

体外循環中の血漿及び赤血球過酸化脂質についての検討

滋賀医科大学外科学第2講座（指導：岡田慶夫教授）

田畑 良宏，森 渥視，中村 良雄，渡辺 和朗，尾上 雅彦
高橋憲太郎，山中 晃，加藤 弘文，岡田 慶夫

〔原稿受付：昭和60年11月8日〕

Studies on the Concentration of Lipid Peroxide in Plasma and Erythrocytes during Cardiopulmonary Bypass

RYOKO TABATA, ATSUMI MORI, YOSHIO NAKAMURA, KAZUO WATANABE,
MASAHICO ONOE, KENTARO TAKAHASHI, AKIRA YAMANAKA.
HIROFUMI KATO and YOSHIO OKADA

The Second Department of Surgery, Shiga University of Medical Science
(Director: Prof. Dr. Yoshio Okada)

We attempted to alleviate the toxic effect of a high concentration of oxygen during cardiopulmonary bypass (CPB) by measuring the lipid peroxide concentration in plasma and erythrocyte in clinical cases. The plasma concentrations of the lipid peroxide were decreased during CPB and then recovered to the initial values after two hours of CPB. On the other hand, the lipid peroxide concentrations of erythrocyte were not significantly changed. But the positive correlation was existed between the age and the levels of lipid peroxide of plasma and erythrocyte. Thus it is concluded that the toxic effects of lipid peroxide during CPB were hardly recognized except the older patients.

序 論

宇宙飛行や高圧酸素治療等における知見から高濃度酸素は生体に対する毒性，とりわけ血液に対しては溶血作用を呈し，貧血をきたす事が知られるようになった¹⁾。一方，体外循環においては，溶血が重要な合併症の一つとしてみられ，その原因の解明と対策とが望まれている。前述の高濃度酸素の毒性を考えると，体外循環における溶血にも高濃度酸素の関与が推定される。

高濃度酸素による溶血は過酸化脂質が形成され，それによって赤血球膜が破壊されるためであるとされている²⁾。そこで，著者らは臨床例において体外循環中の赤血球及び血漿の過酸化脂質濃度の変動について検討した。

対 象 と 方 法

1. 症 例

対象とした臨床例は表1の通りである。これらは昭

Key words: Cardiopulmonary bypass, Hyperoxia, Hemolysis, Lipid-peroxide, Aging.

索引語：体外循環，高濃度酸素，溶血，過酸化脂質，加齢。

Present address: The Second Department of Surgery, Shiga University of Medical Science, Seta, Otsu City, Shiga, Japan 520-21.

表1 対象臨床症例の詳細

●総数	16例	
●性別 男	12例	
女	4例	
●使用人工肺 膜型肺 (TMO)	6例	
気泡型肺 (BOS)	10例	
	分布	平均
●年齢 (才)	1.7~65	28.7±25.7
●総体外循環時間 (分)	62~324	119.3±78.8
●術前ヘマトクリット (%)	32~46	39.2±4.3
●灌流血ヘマトクリット (%)	18~28	23.8±3.8
●体外循環2時間後の ヘマトクリット (%)	25~41	33.5±4.7
●灌流血温 (°C)	19.5~30.0	24.2±4.1
●灌流血酸素分圧 (mmHg)	233~691	444.8±148.1

和58年7月より昭和59年1月までの間に滋賀医科大学第2外科にて開心術を行った症例の一部である。男12例、女4例の合計16例で、症例の年齢は1.7才から、65才に及び、平均28.7±25.7才である。

人工心は SARNs Model 5000 を、回路は日本メディカル、サプライ社製を使用した。1回転 29ml で、完全体外循環時には成人で 2.4 l/min/m²、小児で 2.6~2.8 l/min/m² の灌流血量を維持した。人工肺は Travenol 社製膜型肺 (成人は LPM-2000、小児は小児用 TMO 肺)、又は気泡型肺 (Bentley 社製 BOS-5 及び BOS-10) を使用した。

