

平成 21 年 6 月 16 日現在

研究種目：基盤研究（C）  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19590789  
 研究課題名（和文） エタノール投与の腸管虚血再灌流惹起性肝障害の影響および適正飲酒ラットモデルの作成  
 研究課題名（英文） Effect of moderate drinking for gut ischemia / reperfusion induced liver dysfunction in rat model  
 研究代表者  
 山岸 由幸 (YAMAGISHI YOSHIYUKI)  
 慶應義塾大学・医学部・助教  
 研究者番号：00286486

研究成果の概要：ラット腸管虚血再灌流惹起性肝障害モデルにおいて、低用量の急性エタノール投与は肝微小循環障害、肝障害を抑制することが示唆された。一方、高用量の急性エタノール投与ではそれぞれ増悪することが示唆され、その機序にアデノシン A2 受容体を介した経路の関与が示唆され、これらの結果は肝における適正飲酒の効果につき機序解明の一端となると思われた。エタノール 35% 含有液体飼料 (Lieber diet) 投与は腸管虚血再灌流惹起性肝障害を増悪し、現在、エタノール濃度を調整し肝における適正飲酒モデル作成につき研究継続中である。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2008 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・消化器内科学

キーワード：エタノール、腸管虚血再灌流、肝障害、適正飲酒、Ischemic preconditioning

## 1. 研究開始当初の背景

我々は生体顕微鏡下にラット肝を *in vivo* で観察し、腸管虚血再灌流惹起性肝微小循環障害において白血球の膠着が重要な働きをしていることを示した (Horie Y, et al., Gastroenterology 111; 666-673, 1996, Horie Y, et al., J Clin Invest 99; 781-788)。また急性エタノール投与が虚血再灌流惹起性肝障害も増悪させる可能性が示唆される一方で、低用量の急性エタノール投与は腸管

虚血再灌流惹起性肝障害を抑制することを報告した (Yamagishi Y, et al., Am J Physiol, 2002)。

低用量エタノール投与は、動物モデルにおいて心臓や脳における虚血再灌流惹起性障害を抑制することが報告されている。また、J カープと言われるように適正飲酒は心脳血管系イベントを抑制することが知られているが、肝についての詳細な検討は少ない。

本邦においても近年、肝臓はじめ小腸移植

も施行されたが、その際に腸管虚血再灌流が生じる。それによって肝臓、肺などの循環動態的に腸管の下流にある臓器が障害を受ける。一方、我が国でも飲酒量は近年増加しており、臨床の面からも、習慣飲酒者の虚血再灌流惹起性臓器障害の合併という症例も増えることが予想される。

## 2. 研究の目的

適正飲酒時などの低用量エタノールは、虚血再灌流惹起性肝障害を抑制する可能性もある。今回、適正飲酒の肝に対する効果についての説明の一端として、急性ならびに慢性エタノール投与ラットを用い、アルコールの腸管虚血再灌流惹起性肝障害に対する影響に加えそのメカニズムについて検討し、適正飲酒動物モデルの作成を試みる。その結果、本研究が臨床的にも飲酒者の臓器移植や、消化器系の虚血性疾患への飲酒の影響についての検討のみならず、近年増加している重症型アルコール性肝炎の病態解明、あるいは適正飲酒による健康増進のについての検討の糸口になることを目的とする。

## 3. 研究の方法

(1) Wistar系雄性ラットを、麻酔後開腹し、ラット肝左葉をカバーガラスの窓を設けたプレート上に固定し、rhodamine 6Gにて白血球を蛍光ラベルし、肝表面を倒立型蛍光顕微鏡下に観察する。生理食塩水、低用量(1g/kg)あるいは高用量(4g/kg)エタノールを胃管より投与する。エタノール投与後15分より肝類洞における膠着した白血球数ならびに肝類洞数を計測する。ポリエチレンチューブにより上腸間膜動脈を結紮し、30分後虚血を解除(再灌流)し、その後の白血球数ならびに血流のない肝類洞のパーセンテージを経時的に解析する。下大静脈の肝静脈合流部と門脈に留置したカテーテルより経時的に採血し、エンドスペック、ELISAを用いてエンドトキシンやTNF- $\alpha$ など各種サイトカインの血中濃度を測定する。蛍光dextranを腸管内に投与し、血中dextran濃度を蛍光光度計にて測定し、腸管粘膜透過性の変化を検討する。再灌流1、6、12、24時間後の血中ALT値を測定し、また肝を組織学的に検討する。

