

## 原著

## エンドトキシンの肝臓内血流に及ぼす影響

木村 健一\*

## 要 旨

われわれは、摘出肝灌流ラット肝を用いて、エンドトキシン（以下 ET と略す）の肝循環への直接作用を検討した。ET 注入により胆汁分泌量は、投与前の  $0.88 \pm 0.38 \mu\text{l} \cdot \text{g}^{-1}$  に比し  $0.29 \pm 0.24$  と減少し ( $p < 0.01$ )、平均灌流圧は、ET 注入前の  $14.4 \pm 2.3 \text{ cmH}_2\text{O}$  から ET 注入 30 分後  $13.1 \pm 1.6 \text{ cmH}_2\text{O}$ 、1 時間後に  $12.6 \pm 1.5 \text{ cmH}_2\text{O}$  と低下傾向が見られた ( $0.05 < p < 0.10$ )。そして類洞内血管容積は  $0.302 \pm 0.040 \text{ ml} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{liver}$  から ET 注入 60 分後には  $0.245 \pm 0.043$  と減少傾向が見られた ( $0.05 < p < 0.10$ )。シャント率は  $2.7 \pm 0.6\%$  から ET 注入後  $3.5 \pm 1.1\%$  と増加した ( $0.01 < p < 0.05$ )。ET は肝の類洞周囲組織の細胞の膨化を発生させることが推測された。そしてそのためか大孔径毛細血管の血流を増加させ、シャント率を増加させることが推測された。

## はじめに

重症感染症ではしばしば原因不明の黄疸を合併して、病態がさらに重篤となる事がある。西田<sup>1)</sup>らによると重症感染症の 33% に高ビリルビン血症が見られその内の 81% に血中の ET を証明したと報告している。Uitl ら<sup>2)</sup> は、ラット摘出肝の灌流実験で ET には胆汁鬱滞作用があると報告している。この胆汁鬱滞は肝の血流低下<sup>1,3)</sup> によるものと、ET の直接の毛細胆管への作用によるものとがあると考えられている<sup>4)</sup>。杉浦<sup>3)</sup> はイヌを用いた研究で ET ショック時に、肝内の血流が低下することを報告している。また西田ら<sup>1)</sup> はラットを用いて持続的に ET を投与したところ胆汁鬱滞

作用がみられ肝組織血流は低下したと報告している。一方、市川<sup>4)</sup> はラットの腸間膜静脈枝から ET を持続注入する急性実験を行い、肝組織血流の変化を観察したが認むべき変化を得るに至らなかったと報告している。したがって ET 自体が肝に直接作用し、胆汁鬱滞をきたしたためであると説明した。しかしこれらの研究は *in vivo* で行われ、他の臓器からの影響も否定できず、直接的な肝自体の微小循環に及ぼす ET の影響についてはほとんど研究されていない。そこで今回われわれは、摘出ラット肝灌流法を用いて、ET の肝臓内血流への直接的影響について研究を行った。

## 方 法

## 1) 実験動物および灌流方法

実験開始 12 時間前より絶食させた Sprague-Dawley ラット（体重約 400 g）を 16 頭使用した。

ラットの腹腔内にペントバルビタール  $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  を投与して麻酔した後開腹した。総胆管に PE-10 カテーテルを挿入固定後、ヘパリン 100 単位を下大静脈に注入後、門脈内にプラスチックカテーテル（外径 2.8 mm、内径 1.5 mm、長さ 15 mm）を挿入固定した。そしてこのプラスチックカテーテルを直ちに灌流装置の inflow 側に接続し灌流を開始した。

ウシの全血より赤血球を遠心分離し、約 3 倍量の生理食塩水にて 2 回洗浄し、この洗浄赤血球をウシアルブミン (Fraction V, Sigma, St. Louis)  $2 \text{ g} \cdot \text{dl}^{-1}$ 、グルコース  $100 \text{ mg} \cdot \text{dl}^{-1}$  を含む Krebs-Henseleit 緩衝液にそのヘマトクリットが約 20% になるように浮遊させ灌流液を調整した。

