

## *In vivo* 小腸虚血再灌流モデルの構築の重要性

富田 幹雄

### Impact of Establishment in *In Vivo* Intestinal Ischemia/Reperfusion Model

Mikio TOMITA

(Received November 20, 2013)

#### はじめに

虚血性腸疾患とは、血液の循環が悪くなり、小腸に必要な酸素や栄養分が十分に供給されなくなるために、消化管粘膜が虚血となり炎症や潰瘍を生じる疾患である。虚血性疾患には、急性腸間膜動脈閉塞症や虚血性大腸炎、腹部アンギナ、非閉塞性腸管虚血症、慢性腸間膜静脈血栓症、慢性腸間膜動脈拳血症、腹腔動脈圧迫症などがある。さらにこの他に、移植手術などの外科的処置における虚血再灌流による障害、すなわち副次的に誘発される虚血性腸疾患も挙げられる。

近年、超高齢化社会の到来に対応し、更なる未来型医療の実現が望まれている。その一つに、自己修復能力の限界を超えた慢性的機能不全臓器を健常臓器に取り替える医療、すなわち移植医療が挙げられる。1997年10月に「臓器移植に関する法律」が施行され、わが国でも脳死臓器移植が実施され、さらに人工臓器・再生医工学の研究等により、移植医療は21世紀型医療として進歩の途にある。さらに、2009年7月に臓器移植に関する法改正により、日本においても15歳以下の臓器移植が事実上可能となった。このことから、社会における移植医療に対する注目度および期待度はさらに上昇し、症例数も増加することが予測できる。しかしながら、脳死移植は脳死を個体死とするか否かという倫理的障壁や行政上の問題等克服すべき社会的問題が多く、人工臓器も生体機能代替性、生体適合性といった問題を抱えている。また胚性幹細胞(ES細胞)を用いた再生医工学は、無限増殖能というある種のガンの性質を持つES細胞そのものの安全性の問題や、多数のヒト胚を使用するため倫理的な重要問題が数多く残されている。

上記の状況の中でも、心臓・肝臓・腎臓などの臓器移植は、免疫抑制剤であるシクロスポリンの登場により移植成績を向上させ、一般的な治療法として

の地位を確立した。これに対して、小腸も長く移植に関して“許されざる臓器”とみなされてきた。近年、タクロリムスの臨床導入により小腸は移植対象臓器となり、タクロリムスによる小腸移植の1年生存率は60~70%、3年生存率は40~50%を得るに至った<sup>1)</sup>が、この成績は他の臓器移植に比較するといまだに満足できるものではなく、一般臨床への応用が難しい治療法である。その理由として、小腸は腸内細菌叢を含む外界と直接接している組織であり、感染症が容易に起こりやすいこと、<sup>2)</sup>リンパ組織が豊富なため、拒絶反応が起こりやすい上に拒絶反応の診断が難しいこと、虚血再灌流障害を受けやすい臓器であることなどが挙げられており、<sup>3-4)</sup>成績向上のために改良すべき点を多く残している。

小腸移植は小腸の消化、吸収不全のために、栄養、水分、電解質などを経静脈的に補給しなければ生命を維持することができない小腸不全の患者を対象に行われる。原疾患は腸帯ヘルニア、腸捻転、腸閉鎖、新生児壊死性腸炎、上腸間膜動静脈血栓症、クローン病、外傷などさまざまであるが、小腸大量切除後の短腸症候群が小腸機能不全のほとんどを占めている。小腸機能低下に対する基本的な治療法としては中心静脈栄養(Total Parental Nutrition: TPN)などによる栄養管理が行われているが、カテーテルに起因する感染症や血栓症を頻回に繰り返す、輸液ルートが確保できなくなる例や、高カロリー輸液により胆汁うっ滞型の肝機能障害が発生し、TPNを続けられない例には、小腸移植が唯一の手段となる。<sup>5-6)</sup>欧米で実施された小腸移植のほとんどは脳死体からの移植であるが、日本では、深刻なドナー不足のため脳死体からの移植が進んでいない。このような背景から、小腸は部分生体移植が可能な臓器であるため、まだ例数は少ないものの、近年、生体小腸移植が実施されるようになり注目を集めている。

過去には重症患者に対する最終手段としての最先端医療であった臓器移植医療も、上記のように新規免疫抑制剤の開発により最大の課題である臓器拒絶を克服し始め、今や施術されるたびに大きく報道されるようなことはなくなった。また、臓器保存技術、手術手技自体の向上により、患者の生存成績を中心に評価した場合の移植後成績も確実に伸びている。しかしながら、移植医療が普及医療と呼べるまでに発展しないのは、拒絶反応とは別にいまだ解決されていない課題を抱えているからである。

臓器移植の抱える問題は多岐にわたり、急性拒絶反応とその抑制のために行われる免疫抑制に起因する副作用、虚血再灌流障害、慢性拒絶反応などが、治療上の問題として提起されている。これらの中で、生体小腸移植の問題点としては特に、虚血再灌流による術後早期の障害が移植医療を脅かす重大な問題として認識されつつある。虚血再灌流とは“血管の結紮とその後の血管の開放”という外科的に施行される医療技術であり、施術後周辺部位に起こる浮腫や壊死といった副作用を虚血再灌流障害と称する。

虚血再灌流によりさまざまな臓器が障害を受けるが、非吸収性物質の尿中排泄が認められるなど小腸粘膜バリアー機能の低下が数多く報告されている。<sup>7-10</sup> 特に、消化管上皮細胞は外界と体内との境界線でもあることから、生体にとって好ましくない異物の体内侵入に対して極めて精巧な防御システムを敷いている。しかしながら、消化管の虚血再灌流による膜バリアー機能の低下がバクテリアのトランスロケーションを引き起こし、<sup>7,11-12</sup> 結果として多臓器不全を誘発し、死に至る場合がある。<sup>11-13</sup> また、移植時の虚血再灌流は慢性拒絶反応の増悪因子となる可能性も指摘されている。<sup>14</sup> さらに、移植時の虚血は施術されるレシピエントのみならず、移植されるドナー組織も、ドナー体内より切除されてからレシピエントに移植されるまでの時間、虚血状態にある。

