## 慶應義塾大学学術情報リポジトリ

Keio Associated Repository of Academic resouces

Title	マクロファージ由来の nitric oxide による肝細胞酸化的DNA傷害の検討
Sub Title	
Author	渡部, 直行(Watanabe, Naoyuki)
	石井, 裕正(Ishii, Hiromasa)
Publisher	慶應医学会
Publication year	2003
Jtitle	慶應医学 (Journal of the Keio Medical Society). Vol.80, No.2 (2003. 6) ,p.T111- T122
JaLC DOI	
Abstract	
Notes	学位論文
Genre	Journal Article
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=AN00069296-20030601-0111

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって 保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the KeiO Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

# 学位論文

# マクロファージ由来の nitric oxide による肝細胞酸化的 DNA 傷害の検討

慶應義塾大学医学部内科学教室

(指導:石井裕正教授)

波 部 直 行

(平成14年12月13日受付)

**Key words**: splenic macrophage, nitric oxide, peroxynitrite, DNA damage, 8-hydroxy-deoxyguanosine (8-OH-dG)

ウイルス、細菌および寄生虫感染やアスベスト暴露などによる慢性的な炎症状態が、宿主の発癌リスクを高めることは多くの研究から明らかであり、肝臓病学の領域においても慢性肝疾患は肝細胞癌の発生母地であることが知られている.慢性肝疾患において肝細胞の壊死-再生のサイクルの病的な亢進と不規則再生が肝発癌の原因となると考えられている<sup>1.2)</sup>.

Nitric oxide (以下 NO) が血管内皮由来の平滑筋弛緩因子として発見され、その後極めて多くの研究がなされた結果、NO が消化器病の領域において平滑筋弛緩、粘膜血流調節、分泌調節機構に関与していること、肝疾患においても血行動態、肝障害、抗腫瘍活性などの様々な病態生理に関することが明らかになってきた³-6).

一般に constitutive type NO 合成酵素(以下 cNOS)を介して微量の NO が産生された場合と,inducible type NO 合成酵素(以下 iNOS)を介して多量の NO が産生された場合ではその代謝及び生物学的活性が異なるとされている.微量の NO は主に cGMP 濃度を上昇させることで細胞傷害を抑制し,さらに組織修復や再生に関係する可能性がある.反面,多量の NO の放出は種々な機序を介して細胞,組織傷害や炎症を助長するという,いわゆる NO の二面性が指摘されている.

肝臓に炎症が生じている状態,すなわち肝炎や肝硬変に罹患している場合にはヒトや動物の体内で,炎症細胞から放出される活性酸素の過剰産生が認められている $^{7}$ .特に,肝硬変症において,活性酸素の一つである NO の過剰産生が,血清中に認められており, Guarner ら<sup>8</sup> によると健常人の NO のレベルに比して, 肝硬変患者

で有意に高値であり、また腹水を伴う非代償性肝硬変患 者で特にその上昇が著しいと報告されている. また、肝 硬変患者の血清 NO 値は血清エンドトキシンと正の相 関を示し、抗生物質投与によるエンドトキシン血症改善 とともに NO 値は低下することから、NO 産生はエンド トキシン血症と密接に関与することも示されている8. この場合に肝臓内における NO 産生細胞として、内皮 細胞<sup>9,10)</sup>, Kupffer 細胞<sup>11)</sup>, 好中球<sup>12)</sup>, 肝細胞<sup>13)</sup>, マクロ ファージ<sup>14)</sup>, 伊東細胞<sup>16)</sup>が考えられ, cNOS を介した NO 産生は内皮細胞で、iNOS を介した NO 産生は主に Kupffer 細胞、肝細胞、好中球、マクロファージで行わ れると考えられる. これらの個々の NO 産生能は、病 態によって異なり、Rockey<sup>16,17)</sup>らによると、肝硬変に おいては内皮細胞由来の cNOS の低下が報告されてい る. Kupffer 細胞は、グラム陰性の細菌性エンドトキシ ン lipopolysaccharide (以下 LPS) 単独, さらには interleukin-1 (以下 IL-1), tumor necrosis factor-α 以下 TNF-α), Interferon-y 以下 IFN-y などの炎症性サ イトカインを加えることにより、よりいっそう活性化さ れ iNOS を発現し、多量の NO を産生する<sup>18,19)</sup>. 一方、 肝細胞は LPS 単独刺激では NO を産生しないが IL-1, TNF-α といったサイトカインの同時添加にて iNOS を 発現し、多量の NO を産生するとされ、事実、Kupffer 細胞との共培養にても肝細胞が NO を産生することが 報告されている<sup>20,21)</sup>. また, 伊東細胞に関しても LPS, IL-1, TNF-α, IFN-γ 刺激により iNOS を発現し NO を産生することが報告されている(5). 多量に放出された NO は、細胞傷害因子として働き、DNA 合成、蛋白合

本論文は、Watanabe N, Miura S, Zeki S, Ishii H: Hepatocellular oxidative DNA injury induced by macrophage-derived nitric oxide. Free Radical Biology Medicine. 30 (9): 1019-1028, 2001 の一部を含む.

成, ミトコンドリアエネルギー代謝を抑制することで, 腫瘍細胞や正常細胞に対して傷害作用を有することが知られている<sup>22~26)</sup>.

一方、肝臓へ遊走するマクロファージも有力な NO 産生源として注目される. エンドトキシンにより肝傷害 が生じる際には、脾臓に存在するマクロファージは肝臓 に遊走し、肝傷害に重要な役割を担っているということ が今までの研究より想定されており27, 実験的に摘脾し た際には、脾マクロファージの出現をおさえ、LPS に よって惹起された肝傷害が軽減されたという報告が見ら れる<sup>28)</sup>. 教室の Mizukami<sup>29)</sup>らにおいても脾臓を摘出し たラットにおいて、LPS によって生じた肝類洞内の活 性酸素をおさえて、肝類洞内皮細胞の傷害をおさえたと いう報告を行っている. さらにこのような活性化された マクロファージは,NO だけでなく O₂⁻も産生し,その 結果放出された O₂⁻は NO と反応し短時間で ONOO⁻と なりこれが強力な細胞毒性を持つことが報告されてい る<sup>30)</sup>. Wink<sup>31)</sup>らは NO 関連物質が核酸に傷害を与え, DNA に変異を起こす事を証明しており、また deRojas-Walker<sup>32)</sup>は、サイトカインで NOS を誘導したマクロファー ジの DNA 中において、脱アミノ化と酸化的傷害の両方 を認めている. これらの研究より, エンドトキシン血症 の時に脾マクロファージは肝に遊走し、肝細胞を死にい たらしめる傷害性因子の一つとなる可能性が考えられる. それゆえに、炎症が持続した状態下で肝臓においてマク ロファージ由来の NO 関連物質が肝細胞の DNA 変異に どのように関与しているかを明らかにすることは臨床的 にも重要と考えられる.

