

博士論文

Ischemic preconditioning による
肝虚血再灌流障害軽減作用の機序に関する研究

手島 一陽

要旨

肝移植や肝切除時に生じる虚血再灌流障害への対策として注目されている ischemic preconditioning (IP)とは、『短時間の虚血と再灌流が先行すると、その後の長時間の虚血再灌流障害が軽減するという現象』である。IP による肝虚血再灌流障害軽減作用の機序の詳細は不明である。本研究では、IP の作用発現機序について、Kupffer 細胞およびその活性酸素種(ROS)産生を抑制したラットを用い cell specific に検討した。その結果、IP による肝細胞保護作用が、短時間の虚血再灌流において Kupffer 細胞の NADPH oxidase により産生される少量の ROS を介して発現することを見出した。

序文

虚血に陥った臓器が血液の再灌流を受けると、臓器には虚血およびその後の再灌流に伴う障害が生じる。肝臓病の臨床では、肝移植や肝切除手術などにおいて、肝臓は血流の途絶と再開にさらされ、この一連の虚血・再灌流に起因し肝障害が惹起される[1, 2]。虚血再灌流障害 ischemia/reperfusion injury と呼ばれるこの障害は、術後経過・予後に大きく影響を及ぼし、時に致命的な合併症の原因となる[3, 4]。肝移植後に発生する primary graft nonfunction は虚血再灌流障害が主な原因とされ、再移植以外に救命手段がなく[5-7]、とりわけ肝移植医療において虚血再灌流障害の軽減は重要な課題である。

虚血再灌流障害の軽減を図る上で、その障害成立の機序解明が必要となるが、動物モデルでの検討から、肝虚血中の温度の違いにより障害成立機序が異なることが判明している[8-11]。虚血中の保存温度が 0~4℃の「冷虚血」後再灌流障害では、肝類洞内皮細胞障害が主に惹起され、類洞の微小循環障害に起因した肝細胞障害へと進む[8, 9]。一方、虚血時温度が 37℃の「温虚血」後再灌流障害では、先ず肝細胞が著明な oxidative stress により障害されることが知られている[10, 11]。Kupffer 細胞は、いずれのモデルにおいても再灌流後に活性酸素や TNF α などを産生し、障害成立への関与が示唆されている[12-15]。肝移植や肝切除の実臨床においては、これら温虚血と冷虚血の状態が混在しているのが実情である。

虚血再灌流障害への対策として、近年、ischemic preconditioning (IP)と呼ばれる現象が注目されている。これは、「短時間の虚血と再灌流」が先行すると、その後の「長時間

の虚血と再灌流」によって惹起される臓器障害が軽減されるという現象である。実験動物において種々の臓器で効果が確認されており[16-19]、また、臨床例でも心臓、肝臓において、IP の有効性を示唆する報告がなされているが[20-24]、本現象の機序の詳細はいまだ不明である。

これまでに、ラット肝移植モデルを用いて、IP が肝類洞内皮細胞のアデノシンリセプター刺激を介して、冷虚血再灌流後の類洞内皮障害と Kupffer 細胞活性化を抑制し、移植後レシピエントの生存率を改善することが報告されている[17, 25, 26]。一方、IP の効果は肝温虚血再灌流障害に対しても確認されているが[19, 27-30]、cell specific な検討はなされておらず、その標的細胞や効果発現機序は未だ不明である。これらを明らかにすること、すなわち肝細胞、類洞内皮細胞、Kupffer 細胞それぞれに着目し、IP による肝の温虚血再灌流障害軽減作用の機序を解明することが本研究の目的である。

方法

使用動物

Sprague-Dawley (SD)系雄性ラット(体重 220~280g)を使用した。飼育および実験実施にあたっては、東京大学動物実験実施規則ならびに National Institutes of Health Guidelines に則って行った。

Ischemic preconditioning (IP)

ペントバルビタール Na 50 mg/kg をラットに腹腔内投与し麻酔導入した。正中切開にて開腹後、肝左葉および中葉への門脈と肝動脈を 10 分間クランプし、解除後 10 分間同血流を再灌流することにより IP を行った。IP 施行後は、引き続いて後述の *in vivo* または肝灌流系での温虚血再灌流障害に供した。対照群はクランプ以外の処置を同時間施行した。

In vivo 温虚血再灌流障害

前記の IP ないし sham 手術に引き続いて、肝左葉および中葉への門脈・肝動脈をクランプし血流遮断後、クランプを開放し再灌流した。終了時点において、肝細胞障害を血清 ALT 活性、類洞内皮細胞障害を血清ヒアルロン酸(HA)濃度によって評価した。予備実験において、血清 ALT 活性は、40 分間の肝虚血後に有意に上昇し、再灌流後 1~3 時間にピーク値を呈した為、40 分間の虚血後、1 時間再灌流した時点での血清にて評価した。

肝灌流系での実験

IP ないし sham 手術に引き続いて、経門脈的に肝を生理的緩衝液(Krebs-Henseleit bicarbonate buffer、KHB) 流速 30 mL/min にて 10 分間灌流を施行した後、肝を取り出し、

37°C KHB 内で40分間保存した。その後、500 ng/mL HA 含有 KHB を 200 mL、95% O₂、5% CO₂ 飽和条件下、30 mL/min にて閉鎖灌流系で1時間再灌流し、終了時点での灌流液中 ALT 活性、および HA 濃度を測定し、再灌流前後での HA 取り込み量を算定した。

前投薬

IP の作用における Kupffer 細胞およびその reactive oxygen species (ROS) 産生の関与を検討するため、以下の前投薬を用いて抑制実験を施行した。

1. Kupffer 細胞の抑制: IP 施行の 24 時間前に、塩化ガドリニウム(GdCl₃、和光純薬) 20 mg/kg を、エーテル麻酔下ラットに静注することにより行った[31]。GdCl₃ 投与の効果については、予備実験として抗 ED2 抗体を用いた免疫組織染色切片で確認した。
2. ROS の除去: IP 施行の 3 時間前および 1 時間前の 2 回、N-acetyl-L-cysteine (NAC、Sigma-Aldrich Co.) を 300 mg/kg ずつエーテル麻酔下ラットに静注、または、IP 施行の 5 分前に superoxide dismutase (SOD, Sigma-Aldrich Co.) 10,000 U/kg、ないし catalase (Sigma-Aldrich Co.) 65,000 U/kg をそれぞれエーテル麻酔下ラットに静注することにより行った。以上の薬剤は全て生理食塩水に溶解して使用し、対照群ではそれぞれに対応した生理食塩水を静注した。
3. Reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) oxidase の阻害: 10 μmol/L diphenyleneiodonium chloride (DPI, Sigma-Aldrich Co.) 含有 KHB を用いて、IP における 10 分間の虚血後再灌流を行った。また、後述する H₂O₂ preconditioning においては同灌流液に H₂O₂ を加え 10 分間の肝灌流を行った。DPI は dimethyl sulfoxide (DMSO)

に 20 mmol/L で溶解して使用し、対照群では 500 μ L/L の DMSO 含有 KHB で同時間の灌流を行った[32]。

過酸化水素(H₂O₂)灌流による preconditioning

IP を行わずに、前述の肝灌流系の導入と同様に KHB を用いて経門脈的に肝を 10 分間灌流後、種々濃度の H₂O₂ 含有 KHB による 10 分間の灌流を行った。その後、KHB にて 2 分間 wash out 後、37°C、40 分間の保存、1 時間の閉鎖灌流系での再灌流を行い、終了時点での灌流液中 ALT 活性を測定した。

Preconditioning における *in situ* での Kupffer 細胞の ROS 産生の同定

IP において、前述のごとく肝左葉および中葉への門脈と肝動脈の血流を 10 分間遮断後、500 mg/L nitro blue tetrazolium (NBT, Sigma-Aldrich Co.) 含有 KHB を用いて 10 分間の再灌流を行った。また、H₂O₂ preconditioning においては、10 分間の H₂O₂ 含有 KHB での灌流後に、NBT 含有 KHB での 10 分間の灌流を行った。その後、10% formalin による肝の灌流固定、パラフィン包埋、薄切、nuclear fast red 染色を行い、NBT が Kupffer 細胞の産生した ROS に還元され生じる不溶性の formazan 沈着を顕微鏡下に観察した[33, 34]。

In vitro での実験

1. 肝細胞の虚血再灌流障害モデル：ラット初代培養肝細胞を用い[35]、嫌気培養用 chamber および Anaeropack (Mitsubishi gas chemical co.) によって種々の時間の嫌気培養 (anoxia) と、それに続く再酸素化 (reoxygenation) を誘導し、至適な anoxia 時間および reoxygenation 時間を検討した。肝細胞の viability は、30 μ mol/L propidium iodide 含有

100 μ L 培養液(Krebs-Ringer N-2-hydroxyethylpiperazine-N⁺-2-ethanesulfonic acid buffer、KRH、pH 7.4)を用いた fluorometry にて、350 μ mol/L digitonin 添加後の蛍光強度をもって 100 % 肝細胞壊死とし、経時的に算定した [36]。蛍光強度は Cytofluor S4000 fluorescence reader (Applied Biosystems)を使用し、530 nm excitation/645 nm emission filter を用いて測定した。

2. 肝細胞の虚血再灌流障害に対する H₂O₂ preconditioning: 培養肝細胞に対し、0~1 mmol/L の種々濃度 H₂O₂ を 37°C、10 分間、100 μ L KRH 培養液に加え前投与し、KRH による 2 回の洗浄後に、前記の anoxia/reoxygenation に供した。

生化学的測定

血清および灌流液中の ALT 活性、HA 濃度は、それぞれ市販測定キット(Wako Pure Chemical Industries、Chugai Pharmaceutical Co., Ltd.)を用いて測定した。

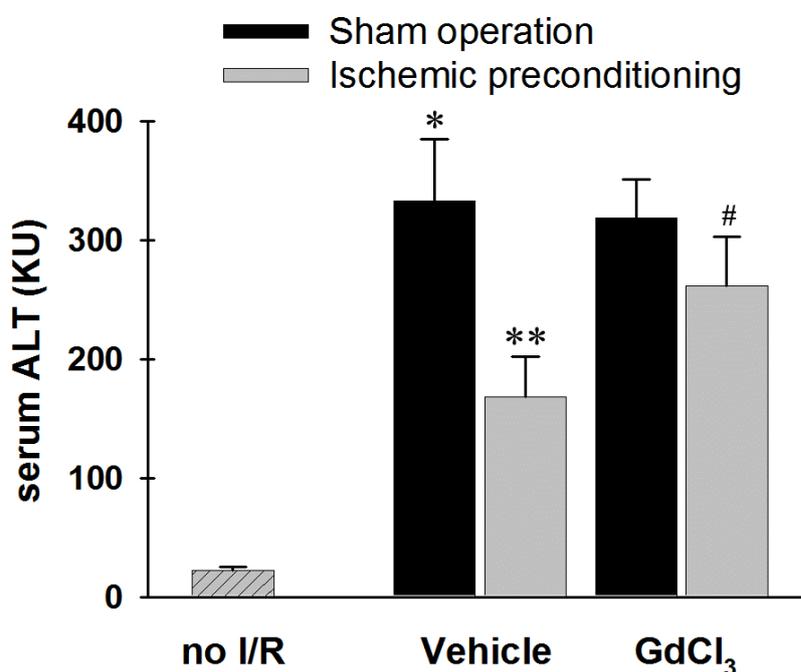
統計学的解析

測定結果は mean \pm standard error (SE)で記載し、2 群間比較においては、正規性および等分散性を確認後、Student's *t* 検定を用い P value < 0.05 をもって統計学的有意差ありとした。

