

## 学位論文題名

## Analysis of the energy metabolism of rat liver mitochondria and hepatocytes by the use of near-infrared optical probe.

(近赤外プローブを用いたラット肝ミトコンドリア  
および遊離肝細胞におけるエネルギー代謝の解析)

## 学位論文内容の要旨

近赤外光 (near-infrared light) は 700-1500 nm の波長を持つ光で紫外、可視部の光に比べ生体組織において比較的大きな透過性を示す。そこで医療の立場から近赤外光を用いて生体の診断に応用しようとする試みがなされてきた。ただしこれまでの生体における近赤外分光法(NIRS)は生体の内在の吸収物質であるヘモグロビン、チトクロームオキシダーゼ等のスペクトルを用いて行われてきたため、得られる情報は組織における酸素化度にほぼ限られてきた。

本研究は蛍光色素を用いた色素分光法をNIRSと組み合わせることにより生体のエネルギー状態を外部から無侵襲に計測することを目的として行われた。近赤外色素分光法に用いる化合物として 8-Cyano-2, 3, 5, 6, 11, 12, 14, 15-octahydro-1H, 4H, 10H, 13H-diquinolizino xanthylum Perchlorate (Rhodamine 800, 以下 R800) を選んだ。散乱吸収系である生体組織における基礎データを得るためラットの肝臓から単離したミトコンドリアおよび肝細胞の懸濁液中において R800の示す吸収、蛍光スペクトルを測定した。

最初に単離したラット肝ミトコンドリアの各エネルギー状態すなわち、高エネルギーリン酸化状態(state 4), 高エネルギーリン酸生成過程(state 3), 脱共役した低エネルギー状態(uncoupling)において R800がミトコンドリアのバイアビリティに及ぼす影響を測定した。その結果から以下の全ての実験において、ミトコンドリアの酸素消費を阻害しない濃度の R800 (<math> < 5 \mu\text{M}</math>)を用いた。

ついで state 4, uncoupling各エネルギー状態で単離ミトコンドリアとインキュベーションした R800の吸収および発光スペクトルを測定した。state 4での吸収スペクトルは 710 nmにピークを持つが uncouplingすることにより速やかに 690 nmにピークを持つスペクトルへと変化した。このスペクトルはミトコンドリアを含まないバッファー中のものに酷似していた。また、両者の差スペクトルは、730 nmに極大値、685 nmに極小値を持っていた。懸濁液中の R800を遠心分離により直接アッセイすることにより各エネルギー状態でのミトコンドリア膜内外へのR800の分配を測定した結果、state 4では 85%, uncouplingでは 50%がミトコンドリアのマトリクス中に存在し残りの R800はバッファー中にあった。この R800のマトリクス内外への分配が懸濁液全体のスペクトルを決定していると結論した。呼吸状態により生成される各エネルギー状態と R800のス

ペクトルの関係を調べるため 呼吸基質なし(state 1), 基質あり(state 2), ATP生成過程 (state 3), 高エネルギー状態(state 4), 脱共役(uncoupling)の各エネルギー状態を順次生成し2波長吸光度差スペクトルを測定した。測定に用いた2波長の組み合わせは前述の 730-685 nmおよび、より生体での透過率の高い 730-800 nmである。その結果、いずれの2波長の組み合わせでも各エネルギー状態に対応した値が得られた。次に、ミトコンドリア膜電位と吸光度変化の定量性を調べるため $[K^+]$ 拡散電位を生成した。膜電位は、Nernstの式:  $\Delta\psi_{K^+} (mV) = 59 \log ([K^+]_{in}/[K^+]_{out})$  ( $[K^+]_{in} = 120 mM$ ) に従うとし外液の $[K^+]$ を変化させた。測定には前述の2波長吸光度差を用い $K^+$ 輸送担体である valinomycinの添加により生じた膜電位とスペクトル変化の関係を測定した。その結果、拡散電位 50-160 mVの範囲において電位と2波長のスペクトル変化は比例関係にあった。直線から外挿して state 4, state 3のミトコンドリア膜電位を求めるとそれぞれ 191 mV, 178 mVであった。これらの値は他の色素を用いた手法と同一の結果を与える。以上の結果は、 $\lambda_{ex} = 660 nm$ ,  $\lambda_{em} = 700 nm$  の組み合わせを用いた蛍光強度測定からも得られた。また、酸素濃度、生理的条件下での pH, アデニンヌクレオチド(ADP,ATP)の存在による R800のスペクトルへの影響は無視できる範囲であった。以上より R800は、近赤外領域においてミトコンドリア膜電位(エネルギー状態)の測定に使用可能な色素と結論した。

