

AMCoR

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

薬理と治療 (1999.04) 27巻Suppl.3:S835～S838.

【肝病態生理研究のあゆみ】

エンドトキシン血症時におけるNOと抗炎症性サイトカインの関連に関する研究

河野 透, 小谷裕美, 安藤修敏, 神谷和則, 葛西眞一, 岩元純, 米田政志

12. エンドトキシン血症時におけるNOと 抗炎症性サイトカインの関連に関する研究

旭川医科大学 第二外科

河野 透 小谷 裕美 安藤 修敏

神谷 和則 葛西 眞一

旭川医科大学 看護学科 応用生理部

岩元 純

獨協医科大学 第二内科

米田 政志

Nitric Oxide and Interleukin-10 Production during Endotoxemia

Toru Kono¹⁾, Jun Iwamoto²⁾, Hiromi Kotani¹⁾, Nobutoshi Ando¹⁾,
Kazunori Kamiya¹⁾, Masashi Yoneda³⁾ and Shinichi Kasai¹⁾

¹⁾ Second Department of Surgery, Asahikawa Medical College

²⁾ Division of Applied Physiology, Asahikawa Medical College

³⁾ Second Department of Medicine, Dokkyo Medical College

はじめに

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た^{1~4)}。現在、LPSによって各種細胞内(マクロファージ、肝細胞、Kupffer細胞など)でiNOS遺伝子からiNOSmRNAが転写され、合成された誘導型NO合成酵素(iNOS)によってアミノ酸である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。生成されたNOは周囲に存在するラジカル、遷移金属、特に血流中のヘモグロビンと結合し、数秒から数分以内に発生部位からすべて消去されると現在考えられている^{5~8)}。しかし、NOは、生体膜を拡散障壁とはせず、細胞膜を越え自由に拡散できる性質を有してい

る。その拡散係数から換算すると1秒あたり数cm単位で拡散可能である。したがって、NO産生細胞周囲だけでなくNO産生細胞を有する臓器内および臓器外へと拡散する可能性があることを示唆している。いままでにも、潰瘍性大腸炎患者の病変腸管壁内で産生されたNOが管腔内に拡散し、そのNO濃度と病変程度が相関していることが報告されている⁹⁾。さらに、生理的な状態でも鼻腔粘膜、気管粘膜内で産生されたNOが拡散していることが報告されている^{10,11)}。さらには、小児肺高血圧症の治療に高濃度NOを直接気管内に投与して気管壁を介して肺血管を拡張させることが試みられている^{12,13)}。これらの報告は、NOが産生細胞、臓器外へ拡散し、NOとしての作用を有している可能性を強く示唆したものと見える。しかし、敗血症時に大量に産生さ

れるNOの生体内制御に関してはいまだに一定の見解を得ていない。産生されたNOの制御を論ずるためには、NOの気体としての性質を理解し、その動態を経時的に観察することが必要条件であると考えられるが、われわれは、エンドトキシン血症時にNO産生臓器から経時的にNO自体を測定するための方法を開発した^{14,15)}。最近の研究報告で抗炎症性サイトカインであるIL-10によるNO産生抑制が報告された¹⁶⁾。そこで、エンドトキシン血症時におけるNOと抗炎症性サイトカインの関連について、開

発した肝由来腹腔内NO測定法を用いて検討した。

I 方法

動物はWistar系ラットで、肝障害を誘発しないLPS微量投与群(0.001, 0.1mg/kg, ip)と肝障害を誘発するLPS大量投与群(1, 5mg/kg, ip)によって誘導される腹腔内NOを経時的に化学発光法にて測定した^{14,15)}。同時に、抗炎症性サイトカイン(IL-4, IL-10)の血清濃度をELISA法にて測定した。

