



はじめに

心筋細胞中には ATP をはじめとして比較的多量のリン酸化合物が含まれる。このうちの ATP やクレアチンリン酸 (CP) は心筋の収縮能を保つためのエネルギー源としてもっとも重要なことから、細胞生理学や生化学的な面から詳しく検討されてきた。また、心筋細胞内 pH は心筋虚血のさい生ずる乳酸により変化し、その低下は最終的に細胞障害を引き起こすと考えられ、病態生理学的な観点から研究が行われてきた。従来からこれらの研究の手段として、ランゲンドルフ法など、単離した心臓を灌流しながら一定の時点で液体窒素で瞬間凍結した後、生化学的な手段で測定する方法が取られて来た。また、細胞内の pH を知るためには、心筋虚血状態を simulate した条件で灌流しながら微小電極を穿刺し、測定していた。これらの方法の最大の欠点として、① 同じ検体を繰り返して使うことができない。従ってサンプル間のばらつきがあり、多数の検体の測定を行い、統計処理する必要があること。② 灌流心が、真に動物体内 *in situ* の心と同じ代謝を行っている保障がないこと、そして当然のことながら、③ ヒトでは、心筋細胞内の高エネルギーリン酸化合物の代謝や細胞内 pH の変化をとらえることがほとんど絶望的であったことなどがあげられる。①、②、③ の問題を一挙に解決する手段が NMR 法である。1977 年頃より灌流心を用いた  $^{31}\text{P}$ -NMR が生体系に応用されたが<sup>1-4)</sup>、これを更に一歩進め完全に非侵襲的に体内のリン酸化合物を研究する方法がオックスフォード大の生化学グループにより提案された。ラットで、脳や肝のリン信号を得ることに成功した<sup>5)</sup>。これは体表面に検出用コイルを置くので、表面コイル法 (surface coil method) と一般にはよばれている。この方法は NMR 信号 ( $^{31}\text{P}$ ) の検出範囲が表面コイルの近傍に限定されるという性質を用いて、一種の

聴診器のように体表近くの器官由来の信号を特定する。この表面コイル法に NMR イメージングでも用いられている焦点磁場法を組み合わせ、空間分解能を向上させたのが TMR 法 (Topical Magnetic Resonance) である<sup>6)</sup>。従って TMR 法は体内臓器の代謝異常をモニターし病態診断を非侵襲的に行うことの出来る装置といえる。

本研究では TMR 法を自発性心筋症 (Spontaneous cardiomyopathy) を有する Syrian hamster (BIO 14.6 系) の病態診断に応用した。この動物系は、ヒトの特発性心筋症とよく似た病像を呈すること<sup>7)</sup>、そしてその発症時期もすべて詳細に観察されている<sup>8)</sup> ことなどから、病変の進行や薬の作用の検討などに広く用いられてきた。心筋症ハムスターとその littermate の、性と周齢を合わせた系を用いて、幼若期 (生後 72 日目) から、うっ血型心筋症を呈する生後 155 日目まで、 $^1\text{H}$ - と  $^{31}\text{P}$ -TMR を同時に測定してその経時変化を追った。更に最終的に動物を犠牲にして心を取り出し、TMR 測定が正確に行われたか否か生化学的に検討した。

## 方法

TMR スペクトルは全てオックスフォードリサーチシステム社製 TMR-32/200<sup>®</sup> 装置を用い記録された。この TMR は磁場強度 1.89 テスラ、20 cm の口径を持つ超伝導磁石を使用しており、 $^{31}\text{P}$  核は 32 MHz、 $^1\text{H}$  核は 80 MHz の共鳴周波数である。ハムスターの心からの信号を正確に得るために、直径 1.5 mm の銀メッキ銅線を外径 16 mm、内径 9 mm に蚊取線香状に手製した。

予備実験として、この表面コイルの空間感度を次の様にして測定した。アクリル樹脂製のブロックに縦 6 列、横 7 列、直径 2 mm の穴を 4 mm 間隔で 42 開け、表面コイル上に固定する。その穴に 5 M 正リン酸 70  $\mu\text{l}$  を含む直径 1.8 mm 長さ 2 cm のガラス管を入れ、その  $^{31}\text{P}$ -NMR 信号の強度を測る。42 個の穴に順次上記標本を入れて