したがって、移植手術はレシピエントとドナーの二重の虚血を抱えることになり、臓器保存の観点や、ドナー数の飛躍的な増加につながる可能性からも、移植医療における虚血再灌流障害克服は重大な課題である。このように虚血再灌流障害は小腸移植そのものを根底から否定し兼ねず、“移植”を内科的治療の限界を超える21世紀の医療と位置づけ、最先端医療から普及医療へと発展させるた

めには、拒絶反応に加えて虚血再灌流障害の克服が求められる。

一方、小腸移植後の術後管理の問題点としては、免疫抑制療法が挙げられ、小腸移植では免疫抑制と過剰免疫による感染症の間でその投与量、併用薬剤などで非常に繊細かつ微妙なバランスをとらなければならない。免疫抑制療法は、タクロリムスとステロイドの2剤併用あるいはこれに代謝拮抗薬を加えた3剤併用が一般的であり、<sup>2-3</sup> タクロリムスは免疫抑制療法の礎石である。しかしながらタクロリムスの場合、移植片の拒絶反応を抑制し、かつ腎毒性や神経毒性などの副作用の危険性が低い治療域が、 $10\sim 20\text{ ng/mL}$ と狭いため、<sup>15</sup> 血中濃度管理が必要不可欠な薬物である。

経口投与された薬物の腸管吸収ルートは、生理解剖学的に腸管上皮細胞における細胞間隙経路 (Paracellular route) と細胞内経路 (Transcellular route) の2つに大別される。<sup>16</sup> 前者の細胞間隙経路による薬物の吸収は、細胞同士の接着部分である Tight Junction (TJ) により調節されていることが知られている。また、後者の細胞内経路による薬物の輸送には、pH分配理論に従う受動拡散による輸送と、薬物輸送タンパクであるトランスポーターが関与している輸送がある。P-glycoprotein (P-gp/MDR1) は、ATP binding cassette (ABC) を1分子中に2カ所有する ABC transporter (ABCB1) として知られており、ATPの加水分解により生じるエネルギーを直接駆動力として、薬物を上皮細胞内から腸管腔側へと能動的に排泄する一次性能動輸送に関与するトランスポーターとして機能し、免疫抑制剤の吸収動態を制御している。免疫抑制剤であるタクロリムスの体内動態には個人差や同一患者での変動が大きく、経口投与時のバイオアベイラビリティは変化しやすい。<sup>17</sup> 生体に投与されたタクロリムスは、主として肝臓に発現する CYP3A4 によって代謝され、代謝物および未変化体は P-gp を介して胆汁中に排泄される。P-gp や CYP3A4 は小腸粘膜にも発現しており、薬物の吸収過程においてそれぞれ排泄・代謝の作用を有することにより、吸収障壁として機能することから、経口投与されたタクロリムスの血中濃度を支配する重要な生体因子として位置づけられている。また、術後1週間という早期には、小腸移植患者の回腸および空腸移植片において、CYP3A4 は正常レベルであるが、P-gp 発現量は高く、経口投与されたタクロリムスの低いバ

イオアベイラビリティは P-gp 発現量に起因することが報告されており、<sup>15,17-19)</sup> 主として小腸での P-gp が薬物消失に大きく寄与していると考えられる。したがって、移植手術時の虚血再灌流が P-gp 機能や発現の変動を誘発する場合は、タクロリムスの個別投与設計に重要な影響を及ぼすことになる。

以上の背景を踏まえると、小腸虚血再灌流による各種因子の変動を検討するためには、*in vivo* 小腸虚血再灌流モデルの構築重要課題である。これまでの報告では、*in vivo* 小腸虚血再灌流モデルの作成方法としては、外科用クリップを用いて腸間膜動脈を結紮する方法が一般的だが、この方法よりも、血管への負荷を調節することができ、虚血の程度を変化することができるため利用性および有用性が高い、バネ秤と手術用縫合糸を用いた装置による *in vivo* 小腸虚血再灌流モデルの構築の例を挙げることにする。

本モデルの構築は、虚血再灌流障害の克服につながるのみではなく、薬物の吸収制御因子の変動に応じた薬物投与設計の個別化から、その制御因子の受ける免疫抑制剤の適正使用に有益な情報を与えるものであり、移植医療の安全性の向上につながるものと考えられる。

## 実例の紹介

臓器移植は臓器不全に対する内科的治療の限界を越える新しい治療法と位置づけられ、特に近年、生体小腸移植が実施され注目を集めている。移植に関する問題として、術後ある程度の時間が経過した後に現れる拒絶反応に加え、手術時に行う血管の結紮とその後の血管（血流）の開放という操作によって誘発される、いわゆる虚血再灌流障害も大きな問題として認識されている。

各種動物実験において、虚血再灌流障害後に [<sup>51</sup>Cr]EDTA<sup>7)</sup> やフルオレセイン<sup>20)</sup> のような非吸収性物質の尿中排泄が認められるなど、虚血再灌流による腸管粘膜の透過性亢進が報告されている。これは TJ 開口による細胞間隙経路の拡大に起因するものと考えられており、活性酸素種<sup>21-24)</sup> や内皮細胞由来の Nitric Oxide (NO)<sup>25-27)</sup> がその原因物質として挙げられているが、その詳細は現在のところ明らかではない。

これまでに、ヒト結腸癌由来 Caco-2 細胞を用いて、虚血再灌流による腸管粘膜構造などの変動（特に細胞間隙接着部 Tight Junction (TJ) の変化）