\*川崎医科大学麻酔科学教室

そしてこの灌流液を送液定量ポンプ (Masterflex, Cole-Parmer Instrument Co., Chicago) を用いて灌流した。灌流条件は流速  $30 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$  で、回路内に模型肺 (キャピオックス II—テルモ社製—) を装備し、 $95\% \text{ O}_2 \cdot 5\% \text{ CO}_2$  の混合ガスにて灌流液の酸素化を行った。同時に下腹部の大静脈を切断した。血液の流出は一時的にそのままとし、直ちに胸骨を切開して下大静脈を可及的に心臓部近くで切断し、次に肝臓を他の組織から剥離し摘出した。下大静脈に 8 Fr のプラスチックカテーテルを挿入、固定し、流出する灌流液はリザーバーに誘導し再度灌流に用いた (図 1)。

肝の灌流状態は、肉眼的に肝が均一な赤褐色であり、腫脹がなく、inflow と outflow の灌流液に明かにヘモグロビンの酸素化に差があることを確認し、また灌流圧が  $20 \text{ cmH}_2\text{O}$  を越えないことを指標とした。

灌流開始30分後、灌流圧が安定していることを確認し実験を開始した。

2) 胆汁量および酸素消費量の測定

胆汁量は総胆管に挿入したポリエチレンチューブより自然落下させ試験管へ集め、30分毎に取り出し、その量をマイクロピペットにて測定した。

酸素消費量は肝の inflow, outflow 側より採血し、それぞれの酸素含量を ABL 2 (Radiometer, Copenhagen) にて測定し、酸素消費量 = 灌流量 × (inflow 灌流液中酸素含量 - outflow 灌流液中酸

素含量) / 100 より求めた。

3) 類洞内血管容積, 血管外アルブミン分布容積, およびシャント率の測定

Goreskey<sup>5,6)</sup> によると標識赤血球の希釈曲線よりピーク時間を求め0時間よりピーク時間までの希釈曲線の面積を求め、この面積の1/2になる時間を  $t_{\text{RBC}}$  とし、 $t_{\text{RBC}} - t_0$  を赤血球の平均循環時間とし、この平均循環時間と血流量の積より類洞内血管容積を計算した。また同時に標識アルブミンを注入し、その  $t_0$  から希釈曲線と標識赤血球の希釈曲線との交差する時間  $t_x$  までの希釈曲線下の面積を求め、その面積が1/2となる時間  $t_{\text{alb}}$  を求め、これを標識アルブミンの平均循環時間とした。そしてこれから赤血球の平均循環時間を引いたものと、灌流量との積から血管外アルブミン分布容積を算出した。肝内血流シャント率は、 $^{46}\text{Sc}$  ( $10 \mu\text{Ci}$ ) 標識 microsphere ( $9 \mu\text{m}$ ) を上記アルブミン、赤血球と同時に門脈内に注入し、肝静脈内への流出量から算出した。

4) 測定操作, 測定時間

実験開始1時間後、および2時間後に  $^{51}\text{Cr}$  ( $10 \mu\text{Ci}$ ) 標識赤血球、 $^{125}\text{I}$  ( $10 \mu\text{Ci}$ ) 標識アルブミン、 $^{46}\text{Sc}$  ( $10 \mu\text{Ci}$ ) 標識 microsphere ( $9 \mu\text{m}$ ) の混合液  $0.2 \text{ ml}$  を門脈内に bolus 注入した。肝静脈からの血液をフラクションコレクター (SF-2120, Advantec, Tokyo, Japan) を用いて1秒毎に50秒間採取し、その比放射能を Packard 社製5320型

