

Thesis

穿孔性腹膜炎におけるビリルビン酸化生成物(Biopyrrins)ならびに ヘムオキシゲナーゼの動向 —— 実験的ならびに臨床的検討 ——

埼玉医科大学外科学(消化器・一般外科部門 消化器・一般外科(II))
(指導 平山 廉三 教授)

菊地 政貴

Heme oxygenase(HO)-1, the rate-limiting enzyme in heme degradation, is induced by oxidative stress and its major final product, bilirubin, is a potent physiological antioxidant. Bilirubin oxidative metabolites are generated from bilirubin as a result of its scavenging action against reactive oxygen species (ROS). Thus, the production of Biopyrrins, oxidative metabolites of bilirubin, appears to reflect the degree of oxidative stress, and the level of urine Biopyrrins may be useful for evaluation of oxidative stress. The purpose of this study was to clarify the target organs for oxidative stress by acute abdomen, based on the change of urine Biopyrrins levels and HO-1. The levels of urine Biopyrrins and expression of HO-1 were determined from mice cecal ligation and puncture (CLP) model, the lipopolysaccharide injected intraperitoneally (LPS I.P.) and intravenously(LPS I.V.) models. The expression of HO-1 protein was shown at liver in CLP model, at spleen in LPS I.V. model, and at both of liver and spleen in LPS I.P. model. The level of urine Biopyrrins changed in accordance with the expression of HO-1 in all models. The level of urine Biopyrrins in 71 cases of acute abdomen was determined, and compared with the criteria of SIRS (systemic inflammatory response syndrome). In the perforated peritonitis cases, high level of urine Biopyrrins were shown despite of that these cases did not satisfy the criteria of SIRS. These results suggest that the level of urine Biopyrrins is a possible marker for continuous monitoring of clinical severity of perforated peritonitis cases.

Keywords: Biopyrrins, Bilirubin, Heme oxygenase, 活性酸素, 腹膜炎

§ 背 景

肝・胆道系疾患において、肝障害および胆道通過障害由来などの血中ビリルビン濃度上昇により黄疸の発現をみる。ほかに、重症急性膵炎、食道癌手術後、重篤な汎発性腹膜炎などの際にも血中ビリルビン濃度上昇による黄疸をみることがあるが、これらは高度肝機能障害や胆道通過障害を伴わない。これまで、ビリルビン(BR)についてはヘム代謝産物としての面を重視し黄疸との関係を強調した研究が多くなされてきたきらいがあるが、BRの抗酸化力はビタミンEをしのご、しかも、生体内で容易に合成されることを考え併せ、最近ではビリルビンの抗酸化能を真正面からとりあげ

て、生体内の抗酸化機構におけるBRの積極的役割に関する検討も始められた¹⁻³⁾。

ヘムオキシゲナーゼ(HO)はBR生成系の酵素であり、その誘導型アイソザイムであるHO-1は、ストレス蛋白として知られ、熱ショック蛋白32(HSP32)そのものである。HOはヘム(基質)からのBR合成をすすめる。細胞内のHO誘導は、ヘムのみならず、IL-6などのサイトカイン、熱ショック、紫外線照射などによる活性酸素によってもなされ、活性酸素を解消する方向に作用すると考えられる。活性酸素を消去する際にBR自らの酸化がすすむことから、活性酸素と反応したBR酸化生成物質が存在するはずである。これらをつきとめて、それがバイオピリン(Biopyrrins)であることを明らかにしたのは著者らのグループである^{4,5)}。

侵襲に際しての多くの局面で生体内で活性酸素が増加するが、これら活性酸素消去の際に生じたBiopyrrinsはすみやかに尿中へ排出され、その尿中Biopyrrins量の多寡が侵襲ならびにこれを反映した酸化ストレスの程度を示すものと考えてもよい⁶⁾。

BR代謝の主たる場は肝臓、脾臓とされる。しかし、生体侵襲の種類により、酸化的ストレス状態の解消のために積極的に賦活される臓器、すなわち、ストレスの標的臓器の変動する可能性があり、標的臓器の確定は外科侵襲学の立場からも重要である。

今回、尿中Biopyrrins値の動向をエンドトキシン血症モデル、腹膜炎モデルにおいて探るとともに、肝臓、脾臓におけるHO-1の動向をもとに侵襲の種類と標的臓器の関係を検討した。併せて腹膜炎例を中心に、急性腹症における尿中Biopyrrins値の変動とその臨床的意義を探った。

第1節

§ 動物と方法

1. 動物

8週齢のddY系雄性マウスを使用した。各群、各時間ごとに3匹ずつを割り当てた。以下の実験における動物の取り扱い方は埼玉医科大学動物実験指針に準拠した。マウスは頸椎脱臼による安楽死ののち開腹した。膀胱穿刺にて採尿した。肝臓(左葉)および脾臓を摘出し、各々を約5 mm角片に細切、生理食塩水による洗浄の後に液体窒素で凍結した。

2. エンドトキシン血症モデル(LPS I.V.モデル)の作製方法

エンドトキシン(Lipopolysaccharide: LPS: E.coli. Serotype 0127: B8 SIGMA)を生理的食塩水で溶解し、1 mg/kg body weightとなる約200 μ lを尾静脈より注入した。また、生理的食塩水200 μ lを尾静脈より投与した3匹をコントロールとした。

