

燐核磁気共鳴法 ( $^{31}\text{P}$ -NMR)  
による心筋内高エネルギー  
燐酸動態の解析

A study on the Kinetics of  
High-energy Phosphates in  
Myocardium by Phosphorous  
Nuclear Magnetic Resonance

楠岡英雄 (大阪大学医学部第一内科)  
常岡 豊 ( 同 上 )  
井上通敏 ( 同 上 )  
阿部 裕 ( 同 上 )  
亘 弘 (岡崎国立共同研究機構生理学研究所)

キーワード

核磁気共鳴法 (Nuclear Magnetic Resonance), 心筋代謝 (Myocardial Metabolism), 高エネルギー燐酸 (High Energy Phosphate), 人工血液 (Perfluorochemicals), 冠灌流量 (Coronary flow)

要 旨

連続的かつ非破壊的な生体内燐化合物の測定法として有用な  $^{31}\text{P}$ -NMR により, 人工血液 FC 43 が心筋内高エネルギー燐酸動態に及ぼす影響について検討した. ラット摘出灌流心を Krebs-Henseleit 変法液と FC 43 にて交互に灌流し, 対照時, 虚血時, 再灌流時の心筋内クレアチン燐酸, ATP, 無機燐の量を  $^{31}\text{P}$ -NMR にて計測し, 同時に冠灌流量を測定した. いずれの時においても, 灌流停止により虚血状態にすると, クレアチン燐酸は急速に減少し同時に無機燐の増加と細胞内アドーシスが観測された. しかし, ATP 量は虚血時においてもほとんど変化を認めなかった. 灌流の再開と共にクレアチン燐酸, 無機燐ともに速やかに対照時のレベルに回復した. また, FC 43 群では冠灌流量は  $2.68\text{ml}/\text{分}/\text{g}$  心重量で Krebs-Henseleit 液群 ( $5.68\text{ml}/\text{分}/\text{g}$  心重量) の約  $1/2$  であったが, 対照時のクレアチン燐酸量, 虚血回復時のクレアチン燐酸回復率ともに両群間に差はなかった. すなわち, FC 43 は生理的な冠灌流量にて十分な酸素供給を行い, 心筋内エネルギー動態に影響しないことが示された.

## 1 はじめに

核磁気共鳴法 (NMR) は分析化学の一手法として広く用いられてきたが、近年、摘出灌流臓器の生理学的研究にも用いられている。とくに、 $^{31}\text{P}$ -NMR は、生体内エネルギー代謝の主役をなす高エネルギーリン酸化合物を非破壊的、連続的に観測できるため、各種の摘出灌流臓器におけるエネルギー動態の解析手法として注目されている<sup>1)</sup>。

一方、perfluorochemicals (FC) はその酸素結合能より人工血液として注目されている。摘出心臓を FC にて灌流した際の心機能への影響については最近 Segel ら<sup>2)</sup> により、長時間灌流においては通常の灌流液よりも FC が優れていることが示された。しかし、FC の心筋内高エネルギーリン酸動態への影響についてはまだ報告はない。

今回、我々は、人工血液 FC-43 (ミドリ十字社製) の心筋内高エネルギーリン酸動態に及ぼす影響について、 $^{31}\text{P}$ -NMR を用いた検討を行った。

## 2 方法

ラット摘出心臓標本は、体重 180~200 g の Wister 種雄性ラットにヘパリン 2000 単位を腹腔内注射し、20 分後、頸部殴打により失神させ、直ちに摘出した心臓を用いた。これに、大動脈よりカニューレを逆行性に挿入し、Langendorff 標本を作製した。

灌流液は、Krebs-Henseleit 変法液 (NaCl 127 mM, KCl 4.7 mM, CaCl<sub>2</sub> 2.5 mM, NaHCO<sub>3</sub> 25 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.2 mM, ブドウ糖 11.1 mM, ピルビン酸 Na 2.0 mM) と、ミドリ十字社製人工血液 FC-43 (NaCl 103 mM, KCl 4.6 mM, CaCl<sub>2</sub> 2.5 mM, NaHCO<sub>3</sub> 25 mM, MgCl<sub>2</sub> 2.1 mM, ブドウ糖 10.0 mM および perfluorocarbon FC-43 20.0 w/v%) を用いた。いずれも O<sub>2</sub> 95%, CO<sub>2</sub> 5% 混合ガスにて酸素化し、灌流圧は 100 cmH<sub>2</sub>O

