

# 原 著

## 骨格筋の温阻血に対する耐容性の研究—<sup>31</sup>P-MRS を用いて— The study of the tolerance to skeletal muscle ischemia—using <sup>31</sup>P-MRS—

津保雅彦 (徳島大学医学部整形外科)

高井宏明 ( 同 上 )

井形高明 ( 同 上 )

曾我部孝行 (大塚製薬株式会社徳島研究所)

エネルギー代謝研究センター)

三浦 巖 ( 同 上 )

Masahiko Tsubo

(Dept of orthopaedic surgery, Tokushima Univ.  
School of Medicine)

Hiroaki Takai

(Dept of orthopaedic surgery, Tokushima Univ.  
School of Medicine)

Takaaki ikata

(Dept of orthopaedic surgery, Tokushima Univ.  
School of Medicine)

Takayuki Sogabe

(Bioenergetics Res.Center, Tokushima Res.  
Inst., Otsuka Pharmaceutical Co., Ltd.)

Iwao Miura

(Bioenergetics Res.Center, Tokushima Res.  
Inst., Otsuka Pharmaceutical Co., Ltd.)

### キーワード

<sup>31</sup>P-MRS, skeletal muscle ischemia, energy metabolism, intracellular pH, critical time

### 要 旨

A model of amputated and replanted legs were used for the study on the energy metabolism during long-period skeletal muscle ischemia. The energy metabolic changes and intracellular pH were measured continuously and non-invasively by <sup>31</sup>P-MRS technique.

Immediately following ischemia, phosphocreatine declined and inorganic phosphate rose. However, ATP was maintained for 2 hours.

During ischemia, phosphocreatine was not detected after about 3.5 hours and ATP was no longer detectable after about 5 hours. On the other hand, intracellular pH began declining linearly after 30 minutes.

All cases of 4-hour ischemia and 57% of 5-hour ischemia recovered. And all cases of 6-hour ischemia did not recover.

Consequently irreversible changes to the energy metabolism of skeletal muscle were caused by an ischemia of longer than 5 hours.

## 〈はじめに〉

骨格筋の虚血に対する耐容性について多くの研究報告がみられる。これまでに採用した方法は再接着肢の生着率や組織学的検索<sup>1)~7)</sup>ならびに筋生検による分析<sup>8)~17)</sup>がその大半を占めている。今回我々は、無侵襲、連続的、real timeでの測定が可能な<sup>31</sup>P-MRS<sup>18)</sup>を用いた。実際には骨格筋のエネルギー代謝に不可逆的な変化が生じる阻血限界時間(critical time)の究明を目的とし、長時間阻血における骨格筋の高エネルギーリン酸化合物の代謝過程及び阻血解除後の回復過程における変化を測定し検討した。

## 〈実験動物及び操作〉

実験動物は、11～15週齢、体重250～320gのWistar系雄ラットを用いた。腹腔内ペントバルビタール麻酔(50mg/kg)を行ったのち、以下のモデルを作成した。なお、これ以降の麻酔は適宜追加した。

まず、ラットの左後肢を下腹部より足部にかけて剃毛し、大腿中枢1/3のレベルで鼠径靭帯に沿って全周にわたる輪状皮切を加えた。剝離した大腿動静脈、同神経及び坐骨神経を温存して、大腿諸筋、大腿骨を完全に切断した。直ちに筋・皮膚の縫合を行い、クリップで大腿動静脈を鼠径靭帯と浅下腹壁動静脈との間で圧迫阻血し、阻血モデルとした。このモデルを室温(25～30℃)に保存し、以下の2群の実験を行った。

第1群は阻血群であり、非磁性体クリップ(協和時計工業社製)により大腿動静脈を6時間阻血した。

第2群は再還流群であり、Scovilleのクリップを用い、大腿動静脈を阻血した。阻血後4時間、5時間、6時間で再還流を行った。この際、血流再開後動脈拍動と静脈還流を観察確認した。