II 結果と考察

肝障害を誘発しないLPS微量投与群の腹腔内NO濃度はLPS投与後2時間後に有意に増加し始めた。その後、時間経過とともに増加し、投与8~10時間後には最高値約1ppm(1000ppb)に達した。その後減少に転じ、48時間後まで持続した(図1)。大量投与群の腹腔内NO濃度は投与10時間まではLPS微量投与群とほぼ同様の経過を示したが、その後低下するも、再度増加し、24時間後に数ppmレベルに達する二相性の変動パターンを示した(図1)。LPS投与量依存性にIL-10は投与10時間後にピークを有する单相性の変動パターンを示したが(図2)、IL-4は有意な変動を認めなかった(図3)。LPS微量、大量投与両群とも、LPS投与後、10時間までのNO産生の経時的変動パターンはきわめて近以していた

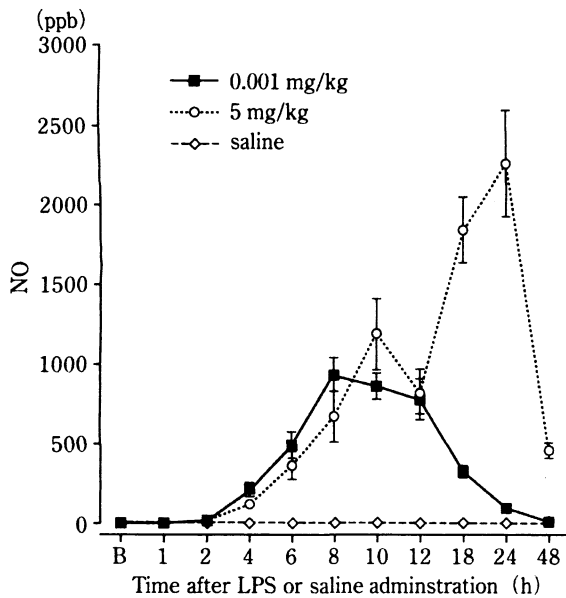


図1 LPS投与量による腹腔内NOの経時的変動への影響

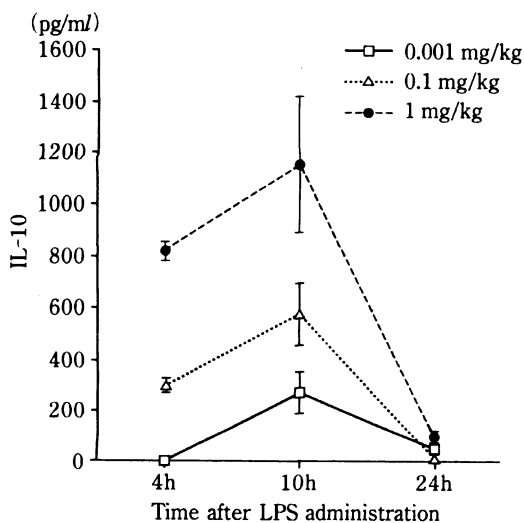


図2 LPS投与量による血清IL-10の経時的変動への影響

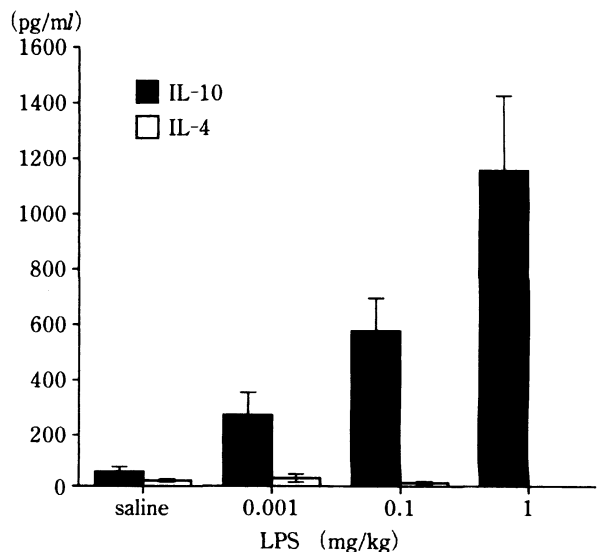


図3 LPS投与10時間後における血清IL-10, IL-4の変動

が、10時間までのAST, ALT値の変動とは正相関していなかった。このことはLPS大量投与においても、投与10時間までに肝臓内で産生されるNOは、肝細胞障害を誘発するものではないことが推察された。文献的にも、NOそのものの細胞障害性について反対の実験報告がなされている。外因性のNOを培養肝細胞に曝露しても、培養液中のASTが変化をしない¹⁷⁾。ラット培養肝細胞にサイトカインとLPSを加えてもAST, LDHは変化をしない¹⁸⁾。ラットにLPSを投与後、血中nitrite/nitrateともに増加したにもかかわらずASTレベルは変化しなかったが、NOをブロックするとASTは上昇した¹⁹⁾ことを考えると、LPS投与後の肝細胞障害はNO単独によって直接もたらされるものではないと推察される。したがって、NO単独による直接的な細胞障害誘発はきわめて懐疑的であると考えられる。そこで、LPS投与後10時間までに産生されるNOの作用を検討するために、NO合成抑制剤を用いて検討した結果、LPS投与10時間までに多量に産生するNO合成を抑制するとIL-10も抑制され、肝障害が著しく増悪した。NOが抑制されるとIL-10も抑制され肝障害が増悪したことから、LPSで投与10時間までに誘導されるNOは、抗炎症性サイトカインであるIL-10と連動して肝細胞障害抑制作用を有していることが示唆された。文献的には、LPS投与時の肝障害発生機序として肝類洞内循環不全によって肝細胞壊死が発生すると考えられているが^{20,21)}、NOが、血管の拡張作用、血小板凝集阻害、好中球の血管への付着阻害作用などを介して^{22~25)}、LPS投与後、数時間以内に形成する肝類洞内のフィブリン血栓を阻止し、類洞内の血流を維持し、肝細胞壊死を回避していることが推察された。今回の実験結果からは、敗血症初期時における肝細胞障害に対するNOの病因論的関与を否定し、細胞保護を示唆する結果となった。最近の報告でも、LPS投与初期に発生するNOが細胞障害や循環障害に関与していないことが報告されている^{26,27)}。一方、肝障害を誘発する大量のLPS投与で、24時間後に再度ピークに達するNO変動パターンを認めたことは、LPS投与時早期に産生されるNOによる肝細胞障害阻止が不十分なため、傷害を受けた肝組織に外来性の免疫担当細胞、マクロファージ、単球、好中球の集積が起こり、これらの外来性細胞を中心に、iNOSが誘導され、NOが再度多量に産生されたため、24時間後にNO産生

の再ピークを示したものと推察され、LPS投与12時間後に産生されるNOが、LPS誘発肝細胞障害に対し病因論的に関与していることが推察された。しかし、この後期NOと肝障害の関連についての詳細は今後の検討課題である。

