<原 著>

肝部分切除後エンドトキシン誘発肝障害に対する外因性
cyclic AMP の有用性とその機序に関する実験的研究

工藤 浩市 柿坂 明俊 葛西 真一*

要 旨：肝部分切除後エンドトキシン誘発肝障害に対する外因性 cyclic AMP の効果及びその作用機序を明らかにするため、Dibutyryl cyclic AMP (DBcAMP) 15mg/kg/回を、70%肝切除 (70%Hx) 24時間後に Lipopolysaccharide (Et) 3.0mg/kg を投与して作成した肝部分切除後エンドトキシン血症ラットに用いて検討した。生存率は、70%Hx+Et 群 (対照群) 10.0%、DBcAMP 投与群 (治療群) のうち、70%Hx 前1時間、Et 投与前1時間の両方に投与した群 (A 群) 80.0%、70%Hx 前投与群 (B 群) 36.0%、Et 前投与群 (C 群) 64.0%であった。肝機能検査、肝組織検査でも治療群で良好な結果を示した。Et 投与1時間後の血清 TNF 値は治療群で有意に抑制され、また A 群及び C 群では Et 投与後の肝組織血流量も維持されていた。以上より、DBcAMP は肝部分切除後エンドトキシン誘発肝障害に対して極めて有用であった。

索引用語： 肝部分切除 エンドトキシン血症 Dibutyryl cyclic AMP (DBcAMP)
Tumor necrosis factor (TNF) 肝組織血流量

はじめに

肝臓における外科治療の適応の拡大に伴って、臨床において肝切除を含む複数臓器切除術を行う機会が多くなっている。すなわち胃癌、結腸癌などの消化器癌と転移性肝癌の一期的手術や肝近傍臓器癌における合併肝切除が積極的に行われるようになってきた。しかしながら、これら侵襲の大きな手術には合併症の危険性の増大も伴っており、術後感染症や縫合不全などをきっかけに発症する重症肝機能障害は治療も困難なことが多く、MOF (multiple organ failure) へ進展することもしばしば認められる。この原因の一つとしてエンドトキシンが考えられており、肝障害とエンドトキシンの関係については多くの研究が報告されている¹⁻⁵⁾。近年、免疫反応による肝細胞障害性の mediator 産生及び血管内皮細胞障害や白血球、血小板、フィブリンなどの凝集による肝血流障害から病態を解明する試みも報告されている¹⁻⁵⁾が、その機序は不明な点が多く、治療法も確立されていないのが現状である。さきに我々は、ガラクトサミン肝障害モデルを用いて、細胞内のセカンドメッセンジャーで、肝臓においても物質代謝の調節に関与するとされている cyclic AMP

(cAMP) の誘導体で、循環・代謝系に種々の生物活性を有し、細胞膜透過性が良好とされている Dibutyryl cyclic AMP (DBcAMP) の肝不全に対する肝障害抑制効果およびその救命効果について報告した⁶⁾。そこで本研究では、肝切除後エンドトキシン誘発肝障害モデルに対して DBcAMP を使用し、その有用性と機序について検討したので報告する。

方 法

1. 肝部分切除後エンドトキシン誘発肝障害モデル (対照群) の作成

体重約200g の Wistar 系雄性ラットに、エーテル麻酔下で Higgins-Anderson の方法⁷⁾に準じた約70%の肝切除 (70%Hx) を行い、24時間後に Et [Sigma 社] 3.0mg/kg 体重を陰茎静脈から投与 (i.v.) することにより、肝部分切除後エンドトキシン誘発肝障害ラットを作成した。

2. DBcAMP の投与方法 (DBcAMP 治療群)

DBcAMP [第一製薬] は、エーテル麻酔下で1回投与量15mg/kg を以下の3群に分けて i.v. した。A 群は70%Hx 1時間前および Et 投与1時間前に i.v.、B 群は70%Hx 1時間前のみ i.v.、C 群は Et 投与1時間

