

肝ミトコンドリア機能よりみた、出血性ショック及び エンドトキシンショックにおける実験的研究

京都大学医学部第1外科（指導：戸部隆吉教授）

嵐 原 康 行

〔原稿受付：昭和57年3月1日〕

An Analysis of Altered Energy Metabolism in Hemorrhagic and Endotoxin Shock —Experimental Studies on the Basis of Hepatic Mitochondrial Activities—

YASUYUKI SHIMAHARA

The First Department of Surgery, Faculty of Medicine, Kyoto University
(Director: Prof. Dr. TAKAYOSHI TOBE)

In research as to pathophysiology of vital organs following progressive shock, it is of great importance to define the manner in which cells are damaged and how intracellular derangement becomes irreversible. Normally, vital cellular functions and organic structures are sustained by sufficient energy supply, for which energy metabolism is adequately regulated by various kinds of compensatory mechanism. At the cellular and molecular level, a common denominator exists for all forms of shock, regardless of etiology. When supply of both oxygen and substrates to cells is limited during shock, cellular energy metabolism is severely depressed, resulting in the depletion of ATP. Then the life of the cell is endangered as a great number of endergonic biological reactions cease and cell membrane starts to malfunction. In these processes, while certain forming of metabolic aberration in shock is remedied with the restoration of normal perfusion, their relationship of irreversible cell damage remains to be clarified.

In this experiment, the relationship was examined between the reversibility of shock and the cellular energy status, from the viewpoint of energy charge, mitochondrial redox state, oxidative phosphorylative activity of isolated mitochondria, and fragility of mitochondrial membrane in rat livers following hemorrhagic and endotoxin shock.

In hemorrhagic shock, the derangement of energy metabolism passed series of four stages.

Key words: Hemorrhagic shock, Endotoxin shock, Energy metabolism, Liver mitochondria, Hepatic adenine nucleotide.

索引語：出血性ショック、エンドトキシンショック、エネルギー代謝、肝ミトコンドリア、肝アデニンヌクレオチド。
Present address: The First Department of Surgery, Faculty of Medicine, Kyoto University. 54 Kawara-cho, Shogoin, Sakyo-ku, Kyoto 606 Japan.

At Stage I (Initial stage), the energy charge level decreased significantly to 0.53 with little changes in mitochondrial redox state. Oxidative phosphorylation of isolated mitochondria was maintained within normal range. This indicates that cellular energy status decreased due to marked energy consumption without any organic damages in the mitochondria. Stage II (Cell distress stage) showed that cellular energy imbalance proceeded due to the depressed mitochondrial activity in vivo. Energy charge level decreased to 0.49 with a significant fall of mitochondrial redox state to 5.0. However, they were reversible when the blood supply was restored. Stage III (Transitional stage) was the phase at which mitochondrial fragility increased severely. Isolated mitochondria were rapidly deteriorated by the short period of aging. The energy charge level and mitochondrial redox state were scarcely restored to 0.60 and 6.5 after reinfusion of shed blood. At Stage IV (Terminal stage), mitochondria were markedly damaged organically. Oxidative phosphorylation of isolated mitochondria decreased to 50% of the normal value. The energy charge and mitochondrial redox state showed further decrease to 0.40 and 3.1. Cellular energy metabolism was not remedied by any intensive therapies, which inevitably meant the death of vital organs.

In endotoxin shock, the nature of apparent abnormality in fuel substrate utilization was clarified concomitant with the alteration of mitochondrial functions. Marked differences appeared in the time courses of hepatic energy charge and mitochondrial oxidative phosphorylative activity between the early stage with normal blood pressure and the late stage with low blood pressure. In the early stage (Hypermetabolic stage), the hepatic energy charge was maintained at near normal levels of 0.83–0.80 with a concomitant enhancement in mitochondrial oxidative phosphorylative activity (150–200% of the control). In the late stage (Hypometabolic stage), this enhancement of mitochondrial oxidative phosphorylative activity was depressed to 70–50% of the control, concomitant with a fall in hepatic energy charge to 0.66–0.52. The mitochondrial enhancement was further associated with a fall in mitochondrial redox state (9.4–5.7), a rise in ketone body formation to 200% of the control, and normoglycemia, indicating an acceleration of free fatty acid β -oxidation at the hypermetabolic stage. In comparison, mitochondrial inhibition was accompanied by a further fall in mitochondrial redox state to 5.7–2.3 and hypoglycemia (80–65 mg/dl), indicating an inhibition of gluconeogenesis at the hypometabolic stage. It is suggested that an enhancement in mitochondrial oxidative phosphorylative activity is a protective mechanism which compensate for the fall in hepatic energy charge, and thus plays an essential role in the survival and recovery.

In both hemorrhagic and endotoxin shock, disturbed energy metabolism of terminal stage was greatly associated with the severe impairment of mitochondrial organic structure.

Thus, it became possible to elucidate the mode of derangement of energy metabolism and the relationship between the reversibility and irreversibility in shock. It should be emphasized that any intensive therapies including cardiovascular adjustment, respiratory assist, and metabolic liver support, must be started prior to the evidence of mitochondrial deterioration.

緒 言

ショックによって著しく障害を受ける臓器、すなわち primary target organ としては、従来、腎、肺、脳、心血管系、肝等が問題となって、血行動態、微小循環、内分泌、凝固、網内系、代謝等の立場よりそれぞれ病態の解明がなされて来た^{37,64)}。しかしながら近年、複数の臓器が同時、あるいは連続的に機能不全をおこしてくる状態があることが注目されて来ており、Multiple organ failure, Sequential systems failure 等の呼称で知られる様になった^{6,16,18)}。そこで、こうした重要臓器の障害を考えるにあたり、それらに共通した細胞レベルの障害に関する研究が重要視されて来ている^{8,51)}。

進行したショックにおける基本的な病態は tissue perfusion の障害として把握されるが、この過程において、個々の細胞がどの様にして不可逆的な変化を示してゆくかを調べることは重要である⁵²⁾。細胞が本来の形態及び機能を維持するには、充分なエネルギー供給を必要とし、種々の機構によりそのエネルギー代謝は調節されている。ショック臓器においては、個々の代謝動態は異なるものの、それらを構築する細胞でのエネルギー産生機構には、基本的に共通した失調が想定される。すなわち細胞レベルの代謝像は好氣的なものより嫌氣的な代謝系へと変化することが知られている。細胞内の有効酸素量が減少するにつれ、電子伝達系における NADH の酸化が障害され、ミトコンドリアの TCA cycle の回転が抑制され、細胞が利用出来るエネルギーは、通常は解糖系亢進による ATP 生成に依らざるを得なくなる¹⁷⁾。しかもこれはごく限られた間のみ働き、エネルギー産生の効率からみても極めて悪いものである。細胞内 ATP の枯渇につれ、エネルギー要求性の生体反応は停止する。例えば細胞膜におけるイオンの能動輸送機構は破綻し、Na⁺ は水と共に細胞内に入り、K⁺ の流出がおこって来る³⁾。乳酸の蓄積は細胞内アシドーシスを増悪させ、細胞の代謝は悪循環に陥り、細胞壊死に到ってついには臓器不全が生来するものと考えられる⁷⁾。

この様に細胞におけるエネルギー代謝は、ショックの病態解明の重要な手がかりを与えるものであり、エネルギー代謝の破綻こそ、ショックの可逆、不可逆を規定する因子であろうと想定することが出来る。

本論文は、代謝の中心的な存在であり、嫌氣的及び好氣的代謝系の両方を具備する肝臓に焦点をしぼり、

エネルギー産生機構として大切な役割を果たしているミトコンドリアの機能を通じて、細胞障害の経過を検討したものである。出血性及びエンドトキシンショックの二つの実験モデルに関して、エネルギー代謝失調、代償機転、可逆不可逆性の問題に言及したい。

実験材料及び方法

1. 出血性ショックモデル

体重 240~260 g の Wistar 系雄ラットを用い、実験開始直前まで自由摂食とした。麻酔は、ペントバルビタール 30 mg/kg を腹腔内投与により行なった。手術台上に仰臥位に固定し、左の大腿動脈を露出し、ポリエチレンカニューラ (Venula V5) を挿入した。これに三方活栓を接続し、ヘパリンナトリウム 500 単位を注入した。三方活栓の一方を水銀血圧計に連結し、他方には 10 ml の注射器をつけ脱血用のリザーバーとした。Wiggers 氏法により血圧 30 mmHg の出血性ショックを作成した。すなわち麻酔の影響による一時的呼吸抑制や血圧低下の改善されるのを待って、急速脱血を開始し 1 分後に動脈血圧 30 mmHg となる様にした。この時の脱血量の平均は 3.7 ml であった。このモデルでは、脱血開始 1~2 時間は、血圧はたえず回復傾向にあり、30 mmHg の定常低血圧を維持する為には、少量の脱血を継続する必要があった。しかしながら、その後血圧は低下傾向を示し、30 mmHg を保つ為には、少量ずつ還血する必要があった。本実験では、最大脱血量と還血量の関係、すなわち還血率により、実験動物を以下の 5 群に分けた。

還血率(%)

$$= \frac{\text{血圧 30 mmHg を維持するに必要な還血量}}{\text{血圧 30 mmHg ショック経過中の最大脱血量}} \times 100$$

A 群: 還血率 0% (最大脱血量の時点)

B 群: 還血率 25% (最大脱血量の 25% を還血した時点)

C 群: 還血率 50% (最大脱血量の 50% を還血した時点)

D 群: 還血率 75% (最大脱血量の 75% を還血した時点)

E 群: 還血率 100% (全脱血量を還血した時点)

脱血及び還血により変化したリザーバー中の血液量の時間的経過をみると、Fig. 1 の如くであった。対照群としては、同様の手術操作及び全身ヘパリン化を行って、脱血を行なわなかったのを、手術後 30 分に sampling した。

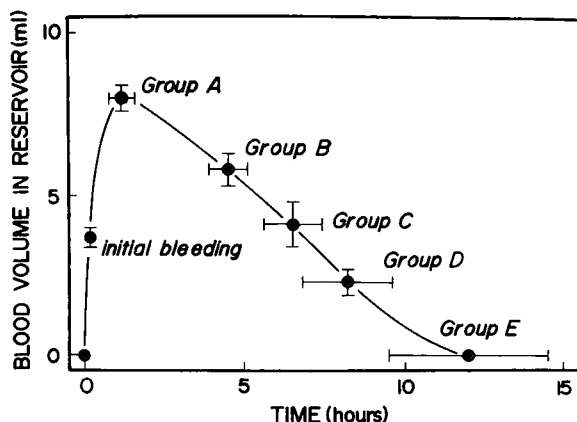


Fig. 1. Relationship between blood volume in reservoir and time course following hemorrhagic shock

Initial bleeding: The amount of shed blood to induce hemorrhagic shock of 30 mmHg blood pressure within 1 minute

Numbers of rat are as follows: A (29), B (29), C (8), D(5), E (7).

