

肝外閉塞性黄疸時および閉塞解除後の肝細胞 ミトコンドリア機能に関する研究

東京大学第1外科(主任:石川浩一教授)

岩 月 淳

STUDIES OF LIVER MITOCHONDRIAL FUNCTION DURING AND AFTER EXPERIMENTAL BILIARY OBSTRUCTION

Atsushi IWATSUKI

First Department of Surgery, Faculty of Medicine, Tokyo University

閉塞性黄疸時および閉塞解除後の肝の病態を検討するために、ラットを用いて機械的に発症させた閉塞性黄疸を任意の閉塞期間後に解除しうる新たな術式を考案した。この実験モデルを用いて閉塞性黄疸時および閉塞解除後の肝の病態を肝ミトコンドリア(Mt と略)の機能面から検討した。総胆管閉塞5日後の黄疸肝 Mt は、呼吸曲線の分析、呼吸酵素の測定、内膜 Mt ATPase の検討から酸化的リン酸化反応の脱共役を主とする障害をうけていることを認めた。総胆管閉塞5日後に閉塞解除を行うと、血清総ビリルビン値は円滑に正常値に低下したにも拘らず、肝 Mt の機能障害の回復は遅延した。このことは外科臨床上術後管理の上で留意すべき事実と考えられた。

I. 序 論

肝外閉塞性黄疸を来す疾患では、胆汁成分が血中、組織内にうっ滞することにより、全身の臓器組織に様々の影響がみられる。黄疸時の病態は原疾患の種類、既往の肝疾患、患者の年齢、黄疸の程度および持続期間などにより修飾される。肝外閉塞性黄疸患者の手術例では、非黄疸患者に比較して手術後合併症が多く、手術などの侵襲に対して抵抗力が低下していることが指摘されている¹⁾²⁾。閉塞性黄疸が生体に及ぼす影響、とくに諸代謝の中心臓器である肝に及ぼす影響および閉塞解除後の回復過程を正確に把握することは、極めて重要な課題である。著者はこの肝における病態を知るために、まずダイコクネズミ(以下ラットと略)を用いて機械的に発症させた閉塞性黄疸を任意の閉塞期間後に解除しうる新しいかつ簡単な術式を開発した。ついでこの実験モデルを用いて、黄疸時および閉塞解除後の肝の病態を、肝細胞内の主要なエネルギー産生分画であるミトコンドリアの機能面から検討し、臨床上の病態解明の一助としようとした。

II. 実験モデル

総胆管を二重に結紮・切離して作製した閉塞性黄疸ラ

ットの総胆管閉塞を解除することは、胆のうが存在しない点また拡張した総胆管壁が極めて薄い点などから技術的に非常な困難さを伴う。したがって著者は、機械的に総胆管を閉塞して血清総ビリルビン値が plateau に達したラットの閉塞解除を目的として以下の実験モデルを工夫した。

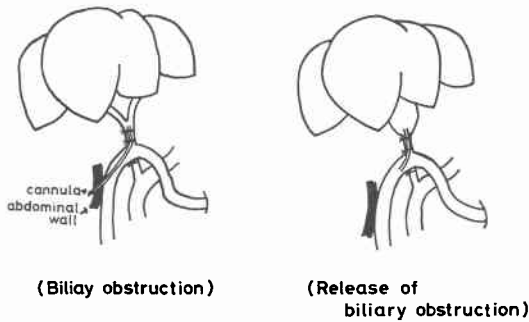
A. ラットにおける機械的総胆管閉塞 および閉塞解除の方法

約230g 前後の雄性ウィスター系ラットを用い、手術前日より一夜絶食とし、エーテル麻酔下で手術を行った。

総胆管閉塞の作製方法は、まず背臥位に固定したラットを正中切開で開腹し、肝十二指腸間膜内の総胆管を露出する。総胆管の肝側約1/3の部位、すなわち左主膵管が総胆管に合流する部位より肝側で総胆管前壁を切開し、外径0.5mmのビニール管を総胆管に挿入する。この総胆管内のビニール管を、肝管分岐直下およびビニール管挿入部直上の2カ所で結紮して固定する。この操作により胆汁はビニール管を通して排泄される。さらにビニール管を挿入した部位に接した十二指腸側総胆管を結紮し、膵液が腹腔内へ流出するのを防ぐ。次に総胆管内

に固定したビニール管の他端を Treitz 靱帯より約6 cmの部位で空腸内に挿入し、空腸内を2~3 cm 通したのち空腸外へ誘導する。空腸挿入部のビニール管周囲にタバコ縫合を行い、さらにこの糸の一端は総胆管を圍繞させたのち、空腸挿入部と総胆管切開部が密着するよう挿入部を閉鎖する。ビニール管を引き出した空腸壁は壁側腹膜に固定する。皮下を通して体外に誘導したビニール管の断端は加熱圧挫して閉塞し、再び皮下に埋没する。図1—左は本法による総胆管閉塞が完了した状態の模式図である。

図1 Diagram of biliary obstruction & release of biliary obstruction



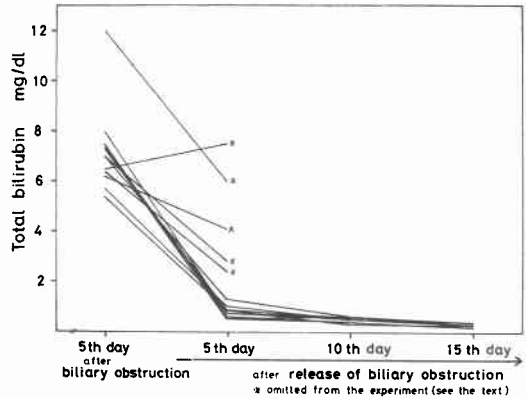
総胆管閉塞解除の方法は、図1—右に示すように皮下に埋没したビニール管閉塞断端を切離し、胆汁の流出が良好であることを確かめた後、断端を再び空腸内に戻すことにより容易に達成される。