結果

In vivo 温虚血再灌流後の肝細胞障害および類洞内皮細胞障害への IP の作用

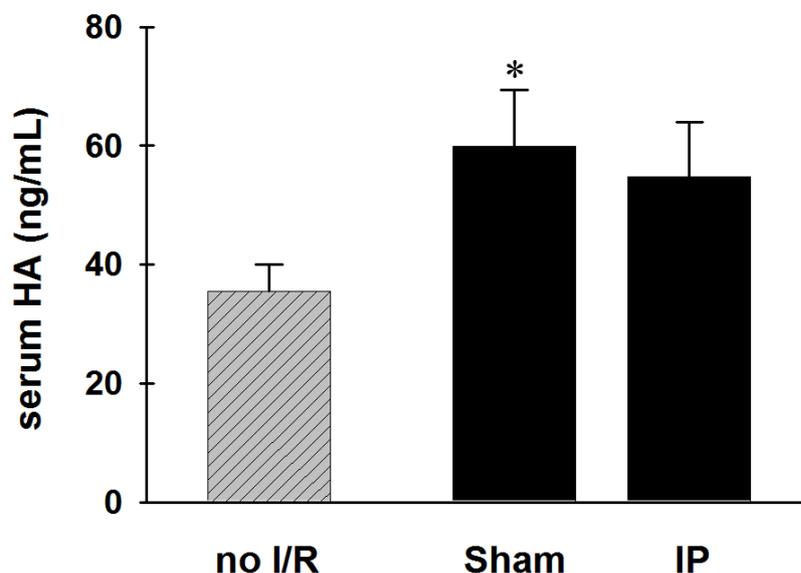
37°C、40 分間の虚血/1 時間の再灌流後の肝細胞障害を血清 ALT 活性で、類洞内皮細胞障害を血清 HA 濃度により評価し、それぞれの障害に対する IP の作用を検討した。無処置ラットに比べ、温虚血再灌流後の血清 ALT 活性は著明に増加し、IP はこれを有意に軽減した(図 1 Vehicle)。一方、血清 HA 濃度は、無処置ラットに比べ温虚血再灌流後に、類洞内皮細胞障害を反映して上昇したが、IP はこの上昇に対して有意な軽減作用を示さなかった(図 2)。すなわち、IP は温虚血再灌流障害に対し、類洞内皮細胞障害の軽減を介さずに肝細胞障害を軽減することが示唆された。



(図 1) *In vivo* 温虚血再灌流障害における IP の肝細胞障害軽減作用

グラフは、温虚血再灌流後の血清 ALT 活性(mean ± SE)を表す。各群 n=6

* $p < 0.01$ vs. no ischemia/reperfusion (I/R); ** $p < 0.05$ vs. Vehicle treatment & sham operation; # $p < 0.05$ vs. Vehicle treatment & ischemic preconditioning. KU, karmen unit.



(図 2) *In vivo* 温虚血再灌流障害における IP の肝類洞内皮細胞障害に対する作用
 グラフは、温虚血再灌流後の血清ヒアルロン酸(HA)濃度(mean ± SE)を表す。各群 n = 6
 * $p < 0.05$ vs. no ischemia/reperfusion (I/R). IP, ischemic preconditioning.

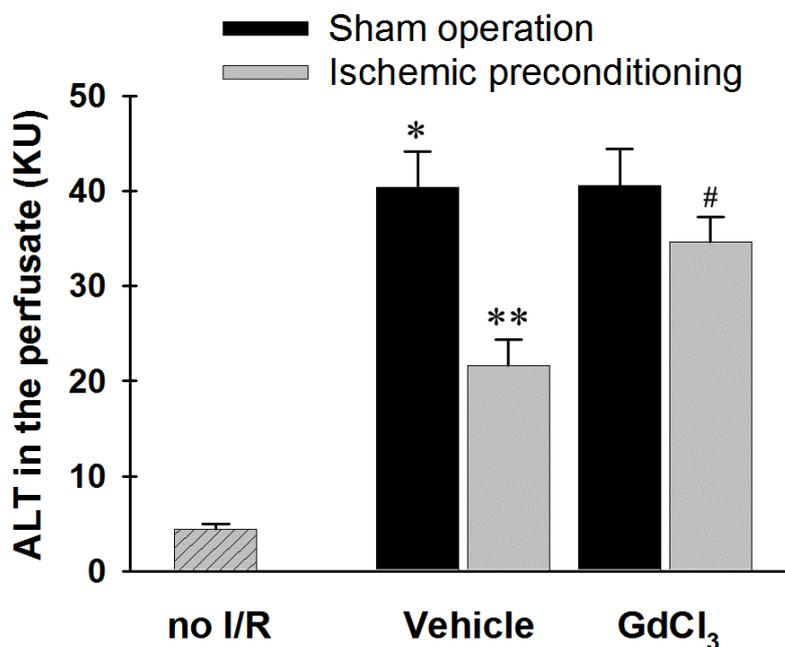
IP による *in vivo* 温虚血再灌流後の肝細胞障害軽減作用への Kupffer 細胞の関与

塩化ガドリニウム($GdCl_3$)により Kupffer 細胞を抑制したラットにおいて、温虚血再灌流後の血清 ALT 活性上昇の程度は vehicle treatment 群と比して変わらず、温虚血再灌流後の肝細胞障害自体に Kupffer 細胞は関与していないことが示唆された(図 1 $GdCl_3$)。しかし、Kupffer 細胞を抑制した $GdCl_3$ 群においては、vehicle 群で見られた IP による肝細胞障害軽減作用が消失するという結果が得られた。この結果から、温虚血再灌流障害に対する IP の肝細胞保護作用は、Kupffer 細胞を介して発現していることが示唆された。

肝灌流モデルを用いた温虚血再灌流障害に対する IP の肝保護作用

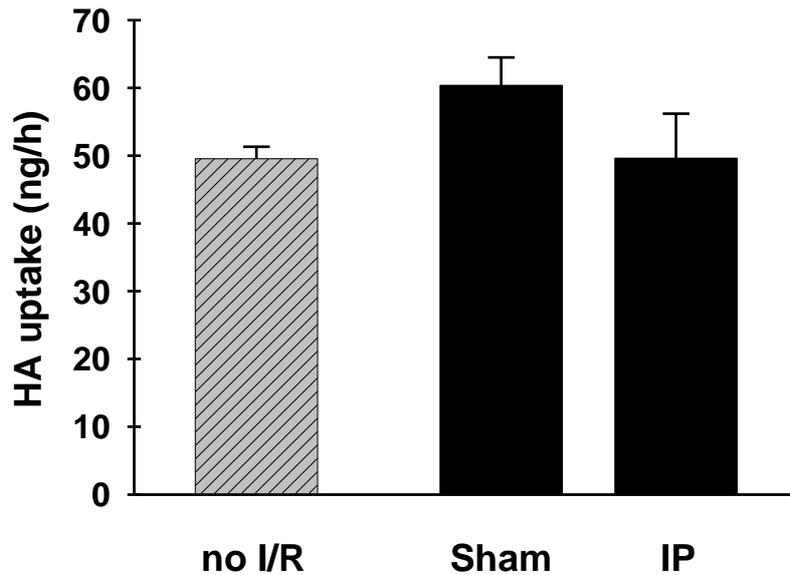
上記の *in vivo* での検討に加え、より肝特異的に IP の肝細胞障害軽減作用を検討するた

め、肝灌流系を用いて同様の実験を行った。肝細胞障害は灌流液中 ALT 活性で、類洞内皮細胞障害は再灌流前後の灌流液中 HA 濃度から算定した HA 取り込み量で評価した。結果は、*in vivo* での実験と同様、温虚血再灌流後に著明に上昇した灌流液中 ALT 活性が IP によって有意に減少し(図 3 Vehicle)、この IP の肝細胞障害軽減作用が Kupffer 細胞の抑制によって消失した(図 3 GdCl₃)。P 値からは、*in vivo* での検討に比して、灌流系での検討でより安定した結果の得られることが示唆された。一方、HA 取り込み量については、温虚血再灌流後においても類洞内皮細胞障害を反映した低下が認められず、IP による HA 取り込み量の有意な増加も認められなかった(図 4)。



(図 3) 肝灌流系での温虚血再灌流障害に対する IP の肝細胞障害軽減作用

40 分間の温虚血/1 時間の再灌流後の灌流液中 ALT 活性(mean ± SE)を表す。各群 n = 6
 * $p < 0.01$ vs. no ischemia/reperfusion (I/R); ** $p < 0.01$ vs. Vehicle treatment & sham operation; # $p < 0.01$ vs. Vehicle treatment & ischemic preconditioning. KU, karmen unit.

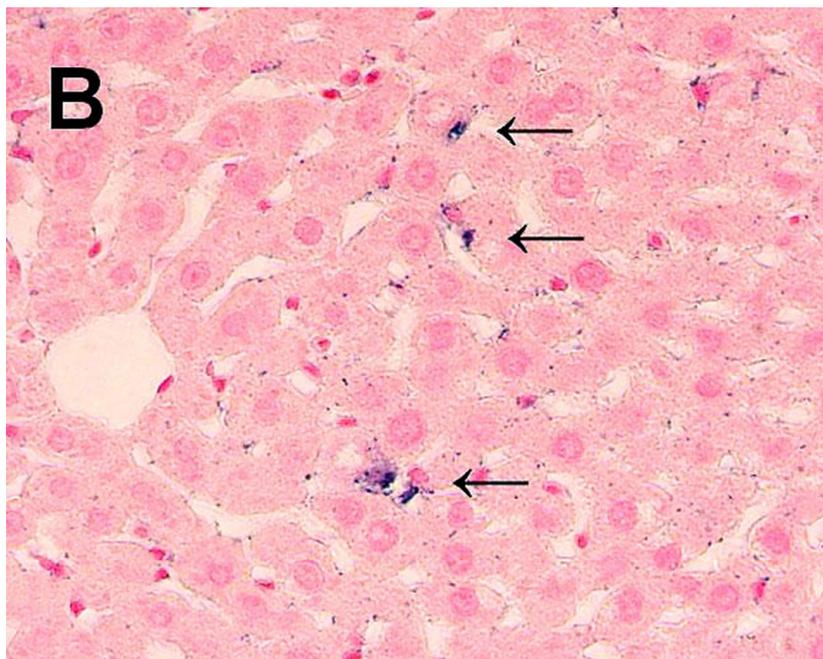
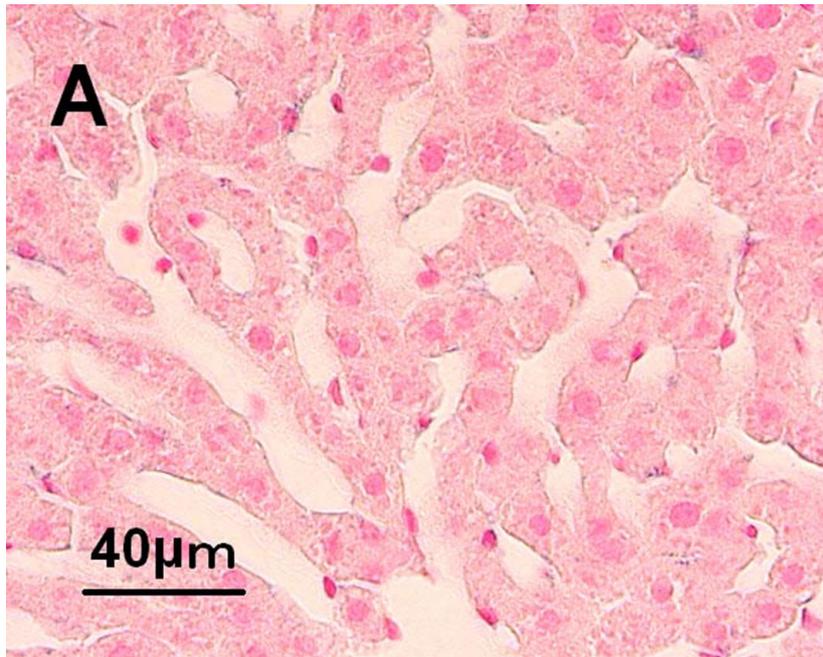


(図 4) 肝灌流系での温虚血再灌流障害における肝類洞内皮細胞障害

グラフは、40 分間温虚血後、1 時間再灌流の前後における灌流液中ヒアルロン酸(HA)濃度から算定した HA 取り込み量(mean ± SE)を表す。各群 n = 6 I/R, ischemia/reperfusion; IP, ischemic preconditioning.

