

虚血再還流の膵に及ぼす影響

京都大学医学部外科学教室第1講座

田村耕一郎, 真辺 忠夫, 戸部 隆吉

[原稿受付:平成3年6月24日]

Effect of Short-Term-Ischemia and Reperfusion on the Rat Pancreas

KOICHIRO, TAMURA, TADAO, MANABE and TAKAYOSHI, TOBE

The 1st Department of Surgery, Faculty of Medicine, Kyoto University, Kyoto, JAPAN.

In order to examine the toxic effects on the pancreas of oxygen free radicals which are generated at reperfusion after ischemia, a short term-ischemia/reperfusion model was prepared in rats. Both the anterior mesenteric artery and the celiac artery were ligated and then released to restore blood flow. In a group where the anterior mesenteric and the celiac arteries were ligated for 60 minutes, the serum levels of amylase and lipase rose 7 and 6 times, respectively, 7 hours after reperfusion. In a group ligated for 30 minutes, both levels remained unchanged. Histologically, vacuolization of the pancreatic acinar cells was observed, only in a group rats ischemic for 7 hours. In rats ligated for 60 minutes with a continuous venous infusion of superoxide dismutase (SOD) (3600 U/Kg/hour), the secretion of amylase and lipase decreased to 25 percent of that in the non-injected group. These results confirm that the oxygen free radicals, which are generated by the short term-ischemia/reperfusion method, injure the pancreas. This may lead to pancreatitis with hyperamylasemia and hyperlipasemia. Pretreatment with an active oxygen scavenger, SOD, markedly reduces the rise in serum amylase and lipase levels. This suggests that active oxygen free radicals are involved in the pathogenesis of acute pancreatitis.

I. 緒 言

心・肺・脳・腎等の臓器に虚血病巣が生じた時、その組織は虚血により障害更には壊死に至るため、血行再開が要求される。しかし、血行再開後、組織エネルギー代謝が更に障害されることが報告されている¹⁻⁶⁾。虚血により細胞のエネルギー状態を示す ATP 濃度が低下したところに、更に再還流によるフリーラジカル

生成により ATP 再合成能の回復が阻害され臓器障害の増悪を促進することによると考えられている。以上の臓器同様、Sanfey⁷⁻¹⁰⁾以来急性膵炎にもフリーラジカルが関与することが指摘されてきた。膵の虚血再還流モデルでは、再還流後短時間では膵組織に浮腫は認めるも高アミラーゼ高リパーゼ血症は呈していない¹¹⁾。一方、虚血再還流モデルでは、再還流開始後、時間経てフリーラジカルが生成されることが示されている⁵⁾。

Key words: Acute pancreatitis, Free radical, Ischemia and reperfusion, Free radical scavengers.

索引語: 急性膵炎, フリーラジカル, 虚血再還流, フリーラジカル消去剤.

Present address: First Department of Surgery, Faculty of Medicine, Kyoto University, 59 Shogoin, Kawara-cho, Sakyo-ku, Kyoto 606.

又、脳虚血再還流実験で、再還流後、血流量の一過性 overshoot (initial hyperemia) により脂質過酸化物が生成されていることも指摘されている⁹⁾。本研究では、ラットを用い脾支配血管である前腸間膜動脈及び腹腔動脈を結紮再開放することにより脾虚血再還流モデルを作成し脾組織への影響を検討するとともに、スーパーオキシド消去剤であるスーパーオキシドディスムターゼ (SOD) を投与しその効果についても併せて検討した。

I. 材料および方法

1. 虚血再還流モデルの作製

体重 170~230 g の Sprague-Dawley 系雄性ラットを一夜絶食後、ペントバルビタール (50 mg/kg) の腹腔内麻酔下で、一側の外頸動脈にポリエチレンカテーテル (PE-50) を挿入し、薬剤投与及び輸液路とした。ついで、開腹し、前腸間膜動脈 (AMA) 及び腹腔動脈 (CA) を露出し、以下の5群にわけてモデルを作製した。