3. エンドトキシン腹膜炎モデル(LPS I.P.モデル)の作製方法

LPSを生理食塩水で溶解し、1 mg/kg body weightとなる約200 μ lを腹腔内に投与した。また、生理的食塩水200 μ lを腹腔内に投与した3匹をコントロールとした。

4. 盲腸の穿孔性腹膜炎モデル(Cecal ligation and puncture: CLPモデル)の作製方法

エーテル吸入麻酔下、腹部正中切開で開腹。注意深く回盲弁を温存して盲腸根部を3-0絹糸を用いて結紮した。そのあと、18G針を用いて盲腸壁全層にわたり穿刺、穿孔させた。開腹創は一層縫合で閉鎖した。単開腹マウスをコントロール群とした。手術操作の後、水分および食餌摂取は自由にまかせた。

5. 尿中Biopyrrinsの測定^{7,8)}

BiopyrrinsはBRの酸化生成物で、抗BR単クロー

ン抗体(24G7)に反応するエピトープをもつ⁹⁻¹¹⁾。採取した尿をPBSで10倍、15倍に希釈した後、抗BR単クローン抗体(24G7)を用いたBiopyrrins測定キット(Biopyrrin EIA Kit, 同仁化学研究所)にてELISA法により尿中Biopyrrins量を測定した。

6. HO蛋白量の測定(Western blot法)

経時的に摘出し細切された肝臓、脾臓を速やかに液体窒素で凍結して-80℃で保存した。各臓器をDulbecco's PBS(-) (DPBS)で十分に洗浄し、その5 mm角片に対し1 mM phenylmethane sulfonyl fluoride(PMSF)を含む1mlのDPBSを加えてホモジネートした。遠心分離(12,000 rpm, 15 min)の後に上清を採取し、蛋白量40 μ gを10-20%グラディエントゲルを用いたSDS-PAGEにのせた。polyvinilidene difluoride(PVDF)膜(MILLIPORE社)に転写し、Block-Ace(大日本製薬)中で1時間のブロッキングの後、ウサギ由来抗HO-1ポリクローナル抗体(Stressgen Biotechnologies Co., 0SA-150)およびPOD結合抗IgG抗体(The Binding Site社, AP-311)で、順次インキュベートした。十分な洗浄の後、ECL chemiluminescence detection kit (Amersham社)にて検出し、ATTO densitographにてそれぞれのバンドの蛋白量を定量した。

結 果

1 尿中Biopyrrinsの経時的変動

エンドトキシン血症モデル(LPS I.V.モデル)、エンドトキシン腹膜炎モデル(LPS I.P.モデル)、穿孔性腹膜炎モデル(CLPモデル)の尿中Biopyrrins量の経時的变化をFig. 1, 2, 3に示した。

CLPモデルにおいて、Biopyrrinsの量は処置後約10時間目にピークを示し、いったん減少したのちに、再び上昇して20時間後に小さなピークを示した(Fig. 1)。

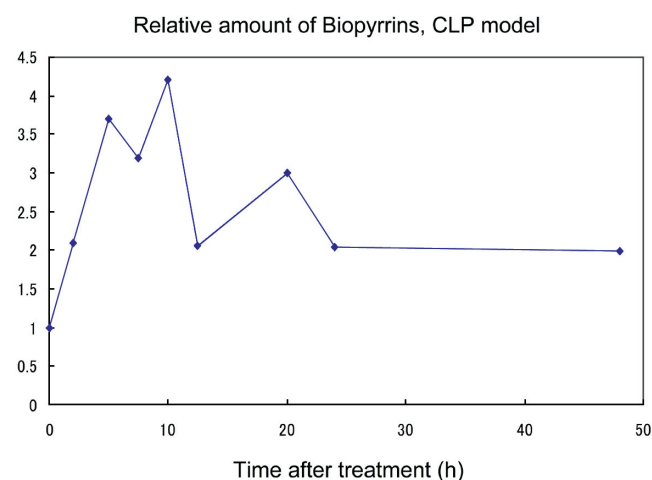


Fig. 1. Relative amount of urine Biopyrrins (◆) determined by ELISA, according to the previously published method. Cecal ligation and puncture (CLP) model.

LPS I.P. モデルでは、処置後約3時間目にピークを示し、いったん減少したのちに、再び上昇して7.5時間後にピークを示した (Fig. 2).

LPS I.V.モデルでは、10~12.5時間後のピークを示し推移した (Fig. 3). 単開腹群および生理食塩水投与群においては、Biopyrrinsの有意な経時的変化は認められなかった. 尿中Biopyrrins値はLPS投与による外的酸化ストレスおよび腹膜炎モデルの激的な炎症によって増加していることがわかった.

2 HO蛋白量の変動

CLPモデルでは肝臓でのHO-1蛋白量は5時間目をピークに示した後、いったん減少した. その後再び増加して15時間目をピークに推移した. 脾臓ではHO-1蛋白量の有意な変化はみられなかった (Fig. 4).

LPS I.V. モデルでは脾臓におけるHO-1蛋白量が

10~12.5時間目にピークを示した後に漸減した. 肝臓ではHO-1蛋白量の有意な変化はみられなかった (Fig. 5).