IP における Kupffer 細胞の reactive oxygen species (ROS) 産生

以上の *in vivo* および肝灌流系での実験結果から、IP による温虚血再灌流障害軽減作用は、Kupffer 細胞を介して発現していることが示唆された。そこで、次に Kupffer 細胞の活性化によって産生される ROS に着目し、この ROS が IP の作用発現の mediator となっているのではないかと考え、検証のための実験を進めた。まず、IP すなわち 10 分間という短時間虚血後の再灌流で、Kupffer 細胞が ROS を産生しているか否かを、*in situ* での Kupffer 細胞の ROS 産生の評価法である NBT 灌流法[33, 34]を用いて検討した。無処置ラット肝では特に所見を認めなかったが(図 5 A)、10 分間の虚血後再灌流によって、Kupffer 細胞の ROS 産生を反映した青色の formazan 沈着が認められた(図 5 B)。

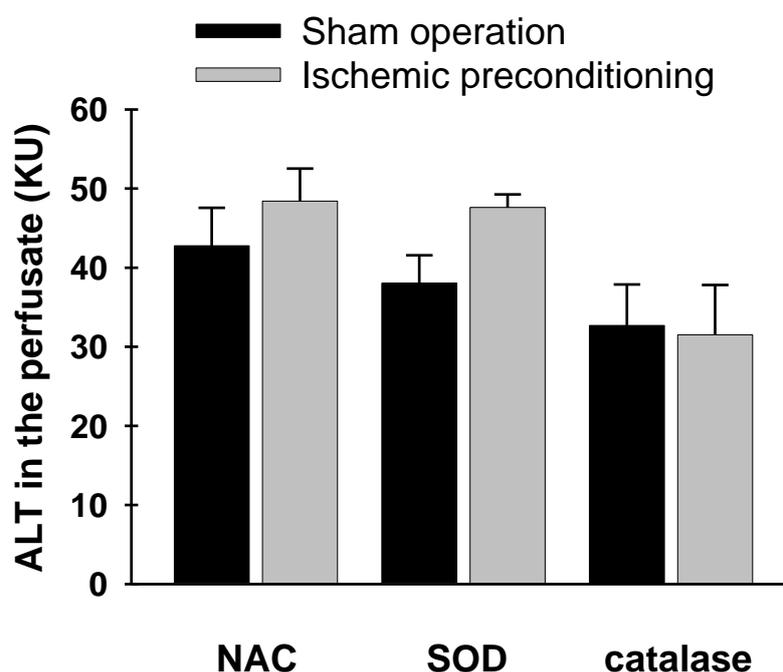


(図 5) IP における Kupffer 細胞の ROS 産生

A: Sham control liver、B: 10 分間の虚血後再灌流により、Kupffer 細胞の ROS 産生を反映した formazan 沈着の出現が認められた(矢印)。

IPによる温虚血再灌流後の肝細胞障害軽減作用への ROS の関与

次に、IP すなわち短時間の虚血再灌流で生じた ROS を除去することで、その後の温虚血再灌流障害に対する IP の肝細胞保護作用が消失するか否か、ROS 除去剤である NAC、SOD、catalase をそれぞれ前投与し、温虚血再灌流後の灌流液中 ALT 活性を検討した。NAC および SOD の前投与によって、sham 手術群における温虚血再灌流後の肝細胞障害自体には変化がなかったが、IP の作用が消失し、むしろ IP 施行群で ALT 活性が上昇していた。Catalase を前投与した場合、温虚血再灌流障害自体が有意ではないものの軽度軽減され、IP の作用は、NAC、SOD を前投与した場合と同様に消失した(図 6)。

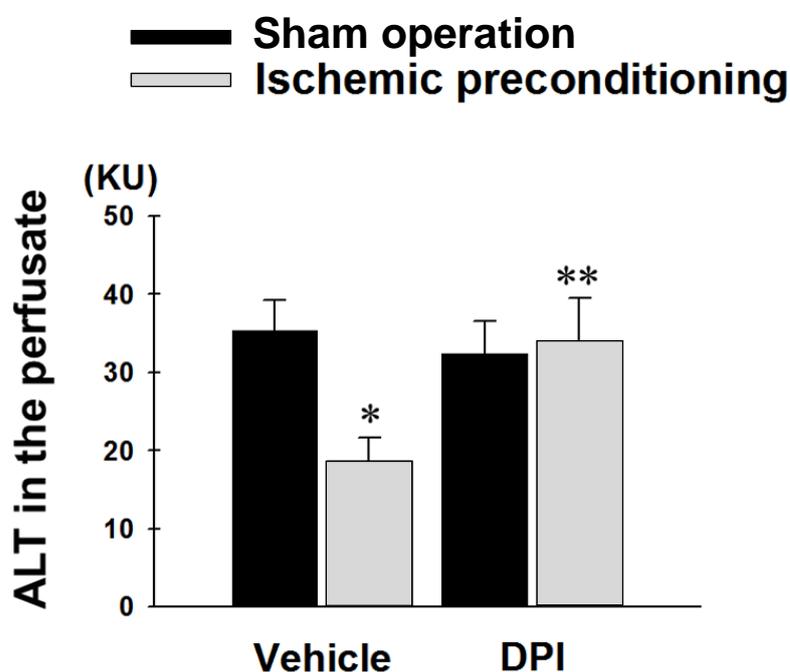


(図 6) IP の温虚血再灌流障害に対する肝細胞保護作用への ROS の関与

N-acetyl-L-cysteine (NAC)、superoxide dismutase (SOD)、catalase を静注したラットにおいて、sham ないし IP を施行後、40 分間の温虚血、閉鎖灌流系での 1 時間再灌流を行った。グラフは、温虚血再灌流後の灌流液中 ALT 活性(mean \pm SE)を表す。各群 n = 6 KU, karmen unit.

IP の温虚血再灌流障害軽減作用における NADPH oxidase の関与

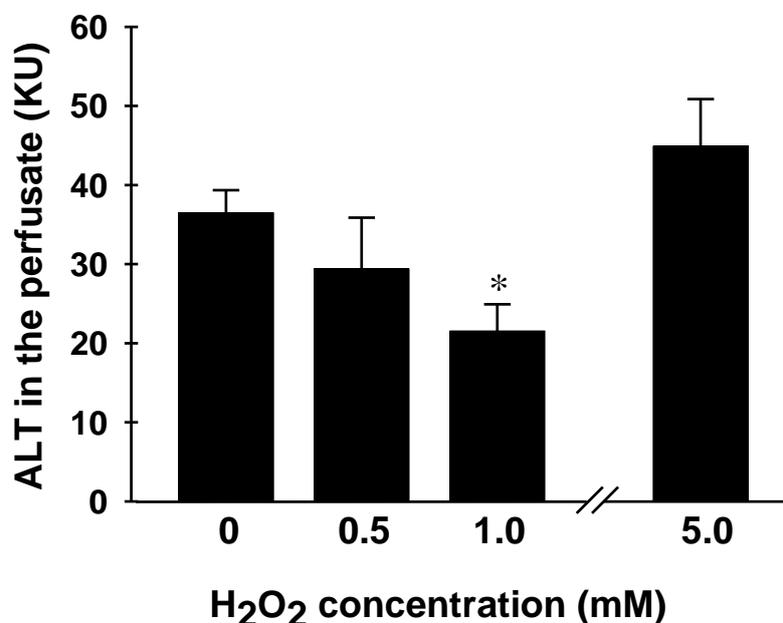
(図 5)、(図 6)の結果から、IP において Kupffer 細胞が ROS を産生しており、ROS の除去によって IP の温虚血再灌流障害軽減作用が消失することが示された。Kupffer 細胞は虚血再灌流により NADPH oxidase 活性化を介して ROS を産生・放出することが知られており[37]、NADPH oxidase を阻害したラットで、IP の作用が消失するか否かを検討した。(図 7)に示すように、vehicle treatment 群では、温虚血再灌流後の肝細胞障害を反映して上昇した灌流液中 ALT 活性は IP によって有意に低下したが、diphenyleneiodonium chloride (DPI)により NADPH oxidase を阻害すると、この IP の作用が消失し、IP による温虚血再灌流障害に対する肝細胞保護作用への NADPH oxidase の関与が示唆された。



(図 7) IP の温虚血再灌流障害に対する肝細胞保護作用への NADPH oxidase の関与 40 分間の温虚血/1 時間の再灌流後の灌流液中 ALT 活性(mean \pm SE)を表す。各群 n = 6 * $p < 0.01$ vs. Vehicle treatment & sham operation; ** $p < 0.01$ vs. Vehicle treatment & ischemic preconditioning. KU, karmen unit.

温虚血再灌流障害に対する H₂O₂ を用いた preconditioning

以上の結果を踏まえ、次に、少量の ROS を前投与することで、IP と同様に温虚血再灌流障害を軽減し得るか否かを検討した。IP の代わりに、種々濃度の H₂O₂ 含有灌流液による10分間の前灌流を行った後に、37°C、40分間の温虚血/1時間の閉鎖灌流系での再灌流を行い、灌流液中 ALT 活性を測定した。結果は、(図 8)に示すように、1 mmol/L H₂O₂ の前灌流によって、温虚血再灌流後の灌流液中 ALT 活性が control に比して有意に低下し、IP と同様な温虚血再灌流障害に対する肝細胞保護作用を再現することが出来た。更に、より高濃度 5 mmol/L H₂O₂ の前灌流を行うと、温虚血再灌流後の灌流液中 ALT 活性はむしろ上昇し、肝細胞障害が増悪するという結果が得られ、一定範囲の ROS 前投与によって始めて肝細胞保護作用が発現するということが示唆された。



(図 8) 温虚血再灌流障害に対する短時間の H₂O₂ 灌流による肝細胞保護作用
40分間の温虚血/1時間の再灌流後の灌流液中 ALT 活性(mean ± SE)を表す。各群 n = 6
* $p < 0.01$ vs. 0 mmol/L (mM). KU, karmen unit.

