

## ラット阻血再灌流肝における一酸化窒素合成酵素の役割

穂 苺 厚 史      長 田 正 久      銭 谷 幹 男  
田 尻 久 雄

東京慈恵会医科大学内科学講座消化器・肝臓内科

(受付 平成21年12月12日)

### ROLE OF NITRIC OXIDE SYNTHASE IN HEPATIC INJURY INDUCED BY ISCHEMIA / REPERFUSION IN THE RAT

Astushi HOKARI, Masahisa OSADA, Mikio ZENIYA,  
Hisao TAJIRI

*Division of Gastroenterology and Hepatology, Department of Internal Medicine,  
The Jikei University School of Medicine*

The important role of nitric oxide (NO) in hepatic ischemia/reperfusion injury has increasingly been recognized. In the present study, we evaluated serum levels of NO by measuring the serum concentration of nitrite/nitrate during ischemia reperfusion in rats and by performing immunohistologic staining for NOS-2 in liver tissue. After 90 minutes of ischemia in the left and middle hepatic lobes, the ischemia was released, and the liver was reperfused for up to 24 hours. The serum level of alanine aminotransferase (ALT) peaked 3 hours after reperfusion and gradually decreased thereafter. Nitrite/nitrate levels in serum increased until 1 hour after reperfusion and then decreased but increased again 12 hours after reperfusion. We recognized a dissociation between ALT and NO. Twelve hours after reperfusion, NO synthase (NOS)-2 was induced, and NO was produced in large amounts, but ALT showed a consistent downward trend, and significant hepatocellular necrosis was not recognized. Immunohistological staining of cells for NOS-2 was not observed for up to 3 hours after reperfusion, but staining of monocytes was observed in Glisson's sheath and hepatocytes close to the central vein 12 hours after reperfusion. Staining of monocytes in Glisson's sheath was more pronounced. While NO production from NOS-2 increased from 12 to 24 hours during reperfusion, serum ALT levels decreased. These findings suggest that NO does not promote liver cell damage through the production of free radicals in the rat, but hepatic injury induced by ischemia/reperfusion improves by NO.

(Tokyo Jikeikai Medical Journal 2010;125:109-14)

Key words: ischemia, reperfusion, liver injury, nitric oxide, nitric oxide synthase

#### I. 結 言

阻血再灌流肝細胞障害は、ショック、肝臓手術、肝移植<sup>1)</sup>などによる肝血流の一時的低下後に認められ、重篤な場合は肝不全を引き起こし、予後を規定する因子となる臨床的に重要な病態である。阻血再灌流肝細胞障害の病態には、肝細胞に浸潤した好中球が産生する活性酸素やプロテアーゼ<sup>2)3)</sup>、活性化されたKupffer細胞により産生される活性酸素、TNF- $\alpha$ <sup>4) 5)</sup>

などの炎症性メディエーターが関与するほか、補体の活性化<sup>6)</sup>、platelet activating factor<sup>7)</sup>、endothelin-1<sup>8)</sup>などが関与することが示されている。またsomatostatin<sup>9)</sup>、verapamil<sup>10)</sup>、misoprosol<sup>11)</sup>などの投与によりその障害が軽減することが報告されている。Endothelin-1<sup>12)</sup>は、類洞、類洞外の両者に作用する強力な血管収縮因子の一つであり、阻血再灌流時の肝組織中で上昇し、肝類洞の無灌流現象を引き起こすことから重要視されている。一方では、一酸化窒素(Nitric oxide; NO)を

