

氏 名（本籍）
いま 今 いずみ 泉 しげ 茂 き 樹

学 位 の 種 類
医 学 博 士

学 位 記 番 号
医 第 1 6 6 2 号

学位授与年月日
昭 和 6 0 年 2 月 2 7 日

学位授与の要件
学位規則第 5 条第 2 項該当

最 終 学 歴
昭和 5 2 年 3 月
弘前大学医学部医学科卒業

学 位 論 文 題 目
低酸素脳における超微弱発光の検出

（主 査）

論文審査委員 教授 鈴 木 二 郎 教授 小 暮 久 也

教授 岩 崎 祐 三

論文内容要旨

目 的

虚血脳および低酸素脳における free radical 反応に伴う膜脂質過酸化の進展を調べるため、新しい方法として励起状態の分子が遷移する際の発光を検出することにより検討した。さらに、free radical 反応の発現がミトコンドリア呼吸鎖の電子の流れといかに関連するかの大要を知るため ATP, ADP, glucose, lactate, pyruvate などの経時的動態についても検討した。

方 法

実験動物としては雄 Wistar ラット (250~280 g) 142 匹を用いた。導入麻酔としてフローセンを使用し、pancuronium bromide (0.8 mg/kg) を静注した後、気管切開し人工呼吸を行った。低酸素負荷前および負荷後の動脈血ガスは O_2 ガスと N_2 ガスを調節混合して吸気させ、 PaO_2 110~140 mmHg, $PaCO_2$ 35~45 mmHg, MABP 100~140 mmHg の範囲に調節した。低酸素負荷は 4% O_2 96% N_2 混合ガスを瞬時に吸気させ、 PaO_2 17~22 mmHg の arterial hypoxemia を 5 分間負荷した。この際血圧を 100 mmHg 以上に保つため tidal volume を減じて $PaCO_2$ を 28~38 mmHg とした。脳試料採取の時点は pre-hypoxia, hypoxia 3 分, 5 分, POST-hypoxia 5 分, 30 分とし、Ponten らの freezing method により採取した。エネルギー代謝産物は酵素法により、超微弱発光は 500 mg 試料の 10 倍希釈ホモジネートからの発光を東北電子産業社製 Chemiluminescence analyzer OX-7 にて検出し、10 秒間ずつ 10 回の発光量の平均値を算出した。また Chemiluminescence スペクトル分析は、Post-hypoxia 5 分後の検体を空气中 35~36℃ の条件で発光量 3000 counts/30 sec.g 以上の時点で、東北大学電気通信研究所稲場研究室における装置を用いて分析した。

実 験 結 果

(1) Chemiluminescence 値 (発光量) : Pre-hypoxia の発光量は 0~50 counts/10 sec.g と低値を示し、hypoxia 3 分が 231 counts/10 sec.g ($n=5$), 5 分後が 154 counts/10 sec.g ($n=19$) と上昇し、post-hypoxia 5 分で 217 counts/10 sec.g ($n=9$) と上昇したが、30 分後には pre-hypoxia と同様の低値に復した。

(2) Chemiluminescence スペクトル分析 : スペクトルの peak は、480 nm, 520~530 nm, 570 nm, 620~640 nm, 680~700 nm の波長域に存在し、強度優位のものは 570 nm, 620~640 nm, 680~700 nm のものであった。一方、pre-hypoxic brain の試料では同様に空气中

35～36℃に加温しても40分～60分以内は発光増加が認められずスペクトル分析は出来なかった。

(3) エネルギー代謝：各測定値は5匹の測定値の平均値±標準誤差で示す。ATPは、負荷前 $2.44 \pm 0.33 \text{ mmol/kg}$ であが負荷中、負荷後ともに有意の減少を示さず、最低のpost-hypoxia 5分でも $2.31 \pm 0.07 \text{ mmol/kg}$ であった。ADPは負荷前が $0.280 \pm 0.007 \text{ mmol/kg}$ であったが、負荷中増加しhypoxia 5分で $0.445 \pm 0.020 \text{ mmol/kg}$ と最高値を示し、負荷後漸減した。pyruvateは負荷前で $0.084 \pm 0.003 \text{ mmol/kg}$ であったが、負荷により増加し、hypoxia 5分で $0.200 \pm 0.005 \text{ mmol/kg}$ を示したが負荷後漸減した。glucoseは、負荷前が $3.39 \pm 0.07 \text{ mmol/kg}$ であったが負荷中漸減しhypoxia 5分で $0.84 \pm 0.005 \text{ mmol/kg}$ まで低下し、post-hypoxia 5分で $4.71 \pm 0.08 \text{ mmol/kg}$ と最も高値を示し以後は漸減した。