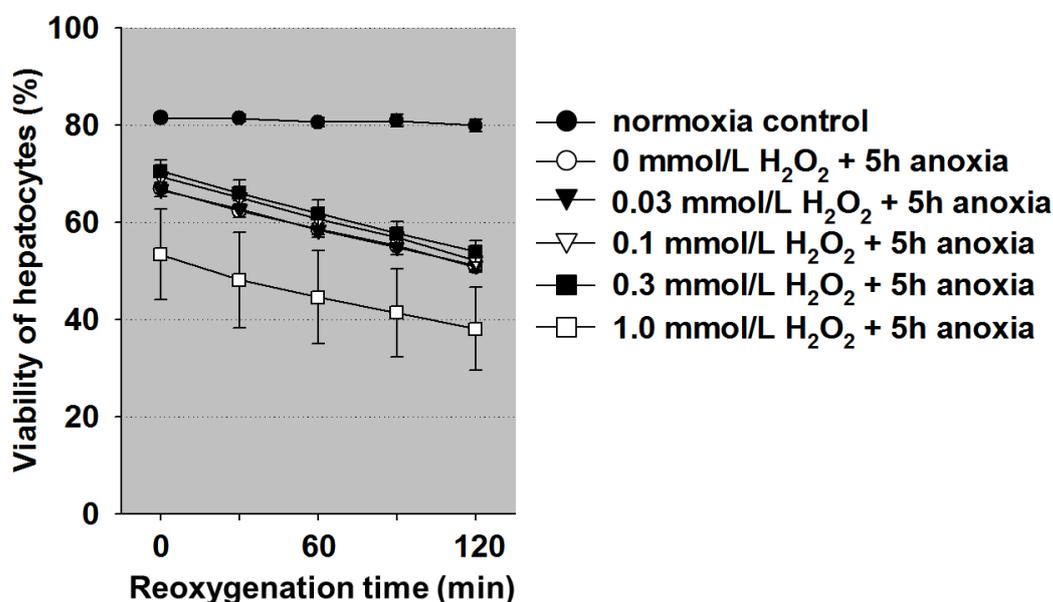
H₂O₂ preconditioning の肝細胞への直接作用についての *in vitro* における検討

肝灌流系において、H₂O₂ による温虚血再灌流障害に対する preconditioning が可能であったため、肝細胞への直接作用についてラット初代培養肝細胞を用い *in vitro* で検討した。

予備実験では、肝細胞の viability は 3~4 時間以上の嫌気培養(anoxia)後の再酸素化(reoxygenation)で低下を認め、6 時間 anoxia では reoxygenation 直後から著明な低下を来たしたため、5 時間 anoxia/ 2 時間 reoxygenation モデルを用いて検討した[36, 38]。肝細胞

の viability は、normoxia control に比し、anoxia/reoxygenation 後にほぼ直線的に低下した。これに対し、0~1 mmol/L H₂O₂ 含有緩衝液にて 10 分間の培養を先行させ

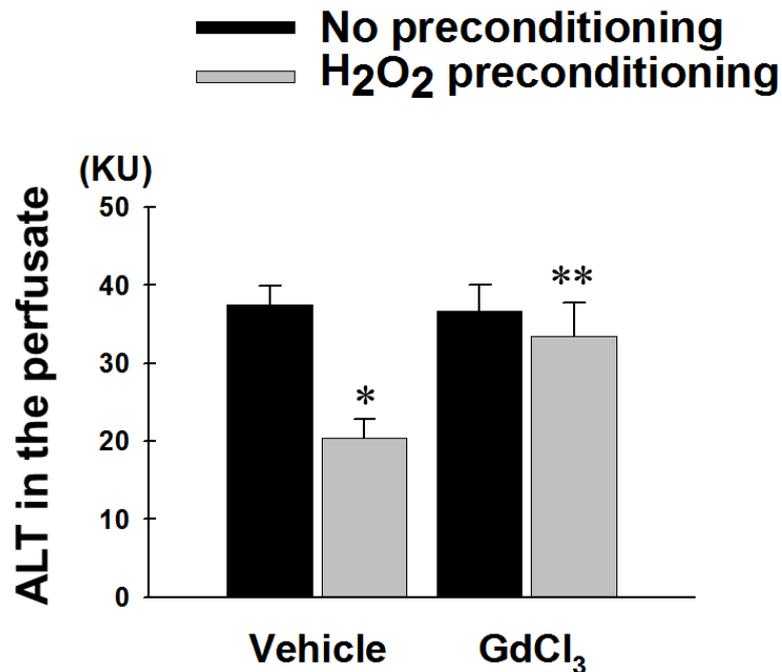
preconditioning を試みたが、0~0.3 mmol/L H₂O₂ ではいずれにおいても肝細胞障害の有意な悪化・軽減とも認めず、1 mmol/L H₂O₂ では肝細胞障害の悪化を認めた(図 9)。



(図 9) 肝細胞の anoxia/reoxygenation injury に対する H₂O₂ preconditioning の効果
グラフは、各濃度の H₂O₂ 前投与に続く 5 時間嫌気培養/2 時間再酸素化における再酸素化後の肝細胞の viability の推移を表す。

H₂O₂ preconditioning の作用発現における Kupffer 細胞の関与

In vitro の実験結果と、H₂O₂ 前投与による温虚血再灌流障害に対する肝細胞保護効果が認められた肝灌流系での結果(図 8)とから、H₂O₂ による preconditioning は、肝細胞への直接作用ではなく、IP と同様に Kupffer 細胞を介した作用である可能性が考えられた。そこで、GdCl₃ によって Kupffer 細胞を抑制したラットを用い、肝灌流系において 10 分間の 1 mmol/L H₂O₂ 前灌流による preconditioning の肝細胞保護作用を再度検討したところ、(図 10)に示すように、Kupffer 細胞を抑制することで、H₂O₂ preconditioning による温虚血再灌流後の肝細胞障害軽減作用が消失するという結果が得られた。



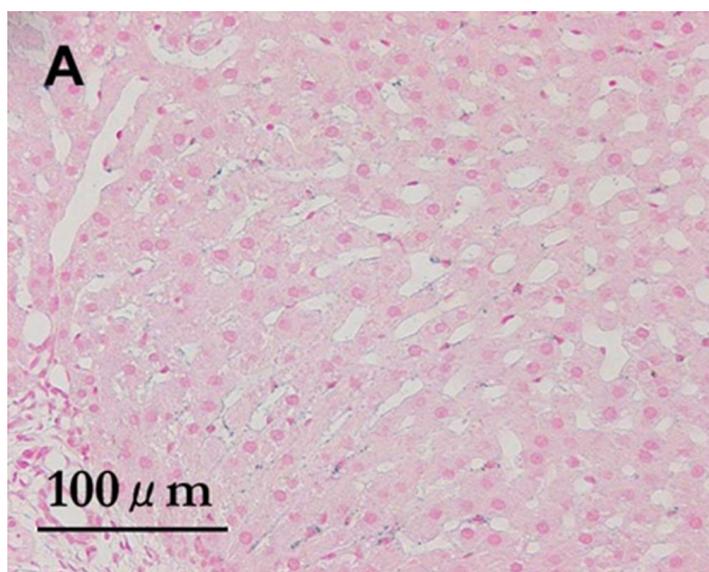
(図 10) H₂O₂ preconditioning の肝細胞保護作用における Kupffer 細胞の関与

40 分間温虚血/1 時間再灌流後の灌流液中 ALT 活性(mean ± SE)を表す。各群 n = 6

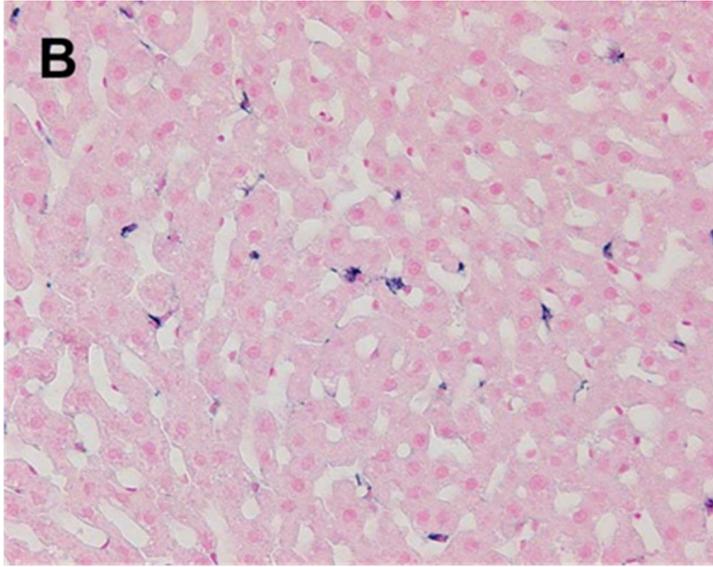
* $p < 0.01$ vs. Vehicle treatment & no preconditioning; ** $p < 0.01$ vs. Vehicle treatment & H₂O₂ preconditioning. KU, karmen unit.

H₂O₂ preconditioning における Kupffer 細胞の ROS 産生の検討

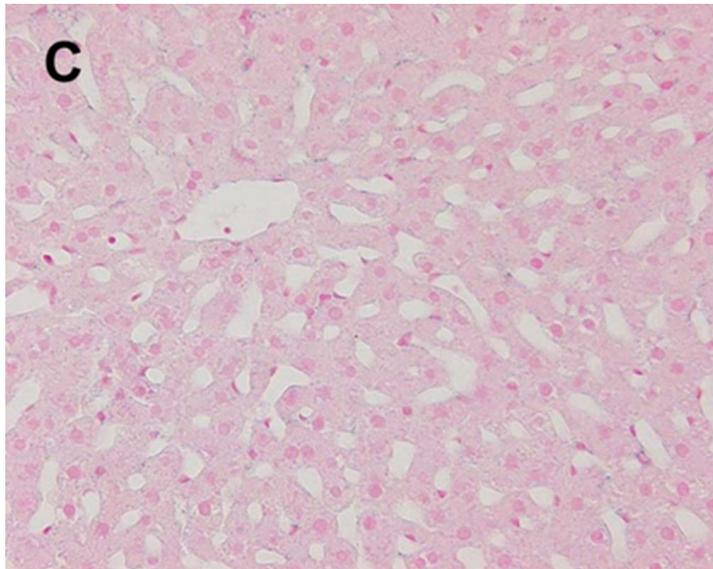
H₂O₂ preconditioning の温虚血再灌流障害に対する肝細胞保護作用も、IP と同様 Kupffer 細胞を介して発現していることが示唆されたため、H₂O₂ preconditioning においても Kupffer 細胞が *in situ* で ROS を産生しているか否か、NBT 灌流法を用いて組織学的に検討した。(図 11 A)に no-treatment control、(図 11 B)に H₂O₂ 灌流ラットの肝組織を示す。1 mmol/L、10 分間という少量短時間の H₂O₂ 灌流によって、IP の場合と同様に Kupffer 細胞の ROS 産生を反映した formazan 沈着が確認された。この所見は、GdCl₃ 前投与により Kupffer 細胞を抑制したラット(図 11 C)、および NADPH oxidase 阻害剤(DPI)投与ラット(図 11 D)における同条件の H₂O₂ 灌流では認められなかった。(図 11 E)に各標本中 10 箇所の高倍率視野 (HPF) での formazan 陽性細胞数を示す。すなわち、肝灌流系で認められた H₂O₂ preconditioning による温虚血再灌流障害軽減作用(図 8)は、IP においてと同様、Kupffer 細胞の産生する ROS を介した機序であることが示唆された。



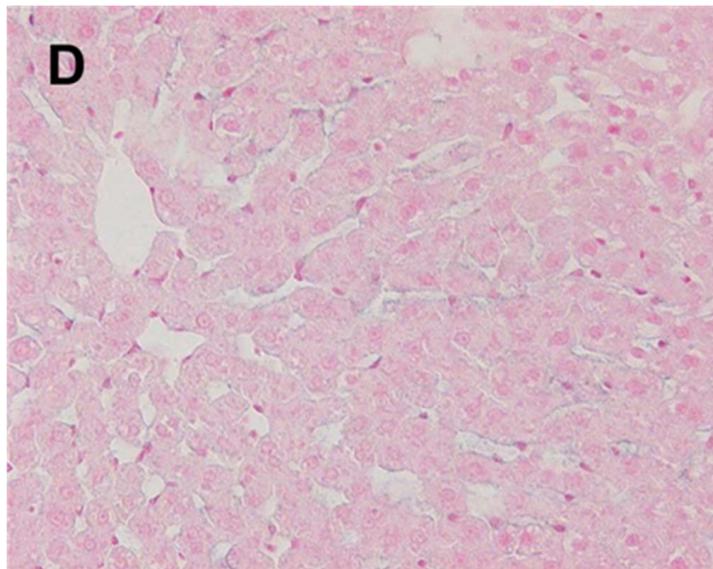
(図 11 A)