介した血管拡張作用がEndothelin-1による肝類洞収縮を抑制することから、この両者のバランスが再灌流後の肝類洞内の血流を制御していると考えられている。NOは、L-arginineを基質として一酸化窒素合成酵素(nitric oxide synthase; NOS)により産生される<sup>13) 14)</sup>。NOSは、3つの異なるisoform、神経型(NOS-1, neuronal NOS, nNOS)、誘導型(NOS-2, inducible NOS, iNOS)、内皮型(NOS-3, endothelial NOS, eNOS)に分類される。NOS-1, NOS-3は構成型で恒常的に発現しておりカルシウムあるいはリン酸化により活性を調節することによりNO産生を調整しており、NOS-2は、マクロファージ、肝細胞、平滑筋細胞、好中球、内皮細胞、軟骨細胞、メサングウム細胞、線維芽細胞、角質細胞、巨核球、グリア細胞などさまざまな細胞において種々のサイトカイン(IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ など)の刺激により誘導されて発現することが知られている<sup>15)</sup>。NOSにより産生される多量のNOは、活性酸素と瞬時に反応してより強力な酸化作用を有するPeroxynitrite (ONOO<sup>-</sup>)を形成し周囲の細胞に対して細胞毒性を発揮する。しかし阻血再灌流肝細胞障害におけるNOの動態については不明な点が多く、NOSにより産生されたNOが肝障害とどのように関わっているのか明らかにされていないことが多い。また、NOは、半減期の非常に短い物質であり直接測定することが困難な物質である。NOS-1, NOS-3は恒常的に発現しており、カルシウムとカルモジュリン、リン酸化によりNOの産生がコントロールされており、NOS蛋白の定量だけではNOの産生量の検討ができない。NOS-2によるNO産生はNOS-1, NOS-3とは異なり細胞内カルシウムによる調節は受けずに遺伝子の転写段階で制御されている。今回我々は、ラット阻血再灌流肝モデルにおいてNOの最終代謝産物である血清硝酸亜硝酸量を経時的に測定することにより、間接的ではあるがNO動態の変化と阻血再灌流肝障害の関係について検討し、さらに阻血再灌流により誘導されたNOS-2の発現について免疫組織学的に検討した。

## II. 方 法

体重200-250 gのSD系雄性ラット(三共ラボサービス, 東京)を使用した。室温22度で、明暗一定サイクルとし、飼料の摂取に制限を加えず飼育した。実験は東京慈恵会医科大学動物実験指

針を遵守して施行された。阻血再灌流モデルは、ラットをベントバルビタール(5 mg/100 g)腹腔内投与にて麻酔し、正中切開にて開腹、ヘパリン(25U/100g)投与後、肝の中葉、左葉へ分枝する門脈、肝動脈、胆管を、一過性の血流遮断目的で開発されたSugita Clip (CAT. No.07-94057, 瑞穂, 東京)を用いて結紮し、一過性に血流を遮断、90分間の阻血後Clipを除去し再灌流した。術中、体液および血液喪失補填として、生理食塩水0.5mlを経静脈的に投与した。阻血再灌流前、再灌流5分後、1, 3, 12, 24時間後に下大静脈、門脈から採血し、脱血にて殺し、採血したものを1つにして血清保存した。肝臓の組織を採取、10%ホルマリンにて固定し、組織学的検討を行った(阻血再灌流前、再灌流5分後、1, 3, 12, 24時間後、それぞれn=6)。

血清硝酸亜硝酸の測定は、血清をsodium hydroxide, magnesium sulfoxideにて脱蛋白化にて溶血成分を除去、Cd-Cuカラムを用いて亜硝酸を硝酸に変換し、硝酸をGriess Reagent<sup>16)</sup>(1% sulfanilamide in 50% HCl/0.12% naphthylenediamine dihydrochloride)と反応させ、TCI-NOX100測定器(Tokyo Kasei, Tokyo)を用いて540nmの吸光度にて測定した。すべての検体は2回ずつ測定した。血清ALT値はVISION SYSTEM (Abbott Laboratories, USA)を用いて測定した。

免疫組織学的検討は、10%ホルマリンで固定した肝組織をパラフィン包埋の後5 $\mu$ mの薄切標本を作製、内因性ペルオキシダーゼ活性を0.3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>メタノールを用いて室温30分で阻害し、その後抗マウスNOS-2抗体(anti-NOS-2, IgG2a Ab, Transduction Laboratories, Kentucky, USA)を1:50の希釈にて一次抗体として用い、4℃でover nightにてインキュベートし、Avidin Biotin Complex法(Vector Lab. Inc., Burlingame, USA)で1時間染色、counterstain後マウントした。使用した抗マウスNOS-2抗体は、他の2種のNOSと交叉反応を示さないことをpositive controlを用いてWestern blot法で確認したものを用いた。

