

In vivo ^{31}P -NMR 法を用いた虚血-再灌流負荷ラット骨格筋エネルギー動態の解析

新原 寿志¹ 梅田 雅弘² 西川 弘恭¹

¹ 明治鍼灸大学大学院 鍼灸基礎医学 ² 明治鍼灸大学 脳神経外科教室

要旨: 虚血時間の異なる (120分と150分) ラット骨格筋の高エネルギーリン酸化合物 (PCr, ATP) と細胞内 pH (pHi) を in vivo ^{31}P -NMR スペクトロスコピーにて観察し, さらに, 再灌流後のクレアチンキナーゼ反応の正方向への反応速度 (V_{for}) を in vivo ^{31}P -NMR 飽和移動法にて測定した. また, これらと同様のプロトコールで, 筋血流量をレーザードップラー血流計にて観測した. その結果, 再灌流後の高エネルギーリン酸化合物および pHi の回復は, 虚血開始120分と150分の間で起こる ATP の減少と関係があること, および, 再灌流後の反応速度 (V_{for}) の低下は, ATP の不完全な回復に関与することが示唆された.

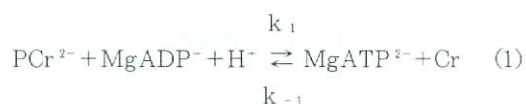
I 緒 言

虚血-再灌流負荷による骨格筋の損傷は, 一般に虚血-再灌流損傷と呼ばれ, 筋収縮不全や筋壊死, 細胞内酵素やタンパク質の流出, 内皮細胞の膨張, 微小循環におけるタンパク質透過性の増大などを特徴とし, 筋浮腫の発生を引き起こす^{1, 2)}. 生体組織の急速な虚血に対して外科的処置を施す場合, 虚血-再灌流による損傷は, 疾患の重症度および死亡率に強く関与するといわれている^{1, 3)}. また, これらの損傷の程度はその虚血時間に依存し⁴⁾, 特に虚血期間中のエネルギー代謝の動態が深く関与するとされている^{2, 5, 6)}.

in vivo ^{31}P -NMR 法および HPLC 法を用いた Soussi らの研究によれば, 虚血2時間後再灌流されたラット骨格筋の高エネルギーリン酸化合物 (PCr, ATP) の各濃度は, 再灌流後1時間では虚血前値 (安静時) にまで回復するのに対し, 虚血4時間では再灌流後24時間経っても不完全な回復しか認められなかったと報告している^{4, 7)}. 一方, 本研究で予備実験を行ったところ, 虚血150

分間後再灌流されたラット骨格筋においては, 高エネルギーリン酸化合物の不完全な回復が観察された. そこで今回, 虚血時間の異なる (120分と150分) ラット骨格筋の高エネルギーリン酸化合物を虚血負荷前・中・後において, 非侵襲的かつ経時的測定が可能である in vivo ^{31}P -NMR 法⁸⁾にて観察し, その経時的変化を検討した.

この虚血時間による高エネルギーリン酸化合物の回復状態の差異をさらに検討するために, 再灌流後のラット骨格筋の CK 反応 (creatine kinase reaction) の正方向への反応速度 (V_{for}) を in vivo ^{31}P -NMR 飽和移動法^{9, 10, 11, 12)}にて観測した. CK 反応は, 骨格筋細胞のエネルギー代謝に深く関わっており, 細胞内のエネルギー代謝状態を評価する上で重要であると考えられる. 一般に, CK 反応は以下の反応式 (1) で表される.



平成8年6月10日受付, 平成8年7月30日受理

Key Words: 虚血, 再灌流, 高エネルギーリン酸化合物, 細胞内 pH, クレアチンキナーゼ反応

k_1 および k_{-1} はそれぞれ正方向と負方向への1次反応速度定数を表す。CK 反応の主な役割は、PCr (phosphorylcreatine) からのエネルギー補充による ATP 濃度の維持と、過剰なエネルギーを ATP から PCr へと転換するエネルギー貯蔵にあり、また、PCr-Cr shuttle 仮説によれば、PCr は ATP 産生系から ATP 利用系へとエネルギーを運ぶ輸送体としての役割をもつとされている¹³⁾。