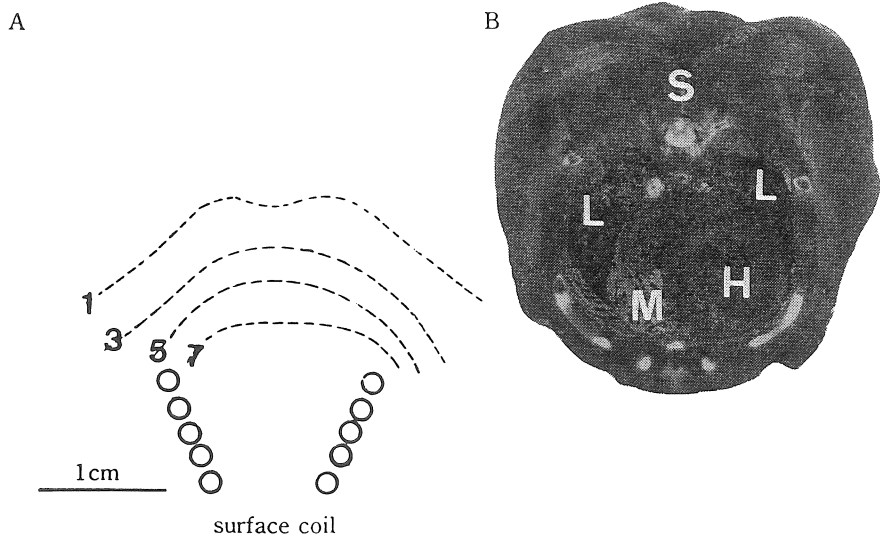


図 1 Surface coil 近傍の空間分解能と受信感度 (A), 実験に供した Syrian hamster 胸部の横断面 (B)  
S, L, M, H はそれぞれ脊椎, 肺, 縦隔, 心を示す.

$^{31}\text{P}$ -TMR を測定し, 信号強度の等高線を描き, その空間分解能と, 測定可能な深さを求めた (図 1A).

一方, 上記ハムスターの 1 匹を犠牲にして, 液体窒素中で固定した後, 前胸部の横断面を得て心の位置を確認した (図 1B). TMR 測定の入射パルス幅を変えて ( $3\mu\text{s}\sim 15\mu\text{s}$ ), 左室, 心室中隔および右室を含むように測定深度を合わせた. 図 1A に最適測定深度を持つと考えられるパルス幅  $13\mu\text{s}$  の場合の感度の等高線図を示した. これらの予備測定の後, 実際のハムスターをペントバルビタール  $35\text{mg}/\text{kg}$  腹腔内投与して麻酔した後, その心尖拍動部を先のコイルの中央と合わせ固定し, 動物全体を TMR 装置内に置いた.

TMR の信号強度は心拍と温度により変わるため,  $^1\text{H}$ -については毎秒 1 回, 40 回分を, そして  $^{31}\text{P}$ -については 2 秒に 1 回, 計 300 回分を積算平均した. また, 155 日目の実験の後, 心を取り出し, 左室自由壁内の水分含量を  $60^\circ\text{C}$  の乾燥器内に入れ, 重量が変わらなくなるまで乾かして, 前

後の差から求めた. また, 心の部分をホモゲナイズした後, クロロフォルム-メタノール (2: 1) 液で脂質を抽出し定量した. 又, ATP や CP 量も定量しようと試みたが, 動物を屠殺後, 左室筋を液体窒素中で固定すると, 固定までの時間がかかりすぎたため (20 秒以上), 無機リンの量が多く, ATP や CP の量が非常に少なくなり, 実験データには供さなかった. その代わりに, CP から ATP 生産にかかわるクレアチンリン酸キナーゼ (CPK) 活性を Oliver 法<sup>9)</sup> で測定した. この酵素活性は上記基質に比べはるかに安定である.

