

機器紹介

二波長バイオスペクトロメーター

田村正秀* 田村 守**

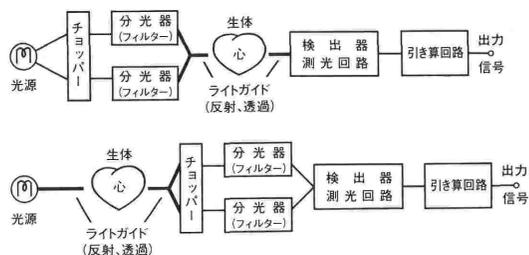
1951年 Briton Chance により考案された二波長分光光度計はその後幾多の改良を経て現在では生化学、農、工、医学など幅広い分野で応用されている。本邦でも1967年頃より用途に応じた種々の秀れた装置が商品化されている。ここでは生体組織酸素代謝を二波長分光技術を用いて“in situ”に測定する試み、二波長組織分光の原理と装置およびその応用を紹介する。著者らは多年に渡り灌流心臓を可視光領域の光を用い、一方脳および四肢筋肉組織では近赤外領域の光を用いた二波長分光測定を続けて来た。今回は灌流心臓を対象とした心筋細胞内酸素濃度の測定を主に述べる。

原理と装置

生体組織に含まれる光の吸収体に血液ヘモグロビン (Hb), 筋肉ミオグロビン (Mb), チトクローム酸化酵素 (Cyt.oxidase) などが知られている。これらは酸素濃度に対応して特徴的な吸収変化を示す。二波長分光はこの特異な性質を利用している。灌流心臓を対象とした二波長分光法は田村ら¹⁾により実用化されたもので詳細は著者らの文献を参照されたい¹⁻⁵⁾。本測定法の特徴は心筋細胞の Cytosol に含まれる Mb およびミトコンドリア (Mt) の電子伝達系の成分である Cyt.aa₃ を“光学的指示物質”として利用する事にある。すなわち Mb と Cyt.aa₃ の吸収変化を同時に測定する事で Cytosol と Mt の細胞内の異なった部位における酸素(代謝)動態を知る事となる。

図1に二波長生体分光測定器のブロックを示した。上段の場合、白色光をチョッパーにより交互に二個の分光器(又は吸収フィルター)に導き分

光された二種の単波長光を組織に照射し、その反射光又は透過光を検出器により測定する方式を示し、下段は測定光を直接、生体に照射し組織反射、透過光を分光器に通し、二つの波長における光量を検出し引き算回路により二波長吸収差を得るものである。二波長分光に用いる適当な波長の組合せは組織の吸収スペクトルの検討から始まる。灌流心臓の場合好気状態で灌流している心臓に測定光を照射し反射(透過)光をライトガイドで検出器(通常, photomultiplier)に導き各波長毎に光量に比例した出力を得る。しかしこの出力は各々の波長における心筋の吸収以外に散乱光、光源強度、検出器感度、ライトガイドの光減衰などの加わったもので各波長に対する出力をプロットしても灌流心臓の真のスペクトルと云えない。そこで検出器からの出力を各波長ごとに記憶させ、次に嫌気灌流に変えて波長スキャンを行い、各波長毎の出力を前に記憶させた値で割ってやる。この操作で各波長での散乱光などのアーチファクトを消去出来る。この様にすると灌流心臓の好気-嫌気に対応したスペクトルが得られる。図2に灌流ラット心臓で得た可視光領域のスペクトルを呈示した。この図では好気灌流時のスペクトルを base line (a) にとり嫌気灌流のスペクトルとの差、



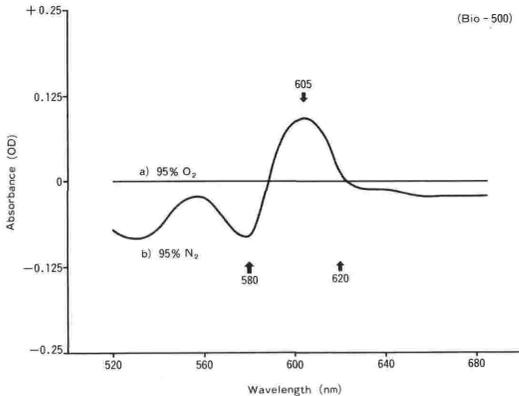
二波長分光光度計概要

図1 分光測定ブロック・ダイアグラム

*旭川医大第1外科

**北大応用電気研究所

Date : 60. 8. 23 Sample : perfused rat heart
 Remarks : Mb (oxy-deoxy Mb)
 Gate time : 50 msec Reference wavelength : 540 nm



Trace a) : the aerobic rat heart perfused with 95% O₂ +5% CO₂ KRB solution.
 The spectrum at 95% O₂ was recorded as flat baseline.
 Trace b) : the aerobic-anaerobic spectrum (difference spectrum) obtained with
 95% N₂ +5% CO₂ KRB solution.