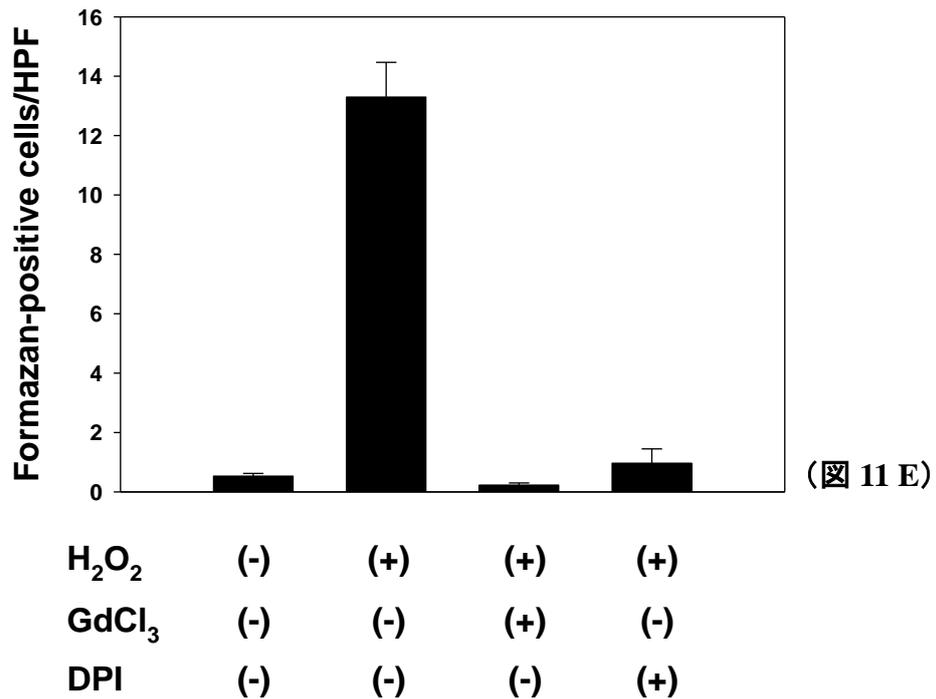
(图 11 B)



(图 11 C)



(图 11 D)



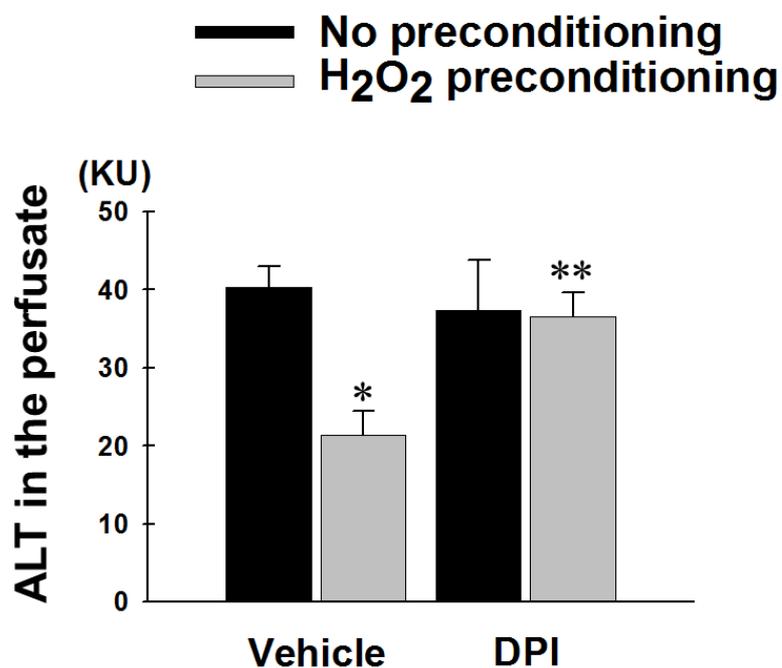
(図 11) H₂O₂ preconditioning における Kupffer 細胞の ROS 産生

A: no-treatment control liver、B: 少量短時間の H₂O₂ 灌流による Kupffer 細胞の ROS 産生を反映した blue formazan 沈着、C: GdCl₃ & H₂O₂ preconditioning、D: DPI & H₂O₂ preconditioning、E: グラフは、A–D 各群における肝組織標本中 10 箇所の高倍率視野 (= HPF) での formazan 陽性細胞数を表す。

H₂O₂ preconditioning の作用発現における NADPH oxidase の関与

H₂O₂ preconditioning の温虚血再灌流障害に対する肝細胞保護作用が Kupffer 細胞の抑制により消失したこと、また NBT 灌流を用いた組織学的検討において、少量短時間の H₂O₂ 投与によって Kupffer 細胞の ROS 産生が認められ、かつこれが NADPH oxidase 阻害により抑制されたことから、最後に、10 分間の 1 mmol/L H₂O₂ 前灌流による H₂O₂ preconditioning の肝細胞保護作用における NADPH oxidase の関与を検討した。(図 12) に示すように、vehicle treatment 群で認められた H₂O₂ preconditioning による温虚血再灌流後の肝細胞障害軽減作用が、IP の場合と同様、DPI によって NADPH oxidase を阻害

することで消失するという結果が得られた。



(図 12) H₂O₂ preconditioning の肝細胞保護作用における NADPH oxidase の関与
40 分間の温虚血/1 時間の再灌流後の灌流液中 ALT 活性(mean ± SE)を表す。各群 n = 8
* $p < 0.01$ vs. Vehicle treatment & no preconditioning; ** $p < 0.01$ vs. Vehicle treatment & H₂O₂ preconditioning. KU, karmen unit; DPI, diphenyleneiodonium chloride.

考察

Ischemic preconditioning (IP)による温虚血再灌流障害に対する肝保護作用の発現機序について、cell specific に検討するため、まず温虚血再灌流後の肝細胞障害と類洞内皮細胞障害を分けて観察し、それぞれに対する IP の効果を検討した。次に、GdCl₃ によって Kupffer 細胞を抑制したラットを用いて、温虚血再灌流障害に対する IP の効果を観察することで、IP の肝保護作用発現における Kupffer 細胞の関与について検討した。

In vivo においては、肝細胞障害を血清 ALT 活性で評価し、類洞内皮細胞障害を血清ヒアルロン酸(HA)濃度で評価した。血中の HA は類洞内皮細胞によって速やかに取り込まれるため[39]、血清 HA 濃度の上昇は類洞内皮細胞障害の指標となる。結果の項(図 1、2)に示すとおり、IP は温虚血再灌流後の肝細胞障害を有意に軽減したが、類洞内皮細胞障害については軽減しなかった。

Kupffer 細胞の活性化は、温虚血再灌流、冷虚血再灌流のいずれにおいても肝障害への関与を示唆する報告がなされており[12, 13, 40, 41]、冷虚血再灌流障害においては、IP が虚血再灌流後の Kupffer 細胞による ROS および TNF α 産生を抑制することが報告されている[25, 26]。本研究では、温虚血再灌流障害に対する IP の肝保護作用への Kupffer 細胞の関与を検討した。当初、冷虚血再灌流障害においてと同様に、IP によって温虚血再灌流後の Kupffer 細胞活性化に起因した肝障害が減ずることも予測されたが、GdCl₃ によって Kupffer 細胞を抑制しても温虚血再灌流後の ALT 活性上昇には変化がないという結果が得られ(図 1)、本モデルにおいては、Kupffer 細胞は虚血再灌流後の肝細

胞障害自体に影響していないことが示唆された。従って、類洞内皮細胞障害に関する知見と合わせて、温虚血再灌流障害に対する IP の肝細胞障害軽減作用は、冷虚血再灌流障害における機序とは異なり、類洞内皮細胞障害の軽減や Kupffer 細胞活性化の抑制を介さない、肝細胞へのより直接的な保護作用であると考えられた。これは、温虚血再灌流障害の主たる要因が、冷虚血再灌流障害と異なり肝細胞に生じる oxidative stress であるという報告[10, 11]と整合性のある結果とも考えられた。

In vivo で得られたこれらの結果について更に検証するために、肝灌流系での実験を行った。肝灌流系を導入することで、虚血再灌流後に肝類洞における血栓形成やフィブリン沈着によって惹起される副次的な微小循環障害[42, 43]の影響を減じ、より肝特異的に虚血再灌流障害と IP の機序を解析することが可能となる。肝灌流系での実験では、類洞内皮細胞障害について、灌流液に加えた HA 濃度の再灌流前後での差、すなわち HA の取り込み量を算定することにより評価した。類洞内皮細胞の速やかな HA 除去能[39]を踏まえ、HA 取り込み量の減少は類洞内皮細胞障害の指標となる。結果は、*in vivo* と同様、IP は温虚血再灌流後の肝細胞障害を軽減したが、類洞内皮細胞への影響は捉えられなかった(図 3, 4)。また、Kupffer 細胞を抑制しても、やはり温虚血再灌流後の肝細胞障害の程度は不変であり、IP は温虚血再灌流障害に対して類洞壁細胞の変化を抑制することを介さずに肝細胞障害を軽減していることが確認された。

温虚血再灌流障害における Kupffer 細胞活性化の抑制効果については、障害軽減に寄与するという報告[13, 40]と否定的な報告[44]とがあり、冷虚血再灌流障害において

も、いまだ両者の報告がみられる[12, 41, 45, 46]。虚血再灌流に伴う Kupffer 細胞活性化の程度は虚血時間によっても変化し[47]、モデルによる虚血および再灌流時間の違いによって障害への関与についても差異が生じている可能性が考えられた。

本研究では、GdCl₃ を用いた Kupffer 細胞の抑制実験により、もうひとつの非常に重要な結果を得た。*In vivo* および肝灌流系での実験とも、Kupffer 細胞を抑制したところ、IP の肝細胞障害軽減作用が消失したという結果である(図 1、3 GdCl₃)。この結果は、IP による肝細胞保護作用が Kupffer 細胞を介して発現していることを示唆するものであり、同様の立場では、Kupffer 細胞が heme oxygenase-1 (HO-1)の誘導を介して虚血再灌流障害に対し肝細胞保護的に働いているという報告がある[44, 48, 49]。我々は、Kupffer 細胞の ROS 産生に着目し、更に IP の機序解明を進めた。虚血再灌流障害において、Kupffer 細胞や好中球により産生される細胞外 ROS およびミトコンドリアや xanthine oxidase により産生される細胞内 ROS は、いずれも肝細胞障害の要因として重要である[1, 2, 15]。一方で、oxidative stress が虚血再灌流障害に対する組織の虚血耐性誘導において重要な役割を担っていることを示す報告が散見される[50-52]。そこで、『IP における短時間の虚血再灌流によって、Kupffer 細胞が少量の ROS を産生し、この ROS を介してその後の温虚血再灌流障害に対する肝細胞保護作用が誘導されているのではないか』という仮説を立てた。

この仮説を検証するため、まず、IP において Kupffer 細胞が ROS を産生しているか否かを、我々の研究室において開発した *in situ* での ROS 産生の評価法である NBT 灌流

法[33, 34]を用いて検討した。NBT は ROS と反応し不溶性の青い formazan 沈着を生じ、肝においてとりわけ Kupffer 細胞の ROS 産生を顕微鏡下に組織切片で簡便に捉えることが可能となる。長時間の虚血再灌流において Kupffer 細胞が ROS を産生することは知られているが[10, 53, 54]、本検討では(図 5)に示すように、NBT 灌流法によって、10 分間という短時間の虚血後再灌流において、無処置ラットの肝組織では認められなかった formazan 沈着が生じることを初めて捉え、IP において Kupffer 細胞が ROS を産生していることが確認された。

