



Possible involvement of nitric oxide in the lipopoly saccharide-induced impairment of hepatic mitochondrial respiration in vivo

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2014-11-05 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 崔, 晃栄 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/1079

学位論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨

学位記番号	医博第 226号	学位授与年月日	平成 9年 3月26日
氏 名	崔 晃 栄		
論文題目	Possible involvement of nitric oxide in the lipopolysaccharide-induced impairment of hepatic mitochondrial respiration <i>in vivo</i> (<i>In vivo</i> でのリポポリサッカリド誘発肝ミトコンドリア呼吸障害への一酸化窒素の関与)		

博士(医学) 崔 晃 栄

論文題目

Possible involvement of nitric oxide in the lipopolysaccharide-induced impairment of hepatic mitochondrial respiration *in vivo*

(*In vivo* でのリポポリサッカライド誘発肝ミトコンドリア呼吸障害への一酸化窒素の関与)

論文の内容の要旨

[はじめに]

グラム陰性菌の内毒素 (lipopolysaccharide; LPS) による多臓器障害 (multiple organ failure; MOF) の重篤な代謝障害には肝ミトコンドリアの呼吸障害に由来するものが多いと考えられている。LPS 投与により一酸化窒素 (NO) 合成酵素 (NOS) がマクロファージや肝細胞において誘導されることや、NO は金属酵素、特に鉄酵素に高い親和性を持つことが知られている。最近、チトクローム酸化酵素が NO により可逆的に阻害されることが明らかにされた。脂質過酸化の呼吸障害への関与も示唆されている。LPS による肝ミトコンドリアの呼吸障害機構への NO および脂質過酸化の関与を *in vivo* のレベルで解析することを目的として本研究を行った。

[材料ならびに方法]

Wistar 系雄性ラット (150–200g) を用い、以下の実験を行った。(1) LPS による肝ミトコンドリア呼吸障害発生のタイムコースと用量依存性：種々の量の LPS (BE. coli055: B5; DIFCO) を尾静脈より注入した後、経時的に肝ミトコンドリアを単離しポーラログラフィーにて酸素消費を測定した。(2) 肝臓の NO に対する LPS の影響：ラットを a) 対照群 (生食 3 ml/kg を *i.v.* 投与)、b) LPS 群 (LPS15 mg/kg を *i.v.* 投与)、c) LPS/SKF 群 (LPS15mg/kg を *i.v.* 投与後直ちに SKF525A [ミクロソーム P-450 阻害剤] 25mg/kg を *i.p.* 投与)、d) LPS/NMMA 群 (LPS15mg/kg を *i.v.* 投与後直ちに N^G-monomethyl-L-arginine [NMMA, NOS 阻害剤] 50mg/kg を *i.p.* 投与)、e) LPS/SKF/NMMA 群 (LPS15mg/kg を *i.v.* 投与後直ちに SKF525A25mg/kg、NMMA50mg/kg を *i.p.* 投与) の 5 群とし、10時間後に各群の肝抽出液の NO を nitrite+nitrate として Griess 反応により測定した。(3) 肝ミトコンドリアの呼吸およびミトコンドリアとミクロソームの脂質過酸化に対する LPS の影響：上記 a) – d) 群の10時間後に単離した肝ミトコンドリアの呼吸速度をポーラログラフィーにより、さらにミトコンドリアとミクロソームの脂質過酸化を TBA (thiobarbituric acid) 反応物質として測定した。

[結 果]

(1) 電子伝達系にそれぞれ complex I、III、IVから電子を導入するため malate/glutamate、succinate、還元型 TMPD (N, N, N', N'-tetramethyl-*p*-phenylenediamine) を基質として呼吸を測定した。LPS15 mg/kg 静注後のミトコンドリア呼吸障害発生のタイムコースの検討では、malate/glutamate、succinate を基質とする呼吸速度は10時間後に0-time の67–69%に低下した ($p < 0.05$)。LPS 静注後10時間における用量依存性の検討では LPS10mg/kg、15mg/kg 投与により対照群に比し有意の呼吸低下を認めた (LPS15 mg/kg 投与による低下は malate/glutamate: 34%、 $p < 0.05$; TMPD: 28%、 $p < 0.05$; succinate: 37%、 $p < 0.01$)。呼吸とりん酸化の脱共役は認められなかった。(2) nitrite+nitrate として測定した肝 NO の産生は15mg/kg LPS 投与10時間後に約10倍に上昇していた。この上昇は SKF525A、NMMA のいずれに

よっても有意に抑制された（それぞれ57%、59%、69%低下、 $p < 0.01$ ）。(3) a) -d) 群の呼吸速度の検討では、LPS 群（15mg/kg 10h）は3種いずれの基質を用いた場合にも対照群に比し有意に呼吸速度の低下を示した（低下率は malate/glutamate: 32%、 $p < 0.01$; succinate: 37%、 $p < 0.01$; TMPD: 36%、 $p < 0.01$ ）。この呼吸速度の低下は、SKF525A あるいは NMMA の同時投与により保護された。LPS 群における脂質過酸化は、対照群に比しミクロソームでは有意の上昇（48%上昇、 $p < 0.01$ ）を示したが、ミトコンドリアでは逆に有意に低下した（51%低下、 $p < 0.01$ ）。この脂質過酸化の変動は NMMA、SKF525A のいずれによっても有意に保護された。