NMR装置はPE社製BEM-250/80(Bore径25cm, 1.9 Tesla)を用い、測定条件はパルス繰返時間2sec, 積算回数60回(2min)とした。第1群の測定は、阻血前から阻血6時間までとし、内径25mmのソレノイドコイルに挿入した左後肢の下腿三頭筋部の<sup>31</sup>P-NMRスペクトルを15分間隔で測定した。第2群は、解除後180分までは15分間隔で測定し、さらに24時間後の測定を追加した。なお、各成分の変化はそれぞれの面積比を用いた。細胞内pH(pHi)は、phosphocreatine(PCr)を基準としてのinorganic phosphate(Pi)の化学シフト( $\delta$  ppm)より次式を用いて算出した<sup>19)</sup>。

$$pHi = 6.90 - \log(\delta - 5.805) / (3.290 - \delta) \quad (1)$$

## 〈結果〉

実験に供した足趾は、阻血開始後増強するチアノーゼを認めた。阻血解除後は潮紅及び充血を呈し、阻血時間が長くなるにつれ色調変化出現の遅れを示した。

第1群(阻血群)：阻血開始直後よりPCrの減少とPiの増加が認められた(Fig. 1)。PiとPCrとの相対比〔Pi/(Pi+PCr)〕(Fig. 2)は、阻血前の $0.10 \pm 0.03$ (MEAN  $\pm$  SEM)に対し、阻血30, 60, 120, 180分では、それぞれ、 $0.43 \pm 0.03$ ,  $0.67 \pm 0.02$ ,  $0.91 \pm 0.02$ ,  $0.98 \pm 0.01$ と増加を示した。また、Pi, PCr, 及び $\beta$ -ATP(以下ATP)の相対比〔 $\beta$ -ATP/(Pi+PCr+ $\beta$ -ATP)〕(Fig. 3)は、阻血前の $14.3 \pm 1.0$ に対

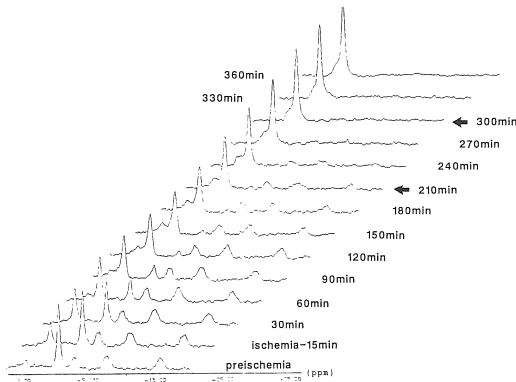


Fig. 1 Time course of the changes in high energy metabolites during skeletal muscle ischemia, <sup>31</sup>P-NMR spectra recorded from the calf muscles of a single rat during 6 hours of ischemia. Chemical shifts (spectral position) defined as positive in the high-frequency direction with phosphocreatine chosen as the internal chemical shift standard.

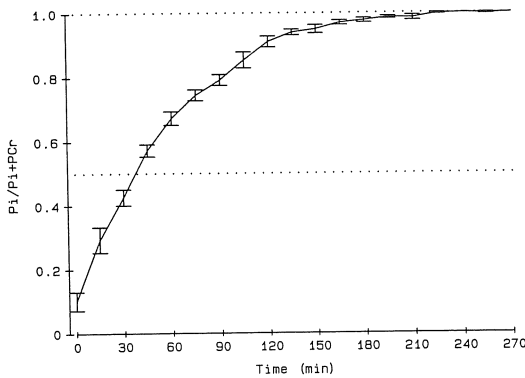


Fig. 2 Time course of the changes in Pi/ (Pi+PCr) during period of 4.5 hours of ischemia. Values are means, and error bars represent  $\pm$  SE.(n=7) Pi: inorganic phosphate, PCr: phosphocreatine

して、阻血 30, 60, 120, 180 分でそれぞれ、 $16.2 \pm 1.2$ ,  $14.6 \pm 0.7$ ,  $14.2 \pm 0.8$ ,  $10.8 \pm 1.3$  と、阻血 120 分までは ATP はほぼ一定に保たれた。