LPS I.P. モデルでは、肝臓でのHO-1蛋白量は7.5時間をピークに推移した. 脾臓でのHO-1蛋白量3時間目にピークを示した後、いったん減少した. その後再び増加して10時間目をピークを示した (Fig. 6).

Heme oxygenase-1 protein, CLP model

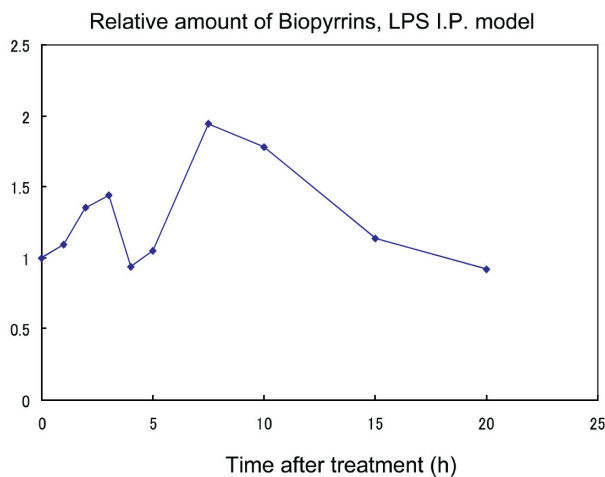
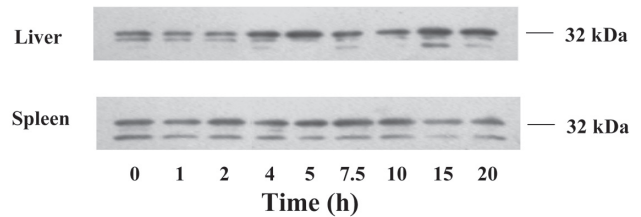


Fig. 2. Relative amount of urine Biopyrrins(◆). LPS I.P. model.

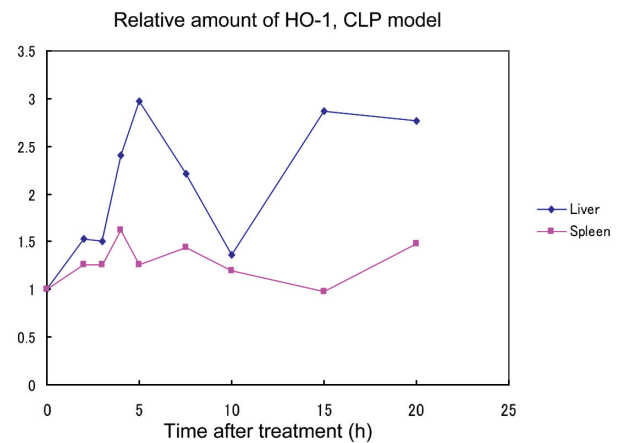


Fig. 4. Expression of HO-1 protein of liver(◆) and spleen(■). CLP model. Western blot analysis using anti-HO-1 antibody according to the previously published method. Values were normalized by the amount at 0 h after treatment.

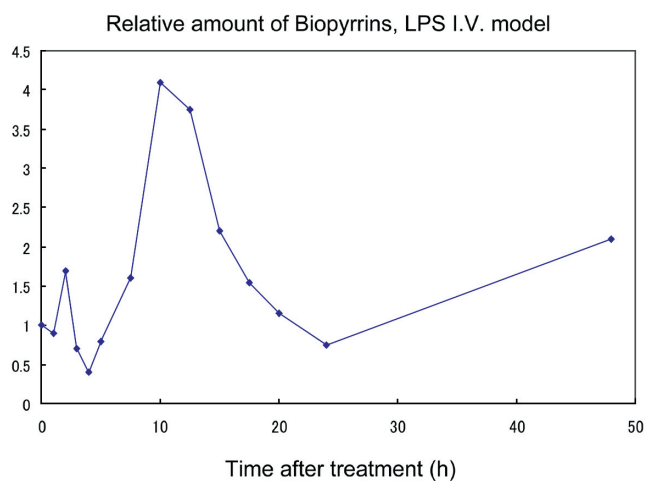


Fig. 3. Relative amount of urine Biopyrrins(◆). LPS I.V. model.

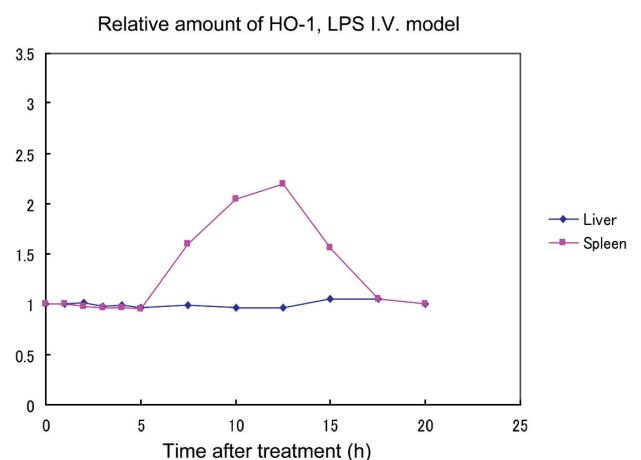


Fig. 5. Expression of HO-1 protein of liver(◆) and spleen(■), LPS I.V. model.