以上から得られた結果を遊離したラット肝細胞へ応用した。R800とインキュベーションした肝細胞を懸濁した  $O_2$ -saturated Krebs-Ringer buffer中において酸素呼吸により徐々に嫌気状態になっていく過程で  $[O_2]$ ,  $\Delta A_{730-685}$  (R800),  $\Delta A_{620-605}$  (cytochrome oxidase) を同時測定した。酸素呼吸により嫌気状態になると cytochrome oxidaseは速やかに還元されるのに対し  $\Delta A_{730-685}$  は嫌気後数分間スペクトルを保ち、脱共役剤の添加により大きく低エネルギー側にシフトした。この R800のスペクトル変化はミトコンドリア懸濁液中のものと同じものである。また、R800で染色した肝細胞の顕微鏡観察からはサイトゾル全体が一様に染まっていることから R800は肝細胞中にもサイトゾル中に分布するミトコンドリアのマトリクスに取り込まれ細胞の酸素化状態よりミトコンドリアの膜電位を反映して変化すると分かった。次に嫌気状態が長時間連続することによる肝細胞のエネルギー喪失が R800のスペクトルに与える影響を測定した。嫌気状態が長時間続くと R800のスペクトルは徐々に低エネルギー側にシフトしていく。完全に脱共役した状態で酸素を再添加すると cytochrome oxidaseは速やかに元のレベルまで酸化されるのに対し R800は再酸素化後も低エネルギー側のままである。このことから長時間の嫌気により脱共役した肝細胞は酸素の再添加によってもエネルギー状態を回復しないことが分かった。肝細胞が嫌気後数分間高エネルギー状態を保持したのは解糖系など別のエネルギー経路により膜電位低下を回避したためと考えられた。一方、 $\lambda_{ex} = 660 nm$ ,  $\lambda_{em} = 700 nm$  の組み合わせによる蛍光強度測定からも同様の結論が得られた。

以上から R800 が生体のエネルギー状態を反映する近赤外プローブとして有用であると結論した。将来他の方法(灌流法, 光CTなど)と組み合わせることにより生体組織そのものへも応用可能であると考えられる。今後、現行の光を用いた診断システムに加え近赤外プローブを光造影剤, 光診断薬として発展させていきたい。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 市 川 和 彦  
副 査 教 授 田 村 守 (電子科学研究所)  
副 査 教 授 荒 木 義 雄  
副 査 教 授 中 村 博

学 位 論 文 題 名

Analysis of the energy metabolism of rat liver mitochondria and hepatocytes by  
the use of near-infrared optical probe.

(近赤外プローブを用いたラット肝ミトコンドリア  
および遊離肝細胞におけるエネルギー代謝の解析)

近赤外光(700-1500 nm)は可視光に比べ生体組織において高い透過性を示すので医療の立場から生体の診断に応用しようとする試みが数多くなされてきた。

本研究は従来より幅広く用いられている蛍光色素と近赤外分光學と組み合わせることにより生体のエネルギー状態を外部から無侵襲に計測することを目的としている。本論文では近赤外色素として 8-Cyano-2, 3, 5, 6, 11, 12, 14, 15-octahydro-1H, 4H, 10H, 13H-diquinolizino xanthylum Perchlorate (Rhodamine 800, 以下 R800) を選び、その吸収および蛍光スペクトルについて *in vitro* および *in vivo* で詳細に検討したものである。

