

AMCoR

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

薬理と治療 (2001.11) 29巻Suppl.2:S181~184.

【肝病態生理研究のあゆみ】

ウリナスタチンによるNO産生抑制効果の肝細胞での検討

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

6. ウリナスタチンによる NO 産生抑制効果の 肝細胞での検討

旭川医科大学 第二外科

河野 透 海老澤 良昭 菅原 睦

有倉 潤 浅間 俊之 千里 直之

青木 貴徳 葛西 眞一

旭川医科大学看護学部 応用生理学科

石川 一志 岩元 純

Protective Effects of Ulinastatin on Endotoxin Induced Liver Damage and Downregulation of Nitric Oxide in Hepatocytes During Endotoxemia

Toru Kono¹⁾, Yoshiaki Ebisawa¹⁾, Mutumi Sugawara¹⁾,
Jun Arikura¹⁾, Toshiyuki Asama¹⁾, Naoyuki Chisato¹⁾,
Takanori Aoki¹⁾, 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

KEY WORDS

Ulinastatin, Nitric oxide, Hepatocyte, Endotoxemia,
Liver damage, 4,5-diaminofluorescein

ABSTRACT

In the septic shock, Ulinastatin (ULN), a human urinary protease inhibitor suppressed the liver damage in the septic shock model. However, the effect of ULN on liver damage during severe endotoxemia remains unclear. Overproduction of hepatic nitric oxide (NO) during severe endotoxemia may participate in the development of liver damage. Therefore, we hypothesized that ULN might ameliorate endotoxin-induced liver damage and down regulate endotoxin-induced hepatic NO production. The aims of this study were to determine whether ULN ameliorated endotoxin-induced liver damage and down regulated endotoxin-induced

hepatic NO. Male Wistar rats were administered lipopolysaccharide (LPS) intraperitoneally at a dose of 5 mg/kg. ULN (1000 U/kg) was injected three times intravenously through tail veins using at 0, 3 and 6hr after LPS injection. Blood sample and liver specimen were obtained at 10h after LPS injection, and serum aspartate aminotransferase (AST) and alanine aminotransferase (ALT) levels were measured for assessment of liver damage. Using the novel fluorometric NO detection system, 4,5-diaminofluorescein diacetate, we observed the presence of NO production in hepatocytes by fluorescence microscopy. NO production rate was assessed by the number of the labeled cells per 1000 hepatocytes. There was marked elevation of serum AST and ALT levels at 10h after LPS injection (AST and ALT : 1314±326 IU/L and 1202±325 IU/L, respectively) in saline-treated control rats. These parameters were significantly improved in ULN-treated rats (AST and ALT : 102±12 IU/L and 80±9 IU/L, respectively $p < 0.01$ vs. saline-treated group). ULN also reduced histological liver damage induced by LPS. NO production rate was significantly decreased from 96±1 to 65±1 per cent in ULN treated rats ($p < 0.05$). Conclusions : Treatment of ULN is effective for amelioration of endotoxin-induced liver damage and down regulates endotoxin induced-NO production in hepatocytes.

はじめに

ウリナスタチンは血管内皮細胞における構成型 NO 産生を抑制し、敗血症性低血圧を改善するとの報告がなされた。一方、敗血症時における肝細胞障害において肝で産生される大量の誘導型 NO が関与していることはすでに数多く報告されている。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 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経時的に NO 測定し報告してきた¹⁾。一方、ウリナスタチンは TNF など誘導型 NO 産生促進効果を持つ各種サイトカインを抑制することが報告されている。そこでわれわれは、ウリナスタチンによる各種サイトカイン産生抑制効果が敗血症時、肝において過剰に誘導産生される NO 産生を抑制し、肝障害を抑制するか否かについて検証するため、最近、小島らの方法を応用し開発した NO 産生肝細胞を生きのまま検証できる方法 daminofluorescein-2diacethyl (DAF-2DA) 法を使用し、LPS 投与肝障害モデルにおいて検討した^{2,3)}。