又別のシリーズの同じ実験で、A～D群について、リザーバー中の血液を約10分間で還血し、全血返還5分後における肝エネルギーチャージ及びミトコンドリア Redox State (後述) を測定した。

2. エンドトキシンショックモデル

同様にラットを麻酔し、手術台上に固定した後、左大腿静脈及び右大腿動脈を露出し、それぞれにカニューレーションを行ない、500単位の全身ヘパリン化を行った。右大腿動脈のカニューレは、水銀血圧計に接続し、左大腿静脈より、エンドトキシン 5 mg/kg を注入した。エンドトキシンは大腸菌より分離精製したもの (Lipopolysaccharide B, E-coli 055, Bs, Difco) を用い、実験直前に滅菌生理食塩水に溶解し、2 mg/ml の濃度で用いた。エンドトキシンの注入後、動脈血圧を継続してチェックした。血圧は一般に6時間までは大した変化を示さなかったが、6時間を越えると個々の動物により差が出て来た。すなわち、あるものは急激に血圧低下を来し、いわゆるショック状態に陥ったが、別のものは 80 mmHg 以上を維持していた。9時間目においては、生存ラット群の40%は 80 mmHg 以上を示し、40%は血圧が 80～30 mmHg の間であった。残り20%は血圧 30 mmHg 以下であり、瀕死の状態であった。本モデルの時間的経過と死亡率の関係をみると Fig. 2 の如くであった。3時間では0%、6時間では5% (1/20)、9時間では55% (11/20)、12時間では90% (18/20)であった。そこで、本実験では、エンドトキシン注入後、3時間、6時間、及び9時間目に sam-

pling を行ない、それぞれ a 群、b 群、c 群とした。この c 群 (9時間群) については、その時の血圧の状態によって、c₁ 群 (BP ≥ 80 mmHg)、c₂ 群 (30 mmHg < BP < 80 mmHg)、c₃ 群 (BP ≤ 30 mmHg) に分けて検討した。なお本実験における対照群として、同様の操作を行ったラットに、エンドトキシンの代りに滅菌生理食塩水を注入し、3、6、9時間にて sampling したものをを用いた。なお sampling に際して、必要に応じてペントバルビタールの静脈麻酔を追加した。

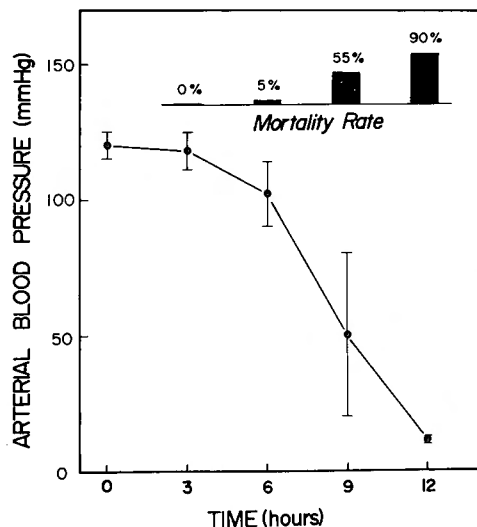


Fig. 2. Mortality rate and changes in arterial blood pressure following injection of endotoxin

3. 測定したパラメーター

(a) 肝アデニンスクレオチド及びエネルギーチャージ, ミトコンドリア Redox State.

肝をin situの状態では採取する為、液体窒素(−196°C)に浸しておいたステンレス圧搾鉗子にて freeze clamp した。このうち 2 g を液体窒素中で粉碎し、6%(W/V)の PCA (perchloric acid) 6 ml に移し、直ちにホモジェナイズした。これを 10,000 g にて 0–4°C で 15 分間遠沈し、上清を採取した。さらにこの時の沈殿に対し、3% PCA 2 ml を加え攪拌し、同様 10,000 g, 15 分間の遠沈を行なった。この上清を 1 回目の上清と混ぜ、69% K₂CO₃ を滴下し、pH を 6 に調製した。これを再度、5 分間遠沈して上清を sample として得た。ATP, ADP 及び AMP 量は、酵素法にて測定した^{1,25)}。エネルギーチャージの計算は、次の公式によった^{3,4)}。

Energy Charge

$$= (\text{ATP} + 0.5\text{ADP}) / (\text{ATP} + \text{ADP} + \text{AMP})$$

また、同抽出液にてアセト酢酸及びβ-ヒドロキシ酪酸を、Williamson Mellanby の方法により測定し、ミトコンドリア Redox State は次の計算式に従って求めた⁵⁰⁾。

ミトコンドリア Redox State

$$\begin{aligned} &= \frac{\text{Free NAD}^+}{\text{Free NADH}^+} \\ &= \frac{\text{アセト酢酸}}{\beta\text{-ヒドロキシ酪酸}} \times \frac{1}{k} \end{aligned}$$

ここで、k は反応平衡係数であり、β-ヒドロキシ酪酸脱水素酵素のそれは、 4.93×10^{-2} とした。

(b) 分離ミトコンドリアの機能—ATP 生成能—の測定。

肝ミトコンドリアは小沢等の方法にて分離調製した⁴¹⁾。また既報により酸素消費を polarography にて測定し⁴²⁾、呼吸調節能 (RC: respiratory control ratio) は Chance の方法にて¹¹⁾、次の如く計算した。(RC = state 3 respiration rate/state 4 respiration rate)。酸化的磷酸化能 (PR: phosphorylation rate)、すなわち ATP 生成能は、state 3 respiration rate × ADP/O より計算した。ミトコンドリアの蛋白量は Lowry 等の方法で測定した³¹⁾。なお、これらのミトコンドリアの機能は、各群分離調製直後と、aging の効果をみる為、22°C 60 分間、isolation medium 中で incubation した後も測定した。

(c) 分離ミトコンドリアの膨化 (swelling) 及び収縮能 (shrinking) の測定^{26,27)}。

分離直後のミトコンドリア 1.4–1.8 mg protein を KCl 反応液 (0.125 M KCl–0.02 M Tris, pH 7.4) に混じ、懸濁液を作成した。これを 22°C にて incubation し、520 nm の波長をもつ光をあて、その吸光度を測定した。まず 10 分間の自然膨化をみた後に、Pi (0.01 M) を添加して Pi-induced swelling を測定した。その後、一度膨化したミトコンドリアを収縮させるべく、ATP (0.05 M)、牛血清アルブミン (2 mg/ml)、MgCl₂ (0.03 M) を添加した。収縮能は、10, 20, 30 分後に吸光度を測定して観察した。

(d) 分離ミトコンドリアの DNP (dinitrophenol)-induced ATPase 活性の測定。

分離直後のミトコンドリアを、反応液 (0.25 M マニトール, 0.01 M KCl, 0.2 mM EDTA, 0.01 M Tris-HCl Buffer, 1.5 mM DNP) に入れ、25 m モルの ATP を加えたあと、22°C にて incubation した。10 分後に 10% (W/V) TCA (trichloroacetic acid) 溶液を加えて反応を停止させた。ATP の分解により出てくる Pi の量を、Fiske-Subbarow 等の方法で測定した²⁰⁾。

(e) 動脈血中グルコースの測定。

大腿動脈に挿入したカニュラより、各群 0.05 ml の血液を採取した。グルコースの定量はオルソトリジン法²⁴⁾により発色させ、分光光度計を用いて測定した。

すべての結果は、平均値 ± 標準誤差で示し有意性の検定は Student の t テストにて行なった。実験動物数は各々 () 内に示した。

結 果

1. 肝アデニンスクレオチドと肝エネルギーチャージ

Table 1 は出血性ショックにおける、肝アデニンスクレオチド量と、エネルギーチャージの変動を示したものである。ATP 量は、出血後急速に低下し、A 群ですでに、出血前値の 43% にまで低下し ($p < 0.001$)、以下徐々に減少を続け、E 群では正常の 20% しかなかった ($p < 0.001$)。ADP 量は、一過性に上昇する (A 群で約 60% 上昇, $p < 0.001$) が、その後、徐々に減少し、E 群では出血前の 77% ($p < 0.05$) となった。AMP 量は、ATP とは逆に、ショック導入と共に直ちに著しく増加し、A 群ですでに出血前値の 5 倍に達した ($p < 0.001$)。以後、ショックの進行と共に上昇を続けた。アデニンスクレオチド総量としては、最初は軽度の減少を示すにすぎない (A 群で 10% 減, $p < 0.05$) が ATP の減少に伴ない低下し、最終的には正常の 57%

Table 1. Hepatic adenine nucleotide concentration and adenylate energy charge in hemorrhagic shock

GROUPS	μ moles/g wet tissue				E.C
	ATP	ADP	AMP	Total	
CONTROL (9)	2.59 $\pm$ 0.07	0.82 $\pm$ 0.05	0.16 $\pm$ 0.01	3.57 $\pm$ 0.07	0.842 $\pm$ 0.008
Group A (8)	1.12 $\pm$ 0.06***	1.32 $\pm$ 0.13***	0.80 $\pm$ 0.05***	3.24 $\pm$ 0.13*	0.534 $\pm$ 0.025***
Group B (8)	0.80 $\pm$ 0.05***	0.92 $\pm$ 0.08	0.83 $\pm$ 0.09***	2.55 $\pm$ 0.08***	0.494 $\pm$ 0.040***
Group C (5)	0.70 $\pm$ 0.08***	0.86 $\pm$ 0.09	0.88 $\pm$ 0.07***	2.44 $\pm$ 0.08***	0.459 $\pm$ 0.042***
Group D (5)	0.62 $\pm$ 0.10***	0.74 $\pm$ 0.08	0.94 $\pm$ 0.06***	2.31 $\pm$ 0.08***	0.428 $\pm$ 0.031***
Group E (5)	0.51 $\pm$ 0.08***	0.63 $\pm$ 0.07*	0.90 $\pm$ 0.08***	2.04 $\pm$ 0.10***	0.402 $\pm$ 0.022***

Results given are means $\pm$ SEM with n values in parentheses. CONTROL: before bleeding, Total: ATP+ADP+AMP, E.C: Energy Charge=(ATP+0.5ADP)/(ATP+ADP+AMP)

*p<0.05, ***p<0.001, compared with control

にまで低下した (p<0.001). エネルギーチャージは、各群とも著しく低下しているが、傾向としては、初期ですでに急激に低下し (p<0.001), 以後時間的経過とともに漸減する。この変化の主体は、ATP の減少と、AMP の増加によるところが大きかった。

各群における、全血返還後のエネルギーチャージの回復状態を見たのが Fig. 3 である。A, B 群においては、エネルギーチャージはほぼ完全に、出血前値にもどり得た (p<0.001)。しかしながら、C, D 群では不完全であり、血圧の上昇も軽度であった。E 群は、すでに全脱血量を還血してしまっており、ようやく 30mmHg の血圧を維持している状態であるが、試みに輸血、輸

液等を追加しても、血圧上昇は認めず、エネルギーチャージは低下したままであった。

Table 2 及び Fig. 4 に、エンドトキシン注入後の肝アデニンヌクレオチドとエネルギーチャージの変動を示した。3 時間 (a 群) では、各アデニンヌクレオチド量及びエネルギーチャージはほとんど変化せず、対照との差をみなかった。6 時間 (b 群) では ATP の低下 AMP の上昇の傾向は認めるものの、有意ではなかった。しかし、エネルギーチャージは、すでに軽度ではあるが低下していた (0.800, p<0.05)。9 時間群において、血圧の比較的良好な、c₁ 群では、6 時間群との差をみなかったが、血圧低下の著しい c₂, c₃ 群では、出血性ショックと同様に、ATP の減少、AMP の増加は著しく、従ってエネルギーチャージの低下も著明に認められた (c₂: p<0.01, c₃: p<0.001) エンドトキシン血症全経過よりみると、肝アデニンヌクレオチド量、及びエネルギーチャージは、かなり長時間ほぼ正常に近い状態に保たれ、ある時点を過ぎて急激に低下する傾向を示している。なお、データでは示していないが、出血性ショックと異なり、血圧 30mmHg になった時点で、輸血、輸液、ステロイド注入等の治療を試みるも、血圧は一時的にやや回復するのみで、エネルギーチャージの改善はほとんど認められなかった。

