

原 著 初期肝障害期における血液流動性の変化

昭和大学医学部第一生理学教室

安 齋 勉 石川慎太郎 石川 貴子
池谷 洋一 酒 井 健 本 田 豊
村田健三郎 米山 早苗 砂川 正隆
佐藤 孝雄 久 光 正

要約：非アルコール依存性脂肪性肝炎（NASH）は、通常、無症候性の肝疾患である。NASHでは肝細胞の炎症と傷害が繰り返され、その結果肝細胞の脂肪変性、さらには線維化が進行、肝硬変へと進展する。一方、進行性の肝炎あるいは肝癌において血小板機能障害をきたすことが複数報告されているが、NASHのような初期の肝臓障害（Early-Hepatopathy: EH）における血小板機能と血液流動性に関してほとんど検討されていない。そこで、我々は3'-methyl-4-dimethylaminoazobenzene（DAB）を用いてラットに初期の肝障害を発症させ、血液細胞の動態と血小板機能を観察し、血液流動性との関連を検討した。本実験では8週齢、約120gの雄性F344ラットを使用した。被験ラットにはDABを0.06%の割合で混合した特殊餌を生後8週間目から16週間、自然給餌により摂取させた。対照群ラットには上記と同様に通常餌を摂取させた。実験開始後18週目にラットを解剖、肝臓の外観観察後、薄切切片を作製、HE染色し、組織学的検討を行うとともに、血中alkaline phosphatase（ALP）濃度を測定することによって肝障害の発生を確認した。また、ラットの剖検時に採取した血液を対象に血液細胞数、血小板凝集能ならびに血液流動性を測定した。DABを16週間摂取させたラット肝臓では組織学的に肝細胞や核の大小不同、細胞質の空洞化を認め、血中ALP濃度も上昇をしていた。さらに被験ラットからヘパリン採血した血液の流動性は対照ラットと比較し有意に低下するとともに、血小板凝集能も亢進していた。本実験の結果から、NASHのような初期肝障害の病態把握には血小板凝集能や血液流動性の測定が有用であることが示唆された。

キーワード：肝障害、血小板凝集能、血液流動性、非アルコール性脂肪性肝炎

肝臓は生体における物質代謝の中心となっている代償性の非常に強い臓器である。このような臓器であってアルコールの大量かつ長期間の摂取や毒物大量摂取等により、その機能に重大な障害が発生する。

非アルコール依存性脂肪性肝炎（NASH）は通常、無症候性の肝疾患である。NASHでは、肝臓組織に認められる炎症と傷害の繰り返しと肝細胞の脂肪変性が特徴とされるとともに肝臓の癒痕化と硬化が進み、線維形成が悪化するにつれて肝硬変にまで移行する^{1,2)}。

一方、ウイルス性肝炎あるいは進行性肝癌において血小板機能障害をきたすことが報告されているが^{3,4)}、NASHのような初期の肝臓障害（Early-Hepatopathy: EH）における、血小板機能と血液流動性に関してはほとんど検討されていない。

3'-methyl-4-dimethylaminoazobenzene（DAB）は、生体に取り込まれると肝ミクロソームの薬物代謝酵素であるチトクロームP450やスルホトランスフェラーゼなどを介して発癌性物質に代謝される物質である⁵⁾。本物質の長期間に渡る経口投与を受けたラットでは肝障害を経て高率に肝癌に移行することが報告されている⁶⁾ことから、DABを用いたラットの実験系は肝障害や肝癌の発症機序、さらには肝疾患の治療薬開発に多用されている。

我々はこれまでにストレス負荷や自律神経系に作用する薬剤投与により血液流動性が変動することを、Micro Channel array Flow Analyzer（MC-FAN）assayでヒトあるいはラットを用いて報告した^{7,8)}。MC-FANは血液100μLが毛細血管を模したマイクロアレイ上を流れる時間を測定し、その速さから血液流動性を測定するもので、血液通過時間

