

Title	低酸素適応, 順化能力についての考察(生体肝細胞電位の測定)
Sub Title	On the ability of adaptation and acclimatization of organisms under the hypoxia (measurement of living liver-cell potential)
Author	辰沼, 廣吉(Tatsunuma, Hirokichi)
Publisher	慶應義塾大学体育研究所
Publication year	1988
Jtitle	体育研究所紀要 (Bulletin of the institute of physical education, Keio university). Vol.28, No.1 (1988. 12) ,p.53- 62
JaLC DOI	
Abstract	
Notes	
Genre	Departmental Bulletin Paper
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=AN00135710-00280001-0053

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the KeiO Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

低酸素適応, 順化能力についての考察 (生体肝細胞電位の測定)

辰 沼 廣 吉*

- I. 方法並びに結果
 - (1) 白金電極法
 - (2) ガラス電極法
 - (3) 肝抽出液電位測定
- II. 考 察
- III. 結 論

生理的には主として心肺系を中心に考究されて来たのであるが, 高々度での無酸素補給登行には細胞レベルでの低酸素適応, 順化の様相をとり上げなければならない。ただこの問題については山中での実測は方法の点で多くの困難を伴い不可能に近いので, 動物実験によらなければならない。

I. 方法並びに結果

酸素によって変動する細胞の自由 Energy 変化を知るには, 電子伝達系に伴う酸化還元電位は都合の良い物理量の一つである。生体反応で TcA 回路及び呼吸鎖における酸化還元反応は Energy 産生過程としての場であり, ことに呼吸鎖は基質の脱水素反応と, 還元当量体の分子状酸素への伝達を触媒する多酵素複合体とされている。これらの水素運搬体または呼吸酵素などは著しい電動能をもち新陳代謝物質としても適当な操作のもとに電動能をうるに至る。そしてこの電動能を量化して表すものが酸化還元電位である。

水素電極の平衡定数 $K_H = \frac{(H^+)^2(e)^2}{(H_2)}$ はつねに 1 に等しいから $(e) = \frac{\sqrt{(H_2)}}{(H^+)}$ となり, これを酸化還元電位と自由エネルギーとの関係式 $E_h = -\frac{RT}{F} \ln(e)_H$ に代入すれば

$$E_h = -\frac{RT}{F} \ln \frac{\sqrt{(H_2)}}{(H^+)} = 0.06 \log \sqrt{(H_2)} - 0.06 \ln \frac{1}{(H^+)}$$

* 元慶應義塾大学体育研究所教授

低酸素適応, 順化能力についての考察

が得られる。ここで $-\log(\text{H}_2)$ を rH なる記号であらわせば $E_h = 0.03rH - 0.06\text{pH}$ となる。

即ち温度と pH が与えられるとき酸化還元電位を rH で現わし比較検討できる。正常細胞内電位は rH20 近傍が多い。マウスの体温は酸素量の低減とともに下降するので、電位補正を加えなければならない。

(1) 白金電極法

生体肝組織の総合的な電位を測定するために、マウスに軽度エーテル麻酔のもとに上腹部正中線で 1 cm 縦切開を加え肝葉前面に達し、これに白金線に絶縁塗料をほどこしたものの先端を斜に切断したものを 5 mm 挿入固定する。一方甘汞電極を下腹部の皮下に圧着させて肝電位を測定した。これらすべてをマウスに着装のままデシケーターに入れ種々の程度に減圧し導線で外部の電位差計に接続し自記記録した。

順化状態形成には 1 日 6 時間宛 405mmHg で 1 週間負荷を与えた。生肝の電位測定は低酸素負荷を 526, 462, 405, 354, 308, 267, 230, 198, 169mmHg の各圧を 10 分間宛加え、それぞれについて自記記録した。

注) 気圧相当高度 526mmHg—3,000m, 462mmHg—4,000m, 405mmHg—5,000m, 354mmHg—6,000m, 308mmHg—7,000m, 267mmHg—8,000m, 230mmHg—9,000m, 198mmHg—10,000m, 169mmHg—11,000m。