### 結果

心臓近傍由来の TMR スペクトルの特徴を調べるため, 体の他の部分の TMR スペクトルと比較した (図 2). 前胸部 (apical area), 上腹部 (epigastrium), 大腿 (thigh) に共通なのは,  $^1\text{H}$ -TMR では 0 ppm に巨大な水のピークと  $-3.5\text{ ppm}$  に小さな山が認められたこと,  $^{31}\text{P}$ -TMR では 0 ppm に CP の大きな山と,  $-2$  から  $-17\text{ ppm}$

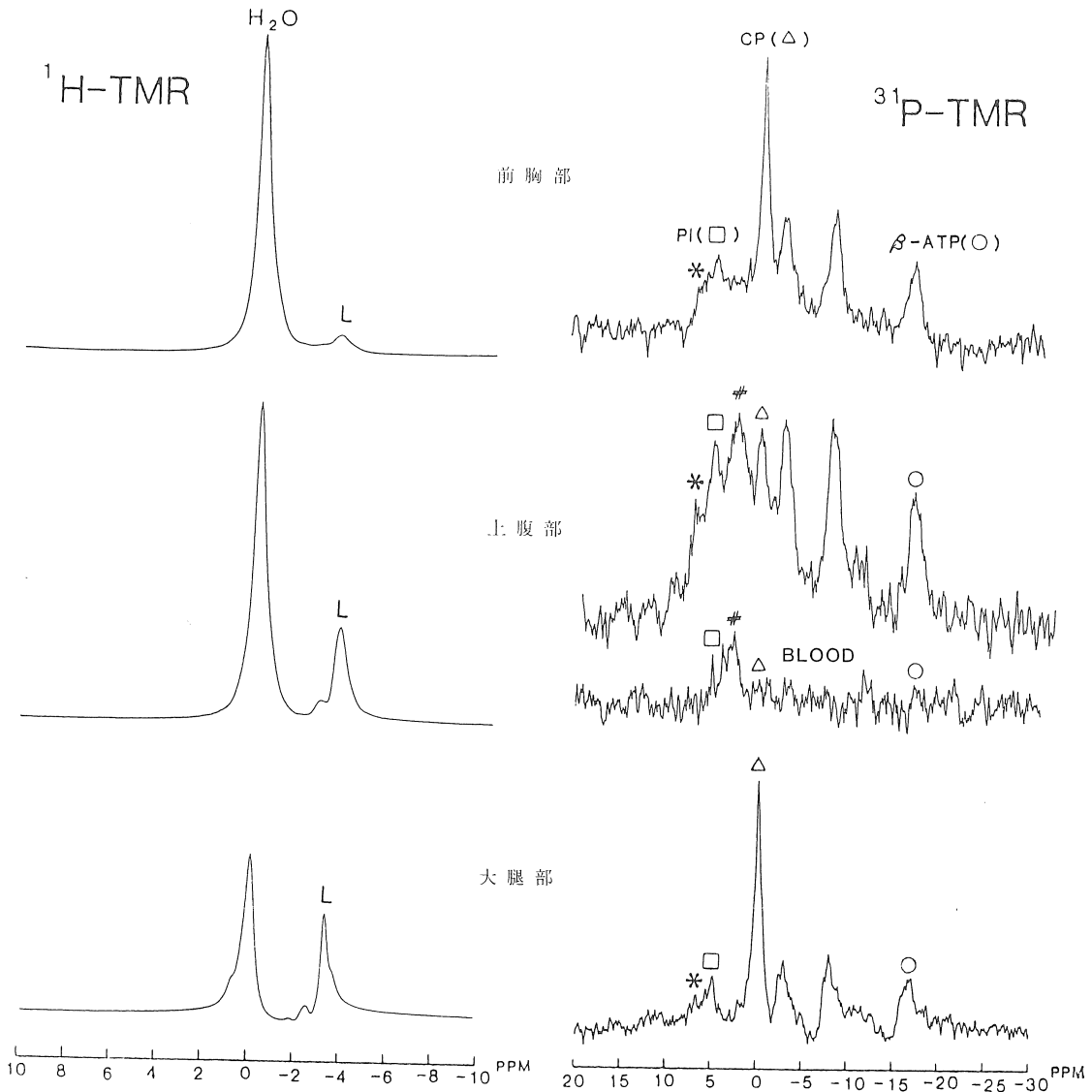


図2 Syrian hamster 前胸部(心尖拍動部), 上腹部, 大腿部より得た<sup>1</sup>H-および<sup>31</sup>P-TMR スペクトル. L, Pi, CP, β-ATP は, それぞれ脂質内のメチレン基, 無機リン酸, クレアチンリン酸, ATPのβ位のリンを示す. #はグリセロリン酸, \*は糖リン酸の位置を示す.

