

下肢急性動脈閉塞モデルにおける虚血再灌流障害時の アポトーシスの関与についての実験的検討

新野 哲也

要 旨：ラット急性動脈閉塞再灌流障害モデルを作製し、虚血部、非虚血部におけるアポトーシスの発現について実験的検討を行った。腎動脈下腹部大動脈と両側総大腿動脈を6時間遮断し、再灌流6時間後または24時間後に採血ならびに心臓、肺、腎臓、大腿部骨格筋を摘出した。血清中のCPKを測定し、hematoxylin-eosin(H-E)染色、TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling method(TUNEL法)、電気泳動法を用いて各臓器におけるアポトーシスの発現について比較検討した。再灌流6時間群ではCPKは対照群より有意($p=0.03$)に高値を示し、H-E染色、TUNEL法では各臓器ともアポトーシスが多く認められ、電気泳動法でもDNAの梯子状構造が認められた。再灌流24時間群ではCPKは低下し対照群と有意差はなかったが、H-E染色、TUNEL法において肺、腎臓でのアポトーシスが認められた。再灌流6時間群では虚血部骨格筋だけでなく、非虚血部である心、肺、腎臓でもアポトーシスの所見が散見された。肺、腎臓においては再灌流24時間後でもアポトーシスの所見が認められており、臓器障害が遷延している可能性が示唆された。このことはMNMSの臨床において、致死的な腎障害や肺障害が発症するという臨床所見を考えると興味深い所見と思われた。下肢急性動脈閉塞症の虚血再灌流障害における遠隔臓器障害の発現に、アポトーシスが関与している可能性が示唆された。(日血外会誌 10 : 661-670 , 2001)

索引用語：アポトーシス，再灌流障害，TUNEL法

はじめに

急性動脈閉塞症における虚血再灌流障害であるmyonephropathic-metabolicsyndrom(以下、MNMS)は、発症すると致死となることも多く、重篤な合併症の一つである^{1,2)}。虚血再灌流障害については多くの研究がなされ、なかでも好中球の関与が多く報告され³⁻⁵⁾、当教室でも白血球除去フィルターやleukotrien B₄(LTB₄)拮抗物質を用いて白血球の関与について報告した⁶⁾。しかし、いまだ不明な点も多く病態の解明や治療法の確立

にはいたっていない。局所での障害と遠隔臓器障害を関連させる機序については不明であったが、当教室では虚血局所での臓器障害と遠隔臓器障害との関連を示唆するサイトカインの関与を報告した^{7,8)}。また、心臓⁹⁾、肝臓¹⁰⁾、腎臓¹¹⁾、骨格筋¹²⁾における虚血再灌流障害の発症にアポトーシスの関与が報告され、ショックに伴う多臓器障害発症の機序についてもanoxic necrosisのみならずアポトーシスの関与も報告されている¹³⁾。虚血再灌流障害におけるアポトーシスは各臓器での研究はされているが、虚血再灌流による遠隔臓器障害におけるアポトーシスの関与についての報告はない。そこで今回、MNMSの病態解明の一助として、虚血再灌流時の遠隔臓器障害におけるアポトーシスの関与について実験的に検討した。

日本大学医学部外科講座外科2部門
(Tel: 03-3972-8111; ex: 2462-2464)
〒173-8610 東京都板橋区大谷口上町30-1
受付：2001年7月10日
受理：2001年10月12日

対象と方法

1. 虚血再灌流群 (IR群: IR6h群, IR24h群) の作製
 体重180~200gのWistar系雄性ラットを使用し, ペントバルビタール0.05mg/gの腹腔内投与による全身麻酔下に, 腎動脈下腹部大動脈と両側総大腿動脈をマイクロバスキュラークリップ(TKS-1, 協和時計工業社)にて血行を遮断して下肢の冷感, チアノーゼを確認したのちに一度閉創した. 血行遮断 6 時間後に下肢の低温, チアノーゼを再度確認したのち, 再度ペントバルビタール0.05mg/gの腹腔内投与による麻酔下にクリップを摘出し, 6 時間(IR 6h群: n=6) または24時間(IR24h群: n=4) の再灌流を行いIR群とした(Fig. 1).

2. 対照群 (C群) の作製

同様の操作手順で血行遮断は行わずに腎動脈下腹部大動脈と両側総大腿動脈に剥離操作のみを加えて閉復, 閉創し, これをC群とした(Fig. 1).

3. 採血方法

再灌流 6 時間または24時間後に腎動脈下腹部大動脈から採血した. 採血後, 直ちに遠心分離 (3,000rpm, 5 分間) を行い血清を分離して測定まで冷凍保存した.

4. 測定項目および測定方法

血清CPK値は紫外外部吸光度分析法 (GSCC準拠) を用いて測定した.

5. ホルマリン固定標本の作製

採血後直ちに採取した心臓, 肺, 腎臓, 大腿部骨格筋を20%ホルマリン固定し, TUNEL法 (TREVIGEN®, Trevigen, Inc., USA) ならびにH-E染色を行った.

