The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Measurement of redox states of mitochondrial cytochrome aa3 in regions of liver lobule by reflectance microspectroscopy
Author(s)	陳, 声松
Citation	大阪大学, 1994, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/38893
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。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

氏　　名	陳（ちん）　声（せい）　松（しょう）
博士の専攻分野の名称	博　士（医　学）
学　位　記　番　号	第　11286　号
学位授与年月日	平成6年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学研究科内科系専攻
学　位　論　文　名	**Measurement of redox states of mitochondrial cytochrome aa_3 in regions of liver lobule by reflectance microspectroscopy** **（反射顕微分光分析法による肝小葉内チトクロームaa_3酸化還元レベルの解析）**
論　文　審　査　委　員	（主査） 教　授　鎌田　武信 （副査） 教　授　志賀　　健　　教　授　松沢　佑次

論　文　内　容　の　要　旨

【目的】

肝組織の酸素分圧と代謝は密接に関係している。肝小葉内の門脈域および中心静脈域ではその酸素分圧に差異があることがよく知られている。酸素分圧は門脈域では中心静脈域より約2倍高いことが報告されており，しかも，門脈域の酸素消費は中心静脈域より約2倍高いことも明らかになっている。この様に肝小葉内における酸素分圧の部位差は肝細胞代謝レベルの指標となりうると考えられ，その実測値は肝小葉内における細胞機能の部位差を表現する時に，重要な因子となると推測される。種々の肝細胞障害の発生に肝小葉内での酸素分圧の不均一が関与していることが推察されている。しかし，現在まで，比較的大きなスポット（直径>50μm）で肝酸素分圧の実測が行われてきたが，より微小な領域では未だ明らかにされていない。その原因は，肝小葉内の微小領域（20μm）における酸素分圧や肝細胞の酸化還元レベルを計測する手法がなかったからである。本研究の目的は，(1)肝実質細胞のミトコンドリア・チトクロームの反射スペクトル解析が可能な生体顕微分光分析装置を開発し，(2)肝小葉内の各微小部位の酸素分圧とチトクロームaa_3酸化還元レベルの関係を検討することである。

【方法】

1）肝灌流

SD系雄性飽食ラット（体重130－170g）の肝を，in situにて95%O_2＋5%CO_2で飽和したKrebs-Henseleit緩衝液（pH7.4，37℃）を用い，開放系回路・定圧で門脈より灌流し，流量が4ml／min／g liverとなるように門脈圧を設定した。流入液及び流出液中の酸素濃度はガルバニ型酸素電極を用いて経時的に測定した。流入液中酸素濃度は緩衝液を95%O_2＋5%CO_2及び95%N_2＋5%CO_2の混合比を変えて同時にbubblingすることによって可変とした。肝小葉内の門脈域及び中心静脈域各々の局所類洞内酸素濃度は，各々流入及び流出液中酸素濃度に等しいとした。

2）生体顕微分光分析装置によるチトクロームaa_3酸化還元レベルの計測

20倍対物レンズを用いる顕微鏡の接眼部と分光器・高感度フォトンカウンターを2本のライトガイド（径400μm）で直結した顕微分光分析装置を用い，肝表面上の2つの微小スポット（径20μm）からの反射スペクトルを同時にコンピュータで演算・記録した。CCDカメラから得られた顕微鏡像上で肝小葉の構造（肝細胞索や類洞など）が明瞭に観察され,肝小葉内門脈域・中心静脈域の同定を行い，測定部位の選択を行った。95%O_2＋5%CO_2飽和緩衝液で灌流したnormoxia時と，よりhypoxia時との差スペクトルを求め，603－630nmでの吸光度差$\triangle OD_{603-630}$からミ

トコンドリア・チトクロームaa_3の酸化還元レベルを求めた。

【結果】

生体顕微分光分析装置を用いて，酸素或は窒素で飽和した緩衝液で灌流した時肝表面任意の径20μmスポットから得られた反射スペクトルの差スペクトルに還元型チトクロームc_+c_1，b，aa_3の吸光peakが認められた。その吸光peakは酸素分圧の低下と共に増大し，酸素濃度が0の時に最大となった。酸素で飽和した緩衝液から窒素で飽和した緩衝液に切り替えると門脈域と中心静脈域各々の20μmスポットの吸光度差$OD_{603-630}$は同時に2分以内に最大となり，持続し，ハイドロサルファイトを添加しても最大値の変化はなかった。門脈域や中心静脈域での各々表面20μm径のスポットでのチトクロームaa_3酸化還元レベルと酸素分圧との関係はそれぞれの局所類洞内酸素濃度と逆S字状の関係を示し，チトクロームaa_3が50%還元される酸素濃度は門脈域より中心静脈域が低かった。酸素飽和緩衝液で灌流した時に，門脈域や中心静脈域における流量とチトクロームaa_3酸化還元レベルの関係は流量4 ml／min／g liver以上になると一定値であった。以上のように肝小葉内における一本の類洞に沿った門脈域から中心静脈域への酸化還元レベルの勾配が認められたが，その勾配は各類洞ごとに不均一であった。

【総括】

生体顕微反射分光分析方法により灌流肝小葉内20μmスポットでの酸化還元レベルの部位差の計測ができた。肝細胞内の酸素分圧は類洞に沿って門脈域から中心静脈域に向かい勾配があるが，その程度は各類洞間では不均一であった。従来，種々の肝病変で肝細胞障害の好発部位は例えば中心静脈域であっても，必ずしも一様でなく小葉内でも微小な部位により差があるとされてきたが，本研究により肝細胞内の微小部位について酸素分圧の面から解析が可能となった。

論文審査の結果の要旨

組織機能のmappingをするために，チトクロームの酸化還元レベルの微小スポットでの測定は重要である。本研究では顕微反射スペクトル分析装置を開発し，測定スポットを微小化し，反射スペクトルの解析を行った。ラット灌流肝小葉内の20μmスポットでも還元型チトクロームc_+c_1，b，aa_3の吸光peakが認められ，これらのpeakは灌流液中の酸素濃度の変化に応じて変化していた。門脈域や中心静脈域でのチトクロームaa_3酸化還元レベルは肝小葉内の酸素分圧の部位差をよく反映し，門脈域から中心静脈域へ向かう還元レベルの上昇がみられた。各部位のチトクロームaa_3酸化還元レベルとそれぞれの局所類洞内酸素濃度と密接な関係を示し，チトクロームaa_3が50%還元される酸素濃度は門脈域より中心静脈域が低かった。一方，門脈域から中心静脈域へ向かう肝細胞索の酸化還元レベルの勾配には同一肝小葉内でも類洞ごとに若干の差異があった。

本研究における顕微反射スペクトル分析装置による肝組織酸化還元レベルの研究は，二次元分布の研究及び肝病態生理メカニズムの解析など，貢献するところが多く，本論文は学位の授与に値すると考えられる。