本論文は5章からなり、第1章では、近赤外光を用いた過去の研究の成果について言及した。第2章では、各種溶媒中における R800の吸収、蛍光スペクトルについて検討した。その結果、R800のスペクトルは様々な溶媒の環境に応じて変化することが分かった。第3章では、R800の生体におけるエネルギープローブとしての性質を単離したラット肝ミトコンドリアを用いて検討した。初めに 5  $\mu$ M以下の R800がミトコンドリアの呼吸を阻害しないことを確かめた。次にミトコンドリア懸濁液中での R800のスペクトルを測定したところ、高エネルギー状態における吸収スペクトルは、710 nmにピークを持ち、脱共役することにより速やかに 690 nmにピークを持つスペクトルへと変化した。両者の差スペクトルは 730 nmに極大値、685 nmに極小値を持っていた。懸濁液中の R800を遠心法により直接アッセイし、ミトコンドリア内外への R800の分配を測定した結果、高エネルギーでは 85%、脱共役では 50%がマトリ

クス中に存在し、残りは水相中にあった。この R800のマトリクス内外への分配平衡が懸濁液のスペクトルを決定していた。次に呼吸状態により生成された様々なエネルギー状態と R800のスペクトルの関係を調べるため、730-685 nmを用いた2波長吸光度差スペクトルを測定した。その結果、各エネルギーに対応した測定値が得られた。次にミトコンドリア膜電位と吸光度変化の関係を調べるため  $[K^+]$ 拡散電位を生じさせた。膜電位は Nernstの式に従うとし外液の  $[K^+]$ を変化させ、 $K^+$  輸送担体である valinomycinの添加により生じたスペクトル変化を測定した。その結果、50-160 mVにおいて電位とスペクトル変化は比例関係にあった。直線から外挿して求めた呼吸時のミトコンドリア膜電位は他の色素を用いた手法から得られた値に一致した。以上の結果は、 $\lambda_{em} = 700$  nmによる蛍光強度測定からも得られた。これらより R800は、近赤外領域においてミトコンドリアのエネルギー状態(膜電位)の測定に使用可能な色素と結論した。第4章では、ミトコンドリアから得られた結果を遊離したラット肝細胞へ応用した例を示す。R800とインキュベーションした肝細胞懸濁液中において呼吸により徐々に嫌気になっていく過程で  $\Delta A_{730-685}$  (R800),  $\Delta A_{620-605}$  (cytochrome) および  $[O_2]$ を同時測定した。嫌気により cytochromeが速やかに還元されるのに対し、R800は数分間高エネルギーのスペクトルを保ち、脱共役剤の添加により大きく低エネルギー側にシフトした。この変化はミトコンドリア懸濁液中のものと同様であった。蛍光顕微鏡観察も踏まえ、R800は肝細胞中のサイトゾルに分布するミトコンドリアに取り込まれ、細胞の酸素化状態よりミトコンドリアの膜電位を反映して変化すると結論した。次に長時間の嫌気が肝細胞中の R800のスペクトルに与える影響を測定した。嫌気状態が続くと R800は徐々に低エネルギー側にシフトし、低エネルギー状態において酸素を再添加すると、cytochromeが速やかに元のレベルまで酸化されるのに対し、R800は変化しなかった。このことから長時間の嫌気によりエネルギーを失った肝細胞は再酸素化によってもエネルギーを回復しないと結論した。肝細胞が嫌気後数分間高エネルギー状態を維持したのは他のエネルギー供給経路により膜電位低下を回避したためと考えられた。第5章では、以上の結果を踏まえ、R800が生体のエネルギー状態を反映する近赤外プローブとして有用であると結論した。将来、近赤外プローブを灌流法、光CTなどと組み合わせることにより生体組織へ応用可能な光造影剤、光診断薬として発展することが期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における取得単位なども併せ申請者が博士(地球環境科学)の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判断した。