CK 反応と同様に細胞内のエネルギー代謝を左右する因子として循環動態が挙げられる。そこで、前述の ^{31}P -NMR スペクトルと同様のプロトコー

ルで、筋血流量をレーザードップラー血流計にて測定し、虚血-再灌流中のラット骨格筋エネルギー代謝の変化とその循環動態について検討した。

II 実験動物と方法

実験動物および虚血-再灌流法

実験動物には雄性のウイスター系ラット ($n=62$, 体重 $306 \pm 1.5 \text{ g}$; mean $\pm$ S.E.) を用い、室温 25°C , light-dark cycle 12:12 時間で飼育し、餌 (オリエンタル酵母工業社製, MF) と水は任意に摂取させた。虚血-再灌流法を Fig.1 に示す。虚血は、

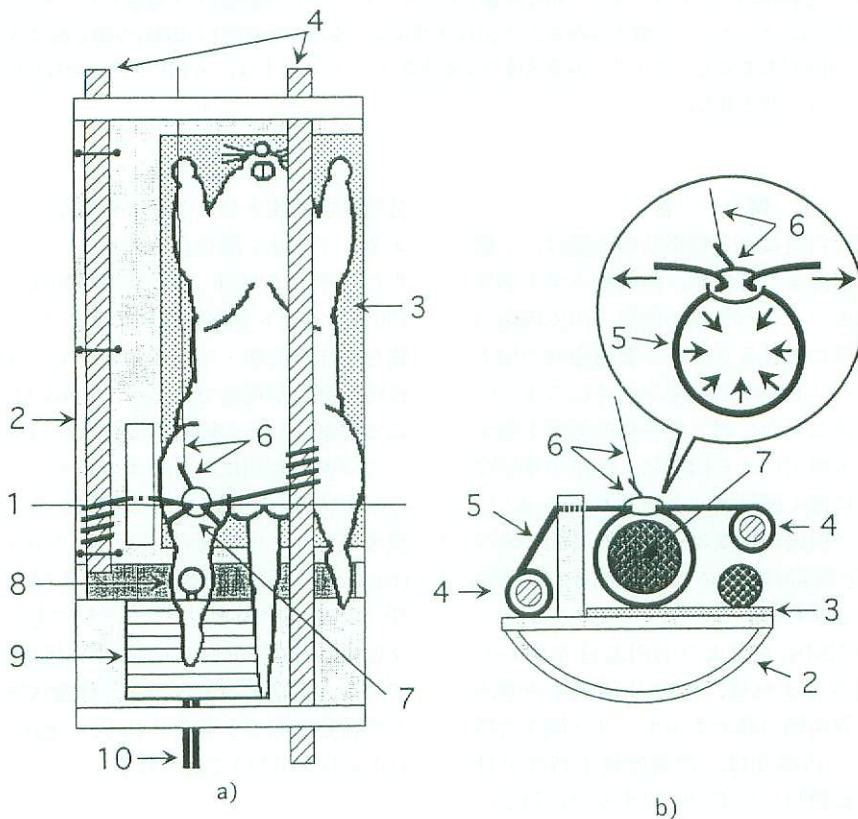


Fig.1 虚血-再灌流法

a) および b) はそれぞれラットを NMR 測定台に仰臥位で固定した様子と、駆血部位であるラット右後肢大腿部断面を表す。

1: b) の断面線, 2: 自家製 NMR 測定台, 3: 保温マット, 4: 回転棒, 5: 駆血用ゴム紐, 6: 金具および糸, 7: ラット右後肢下腿部 (測定部), 8: ラット後右肢大腿部 (駆血部), 9: 同調・整合回路, 10: 同軸ケーブルを示す。なお、サーフェイスコイルはラット右後肢下腿部背側面 (7) に位置させた。詳細は本文参照。

ラットをベントバルビタールナトリウム (0.5mg/kg) 腹腔内投与により麻酔後、自家製の NMR 測定台 (アクリル製) に仰臥位で固定し、完全虚血となるよう伸長性のあるゴム紐 (直径 3 mm) でラット右後肢大腿部を駆血して行った。大腿部の駆血は、まずリング状の金具 (銅製、直径 8 mm) に 2 つ折りにしたゴム紐をとおし、できたゴム紐の輪の中に大腿部を挿入させる。次に、このゴム紐の両端をそれぞれ左右に引き大腿部に圧が加わるようにした。また、このゴム紐の両端はそれぞれ 2 本の円柱状の回転棒 (アクリル製、直径 1 cm) に取り付けられており、これを回転かつ固定することにより駆血を維持できるようにした。再灌流はこの 2 本の回転棒の固定を外しゴム紐を弛め、さらにリング状の金具に取り付けられた糸 (綿製、直径 1.2 mm) をラットの頭部方向へ引き、ゴム紐を完全に弛緩させた。なお、この金具は ^{31}P -NMR 測定用のラジオ波パルス照射及び受信コイルに影響を与えないことを確認した。測定中は、自家製のフェイスマスクから 0.6 % のハロセン (air, 0.3 liter/min) をラットに持続吸入させることにより麻酔を維持した。また、ラット体温 (直腸温) は、バスサーキュレーターから温水を保温用マットに送りかつラット全体を厚手のガーゼで覆うことにより $37 \pm 0.5^\circ\text{C}$ に保持された。