阻血の進行に伴って、PCr, ATP のシグナル

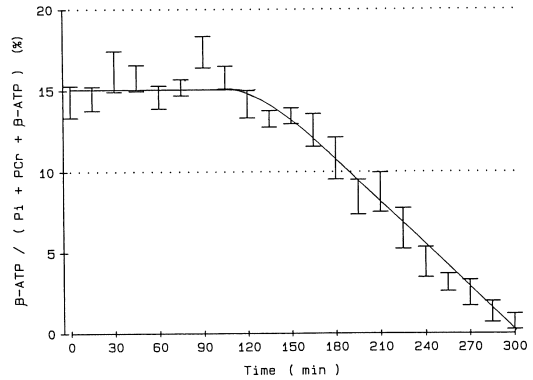


Fig. 3 Time course of the changes in  $\beta$ -ATP/ (Pi+PCr+ $\beta$ -ATP) during period of 5 hours of ischemia. Values are means, and error bars represent  $\pm$  SE.(n=7) Pi: inorganic phosphate, PCr: phosphocreatine

はいずれも NMR スペクトル上減少し、消失がそれぞれ、阻血  $212 \pm 7$  分、阻血  $298 \pm 6$  分に認められた。

一方、(1)式より算出した細胞内 pH は Pi や PCr の変化とは少し異なり、阻血後の低下は 30 分までゆるやかであり、それ以降は時間とともに linear な低下を示した。しかし、阻血 210 分までは PCr の存在がみられたが、それ以降判別困難となったため測定は不可能だった (Fig. 4)。

第 2 群(再還流群): 4 時間阻血における解除後 180 分までの高エネルギーリン酸化合物の回復は個々に異なっていたが、7 例中全例、回復率 100% であった。このうち、最も早い回復例では、解除直後より Pi の減少と PCr の増加が著明にみられ、解除後 105 分で両者の相対比 (Pi/ (Pi+PCr)) は 0.1 以下に達し、細胞内 pH は約 7.0 まで回復した。また、最も遅い回復例では解除後 180 分でも面積比 0.82、細胞内 pH は約 6.0 であったが、24 時間後には、ほぼ同レベルまでの回復を示した (Fig. 5)。次に、5 時間阻血においては、回復率 57% (7 例中 4 例) であり、再還流により PCr のシグナルに回復を認めたものでも、解除後 180 分での相対比は 0.76、細胞

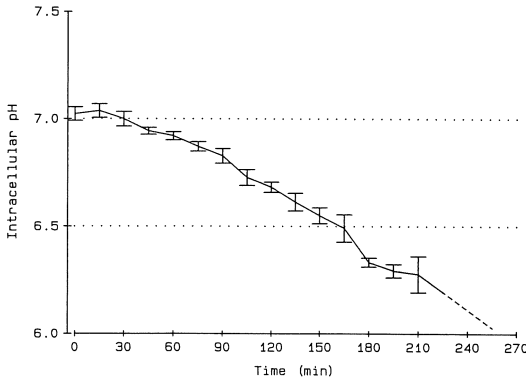


Fig. 4 Time course of the changes in intracellular pH during period of 3.5 hours of ischemia. Values are means, and error bars represent  $\pm$  SE.(n=7) It was impossible to calculate the intracellular pH because of no PCr signal after 3.5 hours of ischemia. PCr: phosphocreatine

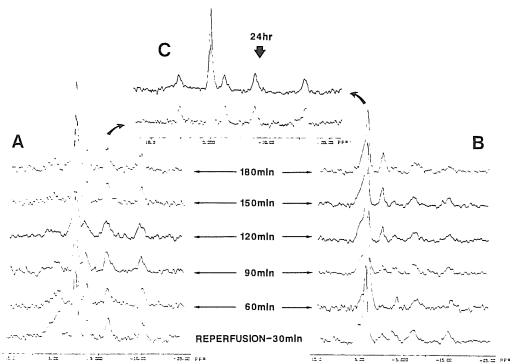


Fig. 5 Time course of the changes in high energy metabolites after periods of 4 hours of ischemia. (A): These spectra show the most rapid recovery. (B): These spectra show the slowest recovery. (C): Both case (A) and case (B) recovered to the same degree after 24 hours of reperfusion.