I 群 (sham-operation, N=7) : AMA 及び CA を露出後 (Time 0), 閉腹する。

II 群 (N=8) : AMA 及び CA を露出後、絹糸にて結紮し血流遮断後 (Time 0), 閉腹する。

III 群 (N=8) : AMA 及び CA を露出後、絹糸をかけた一定張力による血流遮断後閉腹し、30分後 (Time 0) 絹糸を除去し、血流を再還流する。

IV 群 (N=7) : AMA 及び CA を露出後、III 群と同様の方法で血流遮断後閉腹し、1時間の血流遮断後 (Time 0) 絹糸を除去し、血流を再還流する。

V 群 (N=7) : 外頸静脈に挿入したカテーテルよりスーパーオキシドディスムターゼ (SOD, 3600 U/kg/hour, 日本化薬製) を持続静注し、30分後に IV 群と同様に、AMA 及び CA を露出後、一定の張力をかけた絹糸による血流遮断後、閉腹し、1時間の血流遮断後 (Time 0) 絹糸を除去し血流を再還流する。

以上5群とも、前値を含め経時的に尾血管よりヘパリン採血し、遠心分離し -70°C で冷凍保存し、血清酵素の測定に用いた。7時間後に脱血屠殺し、脾を摘出し、一定部位を脾乾湿重量比測定及び病理組織標本作製に供した。血流遮断時間の決定は、胃粘膜病変を観察して行った¹⁴⁾。すなわち、AMA 又は CA のどちらか一方の結紮再開放では、30分までの血流遮断後再還流を行っても何ら病変を認めなかったため、二本の血管の同時結紮再開放を行った。30分までの血流遮断後では、胃粘膜に極軽度の発赤を認めるにとどまり、1

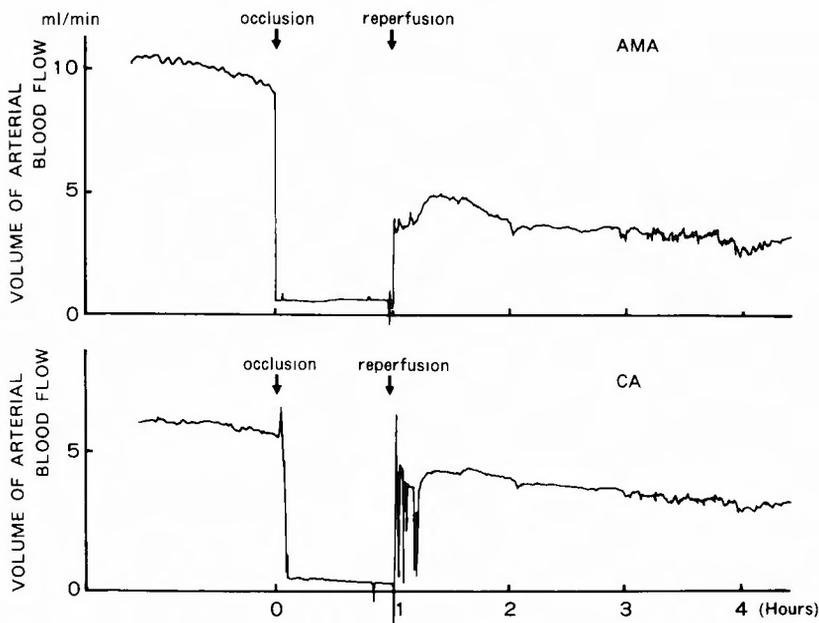


Fig. 1 Changes of volume of blood flow in celiac and anterior mesenteric arteries in rats in response to 1 hour of occlusion and reperfusion.

