

# AMCoR

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

薬理と治療 (2001.04) 29巻Suppl.1:S13~15.

【肝病態生理研究のあゆみ】

DAF-2 DAによる肝臓におけるNO産生細胞の同定とその意義

河野 透, 海老澤良昭, 安藤修敏, 浅間俊之, 千里直之, 川  
端規弘, 富田一郎, 青木貴徳, 紀野修一, 葛西眞一, 石川  
一志, 岩元 純

## 2. DAF-2 DA による肝臓における NO 産生細胞の同定とその意義

旭川医科大学 第二外科

河野 透 海老澤 良昭 安藤 修敏  
浅間 俊之 千里 直之 川端 規弘  
富田 一郎 青木 貴徳 紀野 修一  
葛西 真一

旭川医科大学看護学部 応用生理学科

石川 一志 岩元 純

### Direct Evidence of NO Production in Rat Hepatocytes and Kupffer Cells Using a New Fluorescent Indicator : DAF-2 DA

Toru Kono<sup>1)</sup>, Yoshiaki Ebisawa<sup>1)</sup>, Nobutoshi Ando<sup>1)</sup>,  
Kazushi Ishikawa<sup>2)</sup>, Jun Iwamoto<sup>2)</sup>, Toshiyuki Asama<sup>1)</sup>,  
Naoyuki Chisato<sup>1)</sup>, Norihiro Kawabata<sup>1)</sup>, Ichiro Tomita<sup>1)</sup>,  
Takanori Aoki<sup>1)</sup>, Shuichi Kino<sup>1)</sup> and Shinichi Kasai<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup>Asahikawa Medical College, School of Medicine, Department of Second Surgery

<sup>2)</sup>Asahikawa Medical College, School of Nursing, Division of Applied Physiology

#### ABSTRACT

The biological functions of nitric oxide in the LPS-induced liver injury remain controversial. Using a novel fluorescence indicator, DAF-2 DA, for direct detection of NO, we examined both hepatocytes and Kupffer cells, using isolated hepatocytes and Kupffer cells preparation by perfusion of the liver with collagenase. The fluorescence intensity in the hepatocyte was augmented, especially 8 to 10 hours after stimulation with LPS. This NO production in the hepatocyte was also confirmed by the immunocytochemistry using an anti-inducible NO synthase antibody as well as an anti-albumin antibody. This is the first direct evidence of NO production in the hepatocyte. There were also fluorescent cells in the liver cells, such as Kupffer cells after stimulation with LPS. Imaging techniques using DAF-2 DA should be very useful for the clarification of hepatic NO functions.

はじめに

I 方 法

グラム陰性桿菌の菌体成分である lipopolysaccharide (LPS) の投与で尿中、血中に一酸化窒素 (NO) の代謝産物が増加することが報告され、現在、LPS によって細胞内で誘導型 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。われわれも、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を経時的に NO 測定し報告してきた<sup>1)</sup>。さらに、最近、肝障害を発生させる大量 LPS だけでなく肝障害を惹起しない微量 LPS によっても、投与後早期の時点では同程度の NO が産生され、しかも敗血症発症早期における NO 産生は肝細胞保護作用を目的に産生されていることも報告してきた<sup>2)</sup>。

しかし、肝臓内で産生される NO の主たる産生細胞が肝細胞なのかクッパー細胞など非実質細胞なのか、または、両者なのかについては未解決のままである。いままで、肝臓組織レベルでの NO 合成酵素蛋白、mRNA、モノクローナル抗体による免疫染色が試みられているが、結論は得ていない。そこで、最近 NO 産生細胞を細胞レベルおよび組織レベルにおいて直接的に証明できる方法として中枢神経系を中心に開発、報告され注目されている daiminofluorescein-2 diacetyl (DAF-2DA) 法を用いて肝細胞における NO 産生を検討した<sup>3,4)</sup>。

1 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 基をもつ 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 の光をあてると波長 515 nm の緑色蛍光を放つ。DAF-2T 自身は細胞膜透過性がなく細胞内に留まるので、蛍光顕微鏡にて NO 産生細胞を同定する。

2 実験群と細胞分離・同定

Wistar 系ラットを使用。生食、LPS 0.001 mg/kg または 5 mg/kg を投与し 1 時間後から 48 時間後まで各種時間においてクッパー細胞同定のため Rhodamine 含有 Latex 投与、1 時間後に犠牲死させ、肝臓の細胞分離を行った。細胞分離方法は門脈よりコラゲナーゼを注入し、肝細胞分離と Percoll 法にてクッパー細胞分離を行った。クッパー細胞同定に CD68 免疫染色および Rhodamine 含有 Latex 粒子の貪食、肝細胞同定はアルブミンの免疫染色にて行った。また、NO 合成酵素の同定も免疫染色にて行った。