2. ミトコンドリア Redox State

Fig. 5 は出血性ショック各群におけるミトコンドリア Redox State の変動と、リザーバー中の全血液の返還 5 分後の回復程度を見たものである。ショック初期 (A 群) では、ミトコンドリア Redox State は出血前値に対し低下傾向を示すものの (有意差なし) ま

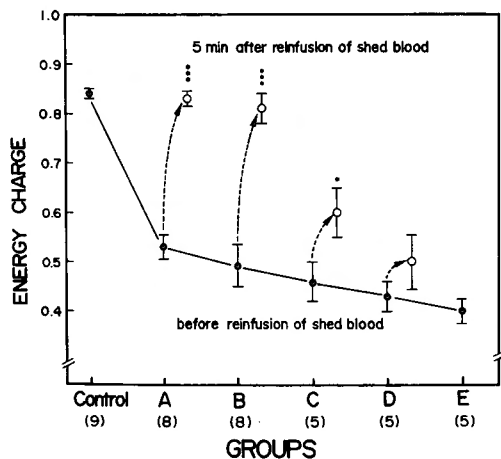


Fig. 3. Changes in hepatic energy charge levels following hemorrhagic shock both before and after reinfusion of residual shed blood

*p<0.05, ***p<0.001 compared with the value before reinfusion

Table 2. Hepatic adenine nucleotide concentration and adenylate energy charge following injection of endotoxin

GROUPS	ATP	μ moles/g wet tissue			E.C
		ADP	AMP	Total	
0 hour					
Control (9)	2.59±0.07	0.82±0.05	0.16±0.01	3.57±0.07	0.842±0.008
3 hours					
Control (5)	2.51±0.06	0.84±0.06	0.15±0.02	3.50±0.06	0.837±0.007
Etx (6)···Group a	2.47±0.12	0.88±0.12	0.14±0.01	3.49±0.23	0.835±0.011
6 hours					
Control (5)	2.52±0.06	0.87±0.08	0.17±0.02	3.56±0.07	0.834±0.009
Etx (6)···Group b	2.21±0.14	0.95±0.09	0.20±0.05	3.36±0.27	0.800±0.012*
9 hours					
Control (5)	2.41±0.09	0.90±0.08	0.19±0.03	3.50±0.08	0.817±0.012
Etx (6)···Group c ₁	2.20±0.13	0.98±0.11	0.21±0.03	3.39±0.25	0.794±0.015
Etx (6)···Group c ₂	1.20±0.30**	0.92±0.08	0.40±0.07*	2.52±0.43*	0.659±0.045**
Etx (6)···Group c ₃	0.85±0.12***	0.88±0.06	0.72±0.11***	2.45±0.23**	0.527±0.031***

Results given are means±SEM with n values in parentheses. Etx: treated with endotoxin, Total: ATP+ADP+AMP, E.C: Energy Charge=(ATP+0.5ADP)/(ATP+ADP+AMP)
*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, compared with controls

だ比較的高いレベルに維持されている。しかしながら、それ以後急激に低下してゆくのが認められた (B～E 群で各々 p<0.001)。全血返還後では、A群で著しい 上昇を示し、出血前値をはるかに上まわる over shoot 現象を認める (p<0.001)。B群では、ほぼ出血前値ま で回復する (p<0.05) が、ショックの進行に伴ない、

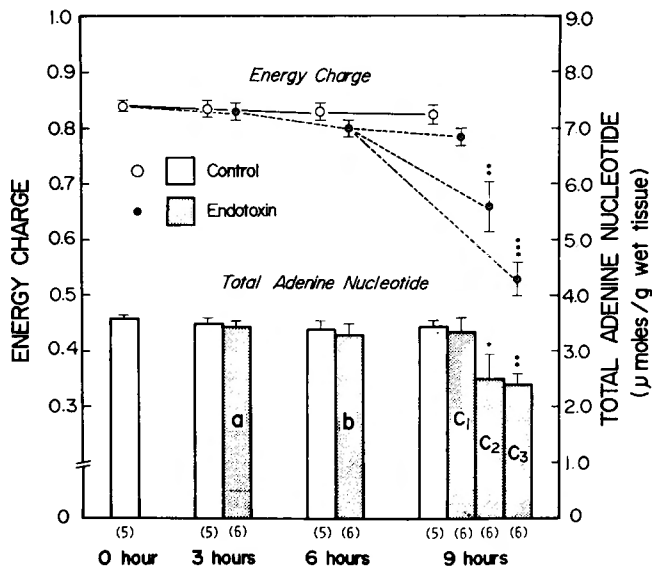


Fig. 4. Changes in total amount of adenine nucleotide and energy charge levels following injection of endotoxin
Total adenine nucleotide: ATP+ADP+AMP, Energy Charge: (ATP+0.5ADP)/(ATP+ADP+AMP)
*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 compared with control values

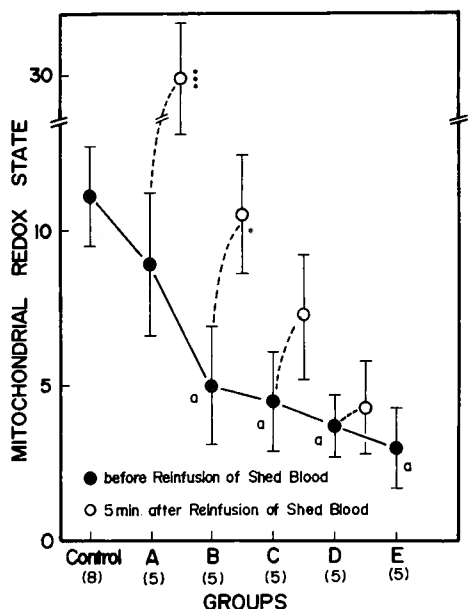


Fig. 5. Changes in mitochondrial redox state following hemorrhagic shock both before and after reinfusion of residual shed blood
a: $p < 0.001$ compared with control
* $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ compared with the value before reinfusion

肝エネルギーチャージの回復状態と類似して、C、D群では出血前値までは回復し得なかった。E群では、

輸液等の治療を行なっても、ミトコンドリア Redox State は変化せず、低値を示したままであった。ケトン体総量は、摂食ラットである為、もともと少ないが、ショックの進行と共に徐々に減少し、特にアセト酢酸の減少が大であった（データは不提示）。

Fig. 6 は、エンドトキシンショックにおけるミトコンドリア Redox State とケトン体量の変動を示したものである。ミトコンドリア Redox State は、3時間（a 群）までは対照とほとんど変らなかったが、6時間（b 群）では有意差はないものの低下傾向を示していた。9時間群（c₁, c₂, c₃ 群）では、いずれも著明な低下を来した（各々 $p < 0.05$, 0.05 , 0.001 ），特に c₃ 群では、出血性ショック末期（E 群）と同程度にまで低下した。ケトン体総量は、いずれも対照群より増加したが、特に c₁ 群で著しかった（ $p < 0.001$ ）。c₂, c₃ 群では、アセト酢酸が著明に減少し、ケトン体総量としては、c₁ に比して減少の傾向を認めた。

3. 分離ミトコンドリアの活性

出血性ショック各群における肝ミトコンドリアの活性を Table 3 に示した。ミトコンドリアの呼吸調節能（RC）は、A～D 群に到るまで著しい変化は来さなかった。しかしショック末期の E 群では有意に低下していた（ $p < 0.001$ ）。State 3 呼吸は E 群でやや低下しているものの有意差は認められなかった。ADP/O は、E 群で著明に低下（ $p < 0.001$ ）するが他の群では、出

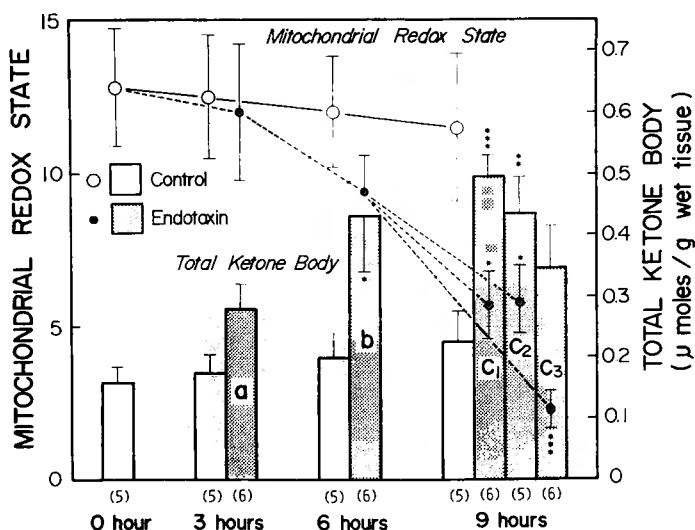


Fig. 6. Changes in total amount of ketone body and mitochondrial redox state following injection of endotoxin
Total Ketone Body: acetoacetate + β -hydroxybutyrate
* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ compared with control values.

Table 3. Changes in mitochondrial activities of rat liver following hemorrhagic shock

GROUPS	RC	ST3	ADP/O	PR
CONTROL (7)	5.18±0.32	40.8±3.8	2.74±0.07	113.1±13.0
Group A (5)	6.06±0.58	40.1±3.9	2.72±0.21	109.6±13.2
Group B (5)	5.51±0.94	39.3±3.8	2.68±0.16	105.3±11.6
Group C (5)	4.94±0.42	39.8±4.6	2.49±0.17	103.1±16.9
Group D (5)	4.88±0.47	42.9±4.5	2.45±0.16	105.4±12.7
Group E (5)	3.12±0.16***	36.5±4.2	1.62±0.08***	59.7± 8.6**

Values are means±SEM. Numbers of rat appear in parentheses. CONTROL: before bleeding, RC: respiratory control ratio, ST3: state 3 respiration rate (n atoms/mg protein/min.), PR: phosphorylation rate (n moles ATP/mg protein/min.)
p<0.01, *p<0.001, compared with control

血前と比して有意差を認めていない。酸化的磷酸化能 (PR), すなわち ATP 生成能は, E 群では著明に低下し, 出血前値の約52% (p<0.01) であったが, 他の群では大きな変化を示さなかった。これ等の結果より見たならば, 出血性ショックにおける肝ミトコンドリアは, 末期では著しい機能低下を示すが, かなり長期にわたって活性を保ち得ることがわかる。以上のデータはミトコンドリアの分離直後に測定したものであるが, 次にこれ等を 22°C で 60 分間 isolation medium

(0.3 M マニトール, 0.02 M EDTA) 中で incubation した後, 同様に活性を測定した。これは, aging に対するミトコンドリアの抵抗, すなわちミトコンドリア膜の脆弱性をみる為に行なったものである。酸化的磷酸化能が, incubation の前後でどの様に変化するかを見たのが Fig. 7 である。incubation により正常のミトコンドリアでも, ATP 生成能は約30% (113.1→78.2 n モル/mg 蛋白/分, p<0.05) の低下を示す。A~C 群における aging の効果は, 対照群における効果と