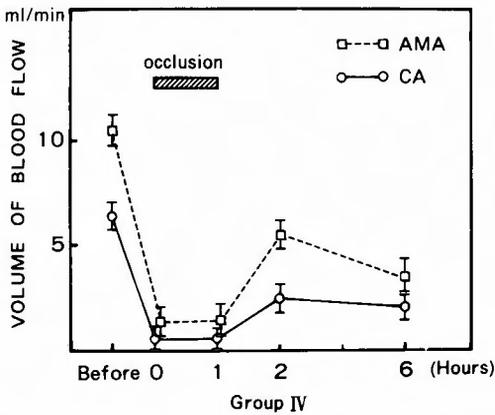
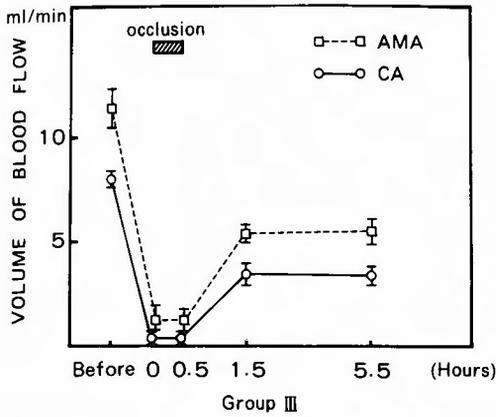


Fig. 2 Changes of volume of blood flow in celiac and anterior mesenteric arteries in rats in response to 30 or 60 minutes of occlusion and reperfusion. Mean \pm SEM. n=5.

時間に延長して著明な発赤及び潰瘍を認めたため、IV、V群を設定した。

2. 測定項目

(i) 前腸間膜動脈及び腹腔動脈の血流量

電磁血流量計 (モデル MFV-3100, 日本光電製, 日本) を用い, 結紮再開放による AMA 及び CA の血流量変化を測定した。プローブは, AMA には 1 mm 用, CA には 1.5 mm 用を用い動脈根部に設置して連続的に記録した。

(ii) 脾組織の乾湿重量比及び病理組織像

実験終了時である 7 時間後に脱血後摘出した脾の一定部位を採取し, 直ちに, 湿重量を電子天びん (Chyo Balance Co., 日本) で計測した。その後, 70°C の乾燥中に 72 時間静置し, 乾重量を計測し, その比により浮腫の程度を示した。また, 他の一定部位を採取

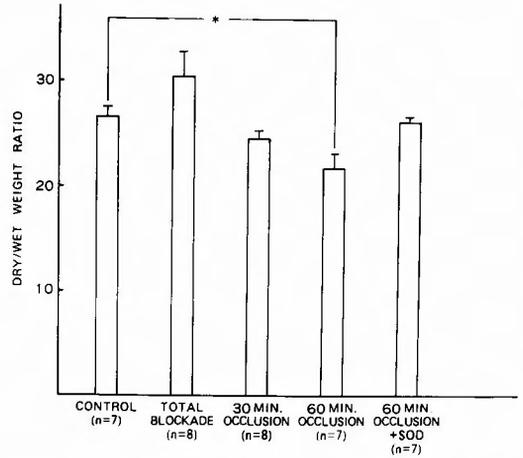


Fig. 3 Pancreatic dry to wet weight ratio 7 hours after reperfusion. Data are shown as mean \pm SEM. Control: sham-operation (only exposure of the celiac artery (CA) and the anterior mesenteric artery (AMA)); total blockade: blocking of the blood flow in the CA and AMA during this experiment; 30 minutes of occlusion: blocking the blood flow in the CA and AMA for 30 minutes; 60 minutes occlusion: blocking the blood flow in the CA and AMA for 60 minutes; 60 minutes occlusion plus SOD: continuous infusion of superoxide dismutase (SOD) with blocking of the blood flow in the CA and AMA for 60 minutes. *p < 0.01 vs control.

し HE 染色による病理組織標本を作成し次の 5 項目について, 5 段階評価を行った。

- (1) 浮腫
- (2) 炎症細胞浸潤
- (3) 空胞変性
- (4) 出血
- (5) 壊死

(iii) 血清アミラーゼ値及びリパーゼ値の経時変化

前述の如くストックしておいた血清を解凍後, アミラーゼはアミラーゼ A テストシオノギ (シオノギ, 日本) を用いたブルースターチ法¹²⁾ にて, リパーゼは Lipase Kits (大日本製薬, 日本) を用いた BALB-DTNB 法¹³⁾ にて測定した。