の延長が血液流動性の低下を示す^{7,8)}。MC-FANにおける血液流動性には、血液細胞数あるいは血小板凝集能も影響する^{7,8)}。

そこで今回、DABを用いてラットに初期の肝障害を発症させ、血液細胞の動態と血小板機能を観察するとともに、血液流動性と肝障害の関連を検討した。

研究方法

1. 薬剤とその投与

本実験で使用したDABはSIGMA社(St Louis, MO, USA)から購入したものである。Fig. 1に示したように、被験ラットにはDABを0.06%の割合で餌(CE-210, 日本クレア(株))に混合した特殊餌を生後8週間目から16週間(24週齢まで)、自然給餌により摂取させた⁶⁾。さらに血液流動性をはじめ、本実験に際して血球などへのDABの薬理的作用の影響を除く目的で、DABを摂取した最終日から2週間にわたって通常餌(CE-210)を給餌した。対照群ラットに対しては通常餌を摂取させた。すべての動物を実験開始後18週目(26週齢)で実験に使用した。

2. 実験動物

本実験では8週齢、約120gの雄性F344ラット(日本生物材料センター(株)東京)を使用した。実験期間中、上記ラットを底面に金網が張られているケージに収容し、室温 $25 \pm 2^\circ\text{C}$ 、湿度 $55 \pm 5\%$ 、12時間の明暗サイクルで飼育した。飼育中、ラットには飼料(CE-210)と水分を自由摂取させた。本実験で使用した動物の数は1群5匹であり、対照ラット(Control)、DAB摂取ラット(Early Hepatopathy: EH)の2群とした。尚、本実験は昭和大学実験動物倫理委員会承認(00071)を受けている。

3. 組織学的検討

ラットを解剖して肝臓を摘出し、肉眼的観察および写真撮影を行った。その後、臓器をりん酸緩衝生理食塩水(PBS)で4%に希釈したホルマリンにて浸漬固定し、パラフィン包埋後に $7 \mu\text{m}$ に薄切、ヘマトキシリン・エオジン染色(HE染色)を施した組織標本を作製、光学顕微鏡下で観察した。

4. 血液の採取と凝固阻止

実験開始から8週目にペントバルビタール(ソムノベンチル, 共立製薬(株)) 50 mg/kg の腹腔注

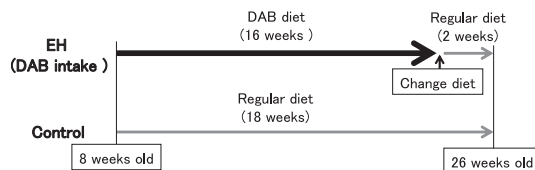


Fig. 1 Experimental procedure

The EH group was administered DAB mixing diet for 16 weeks and changed to regular diet for two weeks before dissection.

The all animals were anatomized in 26 weeks old. (each group: n=5)

射により麻酔した被験ラットの下大動脈から22Gの針を用いて血液を採取した。血液の凝固阻止にはヘパリンナトリウム、クエン酸ナトリウム、EDTA-2Kを用い、血液1mlへの添加濃度はそれぞれ45単位、1、6%、1.2mgであった⁹⁾。

5. 血漿の採取

クエン酸ナトリウムで凝固を阻止した血液2mlを $400 \times g$ で5分間の遠心後、得られた上清を多血小板血漿(platelet-rich plasma: PRP)とした。PRPを採取した残りの血液を再び $2,300 \times g$ で5分間遠心し、その上清を乏血小板血漿(platelet-poor plasma: PPP)とした¹⁰⁾。

6. 血液細胞成分の測定および血中ALPの測定

血液細胞成分(血算)の測定には動物用全自動血球計数装置PCE-210(エルマ販売(株))を用いた。EDTA-2Kで凝固阻止した血液を対象に赤血球・白血球・血小板の各血球数およびヘマトクリットを測定した。また、血小板凝集能の判定が血小板数によって左右されないようにするために、血小板凝集能の測定を行う直前に、PRPの血小板数が血漿 $1 \mu\text{l}$ あたり30万個となるようにPPPによって希釈・調整(調整PRP)して測定に用いた¹⁴⁾。

さらにヘパリン採血した血液から血漿を得て、Alkaline Phosphatase (APL)をLabAssayTM(和光純薬工業(株))を用いて測定した。本キットの測定限界は 4.0 IU/L であった。

7. 血小板凝集能の測定

血小板凝集能は血小板凝集能測定装置PA-20(興和(株))を用いて測定した。ガラス製キュベットに調整PRPを $270 \mu\text{l}$ 取り、 37°C で予備加熱後、アゴニストとしてアデノシン二リン酸(ADP; Oriental Yeast Co., Ltd.)を生理食塩水で $100 \mu\text{M}$