体外循環中には、成人ではヘマトクリット (Ht) を 25% に、血清総蛋白量 (TP) を 4.0 g/dl に、また小児では Ht を 30% に、TP を 5.0 g/dl に維持するように努めた。また、血液希釈には KN-4A (大塚製薬) 及び plasmanate を用い、利尿剤としてマニトールを 2.5 ml/kg の割合で混入した。

総体外循環時間は62~324分、平均119.3±78.8分、術前 Ht は平均39.2±4.3%から灌流血 Ht は23.8±3.8%まで希釈され、体外循環終了2時間後には輸血及び利尿剤により Ht 33.5±4.7%まで回復している。体外循環中の最低灌流血温は 24.2±4.1°C であった。

体外循環中は30分毎に血液ガス分析及び血漿電解質測定を行い、酸素流量、酸塩基平衡、及び電解質の補正を行ったが、灌流血の酸素分圧は 233~691 mmHg、平均 444.8±148.1 mmHg であった。

血液の採取は術前、体外循環開始直後、体外循環中は20分間隔、体外循環終了時及びその2時間後に行っ

た。

2. 血漿過酸化脂質濃度

過酸化脂質濃度の測定はチオ・バンビツール酸法により測定した³⁾。標準物質としてはテトラ・エトキシ・プロパンを使用し、既知量を反応させ、532 nm の吸光度の比較により絶対濃度を算出し、マロン・デ・アルデヒドの濃度とし n mol/ml で表示した。

3. 赤血球過酸化脂質濃度

赤血球過酸化脂質の測定に当っては、全血を遠心分離し、血液成分の内、上層に集まる白血球、血小板の層を十分に取り除いた赤血球層を採取し、これを生理的食塩水で3回洗浄した後に分析に供した。過酸化脂質濃度はチオ・バルビツール酸法により Buege らの方法で測定した⁴⁾。同時にチオ・バンビツール酸法で測定する際の溶液のヘモグロビン (Hb) 濃度をツァン・メト・ヘモグロビン法により測定し⁵⁾、過酸化脂質濃度はヘモグロビン 1 g 当りのマロン・デ・アルデヒドの濃度とし、n mol/g Hb で表示した。

結 果

1. 血漿過酸化脂質濃度

術前の血漿過酸化脂質濃度は 1.5 n mol/ml から、4.5 n mol/ml の範囲にあった。この値は図1に示す如く、年齢と相関しており、相関係数0.86で高令となるほど血漿過酸化脂質濃度が増加している事が明らかとなった。