測定結果は平均値 $\pm$ 標準偏差で表した。統計学的有意差検定はStudent's *t*検定を用い、危険率5%未満を有意とした。

### III. 結 果

血清硝酸亜硝酸量は、阻血再灌流前値が $25.9 \pm 5.5 \mu\text{m}$ 、再灌流後5分で $28.2 \pm 5.2 \mu\text{m}$  ( $p=0.56$ )、1時間後 $29.9 \pm 1.8 \mu\text{m}$  ( $p=0.24$ )、3時間後には $27.2 \pm 4.0 \mu\text{m}$  ( $p=0.68$ )、12時間後には $39.3 \pm 5.4 \mu\text{m}$  ( $p<0.05$ )と上昇し、24時間後には $43.9 \pm 4.8 \mu\text{m}$  ( $p<0.05$ )まで上昇した (Fig.1). 再灌流後12時間、24時間における硝酸亜硝酸量は阻血再灌流前値と比し有意な上昇 ( $p<0.05$ ) を認めた. なお再灌流後24時間後までラットの死亡は認めなかった. 血清ALT値は阻血再灌流前値が $41.6 \pm 3.3 \text{ IU/L}$ 、再灌流5分後に $412.3 \pm 97.2 \text{ IU/L}$ と上昇し、1時間後 $1368.6 \pm 145.7 \text{ IU/L}$ 、3時間後には $3377.3 \pm 449.2 \text{ IU/L}$ で最高値となり、12時間後 $1268.1 \pm 611.9 \text{ IU/L}$ 、24時間後 $547.7 \pm 155.1 \text{ IU/L}$ と低下した. 再灌流後のいずれの時間においても阻血再灌流前値に比し有意な上昇を示した ( $p<0.01$ ) (Fig.2).

抗NOS-2抗体による免疫組織学的染色では、NOS-2は再灌流後12時間より門脈域の単核球細胞に発現しているのが認められ、局所的に中心静脈付近の肝細胞にも発現していることが示された (Fig. 3, 4). 24時間後では門脈域の単核球にさらに強く発現しているのを認め、中心静脈付近の肝細胞で部分的、散在性に発現していた (Fig.5).

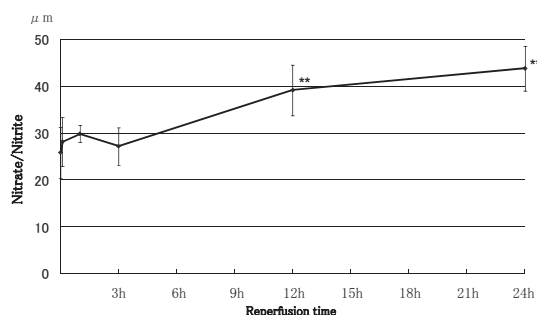


Fig. 1. Changes in plasma Nitrite/Nitrate levels in hepatic injury after ischemia/reperfusion. Plasma Nitrite/Nitrate levels showed two peaks at 1 hour and 24 hours after reperfusion. Each value was expressed as the mean  $\pm$  S.D.  $\mu\text{m}$ . \*\* :  $P<0.05$  compared with before ischemia/reperfusion