[考 察]

還元型 TMPD より電子を供給した際の酸素消費が低下することから、LPS 静注によるミトコンドリア呼吸機能障害には少なくとも complex IV の障害が関与しているものと考えられる。これに加えて malate-glutamate、succinate を基質とした際にも LPS 投与による呼吸障害が認められること、および呼吸鎖のそれぞれの構成要素を介する電子伝達速度を考慮すると、他の構成要素も障害を受けている可能性が高い。この障害は NOS 阻害剤である NMMA の投与により有意に抑制されること等から肝内 NO が関与する機構により生じると考えられるが、NO 産生と脂質過酸化が関連している可能性がある。長期にわたる LPS への暴露により、たとえば NO 関連ラジカルや活性酸素種による呼吸鎖構成要素の障害が起こると推定される。

[結 論]

LPS による肝ミトコンドリア呼吸障害は NO が関与する機構によるチトクローム酸化酵素等、呼吸鎖構成要素の機能低下により生じると推察される。

論文審査の結果の要旨

内毒素 (lipopolysaccharide、LPS) によるエンドトキシンショックは重篤な多臓器障害を引き起こすことが臨床的に知られているが、これには肝臓ミトコンドリアの呼吸障害によって引き起こされる肝臓の代謝障害が主要な役割をしていると考えられている。LPS により肝臓の細胞で一酸化窒素 (NO) 合成酵素が誘導されることや、NO は金属酵素に高い親和性を持ちチトクローム酸化酵素を可逆的に阻害すること、また NO と脂質過酸化とは密接な関係を持つことなどに申請者は注目して、LPS 注入によって生じた肝臓ミトコンドリアの呼吸障害における NO の関与および脂質過酸化の関与を明らかにしようとした。

エンドトキシンショックのモデルとしてラットに lipopolysaccharide (LPS) を注入し肝臓に障害を起こさせる *in vivo* 実験系を用いた。1) 肝臓ミトコンドリアの呼吸障害を経時的にポーラログラフィーを用いて評価して、呼吸障害に関与する電子伝達系の特異性を調べるために3種の異なる基質（リンゴ酸、コハク酸および還元型テトラメチル *p*-フェニレンジアミン）を用いた。2) NO の関与を調べるために LPS 投与群とミクロソーム P-450阻害剤 SKF525A 併用群、NO 合成酵素阻害剤 NMMA 併用群および両者併用投与群を設定して、肝臓のミトコンドリア呼吸および NO 産生を測定した。3) 肝臓ミトコンドリアの呼吸状態とミトコンドリアおよびミクロソームの脂質過酸化を調べた。このような種々の実験系を用いて詳細な分析を行った。

この実験によって明らかになったことは

1. エンドトキシンショックでは複数の呼吸鎖の構成要素の不可逆的障害が示唆された。ミトコンドリア内膜の障害およびATP産生との共役の障害の関与は少ない。
2. エンドトキシンショックにみられる肝臓ミトコンドリアの呼吸障害の主要なメディエーターはNOであるらしい。
3. エンドトキシンショックでの肝臓での脂質過酸化はミトコンドリアよりもミクロソームで起こっている。そしてミクロソームでの脂質過酸化にはNOの生成が関与している。

これまでのLPSの全身的投与による肝臓でのミトコンドリア呼吸障害の研究では障害の部位および呼吸調節能などを詳細に検討した報告は少なく、これとNOとの関連に言及した研究はない。本研究はエンドトキシンショックによる肝臓障害には肝細胞あるいはクッパー細胞等近隣の細胞に生じたNOが肝細胞ミトコンドリアの呼吸障害を引き起こすことが主要な病態であることを示唆したもので、この研究成果はこの分野での研究に寄与するものであることが論文審査会で高く評価された。

申請者発表に対して、これに関連した次のような質疑が行われた。

- 1) LPSと阻害剤の濃度はどのようにして決めたか
- 2) NO測定法で反応液にnitrate reductaseを加える方法は一般的に認められた方法か
- 3) LPS投与後の血清LPSの濃度の経時的变化は
- 4) LPS群でADP/O ratio減少がなく、不変であった理由は
- 5) LPS投与により肝臓に炎症像は見られたか、サイトカインの関与はこの実験系であるか
- 6) LPS投与により生体内でのグルコルチコイドの量は影響を受けるか
- 7) LPS投与により各種の臓器で血栓症が生じることはないか
- 8) 過酸化脂質量の経時的变化がミトコンドリアとミクロソームで異なるのは何故か

これらの質問に対して申請者の解答は適切であり、問題点も十分理解しており、博士（医学）の学位論文にふさわしいと審査員全員一致で評価した。

論文審査担当者 主査 教授 平 光 忠 久

副査 教授 中 島 光 好 副査 教授 藤 田 道 也