3. 統計処理

得られたデータは, Mean \pm S.D. にて表現し Student's t-test を用いて行い, 危険率 5% 以下を有意差ありと判定した。

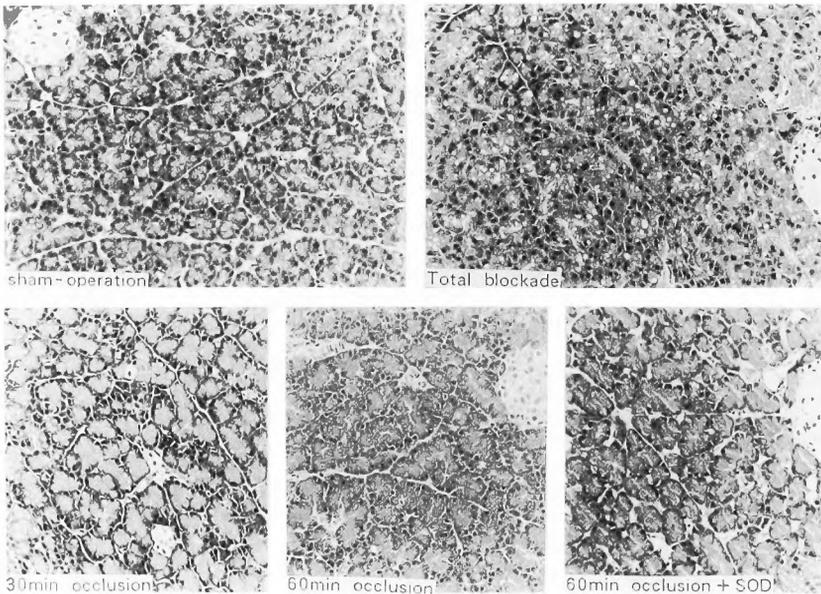


Fig. 4 Histological appearance of pancreas 7 hours after reperfusion (hematoxylin-eosin: Origin magnification $\times 100$). Details are as in Fig. 3.

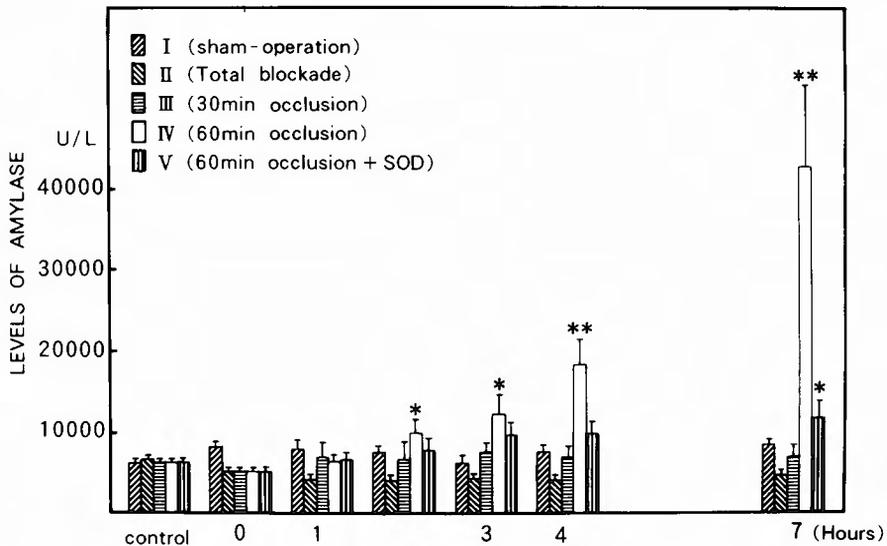


Fig. 5 Changes of serum amylase levels in response to occlusion and reperfusion of the CA and AMA. Mean \pm SEM. * $p < 0.01$ vs control. ** $p < 0.001$ vs control. Details are as in Fig. 3.