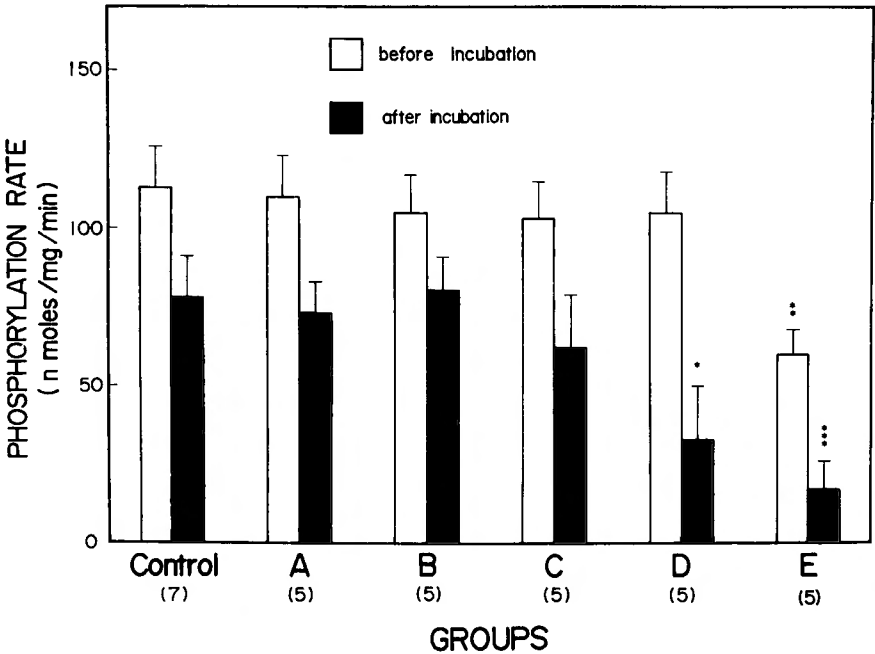


Fig. 7. Aging effect on the mitochondrial oxidative phosphorylation following hemorrhagic shock
Aging effect was examined by incubating mitochondria at 22°C for 60 minutes.
*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 compared with control values before or after incubation

は変っていない。しかしながらD群では incubation 前には正常の ATP 生成能を示すにもかかわらず, incubation 後では著しく低下する ($105.4 \rightarrow 33.5$ n モル, 低下率約68%, 対照群に対し $p < 0.05$)。E群では incubation 前値がすでに低下しているものの, aging 効果も強く uncoupling の状態を示すことも多かった ($59.7 \rightarrow 16.9$ n モル, $p < 0.001$)。これは aging によってミトコンドリアがほとんど崩壊してしまったものと考えられる。

Table 4 は, エンドトキシンショックにおける肝ミトコンドリアの活性の変化を示したものである。6時間までは, 呼吸調節能, State 3 呼吸, 酸化的磷酸化能はいずれも上昇して来る ($p < 0.05$)。9時間群における変化は著しく異なり興味深い。すなわち, 血圧良好な c_1 群では, ミトコンドリアの機能亢進はさらに大きく, 呼吸調節能で8.06 ($p < 0.001$), 酸化的磷酸化能では約2倍の 230 n モル/mg 蛋白/分にも達した ($p < 0.01$)。しかしながらショック状態にある c_2 群では, すでに機能亢進の時期は終了し, むしろ, かなりの低下傾向を示していた。死亡直前の c_3 群においては, ミトコンドリアの活性は著しく抑制され, ATP 生成能は対照群の50%しか認められなかった ($p < 0.01$)。エンドトキシンショック経過中の酸化的磷酸化能の上昇及び低下は, 主として State 3 呼吸の変動によるもので, ADP/O の関与は出血性ショックに比べて少な

かった。

Fig. 8 は, これらのミトコンドリアを 22°C で60分間 incubation した後の活性の変化を示したものである。6時間までは, aging の効果は, 対照と差をみないが, 9時間群では強く出ている。機能亢進の著しい c_1 群では, incubation 後の低下率は対照に比し大きい (37%低下) もの, 活性の絶対値では, 充分保たれ高値を示している。 c_2 群では incubation により著しい低下を来し (54%低下) 出血性ショックD群に相当する状態と言える。 c_3 群では, incubation 前値がもともと低下しているが, aging によってミトコンドリアの活性はほとんどそこなわれ, ミトコンドリアの破壊が容易に起り得ることを示す。

4. DNP-induced ATPase 活性

酸化的磷酸化の脱共役剤である DNP で処理したミトコンドリアの活性, すなわち DNP-induced ATPase は, 元のミトコンドリアが無傷であれば高値を示し, 障害を受けておれば低値を示し, polarography で測定した酸化的磷酸化能とほぼ相関することが知られている。Fig. 9 は, 出血性ショックにおける DNP-induced ATPase 活性を, 出血前値と比較したものである。A, B群においては出血前値と差をみないが, C群で前値の70% ($p < 0.05$), D群で60% ($p < 0.01$) と低下し, E群では, 20% ($p < 0.001$) しかなかった。

一方エンドトキシンショックにおける肝ミトコンド

Table 4. Changes in mitochondrial activities of rat liver following injection of endotoxin

GROUPS	RC	ST3	ADP/O	PR
0 hour				
Control (7)	5.18 ± 0.32	40.8 ± 3.8	2.74 ± 0.07	113.1 ± 13.0
3 hours				
Control (5)	5.20 ± 0.25	40.0 ± 3.5	2.75 ± 0.06	110.4 ± 12.4
Etx (6) ... Group a	5.83 ± 0.25	50.0 ± 4.2	2.80 ± 0.09	140.1 ± 12.6
6 hours				
Control (5)	5.22 ± 0.27	41.2 ± 3.7	2.76 ± 0.08	114.3 ± 12.5
Etx (6) ... Group b	$6.26 \pm 0.32^*$	$58.7 \pm 6.9^*$	2.85 ± 0.07	$165.5 \pm 15.8^*$
9 hours				
Control (5)	5.23 ± 0.33	42.2 ± 3.1	2.77 ± 0.08	116.1 ± 11.5
Etx (8) ... Group c_1	$8.06 \pm 0.26^{***}$	$77.9 \pm 7.9^{**}$	2.97 ± 0.02	$230.2 \pm 22.4^{**}$
Etx (8) ... Group c_2	$4.31 \pm 0.32^*$	$31.2 \pm 3.6^*$	2.84 ± 0.05	89.0 ± 10.8
Etx (6) ... Group c_3	$3.52 \pm 0.33^{**}$	$22.4 \pm 4.6^{**}$	2.64 ± 0.13	$61.0 \pm 13.7^{**}$

Values are means $\pm$ SEM. Numbers of rat appear in parentheses. Etx: treated with endotoxin. RC: respiratory control ratio, ST3: state 3 respiration rate (n atoms/mg protein/min.), PR: phosphorylation rate (n moles ATP/mg protein/min.)

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, compared with controls

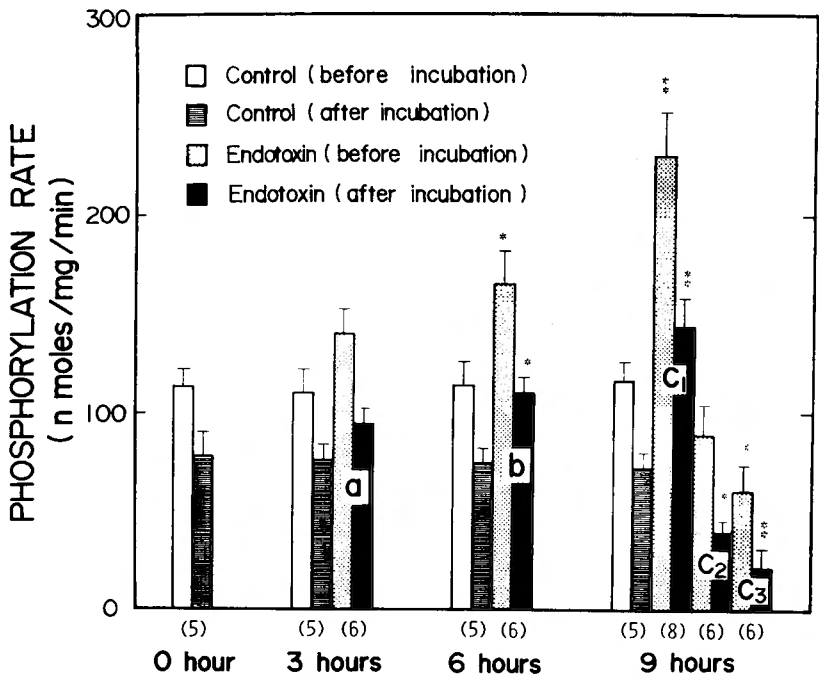


Fig. 8. Aging effect on the mitochondrial oxidative phosphorylation following injection of endotoxin
Aging effect was examined by incubating mitochondria at 22°C for 60 minutes.
* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ compared with control values before or after incubation

リアの DNP-induced ATPase 活性を Fig. 10 に示したが、3 時間 (a 群) ですでに亢進の傾向を示し、6

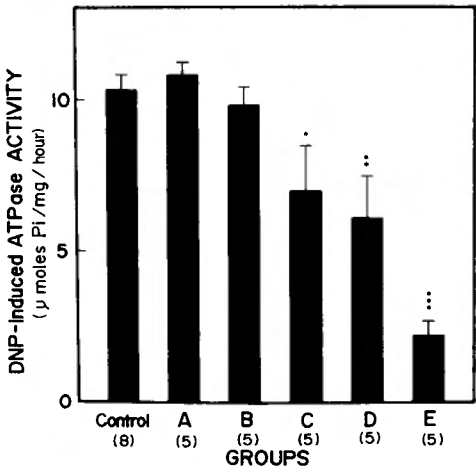


Fig. 9. Changes in DNP-induced ATPase activity of mitochondria following hemorrhagic shock
* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ compared with control value

時間 (b 群) では対照の136% ($p < 0.01$), 9 時間 c_1 群では162% ($p < 0.01$) にまで上昇していた。しかしながら c_2 群で68%, c_3 群で54% ($p < 0.01$) と著明に減少し、全経過においてミトコンドリアの酸化的磷酸化能と同じパターンを認めた。

5. ミトコンドリアの膨化及び収縮能

膨化したミトコンドリアは、水分を多量に含む為、その懸濁液の吸光度は低下する。Fig. 11 は、出血性ショック各群における肝ミトコンドリアの膨化及び収縮能をみたものである。自然膨化は、A~D群では対照と差をみなかった。しかし、E群は、すでに分離調製直後の段階で吸光度は低く、膨化が進行していることがわかる ($p < 0.05$)。10分間の自然膨化の速度も、他の群に比べて速いことが判明した ($p < 0.01$)。Pi-induced swelling は、速度ではすべての群で差をみなかったが、程度ではC, D, E群で強い傾向にあった。ATP, アルブミン, Mg^{++} 添加による収縮能は低下した吸光度の回復としてとらえられるが、ミトコンドリアの変性をよく表わしているものと思われる。すなわち対照群、A及びB群では、ATP, アルブミン, Mg^{++} 添加後30

