

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 22 日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24659604

研究課題名(和文)肝切除時におけるリアルタイム肝機能モニタリングシステムの開発と臨床応用

研究課題名(英文)Development of the monitoring system for the liver function in hepatectomy

研究代表者

榑野 正人(Nagino, Masato)

名古屋大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：20237564

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文):リアルタイム肝機能モニタリングシステムとしてNOプローベの開発を行なった。肝虚血・再灌流モデルにおいて虚血によりNOレベルが上昇し、虚血15分で定常状態に達した。再灌流5分後には虚血前と比較して類洞径が拡張しているのが観察された。p-eNOSは虚血の初回時に強く発現し、虚血再灌流の繰り返しにより、徐々に低下した。逆にiNOS発現は徐々に増強した。本研究において虚血再灌流の反復時のp-eNOSとiNOSの異なる活性化パターンを明らかにした。

研究成果の概要(英文):We developed the NO sensor as a real-time monitoring system for the liver function. Intrahepatic NO levels increased and then reached a plateau approximately 15 min after starting ischemia during I/R (ischemia/reperfusion). The sinusoids after 5 min reperfusion were dilated compared with the sinusoids before ischemia during I/R. The phospho-eNOS expression increased during the first ischemia, and then the levels decreased during the subsequent repeating I/R; however, the iNOS expression gradually increased. This study revealed an altered activation of the phospho-eNOS and iNOS over the course of repeated I/R.

研究分野：消化器外科学

キーワード：肝虚血・再灌流 一酸化窒素 肝障害

## 1. 研究開始当初の背景

肝臓は門脈と肝動脈から豊富な血流を受ける臓器である。肝切除術では出血を抑えるために肝流入血路(肝動脈と門脈)を間歇的に遮断するプリングル法(Pringle maneuver)を用いるが、術後肝不全など重篤な合併症の原因ともなる。現在肝虚血・再灌流時間は外科医の経験に基づき行われているが、肝臓の状態は個々の患者で異なるため、症例毎に適切な虚血・再灌流時間を設定する必要がある。肝虚血・再灌流障害のメカニズムに関して一酸化窒素(NO, nitric oxide)の重要性が報告されている(*Diana L. Diesen, J Surg Res. 167, 96-11, 2011*)。

一酸化窒素(NO)は血管緊張の調節に重要な役割を果たしており、NO合成酵素(NOS)によってアルギニンと酸素から合成される。NOSには3種類のアイソフォームが存在し、肝臓では血管内皮型NOS(eNOS: endothelial nitric oxide synthase)と誘導型NOS(iNOS: inducible nitric oxide synthase)がNO合成の触媒として作用する。iNOSは虚血などの強いストレス後には、種々の細胞で誘導され、CaM/Ca<sup>2+</sup>非依存性に多量のNOを産生する(*Zhang B et al., J Hepatol 26:1348-1355, 1997*)。eNOSは類洞内皮細胞に存在し、通常時は極少量のNOをカルモジュリン・カルシウム(CaM/Ca<sup>2+</sup>)依存性に産生することで肝血管の恒常性を維持している(*Iwakiri Y et al., Hepatology. 47, 1754-1763, 2008*)。また1999年、eNOSのリン酸化を通じてCaM/Ca<sup>2+</sup>非依存性に大量のNOが産生される新たな経路も発見されている。

しかし肝虚血再灌流中のeNOSとiNOSの相補的な活性化や、肝内微小循環の維持に対する役割については未だよくわかっていない。

## 2. 研究の目的

肝臓内NO(nitric oxide)モニタリングシステムを肝虚血・再灌流時の肝機能のリアルタ

イムな質的評価法として確立させ、安全且つ適切な肝切除術施行を可能にすることである。

## 3. 研究の方法

### (1) NOモニタリングシステムの基礎的研究

- NOプローベの測定能に関する実験 -

.NO donor である

S-nitroso-N-acetyl-L,L-penicillamine (SNAP)を溶解した濃度の異なる溶液を作成し、NOプローベにてNOレベルを測定した。

.肝臓の流入血管(門脈)流出血管(肝静脈-下大静脈)を確保して閉鎖回路内を還流液で循環させる分離肝灌流モデルを作成した。このモデルに肝臓流入血管へNO donor である