を保った。

作製した灌流心臓標本は、灌流開始後 20 分以上経過して不整脈のない安定な状態になった後、外径 15 mm の NMR 試験管に挿入し、NMR スペクトル測定を行った (図 1)。この時、心臓標本より流出した灌流液をポンプにて吸引し、冠灌流量として測定した。

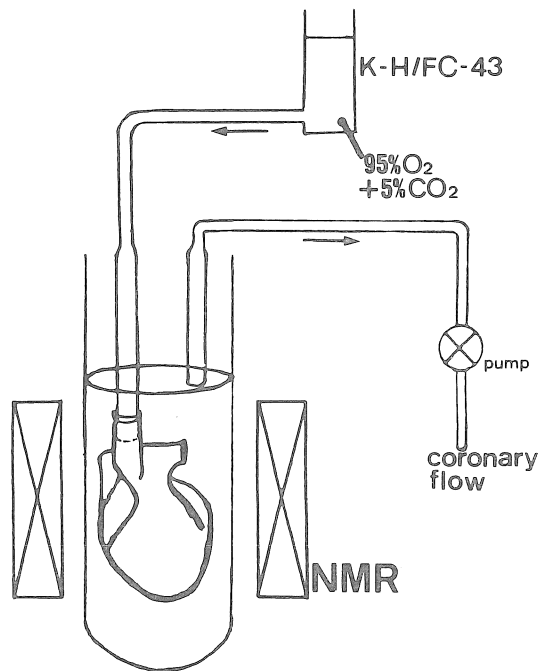


図 1 実験システムの模式図。

ラット摘出心臓 Langendorff 標本を試験管に入れ、灌流しながら NMR スペクトルを測定する。標本よりの排出液はポンプにて吸引し、冠灌流量として測定した。

NMR スペクトル測定には、Bruker 社製 WM 360 を使用した。このとき、 $^{31}\text{P}$  共鳴周波数は 145.808 MHz, パルス幅 4.5  $\mu$  秒, スペクトル幅 6024 Hz, FID 収集時間 0.085 秒, スペクトルサイズ 1024 であり、2048 回の FID を加算したものを 1 データとした。したがってデータの収集・格納に

要する時間を含めて、1 データあたりの収集時間は3分30秒であった。なお、<sup>1</sup>H デカップリングは行わなかった。

NMR による測定開始後、灌流心標本における冠灌流量ならびにクレアチン磷酸、ATP、無機磷の各量が10分間以上安定した状態であることを確認して、これを対照状態とした。その後、灌流停止による虚血状態を10分間作製し、ひき続いて再灌流により虚血よりの回復をはかり、両時相において連続的にNMR スペクトルと冠灌流量を観察した。以上の一連の操作を、Krebs-Henseleit 変法液とFC-43 で交互に灌流しながら行った。

ラット灌流心の<sup>31</sup>P-NMR スペクトルでは、主として無機磷、クレアチン磷酸、ATP の  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  磷およびADP の  $\alpha$ ,  $\beta$  磷のシグナルが認められる(図2)。このうち、ATP- $\alpha$  とADP- $\alpha$ 、およびATP- $\gamma$  とADP- $\beta$  は同じ位置に重畳して出現する<sup>1)</sup>。したがって、今回の検討における心筋内の無機磷、クレアチン磷酸、ATP の各量は、無機磷とクレアチン磷酸ではそのシグナルの高さを、ATP ではATP- $\beta$  のシグナルの高さを測定し、相対値で示した。また、心筋内エネルギー動態の指標として、次の2つの指標を用いた。すなわち、定常状態における酸素供給の指標として対照期におけるクレアチン磷酸(CP)量を採用し、虚血後の回復に対する灌流液の効果の指標としては、虚血回復直後より3分30秒間に収集したスペク

トルにおけるクレアチン磷酸量と虚血前のクレアチン磷酸量との比で求めたクレアチン磷酸回復率を採用した。

$$(\text{CP 回復率}) = (\text{再灌流後 3 分 30 秒までのスペクトルにおける CP 量}) / (\text{対照期の CP 量})$$

