

第2章 研究方法

(1) 肝灌流法

ラット肝灌流はMortimoreら¹⁷⁾の方法に準じた既に報告した¹⁸⁾方法で行った。即ち、ラットに50mg/kgの pentobarbitalを腹腔内投与して麻酔し四肢を伸ばしてあおむけに保定する。腹部を大きく十文字に切開し、胃腸などの消化管を体外に出し、右側に寄せて下行大動脈、胆管および門脈を露出させる。肝臓に流入する血管は、大動脈から分岐した肝動脈と腸管を循環してきた静脈血を集めた門脈の2本が存在し、肝血流のうち 25-30%が肝動脈より、また70-80%が門脈より供給されている。肝動脈からの血液も門脈からの血液も肝臓内に入ってから同じ血管系に入って肝臓内を循環し、肝静脈より流出して下行静脈に入る。そこで肝動脈は結紮し、Fig.4のように門脈よりカニューレーションし灌流液を流入させた。灌流液は Krebs-Ringer-Tris bufferにウシ血清アルブミン(3%)を溶解したものを100% O₂で酸素化し37°Cに保った。循環装置はペリスタリックポンプ(Decarf-24、大洋化学工業、東京)を用いた。実際の血流は心臓の拍動により、脈流となって全身をめぐる。従って臓器灌流を行う際も、できれば定常流によるよりも実際に近い脈流の方が望ましい。しかし肝臓の場合、供給される血液の70-80%は門脈に由来しているので、動脈から直接に血液供給をうける他の臓器と異なり、in vivoでもむしろ定常流に近いと考えられている。このペリスタリックポンプは周期の短い脈流となるが、生理的レベルの脈流と比較するとやはり定常流に近い¹⁹⁾。次に門脈にカニューレーション後、同時に胆管も結紮し、直ちに胸部を大きく切開し、拍動中の右心房より大動脈に out flow用のカテーテルを挿入し、下行静脈を結紮すると out flowカテーテルより灌流液の流出を得る。そして灌流速度は20ml/minとした。これで手術手技は終了するが、肝臓内の血液が除かれて肝臓独特の肉紅色より白色に色が変わるのを確認することより灌流状態に異常がないか否か判定した。また reservoirより collecting tubeまでの灌流時間(time lag)は25秒であることが indocyanine greenを用いた実験で判明した。そして実際の実験結果はこの time lagは補正せずに記載した。