体外循環中の血漿過酸化脂質濃度の経時的変化は術

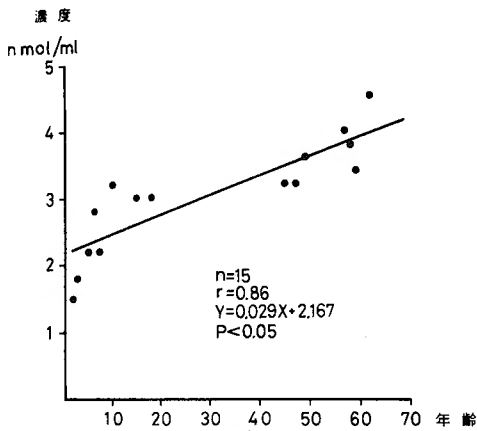


図1 血漿過酸化脂質濃度と年齢との関係

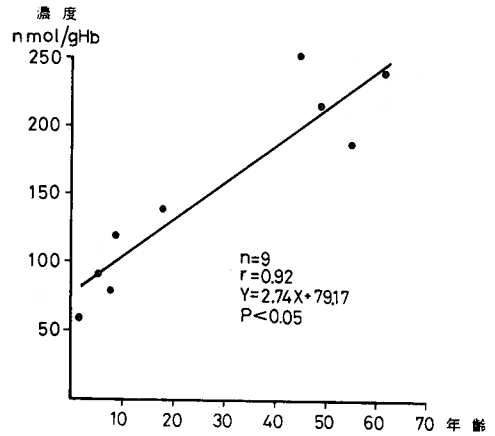


図3 赤血球過酸化脂質濃度と年齢との関係

前の値が年齢の影響を受けるために、術前の値を100%とし、これに対する比率で表示した。結果は図2の如くで体外循環開始直後に術前に比べて有意に過酸化脂質濃度は $78.7 \pm 14.8\%$ まで低下がみられる。その後も過酸化脂質濃度は低下の傾向にあり、2時間後に $57.0 \pm 22.1\%$ まで低下するが、有意な変化ではない。そして、体外循環終了時に比べ終了2時間後には過酸化脂質濃度は有意に増加しており、この時点で術前値の $96.2 \pm 23.3\%$ に回復する。

2. 赤血球過酸化脂質濃度

術前の赤血球過酸化脂質濃度は 59 nmol/g Hb から 254 nmol/g Hb の範囲であった。この値は図3に示す如く、年齢と相関しており相関係数 0.92 で高令と

なるほど赤血球過酸化脂質濃度が増加している事が明らかとなった。

体外循環中の赤血球過酸化脂質濃度の経時的変化は、術前の値が年齢の影響を受けるため、術前の値を100%としこれに対する比率で表示した。結果は図4の如くで、体外循環開始とともに過酸化脂質濃度は若干低下する傾向がみられ、2時間後には $78.7 \pm 20.9\%$ まで低下するが、いずれも有意な変化ではない。終了時及び終了2時間後では、やや上昇傾向にあり、術前値の $114.3 \pm 32.7\%$ となるが、やはり有意な上昇ではない。しかし、術前値に比較するとやや高値である。

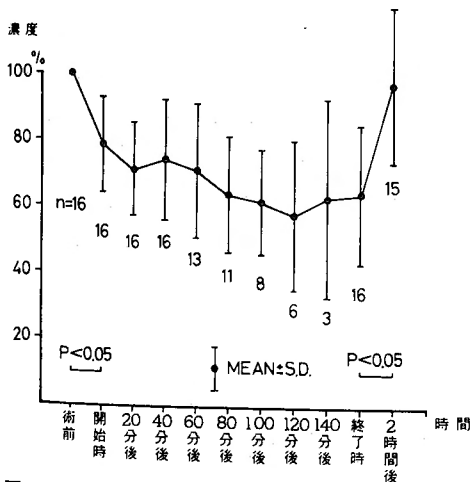


図2 体外循環中の血漿過酸化脂質濃度の経時変化

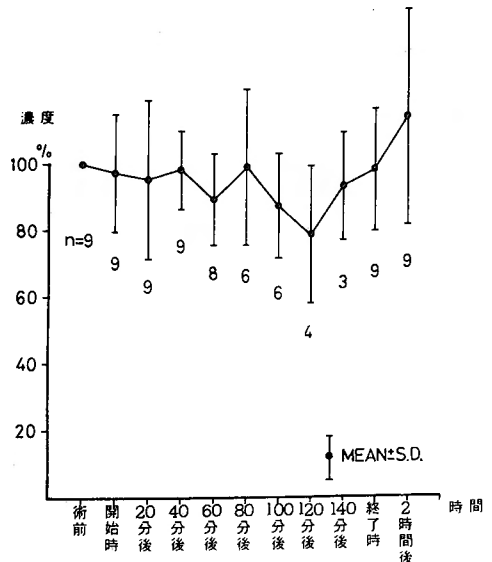


図4 体外循環中の赤血球過酸化脂質濃度の経時変化

考 察

生体では酸化的磷酸化によって酸化エネルギーを高エネルギー磷酸の ATP に変換し、このエネルギーを利用して生命を維持している⁶⁾。この細胞エネルギー産生場であるミトコンドリアの電子伝達系において、酸素が水まで還元されるには4個の電子が必要である。そしてこの場合一個ずつの反応が段階的に行われ、中間体として、一重項酸素(O_2^-)遊離水酸基($\cdot OH$)や過酸化水素(H_2O_2)が発生する⁷⁾。これらの中間体は反応性に富み、生物系に取ってはむしろ有害であり、活性酸素と総称されている。活性酸素はまた電離放射線や光、金属の触媒作用、ヘモグロビンによっても酸素より発生するといわれている⁸⁾。