Methods

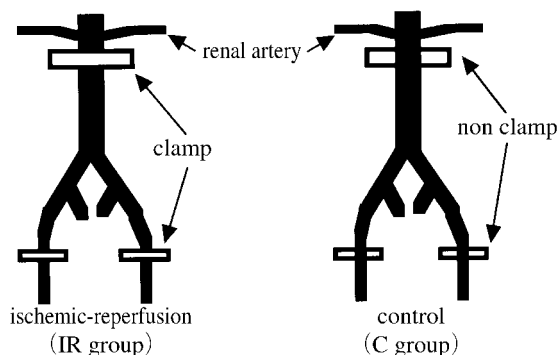


Fig. 1 Preparation of the experimental model (IR group and C group)

判定は任意の20視野を観察し, 観察視野内にアポトーシス細胞が確認できたものを「認めた」とし, 1個もアポトーシス細胞が確認できないものを「認めない」とした. また, 1 視野に 1 個以上確認できたものが10視野以上認められたものを「多く認めた」とした.

6. DNAの抽出と電気泳動

採取した心臓, 肺, 腎臓, 大腿部骨格筋を-70℃のドライアイスで凍結固定し, 1%アガロースゲルにて電気泳動法を施行した.

M1: サイズマーカー (λ DNA/Hind III), 1: 高分子DNAコントロール, 2: 断片化DNAコントロール, 3: 検体DNA, サイズマーカー (ϕ X174 DNA/Hae III)

7. 統計処理

測定値はすべて平均値 \pm 標準偏差で示した. なお, 統計学的処理はWelch's t-testを用い, p valueは0.05以下を有意とした.

結 果

1. CPK値の変動

IR 6h群では $8,733.6 \pm 6,814.6$ IU/lと高値を呈し, C群の 457.0 ± 196.6 IU/lと比較し有意 ($p=0.03$) に高値であった. IR24h群では 486.3 ± 418.1 IU/lまで低下し, C群の 693.5 ± 98.3 IU/lと有意差は認められなかった. CPK値はIR 6h群でC群と比べ有意に高値を呈した.

2. 病理組織所見

a. 心臓

IR 6h群ではH-E染色において核凝縮の存在する細胞を心筋に認め, TUNEL法においてもアポトーシス細胞が認められたが (Fig. 2), C群では認められなかった. IR24h群ではH-E染色, TUNEL法ともにアポトーシス細胞は認められず, C群も同様に認められなかった.

b. 肺

IR 6h群ではH-E染色において鬱血と間質の肥厚, 肺胞構造の破壊がC群と比較して強く認められ, アポトーシスに特徴的な核凝縮の存在する細胞が多く認められた. また, TUNEL法においては, 肺胞上皮細胞にアポトーシス細胞がC群と比較して多く認められた (Fig. 3).

IR24h群ではH-E染色において間質の浮腫および肺胞構造の破壊が認められ, さらにTUNEL法でアポトーシス細胞も認めたが, IR 6h群と比較すると軽度であった. また, C群でもTUNEL法で少数のアポトーシス細胞

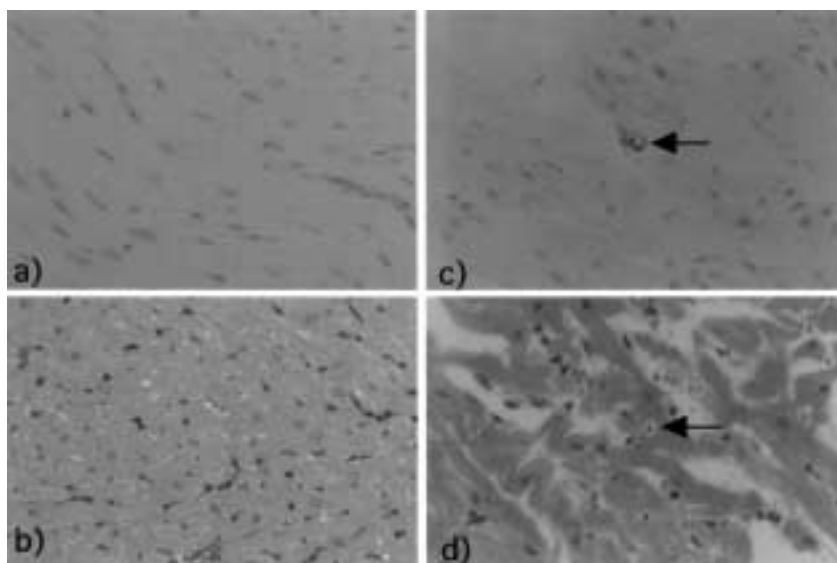


Fig. 2 IR 6h, heart
 a: TUNEL method: Apoptotic cell was not observed in the control ($\times 200$)
 b: H-E staining: Pyknosis was not observed in the control ($\times 200$)
 c: TUNEL method: Apoptotic cell () was observed in the myocardium ($\times 200$)
 d: H-E staining: Pyknosis () was observed in the myocardium ($\times 200$)