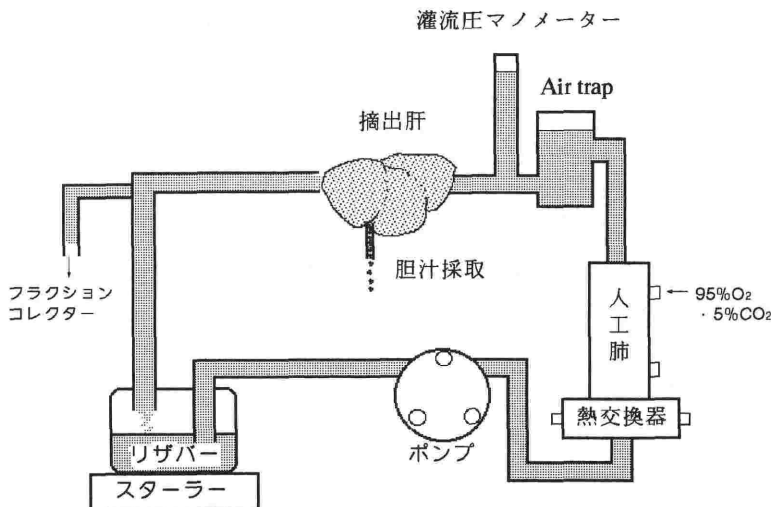


図1 定流量肝灌流装置

gamma scintillation spectrometer にてそれぞれの同位元素毎に測定した。そして、類洞内血管容積、血管外アルブミン分布容積、および肝内血流シャント率を求めた。

5) ET の注入

実験開始1時間後コントロール群8検体(以下C群)には生理食塩水1mlを、ET群8検体には、E. coli endotoxin (0111, B4, Sigma, St Louis) を1mlの生理食塩水に溶解して、灌流液中の濃度が2mg·dl<sup>-1</sup>となるように加えた。

結果は平均±標準偏差で示した。測定値の群間比較には Student t テスト、時間的変化には対応のある t テストを、変化量の時間比較には分散分析によって行った。

結 果

1) 平均灌流圧 (表1)

灌流圧は、ET群でET注入30分後13.1±1.6 cmH<sub>2</sub>O から1時間後に12.6±1.5 cmH<sub>2</sub>O とC群の13.9±1.5から14.0±1.5 cmH<sub>2</sub>O の灌流圧変化に比し低下傾向が見られた(0.05<p<0.10)。

2) 胆汁分泌量 (図2)

ET群では、ET注入直後の30分で0.58±0.45 μl·g<sup>-1</sup> とET投与前の30分間での0.88±0.38に比し分泌量の減少傾向が見られ(0.05<p<0.10)、さらに次の30分では0.29±0.24と減少が見られた(p<0.01)。C群ではET群に対応する各30分間において胆汁分泌量の変化は見られなかった。

3) 酸素消費量 (図3)

酸素消費量はいずれの時間においても両群間に差を認めなかった。

4) 類洞内血管容積および血管外アルブミン分布容積 (図4)

ET注入後血管外アルブミン分布容積は、ET群でやや増加するかの印象を受けたが、統計的に有意ではなかった。類洞内血管容積は0.302±0.040 ml·g<sup>-1</sup>·liver から0.245±0.043とC群の0.307±0.061から0.298±0.072 ml·g<sup>-1</sup>

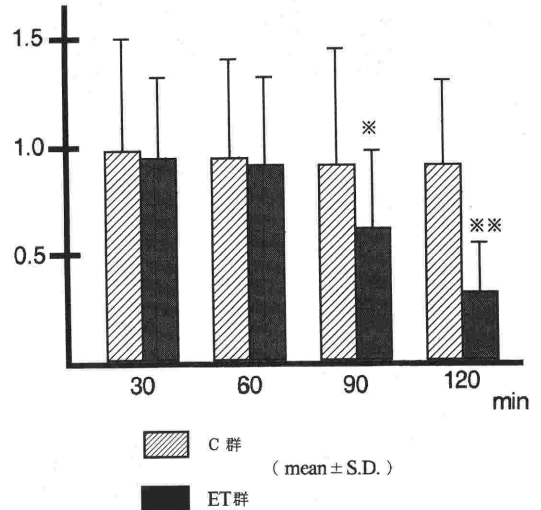


図2 胆汁分泌量 (μl·g<sup>-1</sup>)

\* : 30分後, 60分後からの変化量についてC群との比較 (0.05<p<0.10)  
 \*\* : 30分後, 60分後からの変化量についてC群との比較 (p<0.01)

表1 平均灌流圧, シャント率

		C群 (n = 8)	E群 (n = 8)
平均灌流圧 (cmH <sub>2</sub> O)	30分	15.0±1.6	14.4±2.3
	60分	14.4±1.1	13.4±2.3
	90分	13.9±1.5	13.1±1.6
	120分	14.0±1.5	12.6±1.5*
シャント率 (%)	60分	3.0±1.2	2.7±0.6
	120分	3.1±1.2	3.5±1.0**

(mean±S. D.)

