

●招請講演

細胞内酸素輸送からみたHBO

高橋 英嗣*

はじめに

高圧酸素 (Hyperbaric oxygenation : HBO) の治療効果のひとつとして、末梢循環不全等で酸素不足に陥った組織の酸素化改善が期待される。しかしながら、呼吸生理学の立場からは、HBOによる顕著な動脈血酸素分圧上昇は、必ずしも組織酸素レベルの十分な上昇を伴うものではないとされている。血液による酸素輸送量は、血液の酸素分圧ではなく酸素含量で規定され、HBOの動脈血酸素含量増加効果は、あまり大きくないためである。例えば、Nunn¹⁾によれば、正常人において、1気圧空気呼吸下の動脈血酸素分圧は98 mmHg、末梢組織の酸素レベルを代表すると考えられる静脈血酸素含量は14.3 vol% (静脈血酸素分圧は39 mmHg) である。一方、2気圧純酸素吸入では、動脈血酸素分圧は1425 mmHgと約15倍増加するが、静脈血酸素含量は18.4 vol%と約1.3倍の増加にとどまる。このときの静脈血酸素分圧は68 mmHgである。

ところが、最近の研究により、このような一見わずかな組織酸素レベルの増加が、ミトコンドリアへの酸素供給にとっては、大きな意味を持つであろうことが明らかとなってきた。以下、動脈から毛細血管さらには細胞内ミトコンドリアに至る酸素輸送について、心筋細胞を対象としたわれわれの研究の一部を紹介し、血液による還流性 (convectonal) 酸素輸送のみならず、組織酸素拡散抵抗で決まる拡散性 (diffusional) 酸素輸送が、ミトコンドリアへの酸素供給を規定する重要な因

子であることを述べ、HBOが拡散性酸素輸送を亢進する可能性について論じる。

細胞外酸素分圧勾配

われわれの動脈血酸素分圧は、1気圧空気呼吸下で約90~100 mmHgである。一方、酸素を利用しATPを産生するミトコンドリアの呼吸鎖酵素 (cytochrome c oxidase) の酸素親和性は極めて高く、この酵素の50%酸化に要する酸素分圧は、0.1 mmHg以下といわれている。つまり、動脈血による酸素供給とミトコンドリアにおける酸素消費の間には、分圧で見ても1000倍もの余裕が存在する。このことから、少なくとも正常時には、血液による酸素供給が細胞の好氣的ATP産生を制限する因子とはならないように思える。

最近、細胞の大きさに匹敵する空間分解能で、組織微小血管血あるいはそれに近接した細胞の酸素分圧を測定することが可能となった。それらによれば、毛細血管血と細胞膜の間には、きわめて急峻な酸素分圧勾配が存在し、拍動心筋では、酸素分子が毛細血管血から細胞膜までの距離1~2ミクロンを移動することで、細胞膜付近の酸素分圧は2~5 mmHgと動脈血に比べ驚くほど低いレベルに低下する²⁾。この酸素分圧は、ミトコンドリア呼吸鎖酵素にとっては、まだ十分高い酸素分圧である。しかし、ミトコンドリアが十分な余裕をもって好氣的ATP産生を続けられるかどうかは、さらに、細胞膜からミトコンドリアの間の酸素分圧勾配すなわち細胞内酸素分圧勾配から決定される。

細胞内酸素分圧勾配

われわれは以前より光学的手法を用い、単一分

*山形大学医学部第1生理

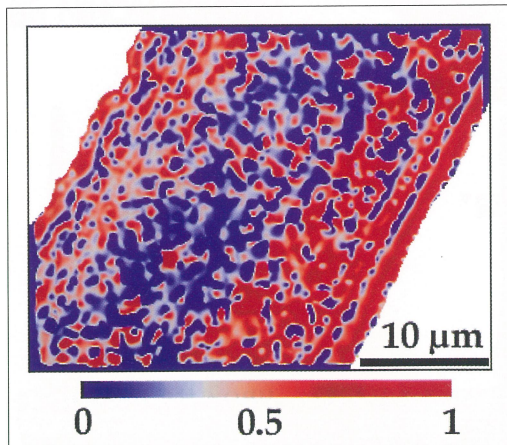


Figure 1

Digital imaging of intracellular oxygenation in a single cardiomyocyte isolated from the rat. Myoglobin oxygen saturations were determined by a microspectrophotometric technique and represented in pseudo colors. Extracellular oxygen level was adjusted so that myoglobin oxygen saturation averaged over the cell was comparable to the in vivo value (~50% saturation). Mitochondrial respiration was stimulated by uncoupler of oxidative phosphorylation.