虚血-再灌流プロトコール

^{31}P -NMR スペクトルおよび筋血流量比測定の虚血-再灌流プロトコールを Fig.2 に示した。実験は 120 分間虚血群 (以下 IR_{120} とする) と 150 分間虚血群 (以下 IR_{150} とする) に分け、また、 IR_{120} および IR_{150} の虚血-再灌流中の全測定時間は、それぞれ虚血 120 分間と再灌流 120 分間の計 240

分間、虚血 150 分間と再灌流 120 分間の計 270 分間とした。

^{31}P -NMR スペクトル測定

虚血-再灌流中の ^{31}P -NMR スペクトルによる測定は、 IR_{120} ($n=10$) と IR_{150} ($n=10$) の 2 群で行った。測定部位はラット右後肢下腿部背側面 (腓腹筋直下) とし、観測は NMR 装置 CSI-II-Omega (GE 社製 4.7T) を用い、観測周波数 81.1 MHz、観測周波数帯域 $\pm 5,000\text{Hz}$ 、繰り返し時間 (TR) 2.0 sec、照射パルス幅 10 μsec 、データポイント 4,096、加算回数 80 回にて行い、一つのスペクトルに対し約 3 分間を要した。ラジオ波パルスの照射及び受信は、直径 14 mm、ダブルターンの自家製サーフェイスコイルを用いて行った。なお、FID (free induction decay) には 20 Hz の line broadening を行った。また、静磁場の均一度を上げるために、骨格筋内の水のプロトン信号 (観測周波数 200 MHz) の線幅を利用した。外部標準として HMPT (hexamethylphosphoric triamide) を直径 5 mm のガラス球に入れサーフェイスコイル中央直下に置いた。なお、スペクトルは PCr のピークを基準値 (0 ppm) とした。また、スペクトルのピーク面積の測定は NMR 装置 CSI-II-Omega の付属アプリケーション (Spectral Analysis Tool) を用いて行い、PCr および ATP (β -P) の各ピーク面積は、各スペクトルの HMPT のピーク面積で除し、測定開始から 10 分毎に、虚血前値をコントロール値とする相対値 (百分率) で表した。

細胞内 pH 測定

細胞内 pH (Intracellular pH, 以下 pHi とする) は、 ^{31}P -NMR スペクトルにおける PCr を基準と



Fig.2 虚血-再灌流プロトコール

120 分間虚血群 (IR_{120}) は、虚血 120 分間と再灌流 120 分間の計 240 分間、150 分間虚血群 (IR_{150}) は虚血 150 分間と再灌流 120 分間の計 270 分間として各測定を行った。

した Pi (inorganic phosphate) の化学シフト値 (ppm) から、以下に示される Henderson-Hasselbalch の式 (2) より算出した。

$$\text{pHi} = \text{pKa} + \log(\sigma - \sigma_a) / (\sigma_b - \sigma) \quad (2)$$

σ は PCr と Pi の化学シフト値の差であり、また pKa , σ_a , σ_b はそれぞれ 6.75, 3.27, 5.69 とした⁴⁾。

筋血流量測定

^{31}P -NMR スペクトル測定と同様のプロトコルで IR_{120} ($n=7$) と IR_{150} ($n=7$) の 2 群で筋血流量 ($\text{ml}/\text{min}/100\text{g}$) を測定した。データは 3 分間の平均値を 10 分ごとに、虚血前の筋血流量をコントロール値とする相対値 (筋血流量比 blood flow volume ratio, 百分率) で表した。筋血流量の測定法を Fig. 3 に示した。筋血流量の観測