以上より標的臓器がCLPモデルでは肝臓, LPS I.P.モデルでは脾臓および肝臓と, エンドトキシン血症では脾臓であることが予想された。

第2節

§ 急性腹症における尿中バイオピリン値の変動とその臨床的意義

症例と方法

最近(2003年6月~2004年8月), 急性腹症の診断で当科入院となった71症例について, 従来急性腹症の重篤度判定に使用されていたAPACHE IIスコアおよび敗血症スコアを算出し, 死亡者と生存者に区分して比較した。最近ではAPACHE IIスコアおよび敗血症スコアにかわりSIRS(systemic inflammatory response syndrome)の診断基準が多用されるようになっていく。そこで同様に, SIRS診断基準(炎症に随伴する体温, 脈拍, 呼吸数, 末梢白血球数の組み合わせ)に準拠し, 症例をSIRS(+), SIRS(-)群に区分し, 各群ごとの生死, 重篤度などを比較して尿中Biopyrrins値との関連を検討した。

尿中Biopyrrins値はバイオピリン測定キット(Biopyrrin EIA Kit, 同仁化学研究所)により測定した。

結果

急性腹症の診断で入院した71症例のAPACHE-IIスコア, 敗血症スコアのポイントを死亡者および生存者に分けて検討すると, 死亡6症例はいずれのスコアにおいても高ポイントを呈し, これらのスコアの有効性を認めた(Fig. 7)。なお, 死亡例6例すべて尿中Biopyrrins値高値であった。

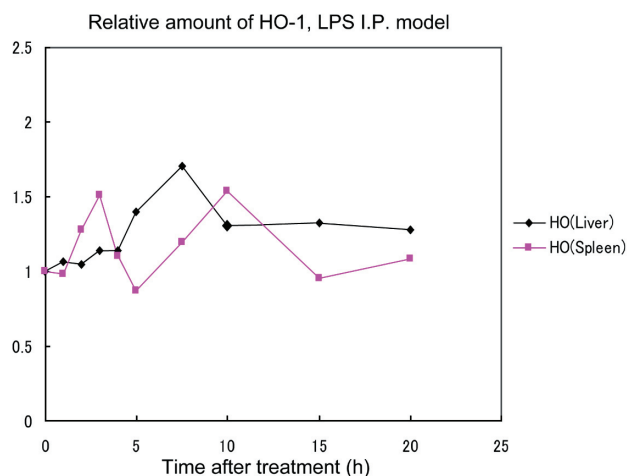


Fig. 6. Expression of HO-1 protein of liver (◆) and spleen (■), LPS I.P. model.

SIRS(+)群, SIRS(-)群と尿中Biopyrrins値との関係を検討するにあたり, 胆道通過障害を伴い血清中総BR値が3.0以上を示した急性胆嚢炎の3症例では, 重篤度と関係なく尿中Biopyrrins値が184.9(86.5~233.1)と高値を示していたため, 71症例のうちからこれら3症例を除き以下の検討を行った。

急性胆嚢炎3例を除いた68症例ならびに健常人34例の尿中Biopyrrins値は, 健常人で中央値 1.05(0.52~1.58). 急性腹症68症例では, 4.6 (0.6~106.3). そのうち, エンドトキシン血症が証明された7例については, 46.7 (17.8~106.0)と高値であった(Table 1)。

保存的治療が可能であった癒着性イレウス症例, 十二指腸潰瘍穿孔例など比較的軽症の急性腹症症例では尿中Biopyrrins値は低値を示し, 多発小腸穿孔や大腸穿孔, 腸管壊死などの重症の穿孔性腹膜炎症例では極だった高値を示した(Table 2)。

これら68症例をSIRS(+), SIRS(-)に2区分したとき, SIRS(+)の26症例はいずれも尿中Biopyrrins高値を示し, そのうち4症例に死亡をみている。一方, Biopyrrins値の正常値群にSIRS(+)症例および死亡例をみない。

死亡6症例のうち2症例は重篤例であるにもかかわらずSIRSの診断基準に合致せず, しかも尿中Biopyrrins値が高値であった(Table 3)。

考察

肝・胆道系疾患において血中BR上昇による黄疸発現をみることから, 肝障害との関連においてBRについて多くの検討がなされた。しかし, 重篤な汎発性腹膜炎などのときにも血中BR濃度の上昇がみられ, これらは肝機能障害を伴わない。これらの臨床観察は

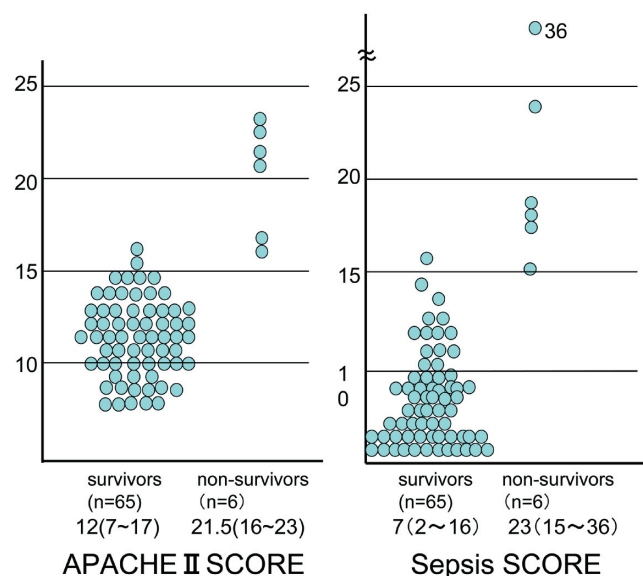


Fig. 7. Comparison of APACHE II score and the sepsis score of the survivors and non-survivors of acute abdomen cases.

