

平成 21 年 4 月 14 日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19591574
 研究課題名（和文） 肝虚血再灌流障害における血小板，血管内皮相互作用の解明と
 障害予防法の新しい開発
 研究課題名（英文） Novel approach for the interaction between platelets and leukocytes
 after the ischemia reperfusion liver injury
 研究代表者
 近藤 匡（KONDO TADASHI）
 筑波大学・大学院人間総合科学研究科・講師
 研究者番号：00375495

研究成果の概要：

これまで肝虚血再灌流障害防止法として白血球・血管内皮の相互作用に着目して、超酸素分子分解酵素などを投与して防止効果を判定してきたが、これらは虚血後の肝微小循環動態を改善したものの、虚血後肝障害を十分に防ぐことはできなかった。そこで、本研究では白血球、類洞内皮以外の要因として血小板に着目して研究を行った。血小板を蛍光染色して肝虚血再灌流後の血小板動態を解析したところ、クッパー細胞の存在下で血小板は虚血再灌流後に類洞内皮と膠着し、微小循環障害へとつながることが明らかとなった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2008年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・消化器外科学

キーワード：肝臓外科学，血小板，肝臓，再灌流

1. 研究開始当初の背景

過去年度の科学研究補助金を得て、筑波大学内に生体蛍光顕微鏡観察システムを構築し虚血後の肝微小循環の観察を行ってきた。血流の再開した肝類洞のなかで、白血球と類洞内皮の膠着現象が発生し、類洞径が縮小することにより類洞血流が減少する

ことをリアルタイムに観察し、微小循環障害が引き起こされることを確認した。さらに微小循環の経時的、定量的評価方法を確立し報告してきた。また予防方法の開発としてSOD-DIVEMA(SOD+ポリマー重合体)やエンドセリン受容体拮抗剤などの投与により虚血後の微小循環障害が抑制されるこ

とを発表した。ところがこれまでの治療群では虚血後の肝微小動態を改善したものの、肝酵素上昇や肝細胞アポトーシスなどの虚血後肝障害を十分に防ぐことはできなかった。そこで、本研究では白血球、類洞内皮以外の要因として血小板に着目した。

血小板の放出するサイトカインは肝虚血再灌流障害の成因の一つとされているため、血小板も類洞内皮と膠着現象を起こし類洞血流の途絶の原因となることが予想された。ところがこれまでの国内外の研究では虚血後の血小板動態を *in vivo* で明らかとした研究はなかった。

2. 研究の目的

肝臓外科手術の安全性向上を目指してこれまでの研究を臨床応用へ発展させるためには白血球にのみ着目するのではなく、血小板・血管内皮膠着現象を防止することにより虚血後肝障害を効果的に抑制することが必要である。そこで以下の目的を挙げた：

(1) 虚血再灌流後に白血球は類洞内で **Rolling** (転がり現象) や **Sticking** (内皮との接着) を呈した後に類洞内皮細胞と膠着する。生体蛍光顕微鏡を用いて虚血後の類洞内血小板動態をリアルタイムで観察し、白血球と同様の血管内皮膠着現象がみられるかどうか確認する。

(2) 血小板と血管内皮細胞との相互作用を定量的に評価するため、録画画像をもとに類洞灌流率、膠着血小板数、微小血栓数ならびに微小血管径について解析を行う。そしてこれらのパラメーターが灌流時間の経過と共にどのように変化していくか経時的評価を行う。さらに摘出した肝臓より H-E 染色による組織形態学的検討を行うと共に、電子顕微鏡による血小板・血管内皮膠着の観察を行う。さらに免疫染色を行い血小板の活性化や貪食細胞機能の評価を行う。これらの評価により血小板・血管内皮相互作用が微小血栓や類洞血流障害をどのように関連するか、そして虚血後の肝細胞障害へ及ぼす影響を明らかとする。