に調整した溶液 30 μ l を加えて凝集能を測定した¹⁴⁾。本装置では散乱光計測法により血小板の凝集塊を大きさによって3ランクに分類した。小凝集塊は直径9~25 μ m, 中凝集塊は直径25~50 μ m, 大凝集塊は直径50~70 μ m とする¹¹⁾。大凝集塊が多く形成され、長時間継続する状態が血小板凝集能の亢進状態を示す¹²⁾。

8. 血液流動性の測定

血液流動性は血液流動性測定装置 Micro Channel array Flow Analyzer KH-6 (MC-FAN; エムシー研究所 (株)) を用いて測定した。この際使用したマイクロチャンネルアレイは Bloody7-7 (幅(呼び径) 6.4 \pm 0.5 μ m, 流路数 7,854 本, 長さ 30 \pm 5 μ m, 深さ 4.5 \pm 0.5 μ m) であった。ヘパリンナトリウムおよび EDTA-2K で凝固を阻止した被験血液 100 μ l が毛細血管を模したシリコンチップ上の溝を流れる様子をモニターで確認しながら、その通過時間を流動性の指標とした。

9. 統計学的処理

図表及び本文中に示したすべての値は平均値 \pm 標準誤差で表示した。得られた値の有意差検定は一元配置の分散分析ならびに post-hoc test として Scheffe test を用い、危険率 5% 未満をもって有意と判定した。

結 果

1. 組織学的検討

肝臓を肉眼的に観察した結果、肝臓表面に異所性脂肪の沈着を思わせる薄黄色の斑点が分布していた (Fig. 2)。さらに組織学的に検討した結果、EH 群の肝臓組織の一部に、細胞および核の大小不同化、細胞質の空洞化を認めた (Fig. 3)。

2. 血算および ALP の測定

血算を行ったところ、赤血球、白血球およびヘマトクリット値には群間で有意な差は認めなかったが、EH 群の血小板は対照群に比べて有意に減少していることが判明した (Table 1)。さらに ALP 濃度を測定したところ、対照群に比べて EH 群で有意に上昇していた (Fig. 4)。

3. 血液流動性の観察

血液流動性への影響を MC-FAN を用いて検討した (Fig. 5)。ヘパリン採血した血液のマイクロアレイ通過時間は対照群で 61.4 \pm 2.0 秒であったのに対

し、EH 群では 70.0 \pm 2.6 秒となり、EH 群は対照群と比較して血液通過時間が有意に延長していた。また EDTA 採血した血液の通過時間は対照群と EH 群との間で有意な差は認めなかった。

4. 血小板凝集能の観察

各動物の血液から分離した血小板の凝集能への影響を検討した。EH 群の大凝集塊の生成割合は対照群に比べて有意に増加し、逆に中凝集塊および小凝集塊の生成割合は有意に減少した (Fig. 6)。

考 察

本研究の目的は肝障害にともなう血小板凝集能と血液流動性との関連性を明らかにすることであった。

ここでまず、DAB をラットに経口摂取させることにより⁶⁾、当該ラットに肝障害を誘導できるか否かを検討した。16 週間にわたる DAB 経口投与ラット肝臓の目視では異所性脂肪の存在を思わせる結節状の斑点を認めた。次に HE 染色にて組織学的に観察したところ、パラフィン包埋標本製作の過程での脂肪滴の溶出跡であると推定される¹³⁾ 細胞の空洞化、細胞及び核の大小不同化や細胞質の拡大を認め、DAB 投与ラット肝臓では細胞の破壊と再生が繰り返されていることが示唆された。また肝障害の指標である血中の ALP が EH 群で有意に上昇していた。肝臓における脂肪の蓄積は非アルコール性脂肪肝疾患 (NAFLD) と呼ばれ、その一部には NASH などの肝炎を経て、肝硬変や肝癌へと進展する予後不良の病態が含まれている^{14, 15)}。NAFLD は 1~4 型に区分され、それぞれを組織学的に観察すると 1 期では単純性脂肪肝、2 期では脂肪性肝炎、3 期では肝細胞壊死に先立つ風船様腫大などの細胞変性を伴う脂肪性肝炎、4 期ではマロリー体あるいは線維化を伴う脂肪性肝炎が認められることが知られ、そのうち 3~4 期を NASH と分類する^{16, 17)}。また障害の程度に関係なく ALP などの酵素活性の上昇も認められる。したがって、上記結果は DAB 摂取による EH 群で、初期の肝障害が発生していることを示唆している。肝臓への異所性脂肪の蓄積は食事由来の脂質類の過剰摂取あるいは薬剤摂取に伴うミトコンドリアやマイクロソームなどの細胞内脂質代謝能低下に起因すると考えられている¹⁸⁾。さらに酸化ストレスや炎症性サイトカインなどが脂肪組織