次に、IP の肝保護作用への ROS の関与を検討した。3 種類の ROS 除去剤：NAC、SOD、および catalase を用いて、IP すなわち 10 分間の虚血と再灌流で生じる ROS を除去したところ、いずれにおいても IP による温虚血再灌流障害に対する肝細胞保護作用が消失し(図 6)、IP の作用発現への ROS の関与が示唆された。Catalase の前投与では、温虚血再灌流後の ALT 活性上昇自体が有意ではないものの軽度低下していたが、これは、 H_2O_2 が虚血再灌流障害の一因であり[2, 37]、かつ catalase は静注後速やかに血中から肝細胞内に移行するため[55]、前投与された catalase が若干なりとも肝細胞内に残留し、後の虚血再灌流において H_2O_2 に起因した肝細胞障害に影響した可能性が考えられた。

Kupffer 細胞は、様々な刺激によって還元型 nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) oxidase の活性化を介して ROS を産生する[37, 56-58]。本研究では、NADPH oxidase の活性化をその特異的かつ可逆的阻害剤である DPI によって阻害したラットを用いて IP の効果を検討することにより、IP において NADPH oxidase が活性化しており、これが IP の作用発現に関与しているということを見出した(図 7)。以上の(図 5、6、

7)に示す結果から、IP による肝保護作用発現には、IP すなわち短時間の虚血再灌流において Kupffer 細胞の NADPH oxidase 活性化を介し産生された ROS が関与していることが示唆された。NADPH oxidase は、Kupffer 細胞膜上に存在し、そのマクロファージとしての主要な機能を果たす上で必要な ROS の産生と細胞外への放出を担う特異な酵素であり[59, 60]、NADPH oxidaseにより産生・放出された細胞外 ROS が IP の効果発現において重要な mediator であると考えられた。

ここまでの検討では、Kupffer 細胞、ROS、NADPH oxidase の抑制実験によって、IP の肝細胞保護作用へのそれぞれの関与が示唆される結果を得た。引き続いて、ROS の前投与によって、IP と同様に肝細胞保護作用が再現されるか否か試みた。Catalase による抑制実験の結果、および少量の oxidative stress という条件を考慮し、IP を施行する代わりに 0.5~1 mmol/L H₂O₂ 含有灌流液の短時間の前灌流によって preconditioning を試みたところ、1 mmol/L H₂O₂ の前灌流で IP と同様に温虚血再灌流後の肝細胞障害軽減作用が再現され、より高濃度 H₂O₂ の前灌流ではその後続く温虚血再灌流障害が増悪した(図 8)。以上の結果から、我々は、『IP の温虚血再灌流障害に対する肝細胞保護作用は、短時間の虚血再灌流によって Kupffer 細胞が NADPH oxidase 活性化により産生する ROS を介して発現している』、という結論に至った。更に、この ROS は、sublethal すなわち肝細胞障害の顕在化を来たさない一定の範囲内においてはじめて肝細胞保護作用を誘導し得るということが示唆された。

H₂O₂についても、近年、ROS の一種として病理学的意義のみならずその生理学的役

割が報告されている[61-63]。従って、前述の H₂O₂ による preconditioning の結果を踏まえ、*in vitro* で温虚血再灌流障害に対する肝細胞への H₂O₂ 前投与の直接作用について検討を進めた。初代培養肝細胞の温虚血再灌流障害は、広く認知されているモデルにならない[64, 65]、嫌気培養用 chamber による嫌気条件下の培養(anoxia)とそれに続く再酸素化(reoxygenation)によって再現し、再酸素化後の肝細胞の viability を propidium iodide fluorometry により経時的に算定した。Propidium iodide は、障害細胞の脆弱となった膜を透過し 2 本鎖 DNA に結合し[36]、その蛍光強度が LDH 逸脱の程度と直線的相関を示すため[66]、*in vitro* での肝細胞の虚血再灌流障害を評価し得る。本検討においても(図 9)に示すように、肝細胞の viability は、normoxia 条件下で培養した control に比して、anoxia によって緩徐に低下し、reoxygenation 後に急速かつ直線的に低下しており、anoxia/reoxygenation による肝細胞障害についての報告[65]と同様の結果であった。

この肝細胞障害に対し、0~1 mmol/L H₂O₂ による preconditioning を試みたが、いずれの濃度の H₂O₂ においても肝細胞の viability に有意な改善は認められなかった(図 9)。1 mmol/L H₂O₂ の 10 分間の前投与は、肝灌流系では温虚血再灌流後の肝細胞障害を軽減したが(図 8)、*in vitro* においては anoxia/reoxygenation 後の肝細胞の viability をより低下させる結果となった(図 9)。培養肝細胞は、*in vivo* 条件と異なり類洞構造が欠如していることから、H₂O₂ 暴露に対する耐性が低いとの報告がある[67-69]。従って、肝細胞保護作用を誘導し得る H₂O₂ 濃度が肝灌流系においてとは異なっていることも推察されたが、他方で、非細胞障害濃度の H₂O₂ 前投与には、培養肝細胞の温虚血再灌流障害に対す

る直接の保護誘導作用はなく、肝灌流系で認められた肝細胞保護作用は、実は Kupffer 細胞を介した作用であった可能性が考えられた。

そこで再度、 $GdCl_3$ によって Kupffer 細胞を抑制したラットを用いて、肝灌流系での H_2O_2 preconditioning による肝細胞保護作用発現への Kupffer 細胞の関与について検討した。結果は(図 10)に示すとおり、 H_2O_2 preconditioning による温虚血再灌流後の肝細胞障害軽減作用が Kupffer 細胞の抑制によって消失し、 H_2O_2 preconditioning の作用発現機序も、IP と同様に Kupffer 細胞を介したものであることが検証された。

Kupffer 細胞の形態変化、貪食能の増加は、それぞれ 0.7 mmol/L H_2O_2 で 10 分間の灌流、1 mmol/L H_2O_2 で 5 分間の灌流によって引き起こされ[69, 70]、*in vivo* では肝細胞に比して Kupffer 細胞の方が H_2O_2 に対する感受性が高いことが示唆される。本検討においては、NBT 灌流法により、 H_2O_2 preconditioning すなわち 1 mmol/L H_2O_2 で 10 分間の灌流によって ROS 産生が惹起されていることを初めて確認した(図 11 A、B)。この ROS 産生は、 $GdCl_3$ で Kupffer 細胞を抑制すると消失し(図 11 C)、前記の結果(図 10)とあわせ、 H_2O_2 preconditioning も Kupffer 細胞の ROS 産生を介して温虚血再灌流障害に対する肝細胞保護作用を誘導していることが示唆された。

最後に、NADPH oxidase の阻害によって、 H_2O_2 preconditioning における *in situ* での Kupffer 細胞の ROS 産生が消失し(図 11 D)、かつ温虚血再灌流障害に対する肝細胞保護作用も消失した(図 12)ことから、1 mmol/L、10 分間という少量短時間の H_2O_2 灌流による preconditioning は、IP においてと同様に、Kupffer 細胞の NADPH oxidase 活性化によ

り産生される ROS を mediator として温虚血再灌流障害を軽減していることが示唆された。本検討に用いた DPI は、NADPH oxidase の細胞基質側の構成部分に作用する可逆的な阻害剤であり[71]、H₂O₂ もまた灌流投与で細胞膜を透過し細胞内に移行するため[59, 72]、前灌流され Kupffer 細胞内に移行した H₂O₂ が NADPH oxidase に作用し細胞外 ROS を産生、この Kupffer 細胞の産生した細胞外 ROS こそが preconditioning の mediator となっていたという機序が考えられた。

近年、IP による温虚血再灌流障害軽減作用と NADPH oxidase (NOX) isoforms の活性化との関連に着目した動物モデルでの検討から、IP は温虚血再灌流後の NOX2 蛋白発現を抑制し温虚血再灌流障害を軽減するが、NOX4 蛋白の発現は不変であり、NOX4 の発現抑制による更なる障害軽減の可能性が示唆されている[58]。IP における短時間虚血再灌流時の NOX 活性化と sublethal な ROS 産生が、IP の温虚血再灌流障害軽減作用を誘導しているという我々の検討結果とあわせると、IP は、短時間虚血再灌流という刺激によって、その後の長時間虚血再灌流に対して肝細胞保護に働く種々シグナル伝達系を惹起する trigger たり得るが、虚血再灌流後に抑制すべき障害因子は多岐にわたると考えられ、虚血再灌流障害自体の更なる機序解明も必要と考えられる。IP は、しかし現在においても、虚血再灌流障害軽減のための最も広く認知されている探求的手法[15]であり、これは、IP という現象を解明することが、広く oxidative stress と生体防御機構の解明に繋がると期待されているからとも考えられる。

本研究は、温虚血再灌流障害に対する肝細胞保護作用が、Kupffer 細胞の NOX 活

性化により産生される sublethal ROS を介して発現することを見出した。そして、この作用は、IP すなわち短時間の虚血再灌流という刺激によっても、少量短時間の H₂O₂ 灌流による preconditioning によっても誘導された。H₂O₂ preconditioning は肝細胞への直接作用かとも推測されたが、検討の結果 Kupffer 細胞を介した肝細胞保護作用の誘導と結論された。一般に、Kupffer 細胞およびその活性化により惹起される oxidative stress は虚血再灌流障害の増悪因子と考えられているが[2, 9, 15]、本研究結果は、肝細胞障害を来たさない限定された範囲内の ROS は、むしろその後の温虚血再灌流障害に対する肝細胞の耐性誘導において不可欠な役割を担っていることを示唆するものであった。これが、我々の解明し得た IP の機序であり、このような肝細胞保護作用を誘導するためには、Kupffer 細胞の活性化とその ROS 産生を、本来の肝レジデントマクロファージとしての定常状態から細胞障害を来たすレベル[54]までの間でいかに厳密に制御するかが重要と考えられた。

本研究のみでは、ROS 相互の複雑な連鎖反応まで考慮すると、どの種類の ROS が主に IP の作用発現に寄与しているのかを特定するのは難しいと考えられるが、抑制実験で用いた NAC は細胞内外のフリーラジカル除去剤であること[73]、SOD は細胞外の superoxide anions すなわち活性酸素ラジカルを H₂O₂ と O₂ に分解・除去すること[74]、また NOX も primary には活性酸素ラジカルを生成すること[59, 60]からは、Kupffer 細胞の産生した細胞外の活性酸素ラジカルを含むフリーラジカルが作用発現に不可欠なのかも知れない。細胞外フリーラジカルは H₂O₂ と異なり、細胞膜を透過せず[59, 72]、膜の脂質二重層に対して直接の酸化作用を持つ[75]。肝類洞構造を鑑みると、IP において Kupffer

細胞により産生されたフリーラジカルと、類洞内皮細胞ないし肝細胞膜の脂質過酸化、そして最終的な効果発現細胞である肝細胞内におけるシグナル伝達との関連について、更なる検討が必要と考えられる。

IP によって惹起される、虚血再灌流障害軽減に寄与する肝細胞内のシグナル伝達経路については、現在までに、adenosine 2A receptor を介した[18, 76]、nuclear factor kappa B (NF-kappaB)および p38/mitogen-activated protein kinase (MAPK)カスケードの活性化[77, 78]、また、phosphoinositide 3-kinase (PI3K)-protein kinase B (PKB)/Akt pathway の活性化[79]など、いずれも細胞外の種々の刺激によって cAMP 反応性に活性化される経路の関与が示されている。従来、温虚血再灌流および冷虚血再灌流障害モデルでの検討から、いずれのモデルにおいても肝細胞保護に寄与する機序として、ストレス応答蛋白(酵素)としての heme oxygenase-1 (HO-1) (heat shock protein 32)蛋白および HO-1 mRNA 誘導が報告されているが[80, 81]、IP の肝細胞保護作用においても HO-1 system の関与が示唆されている [55]。これらの検討から、種々の pharmacological preconditioning による虚血再灌流障害軽減が試みられているが、しかし、いずれも未だ可能性にとどまり、臨床応用に至っていないのが実情である[15, 48, 49]。このことは、肝虚血再灌流障害が非常に多因子の複合により成立しており[82]、単純な radical scavenger や単一のシグナル伝達系の制御のみでは、期待される軽減効果を得るのが困難であることを伺わせる。