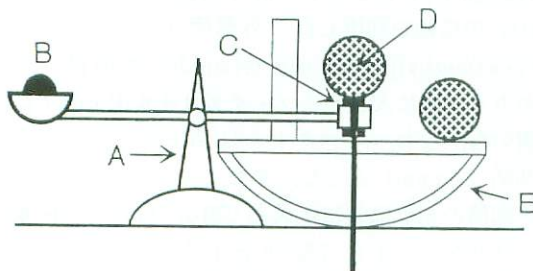


Fig. 3 筋血流量測定法

ドップラー血流計プローブの観測部位であるラット右後肢下腿部の断面を示す。

A: 自家製シーソー, B: おもり(2-3g), C: ドップラー血流計プローブ, D: ラット右後肢下腿部, E: NMR測定台, 詳細は本文を参照。

は、レーザードップラー血流計 (Advance 社製 Laser Flowmeter ALF21RD) にて、ラット右後肢下腿背側部 ^{31}P -NMR スペクトル観測領域と対応する部位で行った。まず、ラットをベントバルビタールナトリウム ($0.5\text{mg}/\text{kg}$) 腹腔内投与により麻酔後、ラットの右後肢下腿背側中央を切開し腓腹筋を露出させ、レーザードップラー血流計プローブが腓腹筋直下に位置するようにラットを自家製 NMR 用測定台に固定した。レーザードッ

プラー血流計プローブを自家製シーソー (アクリル製) の一端に固定し、シーソーの另一端におもりをのせることにより、腓腹筋に対して常に 2-3g 重の圧で密着するように調節した。測定中は、露出した筋が乾燥しないよう周囲をポリエチレンで覆った。なお、レーザードップラー血流計からの出力は、インターフェースモジュールである UIM 100 (BIOPAC Systems 社製, USA) を介し、取込みハードディスクである MP100 (BIOPAC Systems 社製, USA) へと送られ、さらにシリアルケーブルを介して Power Book 150 (Apple computer 社製, USA) のハードディスク上に保存された。データ取込みは 1 秒間に 10 ポイントとして行った。なお、データの取込み及び解析は、MP100 の付属ソフト (Acqknowledge) を用いて行った。

反応速度測定

^{31}P -NMR スペクトルと筋血流量比測定の結果より、 PCr , ATP , pHi および筋血流量比が安定すると考えられる再灌流後 80 分以降 (以下、再灌流後定常状態とする) において、ラット骨格筋の CK 反応の正方向への反応速度 (V_{for}) を in vivo ^{31}P -NMR 飽和移動法にて測定した。測定は、コントロール群 ($n=10$, 以下 Cont とする), IR_{120} ($n=10$), IR_{150} ($n=10$) の 3 群で行い、虚血-再灌流法および測定部位は ^{31}P -NMR スペクトル測定と同様に行った。今回用いた in vivo ^{31}P -NMR 飽和移動法のパルスシーケンスを Fig. 4 に示した。CK 反応の正方向への見かけ上の 1 次反応速

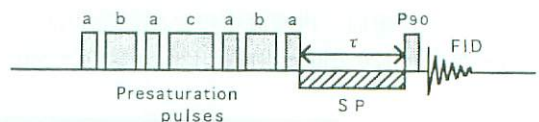


Fig. 4 ^{31}P -NMR 飽和移動法パルスシーケンス

Presaturation pulses はそれぞれ, a: 10usec, b: 20usec, c: 30usec の RF パルスで構成され、また各 Presaturation pulse の後に gradient pulse を照射した。SP: 飽和パルス, τ : interpulse delay, P_{90} : 10usec の RF パルス, FID: free induction decay。

度定数 (k_{for}) は、以下の式 (3, 4) から求めた^{9, 10)}

$$T_1 = T_1^* (M_0 / M_\infty) \quad (3)$$

$$k_{for} = 1/T_1^* - 1/T_1 \quad (4)$$

T_1^* は、PCr の見かけ上の縦緩和時間と呼ばれ、これは飽和パルス (saturation pulse, 以下 SP とする) を選択的に ATP (γ -P) ピークに照射し、見かけ上 ATP (γ -P) ピークが消失した状態で測定される PCr の縦緩和時間である。SP は、presaturation pulses と P_{90} (10usec の RF パルス) の間 (interpulse delay, 以下 τ とする) に照射した (Fig. 4)。また、各 presaturation pulse の後には gradient pulse を照射した。加算回数はそれぞれ、 τ が 0.6sec および 1.2sec で 128 回、2.4sec, 3.0sec, 6.0sec で 64 回、12.0sec で 32 回とした。異なる τ での PCr のピーク面積を、それぞれの加算回数で除し、得られた値を以下の式 (5) でカーブフィッティングして T_1^* を求めた。

$$M(PCr) = M_\infty \{1 - \exp(-t/T_1^*)\} \quad (5)$$

M_0 は、SP を照射せずかつ十分に緩和した状態での PCr のピーク面積であるが、SP を選択的に ATP (γ -P) ピークへ照射した場合、PCr ピークの一部も飽和させてしまうことから、これを補正する目的で M_0 は SP を +2.5ppm の位置へ照射し τ を 12sec とし測定された。