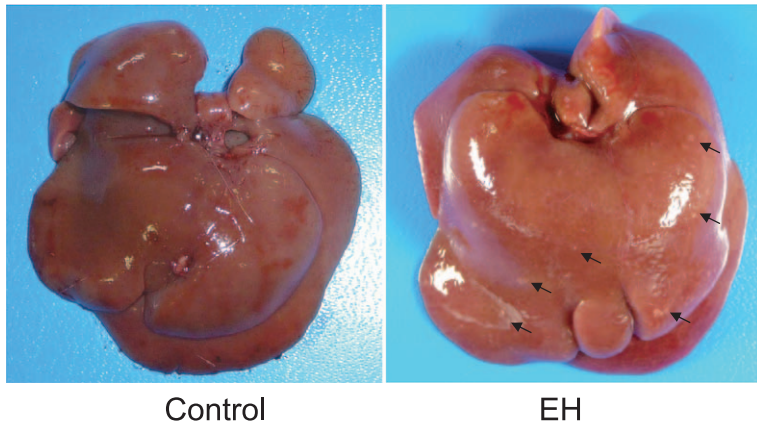


Fig. 2 Autopsy finding of the liver
These are hepatic appearance photographs of rats in 26 weeks old.
The arrows are degenerative parts.

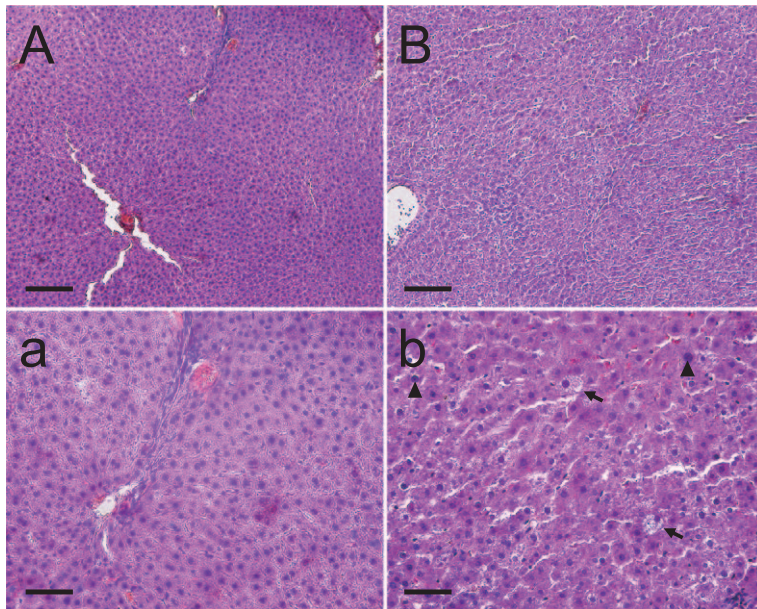


Fig. 3 Histological findings (Hematoxylin Eosin stain)
“A and a” are control group, “B and b” are EH group (DAB intake). “a and b” are high magnification of “A and B”. The liver of EH was the atypical cells.
(A and B: Scale bars, 100 μ m. a and b: Scale bars, 30 μ m.)