上記の総胆管閉塞および解除を行う実験群の対照群には、総胆管にビニール管を挿入後ビニール管の他端を閉塞しないで空腸内に挿入し、総胆管閉塞の方法で述べた如く総胆管切開部とビニール管の空腸挿入部を密着し、胆汁が空腸内に流入するようにしたものを用いた。

B. 実験モデルにおける 総胆管閉塞の完全性および解除の有効性についての検討

上述した著者の術式により完全に総胆管を閉塞し得るか否かを確認する目的で、肝門部で総胆管を二重に結紮して切離する従来の術式による総胆管閉塞群 (n = 5) と著者の術式による総胆管閉塞群 (n = 5) を作製し、両群の血清総ビリルビン値の推移を比較検討した。総胆管閉塞後3, 5, 7日の血清総ビリルビン値は、従来法ではそれぞれ6.2±0.7mg/dl, 7.9±1.3, 7.4±1.7であり、著者の術式ではそれぞれ6.1±0.9, 7.5±1.3, 7.9±1.3で、両者の間に有意の差を認めなかつた。また両

図2 Time trend of total bilirubin in serum after biliary obstruction & release of biliary obstruction



群ともに閉塞後5日と閉塞後7日の血清総ビリルビン値の間に有意の差はなく、総胆管閉塞後5日で血清総ビリルビン値は plateau に達した。ついで著者の術式により総胆管閉塞5日後に解除を行った場合の血清総ビリルビン値の推移を14匹のラットを用いて検討した結果を図2に示した。総胆管閉塞解除時の血清総ビリルビン値は7.3±1.6mg/dlであつた。閉塞解除後5日の血清総ビリルビン値は、9匹で急速に低下したが、4匹で低下が円滑でなく、1匹では逆に血清総ビリルビン値の上昇がみられた。後2者のビリルビン値が低下しなかつた原因は、空腸内に戻したビニール管の開放部が単に空腸内の食物残渣によつて閉塞されるためであることが確認された。総胆管閉塞後順調に黄疸が軽快した9匹の血清総ビリルビン値は、解除後5, 10, 15日で図2に示すようにそれぞれ0.8±0.3mg/dl, 0.5±0.2, 0.3±0.1であり、閉塞解除後10~15日では正常値に回復した。以上の結果から、著者の考案した実験モデルでは企図したラットの総胆管の完全閉塞および閉塞解除が達成されることを血清総ビリルビン値の推移から確認しえた。

III. 肝外閉塞性黄疸時および閉塞解除後の肝細胞ミトコンドリア機能

まず肝外閉塞性黄疸時に肝細胞ミトコンドリア (以下 Mt と略) 機能が障害をうける可能性を検討するために、肝細胞内にうつ滞する胆汁成分の1つであるビリルビンが Mt 機能に及ぼす影響を in vitro で検討した。ついで本実験として、総胆管閉塞5日後に解除を行った群と総胆管閉塞が持続する群の両群を作製し、前者では

閉塞解除時、解除後5, 10, 15日のMt機能について、後者では閉塞後5, 10, 15, 20日のMt機能について検討した。対照には、IIのAの実験モデルの作製方法の項で述べた疑似手術後5日のラットを用いた。

A. Mt分離調整法およびMt機能諸指標の測定方法

1) Mtの分離調整法^{9)~9)}

一夜絶食したラットを断頭脱血後、直ちに肝を摘出秤量し、あらかじめ0°Cに氷冷した下記の組成を持つ分離調整液に浸漬した。Mtの分離調整液は、0.25M sorbitol, 5mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.4), 0.2mM EDTA の組成よりなるものを用いた。Mtの分離調整は基本的にHogeboom-Schneider法^{9)~9)}に従い行つた。分離調整したMtは上記の分離調整液にMt蛋白量が15~20mg/mlになるように再懸濁した。Mt蛋白量の測定は、Lowryらの方法⁹⁾にしたがい、蛋白定量標準曲線の作製には第一化学のウソ血清アルブミン標準液を用いた。

2) Mt呼吸の測定方法^{7)~9)}

Mtの呼吸は、Clark型酸素電極⁹⁾ (Yellow-Spring社)を装置した半閉鎖型反応槽を用いて、以下の条件下で萩原の法⁷⁾にしたがい polarographical に行つた。すなわち、反応液には10mM KCl, 3mM MgCl₂, 10mM Tris-HCl (pH 7.4), 5mM 磷酸緩衝液 (pH 7.4), 0.2mM EDTA を含む0.25M sorbitol 液を用いた。30°Cの恒温槽を用いて温度を一定にした反応液中にMt懸濁液100μl (約1.5~2mgのMt)を加え、呼吸基質には0.2Mのコハク酸、燐受容体には0.05M adenosine 5'-diphosphate (ADP)を用いて、Mtの酸素消費量をChanceの定義にしたがいState 1からState 5まで測定した。添加するADPの濃度は光学的に正確に検定した。