しかし、脾臓由来のマクロファージが刺激下で、どの程度 NO を産生し、その産生された NO が実際に肝細胞傷害を引き起こす重要な因子として働いているか否かの詳細については不明である。したがって本研究では、活性化された脾マクロファージを肝細胞と共培養することによって NO の産生、放出能にどのような変化が生じるか、さらに活性化された脾マクロファージより産生された NO が肝細胞に酸化的 DNA 傷害を生じさせるかどうかについて検討し、これらの研究を通じて脾マクロファージの肝細胞傷害における役割とそのメカニズムについて明らかにすることを目的とした。

### 材料および方法

## 1. 細胞の単離と培養法

すべての実験は、本医学部における動物実験ガイドラインにもとづいて行なわれた。200~250gのウイスター

系雄性ラットから肝細胞と脾マクロファージを分離した $^{33,34)}$ これらの細胞のうち、トリパンブルーテストで 95 %以上の viability のある細胞のみを実験に使用した.肝細胞は分離後コラーゲンコートのプレート上にまき,すべての細胞を  $37^{\circ}$ C、 $5\%{\rm CO}_{2}$ の湿条件下で培養を行った. 10% fetal calf serum (FCS, Gibco Laboratories, USA) と  $100~{\rm IU/m}l$  ペニシリンと  $100~{\rm \mu g/m}l$  ストレプトマイシンを添加した培養液 Dulbecco's modified Eagle medium (以下 DMEM, Gibco Laboratories)を使用した $^{35,36)}$ . また研究に使用された添加物,培養液,プラスチック製剤はエンドトキシン濃度が  $0.1~{\rm ng/m}l$  以下であることを Limulus Amebocyte Lysate Test Kit で測定し確認した.

まず単培養において、分離された脾マクロファージを LPS (Sigma Chemical Co, USA) 1 μg/ml および IFNγ (Serotic Oxford, UK) 1000 units/ml で刺激をした. 共培養の系においては、脾マクロファージを LPS か IFN-γのいずれかで 8 時間刺激をした. 培養液を洗浄後, 肝細胞を1対1の割合に加えて24時間共培養した。共 培養後に8時間,16時間,24時間と蛍光顕微鏡下の観 察と生化学的測定を経過を追って施行した.NO の関与 を検討するために、NO の合成阻害薬 N°-monomethyl-L-arginine (以下 L-NMMA, Sigma Chemical Co) を 100 μM の濃度で、また比較的 iNOS に選択的な阻害薬 である aminoguanidine (Sigma Chemical Co) を 10 μM の濃度で<sup>37,38)</sup>、脾マクロファージと共培養した肝細 胞に添加した. 活性酸素の役割を評価するために superoxide dismutase (以下 SOD, Sigma Chemical Co) 300 units/ml を脾マクロファージと共培養した肝 細胞に添加した. またもう一つの実験系では、NOと O<sub>2</sub> とを産生する SIN-1(100 μM-10 mM, Alexis Co, Läufelfingen, Switzerland) および peroxynitrite (10 μM-1 mM, Alexis Co) を単培養液に添加した.

## 2. iNOS および nitrotyrosine の二重免疫蛍光法

iNOS および nitrotyrosine の分布を特異的モノクローナル抗体を使用して二重免疫蛍光法で観察した。8 穴のチャンバー(Nunc Inc., Naperville, IL)に培養した脾マクロファージと共培養した肝細胞を phosphate-buffered saline(以下 PBS)で 3 回洗浄した後,30 分間 4%パラフォルムアルデヒドにて固定した。PBS で 3 回以上洗浄して 0.1% TritonX を含む PBS で 5 分間培養した。チャンバーは PBS で洗い,iNOS に対するマウスモノクローナル抗体(N32020, Transduction Laboratories, KY; final concentration 20 μg/ml)お

よび nitrotyrosine に対するウサギポリクローナル抗体 (Upstate Biotechnology Inc., NY; final concentration 20 μg/ml) を 1% BSA を含む PBS で細胞を 60 分間 4℃で培養した。 1% BSA を含む PBS で細胞を 3 回以上洗浄した後,FITC 標識ウサギ抗マウス IgG 抗体 (20 μg/ml, Southern Biotechnology Associates Inc., Birmingham, AL) とローダミン標識ヤギ抗ウサギ IgG 抗体 (20 μg/ml, Chemicon International Inc., Temecula, CA) を 1% BSA を含む PBS で室温で 30 分間反応させた. 細胞を再び洗浄し,チャンバーにカバーグラスをのせ,緑色(iNOS),赤色(nitrotyrosine)の蛍光を 63X のレンズ(Diaplot,TMD-25:Nikon, Tokyo, Japan)を装着した共焦点レーザー蛍光顕微鏡 (Bio Rad, Watford, UK) にて観察した.

#### 3. 培養液中の nitrite と nitrate の濃度

Granger³6)らの方法に従って、脾マクロファージと共培養した肝細胞の培養液中の nitrite と nitrate の濃度を測定した³9). Nitrate は大腸菌由来の nitrate 還元酵素によって nitrite に還元されたものを測定した.100μl の培養液を、0.1 M HEPES buffer (PH 7.4)、0.3 M ammonium formate、0.05units/ml の大腸菌由来の nitrate 還元酵素(Sigma Chemical Co)を含む反応液500μl で、60分間 37℃で培養した.培養後に反応液は遠心器で遠心し、そして上清に1 ml の Griess 反応液を添加した.543 nm で吸光度を測定し、nitrite と nitrate の培養液濃度は、sodium nitrite (Sigma Chemical Co)と sodium nitrate (Sigma Chemical Co)の種々の濃度により作成した標準曲線から決定した.

# 4. 8-hydroxy-deoxyguanosine (8-OH-dG)/deoxyguanosine (dG) の測定

DNA は DNA isolation kit(和光純薬)を用い,sodium iodide 法にて培養肝細胞から抽出した.肝細胞から抽出した DNA の 8-OH-dG/dG(dG に対する 8-OH-dGの比)を測定するために,培養肝細胞を一度スクレープして洗浄し,再び培養液に浮遊させたあと,1600 rpm で 5 分間勾配遠心器にかけた.この操作により肝細胞と脾マクロファージを効率良く分離することができた.肝細胞は  $5\,\mu$ M の propidium iodide(以下 PI)で培養し,PI 陽性細胞を除外して実験に用いた.すなわち PI 陰性細胞は,細胞膜の傷害のない細胞であり,これらを DNA の分離解析に使用した.この方法により,傷害のある肝細胞と傷害のない肝細胞と区別し,傷害のない肝細胞を脾マクロファージと共培養した.このよう

に抽出された DNA を用いて、Tris-HCl buffer に溶解した標準液を基準として、Kasai らの方法<sup>40</sup>に従い 8-OH-dG/dG を測定した。8-OH-dG の測定は、高速液体クロマトグラフィー電気化学測定器(HPLC)を用いて行ない、 dG の測定は UV 検出器(SHIMADZU JAPAN)で測定した。測定法は、電極 Modell 5011高感度セル(設定電位 0.15V [electrode 1] と 0.30 V [electrode 2])と電極 Model 2 5020 ガードセル(設定電位 0.35 V)を接続した電気化学測定器クーロケム II(ESA、USA)を用いて、ここに検体を 50 μl 注入し、8-OH-dG の測定を行った。感度は R=50 nA、OUT PUT=1 V で測定した。また dG の測定は、UV 検出器で吸光度 290 nm で測定を行った。

#### 5. 単鎖 DNA の検出

DNA の傷害(単鎖 DNA)を見るために、アクリジ ンオレンジ(以下 AO, Molecular Probes Inc)染色を 行った. AO は、塩酸加水分解によって、核 DNA 二重 鎖の解離によって生成した単鎖 DNA を、異染性に蛍光 染色することができる. AOは、単鎖(異染性赤色蛍光、 y 650 nm) および二重鎖 DNA (正染性緑色蛍光, y 525 nm)の同時蛍光が染色可能な点でメリットがある. つ まり、単鎖および二重鎖の肝細胞 DNA を視覚化するこ とができ, 二本鎖 DNA の時は, 測光 525 nm で緑色蛍 光となるのに対して単鎖 DNA と RNA は, 測光 650nm で赤色蛍光となる. これらの特性にて AO は種々 の細胞で単鎖、二本鎖 DNA と RNA を検出するのに用 いられている. 8穴のチャンバーに培養した肝細胞を 30 分間 4%パラフォルムアルデヒドで固定した. そし て PBS で洗浄した後, 0.1% TritonX, 0.08N HCl, 0.88% NaCl, 0.0039% EDTA 中で 5 分間 4℃で反応 させた. PBS で洗浄したあと, 細胞をさらに 5 Kunits/mlRNase (Type-1A, Sigma Chemical Co) で 37℃で 60 分間処理した. PBS で洗浄したあと, 細胞 をさらに 2 N HCl で 30℃で 8 分間処理し, それを 0.1 N HCl で数秒間冷却した. 再度 PBS で洗浄したあと, 細胞は室温で 15 分間, 30 μg/ml の AO にて染色した. 細胞を再び洗浄しチャンバーにカバーグラスを乗せ観察 した.緑色(二本鎖 DNA)および赤色(単鎖 DNA) の蛍光が各々共焦点レーザー蛍光顕微鏡にて観察された. 単鎖 DNA は 400 倍の倍率の 1 視野当たりで、赤色蛍 光を発する細胞として計測し、全部で10視野を選んで 各々の平均を算出した.

