小腸阻血解除後の粘膜障害発生機序とperfluorochemical（PFC）乳剤を用いた小腸内腔灌流保存に関する実験的研究

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 小野田, 秀樹 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/8164

小腸阻血解除後の粘膜障害発生機序と perfluorochemical (PFC) 乳剤を用いた小腸内腔灌流保存に関する実験的研究

金沢大学医学部外科学第二講座（主任：宮崎逸夫教授）
小野田　秀樹

(平成2年1月5日受付)

活性酸素産生源の一経路であるキサンチンオキシダーゼ系の変化から，阻血解除後の小腸粘膜の再灌流障害発生の機序と酸素化 perfluorochemical (PFC) 乳剤による小腸内腔灌流保存の有用性を検討した．イヌの空腸を60分間阻血し阻血を解除した群 (阻血群)，阻血中に酸素化 PFC 乳剤を空腸内腔に灌流した群 (阻血＋PFC 灌流群) と阻血中に酸素化した PFC を含まない液を空腸内腔に灌流した群 (阻血＋PFC(－) 液灌流群) で阻血解除後の粘膜組織中の adenosine triphosphate (ATP), adenosine diphosphate(ADP), adenosine monophosphate (AMP)，ヒポキサンチン，キサンチン，尿酸を測定した．また組織学的な変化，水分吸収量の変動を調べた．阻血解除後60分までに ATP は阻血群では阻血前より有意に低下したのに対して，阻血＋PFC 灌流群ではその低下は軽度であり両群間に有意差を認めた．総アデニンヌクレオチド (total adenine nucleotides, TAN) やエネルギー充足率も同様の変化を示した．ヒポキサンチン，キサンチン，尿酸は阻血群では阻血解除後いずれも有意に上昇したのに対して，阻血＋PFC 灌流群ではいずれも上昇せずおのおの両群間に有意差を認めた．組織学的には阻血群では絨毛先端で上皮細胞の脱落と炎症細胞浸潤を認めたのに対して，阻血＋PFC 灌流群では変化を認めなかった．水分吸収量は阻血群では阻血前の－7％まで低下したのに対して，阻血＋PFC 灌流群では阻血前の46％の低下であり，両群間に有意差を認めた．阻血＋PFC 灌流群では灌流液の流入部でも流出部でも ATP が保持されたのに対して，阻血＋PFC (－) 液灌流群では灌流液の流出部では ATP が保持されなかった．以上より，小腸の阻血と再灌流により，ATP から ADP, AMP, ヒポキサンチン，キサンチンを経て尿酸に至る反応が進行することが確認され，活性酸素によって粘膜が形態的，機能的に障害されることが示唆され，また，酸素化 PFC 乳剤による小腸内腔灌流保存の有用性が示された．

Key words small intestine, reperfusion injury, xanthine oxidase, perfluorochemical, intraluminal perfusion

しばしば致命的な機転をとる急性上腸間膜動脈閉塞症の十分な治療法はいまだに確立されていない[1]．また最近の膵癌手術や食道癌手術などにおいて小腸の血行再建が施行される機会が増え[2][3]，さらに小腸移植の臨床応用が検討されている[4]．

小腸の血行再建や移植の際に実施される阻血と再灌流の後には組織障害が発生する．その原因として活性酸素が重要であることが，キサンチンオキシダーゼの阻害剤であるアロプリノール[5]かあるいは活性酸素を消去するスーパーオキサイドディスムターゼ (superoxide dismutase, SOD) など[5][6]の投与による病変抑制の面からすでに明らかにされている．しかし活性酸素の産生源であるキサンチンオキシダーゼ系の変化は十分には解明されていない．

ADP, adenosine diphosphate; AMP, adenosine monophosphate; ATP, adenosine triphosphate; HPLC, high performance liquid chromatography; NADPH oxidase, reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase; PEG 4000, polyethylene glycol

また，小腸の阻血と再灌流による組織障害を予防するために，阻血中に小腸内腔から酸素を投与する種種の方法が試みられてきた[7~13]．それらは形態学的組織障害の軽減や阻血解除後の死亡率の低下から評価されているが，細胞機能の変化は未だ不明である．

そこで，キサンチンオキシダーゼ系の基質と生成物であるヒポキサンチン，キサンチン，尿酸を小腸阻血解除後の粘膜組織において定量し，小腸阻血解除後の粘膜障害発生の機序の解明を試みた．また，阻血中に高い酸素溶解能を持つ perfluorochemical (PFC) 乳剤[14]を酸素化して小腸内腔を灌流する方法を試み，主に細胞呼吸と吸収機能の点から PFC 乳剤による小腸内腔灌流法を検討し，小腸保存法としての有用性を調べた．

材料および方法

Ⅰ．実験動物

体重 10～13kg のオスの雑種の成熟イヌを用い，実験開始前24時間は絶食とし，水分のみを与えた．

Ⅱ．小腸阻血と再灌流法

酸素，笑気，エンフルレンによる全身麻酔下に開腹し，トライツ靱帯より 30cm から 60cm の部分の空腸を腸管，腸間膜を切離して遊離した．つぎに遊離した部分空腸を支配するすべての動静脈を同時に血管鉗子にて挟み，温阻血を施行した．60分間の温阻血の後，鉗子をはずし阻血を解除し，血流を再開した．

Ⅲ．小腸内腔の灌流方法

灌流液には PFC 乳剤[14]の FC-43 emulsion (ミドリ十字，大阪) に添加液を加え表1に示す組成に調製したものか，あるいは PFC(－) 液として表1に示す組成から perfluorotributylamine のみを除いたものを用いた．この灌流液 2l を，3l/分の流量の純酸素でバブリングし，37°Cの温水槽に通した後，ローラーポンプの MBP-107 メラ血液ポンプ (泉工医科工業，東京) を用いて 50ml/分の速度で，部分空腸内腔に循環させた．小腸内腔の灌流は阻血開始15分前より阻血を解除するまで行なった (図1)．

Ⅳ．実験群

温阻血と再灌流のみを行なう群を阻血群とし，温阻血中に酸素化 PFC 乳剤を部分空腸内腔に灌流する群を阻血＋PFC 灌流群とし，温阻血中に酸素化した

Table 1. Composition of PFC emulsion

Perfluorotributylamine	20.0 w/v %
Hydroxyethyl starch	3.00 w/v %
Polyoxypropylene-polyoxyethylene copolymer	2.56 w/v %
NaCl	0.600 w/v %
$NaHCO_3$	0.210 w/v %
Glucose	0.180 w/v %
KCl	0.034 w/v %
$CaCl_2$	0.028 w/v %
$MgCl_2$	0.020 w/v %

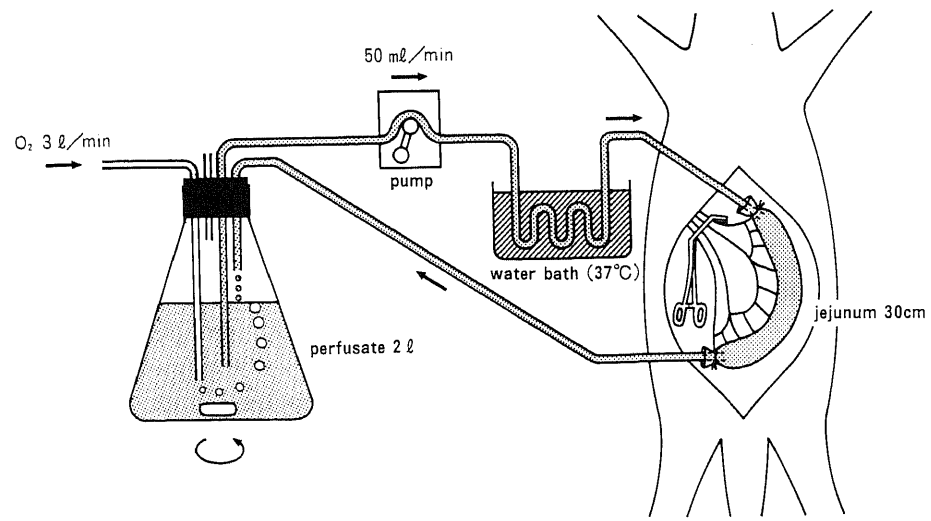


Fig. 1. Schematic diagram of intraluminal intestine perfusion system.