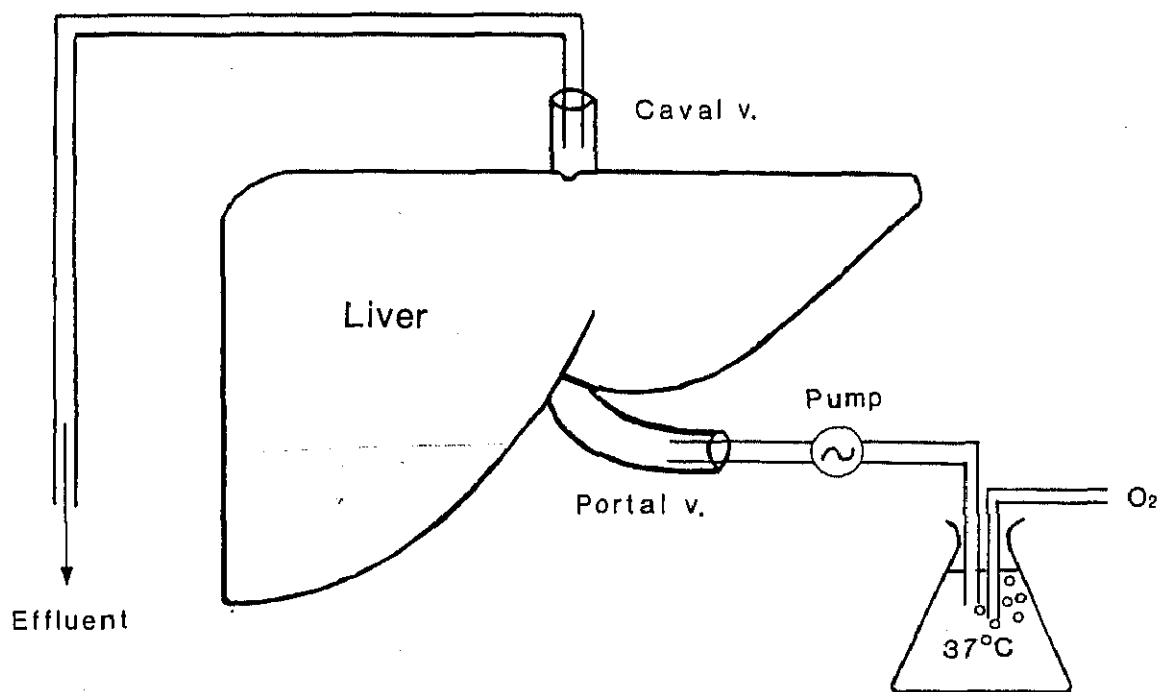


Fig. 4 非再灌流式肝灌流法

(2) 筋灌流法

ラット下肢筋灌流はChanら²⁰⁾の方法に準じて行った。灌流装置はMiller-Mortimore型ラット肝灌流装置の改良型を用いた。Fig.5に略図を示す。この装置は灌流箱とperistaltic pumpより成り立っている。灌流箱には手術台、回転式灌流液酸素化装置、灌流液フィルター、泡除去装置が設置されており、各部品はタイゴンチューブで結ばれている。酸素化装置は酸素タンク(O₂ 95%, CO₂ 5%)に結ばれており常時酸素が供給されるようになっている。また灌流箱を37°Cに保つためのサーモスタット付ヒーターが内臓されている。手術法は、pentobarbital(50mg/kg)の腹腔内投与により麻酔したラットを手術台に固定する。開腹した後、精巣への血管を結紮し、精巣を精管とともに摘出する。膀胱を結紮切除後、腸腰筋への血管を結紮する。下腸間膜動静脈を結紮した後、上腸管膜動脈、腹腔動脈、門脈周囲に糸をかけ、門脈内にヘパリン(10mg/kg)を投与し、結紮する。小腸、大腸、脾臓を摘出した後、腹部大動脈(A.A.)と下行大静脈(I.V.C.)周囲の結合織を取り去り、腎血管より末梢側で、A.A.周囲に2本、I.V.C.の周囲に1本の糸をかけ、腎血管より中枢側でI.V.C.に1本の糸をかける。A.A.の2本の糸の間に16ゲージの針のついたカニューラを挿入し糸を結紮する。つぎに16ゲージの静脈側カニューラをI.V.C.に挿入し結紮する。ただちにポンプを始動させ灌流を開始する。その後、心臓内に塩化カリウム濃厚液を注入し、ラットを死亡させる。3%のデキストランT-70(Pharmacia)、20%の洗浄ヒト赤血球を含むKrebs-Henseleite-Bicarbonate buffer(pH 7.4)を基礎灌流液とした。灌流速度は、3ml/minで行った。灌流中に組織の乾燥を防ぐ目的で、下半身を水でぬらしたガーゼで覆った。実験により被灌流組織重量を求める場合には、灌流最後に動脈側カニューラよりエバンスブルーを灌流し、染色された筋組織を摘出し秤量した。染色される組織は、下肢の骨格筋群と骨、若干の皮膚のみであった。

