



ラット障害肝における酸素および糖利用障害とATP産生能低下について

松井, 悦郎

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

1991-08-07

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

乙1566

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D2001566>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



氏名・(本籍)	まつ い えつ お 松 井 悦 郎 (大阪府)
博士の専攻 分野の名称	博士 (医学)
学位記番号	博ろ第1263号
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位授与の日付	平成3年8月7日
学位論文題目	ラット障害肝における酸素および糖利用障害とATP産生能低下について

審査委員	主査 教授 斎藤 洋一
	教授 尾原 秀史 教授 千葉 勉

論文内容の要旨

I はじめに

肝障害の程度や予備能は肝胆道系の手術は勿論のこと、肝に直接侵襲を加えない手術においても、術前術後管理や予後との関連で問題となる。閉塞性黄疸は percutaneous transhepatic cholangio-drainage (PTCD) の進歩で減黄効果が容易に得られるようになったが、それでも高度閉塞性黄疸による重症肝障害時の病態解明は、PTCD後の根治手術の適応や時期の決定あるいは術前術後管理法の選択において不可欠である。一方、肝硬変は本邦における肝癌症例や食道静脈瘤の大部分に合併するため、肝切を含む手術侵襲に対する予備能とも関連して、肝硬変時の代謝的变化を知ることは重要である。

今回、著者らはラットで閉塞性黄疸や硬変肝を作成し、分離ミトコンドリアや分離灌流肝を用い、その酸素消費やミトコンドリア機能および糖利用について検討し、基本的には両病態が似た動態を示すことを認めたので、両者を併せて障害肝の代謝的变化として報告する。

II 材料並びに方法

1. 実験動物の作成

閉塞性黄疸モデルは、体重200g前後の Wistar 系雄性ラットの総胆管を結紮切離し、2週間経過後に用いた。また肝硬変モデルは、ラットに滅菌精製した4% thioacetamide (以下TAA) 水溶液の200mg/kgを週3回、連続10週腹腔内投与により作成した。対照には同週齢の Wistar 系雄性ラットを用いた。

2. 肝グリコーゲン量およびアデニンヌクレオチド量の測定
3. 肝ミトコンドリア分離とその機能、およびチトクローム量の測定
4. 肝灌流実験

- (i) 肝灌流方法

摘出肝の灌流は、門脈を流入経路 (afferent)、肝静脈を経て下大静脈を流出経路 (efferent) として肝を分離し、測定項目により循環式灌流および flow-through 法を使い分けた。

- (ii) 灌流肝より放出 glucose 量の測定

灌流開始30分後にグリカゴン 1×10^{-9} M および $\text{Br}^2\text{-c-AMP}$ 1×10^{-6} M を投与し、肝より灌流液中へのグルコース放出を5分おきに測定した。

- (iii) 酸素消費とチトクローム酸化還元状態の測定

肝の酸素消費の測定は、灌流肝の門脈側と肝静脈側に酸素電極を置き、酸素分圧を測定し、その両者の酸素分圧の差、流速、肝重量より計算し求めた。また 1×10^{-7} M ノルエピネフリン投与時の酸素消費量を測定し、負荷前値よりの増加率を計算し求めた。

肝チトクロームの酸化還元状態の測定には萩原式臓器反射スペクトル装置を灌流肝表面に置き測定した。測定条件としては95%酸素 bubble 下に流速を20ml/min, 10ml/min, 5 ml/min, 3 ml/minと変化させた時、あるいは供給酸素濃度を95%, 60%, 25%と変え、それぞれの条件下で流速を20, 10, 5, 3 ml/minと変化させた時の灌流肝のチトクロームの酸化還元状態を測定した。

5. 肝血流速の測定

針式の組織水素電極を肝に刺入し、水素クリアランス法にて測定した。

Ⅲ 実験結果

1. 肝グリコーゲン量

非絶食時の肝グリコーゲン量は、閉塞性黄疸ラット及び硬変肝ラットで有意な低値を示した。24時間絶食下の肝グリコーゲン量は、正常ラットにおいても減少を認めたが、それに比較しても両障害肝は、有意な低値を示した。

2. グルカゴンおよび $\text{Br}^2\text{-c-AMP}$ 負荷時の、ラット灌流肝のグルコース放出

非絶食時の正常肝では、グルカゴンあるいは $\text{Br}^2\text{-c-AMP}$ を負荷することにより、グルコースの放出は有意に増加を認めたが、閉塞性黄疸肝および硬変肝ではそのような増加は認められなかった (Fig 1)。