3. 研究の方法

生体蛍光顕微鏡ビデオ観察システムを用いて、ラットに温肝虚血を施した後の類洞内における血球(白血球、血小板)動態、クーパー細胞の分布をリアルタイムで観察を行う。実験終了後に録画された画像をもとに血球と類洞内皮との膠着、類洞灌流率、微小血管径など微小循環動態の解析を行う。実験後に血液と肝組織を採取し血液生化学検査、組織形態学的検査ならびに分子生物学的検査を行う。さらに血小板活性化の抑制による肝虚血再灌流障害抑制効果について検討する。

【実験群・手術操作】

体重 250-300g の Sprague-Dawley 雄ラットを 1.非肝虚血群、2.肝虚血群の 2 群に分ける。エーテル吸入麻酔後、腹腔にペントバルビタール 50mg/kg を投与し麻酔を導入する。体温を維持する手術用プレートの上に固定したのち、気管切開を行い人工呼吸器に接続して調節呼吸を行う。直腸内に体温センサーを挿入して 37℃ に維持する。頸部皮膚を切開したのちカテーテル(PE50, 0.96mm, Portex)を左頸動脈と左頸静脈にそれぞれ挿入し、動脈圧モニター、血液サンプル採取、乳酸化リンゲル液の持続投与、蛍光物質の投与に用いる。横切開で開腹し肝周囲の靭帯を切離し、肝葉(left lateral lobe)を授動して観察ステージ上に載せる。

【蛍光標識】

血小板：血液提供用のラットより採血を行う(8-9ml)。全血 1mL に対して PBS 200 μ L、PGE1(0.02mg/mL)15 μ L をよく混和したのち、さらに PBS 500 μ L と Rhidamine-6G(0.05%)50 μ L を加え遠心分離する。上層ペレットを取り出して、PBS 1000 μ L、PGE1 30 μ L を加えた後遠心分離する。底にたまった血小板ペレットに PBS 400 μ L を加えて吸入排出を繰り返して血小板懸濁液とする。自動血球測定器で血小板数の計測を行い 10⁶ 個/mL に調整する。この *ex vivo* の蛍光標識法により血小板を活性化することなく分離した血小板の 90% 以上を標識することが可能である。

白血球、血漿： Rhodamine6G(0.1 μ mol/kg)を投与し白血球に取り込ませて蛍光標識を行う。またNa-Fluorescein(1 μ mol/kg)投与により血漿のコントラストを得て類洞血流を観察する。

[生体蛍光顕微鏡ビデオ観察システム]

落射型蛍光顕微鏡(オリンパスBX-30)の50cmx50cmの可動式特殊ステージの上に開腹したラットを手術プレートごと載せて観察する。IG、IBの2種類の蛍光フィルターブロックを切り替えることにより同一視野でそれぞれRhodamine 6GとNa-FluoresceinおよびNBD-C₁₂-HPCの蛍光観察を行うことができる。デジタルビデオカメラ(DVC-0, DVC, USA)で撮影しコンピューターに画像を取り込む(640x480 30frame/sec)。血圧および呼吸状態が安定したことを確認し、蛍光標識した血小板と、Na-Fluoresceinを頸静脈カテーテルより1分間かけて投与する。30分後に虚血前の観察を行う。ラット1個体あたり腺房10カ所を30秒ずつ録画する。虚血前の撮影が終了後、肝十二指腸間膜を血管クリップで20分間クランプし全肝温虚血を施す。クランプ解除から30分、60分および120分後に虚血前と同様に腺房10カ所を30秒ずつ録画する。非虚血群でもクランプ以外の開腹操作を行い、相応する時間間隔で観察を行う。

[肝微小循環動態の解析]

実験終了後、コンピューター(Macintosh, Apple inc. USA)に取り込んだ観察画像をもとにクッパー細胞と血小板膠着部位について詳細に検討する。さらに画像解析ソフト(IP Lab for Mac ver3.2)を用いて以下のパラメーターについて解析する。