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、投与後産生されるNOと抗炎症性サイトカインに関してその動態と意義について検討した。LPS刺激でNOが産生され、その一部が拡散し、高濃度の腹腔内NOとして検出できたことは、生体内において神経でもない血管でもない空間という新しいルートを紹介した臓器間言語としてNOを考慮しなければならぬことを示唆したものと考えられる。

文 献

- 1) Wagner DA *et al* : Mammalian nitrate biosynthesis ; Incorporation of $^{15}\text{NH}_3$ into nitrate is enhanced by endotoxin treatment. *Proc Natl Acad Sci USA* 80 : 4518-4521, 1983
- 2) Stuehr DJ, Marletta MA : Mammalian nitrate biosynthesis ; Mouse macrophages produce nitrite and nitrate in response to *Escherichia coli* lipopolysaccharide. *Proc Natl Acad Sci USA* 82 : 7738-7742, 1985
- 3) Hibbs J Jr *et al* : Nitric oxide ; A cytotoxic activated macrophage effector molecule. *Biochem Biophys Res Commun* 157 : 87-94, 1988
- 4) Stuehr DJ, Nathan CF : Nitric oxide ; A macrophage product responsible for cytostasis and respiratory inhibition in tumor target cells. *J Exp Med* 169 : 1543-1555, 1989
- 5) Ignarro LJ *et al* : Oxidation of nitric oxide in aqueous solution to nitrite but not nitrate ; Comparison with enzymatically formed nitric oxide from L-arginine. *Proc Natl Acad Sci USA* 90 : 8103-8107, 1993
- 6) Furchgott RF, Vanhoutte PM : Endothelium-derived relaxing and contracting factors. *Faseb J* 3 : 2007-2018, 1989
- 7) Gow AJ, Stamler JS : Reactions between nitric oxide and haemoglobin under physiological conditions. *Nature* 391 : 169-173, 1998
- 8) Moncada S *et al* : Nitric oxide ; Physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev* 43 : 109-142, 1991
- 9) Lundberg JO *et al* : Greatly increased luminal nitric oxide in ulcerative colitis. *Lancet* 344 : 1673-1674, 1994
- 10) Imada M *et al* : Measurement of nitric oxide in human nasal airway. *Eur Respir J* 9 : 556-559, 1996