4000 ; PFC, perfluorochemical ; SH group, sulfhydryl group ; SOD, superoxide dismutase ; TAN, total adenine nucleotides ; TCA, trichloric acid

PFC (−) 液を部分空腸内腔に灌流する群を阻血＋PFC (−) 液灌流群とした．

V．アデニンヌクレオチド代謝と組織学的変化の検討

阻血前，阻血解除後1分，15分，30分，60分に部分空腸の一分節を遊離した．血流を遮断せずに腸間膜付着部の反対側で長軸方向に切開した後，直ちに小腸粘膜をスライドグラスにて掻把し，液体窒素により瞬間凍結した．スライドグラスによる掻把開始より凍結終了まで3秒以内であった．なお掻把組織片の光学顕微鏡の観察では95%以上が絨毛由来であった．

凍結試料は24時間凍結乾燥を施し，乾燥試料とした．その乾燥小腸粘膜試料の重量を測定し，冷却した5%トリクロロ酢酸 (trichloric acid, TCA) (和光，大阪) を加え，直ちに攪拌した．これを4℃で30分間抽出した後15600g にて5分間冷却遠心した．その上清に0.5M のトリ-n-オクチルアミン (和光) を含む冷却した 1,1,2-トリクロロトリフルオロエタン (和光) を加えて攪拌し，再び15600g にて5分間冷却遠心した後，上清を高速液体クロマトグラフィー (high performance liquid chromatography, HPLC) の試料に供した[15]．

TCA 抽出液中のアデニンヌクレオチドの分析にはポンプ，カラム，ディテクターにそれぞれ HLC-803D (東洋ソーダ，東京), Partisil 5 SAX (Whatman 社，Maidstone，英国), UV-8 model II (東洋ソーダ) を表2に示す条件により使用した．チャート上のピーク面積よりそれぞれ乾燥重量 1g に占める adenosine triphosphate (ATP), adenosine diphosphate (ADP), adenosine monophosphate (AMP) 含量を算定した．ATP, ADP, AMP の総和を総アデニンヌクレオチド (total adenine nucleotides, TAN) とし，細胞のエネルギー状態の指標であるエネルギー充足率[16]は

$$\frac{[ATP] + 0.5\,[ADP]}{[ATP] + [ADP] + [AMP]}$$

の式により算定した．

一方 TCA 抽出液中のヒポキサンチン，キサンチン，尿酸の分析にはポンプ，カラム，ディテクターにそれぞれ LC-6A (島津，京都), Shim-pack CLC-ODS (島津), SPD-6AV (島津) を使用した．入山ら[17]の方法に準じ，表2に示す条件により分離させた後，ヒポキサンチン，キサンチンは吸光度 250nm で，尿酸は吸光度 290nm で測定した．チャート上のピーク面積よりそれぞれ乾燥重量 1g に占めるヒポキサンチン，キサンチン，尿酸含量を算定した．

また阻血前と阻血解除後60分に部分空腸の一部を採取し，HE 染色標本にて組織学的変化を検討した．

VI．水分吸収量の測定

まず Krebs-Ringer 重炭酸塩緩衝液[18]に生理的非吸収分子であるポリエチレングリコール4000 (polyethylene glycol 4000, PEG 4000) (和光) を 0.1w/v% で加えた溶液を作成した．この溶液を，阻血前と阻血解除後に遊離した部分空腸の口側に挿入したカテーテルから，輸液ポンプのテルフュージョン STC-503 (テルモ，東京) により1分間に 3.6ml の流量で，37℃の温水槽に通した後注入し，肛門側に挿入したカテーテルから流出させ部分空腸内腔を灌流した．灌流を30分間行ない定常状態とした後，5分毎に10回肛門側のカテーテルからの流出液を採取した[19]．阻血解除後は解除後30分から110分まで灌流を行ない，解除後60分から110分までの流出液を5分毎に10回採取した．流出液中の PEG 4000 の分析にポンプ，カラム，ディテク

Table 2. Assay condition of HPLC

	ATP ADP AMP	Hypoxanthine Xanthine	Uric acid
Flow pump	HLC-803D (Toyo soda)	LC-6A (Shimadzu)	
Column	Partisil 5 SAX; 4.5×110mm (Whatman)	Shim-pack CLC-ODS; 6.0×150mm (Shimadzu)	
Column temperature	Ambient	Ambient	
Ultraviolet absorption detector	UV-8 model II (Toyo soda)	SPD-6AV (Shimadzu)	
Detector condition	270nm	250 nm	290 nm
Mobile phase	0 min − 0.01 M KH_2PO_4/H_3PO_4 pH 4.0 ↓ linear gradient 25 min, 40 min, 60 min: 0.4 M KH_2PO_4/H_3PO_4 pH 3.25 → 0.4 M H_3PO_4	0.2 M KH_2PO_4/H_3PO_4 pH 2.45	
Flow rate	1.0 ml/min	1.0 ml/min	

ターにそれぞれ LC-6A (島津), TSK-GEL G2500PW (東ソー, 東京), RID-6A (島津) を使用した. 表3に示す条件により分離させた後, 示差屈折計にて測定した. チャート上のピーク面積より流出液 1ml 中の PEG 4000 の濃度を算定した. 算定された流出液中の PEG 4000 の濃度に基づき, 遊離した部分空腸からの水分吸収量を Hubel[20] に準じて計算した.

Ⅶ. 小腸口側 (流入部) と肛門側 (流出部) の比較

阻血前と阻血解除後1分に遊離した部分空腸の口側 (灌流液流入部) と肛門側 (灌流液流出部) の両方で, 小腸粘膜を採取し, 乾燥重量 1g に占める ATP 含量を求めた.

Ⅷ. 統計処理

測定値は平均値±標準偏差で表現し, Student の t 検定により危険率5%以下を統計学的に有意差ありとした.