Table 1. The urine level of Biopyrrins (U /g · creatinine) in acute abdomen cases

Acute abdomen	(n=68)	4.6(0.6~106.3)
{Endotoxemia	(n=7)	46.7(17.8~106.0)}
Healthy volunteer	(n=34)	1.05(0.52~1.58)

Table 2. The values of urine Biopyrrins (U /g · creatinine) in acute abdomen cases

Acute appendicitis	(7) 2.9(1.3~5.1)
Inflammatory tumor of ileocecum	(1) 8.5
Adnexitis	(1) 10.0
Perforated gastroduodenal ulcer	(20) 3.3(0.6~22.7)
Perforation of small bowels	(4) 26.1(2.9~106.3)
Perforation of colon	(8) 31.3(4.8~54.8)
Massive necrosis of small bowels	(1) 91.0
Adhesive ileus	(13) 4.8 (1.6~9.8)
Incarcerated inguinal hernia	(4) 11.3(4.9~17.8)
Strangulation ileus	(6) 13.1(1.1~17.6)
Injury of liver,pancreas	(3) 9.8(2.4~12.0)

Table 3. The relation between the level of urine Biopyrrins (U /g · creatinine) and SIRS criteria

	SIRS (+)	SIRS(-)
Biopyrrins > 2.0 (n=45)	26(4)	19(2)
Biopyrrins ≤ 2.0 (n=23)	0(0)	23(0)

():non-survivors

重要であり、重症急性膵炎、敗血症性ショック、過大な手術侵襲症例などにおける軽度および中等度までの黄疸では、これらのBR上昇が肝機能障害由来でないことから、その機序と意義に大きな興味が寄せられていた。その機序に関しては、著者等のグループの研究の結果、各種、各様の侵襲による酸化ストレスが引き起こしたBR産生亢進であることを明らかにした^{4, 5, 12, 13}。

BR代謝過程をみると、BRはヘム代謝産物として「できてくるもの」というよりも、エネルギーを消費して「積極的に生成されるもの」という性格が濃厚である。さらに、BRのもつ抗酸化能はビタミンEをしのぐほど強力なことも判明している。

「積極的に生成された」BRにantioxidantとしての積極的働きが推測され、しかも活性酸素の多寡に速応してBR生成量を加減できることから、BRは活性酸素消去に関して重大な役割を担っていることが伺われる。

さらに、BRのantioxidantとしての役割は自殺的、つまり、産生されたBR自らが犠牲となって活性酸素を消去する。BR自らは酸化され、抗BR単クローン抗体と反応するdiazo反応陰性の物質(Biopyrrins)となり尿中に排泄される一連の経過を著者らの研究グループは明らかにしてきた¹⁴。

もともと活性酸素は生体にとって必要不可欠なものであり、一定レベルまでの活性酸素には生理的作用が備わる。しかし、恒常的に酸化的ストレスを受け続ける環境下におかれた生体では、バランスが崩れた時に容易に活性酸素が過剰となる。視点をかえると生体は外的な刺激要因(ストレス)に対して機能的変化、構造的変化をもって対応する(ストレス応答)。生理的ストレスは、物理的ストレス、化学的ストレス、そしてそれらの組み合わせた複合ストレスの3者に区分されるが、もっとも基本的なストレスは物理的な高熱ストレスであり、細胞レベルで熱ショック蛋白(heat shock protein;HSP)が誘導される。また、熱ショック以外のストレスでも似たような蛋白質が合成される(ストレス蛋白)。また、化学的ストレスとして活性酸素があげられる。ストレスを受けたときの活性酸素の主な発生源はミトコンドリアや小胞体の電子伝達系であるが、赤血球のヘモグロビンや白血球(顆粒球やマクロファージ)なども活性酸素を放出する。侵襲に際し過剰生成された活性酸素に対するBR生成亢進の結果、尿中Biopyrrins値が上昇するものと考えられる¹⁵。

BR代謝は主に肝臓、脾臓でなされる。しかし、生体にかかる侵襲の差異によって賦活される臓器、すなわち、ストレスの標的臓器が異なる可能性が考えられ、それらを確定することは外科侵襲学の立場から重要である。今回、エンドトキシン血症モデル、エンドトキシン腹膜炎および急性汎発性腹膜炎モデルにおける肝臓、脾臓におけるヘムオキシゲナーゼ(HO)の動向の差異をもとにしてストレスの標的臓器を検討した。