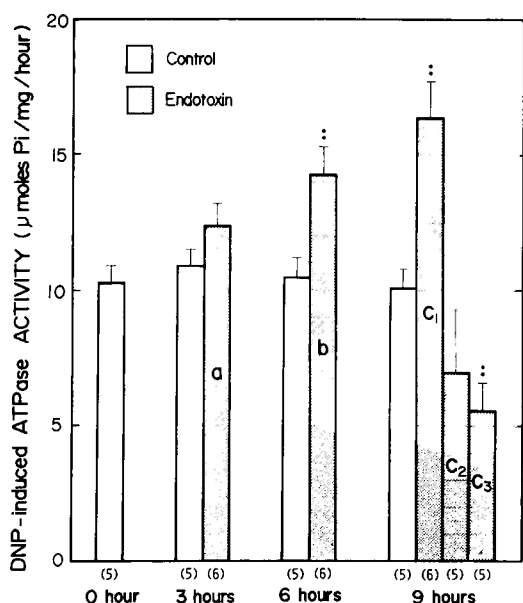


Fig. 10. Changes in DNP-induced ATPase activity of mitochondria following injection of endotoxin

** $p < 0.01$ compared with control values

分で、ほぼ膨化開始前の状態にまで収縮した。しかし C, D 群では、それらに比べると収縮能は不充分であ

り、E 群ではほとんど反応せず膨化したままであった ($p < 0.001$)。

Fig. 12 は、エンドトキシンショックにおいて同様に、ミトコンドリアの膨化、収縮をみたものである。自然膨化の程度は c_3 でやや強いものの、出血性ショック群ほどには差をみなかった。Pi-induced swelling は各群ほとんど同様に進行した。しかしながら ATP, アルブミン, Mg^{++} の添加による収縮能は、各群によって大きく異なった。a 群では対照とほぼ同じであったが b 群では強く収縮する傾向を示し、 c_1 群においては、吸光度は膨化開始前値より高い値を示した ($p < 0.01$)。しかしながら c_2, c_3 群では収縮能は低く ($p < 0.01, p < 0.001$)、出血性ショック E 群と類似したパターンを示した。

6. 動脈血中グルコース濃度

以上は、in vivo 及び in vitro におけるミトコンドリアに関するパラメータであったが、最後に、基質の代表として血糖値を調べ、ミトコンドリアのエネルギー代謝が生体全体としてどの様にホメオスタシスに関与するかをみた。Fig. 13 は、出血性ショック各群の血糖値の変動である。A 群では、著しい高血糖 (285 mg/dl, $p < 0.001$) を示した。B 群では、やや低下するものの前値に比べると高値であった。しかしショック

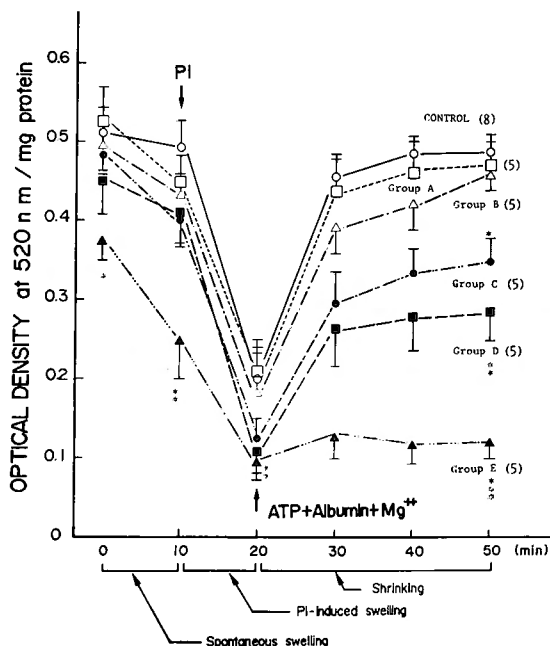


Fig. 11. Changes in swelling and shrinking of mitochondria following hemorrhagic shock

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ compared with the control at each point

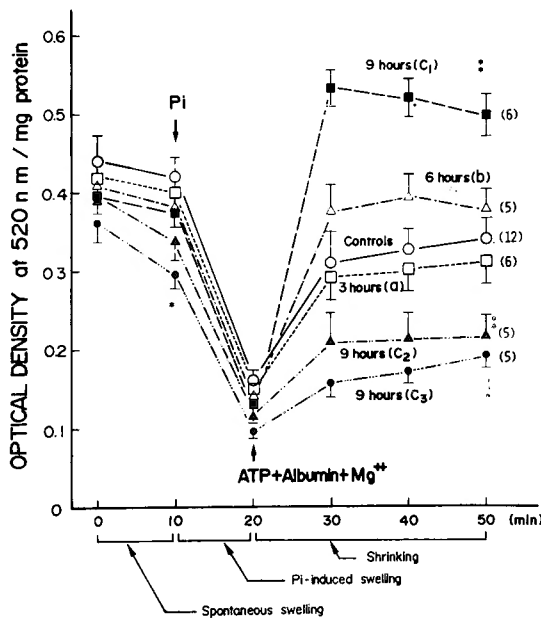


Fig. 12. Changes in swelling and shrinking of mitochondria following injection of endotoxin Control is represented as the mean of 0, 3, 6, 9 hours controls (no difference among them).
* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ compared with the controls at each point

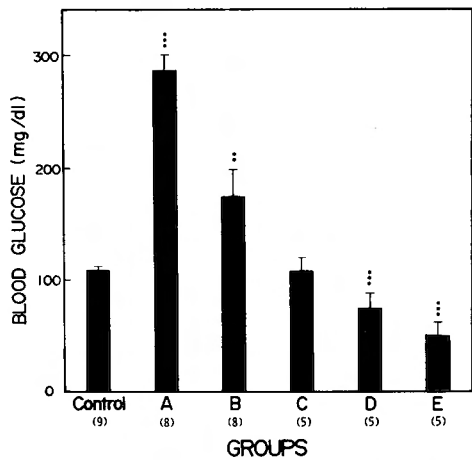


Fig. 13. Changes in blood glucose levels following hemorrhagic shock
** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ compared with control value

進行に伴ない、血糖値は徐々に低下し、C群では normoglycemia に、D、E群では著明な低血糖 (D群 74 mg/dl, $p < 0.001$, E群 51 mg/dl, $p < 0.001$) を示していた。

Fig. 14 はエンドトキシンショックにおける血糖値

の推移をみたものであるが、出血性ショックにみられた様な高血糖は認められなかった。しかし c_2 群では 81 mg/dl ($p < 0.01$), c_3 群では 66 mg/dl ($p < 0.001$) と低下し、末期に近づくにつれ低血糖を示してゆくことは、出血性ショックの場合と同様であった。

考 察

I 出血性ショック

Wiggers 氏法による出血性ショックモデルは、血圧を一定に保つ為、その時点の脱血量は時間的経過により異ってくる。したがって最大脱血時以後のショックの進行度は、還血率により規定され、死亡率とよく相関することが知られている⁷⁾。また本モデルは、ショック導入後の恒常性維持の種々の反応を排除し、長時間における低血圧の影響をみるには適したものである^{57,58)}。

エネルギー代謝よりみた出血性ショックの研究は多く認められるが、大部分は、重要臓器における ATP 量の減少という現象しか述べていない^{12,23,50)}。しかしながら ATP, ADP における高エネルギー磷酸化合物の反応系は、相互変換が迅速であり、アデニンヌクレオチドの量のみを論ずることは、次々と変化する細胞

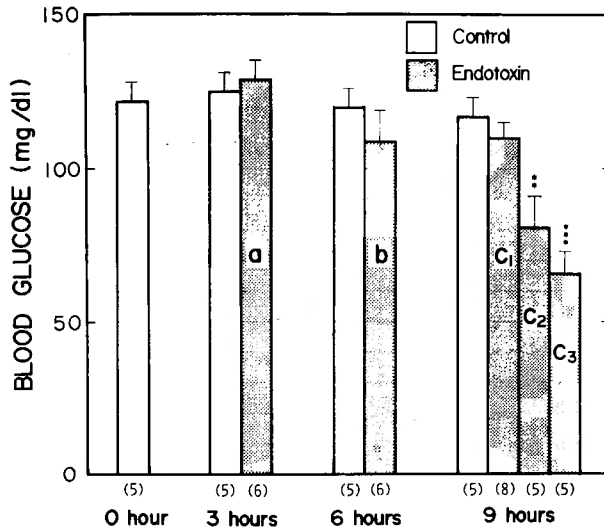


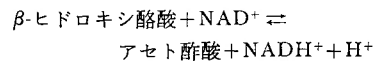
Fig. 14. Changes in blood glucose levels following injection of endotoxin
 p<0.01, *p<0.001 compared with control values

エネルギー代謝の動的な状態を把握するには不十分と言える²⁹⁾。一般に細胞において、そのエネルギー代謝は ATP 産生反応と、ATP 消費反応との割合により energy pool が規定され、それを一定に保つ為に細胞内の種々の代謝が営まれている。この細胞内エネルギー状態を示す指標として 1968 年 Atkinson 等により提唱されたエネルギーチャージの概念は的確なものであり、単にエネルギー産生、消費のバランスを表わすのみならず、代謝調節機構に深くかかわるパラメータであるとしている³⁴⁾。

本実験によれば、肝エネルギーチャージはショックの初期より急激な低下を来し、それは、末期に到るまで徐々に低下し続ける。今回ショックの可逆性を判定する指標として、エネルギーチャージの回復の程度を重要視した。小沢等の実験によれば、可逆性ショックでは、輸血によって肝エネルギーチャージは瞬時に回復し、それに遅れて低下したアデニンヌクレオチド量も回復し、エネルギーチャージの回復こそ、energy store の回復の必須の条件としている⁴⁰⁾。本実験の A、B 群では、エネルギーチャージは還血によりほぼ完全に回復したが、ショックの進行につれてその程度は低くなり、末期ではあらゆる治療に反応せず低下したままであった。この機構に関しては、次に述べるエネルギー産生系の主役であるミトコンドリアの機能と大きく関係しているものと考えられる。

in vivo におけるミトコンドリアの活性をみるには、

ミトコンドリア分画における酸化還元状態、すなわちミトコンドリア Redox State を調べる必要がある。β-ヒドロキシ酪酸脱水素酵素は、肝細胞のミトコンドリアに局在し、次の反応を触媒する。



$$\therefore \frac{\text{NAD}}{\text{NADH}} = \frac{\text{アセト酢酸}}{\beta\text{-ヒドロキシ酪酸}} \times \frac{1}{k} \quad (k: \text{平衡定数})$$

従って、肝ミトコンドリアの redox state (NAD/NADH) は、アセト酢酸と β-ヒドロキシ酪酸の比に反映され、これらのケトン体を測定する事によってとらえることが出来る⁵⁹⁾。

一般にショックの進行において、ミトコンドリアの NAD プールは著しく還元状態に傾くことが知られている。おそらくこの変化は in vivo においては、細胞における有効酸素量の減少による、ミトコンドリアの酸化的磷酸化能の低下に起因し、NADH の再酸化が阻害されて蓄積してゆく為と考えられる^{61,62)}。本実験においては、ショック初期では A 群にみられるごとく、ミトコンドリア Redox State は、出血前値に比べ有意性はないものの、低下傾向を示し、そして、ある時点 (B 群) で急激に低下し、ショックの進行に伴ない極度に低下して行った。このことより、ショック初期から中期でのエネルギーチャージの著しい低下は、エネルギー消費系の増大と共に、エネルギー産生系の