#### 6. 統計

数値は、異なるラットから各々取り出した細胞を用いて6回の平均を求め、satnadard error で表現した。有意差の検定は Scheffe's post hoc test にて解析し、p<0.05を有意差ありとした。

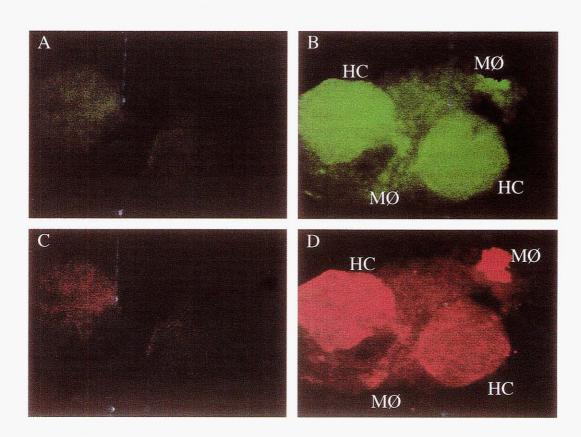
### 結 果

1. 肝細胞と脾マクロファージの共培養後の iNOS および nitrotyrosine の局在

第1図は、共培養した肝細胞と脾マクロファージにおける、iNOS および nitrotyrosine の局在を示したもので、二重免疫蛍光法で特異的モノクローナル抗体を使用して観察した。共培養せずに単離培養された肝細胞では抗 iNOS モノクローナル抗体(第1図A)および抗

nitrotyrosine モノクローナル抗体(第  $1 \, \boxtimes C$ )により 共にほとんど染色されなかった.一方,8 時間 LPS で 刺激した脾マクロファージと 8 時間共培養した肝細胞 は iNOS 抗体にて緑色に染色され,また脾マクロファージも緑色に iNOS 抗体で染色された(第  $1 \, \boxtimes B$ )。また 共培養した後の nitrotyrosine を示す赤色蛍光も,肝細胞と脾マクロファージの両方で増強しているのが観察された(第  $1 \, \boxtimes D$ ).

2. 培養液中の 8 時間後の nitrite と nitrate の濃度 第 1 表は、培養液中の 8 時間後の nitrite と nitrate の濃度を示した。これは脾マクロファージの単独培養、 肝細胞との共培養、あるいは種々の試薬を投与しての測 定結果を示す。脾マクロファージの単培養においては、 無刺激の脾マクロファージ培養液中の nitrite と nitrate



第1図 肝細胞 (HC) と脾マクロファージ (MØ) における iNOS および nitrotyrosine の二重免疫蛍光法. 脾マクロファージと共培養しない単離培養された肝細胞 (A&C) と, LPS で 8 時間刺激した脾マクロファージと共培養した肝細胞 (B&D) 際の iNOS (緑色) および nitrotyrosine (赤色) の二重免疫蛍光法.

Panel A: iNOS で染色された肝細胞.

Panel B: iNOS で染色された肝細胞と LPS で刺激した脾マクロファージ.

Panel C: nitrotyrosine で染色された肝細胞.

Panel D: nitrotyrosine で染色された肝細胞と LPS で刺激した脾マクロファージ.

(×400). (Watanabe N et al: Free Radical Biology Medicine. 30 (9): 1019-1028, 2001 ∅

Fig. 1より許可を得て転機)

第1表 脾マクロファージの培養液中の nitrite と nitrate 濃度. 肝細胞と共培養した場合,及び,種々の試薬を添加した際の影響.

Nitrite and nitrate level (μmole/l)		
	Hepatocyte (-)	Hepatocyte (+)
None	12.3±1.3	15.6±1.5
MØ	$16.1 \pm 2.0$	$19.2 \pm 1.8$
LPS-MØ	$56.5 \pm 2.3*$	$187.0 \pm 10.6*^{\$}$
+L-NMMA	$19.0 \pm 2.0^{*}$	$136.7 \pm 6.8^{*\dagger}$ *
+AG	$18.0 \pm 1.8^{*}$	$118.0 \pm 10.8^{*  ^{\dagger}  ^{8}}$
+SOD	44.3±2.2*	$164.9 \pm 12.3^{*8}$
IFN-γ-MØ	56.0±2.0*	$153.3 \pm 12.0^{*\$}$
+L-NMMA	18.3±5.0**	$105.4 \pm 11.4^{*#8}$
+AG	17.5±0.5*#	$102.9 \pm 13.3^{*#\$}$
+SOD	53.0±1.9*	$145.9 \pm 13.9^{*\$}$

数値は、異なるラットから各々取り出した細胞を用いて6回の平均を求め、satnadard error で表現した。Hepatocyte (一):肝細胞と共培養しない場合。Hepatocyte (十):肝細胞と共培養した場合。None:何も添加しない場合。MØ:脾マクロファージ。LPS-MØ:LPS(1  $\mu$ g/ml)で 8 時間刺激した脾マクロファージ。IFN- $\gamma$ -MØ:IFN- $\gamma$ (1000 units/ml)で 8 時間刺激した脾マクロファージ。L-NMMA:N°-monomethyl-L-arginine(100  $\mu$ M)。AG:aminoguanidine(10  $\mu$ M)。SOD:superoxide dismutase(300 units/ml)。\*p<0.05 vs None, \*p<0.05 vs LPS-MØ,\*p<0.05 vs IFN- $\gamma$ -MØ,\$p<0.05 vs Hepatocyte(一)。脾マクロファージの培養液中の nitrite と nitrate 濃度は,種々の試薬を添加した後,8 時間後に測定した。(Watanabe N et al:Free Radical Biology Medicine。30(9):1019-1028,2001 の table 1 より許可を得て転機)

濃度は、観察中大きな変化は認められなかった。しかし LPS で刺激した脾マクロファージでは約4倍、IFNγで刺激した脾マクロファージでも約4倍の上昇が認められた。肝細胞と共培養して8時間後、LPSで刺激した脾マクロファージで、無刺激脾マクロファージの単培養に比べて約10倍、IFNγで刺激した脾マクロファージでも約8倍の上昇が認められた。これらのnitriteとnitrate 濃度の上昇は単培養あるいは共培養のいずれにおいても L-NMMA や aminoguanidine の処置によって抑制された。しかし、SODの投与によっては、単培養または共培養のいずれにおいても抑制されなかった。一方、LPSで刺激した単培養の肝細胞のnitriteとnitrate 濃度は、コントロールに対して上昇せず23.3±1.3 (μmole/l) にとどまった(この値は図に示していない)。