について、*in vitro* における細胞レベルでの詳細な検討を行い報告している。<sup>28-31)</sup> このような培養系を用いた *in vitro* モデルによる検討は、詳細な障害機構を解明する上で有用である一方、生体の持つ回復能や防御能、免疫系などを含む本来の生体内現象や、薬物体内動態の変動を詳細に反映することは困難である。

これまでに、小腸虚血再灌流に関する研究は *in vivo* においても多くなされており、*in vivo* 小腸虚血再灌流モデルの作成方法の多くは、Treitz 靭帯を剥離し腸間膜動脈を露出させ、外科用クリップを用いて結紮する方法が多い。<sup>32-34)</sup> しかしながらこの方法では、外科用クリップの繰り返し使用による血管に対する把持力の低下から、病態モデルのバラつきが懸念され、さらに Treitz 靭帯の剥離そのものの影響も十分に懸念される。

一方、移植時には腸間膜動脈だけではなく、腸間膜静脈も結紮される。ドナーから摘出された腸管のみを考えるのであれば、動脈結紮によるモデルでの検討のみでも十分だと考えられるが、レシピエントの観点から考えると、上記のような動脈のみの結紮モデルではなく、動脈および静脈を結紮したケースでのモデルを用いての検討が必要であると考えられる。

本稿では、バネ秤と手術用縫合糸を用いた装置による新しい *in vivo* 小腸虚血再灌流モデルの構築について紹介する。

## 虚血時の腸間膜動静脈に対する適切な負荷力の検討

バネばかりにかけた手術用縫合糸を用いて、腸間膜動静脈を吊り上げることにより血流を遮断し虚血状態とした。虚血開始 60 分後、手術用縫合糸

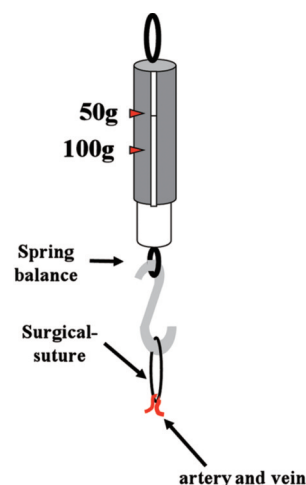


Fig. 1. Material used in this study

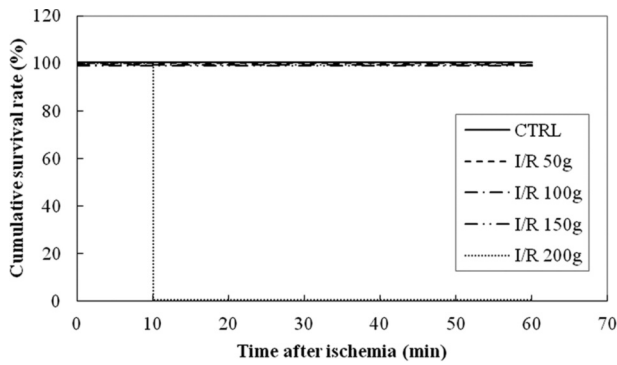


Fig. 2. Effect of intestinal ischemia on survival ratio. Results represent means ( $n=5\sim10$  for each condition).

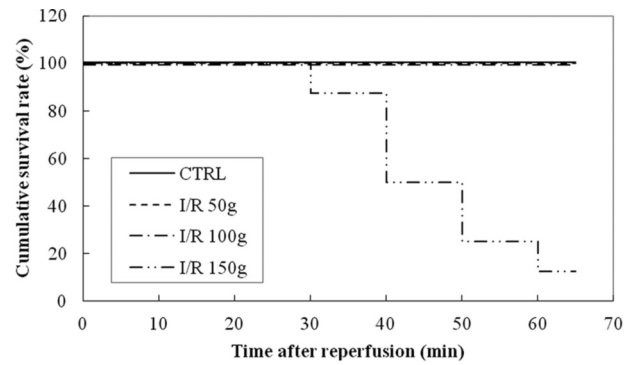


Fig. 3. Effect of intestinal ischemia/reperfusion on survival ratio. Results represent means ( $n=8$  for each condition).

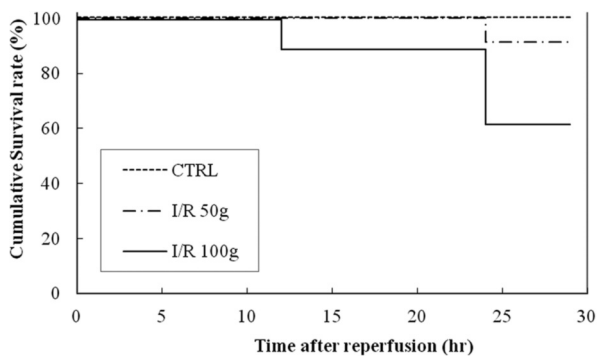


Fig. 4. Effect of intestinal ischemia/reperfusion on survival ratio. Results represent means ( $n=9\sim59$  for each condition).

を切断することにより血管を開放し再灌流状態とした (Fig. 1).