離心筋細胞内部の酸素レベルおよびミトコンドリア酸素代謝の測定をおこなってきた^{3)~6)}。特に、デジタル画像処理を駆使し、測定の空間分解能をミトコンドリアの大きさに匹敵する1ミクロン以下とすることで、細胞内酸素輸送及びミトコンドリア酸素代謝の細胞内分布・細胞内勾配を克明に観察した。**Fig. 1**に示すのは、心筋細胞の細胞質に存在するミオグロビンを酸素プローブとして、ミオグロビンと酸素の結合に伴うミオグロビンの光吸収量変化から細胞内酸素レベルを画像化したものである⁵⁾。細胞内酸素分圧の平均値が、生体内で拍動している心筋における値である2~5 mmHgとなるように細胞外液の酸素分圧を制御している。成ラットから急性単離した心筋細胞は、電気刺激を与えない限り静止しているが、このような状態では細胞内部に酸素レベルの不均一性は見られなかった。一方、ミトコンドリア脱共役剤を用いミトコンドリアの酸素消費量を約8倍に増加させたところ、細胞膜近傍から細胞の中心部に向かい顕著なミオグロビン酸素飽和度の低下が画像化された。**Fig. 2**は、ミオグロビン酸素飽和度

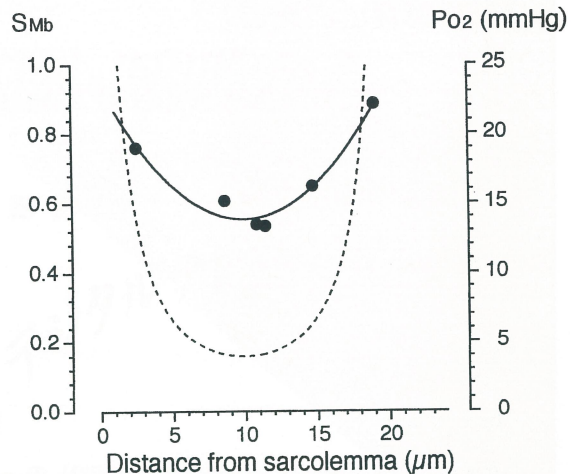


Figure 2

Radial changes in myoglobin oxygen saturation (S_{Mb} , solid curve) within the cell indicated in Fig. 1. Intracellular oxygen partial pressure (P_{O_2} , broken curve) was calculated from the myoglobin oxygen saturation.

の細胞内変化を細胞の短軸に沿ってプロットしたものである。ミオグロビン酸素飽和度から計算した酸素分圧も点線で示してある。これらの結果から、ミトコンドリアの酸素需要が中等度増加した時には、細胞膜近傍に特に顕著な酸素分圧勾配が生じることが明らかとなった。

はたしてこのような細胞内酸素分圧勾配が、ミトコンドリア酸素代謝を制限する要因となるかどうかを、ミトコンドリア酸素代謝の高空間分解能画像化により検討した⁶⁾。ミトコンドリア呼吸鎖への電子供給基質はNADH (還元型ニコチンアミドジヌクレオチド)である。NADHから遊離した電子(還元当量)は種々の呼吸鎖酵素間を伝達し、最終的にcytochrome c oxidaseで酸素分子の還元を用いられる。したがって、ミトコンドリアへの酸素供給低下は、電子伝達速度の減少に伴うミトコンドリアNADH量増加として検出できる。ミトコンドリアのNADH量は、NADHが紫外光照射に対し発生する自家蛍光から画像化できる。細胞外酸素分圧が十分高い時は、NADH蛍光は細胞内で一様であり、そのレベルは低かった。一方、細胞

