

胎児の無酸素症に対する耐性についての基礎的研究

福岡大学医学部産婦人科

金 岡 毅, 清 水 博
戸 上 玲 子

研究目的

胎児(仔)が成人(獣)に比較して無酸素症に対して耐性を有することはよく知られた事実である。しかしながらその理由については、いまだ不明のものが多い。そこで胎児(仔)の組織細胞代謝が成人(獣)のそれとどのように異なり、無酸素症によってどのような機序によって障害され、不可逆性変化に陥るかを究明しようと試みた。

研究方法

成獣として生後4週以後のHartley系非妊雌モルモットを、胎仔として同系妊娠65日前後のモルモットから外科的に娩出した仔を、それぞれ用いた。成獣にはsodium pentobarbital 2mg/kgの腹腔内注入による麻酔を行った。成獣では開腹後門脈および胸腔内大静脈にcannulationして、胎仔では墨汁注入予備実験で門脈と同様の拡散像を認めたため、臍静脈腹壁内走行部および腹腔内大静脈にcannulationして、それぞれ灌流しつつ肝を摘出した。灌流液は95%O₂-5%CO₂混合ガスで曝気したpH 7.40, 31°CのKrebs-Henseleit液で、Harvard pumpにより3ml/g liver tissue/minの拍動液を得た。灌流回路の途中に、夏目KN式微量注入器を挿入して、10⁻³mM norepinephrine (NE), 5 mM lactateと5 mM pyruvateの10:1の混合液(L/P), 0.2 mM octanoate, 5 mM ethanol, 35 mM succinateなどの薬液を注入した。その後95%N₂-5%CO₂混合ガス曝気液灌流による1または3時間の無酸素症負荷を行い、その後30分間の95%O₂-5%CO₂混合ガス曝気灌流液によるpreinfusionのち、各種薬物注入を反復した。

細胞内mitochondriaおよびcytosolに存在するNAD(nicotinamide adenine dinucleotide)のreduction率を測定するため、小林ら¹⁾の開発したredoximeter(立石ライフサイエン

ス研)を用い、また排液中の酸素濃度をBiochemical oxygen monitor(日科機)で測定して肝のO₂uptakeを算出し、さらに排液中のブドウ糖濃度をnew sugar test(Boehringer)で測定した。

研究結果

まず成獣については、表に示すように、NE注入で平均22.7±7.4%のNAD reduction, 0.14±0.07 μmol/g liver/minのO₂uptake, 排液中4.4±2.2mg/dlのブドウ糖産生が観察され、L/P注入で平均11.9±4.4%のNAD reduction, 0.39±0.17 μmol/g/minのO₂uptake, 1.9±0.7mg/dlの糖産生があり、L/P注入下のNE注入で平均25.3±6.7%でNAD reduction, 0.43±0.19 μmol/g/minのO₂uptake, 4.7±1.7mg/dlの糖産生というenhanceされた代謝反応がみられた。まよoctanoate注入で平均18.2±2.8%のNAD reductionと0.51±0.17 μmol/g/minのO₂uptakeが、octanoate注入下のL/P注入で平均13.8±4.6%のNAD reductionと0.79±0.24 μmol/g/minのO₂uptakeが、ethanol注入で平均31.7±6.8%のNAD reductionと0.39±0.15 μmol/g/minのO₂uptakeが、それぞれ観察された。succinate注入ではNAD reductionとO₂uptakeはほとんどなかった。

成獣において1時間の無酸素症負荷後は、NE注入によるNAD reductionが平均8.3±1.1%とcontrol値の36.6%に減少、糖産生が1.0±0.4mg/dlとcontrol値の22.3%に減少、3時間の無酸素症負荷後はNE注入によるNAD reductionが平均2.4±2.3%とcontrol値の10.6%に激減、糖産生も0.1±0.1 mg/dlとcontrolの2.3%に激減した。L/P注入下でNE注入でもほぼ同様のことが観察された。一方3時間の無酸素症負荷後、succinate注入に対して平均10.8±6.3%のNAD

reduction がみられた。これに対し、1または3時間の無酸素症負荷後のL/P, octanoate, octanoate 注入下のL/P, あるいは ethanol 注入によるNAD reduction は control 値とほぼ同様であった。

