

学位論文の要旨

学位の種類	博士	氏名	海老澤 良昭
学位論文題目			
Direct evidence that induced nitric oxide production in hepatocytes prevents liver damage during lipopolysaccharide tolerance in rats (ラット LPS トレランスにおける肝細胞誘導型一酸化窒素(NO)の肝障害抑制作用の直接的証明に関する研究)			
共 著 者 名			
旭川医科大学 第二外科 河野 透、浅間 俊之、 千里 直之、菅原 睦、 葛西 眞一			
旭川医科大学 第三内科 綾部 時芳、高後 裕			
旭川医科大学 看護学科 石川 一志、岩元 純			
獨協医科大学 消化器科 米田 政志			
掲載雑誌 Journal of Surgical Research, in press (2003)			
【研究目的】			
<p>lipopolysaccharide(LPS)投与によって NO は体内で過剰に産生されるが、LPS によって引き起こされる LPS トレランス (中等度 LPS 肝障害を起こした肝臓は致死量 LPS 大量投与に耐性) に NO が関与しているか否かは明らかではない。われわれはこれまでに、LPS による中等度肝障害ラットモデルにおいて、肝臓内で誘導型 NO 合成酵素から大量の NO が産生され、肝臓表面から湧出することを報告した<sup>(1)</sup>。さらに LPS 投与による経時的 NO 産生量は、LPS 投与後早期の時点では LPS 投与量と無関係であり、早期 NO は肝細胞保護を目的に産生されていることを報告した<sup>(2)</sup>。しかしながら、肝臓内での細胞保護的 NO 産生細胞の同定については未解決であり、これまで NO 合成酵素免疫抗体による免疫染色が主に試みられてきたが結論は得ていない。本研究は、肝における細胞保護的 NO 産生細胞を、最近開発された NO 産生細胞を直接的に同定できる diaminofluorescein 法(DAF 法)を用いて初めて検討した。また、早期 LPS トレランスに LPS 誘導早期 NO が関与しているか否かについて検討した。</p>			

## 学位論文の要旨

### 【材 料・方 法】

動物は体重 240~280g の Wistar 系雄性ラットを使用した。

#### 1. LPS トレランス発現動物モデルの作成と細胞分離法

生食または low dose LPS(LLPS; 0.01~1000 $\mu$ g/kg)腹腔内投与(IP)後に引き続き、high dose LPS(HLPS; 5mg/kg)を各種時間間隔(4~16 時間)で IP した。HLPS 投与 10 時間後に犠牲死させ、血液(AST, ALT)および肝臓サンプル採取を行った。続いて門脈よりコラゲナーゼを注入し細胞分離(コラゲナーゼ酵素消化法)を行い、肝細胞を採取、さらにパーコール法を用いてクッパー細胞分離を行った。

#### 2. NO 産生細胞の同定法 (DAF 法)

NO 産生細胞を同定するために、分離肝細胞をシャーレに接着させ、クレブス液に浸し、氷温にて 4,5-Diaminofluorescein-2 diacetate (DAF-2 DA; 7 $\mu$ M) を添加、その後、クレブス液で持続還流しながら蛍光顕微鏡下にて、細胞に励起波長 495nm の蛍光を当て、DAF 蛍光(緑色 515nm)を細胞が生きた状態で観察した。その後、直ちに 1%パラフォルムアルデヒドで固定し、共焦点レーザー蛍光顕微鏡を使用し画像解析ソフトにて発光率を解析した。肝細胞およびクッパー細胞における NO 産生率は、それぞれ 1000 個/rat、あるいは 100 個/rat にて算出した。肝細胞同定には抗アルブミン抗体を使用し、クッパー細胞はその貪食能を利用し Rhodamine 含有 Latex を犠牲死前に投与し同定した。NO 合成酵素は各種 NO 合成酵素免疫抗体を用いて同定した。

#### 3. 統計学的検討

本実験で得られた全ての実験結果は、平均値 $\pm$ 標準誤差で表記した。多群間の比較は ANOVA、引き続き Duncan's contrast test により行なった。独立した 2 群間の比較は Mann-Whitney test で検定した。危険率 5%以下を統計学的有意差ありとした。