S-nitroso-N-acetyl-L,L-penicillamine (SNAP)を投与し、肝組織内のNOレベルをNOプローベで測定した。

### (2) 虚血・再灌流に対するNOモニタリングシステムの検討

- NOプローベによる肝組織NOレベルの測定 -

.ラット肝虚血・再灌流モデルで異なる虚血時間(5, 15, 30, 60分)での肝組織におけるNOレベルの変化をNOプローベにて検討した。

.ラット肝虚血・再灌流モデルで15分の虚血時間後に異なる再灌流時間(5, 15, 30分)での肝組織におけるNOレベルの変化をNOプローベにて検討した。

.ラット肝虚血・再灌流モデルで15分の虚血と5分の再灌流を2回繰り返した肝組織と5回繰り返した肝組織におけるNOレベルの変化をNOプローベにて検討した。

.ラット肝虚血・再灌流モデルで15分の虚血と15分の再灌流を2回繰り返した肝組織と5回繰り返した肝組織におけるNOレベルの変化をNOプローベにて検討した。

### (3) 虚血・再灌流のメカニズムに関する研究

- 生体顕微鏡による肝微小循環障害および白血球の接着、遊走の評価 -

5分の虚血と5分の再灌流を行なったラット肝虚血・再灌流モデルでの生食投与群、L-NAME 投与群、iNOS の特異的阻害剤である L-NIL 投与群において生体顕微鏡による観察を行った。また肝血流について類洞径(Ds)流速(VRBC)流量(VF)、灌流指数(PI)を検討した。

- 虚血・再灌流の肝組織を用いた in vitro での eNOS, iNOS 活性測定 -

ラット虚血・再灌流モデルで異なる虚血時間(0, 1, 3, 5, 7, 10, 15, 30分)の肝組織、15分虚血・5分再灌流した肝組織と15分虚血・15分再灌流した肝組織でのNOS活性を、特殊チャンバーを用いて測定を行う検討した。

- 虚血・再灌流による肝障害とNOレベルとの関連の検討 -

.ラット肝虚血・再灌流モデルで15分の虚血と5分の再灌流を4回繰り返したモデルの虚血中の肝組織でのp-eNOSおよびiNOSの発現をウエスタンブロッティング、リアルタイムPCRで検討した。

.60分の虚血と30分の再灌流行なったラット肝虚血・再灌流モデルでの生食投与群、非特異的NOS阻害剤であるL-NAME投与群での肝組織におけるNOレベルの変化をNOプローベにて検討した。

.5分の虚血と5分の再灌流を行なったラット肝虚血・再灌流モデルでの生食投与群、L-NAME投与群の肝組織のDAF-2DA染色によりNOの発現を検討した。

### 4. 研究成果

#### 【NOモニタリングシステムの基礎的研究】

- NOプローベの測定能に関する実験 -

NOプローベはNO donorである

S-nitroso-N-acetyl-L,L-penicillamine

(SNAP)を溶解した溶液においてNOレベルの測定が可能であった。異なる濃度の

S-nitroso-N-acetyl-L,L-penicillamine

(SNAP)溶液においてもNOレベルの濃度依存的な測定が可能であった。NOプローベは複数回の測定においても破損や測定感度の低下などの異常を認めず、耐性に問題がなかった。分離肝灌流モデルにおいても肝組織内のNOレベルの測定は可能であった。またNO donorである

S-nitroso-N-acetyl-L,L-penicillamine

(SNAP)を投与により、肝組織内のNOレベルは抑制されていた。

#### 【虚血・再灌流に対するNOモニタリングシステムの検討】

- NOプローベによる肝組織NOレベルの測定 -

ラット肝虚血・再灌流モデルにおいて、いずれの虚血時間(5, 15, 30, 60分)においても虚血によりNO濃度が上昇し、再灌流によりNO濃度が減少した。また60分の虚血と30分の再灌流モデルでは虚血によるNOレベルの増加は10分程で定常状態に達し、虚血中高いNO濃度を維持していた。再灌流後NOは減少し、約30分後には虚血前のレベルに回復した。