小腸虚血再灌流モデルを構築するに当たり、虚血時のラットの腸間膜動静脈に対する負荷力を検討した。使用するラットの体重が250 g前後であることから、負荷力を50 g単位で増大させ、最大で200 gに設定した。

虚血時の腸間膜動静脈に対する負荷力を50, 100, 150, 200 gに設定し、虚血開始から60分後の生存率の検討を行った。50, 100, 150 g負荷群においては、虚血60分間の生存率は100%であったが、200 g負荷群においては、虚血開始から10分以内に腸間膜動静脈が縫合糸により切断されてしまうことから、虚血10分以降の生存率は0%となった (Fig. 2)。以上の結果より、以後の実験には負荷力50~150 gでの検討を行った。

Fig. 2の検討において60分間の虚血に耐えられた50, 100, 150 g負荷の3条件において、虚血後の血管の開放、すなわち再灌流開始から60分後までの生存率の検討を行った。50, 100 g負荷群にお

いては、再灌流開始後60分までの生存率は100%であったのに対し、150 g負荷群においては、再灌流開始後60分までの生存率は約10%であった (Fig. 3)。以上の結果より、負荷力150 gにおける検討は困難であることが示されたため、以降は50, 100 gの2条件にて検討を行った。

また、早期の虚血再灌流に加え、中・長期的虚血再灌流における薬物療法を念頭に、再灌流時間に着目し、経時的に生存率を検討した。その結果、再灌流後24時間までの生存率は、50 g負荷で約90%、100 g負荷で約60%と、Fig. 3の再灌流1時間までの検討において100%の生存率を示していた虚血条件においても、24時間後までに生存率が低下することが示された (Fig. 4)。

### Thiobarbituric Acid-Reactive Substance 生成量の検討

前項では、検討可能な腸間膜動静脈への負荷力の設定を行った。虚血再灌流時には、脂質過酸化の誘導が報告されている。<sup>34-36)</sup>そこで、脂質過酸化の指標となる Thiobarbituric Acid Reactive Substances (TBA-RS) の生成量を測定することにより、本モデルの小腸虚血再灌流モデルとしての妥当性を評価した。TBA-RSは水溶性の高い物質であることから、回腸に作成したloop内に phosphate buffer saline (PBS) を投与し、PBS中に漏出したTBA-RSを測定し評価した (Fig. 5)。

TBA-RSの生成量は、再灌流後1時間まで、control群に比較して、50 g負荷の虚血再灌流群で約1.9倍、100 g負荷の虚血再灌流群で約3倍と、虚血時の負荷力依存的に有意な増加を示した。再灌流後3時間までのTBA-RSの生成量は、control

群に比較して、虚血時の負荷力依存的に有意な増加を示した。さらに、再灌流後1時間までの生成量に比較して高い値を示した。一方、再灌流後24時間におけるTBA-RSの生成量は、再灌流後1および3時間に比較して低い値を示したが、100 g 負荷の虚血再灌流群においても50 g 負荷と同様であったが、TBA-RS生成量は、control群と比較して約2倍の増加を示した (Fig. 5)。

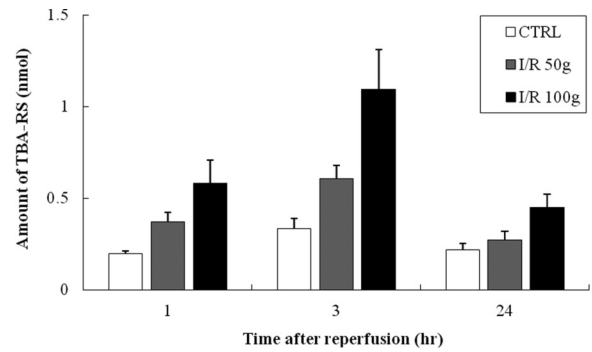


Fig. 5. Effect of intestinal ischemia/reperfusion on thiobarbituric acid-reactive substance (TBA-RS) production in ileal perfusate.

Results represent means and S.E. (n = 5~12 for each condition). \*P<0.05 compared with control conditions.

消化管粘膜変動の検討

各種動物実験において虚血再灌流後には、<sup>[51Cr]</sup>EDTA<sup>7)</sup> やフルオレセイン<sup>20)</sup> のような非吸収性物質の尿中排泄が認められ、虚血再灌流による腸管粘膜の透過性亢進が報告されており、さら