内 pH 約 6.0 までであった。また、回復しなかった例では、解除後 90 分経過しても PCr のシグナルの出現は見られなかった (Fig. 6)。さらに、6 時間阻血においては、回復率 0% (7 例中 0

例) であり、5 時間阻血の回復しなかった例と同様解除後 90 分経過しても、PCr のシグナルの出現は認められなかった (Fig. 7)。

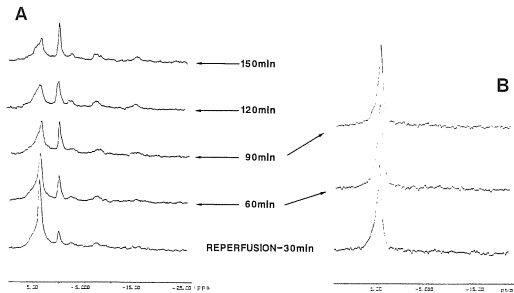


Fig. 6 Time course of the changes in high energy metabolites after periods of ischemia. (A): These spectra show that PCr signal appeared within 90 minutes of reperfusion, and which indicated the tendency of recovery. (B): These spectra show that the signal did not appear and indicated no tendency of recovery. PCr: phosphocreatine

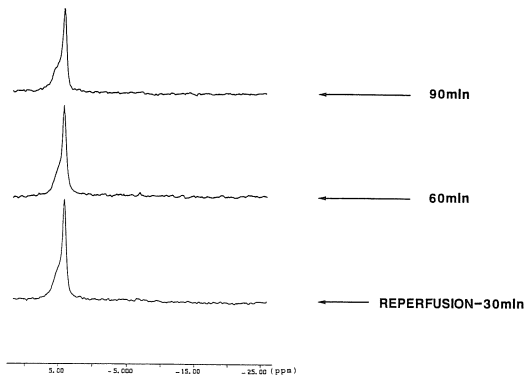


Fig. 7 Time course of the changes in high energy metabolites after periods of 6 hours of ischemia. These spectra indicated no tendency of recovery and Pi signal did not decrease even after 90 minutes of reperfusion. Pi: inorganic phosphate

## 〈考察〉

阻血性筋組織壊死に関するこれまでの研究では、時間的限界は1～7時間と幅のある結果の報告がみられる<sup>1)~4)6)~9)11)~16)20)~22)</sup>。これらの違いは、阻血方法の多様性や臨床的な安全性を含めた可逆不可逆の判定方法に基づくものと考えられる。なかでも、大半を占める筋組織の変性についての組織学的研究や筋の代謝に関する生化学的研究においては、同一個体を連続的無侵襲で評価することの困難性によるところが大である。生化学的検討については生検から測定までのtime lagも問題となる。一方、MRSは骨格筋のエネルギー代謝を無侵襲、連続的にreal timeで測定可能<sup>23)~26)</sup>であり、筋肉そのものの阻血限界時間を検討する最良の手段として利用できる。

今回、<sup>31</sup>P-MRSを用いた再還流群の結果より、骨格筋のエネルギー代謝に不可逆的な変化が生じるcritical timeは5時間であることがわかった(Fig. 8)。この結果は、三橋(1965)<sup>2)</sup>、Eiken(1964)<sup>21)</sup>、小浜(1969)<sup>6)</sup>、Whitesides(1971)<sup>7)</sup>、Makitie(1977)<sup>22)</sup>、村松(1979)<sup>4)</sup>、村上(1983)<sup>1)</sup>らの結果とほぼ一致している。さらに、回復のみられる場合には最低90分までにPCrが出現したことより、阻血解除後の回復判定の指標となりうる可能性が示唆された。

阻血骨格筋のcritical factorについては、阻血時間以外に、再還流後の循環不全<sup>2)21)</sup>、組織の酸素分圧<sup>17)</sup>があり、さらに、細胞内pH<sup>27)</sup>、ATP<sup>23)27)</sup>、などとの関係が報告されている。