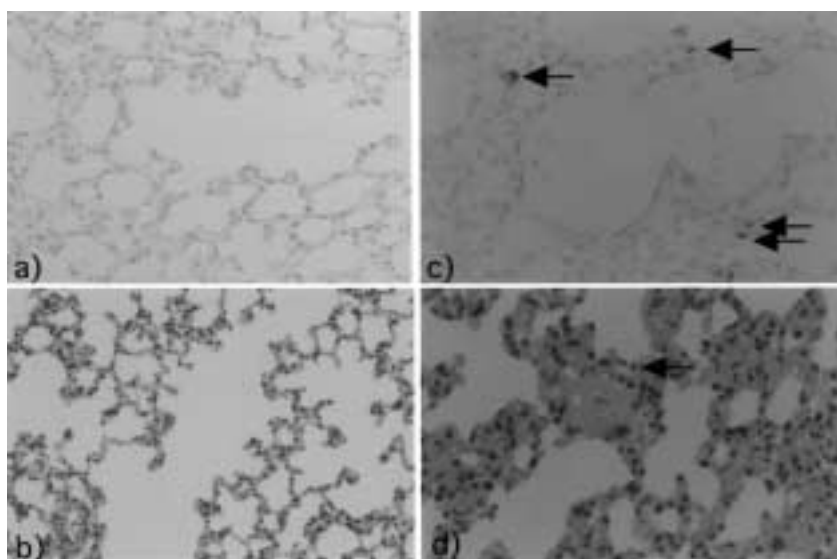


Fig. 3 IR 6h, lung
 a: TUNEL method: Apoptotic cell was not observed in the control ($\times 100$)
 b: H-E staining: Pyknosis was not observed in the control ($\times 100$)
 c: TUNEL method: More apoptotic cells () were observed among the alveolar cells than in the C group ($\times 200$)
 d: H-E staining: The thickening of the stroma and destruction of alveolar structure were more marked than in the C group. Pyknosis () was also observed ($\times 200$)

胞が認められたが、間質の浮腫・肺泡構造の破壊は軽度であった。

c. 腎臓

IR 6h群ではH-E染色において尿細管上皮細胞の浮腫や核凝縮像が認められ、また、TUNEL法ではアポトーシス細胞はC群と比較し、多く認められた(Fig. 4)。

IR24h群でのアポトーシス細胞は、C群と比較すると多く認められたが、IR 6h群と比較すると尿細管細胞の浮腫は軽度であり、TUNEL法でのアポトーシス細胞は

少ない傾向にあった。

d. 骨格筋

IR 6h群においては細胞間質の浮腫、およびTUNEL法でのアポトーシス細胞が認められた(Fig. 5)。C群では筋肉細胞間質の浮腫やアポトーシス細胞は認められなかった。

IR24h群においては筋肉細胞間質の浮腫が認められたが、IR 6h群と比較し軽度であり、TUNEL法ではアポトーシス細胞は認められなかった。また、C群では筋肉

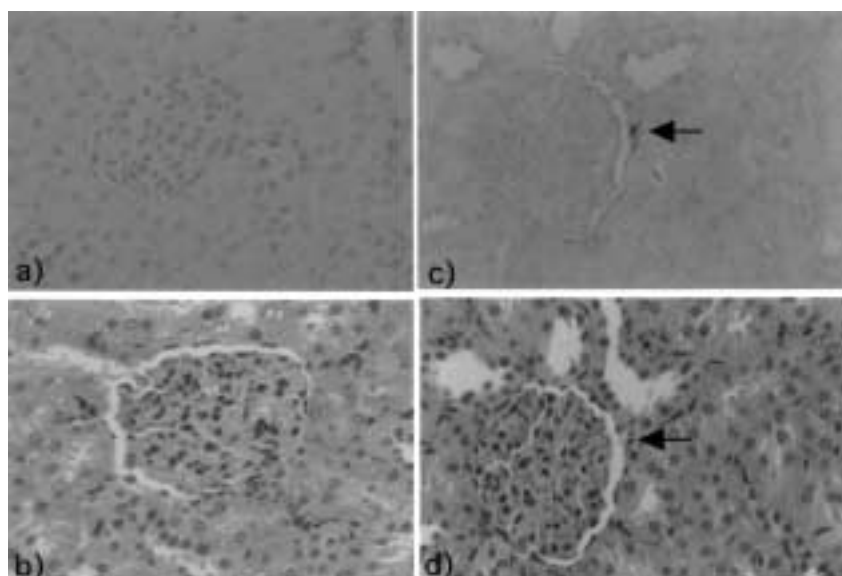


Fig. 4 IR 6h, kidney
 a: TUNEL method: Apoptotic cell was not observed in the control ($\times 200$)
 b: H-E staining: Pyknosis was not observed in the control ($\times 200$)
 c: TUNEL method: Apoptotic cell () of renal tubular epithelium was observed ($\times 200$)
 d: H-E staining: Edema and pyknosis () of renal tubular epithelium were observed ($\times 200$)