#### 3. 肝細胞 DNA の 8-OH-dG/dG 測定法

肝細胞の DNA を用いて、8-OH-dG/dG につき HPLC で測定した代表的な結果を第2図に示す。我々の予備実験の結果では、肝細胞の DNA 障害は脾マクロファージとの共培養16時間後に発現し、24時間後に有意となる成績が得られた。それゆえに、本実験においては DNA 抽出前に24時間 LPS で刺激した脾マクロファージと肝細胞を共培養した。この第2図において、8-OH-

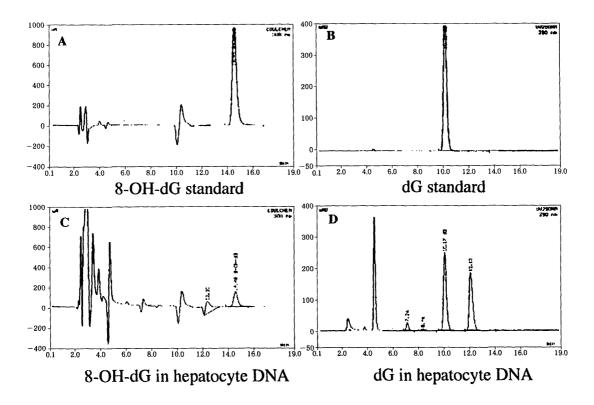
dG は  $14\sim15$  分に,dG は約 10 分のところに標準物質が出現しており,その部位に当たる範囲を検体において測定し計算した.この実験において,LPS で刺激した脾マクロファージと肝細胞を共培養した後,肝細胞DNA 0 8-OH-dG/dG 値は  $4.81\pm0.67$  であった.

#### 4. 肝細胞 DNA の 8-OH-dG/dG 測定値

第 2 表は、肝細胞 DNA の 8-OH-dG/dG と PI 陽性 細胞を、24 時間脾マクロファージと共培養した場合、さらに種々の試薬を投与した場合に分けて表示をした。細胞膜の破壊を示す PI 陽性細胞数の%は、LPS で刺激した脾マクロファージと共培養した後に上昇を認めた。それゆえ生き残った細胞のみを 8-OH-dG/dG を測定するために使用した。活性化されていない無刺激の脾マクロファージとの共培養では、肝細胞での 8-OH-dG/dG は上昇を認めなかった。一方、LPS や IFN $\gamma$ で刺激した脾マクロファージと 24 時間共培養した肝細胞は、著明な上昇を認めた。L-NMMA、aminoguanidine、SOD はともに、LPS や IFN $\gamma$ で刺激した脾マクロファージで培養した肝細胞の 8-OH-dG/dG の上昇を有意に抑制した。

#### 5. 肝細胞の単鎖 DNA(AO 染色)

第3図に、LPSで刺激した脾マクロファージと、24

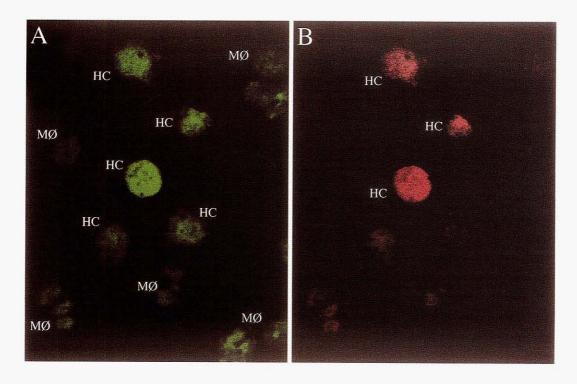


第2図 肝細胞の DNA を用いて、8-OH-dG/dG につき HPLC で測定した代表的な結果、この図において、8-OH-dG は 14-15 分に、dG は約10 分のところに標準物質が出現しており、その部位に当たる範囲を検体において測定し計算した。(Watanabe N et al: Free Radical Biology Medicine. 30 (9): 1019-1028, 2001 の Fig. 2 より許可を得て転機)

第2表 肝細胞 DNA の8-OH-dG/dG と PI 陽性細胞の比率. 単独で培養した場合と 24 時間脾マクロファージと共培養した場合, さらに種々の試薬を投与した場合の影響.

	8-OH-dG/dG ratio in hepatocytes ( $\times 10^{-5}$ )	PI-positive hepatocytes (%)
None	1.05±0.20	$2.90 \pm 0.50$
MØ	$1.30 \pm 0.17$	$3.10 \pm 0.60$
LPS-MØ	4.81±0.67 *	$22.50 \pm 2.60 *$
+ L-NMMA	$2.27\!\pm\!0.20$ * $^{\dagger}$	$8.20 \pm 1.30^{*}$
+ AG	$2.19\!\pm\!0.22$ *†	$9.30\pm1.70^{*\dagger}$
+ SOD	$2.82\!\pm\!0.25$ * $^{\dagger}$	$11.10 \pm 1.50^{*}$
IFN-γ-MØ	6.65±0.55 *	24.30±2.10 *
+ L-NMMA	$2.55 \!\pm\! 0.33$ **	$12.50 \pm 2.00*$ *
+ AG	3.09±0.35 **	$10.80 \pm 1.20**$
+SOD	$3.90 \pm 0.45^{*\#}$	$14.30 \pm 1.40**$

数値は、異なるラットから各々取り出した細胞を用いて 6 回の平均を求め、satnadard error で表現した。8-OH-dG:8-hydroxy-deoxyguanosine、dG:deoxyguanosine。8-OH-dG と dG は高速液体クロマトグラフィー電気化学測定器と UV 検出器で測定した. \*p<0.05 vs None、 \*p<0.05 vs LPS-MØ、\*p<0.05 vs IFN $\gamma$ -MØ、8-OH-dG/dG の比は、共培養した後 24 時間後に測定した.(Watanabe N et al:Free Radical Biology Medicine。30(9):1019-1028、2001 の table 2 より許可を得て転機)



第3図 LPSで刺激した脾マクロファージ(MØ)と、24 時間共培養した肝細胞(HC)の AO 染色写真. 緑色蛍光(A) は、二本鎖 DNA と結びついた AO を示し、赤色蛍光(B) は、単鎖 DNA と結びついた AO を示す。(×1260)(Watanabe N et al: Free Radical Biology Medicine. 30(9):1019-1028, 2001の Fig. 3より許可を得て転機)

第3表 活性化された脾マクロファージと共培養した後 24時間の肝細胞の単鎖 DNA

	Rate of hepatocytes with single stranded DNA (%)
None	4.8±0.6
MØ	$5.4 \pm 1.0$
LPS-MØ	43.2±4.8*
+L-NMMA	19.2±2.5*†
+AG	21.0±2.6* <sup>†</sup>
+SOD	19.8±2.1* <sup>†</sup>
IFN-γ-MØ	45.1 ± 3.3*
+L-NMMA	18.9±2.1**
+ AG	16.5±1.7**
+SOD	14.2±1.3**

数値は、異なるラットから各々取り出した細胞を用いて 6回の平均を求め、satnadard error で表現した。肝細胞の単鎖 DNA の比率は、AO 染色で施行した。\*p<0.05 vs None, \*p<0.05 vs LPS-MØ, \*p<0.05 vs IFN-γ-MØ. 肝細胞の単鎖 DNA の比率は、添加後 24 時間で測定した。 (Watanabe N et al: Free Radical Biology Medicine. 30(9): 1019-1028, 2001 の table 3 より許可を得て転機)