成 績

Ⅰ. アデニンヌクレオチド代謝と組織学的変化

1. 粘膜組織中 ATP の変動

粘膜組織中 ATP は阻血群では阻血前には8.0±0.6 μmol/g dry weight であったが, 60分間の温阻血の後には, 阻血解除後1分に1.8±0.5 μmol/g dry weight と有意に低下した. それ以後回復を認めず, 阻血解除後60分には2.9±1.4 μmol/g dry weight であった. これに対して, 阻血+PFC 灌流群では阻血

Table 3. Assay condition of HPLC

	PEG 4000
Flow pump	LC-6A (Shimadzu)
Column	TSK-GEL G2500PW; 7.5×300 mm (Tosoh)
Column temperature	Ambient
Detector	RID-6A (Shimadzu)
Detector condition	Differential refractive index against 0.1 M NaCl
Mobile phase	0.1 M NaCl
Flow rate	1.0 ml/min

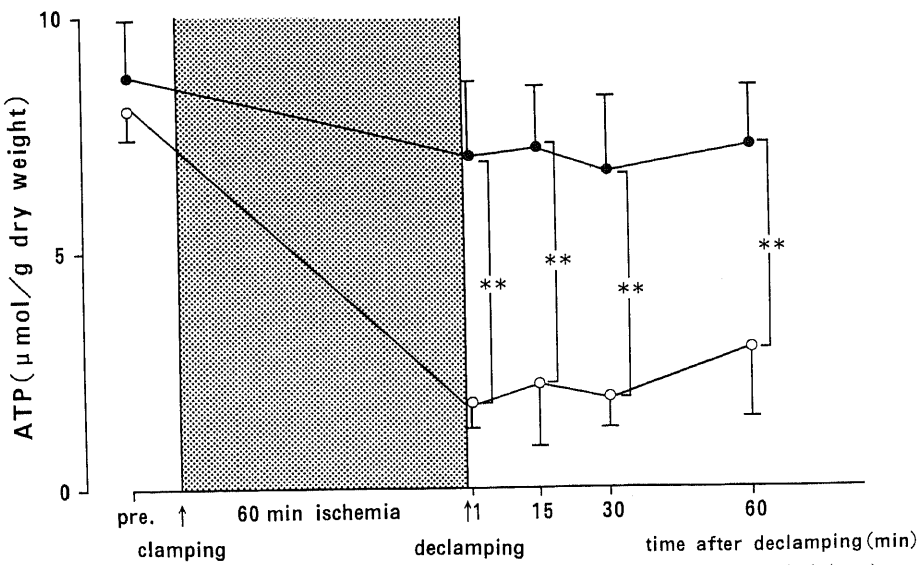


Fig. 2. Changes in ATP contents in intestinal mucosa at untreated period (pre.), 1, 15, 30 and 60 min after declamping. Each point represents the mean±S. D. ○——○, intestines subjected 60 min's ischemia and reperfusion (ischemia group,5 dogs); ●——●, intestines intraluminally perfused with oxygenated PFC emulsion during 60 min's ischemia (ischemia+PFC perfusion group, 5 dogs). *, $P<0.01$ between the two groups.

前には8.9±1.4μmol/g dry weight であり，60分間の温阻血の後でも，阻血解除後1分に7.0±1.6μmol/g dry weight と有意な低下を示さなかった．阻血解除後60分にも7.2±1.3μmol/g dry weight と高値を維持した．両群間には阻血前には有意差を認めなかったが，阻血解除後1，15，30，60分の全てで有意差を認めた (図2)．

2．粘膜組織中総アデニンヌクレオチドの変動

粘膜組織中総アデニンヌクレオチドは阻血群では阻血前には14.5±1.1μmol/g dry weight であったが，

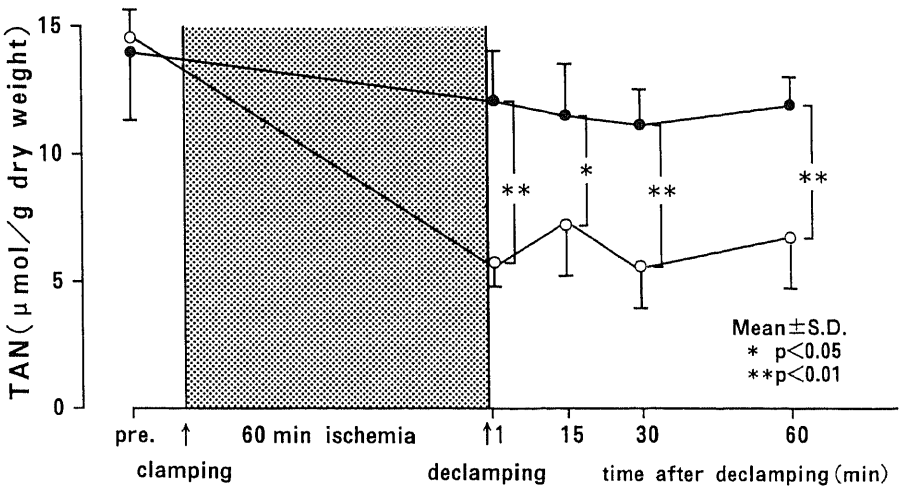


Fig. 3. Changes in TAN contents in intestinal mucosa at untreated period (pre.), 1, 15, 30 and 60 min after declamping. Each point represents the mean±S. D. ○——○, ischemia group (5 dogs); ●——●, ischemia+PFC perfusion group (5 dogs). *, $p<0.05$; **, $p<0.01$ between the two groups.

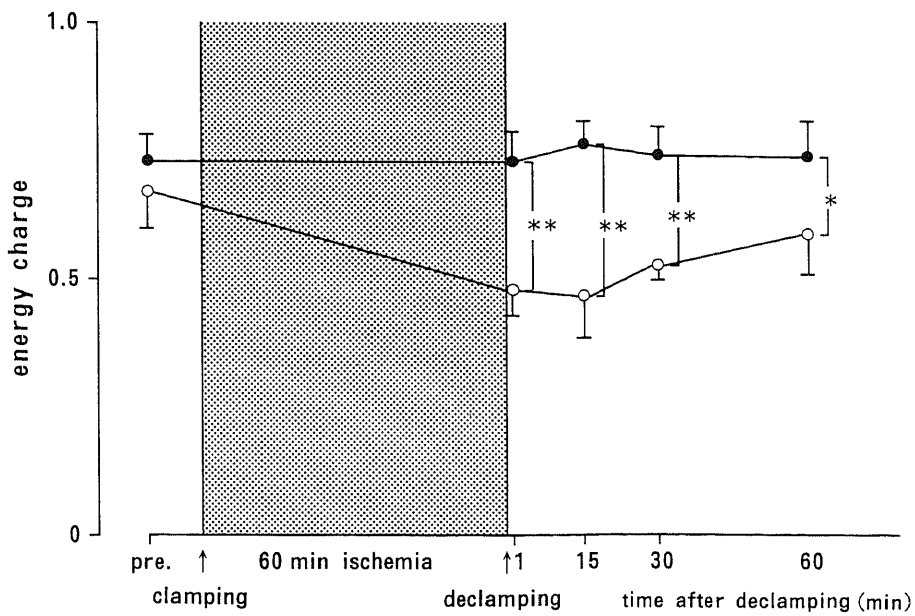


Fig. 4. Changes in energy charge in intestinal mucosa at untreated period(pre.), 1, 15, 30 and 60 min after declamping. Each point represents the mean±S. D. ○——○, ischemia group (5 dogs); ●——●, ischemia+PFC perfusion group (5 dogs). *, $p<0.05$; **, $p<0.01$ between the two groups.