- 1) 類洞膠着血小板数(/acinus)：腺房のなかで類洞内皮と付着し20秒以上動きのない血小板数
- 2) 類洞膠着白血球数(/acinus)：腺房のなかで類洞内皮と付着し20秒以上動きのない白血球数
- 3) 類洞灌流率(%)：腺房内で血流の保たれている類洞の割合
- 4) 類洞血管径(μ m)：一つの腺房内の類洞内径を測定した平均値

[生化学検査、分子生物学的検討]

観察終了後に腹部大動脈より動脈血を採取し、血清を分離したのちLDH, AST, ALTなどの肝酵素測定ならびにIL-1 β 、IL-6、TNF α などの血中サイトカイン、NF κ β 、Stat3をはじめとする転写因子について測定する。また実験中20分毎に採取した胆汁は、計量ののち20分毎の胆汁酸濃度を分析する。さらに摘出した肝組織より光顕、電顕を用いて組織形態学的検査ならびにP-selectin, ICAM1など接着分子の免疫組織学的を行う。

[組織形態学的検討]

また虚血再灌流120分後の観察の後、肝臓を摘出し生体顕微鏡観察に用いなかったright medial lobeを用いて組織形態学的検査(H-E染色、電子顕微鏡)ならびに免疫組織学的検査(p-selectin, NF- κ β)を行う。また電子顕微鏡観察では類洞内皮における血小板とクッパー細胞との接触について検討する。

4. 研究成果

結果として、血小板は血流再開直後より類洞内皮に膠着し始め、再灌流時間の経過とともに膠着数は増加することが判明した。白血球と比較すると血小板は血流再開の早い段階(30分以内)で膠着し始めるという特徴があり、さらにほとんどの血小板の膠着する部位が門脈近傍(Zone1)であることが判った。我々の実験結果をふりかえると、血小板は再灌流後早い段階で膠着しその部位もクッパー細胞が多く分布するZone1であった。そこで「再灌流直後のクッパー細胞と血小板の間の相互作用が、その後の白血球膠着を調節しているのではないか」という仮説を導き出した。そして、虚血後の血小板膠着にクッパー細胞がどのように関与するかを明らかにするため、クッパー細胞除去モデルを作製し虚血後血小板動態を観察した。クッパー細胞除去群では正常群と比較して血小板膠着は3分の1にとどまり、類洞血流は保たれて肝障害も抑制されることを明らかにした。同様に白血球膠着も抑制されることが判明した。クッパー細胞の

存在下で血小板は虚血再灌流後に類洞内皮と膠着し、微小循環障害へとつながることを明らかにした。

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 2 件)

- ① Y Nakano, T Kondo, R Matsuo, S Murata, K Fukunaga, N Ohkohchi. Prevention of leukocyte activation by the neutrophil elastase inhibitor, sivelestat, in the hepatic microcirculation after ischemia-reperfusion. Journal of Surgical Research, in press. 査読有
- ② Y Nakano, T Kondo, R Matsuo, I Hashimoto, T Kawasaki, K Kouno, A Myronovych, S Tadano, K Hisakura, O Ikeda, M Watanabe, S Murata, N Ohkohchi. Platelet dynamics in the early phase of post-ischemic liver in vivo. Journal of Surgical Research, 149(2); 192-198, 2008. 査読有

[学会発表] (計 1 件)

- ① Y Nakano, T Kondo, R Matsuo, S Murata, N Ohkohchi. The role of Kupffer cells and platelets after the ischemia-reperfusion of the liver-in vivo study- European Society for Surgical Research (ESSR), 2007 年 5 月 24 日, Rotterdam, The Netherlands

6. 研究組織

(1) 研究代表者

近藤 匡 (KONDO TADASHI)

筑波大学・大学院人間総合科学研究科・講師
研究者番号：00375495

(2) 研究分担者

大河内 信弘 (OHKOHCHI NOBUHIRO)

筑波大学・大学院人間総合科学研究科・教授
研究者番号：40213673

福永 潔 (FUKUNAGA KIYOSHI)

筑波大学・大学院人間総合科学研究科・講師
研究者番号：20361339