

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 4 日現在

機関番号：33303

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592268

研究課題名(和文) 脂肪肝の虚血再灌流障害に対する運動トレーニングの効果

研究課題名(英文) The effect of exercise training on ischemia-reperfusion injury of the steatoliver

研究代表者

宮前 俊一 (MIYAMAE, Shunichi)

金沢医科大学・医学部・非常勤講師

研究者番号：30121263

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：肝外科手術や肝移植の際に肝血流の一時的な遮断後の再開時に肝細胞障害が生じるが(肝虚血再灌流障害)、脂肪肝ではその障害が強いことが知られている。本研究は脂肪肝の虚血再灌流障害に対する運動トレーニングの効果を検討した。脂肪肝を有する肥満のOLETFラットとその対照のLETOラットを用いて摘出灌流肝臓と麻酔下ラットで実験した。両実験とも、肥満ラットでは虚血再灌流による肝障害が対照ラットに比べて増悪した。一方、4週間のトレッドミルによる運動は肥満ラットの脂肪肝の発生を抑制するとともに虚血再灌流肝障害の増悪を抑制した。肥満に伴う脂肪肝における虚血再灌流障害には運動が有効であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Steatotic livers are known to be vulnerable to ischemia-reperfusion (I/R) injury during hepatic surgery and liver transplantation. Exercise training is recommended to prevent obesity-associated disorders. However, it remains unknown whether exercise training attenuates I/R injury of steatotic liver. We determined, using the hyperphagic, Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF) rat and the control Long-Evans Tokushima Otsuka (LETO) rat, effects of exercise training on I/R injury under both anesthesia and isolated liver perfusion. Running training was given on a motorized treadmill for four weeks from 19-t h week. In both preparations of isolated perfused livers and anesthetized rats, I/R-induced liver injury was greater in the OLETF rats than that of LETO rats. Exercise training prevented the development of steatotic livers and attenuated the I/R injury, as observed in non-exercise OLETF rats. In conclusion, exercise training attenuates I/R injury of steatotic livers from OLETF rats.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学、麻酔・蘇生学

キーワード：肝虚血再灌流障害 脂肪肝 肥満 運動 摘出灌流肝

1. 研究開始当初の背景

脂肪肝が肝移植や外科手術時に虚血再灌流 (Ischemia-reperfusion) 障害を起こしやすいことは多くの臨床例と動物実験の検討から知られている。その機序の一因として脂肪を蓄積した腫大肝細胞による肝類洞血管の閉塞が形態学的検討から提唱されている。しかしながら、その肝類洞血管抵抗を生理学的に測定した報告はない。

運動トレーニングは肥満対策として推奨されている。しかしながら、脂肪肝の虚血再灌流障害の予防に効果があるかを検討した報告はない。

一方、申請者らは摘出灌流肝臓および麻酔下ラットにおいて肝臓微小血管圧測定法を開発してきている。また、運動トレーニングについても、その効果を肝臓のアナフィラキシーで報告してきている。

2. 研究の目的

脂肪肝は虚血再灌流障害に対する耐性が弱いとの臨床報告ならびに動物実験の報告がある。近年、肥満対策として運動トレーニングが推奨されている。脂肪肝の虚血再灌流障害が運動トレーニングにより改善するか、肝微小血管の挙動とともに脂肪肝を呈する肥満ラットを用いて in vivo 麻酔下ならびに ex vivo、摘出灌流肝臓で明らかにする。

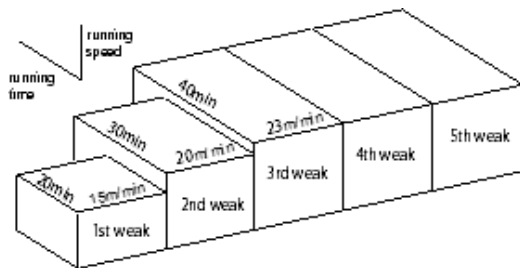
3. 研究の方法

実験動物として脂肪肝を有する肥満ラットである Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF) ラットと、その対照として非肥満ラットには Long-Evans Tokushima Otsuka (LETO) ラットを用いた。

実験は (1) 摘出灌流肝臓と (2) 麻酔下ラットにおいて検討した。

(1) 摘出灌流肝臓

運動トレーニング：トレッドミルで、速度 10m/min、10 分間を週 5 回よりはじめ、漸増して 4 週には 23m/min、40 分間を負荷した。



肝臓の灌流方法：肝動脈を結紮したラット摘出肝臓は門脈からヘパリン加自家血(ヘマトクリット 9%)で定流量 (門脈圧 7-8cmH<sub>2</sub>O)で灌流した。混合ガス(5% CO<sub>2</sub>, 95% O<sub>2</sub>)で灌流血液をバブリングして酸素化並びに