つぎに胎仔においては、表に示すように、NE 注入で平均 $18.3 \pm 7.8\%$ のNAD reduction, $0.05 \pm 0.03 \mu\text{mol/g/min}$ の O_2 uptake, 排液中 $0.9 \pm 0.5 \text{ mg/dl}$ の糖産生が観察され、L/P 注入により平均 $5.7 \pm 2.8\%$ のNAD reduction, $0.26 \pm 0.03 \mu\text{mol/g/min}$ の O_2 uptake, $0.7 \pm 0.3 \text{ mg/dl}$ の糖産生があり、L/P 注入下のNE 注入で平均 $21.3 \pm 7.2\%$ のNAD reduction, $0.28 \pm 0.21 \mu\text{mol/g/min}$ の O_2 uptake, $0.9 \pm 0.6 \text{ mg/dl}$ の糖産生がみられ、呼吸能と糖産生能は成獣灌流肝に比較して有意に低下しているものの、ほぼ同様のNAD reduction が観察された。しかしながら、octanoate 注入では平均 $3.7 \pm 2.1\%$ のNAD reduction と $0.2 \pm 0.1 \mu\text{mol/g/min}$ が O_2 uptake が、octanoate 注入下でL/P 注入では $7.6 \pm 4.0\%$ のNAD reduction, $0.5 \pm 0.2 \mu\text{mol/g/min}$ の O_2 uptake が、ethanol 注入では $4.1 \pm 3.4\%$ のNAD reduction, $0.4 \pm 0.2 \mu\text{mol/g/min}$ の O_2 uptake が、それぞれ観察され、成獣に比し肝細胞内代謝反応が有意に低下していた。

胎仔において1時間の無酸素症負荷後は、NE 注入によるNAD reduction が平均 $11.2 \pm 8.1\%$ と control 値の 61.2% に減少、糖産生は $0.9 \pm 0.1 \text{ mg/dl}$ と control 値の 94.5% に減少、3時間の無酸素症負荷後は、NE 注入によるNAD reduction が平均 $8.2 \pm 7.9\%$ と control 値の 44.8% に減少、糖産生は $0.5 \pm 0.3 \text{ mg/dl}$ と control 値の 55.6% に減少するにすぎず、成獣の無酸素症負荷に比較して推計学上有意にNAD reduction および糖産生能の低下が少なく、胎仔肝細胞膜NE receptor が無酸素症に対して耐性を有することが明かとなった。また3時間の無酸素症負荷後、成獣にみられた succinate 注入によるNAD reduction は、胎仔灌流肝では観察されなかった。一方、成獣灌流肝と同様に、1または3時間の無酸素症負荷後のL/P, octanoate, octanoate 注入下のL/P, あるいは ethanol 注入によるNAD reduction は control 値とほぼ同様であった。

考 察

灌流肝に lactate と pyruvate とを注入すると、cytosol の lactate dehydrogenase, mitochondria の TCA cycle, さらに gluconeogenesis によって、NAD reduction, 呼吸促進および糖産生がもたらされる。octanoate の注入は、mitochondria の flavoprotein を介する cytochromes の還元によって、NAD reduction と呼吸促進をもたらす。また ethanol の注入は、cytosol のアルコール代謝により、NAD reduction と呼吸促進をもたらすと考えられる²⁾。今回の実験では、このような成人の肝細胞内代謝機能に比較して、胎仔ではそのような代謝反応が存在するものの、機能の低下、換言すれば機能の未熟を示唆する成績が得られた。すなわち全身の無酸素症負荷によって生ずる乳酸などの処理能が、胎仔において低下していることが示唆された。一方、1~3時間の無酸素症負荷によって、成獣と胎仔とのいずれにおいてもこれら代謝反応が障害されず、肝細胞内の代謝機構が無酸素症に対して耐性を有することが明かとなった。