M_∞ は式 (5) より得られた値を用いた。また、 T_1 は PCr の本来の縦緩和時間である。CK 反応の正方向への反応速度 (V_{for}) は以下の式 (6) により求めることができる。

$$V_{for} = k_{for} [PCr] \quad (6)$$

なお、Bittle らの報告より、ラット骨格筋 (腓腹筋) 内の PCr 濃度を 35mM とし、各定常状態における相対濃度を概算した¹¹⁾。

統計解析

統計解析には統計解析ソフト Visual Stat (Stat Soft 社製, USA) を使用した。検定法は、反応

速度測定に一元配置分散分析を、その他の経時的データに経時型二元配置分散分析を用い、これらの中で有意差の認められたものにはさらに Tukey 法を用いて検定を行った。検定は有意水準 5% として行った。また、重回帰分析の決定係数 (R^2) は各時点の平均値を用いた。なお、すべてデータは平均値 $\pm$ 標準誤差 (mean $\pm$ S.E.) で表した。

結 果

^{31}P -NMR スペクトル

IR_{150} の安静時、虚血時および再灌流時の典型的な ^{31}P -NMR スペクトルを Fig. 5 a-c に示した。

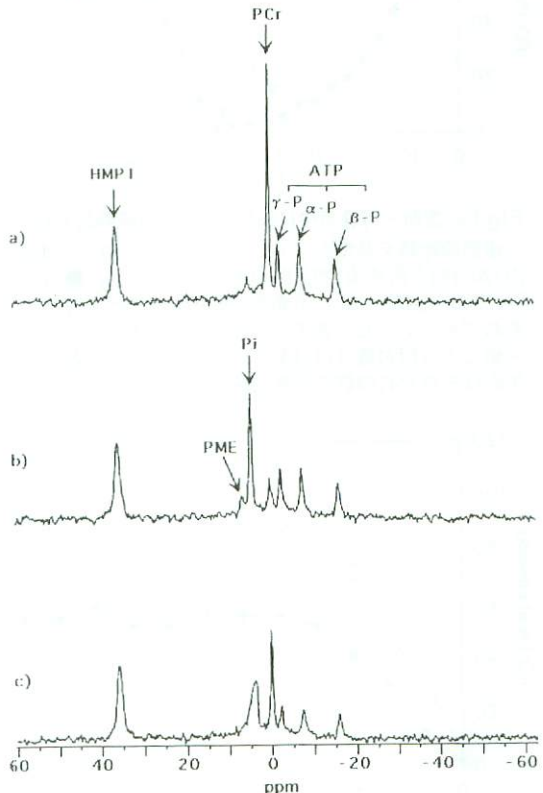


Fig. 5 ^{31}P -NMR スペクトル

IR_{150} の a) : 安静時, b) : 虚血時, c) : 再灌流時の典型的なスペクトルを示す。HMPT, PCr, ATP (γ -P, α -P, β -P) のピークは、それぞれ 36.0ppm, 0 ppm, -2.4ppm, -7.5ppm, -16.0ppm に、また PME および Pi は 6.0-6.5ppm と 4.0-5.0ppm の範囲にそれぞれ観察された。

安静時には, HMPT, PCr, ATP (γ -P, α -P, β -P) のピークが観察され, 虚血および再灌流中では PME (phosphomonoester) と Pi のピークが認められた. しかし, 虚血および再灌流中の PME および Pi ピークは互いに重なり合っており, それらのピーク面積を測定することは困難で