著しい抑制によるところが大きいことを示すものと考えられる。還血によるエネルギーチャージの回復度と同様に、ミトコンドリア Redox State の回復度を調べる事は、エネルギー生産系の可逆性をみる意味で大きな意義をもつと思われる。A群では還血によりミトコンドリア Redox State は著しく上昇したが、これは蓄積して増量していた NADH がほぼ完全に NAD に転換された為であり、TCA cycle の回転が著しく速められた結果であろう。B群でもミトコンドリア Redox State の回復は、ほぼ正常域にまで達し、これら初期の群では、ミトコンドリアは血流の再開により充分な基質と酸素の供給を受ければ、充分活性を維持している事を示唆するものであった。しかしながら、他の群では、ショック進行度と一致してミトコンドリア Redox State の回復は不完全であり、エネルギー生産系が潤活に回転するに到らないことを示している。そして末期のE群では、ミトコンドリア Redox State の回復は全く見られず、輸血、輸液、ステロイド投与等の治療にも何ら反応を示さなかった。この意味で、最も重篤な、あるいは最終的なエネルギー代謝の失調とは、ミトコンドリアにおける H^+ の shuttle 機構の崩壊を意味し、これはおそらく次に述べるミトコンドリアの器質的構造の変化によるところが大きいと思われる。以上、エネルギーチャージとミトコンドリア Redox State の還血による回復程度より、A、B群は可逆的段階であり、Eは完全に不可逆に陥った状態であると言える。

エネルギーチャージ、ミトコンドリア Redox State はミトコンドリアに関する *in vivo* のパラメータであるが、次に、実際に分離調製した *in vitro* のミトコンドリアの変化について述べてみたい。出血性ショックの多くの実験で、ミトコンドリアが機能低下を来す事はすでに報告されている^{15,33,35)} 本実験において、酸化的磷酸化能、また aging の効果、DNP-induced ATPase 活性、膨化及び収縮能の測定は、ミトコンドリアの機能と同時に器質的な変化をとらえる目的で進められた。

無傷のミトコンドリアでは、呼吸は一定の制御状態にあり、無駄な呼吸をしない様になっており、この調節代謝制御を示す指標として、呼吸調節能 (R. C)、ADP/O がある。そしてこれらが高い程、ミトコンドリアの共役能が強く酸化的磷酸化能も高くなる⁴³⁾。

本実験では、酸化的磷酸化能は、D群までは出血前値との差はなく、E群における如く末期に到って著しい

低下を示した。*in vitro* の測定では、ミトコンドリアは充分な基質と酸素を供給され、pH においても至適条件であり、これらのデータが、そのまま *in vivo* であてはまらないことは、ミトコンドリア Redox State の変動をみれば解釈出来るものと思われる。しかし、少なくともエネルギー産生の中心器管の変性度を知る有力な手がかりを与えてくれる。22°C 60分の incubation による aging の効果は、ミトコンドリアの器質的变化を増幅する意味で、興味深い結果を示した。すなわち、incubation 前ではE群においてのみ低下していた ATP 生成能は、incubation 後ではD群ですでに他の群より著しい低下を示している。これは、ミトコンドリア膜が構造的な変性を受けて、いわゆる脆弱性が亢進した崩壊への前段階であると考えられる。

DNP-induced ATPase 活性の意義については、ミトコンドリアの酸化的磷酸化機構の解析とかかわり議論の多いところである⁴⁴⁾。化学説によれば、ATP 形成は ATP 分解の逆反応であり、共役因子は ATPase 活性をもつと考えられる。しかし、一般に正常ミトコンドリアの ATPase は極めて低い活性を示すにすぎず、latent ATPase と呼ばれる。これに対し、DNP で処理した場合、著しく高い活性があらわれる様になり、しかも元のミトコンドリアが無傷であるほど高い活性を示すことが知られている。つまり DNP-induced ATPase の ATP 分解反応を見ることにより、ATP 合成系の活性を推察することが出来る。実際、DNP-induced ATPase 活性は、ミトコンドリアの呼吸レベルとよく相関し⁵⁾、本実験においても、polarography で測定した酸化的磷酸化能とほぼ一致した。これによると、やはりショック末期では、その活性は著しく抑制されていることがわかる。またC、Dでも低下していることにより、ミトコンドリアの区画構造の変化を、より鋭敏に反映するものと推察される。

ミトコンドリアの膨化、収縮能をみた実験は、incubation による aging 効果と同じく、ミトコンドリア膜の脆弱性及び障害自体の可逆性を端的に示すものと言える。ミトコンドリアは、本来 ATP、ADP の欠除した呼吸状態では、膨化をおこしやすいことはよく知られている²⁸⁾ またその時には、遊離脂肪酸、 P_i 、Ca 等の物質が蓄積している。Vogt 等は、Ca-induced swelling と ATP、アルブミン、 Mg^{++} による収縮能を阻血腎のミトコンドリアにおいて調べて、可逆性の判定を行なっているが⁵⁶⁾、彼等のデータでは有意差をもってとらえられなかったとしている。しかしながら、

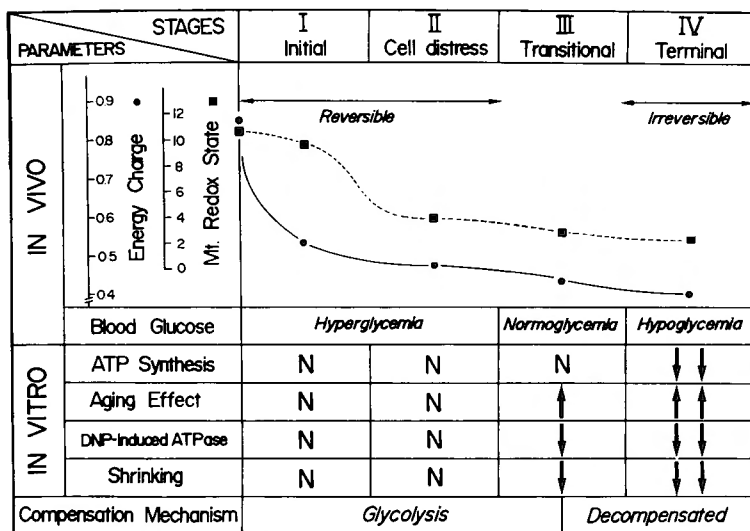


Fig. 15. Stages of hemorrhagic shock in energy metabolism and mitochondrial alteration
N: within normal range

本実験による結果では、末期E群における如く明らかな機能低下を示すミトコンドリアでは、当初より著しい膨化を起し、ATP、アルブミン、 Mg^{++} 添加による収縮も認められず、ミトコンドリアの器質的障害は決定的と言えよう。この原因については明瞭ではないが、やはり uncoupling 物質の蓄積によるものと想定される³⁰⁾。

以上、in vivo 及び in vitro におけるミトコンドリアに関するパラメータの変化を分析すると、出血性ショックにおけるエネルギー代謝の失調は次の stage に分類可能であり、この過程に従って進行して行くものと推察される (Fig. 15)。

Stage I (Initial stage)……A 群

エネルギーチャージのみが著明に低下し、他のパラメータは正常域にとどまる。この段階は、ショックによる急激なエネルギー消費系の増大が主要な病態としてあらわれ、産生系がこれに追いつかないものと思われる。エネルギー消費増大の原因としては、阻血腸管や筋といった他の器管で産生された膨大な代謝負荷物質、例えばアンモニア、乳酸等によるものであろう。あるいは肝血流量の減少により肝自体の異化が亢進し、蓄積された種々の代謝産物によるかも知れない。細胞のエネルギー状態は極度に低下しているものの、ミトコンドリアは無傷であり、還血等による循環系の回復により、エネルギー代謝は容易に正常化する。

Stage II (Cell distress stage)……B 群

肝エネルギーチャージとミトコンドリア Redox State が著明に低下している。これは、エネルギー消費反応の増大に加えて、in vivo におけるミトコンドリアの酸化的燐化の抑制がおり、エネルギー産生の減少を意味し、エネルギーバランスの不均衡は、より重篤になる。Stage I より、すでに解糖系の亢進による高血糖がおこるが、この段階ではエネルギー産生の主要な経路として意義がある。しかしながら嫌気性解糖による ATP の供給は、TCA cycle 抑制によるエネルギー不足を代償するには不十分であり、エネルギーチャージの低下はより強くなる。この段階では、エネルギーチャージもミトコンドリア Redox State も還血により出血前の状態にまで充分回復可能であり、エネルギー代謝失調は、未だ可逆的範囲にあるものと考えられる。ミトコンドリアは器質的には何ら障害を受けていない。

Stage III (Transitional stage)……C, D 群

短時間の incubation により、ミトコンドリアの酸化的燐化が低下することや、あるいは膨化したミトコンドリアに対する、ATP、アルブミン、 Mg^{++} による収縮能がすでに低下していることより、この stage ではミトコンドリアの膜構造に変化を来していることがわかる。ミトコンドリアの脆弱性が亢進し、器質的障害が潜在している時期であると言える。この時点では血糖値も極度には低下しておらず、心循環系の補助やステロイド投与等による精力的な治療でショックよりの回復は可能性があり、不可逆に陥る臨界点である。

う。

Stage IV (Terminal stage)……E 群

この段階では、分離ミトコンドリアの酸化的磷酸化能は著しく低下し、ATP、アルブミン、 Mg^{++} の添加による収縮能も見られず、DNP-induced ATPaseの活性は極度に低い。すなわちミトコンドリアの器質的障害が著明になり、もはや修復が不可能である。従って、輸血や輸液、ステロイド等の治療にも反応せず、ミトコンドリア Redox State の回復は起らず、エネルギーチャージは低下したままである。糖新生は抑制され、著しい低血糖を生来する。細胞のエネルギー代謝は完全に破綻し、必然的に臓器機能不全をひきおこし、死亡するに至る。

II エンドトキシンショックの経過

出血性ショックと同様、エンドトキシンショックにおける病態を解明する為に、代謝変動の重要性は数多く、指摘されている^{19,32,42)}。多くの研究は、種々の実験モデルにて、エンドトキシンの致死量投与後、ミトコンドリアの活性が低下することを報告している^{34,35)}。しかしながら、エンドトキシン血症の初期の反応より、ショック不可逆過程に到る全経過を詳細に観察したものは見あたらない。各 stage における生体の反応を分析することは重要であり、それにより始めて治療への道が開かれるものと推察される。

エンドトキシンショックや細菌性ショックでは、一般に種々の臓器で ATP の低下を来することはすでに報告されている^{13,54)}。本実験では、初期の段階では、エネルギーチャージの低下及びアデニンヌクレオチド量の減少は軽度であり、一定の時点より急激に低下することが判明した。敗血症やエンドトキシン血症のある段階においては、脳、筋等の種々の臓器で、糖利用能の亢進がみられることは、よく知られている^{19,15,46)}。乳酸、種々のアミノ酸、グリセロールやアンモニア等の増量による代謝的負荷は、主として糖新生や、尿素合成の過程で大量の ATP の消費をもたらす。この意味では、エンドトキシンショック初期におけるエネルギーチャージの低下は、エネルギー消費反応の亢進によるものと思われるが、出血性ショック初期に比べてその低下の度合いが少ない。それに対して、エンドトキシンショックにおけるエネルギー産生機構の反応、すなわちミトコンドリアの酸化的磷酸化能の変動は興味深く注目に値する。すなわち、エンドトキシン血症初期及び中期に到る長い時間において、ミトコンドリアの ATP 産生能は著しく亢進していることが判明した。