60分間の温阻血の後には，阻血解除後1分に5.7±0.9 μmol/g dry weight と有意に低下した．それ以後回復を示さず，阻血解除後60分には6.7±2.0 μmol/g dry weight であった．これに対して，阻血＋PFC 灌流群では阻血前の14.0±2.7 μmol/g dry weight から，60分間の温阻血の後でも，阻血解除後1分に12.1±1.9 μmol/g dry weight と有意な低下を示さなかった．阻血解除後60分にも11.9±1.1 μmol/g dry weight と高値を維持した．両群間には阻血前には有意差を認めなかったが，阻血解除後1，15，30，60分の全てで有意差を認めた (図3)．

3．粘膜組織中エネルギー充足率の変動

粘膜組織中エネルギー充足率は阻血群では阻血前には0.67±0.07であったが，60分間の温阻血の後には，阻血解除後1分に0.48±0.05と有意に低下した．それ以後阻血解除後60分には0.59±0.08と回復した．これに対して，阻血＋PFC 灌流群では阻血前の0.73±0.05から，60分間の温阻血の後でも，阻血解除後1分に0.73±0.06と低下しなかった．阻血解除後60分にも0.74±0.07と変動を示さなかった．両群間には阻血前には有意差を認めなかったが，阻血解除後1，15，30，60分の全てで有意差を認めた (図4)．

4．粘膜組織中ヒポキサンチンの変動

粘膜組織中ヒポキサンチンは阻血群では阻血前には0.86±0.48 μmol/g dry weight であったが，阻血解除後上昇し阻血解除後30分に1.58±0.28 μmol/g dry weight とピークを示した後低下した．これに対して，阻血＋PFC 灌流群では阻血前の0.77±0.17 μmol/g dry weight から，阻血解除後も上昇せず阻血解除後30分にも0.85±0.20 μmol/g dry weight と低値を示した．両群間には阻血前には有意差を認めなかったが，阻血解除後30分で有意差を認めた (図5)．

5．粘膜組織中キサンチンの変動

粘膜組織中キサンチンは阻血群では阻血前には0.55±0.24 μmol/g dry weight であったが，阻血解除後1分には1.08±0.44 μmol/g dry weight と有意に上昇した．その後は低下し，阻血解除後60分には阻血前値に復した．これに対して，阻血＋PFC 灌流群では阻血前の0.39±0.04 μmol/g dry weight から，阻血解除後1分にも0.37±0.10 μmol/g dry weight と上昇せず，その後も低値を示した．両群間には阻血前には有意差を認めなかったが，阻血解除後1分と30分で有意差を認めた (図6)．

6．粘膜組織中尿酸の変動

粘膜組織中尿酸は阻血群では阻血前の0.32±0.14 μmol/g dry weight から，阻血解除後1分には2.19±0.22 μmol/g dry weight と有意に上昇し，その後も高値を維持した．これに対して，阻血＋PFC 灌流

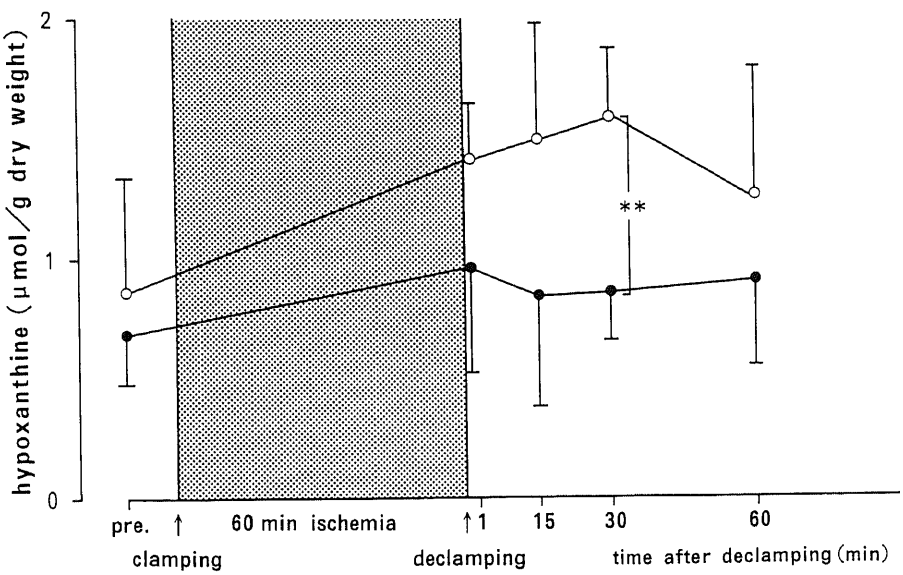


Fig. 5. Changes in hypoxanthine contents in intestinal mucosa at untreated period (pre.), 1, 15, 30 and 60 min after declamping. Each point represents the mean±S. D. ○——○, ischemia group (5 dogs); ●——●, ischemia+PFC perfusion group (5 dogs). **, $p<0.01$ between the two groups.

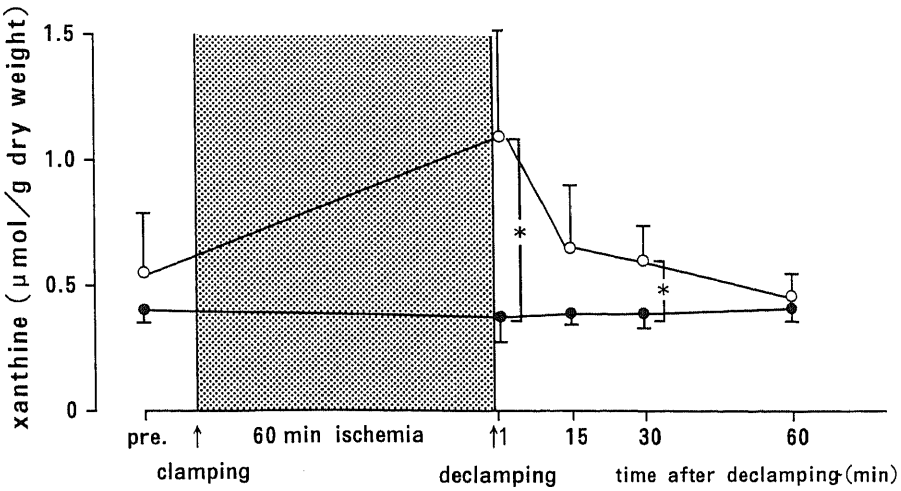


Fig. 6. Changes in xanthine contents in intestinal mucosa at untreated period (pre.), 1, 15, 30 and 60 min after declamping. Each point represents the mean±S. D. ○——○, ischemia group (5 dogs); ●——●, ischemia+PFC perfusion group (5 dogs). *, $P<0.05$ between the two groups.