活性酸素は、一方では白血球の殺菌作用、放射線障害、脂質の酸化、抗癌剤の細胞傷害作用等にも関与している⁹⁾。

特に、細胞膜に対しては活性酸素はその脂質、特に燐脂質の脂肪酸の不飽和結合の部分に作用し、過酸化脂質を形成する。高濃度酸素による溶血は、過酸化脂質による赤血球膜の破壊が原因とされている¹⁰⁾。したがって生物にとり、酸素は不可欠な要素であるが、不必要に高濃度の酸素はむしろ有害であるといわねばならない。

表1にもみられるように、体外循環中の血中酸素分圧は異常に高値をとる。しかし、本研究によれば、体外循環中の血漿過酸化脂質は予想に反して、体外循環前より低下することが明らかにされた。また、赤血球過酸化脂質濃度についてみると、術前と体外循環中とはほとんど有意な差はみられず、終了2時間後では、体外循環中に比べて有意ではないが若干、上昇傾向がみられた。

以上から、体外循環中は血中酸素分圧が平均 444.8 mmHg と著明に上昇しても、赤血球過酸化脂質濃度は、ほとんど影響をうけないことが判る。

血漿過酸化脂質は、体外循環中にはむしろ、低下する傾向さえみられた。

これらの原因としては稀釈体外循環の効果が大きいと思われる。すなわち、体外循環開始直後に血漿過酸化脂質濃度が急激に減少するのは循環回路に充填した液により血液が急速に稀釈される為であろう。これは Ht 値から計算した稀釈率との関係からも裏付けられる。また、体外循環終了後に血漿過酸化脂質濃度が急速に上昇するのは、利尿剤投与と輸血によって血液

が濃縮される結果であろう。

一般に、化学反応は $10^\circ C$ の温度低下で反応速度は半分になると云われる⁶⁾。通常、体外循環は中等度低体温下に行なわれるので、低温下で活性酸素の発生が抑制されることも推定される。

更に生体には活性酸素に対する防禦機構が発達していて、その代表的なものとしては superoxide dismutase (SOD) があげられる。これは1969年 McCord と Fridorich¹¹⁾ により発見された酵素で、不均化反応(dis-mutation)により活性酸素($\cdot O_2^-$)を消失せしめる作用を有し、細菌¹²⁾やラット¹³⁾を高圧酸素下におくと $\cdot O_2^-$ に反応して SOD の誘導合成がみられるという。臓器別にみると Peeters¹⁴⁾ は血液は、肝臓、副腎、腎臓について SOD の比活性が高いことを示している。これは血液が酸素運搬と云う使命を有し、高濃度酸素に接する機会が多いことに対する一種の防禦機構であろう。血液の SOD の濃度は $\cdot O_2^-$ の定常濃度をはるかに凌駕し、数倍あるとも云われ¹⁵⁾、我々の実験で赤血球過酸化脂質濃度が予想外に低値であった原因は、豊富な SOD による影響かと考えられる。

活性酸素には Scavenger (除去剤)として、その傷害作用を防禦する薬物が多数知られており、マントールもその一つとして知られている¹⁶⁾。我々は体外循環中には利尿剤として、これを常に 2.5 ml/kg の濃度で混入しており、このことも活性酸素($\cdot OH$)の抑制に作用していると思われる。

要するに、体外循環中の高濃度酸素下では活性酸素の影響を考慮しなければならないが、稀釈や低温等の条件や各種の防禦機構や Scavenger の存在等により過酸化脂質の生成は微量に抑えられ、溶血にはほとんど影響を及ぼさないものと思われる。