### 【成 績】

#### 1) LLPS 前投与量とトレランス効果発現

HLPS 投与 10 時間後の血清 AST、ALT 値は共に上昇し、重度の急性肝障害を生じた。HLPS 投与 8 時間前に、LLPS(0.1, 1, 10, 100 $\mu$ g/kg)を前投与しておくると血清 AST、ALT 値の上昇は有意に抑制され、最大のトレランス効果は 1 $\mu$ g/kg 群と 10 $\mu$ g/kg 群で認められた。しかし 0.01 $\mu$ g/kg 群, 1000 $\mu$ g/kg 群では有意な抑制は認められなかった。

#### 2) LLPS 前投与時間とトレランス効果発現

LLPS (1 $\mu$ g/kg) 前投与時間は6時間後から12時間までトレランス効果が認められ、最大のトレランス効果は8時間前投与群で観察された。4時間群、16時間群では有意なトレランス効果は認められなかった。

3) NO合成酵素抑制とトレランス効果

L-NAME併用によって、LLPS前投与によるLPSトレランスは有意に抑制された。

4) DAF法によるNO産生細胞同定

LLPS投与群では、投与8時間後にDAF陽性肝細胞(NO産生肝細胞)率は84%と最多となり、48時間後では5%以下となった。一方、生食投与群においてNO産生肝細胞は3%前後であった。また、免疫染色にてNO産生肝細胞に誘導型NO合成酵素とアルブミン産生が認められた。クッパー細胞はLLPS投与の有無に関わらずDAF陽性率は約95%とほぼ一定の値を呈していた。

【考 察】

本実験でLLPS前投与によって、後投与されたHLPSによる急性肝障害が抑制された。この現象はLPSトレランスに含まれる。LPSトレランスは、その時間経過から24時間以内に生じる早期トレランス、72時間後に再出現する晚期トレランスの2つに分類されており、本実験は早期トレランスに属すると考えられる。早期LPSトレランスの機序に関して、LPS自体がNO産生の強力な誘発物質であることから、NOの関与が示唆されてきたが未だ十分解明されていない。その理由として、これまでのLPSトレランス関連研究で前投与されたLPSは、中等度肝障害を誘発する量で検討されており、肝臓のみならず全身への影響が生じたことが推察される。本研究で前投与したLPSは1 $\mu$ g/kgと極微量であり、肝障害を起こさず全身への影響も無視できる量であり、LPSトレランスの機序解明には有利である。本実験結果から、早期LPSトレランスにおける肝細胞保護効果発現に肝細胞誘導型NOが大きく寄与していることが考えられた。これまでも、薬理学的手法によって早期LPSトレランスの発現機序にNO合成促進が不可欠であることが示されてきたが、iNOS(誘導型NO合成酵素)欠損マウスを用いた研究では、iNOSはLPSトレランス発現そのものに関与しない可能性が示唆されている。このことは早期LPSトレランスの発現機序に複数の因子が関与している可能性が考えられ、機序解明にはさらなる研究が必要であることを示す。NOの細胞保護効果発現機序に関してこれまで、NOの血管拡張作用、血管内皮細胞へのリンパ球、単球、血小板の付着抑制作用、血小板凝集抑制作用によって生じる肝類洞内の血

## 学位論文の要旨

流維持・改善などの肝血流維持作用、NO による抗酸化作用などが報告されている。われわれは劇症肝炎モデルであるガラクトサミン大量投与モデルで、LLPS 前投与によって、ガラクトサミン肝障害を抑制し、生存を向上させることを報告したが、LLPS 誘発肝 NO を産生する主たる細胞を明らかにすることはできなかった<sup>(3)</sup>。NO はガス状物質であり、NO 自体を補足し、産生細胞を同定する確固たる手法が存在しなかったため、肝 NO 産生細胞を特定することは困難であった。最近、in vivo で NO の機能について直接的な証拠を得るために、NO に対する新しい高感度蛍光標識物質(検出限界 5nM)である DAF-2 が開発された。われわれの知る限りでは、本研究は生きた肝細胞から NO が産生されることを直接的な証拠で示した初めての報告である。DAF 法による解析結果から、肝細胞は正常時にはほとんど NO 産生が行われず、LLPS 投与 8 時間後において DAF 陽性細胞数は最大となり、LPS トレランスが最大の効果を発現する時間と一致している。これに対し、クッパー細胞は LLPS 投与前後で DAF 陽性細胞数に変化はなく、早期 LPS トレランス発現機序に寄与する NO は肝実質細胞である肝細胞が主体となっていることが強く示唆された。また、免疫染色法で NO 合成酵素が誘導型であることが明らかとなり、早期 LPS トレランス発現に寄与する細胞保護的 NO が LLPS によって誘発された NO であることと一致した。

