

AMCoR

Asahikawa Medical University Repository <http://amcor.asahikawa-med.ac.jp/>

薬理と治療 (2002.11) 30巻Suppl.2:S339~341.

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

河野 透, 海老澤良昭, 菅原 睦, 浅間俊之, 千里直之, 石川一志, 岩元 純, 葛西眞一

9. 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

旭川医科大学 第二外科

河野 透 海老澤 良昭 菅原 睦
浅間 俊之 千里 直之

旭川医科大学看護学部 応用生理学科

石川 一志 岩元 純 葛西 眞一

Bio-imaging of Nitric Oxide-producing Cells in Slices of Rat Liver Using 4, 5-Diaminofluorescein

Toru Kono¹⁾, Yoshiaki Ebisawa¹⁾, Mutubu Sugawara¹⁾,
Toshiyuki Asama¹⁾, Naoyuki Chisato¹⁾, Kazushi Ishikawa²⁾,
Jun Iwamoto²⁾ and Shinichi Kasai¹⁾

¹⁾Asahikawa Medical College, School of Medicine, Department of Second Surgery

²⁾Asahikawa Medical College, School of Nursing, Division of Applied Physiology

はじめに

グラム陰性桿菌の菌体成分である lipopolysaccharide (LPS) の投与ラット敗血症モデルにおいて、LPS によって細胞内で誘導型一酸化窒素 (NO) 合成酵素遺伝子から mRNA が転写され、合成された誘導型 NO 合成酵素によってアミノ酸 L-arginine と酸素から NO が大量に生成されると考えられている。臨床上、敗血症患者において特有な末梢血管拡張に伴う血圧低下が NO によって惹起されることはすでによく知られている。しかしながら、敗血症時において肝臓で大量の誘導型 NO 酵素から産生される NO に関して、肝細胞障害発生の原因または増悪因子として当初、考えられていた。

そこで、われわれはガス生理活性物質である NO が肝臓で産生されるがガスであるため細胞膜を自由に通過できる性質上、肝臓表面から湧出し、腸間膜血流など腹腔内臓器、組織の血流への影響を与えているのではないかという仮説を立て動物モデルで検証した。その結果、LPS 投与による敗血症発症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、肝臓内に充満した NO が肝臓表面から腹腔内に湧出すること経時的に直接的に NO 測定し報告してきた¹⁾。さらに、肝障害を発生させない、微量な LPS 投与によっても投与後 8 時間をピークにした一過性の NO 産生が肝臓内に起こり、誘導型 NO 合成酵素を介して行われることを明らかにした。その経時的変化、量的な変化について

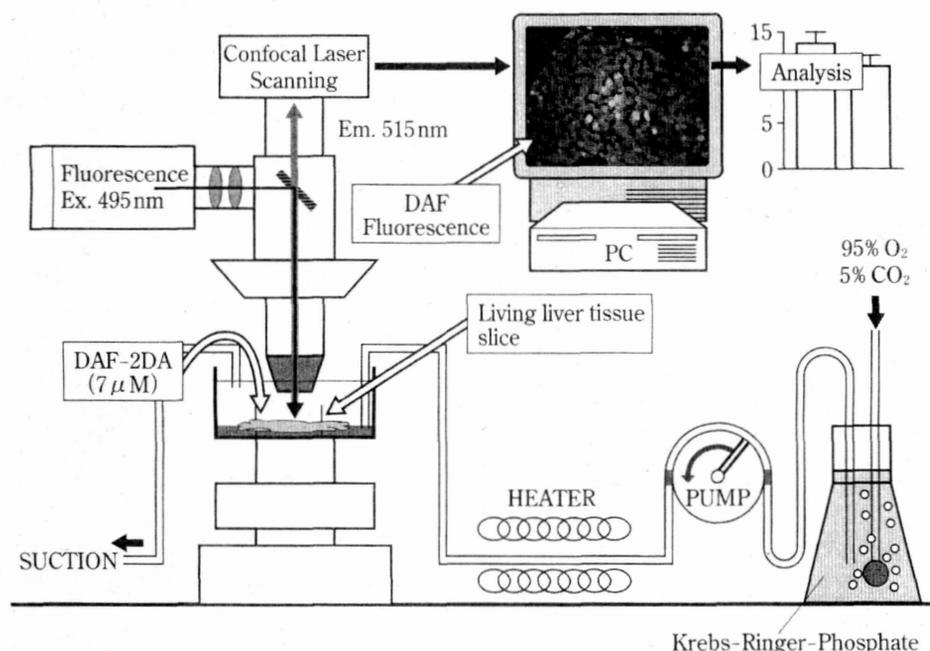


図 1 肝組織レベル用 DAF-2DA 法

も微量, 大量 LPS 投与で比較検討した結果, LPS 投与 10 時間以内であれば, 両者に有意な差はなく, しかも, 10 時間以内に産生される NO を選択的合成阻害剤で産生抑制することで肝障害が増悪することが観察された²⁾。