### IV. 考 察

肝阻血再灌流時の血清ALT値は再灌流後3時間の3377.3 IU/Lをピークとして低下していくのに対して、血清硝酸亜硝酸量は上昇しつづけ、24時間後に最も高値となり、ALTとNOの動態に解離が認められた. また後期の硝酸亜硝酸量の増加も初期のピークの数倍程度しか認めておらず、爆発的なNO産生の増加は認めなかった. 阻血再灌流初期においては、阻血する前にNOを加えることにより再灌流後90分のAST, ALT, LDHの上昇がコントロールに比べて有意に抑制され、逆にNOS inhibitorであるL-NAME (N-nitro-L-arginine methyl ester)を加えてNO産生を抑制すると肝障害の程度が強くなることが報告されている<sup>17)</sup>. またNOS inhibitorであるL-NAMEを加えてNO産生を抑制することにより類洞血流量が再灌流後60分でコントロールに比べ有意に低下し、壊死肝細胞数が有意に増加する事<sup>12)</sup>が示されている. 阻血再灌流初期においては、NOの存在が、肝類洞の無灌流現象の抑制などにより、血流障害を抑制し、肝障害の軽減に貢献しているものと考えられる. また選択的NOS-2 inhibitorであるS-methylisothiourea sulfate<sup>18)</sup>やAminoguanidine<sup>19)</sup>を加えてNOS-2によるNO産生を抑制してもAST, ALT値や壊死肝細胞数はコントロール群と比較して有意差がないと報告されており、阻血再灌流の初期に関与しているNOはNOS-2以外のNOSにより

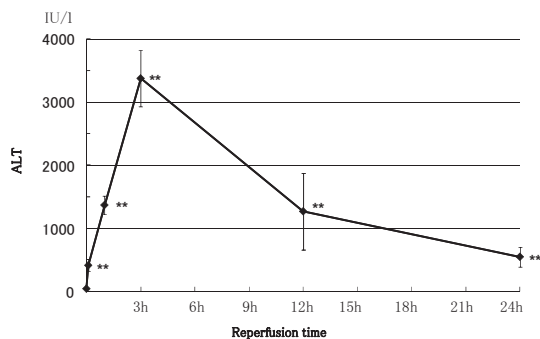


Fig. 2. Changes in plasma ALT levels after ischemia/reperfusion. Plasma ALT levels gradually increased with peak at 3 hours after reperfusion. Each value was expressed as the mean  $\pm$  S.D. IU/L. \*\*:  $P<0.01$  compared to control.



産生されていると考えられる。

阻血再灌流後期においては、NOS-2によるNO産生が極端に増加するためにPeroxynitriteが形成され、肝障害に働くと報告されている<sup>20)-22)</sup>。だが本実験で測定した後期における硝酸亜硝酸量は初期のピークの数倍程度の増加しか認めていない。これはPeroxynitriteの形成がおきるレベルの多量なNO産生量とは考えづらく、NOS-2によるNO産生がフリーラジカルを介して肝細胞障害を促進する方向に働くという見解を支持する結果とは考えづらい。NOS-2が誘導発現され、それに伴いNOが多量に産生されていると推測される時

期においては、すでにALTは一貫して低下傾向となっており、また免疫組織学的にもNOS-2は門脈域の単核球細胞に発現していたが発現量は顕著ではなかった。NOは単純な物質であるが非常に多岐にわたる作用があり、NOの量によりNOSにフィードバックが掛ったり、逆の作用をおよぼすという二面性をもっている。少なくとも本実験においては、誘導されたNOS-2により産生されたNOが肝細胞障害に働いているというよりも、NOの持つフリーラジカルの消去作用や白血球の内皮への接着阻害、さらには接着分子発現抑制といった働きを介して、肝保護に働いている可能性

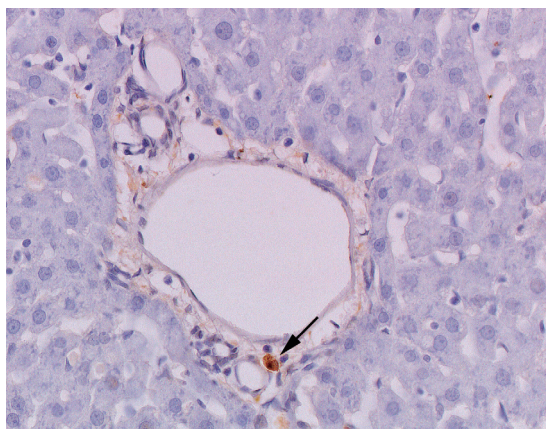


Fig. 3. Expression of iNOS using anti-mouse iNOS antibody 12 hours after ischemia/reperfusion. The staining was observed at monocytes in Grison sheath.