実験1) 非順化群と順化群の週間並びに月間推移比較

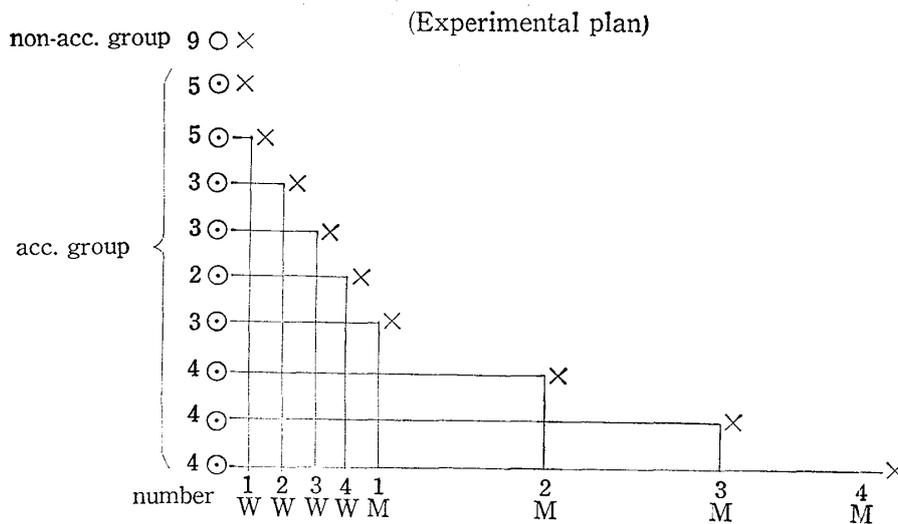


Fig. 1 Weekly and monthly transition-comparison between non-acclimatized and acclimatized groups.

- non-acclimatized group
- ⊙ making acclimatized state
- × potential-test on hypoxia burden

低酸素適応、順化能力についての考察

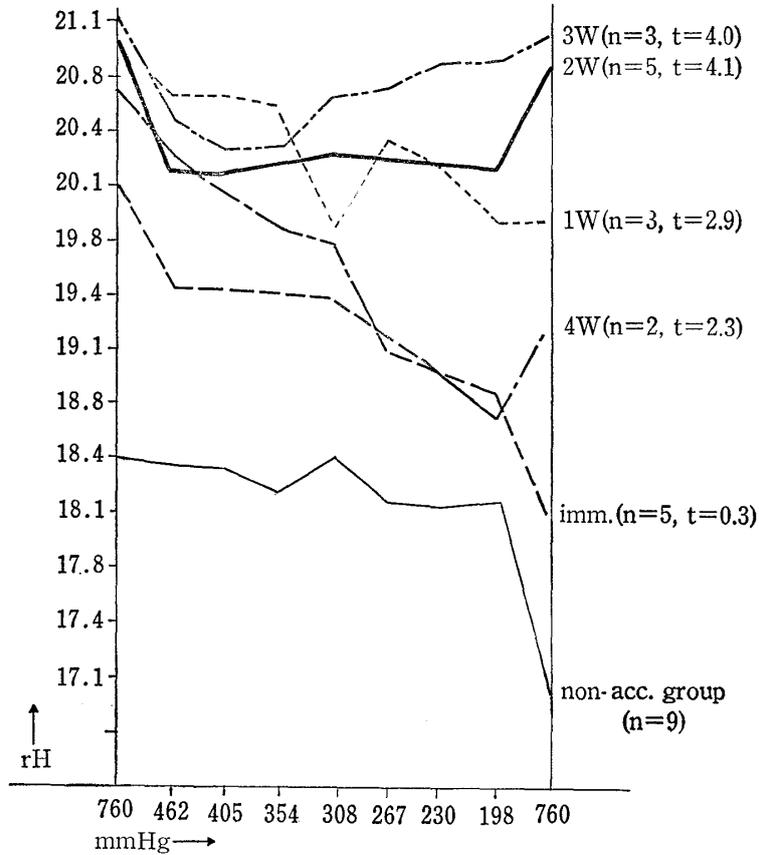


Fig. 2 Weekly transition-comparison between acclimatized and non-acclimatized groups.

