1%と2.3%で極めて安定して測定できることが判明した。

ラット肝マイクロゾームを用いた検討の結果、2,5-DHBAと2,3-DHBAの比率は94%と6%であった。

(2) 肝虚血再灌流モデルの評価

肝表面における組織血流量を測定した結果、このモデルにおいて阻血処置をした肝は充分虚血に陥っており、虚血解除後も確実に再灌流されていることを確認した。

動脈血pHおよび酸素分圧を測定した結果、経時的に多少ともアシドーシス傾向を示したが、有意な変化ではなかった(図2)。

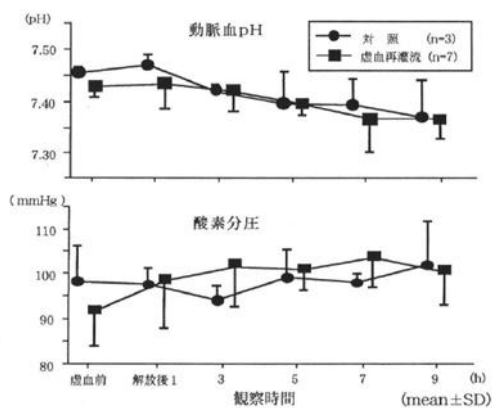


図2 動脈血pHおよび酸素分圧

(3) 肝虚血再灌流障害時におけるヒドロキシルラジカルのリアルタイム定量

肝虚血再灌流障害時におけるヒドロキシルラジカルとNOの測定結果、再灌流後の肝組織内2,5-および2,3-DHBAは、阻血を行わなかった対照群と比較して、再灌流直後と7時間以後有意な上昇を認め(p<0.05), 二相性の上昇を示していた(図3)。

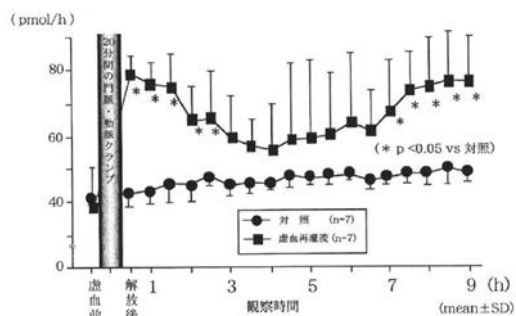


図3 再灌流後の肝組織内DHBA

広範な肝切除や肝移植など肝臓外科手術の領域において、Pringle法を代表とする肝血流遮断法は不可避的な過程である。出血量減少を目的とした肝血流遮断という操作により肝は温虚血障害(warm ischemic injury)

を受け、その後の血流遮断解除による再灌流(reperfusion)は単に虚血状態からの解放と回復だけでなく、局所に存在していた物質の大量流入により、活性酸素の発生などのために直接肝障害を引き起こして、肝微小循環の破綻を来たし、その結果 no-reflow phenomenonと呼ばれる血流障害から二次的な虚血障害に進展し、重篤な場合は肝細胞壊死から肝不全に陥る。

活性酸素の中でも、 $\cdot\text{OH}$ は最も反応性の高いラジカルで、蛋白質や脂質をはじめとする多くの生体分子と速やかに反応する。その反応速度定数は拡散律速に近く、このため $\cdot\text{OH}$ はその局所に存在する生体物質と非特異的に反応する。したがって、一旦、 $\cdot\text{OH}$ が発生すると、それを特異的に除去することはできない。すなわち、 $\cdot\text{OH}$ の生体毒性を軽減するには、その発生自体を抑制することが肝要で、虚血再灌流後の局所生体臓器は、どの時期に、どれだけの $\cdot\text{OH}$ が発生し臓器障害に影響するかを明らかにする必要がある。

今回、*in vivo*で、一定の酸素分圧(大気圧)の条件下におけるウサギ肝虚血再灌流モデルで肝組織内に発生した $\cdot\text{OH}$ 産生の変化を肝 microdialysis法を用いてリアルタイムに経時的に試料を抽出し、aromatic hydroxylationにより生じたDHBAを電気化学検出器によってキャッチした。