時間共培養した肝細胞の AO 染色写真を示した。 蛍光 (A)は、脾マクロファージと肝細胞の核内中の AO で染 まった二本鎖 DNA を示し、蛍光(B)は、そのうち特 に核内中の AO で染まった単鎖 DNA を示した。これよ り蛍光(A)で染色されていた脾マクロファージは, 蛍 光(B)では傷害を受けなかったために染色されておら ず, また傷害を受けなかった肝細胞も蛍光(B)では染 色されなかった. これらの写真から, 蛍光(A)を発す る全肝細胞中のうち傷害を受けたであろう蛍光(B)を 発する肝細胞の比率を計算して、単鎖 DNA の割合とし て第3表に示した。 肝細胞のみ24時間培養した時は単 鎖 DNA 比率は、上昇を認めなかった。また無刺激の脾 マクロファージは、単鎖 DNA の肝細胞の割合を上昇さ せなかった. しかし、LPS や IFN-γ で刺激した脾マク ロファージと 24 時間共培養した肝細胞では、単鎖 DNA の比は著明に上昇を認めた. また第3表には、活性化 された脾マクロファージと共培養した後24時間の肝細 胞の単鎖 DNA 比率に対する種々の薬物の効果をあらわ した. L-NMMA, aminoguanidine, SOD は、LPSや IFN-yで刺激した脾マクロファージで培養した肝細胞の 単鎖 DNA 比率の上昇を抑制した。 さらに活性化された 脾マクロファージと共培養した後の肝細胞 DNA 変化に

おける活性酸素の役割を見るために、NO と  $O_2$  両者を産生する SIN-1 の効果や、ONOO の効果、および SIN-1 や ONOO 投与下での SOD の効果につき検討した。

# 6. SIN-1 や ONOO<sup>-</sup>投与の肝細胞 DNA の 8-OH-dG/dG に対する影響

第 4 表は SIN-1 や ONOO<sup>-</sup>投与の肝細胞 DNA の 8-OH-dG/dG に対する影響を示した。SIN-1 (>1 mM) や ONOO<sup>-</sup> (>100  $\mu$ M) と 24 時間培養後,肝細胞の 8-OH-dG/dG は 用量依存的に上昇を認めた。SOD を加えることにより 10 mM の SIN-1 で培養した肝細胞における 8-OH-dG/dG の上昇効果を著明に抑制したが,1 mM で培養した ONOO<sup>-</sup>ではその抑制効果は認められなかった。

# 7. SIN-1 や ONOO<sup>-</sup>投与の肝細胞の単鎖 DNA 出現比率に与える影響

第 5 表は SIN-1 や,ONOO<sup>-</sup>投与が,AO 染色にて評価した肝細胞の単鎖 DNA 出現比率に与える影響を示した。SIN-1(>1 mM)や ONOO<sup>-</sup>(>100  $\mu$ M)を投与し 24 時間培養後,肝細胞の単鎖 DNA 比率は著明に上昇を認めた。SOD を加えることにより 10 mM の SIN-1 で培養した肝細胞の単鎖 DNA 比率を著明に抑制したが,1 mM で培養した ONOO<sup>-</sup>による単鎖 DNA 比率に

第4表 SIN-1 や ONOO- 投与の肝細胞 DNA の 8-OH-dG/dG に対する影響.

	8-OH-dG/dG ratio in hepatocytes ( $\times 10^{-5}$ )
None	$1.21 \pm 0.14$
SIN-1	
100 μΜ	$1.30 \pm 0.12$
1 mM	$5.71 \pm 0.99*$
10 mM	$10.71 \pm 1.42*$
SIN-1(10  mM) + SOD	$4.36 \pm 1.24^{*\dagger}$
peroxynitrite	
10 μΜ	$1.61\!\pm\!0.12$
100 μΜ	$11.71 \pm 0.99*$
1 mM	$24.65 \pm 2.30*$
Peroxynitrite (1 mM) + SOD	20.33±1.87*

数値は、異なるラットから各々取り出した細胞を用いて 6 回の平均を求め、satnadard error で表現した。SIN-1、peroxynitrite、SOD を肝細胞培養液に添加し、24 時間後の 8-OH-dG/dG を測定した。 $^*p$ <0.05 vs None,  $^†p$ <0.05 vs SIN-1. (Watanabe N et al: Free Radical Biology Medicine. 30 (9): 1019-1028, 2001 の table 4 より許可を得て転機)

第 5 表 SIN-1 や ONOO 投与が, 肝細胞の単鎖 DNA 出現比率に与える影響.

	Rate of hepatocytes with single stranded DNA (%)
None	4.5±0.5
SIN-1	
100 μΜ	$4.6 \pm 0.4$
1 mM	38.6±4.4 *
10 mM	60.3±7.8 *
SIN-1(10  mM) + SOD	$22.1\!\pm\!2.2$ *†
peroxynitrite	
10 μΜ	$4.8 \pm 0.4$
100 μΜ	60.5±4.4 *
1 mM	$82.6 \pm 6.5$
Peroxynitrite (1 mM)+SOI	O 78.5±9.3*

数値は、異なるラットから各々取り出した細胞を用いて 6回の平均を求め、satnadard error で表現した。SIN-1、peroxynitrite、SOD を肝細胞培養液に添加し、24時間後の肝細胞の単鎖 DNA 出現比率を測定した。\*p<0.05 vs None、†p<0.05 vs SIN-1、(Watanabe N et al: Free Radical Biology Medicine. 30 (9): 1019-1028, 2001 のtable 5より許可を得て転機)

対しては抑制効果を示さなかった.

### 考 案

本研究の結果より、活性化された脾マクロファージが、 肝細胞の DNA に傷害を与えることが明らかになった. 教室の Kurose らは、 NO の選択的合成阻害薬 L-NMMA を加えることによって、肝細胞33)と肝癌細 胞<sup>35,41)</sup>の両者で Kupffer 細胞によって生じたミトコンド リアの障害を減少したことを報告した. 今回の研究にて, 活性化されたマクロファージの培養液中に過剰な NO 産生を認め,脾マクロファージや肝細胞内での iNOS 発 現を認めた. さらに NO 合成阻害薬が、マクロファー ジにより惹起された肝細胞変化、すなわち nitrotyrosine の形成と DNA 傷害を抑制したことを示した. これらの結果を考え合わせると、LPSや IFN-yで刺激 された脾マクロファージによって iNOS の発現が亢進し、 多量の NO を生じた結果、肝細胞傷害を引き起こした と想定される. サイトカインや脂質メデイエーターや活 性酸素などの種々のメデイエーターは炎症が生じた肝臓 において多量に放出されることが知られており7,42, と くに IFN-y や TNF-αは、マクロファージによる NO 産 生を刺激する物質として知られている. これらはさらに, 炎症を起こした肝臓や他の臓器において細胞傷害を引き 起こす物質を誘導すると考えられている43,44).