Koichi KUDOH, Akitoshi KAKISAKA and Shinichi KASAI*

*旭川医科大学第2外科

<受付日1995年1月17日>

Fig. 1 Administration pattern of DBcAMP for endotoxemia after 70% hepatectomy

前のように i.v. とした。対照群では 70% Hx 1 時間前および Et 投与 1 時間前に生理食塩水を i.v. した。なおそれぞれの薬剤は 1 回投与量が 1ml/以下となるようにし、生理食塩水は 1ml/回として投与した (Fig. 1)。

3. 効果判定のパラメーター

生存率は、2 週間飼育し生存の有無を観察した [対照群は $n=30$, A 群, B 群, C 群は $n=25$]。肝機能検査では血清 GOT 値, 血清総ビリルビン値 (TB), ヘパラスチンテスト (HPT), 血糖値を Et 投与 1 時間, 6 時間, 24 時間後, 及び 5 日後に測定した [HPT は $n=5$, 他は $n=10$]。GOT はセロテック株式会社の「セロテック」TA-E を用いて Lippe 法によって測定し, 血糖値は同社の「セロテック」グルコース M を用いて酵素法 (GOD-POD 法) により, TB は日本商事株式会社のネスコートビリルビンキット-K を用いてミハエルソン変法により, また HPT はエーザイ株式会社のヘパラスチンテストを用いて測定した。血清 TNF 値は, L929 細胞株を用いた bioassay により Et 投与 1 時間, 6 時間, 24 時間後に測定した [$n=5$]。血清エンドトキシン値は, Et 投与 6 時間後に Endospecy 法により測定した [$n=5$]。肝組織血流量は, 電解式組織血流量計 [バイオメディカルサイエンス株式会社製の RBF-2] により Et 投与 1 時間, 6 時間後の時点で測定した [$n=5$]。また, Et 投与 24 時間後に摘出した肝をホルマリン固定した後 HE 染色を行い観察した (但し, 死亡したラットでは, その死亡直後のものを同様に観察した)。

なお, 生存率を観察した実験群では諸検査を施行せずに生死判定のみを行った。また肝機能検査については同一個体で, エーテル麻酔下でラットの尾から約 1 ml の採血による成績であり, 血清 TNF の各時間の数

値および血清エンドトキシン値は異なる個体で, エーテル麻酔下で大静脈から約 5ml 採血を行って検体とした。

4. 統計処理

統計学的数値は, mean $\pm$ SD にて表し, 有意差検定は Student's t test, 生存率の有意差検定は χ^2 検定を用いて行った。

結 果

1. 生存率

生存率は対照群 10.0% (30 匹中 3 匹), A 群 80.0% (25 匹中 20 匹), B 群 36.0% (25 匹中 9 匹), C 群 64.0% (25 匹中 16 匹) で, DBcAMP 投与群では対照群に対して有意の改善が認められた。また A 群, C 群は B 群に比して有意に良好であった (Fig. 2)。

2. 血清 GOT, T.B の経時的変化

GOT は, 対照群では Et 投与 6 時間後で, 518 ± 46 KARMEN 単位 (KU) と高値を示したのに対して, A 群 295 ± 55 KU, B 群 385 ± 55 KU, C 群 301 ± 49 KU と有意に低値を示し ($p < 0.01$), 特に A 群, C 群で良好な値が得られた。また生存した治療群 3 群ではともに 24 時間後には低下する傾向がみられ, 5 日後には A 群, C 群では 100 ± 7.6 KU, 86.2 ± 12.3 KU とほぼ正常範囲内に改善した (Fig. 3)。

T.B は治療群の 6 時間後で対照群 6.1 ± 2.4 mg/dl に比べて有意に低値であり ($p < 0.01$: Control vs Group A, $p < 0.05$: Control vs Group B and Group C), A 群では 2.3 ± 0.8 mg/dl と最も低値を示した (Fig. 4)。

3. HPT の経時的変化

HPT は, 各群とも 1 時間後には延長していたが, 対

Fig. 2 Survival rates during 2 weeks after Et administration

Fig. 3 Changes of serum GOT activities during 5 days after Et administration. Each value represents the mean $\pm$ SD

Fig. 5 Changes of HPT during 5 days after Et administration. Each value represents the mean $\pm$ SD

Fig. 4 Changes of serum Total bilirubin concentration during 5 days after Et administration. Each value represents the mean $\pm$ SD