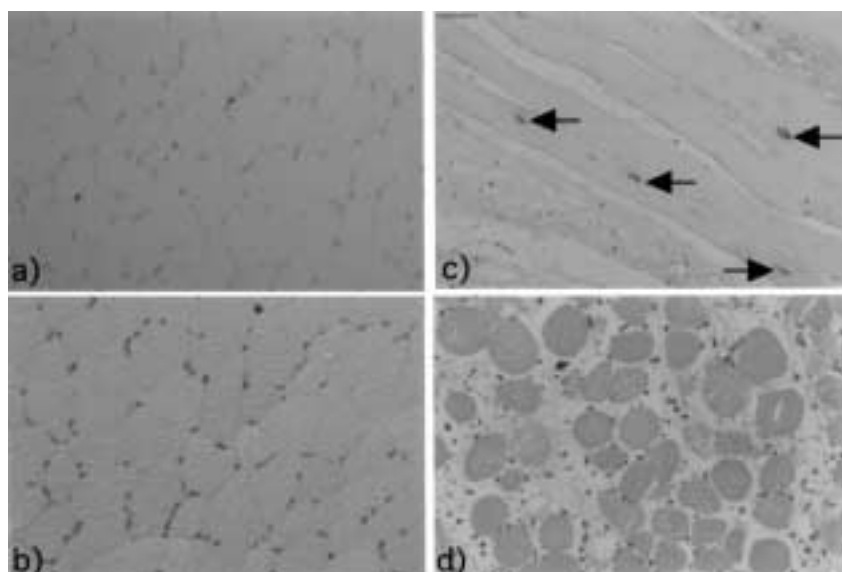


Fig. 5 IR 6h, muscle
 a: TUNEL method: Apoptotic cell was not observed in the control ($\times 100$)
 b: H-E staining: Pyknosis was not observed in the control ($\times 100$)
 c: TUNEL method: Stromal edema and apoptotic cells () were observed ($\times 100$)
 d: H-E staining: Stromal edema was observed ($\times 100$)

細胞間質の浮腫やアポトーシス細胞は認められなかった。

3. 電気泳動法

a. 心臓 (Fig. 6)

IR 6h群で断片化したDNAが認められ梯子状構造を呈したが、C群では認められなかった。

IR24h群ではIR群、C群ともにDNAの断片化は認められなかった。

b. 肝臓 (Fig. 7)

IR 6h群においてIR群で梯子状構造を呈する断片化したDNAが認められたが、C群では認められなかった。

IR24h群においてはIR群で梯子状構造を呈する断片化したDNAが認められたが、C群では認められなかった。

c. 腎臓 (Fig. 8)

IR 6h群ではC群とともにDNAの断片化が認められたが、IR群では梯子状構造が認められた。

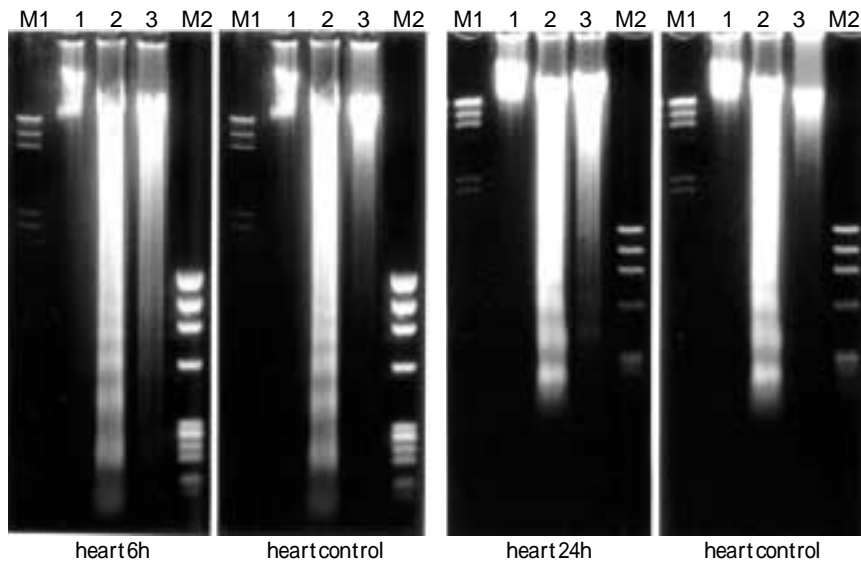


Fig. 6 Heart
Fragmentation of DNA were observed as a ladder pattern in the IR 6h and 24h groups, but not in the C group.

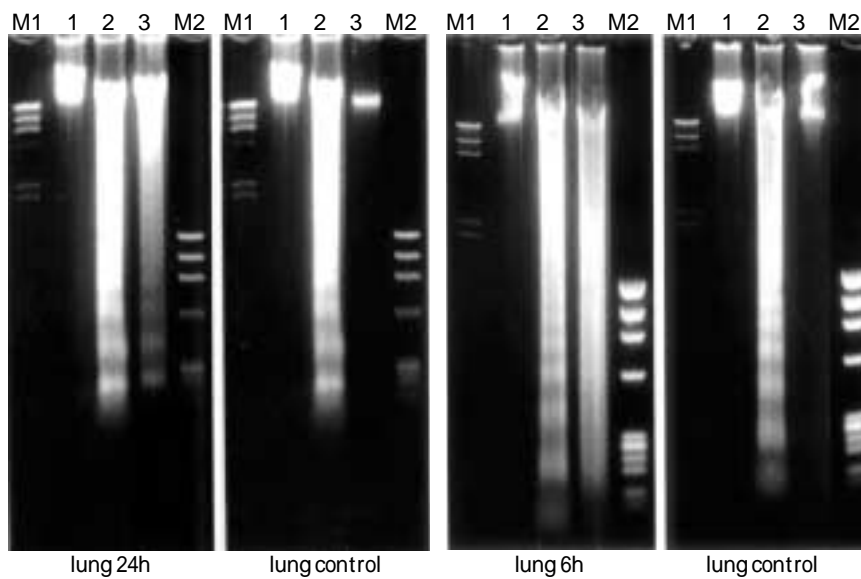


Fig. 7 Lung
Fragmentation of DNA were observed as a ladder pattern in the IR 6h and 24h groups, but not in the C group.