NO 依存性の TNF-αの役割は知られているが、NO 依

存性および NO 非依存性の IFN-γ による肝細胞傷害に ついては未だ詳細が明らかでない. そこで本研究では, IFN-γの NO 産物に対する影響とそれに引き続く肝細胞 傷害について LPS と比較して検討を加えた. IFN-γで 刺激した脾マクロファージと肝細胞の共培養液中では、 LPSで刺激した脾マクロファージと同様に8時間でnitrite と nitrate 濃度の上昇を認めた. さらに、肝細胞 DNA 傷害は NO 合成阻害薬で効果的に抑制を認めた. これらの結果は、肝細胞に対する IFN-y で刺激をした 脾マクロファージの傷害性がやはり過剰に産生された NOに依存していることを示している。これまでの研究 結果と考え合わせ、これらの成績からエンドトキシン血 症の際に、脾臓や肝類洞の炎症細胞が LPS で直接刺激 されるという以外に、活性化されて遊走してきた脾マク ロファージが、炎症により増加した IFN-γ により、間 接的に NO 依存性に肝細胞傷害を起こすという傷害経 路が考えられた. NO とその酸化的代謝物の一つである ONOO<sup>-</sup>は種々のステップにて肝細胞のミトコンドリア のエネルギー代謝を抑制する. 一般的に、細胞の ATP 減少は虚血再潅流によってもたらされる細胞傷害の特徴 であるが、ミトコンドリアの ATP 合成の崩壊は、種々 の活性酸素によって引き起こされる傷害により肝細胞死 を導く<sup>45)</sup>. したがってミトコンドリア障害は, NO や ONOO-によって肝細胞傷害が惹起される際の大きな要 因となると考えられる、とくに ONOO-は NO と O₂-か ら産成され、非常に毒性の強い活性酸素となる46). 本研 究で最も重要な所見の一つは、SODや NO 合成阻害剤 が、活性化された脾マクロファージと共培養した後に見 られた肝細胞 DNA 傷害を抑制したことであるが、この ことは NO と O₂⁻の両者の代謝経路がこのモデルでの肝 細胞傷害に役割を果たすことを示している. またこの結 果は、ONOO-が、活性化されたマクロファージによる 肝細胞傷害の発生に一役買っている可能性を示唆してお り、この仮説は、活性化脾マクロファージと共培養した 肝細胞において nitrotyrosine の存在が免疫蛍光染色か ら明らかにされた事実によっても支持される. しかし nitrotyrosine は ONOO<sup>-</sup>に特異的なものでないので<sup>47)</sup>, 我々は、このモデルにおいて、ONOO-が直接肝細胞傷 害に関与していると断定することはできない. しかし, やはり本実験でNOと O₂-を放出し結果的にONOO-を 産生する SIN-1 を加えることにより、効率的に肝細胞 DNA 傷害を生じたという結果から、ONOO⁻は NO 依 存性の肝傷害の主要な成因の一つであると考えられる。

LPS で刺激されたマクロファージに由来した大量の NO が肝細胞ミトコンドリア障害を引き起こす可能性が,

これまでの成績33)および本研究の結果から考えられる一 方, 共培養中の肝細胞自体が NO を放出する可能性は 残されている。 さらに、活性化された脾マクロファージ のみならず肝細胞自体が iNOS を産生していることも免 疫蛍光染色によって示されている. しかし肝細胞単独で の nitrite と nitrate の培養液濃度は、 たとえ LPS や IFN-γで刺激後であっても変化は認められなかったので、 肝細胞のみでは多量の NO を産生する可能性は少ない と考えられる. ところが一方, 本研究では, 活性化され た脾マクロファージ単独より肝細胞と共培養した場合の 方が nitrite と nitrate の培養液濃度は高く, この共培 養中の NO は、NO 阻害薬や SOD により効果的に阻害 された. これらの結果は、LPS や IFN-y によって活性 化された脾マクロファージによって放出されるメデイエー ターが肝細胞に iNOS の産生を刺激した可能性があり, これは以前の報告に一致している21,48)。マクロファージ は、LPS や IFN-y の刺激に反応して、IL-1 や TNF-a などを含む種々の炎症性メデイエーターを産生し放出す ることが知られている.一方,LPS とこれらのメデイ エーターが混在した場合には肝細胞に iNOS を生じるこ とが示されている<sup>21,48)</sup>. 教室の Kurose<sup>33)</sup>らサイトカイ ン刺激により産生された肝細胞由来の NO の一部が肝 臓のミトコンドリアの機能を抑制する可能性を報告した. したがって, 活性化された脾マクロファージによって誘 導された肝細胞 iNOS が、この共培養の系において肝細 胞傷害を惹起させる要因の一つとなっている可能性も否 定できない.

本研究の目的の一つは、活性化された脾マクロファー ジによって肝細胞に重篤な傷害を引き起こした後に、残 存する細胞に酸化的 DNA 傷害を生じるかどうかを明ら かにすることであった.多くの臨床的知見から49~52),肝 臓の持続性の炎症に伴い傷害された多くの肝細胞は除去 されるが、細胞のあるものは酸化的 DNA 傷害を受けた まま生き残るとことが想定される。DNAにあるC-8基 が,種々の酸化的活性物質,例えば還元剤<sup>53)</sup>, X線<sup>54)</sup>,  $H_2O_2 + アスベスト<sup>55)</sup>$ , $H_2O_2 + 鉄イオンを伴うポリフェ$ ノール<sup>56)</sup> などにより、生体内で水酸化され 8-OHdG に なる. 最近, Tannenbaum<sup>57,58)</sup>らは ONOO<sup>-</sup>を介する反 応において8-OHdGが形成されることを報告している。 本研究では、LPSとIFN-yで刺激した脾マクロファー ジによって肝細胞を共培養した際に、コントロールと比 較して 3~5 倍に 8-OHdG/dG 比は上昇していたが, この時点で活性化脾マクロファージと共培養後に生き残っ た肝細胞の数は、コントロールの肝細胞の約40%に減 少していた (データは示していない). この際の肝細胞

内 8-OHdG の上昇は、NO 阻害薬や SOD で阻害されることより、NO や ONOO<sup>-</sup>が肝細胞 DNA 傷害の大きな原因であることを示唆している。また本研究における AO 染色の結果は、活性化脾マクロファージで共培養した後に、生き残った肝細胞内での単鎖 DNA の増加を示しており、それはやはり SOD や NO 阻害薬によって効果的に抑制された。DNA 単鎖は DNA 傷害のもう一つのマーカーであり、初期を示唆するかも知れない。したがって、もし肝細胞に炎症が続き慢性化した場合には、活性化されたマクロファージやその近傍に存在する肝細胞より放出される NO および ONOO<sup>-</sup>が、生き残った肝細胞に DNA 傷害を引き起こす可能性があり、将来的な発癌にもつながるのではないかと想像された $^{50}$ .

#### 総 括

- 1. 活性化脾マクロファージと肝細胞の共培養により以下の結果を得た.
- 1) IFN-yやLPSで刺激した脾マクロファージと肝細胞の共培養液中では、8時間で nitrite と nitrate 濃度の上昇を認めた。さらに、これらは NO 合成阻害薬で効果的に抑制を認めた。このことにより、活性化脾マクロファージと肝細胞の共培養により、NO が産生されることが明らかとなった。
- 2) 免疫蛍光染色により、8 時間 LPS で刺激した脾マクロファージと共培養した脾マクロファージと肝細胞は iNOS 抗体、nitrotyrosine を示す蛍光の両方で増強しているのが観察された。nitrotyrosine は ONOO<sup>-</sup>に特異的なものでないが、ONOO<sup>-</sup>の関与が疑われた。
- 3) 肝細胞の酸化的 DNA 傷害を見るために 8-OHdG/dG 比を測定した. LPS と  $IFN\gamma$  で刺激した脾マクロファージによって肝細胞を共培養した際に,コントロールと比較して 3-5 倍に 8-OHdG/dG 比は上昇した. この際の肝細胞内 8-OHdG の上昇は,NO 阻害薬や SOD で阻害された. このことより,活性化されたマクロファージや肝細胞より放出される NO や ONOO-が,肝細胞 DNA 傷害の大きな原因であることが示された.
- 4) DNA 傷害のもう一つのマーカーである DNA 単鎖を見るために AO 染色を行った。その結果,活性化脾マクロファージで共培養した後に,生き残った肝細胞内での単鎖 DNA の増加を示しており,それはやはりSOD や NO 阻害薬によって効果的に抑制された.