にわたってα, β, γのリンを示すATP, そして5ppmに無機リンの山が示されたことである. -3.5ppmの<sup>1</sup>H信号は脂質内部のメチレン, メチル基由来のものと推定される<sup>10,11</sup>. 前胸部と上

腹部のTMRスペクトルの大きな違いはCP量とCPとPiの間に見られる上腹部特有のピークである. 又, 前胸部と大腿部の差は大腿部の強いCPピークである. 前胸部TMRスペクトルの特

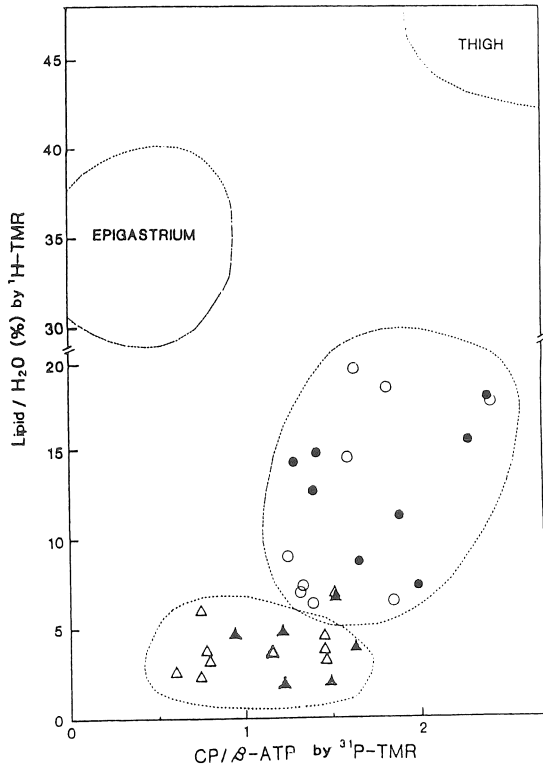


図 3  $^1\text{H-TMR}$  による脂質/水の比と,  $^{31}\text{P-TMR}$  による  $\text{CP}/\beta\text{-ATP}$  の比の 2 次元表示。  
 正常群 (○, ●) と CM 群 (△, ▲). 124 日目 (白抜き印) と 155 日目 (黒印) のデータを用いた。  
 参考のため上腹部, 大腿部の TMR スペクトルの 2 次元表示も示した。

徴はその信号が主に心筋由来のものであることを示す。又, 上腹部の CP と Pi の間のピークは肝の血液由来と思われる。上腹部 TMR スペクトルは肝の特徴と符合する。大腿部と前胸部の大きな差は大腿部の Lipid 由来ピークの増大となってむしろ  $^1\text{H}$  の TMR に現われている。今回の実験では各成分の局所の絶対量を測定することが難しかったので、ピーク間の比を用いた。つまり、 $^1\text{H-TMR}$  では脂質/水の比を、また  $^{31}\text{P-TMR}$  では  $\text{CP}/\beta\text{-ATP}$  の比である。両者を縦軸と横軸にとって 2 次元表示すると、心筋症発症群 (以下 CM 群) と正常群の差が明確となった。図 3 に CM 群と正常群の前胸部からの TMR について行った 2 次元プロットを示した。2 つの群がそれぞれある偏りを持って集合を作っているのが見てとれる。日を置いて (30 日) 取ったデータの一致の良いことは (丸印と三角印) この測定法の信頼性について示唆的である。図 3 には又上腹部, 大腿部の TMR スペクトルから得た結果も示してあるが、体内臓器による差が顕著に見てとれる。

今回の実験では、測定時間を短縮して 2 秒に 1 回  $^{31}\text{P-TMR}$  を行ったが、こうして得た  $\text{CP}/\beta\text{-ATP}$  の比は、10 秒に 1 回  $^{31}\text{P-TMR}$  測定を行った時に得た値に較べ小さく見積られてしまう。正確な量比は 2 秒で得たときの比の値を 1.45 倍す