IR24h群ではC群ともにDNAの断片化が認められたが、差は認められなかった。

d. 骨格筋 (Fig. 9)

IR 6h群では梯子状構造を呈するDNAの断片化は認められたが、C群には認められなかった。

IR24h群ではIR群、C群ともにDNA断片化は認められなかった。

考 察

組織は虚血により障害を受けるが、虚血後の再灌流

によって虚血のみの場合よりも強い障害を受けるとされ、実験的にも報告されている¹²⁾。臨床においても下肢急性動脈閉塞症では、再灌流により多臓器障害が発症するMNMSがあり、腎不全や呼吸不全等が主体となり致命的になる重篤な病態である^{1,2)}。従来、MNMSは虚血部の組織障害による代謝性アシドーシス、高カリウム血症、高ミオグロビン血症などが関与して発症していると考えられていたが、それだけで病態のすべての説明は困難であった^{1,14)}。さらに、oxygen free radicalや未知毒の関与が示唆され、これら有害物質に対し

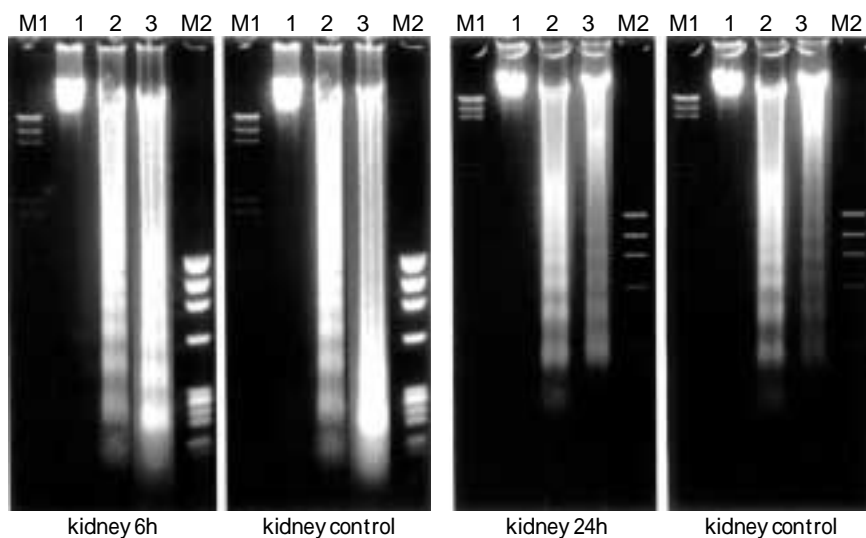


Fig. 8 Kidney
In the IR 6h and IR 24h groups, a ladder pattern was observed more marked than in the C group.

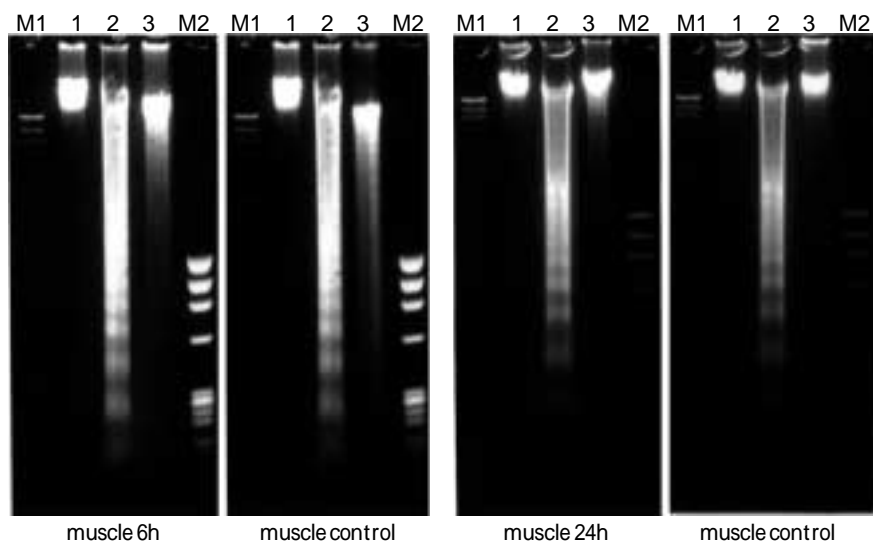


Fig. 9 Skeletal muscle
DNA fragmentation showing a ladder pattern was observed in the IR 6h group, but not in the C group. No DNA fragmentation was observed in the IR 24h or C group.