### 3 結 果

ラット摘出灌流心に虚血操作を加えると、<sup>31</sup>P-NMR スペクトルでは、クレアチン磷酸のシグナル消失と無機磷のシグナルの増強が認められた(図3)。さらに、無機磷のシグナルは虚血により高磁場側へ0.5ppm 移動したが、これは無機磷の化学シフトとpHの関係(図4)より、細胞内pHが対照時に7.1であったが、虚血時には6.8に低下したことを示唆する。しかし、いずれの変化も再灌流により消失し、対照時の状態に復している。虚血の前後を通じてATPのシグナルには著明な変化を認めなかった。すなわち、心筋では、虚血によりクレアチン磷酸が著明に減少し、同時に無機磷の増加と細胞内アシドーシスが発生するが、ATP量はほとんど変化しないこと、さらに、再灌流によりクレアチン磷酸、無機磷はともに対照時の量に回復し、かつ、細胞内pHも正常となることが明らかとなった。この虚血が心筋内高エネルギー磷酸動態に及ぼす影響について、Krebs-

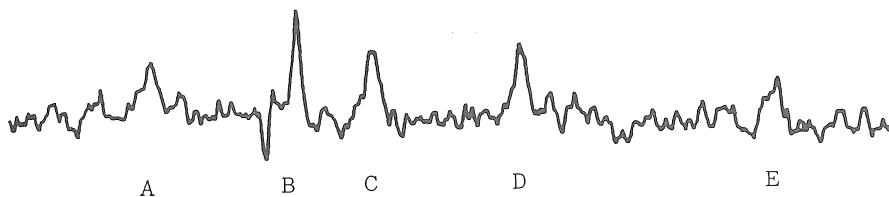


図2 ラット灌流心の<sup>31</sup>P-NMR スペクトル。対照時に計測したもの。シグナルA-Eは次の磷化合物による。A: 無機磷, B: クレアチン磷酸, C: ATP- $\gamma$ +ADP- $\beta$ , D: ATP- $\alpha$ +ADP- $\alpha$ , E: ATP- $\beta$

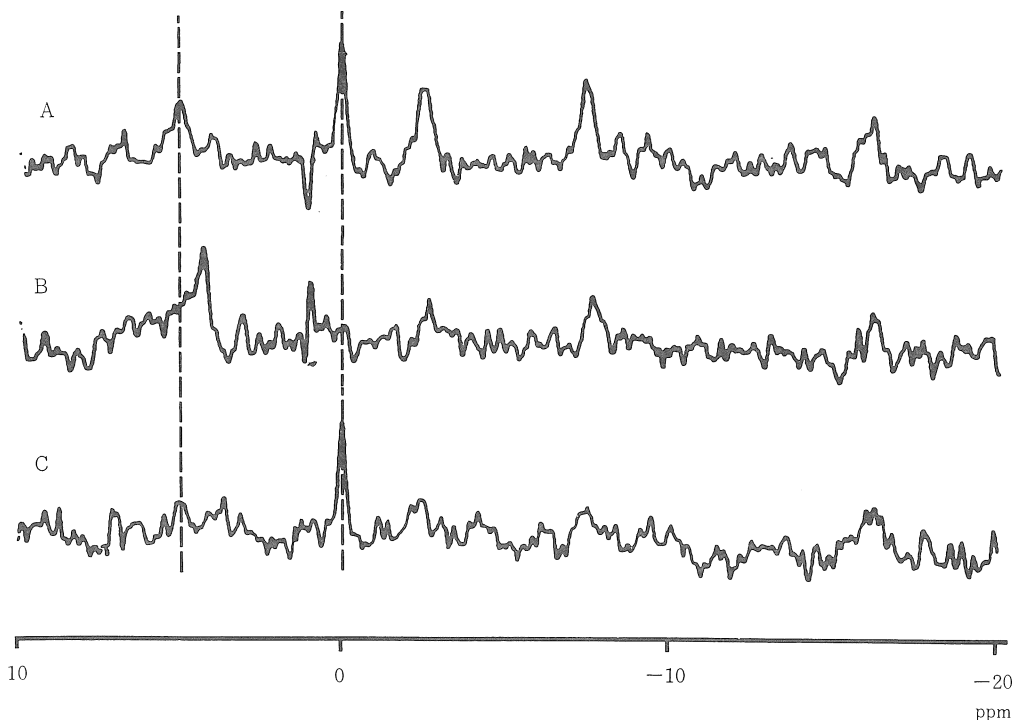


図 3 虚血によるラット灌流心の  $^{31}\text{P}$ -NMR スペクトルの変化。  
 上段 (A) は対照時, 中段 (B) は虚血時 (灌流停止後 10 分), 下段 (C) は虚血より回復後 (再灌流後 14 分) の  $^{31}\text{P}$ -NMR スペクトルである。虚血時には無機燐のシグナルがクレアチン燐酸側へ 0.5 ppm 移行している。いずれも Krebs-Henseleit 液にて灌流した。また、化学シフトはクレアチン燐酸を基準にしている。