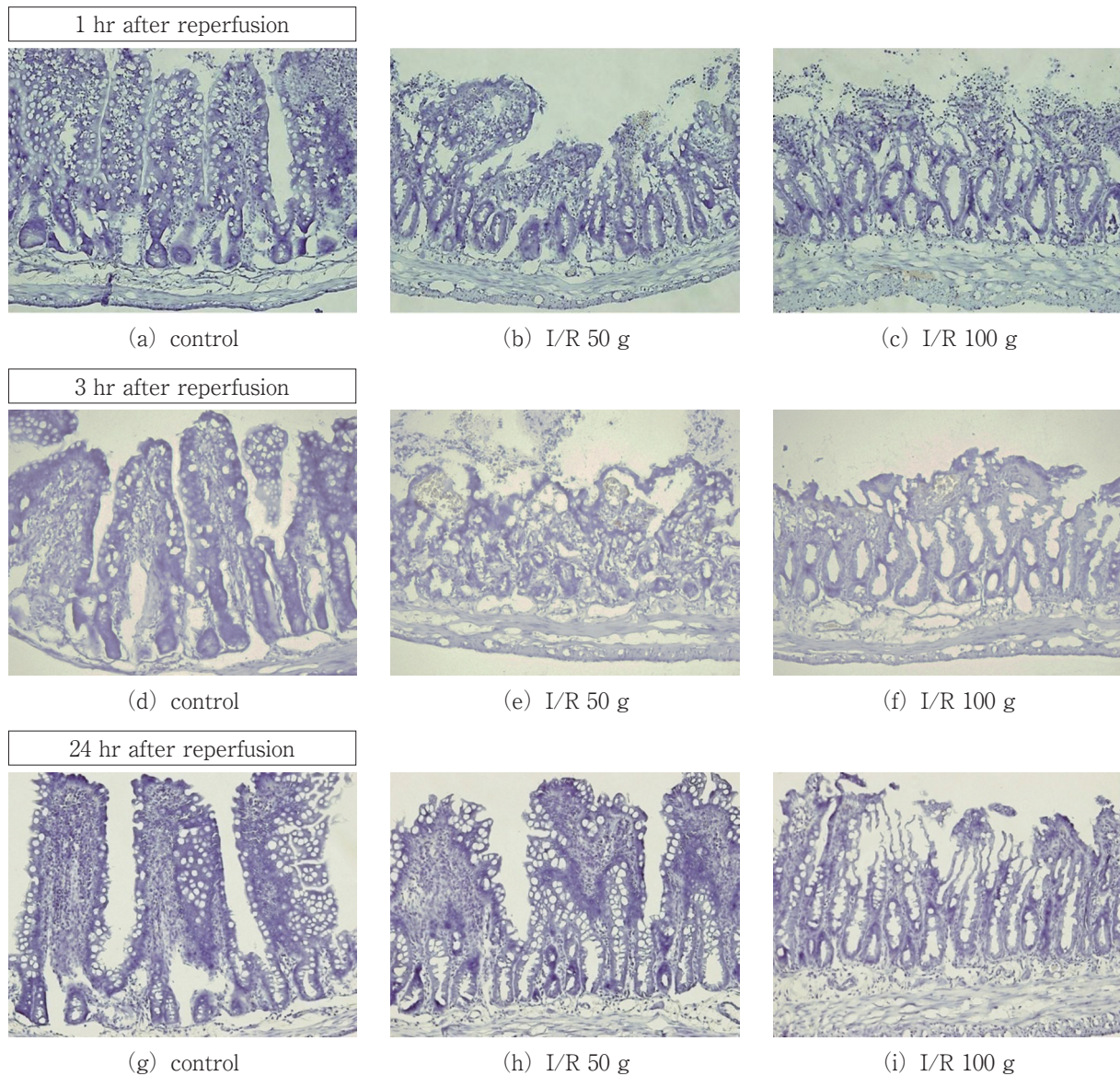


Fig. 6. Effect of intestinal ischemia/reperfusion on histological changes of ileal mucosal epithelium at 1 hr (a~c), 3 hr (d~f) and 24 hr (g~i).

Frozen section of ileal were stained with Hematoxyline and Eosin. 400X.

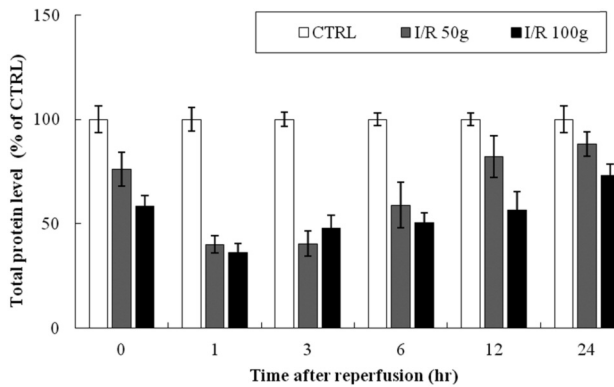


Fig. 7. Effect of intestinal ischemia/reperfusion on total protein level in ileum.

Results represent means and S.E. ( $n=4\sim7$  for each conditions). \* $P<0.05$  compared with control conditions.

に種々の腸管粘膜障害が報告されている。<sup>37,38)</sup>したがって、小腸虚血再灌流モデルにおいて消化管粘膜構造の変化を確認することは必要不可欠である。このことから、本モデルにおける小腸虚血再灌流による消化管粘膜構造の変化を検討した。

まず、凍結組織切片を核染色法により染色し、腸管粘膜構造の経時変化を視覚的に評価した。

再灌流後1時間における腸管粘膜の構造は、control群に比較して、50g負荷の虚血再灌流群で、絨毛(villi)の脱落や高さに影響が見られ、100g負荷の虚血再灌流群では絨毛の構造すら維持できない状態であり、虚血時の負荷力に依存した腸管粘膜構造の破壊が確認された(Fig. 6a, b, c)。

また、再灌流後3時間においても、control群に比較して虚血再灌流群で、虚血時の負荷力に依存した腸管粘膜構造の破壊が見られ、さらに、50g負荷と100g負荷に差が見られず、障害の進行が確認された(Fig. 6d, e, f)。

一方、再灌流後24時間では、50g負荷の虚血再灌流群でcontrol群と同程度にまで回復が見られ、100g負荷の虚血再灌流群においても回復傾向が確認された(Fig. 6g, h, i)。

次に、消化管粘膜における総タンパク量および粘膜からのリン脂質の脱落量を測定することで、粘膜変化を定量的に評価した。

腸管粘膜中総タンパク量は、再灌流後1時間および3時間において、control群に比較して虚血再灌流群において、虚血時の負荷力に依存して有意に減少した。また、再灌流後24時間においては、3群間において有意な差が認められなくなり、両虚血再灌流群時において回復傾向が認められた(Fig. 7)。

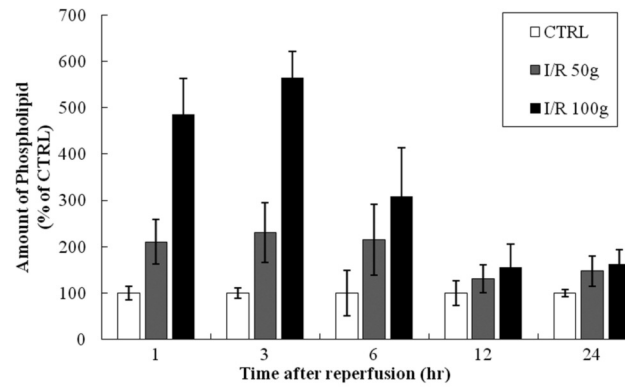


Fig. 8. Effect of intestinal ischemia/reperfusion on leaked phospholipid from ileal mucosa.

Results represent means and S.E. ( $n=4\sim11$  for each condition). \* $P<0.05$  compared with control conditions.