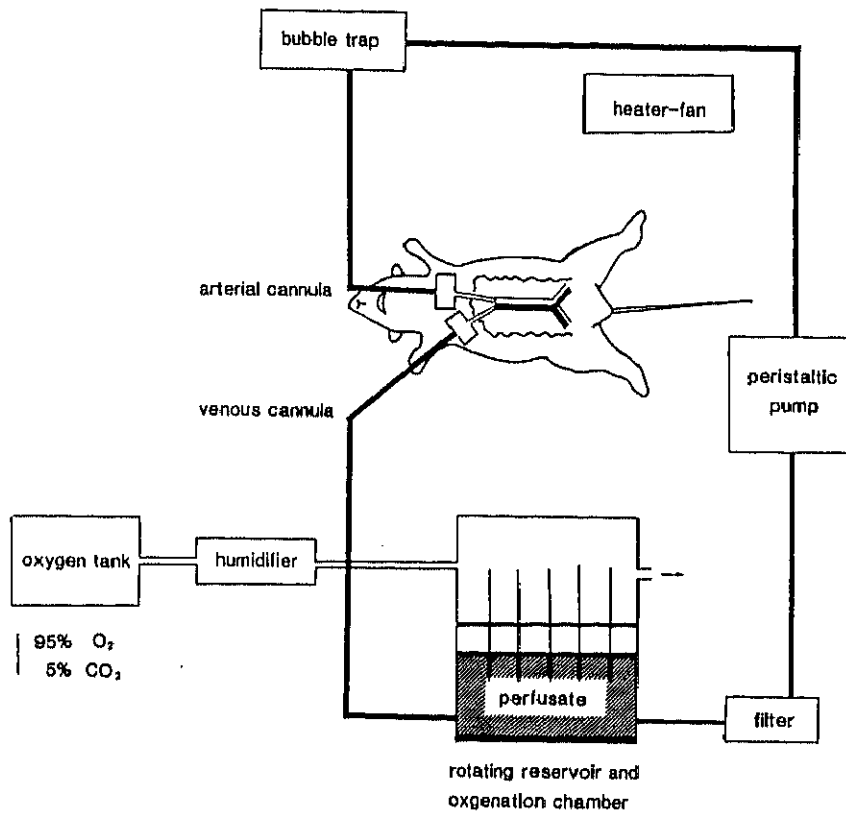
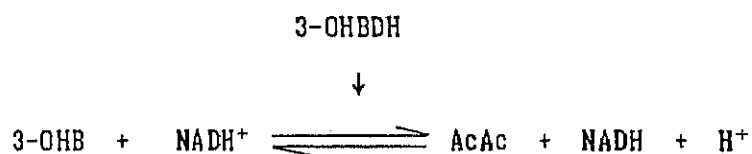


Fig. 5 筋灌流装置

(3) ケトン体の測定法 (Mellanby法²¹⁾)