このことから、活性化された脾マクロファージやその近傍に存在する肝細胞より放出される NO や  $ONOO^-$ が肝細胞 DNA 傷害の大きな原因であることが示された.

- 2. 活性化された脾マクロファージと共培養した後の肝細胞 DNA 変化における活性酸素の役割を見るために、NO と  $O_2$  両者を産生する SIN-1 の効果や、ONOO の効果、および SIN-1 や ONOO 投与下での SOD の効果につき検討した。
- 1) SIN-1 (>1 mM) や ONOO $^-$  (>100  $\mu$ M) と 24 時間共培養後,肝細胞の 8-OH-dG/dG は 用量依存的に上昇を認めた.SOD を加えることにより 10 mM の SI N-1 で培養した肝細胞における 8-OHdG/dG の上昇効果を著明に抑制したが,1 mM で培養した ONOO $^-$ ではその抑制効果は認められなかった.
- 2) SIN-1 (>1 mM) や ONOO<sup>-</sup> (>100 μM) を投与し 24 時間培養後,肝細胞の単鎖 DNA 比率は著明に上昇を認めた。SOD を加えることにより 10 mM の SIN-1 で培養した肝細胞の単鎖 DNA 比率を著明に抑制したが,1 mM で培養した ONOO<sup>-</sup>による単鎖 DNA 比率に対しては抑制効果を示さなかった。

このことにより NO や ONOO<sup>-</sup>が肝細胞 DNA 傷害の大きな原因であり、用量依存的に傷害されることが示された。

稿を終えるにあたり、御指導と御校閲を賜りました慶應義塾大学医学部内科学教授石井裕正教授に深甚なる謝意をあらわします。本研究にあたって直接御指導御助言いただきました防衛医科大学校内科学第二講座教授三浦総一郎教授に深謝致します。さらに、本研究に当たり多大な御協力いただきました消化器内科学教室の諸各先生方に厚く御礼申し上げます。本研究の一部は第32回日本肝臓病学会総会、第96回全米消化器病学会(San Francisco, 1996)第47回全米肝臓病学会(Chicago, 1996)にて発表した。本研究の一部は、1996、1997、1998年度文部省科学研究費(奨励研究 A 番号 32612)により援助を受けた。

#### 文 献

- Takano S, Yokosuka O, Imazeki F, Tagawa M, Omata M: Incidence of hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis B and C: prospective study of 251 patients. Hepatology 21: 650-655, 1995
- 2) Shiratori Y, Shiina S, Imamura M, Kato N, Kanai F, Okudaira T, Teratani T, Tohgo G, Toda N, Ohashi M, Ogura K, Niwa Y, Kawabe T, Omata M: Characteri stic difference of hepatocellular carcinoma between hepatitis B-and C-viral infection in Japan. Hepatology 22: 1027-1033, 1995
- 3) Stark ME, Szurszewski JH: Role of nitric oxide in gastrointestinal and hepatic function and disease. Gastroenterology 1103: 1928-1949, 1992

- 4) Whittle BJ, Moncada S: Nitric oxide: the elusive mediator of the hyperdynamic circulation of cirrhosis? Hepatolgy 16: 1089-1092, 1992
- 5) Bomson A, Blendis LM: The nitric oxide hypothesis and the hyperdynamic circulation in cirrhosis. Hepatology 20: 1343-1350, 1994
- 6) Abelmann WH: Hyperdynamic circulation of liver disease 40 years later: pathophysiology and clinical consequences. Hepatology 20: 1359-1363, 1994
- 7) Rosser BG, Gores GJ: Liver necrosis: Cellular mechanisms and clinical implications. Gastroenterology 108: 252-275, 1995
- 8) Guarner C, Soriano G, Tomas A, Bulbena O, Novella MT, Balanzo J, Vilardell F, Mourelle M, Moncada S: Increased serum nitrite and nitrate levels in patient with cirrhosis: relationship to endotoxemia. Hepatology 18: 1139-1143, 1993
- Palmer RMJ, Ferrige AG, Moncada S: Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. Nature 327: 524– 526, 1987
- Furchgott RF, Vanhoutte PM: Endothelium-derived relaxing and contracting factors. FASEB J 3: 2007– 2019, 1989
- 11) Billiar TR, Curran RD, Stuehr DJ, West MA. Bentz BG, Simmons RL: An L-arginine-dependent mechanism mediates Kupffer cell inhibition of hepatocyte protein synthesis in vitro. J Exp Med 169: 1467-1472, 1989
- 12) Schmidt HHHW, Seifert R, Bohme E: Formation and release of nitric oxide from human neutrophils and HL-60 cells induced by a chemotactic peptide, platelet activating factor and leukotriene B4. FEBS Lett 244: 357-362, 1989
- 13) Curran RD, Billiar TR, Stuehr DJ, Hofmann K, Simmons RL: Hepatocyte produce nitrogen oxides from L-arginine in response to inflammatory products from Kupffer cells. J Exp Med 170: 1769-1774, 1989
- 14) Stuehr DJ, Gross SS, Sakuma I, Levi R, Nathan CF: Activated murine macrophages secrete a metabolite of arginine with the bioactivity of endotheliumderived relaxing factor and the chemical reactivity of nitric oxide. J Exp Med 169: 1011-1020, 1989
- 15) Rockey DC, Chung JJ: Inducible nitric oxide synthase in rat hepatic lipocytes and the effect of nitric oxide on lipocyte contractility. J Clin Invest 95 (3): 1199-1206, 1995
- 16) Yu Q, Shao R, Qian HS, George SE, Rockey DC: Gene transfer of the neuronal NO synthase isoform to cirrhotic rat liver ameliorates portal hypertension. J Clin Invest 105(6): 741-748, 2000
- 17) Rockey DC: Hepatic blood flow regulation by stellate cells in normal and injured liver. Semin liver Dis 21(3): 337-349, 2001
- 18) Gaillad T, Mulsch A, Busse R, Klein H, Decker K:

- Regulation of nitric oxide production by stimulated rat Kupffer cells. Pathobiology 59 (4): 280-283, 1991
- 19) Spitzer JA: Cytokine stimulation of nitric oxide formation and differential regulation in hepatocytes and nonparenchymal cells of endotoxemic rats. Hepatology 19 (1): 217-228, 1994
- 20) Billiar TR, Curran RD, Ferrari FK, Williams DL, Simmons RL: Kupffer cell: hepatocyte cocultures release nitric oxide in response to bacterial endotoxin. J Surg Res 48: 349-353, 1990
- 21) Curran RD, Billiar TR, Stuehr DJ, Ochoa JB, Harbrecht BG, Flint SG, Simmons RL: Multiple cytokines are required to induce hepatocyte nitric oxide production and inhibit total protein synthesis. Ann Surg 212: 462-471, 1990
- 22) Moncada S: The L-arginine: nitric oxide pathway. Acta Physiol Scand 145: 201-227, 1992
- 23) Nathan C: Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. FASEB J 6: 3051-3064, 1992
- 24) Moncada S, Palmer RMJ, Higgs EA: Nitric oxide: Physiology, pathophysiology, and pharmacology. Pharmacol Rev 3: 109-142, 1991
- 25) Hibbs JB, Taintor RR, Varin Z, Rachin EM: Nitric oxide: a cytotoxic activated macrophage effector molecule. Biochem Biophys Res Commun 57: 87-94, 1988
- 26) Stuehr DJ, Nathan CF: Nitric oxide: a marophgage product responsible for cytostasis and respiratory inhibition in tumor target cells. J Exp Med 169: 1543– 1555, 1989
- 27) Ferluga J, Allison AC: Role of mononuclear infiltration cells in pathogenesis of hepatocytes. Lancet 2: 610-611, 1978
- 28) Shiratori Y, Tanaka M, Umihara J, Kawase T, Shiina S, Sugimoto T: Leukotriene inhibitors modulate hepatic injury induced by lipopolysaccharide-activated macrophages. Journal of Hepatology 10: 51-61, 1990
- 29) Mizukami T, Yokoyama H, Okamura Y, Ohgo H, Fukuda M, Kamegaya Y, Kato S, Ishii H: Splenectomy attenuates superoxide anion release into the hepatic sinusoids after lipopolysaccharide challenge. Journal of Hepatology 31(2): 235-241, 1999
- 30) Radi R, Beckmann JS, Bush KM, Freeman BA: Pero xynitrite oxidation of sulfhydryls. The cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. J Biol Chem 266: 4244-4250, 1991
- 31) Wink DA, Kasprzak KS, Maragos CM, Elespuru RK, Misra M, Dunams TM, Cebula, TA, Koch WH, Andrews AW, Allen JS. Keefer LK: DNA deaminating ability and genotoxicity of nitric oxide and its progenitors. Science 254: 1001-1003, 1991
- 32) deRojas-Walker T, Tamir S, Hong Ji, Wishnok JS, Tannenbaum SR: Nitric oxide induces oxidative damage in addition to deamination in macrophage