3. 肝 total adenine nucleotides 量

肝のATP量、total adenine nucleotides 量は、正常ラットに比べ閉塞性黄疸ラット及び硬変ラットで低値を示した (Fig 2)。

4. 肝ミトコンドリア機能

閉塞性黄疸ラット、硬変ラットでは、正常ラットに比べて、ADP/O比、RCR共に低値を示し

た (Fig 3)。

5. ラット肝ミトコンドリアのチトクローム含量

正常ラットと障害肝ラットで差を認めなかった。

6. ラット肝の酸素消費

硬変肝ラットでは正常ラットより有意に酸素消費の低下が認められた (Fig 4)。

7. ラット肝呼吸色素の酸化還元状態

灌流肝の流速と酸素化の濃度を同時に変えた時に肝が完全な酸化型を保ちうる限界は、閉塞性黄疸や硬変肝の方がより流速が速いか、酸素濃度が高い方向に移動した。

IV 考 察

障害肝におけるグリコーゲン貯留の状態を正常肝と比較したが、非絶食下における障害肝のグリコーゲン量は正常対照群の約半量であり、絶食下の正常肝よりは多く、また絶食下の比較でも障害肝のそれが対照群より有意に低かった。このことは障害肝といえどもグリコーゲンを合成しかつ利用しているが、その合成の程度は強く低下し、糖質としての貯蔵エネルギーは約半量になっていることが窺われた。

次に糖利用の状態を肝のみの代謝を知ることの出来る灌流肝を用いて追及した。正常ラットにおいてはグルカゴン、あるいは Cyclic AMP 負荷により十分量のグリコースの放出が見られ、しかもこのグリコース放出機構は肝グリコーゲン量の著明に減少した絶食時においても、量的には有意に減少するものの、なお保たれていた。一方、障害肝では非絶食下においても肝グリコーゲン量は正常群の24時間絶食時よりも多く存在するにもかかわらず、グルカゴン負荷にてグルコース放出がほとんど見られず、グルカゴン負荷に対する反応低下が明らかになった。

今回の成績はグルカゴンに対する肝細胞膜の感受性低下の結果と解釈することも可能である。しかし、同じ条件の灌流肝に Cyclic-AMP を負荷するとグルカゴン負荷の時と同様、閉塞性黄疸、硬変肝ともグルコース放出をほとんど認めなかったことは、閉塞性黄疸肝および硬変肝はともに肝細胞膜の障害だけでなく second messenger 以降の glycogenolysis の障害も加わっていることが明らかとなった。

つぎに障害肝のエネルギー代謝をミトコンドリア機能より考察を加えた。

今回、著者らの閉塞性黄疸および硬変肝ラットの肝ミトコンドリアにおいて、両者とも同じように、未だチトクローム量まで変化がない時期に既に ADP/O比、RCRが低下し、その結果としてアデニンヌクレオタイド量の減少がみられた。すなわち、両障害とも時期的には早期よりミトコンドリアにおける強いエネルギー産生能の障害が始まっており、臨床において指標とするチトクローム量に変化の生じる時は、既に予備能が中等度以上に低下していることが明らかになった。またその障害の生ずる機序も成因は異なってもmGOTの変化で示されるように、ミトコンドリア膜まで障害が及べば同程度であることを示唆している。

肝血流の成績で、両障害肝の血流は有意に低下していたので、閉塞性黄疸や硬変肝においては細胞

膜やミトコンドリア自体の障害に血流の変化が加わって、エネルギー産生能を低下させたと思われる。

また、肝外シャントの存在による影響を除外出来る単離灌流肝を用いて灌流流量を一定にして、障害肝と正常対照肝の酸素消費量を比較すると、酸素消費量は黄疸だけでは有意な減少とはならなかったものの、ノルエピネフリン投与時の変化率では低く、硬変肝ではノルエピネフリン投与の有無にかかわらず、いずれの場合も対照群より低かったことから肝内シャントによる血流低下も加わって酸素消費が減少したと考えられる。