肝ミトコンドリアの著しい機能亢進は、大量肝切除後の残存肝や、門脈枝結紮における非結紮葉で認められることは、既に報告され、これはエネルギー需要増大時のミトコンドリアの代償的反應であるとされている^{42,63,65)}。本実験におけるミトコンドリアの機能亢進も、エネルギー消費の増大によりもたらされた、細胞内エネルギー状態の低下を改善する為の代償的機転と推察される。このミトコンドリアの機能亢進は polarography による測定のみならず、DNP-induced ATPase 活性においても著明に認められ、また ATP、アルブミン、 Mg^{++} 添加による収縮能の変化においても対照群とは明らかに異なった反応を呈する。これは、ミトコンドリア膜の構造区画 (compartment) に何か著しい変化が進行していることを示唆する。

この現象には、いかなる機構が関与しているのか、議論の多いところである。Mela 等も、エンドトキシンショックの一時期には、一過性にミトコンドリアの呼吸調節能が上昇することを報告しているが、これを hypoxia に対する反応としている。しかし、出血性ショックでは、かかるミトコンドリアの機能亢進を認めず、また本実験においては、a, b, c₁ 群では hypoxia は認めていない。in vivo のミトコンドリアの活性を示すミトコンドリア Redox State の変動は、この問題に対して一つの仮説を提供するものと思われた。ミトコンドリア Redox State は、ミトコンドリアが十分なグルコースと酸素を供給され、TCA cycle が円滑に回転しているかぎり、通常は一定の高いレベルに保たれる。しかしながら、本実験では、初期より低下の傾向を示し、in vitro でミトコンドリア機能の最大活性を認めた時期 (c₁ 群) には、対照群に比し有意に低下していることが判明した。一般に、ミトコンドリア Redox State の著明に低下する原因としては次の状態がよく知られている。すなわち(1)ミトコンドリアの障害、(2) hypoxia、(3) 脂肪酸酸化の亢進等である。hypoxia やミトコンドリア自体の障害は、TCA cycle の抑制をもたらす、その結果として必然的にエネルギーチャージの著明な低下を伴うものである⁵⁵⁾。出血性ショックや肝阻血実験でのエネルギー代謝の破綻は、これに帰するところが大い¹⁴⁾。エンドトキシン血症初期及び中期における、エネルギーチャージの低下の度合い、分離ミトコンドリアの著しい機能亢進を考えると、このミトコンドリア Redox State の低下は、脂肪酸酸化すなわち β -酸化の亢進によるものと考えるのが、自然な解釈であろう。事実、ミトコンドリア

の酸化的磷酸化能が亢進している時期では、肝組織におけるケトン体総量は増加して、末期でのミトコンドリア機能の低下時期には、減少してゆく傾向を示している。これ等の事実、エンドトキシン血症のある時期においては、脂肪酸の β -酸化が著しく亢進することを裏付けるものと解釈出来る。

等モルのグルコース酸化よりは、脂肪酸の β -酸化による ATP 産生の方が、はるかに効率的であり、Neely 等も、心筋の灌流実験でこのことを証明している³⁸⁾。

以上の如く、エンドトキシン血症における初期より中期に及ぶ stage は、エネルギーチャージをかなり上げて保つべく、ATP 産生が亢進した、いわゆる hypermetabolic stage と解釈され、脂肪酸酸化によるミトコンドリアの機能亢進は、エネルギー代謝における一つの代償機転と考えることが出来る。

Askanazi 等は、臨床例における敗血症患者で高カロリー輸液施行時に、呼吸商 (R, Q) < 1.0, 及び酸素消費が 29% と有意に増加することより、大量のグルコースは、すべて完全に利用されずにエネルギー源としては、むしろ脂肪が利用されることを報告したが²⁾、本実験のデータと合せ考えると興味深い。そして、その敗血症の時期は、ミトコンドリアの hypermetabolic stage を反映しているものと推察される。

エンドトキシンショック末期においては、ミトコンドリアの酸化能は極度に低下し、必然的にエネルギーチャージの著しい低下をもたらす。この状態は、エネルギー代謝における代償不全の stage であり、ミトコンドリア Redox State は、さらに低下している。ミトコンドリアの膨化、収縮能の結果や、incubation による aging 効果、DNP-induced ATPase 活性のデータよりみると、出血性ショック末期と同様に、ミトコンドリアの器質的障害が進行したと思われる。エンドトキシンショックにおいても、最終的かつ最も重篤なエネルギー代謝失調は、ミトコンドリアにおけるプロトンの shuttle 機構の破綻であると推定出来る。エンドトキシンショックや敗血症末期に認められる低血糖は、肝エネルギー代謝不全によりもたらされる糖新生の抑制の結果生ずるものであろう。好氣的代謝におけるピルビン酸からの糖新生反応は、フォスホエノールピルビン酸への変換の過程でオキサロ酢酸を重要段階としている。オキサロ酢酸の濃度は、クエン酸酸化における律速因子である為、大量のオキサロ酢酸の消費は TCA cycle の回転を抑制することになる。また、脂肪酸の β -酸化の亢進は、ミトコンドリア

の Redox State の低下をもたらす、ピルビン酸脱水素酵素複合体の活性を阻害する。糖新生反応は、大量の ATP を消費し、他の反応に必要なエネルギープールを減少することになる。また逆に、出血性ショックや、エンドトキシンショック末期における如く、肝エネルギーチャージの極度に低下した時点では、エネルギー不足の為に糖新生が阻害されることになり、低血糖を生ずるものと思われる。

エンドトキシン血症では、hypermetabolic stage を経て、hypometabolic stage へと移行し、不可逆性ショックに陥るが、このミトコンドリアの障害をひきおこす直接的な原因に関しては、未だ議論の多いところである。エンドトキシンを分離ミトコンドリアに添加した場合、酸化的磷酸化が阻害されることは Shumer 等により報告されている⁴⁷⁾。また実際、電子伝達系における、どの ATP 生成部位が阻害されるかといった研究も報告されている^{33,34,39)}。しかしながら in vivo において、エンドトキシンがどの様に、肝細胞のミトコンドリアに到達するかは、疑問の多いところである。

多くの研究者は、エンドトキシンによる心血管系の抑制が primary であるとし、肝血流量の減少がミトコンドリアの障害をひき起すのであろうと推察している^{22,53)}。エンドトキシン血症においては、肝血流量の減少を示した報告は多数みられるものの、この循環系の抑制は、むしろ代謝的抑制の結果であるとする推察も充分成りたつものと思われる^{10,48)}。事実、平井等は、ブタを用いた敗血症の実験において、心拍出量とミトコンドリアの活性の相関より、代謝変動の重要性を示唆している²¹⁾。

過度の脂肪酸のミトコンドリアへの蓄積が、natural uncoupler として作用することはよく知られたことである³⁰⁾が、エンドトキシンショックにおける hypermetabolic stage において脂肪酸酸化の亢進がおこり、大量の脂肪酸が摂取され最終的にミトコンドリアの障害をもたらす可能性もある。またライソゾーム酵素や、網内系 (特に Kupffer 細胞) の損傷も、この問題を考えるにあたり重要な因子であろう。

以上、エンドトキシンショックにおける経過をミトコンドリア機能を中心に述べたが、各 stage と、その特徴を集約すると次の如くなる (Fig. 16)。

Stage I (Hypermetabolic stage)……a~c₁ 群

血圧は充分保たれ、肝エネルギーチャージは軽度低下するのみである。ミトコンドリアの ATP 生成能は著明に亢進し、そのエネルギー基質として脂肪酸が重

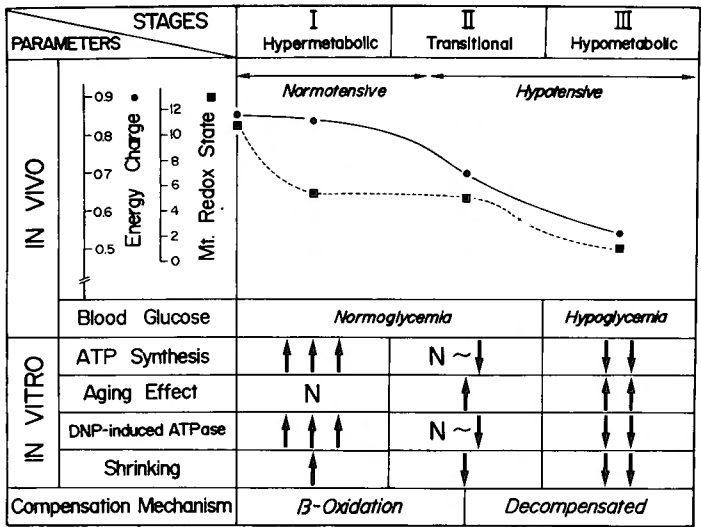


Fig. 16. Stages of endotoxin shock in energy metabolism and mitochondrial alteration
N: within normal range

要な役割を果たしている。代謝負荷の増大にもかかわらず、十分に代償されている時期であり、全経過を通じて長時間をしめる。

Stage II (Transitional stage)……c₂群

血圧低下を来たす時期であり、ミトコンドリア膜の脆弱性が進行している。ミトコンドリアの代償性機能亢進が破綻し始め、エネルギーチャージは著明に低下する。metabolic liver support 等の治療を導入するには、この stage が臨界点になると思われるが、きわめて短い期間である為に注意深い観察が必要である。

Stage III (Hypometabolic stage)……c₃群

強い低血糖を呈し、血圧もさらに低下している。ミトコンドリアの器質的障害が著しくミトコンドリア Redox State、エネルギーチャージも極度に低下し、出血性ショック末期と同様に、いかなる治療によっても回復は望めない。細胞のエネルギー代謝が完全に破綻し、臓器の機能不全は不可逆性である。

結 語

Tissue perfusion の障害と考えられているショックに関して、細胞レベルでどの様に代謝変動が進むかを、肝ミトコンドリアに関するエネルギー代謝を通じて、出血性及びエンドトキシンショックモデルで検討した。

出血性ショックでは、早期より血流量の著しい減少により、増大した代謝負荷に対応するには嫌氣的解糖による部分が大きい。しかしこれは、エネルギー産生

系からみれば効率が悪く、早期に細胞のエネルギー不足を生来する。一方エンドトキシンショックにおいては、肝ミトコンドリアは、脂肪酸のβ-酸化により著しい機能亢進を示し、エネルギー消費に対する代償機転が強く働くものと思われる。ショックの可逆性、不可逆性を左右する重要な因子は、重要臓器のエネルギー代謝失調の回復としてとらえることが可能であり、治療により、エネルギーチャージが正常化することが必須条件である。

出血性、エンドトキシンショックを問わず、末期にはミトコンドリアの器質的障害をひきおこし、エネルギー代謝不全の回復は望めなくなり、治療はこういった時期以前に進められなければならないものと推察された。

稿を終るにあたり、終始御指導を賜った本学第一外科教室、戸部隆吉教授に深甚なる感謝の意を捧げます。また実際のエネルギー代謝理論、実験方法論及びデータの解釈に御教授、御指導いただいた小沢和恵助教授に深謝いたします。また、実験デル作成や assay 技術等にも、有益なる助言及び協力をおしめなかった、島根医科大学外科、井田健講師を始め、本学外科第五研究室の諸兄に対し心より感謝いたします。