HOは、ストレス蛋白、すなわち、熱ショック蛋白32(HSP32)そのものでBR生成系の律速酵素である。HOはヘム(基質)によって誘導されるが、ヘムのみならずIL-6などのサイトカイン、熱ショック、あるいは紫外線照射などによって生成される活性酸素により誘導がなされBR生成がすすむ。活性酸素に誘導されたHOはBR生成を亢進し、生成されたBRがantioxidantとして働いて局所の活性酸素を消去し、さらに、その作用が全身レベルに及ぶときに酸化的ストレス状態の解消に役立つ。このとき、BRと活性酸素とが反応してできた酸化生成物質がBiopyrrinsである(Fig. 8)。今回、急性腹症、さらに急性汎発性腹膜炎において初動的に賦活される臓器、すなわち、標的臓器の実験的検討を肝臓、脾臓におけるHO-1と尿中Biopyrrins値の動向に基づいて試みたが、尿中Biopyrrins値上昇の時期にやや先んじて、肝臓、脾臓におけるHO蛋白量増加

が認められた。これらの所見から、急性腹膜炎、さらに穿孔性腹膜炎の状況下におけるBR産生系の賦活・亢進が示唆された。また、穿孔性腹膜炎の際のストレス標的臓器は肝臓、エンドトキシン血症の際には脾臓であり、LPS腹腔内投与では肝臓および脾臓が標的臓器となることが明らかとなった (Fig. 9, 10, 11)。

これまで明らかにしたように、活性酸素の過剰環境下に生成されたBRによる強力な抗酸化作用によって、酸化ストレス状態は緩和される方向に向かうものと考えられる。したがって、このときに尿中に排泄されるBiopyrrinsなどのBR酸化生成物の多寡から生体侵襲の程度を推測できる可能性がある¹⁶⁻¹⁹⁾。

これまで急性腹症の重症度判定に、CRP、APACHE-IIスコア、敗血症スコアなどが使用され、さらに、最近では、SIRS診断基準が重用されるようになった²⁰⁻²²⁾。SIRSは、American College of Chest PhysiciansとSociety of Critical Care Medicineの合同カンファレンスで提唱された基準である。SIRSの概念では局所炎症反応に止まらず、炎症に伴って重症な全身症状が発生したとき、それらを(i)感染を伴わない全身性反応(炎症)、(ii)感染に伴う全身性反応(炎症)に2分する。そして(ii)をsepsisと定義したため、ここにあるsepsisの定義では従来の敗血症と異なり菌血症は必要条件ではない。

さて、SIRSは利便性のある呼称であるが便宜的な定義でもある。それに準拠するとき重症臨床例の多くがSIRS状態にあるとみなされる。しかし、外科的疾患の重症例、なかんずく重篤な急性腹症症例のうちにSIRS診断基準と合致しないものが今回の検討で散見された。SIRS診断基準を満たさず、しかも、尿中Biopyrrins値高値の急性腹症症例が少なからず存在することが判明したことはすこぶる重要である。肝胆道

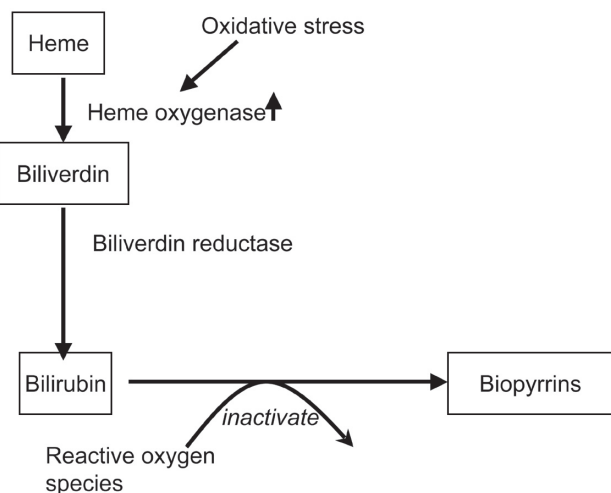


Fig. 8. Oxidative stress and bilirubin.

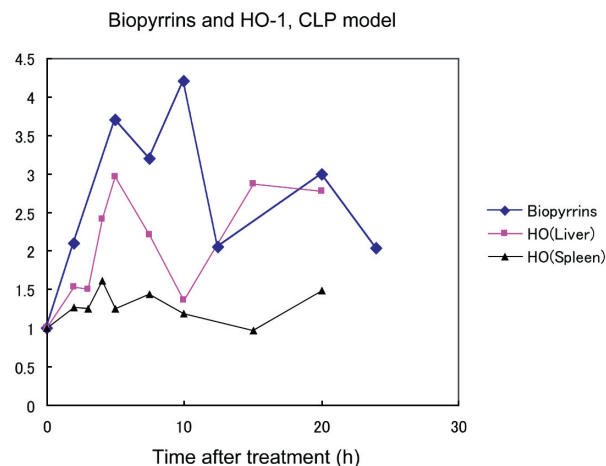


Fig. 9. The relation between Biopyrrins(◆) and HO-1 of liver(■) and spleen(▲). CLP model.