また *in vitro* でビリルビンがMtの呼吸に及ぼす影響を検討するために、ビリルビン結晶 (Sigma社)を0.2M KOHで溶解後、IN HClを加えてpH 7.6に調整し、脱イオン蒸留水を加重して4.3mMビリルビン溶液を作製した¹⁰⁾。ついでMt懸濁液にビリルビン濃度が43, 86, 172, 258μMとなるように4.3mMビリルビン溶液を添加して2~3分間覚拌した後、上記の方法にしたがいMt呼吸の測定を行つた。

3) 内膜Mt調整法および内膜Mt ATPase活性の測定^{11)~13)}

上述のMt分離調整液に、熱アルコールに融解させた後再結晶させて純化したdigitonin (Merk社)を10

mg/mlとなるように加えて20分間加熱融解させた後氷冷し、Mt外膜分離用に用いた¹¹⁾。内膜Mtの分離調整には、まず前述のごとく分離調整したMt懸濁液に、Mt蛋白対digitonin比が5対1となるように氷冷したdigitonin液を加えて氷冷下に20分間緩徐に覚拌した。ついで5mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.4)と0.2mM EDTAを含む1.3M sorbitol液を加えて約3倍量に稀釈し、8,500×gで10分間遠心して内膜Mtを分離した。さらにこの内膜Mtを1.3M sorbitol液に再懸濁し、同様に遠心して純化した後、1.3M sorbitol液に約10mg内膜Mt蛋白/mlとなるように再懸濁した¹²⁾。この操作により得られた内膜Mtの蛋白量は使用した全Mt蛋白量の50~60%であつた。得られた内膜Mt懸濁液は-18°Cで凍結保存し、内膜Mt ATPase活性の測定資料とした。

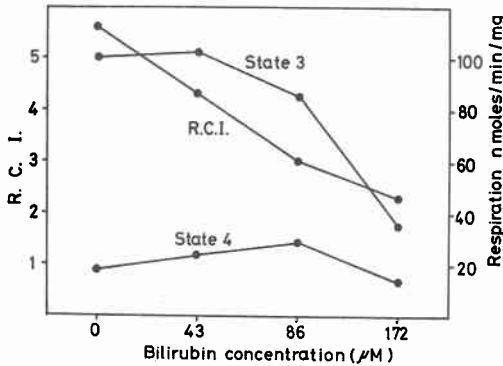
内膜Mt ATPase活性の測定には¹³⁾、まず1ml中に50mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.4), 2mM MgSO₄, 2mM adenosine triphosphate (またはguanosine triphosphate, cytosine triphosphate, inosine triphosphate, uridine triphosphate, それぞれATP, GTP, CTP, ITP, UTPと略), 約100μg内膜Mt, 2mM phosphoenol pyruvate, 75μg pyruvate kinaseを含む反応液を作つた。ついでこの反応液を10分間にわたり、30°Cの恒温槽中で反応させた後、直ちに氷冷して10% silicotungstate 0.5mlを加えて酵素反応を停止させた。反応液中に生成した無機燐をMartin-Doty法¹⁴⁾により比色定量し、1mg内膜Mtが1分間に遊離する燐の量を計算して内膜Mt ATPase活性 (μmoles/min/mg)を求めた。また2, 4-dinitrophenol (DNP)による内膜Mt ATPaseの活性化、oligomycineによる阻害効果を観察するために、前述の反応液中にDNPまたはoligomycineをそれぞれ10⁻⁴M, 5μg/mlとなるように添加して内膜Mt ATPase活性を測定した。

4) 呼吸酵素の測定^{15)~17)}

呼吸酵素の測定は積分球を装置した2波長自記分光々度計 (日立356型)を使用し、岩田らの方法¹⁶⁾にしたがい、赤血塩を添加したMtの酸化型とジチオナイトを添加した還元型の差スペクトルを測定することにより行つた。Mtの呼吸鎖の成分であるチトクローム (Cytと略) a (+a_s), b, c (+c_s)量の計算は、それぞれ605-630nm, 561-575nm, 551-540nmの吸収差をとり、mM吸光係数としてそれぞれ16, 20, 19を用いて行つた¹⁶⁾。

B. 実験結果

図3 Effect of various concentrations of bilirubin on R.C.I., State 3 & State 4 respiration



1) in vitro でビリルビンが Mt 呼吸に及ぼす影響
 図3のようにビリルビンを in vitro で添加し、呼吸基質としてコハク酸を用いた際の Mt の呼吸調節比 (State 3/State 4, RCI と略) は、ビリルビン無添加では5.6であつたが、43μM 濃度では4.3、86μM 濃度で3.0、172μM 濃度で2.3とほぼ直線的に低下し、258μM 濃度では RCI は認められなかつた。この RCI の低下を State 3 呼吸および State 4 呼吸から別個に検討すると、43μM ビリルビン濃度では RCI の低下は State 4 呼吸の上昇すなわち電子伝達系から ATP 生成系の脱共役によると考えられるが、86μM 濃度では State 4 呼吸の上昇とともに State 3 呼吸の低下が加つている。172 μM では State 3 呼吸の障害は著明であつた。