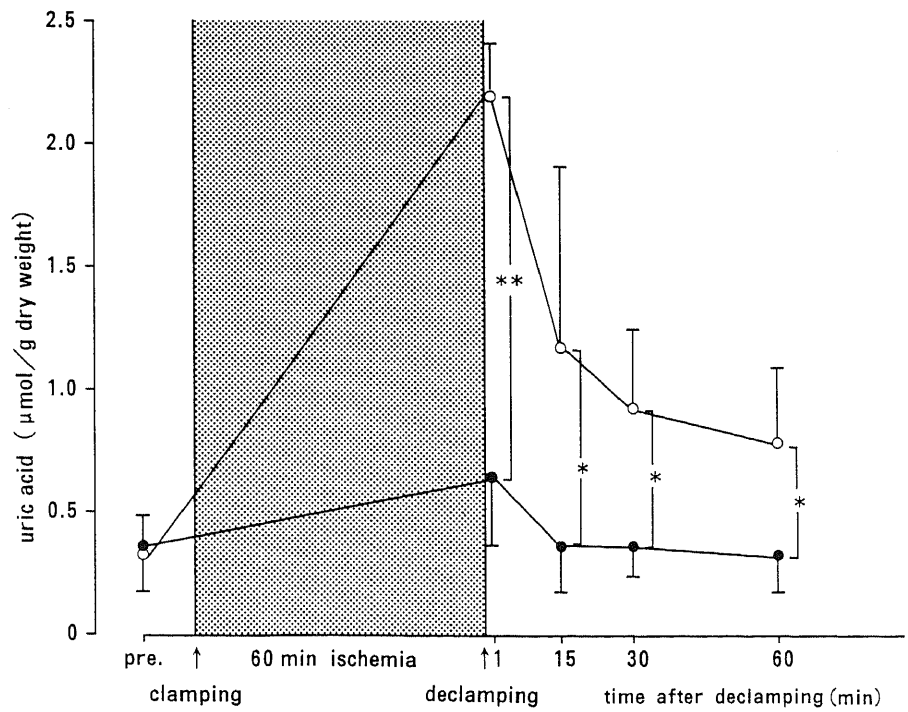
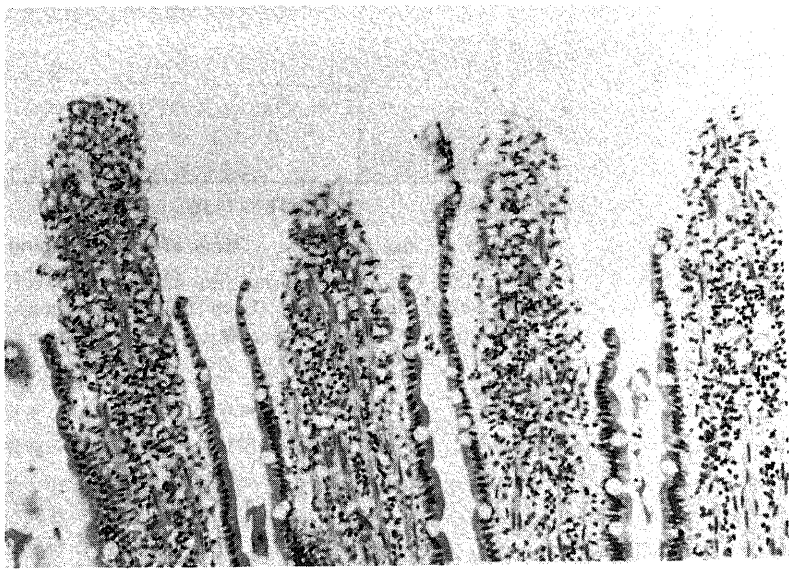


Fig. 7. Changes in uric acid contents in intestinal mucosa at untreated period (pre.), 1, 15, 30 and 60 min after declamping. Each point represents the mean±S. D. ○——○, ischemia group (5 dogs); ●——●, ischemia+PFC perfusion group (5 dogs). *, $p<0.05$; **, $p<0.01$ between the two groups.

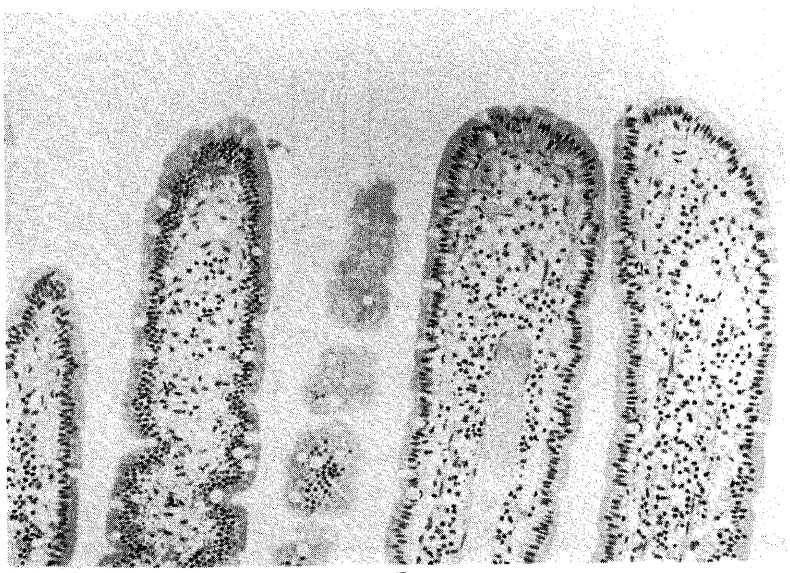
群では阻血前の 0.36±0.13μ mol/g dry weight から，阻血解除後1分にも 0.63±0.26μ mol/g dry weight と有意な上昇を示さず，その後も低値を維持した．両群間には阻血前には有意差を認めなかったが，阻血解除後1，15，30，60分の全てで有意差を認めた (図7)．

7．組織学的変化の検討

遊離した空腸の組織像を阻血解除後60分に両群で比較すると，阻血群では全例絨毛先端で上皮細胞の脱落と炎症細胞浸潤を認めた (図8-A)．これに対して，阻血＋PFC 灌流群では上皮細胞の脱落や炎症細胞浸潤は認められなかった (図8-B)．



A



B

Fig. 8. Histological findings of the intestinal mucosa at 60 min after declamping. (A), ischemia group shows desquamation of the epithelium from the villus tips and inflammatory cell infiltration (HE stain, ×50). (B), ischemia+PFC perfusion group shows neither desquamation of the epithelium nor inflammatory cell infiltration (HE stain, ×50).

II．水分吸収量の変動

遊離した空腸からの水分吸収量は阻血前を100％とすると，阻血群では阻血解除後に阻血前の－7.1±30.9％まで低下し，水分の分泌を認めた．これに対して，阻血＋PFC 灌流群では阻血解除後の水分吸収量は阻血前の46.1±8.4％とその低下は有意に抑制されていた (図9)．

III．小腸口側 (流入部) と肛門側 (流出部) の比較

遊離した部分空腸の粘膜組織中 ATP は阻血前には口側の 8.5±1.2μ mol/g dry weight に対して，肛門側では 8.4±1.2μ mol/g dry weight と有意差を認めなかった．阻血群でも阻血解除後1分の口側での 1.8±0.5μ mol/g dry weight に対して，肛門側では 1.9±0.6μ mol/g dry weight と有意差を認めなかった．また阻血＋PFC 灌流群でも阻血解除後1分の灌流液の流入部に相当する口側の 7.6±1.3μ mol/g dry weight に対して，灌流液の流出部に相当する肛門側では 7.2±1.9μ mol/g dry weight と有意差を認めなかった．一方阻血＋PFC (－) 液灌流群では灌流液の流入部に相当する口側の 7.2±1.5μ mol/g dry weight に対して，灌流液の流出部に相当する肛門側では 4.2±0.9μ mol/g dry weight と，肛門側の方が口側より有意に低値であった (図10)．