4. 結果

(i) 前腸間膜動脈及び腹腔動脈の血流量
 コントロール群である I 群では、全期間を通じ、AMA, CA は各々 11.3 ± 1.0 ml/min, 6.3 ± 0.7 ml/min

を示した。結紮維持群の II 群では、AMA, CA は各々 1.0 ± 1.0 ml/min, 0.3 ± 0.3 ml/min を示し、全例生存した。III, IV, V 群では、AMA, CA は結紮前は I 群30分又は1時間の結紮中は II 群と同じ血流量を示し、再

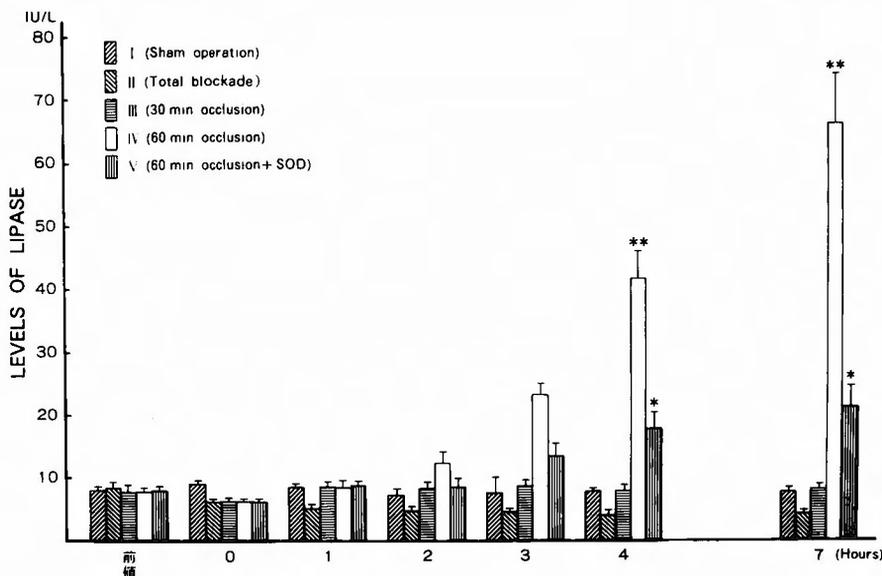


Fig. 6 Changes of serum lipase levels in response to occlusion and reperfusion of the CA and AMA. Mean \pm SEM. * $p < 0.01$ vs control. ** $p < 0.001$ vs control. Details are as in Fig. 3.

開放により 7.5 ± 1.0 ml/min, 4.0 ± 1.0 ml/min に増加した。経時的には減少傾向がみられたが、前期間を通じ、前値の50%の血流量は維持された。(Figs. 1, 2)

(ii) 脾組織の乾湿重量比

コントロール群は27%であるが、III, IV群では、23%, 24%で浮腫が生じていることを示している。V群はコントロール群を有意差を認めない。II群は30%で増加を示した。(Fig. 3)

(iii) 脾病理組織像

実験終了時に屠殺し、200倍の HE 染色光顕像である。II群で、腺房細胞に著明な空胞変性を認める。III, IV, V群はコントロール群との差を認めなかった。

(Fig. 4)

(iv) 血清アミラーゼ値及びリパーゼ値の経時変化

アミラーゼ値は、前値 7150 ± 515 IU/L で、コントロール群では全期間有意な変化は認めないが、II群では、経時的に減少し、終了時には 4010 ± 300 IU/L と有意差を認めた。III群は、再開放直前の Time 0 ではII群同様、 5300 ± 300 IU/L で、I群と有意差を認めたが、再還流後、しだいに増加し実験終了時にはI群との差を認めなかった。IV群もIII群同様、再開放直前の Time 0 で、 5300 ± 300 IU/L で有意差を認めた。再還流後、急に増加し、実験終了時には前値の約7倍の 48000 ± 13000 IU/L に増加した。V群では Time 0

で、III, IV群同様有意に減少した。再開放後、しだいに増加するもののIV群の約25%の 11000 ± 2000 IU/L にとどまり、SOD の持続投与による高アミラーゼ血症の有意な抑制を認めた。(Fig. 5)