したがって, われわれは敗血症初期時, 10 時間以内に産生される NO は細胞保護を目的に産生されるのではないかという仮説を立てガラクトサミン急性肝障害ラットモデルにて検証した。その結果, 肝障害を発生させない程度の微量な LPS を前投与し, その 8 時間後にガラクトサミンを後投与すると, 対照群に比べて有意に肝障害が抑制され, 生存率の有意な改善も認められた³⁾。

さらに, 最近, 小島らの方法を応用し開発した NO 産生細胞をきたまま検証できる方法 daiminofluorescein-2 diacethyl (DAF-2DA) 法を使用し, LPS 投与ラットにおいて肝細胞が細胞保護効果を有する NO を産生しているか否かを検討した^{4,5)}。その結果, 肝細胞自身が, 細胞保護を目的に誘導型 NO 酵素を介して NO 産生を行っていることを明らかにした。しかしながら, NO 産生を行っている肝細胞の肝臓内における分布については全く不明であった。そこで, 今回われわれは, 前述の DAF-2DA 法を発展させ, 肝臓の組織レベルでの解析を行った。

I 方 法

肝組織レベル用 DAF-2DA 法 (図 1) : DAF-2DA は細胞膜透過性があり, 細胞内のエステラーゼにより加水分解され OH 基を持つ DAF-2 となる。DAF-2 は細胞膜透過性がないので細胞内に留まり, DAF-2 のアミノ基が NO と反応し DAF-2T となり, 波長 495 nm の光を当てると波長 515 nm の緑色蛍光を放ち, 蛍光顕微鏡にて NO 産生細胞を観察可能となる。DAF-2T 自身は細胞膜透過性がなく細胞内に留まるので, 緑色蛍光を放した NO 産生細胞は, 長時間観察同定することができる。さらに, 固定液で固定されても緑色蛍光はほとんど減衰しない。また, NO に特異的に反応し, 蛍光強度と NO 産生量は正相関する。そこで, 共焦点レーザーの特性を利用して, 肝臓の薄切切片 (150 μm) をビプラトームで作製。切片をプラスチックシャーレに固定し, 蛍光顕微鏡下に DAF (7 μM) 添加し, クレブス液で灌流しながら波長 495 nm の光励起, その後レーザー顕微鏡にて観察し, 付属する画像解析用コンピュータソフトにて組織画像の 3D 構築, NO 産生細胞蛍光強度を測定。観察後, 組織は固定し, アルブミン免疫染色にて肝細胞であることを確認。また, NO 合成酵素の同定も免疫染色にて行った。

II 結 果

正常肝組織における肝細胞の NO 産生細胞はごく少数で、特に、有意な分布差は認められなかった。クッパー細胞の多くは NO 産生細胞であった。微量 LPS 投与 (0.001 mg/kg) 8 時間後に分離した肝細胞の約半分の肝細胞が誘導型酵素から NO を産生していた。肝組織レベルでは zone 2 において NO 産生肝細胞が多数認められた。組織固定後の免疫染色で、NO 産生肝細胞はすべてアルブミン免疫染色と二重染色となった。また NO 合成酵素の免疫染色では誘導型 NO 合成酵素と二重染色が可能であった。

III 考 察

DAF-2DA 法による肝組織レベルにおける NO 産生細胞同定法を用いて観察した敗血症時における肝細胞分布は主に、zone 2 であり、敗血症時における肝障害発生部位に一致していた。このことから極微量な LPS 投与によって細胞保護を目的に NO が大量に肝臓内の zone 2 で産生されることで、zone 2 の肝細胞障害の発生が抑制されている可能性が強く示唆された。また、NO 産生量の時間的変化が、われわれが報告してきた微量 LPS 投与モデルにおける肝臓での NO 産生時間経過と極めて一致していた^{1,2)}ことから共焦点レーザーで観察した画像による 3D 解析で、組織レベルでの NO 産生量を相対比較できることが示唆された。しかしながら、組織レベルでの診断限界として組織の厚さが現時点では、レーザー到達可能距離 (200 μ m) に依存するため、さらな

る解析能力を発揮するためには多光子レーザーなど新技術の開発が必要である。

おわりに

生きた細胞に浸透し NO と特異的に反応して蛍光を発する daiminofluorescein-2 diacethyl (DAF-2DA) を用いて、NO 産生肝細胞の同定法を開発し、報告してきたが、最近、さらに共焦点レーザーを導入することで、肝組織レベルでの NO 産生部位を観察、画像解析手法を開発した。

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* 1998 ; 2 : 481-8.
- 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* 2000 ; 14 : 229-33.
- 3) Kono T, Kotani H, Asama T, et al. Protective effect of pre-treatment with low-dose lipopolysaccharide on D-galactosamine-induced acute liver failure. *International Journal of colorectal disease* 2002 ; 17, 98-103.
- 4) Kojima H, Nakatsubo N, Kikuchi K, et al. Detection and imaging of nitric oxide with novel fluorescent indicators : diamino fluoresceins. *Anal Chem* 1998 ; 70 : 2446-53.
- 5) Kojima H, Sakurai K, Kikuchi K, et al. Development of a fluorescent indicator for nitric oxide based on the fluorescein chromophore. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 1998 ; 46 : 373-5.

* * *