膜リン脂質の脱落量は、再灌流後1時間で、control群に比較して、50g負荷の虚血再灌流群で約1.8倍、100g負荷の虚血再灌流群で約5.4倍と、虚血時の負荷力依存的に有意な増加を示した。再灌流後3時間までの膜リン脂質の脱落量は、control群に比較して、虚血時の負荷力依存的に有意な増加を示した。さらに、再灌流後1時間までの生成量に比較して高い値を示した。再灌流開始3時間後以降は、リン脂質の脱落量は減少傾向を示し、再灌流開始24時間後には依然として虚血時の負荷力依存的な増加傾向が示されたが、controlレベルへ収束する傾向が示された(Fig. 8)。

#### 考察として

バネばかりと手術用縫合糸を用いて腸間膜動静脈を吊り上げる虚血法は、Treitz靭帯を剥離する必要がないため、虚血以外の手術が生体に及ぼす影響はクリップを用いた方法より軽度であると考えられる。

また、外科用クリップを用いた虚血法は、各クリップ間やクリップの劣化などによって把持力に差が生じ、一定の虚血状態が作成しにくいという欠点がある。これに対して本方法は、毎回一定の負荷力をかけることが可能であり、さらに段階的な力を負荷することが可能であるため、虚血の程度を数段階に分けることができ、生体に対する虚血再灌流の影響を検討するのに適している。

以上より、バネばかりと手術用縫合糸を用いた装置における虚血作成方法は外科用クリップを用いる虚血作成方法よりも有用であると考え、本法を採用した。

まず、虚血時の腸間膜動静脈に対する負荷力の条件を虚血時の生存率から検討した。その結果、50, 100, 150 g 負荷では予定している実験時間中の生存率が100%であるために検討は可能であるが、200 g 負荷では生存率が0%となり検討は不可能であることが示された (Fig. 2)。さらに、再灌流時の生存率から、150 g 負荷では生存率が約10%であるために、この条件を検討に用いるのは不適当であることが示された (Fig. 3)。以上の結果より、虚血再灌流実験を行う際の、虚血時の血管に対する負荷力として、50, 100 g が適当であると判断した。

また、中・長期的な薬物療法を念頭に、再灌流時間に着目し、経時的に生存率を検討した。その結果、再灌流後24時間までの生存率は、50 g 負荷で約90%、100 g 負荷で約60%と、これまでの早期(再灌流後1時間まで)の検討において100%の生存率を示していた虚血条件においても、24時間後までに生存率が低下することが示された (Fig. 4)。この要因としては、再灌流の時間経過に伴い、他臓器障害が誘発され、生存率に影響を及ぼしたと考えられる。

一方、バネばかりと手術用縫合糸を用いた装置による小腸虚血再灌流モデルを作成するに当たり、本モデルが小腸虚血再灌流モデルとして妥当であるか否かを、他の方法により作製された小腸虚血再灌流モデルと比較し、評価するための指標が必要である。

脂質過酸化の程度を表す指標として、Malondialdehyde (MDA) と alkadienal (赤色色素反応) を示す、TBA-RS の測定が一般的に用いられている。脂質過酸化による自動酸化に伴い発生する MDA が、外科用クリップにより腸管膜動脈を60分間結紮し、再灌流後120分で正常群に対して約2倍になるという報告がある。<sup>34)</sup> また、30分間の虚血と、その後の再灌流24時間においては、小腸により MDA の生成量が正常群に対して約6倍になるという報告もある。<sup>36)</sup> これらの報告から、小腸虚血再灌流による脂質過酸化の誘導は明らかである。

そこで、次に、バネばかりと手術用縫合糸を用いた装置により作成した小腸虚血再灌流モデルにおいて脂質過酸化の誘導を確認することにより、本方法により作成した病態モデルの小腸虚血再灌流モデルとしての妥当性を評価した。

50, 100 g 負荷の小腸虚血再灌流群において、TBA-RS の生成量は control 群と比較して、50 g 負荷の虚血再灌流群で約1.7倍、100 g 負荷の虚血再灌流群で約3.8倍と虚血時の負荷力依存的に増大したことから、小腸において脂質過酸化が進行していることが示された (Fig. 5)。したがって、50, 100 g 負荷によるモデルの、小腸虚血再灌流モデルとしての妥当性が示された。

さらに、再灌流後3時間までの検討時間において、control 群に比較して虚血時の負荷力依存的に有意な増加を示したことから、虚血再灌流による脂質過酸化反応の誘導が示され、時間経過に伴う TBA-RS 生成量の増大から、脂質過酸化反応の進行が示された。また、再灌流後24時間においても、control 群に比較して100 g 負荷の虚血再灌流群で生成量の増大を示したことから、24時間後においても脂質の過酸化が示された。このような TBA-RS の生成量の経時変化は、膜リン脂質の脱落量と対応する結果 (Fig. 8) となり、以上の結果をまとめると、虚血再灌流による粘膜障害は脂質過酸化に起因する障害であることが確認された。小腸の粘膜表面には輪状のひだがあり、そのひだには絨毛 (villi) と呼ばれる突起がある。絨毛の外側は単層の上皮細胞によって形成されており、内部の粘膜固有層には毛細血管やリンパなどが見られる。さらに、上皮細胞の頂側膜 (apical) には微絨毛 (microvilli) が存在しており、その構造から刷子縁膜 (brush-border membrane) と呼ばれている。<sup>39)</sup> 薬物の消化管吸収過程は、消化管管腔内から上皮細胞の頂側膜を透過して細胞内へ移行し、細胞内を拡散後、側底膜 (basal) を透過して血管側へと運ばれる細胞内経路 (Transcellular route) と、細胞同士の接合部 (Tight junction : TJ) から側細胞間隙にかけての細胞間隙経路 (Paracellular route) の2つに大別される。<sup>40)</sup>

