

# 原著

## Furosemide 持続注入時の 家兎腎組織高エネルギー磷酸 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 Furosemide 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磷酸動態, 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磷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、糖磷酸含量の減少、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、そのシグナルは腎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、10 mg/kg/hr, 20 mg/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、非破壊的な生体内磷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磷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、腎組織の糖磷酸、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

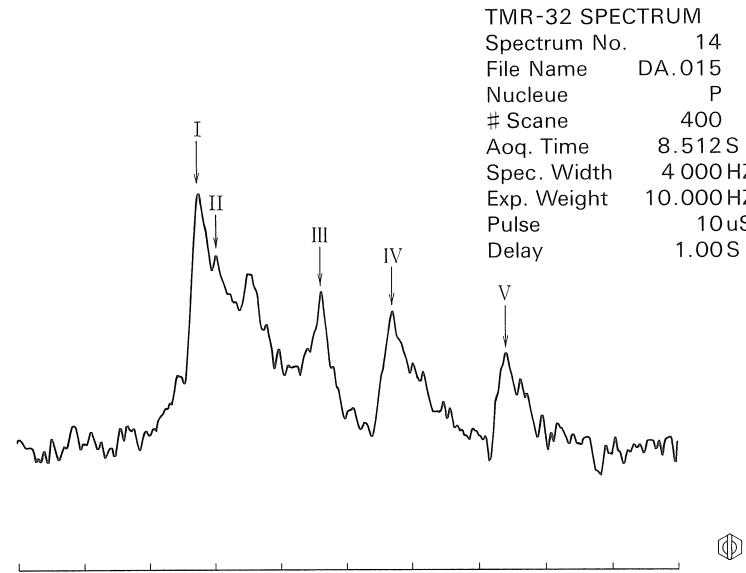


図 1 <sup>31</sup>P-NMR spectrum

I: sugar phosphate, II: inorganic phosphate, III:  $\gamma$ -ATP +  $\beta$ -ADP,  
IV:  $\alpha$ -ATP +  $\alpha$ -ADP, V:  $\beta$ -ATP

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

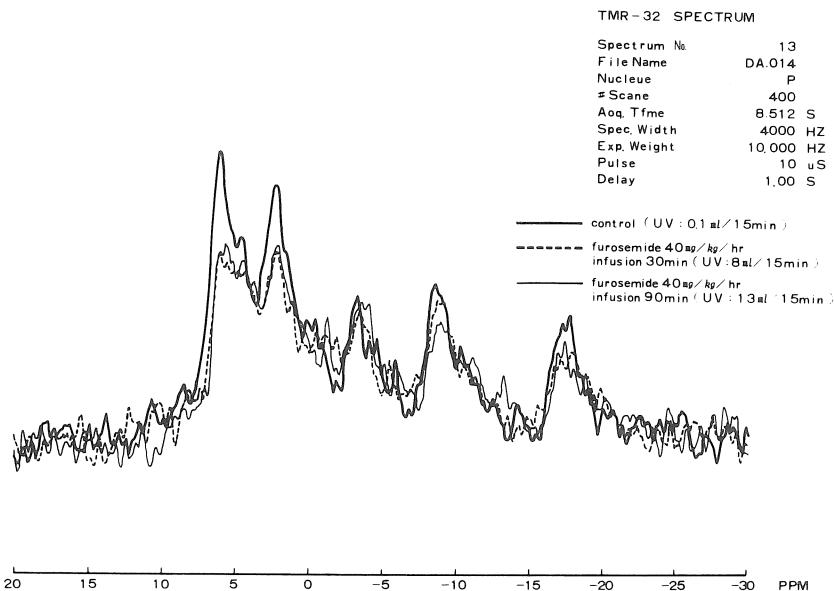


図 2  $^{31}\text{P}$ -NMR spectra of rabbit kidney before and after furosemide infusion.