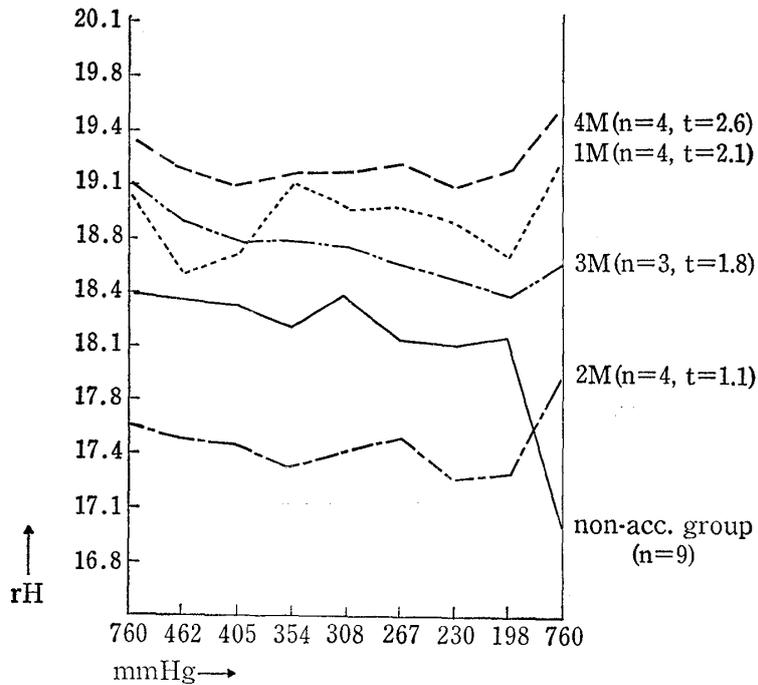


Fig. 3 Monthly transition-comparison between acclimatized and non-acclimatized groups.

低酸素適応, 順化能力についての考察

実験計画は (Fig. 1) に示す。非順化群 9 匹に対し順化群 33 匹を 8 群に分け, 4 カ月間にわたり電位測定を行った。

成績は (Fig. 2 および Fig. 3) に示す。非順化群の初期 rH は 18.4 を示し 198mmHg 低酸素負荷まではほぼ水平を維持するが, 最後には復圧しても死亡例が多く最終電位は低値を示す。順化直後の初期電圧は高く保たれているが, 低酸素負荷中は下降の傾向を示し復圧後は著しく下降したが, これは 5 匹中 3 匹が死亡したためである。順化後 1, 2, 3 週後は初期及び復圧後も高電位を示し非順化群とは明らかに有意差を示している。4 週後は低酸素負荷が強くなるに従って下降したが死亡例はなかった。2, 3 週後は安定した様相を残している。

1, 3, 4 カ月後の初期電位及び復圧後電位は非順化群より高い ($t = 0.9 \sim 1.8$)。2 カ月後は非順化群に比べて低い安定はしている ($t = 1.4$)。しかし一般的に週間電位変化より低い電位を示す。

(2) ガラス電極法

生肝細胞の電位を測定するために, 実験1)と同様な操作をマウスにほどこし, 白金線の代りにガラス電極を使用した。

実験2) 非順化群と順化群の週間推移比較

実験計画は (Fig. 4) に示す。マウス 30 匹を使用し飼養中 5 匹は死亡, 7 匹を対照とし残りを全部前実験と同様に低酸素負荷を与えて順化状態を形成した。この順化直後 4 匹, 1 週間後 4 匹, 2 週間後 4 匹, 3 週間後 3 匹, 4 週間後 3 匹について低酸素負荷を与え生肝の電位変化の推移を求めた。