(2) Adenosine、Adenosine antagonistであるADA、A<sub>2</sub>受容体 antagonistであるFK532、A<sub>2</sub>受容体 antagonistであるDMPXを経門脈的に投与し同様の解析を行う。

(3) エタノール 35%含有液体飼料(Lieber diet)を6週間feeding後腸管虚血再灌流施行し、肝微小循環障害、肝障害を評価する。

コントロール食のラットと比較し増悪を認めた。現在、液体資料のエタノール濃度5%ずつ振り分けて慢性エタノール投与にて肝における適正飲酒モデル作成につき研究継続中である。

## 4. 研究成果

(1) 生理食塩水投与と比較し低用量エタノールは腸管虚血再灌流による肝微小循環障害、肝障害をALT値、組織とも改善し、高用量では増悪した。

低用量エタノール前投与は、腸管虚血再灌流単独と比べて腸管粘膜透過性と血中エンドトキシン濃度には差を認めなかったが、血中TNF- $\alpha$ の血中濃度は低用量では減少した。このことより、腸管虚血再灌流惹起性肝障害において、低用量エタノールはTNF- $\alpha$ 産生を抑制し肝微小循環障害、肝障害を抑制するIschemic preconditioning (IP)効果が示された。尚、高用量では腸管虚血再灌流単独と比べて腸管粘膜透過性には変化がなかったが、血中エンドトキシン増加し、TNF- $\alpha$ の血中濃度が上昇した。エンドトキシン上昇を介した肝障害の増悪が考えられた。

(2) IPにはAdenosineが関与することが知られている。Adenosineの腸管虚血再灌流前投与は、低用量エタノール前投与と同様に腸管粘膜透過性と血中エンドトキシン濃度には差を認めず、血中TNF- $\alpha$ の血中濃度の減少を介して肝微小循環障害、肝障害を抑制した。ADAを前投与し、エタノール低用量投与後に腸管虚血再灌流を施行した際には、低用量エタノールのIP効果は減弱され、血中エンドトキシン増加し、TNF- $\alpha$ の血中濃度が上昇し、肝障害は増悪した。FK532前投与では、低用量エタノール前投与と特に著変ない結果であったが、A<sub>2</sub>受容体拮抗薬にて低用量群の肝微小循環障害、ならびに肝障害が増悪し、組織にも炎症細胞浸潤増加を認め増悪がみられ、ADA投与と同様の傾向が見られた。このことより、低用量エタノールによるIP効果にはA<sub>2</sub>受容体を介した経路の関与が示唆された。なお、心筋でのIP効果にはA<sub>1</sub>受容体が関与しているとされており、肝と心筋では機序が異なる可能性が示唆された。これらの結果は肝における適正飲酒の効果につき機序解明の一端となると思われる。

(3) エタノール 35%含有液体飼料(Lieber diet)を6週間feeding後腸管虚血再灌流施行し、肝微小循環障害、肝障害を評価したところ、コントロール食のラットと比較し増悪を認めた。これは、常習飲酒は腸管虚血再灌流惹起性肝障害を増悪させることが明らかとなり、肝において常習飲酒は侵襲的処置に

伴う肝障害を悪化させる可能性を示唆するものであったが、現在、液体資料のエタノール濃度 5% ずつ振り分けて慢性エタノール投与にて肝における適正飲酒モデル作成につき研究継続中である。従来より、心血管系における適正飲酒については、とくに LDL コレステロールの低下と HDL コレステロールの上昇による動脈硬化抑制によりそのリスクを軽減するとされるが、肝については、一般的に適正飲酒については議論のあるところである。適正飲酒の肝への影響については、肝切除後の肝再生や、あるいは薬物性肝障害からの回復において、低用量エタノールの継続投与はラットではいずれも有効に働くと報告される ( Zhang M, et al., Gastroenterology 2000, Dig Dis Sci 2003 ) が、adenosine、サイトカインなどの関与から検討した報告はない。これらを動物モデルにて作用機序や有効性を詳細に解析した報告はなく、これらいずれも我々の教室にて今後検討を継続するべき研究であると思われる。