細胞内pHとの関係では、Thulborn(1981)<sup>27)</sup>が、<sup>31</sup>P-NMRを用いたラットでのターニケット阻血実験より細胞内pHとATPとの関係を報告し、細胞内pHは再還流後の回復にかかわっており、6.2-6.0がcritical rangeであると主張した。しかし、我々の実験では3時間30分の時点で細胞内pHは約6.2とcritical levelに達したが、この限りではすべて回復した。細胞内pHがこれ

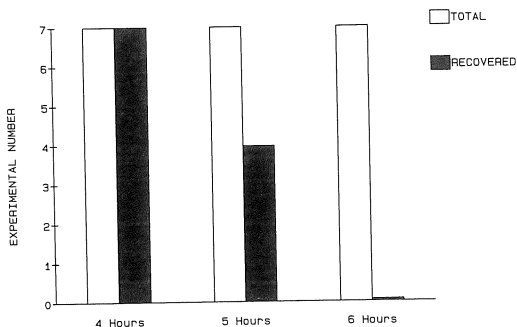


Fig. 8 This figure indicates the relationship between ischemic time and recovery. White bar: the number of total samples. Black bar: the number of recovered samples.

よりも低いと考えられる5時間でも回復例がみられたことより、critical rangeとしては一段と低いことが予測された。

阻血群での細胞内pHの低下に関して、Pi/(Pi+PCr)の比と細胞内pHとの関係をみてみたが、Piの増加に伴い細胞内pHは低下しているものの、直線的な関係はなく、ほぼ二相性の変化を示した。また、Piの増加が、上記の比で0.7~0.8に達するまでは細胞内pHは大きく低下しないなど、Piの増加が細胞内pHの低下に関与するというArnoldらの結果<sup>28)</sup>とは異なっていた(Fig. 9)。

次に、ATPの消失が阻血骨格筋のcritical factorに関与することは、Thulborn(1981)<sup>27)</sup>やNewman(1984)<sup>23)</sup>らのMRSを用いた実験より明らかにされている。今回の結果では、<sup>31</sup>P-MRS上、ATPのシグナルが消失した5時間の阻血からの回復が57%にみられたことより、MRSでのATP消失が必ずしも回復のcritical factorとはならないことが示唆された。この点については、MRSによるATPの把握が遊離型ATPに限られていることが関与しており、結合型ATPとの関係についても検討する必要があると思われる。ATPの減少とPCrとの関係をみてみると、NMRスペクトル上PCrが消失する以前の阻血

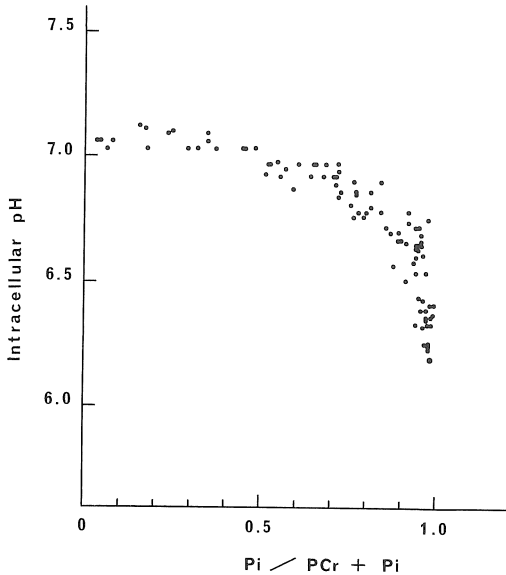


Fig. 9 This figure indicates the relationship between  $Pi/(Pi+PCr)$  and intracellular pH during ischemia. (n=7) Pi: inorganic phosphate, PCr: phosphocreatine

開始後 120 分の時点より ATP が直線的に低下した。このことは、定量的実験で ATP は PCr の量が 70% まで減少してはじめて急減するとの報告によく符合した。