成績は (Fig. 5) に示す。非順化群と順化群 1, 2, 4 週後は有意性 ($t = 1.9 \sim 4.1$) を示す

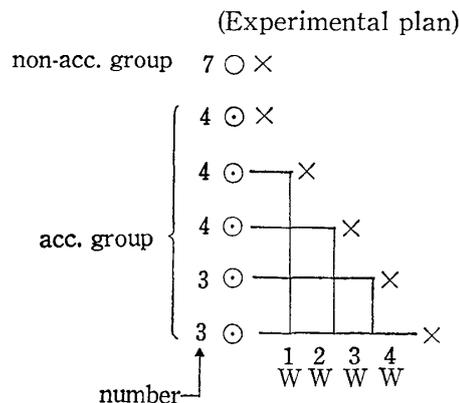


Fig.4 Weekly transition-comparison between non-acclimatized and acclimatized groups.
 O non-acclimatized group
 ⊙ making acclimatized state
 X potential-test on hypoxia burden

低酸素適応, 順化能力についての考察

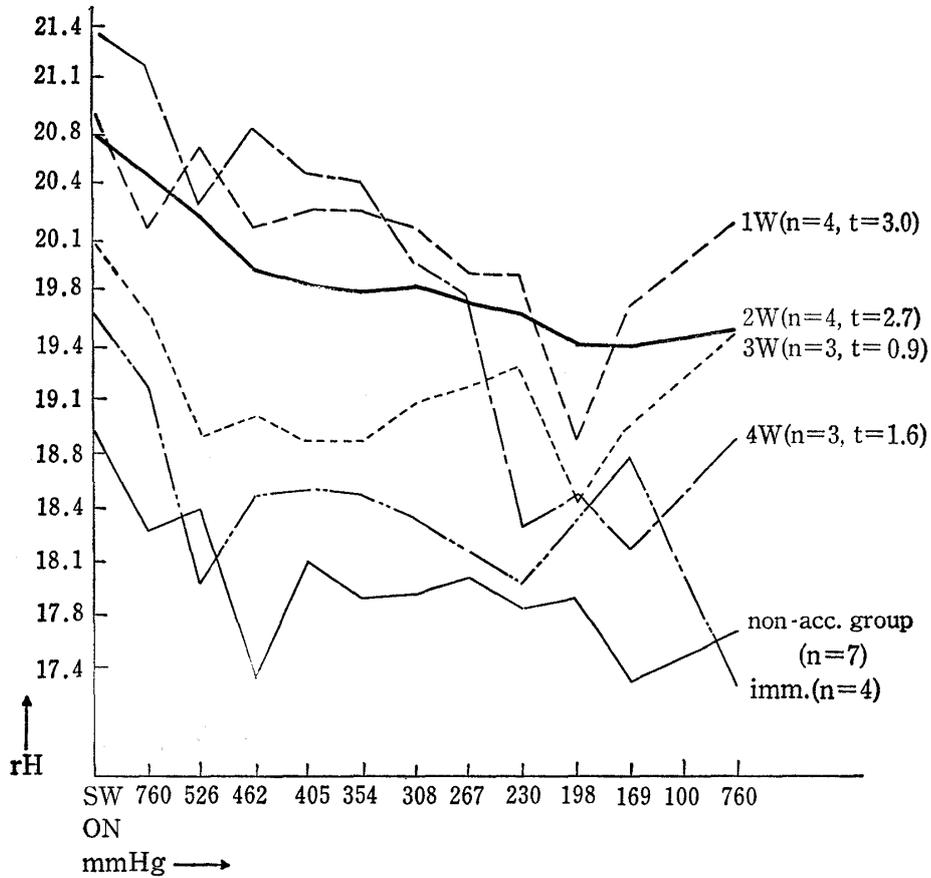


Fig.5 Weekly transition-comparison between acclimatized and non-acclimatized groups.

が3週後は稍低電位で ($t = 1.1$) 不安定である。低酸素負荷順化形成直後は一般的に他例のごとく低電位である。負荷に対しては一般に低電位に下降しやすく不安定である。

実験3) 再順化群の月間推移比較

実験計画を (Fig. 6) に示す。マウス30匹を使用し飼育中8匹死亡, 3匹を対照とし残り全部に同様の低酸素負荷を与え順化状態を形成し, このうち1か月後9匹について生肝電位を測

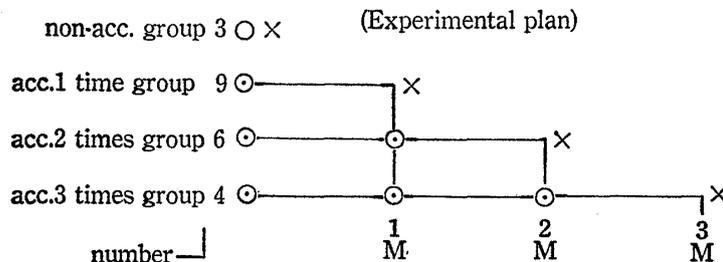


Fig.6 Monthly transition-comparison between re-acclimatized and non-acclimatized groups.