肝虚血再灌流障害の成立が多因子の複合によるのと同様に、IP の肝保護作用発現

機序も multifactorial と考えられる[15]。肝移植前後のドナー肝における検討から、酸化ストレス・炎症・免疫応答などに関わる 57 遺伝子に、移植後すなわち虚血再灌流後の発現増加が認められ、術中 Pringle's maneuver を施行、すなわち 10 分間の IP を施行することにより、これらの発現増加の抑制と、細胞増殖や cell cycle 制御に関わる 43 遺伝子の発現増加が認められたとの報告もある[83]。IP の実際は、肝切除時に出血対策として施行されてきた術式である Pringle's maneuver と同様であり[21]、pharmacological preconditioning の確立を待たずに、"traditional" ischemic preconditioning と表現される[15]IP を広く施行すべきであろうか。しかし、IP はあくまで侵襲的手技でもあり、未知の機序が存している。また、障害軽減効果についても、未だ限界があるとされ[58]、確立された治療介入手技とまでは至っていない。

多因子が関与する IP の肝保護作用機序を更に解明し、pharmacological にもより広く虚血再灌流障害の軽減を目指す上で、最近、温・冷虚血再灌流障害モデルのいずれにおいても、抗酸化ストレス作用に関与する種々遺伝子ないし遺伝子産物(酵素)の発現を制御する転写因子 nuclear factor erythroid 2 p45-related factor 2 (Nrf2)の活性化、および Kelch-like ECH-associated protein 1 (Keap1)によるその制御機構である Nrf2-Keap1 system が注目されている[84-86]。フリーラジカルによる Keap1 不活化、それにより抑制が解除された Nrf2 の細胞核内移行と抗酸化酵素群の遺伝子発現の誘導は、前述の HO-1 誘導を含む多種遺伝子発現を制御するとされる[15, 85]。

本研究は、ラット肝温虚血再灌流障害モデルを用いて、IP の肝細胞保護作用発現機

序の trigger に関する新たな知見を見出したと言える。今後は、効果発現細胞である肝細胞における multi antioxidant pathways を制御する Nrf2-Keap1 system の、IP 作用への関与、および肝虚血再灌流障害自体への関与についての更なる検討により、IP の臨床応用と、虚血再灌流障害に対する IP を含めたより確実に包括的な治療法の確立が期待されるのではないかと考えられる。

おわりに

Ischemic preconditioning および少量短時間の H₂O₂ 前投与による肝の虚血再灌流障害軽減作用の機序は、いずれも Kupffer 細胞の NADPH oxidase により産生された ROS を介した作用であるということが本研究によって示された。H₂O₂ preconditioning の肝細胞への直接作用をとらえ、肝細胞におけるシグナル伝達につき検討することも期待されたが、H₂O₂ preconditioning の機序も ischemic preconditioning と同様に Kupffer 細胞を介した作用であるという結論に至った。翻って、これら preconditioning による肝の虚血耐性獲得の機序において、Kupffer 細胞の重要性が繰り返し示唆される結果が得られたと考えられる。加えて、本研究では preconditioning という現象を、Kupffer 細胞膜上であって、そのマクロファージとしての主要な機能を果たす上で重要かつ特異な酵素 NADPH oxidase に着目して検討することで、Kupffer 細胞によって産生される細胞外の ROS、とりわけ活性酸素ラジカルを含むフリーラジカルが重要なメディエーターであることを示唆する結果を得た。

酸化ストレスに対する生体防御機構と考えられる IP という現象の機序を解明することから、肝細胞の虚血再灌流障害に対する耐性誘導のみならず、酸化ストレスの関与する様々な障害に対する細胞保護作用の誘導機序解明、治療法の確立に資することができればと考えている。

参考文献

1. Serracino-Inglott F, Habib N, Mathie R. Hepatic ischemia-reperfusion injury. *Am J Surg* 181:160-6;2001.
2. Jaeschke H. Molecular mechanisms of hepatic ischemia-reperfusion injury and preconditioning. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 284:G15-26;2003.
3. Ploeg RJ, D'Alessandro AM, Knechtle SJ, Stegall MD, Pirsch JD, Hoffmann RM, Sasaki T, Sollinger HW, Belzer FO, Kalayoglu M. Risk factors for primary dysfunction after liver transplantation--a multivariate analysis. *Transplantation* 55:807-13;1993.
4. Lemasters JJ, Thurman RG. The many facets of reperfusion injury. *Gastroenterology* 108:1317-20;1995.
5. Strasberg SM, Howard TK, Molmenti EP, Hertl M. Selecting the donor liver: risk factors for poor function after orthotopic liver transplantation. *Hepatology* 20:829-38;1994.
6. Burkea A, Lucey MR. Non-Alcoholic Fatty Liver Disease, Non-Alcoholic Steatohepatitis and Orthotopic Liver Transplantation. *Am J Transplant* 4:686-93;2004.
7. Chen H, Zhang T, Zhou L, Xie HY, Zhang SS. Role of basic studies in expanding the donor pool for liver transplantation. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 7:571-80;2008.
8. Caldwell-Kenkel JC, Currin RT, Tanaka Y, Thurman RG, JJ L. Reperfusion injury to endothelial cells following cold ischemic storage of rat livers. *Hepatology* 10:292-9;1989.
9. Lemasters JJ, Thurman RG. Reperfusion injury after liver preservation for transplantation. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 37:327-38;1997.
10. Mochida S, Arai M, Ohno A, Masaki N, Ogata I, Fujiwara K. Oxidative stress in hepatocytes and stimulatory state of Kupffer cells after reperfusion differ between warm and cold ischemia in rats. *Liver* 14:234-40;1994.
11. Ikeda T, Yanaga K, Kishikawa K, Kakizoe S, Shimada M, Sugimachi K. Ischemic injury in liver transplantation: difference in injury sites between warm and cold ischemia in rats. *Hepatology* 16:454-61;1992.
12. Marzi I, Cowper K, Takei Y, Lindert K, Lemasters JJ, Thurman RG. Methyl palmitate prevents Kupffer cell activation and improves survival after orthotopic liver transplantation in rats. *Transpl Int* 4:215-20;1991.
13. Jaeschke H, Farhood A. Neutrophil and Kupffer cell-induced oxidant stress and ischemia-reperfusion injury in rat liver. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 260:G355-62;1991.
14. Perry BC, Soltys D, Toledo AH, Toledo-Pereyra LH. Tumor necrosis factor-alpha in liver ischemia/reperfusion injury. *J Invest Surg* 24:178-88;2011.

15. Jaeschke H, Benjamin LW. Current strategies to minimize hepatic ischemia-reperfusion injury by targeting reactive oxygen species. *Transplant Rev* 26:103-14;2012.
16. Murry CE, Jennings RB, Reimer KA. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation* 74:1124-36;1986.
17. Arai M, Thurman RG, Lemasters JJ. Contribution of adenosine A(2) receptors and cyclic adenosine monophosphate to protective ischemic preconditioning of sinusoidal endothelial cells against Storage/Reperfusion injury in rat livers. *Hepatology* 32:297-302;2000.
18. Arai M, Tejima K, Ikeda H, Tomiya T, Yanase M, Inoue Y, Nagashima K, Nishikawa T, Watanabe N, Omata M, Fujiwara K. Ischemic preconditioning in liver pathophysiology. *J Gastroenterol Hepatol* 22:S65-7;2007.
19. Adam AN. Some mechanisms of the protective effect of ischemic preconditioning on rat liver ischemia-reperfusion injury. *Int J Gen Med* 7:483-9;2014.
20. Cleveland JC, Jr., Raeburn C, Harken AH. Clinical applications of ischemic preconditioning: from head to toe. *Surgery* 129:664-7;2001.
21. Imamura H, Takayama T, Sugawara Y, Kokudo N, Aoki T, Kaneko J, Matsuyama Y, Sano K, Maema A, Makuuchi M. Pringle's manoeuvre in living donors. *Lancet* 360:2049-50;2002.
22. Clavien PA, Selzner M, Rudiger HA, Graf R, Kadry Z, Rousson V, Jochum W. A prospective randomized study in 100 consecutive patients undergoing major liver resection with versus without ischemic preconditioning. *Ann Surg* 238:843-50; discussion 851-2;2003.
23. Arkadopoulos N, Kostopanagiotou G, Theodoraki K, Farantos C, Theodosopoulos T, Stafyla V, Vassiliou J, Voros D, Pafiti A, Smyrniotis V. Ischemic preconditioning confers antiapoptotic protection during major hepatectomies performed under combined inflow and outflow exclusion of the liver. A randomized clinical trial. *World J Surg* 33:1909-15;2009.
24. Franchello A, Gilbo N, David E, Ricchiuti A, Romagonoli R, Cerutti E, Salizzoni M. Ischemic preconditioning (IP) of the liver as a safe and protective technique against ischemia/reperfusion injury (IRI). *Am J Transplant* 9:1629-39;2009.
25. Arai M, Thurman RG, Lemasters JJ. Involvement of Kupffer cells and sinusoidal endothelial cells in ischemic preconditioning to rat livers stored for transplantation. *Transplant Proc* 31:425-7;1999.
26. Arai M, Thurman RG, Lemasters JJ. Ischemic preconditioning of rat livers against cold storage-reperfusion injury: role of nonparenchymal cells and the phenomenon of heterologous preconditioning. *Liver Transpl* 7:292-9;2001.
27. Lloris-Carsi JM, Cejalvo D, Toledo-Pereyra LH, Calvo MA, Suzuki S. Preconditioning: effect upon lesion modulation in warm liver ischemia. *Transplant*

- Proc* 25:3303-4;1993.
28. Peralta C, Closa D, Xaus C, Gelpi E, Rosello-Catafau J, Hotter G. Hepatic preconditioning in rats is defined by a balance of adenosine and xanthine. *Hepatology* 28:768-73;1998.
 29. Clavien PA, Yadav SS, Sindram D, Bentley RC. Protective effects of ischemic preconditioning for liver resection performed under inflow occlusion in humans. *Annals of Surgery* 232:155-62;2000.
 30. Boyko VV, Pisetska ME, Tyshchenko OM, Skoryi DI, Kozlova TV, Gorgol NI, Volchenko IV. Role of ischemic preconditioning in hepatic ischemia-reperfusion injury. *Hepatobiliary Surg Nutr* 3:179-84;2014.
 31. Hardonk MJ, Dijkhuis FW, Hulstaert CE, Koudstaal J. Heterogeneity of rat liver and spleen macrophages in gadolinium chloride-induced elimination and repopulation. *J Leukoc Biol* 52:296-302;1992.
 32. Hasegawa T, Kikuyama M, Sakurai K, Kambayashi Y, Adachi M, Saniabadi AR, Kuwano H, Nakano M. Mechanism of superoxide anion production by hepatic sinusoidal endothelial cells and Kupffer cells during short-term ethanol perfusion in the rat. *Liver* 22:321-9;2002.
 33. Mochida S, Ogata I, Ohta Y, Yamada S, Fujiwara K. In situ evaluation of the stimulatory state of hepatic macrophages based on their ability to produce superoxide anions in rats. *J Pathol* 158:67-71;1989.
 34. Tejima K, Arai M, Ikeda H, Tomiya T, Yanase M, Inoue Y, Nagashima K, Nishikawa T, Watanabe N, Omata M, Fujiwara K. Ischemic preconditioning protects hepatocytes via reactive oxygen species derived from Kupffer cells in rats. *Gastroenterology* 127:1488-96;2004.
 35. Seglen PO. Preparation of isolated rat liver cells. *Methods Cell Biol* 13:29-83;1976.
 36. Trost LC, Lemasters JJ. A cytotoxicity assay for tumor necrosis factor employing a multiwell fluorescence scanner. *Anal Biochem* 220:149-53;1994.
 37. Rymsa B, Wang JF, de Groot H. O₂⁻ release by activated Kupffer cells upon hypoxia-reoxygenation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 261:G602-7;1991.
 38. Tejima K, Arai M, Ikeda H, Tomiya T, Yanase M, Inoue Y, Nishikawa T, Watanabe N, Ohtoma N, Omata M, Fujiwara K. Induction of ischemic tolerance in rat liver via reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase in Kupffer cells. *World J Gastroenterol* 13:5071-8;2007.
 39. Eriksson S, Fraser JR, Laurent TC, Pertoft H, Smedsrod B. Endothelial cells are a site of uptake and degradation of hyaluronic acid in the liver. *Exp Cell Res* 144:223-8;1983.
 40. Peralta C, Prats N, Xaus C, Gelpi E, Rosello-Catafau J. Protective effect of liver ischemic preconditioning on liver and lung injury induced by hepatic ischemia-reperfusion in the rats. *Hepatology* 30:1481-9;1999.