リパーゼ値は、アミラーゼ値と同様の変化を示した。つまり、コントロール群で 10 ± 1 IU/L を示し、II群では、終了時に 6 IU/L まで低下した。III, IV, V群とも Time 0 では 7 IU/L に低下したが、経時的には、III群は前値に後し、IV群は約6倍の 65 ± 10 IU/L に増加した。しかし、SOD 投与したV群は、終了時に 15 ± 3 IU/L と有意に抑制が認められた。(Fig. 6)

5. 考察

虚血は、エネルギー代謝において、解糖系亢進による乳酸をはじめとする最終代謝産物の増加が細胞内 pH を低下させ細胞機能障害をひきおこす¹⁵⁾。更に、(1) ATP は xanthine oxidase の基質となる hypoxanthine あるいは xanthine (X) 分解される¹⁶⁾、(2) カテコールアミンの遊離が増大する¹⁷⁾、(3) cyclooxygenase 系の活性化¹⁸⁾ (4) xanthine dehydrogenase (X.D.) が血管内皮細胞内で xanthine oxidase (X.O.) に変換される¹⁹⁾、ことが知られている。低酸素条件でのこれらの代謝は、(1) xanthine と xanthine oxidase の反応、(2) カテコールアミンの自動酸化、および prostaglandine $G_2 \rightarrow$ prostaglandine H_2 変換

反応などを介してフリーラジカル ($\cdot O_2^-$, $\cdot OH$, H_2O_2) を多量に産生する²⁰⁾。こうして虚血時に産生されたフリーラジカルが細胞障害性を示すことは一般に認められている。更に、再還流により、虚血血管床に酸素分子が供給されると、突発的なフリーラジカル産生により、細胞機能の回復がみられないばかりか、逆に機能低下が促進され、非可逆的な障害へと進展することが、胃¹⁴⁾、腹管²¹⁾、肝²²⁾、心²³⁾、脳²⁴⁾などの臓器で示されている。

予備実験において、腹腔動脈または前腸間膜動脈のみの30分又は1時間の虚血再還流実験では胃粘膜病変は生じなかった。更に、血清アマラーゼ値及びリパーゼ値の変化も脾病理組織にも変化を認めなかった。血管結紮による虚血再還流モデルでは、諸家が報告している如く、局所においてフリーラジカルの生成がおこっていると考えられるが、上記の条件では、各々の動脈にカニューレションした時に認められる血液の back flow で示されるように側副血行により組織としては虚血再還流状態に陥っていないためと考えられる。

然るに、腹腔動脈及び前腸間膜動脈を同時に結紮再開放すると、30分及び1時間の虚血時間の条件下で、虚血時間依存的に胃に、著明なびらん、潰瘍、出血を認めた。脾においても、本条件で虚血再還流状態が達成されていることより、組織障害をおこしうる量のフリーラジカルが生成しうると考え、本実験の至適条件とした。

本研究では、脾の虚血再還流モデルを作製し、(1) 30分又は1時間の血流遮断により、乾湿重量比から検討すると、軽度の浮腫は惹起されており、SOD 投与で全く浮腫が消失してしまうこと、(2) 1時間の血流遮断により、著明な高アマラーゼ高リパーゼ血症を呈し、SOD 投与により抑制が認められることを示した。本モデルにより、急性脾炎が発症し、活性酸素種消去剤の1つである SOD により抑制できることが示され、脾においても虚血再還流でフリーラジカルが生成し、それが脾障害の原因の1つに考えられた。