でのプラズマフィルトレーションの応用¹⁵やoxygen free radicalに対するoxygen radical scavengerの投与¹⁶等の報告がされてきたが、局所での障害と遠隔臓器障害を関連させる機序については不明であった。

当教室では虚血局所での臓器障害と遠隔臓器障害との関連を示唆するサイトカインの関与を報告^{7, 8)}している。また臓器移植に伴い移植臓器における虚血再灌流障害に関する研究が多くなされ、組織障害発生時におけるアポトーシスの関与も報告されている⁹⁻¹²⁾。しかし、アポトーシスについては虚血再灌流による各臓器での研究はされているが、遠隔臓器におけるアポトー

シスの関与についての報告はない。また、MNMSの病態解明や有効な治療法が確立していないのが現状である。

虚血により障害を受けた局所の血管内皮細胞や白血球などから各種サイトカインが産生され、虚血部局所でのサイトカインが上昇し、さらに血中にも流出し全身に循環する。そのために高サイトカイン血症となり、遠隔臓器障害が惹起され、多臓器障害(multiple organ dysfunction syndrome: MODS)の準備段階とされる全身性炎症性反応症候群(systemic inflammatory response syndrome: SIRS)⁷⁾の状態となると考えられる。SIRSは

細菌感染，外傷，熱傷，肺炎などが認められ，その病態はTNF- α やIL-8などの高サイトカイン血症であるとされており，MNMSもこのSIRSの概念に含まれると考えられる．

下肢虚血再灌流障害における遠隔臓器障害については，Blaisdellら¹⁸が下肢虚血モデルにおけるARDSの発生について報告し，当教室でも心臓，肺，腎臓について実験モデルにおいて組織障害を報告している^{19, 20}．下肢骨格筋の障害についての蜂谷¹²の報告では，虚血のみの群では高度のアシドーシスにもかかわらず骨格筋の障害は軽度であり，再灌流により組織障害が増強するとしている．また，アポトーシスについても虚血のみの群ではアポトーシスは認めず，再灌流群においてアポトーシスを認めたとしており，細胞障害の誘導に対してのフリーラジカル，サイトカイン等の関与を推論している．

従来，細胞死はネクローシス(necrosis)とされ細胞は膨化，融解してネクローシスを起こしていると考えられていた．しかし，1972年，Kerrら²¹は細胞死の形式としてネクローシスとは形態学的に異なる細胞死であるアポトーシス(apoptosis)という概念を提唱した．ネクローシスは細胞膜の透過性が亢進して細胞は膨化，融解し周囲に炎症を波及させる．一方，アポトーシスはクロマチンの凝集，核の縮小，さらに細胞も縮小し周囲組織から遊離し，この過程でDNAは約180塩基対に断片化され，アポトーシス小体となる．アポトーシス小体は周囲のマクロファージ等に貪食されるため，周囲に炎症は波及せず時間的，空間的にも散在的に発生し急速に進行する²²．

生体内で生成されるNOはL-アルギニンからNO合成酵素(NOS)により合成されるが，内皮型(eNOS)および誘導型(iNOS)の二つの酵素により合成される．iNOSはTNF- α ，IL-1 β などのサイトカインにより誘導され，大量のNOを産生してアポトーシスを起こすとされている²³．さらにNOがスーパーオキシド($O_2^{\cdot-}$)との反応で生じたペルオキシ亜硝酸イオン($ONOO^-$)がアポトーシスに関与している可能性も報告²⁴されている．また，NOにはそれ自体によるアポトーシスの誘導のみならず，アポトーシスを抑制する酵素であるグルタチオンペルオキシダーゼ(GPx)の活性を低下させることが証明²⁵されており，このGPxが阻害されることで活性酸素が蓄積しアポトーシスが誘導されている可能性がある．

アポトーシスシグナルがミトコンドリアに伝達するとミトコンドリア膜電位(MMP)が低下し，cytochrome cがミトコンドリアから放出される．放出されたcytochrome cによりcaspase familyが活性化され，最後にcaspase 3が活性化される．caspase 3はアポトーシスに特徴的なDNAの断片化に関与するDNAヌクレアーゼ(DNase)であるcaspase-activated deoxyribonuclease(CAD)²⁶を活性化し，CADは核膜を通過してDNAの断片化を生じさせる．また，caspase 3により細胞質にあるapoptotic chromatin condensation inducer in the nucleus(ACINUS)²⁷も活性化され，核クロマチンの凝集が起こるとされている．

これらの報告を参考にして急性動脈閉塞症における再灌流による遠隔臓器障害を次のように推論した(Fig. 10)．急性動脈閉塞症が発症すると虚血部での嫌気性代謝が促進され，同時にchemical mediatorが活性化される．再灌流によりchemical mediatorがさらに活性化され，TNF- α やIL-1 β がマクロファージ等から産生される．次いでサイトカインネットワークの下流が活性化され，さらに接着分子も産生される²⁸．その結果として微小循環不全や好中球の組織浸潤が誘導され，フリーラジカル，NO，好中球エラスターゼ等の放出による局所での組織障害が生じる²⁹．また，組織障害過程のなかでTNF- α 等により，好中球等による障害のみならずアポトーシスも惹起されて細胞障害が発生する³⁰．

こうしてchemical mediatorにより惹起された組織障害は局所から拡大し，局所でのサイトカイン高値が遷延して高サイトカイン血症となる．この高サイトカイン血症は，遠隔臓器での好中球の組織浸潤による障害のみならず，TNF- α ，ICE，フリーラジカル，NO等が遠隔臓器でもアポトーシスを誘導して組織障害を引き起こされ，MNMSが発症すると推測した．