Fig. 6 Changes of blood sugar concentration during 5 days after Et administration. Each value represents the mean $\pm$ SD

照群, B 群では 6 時間後にさらに悪化し, 特に対照群では 10% 以下と著明に延長した ($p < 0.01$). その後 B 群は回復に向かった. A 群, C 群においてはそれぞれ 6 時間後 $28.8 \pm 8.6\%$, $32.4 \pm 1.5\%$, 24 時間後 $34.4 \pm 9.0\%$, $38.4 \pm 4.3\%$ と経時的に改善する傾向がみられた. また 5 日後には両群はそれぞれ $61.6 \pm 14.4\%$, $63.8 \pm 4.3\%$ に回復した (Fig. 5).

4. 血糖値の経時的変化

対照群では Et 投与 6 時間後には $17.2 \pm 4.1 \text{ mg/dl}$ と著明に低下したのに対し, 治療群ではそれぞれ A 群 $100 \pm 3.7 \text{ mg/dl}$, B 群 $89.4 \pm 15.6 \text{ mg/dl}$, C 群 $89.2 \pm 20.1 \text{ mg/dl}$ と有意に高値を示し ($p < 0.01$), 24 時間後においても 100 mg/dl 前後に維持された (Fig. 6).

5. 血清エンドトキシン値

Et 投与 6 時間目の血清エンドトキシン値は対照群,

治療群いずれも 200 pg/ml と高値を示した.

6. 血清 TNF 値の経時的変化

血清 TNF 値は, 各群とも Et 投与 1 時間後で最も高値を示し, その後急速に低下した. 1 時間値をみると, 対照群で $897.25 \pm 186.01 \text{ IU/ml}$ であったのに対して, 治療群では有意の低値を示し ($p < 0.01$), 特に A 群では $26.9 \pm 11.1 \text{ IU/ml}$ と最も低値であった (Fig. 7).

7. 肝組織血流量

Et 投与 1 時間後の対照群及び B 群の肝組織血流量は Et 投与 1 時間前に DBcAMP を投与した A 群及び C 群よりも低値であった ($p < 0.05$) が, 正常ラットの $57.0 \pm 11.5 \text{ ml/min/100g}$ に対して有意差はみられなかった. 6 時間後には対照群で著明に低下したのに対して治療群では有意に高値を示し ($p < 0.01$), とくに A 群では $51.2 \pm 11.9 \text{ ml/min/100g}$ と正常ラット血流

Fig. 7 Changes of serum TNF activities during 24 hours after Et administration. Each value represents the mean $\pm$ SD

Fig. 8 Blood flow in liver tissues 1 and 6 hours after Et administration. [n=5] Each value represents the mean $\pm$ SD

量を維持した (Fig. 8).

8. 肝組織所見

Et 投与24時間後の摘出肝の HE 染色による観察では、治療群の生存ラットでは、炎症細胞浸潤に一部で巣状壊死像を伴う所見であった。これに対して対照群では出血を伴う広範囲壊死像を示した (Fig. 9, 10)。

考 察

肝臓はエネルギー代謝の中心的な臓器であり、生体維持のためのさまざまな代謝を行っている。また免疫担当細胞である Kupffer 細胞を有し、生体の防御機構の重要な役割を担っている。体内に進入したエンドトキシンはまず肝臓で処理されることから、本来肝臓はエンドトキシンを速やかに、かつ安全に排除する機構を持っていることが考えられる。しかし、肝切除術後には、肝硬変⁸⁾、薬物性肝障害^{6,9)}、肝血行障害⁵⁾などの

Fig. 9 Histological findings (group A), HE, $\times$ 100. inflammatory changes with focal necrosis were observed on 24 hours after Et administration

Fig. 10 Histological findings (Control group), HE, $\times$ 100. massive necrosis were observed on 6 hours after Et administration

