

学 位 論 文 題 名

Oxygen characteristics of rat cerebral tissue in situ

（ラット大脳組織の in situ での酸素特性についての研究）

学位論文内容の要旨

動物の脳にはエネルギー源となる物質の貯蔵が極めて少なく、その機能は高度に制御された脳循環を経由した基質（殆どグルコース）や酸素の供給に依存している。そのため、動物の脳を無傷のまま体全体の循環系から切り離し、人工的な外循環による灌流系として取り出し脳の機能を長時間維持することは今日においても非常に困難とされている。それ故、脳灌流法には、従来の脳波観測だけでなく、実時間で定量的に脳の状態を評価する方法が必要である。

チトクロームオキシダーゼは、ミトコンドリアの内膜に存在し、電子伝達系の末端酵素として、好気条件下の酸素消費にかかわるエネルギー代謝の中心的な役割を担っている。ヘム（heme $a+a_3$ ）と銅（ $Cu_A+C u_B$ ）は、チトクロームオキシダーゼの酸化還元中心として機能し、これらの酸化還元変化は可視・近赤外領域の分光学的測定法により観測される。生体内のヘムと銅は、組織の酸素濃度やエネルギー状態に応じてその酸化状態を変化させていることが知られている。灌流脳では、組織のエネルギー代謝のレベルに適応したチトクロームオキシダーゼの本来の機能について知ることが可能で、ヘムと銅の酸化還元状態は灌流脳のエネルギー状態の定量的な指標ともなる。本研究では、ラット脳の灌流法を確立し、脳内チトクロームオキシダーゼの分光学的特性と脳のエネルギー状態について検討した。

ラットの脳の灌流系の作成では、従来の方法を改良して、手術時に一定の脳循環を損なわないように左右両側の総頸動脈に片方ずつバイパス経路を設ける手法を考案した。その結果、脳は虚血や低酸素のような致命的な状況に陥ることなく、脳波観測上

でも無傷のものが得られた。また、この方法は、脳を通常の循環系から切り離し脳灌流系への緩和な移行を実現する上でも十分に有効であった。灌流液には 95% 酸素と 5% 炭酸の混合ガスで飽和されたフルオロカーボン液 (FC-43 emulsion; ミドリ十字) を用いた。この液は、分光測定上ほとんど不活性な人工血液であり、本研究での生体組織の分光学的測定の目的に適合した特性を持っている。脳灌流は、定温 (25.0 ± 0.5 °C) ・定圧 (200 mmHg) を標準として行なわれた。これらの方法によって調製されたラットの灌流脳では、正常な周波数特性をもつ脳波が観測された。この灌流脳は、脳波上で光刺激に対する応答や薬物投与による癲癇発作誘発ではスパイク波などの応答も示した。また、好気条件下のスペクトルを基準にして嫌気条件下で灌流したときの差スペクトルは、*in vitro* で知られているチトクロームオキシダーゼの還元-酸化の差スペクトルにほぼ一致するものであった。これらの結果は、ヘモグロビンの無い脳灌流系でも十分に脳本来の機能が保たれた上に脳のチトクロームオキシダーゼの分光学的観測が可能であることを示したものである。

この灌流脳を使って、脳のチトクロームオキシダーゼの酸化還元状態を調べたところ、注入側での灌流液の酸素濃度が 3.3 mM 以上でヘムと銅の酸化状態は共に最大限に達した。このときの灌流脳での酸素消費速度は、25 °C でほぼ一定の約 $1.75 \mu\text{mol} \cdot \text{O}_2/\text{min}/\text{g} \cdot \text{wet weight}$ であった。さらに、灌流脳でのチトクロームオキシダーゼの酸化還元に関する特性を明らかにするために灌流条件を好気から嫌気にしたところ、同じチトクロームオキシダーゼの成分でありながらヘムが銅より早い段階 (高い酸素濃度) で還元され始め、ヘムの還元とほぼ同時に脳波の振幅の減衰も始まった。また、幾つかの脳灌流実験で定常状態を保ちながら灌流液の酸素濃度を緩やかに下げたところ、3.1-2.8 mM の酸素濃度でヘムが、そして 2.8-2.6 mM で銅が還元されはじめ、2.1 mM 以下で脳波の振幅が観測されなくなるまで減衰した。このような、ヘムと銅の還元に関する差異は *in vitro* のミトコンドリアの実験系で報告されているところの '呼吸状態 3' に相当する特徴を示した。さらに、好気条件下の灌流脳にピククリン投与によって癲癇発作を引き起こし脳のエネルギー消費を亢進させたときには、ヘムが好気-嫌気 (グルコース存在下) のフルスケールの約 10% まで還元され、同時に酸素消費の増大 (約 $0.35 \mu\text{mol} \cdot \text{O}_2/\text{min}/\text{g} \cdot \text{wet weight}$) も観測されたが、銅は還元されなかった。その後、灌流条件を嫌気にすると、ヘムと銅両方とも癲癇発作の無い