Table 1 Body weight and Blood properties of each group

	Platelet ($\times 10^4/\mu\text{L}$)	Leukocyte ($\times 10^2/\mu\text{L}$)	Erythrocyte ($\times 10^4/\mu\text{L}$)	Hematocrit (%)	Body weight (g)
Control group	55.84 \pm 1.35	40.00 \pm 1.48	829.2 \pm 5.01	42.42 \pm 0.69	314.00 \pm 11.11
EH group	50.54 \pm 2.25 *	40.00 \pm 1.79	831.0 \pm 8.98	42.72 \pm 1.13	284.00 \pm 6.96

Asterisk shows statistically significant difference as compared with the control ($P < 0.05$). (each group: n = 5, mean \pm SE)

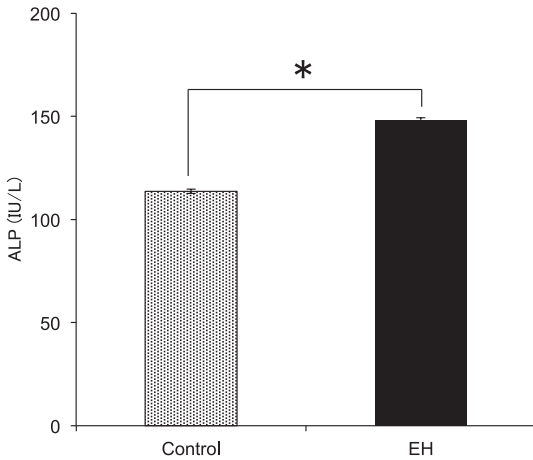


Fig. 4 Blood ALP level

Blood ALP increased in the EH group. Asterisk shows significant difference for control ($p < 0.05$). (each group: $n = 5$, mean \pm SE)

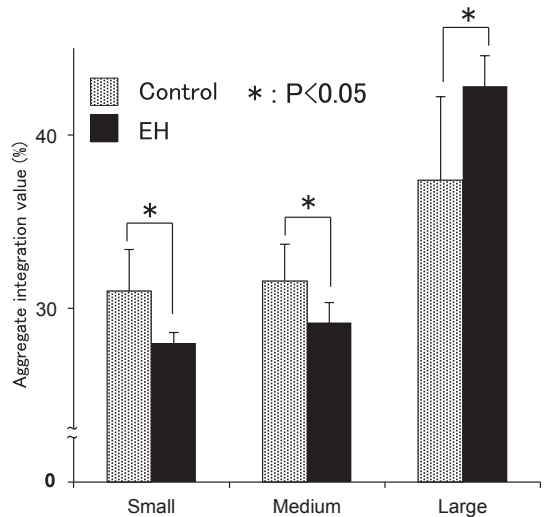


Fig. 6 Influence on platelet aggregation by the light scattering method

The light scattering method revealed that large-sized aggregates of EH group had increased as compared with the control ($P < 0.05$). (each group: $n = 5$, mean \pm SE)

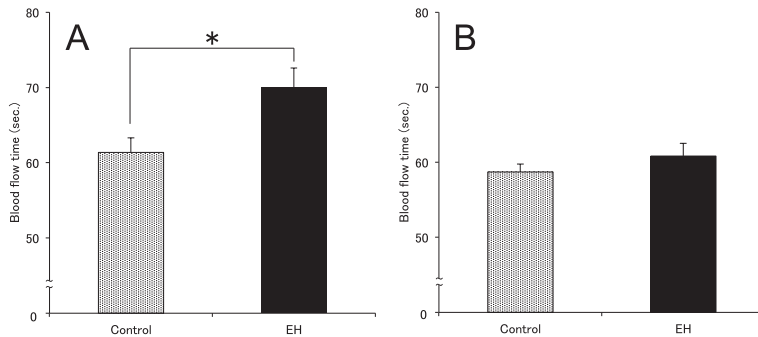


Fig. 5 Influence on blood fluidity

A: Heparin was used for anticoagulant.

B: EDTA was used for anticoagulant.

The blood fluidity of EH group had increased as compared with the control ($P < 0.05$). (each group: $n = 5$, mean \pm SE)

に働き、肝臓の炎症や線維化を誘導するとNASHに進展する^{1,2)}。本研究で用いたDABはミトコンドリアや小胞体に多く存在するシトクロムP450を阻害することが知られていることから⁵⁾、今回の肝障害はNASHの発症と類似している可能性が示唆された。