2) 黄疸肝における Mt 諸指標の変化

総胆管完全閉塞5日後の肝 Mt 諸指標の変化を表1にまとめて示した。Mt の ATP 産生機能を表わす RCI および ADP/0 比 (呼吸曲線の State 3 呼吸から萩原の計算方法⁷⁾にしたがい算出) は、対照肝 Mt でそれぞれ 5.7±0.2 および 1.72±0.09 であつたが、閉塞性黄疸肝 Mt では 3.6±0.4 および 1.35±0.05 と著明に低下した (ともに p<0.01)。State 3 呼吸より算定した Mt の ATP 生成量は対照肝 Mt では 351.0±58.1 n moles/min/mg で、閉塞性黄疸肝 Mt では 217.0±26.7 と低下した (p<0.05)。しかし、State 3 呼吸は対照肝 Mt の 96.1±7.0 n moles/min/mg に対して閉塞性黄疸肝 Mt では 98.9±8.4 と軽度の上昇傾向を示した。一方、電子伝達系の成分である Cyt. a (+a₃) は対照肝 Mt の 0.20±0.01 n moles/mg に対し、黄疸肝 Mt では 0.18±0.02 と低下の傾向を示したが推計学的に有意の差を認めなかつた。

表1 Comparison of mitochondrial indices

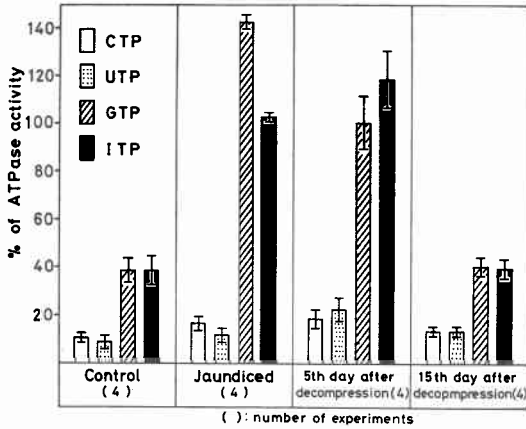
		Control (n=6)	Jaundiced (n=6)		
Respiratory activities	R. C. I.	5.7 ± 0.2	3.6 ± 0.4	P<0.01	
	ADP/0	1.72 ± 0.09	1.35 ± 0.05	P<0.01	
	ATP synthesis (n moles/min/mg)	351.0 ± 58.1	217.0 ± 26.7	P<0.05	
	State 3 respiration (n moles/min/mg)	96.1 ± 7.0	98.9 ± 8.4	n.s.	
Cytochromes (n moles/mg)	Cyt. a (+a ₃)	0.20 ± 0.01	0.18 ± 0.02	n.s.	
	Cyt. b	0.15 ± 0.01	0.14 ± 0.01	n.s.	
	Cyt. c (+c ₁)	0.36 ± 0.01	0.33 ± 0.01	P<0.05	
Inner membrane ATPase (μmoles/min/mg)		0.45 ± 0.02	0.41 ± 0.03	n.s.	
		+ oligomycine (%)	3.9 ± 0.2	3.9 ± 1.2	n.s.
		+ DNP (%)	113.2 ± 6.2	124.0 ± 9.7	n.s.

Mean ± S.D.
 n: number of animals
 n.s.: not significant

Cyt. b についても両者に有意の差を認めなかつたが、Cyt. c (+c₁) は対照肝 Mt の 0.36±0.01 に対して黄疸肝 Mt では 0.33±0.01 と有意 (p<0.05) に低下した。電子伝達系に共役して ATP を生成するエネルギー転移系の酵素である内膜 Mt ATPase 活性は、対照肝 Mt で 0.45±0.02 μmoles/min/mg であるのに対して黄疸肝 Mt では 0.41±0.03 であつたが両者の間に有意の差を認めなかつた。oligomycine による内膜 Mt ATPase 活性の抑制は対照肝 Mt で 3.9±0.2%、黄疸肝 Mt で 3.9±1.2 と両者の間に有意の差を認めなかつた。また DNP を添加した際の内膜 Mt ATPase 活性の亢進は対照肝 Mt で 113.2±6.2% であるのに対して、黄疸肝 Mt では 124.0±9.7% であり、軽度の上昇の傾向を示したが有意の差ではなかつた。

図4に内膜 Mt ATPase の性質の1つであるヌクレオチド特異性を示した。対照肝 Mt ではピリミジン塩基をもつ CTP, UTP を基質とした場合の内膜 Mt ATPase の水解能は、それぞれ ATPase 活性の 11.4±0.5%、8.9±0.7% であり、プリン塩基をもつ GTP, ITP を基質とした場合ではそれぞれ 38.5±4.2%、38.8±5.3% であつた。すなわち、GTP, ITP を基質とした方が UTP, CTP を基質とした場合より内膜 Mt ATPase の水解能が高い。黄疸肝 Mt では対照肝 Mt に比較して内膜 Mt ATPase の CTP, UTP に対する水解能は、それぞれ 16.6±2.1%、12.1±2.7% と亢進 (ともに p<0.05) したが、GTP, ITP に対する水解能はそれぞれ 143.0±1.8%、102.9±0.6% と著明に亢進した。

