

# Furosemide 持続注入時の 家兎腎組織高エネルギー燐 酸代謝動態の局所核磁気共 鳴法による検討の試み

A Trial of Topical Magnetic  
Resonance Study on Metabolism  
of High Energy Phosphate of  
Rabbit Kidney during Furose-  
mide Infusion

折田義正 (大阪大学医学部第一内科)  
柳瀬昌弘 ( 同 上 )  
中西 健 ( 同 上 )  
堀尾 勝 ( 同 上 )  
岡田倫之 ( 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 .....

furosemide,  $^{31}\text{P}$ -NMR, 局所核磁気共鳴法 (topical magnetic resonance, TMR), 腎組織高エネルギー燐酸動態, ATP, 細胞内 pH, mitochondria 電子伝達系

..... 要 旨 .....

我々は既に、① loop 利尿薬 furosemide が単離 mitochondria 電子伝達系を阻害すること、② 持続注入時に、freeze clamp・高速液体クロマトグラフィーによる adenine nucleotides 含量測定で、腎 total adenine nucleotides 含量および ATP 含量減少が認められることを報告した。

本研究では、furosemide 注入時に同一個体で経時的に腎組織内高エネルギー燐酸動態を観察するため、 $^{31}\text{P}$  を用いた局所核磁気共鳴法を適用した。本法においても、腎組織 ATP 含量の減少、糖燐酸含量の減少、細胞内 pH の低下を示唆するスペクトルを得た。しかしながら、TMR 法では S/N 比が大であり、そのシグナルは関心領域内の総量の反映であるため、腎血流変化によってもシグナルが変化する可能性があげられる。今後の改良が待たれるところである。

既に我々は loop 利尿薬 furosemide が単離 mitochondria 電子伝達系を阻害することを報告してきた<sup>1),2)</sup>。さらに, freeze clamp 高速液体クロマトグラフィー (以下 HPLC) を用い, 10mg/kg/hr, 20mg/kg/hr の furosemide を持続静注した rat で, 腎 ATP 含量, total adenine nucleotides 含量は, 対照 rat 腎のそれらに比し減少, AMP 含量は増加すること, furosemide 持続静注は, 肝 adenine nucleotides 含量には影響しないことを報告した<sup>3)</sup>。

しかし, この測定法には同一個体の経時的変化を検討できない等の欠点がある。<sup>31</sup>P-NMR は連続的, 非破壊的な生体内燐代謝化合物の測定法として有用であり, 特に磁場焦点法による局所核磁気共鳴法 (Topical Magnetic Resonance 以下 TMR) の開発は, 摘出臓器でなく, *in vivo* 局所 <sup>31</sup>P-NMR スペクトル測定を可能とした。我々は TMR を用い, furosemide 持続注入が家兎腎組織高エネルギー燐酸動態に及ぼす影響を連続的,

非侵襲的に検討した。

〔方法〕 体重 1-2kg の雄家兎を, 初期量 30 mg/kg, 持続量 15 mg/kg/hr の pentobarbital を耳静脈カテーテル挿入により麻酔し, 対側耳静脈を furosemide の輸液路とした。背部を切開し, 背筋と腹筋の間より腎動脈を圧迫狭窄しない様留意し, 左腎を体外に露出した。また膀胱にカテーテルを挿入, 留置し採尿した。家兎をアクリル製固定台に surface coil 直上に露出した左腎が位置する様固定し, NMR スペクトル測定を行った。

NMR スペクトル測定は Oxford 社製 TMR-32 を使用した。パルス幅 10 μ 秒, スペクトル幅 4000 Hz, FID 収集時間 0.512 秒で, 400 回の FID を加算したものを 1 データとした。

NMR 測定開始後, 腎組織の糖燐酸, ATP の含量が 30 分以上安定した状態であることを確認し, これを対照期とした。その後, furosemide を 40 mg/kg/hr で持続注入し, 連続的に NMR ス

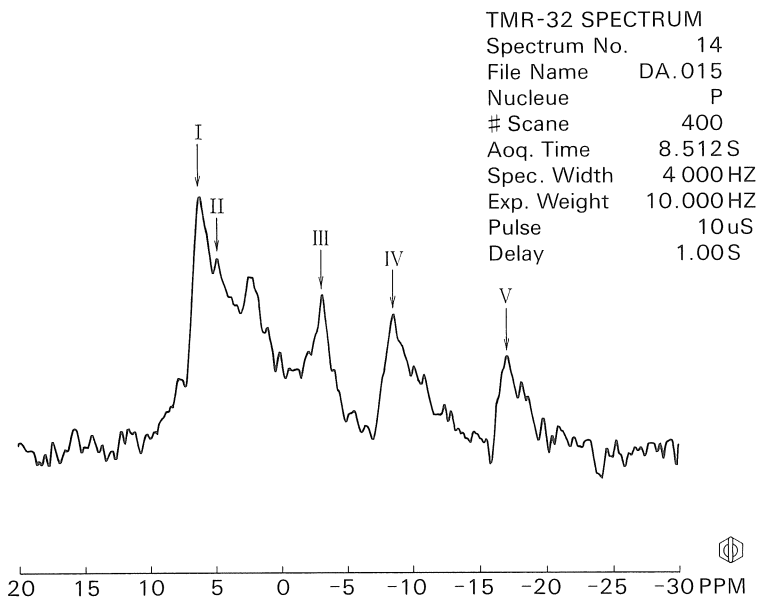


図 1 <sup>31</sup>P-NMR spectrum  
 I: sugar phosphate, II: inorganic phosphate, III:  $\gamma$ -ATP+ $\beta$ -ADP,  
 IV:  $\alpha$ -ATP+ $\alpha$ -ADP, V:  $\beta$ -ATP