ヘパリンはアンチトロンビンIIIと複合体を作り、トロンビンや凝固因子Xa, XIIa等の活性を阻害することで血液凝固系を阻止するため、血小板凝集系

を抑制する作用は有さない。一方、EDTAは二価の金属イオンをキレートする作用により、血小板凝集および血液凝固に必要なカルシウムイオンが除去され、これらの反応に必要なタンパクと脂質の結合が阻害されるため、血小板凝集系ならびに血液凝固系が抑制される。これらを考慮するとMC-FANを用いての血液流動性の観察では抗凝固剤がヘパリンの場合、血小板の凝集能と赤血球の変形能及びその数の変化を、抗凝固剤がEDTAの場合は

赤血球の変形能とその数の変化が反映されることとなる。本研究では、ヘパリン採血された血液ではEH群の流動性が低下し、EDTA採血された血液では対照群とEH群で有意な差は認められなかったことから、EH群では血小板凝集能が亢進した可能性が推察された。そこで、当該血液中の血小板機能を測定したところ、EH群の血小板凝集能が有意に上昇していることが判明した。肝臓や肝機能障害に伴う血小板機能は変性肝細胞をとりまく白血球や正常組織から放出される炎症性サイトカインが血管内皮細胞等に働き、組織因子 (tissue factor: TF) を発現させ¹⁹⁾、トロンビン受容体であるプロテアーゼ受容体1 (PAR-1) を介して活性化することが知られている。またストローマ細胞から分泌されるマトリックスメタロプロテアーゼ (MMP) はPAR-1を直接活性化することが報告され、変性組織が直接血小板を活性化することが示唆されている²⁰⁾。本研究における血算の結果、血小板数がEH群で低下していた。また汎血球性に減少が生じていないこと、剖検および組織学的検査から肝門脈亢進をきたすほどの障害レベルでないことを考慮すると、血小板凝集の亢進により血小板減少が生じた可能性が推察される。本研究モデルではヒトで観察されるような急性のDICを起こすことは考えにくい、肝障害の初期であっても上記のような機序を介して血小板凝集能が亢進している可能性があり、血液凝固系を活性化して血栓が形成されやすい状態であることが示唆される。

種々の悪性腫瘍は血小板凝集系だけでなく血液凝固系にも影響が及ぶと考えられている^{19,21)}が、本研究では血液凝固を抗凝固剤で阻止していることから、血液流動性に影響する因子としては、血小板機能と血小板数が反映されると推察される。さらに血小板数の低下は血小板凝集能を低下させ、血液流動性を亢進させると考えられる。しかしながらEH群で流動性が低下した理由として、本研究におけるラット肝障害では血小板凝集能の強さが血小板数の減少による影響を凌駕したことを示していると推察される。

本実験の結果から、血液流動性の測定は血小板凝集能や肝臓疾患マーカーの測定と同様に、肝臓障害における病態を把握するうえで有用な指標となり得る可能性が示された。

文 献

- Harding HP, Calton M, Urano F, *et al*: Transcriptional and translational control in the mammalian unfolded protein response. *Annu Rev Cell Dev Biol* 18 : 575-599, 2002.
- Matsuzawa N, Takamura T, Kurita S, *et al*: Lipid-induced oxidative stress causes steatohepatitis in mice fed an atherogenic diet. *Hepatology* 46 : 1392-1403, 2007.
- Komatsu Y, Koizumi T, Yasuo M, *et al*: Malignant hepatic epithelioid hemangioendothelioma with rapid progression and fatal outcome. *Intern Med* 49 : 1149-1153, 2010.
- Kunihiro N, Kawai B, Sanjo A, *et al*: Platelet aggregation and coagulation and fibrinolysis parameters in both portal and systemic circulations in patients with cirrhosis and hepatocellular carcinoma. *Hepatol Res* 19 : 52-59, 2001.
- Yang M, Yamamura K, Yan Y, *et al*: Studies on the microsomal cytochrome P450s in the livers of carcinogen-resistant and sensitive rats during long-term administration of 3'-methyl-4-dimethylaminoazobenzene. *J UOEH* 19 : 277-286, 1997.
- Asano K, Satoh K, Hosaka M, *et al*: Production of hydrogen peroxide in cancerous tissue by intravenous administration of sodium 5,6-benzylidene-L-ascorbate. *Anticancer Res* 19 : 229-236, 1999.
- Ishikawa S, Sato T, Thein H, *et al*: The effects of stressors on blood fluidity in rats. *Eastwest Integr Med* 4(5) : 14-17, 2007.
- Ishikawa S, Sunagawa M, Tanigawa H, *et al*: The effects of adrenergic receptor agonists and antagonists on blood fluidity in rats. *Showa Univ J Med Sci* 22 : 117-125, 2010.
- 石川慎太郎, 砂川正隆, 藤原博士, ほか: コンドロイチン硫酸が血液流動性に及ぼす影響. *薬理と治療* 38 : 349-356, 2010.
- 石川慎太郎, 浅野和仁, 本田 豊, ほか: 抗血小板薬 (クロピドグレル) 投与における血小板機能検査 (散乱光法) および血液流動性検査の有用性. *薬理と治療* 39 : 481-489, 2011.
- Matsuno H, Tokuda H, Ishisaki A, *et al*: P2Y12 receptors play a significant role in the development of platelet microaggregation in patients with diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 90 : 920-927, 2005.
- Yamamoto T, Kamei M, Yokoi N, *et al*: Platelet aggregates in various stages of diabetic retinopathy: evaluation using the particle-counting light-scattering method. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 243 : 665-670, 2005.