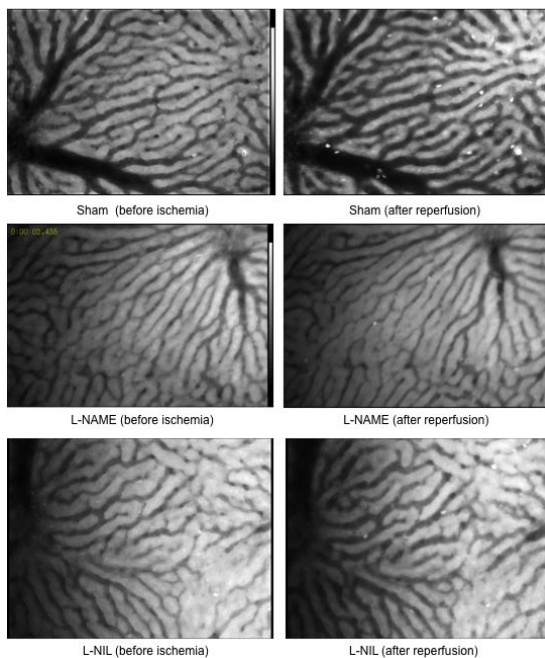
15分の虚血と5分の再灌流を2回繰り返した肝組織と5回繰り返した肝組織においても、虚血によりNO濃度が上昇し、再灌流によりNO濃度が減少した。虚血回数が増加することにより再灌流後NOレベルは徐々に減弱していき、虚血前のレベルまで回復しなかった。15分の虚血と15分の再灌流を2回繰り返した肝組織と5回繰り返した肝組織においても虚血回数が増加することにより再灌流後NOレベルは徐々に減弱していった。同じ再灌流回数での再灌流時間5分と15分では再灌流後NOレベルの減弱は15分のほうが緩やかであった。

#### 【虚血・再灌流のメカニズムに関する研究】

- 生体顕微鏡による肝微少循環障害および白血球の接着、遊走の評価 -

5分の虚血と5分の再灌流モデルへの生食投与群では生体顕微鏡による観察により、再灌流5分後には類洞径が拡張しているのが観察された。一方L-NAME投与群では虚血前から再灌流後までを通じて類洞径が非常に細くなっていた。iNOSの特異的阻害剤(L-NIL)投与群では、生食投与群と同様に再灌流5分後には類洞の拡張を認めた(図1)。

図1



また再灌流後の類洞径(Ds)は生食群・L-NIL群で虚血前に比べ有意に拡張するのに対して、L-NAME群では全期間を通じて狭いままであった。流速( $V_{RBC}$ )は各群とも虚血前に比べ再灌流後に有意に遅くなった。類洞1本の流量(VF)、及び各小葉血流としての灌流指数(PI)は、生食群・L-NIL群で再灌流後も虚血前と同様のレベルに保たれているのに対して、L-NAME群では再灌流後に有意に減少していた。以上より類洞径の変化もNOの産生が関連しているが、iNOSは虚血急性期の反応には関与していません、eNOSを介する大量のNO産生が虚血急性期の類洞開存に重要な役割を果たしていると考えられた。

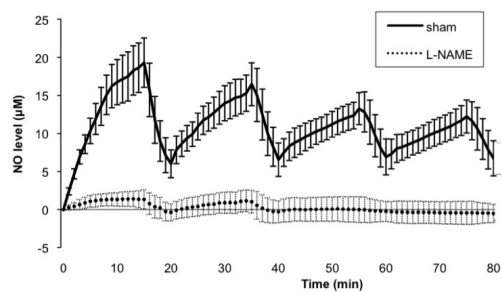
- 虚血・再灌流の肝組織を用いた in vitro での eNOS, iNOS 活性測定 -

15分の虚血と5分の再灌流した肝組織と15分の虚血と15分の再灌流した肝組織では、NOSの活性が再灌流時間により異なっていた。NOレベルの動態は肝内p-eNOSの発現と関連していた。

- 虚血・再灌流による肝障害とNOレベルとの関連の検討 -

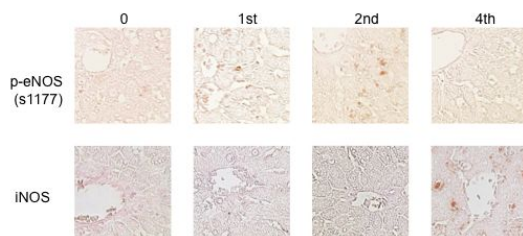
虚血再灌流を繰り返した場合、虚血時の肝NO産生能力は徐々に減少していた(図2)。