- 11) Iwamoto J *et al* : Effect of graded exercise on nitric oxide in expired air in humans. *Respir Physiol* **97** : 333-345, 1994
- 12) Adatia I, Wessel DL : Therapeutic use of inhaled nitric oxide. *Curr Opin Pediatr* **6** : 583-590, 1994
- 13) Pepke ZJ *et al* : Inhaled nitric oxide as a cause of selective pulmonary vasodilatation in pulmonary hypertension. *Lancet* **338** : 1173-1174, 1991
- 14) Kono T *et al* : Intraabdominal nitric oxide production in rats ; Measurements in expelled air. *Gastroenterology* **110** : A1239, 1996
- 15) Ando N *et al* : Nitric oxide release from the liver surface to the intra-abdominal cavity during acute endotoxemia in rats. *Nitric Oxide : Biology and Chemistry* (in press 1999)
- 16) Jacobs F *et al* : IL-10 up-regulates nitric oxide (NO) synthesis by lipopolysaccharide (LPS)-activated macrophages : Improved control of *Trypanosoma cruzi* infection. *Clin Exp Immunol* **113** : 59-64, 1998
- 17) Curran RD *et al* : Nitric oxide and nitric oxide-generating compounds inhibit hepatocyte protein synthesis. *Faseb J* **5** : 2085-2092, 1991
- 18) Billiar TR *et al* : Association between synthesis and release of cGMP and nitric oxide biosynthesis by hepatocytes. *Am J Physiol* **262** : C1077-1082, 1992
- 19) Frederick JA *et al* : Nitric oxide may upregulate *in vivo* hepatic protein synthesis during endotoxemia. *Arch Surg* **128** : 152-156, 1993
- 20) Mochida S *et al* : Provocation of massive hepatic necrosis by endotoxin after partial hepatectomy in rats. *Gastroenterology* **99** : 771-777 (1990)
- 21) Fujiwara K *et al* : Intravascular coagulation in acute liver failure in rats and its treatment with antithrombin III. *Gut* **29** : 1103-1108, 1988
- 22) Radomski MW *et al* : Endogenous nitric oxide inhibits human platelet adhesion to vascular endothelium. *Lancet* **ii** : 1057-1058, 1987
- 23) Mellion BT *et al* : Evidence for the inhibitory role of guanosine 3', 5'-monophosphate in ADP-induced human platelet aggregation in the presence of nitric oxide and related vasodilators. *Blood* **57** : 946-955, 1981
- 24) Wright CE *et al* : Protective and pathological roles of nitric oxide in endotoxin shock. *Cardiovasc Res* **26** : 48-57, 1992
- 25) Kubes P *et al* : Nitric oxide ; An endogenous modulator of leukocyte adhesion. *Proc Natl Acad Sci USA* **88** : 4651-4655, 1991
- 26) Gundersen Y *et al* : Use of selective and nonselective nitric oxide synthase inhibitors in rat endotoxemia ; Effects on hepatic morphology and function. *Shock* **8** : 368-372, 1997
- 27) Hock CE *et al* : Effects of inhibition of nitric oxide synthase by aminoguanidine in acute endotoxemia. *Am J Physiol* **272** : H843-850, 1997

* * *