本論文の要旨は、第79回日本外科学会総会(1979年、札幌)、第7回日本救急医学会総会(1979年、東京)、第14回 European Society for Surgical Research (1979年、Barcelona)、第15回 European Society for Surgical Research (1980年、Brussels) において発表した。

参 考 文 献

- 1) Adam H: Adenosine-5-diphosphate and adenosine-5-monophosphate. *In* Method of Enzymatic Analysis edited by Bergmeyer HU. New York, Academic Press Inc 1965, p 573.
- 2) Askanazi J, Carpentier YA, et al: Influence of total parenteral nutrition on fuel utilization in injury and sepsis. *Ann Surg* **191**: 40-46, 1980.
- 3) Atkinson DE: The energy charge of the adenylate pool as a regulatory parameter, interaction with feed back modifiers. *Biochem* **7**: 4030-4034, 1968.
- 4) Atkinson DE: Enzymes as control elements in metabolic regulation. *In* The Enzymes edited by Boyer PD. New York, Academic Press Inc 1970, p 461.
- 5) Azzone GF: Respiratory control and compartmentation of substrate level phosphorylation in liver mitochondria. *J Biol Chem* **236**: 1501-1509, 1961.
- 6) Baue AE: Multiple, progressive or sequential systems failure. *Arch Surg* **110**: 779-781, 1975.
- 7) Baue AE: Mitochondrial function in shock. *In* The Cell in Shock. Proceedings of symposium on recent research development and current clinical practice in shock. 1974, p 11.
- 8) Baue AE, Chaudry IH: Cellular alterations with shock and ischemia. *Angiol* **25**: 31-39, 1974.
- 9) Baue AE, Wurth MA, et al: Impairment of cell membrane transport during shock and after treatment. *Ann Surg* **178**: 412-422, 1973.
- 10) Cerra FB, Siegel JH, et al: Correlations between metabolic and cardiopulmonary measurements in patients after trauma, general surgery and sepsis. *J Trauma* **19**: 621-629, 1979.
- 11) Chance B: Quantitative aspects on the control of oxygen utilization. *In* Ciba foundation symposium on regulation of cell metabolism. Boston Little Brown Inc 1959, p 91.
- 12) Chaudry IH, Sayeed MM, et al: Depletion and restoration of tissue ATP in hemorrhagic shock. *Arch Surg* **108**: 208-211, 1974.
- 13) Chaudry IH, Wicherman KA: Effect of sepsis on tissue adenine nucleotide levels. *Surgery* **85**: 205-211, 1979.
- 14) Daniel AM, Beaudoin JG: Evaluation of mitochondrial function in the ischemic rat liver. *J Surg Res* **17**: 19-25, 1974.
- 15) DePalma RG: Ultrastructure and oxidative phosphorylation of liver mitochondria in experimental hemorrhagic shock. *J Trauma* **10**: 122-134, 1970.
- 16) Donald EF, Leslie P, et al: Multiple system organ failure. *Arch Surg* **115**: 136-140, 1980.
- 17) Drucker WR, Craig J, et al: Citrate metabolism during surgery. *Arch Surg* **85**: 557-563, 1962.
- 18) Eiseman B, Beart R: Multiple organ failure. *Surgery* **44**: 323-326, 1977.
- 19) Filkins JP, Buchanan BJ: In vivo vs in vitro effects of endotoxin on glycogenolysis, gluconeogenesis, and glucose utilization. *PSEBM* **155**: 216-218, 1977.
- 20) Fiske CR, Subbarow Y: The colorimetric determination of phosphorus. *J Biol Chem* **66**: 375-400, 1925.
- 21) Hirai F, Aoyama M, et al: Hepatic energy metabolism of sepsis in pigs and its relationship to hemodynamic changes. *Eur Surg Res* **13**: 72-73, 1981.
- 22) Hinshaw LB, Emerson TE, et al: Cardiovascular response of the primate in endotoxin shock. *Am J Physiol* **201**: 335-340, 1966.
- 23) Horpacsy G, Schnells G: Energy metabolism and lysosomal events in hemorrhagic shock after aprotinin treatment. *Circ Shock* **7**: 49-58, 1980.
- 24) Hultman E: Rapid specific method for determining of aldosesaccharide in body fluid. *Nature* **183**: 108-109, 1959.
- 25) Lamprecht W, Traushold I: Determination with hexokinase and glucose-6-phosphate dehydrogenase. *In* Method of Enzymatic Analysis edited by Bergmeyer HU. New York, Academic Press Inc 1965, p 543.
- 26) Lehninger AL: Reversal of thyroxine-induced swelling of rat liver mitochondria by adenosine triphosphate. *J Biol Chem* **234**: 2187-2195, 1959.
- 27) Lehninger AL: Reversal of various types of mitochondrial swelling by adenosine triphosphate. *J. Biol Chem* **234**: 2465-2471, 1959.
- 28) Lehninger AL: Water uptake and extrusion by mitochondria in relation to oxidative phosphorylation of liver mitochondria. *Physiol Rev* **42**: 467-517, 1962.
- 29) Lehninger AL: Bioenergetic principles and the ATP cycle. *In* Biochemistry (2nd edition), New York, Worth Publishers Inc 1975, p 387.
- 30) Lehninger AL, Remmert LF, et al: An endogenous uncoupling and swelling agent in liver mitochondria and its enzymic formation. *J Biol Chem* **234**: 2459-2464, 1959.
- 31) Lowry OH, Rosenbrough NJ, et al: Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* **193**: 265-275, 1951.
- 32) Maw SL, Spitzer JJ: Myocardial fatty acid and lactate metabolism after E. coli endotoxin administration. *Circ Shock* **4**: 191-200, 1977.
- 23) Mela LM, Bacalzo lv, et al: Defective oxidative metabolism of rat liver mitochondria in

- hemorrhagic shock and endotoxin shock. *Am J Physiol* **220**: 571-577, 1971.
- 34) Mela LM, Miller LD, et al: Effect of *E. coli* endotoxin on mitochondrial energy-linked functions. *Surgery* **68**: 541-549, 1970.
 - 35) Mela LM, Miller LD, et al: Alterations of mitochondrial structure and energy-linked functions in hemorrhagic shock and endotoxemia. *Proceedings of the symposium on neurohumoral and metabolic aspects of injury*, edited by Arisztid GB et al. New York, Plenum Publ Corp 1973, p 231.
 - 36) Muller W, Smith LL: Hepatic circulatory changes following endotoxin shock in the dog. *Am J Physiol* **204**: 641-644, 1963.
 - 37) 宮崎正夫: ショックの病態生理と臨床, 東京, 金原出版, 1974.
 - 38) Neely JR, Whitmer KM, et al: Effects of mechanical activity and hormones on myocardial glucose and fatty acid utilization. *Circ Res* **38** suppl 1: 22-30, 1976.
 - 39) Nicholas GG, Mela LM, et al: Shock-induced alterations of mitochondrial membrane transport. *Ann Surg* **176**: 579-584, 1972.
 - 40) Ozawa K, Ida T, et al: Different responses of hepatic energy charge and adenine nucleotide concentrations to hemorrhagic shock. *Res Exp Med* **169**: 145-153, 1976.
 - 41) Ozawa K, Kitamura O, et al: Human liver mitochondria. *Clin Chim Acta* **38**: 385-393, 1972.
 - 42) Ozawa K, Takasan H, et al: Effect of ligation of portal vein on liver mitochondrial metabolism. *J Biochem* **70**: 755-764, 1971.
 - 43) 小沢高将, 浅井淳平他: ミトコンドリアの呼吸パターンと酸化的リン酸化, ミトコンドリア, 東京, 南江堂 1971, p 190.
 - 44) 小沢高将, 浅井淳平他: 電子伝達に共役したエネルギー伝達反応, ミトコンドリア, 東京, 南江堂 1971, p 172.
 - 45) Peyton MD, Hinshaw LB, et al: Hypoglycemic effects of endotoxin in eviscerated dogs. *Surg Gynecol Obstet* **141**: 727-729, 1975.
 - 46) Raymond RM, Emerson TE: Cerebral metabolism during endotoxin shock. *Fed Proc* **35**: 794-794, 1976.
 - 47) Shumer W, Gupt TK, et al: Effect of endotoxemia on liver cell mitochondria in man. *Ann Surg* **171**: 875-882, 1970.
 - 48) Siegel JH, Cerra FB, et al: Physiological and metabolic correlation in human sepsis. *Surgery* **86**: 163-193, 1979.
 - 49) Spitzer JJ: Lipid metabolism in endotoxin shock. *Circ Shock* suppl 1: 69-79, 1979.
 - 50) Staple DA: Comparison of adenosine triphosphate levels in hemorrhagic shock and endotoxin shock in the rat. *Surgery* **66**: 883-885, 1960.
 - 51) Suteu I, Cafrita A, et al: The shock cell. *In Shock (Pathology, Metabolism, Shock cell, Treatment)*, edited by Suteu I, et al. England, Abacus Press Inc 1977, p 313.
 - 52) Trump BF: The role of cellular membrane system in shock. *In The cell in shock Proceedings of symposium on recent research development and current clinical practice in shock*. 1974, p 16.
 - 53) 上田博: エンドトキシンのエネルギー代謝に及ぼす影響. 特に肝ミトコンドリア機能と肝アデニンヌクレオタイドの動態について. *日外会誌* **81**: 581-593, 1980.
 - 54) 浮草実, 井田健他: エネルギー代謝面よりみたエンドトキシシンショック時の各臓器の変化. *救急医学* **3**: 693-698, 1979.
 - 55) Ukikusa M, Ida T, et al: The influence of hypoxia and hemorrhage upon adenylate energy charge and bile flow. *Surg Gynecol Obstet* **149**: 346-352, 1979.
 - 56) Vogt MT, Farber E, et al: On the molecular pathology of ischemic renal cell death, reversible and irreversible cellular and mitochondrial metabolic alterations. *Am J Pathol* **53**: 1-27, 1968.
 - 57) Wiggers CJ: *Physiology of shock*. New York, Commonwealth Fund 1950, p 137.
 - 58) Werle JM, Cosby RS: Observations on hemorrhagic hypotension and hemorrhagic shock. *Am J Physiol* **136**: 401-420, 1942.
 - 59) Williamson DH, Lund PA, et al: The redox state of free nicotinamide adenine dinucleotide in the cytoplasm and mitochondria of rat liver. *Biochem J* **103**: 514-527, 1967.
 - 60) Williamson DH, Mellanby J: D-(-)-3-hydroxybutyrate and acetoacetate. *In Methods of Enzymatic Analysis*, edited by Bergmeyer HU. New York, Academic Press Inc, 1974, p 1836.
 - 61) Yamamoto M, Sato M, et al: Obstructive jaundice and hemorrhagic shock. *Circ Shock* **5**: 235-249, 1978.
 - 62) Yamamoto M, Tanaka J, et al: Significance of acetoacetate/ β -hydroxybutyrate ratio in arterial blood as an indicator of severity of hemorrhagic shock. *J Surg Res* **28**: 124-131, 1980.
 - 63) Yamamoto M, Yamada T, et al: Inhibitory effects of jaundice on regenerating liver. *Res Exp Med* **171**: 121-128, 1977.
 - 64) 山村秀夫, 草間悟他編: ショックの臨床, 東京, 金原出版, 1979.
 - 65) Yamaoka Y, Ohsawa T, et al: Energy requirement in regenerative and atrophic processes of the liver in man and mammals. *Surg Gynecol Obstet* **139**: 234-240, 1974.