表 1 心筋症ハムスターと正常ハムスターの胸部脂質/水比、及び  $\text{CP}/\text{ATP}$  比の経時変化

|   |       | 周 齢             |               |               |
|---|-------|-----------------|---------------|---------------|
|   |       | 72 日            | 124 日         | 155 日         |
| 脂質/水<br>( $^1\text{H-TMR}$ )                      | 対 照 群 | 0.121±0.019     | 0.128±0.021   | 0.118±0.019   |
|   | 心筋症群  | 0.073±0.014**   | 0.041±0.008** | 0.040±0.005** |
| $\text{CP}/\text{ATP}$<br>( $^{31}\text{P-TMR}$ ) | 対 照 群 | 1.61±0.26       | 1.73±0.18     | 1.62±0.12     |
|   | 心筋症群  | 1.48±0.09       | 1.32±0.10*    | 1.07±0.12*    |
| $\text{CP}/\text{ATP}$<br>補正後                     | 対 照 群 | 2.33±0.38       | 2.58±0.26     | 2.35±0.17     |
|   | 心筋症群  | 2.13±0.13       | 1.91±0.15*    | 1.55±0.17*    |
| $\text{CP}/\text{ATP}$<br>化学的分析結果<br>(文献 8 より)    | 対 照 群 |                 | 2.54          |               |
|   | 心筋症群  | (moderate) 1.84 |               | (late) 1.41   |

各値は平均 ±SE,  $n=4\sim 10$ . 対照群と比べ危険率 5% および 1% 以下で有意な変化を \* および \*\* で示した。

表 2 TMR 測定後単離した心の物理・化学的分析結果 (155日)

|       | 体 重 (g)     | 心重量 (mg)  | 心重量/体重 (%)             |
|-------|-------------|-----------|------------------------|
| 対 照 群 | 144.6±0.6   | 482±22    | 0.333±0.016            |
| 心筋症群  | 108.2±1.3** | 499±26    | 0.462±0.004**          |
|       | 水分量 (%)     | 脂質量 (%)   | CPK 活性<br>(I. U./g 蛋白) |
| 対 照 群 | 77.8±0.9    | 1.80±0.19 | 1,480±95               |
| 心筋症群  | 81.3±1.4*   | 1.78±0.16 | 1,390±75*              |

各値は平均±SE,  $n=4\sim 10$ . 対照群と比べ危険率 5% および 1% 以下で有意な変化を\*および\*\*で示した.

る必要があった.

CM の進展に応じた脂質/水の値と, CP/ATP の値の変化を表 1 にまとめた. 脂質/水の値は, 生後 72 日目 (このとき心臓は肥大型にあり, うっ血期ではないと報告されている) ですでに CM 群で有意に ( $P<0.05$ ) 低く, 124 日目ですらに低下し (このとき心臓は肥大型を過ぎ, 軽度のうっ血期がはじまる), 155 日目ではあまり変化が観測されなくなるが, このとき心臓は顕著なうっ血性心不全を呈する<sup>8)</sup>. 対照群ではこの比の値に変化をきたしていない.

一方, CP/ $\beta$ -ATP の比の値は, 72 日目では有意差がなく, 124 日目で CM 群で有意に ( $P<0.01$ ) 低下し, 155 日目でこの比はさらに低下した. 対照群では, ばらつきがやや大きいものの, 有意の変化を示さなかった. われわれは, 心筋中の CP と ATP の量を個々に正確に測定できなかったが, BIO 14.6 系が発見された当時カナダの生理学のグループがすでに定量報告<sup>9)</sup>していたのでこれをもとに, われわれが計算した結果を表 1 に併記した. このグループでは, われわれのように周齢を一定にせず, 病態を対照群, moderate stage 群, late stage 群とに分けている. 具体的な周齢はわれわれの用いた時期 124 日と 155 日にほぼ近い由であった<sup>12)</sup>. 今回のわれわれのデータと彼らのデータとを比較すると, 両者の一致の良いことがわかる.

動物屠殺後に単離した心筋の生化学的分析の結果を表 2 にまとめた. 体重は, 155 日目では対照群の方が大きく ( $P<0.01$ ), 心重量は変わらなかった. しかし, 心/体重の比は CM 群で有意に ( $P<0.01$ ) 大きく, また左室壁内の水分含量も CM 群で有意に ( $P<0.01$ ) 大きかった. 脂質の含量について両者間に有意差はなかった. また, 細胞質内の蛋白重量当りの CPK 活性は有意に ( $P<0.05$ ) CM 群で少なかった.

#### 考 察

TMR 測定が, 心疾患の非侵襲的診断法に役立つかどうか検討するさいに, つぎの 3 つ重要な点であろう.