図4 Nucleotide specificity of inner membrane ATPase



3) 総胆管閉塞解除後の Mt 諸指標の変化

前述したように閉塞性黄疸肝では、polarographical に測定した ATP 生成能が低下し、内膜 Mt ATPase の性質の1つであるヌクレオチド特異性が対照肝 Mt に比較して著しく変化することがわかった。ついでこの両者を中心に閉塞解除後の変化を検討した。総胆管完全閉塞5日後に解除を行った群 (D群と略) と総胆管閉塞が持続する群 (B群と略) の血清総ビリルビン値と Mt の ATP 生成能の指標である RCI および ADP/0 比を表2および図5に示した。5日にわたる総胆管閉塞で血清総ビリルビン値は7.1±0.9mg/dl となった後、総胆管閉塞が持続するB群の閉塞後10, 15, 20日の血清総ビリルビン値は、それぞれ7.8±1.8mg/dl, 8.1±0.3, 8.0±3.5で高値を保っている。一方、閉塞後5日で解除を行ったD群では、解除後5, 10, 15日の血清総ビリルビン値は、それぞれ0.8±0.2mg/dl, 0.5±0.1, 0.3±0.1と順調に低下し、正常値に回復した (図5-A)。このD, B両群におけるRCIの変化を図5-Bに示した。すなわち、D群では閉塞後5日で3.6±0.4と低下したRCIは、解除後5日でも3.6±0.3であつたが、解除10, 15日ではそれぞれ4.7±0.4, 5.2±0.3と有意 (p<0.01) に回復した。しかし、解除後15日においても対照肝 Mt の5.7±0.2に比較すると有意 (p<0.05) に低かつた。これに対してB群では、閉塞後10, 15, 20日のRCIは、それぞれ3.6±0.5, 3.9±0.5, 4.0±0.2であり、軽度の上昇の傾向を示したが、閉塞後5日と閉塞後20日のRCIの間には有意の差を認めなかつた。すなわち、総胆管閉塞

図5-A Time trend of total bilirubin in serum

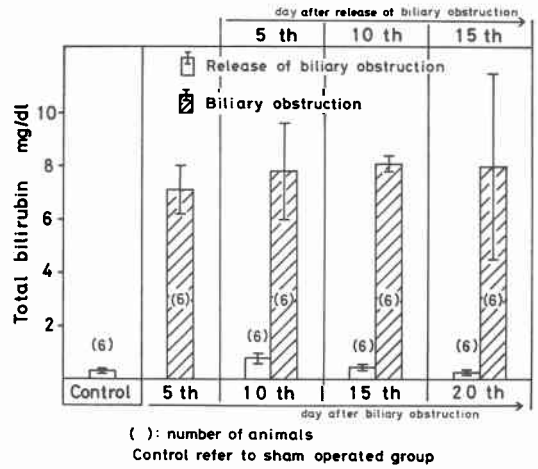
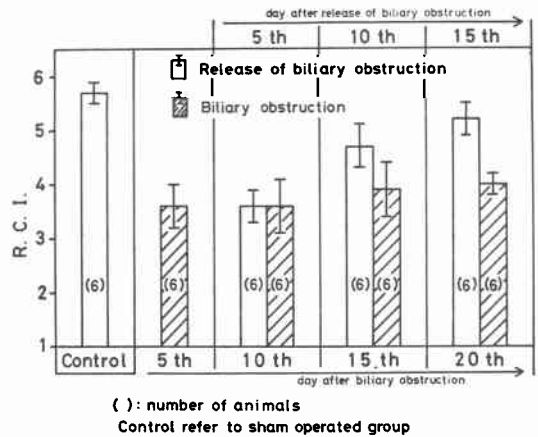


図5-B Time trend of respiratory control index



5日後に閉塞解除を行った場合、血清総ビリルビン値は順調に正常化するのに対して、RCIの正常化は遅延した。閉塞解除後の各時点での血清総ビリルビン値とRCI (表2) から、次式のような回復度 (%) を設定すると、

$$\text{血清総ビリルビン値回復度 (\%)} = \frac{7.1^{*1} - A}{7.1^{*1} - 0.3^{*2}} \times 100$$

*1: 閉塞5日目の血清総ビリルビン値

*2: 対照群の血清総ビリルビン値

A: 閉塞解除後5, 10, 15日の血清総ビリルビン値

RCIの回復度

$$\text{RCIの回復度 (\%)} = \frac{3.6^{*3} - B}{3.6^{*3} - 5.7^{*4}} \times 100$$

表 2 Respiratory activities & total bilirubin in serum after biliary obstruction & release of biliary obstruction

	T. Bilirubin (mg/dl)	R. C. I.	*p	ADP/O	*p
Control (6)	0.3 ± 0.1	5.7 ± 0.2	p<0.01	1.72 ± 0.09	p<0.01
Biliary obstruction	5 th day (6)	7.1 ± 0.9	3.6 ± 0.4		1.35 ± 0.05
	10 th day (6)	7.8 ± 1.8	3.6 ± 0.5	n.s.	1.40 ± 0.06
	15 th day (6)	8.1 ± 0.3	3.9 ± 0.5	n.s.	1.50 ± 0.17
Release of biliary obstruction	5 th day (6)	8.0 ± 3.5	4.0 ± 0.2	n.s.	1.40 ± 0.08
	10 th day (6)	0.8 ± 0.2	3.6 ± 0.3	n.s.	1.35 ± 0.05
	15 th day (6)	0.5 ± 0.1	4.7 ± 0.4	p<0.01	1.55 ± 0.12
15 th day (6)	0.3 ± 0.1	5.2 ± 0.3	p<0.01	1.77 ± 0.05	p<0.01

Mean ± S.D. (): number of animals
 *p between 5 day biliary stasis group and others
 n.s. = not significant