本実験においても虚血部骨格筋だけでなく，心臓，肺，腎臓でもアポトーシスが認められたことは，下肢急性動脈閉塞症の虚血再灌流障害のなかで，遠隔臓器での臓器障害の発現にアポトーシスに関与している可能性が示唆された．また，遠隔臓器のなかでも肺・腎臓にアポトーシスが多く認められ，遷延していたことは，MNMSの臨床においては腎不全，呼吸不全の合併症が多いという知見と考え合わせると興味深い所見であると思われる．肺には虚血部からの静脈血が流入し，腎臓は濾過作用を有していることが，サイトカイ

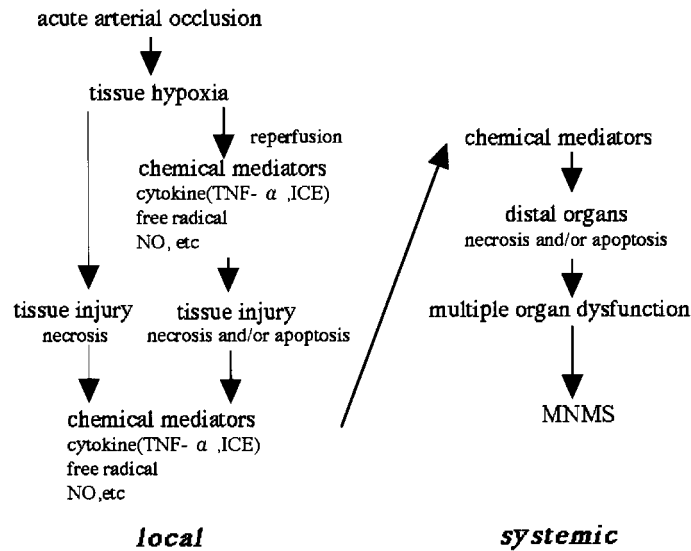


Fig. 10 The pathway to the onset of MNMS in acute arterial occlusion(inference)

ンなどによる影響を受けやすい臓器である可能性が示唆され、また、組織障害誘発因子の影響を受けやすい結果、アポトーシスが誘発され、さらに遷延する可能性があると考えられる。今後、虚血再灌流障害の予防、軽減には虚血再灌流によるアポトーシスの発現機構の解明も必要と思われた。

結 語

1. 非虚血部である遠隔臓器においてアポトーシスが認められたことは、急性動脈閉塞症の虚血再灌流障害発生にアポトーシスが関与している可能性が示唆された。
2. 虚血部骨格筋では再灌流により、虚血性変化だけでなくアポトーシスも混在し、組織障害を引き起こしているものと考えられた。

稿を終えるに臨み、ご指導、ご校閲を賜りました恩師瀬在幸安教授、根岸七雄教授に深く謝意を表するとともに、ご協力をいただいた教室の諸兄に心から感謝の意を表します。

本論文の要旨は第27回日本血管外科学会総会(平成11年5月21日、大宮)、第40回日本脈管学会総会(平成11年12月10日、広島)、第100回日本外科学会総会(平成12年4月13日、東京)において発表した。

文 献

- 1) Haimovici, H.: Metabolic complications of acute arterial occlusions and related conditions: Role of free radicals (myonephropathic metabolic syndrome) Haimovici's Vascular Surgery. Appleton & Lange, Norwalk, 1989, pp. 386-408.
- 2) Anner, H., Kaufman, R. P., Kobzik, L., et al.: Pulmonary hypertension and leukosequestration after lower torso ischemia. Ann. Surg., 206: 642-648, 1987.
- 3) Mehta, J. L., Nichols, W. W., and Mehta, P.: Neutrophils as potential participants in acute myocardial ischemia: Relevance to reperfusion. J. Am. Coll. Cardiol., 11: 1309-1316, 1988.
- 4) Reynolds, J. M. and McDonagh, P. F.: Early in reperfusion, leukocytes alter perfused coronary capillarity and vascular resistance. Am. J. Physiol., H256: H982-H989, 1989.
- 5) Summers, S. T., Wyatt, L. E., and Freischlag, J. A.: Persistent neutrophil (PMN) activation 24hr after ischemia and reperfusion. J. Surg. Res., 56: 130-133, 1994.
- 6) 梅澤久輝: 下肢急性動脈閉塞症の再灌流障害における白血球の関与 - 急性動脈閉塞症の実験的検討 - . 日心外会誌, 26: 141-149, 1997.
- 7) 知久信明: 急性動脈閉塞症の再灌流障害における ICAM-1, IL-8の関与に対する実験的検討. 日心外会誌, 26: 217-223, 1997.
- 8) 長 伸介: 急性動脈閉塞症の再灌流障害におけるサイ