ペクトル測定を行った。

糖磷酸の測定はそのシグナル高で、ATPの測定はATP- $\beta$ 磷酸のシグナル高で行い、各量をその相対値で示した。さらに無機磷のchemical shiftにより細胞内pHを求めた。但し、腎にはクレアチニン磷酸がほとんどなく<sup>4)</sup>、正確な細胞内pHが求められないため、Raddaらの報告<sup>5)</sup>に基づき、対照期の細胞内pHを7.2として細胞内pHを求めた。

〔成績〕 家兎腎の $^{31}\text{P}$ -NMRスペクトルの一例を図1に示す。主として、糖磷酸、無機磷、ATPの $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ 磷酸およびADPの $\alpha$ 、 $\beta$ 磷酸のシグナルおよびunknown peakが観察される。クレアチニン磷酸はほとんど認められず、このことより選択的に腎のみからの情報を得ていると判定される。

図2に対照期およびfurosemide注入30分、90分後の $^{31}\text{P}$ -NMRスペクトルの比較を示す。furosemide注入により糖磷酸のシグナルとATP、

特にATP- $\beta$ 磷酸のシグナルが低くなっている。無機磷のシグナルも低くなっているが、前二者程著明でない。furosemide注入により無機磷のシグナルが約0.2ppm高磁場側に移動した。

図3は、furosemide注入前後の腎ATP、糖磷酸、細胞内pH、尿量の成績である。furosemide注入後約10分でATPは対照期に比し約20%低下、furosemide注入中止後約60分迄約20-25%低下した状態を持続した。その後徐々にATP含量が増加して来ているが、完全に対照期迄は回復していない。糖磷酸もfurosemide注入により30-35%低下し、その持続はATPの低下より長かった。細胞内pHはfurosemide注入により0.6-1.2unit低下、furosemide注入中止後約60分間低下を持続したが、その後やや回復する傾向を認めた。尿量は、furosemide注入後10分で既に増加、約20分で30mL/hr以上に著増した。furosemide注入中止後約60分迄尿量は増加したままであったが、その後徐々に減少する傾向を認めた。

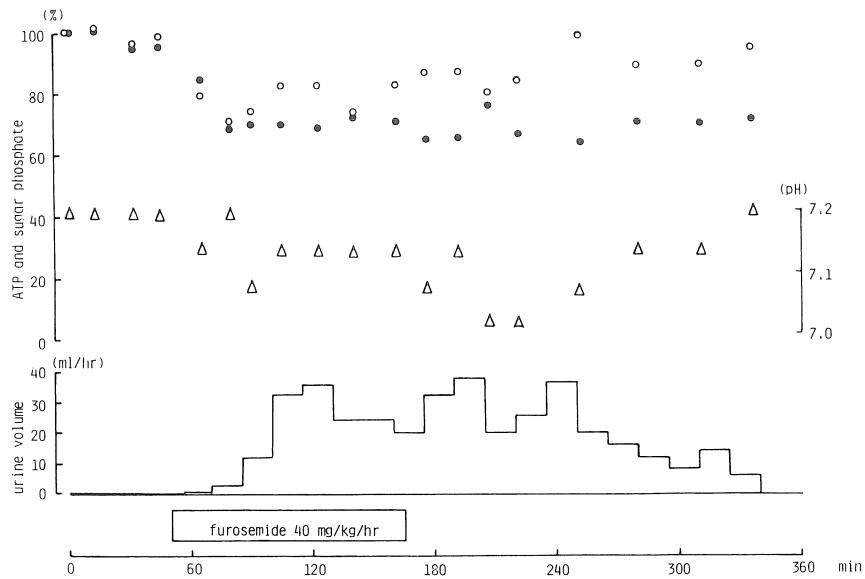


図 3 Renal content of ATP and sugar phosphate, intracellular pH and urine volume through furosemide infusion. Open circles represent ATP content in the kidney. Closed circles represent sugar phosphate in the kidney. Open triangles represent intracellular pH of the kidney estimated by the formula of Radda. 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気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つ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 產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 产生が低下しても、それにみあって 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.