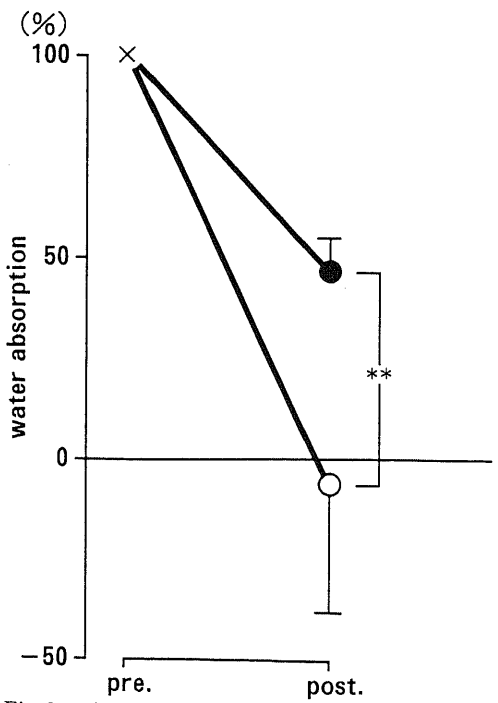


Fig. 9. Changes in water absorption of intestine during untreated period (pre.) and reperfusion period (post.). Each point represents the mean±S. D. ×, pre.; ○, ischemia group (5 dogs); ●, ischemia＋PFC perfusion group (5 dogs). **, $p<0.01$ between the two groups.

考　　察

Granger ら[5)6)]はネコの腸管を用いた阻血再灌流実験で，キサンチンオキシダーゼの阻害剤であるアロプリノール[5)]かあるいは活性酸素を消去するスーパーオキサイドディスムターゼなど[5)6)]の投与により病変が抑制されることを示した．これより彼らは，組織障害因子としての活性酸素の関与とその産生源としてのキサンチンオキシダーゼ系の重要性を指摘した．また，Schoenberg ら[21)]はネコの腸管の再灌流後に粘膜組織中ヒポキサンチンが上昇することを示した．しかし，再灌流後のキサンチン，尿酸の変動は明らかにしていない．そこで，阻血解除後の小腸粘膜組織においてヒポキサンチン，キサンチン，尿酸の変化を測定し，ヒポキサンチンからキサンチンを経て尿酸に至る反応の進行を検討した．

ヒポキサンチンからキサンチンを経て尿酸に至る反応は活性酸素を産生するキサンチンオキシダーゼかあるいは，活性酸素を産生しないキサンチンデヒドロゲナーゼのいずれかの酵素の存在下に進行する[5)22)]．McCord ら[22)]はラット小腸の虚血モデルの実験から，虚血前はキサンチンデヒドロゲナーゼがキサンチンオキシダーゼの8～9倍の活性を持つが，虚血により急速にデヒドロゲナーゼがオキシダーゼに変換され，虚血後1分にはこの変換がほぼ完全に完了したとしている．また一旦オキシダーゼに変換されれば，ジチオスレイトールなどの SH 基 (sulfhydryl group, SH group) の還元剤なしにはデヒドロゲナーゼにもどることはないとされている[23)]．従って，今回検討したヒポキサンチンからキサンチンを経て尿酸に至る反応は主としてキサンチンオキシダーゼによると考えられ，阻血解除後1分のキサンチンと尿酸の上昇は粘膜組織における急激な活性酸素の産生を示すものと考えられる．

活性酸素の産生系は多くのものが明らかにされており[24)]，キサンチンオキシダーゼ系もその一つである．小腸がキサンチンオキシダーゼ活性の高い臓器である[25)]ことや，キサンチンオキシダーゼの阻害剤であるアロプリノールが再灌流後の粘膜障害を軽減する[5)]ことから，キサンチンオキシダーゼ系が再灌流後の活性酸素産生源の主体をなすものと考えられる．

阻血解除後60分の空腸の組織像では絨毛先端で上皮細胞の脱落を認めた．小腸ではキサンチンオキシダー

ゼ活性は主として粘膜に認められ，絨毛先端に向かう程活性が高くなることが明らかにされている[26]．従って，キサンチンオキシダーゼ活性の最も高い部位で組織障害が認められたこととなる．また粘膜に炎症細胞浸潤を認めたが，これは Granger ら[27]が再灌流後60分の小腸粘膜でミエロペルオキシダーゼ活性の上昇を認めたことと一致する．彼らは好中球の動員がキサンチンオキシダーゼ系から産生される活性酸素による組織障害の結果現れると提唱している．こうして動員された好中球からも NADPH オキシダーゼ (reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase, NADPH oxidase) を介して活性酸素が放出され[24]，さらに組織障害が進行するものと推定される．

今回，60分間温阻血後の ATP，総アデニンヌクレオチド，エネルギー充足率の低下を示したが，これは阻血中に ATP から ADP, AMP を経てヒポキサンチンに至る反応が進行することを証明するものである．また阻血解除後のヒポキサンチン，キサンチン，尿酸の上昇を示したが，これは阻血解除後にヒポキサンチンからキサンチンを経て尿酸に至る反応が進行することを直接証明するものである．そして，阻血中にキサンチンデヒドロゲナーゼがキサンチンオキシダーゼへ変換する報告[22]をふまえると，阻血解除後の活性酸素産生を示すものである．さらに阻血解除後の絨毛先端における上皮細胞の脱落と水分吸収量の低下を示したが，阻血解除後産生された活性酸素による粘膜の形態的，機能的障害と考えられる．このように小腸の阻血と再灌流に伴う一連の生化学的変化を調べることにより，粘膜障害発生の機序を明らかにすることができた．

ところで，小腸阻血時に小腸内腔から酸素を投与する方法は，酸素ガス[7]，酸素化生理食塩水[8]，酸素化ブドウ糖溶液[9]，酸素化 PFC 乳剤[10]~[13]を小腸内腔に注入する方法が用いられてきた．これらはいずれも阻血中ないし阻血解除後の形態学的組織障害の軽減や阻血解除後の死亡率の低下が示されている．本研究では，酸素化 PFC 乳剤を用いて細胞機能の面から検討した．