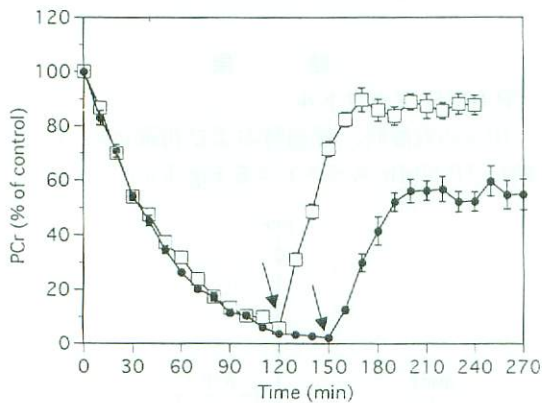


Fig. 6a 虚血-再灌流中における PCr の経時の変化

虚血開始時を基準として, IR_{120} ($\square$, $n=9$) では虚血120分間と再灌流120分間のデータを, IR_{150} ($\bullet$, $n=9$) では虚血150分間と再灌流120分間のデータをそれぞれプロットした. 各データは虚血前値をコントロール値とする相対値 (百分率, $\text{mean} \pm \text{S.E.}$) で表した. 矢印はそれぞれの群の再灌流開始を示している.

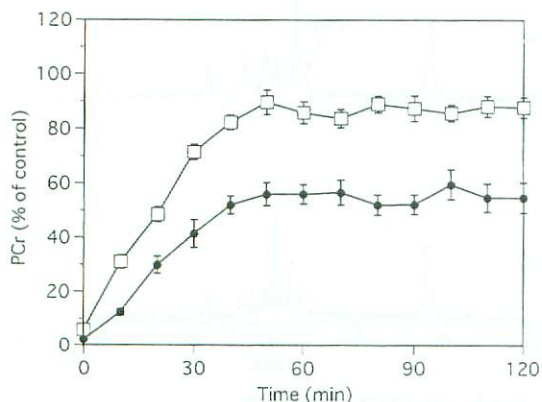


Fig. 6b 再灌流中における PCr の経時の変化

再灌流開始時を基準として, IR_{120} ($\square$, $n=9$) および IR_{150} ($\bullet$, $n=9$) の再灌流120分間のデータをそれぞれプロットした. 各データは虚血前値をコントロール値とする相対値 (百分率, $\text{mean} \pm \text{S.E.}$) で表した.

あった. ^{31}P -NMR スペクトルにより測定された IR_{120} ($\square$, $n=9$) および IR_{150} ($\bullet$, $n=9$) の PCr と ATP (β -P) の経時の変化をそれぞれ Fig. 6 a-b と Fig. 7 a-c に, また pHi の経時の変化を Fig. 8 a-b に示した.

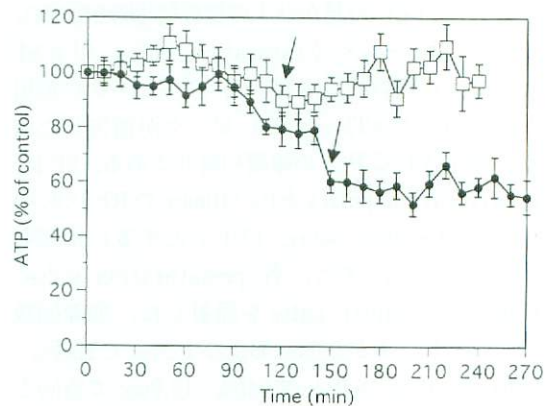


Fig. 7a 虚血-再灌流中における ATP の経時の変化

虚血開始時を基準として, IR_{120} ($\square$, $n=9$) では虚血120分間と再灌流120分間のデータを, IR_{150} ($\bullet$, $n=9$) では虚血150分間と再灌流120分間のデータをそれぞれプロットした. 各データは虚血前値をコントロール値とする相対値 (百分率, $\text{mean} \pm \text{S.E.}$) で表した. 矢印はそれぞれの群の再灌流開始を示している.

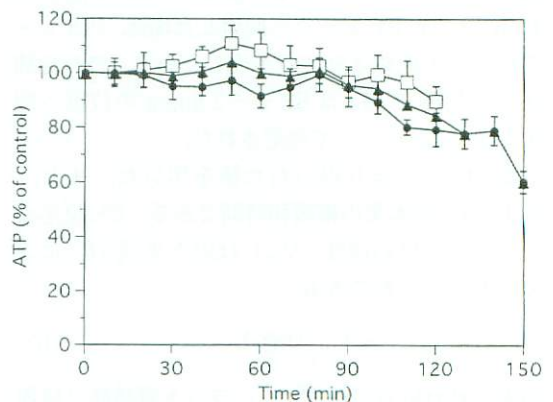


Fig. 7b 虚血120分間における ATP の経時の変化

虚血開始時を基準として, IR_{120} ($\square$, $n=9$) では虚血開始から虚血120分までのデータを, IR_{150} ($\bullet$, $n=9$) では虚血開始から虚血150分までのデータを, また, 2群の平均値 ($\blacktriangle$, $n=18$) のデータをそれぞれプロットした. 各データは虚血前値をコントロール値とする相対値 (百分率, $\text{mean} \pm \text{S.E.}$) で表した.