そこで、さらに、凍結組織切片を核染色法により染色し、腸管粘膜構造の変化を検討した結果、再灌流後1時間および3時間において、虚血時の負荷力に依存した腸管粘膜構造の破壊が確認され (Fig. 6a-f)、再灌流後24時間では、control 群と同程度にまで回復あるいは回復傾向が確認された (Fig. 6g, h, i)。また、腸管粘膜中タンパク量も同様の傾向が見られ、Fig. 5の結果を支持するものであることが示された。小腸虚血再灌流による腸管粘膜障害に可逆性が見られたことから、*in vivo* 小腸虚血再

灌流モデルの妥当性がより明確に示され、中・長期的な腸管粘膜バリアー機能の変動について、さらに詳細な検討が可能であることが示された。

### おわりに

小腸移植の場合、腸管粘膜は虚血再灌流による障害に抵抗性の低い組織であり、虚血再灌流による腸管粘膜構造の変化を明らかにすることは重要である。これまでに虚血再灌流による脂質過酸化反応に応じて、TJの開口が報告されており、<sup>28-31)</sup> TJ開口による細菌のトランスロケーションが誘発され、種々の障害を引き起こす可能性があるため、虚血再灌流のTJに与える影響も、経時的に検討する必要があると考えられる。また、NOが経上皮膜間電気抵抗 (TEER) を低下させることや、<sup>41)</sup> TJのアダプタータンパク質である Zonula Occludins (ZO) タンパク質の発現量を低下させることが報告されており、<sup>42)</sup> TJ開口の要因としてNOに着目した検討も行う必要があると考えられる。

### REFERENCES

- 1) 藤堂 省, 古川博之, 小腸移植・腹部多臓器移植. 医学のあゆみ, **196**, 1045-1050 (2001).
- 2) 古川博之, 岸田明博, 木村孝志, 藤堂 省, 小腸移植の現状と問題点. 最新医学, **53**, 71-77 (1998).
- 3) McCord J. M., Oxygen derived free radicals in postischemic tissue injury. *N. Engl. J. Med.*, **312**, 159-163 (1985).
- 4) Bulkley G. B., The role of oxygen free radicals in human disease processes. *Surgery*, **94**, 407-411 (1983).
- 5) 藤堂 省, 古川博之, 小腸不全の治療. 医学のあゆみ, **186**, 853-857 (1998).
- 6) 堀 誠司, 落合武徳, 小腸移植の現状と展望. 千葉大学医学部外科学第二講座ホームページ.
- 7) Kubes P., Hunter J., Granger D. N., Ischemia/reperfusion-induced feline intestinal dysfunction: importance of granulocyte recruitment. *Gastroenterol.*, **103**, 807-812 (1992).
- 8) Roumen R. M. H., Van der Vliet J. A., Wevers R. A., Goris R. J. A., Intestinal permeability is increased after major vascular surgery. *J. Vasc. Surg.*, **4**, 734-737 (1993).
- 9) Villarreal D., Grisham M. B., Granger D. N., Nitric Oxide donors improve gut function after prolonged hypothermic ischemia. *Transplantation*, **59**, 685-689 (1995).
- 10) Kim J., Fryer J., Craig R. M., Absorptive function following small intestinal transplantation. *Dig. Dis. Sci.*, **43**, 1925-1930 (1998).
- 11) Xu D., Lu Q., Kubicka R., Dietch E. A., The effect of hypoxia/reoxygenation on the cellular function of intestinal epithelial cells. *J. Trauma*, **46**, 280-285 (1999).
- 12) Horton J. W., Walker P. B., Oxygen radicals, lipid peroxidation, and permeability changes after intestinal ischemia and reperfusion. *J. Appl. Physiol.*, **74**, 1515-1520 (1993).
- 13) Sun Z., Wang X., Deng X., Borjesson A., Wallen R., Hallberg E., Andersson R., Phagocytic and intestinal endothelial and epithelial barrier function during the early stage of small intestinal ischemia and reperfusion injury. *Shock*, **13**, 209-216 (2000).
- 14) 磯部光章, 安全な移植技術の開発をめざして. 医学のあゆみ, **196**, 885-889 (2001).
- 15) Masuda S., Uemoto S., Hashida T., Inomata Y., Tanaka K., Inui K., Effect of intestinal P-glycoprotein on daily tacrolimus trough level in living donor small bowel recipient. *Clin. Pharmacol. Ther.*, **68**, 98-103 (2000).
- 16) Banan A., Choudhary C., Zhang Y., Fields J. Z., Keshavarzian A., Oxidant-induced intestinal barrier disruption and its prevention by growth factors in a human colonic cell line: role of the microtubule cytoskeleton. *Free Rad. Biol. Med.*, **28**, 727-738 (2000).
- 17) Hashida T., Masuda S., Uemoto S., Saito H., Tanaka K., Inui K., Pharmacokinetic and prognostic significance of intestinal MDR1 expression in recipient of living donor liver transplantation. *Clin. Pharmacol. Ther.*, **69**, 308-316 (2001).
- 18) Kaplan B., Lown K., Craig R., Abecassis M., Kaufman D., Leventhal J., Stuart F., Meier-Kriesche H., Fryer J., Low bioavailability of cyclosporine microemulsion and tacrolimus in a small bowel transplant recipient: Possible relationship to intestinal P-glycoprotein activity. *Transplantation*, **67**, 333-335 (1999).
- 19) Masuda S., Uemoto S., Goto M., Fujimoto Y., Tanaka K., Inui K., Tacrolimus therapy according to mucosal