### 【結 論】

- 1 LLPS によって誘導された NO が早期 LPS トレランス発現に寄与していることが明らかとなった。
- 2 DAF 法によって早期 LPS トレランス発現に寄与する NO は、肝実質細胞である肝細胞から誘導型 NO 合成酵素を介して産生されることを明らかにした。

### 【引 用 文 献】

1. Ando N., Kono T., Iwamoto J. *et al.* Nitric oxide release from the liver surface to the intra-abdominal cavity during acute endotoxemia in rats. *Nitric Oxide* 2: 481-488, 1998
2. Kamiya K., Kono T., Iwamoto J. *et al.* The cytoprotective role of lipopolysaccharide-induced nitric oxide against liver damage during early phase of endotoxemia in rats. *Shock* 14: 229-233, 2000
3. Kono T., Kotani H., Asama T. *et al.* Protective effect of pretreatment with low-dose lipopolysaccharide on D-galactosamine-induced acute liver failure. *Int J Colorectal Dis* 17:




学位論文の要旨

98-103, 2002.

【参 考 論 文】

1. 河野 透、富田一郎、海老澤良昭、葛西眞一ら Circular skin excision and Purse string skin closure (CEP)の炎症性腸疾患手術への応用 消化器科、第37巻、473-479、2003
2. 河野 透、海老澤良昭、葛西眞一ら DAF-2DA 法による生きた肝組織レベルにおける NO 産生細胞の同定法の開発とその意義 薬理と治療、30, 339-341, 2002
3. Kono T., Chisato N., Ebisawa Y. *et al.* Impaired nitric oxide production of myenteric plexus in colitis detected by a new bio-imaging system. *J Surg Res*, 2003 (in press)

学位論文の審査結果の要旨

報告番号	第 号		
学位の種類	博士(医学)	氏名	海老澤 良昭
<p>審査委員長 小川 隆洋 </p> <p>審査委員 葛西 真一 </p> <p>審査委員 若宮 伸隆 </p>			
<p>学位論文題目</p> <p>Direct evidence that induced nitric oxide production in hepatocytes prevents liver damage during lipopolysaccharide tolerance in rats</p> <p>(ラット LPS トレランスにおける肝細胞での誘導型 NO (一酸化窒素)の肝障害抑制作用の直接的証明に関する研究)</p>			
<p>低容量の lipopolysaccharide (LPS) で処理をした肝臓は、その後、致死量の LPS を投与してもその毒性に対する耐性になることが知られている。しかし、この LPS トレランスの発現機序は不明である。著者らのグループは、ラットに低容量の LPS を投与するモデルにおいて、LPS 投与後比較的早期に肝臓に誘導型 NO 合成酵素が発現し、肝臓表面から大量の NO が湧出することを報告している。しかし、LPS 投与後早期に産生される NO が肝細胞保護作用をもつか否かは不明であり、また肝臓内でいかなる細胞が NO を産生するのかについても未だ分かっていない。</p> <p>本研究では、はじめに LPS トレランスに LPS 誘導早期 NO が関与しているか否かを検討した。肝障害を起こさず、また全身への影響もほとんどない低容量の LPS (1 又は 10 µg/kg)を 8 又は 10 時間前に投与することにより、高容量 LPS (5mg/kg) による急性肝障害が効果的に抑制された。一方、NO 合成酵素抑制剤である L-NAME を LPS 前投与と併用すると、LPS トレランスが有意に抑制され、LPS トレランスに NO が大きく寄与していることが明らかになった。つぎに、LPS 処理後、肝細胞及び Kupffer 細胞を分離して diaminofluorescein 法 (DAF 法)を用いて NO 産生能を検討したところ、Kupffer 細胞は LPS 処理に関係なく恒常的に NO を産生していたのに対して、肝細胞は LPS 投与に反応して NO を産生することが明らかになった。さらに、免疫染色により誘導型 NO 合成酵素が LPS 処理により肝細胞に誘導されることが明らかになった。</p>			

## 学位論文の審査結果の要旨

以上の結果から、肝障害を惹起しない低容量の LPS により肝細胞に誘導型 NO 合成酵素が誘導され、それによる NO の産生亢進が LPS トレランスの原因となっていることが明らかになった。

論文提出者に対する諮問審査においても適切な回答がなされ、本論文提出者は関連分野に関する十分な知識を有していると認められた。よって本審査委員会は本論文が医学博士の学位に値するものと判断した。