##### 1) TMR 信号は心由来といえるか

われわれはつぎの 4 点から心尖拍動を中心にした前胸部からの TMR 信号は, “主として” 心由来であろうと考えた. ① 凍結切断して得た心臓の位置と, 予備実験でのコイルの受信領域とがよく一致していること (図 1, 図 4). ② 前胸部で得た CP/ $\beta$ -ATP の比の値は, 単離して灌流しながら得た心の NMR 信号に近く<sup>1~4)</sup>, またわれわれが骨格筋モデルとして用いた大腿 4 頭筋由来の CP/ $\beta$ -ATP の比は前胸部に較べずっと大きく (図 2, 3), その値も従来単離した骨格筋から得た NMR の値と近いこと<sup>13,14)</sup>, ③ このハムスターに大量のイソプロテレノール (1.0 mg/100 g)

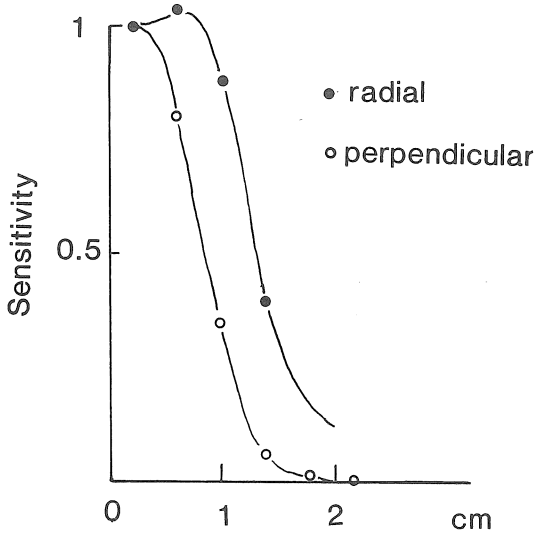


図4 Surface coil 近傍の感度曲線。  
 図よりコイル表面上半径 1.5cm、奥行 1cm の範囲の空間内の試料が測定可能とわかる。

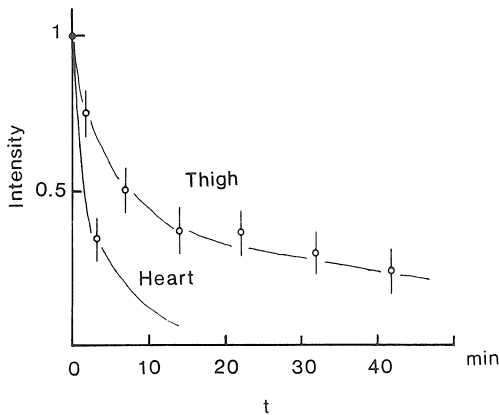


図5 CP/ATP 比の死後変化  
 心拍の止まった時点より TMR 測定を開始。経時変化を追った。

と KCl とを投与すると、心臓は強い頻拍を繰り返した後、心室細動を起こして停止することが心電図で認められるが、このとき局所の CP の量は 10% 以下に減っているが、同時点で同じ動物の

骨格筋の TMR 測定を行うと、まだ初期の 50% 程度の CP を保持していたこと (図 5), そして、④ パルス幅を最初の 13 $\mu$  秒から 3 $\mu$  秒に短くすると、コイルに近いつまり胸郭表面の TMR 信号が得られるが、この信号を先の 13 $\mu$  秒の信号から演算処理して引いても、最終的な CP/ATP 比の結果には有意差が認められなかったことによる。

2) TMR 測定結果と生化学的分析結果との対応  
 TMR の測定で得られるデータは、100% 生化学的分析結果で証明できるとは限らない。この理由として、それぞれの特異性、測定感度などが異なっていることが考えられる。たとえば TMR の測定結果得られた脂質/水の比は、対照群に比べ約 1/3 に低下していたが (表 1), 生化学的分析結果ではせいぜいこの比は 20% 低下していたにすぎない (表 2)。これは、TMR で取得される脂質とは脂質全体の単なる量ではなく、脂質の相の変化、たとえば分子自体の曲がりやすさ (flexibility) や、生体膜内の移動のしやすさ (fluidity) などが反映する。一方、クロロフォルム-メタノールを用いると、上記の脂質分子の細かな性質と無関係に抽出されてしまうことによると思われる。