- MDR1 levels in small-bowel transplant recipients. *Clin. Pharmacol. Ther.*, **75**, 352–361 (2004).
- 20) Salzman A., Wollert P. S., Wong H., Menconi M. J., Youssef M. E., Compton C. C., Fink M. P., Intraluminal oxygenation ameliorates ischemia/reperfusion-induced gut mucosal hyperpermeability in pigs. *Circulatory Shock*, **40**, 37–46 (1993).
- 21) Kooij A., Bosch K. S., Frederiks W. M., Van Noorden C. J., High levels of xantine oxidase in rat endothelial, epithelial and connective tissue cells. A relation between localization and function? *Virch. Arch. B. Cell Pathol. Mol. Pathol.*, **62**, 143–150 (1992).
- 22) Parks D. A., Williams T. K., Beckman J. S., Conversion of xantine dehydrogenase to oxidase in ischemic rat intestine: a reevaluation. *Am. J. Physiol.*, **254**, G768–G774 (1988).
- 23) Henkel J., Sane P. V., Wildner G. F., The oxygen-dependent deactivation and reactivation of spinach ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase. *Biochim. Biophys. Acta*, **614**, 564–576 (1980).
- 24) Menconi M. J., Unno N., Smith M., Aguirre D. E., Fink M. P., Nitric oxide donor-induced hyperpermeability of cultured intestinal epithelial monolayers: role of superoxide radical, hydroxyl radical, and peroxynitrite. *Biochim. Biophys. Acta*, **1425**, 189–203 (1998).
- 25) Takada K., Yamashita K., Sakurai Y., Shigematsu K., Hamada Y., Hioki K., Taniyama K., Participation of Nitric Oxide in the mucosal injury of rat intestine induced by ischemia-reperfusion. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **287**, 403–407 (1998).
- 26) Hotter G., Closa D., Pardos M., Fernandez-Cruz L., Prats N., Gelpi E., Rosello-Catafau J., Intestinal preconditioning is mediated by transient increase in Nitric Oxide. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **222**, 27–32 (1996).
- 27) Wada K., Kamisaki Y., Ohkura T., Kanda G., Nakamoto K., Kishimoto Y., Ashida K., Itoh T., Direct measurement of nitric oxide release in gastric mucosa during ischemia-reperfusion in rats. *Am. J. Physiol.*, **274**, G465–G471 (1998).
- 28) Tomita M., Nagira M., Hotta Y., Kobayashi C., Ohkubo R., Hayashi M., Assessment using monolayers of human intestinal epithelial cell line Caco-2 for ischemia/reperfusion-induced epithelial dysfunction. *Organ Biol.*, **7**, 87–94 (2000).
- 29) Tomita M., Nagira M., Haga M., Hayashi M., Clarification of the mechanism of structural change induced by reoxygenation following the induction of lipid peroxidation in Caco-2 cell monolayers. *Drug Metab. Pharmacokinet.*, **17**, 83–91 (2002).
- 30) Nagira M., Tomita M., Mizuno S., Kumata M., Ayabe T., Hayashi M., Ischemia/reperfusion injury in the monolayers of human intestinal epithelial cell line Caco-2 and its recovery by antioxidants. *Drug Metab. Pharmacokinet.*, **21**, 230–237 (2006).
- 31) 柳樂真友子, 小腸虚血再灌流における吸収制御因子の変動および抗酸化剤による回復機構 (博士論文). 東京薬科大学 (2007).
- 32) Ji L., Guang T. Y., Xiu H. H., Lu H. W., Kai Z., Hui X., Effect of intestinal ischemia-reperfusion injury on protein levels of leptin and orexin-A in peripheral blood and central secretory tissues. *World J. Gastroenterol.*, **11**, 1000–1004 (2005).
- 33) Anthony A., Tzuyung K., Samir L., Kelly M., Meverly D., David D., Alan L., Ischemia/reperfusion: a clinically relevant model of intestinal injury yielding systemic inflammation. *J. Pediatric Surgery*, **40**, 470–477 (2005).
- 34) Tetik C., Ozden A., Calli N., Bilgihan A., Bostanci B., Yis O., Bayramoglu H., Cytoprotective effect of trimetazidine on 60 minutes of intestinal ischemia-reperfusion injury in rats. *Transpl. Int.*, **12**, 108–112 (1999).
- 35) Salehi P., Madsen K., Zhu J., Castillo E., Avila J., Lakey J. R., Churchill T. A., Alleviating ischemia-reperfusion injury in small bowel. *Am. J. Transplant.*, **4**, 728–737 (2004).
- 36) Ozturk C., Avlan D., Cinel I., Cinel L., Unlu A., Camdeviren H., Atik U., Oral U., Selenium pretreatment prevents bacterial translocation in rat intestinal ischemia/reperfusion model. *Pharmacol. Res.*, **46**, 171–175 (2002).
- 37) Omae T., Goto M., Shimomura M., Masuda S., Ito K., Okuda M., Inui K., Transient up-regulation of P-glycoprotein reduces tacrolimus absorption after ischemia-reperfusion injury in rat ileum. *Biochem. Pharmacol.*, **69**, 561–568 (2005).
- 38) Nakagawa H., Tsunooka N., Yamamoto Y., Yoshida M., Nakata T., Kawachi K., Intestinal ischemia/reperfusion-induced bacterial translocation and lung

- injury in atherosclerotic rats with hypoadiponectinemia. *Surgery*, **145**, 48–56. Epub (2009).
- 39) 林 正弘, 谷川原祐介, 生物薬剤学. 南江堂, 東京, pp.7–36 (2001).
- 40) 富田幹雄, 薬物トランスポーターと薬物間相互作用, *Organ Biology*, **10**, 267–272 (2003).
- 41) Yamamoto A., Tatsumi H., Maruyama M., Uchiyama T., Okada N., Fujita T., Modulation of intestinal permeability by nitric oxide donors implications in intestinal delivery of poorly absorbable drugs. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **296**(1), 84–90 (2001).
- 42) Han X., Fink M. P., Delude R. L., Proinflammatory cytokines cause NO\*-dependent and -independent changes in expression and localization of tight junction proteins in intestinal epithelial cells. *Shock*, **19**, 229–237 (2003).