- non-acclimatized group
- ⊙ making acclimatized state
- × potential test on hypoxia burden

低酸素適応、順化能力についての考察

定し、更に残部10匹について低酸素負荷を与え再順化状態を形成せしめ、その1カ月後にうち6匹について生肝電位を測定、更に1カ月後残部4匹について更に低酸素負荷を与え、再順化状態を形成し、この1カ月後に生肝電位を測定比較した。

成績は (Fig. 7) に示す。非順化群に比較して再順化群 (1回, 2回, 3回負荷) はいずれも有意性 ($t=3.7\sim 0.8$) をもって高電位を示す。とくに2回, 3回と重ねて順化を形成することは有効に作用している様相がうかがわれる。さらに安定化していることも特徴として認められるが、一般的に週間電位推移より低い電位である。

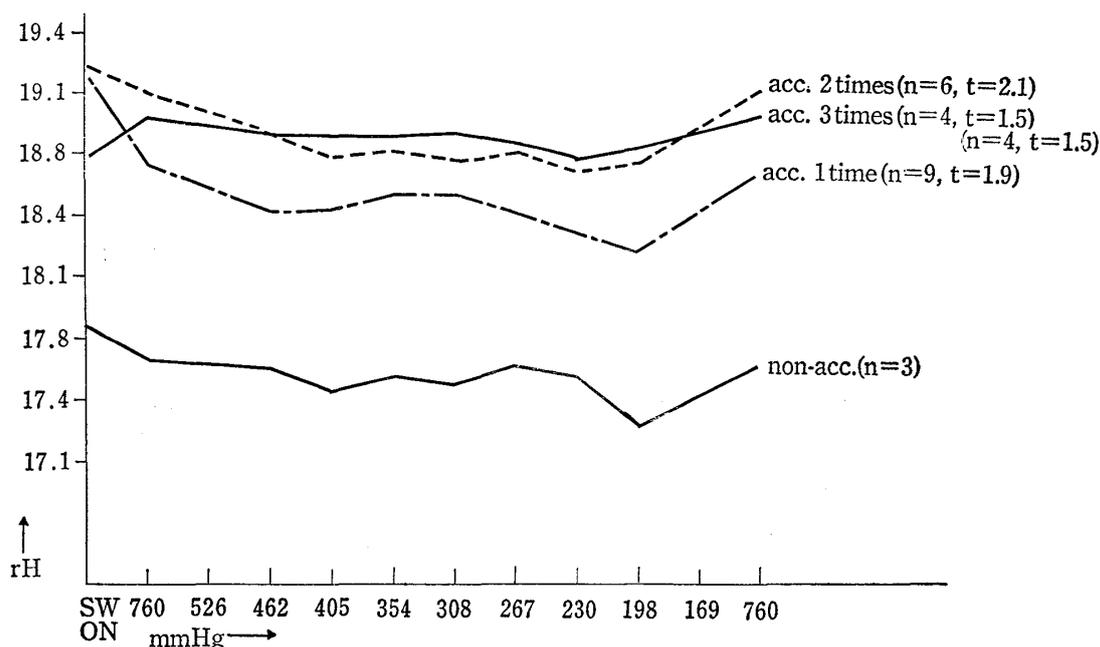


Fig.7 Transition-comparison between re-acclimatized groups.