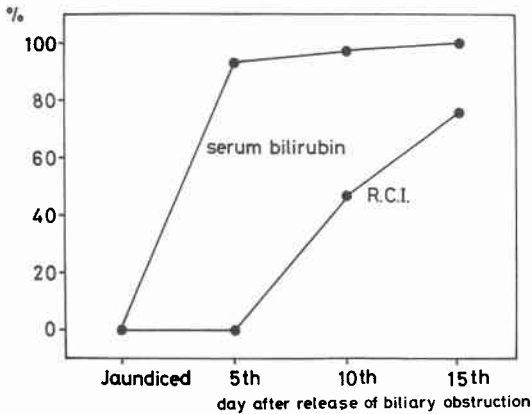
*3 : 閉塞 5 日目の RCI

*4 : 対照群の RCI

B : 閉塞解除後 5, 10, 15 日の RCI

図 6 に示したように血清総ビリルビン値の回復に対して、RCI の回復が遅延していることが一見して明らかになる。

図 6 The degree of recovery in serum bilirubin & R.C.I. after release of biliary obstruction



内膜 Mt ATPase 活性は、対照肝 Mt で 0.45 ± 0.02 n moles/min/mg で、閉塞後 5 日の黄疸肝 Mt で 0.41 ± 0.03 であつたが、閉塞解除後 5 日では 0.40 ± 0.05 、解除後 15 日では 0.42 ± 0.03 であり、各群の間に有意の差を認めなかつた。しかし、黄疸肝で著明な変化を認めた内膜 Mt ATPase のヌクレオチド特異性については、閉塞解除後 5 日の内膜 Mt ATPase の GTP, ITP に対する水解能は、それぞれ、内膜 Mt ATPase 活性の 100.5 ± 11.8%, 118.9 ± 11.9% であり、なお著明な変化を示した。解除後 15 日では、GTP, ITP に対する水解能は、それぞれ、40.5 ± 3.5%, 40.0 ± 3.9% と低下し、対照肝 Mt

との間に有意の差を認めなかつた (図 4)。

IV. 考 按

主として胆道系の閉塞性疾患が原因して発症する肝外閉塞性黄疸時における各臓器の病態生理は複雑である。長期かつ高度の黄疸が持続すると、生体の代謝の中心である肝のみならず他の臓器にも障害がみられ、原因疾患に対する根治手術のみならず姑息的な黄疸解除手術に際してさえも、重篤な合併症をみることがある¹⁾¹⁰⁾。したがつて临床上、閉塞性黄疸時の諸臓器の病態生理を理解し把握することは、良好な治療成績を得るために必要な課題である。著者は、肝外閉塞性黄疸により直接的な影響をうける肝の病態生理を、黄疸時および黄疸解除後の変化を中心に肝の微細構造レベルの機能面より検討した。

従来、機械的閉塞性黄疸についてはいろいろの実験動物で様々の観点より多くの研究が行われている^{2)19)~23)}、しかし、一般に実験的閉塞性黄疸の解除には、閉塞された胆汁流路の変更手術を要する煩雑さがあるため、閉塞解除後の病態に中心をおいた研究は比較的少ない²³⁾。とくにラットでは機械的に総胆管を閉塞した後に総胆管閉塞を解除することは手技的に容易でない。Trams²⁴⁾ はラットで総胆管を単結紮して閉塞性黄疸を作製した場合、拡張した肝側総胆管が十二指腸側総胆管に重なり、単結紮上下の総胆管壁が癒合して、総胆管閉塞後 10~15 日で閉塞上下の総胆管に自然再疎通が生じることを認めた。したがつて総胆管単結紮ラットは閉塞性黄疸解除の実験モデルとして使用しうる可能性があると指摘した。しかし、この総胆管単結紮後の自然再疎通は、その成立機序や血清総ビリルビン値が高値となつた後に徐々に正常値に低下することから推測されるように、部分的再疎通の状態から次第に完全な解除になると考えられる。すなわち、閉塞期間や再開通の時期が不定である欠点が推定され、事実、著者の予備実験でもこのような欠点を経験した。これに反して著者が考案した実験モデルは閉塞解除の時期をビニール管を開放し空腸内に戻す簡単な方法により自由に任意に決定できる利点があるので、閉塞解除後の病態を検討するには有力な実験モデルであると判断した。

閉塞性黄疸時、肝細胞内にうづ滞する胆汁成分の 1 つであるビリルビンが、in vitro で Mt 機能を障害することは一般に認められている。このビリルビンによる Mt 機能障害については、Day²⁵⁾ がラットの細片脳組織を用いて呼吸の抑制を認めて以来多くの研究があり、呼吸の

抑制の他、酸化的リン酸化反応の脱共役、Mt の形態変化などが認められている反面^{26)~29)}、低濃度ビリルビンでは逆に Mt の呼吸が促進するといわれている²⁸⁾。著者の *in vitro* の実験結果でも、ビリルビンによる Mt 機能の障害はビリルビン濃度によつて異なつた影響をうけた。すなわち、Mt の intactness の指標とされている RCI はビリルビン濃度の増加とともに、ほぼ直線的に低下し、Mt 機能の障害が次第に著しくなつていくことを示した。しかし、この RCI の低下の原因は、43 μ M ビリルビン濃度では State 4 呼吸の亢進すなわち酸化的リン酸化反応の脱共役が主因であつた。さらにビリルビン濃度が高い場合では State 3 呼吸の低下の影響も加わり、Mt 機能は複雑な障害をうけていると推測された。従つて、ビリルビンによる Mt の機能障害は酸化的リン酸化反応の脱共役が第一義的であると考えられ、Zetterström ら¹⁰⁾、Cowger ら²⁷⁾の結論も同様である。