Vitamine E は抗酸化剤として $\cdot O_2^-$ の連鎖反応を阻止し、脂質の過酸化を抑制する作用を持っている¹⁷⁾。また、同剤は燐脂質が膜を形成する場合、不飽和二重結合を持つ脂肪酸鎖との相互作用により膜を安定化し、不飽和脂肪酸に対する活性酸素の攻撃を防いでいる。したがって Vitamine E 不足の状態では赤血球膜は高圧酸素に対し鋭敏であり、容易に溶血を起す事が立証されている¹⁸⁾。このような点から、Vitamine E 不足のような病的状態では、高濃度酸素による溶血の促進には十分注意を払わねばならず、このような症例の体外循環には慎重を要するものと思われる。

人類は絶えず酸素と光、化学物質、放射線等との反応から発生する活性酸素によって、その障害作用に曝

されていると云われる。Harman¹⁸⁾は放射線生物学の立場から遊離基説をとね、内的・外的要因で生じた遊離基活性酸素による障害が蓄積して人類の寿命を短縮させると考えている。そしてこの活性酸素による障害は、細胞の生体膜中に存在する脂質の過酸化によって過酸化脂質が生成され、これが障害作用をおよぼすと考えられている。

前述のように、加齢とともに血中の過酸化脂質は増加するが、これも同様の機序によるものと考えられる。血液以外でも、脳や睪丸、肝臓等¹⁹⁾で過酸化脂質濃度が加齢とともに増加することが知られている。Reissら²⁰⁾は生後6ヶ月と2ヶ月のラットについて、肝臓中の細胞質 SOD の失活速度を比較し、年長のものの方が失活速度が早いことを見出した。また、彼等はラット肝臓の組織 SOD の比活性も加齢とともに低下することを確かめている。

以上の所見から赤血球及び血漿の過酸化脂質濃度が年齢とともに増加するのは、これらにおける SOD 活性が加齢とともに低下するためであろうと考えられる。

Walls ら²¹⁾は同一症例の赤血球にも新旧種々の赤血球が含まれており、アルブミン勾配法で分離し調べると古い赤血球は・OH に対する抵抗性が弱く・OH や H₂O₂ で容易に溶血をきたすと報告している。また、古い赤血球は変形能が低下し、filtability が低下しており、容易に脾臓でとらえられ、破壊されると報告している。これは古い赤血球の SOD の活性低下や過酸化脂質の増加等により赤血球の脆弱性が促進されるためであろう。したがって過酸化脂質濃度の高い高齢者の血液は・OH 等の活性酸素により溶血しやすく、又赤血球寿命も短いものと推察される。

近年、高齢者に対しても開心術が積極的に行なわれようになったが²²⁾、前述のような理由で、これら症例では体外循環による溶血について、特に注意を払うべきである。一方、高齢者では術前から栄養状態が不良なものや、腎機能が低下しているものが多く、溶血による腎機能不全の招来についても十分配慮する必要がある。このような連鎖反応を予防するには、SOD の活性低下に対しては抗過酸化作用を有する Vitamine E を投与し膜の安定化をはかることも一つの対策であろう。石岡ら²³⁾によればラットに Vitamin E の食餌性補充を行なうと、血清の Vitamine E 値はほとんど影響されないが、血小板、赤血球等の血球成分、特に赤血球中の Vitamine E のレベルは著明に増加するという。したがって、特に高齢者において体外循環を施

行するに先立って、溶血防止の目的で Vitamine E を投与することも十分意義あるものと考えられる。

結 語

- 1) 高濃度酸素下で体外循環を施行する場合にみられる血漿及び赤血球に対する活性酸素の影響について検討した。当科における体外循環施行例中16例を対象とし、過酸化脂質を指標として活性酸素の変動を推定した。
- 2) 高濃度酸素下での体外循環においても、血漿及び赤血球の過酸化脂質濃度の増加はみられず、むしろ体外循環中は減少する傾向がみられた。
- 3) 年齢と血漿及び赤血球過酸化脂質濃度との間には、正の相関関係がみられた。高齢者におけるこの所見は、加齢による SOD 活性低下に由来すると考えられる。
- 4) 高齢者の赤血球は脆弱性が高く、寿命も短かいので、体外循環に際してはとくにこの点に留意する必要がある。SOD 活性低下に対し Vitamine E 投与等も考慮すべきであろう。