- トカインの実験的検討 - IL-8, IL-10について - . 日心外会誌, 27 : 282-287, 1998 .
- 9) Gottlieb, R. A., Burlison, K. O., Kloner, R. A., et al.: Reperfusion injury induces apoptosis in rabbit cardiomyocytes. *J. Clin. Invest.*, 94: 1621-1628, 1994.
- 10) Shimizu, S., Eguchi, Y., Kamiike, W., et al.: Induction of apoptosis as well as necrosis by hypoxia and predominant prevention of apoptosis Bcl-2 and Bcl-XL. *Cancer Res.*, 56: 2161-2166, 1996.
- 11) Schurer, M., Colombel, M. C., Sawczuk, I. S., et al.: Morphologic, biochemical, and molecular evidence of apoptosis during the reperfusion phase after brief periods of renal ischemia. *Am. J. Pathol.*, 140: 831-838, 1992.
- 12) 蜂谷 仁：虚血，および虚血後再灌流における骨格筋の病理組織学的，分子生物学的検討．愛医大雑誌，24 : 109-120, 1996 .
- 13) Hotchkiss, R. S., Swanson, P. E., Freeman, B. D., et al.: Apoptotic cell death in patients with sepsis, shock, and multiple organ dysfunction. *Crit. Care. Med.*, 27: 1230-1251, 1999.
- 14) 根岸七雄，新野成隆，瀬在幸安，他：血行再建後のMyonephropathic metabolic syndromeの1 治験例．循環器科，16 : 380-385, 1984 .
- 15) 一和多雅雄：Myonephropathic metabolic syndromeに対する新しい予防と治療方法 - プラズマフィルトレーションの応用 - . 日外会誌，89 : 1114-1121, 1988 .
- 16) 渡井健男：MNMSに対するoxygen radical scavengerの効果に関する研究 - とくにSOD活性と組織逸脱酵素に対する実験的検討 - . 日心外会誌，20 : 5-10, 1990 .
- 17) Members of the American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine Consensus Conference Committee: American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine Consensus Conference: Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. *Crit. Care. Med.*, 20: 864-874, 1992.
- 18) Blaisdell, F.W. and Lewis, F.R.: Thromboembolism in the etiology of the respiratory distress syndrome. *Respiratory distress syndrome of shock and trauma: Post-traumatic respiratory failure.* W. B. Saunders Company, Philadelphia, 1977, pp. 84-116.
- 19) 鈴木克行：下肢虚血再灌流後の心臓と肺の障害 - 超微形態的研究 - . 日心外会誌，26 : 150-157, 1997 .
- 20) 四万村三恵：急性動脈閉塞における腎臓および動脈の光顕的，電顕的所見．日心外会誌，21 : 24-34, 1992 .
- 21) Kerr, J. F. R., Wyllie, A. H., and Currie, A.R.: Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer*, 26: 239-257, 1972.
- 22) Kerr, J. F. R. and Harmon, B. V.: Apoptosis: Its significance in cancer and cancer therapy. *Cancer*, 74: 2013-2026, 1994.
- 23) Ing, D. J., Zang, J., Dzau, V. J., et al.: Modulation of cytokine-induced cardiac myocyte apoptosis by nitric oxide, bax, and bcl-x. *Circ. Res.*, 84: 21-33, 1999.
- 24) Jacobson, M.D.: Reactive oxygen species and programmed cell death. *Trends. Biochem. Sci.*, 21: 83-86, 1996.
- 25) Asahi, M., Fujii, J., Suzuki, K., et al.: Inactivation of glutathione peroxidase by Nitric Oxide. *J. Biol. Chem.*, 270: 21035-21039, 1995.
- 26) Liu, X., Kim, C. N., Yang, J., et al.: Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. *Cell*, 86: 147-157, 1996.
- 27) Enari, M., Sakahira, H., Yokoyama, H., et al.: A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature*, 391: 43-50, 1998.
- 28) Sahara, S., Aoto, M., Eguchi, Y., et al.: Acinus is a caspase-3-activated protein required for apoptotic chromatin condensation. *Nature*, 401: 168-173, 1999.
- 29) Walz, A., Peveri, P., Aschauer, H., et al.: Purification and amino acid sequencing of NAF, a novel neutrophil-activating factor produced by monocytes. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 149: 755-761, 1987.
- 30) 川上正舒，黒木昌寿：TNFとアポトーシス．医学のあゆみ，187 : 333-338, 1998 .

The Role of Apoptosis in Reperfusion Injury Following Acute Arterial Occlusion of the Lower Extremities

Tetsuya Niino

Second Department of Surgery, Nihon University School of Medicine

Key words: Apoptosis, Reperfusion injury, TUNEL method

We induced acute arterial occlusion-reperfusion injury in rats and experimentally investigated the development of apoptosis in ischemic and nonischemic locations. The abdominal aorta below the origin of the renal arteries and the common femoral artery of both limbs were occluded for 6 h. After 6 or 24 h of reperfusion, blood was collected, and the heart, lung, kidney, and femoral skeletal muscle were removed. Serum CPK was measured, and the development of apoptosis in each organ was compared using hematoxylin-eosin (H-E) staining, the TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling (TUNEL) method, and electrophoresis. The 6-h reperfusion group had a higher level of CPK, compared with the control group ($p=0.03$). H-E staining and TUNEL showed many apoptotic cells in each organ. Electrophoresis also showed a ladder pattern of DNA fragments. The 24-h reperfusion group had a decreased level of CPK with no significant difference from that in the control group but showed apoptosis in the lung and kidney on H-E staining and TUNEL. In the 6-h reperfusion group, not only the ischemic skeletal muscle but also the nonischemic heart, lung, and kidney showed scattered apoptotic cells. Apoptosis was observed in the lung and kidney even after 24 h of reperfusion, which suggests persistent organ damage and agrees with the clinical findings in the development of damage to distant organs in association with ischemic-reperfusion injury due to acute arterial occlusion of the lower limb.

(Jpn. J. Vasc. Surg., **10**: 661-670, 2001)