- DNA. Chem Res Toxicol 8: 473-477, 1995
- 33) Kurose I, Kato S, Ishii H, Fukumura D, Miura S, Suematsu M, Tsuchiya M: Nitric oxide mediates lipopolysaccharide-induced alteration of mitochondrial function in cultured hepatocytes and isolated perfused liver. Hepatology 18: 380-388, 1993
- 34) Kurose I, Miura S, Saito H, Tada S, Fukumura D, Higuchi H, Ishii H: Rat Kupffer cell-derived nitric oxide modulates induction of lymphokine-activated killer cell. Gatroenterology 109: 1958-1968, 1995
- 35) Kurose I, Ebinuma H, Higuchi H, Yonei Y, Saito H, Kato S, Miura S, Ishii H: Nitric oxide mediates mitochondrial dysfunction in hepatoma cells induced by non-activated Kupffer cells: An evidence implicating ICAM-1-dependent process. J Gastroenterol Hepatol 10: S68-S71, 1995
- 36) Kurose I, Wolf R, Grisham MB, Granger DN: Modul ation of ischemia/reperfusion-induced microvascular dysfunction by nitric oxide. Circ Res 74: 376-382, 1994
- 37) Griffiths MJ, Messent M, MacAllister RJ, Evans TW:
  Aminoguanidine selectively inhibits inducible nitric
  oxide synthase. Br J Pharmacol 110: 963-968, 1993
- 38) Hasan K, Heesen B J, Corbett JA, McDaniel ML, Chang K, Allison W, Wolffenbuttel BHR, Williamson JR, Tilton RG: Inhibition of nitric oxide formation by guanidines. Eur J Pharmacol 249: 101-106, 1993
- 39) Granger DL, Hibbs JBJr, Perfect JR, Durack DT: Metabolic fate of L-arginine in relation to microbiostatic capability of murine macrophages. J Clin Invest 85: 264-273, 1990
- 40) Kasai H, Chain PF, Kuchino Y, Nishimura S, Ootuyama A, Tanooka H: Formation of 8-hydroxy guanosine moiety in cellular DNA by agents producing oxygen radicals and evidence for its repair. Carcinogenesis 7: 1849-1851, 1986
- 41) Kurose I, Miura S, Fukumura D, Yonei Y, Saito H, Tada S, Suematsu M, Tsuchiya M: Nitric oxide mediates Kupffer cell-induced reduction of mitochondrial energization in syngeneic hepatoma cells: A comparison with oxidative burst. Cancer Res 53: 2676-2682, 1993
- 42) Decker K: Biological active products of stimulated liver macrophages (Kupffer cells). Eur J Biochem 192: 245-261, 1990
- 43) Sheehan KC, Schreiber RB: The synergy and antagonism of interferon-γ and TNF. Tumor Necrosis Factor. (Ed) Beutler B, Raven Press, New York, p. 145-178, 1992
- 44) Wong GH, Goeddel DV: Tumor necrosis factor. Human Monocytes. (Ed) Asherson, GL, Zembala, M, Academic Press, New York, p.195-215, 1989
- 45) Nieminen AL, Dawson TL, Gores GJ, Herman B, Lemansters JJ: Protection by acidotic pH and fructose against lethal injury to rat hepatocytes from mitochondorial inhibitors, ionophores and oxidant chemicals. Biochem Biophsys Res Commun 167:

- 600-606, 1990
- 46) Beckmann JS, Beckmann TW, Chen J, Marshall P, Freeman BA: Apparent hydroxy radical production by peroxynitrite: Implications of endothelial injury from nitric oxide and superoxide. Proc Natl Acad Sci USA 87: 1620-1624, 1990
- 47) Eiserich JP, Cross CE, Jones AD, Halliwell B, van der Vliet A: Formation of nitrating and chlorinating species by reaction of nitrite with hypochlorous acid. A novel mechanism for nitric oxide-mediated protein modification. J Biol Chem 271: 19199-19208, 1996
- 48) Nussler AK, Di Silvio M, Billiar TR, Hoffman RA, Geller DA, Selby R, Madariaga, J, Simmons RL: Stimulation of the nitric oxide synthase pathway in human hepatocytes by cytokines and endotoxin. J Exp Med 176: 261-264, 1992
- 49) Sheldon WH, James DF: Cirrhosis following infectious hepatitis -a report of five cases, in two of which there was superimposed primary liver cell carcinoma. Arch Int Med 81: 666-672, 1948
- 50) Bermann MM: Hepatocellular carcinoma, polygonal cell type with fibrous stroma -an atypical variant with favorable prognosis. Cancer 46: 1448-1455, 1980
- 51) Peters RL: Pathology of hepatocellular carcinoma. Hepatocellular Carcinoma. (Ed) Okuda K, Peters RL, Wiley, New York, p.107-168, 1976
- 52) Anthony PP, Vogel CL, Barker LF: Liver cell dysplasia -a premalignant condition-. J Clin Pathol 26: 217-223, 1973
- 53) Kasai H, Nishimura S: Hydroxylation of deoxyguanosine by the C-8 position by ascorbic acid and other reducing agents. Nucleic Acids Res 12: 2137-2145, 1984
- 54) Kasai H, Tanooka H, Nishimura S: Formation of 8-hydroxyguanosin residues in DNA by X-irration. Gann 75: 1037-1039, 1984
- 55) Kasai H, Nishimura S: DNA damage induced by asbestos in the presence of hydrogen peroxide. Gann 75: 841-844, 1984
- 56) Kasai H, Nishimura S: Hydroxylation of deoxyguanosine at the C-8 position by polyphenols and aminophenols in the presence of hydrogen peroxide an ferric ion. Gann 75: 565-566, 1984
- 57) Tretyakova NY, Niles JC, Burney S, Wishnok JS, Tannenbaum SR: Peroxynitrite-induced reactions of synthetic oligonucleotides containing 8 oxoguanosine. Chem Res Toxicol 12: 459-466, 1999
- 58) Burney S, Caulfield JL, Niles JC, Wishnok JS, Tannenbaum SR: The chemistry of DNA damage from nitric oxide and peroxynitrite. Mutat Res 424: 37-49, 1999
- 59) Watanabe N, Miura S, Zeki S, Ishii H: Hepatocellula r oxidative DNA injury induced by macrophagederived nitric oxide. Free Radical Biology Medicine 30: 1019-1028, 2001