一方、著者が閉塞5日後の黄疸肝 Mt で検討した結果では、polarographical に測定した呼吸曲線の分析から ATP 生成能の障害がみられた(表1)。小沢ら³⁰⁾、山岡ら³¹⁾も同様の結果を報告している。この ATP 生成能の低下は、State 3 呼吸の軽度の亢進をみるにも拘らず RCI, ADP/0 比が低下していることから、*in vitro* での検討と同じく酸化的リン酸化反応の脱共役が主因をなしていると考えられる。著者は、さらに閉塞性黄疸肝で Mt のエネルギー産生機構の中の電子伝達系と ATP 生成系が個々にうけている影響をみるために、電子伝達系の成分であるチトクローム a (+a₃), b, c (+c₁) と ATP 生成系の主体と考えられる ATPase について検討した。閉塞後5日の黄疸肝 Mt の Cyt. a (+a₃) および b と対照肝 Mt のそれらの間に有意の差は認められなかつたが、黄疸肝の Cyt. c (+c₁) は対照 Mt に比較して軽度であるが有意に低下した。しかし、この Cyt. c (+c₁) の低下については、Cyt. c (+c₁) は他の Cyt. a (+a₃), b と異なり Mt から容易に抽出されること³²⁾から想像されるように、黄疸という病態のほか、Mt 分離調整時の影響も否定できないと考えられる。チトクローム系酵素の変動は病態の複雑な閉塞性黄疸臨床例において認められている³³⁾。しかし閉塞後5日のラット黄疸肝では、State 3 呼吸の軽度の亢進が認められていることから、Mt 内膜の成分である電子伝達系酵素に重大な構造的変化は起りにくいものと考えられる。一方内膜 Mt ATPase 活性は黄疸肝 Mt と対照肝 Mt で有意の差を認めなかつたが、内膜 Mt ATPase の性質の1

つであるヌクレオチド特異性については、黄疸肝 Mt でその特異性が著しく低下した。以上の結果から、総胆管閉塞後5日の黄疸肝 Mt におけるエネルギー産生機構の障害は酸化的リン酸化反応の脱共役が主体をなしていると考えられた。しかし、内膜 Mt ATPase のヌクレオチド特異性の低下および Cyt. c (+c₁) の低下が同時に認められることから、胆汁うづ滞時に肝細胞 Mt のうける障害機序は単一ではないと想像された。

肝外閉塞性黄疸時、肝組織の障害は閉塞期間が長くなる程著明となる^{20) 22) 23)}。しかし、微細構造の機能を中心とした著者の実験結果では肝細胞 Mt の ATP 生成能は、閉塞後5日で著明な低下を認め、以後血清総ビリルビン値が高値を維持しているにも拘らず、肝 Mt の ATP 生成能は軽度に回復の傾向を示した。このような機械的総胆管完全閉塞時に肝 Mt が示す ATP 生成能の変化は、山岡ら³¹⁾によるウサギの実験でも認められており、肝組織が高度の障害をうけている中で肝細胞が何らかの適応現象を示して生体の必要とする最低限のエネルギー産生を維持していると考えられる。一方、閉塞性黄疸時に障害をうけた肝 Mt 機能は、閉塞解除後5日で血清総ビリルビン値はすでに著明に低下しているに拘らず(表2、図5-A)、Mt 機能の指標となる RCI (図5-B) や内膜 Mt ATPase のヌクレオチド特異性(図4)でみても黄疸時に比較してほとんど回復していない。しかし解除後15日では、内膜 Mt ATPase のヌクレオチド特異性は対照肝 Mt と同様のパターンとなり、RCI も明らかな改善がみられた。図6からも明らかなように閉塞性黄疸解除後の血清総ビリルビン値と肝 Mt 機能の回復過程の相違は、著者ら¹⁸⁾が既報した電顕上の検索で、閉塞性黄疸時、肝細胞周辺部の微細構造にみられる変化は閉塞解除後早期に回復するが、Mt の形態変化の改善は遅延する所見とも一致した。このような所見は、閉塞性黄疸解除後に、臨床上用いられる血清生化学的検査値が著明に改善しているにも拘らず、肝細胞エネルギー産生機能の回復が充分でない時期が存在することを示唆していると考えられ、外科臨床手術後管理の上で留意すべき事実と考えられた。

V. まとめ

1. 著者が新たに考案したラットにおける機械的閉塞性黄疸作製および解除術式について述べ、この実験モデルが総胆管閉塞および解除後の肝の病態を検索するのに有効であることを知つた。

2. *in vitro* でビリルビンによる Mt の機能障害を polarographical に検討した結果、Mt のエネルギー産生

機能は、低濃度ビリルビンでは酸化的リン酸化反応の脱共役、高濃度ビリルビンではさらに呼吸の抑制による障害をうけることを認めた。

3. 総胆管閉塞後5日の黄疸肝 Mt では、ATP 生成能の著明な低下がみられた。この Mt 機能の障害は、呼吸曲線の分析、呼吸酵素の測定、内膜 Mt ATPase の検討から酸化的リン酸化反応の脱共役が主体であると推定し得た。また、内膜 Mt ATPase の性質の1つであるヌクレオチド特異性および呼吸鎖の成分であるチトクローム c (+c₁) の低下も観察された。

4. 総胆管閉塞後5日で閉塞解除を行い、肝 Mt 機能障害の回復を検討した結果は、血清総ビリルビン値は円滑に正常値に低下したにも拘らず、肝 Mt 機能障害の回復は遅延した。このことは臨床上留意すべきことと思われた。

(本論文の要旨は第11回日本肝臓学会総会(1975年6月、東京)で発表した。

稿を終るに臨み、ご指導ならびにご校閲を賜った恩師石川浩一教授に謝意を捧げるとともに、終始直接にご指導、ご援助を戴いた菅原克彦講師に感謝の意を表す。また実験のご協力を賜った共同研究者の諸先生方に厚くお礼申し上げます。