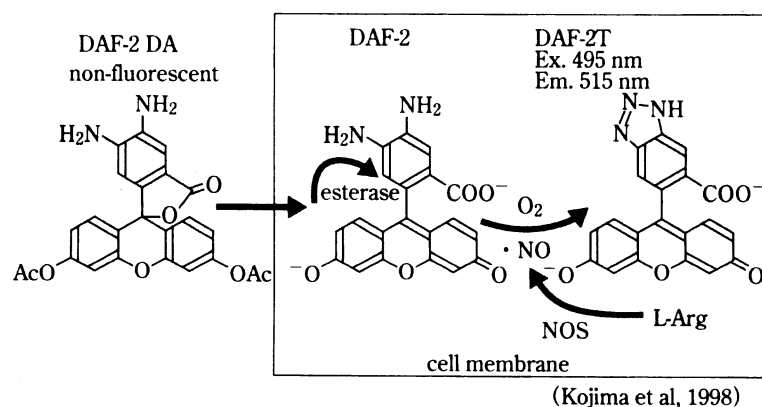


図 1 DAF-2DA (diaminofluorescein-2diacetate) の蛍光原理

I 方 法

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, 蛍光顕微鏡にて NO 産生細胞を長時間同定することができる。実験群と細胞分離・同定: Wistar 系ラットを使用。生食, LPS 5 mg/kg, ウリナスタチン同時・後投与群 (3 時間ごとに 10000 単位/kg 静注を 3 回) を作製し 8 時間後 (NO 産生が肝臓において最大) において肝細胞分離をコラゲナーゼ法にて行った⁴⁾。血清 AST, ALT 値および組織学的にも比較検討した。細胞分離方法は門脈よりコラゲナーゼを注入し, 肝細胞分離を行った。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誘導型 NO 産生は 1% 以下であった。一方, LPS 投与群では投与 8 時間後に, 約 96±1% の肝細胞が NO を産生していた。一方, ウリナスタチン投与群において 31±1% の抑制効果が認められた (図 2)。LPS 投与群での血清 AST, ALT 値 (平均値±標準誤差) は 1314±326 IU/L, 1202±325 IU/L でウリナスタチン投与群では血清 AST, ALT 値は 102±12 IU/L, 80±9 IU/L と有意に抑制された。NO 産生細胞を蛍光顕微鏡下で固定し, 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染色が可能であった。

III 考 察

DAF-2DA 法による分離肝細胞における NO 産生同定法を用いて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

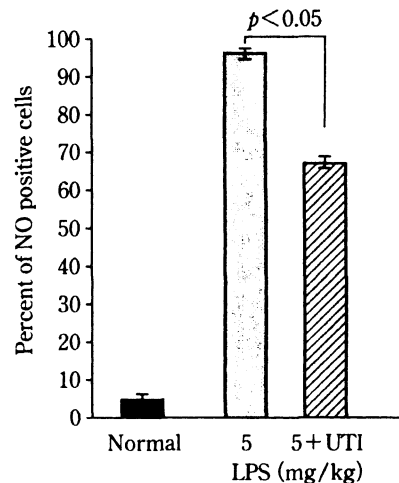


図 2 ウリナスタチンによる LPS 刺激肝細胞における NO 産生抑制効果

発症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るだけでなく^{1,4)}, 敗血症時の肝臓における NO 産生が, ウリナスタチンによって抑制されたことは, ウリナスタチンが構成型 NO だけでなく誘導型 NO を抑制する可能性が強く示唆された。また, ウリナスタチンによる肝障害抑制効果も明らかで, 今後, ウリナスタチンの NO の産生抑制機序および肝障害抑制効果との関連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, 肝細胞から産生された NO が, ウリナスタチンによって抑制されることを明らかにし, ウリナスタチンが敗血症時の肝における誘導型 NO 産生を抑制し肝細胞傷害を抑制する可能性が示唆された。

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) 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.

- 3) 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.
- 4) 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.

* * *