#### 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 7 件)

Yamagishi Y, Saito H, Ebinuma H, et al. A new prognostic formula for adult acute liver failure using computer tomography-derived hepatic volumetric analysis. Journal of Gastroenterology, 2009 (in press). 査読有

Tada S, Saito H, Yamagishi Y, et al: Treatment of hepatitis C virus with peg-interferon and ribavirin combination therapy significantly affects lipid metabolism. Hepatology Reserch 39, 195-199, 2009. 査読有  
堀江義則、山岸由幸、菊池真大、他：飲酒の肝硬変進展への影響 C 型肝炎とアルコール性肝硬変の関係について。アルコール薬物・医学会雑誌 44, 38-42, 2009. 査読有

菊池真大、山岸由幸、堀江義則、他：非 B 非 C アルコール性肝疾患における良性結節と肝細胞癌の鑑別。アルコールと医学生物学 28, 105-110, 2009. 査読有

山岸由幸、堀江義則、横山顕、他：非 B 非 C 大酒家肝細胞癌、肝硬変における ALDH2、ADH2 遺伝子の検討。アルコールと医学生物学 28, 111-117, 2009. 査読有  
山岸由幸、朴沢重成、相馬宏光、他：急性胆管炎に対する緊急 ERCP の経験。Progress of Digestive Endoscopy 73,

116-119, 2008. 査読有

山岸由幸、櫻庭篤、泉谷幹子、他：病態に応じた集学的治療にて救命した重症型アルコール性肝炎の 2 例。アルコールと医学生物学 27, 42-50, 2007. 査読有

#### [学会発表](計 4 件)

山岸由幸、他：非 B 非 C 大酒家肝細胞癌、肝硬変における ALDH2、ADH2 遺伝子の検討。第 28 回アルコール医学生物学研究会。2008/9/16, 横浜。

Yoshiyuki Yamagishi, et al: The ratio of computed tomography-derived liver volume / standardized liver volume is a useful prognostic factor of adult acute liver failure. 58 th American Association for the Study of Liver Disease. 2007/11/5, Boston.

Yoshiyuki Yamagishi, et al: The usefulness of the ratio of computed tomography-derived liver volume / standardized liver volume of fulminant hepatic failure. 6th JSH Single Topic Conference. 2007/9/28, Iwate.

山岸由幸、他：重症型アルコール性肝炎に対する白血球除去療法を中心とした治療の動向。第 43 回日本肝臓学会総会。2007/5/26, 東京。

#### [図書](計 5 件)

山岸由幸、他：日本臨床社。日本臨床増刊号 肝癌 基礎・臨床研究のアップデート - 肝癌の治療 腫瘍因子からみた治療戦略 アルコール性肝障害、NASH における肝細胞癌。2009, 439-443.  
山岸由幸：医歯薬出版株式会社。医学のあゆみ アルコール医学・医療の最前線 アルコール "効用" をめぐる議論。2007, 672-676。

山岸由幸：メディカル・サイエンス・インターナショナル。疾患からまとめた 病態生理 FIRST AID 3 章 消化器疾患 20. アルコール性肝障害。2007, 220-223

山岸由幸、他：アークメディア。肝胆膵 アルコールと肝疾患 アルコールと糖・脂質代謝。2007, 581-585。

山岸由幸、他：ライフサイエンス出版。治療学 肝不全 LOHF (遅発性肝不全) の治療戦略。2007, 24-28。

#### [産業財産権]

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

#### [その他]

6 . 研究組織

(1)研究代表者

山岸 由幸 (YAMAGISHI YOSHIYUKI)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：00286486

(2)研究分担者

(3)連携研究者