図2



15分の虚血と5分の再灌流を4回繰り返したモデルの虚血中の肝組織においてeNOSは全期間を通じて一定の発現量であったが、p-eNOSは1回目・2回目に強く発現していたが、虚血再灌流を繰り返す度に発現が低下していった。4回目には全く発現がみられず、一方iNOSは虚血再灌流を繰り返す毎に発現が強くなり、4回目になって強く発現していた(図3)。

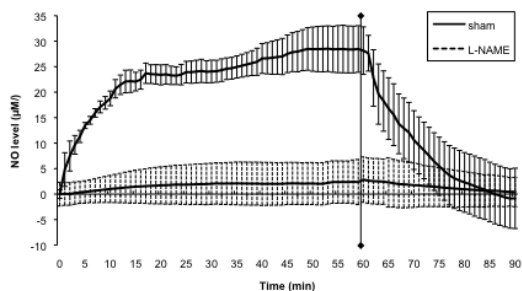
図3



また60分の虚血と30分の再灌流モデルへの生食投与群では虚血中肝組織のNOレベル

は高濃度を維持し、再灌流後 NO は虚血前のレベルに回復した。一方非特異的 NOS 阻害剤 (L-NAME) 投与群では虚血・再灌流を通じてほとんど NO 濃度に変化を認めなかった (図 4)。

図 4



5分の虚血と5分の再灌流モデルへの生食投与群では虚血15分で血管内皮に強くDAF-2DA染色によるNOの発現が認められた。しかし非特異的NOS阻害剤(L-NAME)投与群ではNOの発現を全く認めなかった。

反復する虚血再灌流は、肝内での酸素供給の減少、エネルギー産生障害、eNOS のリン酸化を減少させ、肝内微小循環障害を引き起こしていると考えられる。微小循環障害による低酸素ストレスは肝臓内での iNOS 遺伝子発現の亢進の原因の1つであり、結果として、反復する虚血再灌流中には p-eNOS と iNOS の発現が入れ替わるような活性化パターンを示したと考えられる。

eNOSとiNOSの活性化によるNOの血管拡張作用は、通常時のみならずストレス下においても肝内の恒常性維持に重要な役割を果たしている。今回の我々の研究で観察されたように、虚血再灌流急性期にp-eNOSの活性化がおり、iNOSの発現がそれに続くことは、強い虚血ストレスが肝臓に加わった時に高濃度のNOを産生し肝内血流と組織整合性を保つために働く重要な生体防御機構の1つであると考えられる。

本研究により肝臓内NO(nitric oxide)モニタリングシステムは肝虚血・再灌流時の肝機

能のリアルタイムな質的評価法として有効であると考えられた。

## 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1件)

Miyake T, Yokoyama Y, Kokuryo T, Mizutani T, Imamura A, Nagino M. Endothelial nitric oxide synthase plays a main role in producing nitric oxide in the superacute phase of hepatic ischemia prior to the upregulation of inducible nitric oxide synthase. J Surg Res. 2013 Aug;183(2):742-51. (査読有)

[学会発表](計1件)

横山 幸浩、中川 陽史、三宅 隆史、國料 俊男、江畑 智希、伊神 剛、菅原 元、榑野 正人、一酸化窒素(NO)センサーを用いた肝虚血再灌流時のリアルタイム肝障害評価、第68回日本消化器外科学会総会、2013.7.17-19.シーガイアコンベンションセンター、宮崎県、宮崎市

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

榑野 正人 (NAGINO MASATO)  
名古屋大学・医学系研究科・教授  
研究者番号：20237564

### (2)研究分担者

横山 幸浩 (YOKOYAMA YUKIHIRO)  
名古屋大学・医学部附属病院・講師  
研究者番号：80378091

國料 俊男 (KOKURYO TOSHIO)  
名古屋大学・医学系研究科・特任講師  
研究者番号：60378023

伊神 剛 ( IGAMI TUYOSHI )  
名古屋大学・医学部附属病院・病院講師  
研究者番号 : 50420378