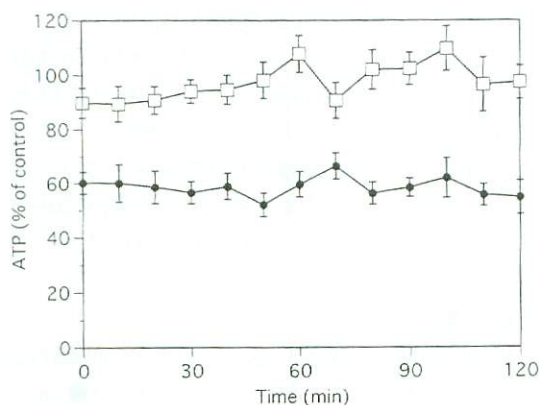
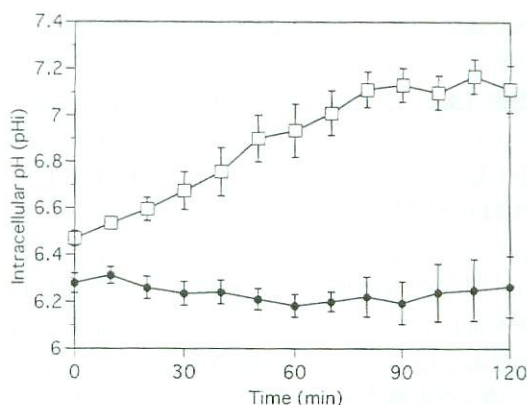
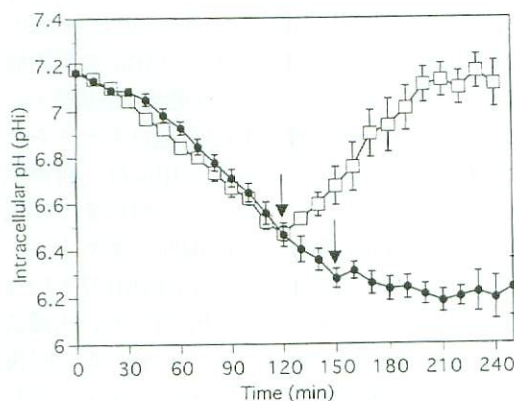


Fig.7c 再灌流中における ATP の経時的変化

再灌流開始時を基準として, IR₁₂₀ (□, n=9) および IR₁₅₀ (●, n=9) の再灌流120分間のデータをそれぞれプロットした. 各データは虚血前値をコントロール値とする相対値 (百分率, mean±S.E.) で表した.


 Fig.8b 再灌流中における pH_i の経時的変化

再灌流開始時を基準として, IR₁₂₀ (□, n=9) および IR₁₅₀ (●, n=9) の再灌流120分間のデータをそれぞれプロットした. 各データは mean±S.E. で表した.


 Fig.8a 虚血-再灌流中における pH_i の経時的変化

虚血開始時を基準として, IR₁₂₀ (□, n=9) では虚血120分間と再灌流120分間のデータを, また IR₁₅₀ (●, n=9) では虚血150分間と再灌流120分間のデータをそれぞれプロットした. 各データは mean±S.E. で表した. 矢印はそれぞれの群の再灌流開始を示している.

PCr について

虚血開始時を基準として, 虚血-再灌流期間中の IR₁₂₀ と IR₁₅₀ の PCr の経時的変化を Fig. 6a に示した. 虚血開始から虚血120分までの期間において2群間に有意な再灌流は認められなかった ($p=0.78$). PCr は虚血開始から指数型の減衰パターンを示した ($R^2=0.99$). 虚血40分の PCr は