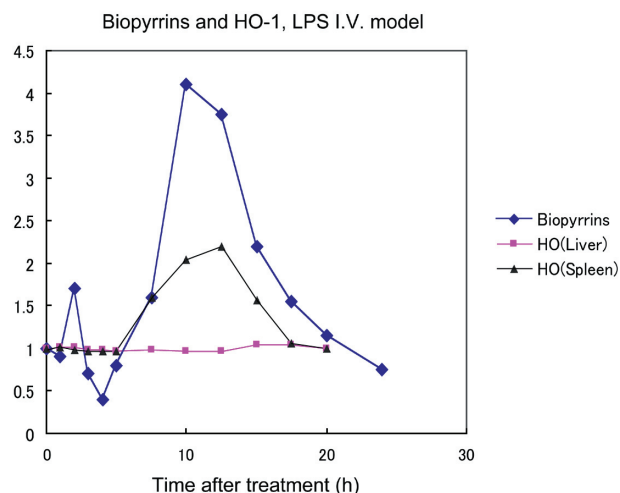


Fig. 10. The relation between Biopyrrins(◆) and HO-1 of liver(■) and spleen(▲). LPS I.V.model.

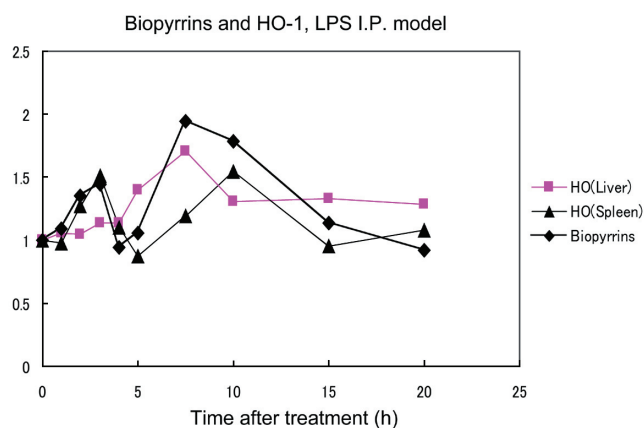


Fig. 11. The relation between Biopyrrins(◆) and HO-1 of liver(■) and spleen(▲). LPS I.P. model.

系疾患の急性腹症には原疾患と直結した高BR血症が含まれるため検討からは除外するとして、感染が関与し、しかも菌血症、エンドトキシン血症などの証明がなされる「旧来型の、いわゆる敗血症ショック」のカテゴリーを満たす腸穿孔、腸管壊死の重症穿孔性腹膜炎症例のなかに、SIRS診断基準を満たさず、しかも、極だった尿中Biopyrrins 高値を示す症例がみられたという所見は注目すべきものである。腸管の穿孔や壊死、sepsis、エンドトキシン血症などに由来する全身性炎症反応の出現が予想されるにもかかわらず、SIRS診断基準を満たす症状出現がみられなかったことの機序は難解である。一般にSIRSの機序は高サイトカイン血症とされるが、SIRSの際のサイトカインの動向は複雑である。SIRSは、感染を伴わない全身性炎症、bacteremiaを伴わないsepsis、bacteremiaを伴うsepsis、と区別できる複数の病態の複合体である。SIRSでは単球やリンパ球のサイトカインの産生は抑制されているが、他方で好中球のサイトカイン産生は亢進状態にあるとされる。無菌手術など、感染関与のない比較的軽度の外科的侵襲では炎症性サイトカイン、ならびに抗炎症性サイトカインは、ともに一過性に上昇した後、まもなくともに正常に復する。TNF- α 、IL-1等の炎症性サイトカインが遊離された場合、生体の恒常性を保つために拮抗する抗炎症性サイトカイン(可溶性TNF受容体、IL-1ra、IL-10等)も同時に遊離されるという指摘がみられる。炎症性サイトカインと抗炎症性サイトカインのバランスが病態を形成するため、侵襲の大きさや時期によって表現される症状は異なる。そして炎症性サイトカインが優位な状態こそがSIRSであるとされる²³⁾。重度の全身性炎症反応、とくに敗血症性ショックに陥った症例においては、炎症性サイトカインおよび抗炎症性サイトカインの発現に著明な差異がみられ、しかもその動向は遷延化している。そのため、不可逆的なショックにおいては抗炎症性サイトカインによる抑制的な作用はみられない。一方で、過大な侵襲による高サイトカイン血症の際に各種サイトカイン同士がさらに作用を打ち消し合うことによってSIRS診断基準に合致する症状が出現していない可能性がある。このような症例では、過剰な活性酸素による高度の酸化的ストレス状態下であり、SIRSを呈さずとも尿中Biopyrrins値が高値を呈するものは、重症度の高いもの、あるいは重症化の可能性の高いと考えられる。それらの判定に尿中Biopyrrins値の測定が大きく資するものと推測できる。

結 語

動物実験モデルにおいて急性腹膜炎におけるストレス標的臓器を検討したところエンドトキシン血症では脾臓、穿孔性腹膜炎では肝臓、エンドトキシン腹腔内投与による腹膜炎では肝臓および脾臓が標的臓器とな

ることが明らかとなった。急性腹症、なかんずく急性腹膜炎における尿中Biopyrrins値の臨床的意義を探った。穿孔性腹膜炎症例のうちに、SIRS診断基準と合致せず、しかも極だって尿中Biopyrrins 高値症例がみられた。尿中Biopyrrins値高値の症例では、重症度が高い、あるいは重症化の可能性が高いと考えられ、SIRSによる重症度診断の隘路を補完するものとして尿中Biopyrrins値の有用性が示唆された。