PFC 乳剤は高い酸素溶解能を持ち，しかも酸素の

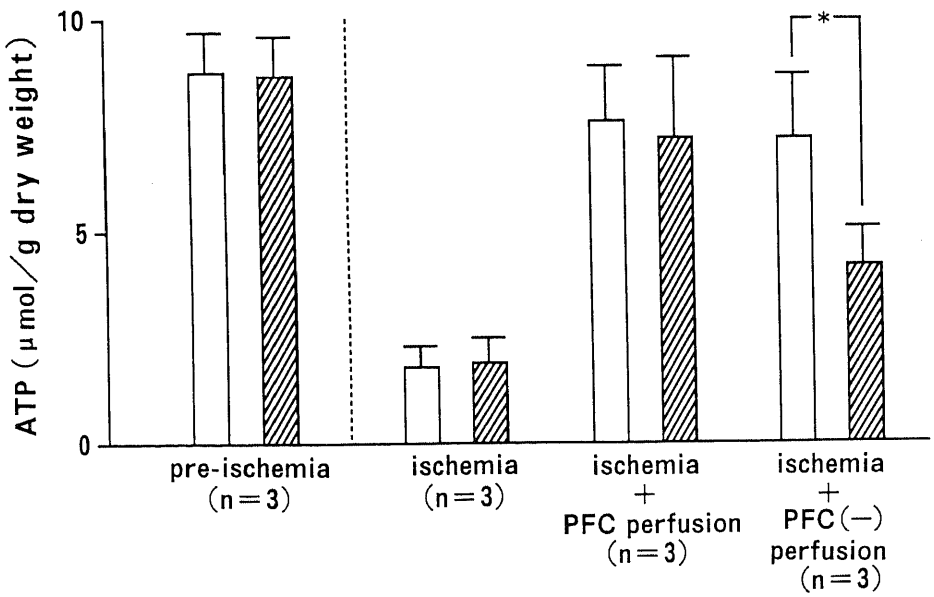


Fig. 10. Comparison between oral side (influx side) and anal side (outflux side) in ATP contents in intestinal mucosa. pre-ischemia, intestines at untreated period (3 dogs); ischemia, intestines at 1 min after declamping in ischemia group (3 dogs); ischemia+PFC perfusion, intestines at 1 min after declamping in ischemia+PFC perfusion group (3 dogs); ischemia+PFC (−) perfusion, intestines at 1 min after declamping which are intraluminally perfused with oxygenated solution without PFC during 60 min's ischemia (3 dogs).
□, oral side (influx side); ▨, anal side (outflux side).
Each bar represents the mean±S. D. *, $p<0.05$ between the oral side and the anal side.

授受反応がヘモグロビンより急速であることから，ヘモグロビンに代わる酸素運搬体として研究されてきた[14]. PFC 乳剤を用いる臓器保存は，Sloviter ら[28]がラット脳を酸素化した PFC 乳剤を用いて灌流し，酸素化した血液で灌流した場合と同じようなパターンの脳波を観察したのが最初である．その後，腎臓[29]，肝臓[30][31]，心臓[32]，膵臓[33]において灌流保存液としての有用性が実験的に示されている．しかし，PFC 乳剤を用いる臓器保存の多くは血管内に PFC 乳剤を灌流するものである[28]~[32]. PFC 乳剤を血管内に灌流する欠点として，その高い粘性のために末梢循環を損なう可能性がある[31]ことと網内系に取り込まれるため臓器に蓄積する可能性がある[14]ことが挙げられる．小腸内腔に灌流する場合，高濃度の PFC 乳剤であっても末梢循環を損なう心配はなく，また PFC 乳剤は小腸から吸収されない[13]ため臓器への蓄積も問題とならない．

小腸阻血中に酸素化 PFC 乳剤を小腸内腔に灌流することにより，阻血による ATP，総アデニンヌクレオチド，エネルギー充足率の低下が抑制され，阻血解除後のヒポキサンチン，キサンチン，尿酸の上昇が抑制された．一方，阻血解除後の上皮細胞の脱落が予防され，水分吸収量の低下が軽減された．酸素化 PFC 乳剤を小腸内腔に灌流することで阻血中にも粘膜における ATP 合成を持続させ，ヒポキサンチンの蓄積を起こさず，阻血解除後のキサンチンオキシダーゼ系の亢進と活性酸素の産生を回避し，その結果粘膜の形態的，機能的障害を予防し得たと考えられる．小腸粘膜は特に虚血に弱い部位であり[11][12]，粘膜組織中 ATP の低下の抑制とプリンヌクレオチド代謝の亢進の抑制を示したことから，酸素化 PFC 乳剤の小腸内腔灌流保存は合理的な灌流保存法であると言える．

結　論

イヌの小腸の阻血再灌流モデルにおいて，60分間阻血し阻血を解除した群，阻血中に酸素化 PFC 乳剤を小腸内腔に灌流した群とさらに阻血中に酸素化した PFC を含まない液を小腸内腔に灌流した群において，粘膜組織中アデニンヌクレオチドとその代謝産物の含量，組織像および水分吸収量を検討し，次の結論を得た．

1．ATP は阻血群では阻血前より有意に低下したのに対して，阻血＋PFC 灌流群ではその低下は軽度であり，阻血群より有意に高値を維持した．また総アデニンヌクレオチドやエネルギー充足率も同様の変化を示した．

2．ヒポキサンチン，キサンチン，尿酸は阻血群ではいずれも阻血前より有意に上昇したのに対して，阻血＋PFC 灌流群ではいずれも上昇せず，おのおの両群間に有意差を認めた．

3．組織学的には阻血群では全例絨毛先端で上皮細胞の脱落と炎症細胞浸潤を認めたのに対して，阻血＋PFC 灌流群では全例変化を認めなかった．

4．水分吸収量は阻血群では阻血前の－7％まで低下したのに対して，阻血＋PFC 灌流群では阻血前の46％の低下であり，阻血群より有意に高値を示した．

5．阻血＋PFC 灌流群では灌流液の流入部でも流出部でも ATP が保持されたのに対して，阻血＋PFC (－) 液灌流群では灌流液の流出部では ATP が保持されなかった．

以上より，小腸の阻血と再灌流により ATP から ADP, AMP，ヒポキサンチン，キサンチンを経て尿酸に至る反応が進行することが示され，活性酸素により粘膜が形態的，機能的に障害されることが示唆された．また酸素化 PFC 乳剤による小腸内腔灌流保存の有用性が形態的，機能的に示された．

謝　辞

稿を終えるに臨み，終始御懇篤なる御指導と御校閲を賜りました恩師宮崎逸夫教授に衷心から感謝の意を捧げます．また，終始直接御指導下さいました八木雅夫博士および御教示御助言を頂きました本学第1生化学教室松川茂博士に深く感謝の意を表します．

なお，本論文の要旨の一部は第33回日本消化器外科学会総会（東京），第89回日本外科学会総会（東京），第2回小腸移植研究会（千葉），第34会日本消化器外科学会総会（久留米）において発表した．

文　献

1） **Wilson, C., Gupta, R., Gilmour, D. G. & Imrie, C. W.:** Acute superior mesenteric ischaemia. Br. J. Surg., **74,** 279-281 (1987).

2） **宮崎逸夫：** 膵頭部癌の根治手術．日消外誌，**22,** 741-746 (1989).

3） **田辺達三：** 一般外科領域における血管外科の応用．日外会誌，**87,** 949-951 (1986).

4） **Schrant, W. H.:** Current status of small-bowel transplantation. Gastroenterology, **94,** 525-538 (1988).

5） **Parks, D. A., Bulkley, G. B., Granger, D. N., Hamilton, S. R. & McCord, J. M.:** ischemic injury in the cat small intestine: role of superoxide radicals. Gastroenterology, **82,** 9-15 (1982).

6） **Granger, D. N., Rutili, G. & McCord, J. M.:** Superoxide radicals in feline intestinal

ischemia. Gastroenterology, **81,** 22-29 (1981).

7) **Shute, K.:** Effects of intraluminal oxygen on experimental ischemia of the intestine. Gut, **17,** 1001-1006 (1976).

8) **Ahren, C. & Haglund, U.:** Mucosal lesions in the small intestine of the cat during low flow. Acta Physiol. Scand., **88,** 541-550 (1973).