灌流液の pH を適正化した。肝血流量は測定プローブを門脈ラインに装着し電磁血流計により測定した。胆汁流量は胆管にカニキュレーションして、流出する胆汁をボトルに採取してその重量を連続的に測定した。さらに門脈圧、肝静脈圧ならびに肝重量を連続的に測定した。

肝微小血管圧と肝血管抵抗の測定：肝微小血管圧の測定は門脈と肝静脈を同時に灌流ラインに装着した電磁弁で閉塞した時に平衡に達する平衡圧である double occlusion pressure (Pdo)により肝毛細血管圧である類洞圧を測定した。その圧と門脈圧との圧格差と肝静脈圧との圧格差をそれぞれ肝血流量で除して前類洞抵抗と後類洞抵抗を算出した。

虚血再灌流負荷：虚血は門脈ラインを閉塞し、1 時間後に解除し再灌流した。その後 1 時間観察した。

肝障害の評価：灌流血中 ALT 濃度、胆汁流量、肝うっ血の程度を肝臓重量、前類洞抵抗と後類洞抵抗、肝組織像により評価した。

実験グループ：肥満運動虚血再灌流群 (n=7)、肥満非運動虚血再灌流群 (n=7)、対照運動虚血再灌流群 (n=7)、対照非運動虚血再灌流群 (n=7) の 4 群において行った。

(2) 麻酔下ラット

麻酔下ラット標本の作成法：ペントバルビタール麻酔下、人工呼吸下に頸動脈と外頸静脈から体血圧と中心静脈圧を測定した。胆管に挿入したチューブより胆汁を連続的に採取し、その重量を流量として測定した。肝左葉にドップラー組織血流計プローブを装着して肝臓表面の組織血流量を連続的に測定した。

虚血再灌流負荷：虚血再灌流はラットを麻酔開腹下に肝臓葉の 70% に相当する左葉と正中葉の基部を門脈と肝動脈をメタルクレンメで閉塞して虚血を惹起する。1 時間後に閉塞を解除する。再灌流後 2 時間観察する。

肝障害の評価：血中 ALT 濃度、胆汁流量、ドップラー組織血流計による肝組織血流量、肝組織像に基づいて評価した。

実験グループ：肥満運動虚血再灌流群 (n=7)、肥満非運動虚血再灌流群 (n=7)、肥満非虚血再灌流群 (n=5)、対照運動虚血再灌流群 (n=7)、対照非運動虚血再灌流群 (n=7)、対照非虚血再灌流群 (n=5) の 6 群において行った。

4. 研究成果

(1) 摘出灌流肝臓実験:

ラット体重は肥満の OLETF ラットについては運動群(483±18(SE)g)、が非運動群(564±38g)に比べて有意に小さかった。しかしながら、非肥満の LETO ラット(451±10g vs 421±22g; 非運動 vs 運動)では差異はみられなかった。肝重量は同様に肥満の OLETF ラットについては運動群(12.8±0.6(SE)g)、が非運動群(15.0±0.8g)に比べて有意に小さかった。しかしながら、非肥満の LETO ラット(11.7±0.5g vs 12.1±0.2g; 非運動 vs 運動)では差異はみられなかった。

摘出灌流肝臓では虚血後の再灌流時に、すべての実験群において門脈圧は上昇したが、Pdo と肝静脈圧には有意な変化はみられなかった。その結果、前毛細血管抵抗が優位に上昇した。このほぼ選択的な前毛細血管抵抗の増加は非運動 OLETF ラット(再灌流後 1.5 分 peak 値; 0.72±0.09 cmH<sub>2</sub>O/mL/min)が LETO ラット(0.43±0.03 vs 0.49±0.03 cmH<sub>2</sub>O/mL/min; 運動 vs 非運動)よりも有意に大きかった。運動はこの非運動 OLETF にみられた増加を抑制した(再灌流後 1.5 分 peak 値; 0.48±0.06 cmH<sub>2</sub>O/mL/min)。

肥満非運動虚血再灌流群では非肥満の LETO 群に比べて肝臓逸脱酵素の ALT 濃度の上昇は有意に大きかった(30 分値: 447±52 IU/L, 284±14 IU/L, 170±15 IU/L, 118±9 IU/L; 60 分値: 722±104 IU/L, 565±35 IU/L, 305±35 IU/L, 244±12 IU/L; 肥満非運動群, 肥満運動群, 非肥満非運動群, 非肥満運動群)。

同様に肥満非運動虚血再灌流群では非肥満の LETO 群に比べて胆汁流量の低下は有意に大きかった。一方、運動はこの肥満ラットのこれら虚血再灌流の肝障害も有意に軽減した。