その結果、肝虚血再灌流直後に肝組織内 $\cdot\text{OH}$ 産生の急激な増大を認め、その後、一旦低値をとるものの、再灌流後7時間を経過して再び $\cdot\text{OH}$ 産生の漸増を認め、その後も継続して上昇傾向を認め、肝組織内で発生した $\cdot\text{OH}$ の時間的経過は二相性の上昇を示すことが判明した。

虚血再灌流後の活性酸素生成系の1つに hypoxanthine-xanthine oxidase系が知られている。これは、虚血状態の細胞内でATPが過剰消費されたために蓄積した hypoxanthine が再灌流によって供給される大量の酸素と反応し、スーパーオキシド(O_2^-)が生成されるものである。さらにその後 Superoxide dismutase (SOD)によって O_2^- から還元された H_2O_2 は Fe^{2+} の存在下で Fenton 反応により $\cdot\text{OH}$ を発生する。

もう一つの系として好中球による産生系が重要で、再灌流後に細胞接着分子が血管内皮細胞と好中球に出現し、好中球が血管壁に付着すると活性化された好中球は血管壁あるいは血管外に遊走して周囲組織に大量の O_2^- を産生し、同様の機序にて $\cdot\text{OH}$ を発生する。

さらに、肝では Kupffer 細胞由来の O_2^- の影響も存在しており、虚血再灌流後の活性酸素の発生には、時間的に異なったピークが存在する可能性があり、今回の結果における肝虚血再灌流直後の初期相としての $\cdot\text{OH}$ 産生

上昇は時間的な経過から hypoxanthine-xanthine oxidase 系,あるいは Kupffer 細胞由来の $O_2^{\cdot-}$ から生じたものと推測され,再灌流後 7 時間を経過した後期相としての $\cdot OH$ 産生漸増は組織学的にも好中球の浸潤を認め,好中球由来の $O_2^{\cdot-}$ が主となって産生されたものと考えられる.

5. 主な発表論文等

(研究代表者・研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 21 件)

① Uchiyama K, Ueno M, Ozawa S, Kiryama S, Shigekawa Y, Hirono S, Kawai M, Tani M, Yamaue H. Combined Intraoperative Use of Contrast-Enhanced Ultrasonography Imaging using a Sonazoid and Fluorescence Navigation System with Indocyanine Green during an Anatomical Hepatectomy *Langenbecks Arch Surg* 2011 ;396(7):1101-1107.

② Ueno M, Uchiyama K, Ozawa S, Hayami S, Shigekawa Y, Tani M, Yamaue H. Adjuvant Chemolipiodolization Reduces Early Recurrence Derived from Intrahepatic Metastasis of Hepatocellular Carcinoma After Hepatectomy. *Ann Surg Oncol*. 2011; 18(13): 3624-3631.

③ Uchiyama K, Ueno M, Ozawa S, Kiryama S, Kawai M, Hirono S, Tani M, Yamaue H. Risk factors for postoperative infectious complications after hepatectomy. *J Hepatobiliary Pancreat Sci*. 18(1):67-73, 2011
以上すべて査読あり

[学会発表] (計 35 件)

① 内山和久：(特別講演) 肝臓に対する肝切除術の工夫. 第 190 回近畿外科学会, 2011.11.26, 大阪

② 内山和久：(宿題報告) 肝胆膵外科学会プロジェクト研究「肝内胆管癌のリンパ節転移症例の検討」. 第 23 回日本肝胆膵外科学会, 2011.6.9, 東京

[図書] (計 2 件)

① 林 道廣, 内山和久: Medica 出版, 消化器外科 NURSING 2012 春季増刊号, 2012, p10-16

② 内山和久: 文光堂, 肝内結石症の診療ガイド, 2011, p37-43

[その他]

ホームページ(大阪医科大学 一般・消化器外科)

<http://www.Osaka-med.ac.jp/deps/sur/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

内山 和久 (Uchiyama Kazuhisa)
大阪医科大学・医学部・教授
研究者番号: 80232867

(2) 研究分担者

山上 裕機 (Yamaue Hiroki)
和歌山県立医科大学・医学部・教授
研究者番号: 20191190

上野 昌樹 (Ueno Masaki)
和歌山県立医科大学・医学部・助教
研究者番号: 90405465