図2 灌流心臓の吸収スペクトル

即ち差スペクトル (b) を書かせたものである。これは精製ラット Mb の好気-嫌気スペクトル (酸素化 Mb が 580 nm で強い吸収帯を有す。図略) に酷似しているが、605 nm に大きな吸収を認める点が異なっている。この吸収は Cyt.aa₃ の還元型吸収が重なったものである (Cyt.aa₃ が酸化→還元により 605 nm の所で大きな吸収変化を示す¹⁾)。さらに 620 nm の波長で好気-嫌気による等吸収点が存在する (Mb, Cyt.aa₃ の両者の等吸収点である)。

灌流心で得たこの特徴的な吸収スペクトルを利用して心臓での二波長分光測定が可能である。二波長分光法は混濁試料の光学測定に多用されるもので近接した二個の波長の光 (吸収変化の最大波長と測定中変化の少い波長、例えば Mb, Cyt.aa₃ などの等吸収点波長) の吸収差を記録する。この場合二つの波長が近い場合、近似的に散乱強度が等しいと考えられる。この原理を用いると組織に光を照射した場合の散乱によるアーチファクトを除去できる事になる。以上から灌流心の場合、Mb 測定に 580-620 nm, Cyt.aa₃ の測定に 605-620 nm の二波長組合せを用いている。

実際の測定に際しては好気状態で Mb, Cyt.aa₃ などの信号をバランスさせる必要がある。この操作はフォトマルの電圧、増幅器の利得を変えるか、減光器で光量を調節して行う。吸収変化量の標示方法として通常バランスさせたこの値を100%にとり測定光を切った場合を0%として full scale

を決定する。しかし異なった灌流心臓間での吸収変化を測定する場合散乱光の強度が灌流心とライトガイドの位置関係で変化するため絶対値で比較出来ない。著者らは個々の灌流心で好気-嫌気灌流による Mb, Cyt.aa₃ の吸収変化量を記録し、これを内部標準 full scale として利用し定量的比較を行なっている。さらに二波長分光器で測定した Mb の酸素化脱酸素化の割合 (酸素飽和度) から心筋細胞内酸素濃度を算出する事が出来る。これは細胞内酸素濃度に対する Mb の酸素解離曲線²⁻⁵⁾ (図略) を前もって作製しておき Mb 飽和度より濃度を求めている。この方法を用いると 10⁻⁶~10⁻⁸M の酸素濃度まで定量化が可能である。

多波長分光測定

上述の二波長測定を発展させたものが多波長分光測定と呼び一組の二波長測定を複数同時に行うものである。これより多数の指標の同時測定が可能である。これには1) 分光器を複数用いる、2) 円盤に多数の光学フィルターを取り付け高速で回転させ各々の光の吸収差を記録する方法、3) 多数の固体素子を用いて任意の波長の吸収差を求める、4) 波長スキャンを反復しながら行う方法が実用化されている。写真1はモーター型分光器により波長スキャンを繰り返す方式の多波長分光器を示し著者らが株式会社ユニソク (大阪) にて試作したものである。

灌流心での測定

ラット灌流心で反射法を用いてカテコラミンの細胞内酸素代謝に対する影響を調べた成績を図3, 4に示した。エピネフリンおよびドパミンの

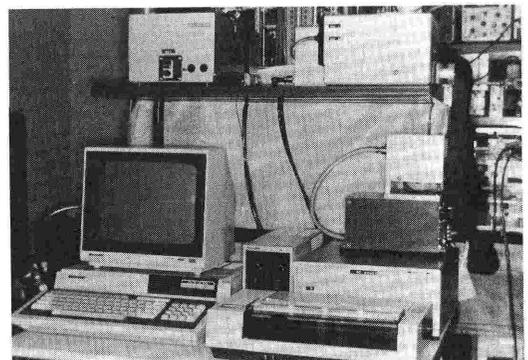


写真1

注入により左室圧を2倍に上昇させた場合の Mb, Cyt.aa₃ の吸収を追ったものである。左室圧, 心拍数の増加(仕事量の増大)により酸素消費が増し, Epi. の場合, Mb は~50%以上脱酸素化された。一方 DOA では Mb の脱酸素化は~20%以内にとどまり, Cyt.aa₃ の redox は僅かに還元側に变化するのみで心筋はほぼ好氣的に保たれた(細胞内酸素濃度 > 10 μM で好氣状態²⁾)。Epi. では組織低酸素が嫌氣代謝を亢進させて乳酸放出の増大をみたが DOA では変化していない。この差異は DOA では冠灌流量が増し酸素消費の増加に見合う酸素が供給され好氣的代謝が確保されやすいと理解できる⁶⁾。