(3) 肝抽出液電位測定

心肺系の細胞への効果を遮断する意味で、マウス35匹を使用し、前実験と同様に順化状態を形成し、肝抽出液は先ず肝臓を生体より切除摘出し生理的食塩水で洗滌し細切し乳鉢で細胞を破壊し $C 30^\circ$ の M/10 磷酸緩衝液 (pH 7.0) 5 cc に浮かべて振盪後、遠心分離 (3,000回転, 60分) して得た抽出液を小容器にとり、これに白金電極並びに甘汞標準電極を浸してデシケーターに入れ 100mmHg ($P_{O_2} 20\text{mmHg}$) に減圧し、60分間の電位下降の様相の測定を行った。この抽出液中の溶在酸素量は測定出来なかったが、E. A. Kovalenko によると $P_{O_2} 6.2\text{mmHg}$ 以下である。⁽²⁾

実験4) 実験計画は (Fig. 8) のごとくで、非順化群には還元 glutation 0.01gr を酵素賦活剤として添加したものと、ウマの心筋から抽出された cytochrome C 1.5mg 添加したものを作った。順化群は順化直後、1, 2, 3, 5 週後に肝摘出して測定に提供した。

低酸素適応, 順化能力についての考察

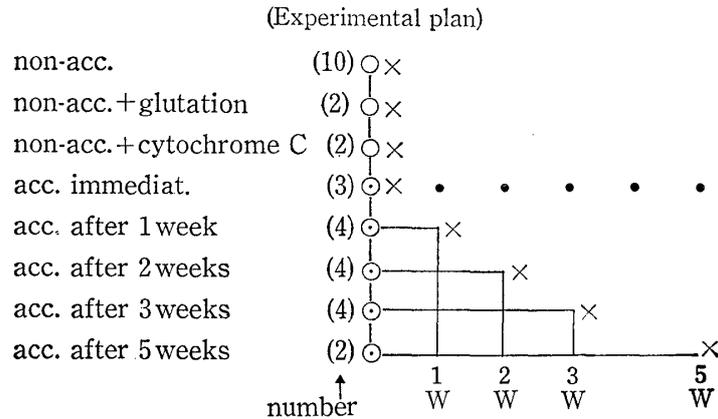


Fig.8 Potential transition-comparison between Liver Extract Fluid in P_{O_2} 20mmHg.
 ○ non-acclimatized group
 ⊙ making acclimatized state
 × potential test on hypoxia burden

成績は (Fig. 9) に示す。順化後 1, 3, 5 週間後の肝抽出液についての下降電位は非順化群のそれに比べて少なく, 最終電位は高く保たれている。2 週間後は稍低調な結果となっている。更に非順化群の肝抽出液の glutathion 添加では下降電位は変わらないが最終電位は rH 16 に保たれている。cytochrome C 添加では下降電位は低く, 非順化群と大差は認められないが, 曲線の下降をこばむような小隆起曲線が +41mV と -8mV の位置にみられる。(Fig. 10)

これらの実験結果は生命体としての心肺系による酸素供給の増強が断たれているにもかかわらず, 細胞それ自身の酵素系の順化の残留があったものと考えられる。又運搬体であるフラビン系, ピリジン系と基準体系である cytochrome C, glutathion とは下降電位曲線の様相の差がみられる。しかし両系については, それぞれ質及び量の問題があり, 又現在までの多くの実験成績からもいろいろな成績があり, まちまちである。しかしいずれにしても, この場合肝臓を摘出しているので心肺系の援助はないはずである。

II. 考 察

元来生体内で素粒子から原子, 分子を構成するところは, きわめて規則性が高い。素粒子の位置する軌道は決まっているから, できた原子や分子は均一で間違いは非常に少ない。そして更に生体高分子をつくる場所は勿論遺伝コードによって制御がある。核酸は塩基対を介して規則的につくられ, ここまでは物理化学的に純粹の共有結合化学である。ところが細胞内小器官の組成成分は分子集合によって作られるが遺伝の命ずるままに作られたものである。しかし好氣的細胞に存在する微小顆粒で酸素呼吸による ATP の合成を基本的機能とする mitochondria