\* : 90分後からの変化量についてC群との比較 (0.05<p<0.10)

\*\* : 60分後からの変化量についてC群との比較 (0.01<p<0.05)

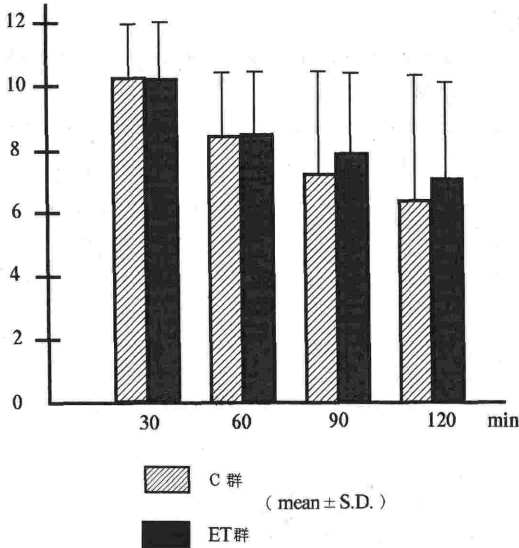


図3 酸素消費量 (ml/min/100 g of the liver)

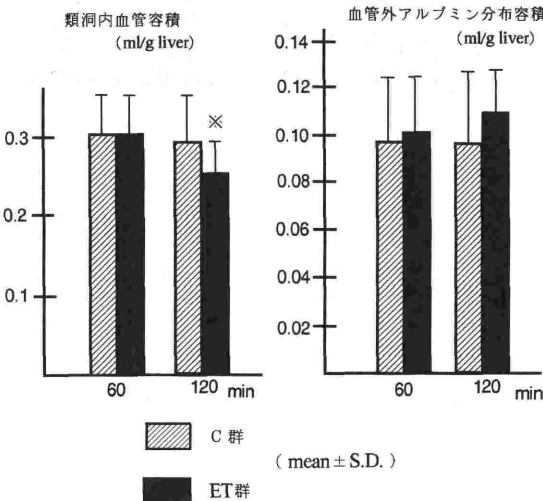


図4 類洞内血管容積と血管外アルブミン分布容積

※: 60分後からの変化量について  
C群との比較 (0.05 < p < 0.10)

・liver の変化に比し減少傾向が見られた (0.05 < p < 0.10).

5) シャント率 (表1)

シャント率は ET 注入後 2.7 ± 0.6% から 3.5 ± 1.1 と増加した (0.01 < p < 0.05).

考 察

重症感染症の際に見られる原因不明の黄疸の多くは ET 血症の共存に原因があると言われている<sup>1)</sup>. そしてこれには ET の直接の肝への影響と、

肝の血流低下による影響とが考えられている. 今回われわれが行った研究では, 肝への血流量は一定に保っていたので ET の肝への影響のみを研究することができたと思える. 今回の研究において, ET 群では, ET 注入後より胆汁分泌量の低下が見られた. これは Utill<sup>2)</sup> らがラット灌流肝で, 1.0 mg% の ET の注入により胆汁分泌量の低下と ICG の低下を認めた研究成績と符合している.

しかし今回の研究で見られた胆汁分泌量の低下が, 胆汁産生の低下によるもの, すなわち肝細胞自体に変化を来たしたためのものか, または胆汁流出障害によるものかは明かでない. 市川<sup>4)</sup> はラットの腸間膜静脈枝から ET を持続注入する急性実験を行い, 肝組織血流量を変化させることなく, ET 自身が肝に直接影響し, 毛細胆管を拡張させ, 毛細胆管周囲のマイクロフィラメントを変性させ, 胆汁鬱滞を来すことを電子顕微鏡にて認めている. しかし, 組織学的に毛細胆管は類洞と接している<sup>7)</sup>, 類洞の形態的あるいは機能的な変化は直接毛細胆管に影響を及ぼすことが考えられる. また, 肝類洞において血液は肝細胞と接している. したがって類洞の血流変化は肝細胞の代謝機能に密接に関係している. そこで今回の研究では, まず ET が肝すなわち類洞内に流れ込んだ時, その類洞を構成する内皮細胞, Kupffer 細胞および肝細胞に作用し, 肝微小循環系にいかなる変化を生じせしめるのかを研究するために, 類洞内血管容積, Disse 腔容積 (血管外アルブミン分布容積), およびシャント率を測定した. その結果, 血管外アルブミン分布容積変化は見られなかったが, 類洞内血管容積は有意ではないが減少する傾向を認め, またシャント率は有意に増加した. 類洞を生体顕微鏡映画法で見た研究<sup>8)</sup> によると ET 注射 5 分後の Kupffer 細胞は, ラテックスを活発に取り込むが, 15 分以内にその取り込みは抑制され, 2 時間後には類洞内の血流速度が低下し, 膨化した内皮細胞によって類洞は閉塞されるという. また, 平間ら<sup>9)</sup> の ET 投与時における肝の経時的な変化を見た研究によると ET 投与後 2 ~ 3 時間後に類洞内にフィブリン様細繊維物質の析出があり, それにより類洞が閉塞されている像が観察されている. そして ET 投与 1 時間では Disse 腔に変化は見られず, 2 ~ 3 時間後に軽度の拡張が見られ, 4 時間後には Disse 腔は著しく拡張す