稿を終えるにあたり測定に際し多大なる御協力を頂いた山崎 香嬢に深く感謝いたします。

また、本論文の要旨は第84回日本外科学会総会(1984年、3月31日、京都)にて発表した。

文 献

- 1) Mengel CE, Kann HE Jr, et al: Effects of in vitro hyperoxia on erythrocytes. II. Hemolysis in a human after exposure to oxygen under high pressure. *Blood* **25**: 822-829, 1965.
- 2) Mengel CE, Kann HE Jr: Effects on in vivo hyperoxia on erythrocytes. III. In vivo peroxidation of erythrocytes lipid. *J Clin Invest* **45**: 1150-1158, 1966.
- 3) 八木国夫: 過酸化脂質の測定. *臨床検査* **23**: 115-120, 1979.
- 4) Buege JA, Aust SD: Microsomal lipid peroxidation. *Method in enzymology* **52**: 302-310, 1969.
- 5) Eilers RJ: Notification of final adaption of an international method and standard solution for hemoglobinometry specifications for preparation of standard solution. *Am J Clin Pathol* **47**: 212-214, 1967.
- 6) White A, Handler P, et al: Principles of biochemistry. 5th edition, Tokyo, McGraw-Hill Kogakusha, Ltd., 1983.
- 7) 浅田浩二: 活性酸素の生物に対する作用. *代謝* **15**: 1277-1285, 1978.
- 8) 浅田浩二: 酸素毒性. *生化学* **48**: 226-257, 1976.

- 9) 大柳善彦: スーパーオキシドと医学. 東京, 共立出版株式会社, 1981.
- 10) Stocks J, Offerman EL, et al: The susceptibility to autoxidation of human red cell lipids in health and disease. *Brit J Haemat* **23**: 713-724, 1972.
- 11) McCord JM, Fridorich I: Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocuprein (Hemocuprein). *J Biol Chem* **224**: 6049-6055, 1969.
- 12) Gregory EM, Fridorich I: Induction of superoxide dismutase by molecular oxygen. *J Bacteriol* **114**: 543-548, 1973.
- 13) Crapo JD, Tierney DF: Superoxide dismutase and pulmonary oxygen toxicity. *Am J Physiol* **226**: 1401-1407, 1974.
- 14) Peeters-Joris C, Vandevooede A, et al: Subcellular localization of superoxide dismutase in rat liver. *Biochem J* **150**: 31-39, 1975.
- 15) 小林陽之助, 白井明包: Superoxide dismutase の臨床的意義: 一赤血球, 白血球, 肺の SOD 活性を中心に. 代謝 **15**: 1297-1306, 1978.
- 16) Nathan CF, Silverstein SG, et al: Extracellular cytolysis by activated macrophages and granulocytes. *J Exp Med* **149**: 100-113, 1979.
- 17) 福沢健治: 細胞下レベルにおけるビタミンEの作用. 一生物膜の構造と機能に対する作用を中心として. ビタミン **50**: 19-31, 1976.
- 18) Harman D: A theory based on free radical and radiation chemistry. *J Geontol* **11**: 298-300, 1956.
- 19) 平井俊策: 老化と活性酸素. 代謝 **15**: 1329-1335, 1978.
- 20) Reiss U, Gershon D: Comparison of cytoplasmic superoxide dismutase in liver, heart and brain of aging rats and mice. *Biochem Biophys Res Commun* **73**: 255-262, 1976.
- 21) Walls R, Kumar KS, et al: Aging of human erythrocytes. Differential sensitivity of young and old erythrocytes to hemolysis induced by peroxide in the presence of thyroxine. *Arch Biochem Biophys* **174**: 463-468, 1976.
- 22) 鈴木隆三, 外山雅章, 他: 70才以上の高齢者に対する冠動脈疾患及び合併症の検討. 日胸外会誌 **32**: 1499, 1984.
- 23) 石岡達司, 木村郁郎, 他: 食餌性ビタミンEは血清よりも血球中のビタミンEに影響を与える. *Medical Tribune* **18**: 13, 1985.