低酸素適応, 順化能力についての考察

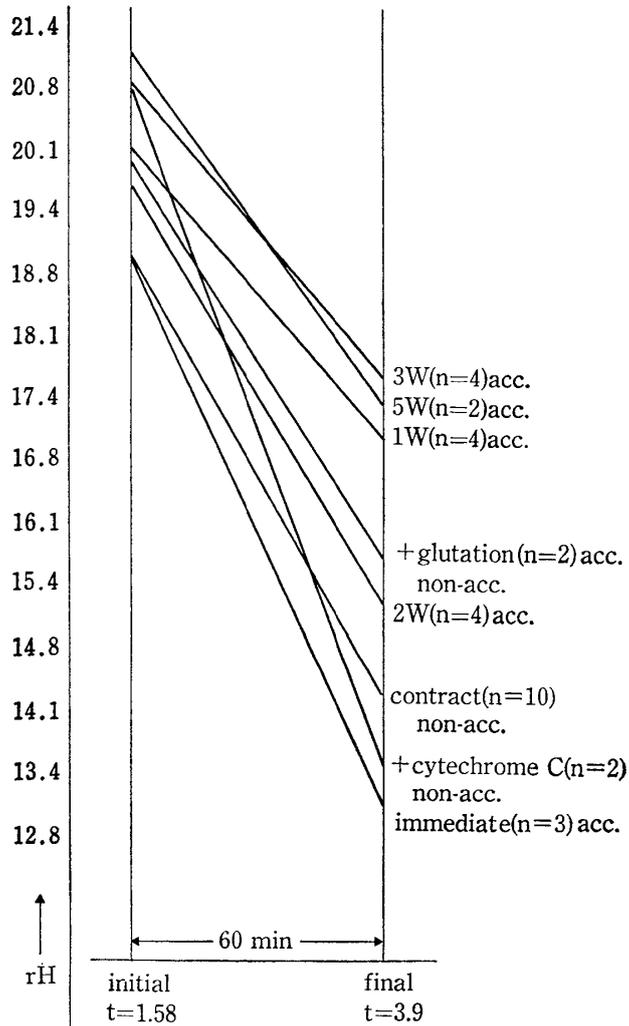


Fig.9 Potential transition-comparison between Liver Extract Fluid in P_{O_2} 20mmHg.

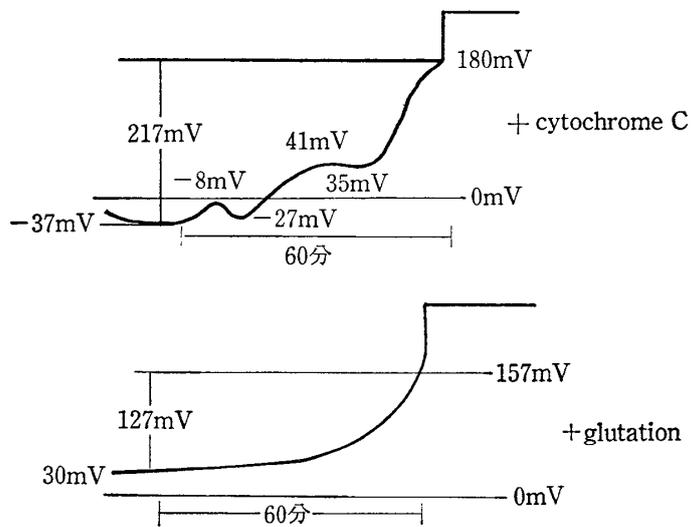


Fig.10

低酸素適応，順化能力についての考察

は低酸素環境では異なる挙動を示すものである。即ち疎水結合が中心となっていて，全体として共有結合はほとんど関与していない。従ってこの mitochondria についてみると遺伝と環境の支配を受ける可能性をもち，電子伝達系における電子供与体，電子受容体，酸化還元酵素の相互位置の究明が必要となってくる。しかし酸素反応系に関与する全物質，つまり酵素蛋白，基質，補因子，溶媒としての水などの機能や相互作用を基質が酵素の活性中心にとり込まれるところから生成物が酵素系から離れてゆくところまで三次元的に明らかにする事が必要となってくるであろう。