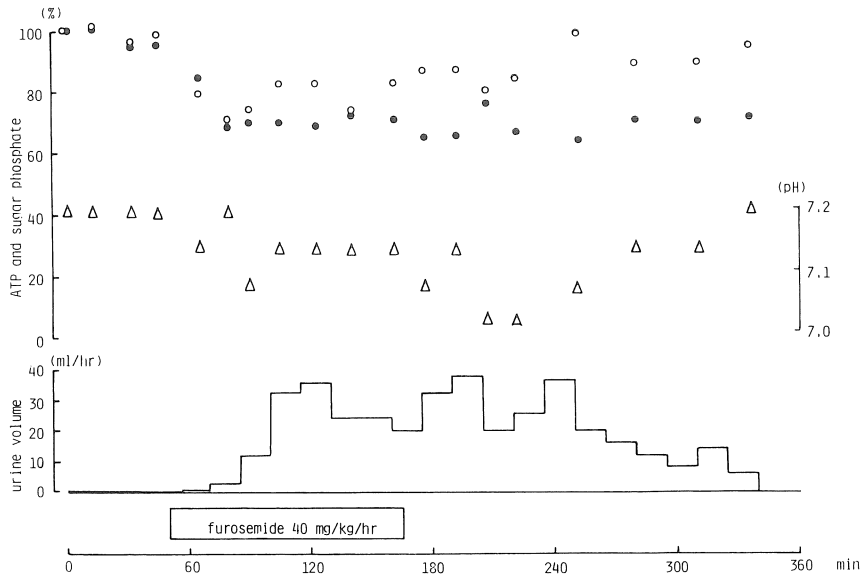


図 3 Renal content of ATP and sugar phosphate, intracellular pH and urine volume through furosemide infusion. Open circles represent ATP content in the kidney. Closed circles represent sugar phosphate in the kidney. Open triangles represent intracellular pH of the kidney estimated by the formula of Radda. ATP content was maximally reduced to 80-75% of control level at 60 minutes after furosemide infusion. Sugar phosphate was also maximally reduced to 70-65% of control level at the same condition. A maximal fall of pH was 1.2 at the same condition.

[考察] furosemide 持続注入により家兎腎組織 ATP 含量が低下した成績は、HPLC を用いた rat での成績と一致する。さらに我々は furosemide が mitochondria 電子伝達系を cytochrome b と cytochrome c+c<sub>1</sub> の間で阻害すると報告していることから、furosemide 注入により腎 mitochondria 電子伝達系が阻害され、ATP 産生が低下したことが腎 ATP 含量低下の原因である事が示唆される。細胞内 pH の低下もこの現象と何らかの関係があると推定されるが原因は不明である。しかし同時に認めた糖磷酸含量の低下は mitochondria 電子伝達系阻害作用のみでは説明は困難である。現在迄報告はないが解糖系酵素活性に furosemide が作用する可能性も否定できない。

又 mitochondria 電子伝達系阻害により嫌氣的解糖が主として行われることの反映であることも考えられる。

furosemide 注入中止後、ATP、糖磷酸、細胞内 pH の回復したスペクトルは、実験途中で兎が死亡し得られていない。また、さらに2羽の同様の実験では、本例程大きなスペクトル変化は得られなかった。その原因について考察すると、まず HPLC による adenine nucleotides 含量の測定は非常に S/N 比がよいが、TMR-32 では約 8 分間要する 400 回積算のスペクトルでもその S/N 比は図 1 のごとく未だ必ずしも良好でない点が挙げられる。また、そのシグナルは関心領域内の総量の反映であるため、腎血流が変化し、腎の容積が

変化することでもシグナルが変化することも考えられる。今回の furosemide の注入量は rat における量の 2 倍であるが、麻酔が持続的に施行されており条件が異なるためか、ATP の変化は最大約 25% であった。これは  $^{31}\text{P}$ -NMR スペクトルでとらえうる最小量の変化と考えられ、一定した成績の得られなかった原因の一つと考えられる。また、rat と家兎との種差も考えられ、今後の装置の改良が望まれる。

さらに、HPLC による成績も  $^{31}\text{P}$ -NMR による成績も組織 ATP 含量の情報であり、直接組織 ATP 産生の情報を示したものでない点にも注意を要する。furosemide 注入により mitochondria 電子伝達系が阻害され ATP 産生が低下しても、それのみあって ATP 消費が低下すれば ATP 含量は不変である。組織エネルギー代謝の検討には、ATP 含量のみならず、ATP turnover の情報も必要と考えられる。

## 文 献

- 1) 福原吉典, 柳瀬昌弘, 安東明夫, 折田義正, 阿部裕: 各種利尿剤の腎ミトコンドリアに対する作用 医学のあゆみ 106: 861-864, 1978.
- 2) Orita, Y., Fukuhara, Y., Yanase, M., Okada, N. & Abe, H.: Effect of furosemide on mitochondrial electron transport system and oxidative phosphorylation. *Arzneim.-Forsch., Drug Res.* 33: 1446-1450, 1983
- 3) 福原吉典: furosemide の mitochondria 呼吸・電子伝達系および組織 adenine nucleotides 含量への影響 日本腎臓学会誌 23: 1281-1289, 1981.
- 4) Balaban, R. S., Gadian, D. G. & Radda, G. K.: Phosphorus nuclear magnetic resonance study of rat kidney in vivo. *Kidney Int.* 20: 575-579, 1981.
- 5) Radda, G. K., Ackerman, J. J. H., Sehr, B. P. & Wong, G. G.:  $^{31}\text{P}$  NMR studies on kidney intracellular pH in acute renal acidosis. *Brit. J. Biochem.* 12: 277-281, 1980.