9) **Robinson, J. W. L. & Mirkovitch, V.:** The roles of intraluminal oxygen and glucose in the protection of the rat intestinal mucosa from the effects of ischemia. Biomedicine, **27,** 60-62 (1977).

10) **Baba, S. & Mizutani, K.:** The intraluminal administration of perfluorochemicals to the ischaemic gastrointestinal tract. Aust. N. Z. J. Surg., **51,** 468-472 (1981).

11) **Ricci, J. L., Sloviter, H. A. & Ziegler, M. M.:** Intestinal ischemia: Reduction of mortality utilizing intraluminal perfluorochemical. Am. J. Surg., **149,** 84-90 (1985).

12) **水谷謙二:** 消化管血流障害に対する Perfluorochemical (PFC) 乳剤の経腸的投与法に関する実験的研究. 日消誌, **83,** 974-983 (1986).

13) **Oldham, K. T., Guice, K. S., Gore, D., Gourley, W. K. & Lobe, T. E.:** Treatment of intestinal ischemia with oxygenated intraluminal perfluorocarbons. Am. J. Surg., **153,** 291-294 (1987).

14) **大柳治正, 斎藤洋一, 光野孝雄:** 人工血液の研究. 日本臨床, **38,** 1966-1979 (1980).

15) **Tanaka, K., Yoshioka, A., Tanaka, S. & Wataya, Y.:** An improved method for quantitative determination of deoxyribonucleoside triphosphates in cell extracts. Anal. Biochem., **139,** 35-41 (1984).

16) **Atkinson, D. E.:** The energy charge of the adenylate pool as a regulatory parameter. Interaction with feedback modifiers. Biochemistry, **7,** 4030-4037 (1968).

17) **入山啓治, 吉浦昌彦, 岩本武夫:** 高速液体クロマトグラフィによる生体試料中のオキシプリン類の定量分析. 尿酸, **10,** 96-104 (1986).

18) **Bussjaeger, L. J. & Johnson, L. R.:** Evidence for hormonal regulation of intestinal absorption by cholecystokinin. Am. J. Physiol., **224,** 1276-1279 (1973).

19) **Dennison, A. R., Collin, J., Watkins, R. M., Millard, P. R. & Morris, P. J.:** Segmental small intestinal allografts in the dog. I. Morphological and functional indices of rejection. Transplantation, **44,** 474-478 (1987).

20) **Hubel, K. A.:** Effects of secretion and glucagon on intestinal transport of ions and water in the rat. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., **139,** 656-658 (1972).

21) **Schoenberg, M. H., Fredholm, B. B., Haglund, U., Jung, H., Sellin, D., Younes, M. & Schildberg, F. W.:** Studies on the oxygen radical mechanism involved in small intestinal reperfusion damage. Acta Physiol. Scand., **124,** 581-589 (1985).

22) **Roy, R. S. & McCord, J. M.:** Superoxide and ischemia: conversion of xanthine dehydrogenase to xanthine oxidase. In R. A. Greenwald & G. Cohen (eds.), Oxy Radicals and Their Scavenger Systems. Volume II: Cellular and Molecular Aspects, 1st ed., p145-153, Elsevier Science Publishing Co., Inc., New York, 1983.

23) **Granger, D. N.:** Role of xanthine oxidase and granulocytes in ischemia-reperfusion injury. Am. J. Physiol., **225,** H1269-H1275 (1988).

24) **Jones, D. P.:** The role of oxygen concentration in oxidative stress: hypooxic and hyperoxic modeles. In H. Sies (ed.), Oxidative Stress, 1st ed., p152-196, Academic Press Inc., London, 1985.

25) **Parks, D. A. & Granger, D. N.:** Xanthine oxidase: biochemistry, distribution and physiology. Acta Physiol.Scand. Suppl., **548,** 87-99 (1986).

26) **Granger, D. N., Hollwarth, M. E. & Parks, D. A.:** Ischemia-reperfusion injury: role of oxygen-drived free radicals. Acta Physiol. Scand. Suppl., **548,** 47-64 (1986).

27) **Grisham, M. B., Hernandez, L. A. & Granger, D. N.:** Xanthine oxidase and neutrophil infiltration in intestinal ischemia. Am. J. Physiol., **251,** G567-G574 (1986).

28) **Sloviter, H. & Kamimoto, T.:** Erythrocyte substitute for perfusion of brain. Nature, **216,** 458-460 (1967).

29) **Linn, B. S., Canaday, W. Jr., Breton, M. & Gollan, F.:** Kidney preservation by perfusion with organic liquids. Surg. Forum, **18,** 278-281 (1967).

30) **Kamada, N., Calne, R. Y., Wight, D. G. D.**

& Lines, J. G.: Orthotopic rat liver transplantation after long-term preservation by continuous perfusion with fluorocarbon emulsion. Transplantation, **30,** 43-48 (1980).

31) 萩野和功，大柳治正，宇佐美真，斎藤洋一： Perfluorochemical 乳剤を用いた24時間ラット肝低温持続灌流保存．日外会誌，**89,** 1662-1671 (1988).

32) Bando, K., Teramoto, S., Tago, M., Seno, S., Murakami, T., Nawa, S. & Senoo, Y.: Oxygenated perfluorocarbon, recombinant human superoxide dismutase, and catalase ameliorate free radical induced myocardial injury during heart preservation and transplantation. J. Thorac. Cardiovasc. Surg., **96,** 930-938 (1988).

33) Kuroda, Y., Kawamura, T., Suzuki, Y., Fujiwara, H., Yamamoto, K. & Saitoh, Y.: A new, simple method for cold storage of the pancreas using perfluorochemical. Transplantation, **46,** 457-460 (1988).

Mechanism of Small Intestinal Reperfusion Injury and Treatment Utilizing Intraluminal Perfluorochemical (PFC) Perfusion

Hideki Onoda, Department of Surgery Ⅱ, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920—J. Juzen Med Soc., 99, 1—13 (1990)

Key words small intestine, reperfusion injury, xanthine oxidase, perfluorochemical, intraluminal perfusion

Abstract

Changes of the mucosal level of adenine nucleotides and purine metabolites in the xanthine oxidase system were quantitatively analyzed in the ischemia-reperfusion model of the canine small intestine. Moreover the effect of intraluminal perfusion with oxygenated PFC emulsion on the small intestinal preservation was examined. Both untreated intestines and PFC-treated intestines received 60 minutes' ischemia and reperfusion. Compared with initial levels, the mucosal levels of adenosine triphosphate (ATP) decreased significantly in the untreated intestines but did not decrease significantly in the PFC-treated intestines. In the untreated intestines the mucosal levels of hypoxanthine, xanthine, and uric acid increased significantly, whereas in the PFC-treated intestines the mucosal levels of these metabolites showed no significant changes. Histological features of the mucosa after reperfusion exhibited desquamation of the epithelium from the villus tips in the untreated intestines and remained unchanged in the PFC-treated intestines. Water absorption decreased to −7% and 46% in the untreated intestines and the PFC-treated intestines respectively. The results directly document that ischemia-reperfusion of the small intestine results in the decline of ATP synthesis and activation of the xanthine oxidase system, suggesting that superoxide anion produced in this xanthine oxidase system induces morphological and functional damage of the mucosa, and indicating that intraluminal perfusion of oxygenated PFC emulsion is effective for small intestinal preservation.