原理

3-ヒドロキシ酪酸脱水素酵素(3-OHBDH)による下記の反応を利用する。

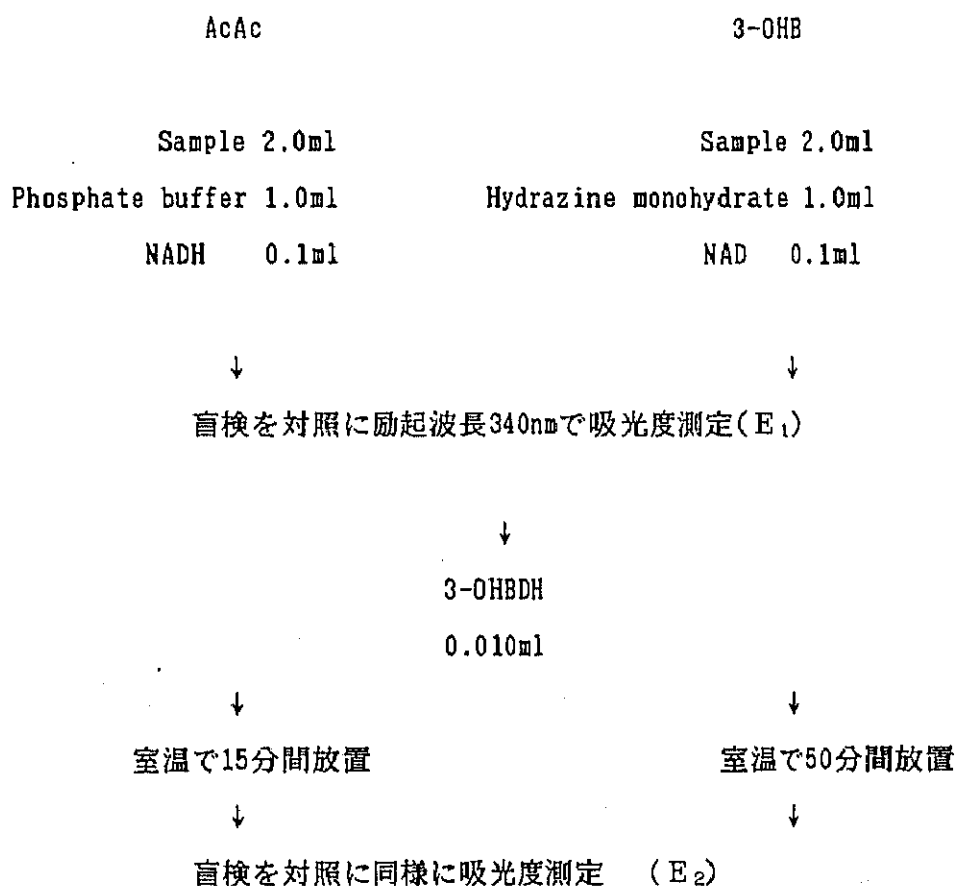


この反応はpH8.5にすると右方向、pH6.8では左方向に進行するので、それぞれのpHにおけるNADHの増減を測定することにより、3-OHB及びAcAcを分別定量した。

試薬

- 1) 0.1M Tris-HCl buffer(pH8.5)
- 2) 0.1M Phosphate buffer(pH6.8)
- 3) 1M Hydrazine monohydrate(pH8.5)
- 4) 1 mg/ml 3-OHBDH
- 5) 10mM NAD
- 6) 5mM NADH

測定操作



計算

$$\begin{aligned} \text{AcAc} \quad [\mu \text{ mole/ml}] \\ = 0.249 \times (E_2 - E_1) \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{3-OHB} \quad [\mu \text{ mole/ml}] \\ = 0.249 \times (E_2 - E_1) \end{aligned}$$

(4) ケトン体の測定法 (ジアゾニウム塩法²²⁾)

測定原理

AcAcとジアゾニウム塩とのcoupling反応により生成するヒドラゾ化合物をアルカリ性にする事により、残存ジアゾニウム塩を不活性型にすると同時に安定性の高いジアゾ化合物のアルカリ銀塩とし、それを波長645nmで比色定量する。

また、3-OHBはNAD⁺、ピルビン酸、乳酸脱水素酵素の存在下に3-ヒドロキシ酪酸脱水素酵素(3-OHBDH)を用いて酵素的に100% AcAcへ変換し、上述の方法で比色定量する。この時、総ケトン体(AcAc+3-OHB)として定量されるので、既存のAcAc量を減じて3-OHBの測定値とした。測定にあたってはkit(ケトンテスト[三和])を使用した。

測定方法

ASSAY FOR KETONE BODIES

<u>AcAc</u>	<u>Total (AcAc + 3OHB)</u>
Serum (S)	Serum (S')
or 0.1 ml	Standard (ST) 0.1 ml
H ₂ O (B)	or
+	H ₂ O (B')
H ₂ O 0.5 ml	+
+	0.03 M phosphate buffer 0.2 ml
15% Perchloric acid 0.1 ml	(pH 8.0)
(PCA)	+
	20 mM NAD 0.2 ml
	6 mM Pyruvate
	+
	6 U/ml 3-OHBDH 0.1 ml
	12 U/ml LDH
	Incubate at 37°C for 10 min
	Add 15% PCA 0.1 ml
	Centrifuge at 3000 rpm for 10 min
	Take sup (0.5 ml) & mix with 0.5 ml 0.4 M citrate buffer (pH 3.9)
	+ Diazonium Salt (1.8 mg/ml) 0.5 ml
	Incubate 37°C for 10 min
	Add 0.5 ml 1.5 N NaOH & Read at 645 nm
	E(S), E(B), E(S'), E(B') and E(ST)