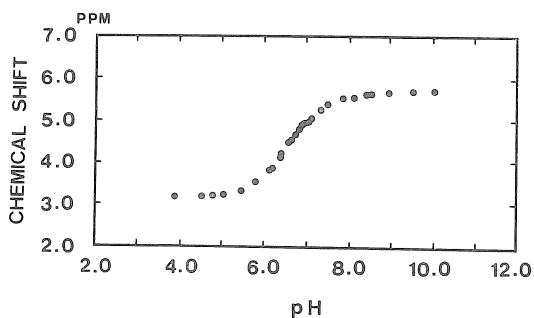


図 4 無機燐の化学シフトと pH の関係。  
 無機燐の化学シフトはクレアチン燐酸を基準にとっている。

Henseleit 液灌流心と FC-43 灌流心とで比較したが (図 5, 図 6), 両灌流液間に大きな差を認めなかった。すなわち, いずれの灌流液を用いても, 虚血状態の前後でクレアチン燐酸と無機燐が互いに逆方向に増減し, かつ, 細胞内 pH の変動を認めたが, ATP には著明な変化を認めなかった。また, 灌流再開直後には, いずれにおいても一過性の反応性充血によると考えられる冠灌流量の増加が観察された (図 6)。

5 回の実験における対照時の冠灌流量, 虚血回復後における最大冠灌流量増加率 ((虚血回復時の最大冠灌流量)/(対照時の冠灌流量)×100(%))に

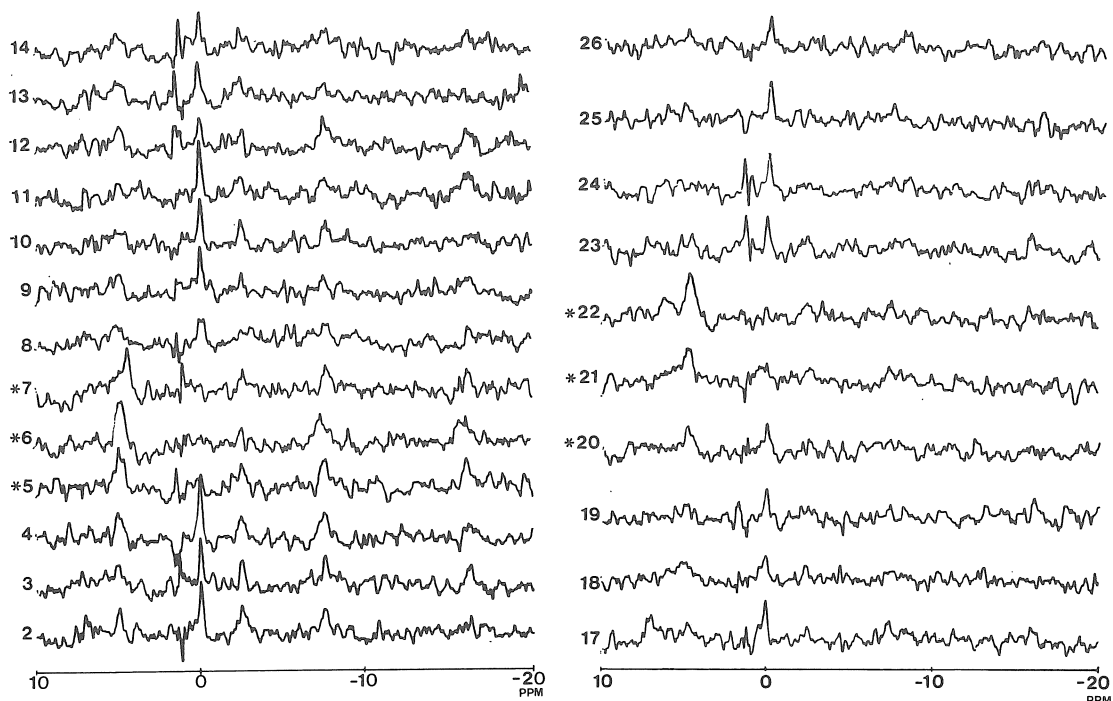


図5 ラット摘出灌流心に虚血操作を加えた際の<sup>31</sup>P-NMR スペクトルの経時変化。  
 No. 2~No. 14 は Krebs-Henseleit 変法液にて灌流し, No. 17~No. 26 では FC-43 を用いた。  
 また No. 5~7 および No. 20~22 では灌流停止により global ischemia を作製した。  
 (図中\*の部分)。1 データの収集には3分30秒を要している。