また、CM 群で CPK 活性が低下しているが (表 2), これだけで単純に TMR の CP/ATP の比が小さくなるとは即断できない。たとえば、ADP が増えれば、 $CP + ADP \rightleftharpoons C + ATP$  反応が右に移行し、CP/ATP 比が減少するからである。したがって、TMR や NMR の測定ですべての生化学的代謝の変化が示されるわけではない。両者を併用してはじめて、生きた細胞・臓器内の代謝を、より動的に詳しく追うことができると考える。

### 3) 展望

TMR で細胞内代謝がすべて把握されるわけではないが、非観血的に繰り返し測定できる点で、革命的な方法といってよいであろう。とくに、臨

床医学的な応用はきわめて広く、脳や心筋の梗塞性疾患の部位や定量診断、内科的・外科的治療、薬効の評価などには有効な武器になると思われる。

すでにオックスフォード大のグループは、われわれの用いた TMR 32/200<sup>®</sup> と同じ機種でヒト骨格筋疾患の非侵襲的診断をはじめている<sup>15)</sup>。また、ロンドン大学では、生下時仮死状態で生まれた新生児の脳内高エネルギーリン酸化化合物量を非侵襲的に測定している<sup>16)</sup>。NMR や TMR 法は、色々な先端科学技術の結合である。そこには超低温技術、超電導磁石、ラジオ波技術、高速フーリエ変換などのコンピュータ技術等々が組み合わされている。更に、今後の技術開発に期待し、ヒト心筋代謝の分析が可能となることを希望したい。

本研究を進めるにあたり、暖いご支援とご助言をいただいた岡崎国立生理学研究所江橋教授、自治医科大学細田教授、ロンドン大学 Wilkie 教授、ハーバード大学 Ingwall 博士、ウィニペグ大学 Dhalla 博士に感謝いたします。又オックスフォード TMR 32/200<sup>®</sup> の装置を使う機会を与えて下さった岡崎国立生理学研究所巨教授に深謝申し上げます。本研究は、文部省一般研究 (58480241)、試験研究 (58870054)、厚生省班研究 (57-1) および日本心臓財団より資金援助を受けました。

## 文 献

- 1) Jakobus, W. E., Taylor, G. T., Hollis, D. P. & Nunnally, R. L.: *Nature* **265**: 756, 1977.
- 2) Garlick, P. B., Radda, G. K. & Seeley, P. J.: *Biochem. J.* **184**: 547, 1979.
- 3) Stossel, E. T., Morgan, H. E. & Ingwall, J. S.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **77**: 3654, 1980.
- 4) Nunnally, R. L. & Bottomley, P. A.: *Science* **211**: 177, 1981.
- 5) Ackerman, J. J. H., Grove, T. H., Wong, G. G., Gadian, D. G. & Radda, G. K.: *Nature* **283**: 167, 1980.
- 6) Gordon, R. E., Hanley, P. E., Shaw, D., Gadian, D. G., Radda, G. K., Styles, P., Bore, P. J. & Chan, L.: *Nature* **287**: 736, 1980.
- 7) Bajuz, E., Baker, J. R., Nixon, C. W. & Homberger, F.: *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **156**: 105, 1969.
- 8) Dhalla, N. S., Sulakhe, P. V., Fedelsova, M. & Yates, J. C.: *Adv. Cardiol.* **13**: 282, 1974.
- 9) Oliver, I. T.: *Biochem. J.* **61**: 116, 1955.
- 10) Hopkins, C. Y. & Bernstein, H. J.: *Can. J. Biochem.* **37**: 775, 1959.
- 11) Chapman, D. & Morrison, A.: *J. Biol. Chem.* **241**: 5044, 1966.
- 12) Dhalla, N. S.: (私信)
- 13) Dawson, M. J., Gadian, D. G. & Wilkie, D. R.: *Nature* **274**: 861, 1978.
- 14) Dawson, M. J., Gadian, D. G. & Wilkie, D. R.: *J. Physiol.* **299**: 465, 1980.
- 15) Ross, B. D., Radda, G. K., Gadian, D. G., Rocker, G., Eisiri, M. & Falconer-Smith, J.: *N. Engl. J. Med.* **304**: 1338, 1981.
- 16) Wilkie, D. R.: (私信)