なお、本研究の一部は文部省科学研究費課題番号857133, 948055によった。附記して謝意を表す。)

文 献

- 1) 石川浩一ほか：黄疸の治療—外科—。内科, **34**: 448, 1974.
- 2) Ozawa, K., et al.: Primary cause of decreased functional reserve in the liver of icteric patients and rats. Surg. Gynec. Obstet., **139**: 358, 1974.
- 3) Hogeboom, G.H.: Fractionation of cell components of animal tissues. Methods in Enzymology, Vol. 1. Academic Press Inc., New York, 1955.
- 4) Potter, V.R. and Elvehjem, C.A.: A modified method for the study of tissue oxidations. J. Biol. Chem., **114**: 495, 1936.
- 5) Hogeboom, G.H. and Schneider, W.C.: Isolation of intact mitochondria from rat liver. J. Biol. Chem., **172**: 619, 1948.
- 6) Lowry, O.H., et al.: Protein measurement with the Folin Phenol reagent. J. Biol. Chem., **193**: 265, 1951.
- 7) 萩原文二：酸素電極法による呼吸の測定。蛋白質・核酸・酵素, **10**: 1689, 1965.
- 8) 水上茂樹：医学・生物学における酸素電極の利

用。医学のあゆみ, **54**: 551, 1965.

- 9) Clark, L.C.: Continuous recording of blood oxygen tensions by polarography. J. Appl. Physiol., **6**: 189, 1953.
- 10) Zetterstrom, R. and Ernster, L.: Bilirubin, an uncoupler of oxidative phosphorylation in isolated mitochondria. Nature, **178**: 1335, 1956.
- 11) Okamoto, H., et al.: On the submitochondrial localization of l-kynurenine-3-hydroxylase. Biochem. Biophys. Res. Comm., **26**: 309, 1967.
- 12) Schnaitman, C., et al.: The submitochondrial localization of monoamine oxidase. J. Cell. Biol., **32**: 719, 1967.
- 13) Caplan, A.L., et al.: The effect of osmotic lysis on the oxidative phosphorylation and compartmentation of rat liver mitochondria. J. Cell Biol., **36**: 15, 1968.
- 14) Martin, J.B. and Doty, D.M.: Determination of inorganic phosphate. Anal. Chem., **21**: 965, 1949.
- 15) Chance, B.: Techniques for the assay of the respiratory enzymes. Methods in Enzymology, Vol. III. Academic Press Inc., New York, 1955.
- 16) Iwata, S., et al.: Flavin and cytochromes contents in the mitochondria of the heart and liver. Acta Med. Okayama, **21**: 191, 1967.
- 17) 萩原文二：差スペクトルと二波長測定で生体内酸化還元色素への応用。蛋白質・核酸・酵素, **13**: 370, 1968.
- 18) 菅原克彦ほか：高度閉塞性黄疸の病態。臨床外科, **3**: 341, 1975.
- 19) Cameron, G.R. and Oaklay, C.: Ligation of the common bile duct. J. Path. Bact., **35**: 769, 1932.
- 20) Sasaki, H.: Experimental obstructive jaundice, morphogenetic studies on biliary cirrhosis. Acta Med. Univ. Kyoto, **37**: 59, 1960.
- 21) Schaffner, F., et al.: Mechanism of cholestasis. Gastroenterology, **60**: 888, 1971.
- 22) Cameron, G.R. and Hasan, S.M.: Disturbances of structure and function in the liver as the result of biliary obstruction. J. Path. Bact., **75**: 333, 1958.
- 23) Aronsen, K.F.: Liver function studies during and after complete extra-hepatic biliary obstruction in the dog. Acta Chir. Scand., Suppl., **275**: 1, 1961.
- 24) Trams, E.G. and Symenoidis, A.: Morphologic and functional changes in the livers of rats after ligation or excision of the common bile duct. Amer. J. Path., **33**: 13, 1957.
- 25) Day, R.L.: Inhibition of brain respiration

- in vitro by bilirubin. Reversal of inhibition by various means. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **85**: 261, 1954.
- 26) Waters, W.J. and Bowen, W.R.: Bilirubin encephalopathy-Studies related to cellular respiration. *Amer. J. Dis. Id.*, **90**: 603, 1955.
- 27) Cowger, M.L., et al.: The mechanism of bilirubin toxicity studied with purified respiratory enzyme and tissue culture systems. *Biochemistry*, **4**: 2663, 1965.
- 28) Mustafa, M.G., et al.: Effects of bilirubin on mitochondrial reactions. *J. Biol. Chem.*, **244**: 64033, 1969.
- 29) Schenker, S., et al.: Studies of cellular toxicity of unconjugated bilirubin in kernicteric brain. *J. Clin. Inv.*, **45**: 1213, 1966.
- 30) Ozawa, K., et al.: Alteration in liver mitochondrial metabolism in a patient with biliary obstruction due to liver carcinoma. *Amer. J. Surg.*, **126**: 653, 1973.
- 31) 山岡義生ほか：ミトコンドリア機能からみた閉塞性黄疸。医学のあゆみ，**86**：499，1973。
- 32) 小沢高将：呼吸鎖成分とその再構成，小沢・浅井・内海著，ミトコンドリア，その分子構築と生理化学，南江堂，東京，1971。
- 33) Ozawa, K., et al.: Human liver mitochondria. *Clin. Chim. Acta*, **38**: 385, 1972.