表1 灌流液の冠灌流量, 最大冠灌流量増加率に及ぼす影響。

	Krebs-Henseleit 群	FC-43 群
冠灌流量 (ml/分/g 心重量)	5.68±1.44	2.68±0.28
最大冠灌流量 増加率 (%)	188±19	226±55

(平均±標準偏差)

ついて表1に, 対照時心筋内クレアチン磷酸量, 再灌流時のクレアチン磷酸回復率について図7にまとめた。FC-43群では冠灌流量は2.68±0.28ml/分/g心重量(平均±標準偏差)であり, Krebs-Henseleit 変法液群の場合の5.68±1.44 ml/分/g心重量に比べて約1/2を示したが, 再灌流時の最

大冠灌流量増加率は Krebs-Henseleit 変法液群の188±19% に対し FC-43 群で226±55% と両群で有意差は認められなかった。また, 対照時のクレアチン磷酸量および再灌流直後のクレアチン磷酸の回復率も両群に有意差を認めなかった(図7)。

#### 4 考案

心筋におけるエネルギー代謝に関しては従来の生化学的手法に基づいて多くの解析が行われている。しかし, それらの手法は, 摘出した心臓を灌流により生理的条件に近い状況に保ちつつ連続的にエネルギー動態を解析するには不適切であった。

生体内のエネルギー供給は, 高エネルギー磷酸

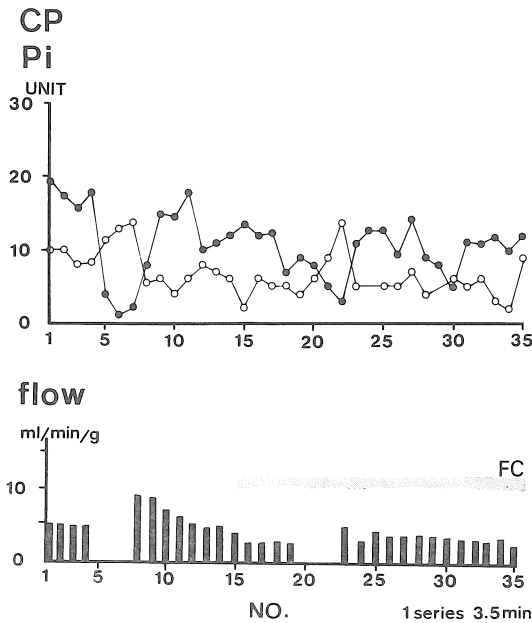


図 6 ラット摘出灌流心における心筋内クレアチン磷酸、無機磷の変化と冠灌流量。

図5のスペクトルより計測した。上段はクレアチン磷酸量 (CP, ●) と無機磷量 (Pi, ○) の変化を相対値で示す。下段は心筋重量 1g 当りの冠灌流量を示す。No. 1~14 は Krebs-Henseleit 液にて灌流, No. 15 以降は FC-43 による。

の形で行われることから、 $^{31}\text{P}$  核磁気共鳴法 ( $^{31}\text{P}$ -NMR) による細胞内磷化合物の動態の解析が、1974 年 Hault ら<sup>3)</sup> の骨格筋における実験以来、非破壊的かつ連続的なエネルギー代謝の解析手法として注目されてきた。 $^{31}\text{P}$ -NMR を用いた心筋内高エネルギー磷酸動態の解析、および虚血の影響の検討は、1976 年 Gadian ら<sup>4)</sup> による非灌流心の実験に始まり、1979 年 Jacob ら<sup>5)</sup> の報告以来 Langendorff 式灌流心における連続的な心筋内磷化合物動態の観察が行われてきた<sup>1,6,7,8,9,10)</sup>。いずれの報告においても、灌流停止により虚血状態 (global ischemia) にすると、まず心筋内クレアチン磷酸の減少と無機磷の増加、および細胞内 pH