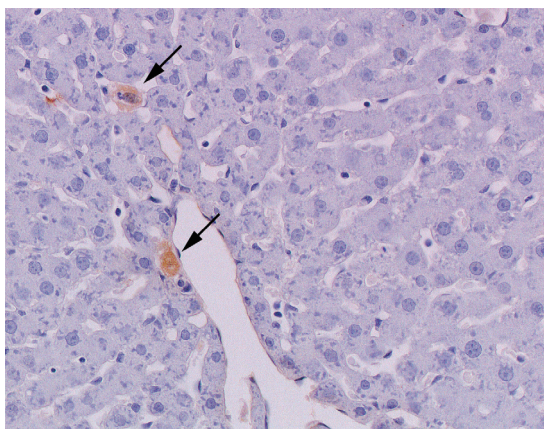


Fig. 4. Expression of iNOS using anti-mouse iNOS antibody 12 hours after ischemia/reperfusion. The staining was also observed at a part of hepatocytes close to central vein.

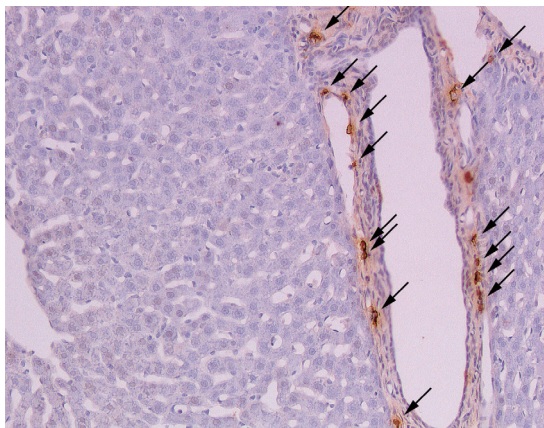
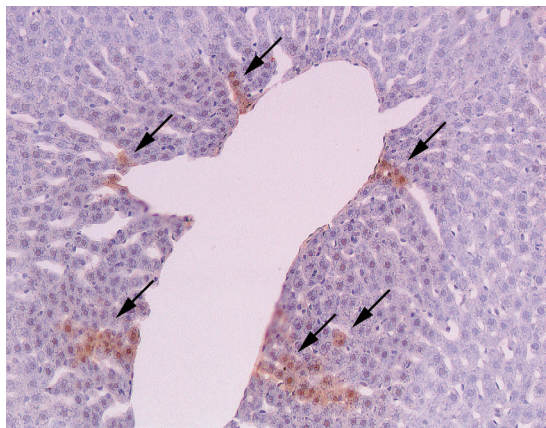


Fig. 5. Expression of iNOS using anti-mouse iNOS antibody 24 hours after ischemia/reperfusion. The staining was observed at a part of hepatocytes close to central vein (CV)(Lt). Another section around the CV showing absence of staining. The staining was observed at monocytes in Grison sheath. (Rt)

