Osaka University Knowledge Archive

Title	虚血肝における細胞質局在酵素の漏出機構 : blebの形成・崩壊に関連して
Author(s)	小関, 萬里
Citation	大阪大学, 1988, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/36718
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

Osaka University

【72】

氏名・(本籍)	小(こ)　関(せき)　萬(まさ)　里(と)
学位の種類	医　学　博　士
学位記番号	第　8371　号
学位授与の日付	昭和63年11月9日
学位授与の要件	学位規則第5条第2項該当
学位論文題目	**虚血肝における細胞質局在酵素の漏出機構－blebの形成・崩壊に関連して－**
論文審査委員	(主査) 教　授　川島　康生 (副査) 教　授　鎌田　武信　　教　授　田川　邦夫

論文内容の要旨

〔目　的〕

肝臓をはじめ重要臓器の虚血による細胞障害の指標として，細胞内酵素の血中漏出量が利用されている。我々は既に虚血肝において，細胞質局在酵素は虚血早期に漏出するのに対し，ミトコンドリア局在酵素は細胞が壊死した後にはじめて漏出し，その漏出量は細胞の壊死量を反映することを報告した。しかし虚血操作に伴う肝臓障害や移植肝のviabilityの判定をより早期に知るために重要と思われる細胞質局在酵素の漏出機構は未だ明らかでない。

本研究は，ラット灌流肝モデルを用いて，肝虚血早期に肝細胞膜に形成されたblebの遊離・崩壊が細胞質局在酵素の漏出と密接に関連していることを明らかにしようとするものである。

〔方法〕

実験は200g前後の雄性ＳＤ系ラットを用いた。虚血肝モデルは肝左外側葉を一定時間血流遮断することにより作成した。肝灌流はN_2：CO_2（95：5）ガスで平衡化したKrebs-Henseleit液で無酸素灌流した。灌流液の粘度は低分子デキストランの添加により調整し，灌流速度は任意に変化させた。ＡＳＴ（aspartate aminotransferase，ＧＯＴ），ＬＤＨ，Ｇ6Pase，ＤＮＡ，ＲＮＡ，蛋白量は既存の方法に従い，cＡＳＴ（細胞質局在ＡＳＴ）とmＡＳＴ（ミトコンドリア局在ＡＳＴ）は抗体法により分別した。燐脂質はロダン鉄錯体による比色法で，プリン代謝物は高速液体クロマトグラフィーを用いて測定した。また肝の形態を光顕像および電顕像にて観察した。

〔成績および考察〕

(1)　肝虚血によるbleb形成

肝を虚血にすると，10分以内に類洞に多数の球状体が認められた。これらは肝細胞から内皮細胞を越えて類洞内に突出したblebであることがわかった。電顕像によるとbleb中には比較的小さなオルガネラであるリボソームやＥＲは存在していたが，ミトコンドリアや核などの大きなオルガネラは認められなかった。

(2) 無酸素灌流下の細胞内成分の漏出様式

肝を無酸素下で灌流して細胞内成分の漏出を調べると，細胞質局在酵素であるｃＡＳＴは灌流後１時間より漏出し始め，３時間で細胞内含量の約70％が漏出した。ＬＤＨや細胞内可溶性蛋白の漏出も同様に認められたが，ＥＲやリボソームの構成成分であるＧ６Pase・ＲＮＡ・燐脂質の漏出は細胞質成分に比して少量であった。一方ＤＮＡやミトコンドリア局在酵素であるｍＡＳＴは灌流後４時間でも殆ど漏出しなかった。このように漏出する細胞成分がblebに含まれる成分と一致していたことは，少なくとも灌流開始３時間までの細胞質局在酵素の漏出がblebの遊離・崩壊によることを強く示唆している。

(3) 細胞質酵素の漏出は灌流液の流速及び粘度に依存する。

通常の緩衝液による灌流では，酸素供給のため門脈血流の約５倍程度の流速が用いられる。無酸素灌流で流速を血流程度にまで下げると，全くｃＡＳＴが漏出しないことが見い出だされた。流速を上げると漏出が始まり，しかもその漏出量が流速に比例することが明らかになった。一方in vivoでは灌流に比較して低流速であるにも拘らず，虚血解除後ｃＡＳＴは急速且つ大量に漏出する。灌流液と血液では粘度が大きく異なる点に注目して，灌流液にデキストランを加えて，その粘度を血液粘度の半分程度にまで高めると，灌流肝からの漏出パターンはin vivoに近づいた。流体の流速と粘度は外壁に与える応力を比例的に増すので，類洞内に突出したblebが血流の機械的な力により崩壊することが結論された。

〔総　　括〕

1. ラット虚血肝で生じるblebにはリボソームやＥＲなどの小器官を含む細胞質成分はみられるが，ミトコンドリア，核はみられなかった。
2. ３時間までの無酸素下灌流では細胞質に局在するｃＡＳＴ，ＬＤＨは灌流液中に漏出したが，ＤＮＡやミトコンドリアに局在するｍＡＳＴは漏出しなかった。
3. 細胞質局在酵素の漏出率は灌流速度や灌流液の粘度に依存していた。
4. 以上より細胞質局在酵素の血中漏出機構は虚血早期に肝細胞表面に生じたblebが血流の流体力学的な力により，機械的に遊離・崩壊するためであると結論される。

論文の審査結果の要旨

本研究は虚血肝細胞からの細胞質局在酵素漏出のメカニズムを，細胞生化学および，形態学の立場から明かにしたものである。

虚血下の臓器からは細胞内酵素が血中へ漏出するため，その漏出量は虚血障害の指標として利用されている。しかしながら，その障害過程において，細胞質局在酵素のような巨大分子が細胞外へ放出される機序は不明であった。

本研究では，虚血下で漏出した細胞質局在酵素が肝細胞表面に形成されたblebに含まれていること。および，そのblebが血流という機械的な力によって遊離・崩壊させられるために，細胞質局在酵素の漏出がおこることを生化学的測定と形態的所見から明かにした。

以上の結果は，細胞障害の指標としての漏出酵素量の測定に理論的根拠を与えるとともに，虚血細胞障害の生化学的過程の研究に大きな知見をもたらした。