ることが観察されている。今回の研究では、類洞内血管容積の減少傾向を示したものの、確実に減少すると結論するに至らなかった。また、血管外アルブミン分布容積にも統計的有意な変化を認めるに至らなかった。これは、今回の実験構成上 ET 注入後 1 時間程度までしか類洞内血管容積および血管外アルブミン分布容積を観察できなかったことにも関係しているかも知れない。もし、さらに長時間の観察が行えたならば生体顕微鏡映画法での観察結果<sup>8)</sup> や、平間ら<sup>9)</sup> の研究を裏付ける成績が得られたのではないかとも思われる。また、もし還流する以前、例えば 1～3 時間前に ET をラットに投与していたならばあるいは類洞内血管容積の減少の様相が観察できたのではないかと思われた。

シャント率は ET 注入により有意に増加した。今回の実験で使用した microsphere は 9 μm のもので、このことからこれよりも大孔径の微小血管の血流への増加によりシャント率が増加したものと考えられる。これは、ET 注入後に平均灌流圧が低下傾向を示した事実からも説明し得る。

小山<sup>10)</sup> の報告によると ET ショック時の hyperdynamic state には交感神経系が関与しているという。また、肝では交感神経の興奮によって血流が大きく左右される<sup>11)</sup>。すなわち ET 投与によって発生する低血圧時に腹腔内臓器交感神経活動は低下するのに比較して、心臓支配は初期には上昇もしくは低下した後、他の交感神経系に比して長時間にわたって、投与前のレベルに維持されるという<sup>10)</sup>。しかし今回の研究は摘出肝臓で行われていたため全く交感神経系の影響から隔絶された状態にあった。すなわち、今回の研究結果は ET 自身が直接的に、あるいは他のメディエーターを介して肝微小循環へ影響を及ぼすことが強く示唆された。そして、ET 投与後 1 時間は、肝の類洞内血管容積の減少が僅かなため灌流圧は上昇せずに、大孔径微小血管への血流の増加のためにむしろ、灌流圧は低下する傾向を示したものと考えられる。

Creasey ら<sup>12)</sup> のヒヒを用いた ET ショックの研究では、ET 自体によっては心血管径の変化はなく、ET によって誘導される tumor necrosis factor (TNF) や、interleukin-1β などの cytokine の連鎖反応により起こるのではないかと推

察されている。また窪田ら<sup>13)</sup> のイヌを用いた ET の研究でも、平均動脈圧の低下は、心拍出量の変化とは相関せず、むしろ血中 TNF 濃度の変化と相関しているという。今回の研究では、灌流液には洗浄赤血球を用い、その際に白血球がほとんど除去されていたため、灌流液中に存在する白血球からの cytokine の放出はなかったものと推測される。しかし、肝の Kupffer 細胞は流血中のマクロファージと同基源であると言われ、これから ET により TNF などの cytokine が分泌される<sup>14,15)</sup>。Gadina ら<sup>16)</sup> はマウスに 30 mg·kg<sup>-1</sup> の lipopolysaccharide を投与し、30 分後では血清中の TNF の上昇はなく、60 分後に有意な上昇を認めている。しかし今回の研究で観察された一連の反応が ET によって直接起こったものか、もしくは ET によって分泌された cytokine によって起こったものかは、血清中の TNF 濃度を測定していないため判断するに至らなかった。