謝 辞

稿を終えるにあたり御校閲を賜りました埼玉医科大学外科学(消化器・一般外科部門 消化器・一般外科(Ⅱ))平山廉三教授に深謝いたします。また直接ご指導頂きました辻 美隆講師、竹内浩紀博士に深甚なる謝意を表すとともに終始ご協力頂いた三吉さおり様に感謝致します。

なお本論文の一部は第103回日本外科学会定期学術集会、第59回日本消化器外科学会、第39回腹部救急学会にて発表した。

文 献

- 1) Stocker R, Yamamoto Y, McDonagh AF, Glazer AN, Ames BN. Bilirubin is an antioxidant of possible physiological importance. *Science* 1987;235:1043-6.
- 2) Stocker R, Glazer AN, Ames BN. Antioxidant activity of albumin-bound bilirubin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987;84:5918-22.
- 3) 小林章男, 山口登喜夫. ビリルビンの生理的役割—酸化ストレスとの関連性—. 安全性評価研究会編集委員会編. 谷本学校毒性質問箱 2000;3:31-5.
- 4) 辻美隆. 酸化ストレスとしてのエンドトキシンに対するビリルビンの抗酸化作用:培養細胞を用いたビリルビンとHeme oxygenaseの動向. 埼玉医科大学雑誌 1995;22:277-90.
- 5) 竹内浩紀. エンドトキシン, ヘモグロビン投与マウスにおける尿中ビリルビン酸化生成物質及び脾, 肝, 腎でのヘムオキシゲナーゼの動態. 埼玉医科大学雑誌 1995;22:239-50.
- 6) 山口登喜夫, 杉本昭子. 酸化ストレスと生体防御機構—バイオピリンを含めて. 臨床検査 2001;45:237-46.
- 7) 塩地出, 芳村一. バイオピリン. 臨床検査 2001;45:265-8.
- 8) 原克子, 高橋伯夫. 尿中バイオピリン. 検査と技術 2002;30:791-4.
- 9) Shimizu S, Izumi Y, Yamazaki M, Shimizu K, Yamaguchi T, Nakajima H. Anti-bilirubin monoclonal antibody. I. Preparation and properties of monoclonal antibodies to covalently coupled bilirubin-albumin. *Biochim Biophys Acta* 1988;967:255-60.
- 10) Izumi Y, Yamazaki M, Shimizu S, Shimizu K,

- Yamaguchi T, Nakajima H. Anti-bilirubin monoclonal antibody. II. Enzyme-linked immunosorbent assay for bilirubin fractions by combination of two monoclonal antibodies. *Biochim Biophys Acta* 1988; 967:261-6.
- 11) Okamura Y, Yamazaki M, Yamaguchi T, Komoda Y, Sugimoto A, Nakajima H. Anti-bilirubin monoclonal antibody. III. Preparation and properties of monoclonal antibodies to unconjugated bilirubin-IX alpha. *Biochim Biophys Acta* 1991;1073(3):538-42.
- 12) 寺角匡弘. 肝虚血再灌流時の酸化的ストレスに対するビリルビンの抗酸化作用と Heme Oxygenase の誘導. 埼玉医科大学雑誌 1996;23:217-26.
- 13) 青木一真. マウス開腹手術時の腹腔内大気曝露によるビリルビン酸化生成物質 (biopyrrins) の産生機序. 埼玉医科大学雑誌 1996;23:169-76.
- 14) 山口登喜夫, 杉本昭子. ビリルビンの多様性と抗酸化作用. 生化学 2003;75:224-33.
- 15) Yamaguchi T, Shioji I, Sugimoto A, Yamaoka M. Psychological stress increases bilirubin metabolites in human urine. *Biochem Biophys Res Commun* 2002;293:517-20.
- 16) Otani K, Shimizu S, Chijiwa K, Yamaguchi K, Kuroki S, Tanaka M. Increased urinary excretion of bilirubin oxidative metabolites in septic patients: a new marker for oxidative stress in vivo. *J Surg Res* 2001;96:44-9.
- 17) Tsujinaka T, Fujita J, Morimoto T, Ogawa A, Ebisui C, Yano M, et al. Increased urinary excretion of bilirubin metabolites in association with hyperbilirubinemia after esophagectomy. *Surg Today* 1998;28:1119-23.
- 18) Shimoharada K, Inoue S, Nakahara M, Kanzaki N, Shimizu S, Kang D, et al. Urine concentration of biopyrrins: a new marker for oxidative stress in vivo. *Clin Chem* 1998;44:2554-5.
- 19) Kozaki N, Shimizu S, Chijiwa K, Yamaguchi K, Kuroki S, Shimoharada K, et al. Bilirubin as an antioxidant for surgical stress: a preliminary report of bilirubin oxidative metabolites. *HPB Surg* 1999; 11:241-8.
- 20) Elebute EA, Stoner HB. The grading of sepsis. *Br J Surg* 1983;70:29-31.
- 21) Larvin M, McMahon MJ. APACHE-II score for assessment and monitoring of acute pancreatitis. *Lancet* 1989;2(8656):201-5.
- 22) Riedemann NC, Guo RF, Ward PA. Novel strategies for the treatment of sepsis. *Nat Med* 2003;9:517-24.
- 23) Bone RC. Sir Isaac Newton, sepsis, SIRS, and CARS. *Crit Care Med* 1996;24:1125-8.