最近、Hagberg (1985)<sup>31)</sup> は、阻血骨格筋に關与する以上述べた細胞内 pH ならびに ATP と深く相互作用をもつ glycogen との関係について報告している。特に、high lactate は low ATP による傷害を増強するとの指摘は興味深い。

今回の研究を通して、臨床面においても、<sup>31</sup>P-MRS は、脱神経の影響が及び以前の切断肢の筋肉の viability を評価し、予後判断を行える唯一の方法であると考えられた。

#### 〈まとめ〉

1) 今回我々は、長時間阻血状態におかれた骨格筋のエネルギー代謝過程について、ラットの

切断肢再接着モデルを使用し、<sup>31</sup>P-MRS により連続的かつ無侵襲で測定し、同時に細胞内 pH も測定した。

2) 阻血過程では、NMR スペクトル上 PCr のシグナルは阻血 3.5 時間前後で消失し、ATP のシグナルは約 5 時間で消失したのに対して、細胞内 pH は阻血開始 30 分後より直線的に低下した。

3) 回復については、4 時間阻血では全例回復したのに対し、5 時間阻血では回復率 57%、6 時間阻血では 0% という結果となった。

4) 以上のことより、阻血 5 時間を境として、骨格筋のエネルギー代謝に不可逆的な変化が生じると考えられた。

#### 謝 辞

稿を終るに臨み、大塚製薬 (株) 徳島研究所 エネルギー代謝研究センターの御協力に深謝致します。

本研究は、昭和 62 年度文部省科学研究費補助金 (一般研究 A, No. 62440060) の一部として行った。また、本論文の要旨は、第 9 回日本磁気共鳴医学会大会 (1987 年 9 月, 岡山) ならびに、第 2 回日本整形外科基礎学術集会 (1987 年 9 月, 京都) にて発表した。

#### 文 献

- 1) 村上恒二: 切断肢指再接着におよぼす阻血時間の影響についての基礎的および臨床的研究, 広島医誌, 31: 485-512, 1983.
- 2) 三橋二良: 切断肢再接着に関する実験以科的研究—主として病理組織学的研究について—, 奈良医誌, 16: 229-241, 1965.
- 3) L. Gordon, H.J. Buncke, J.J. Townsend: Histological changes in skeletal muscle after temporary independent occlusion of arterial and venous supply, Plast. Reconstr. Surg., 61: 576-580, 1978.
- 4) 村松郁夫, 高畑直司, 薄井正道, 他: 阻血が切断