考 察

Chemiluminescenceスペクトル分析により、この発光現象は脂質過酸化崩壊過程における励起状態分子が基底状態に遷移する際のエネルギー差を反映すると考えられた。一般に虚血脳におけるfree radical 反応開始の機序として次の事象が考えられる。①呼吸鎖末端の O_2 の減少により、呼吸鎖は過剰還元状態となる(electron pooling)。②このpoolingによりCytoplasmicなNADH, pyruvateなどの酸化が障害され、引いてはlactateの貯留を生じる。③electron poolingにより、呼吸鎖の一部から電子が漏出する。④electron poolingにより、電子の受容体を失ったsemiquinonが脂肪酸炭素鎖の二重結合部を攻撃し、protonationを引き起こす。⑤不完全虚血、血流再開あるいは低酸素状態から再酸素供給の時期、呼吸鎖はむしろ過剰酸化状態(電子の欠乏)になる。すなわち、酸化可能な基質が、細胞質内に蓄積し、呼吸鎖末端の O_2 は不完全還元を受け活性酸素を生じる。あるいはまた、Cytochrome a_3 と O_2 の接触にHeme鉄が関与することにより、oxygen metal complexが生じる機会も増大する。今回の低酸素脳の実験でも、以上の可能性が考えられた。

結 語

(1) ラット低酸素脳の試料における5分間負荷前後の超微弱発光量を経時的に測定し、正常脳と比較して低酸素脳では有意な発光量の増大が認められた。

(2) エネルギー代謝障害が、可逆的変化の範囲内にある低酸素脳では、エネルギー代謝の回復とともに発光量も低下し、正常に復する現象が認められた。

(3) Chemiluminescenceスペクトル分析より、発光機構は脂質過酸化崩壊過程における励起状態分子の遷移によるエネルギー収支によると考えられた。

審 査 結 果 の 要 旨

虚血脳あるいは低酸素脳において、種々の多価不飽和脂肪酸が増加することは知られており、膜脂質構造の破壊が、free radical 反応により惹起されることも考えられている。この生体膜リン脂質、不飽和脂肪酸の過酸化は酸素的反応あるいは非酸素的な自動酸化により進展し、生体膜の構造的破壊をもたらすと考えられている。しかし、これまでの脂質過酸化の検出法は主にTBAR（チオバルビツール酸法）によってなされており、同法では完全な *in vitro* の系においては信頼しうる反応を示したが、虚血脳など生体試料を用いた実験では研究者により差違がみられ、一定の見解が得られにくい状況にあった。

本論文において試みられた chemiluminescence 検出による脂質過酸化検出法は、これまで主に油脂食品の劣化などの研究に応用されてきたが、今回、脳梗塞の重要な病態の一つである低酸素状態の脳に応用し、エネルギー代謝との相関という観点から負荷前・負荷中・負荷後と経時的に検討した。その結果、低酸素脳において有意な発光現象が生じ、エネルギー代謝の障害が可逆的範囲内にある場合は、エネルギー代謝の回復とともに、発光量即ち過酸化反応も減弱することを確認した点で、脳梗塞臨床の面からも意味のある事象をとらえたものといえる。即ち虚血脳、低酸素脳において free radical 反応による脂質過酸化が進行することが確認できれば、治療の面からはラジカルスカベンジャーなどの投与の有効性が考慮される。又、本論文では chemiluminescence スペクトル分析により、この発光現象が脂質過酸化の崩壊過程において生じる励起状態分子の基底状態への遷移の際のエネルギー差がその本体であることをとらえた点で重要な意味を持つ。以上より、本論文が博士論文に値するものとする。