のほうが高いと考えられた。

今回の検討において、NOS-2はGlisson鞘内の単核球に強く発現していた。肝阻血再灌流時には、肝非実質細胞におけるキサンチンオキシダーゼ、NADPHオキシダーゼ、NOS-2の活性が亢進し、フリーラジカル産生の著しい増加を認め、それに伴う微小循環障害と広汎な肝障害を引き起こすと言われている<sup>23)</sup>。この時の活性酸素産生細胞は血管内皮細胞と活性化好中球などの白血球が主と考えられており、活性酸素の産生は、虚血時のATP分解で生じたヒポキサンチンと再灌流時に補給された酸素からのキサンチンオキシダーゼによる $O_2^-$ 産生と活性化した白血球のNADPHオキシダーゼによる大量の $O_2^-$ の放出によるといわれている。しかし肝細胞におけるキサンチンオキシダーゼ活性は比較的低く、虚血による活性誘導が少ないとも報告されている<sup>24)</sup>。また、阻血再灌流肝障害モデルにおいて、好中球の内皮細胞への接着因子であるCD11b/CD18発現が増加することが報告されており<sup>25)</sup>、CD11b/CD18に対する単クローン抗体を用いると阻血肝への好中球浸潤を抑制し、さらに肝障害を軽減するという事実がある。これらは、阻血再灌流肝における活性化好中球の重要性を示していると考えられる。また、これらの活性化好中球浸潤が肺<sup>4) 5)</sup>でも観察されることは、好中球の活性化が全身で惹起される事を示唆している。阻血再灌流により、脾臓辺縁帯の拡大と同部での単核球増加が認められ、単クローン抗体R2-1A6aを用いた免疫組織学的検討で、この単核球がmacrophage/monocyte populationに属し、再灌流直前の脾摘により阻血再灌流肝障害が軽減する事が報告されており、脾臓も少なからず阻血再灌流肝障害に影響を及ぼす事も示されている<sup>26)</sup>。肝阻血再灌流において、活性化好中球は非常に重要な役割を持っており、NOS-2が発現したGlisson鞘内の単核球の意義についてはより一層の検討が必要である。

現在、NOは循環系、神経系、免疫系など、生体のホメオスタシスを維持する重要なネットワークのいずれにおいても、細胞間情報伝達物質として多彩な役割を果たしていることが明らかにされている。阻血再灌流後のNO産生は必ずしも肝障害方向に働くのではなく、肝障害の軽減にも作用

していると考えられた。しかし病態によって多量のNOが産生されれば肝障害を促進することも考えられ、今後この点に関してより明確な見解を得るために更なる検討が必要と考える。

## V. 結 語

ラット阻血再灌流肝モデルにおいて、血清NOと肝細胞障害の指標である血清ALTの動態に解離が認められた。NOSによるNOの産生は再灌流後の肝細胞障害の原因と報告されてきたが、障害からの回復過程にも関与する可能性がある。

## 文 献

- 1) Thurman RG, Marzi I, Seitz G, Thies J, Lemasters JJ, Zimmerman F. Hepatic reperfusion injury following orthotopic liver transplantation in the rat. *Transplantation* 1988; 46: 502-6.
- 2) Jaeschke H, Farhood A, Smith CW. Neutrophil contribute to ischemia/reperfusion injury in rat liver *in vivo*. *FASEB J* 1990; 4: 3355-9.
- 3) Jaeschke H, Farhood A. Neutrophil and kupffer cell-induced oxidant stress and ischemia-reperfusion injury in rat liver. *Am J Physiol* 1991; 260: G355-62.
- 4) Colletti LM, Remick DG, Burtch GD, Kunkel SL, Strieter RM, Campbell DA Jr. Role of tumor necrosis factor- $\alpha$  in the pathophysiologic alterations after hepatic ischemia/reperfusion injury in the rat. *J Clin Invest* 1990; 85: 1936-43.
- 5) Colletti LM, Burtch GD, Remick DG, Kunkel SL, Strieter RM, Guice KS, et al. The production of tumor necrosis factor  $\alpha$  and the development of pulmonary capillary injury following hepatic ischemia/reperfusion. *Transplantation* 1990; 49: 268-72.
- 6) Jaeschke H, Farhood A, Bautista AP, Spolarics Z, Speizer JJ. Complement activates Kupffer cells and neutrophils during reperfusion after hepatic ischemia. *Am J Physiol* 1993; 264: G801-9.
- 7) Zhou W, McCollum MO, Levine BA, Olson MS. Inflammation and platelet-activating factor production during hepatic ischemia/reperfusion. *Hepatology* 1992; 16: 1236-40.
- 8) Goto M, Takei Y, Kawano S, Nagano K, Tsuji S, Masuda E, et al. Endothelin-1 is involved in the pathogenesis of ischemia/reperfusion. *Hepatology* 1994; 19: 675-81.
- 9) Landa I, Arias J, Gomez M, Quadros M, Moreno A,