References

- 1) Rehncrona S, Folbergrová, J, Smith DS, Siesjö BK: Influence of complete and pronounced in complete cerebral ischemia and subsequent recirculation in cortical concentrations of oxidized and reduced glutathione in the rat. *J. Neurochem* 34: 477, 1980.
- 2) Marubayashi S, Dohi K, Kamasaki T: Adenine nucleotide metabolism during hepatic ischemia and subsequent blood reflow periods and its relation to organ viability. *Transplantation* 30: 294, 1980.
- 3) Tatsukawa Y, Dohi K, Yamada K, Kamasaki T: The role of CoQ₁₀ for the preservation of the rat kidney. *Life Sci* 24: 1309, 1979.
- 4) Tate RM, Repine JE: Phagocytes, oxygen radicals and lung injury. In: Pryor WA, Ed. *Free Radicals in Biology*. New York: Academic Press, 1984; 6: Pp. 199-209.
- 5) Cooper AJL, Pulsinelli WA, Duffy TE: Glutathione and ascorbate during ischemia and postischemic reperfusion in rat brain. *J. Neurochem* 35: 1242, 1980.
- 6) Yoshida S, Inoh S, Asano T: Effect of transient ischemia on free fatty acids and phospholipids in the gerbil brain. *J. Neurosurg* 53: 323, 1980.
- 7) Sanfey H, Bulkley GB, Cameron JL: The role of oxygen-derived free radicals in the pathogenesis of acute pancreatitis. *Ann. Surg.* 200: 405, 1984.
- 8) Sasfey H, Bulkley GB, Cameron JL: The pathogenesis of acute pancreatitis. The source and role of oxygen-derived free radicals in three different experiment models. *Ann. Surg.* 201: 633, 1985.
- 9) Karen SG, Donald EM, Keith TO: Superoxide dismutase and catalase: a possible role in established pancreatitis. *Am. J. Surg.* 151: 163, 1986.
- 10) Rutledge PL, Saluja AK, Powers RE, Steer ML: Role of oxygen-derived free radicals in diet-induced hemorrhagic pancreatitis in mice. *Gastroenterology* 93: 41, 1987.
- 11) Sokolowski A, Spormann H, Urbahn H, Letko G: Contribution of pancreatic edema and short-term ischemia to experimental acute pancreatitis in the rat. *Z. exp. Chir. Transplant. Kunstl. Organe* 19 (Heft 6): 323, 1986.
- 12) Ceska M, Birath K, Brown B: A new and rapid method for the clinical determination of α -amylase activities in human serum and urine. *Clin. Chem. Acta* 26: 437, 1969.
- 13) Bergmeyer HU, Bernt E: Empfehlungen der Deutschen Gesellschaft für Klinische chemie. *Z. Klin Chem Klin Biochem* 10: 182, 1972.
- 14) Itoh M, Guth P: Role of oxygen-derived free radicals in hemorrhagic shock-induced gastric lesions in the rat. *Gastroenterology* 88: 1162, 1985.
- 15) Katz AM: Effect of ischemia on the contractile processes of heart muscle. *Am. J. Cardiol.* 32: 456, 1973.
- 16) Granger DN, Rutili G, McCord JM: Superoxide radicals in feline intestinal ischemia. *Gastroenterology* 81: 22, 1981.
- 17) Schomig A: Release of endogenous catecholamines

- in the ischemic myocardium of the rat. *Circ. Res.* 55: 689, 1984.
- 18) Okabe E: Inhibition by free radical scavengers and by cyclooxygenase inhibitors of the effect of acidosis on calcium transport by masseter muscle sarcoplasmic reticulum. *Biochem. Pharmacol.* 34: 961, 1985.
- 19) McCard JM: Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury. *N. Engl. J. Med.* 312: 159, 1985.
- 20) Granger DN, Hollwarth ME, Parks DA: Ischemia-reperfusion injury: Role of oxygen-derived free radicals. *Acta. Physiol. Scand. (Suppl)* 548: 47, 1986.
- 21) Granger, DN, McCord JM, Parks DA: Xanthine oxidase inhibitors attenuate ischemia-induced vascular permeability changes in the cat intestine. *Gastroenterology* 90: 80, 1986.
- 22) Adkison D, Hollwarth ME, Benoit JN, Parks DA: Role of free radicals in ischemic-reperfusion injury to the liver. *Acta. Physiol. Scand. (Suppl)* 548: 101, 1986.
- 23) Hearse DJ: Abrupt reoxygenation of the anoxic potassium-arrested perfused rat heart: a study of myocardial enzyme release. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 5: 395, 1973.
- 24) Kogure K, Watson BD, Busto R, Abe K: Potentiation of lipid peroxides by ischemia in rat brain. *Neurochem. Res.* 7: 437, 1982.