計算法

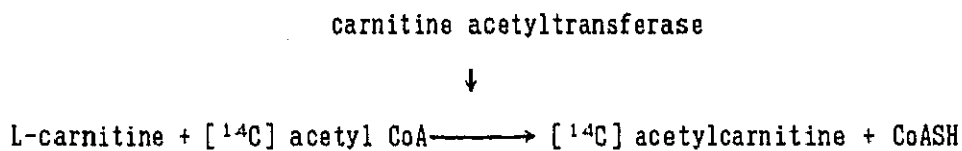
$$\text{AcAc} = \frac{E(S) - E(B)}{E(ST) - E(B')} \times \text{標準物質の濃度} \quad (\text{mM})$$

$$3\text{-OHB} = \frac{E(S') - E(B')}{E(ST) - E(B')} \times \text{標準物質の濃度} \quad (\text{mM})$$

(5) Carnitineの測定法

遊離carnitine及び総carnitine濃度はMcGarryら²³⁾が開発したradioisotopic methodに準じて測定した。

この測定法は次の反応を利用した酵素法である。



試薬

[1-¹⁴C] acetyl CoAはAmersham England社、L-carnitine、carnitine acetyltransferaseはSigma社、Dowex2-X-8 anion exchange resinはBIO,RAD laboratory社、sodium tetrathionateはICN pharmaceuticals Inc社のものを使用した。

測定方法

ASSAY FOR FREE CARNITINE

assay mixture 1.05 ml
| 120 μ mole Tris-HCl buffer
| pH 7.3
| 2 μ mole sodium tetrathionate
| 25 nmole (0.025 μ Ci) 1- 14 C acetyl CoA
+
Plasma 0.05 ml
or
carnitine standards (2.5, 5.0, 10.0 nmoles) 0.05 ml
+
2.5 μ l (IU) carnitine acetyltransferase suspension
| mixture
| stand for 30 min at room temperature
+
0.3 ml continuously stirred Dowex 2-X8 anion exchange
| containing 0.22 ml of water
| agitated with vortex
| place in ice for 10 min
+
0.3 ml continuously stirred Dowex 2-X8 anion exchange
| containing 0.22 ml of water
| agitated with vortex
| place in ice for 10 min
| centrifuge at 3000 xg for 5 min
0.5 ml Supernatant fluid in 10 ml aquasol

ASSAY FOR TOTAL CARNITINE

Plasma 0.05 ml + 1 M Tris bases 0.1 ml
| + 0.4 N KOH 0.05 ml
| stand for 1 hour at 37°C
+
0.575 N HCl 0.2 ml
The subsequent procedure is identical with that described above.

(6) インスリン、グルカゴンの測定法

ラット血中インスリン、グルカゴン濃度はそれぞれの特異抗血清（抗ブタインスリン抗体／清水製薬,30K抗体／Dr Unger 提供）を用いるRIAで測定した。B/F分離は全てデキストラン、活性炭法^{24) 25)}で行った。尚、インスリンのRIAではラットインスリン(Novo,Denmark)を標準物質として用いた。それぞれのRIAの検出範囲、インスリンで2-200 μ U/ml、グルカゴンで10-1000 pg/mlであった。

(7) cyclic AMP(cAMP)の測定法

灌流液中のcAMP量をYAMASA cyclic AMP assay kitを用いRIAにより測定した。

RIAの検出範囲は1.25-640 p mole/mlであった。

(8) glucoseの測定法

灌流液中のglucose濃度はglucose-oxidase法(新ブラッドシュガーテスト、Boehringer)により測定した。ヒト及びラット血漿中のglucose濃度はglucose oxidase法(glucose analyzer 2,Beckman)で測定した。