- Balibrea JL. Cytoprotective effect of somatostatin in a rat model of hepatic ischemic reperfusion. *Hepatology* 1992; 16: 1474-6.
- 10) Ishii K, Arima T, Suita S. Verapamil attenuates postischemic oxidative injury in the rat liver. *Res Exp Med* 1992; 192: 151-9.
  - 11) Lim SP, Andrews FJ, Christophi C, O'Brien PE. Misoprosol hepatoprotection against ischemia-reperfusion-induced liver injury in the rat. *Dig Dis Sci* 1992; 37: 1275-81.
  - 12) Pannen BH, Al-Adili F, Bauer M, Clemens MG, Geiger KK. Role of endothelins and nitric oxide in hepatic reperfusion injury in the rat. *Hepatology* 1998 ; 27:755-64.
  - 13) Knowles RG, Moncada S. Nitric Oxide synthases in mammals. *Biochem J* 1994; 298: 249-58.
  - 14) Marletta MA. Nitric oxide synthase: aspects concerning structure and catalysis. *Cell* 1994; 78: 927-30.
  - 15) Hokari A, Zeniya M, Esumi H. Cloning and functional expression of human inducible nitric oxide synthase (NOS) cDNA from a glioblastoma cell line A-172. *J Biochem* 1994; 116: 575-81.
  - 16) Granger DL, Taintor PR, Boockvar KS, Hibbs JR. Measurement of nitrate and nitrite in biological samples using nitrate reductase and Griess reaction. *Meth Enzymol* 1996; 268: 142-51.
  - 17) Peralta C, Hotter G, Closa D, Gelpí E, Bulbena O, Roselló-Catafau J. Protective effect of preconditioning on the injury associated to hepatic ischemia-reperfusion in the rat: role of nitric oxide and adenosine. *Hepatology* 1997 ; 25: 934-7.
  - 18) Szabo C, Southan GJ, Thiemeermann C. Beneficial effects and improved survival in rodent models of septic shock with S-methylisothiourea sulfate, a potent and selective inhibitor of inducible nitric oxide synthase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 12472-6.
  - 19) Griffiths MJD, Messent M, MacAllister RJ, Evans TW. Aminoguanidine selectively inhibits inducible NO synthase. *Br J Pharmacol* 1993; 110: 963-8.
  - 20) Stewart AG, Barker JE, Hickey MJ. Nitric oxide in ischemia-reperfusion injury. : Grace PA, Mathie RT, editors. *Ischemia reperfusion injury*. Oxford: Blackwell Science 1999; 68: 803-13.
  - 21) Ischiropoulos H, Al-Mehdi AB. Peroxynitrite-mediated oxidative protein modifications. *FEBS Lett* 1995; 364: 279-82.
  - 22) van der Vliet A, Eiserich JP, O'Neill CA, Halliwell B, Cross CE. Tyrosine modification by reactive nitrogen species: a closer look. *Arch Biochem Biophys* 1995 ; 319: 341-9.
  - 23) Menger MD, Richter S, Yamauchi J, Vollmar B. Role of microcirculation in hepatic ischemia/reperfusion injury. *Hepatogastroenterology* 1999 ;46 (Suppl 2):1452-7.
  - 24) Frederiks WM, Marx F, Kooij A. The effect of ischaemia on xanthine oxidase activity in rat intestine and liver. *Int J Exp Pathol* 1993 ;74:21-6.
  - 25) Jaeschke H, Farhood A, Bautista AP, Spolarics X, Spitzer JJ, Smith CW. Functional inactivation of neutrophils with a Mac-1 (CD11b/CD18) monoclonal antibody protects against ischemia reperfusion injury in rat liver. *Hepatology* 1993; 17: 915-23
  - 26) Okuaki Y, Miyazaki H, Zeniya M, Ishikawa T, Ohkawa Y, Tusno S, et al. Splenectomy reduced hepatic injury induced by ischemia/reperfusion in the rat. *Liver* 1996 ; 16: 188-94.