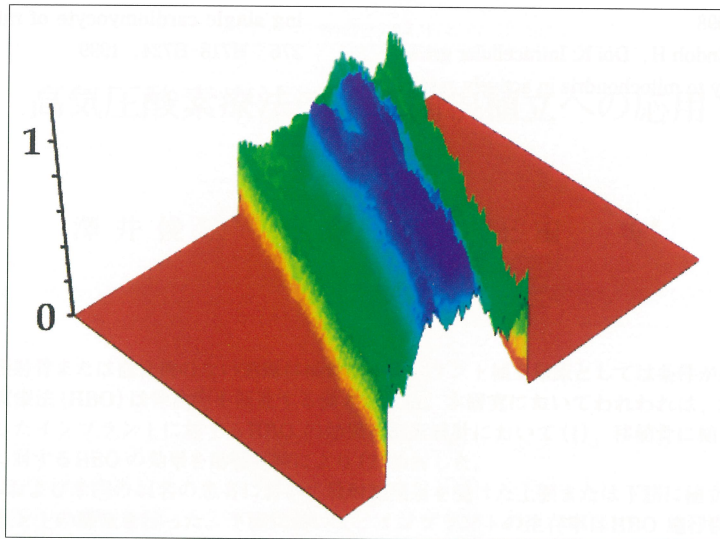


Figure 3

Intracellular heterogeneities of mitochondrial NADH fluorescence. Levels of NADH fluorescence were normalized and indicated in pseudo colors. Mitochondrial respiration was stimulated by uncoupler of oxidative phosphorylation.

を無酸素環境下におくと、NADH蛍光は一様に増加した。生体内と同程度の酸素環境下でミトコンドリア酸素消費を増加させると、先に述べた細胞内酸素分圧勾配と合致するNADH蛍光勾配が画像化された (**Fig. 3**)。この結果は、細胞内拡散性酸素輸送が、正常細胞においてもミトコンドリア酸素代謝を決定する要因であることを意味する。

細胞内酸素輸送とHBO

以上、細胞内酸素輸送およびミトコンドリア酸素代謝の画像解析から、細胞内酸素分圧勾配がミトコンドリアの好氣的代謝を制限するほど大きなものであることがわかった。このように動脈血から細胞膜まで、そして細胞膜から細胞内部のミトコンドリアまでの拡散性酸素輸送のバリアは大きく、細胞は今まで想像されてきたよりはるかに低い酸素環境下でエネルギー代謝を行っている可能性がある。この結論は、心筋細胞という比較的活発な代謝を行っている細胞から得られたものであることに注意しなければならないが、毛細血管酸素分圧の数mmHg程度の変動が、ミトコンドリアへの酸素輸送にとって大きな意味をもつことは十分予想できる。HBOでは、動脈血酸素分圧の

増加幅に比べ静脈血酸素レベル増加の絶対値は極めて小さく、HBOによる組織酸素化改善が疑問視される場合があるが、このような細胞・ミトコンドリアレベルの酸素輸送を考えると、HBOによるわずかな組織酸素レベルの上昇が、ミトコンドリア酸素代謝を大きく増加させる可能性がある。

〔参 考 文 献〕

- 1) Nunn JF: Applied Respiratory Physiology, 3rd ed., Butterworth, London, 1987, pp.480-482
- 2) Gayeski TEJ, Honig CR: Intracellular P_{O_2} in individual cardiac myocytes in dogs, cats, rabbits, ferrets, and rats. Am J Physiol 260: H522-H531, 1991
- 3) Takahashi E, Doi K: Visualization of oxygen level inside a single cardiac myocyte. Am J Physiol 268: H2561-H2568, 1995
- 4) Takahashi E, Doi K: Regulation of oxygen diffusion in hypoxic isolated cardiac myocytes. Am J Physiol 271: H1734-H1738, 1996
- 5) Takahashi E, Sato K, Endoh H et al: Direct observation of radial intracellular P_{O_2} gradients in a single cardiomyocyte of the rat. Am J Physiol 275:

- H225-H233, 1998
- 6) Takahashi E, Endoh H, Doi K: Intracellular gradients of O₂ supply to mitochondria in actively respiring single cardiomyocyte of rats. Am J Physiol 276 : H718-H724, 1999