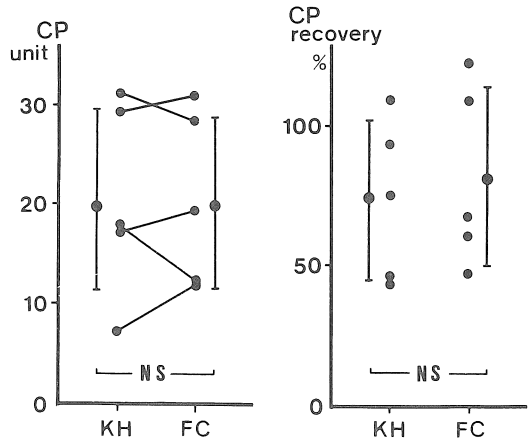


図 7 対照時のクレアチン磷酸量 (左), 虚血後のクレアチン磷酸回復率 (右) に灌流液の及ぼす影響。KH: Krebs-Henseleit 群, FC: FC-43 群。

の低下を示唆する無機磷のピークの高磁場側への移動が認められ、さらに長時間の虚血により ATP の減少が観測されている。今回の我々の結果においても、10 分間の灌流停止中にクレアチン磷酸は著明に減少し、それに伴い無機磷の増加と細胞内アシドーシスが認められたが、ATP 量はほぼ不変であった。また、灌流の再開によりクレアチン磷酸は速やかに虚血前のレベルに回復し、無機磷は減少し、細胞内 pH も回復した。これらの NMR により得られた結果は従来の生化学的手法による Hearse ら<sup>11)</sup> のラット摘出灌流心における虚血実験の結果ときわめてよく一致している。

Langendorff 式心標本の灌流には一般に Krebs-Ringer 液や Krebs-Henseleit 液などの電解質液を使用するが、血液を用いて灌流した実験<sup>12)</sup> と比較すると、より多くの冠灌流量を必要とし、これは酸素運搬能の差に起因すると考えられる。また浮腫の発生も高率で、これらの点から、通常の灌流液による灌流は生理的条件下における心臓のモデルとしては必ずしも理想的とはいえない。最近 Segel ら<sup>2)</sup> は人工血液 FC-43 を使用したラット



- 5) W. E. Jacobs, G. I. Taylor, IV, D. P. Hollis, et al.: Phosphorus nuclear magnetic resonance of perfused working rat hearts. *Nature* 265; 756-758, 1977.
- 6) P. B. Garlick, G. K. Radda, P. J. Seeley, et al.: Phosphorus NMR studies on perfused heart. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 74; 1256-1262, 1977.
- 7) D. P. Hollis, R. L. Nunnally, W. E. Jacobus, et al.: Detection of regional ischemia in perfused beating hearts by phosphorus nuclear magnetic resonance. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 75; 1086-1091, 1977.
- 8) D. P. Hollis, R. L. Nunnally, G. J. Taylor, IV et al.: Phosphorus nuclear magnetic resonance studies of heart physiology. *J. Magn. Reson.* 29; 319-330, 1978.
- 9) P. B. Garlick, G. K. Radda and J. Seeley: Studies of acidosis in the ischemic heart by phosphorus nuclear magnetic resonance. *Biochem. J.* 184; 547-554, 1979.
- 10) J. S. Ingwall: Phosphorus nuclear magnetic resonance spectroscopy of cardiac and skeletal muscle. *Am. J. Physiol.* 242; H729-H744, 1982.
- 11) D. J. Hearse, P. B. Garlick and S. T. Humphrey: Ischemic contracture of the myocardium: Mechanisms and prevention. *Am. J. Cardiol.* 39; 986-993, 1977.
- 12) S. R. Bergmann, R. E. Clark and B. E. Sobel: An improved isolated heart preparation for external assessment of myocardial metabolism. *Am. J. Physiol.* 236; H 644-H 651, 1979.
- 13) A. B. Malik, J. E. Kaplan and T. M. Saba: Reference sample method for cardiac output and regional blood flow determinations in the rat. *J. Appl. Physiol.* 40; 472-475, 1976.
- 14) S. Ishise, B. L. Pergram, J. Yamamoto, et al.: Reference sample microsphere method: Cardiac output and blood flows in conscious rat. *Am. J. Physiol.* 239; H 443-H 449, 1980.
- 15) W. J. Gamble, P. A. Conn, A. Edalgi, et al.: Myocardial oxygen consumption of blood-perfused, isolated, supported rat heart. *Am. J. Physiol.* 219; 606-612, 1970.
- 16) Green Cross Corp.: FC-43 Emulsion: Potential uses of perfluorochemical artificial blood for experimental studies in physiology, biology, biochemistry, chemotherapy, toxicology, metabolism, etc. Osaka, Japan, Green Cross, 1976. (Tech. Info. Ser. 3).