一方、NE の注入は細胞膜 α -receptor を介する Ca^{++} の作用で gluconeogenesis や glycolysis を促進して、NAD reduction, 呼吸促進および糖新生をもたらすと考えられる²⁾。今回の実験では、胎仔は成獣に比べて呼吸能や糖産生能ではやや劣っているものの、NE に対して成獣とほぼ同様のNAD reduction を示し、胎仔肝細胞膜 receptor が十分に作動していることが示唆された。また1~3時間の無酸素症負荷によって、成獣ではNE 注入によるNAD reduction が control 値の $36.6\% \sim 10.6\%$ 、糖産生が control 値の $22.3\% \sim 2.3\%$ と激減し、さらに3時間の無酸素症負荷後では、通常 intact の細胞膜を通過しない succinate の注入によって、mitochondria の flavoprotein を介する cytochromes の還元によると考えられるNAD reduction²⁾ が観察され、細胞膜の無酸素症による傷害が示唆された。すなわち成獣では無酸素症まず細胞膜を障害して、細胞代謝機能の不可逆性変化をもたらすものと思われた。これに対し、胎仔は1~3時間の無酸素症負荷によって、NE 注入によるNAD reduction が control 値の $61.2\% \sim 44.8\%$ 、糖産生が control

rol 値の 94.5%~55.6%に減少するにすぎず、さらに succinate 注入による NAD reduction の増加はみられず、胎仔肝細胞膜の無酸素症に対する耐性が示唆された。

胎仔(児)では、anoxic stressにより paraganglia (Zuckermandl) や副腎から大量の NE が放出されることが知られている³⁾が、この NE が胎仔(肝)に作用して血糖を増加させ、脳など主要臓器の無酸素症下の細胞内代謝機能を維持しているものと考えられる。今回の実験では胎仔肝細胞膜が成獣に比し無酸素症に対して耐性であり、無酸素症負荷後も十分な機能を有することが明らかとなった。しかしながら、一方胎仔体内に蓄積する lactate の処理能は NAD reduction 率からいえば成獣のほぼ $\frac{1}{2}$ にすぎず、無酸素症下の胎仔体内に lactate が蓄積しやすいことが示唆された。

結 論

成獣および胎仔の灌流肝について、細胞内 redox state を中心とする代謝機能の比較検討を行い、以下の結論を得た。(1)胎仔肝は成獣肝に比し、lactate/pyruvate, octanoate および ethanol に対する代謝機能が低下している。しかしながらこれら肝細胞内代謝機能は胎仔、成獣とも無

酸素症負荷に対し耐性を有している。(2)胎仔肝は norepinephrine に対し成獣肝とほぼ同様の代謝反応を示した。成獣では無酸素症負荷後、norepinephrine に対する代謝反応が著明に低下し、細胞膜の損傷が無酸素症による肝細胞代謝の不可逆性変化をもたらすと考えられたが、胎仔においては無酸素症負荷後も norepinephrine に対する NAD 還元能、糖産生能などの低下は著明でなく、胎仔肝組織細胞代謝の無酸素症に対する耐性が明らかとなった。

参 考 文 献

- 1) Kobayashi, S., et al.: Optical consequences of blood substitution on tissue oxidation-reduction state microfluorometry. *J. Appl. Physiol.*, 31: 93, 1971.
- 2) 中瀬雄三・荻原文二: 臓器機能の生理化学(分離臓器を用いて), (1)臓器灌流法 — 肝灌流を中心に。代謝, 20: 91, 1983。
- 3) Kaneoka, T., et al.: Plasma noradrenalin and adrenalin concentrations in feto-maternal blood. *J. Perinat. Med.*, 7: 302, 1979.

Changes following administrations of various agents during the control period, the period after one hour of anoxic loading and the period after three hours of anoxic loading in perfused adult and fetal guinea pig livers.