病態と同様に、エンドトキシンによる重篤な臓器障害を起こしやすいことが知られている⁴⁾。近年、肝切除術が比較的安全に行われるようになった反面、広範囲肝切除症例や他臓器合併切除症例が増加し、これに伴って過大手術侵襲による術後合併症の危険が増えていることも事実である。肝部分切除後エンドトキシン血症の機序はこのような手術操作に伴う外因性的原因と、網内系の機能低下¹⁰⁾及び腸粘膜防御機構の破綻¹¹⁾という内因性的原因があると言われている。こうして体内に進入したエンドトキシンがどのような機序をもって肝障害を起こすかは未だ一定の見解は得られていないが、ひとつは肝血流障害、もうひとつは Kupffer 細胞などに由来する肝細胞障害物質が考えられてい

る^{1-6,9)}。肝細胞の減少に伴うエネルギー代謝能の低下が予想される肝部分切除後においてエンドトキシンによる臓器障害が加わると、ときに致死的事実であることから、このような状況下での病態の解明と治療法の確立が望まれる。そこで基礎実験として、ラットに70%肝切除を施行し、24時間後に0.5mg/kg, 1.0mg/kg, 3.0mg/kgのエンドトキシンを静注して死亡率を調べたところ、それぞれ0%(0/10), 62.5%(10/16), 93.3%(14/15)であった。また正常ラットに3.0mg/kgのエンドトキシンを静注したが死亡率は0%(0/10)であったので、肝部分切除24時間後の状態とエンドトキシン投与の相互作用で高率に致死となるモデルとして、肝部分切除24時間後エンドトキシン3.0mg/kg投与ラットを作成した。

一方、cAMPは細胞内のセカンドメッセンジャーであることから、その誘導体で細胞膜透過性が良好といわれているDBcAMPは様々な生物活性を有することが知られており、急性循環不全や体外循環時¹²⁾、あるいは薬剤性肝障害^{6,9)}、術後肝内胆汁うっ滞¹³⁾に対する有用性が研究され、一部臨床の場においても使用されている。DBcAMPが有していると考えられている循環動態改善作用、及びエネルギー代謝改善作用は肝細胞数が減少し、かつ循環動態の異常による臓器障害が併発しているような病態に対して有利な作用を及ぼすことが期待される。そこで今回は、ラットの肝部分切除後エンドトキシン誘発肝障害モデルに対してDBcAMPを使用し、その有用性と作用機序について検討を行った。

70%肝切除1日後に3mg/kgのエンドトキシンを投与すると、90%が死亡するが、DBcAMP投与群、特に肝部分切除前とエンドトキシン投与前の二回投与群(A群)では80%の生存が得られた。肝機能検査、肝性凝固因子、肝組織所見でも投与群では良好な結果が得られ、DBcAMP投与は、肝部分切除後にエンドトキシンによって誘発される肝障害と、このような病態による全身状態の悪化に対する防御作用のあることが認められた。このことは肝組織血流量からみても明らかで、エンドトキシン投与によって肝組織血流量が著明に減少するのに対して、DBcAMP投与群では血流量が維持された。また治療群を比較してみると、1回投与群のうち肝部分切除前投与群(B群)よりもエンドトキシン投与前投与群(C群)の方が生存率、肝機能検査で良好な成績を示した。これは肝部分切除に伴う代謝能及び食能の低下はDBcAMP投与によっても十分に