(9) 遊離脂肪酸(FFA)の測定法

遊離脂肪酸濃度は酵素法(NEFA C-Test,wako)により測定した。

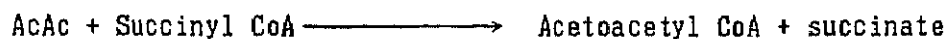
(10) lactateの測定法

lactate濃度は酵素法(ラクテートテスト,Boehringer)により測定した。

(11) 筋組織中の3-oxoacid CoA-transferase活性の測定法

3-oxoacid CoA-transferase

↓



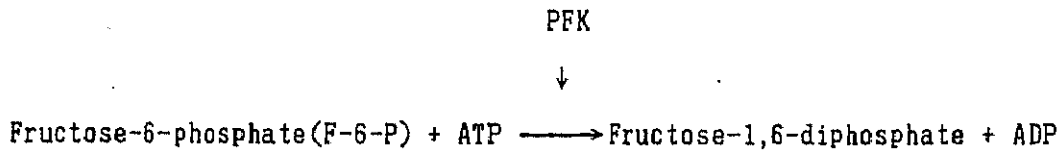
AcAcよりAcetoacetyl CoAの生成方向の活性をWilliamsonら⁹⁾の方法で測定した。Sampleの筋組織(10mg)に対してDilution medium [0.25M sucrose, 1mM 2-mercaptoethanol, 10mM Tris-HCl buffer(pH7.4)] を1mlの割で加え、ホモジネートした。更に超音波(15kHz, 30秒)にかけた後、遠心(21000rpm, 20分間)し、その上清をenzyme sampleとした。このsample 0.1mlに100 μmol, Tris-HCl buffer (pH8.5)、10 μmol, MgCl₂、10 μmol, iodoacetamide、0.2 μmol, Succinyl CoAを加え全量が2mlとなるようにした。25°Cで反応を開始させ、分光光度計(313nm)にセットし2分間測定した。

そして下記の式で酵素活性を計算した。

3-oxoacid CoA-transferase activity (μ mole/ min/ g tissue)

$$= \frac{\Delta \text{ absorbance}}{2 \times 12}$$

(12) 筋組織中のphosphofructokinase(PFK)活性の測定法



上記の反応におけるPFK活性をShonk, Boxerら²⁶⁾の方法により測定した。Sampleの筋組織(10mg)あたり、Dilution medium[150mM KCl, 50mM KHCO₃, 6mM EDTA] 1mlを加え、ホモジネートした。これを遠心(3000rpm, 15分間)し、その上清をenzyme sampleとした。これに3.0ml buffer(50mM Triethanolamine, 5mM EDTA, pH7.6)、10mM, MgCl₂、Aldolase 1.0 U、GDH/TIM(α -glycerolphosphate dehydrogenase-triosephosphate isomerase mixture) 7.1, 18.3 U、0.3mM, NADH、2.8mM, ATPを加えたものに2.8mM, F-6-P を添加し、25°Cの条件下で反応を開始させ、分光々度計(340nm)にセットし30秒ごと4分間測定した。

そして下記の式にて酵素活性を計算した。

PFK activity (μ mole/ min / g tissue)

$$= \frac{\Delta \text{ absorbance}}{t \text{ (min)}} \times \frac{3.546 \times 1000}{6.3 \times 0.2 \times 2}$$

その他実験に用いた主な試薬は以下のとおりである。

Insulin, Glucagon(Novo, Denmark)、GH(Nordisk, Denmark)、Epinephrine(三供、東京)、3-Hydroxybutyrate dehydrogenase(Boehringer, German)、Intrafat®注射液は大五栄養化学(株)、その他の試薬は和光純薬工業(株)の製品を用いた。

(13) 統計的検定

統計学的有意差検定は、Student's t testを用い対照或いは相互の群の差の有意性につき検討し、 $p < 0.05$ をもって有意水準とした。本文中、図中を含め、特に断わらないかぎり統計量は平均値±標準誤差で示した。