この1例をみても従来, 推測の段階にとどまった細胞内酸素代謝の動きを高い感度と速い時間分解能をもって in situ に検出し得る事を示し二波長組織分光が極めて魅力あるアプローチと云えよう。

文 献

1) Tamura M, Oshino N, Chance B, Shilver IA: Optical measurements of intracellular oxygen concen-

tration of rat heart in vitro. Arch Bioch Biophys 191:8-22, 1978.

2) 田村 守, 荒木隆一郎: 心筋代謝と酸素分圧. 代謝 16: 2037-2048, 1979.
 3) 田村 守, 荒木隆一郎, 匂坂勝弘, 山崎勇夫: 心筋組織の酸素特性. 心臓 14: 270-277, 1982.
 4) 田村正秀, 田村 守, 竹内克彦, 久保良彦, 鮫島夏樹: 心筋細胞内酸素濃度からみた心筋保護法の評価. 呼と循 29: 743-747, 1981.
 5) 田村正秀, 高木 勇, 竹内克彦, 久保良彦, 鮫島夏樹, 田村 守: 心筋細胞内酸素濃度と心筋保護. 日胸外会誌 30: 1121-1134, 1982.
 6) 田村正秀, 橘 秀光, 竹内章二, 久保良彦, 鮫島夏樹, 田村 守: 分光計測法を用いた心筋酸素動態の検討. 呼と循 34: 1317-1323, 1986.

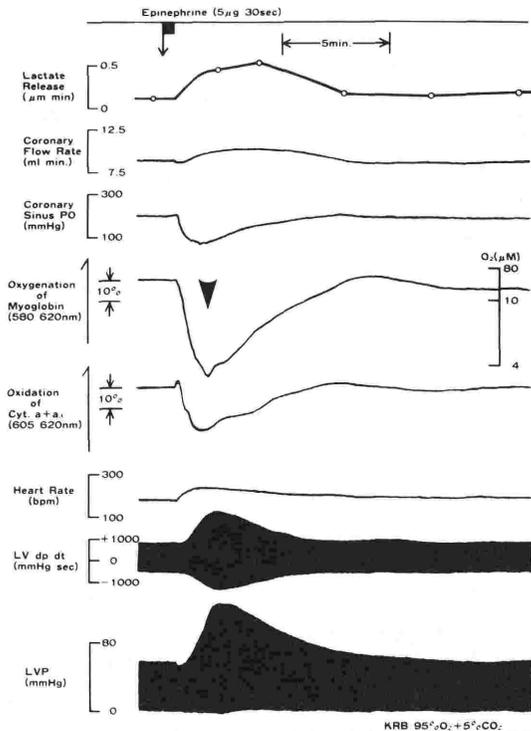


図3 エピネフリン投与時の灌流心酸素代謝(好氣状態)

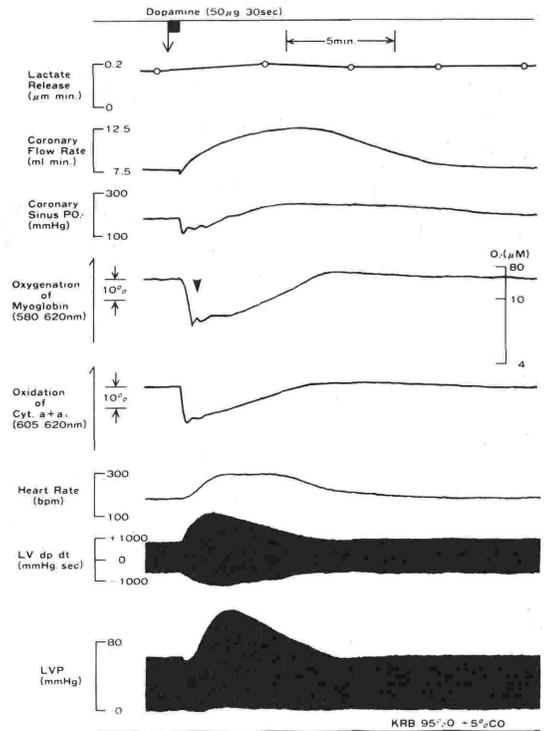


図4 灌流心に対するドパミンの効果(好氣状態灌流)