は改善しえなかったが、エンドトキシンによる生体反応を制御して救命効果を得たものと推測された。しかし治療群のなかでも死亡したラットは組織学的にも対照群の死亡ラット同様に障害が著しく、50%以上の範囲で壊死を起こしていた検体ではいずれの群でも生存例はみられなかった。肝部分切除後エンドトキシン誘発肝障害ラットにおける肝組織血流量の低下は、肝動脈あるいは門脈の血流量の低下と、肝障害物質および類洞の凝固などによる循環障害が原因と考えられている^{1-6,9)}。DBcAMPは上腸間膜動脈や臓器血流を増加させることが明らかにされており¹⁴⁾、その機序は心拍出量の増加と、上腸間膜動脈の血管抵抗の減少であると言われている。また類洞の循環不全に関しては類洞内凝固、内皮細胞障害によることが考えられており、サイトカインの過剰反応、凝固線溶系異常および活性酸素の影響などが報告されている。TNFがこの反応に関与しているかどうか議論が有るが、TNFがエンドトキシン刺激によってKupffer細胞などから産生され、また結果的に内皮細胞障害を起こし得ることが報告されている¹⁵⁾。今回の実験からも肝機能検査で最も不良な結果を示したのがEt投与6時間後であったのに対して、各群のTNF値はそれに先立ってEt投与1時間後に高値を示し、以後速やかに減少したことからTNFが肝障害を引き起こす要素の一つであることが推測された。このTNFの産生を制御するものとしてステロイドやプロスタグランディン¹⁶⁾が知られており、ともに肝障害治療薬として研究されている。Katakamiら¹⁷⁾はプロスタグランディンE₂がマクロファージ細胞内のcAMPの増加を介して作用することに着目し、*in vitro*でDBcAMPがTNF産生を抑制することを報告した。我々の実験でもDBcAMP投与群においてTNFの抑制効果を認め、救命の一助になったことが考えられる。しかし対照群に比べてTNFが有意に低値であったB群の救命率が36.0%にすぎず、実際にはTNF以外の複雑な要素が相俟って、血流障害に至ることが推測される。DBcAMPは血小板凝集抑制作用を有すると言われており¹⁸⁾、またcAMPはセカンドメッセンジャーであることから、副腎皮質ホルモン(ステロイド)を介するなど他の機序でも肝血流に有利に働いている可能性もあるが、今後の検討が必要である。

また、このような血流維持作用のほかに、DBcAMPによってエネルギー代謝改善の得られたことが考えられる。エンドトキシン血症の代謝異常のひとつに低血

糖が良く知られているが、これはアデニレートシクラーゼの活性化を抑制してグルカゴンによる cAMP 上昇の反応を抑制するためであることが示唆されており¹⁹⁾、本実験でも対照群が著明な低血糖状態になったのに対して、治療群ではいずれも約100mg/dl と維持し、DBcAMP はグルカゴン不応の状態でも糖代謝を維持していることが認められた。またエンドトキシン血症時の代謝活性のうち、cAMP の増加によって伝達されるものは、ATP を次々と消費し、やがて枯渇して代謝障害を起こすことが推測されている。DBcAMP 投与によって、肝組織 ATP 値が維持されることが D-Galactosamine 肝障害を用いた研究で証明されており⁶⁾、今回のモデルでも同様な機序が働いたものと思われる。

組織血流維持作用、エネルギー代謝改善の他に、DBcAMP には細胞膜保護作用のあることが考えられる²⁰⁾。これは cAMP がステロイドやプロスタグランジン作用を持っていることが推定されている⁶⁾ことから、これら細胞膜およびライソゾーム膜安定化作用を有する薬剤と同様の効果が期待できる。

以上より、DBcAMP は肝部分切除後エンドトキシン誘発肝障害ラットに対して、肝組織血流量の維持によって十分な酸素と糖を供給し、エネルギー代謝を改善させること、加えて細胞膜安定化作用などの総合的な機序によって、肝障害抑制効果、救命効果を有すると考えられた。