障害肝においては正常肝で酸化状態を維持する流量から既に還元状態が始まり、また流速と灌流液酸素化の濃度を同時に変えると、肝が完全な酸化型を保ちうる限界は、障害肝でより速い流速か、高酸素濃度へ移行した。このことは障害肝では細胞障害の結果チトクローム自体が酸素化されにくい、肝内シャントのために有効肝血流量の低下のためか、あるいは両者の組み合わせが推測される。しかし、障害肝といえども著者らの条件ではチトクローム量の変化のないこと、さらに一般的にミトコンドリアは障害をうけATPを産生しにくくなっている状態でも酸素は同程度に利用していたことなどより、ATPを産生能の低下している障害肝でチトクロームが還元状態になりやすくなっていたことは、有効肝血流量低下による因子が大きいと思われる。したがって、肝外シャントなどにより門脈血流も低下する *in vivo* においては障害肝は酸素消費量も低下し、ますますチトクロームは還元状態になりやすくなるので、その様な患者の管理にあたって門脈血流を増加させるとともに血液中の酸素濃度を上げるために吸入酸素分圧を高くすることが望まれる。

V ま と め

閉塞性黄疸および硬変肝ラットを用い、糖利用、肝血流、酸素消費やミトコンドリア機能を検討し、閉塞性黄疸と硬変肝に共通の以下の結果を得た。

1. 障害肝ではグリコーゲン合成能が強く低下していた。
2. 障害肝ではグルカゴンおよび cyclic-AMP に対する反応性も低下しており、肝細胞膜の障害だけでなく second messenger 以後の glycogenolysis も障害されていた。
3. 障害肝では肝ミトコンドリアのチトクローム量の変化のない時期に既に、ミトコンドリア機能 (ADP/O, RCR) は低下しており、その結果としてアデニンヌクレオチド量の減少を認めた。
4. 障害肝では有効肝血流量が低下し、酸素消費量も減少していた。
5. 障害肝のチトクロームは酸素不足に対して、正常肝より容易に還元型となった。

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

本研究者はラットで閉塞性黄疸や硬変肝を作成し、分離ミトコンドリアや分離灌流肝を用い、その酸素消費やミトコンドリア機能および糖利用について検討し、障害肝の代謝的反応を知ることを目的として研究を行った。

閉塞性黄疸モデルは、体重200g前後の Wistar 系雄性ラットの総胆管を結紮切離し、2週間経過

後に用いた。また肝硬変モデルは体重200 g前後の Wistar 系雄性ラットに、4 % thioacetamide 水溶液の200mg/kgを週3回、連続10週腹腔内投与により作成した。

これらのモデルを用いて肝グリコーゲン量およびアデニンヌクレオチド量、肝ミトコンドリアのADP/O比、RCR、チトクローム量を測定し、さらに摘出肝を灌流し、これらの放出グルコース量、酸素消費とチトクロームの酸化還元状態の測定、肝血流量の測定を行った。

その結果、次の様な成績を得た。すなわち、

- (1) 障害肝ではグリコーゲン合成能が強く低下していた。
- (2) 障害肝ではグルカゴンおよび cyclic-AMP に対する反応性も低下しており、肝細胞膜の障害だけでなく、second messenger 以後の glycogenolysis も障害されていた。
- (3) 障害肝ミトコンドリアのチトクローム量の変化のない時期に既に、ミトコンドリア機能（ADP/O, RCR）は低下しており、その結果としてアデニンヌクレオチド量の減少を認めた。
- (4) 障害肝では有効肝血流量が低下し、酸素消費量も減少していた。
- (5) 障害肝のチトクロームは酸素不足に対して、正常肝より容易に還元型となった。

本研究では総胆管結紮による閉塞性黄疸および thioacetamide による肝硬変ラットを用いて、障害肝での代謝異常を種々の方法で観察しているが、グリコーゲン合成能の低下、グルカゴン、サイクリックAMPに対する反応性の低下による glycogenolysis の低下、ミトコンドリアの機能低下に基づくアデニンヌクレオチド量の減少、有効肝血流の低下による酸素消費量の低下などが明らかとなった。そして以上より本研究者は、障害肝においてはエネルギー源の投与とともに、有効肝血流量の増大対策と、十分な酸素管理が必要であることを強調している。

以上、本研究は閉塞性黄疸および肝硬変時の障害肝について、その代謝動態を研究したものであるが、従来ほとんど行われなかった肝細胞内セカンド・メッセンジャーの変動について重要な知見を得たものとして価値ある集積であると認める。

よって、本研究者は、博士（医学）の学位を得る資格があると認める。