II 結 果

肝細胞は生食投与群においては NO 産生細胞は 1% 以下であった。一方、LPS 0.001 mg/kg 投与群では投与 8 時間後に NO 産生細胞は最多となり、約

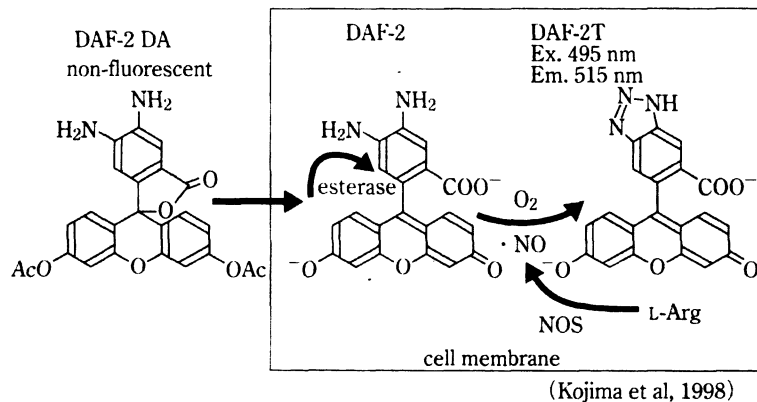


図 1 DAF-2 DA (diaminofluorescein-2 diacetate) の蛍光原理

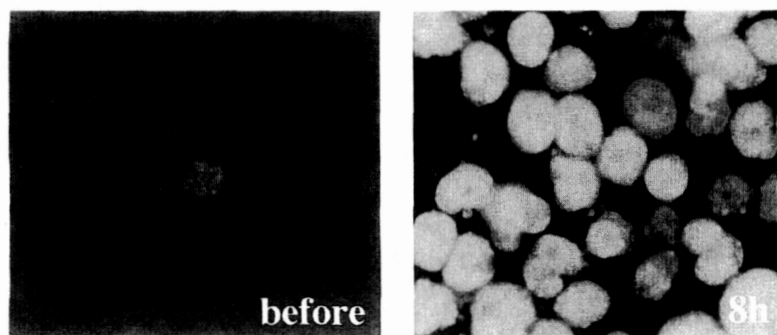


図 2 DAF2-DA 法による LPS 投与前後における NO 産生肝細胞

90%の肝細胞が誘導型酵素から NO を産生していたが、その後減少に転じ、24 時間後、48 時間後には NO 産生細胞は 10%、5%以下であった (図 2)。5 mg/kg 投与群では 8 時間後、24 時間後、48 時間後において約 90%、95%以上の肝細胞が NO を産生していた。クッパー細胞は生食投与群においてほとんどが NO 産生が認められ、LPS 投与量に関係なく Rhodamine 含有 Latex 粒子が貪食されたほぼすべてのクッパー細胞が NO を産生していた。NO 産生細胞を蛍光顕微鏡下で固定し、CD68 またはアルブミンの免疫染色を追加、または NO 合成酵素の免疫染色を重ねた二重、三重免疫染色が可能であった。

### III 考 察

今回、DAF-2DA 法による分離肝細胞における NO 産生同定法を開発し、観察した敗血症時における肝細胞の NO 産生態度が、われわれが報告してきた敗血症発症モデルにおける肝臓から腹腔内への NO 湧出の時間経過と極めて一致しているだけでなく<sup>1,2)</sup>、敗血症時の肝臓における NO 産生量の変動は、クッパー細胞など非実質細胞における NO 産生が寄与すると考えるより、肝細胞自身が産生する NO が大きく寄与している可能性が強く示唆された。今後、NO の産生機構、制御機構について検討

を重ねていきたい。

### おわりに

本稿では敗血症モデルとして LPS をラットに投与し、DAF-2DA 法によって、細胞から産生された NO を捕捉したまま細胞同定を可能にし、今後、肝臓における NO 産生細胞同定において極めて有用な手段となり、NO の役割を解析するうえで重要な役割を果たすものと考えられることを示唆した。

### 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) Kojima H, Nakatsubo N, Kikuchi K, et al. Detection and imaging of nitric oxide with novel fluorescent indicators : diaminofluoresceins. *Anal Chem* 1998 ; 70 : 2446-53.
- 4) 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.

\* \* \*