稿を終えるにあたり、御指導御校閲を賜りました水戸勉郎教授に深甚なる謝意を表します。また、ご協力いただいた旭川医科大学第2外科教室の諸先生に深く感謝致します。

本論文の要旨は第29回日本肝臓学会総会(1993年、奈良)において発表した。

文 献

- 1) Nolan JP: The role of endotoxin in liver injury. *Gastroenterology* 69: 1346—1356, 1975
- 2) Keller GA, West MA, Cerra FB, et al: Macrophage-mediated modulation of hepatic function in multiple-system failure. *J Surg Res* 39: 555—563, 1981
- 3) Hirata K, Kaneko A, Ogawa K, et al: Effect of endotoxin on rat liver analysis of acid phosphatase isozymes in the liver of normal and endotoxin-treated rats. *Lab Invest* 43: 165—171, 1980
- 4) Mochida S, Ogita I, Hirata K, et al: Provocation of massive hepatic necrosis by endotoxin after partial hepatectomy in rat. *Gastroenterology* 99: 771—777, 1990
- 5) 芝山雄老, 斉藤雅文, 中田勝次, 他: エンドトキシンによる肝壊死の発生機序—肝循環障害の原因的役割について—. *肝臓* 24: 1242—1251, 1983
- 6) 柿坂明俊, 葛西真一, 水戸勉郎: Dibutyryl cyclic AMP による D-galactosamine 急性肝不全治療の実験的研究. *日外会誌* 90: 396—403, 1989
- 7) Higgins GM, Anderson RM: Experimental pathology of the liver. *Arch Pathol* 12: 186—202, 1931
- 8) 長島郁雄: 硬変肝切除後のエンドトキシン血症と網膜内皮系機能に関する実験的研究—フィブロンクチン投与の意義について—. *日外会誌* 92: 551—561, 1991
- 9) 柿坂明俊, 工藤浩市, 水戸勉郎: 急性肝不全に対する外因性 cyclic AMP の投与効果及び脾臓の役割に関する実験的研究. *肝臓* 33: 925—931, 1992
- 10) Wang XD, Soltesz V, Bengmark S, et al: Bacterial translocation in acute liver failure induced by 90 percent hepatectomy in the rat. *Br J Surg* 80: 66—71, 1993
- 11) Arii S, Monden K, Tobe T, et al: The three different phases of Reticuloendothelial system phagocytic function in rats with liver injury. *J Surg Res* 45: 314—319, 1988
- 12) 今井昭一: Cyclic AMP の生理・薬理—各種物質の心臓作用への関与—. *最新医学* 40: 241—246, 1985
- 13) 柿坂明俊, 水戸勉郎: 術後肝内胆汁うっ滞に対する cyclic AMP 誘導体の効果. *胆と脾* 14: 759—765, 1993
- 14) 野崎洋文, 遠藤 毅, 坂本陽吉, 他: 臓器血流分配に関する研究—第2報. Endotoxin shock 時における dibutyryl cyclic AMP の影響について—. *麻酔* XXVII: 676—683, 1978
- 15) Gamble JR, Harlan JM, Klebanoff SJ, et al: Stimulation of the adherence of neutrophils to umbilical vein endothelium by human recombinant tumor necrosis factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 82: 8667—8671, 1985
- 16) Chensue SW, et al: In vivo biologic and immunohistochemical analysis of interleukin-1 alpha, beta and tumor necrosis factor during

- experimental endotoxemia. *Am J Pathol* 138 : 395—402, 1991
- 17) Katakami Y, Nakao Y, Fujita T, et al : Regulation of tumor necrosis factor protection by mouse peritoneal macrophages: The role of cellular cyclic AMP. *Immunology* 64 : 719—724, 1988
- 18) 奥秋 晟 : 臨床の現況 (各疾患における cAMP の役割) 血小板凝集. *最新医学* 40 : 314—319, 1985
- 19) 玉田一夫 : エンドトキシンのラット肝細胞に於ける cyclic AMP 産生に及ぼす影響に関する研究. *和歌山医学* 41 : 65—73, 1990
- 20) Kurebayashi Y, Honda Y : Protection by 16, 16-dimethyl prostaglandin E₂ and dibutyl cyclic AMP against complement-mediated hepatic necrosis in rats. *Hepatology* 14 : 545—550, 1991

Protective effects of DBcAMP on endotoxin induced hepatopathy following a partial hepatectomy in rats

Koichi KUDOH, Akitoshi KAKISAKA and Shinichi KASAI*

In order to clarify the effect and mechanism of extrinsic cyclic AMP on endotoxin induced hepatopathy following a partial hepatectomy, doses of dibutyl cyclic AMP (DBcAMP) at 15 mg/kg were administered to rats which had been administered 3.0 mg/kg of lipopolysaccharide (Et) 24 h after a 70% hepatectomy (70% Hx).

The survival rates were 10.0% for the 70% Hx + Et group (control group), 80% for the group which was administered DBcAMP at both 1 h before 70% Hx and 1 h before Et administration (A group). Good results were obtained from both liver function and histological findings in the experimental treatment groups. The serum TNF activity 1 h after administration of Et was significantly decreased in the experimental treatment groups. Also, the liver tissue blood flow was maintained following administration of DBcAMP.

The results showed that DBcAMP was very effective against endotoxin induced hepatopathy following a partial hepatectomy.

---

* Second Department of Surgery, Asahikawa Medical College (Asahikawa)