



Title	虚血肝のミトコンドリア再酸素化障害に関する実験的研究
Author(s)	清水, 重臣
Citation	大阪大学, 1993, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/38559">https://hdl.handle.net/11094/38559</a>
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、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed</a> 大阪大学の博士論文について

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

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

The University of Osaka

氏 名 清 水 重 臣

博士の専攻分野の名称 博 士 (医 学)

学 位 記 番 号 第 1 0 8 7 1 号

学 位 授 与 年 月 日 平 成 5 年 7 月 1 日

学 位 授 与 の 要 件 学位規則第4条第2項該当

学 位 論 文 名 虚血肝のミトコンドリア再酸素化障害に関する実験的研究

論 文 審 査 委 員 (主査) 教 授 松田 晉

(副査) 教 授 鎌田 武信 教 授 岡本 光弘

## 論 文 内 容 の 要 旨

## [目 的]

臓器移植や一時的血行遮断を伴う手術時にみられる臓器障害の原因の一つとして、虚血後血流再開時に発生する再酸素化障害が肝において注目されているが、その障害機序の詳細は未だ明らかではない。本研究は、肝の再酸素化障害の標的器官として活性酸素の発生源の一つとされているミトコンドリアに着目し、酵素漏出の面から再酸素化障害の存在を明らかにし、さらにこの障害に関与するミトコンドリア内  $Ca^{2+}$  の影響、及びその機序を解明することを目的とした。

## [方法ならびに成績]

(1) 虚血肝再酸素化時のミトコンドリア障害

血清因子、炎症細胞の関与を排除するため、灌流肝を用いて実験を行った。灌流液中に漏出するミトコンドリア酵素 (mAST) は、細胞膜を経由するため、必ずしもミトコンドリアより漏出した量を反映しない。このためミトコンドリア障害の指標として、灌流液中の mAST/total AST (cAST+mAST) を用いた。60分間の無酸素灌流後に、無酸素灌流を継続する群と再酸素化灌流を行う群を作成し、細胞質酵素 (LDH, cAST) 漏出量と mAST/tAST を比較した。その結果、再酸素化灌流群は無酸素灌流継続群に比し細胞質酵素漏出量は有意に少なかったが、mAST/tAST は逆に前者で有意に高値を示した。

(2) ミトコンドリア再酸素化障害に与える  $Ca^{2+}$  の影響

ラット灌流肝に  $Ca^{2+}$  作動性ホルモン ( $1 \mu M$  noradrenaline (NOR) +  $10 nM$  glucagon (GLU)) や  $Ca^{2+}$  除去液を投与し、ミトコンドリア内  $Ca^{2+}$  量を増減させた後に、30分間の無酸素、30分間の再酸素化灌流を行い、経時に肝の一部よりミトコンドリア (Mt) 画分、細胞質 (cytosol) 画分を抽出した。各画分の mAST 量を測定し、mAST (cytosol)/mAST (total) より mAST 漏出量を評価した。ミトコンドリア内  $Ca^{2+}$  量を増加させた NOR+GLU 投与群の mAST 漏出量は無処置群に比し有意に大量であり、減少させた  $Ca^{2+}$  除去液投与群の mAST 漏出量は有意に少量であった。

### (3) 単離ミトコンドリアにおける検討

ラット肝より単離したミトコンドリアを用い、溶媒中の  $\text{Ca}^{2+}$  濃度を変化させ、30分間の無酸素に続く再酸素化を行った。その結果、ミトコンドリアより漏出した mAST 量は、溶媒中に  $\text{Ca}^{2+}$  を添加した群では有意に増加し、 $\text{Ca}^{2+}$  キレーターを添加した群では有意に減少した。

### (4) ミトコンドリア再酸素化障害の作用機序に関する検討

Cyclosporine A (CsA) がミトコンドリア内膜の透過性亢進を抑制する作用を有する薬剤であることは既に明らかである。ラット灌流肝、および単離ミトコンドリアを30分間無酸素にした後、再酸素化時に CsA 投与群と非投与群に分け、細胞質中あるいは medium 中に漏出した mAST 量を測定した。その結果、CsA 投与群の mAST 漏出量は非投与群に比し有意に抑制された。

#### [総括]

1. ラット灌流肝において、虚血後に再酸素化を行うと、ミトコンドリア酵素 (mAST) の漏出量は増加した。
2. 再酸素化時のミトコンドリア酵素漏出は、ミトコンドリアに対する  $\text{Ca}^{2+}$  負荷により増加し、 $\text{Ca}^{2+}$  除去により軽減した。
3. この再酸素化時のミトコンドリア酵素漏出は、再酸素化時の CsA の投与により抑制された。
4. 以上より、虚血肝においては、再酸素化時に  $\text{Ca}^{2+}$  依存性のミトコンドリア障害が発生し、その障害は内膜透過性亢進が関与すると推論される。

## 論文審査の結果の要旨

肝虚血障害の病態の一つとして、血流再開時の再酸素化障害の存在が報告されているが、その詳細は未だ不明である。本研究は、ミトコンドリアが活性酸素の発生源であることを着目し、再酸素化時のミトコンドリア障害を酵素漏出の面から検討したものである。

虚血肝を再酸素化すると、無酸素状態を継続するよりも大量の嘘 (mAST) がミトコンドリアから漏出した。また、ご再酸素化時の酵素漏出はミトコンドリアに対するカルシウム負荷により増加し、カルシウム除去により軽減した。さらに、ミトコンドリア内膜透過性亢進を抑制する薬剤であるサイクロスボリン A 投与により、再酸素化時の酵素漏出が抑制されたことより、本障害の発生機序には内膜透過性の亢進が関与しているものと考えられた。

これらの知見は、肝の再酸素化障害過程を知る上で有用であり、学位論文に値すると思われる。