さらに、肝組織像では肥満非運動群では顕著な脂肪肝が見られたが、運動群では脂肪肝所見は見られなかった。

以上より、虚血再灌流による肝細胞障害ならびに前毛細血管優位の肝血管抵抗の増加は肥満ラットで強かったが、それらは運動により体重と肝重量の減少とともに、軽減された。

なお、肝虚血再灌流時の肝微小循環動態理解のためにラットのアナフィラキシー時の肝循環、特に血管収縮部位についても検討し、ラットの血管収縮部位は今回の虚血灌流障害と同様に前毛細血管、特に門脈際病脈に強いことが示された。

(2) 麻酔下ラット実験:

ラット体重と肝重量は摘出肝臓の実験と同様に肥満の OLETF ラットでは運動群は非運

動群に比べて有意に小さかった。しかし非肥満の LETO ラットでは差異はみられなかった。

肝組織像では肥満群において顕著な脂肪肝が認められたが運動により脂肪肝の所見は改善した。

虚血再灌流により ALT 濃度は肥満非運動群が他のすべての群に比較して有意に大きく増加した。

さらに、肝組織血流量の減少からの回復も同様に肥満非運動群で遅延し増悪していた。

一方、胆汁流量は虚血再灌流により低下したが再灌流後 2 時間には虚血前の 90% に回復したが虚血再灌流群間には有意差はなかった。

以上より、肥満非運動ラットでは脂肪肝が認められ、肝逸脱酵素 ALT 並びに肝組織血流量を指標とする虚血再灌流による肝障害は非肥満ラットに比べて強かったが運動によりすべて改善された。

なお、肝虚血再灌流時の肝微小循環動態理解のためにラットのアナフィラキシー時の肝循環と腹腔動態についても検討した。

総括として、OLETF ラットによる脂肪肝の虚血再灌流障害に対する耐性低下はトレッドミル運動により体重減少とともに脂肪肝の発生が抑制され、肝微小循環が改善し減弱することが示された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 5 件)

1. Wang M, Shibamoto T, Kuda Y, Sun L, Tanida M, Kurata Y.

Angiotensin II and vasopressin are involved in the defense system against anaphylactic hypotension in anesthetized rats.

Eur J Pharmacol. 2014;731:38-43. 査読有

2. Shinomiya S, Shibamoto T, Kurata Y, Kuda Y, Zhang W, Tanida M, Toga H.

Nitric oxide and 2-adrenoceptor activation attenuate pulmonary vasoconstriction during anaphylactic hypotension in anesthetized BALB/c mice.

Exp Lung Res. 2013;39(3):119-129. 査読有

3. Zhang W, Shibamoto T, Tanida M, Wang M, Sun L, Kurata Y.

Rat hepatic and splanchnic vascular responses to anaphylactic shock, compared

with hemorrhagic or vasodilator-induced shock.

In Vivo. 2013;27(4):485-493. 査読有

4. Wang M, Tanida M, Shibamoto T, Kurata Y.

Alpha-adrenoceptor antagonists and chemical sympathectomy exacerbate anaphylaxis-induced hypotension, but not portal hypertension, in anesthetized rats.

Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. 2013;305(8):R900-R907. 査読有

5. Kitadate M, Shibamoto T, Tsutsumi M, Tonami H.

Portal venular constriction during anaphylactic shock in anesthetized rats.

Biomed Res. 2013;34(2):61-68. 査読有

〔学会発表〕(計3件)

1. Shibamoto T, Tanida M, Wang M, Kurata Y.

Exercise attenuates ischemia-reperfusion injury of nonalcoholic fatty liver of the OLETF rat.

The 37th Congress of the International Unions of Physiological Sciences. July 24, 2013, Birmingham (英国).

2. Shibamoto T, Yamamoto Y, Kuda Y, Tanida M, Wang M, Kurata Y.

Effect of exercise training on ischemia-reperfusion injury of steatotic livers from OLETF rats.

Experimental Biology 2013. April 21, 2013, Boston (米国).

3. 芝本利重、山本悠貴、九田裕一、谷田 守、王 墨飛、倉田康孝.

運動の肥満ラットの肝臓虚血再灌流障害への効果 –摘出肝での検討–.

第22回日本病態生理学会総会. 2012年8月4日, 湯布院 (大分).

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

宮前 俊一 (MIYAMAE, Shunichi)

金沢医科大学・医学部・非常勤講師

研究者番号：30121263

### (2)研究分担者

芝本 利重 (SHIBAMOTO, Toshishige)

金沢医科大学・医学部・教授

研究者番号：90178921

### (3)連携研究者

なし