今回の研究では ET の投与後 1 時間の観察にとどまったため、微小循環の変化が胆汁鬱滞にどのように関与しているのか解明するには至らなかった。しかしわれわれは ET 注入により 1 時間は肝の類洞内血管容積の減少は僅かであったが、大孔径の微小血管への血流を増加させ、シャント率を増加させ、肝の灌流圧を低下させる作用を有することを認めた。

### 参考文献

- 1) 西田正之, 玉熊正悦, 出井雄幸他: エンドトキシンの胆汁鬱滞作用とその臨床的意義に関する研究. 日外会誌 91: 184-190, 1990.
- 2) Utill, R., Abernathy, C. O., Zimmerman, H. J.: Cholestatic effects of escherichia coli endotoxin on the isolated perfused rat liver. Gastroenterology 70: 248-253, 1976.
- 3) 杉浦有重: エンドトキシンショック時の肝血行動態並びに糖代謝に関する研究—出血性ショックとの比較検討を中心に—. 日外会誌 79: 453-471, 1978.
- 4) 市川栄基: 実験的エンドトキシン起因性急性肝内胆汁鬱滞の発生機序に関する研究. 慶応医学 62: 499-511, 1985.
- 5) Goreskey, C. A.: A linear method for determining liver sinusoidal and extravascular volumes. Am. J. Physiol. 204: 626-640, 1963.
- 6) Goreskey, C. A., Bach, G. G., Nadeau, B. E.: On the uptake of materials by the intact liver. J. Clin. Invest. 52: 975-990, 1973.
- 7) 織田正也, 塚田信廣: 肝細胞の微細構造, 織田敏次編: 肝臓の研究 I. 同文書院, 東京, p. 20-45, 1987.

- 8) 和気健二郎: 類洞細胞の形態と機能, 織田敏次編: 肝臓の研究 I. 同文書院, 東京, p. 50-58, 1987.
- 9) 平間敏憲, 小川勝洋: エンドトキシン投与時におけるラット肝病変の電子顕微鏡的研究. 札幌医誌 46: 425-447, 1977.
- 10) 小山省三: 細菌性ショック時の交感神経活動の特異性. 循環制御 11: 183-190, 1990.
- 11) Reilley, F. D., McCuskey, R. S. and Cilento, E. V.: Hepatic microvascular regulatory mechanisms. Microvasc. Res., 31:103-116, 1981.
- 12) Creasey, A. A., Stevens, P., Kenney, J., et al.: Endotoxin and cytokine profile in plasma of baboons challenged with lethal and sublethal escherichia coli. Circulatory Shock 33:84-91, 1991.
- 13) 窪田達也, 吉沢 睦, 大竹一栄: 低濃度 endotoxin 投与による Endotoxin shock model (イス) 作成の試みと chemical mediator の検討. 臨床麻酔 15: 149-164, 1991.
- 14) 太田康幸, 恩地森一: 肝障害と Killer cell, 織田敏次編: 肝臓の研究 II. 同文書院, 東京, p. 798, 1987.
- 15) Callery, M. P., Kamei, T., Flye, W. M.: Kupffer cell tumor necrosis factor- $\alpha$  production is suppressed during liver regeneration. J. Surg. Research 50:515-519, 1991.
- 16) Gadina, M., Bertini, R., Mengozzi, M., et al.: Protective effect of chlorpromazine on endotoxin toxicity and TNF production in glucocorticoid-sensitive and glucocorticoid-resistant models of endotoxin shock. J. Exp. Med. 173:1305-1310, 1991.

### Effects of endotoxin on hepatic microcirculation in isolated rat liver.

Ken-ichi Kimura

Department of Anesthesiology, Kawasaki Medical School

We studied direct effects of endotoxin on microcirculation in isolated rat liver. Following endotoxin (E. coli 0111, B4, Sigma) administration, bile flow decreased significantly and mean perfusion pressure tended to decrease. Sinusoidal volume tended to be decreased but shunt ratio increased significantly. These results suggested that endotoxin *per se* might

affect directly endothelium and the Kupffer cell by releasing cytokines from the Kupffer cells. Therefore endotoxin might cause cell swelling, and might increase capillary flow. Consequently it explained that endotoxin directly decreased the sinusoidal volume, and increased shunt ratio.