又環境変化に対して生化学的適応が実現される速度は，この適応が生じる代謝制御階層における部位によって異なるであろう。細胞中ですでに活躍している酵素の変調は，ほとんど瞬間的に適応が出来る。一方共有結合で蛋白質の系統進化に伴うアミノ酸置換の多くは自然淘汰に対して中立的な突然変異遺伝子が機会的浮動によって集団に固定されたものであるが，現実には生物は高度に環境に適応したものであり，蛋白質レベルでも中立的進化が混じって適応的進化が起っているにちがいないが，多くの時間を要する。⁽⁴⁾

III. 結 論

1) 生命体の低酸素負荷に対する順化マウスの適応能力は，生肝の総合的電位並びに肝細胞電位の測定値から推測すると，心肺系の協力のもとに，ほぼ大気圧 308~267mmHg (7,000m—8,000m) まで約4週間にわたり良く高電位を保っているが，個体差が認められる。

2) 生肝の総合的電位の月間推移は4カ月にわたり保持されるが非順化のそれに近づき安定化してくる。

3) 低酸素に反復順化させたマウスの生肝細胞の電位についての月間変化の推移は非順化群と比較して明らかに高電位を維持し安定化してくる。

4) 肝摘出抽出液の電位は60分間に下降するが非順化群に比較して高電位を維持している。しかし心肺系からの補給のないことで下降後一定準位にとどまってしまう。

以上の実験中に死亡例並びに個体差のあることを認めなければならない。

以上の結果から月余にわたる細胞の電子伝達系に順化残留の様相がみられる。しかし電位的に生体から切り離された肝抽出液と生命体内における肝細胞では下降電位には明らかな差がみられる。この差は心肺系による酸素供給による一次反応，あるいは他の内分泌の生命体としての適応能力によるものであろう。生命体としての肝臓を扱えば血管及び間質液を通して酸素は細胞に平等に配布され又環境酸素濃度とも必ずしも比例せず高濃度となることもあり得る。一方肝抽出液又は切片等として扱えば表面における酸素濃度は深部より高濃度になっていること

低酸素適応, 順化能力についての考察

もあるはずである。生命体では酵素系においてだけでも量と質の変化が含まれるが、分離系では限られた系内でむしろ質の変化のみにとどまるであろう。いずれにしても細胞内の小器官である mitochondria は疎水結合が中心であり電子伝達系を含み酸素親和性を有するエネルギー産生場として環境の支配を受け適応性を発揮する。さらに代謝系の物理化学的検索, 例えば酵素系の三次的構造 Radical, spine 等の研究も質の問題として必要であるが, 酵素活性については電子が一たんこの系に入ってしまうと特有の方向性をもった流れに沿って最終的には酸素親和性によって処理される。このように固有の秩序ある生体系は環境の支配を受けながらも適応能力によって生きる方向に向ってなされる energy を持っている。従ってこの energy を見失っては適応能力の実体を追求する道がとざされてしまう。総括的にみれば生命体は entropy 減少の方向へ, 摘出物は entropy 増大の方向へと進むから, 研究の対象としては疎水結合を中心として組み立てられる mitochondria level 以上の組織, 臓器についての energy の追求が妥当であろう。しかし実際には生命体から分離された物質についての研究は現在では物理化学的には比較的容易であるが, 生命体内でこれを研究することは極めてむずかしい技術的問題がつきまとうものである。従って生体内における energy 追求の検索と, 生体から分離された化学系の解明は平行的に進められなくてはならない。

更に言うなれば生体の秩序性, フィードバック問題は個立系において物理化学的に追求されてはいるが, 少なくとも生在の方向に向って環境に適応する energy を見失わないことが必要であろう。この示標の一つとして生体内における肝電位の測定も意味があると思う。

文 献

- (1) H. Kubo: Red-ox-potential, NANJO, 1941, p. 143.
- (2) E. A. Kovalenko: The theory of oxygen dynamics in tissues, The oxygen regime of the organism and its regulation, Edited by N. V. Lauer and A. Z. Kolchinskaya, p. 133, 1966.
- (3) D. Mizuno: Chemistry of Organelles, press of Tokyo Univ., 1977, p. 78.
- (4) M. Kimura: Theoretical aspects of population genetics, Princeton Univ. Press, 1971.