41. Von Frankenberg M, Golling M, Mehrabi A, Nentwich H, Klar E, Kraus TW. Donor pretreatment with gadolinium chloride improves early graft function and survival after porcine liver transplantation. *Transpl Int* 16:806-13;2003.
42. Cywes R, Mullen JB, Stratis MA, Greig PD, Levy GA, Harvey PR, Strasberg SM. Prediction of the outcome of transplantation in man by platelet adherence in donor liver allografts. Evidence of the importance of prepreservation injury. *Transplantation* 56:316-23;1993.
43. Arai M, Mochida S, Ohno A, Fujiwara K. Blood coagulation in the hepatic sinusoids as a contributing factor in liver injury following orthotopic liver transplantation in the rats. *Transplantation* 62:1398-401;1996.
44. Kobayashi T, Hirano K, Yamamoto T, Hasegawa G, Hatakeyama K, Suematsu M, Naito M. The protective role of Kupffer cells in the ischemia-reperfused rat liver. *Arch Histol Cytol* 65:251-61;2002.
45. Imamura H, Sutto F, Brault A, Huet PM. Role of Kupffer cells in cold ischemia/reperfusion injury of rat liver. *Gastroenterology* 109:189-97;1995.
46. Schauer RJ, Bilzer M, Kalmuk S, Gerbes AL, Leiderer R. Microcirculatory failure after rat liver transplantation is related to Kupffer cell-derived oxidant stress but not involved in early graft dysfunction. *Transplantation* 72:1692-9;2001.
47. Hines IN, Hoffman JM, Scheerens H, Day BJ, Harada H, Pavlick KP, Bharwani S, Wolf R, Gao B, Flores S, McCord JM, Grisham MB. Regulation of postischemic liver injury following different durations of ischemia. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 284:G536-45;2003.
48. Wang C, Wang Z, Tao S. Preconditioning donor liver with *Nodosin* perfusion lessens rat ischemia reperfusion injury via heme oxygenase-1 upregulation. *J Gastroenterol Hepatol* 27:832-40;2012.
49. Wu CW, Yu J. Heme oxygenase-1 induction: the anti-inflammatory regime in organ transplant. *J Gastroenterol Hepatol* 27:621-2;2012.
50. Das DK, Maulik N, Sato M, Ray PS. Reactive oxygen species function as second messenger during ischemic preconditioning of heart. *Mol Cell Biochem* 196:59-67;1999.
51. Zahler S, Kupatt C, Becker BF. Endothelial preconditioning by transient oxidative stress reduces inflammatory responses of cultured endothelial cells to TNF-alpha. *FASEB J* 14:555-64;2000.
52. Sindram D, Rudiger HA, Upadhyya AG, Strasberg SM, Clavien PA. Ischemic preconditioning protects against cold ischemic injury through an oxidative stress dependent mechanism. *J Hepatol* 36:78-84;2002.
53. Jaeschke H, Bautista AP, Spolarics Z, Spitzer JJ. Superoxide generation by Kupffer cells and priming of neutrophils during reperfusion after hepatic ischemia. *Free Radic Res Commun* 15:277-84;1991.

54. Jaeschke H, Ramachandran A. Reactive oxygen species in the normal and acutely injured liver. *J Hepatol* 55:227-8;2011.
55. Schauer RJ, Gerbes AL, Vonier D, op den Winkel M, Fraunberger P, Bilzer M. Induction of cellular resistance against Kupffer cell-derived oxidant stress: a novel concept of hepatoprotection by ischemic preconditioning. *Hepatology* 37:286-95;2003.
56. Kono H, Rusyn I, Uesugi T, Yamashina S, Connor HD, Dikalova A, Mason RP, Thurman RG. Diphenyleneiodonium sulfate, an NADPH oxidase inhibitor, prevents early alcohol-induced liver injury in the rat. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 280:G1005-12;2001.
57. Cross AR, Segal AW. The NADPH oxidase of professional phagocytes-prototype of the NOX electron transport chain systems. *Biochim Biophys Acta* 1657:1-22;2004.
58. Garab D, Fet N, Szabo A, Tolba RH, Boros M, hartmann P. Remote ischemic preconditioning differentially affects NADPH oxidase isoforms during hepatic ischemia-reperfusion. *Life Sci* 105:14-21;2014.
59. Forman HJ, Torres M. Reactive oxygen species and cell signaling: respiratory burst in macrophage signaling. *Am J Respir Crit Care Med* 166:S4-8;2002.
60. Lassegue B, Clempus RE. Vascular NAD(P)H oxidases: specific features, expression, and regulation. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 285:R277-97;2003.
61. Suzuki YJ, Forman HJ, Sevanian A. Oxidants as stimulators of signal transduction. *Free Radic Biol Med* 22:269-85;1997.
62. Rojkind M, Dominguez-Rosales JA, Nieto N, Greenwel P. Role of hydrogen peroxide and oxidative stress in healing responses. *Cell Mol Life Sci* 59:1872-91;2002.
63. Maemura K, Zheng Q, Wada T, Ozaki M, Takao S, Aikou T, Bulkley GB, Klein AS, Sun Z. Reactive oxygen species are essential mediators in antigen presentation by Kupffer cells. *Immunol Cell Biol* 83:336-43;2005.
64. Carini R, De Cesaris MG, Splendore R, Vay D, Domenicotti C, Nitti MP, Paola D, Pronzato MA, Albano E. Signal pathway involved in the development of hypoxic preconditioning in rat hepatocytes. *Hepatology* 33:131-9;2001.
65. Kim JS, Qian T, Lemasters JJ. Mitochondrial permeability transition in the switch from necrotic to apoptotic cell death in ischemic rat hepatocytes. *Gastroenterology* 124:494-503;2003.
66. Nieminen AL, Gores GJ, Bond JM, Imberti R, Herman B, Lemasters JJ. A novel cytotoxicity screening assay using a multiwell fluorescence scanner. *Toxicol Appl Pharmacol* 115:147-55;1992.
67. Karbowski M, Kurono C, Nishizawa Y, Horie Y, Soji T, Wakabayashi T. Induction of megamitochondria by some chemicals inducing oxidative stress in primary cultured rat hepatocytes. *Biochim Biophys Acta* 1349:242-50;1997.

68. Halliwell B, Clement MV, Long LH. Hydrogen peroxide in the human body. *FEBS Lett* 486:10-3;2000.
69. Cogger VC, Mross PE, Hosie MJ, Ansselin AD, McLean AJ, Le Couteur DG. The effect of acute oxidative stress on the ultrastructure of the perfused rat liver. *Pharmacol Toxicol* 89:306-11;2001.
70. Petermann H, Ludicke U, Nothnagel T, Dargel R. Differential effects of exogenous and endogenously generated H₂O₂ on phagocytic activity and glucose release of normal and cirrhotic livers. *J Hepatol* 28:461-70;1998.
71. Cross AR, Jones OT. The effect of the inhibitor diphenylene iodonium on the superoxide-generating system of neutrophils. Specific labelling of a component polypeptide of the oxidase. *Biochem J* 237:111-6;1986.
72. Halliwell B. Reactive oxygen species in living systems: source, biochemistry, and role in human disease. *Am J Med* 91:14S-22S;1991.
73. Nakano H, Boudjema K, Alexandre E, Imbs P, Chenard MP, Wolf P, Cinqualbre J, Jaeck D. Protective effects of N-acetylcysteine on hypothermic ischemia-reperfusion injury of rat liver. *Hepatology* 22:539-45;1995.
74. Hussain MZ, Watson JA, Bhatnagar RS. Increased prolyl hydroxylase activity and collagen synthesis in hepatocyte cultures exposed to superoxide. *Hepatology* 7:502-7;1987.
75. Kuhn H, Borchert A. Regulation of enzymatic lipid peroxidation: the interplay of peroxidizing and peroxide reducing enzymes. *Free Radic Biol Med* 33:154-72;2002.
76. Hart ML, Much C, Gorzolla IC, Schittenhelm J, Kloor D, Stahl GL, Eltzhig HK. Extracellular adenosine production by ecto-5'-nucleotidase protects during murine hepatic ischemic preconditioning. *Gastroenterology* 135:1739-50;2008.
77. Serafin A, Fernandez-Zabalegui L, Prats N, Wu ZY, Rosello Catafau J, Peralta C. Ischemic preconditioning: tolerance to hepatic ischemia-reperfusion injury. *Histol Histopathol* 19:281-89;2004.
78. Teoh N, Dela Pena A, Farrell G. Hepatic ischemic preconditioning in mice is associated with activation of NF-kappaB, p38 kinase, and cell cycle entry. *Hepatology* 36:94-102;2002.
79. Dal Ponte C, Alchera E, Follenzi A, Imarisio C, Prat M, Carini R. Pharmacological preconditioning protects against hepatic ischemia/reperfusion injury. *Liver Transpl* 17:474-82;2011.
80. Tsuchihashi S, Fondevila C, Kupiec-Weglinski JW. Heme oxygenase system in ischemia and reperfusion injury. *Ann Transplant* 9:84-7;2004.
81. Schmidt R, Tritschler E, Hoetzel A, Loop T, Humar M, Halverscheid L, Geiger KK, Pannen BH. Heme oxygenase-1 induction by the clinically used anesthetic isoflurane protects rat livers from ischemia/reperfusion injury. *Ann Surg* 245:931-42;2007.
82. de Rougemont O, Lehmann K, Clavien PA. Preconditioning, organ preservation, and

- postconditioning to prevent ischemia-reperfusion injury to the liver. *Liver Transpl* 15:1172-82;2009.
83. Jassem W, Fuggle S, Thompson R, Arno M, Taylor J, Byrne J, Heaton N, Rela M. Effect of ischemic preconditioning on the genomic response to reperfusion injury in deceased donor liver transplantation. *Liver Transpl* 15:1750-65;2009.
84. Baird L, Dinkova-Kostova AT. The cytoprotective role of the Keap1-Nrf2 pathway. *Arch Toxicol* 85:241-72;2011.
85. Klaassen CD, Reisman SA. Nrf2 the rescue: effects of the antioxidative/electrophilic response on the liver. *Toxicol Appl Pharmacol* 244:57-65;2010.
86. Kensler TW, Wakabayashi N, Biswal S. Cell survival responses to environmental stresses via the Keap1-Nrf2-ARE pathway. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 47:89-116;2007.