(a) NAD reduction rate (%)

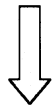
		NE	L/P	L/P•NE	Oct	Oct•L/P	L/P	L/P•Eth	Eth	Suc
A d u l t	Control n=17	22.7 ±7.4	11.9 ±4.4	25.3 ±6.7	18.2 ±2.8	13.8 ±4.6	10.6 ±5.9	25.8 ±6.9	31.7 ±6.8	1.4 ±1.6
	1hr. anoxia n=6	8.3 ±1.1	10.6 ±1.7	16.8 ±1.5	16.3 ±3.3	12.9 ±1.9	8.3 ±1.9	29.4 ±3.5	35.6 ±3.9	3.0 ±2.6
	3hr. anoxia n=7	2.4 ±2.3	11.0 ±4.9	10.6 ±3.4	14.7 ±3.8	15.8 ±4.7	8.8 ±2.5	25.3 ±4.7	29.6 ±6.4	10.8 ±6.3
F e t u s	Control n=18	18.3 ±7.8	5.7 ±2.8	21.3 ±7.2	3.7 ±2.1	7.6 ±4.0	6.8 ±4.1	6.8 ±4.2	4.1 ±3.4	1.5 ±1.6
	1hr. anoxia n=8	11.2 ±8.1	7.5 ±3.5	14.3 ±9.2	4.7 ±4.4	6.9 ±3.9	7.0 ±2.5	4.0 ±2.6	3.2 ±2.6	2.1 ±0.3
	3hr. anoxia n=12	8.2 ±7.9	8.9 ±6.1	11.2 ±9.8	5.1 ±2.7	7.2 ±3.7	8.2 ±5.4	5.8 ±3.5	3.5 ±2.4	1.6 ±2.0

(b) oxygen uptake ($\mu\text{mol/g}$ wet liver tissue/min) during the control period.

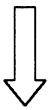
	NE	L/P	NE+L/P	Oct	Oct+L/P	L/P	L/P+Eth	Eth	Suc
Adult n=11	0.136 ±0.07	0.390 ±0.17	0.426 ±0.19	0.508 ±0.17	0.789 ±0.24	0.452 ±0.20	0.502 ±0.17	0.390 ±0.15	0.091 ±0.06
Fetus n=13	0.048 ±0.03	0.260 ±0.03	0.278 ±0.21	0.175 ±0.10	0.449 ±0.24	0.411 ±0.18	0.372 ±0.16	0.364 ±0.16	0.049 ±0.03

(c) Glucose concentrations in the drainage (mg/dl)

	NE	L/P	L/P•NE	Oct	Oct•L/P	L/P	L/P•Eth	Eth	Suc	
A d u l t	Control n=10	4.40 ±2.2	1.89 ±0.7	4.65 ±1.7	0.28 ±0.2	0.87 ±0.3	0.91 ±0.3	1.04 ±0.3	0.01 ±0.4	0.16 ±0.2
	1hr. anoxia n=8	0.98 ±0.4	0.54 ±0.2	0.87 ±0.5	0.33 ±0.2	0.56 ±0.2	0.74 ±0.2	0.19 ±0.1	0.12 ±0.1	0.17 ±0.1
	3hr. anoxia n=8	0.10 ±0.10	0.43 ±0.3	0.59 ±0.4	0.03 ±0.2	0.00 ±0.2	0.23 ±0.4	0.01 ±0.4	0.14 ±0.3	0.01 ±0.1
F e t u s	Control n=12	0.91 ±0.5	0.65 ±0.3	0.87 ±0.6	0.03 ±0.1	0.02 ±0.1	0.02 ±0.3	0.07 ±0.3	0.07 ±0.3	0.09 ±0.1
	1hr. anoxia n=6	0.86 ±0.1	0.75 ±0.2	0.73 ±0.2	0.08 ±0.2	0.05 ±0.0	0.44 ±0.5	0.11 ±0.3	0.29 ±0.2	0.04 ±0.2
	3hr. anoxia n=10	0.49 ±0.3	0.40 ±0.2	0.54 ±0.4	0.12 ±0.0	0.13 ±0.1	0.09 ±0.1	0.05 ±0.0	0.06 ±0.1	0.18 ±0.2



検索用テキスト OCR(光学的文字認識)ソフト使用
論文の一部ですが、認識率の関係で誤字が含まれる場合があります



研究目的

胎児(仔)が成人(獣)に比較して無酸素症に対して耐性を有することはよく知られた事実である。しかしながらその理由については、いまだ不明のものが多い。そこで胎児(仔)の組織細胞代謝が成人(獣)のそれとどのように異なり、無酸素症によってどのような機序によって障害され、不可逆性変化に陥るかを究明しようと試みた。