条件下の数倍の速さで還元されたが、酸化還元による測定光の吸収変化のフルスケールに関して他の結果と殆ど変わらなかった。ところで、以上のすべての脳灌流実験でヘムが酸化還元（好気－嫌気）のフルスケールの 30－40% まで還元されたところで共通して脳波の消滅が観測されたことは、脳波観測上の臨界点を無侵襲で予知する有効な手掛かりとして示唆された。さらに、本研究では、脳灌流による新しい実験も幾つか試みられた。好気と嫌気条件の繰り返しによるヘムや銅の酸化還元状態への影響を調べたところ、嫌気条件下の最初の還元過程では先に述べたようにヘムの還元が銅のそれより高い酸素濃度で始まった。ところが、ヘムと銅が両方とも十分に還元された後、再び好気条件下で灌流を行ったところ、再酸化はヘムのほうから先に始まった。この好気条件下の再酸化で元の酸化レベルに戻るまでの時間は、ヘムと銅ともに最初の還元に要した時間より短いものであった。それから再び嫌気にすると、最初の還元比べてヘムと銅の両者間のそれぞれの還元過程の差異が縮小した。このようなヘムと銅の間の酸化還元の差異の収縮傾向は、好気と嫌気条件を繰り返した灌流脳において酸化と還元の両方の過程で認められた。なお、脳波は最初の嫌気灌流のときに消滅した後は、好気条件で元のレベルまで再酸化されても、二度と現れることはなかった。また、最初から脳波の観測されないような灌流脳においては、ヘムと銅のそれぞれの酸化還元の挙動に差異はまったく認められなかった。これらの結果は、調製された灌流脳の状態を評価するうえで非常に有効であった。ところで、以上の実験はすべて基質（10 mM グルコース）を含んだ灌流においてのものであったが、基質を完全に取除いた灌流液を使って好気条件下で脳の灌流を行ったところ、ヘムは約 5% 銅は約 10%（好気－嫌気の酸化還元のフルスケールで）酸化され、それとほぼ同時に脳波の異常が認められた。それから約 30 分後に一転してヘムが還元される傾向を示した。また、脳のミトコンドリアの酸化的リン酸化能特性を知るために、脱共役剤を灌流液に混入させ好気条件下で脳を灌流した実験では、ヘムの還元に対応する波長域での吸収変化だけが差スペクトルで観測された。これらは、脳灌流系で分離・精製されたミトコンドリアを使った *in vitro* の実験に対しても新しい示唆に富んだ結果であった。

本研究で明らかになった以上の事実は、無傷の脳について従来の生理学的な情報だけでなく生化学的な評価の指標を得たことによる結果であって、複雑な脳の本質を知るためにも、将来の脳研究をさらに進展させる上でその意義は大きいといえる。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 田 村 守
副 査 教 授 谷 口 和 弥
副 査 教 授 芦 田 正 明
副 査 講 師 中 村 正 雄

学 位 論 文 題 名

Oxygen characteristics of rat cerebral tissue in situ

(ラット大脳組織の in situ での酸素特性についての研究)

本学位論文はラット脳の灌流標本の作製とその酸素代謝の特性を詳細に検討したもので、動物の脳を無傷のままで体全体の循環系から切り離し、人工的な外循環による灌流系として取り出し、脳の機能を長時間維持することに初めて成功したものである。

脳組織に含まれるチトクロームオキシダーゼは、ミトコンドリアの内膜に存在し、電子伝達系の末端酵素として、好気条件下の酸素消費にかかわるエネルギー代謝の中心的な役割を担っている。ヘム (heme a+a₃) と銅 (Cu_A+Cu_B) は、チトクロームオキシダーゼの酸化還元中心として機能し、これらの酸化還元変化は可視・近赤外領域の分光学的測定法により観測される。生体内のヘムと銅は、組織の酸素濃度やエネルギー状態に応じてその酸化状態を変化させていることが知られている。灌流脳において、組織のエネルギー代謝のレベルに適応したチトクロームオキシダーゼの本来の機能について知ることが可能であり、ヘムと銅の酸化還元状態は灌流脳のエネルギー状態の定量的な指標ともなる。

ラットの脳の灌流系の作成では、従来の方法を改良して、手術時に一定の脳循環を

損なわないように左右両側の総頸動脈に片方ずつバイパス経路を設ける手法を考案した。その結果、脳は虚血や低酸素のような致命的な状況に陥ることなく、脳波観測上でも無傷のものが得られた。ここで得られたラットの灌流脳標本は、正常な周波数特性をもつ脳波を示し、光刺激に対する応答や薬物投与による癲癇発作誘発ではスパイク波などの応答も示した。また、好気条件下のスペクトルを基準にして嫌気条件下で灌流したときの差スペクトルは、in vitro で知られているチトクロームオキシダーゼの還元-酸化の差スペクトルにほぼ一致するものであった。これらの結果は、ヘモグロビンの無い脳灌流でも十分に脳本来の機能が保たれた上に脳のチトクロームオキシダーゼの分光学的観測が可能であることを示したものである。

本研究において、脳灌流による新しい実験も幾つか試みられた。好気と嫌気条件の繰り返しによるヘムや銅の酸化還元状態への影響を調べたところ、嫌気条件下の最初の還元過程ではヘムの還元が銅のそれより高い酸素濃度で始まった。ところが、ヘムと銅が両方とも十分に還元された後、再び好気条件下で灌流を行ったところ、再酸化はヘムのほうから先に始まった。この好気条件下の再酸化で元の酸化レベルに戻るまでの時間は、ヘムと銅ともに最初に還元に必要な時間より短いものであった。それから再び嫌気にすると、最初の還元と比べてヘムと銅の両者間のそれぞれの還元過程の差異が縮小した。このようなヘムと銅の間の酸化還元の違いの収縮傾向は、好気と嫌気条件を繰り返した灌流脳において酸化と還元の両方の過程で認められた。なお、脳波は最初の嫌気灌流のときに消滅した後は、好気条件で元のレベルまで再酸化されても、二度と現われることはなかった。また、最初から脳波の観測されないような灌流脳においては、ヘムと銅のそれぞれの酸化還元の挙動に差異はまったく認められなかった。

本研究で明らかになった以上の事実は、無傷の脳について従来の生理学的な情報だけでなく生化学的な評価の指標を得たことによる結果であって、複雑な脳の本質を知るためにも、将来の脳研究をさらに進展させる上でその意義は大きいといえる。

審査員一同は、これらの結果に基づいて、本研究の内容は博士（理学）を受けるに十分であると結論した。