- 13) 野本 実, 青柳 豊: 薬物性肝障害の診断基準をめぐって 病理組織学的検討からみた診断と予後推定. 医のあゆみ 214 : 785-790, 2005.
- 14) 大久保昭行: 生活習慣病の病期・病態別診療指針と薬の選択法 脂肪肝. Medical Practice 23 : 1521-1525, 2006.
- 15) 小嶋清一郎, 渡辺勲史: NAFLD の病態. 治療 89 : 1592-1596, 2007.
- 16) Matteoni CA, Younossi ZM, Gramlich T, *et al*: Nonalcoholic fatty liver disease: a spectrum of clinical and pathological severity. *Gastroenterology* 116 : 1413-1419, 1999.
- 17) 橋爪洋明, 佐藤 賢, 高木 均: HBV, HCV を除く各種慢性肝疾患における肝発癌の臨床的特徴 NAFLD/NASH. 肝・胆・膵 54 : 339-348, 2007.
- 18) 宮本英明, 佐々木裕: NASH/NAFLD の基礎知識 NASH/NAFLD の概念. 臨栄 116 : 588-593, 2010.
- 19) Wada H, Sase T and Yamaguchi M: Hypercoagulant states in malignant lymphoma. *Exp Oncol* 27 : 179-185, 2005.
- 20) Pei D: Matrix metalloproteinases target protease-activated receptors on the tumor cell surface. *Cancer Cell* 7 : 207-208, 2005.
- 21) 和田英夫, 野間 桂: 癌と血栓症 総論(基礎). 血栓と循環 18 : 240-244, 2010.

CHANGES IN BLOOD FLUIDITY IN THE EARLY STAGE OF HEPATOPATHY

Tsutomu ANZAI, Shintaro ISHIKAWA, Takako ISHIKAWA,
Yoichi IKENOYA, Takeshi SAKAI, Yutaka HONDA,
Kensaburo MURATA, Sanae YONEYAMA, Masataka SUNAGAWA,
Takao SATO and Tadashi HISAMITSU

Department Physiology, Showa University School of Medicine

Abstract — The present study was designed to examine the influence of the early stage of hepatopathy on blood fluidity. F344 male rats were fed chow containing 3'-methyl-4-dimethylaminoazobenzene at 0.06% (DAB) or regular diet (control). These rats were sacrificed 16 weeks after for the experiments. Histological observation of liver obtained from DAB intake rats showed fatty degeneration and atypical cells, indicating that oral administration of DAB for 16 weeks caused the early stages of hepatopathy in rats. We then examined blood fluidity and the levels of platelet aggregation by using a Micro Channel array Flow Analyzer and a PA-20, respectively. The fluidity of the blood obtained from DAB intake rats decreased and platelet aggregation increased as compared with those of control. In the DAB intake group, platelet aggregation might have been enhanced by inflammatory substances and cytokines in addition to changes of hepatic metabolic function resulting in a decrease of blood fluidity. Our results suggest that blood fluidity and platelet aggregation examination may be useful as an index of early stage in hepatopathy.

Key words: hepatopathy, platelet aggregation, blood fluidity, NASH

[受付：10月25日，受理：11月19日，2011]