- 肢筋組織の代謝および細胞傷害に与える影響, 臨整外, 14 : 669-676, 1979.
- 5) 薄井正道: "Replantation Toxemia"に関する実験的研究一切断阻血肢の冷却保存効果について, 日整会誌, 52 : 663-672, 1978.
  - 6) 小浜啓次: 阻血肢の血流再開後における変化について, 中部整災誌, 12 : 555-580, 1969.
  - 7) T.E. Whitesides, H. Hirada, K. Morimoto: The response of skeletal muscle to temporary ischemia, *J. Bone Joint Surg.*, 53-A : 1027-1028, 1971.
  - 8) K. Harris, P.M. Walker, D.A.G. Mickle, et al.: Metabolic response of skeletal muscle to ischemia, *Am.J. Physiol.*, 250 : H 213- H 220, 1986.
  - 9) R.B. Heppenstall, R. Balderston, C. Goodwin: Pathologic effects distal to tourniquet in the dog, *J. Trauma*, 19 : 234-238, 1979.
  - 10) S.H. Miller, G. Price, D. Buck, et al.: Effects of ischemia and postischemic edema on muscle metabolism, *J. Hand Surg.*, 4 : 547-555, 1979.
  - 11) S. Patterson, L. Klenerman: The effect of pneumatic tourniquets on the ultrastructure of skeletal muscle, *J. Bone Joint Surg.*, 61-B : 178-183, 1979.
  - 12) H. Haljamäe, E. Enger: Human skeletal muscle energy metabolism during and after complete tourniquet ischemia, *Ann. Surg.*, 182 : 9-14, 1975.
  - 13) S. Santavirta, A. Luoma, A.U. Arstila: Ultrastructural changes in striated muscle after experimental tourniquet ischemia and short reflow, *Eur. Surg. Res.*, 10 : 415-424, 1978.
  - 14) S. Santavirta, A. Luoma, A.U. Arstila: Morphological and biochemical changes in striated muscle after experimental tourniquet ischemia, *Res. Exp. Med.*, 174 : 245-251, 1979.
  - 15) 結城正明: 阻血筋における筋構造蛋白の研究, 日整会誌, 61 : 1107-1121, 1987.
  - 16) W.M. Kuzon, P.M. Walker, D.A. Mickle, et al.: An isolated skeletal muscle model suitable for acute ischemia studies, *J. Surg. Res.*, 41 : 24-32, 1986.
  - 17) 山本 尚: 慢性動脈閉塞症の循環動態に関する質的量的解析の研究 —組織酸素分圧よりみた虚血肢の評価—, 脈管学, 26 : 1127-1134, 1986.
  - 18) B. Chance: How might nuclear magnetic resonance be used in the in vivo monitoring of energy metabolism and substrate flow?, *J. Trauma*, 24 : 154-166, 1984.
  - 19) J.T. Flaherty, M.L. Weisfeldt, B.H. Bulkley, et al.: Mechanisms of ischemic myocardial cell damage assessed by phosphorus-31 nuclear magnetic resonance, *Circulation*, 65 : 561-571, 1982.
  - 20) H.J. Eisenhardt, W. Isselhard, G. Prangenberg, et al.: Energy metabolism and histomorphological findings in replanted rat hind limbs using various conservation methods, *Microsurgery*, 5 : 61-69, 1984.
  - 21) O. Eiken, D.C. Nabseth, R.F. Mayer, et al.: Limb replantation II The pathophysiological effects, *Arch. Surg.*, 88 : 76-87, 1964.
  - 22) J. Mäkitie: Microvasculature of rat striated muscle after temporary ischemia, *Acta Neuropath.*, 37 : 247-253, 1977.
  - 23) R.J. Newman: Metabolic effects of tourniquet ischemia studied by nuclear magnetic resonance spectroscopy, *J. Bone Joint Surg.*, 65-B : 434-440, 1984.
  - 24) A.L. Osterman, R.B. Heppenstall, A.A. Sepega, et al.: Muscle ischemia and hypothermia: A bioenergetic study using 31phosphorus nuclear magnetic resonance spectroscopy *J. Trauma*, 24 : 811-817, 1984.
  - 25) R.B. Heppenstall, R. Scott, A. Sepega, et al.: A comparative study of the tolerance of skeletal muscle to ischemia, *J. Bone Joint Surg.*, 68-A : 820-828, 1986.
  - 26) A.A. Sepega, R.B. Heppenstall, B. Chance et al.: Optimizing tourniquet application and release times in extremity surgery, *J. Bone Joint Surg.*, 67-A : 303-314, 1985.
  - 27) K.R. Thulborn: 31P n.m.r. studies of energy metabolism and tissue pH in the ischemic rat leg, *Biochem. Soc. Transact.*, 9 : 238-239, 1981.
  - 28) D.L. Arnold, P.M. Matthews, G.K. Radda: Metabolic recovery after exercise and the assessment of mitochondrial function in vivo in human skeletal muscle by means of 31P NMR,

Magn. Reson. Med., 1 : 307-315, 1984.

- 29) 真島英信：生理学，第 17 版，文光堂，東京，1978，  
p.69-70.
- 30) C.T.Burt, T. Glonek, M. Bárány : Analysis of  
phosphate metabolites, the intracellular pH,  
and the state of adenosine triphosphate in

intact muscle by phosphorus nuclear magnetic  
resonance, J. Biol. Chem., 251 : 2584-2591, 1976.

- 31) H. Hagberg, E. Jennische, H. Haljamae :  
Influence of tissue lactic acid and ATP levels  
on postischemic recovery in rabbit skeletal  
muscle, Circ. Shock, 16 : 363-374, 1985.