平均して $46.3 \pm 1.4\%$ ($n=18$) を示し, 虚血100分では $10.5 \pm 0.8\%$ ($n=18$) であった. また, 虚血120分 ($n=18$) および150分 ($n=9$) では, それぞれ $4.8 \pm 0.4\%$, 2.2 ± 0.4 であった. 次に, 再灌流開始を基準として, IR₁₂₀ と IR₁₅₀ の再灌流後120分間のデータをそれぞれ Fig. 6b にプロットした. 再灌流開始から測定終了時 (再灌流120分) までの期間において, 2群間に有意な差が再灌流が認められた ($p<0.001$). IR₁₂₀ は, 回復速度 $1.7\%/min$ で再灌流50分まで直線的に上昇した後 ($R^2=0.97$), 測定終了時 (再灌流120分) まで定常状態を保った. また, 定常状態における IR₁₂₀ の平均値は $87.1 \pm 1.3\%$ であった. 一方, IR₁₅₀ でも同様に再灌流50分まで直線的な上昇を示し, その回復速度は $1.1\%/min$ であった ($R^2=0.97$). また, 再灌流50分から再灌流120分までは, 平均値 $55.2 \pm 1.9\%$ を示し定常状態を保った.

ATP について

虚血開始時を基準として, 虚血-再灌流期間中の IR₁₂₀ と IR₁₅₀ の ATP の経時的変化を Fig. 7a に, また, 虚血中の IR₁₂₀ および IR₁₅₀ の各データとその平均値 (▲, $n=18$) を Fig. 7b に示した. ただし, Fig. 7b の虚血130-150分では IR₁₅₀ のデータのみを示している. Fig. 7b において, 虚血開始

から虚血120分までの期間で2群間に有意な差は認められなかった ($p=0.50$). 2群のATPの平均値 ($\blacktriangle$) は、虚血開始から虚血80分まではほぼコントロール値を保つが、虚血100分あたりから減少し始め、虚血120分および虚血150分ではそれぞれ $84.6 \pm 4.2\%$ ($n=18$), $60.2 \pm 4.0\%$ ($n=9$) を示した. また、虚血140-150分では $79.1 \pm 5.3\%$ ($n=9$) から $60.2 \pm 4.0\%$ ($n=9$) へと急速な低下を示した. なお、虚血120分の IR_{120} は $89.9 \pm 5.5\%$ であった. 次に、再灌流時を基準として、 IR_{120} と IR_{150} の再灌流後120分間のデータをそれぞれ Fig. 7c に示した. 再灌流開始から再灌流120分までの期間において、2群間に有意な差が認められた ($p<0.001$). IR_{120} のATPは、再灌流10分 ($89.5 \pm 6.5\%$) から上昇し始め、再灌流50分 ($98.1 \pm 6.7\%$) ではほぼコントロール値にまで回復した. この時、ATPは直線的な上昇傾向を示し、その回復速度は $0.2\%/min$ であった ($R^2=0.96$). また、再灌流50分から測定終了時まで、 IR_{120} は平均値 $100.6 \pm 2.5\%$ を示し定常状態を保った. 一方、 IR_{150} では、再灌流開始から再灌流120分まで全く上昇傾向を示さずほぼ定常状態を保った. また、この定常状態における IR_{150} の平均値は $58.3 \pm 1.4\%$ であった.

pHi について

虚血開始時を基準として、虚血-再灌流期間中の IR_{120} と IR_{150} のpHiの経時的変化を Fig. 8a に示した. 安静時におけるラット骨格筋のpHiは平均して 7.18 ± 0.01 ($n=18$) であった. 虚血開始から虚血120分までの期間において2群間に有意な差は認められなかった ($p=0.53$). pHiは虚血開始から直線的に減少し ($R^2=0.99$), 虚血120分および虚血150分ではそれぞれ平均して 6.47 ± 0.03 ($n=18$), 6.28 ± 0.04 ($n=9$) であった. 次に、再灌流時を基準として、 IR_{120} と IR_{150} の再灌流後120分間のデータをそれぞれ Fig. 8b に示した. 再灌流開始から再灌流120分までの期間において、2群間に有意な差が認められた ($p<0.001$). IR_{120} のpHiは再灌流80分 (7.11 ± 0.05) まで直線

的に上昇し、その回復速度は $0.08\text{pH}/10\text{min}$ であった ($R^2=0.99$). しかし、その後再灌流120分まではほぼ一定値を示し、その平均値は 7.12 ± 0.04 であった. 一方、 IR_{150} では再灌流後も全く回復傾向を示さず、ほぼ定常状態を保っていた. なお、再灌流開始から測定終了時 (再灌流120分) までの IR_{150} の平均値は 6.24 ± 0.02 であった.

筋血流量比

虚血開始時を基準として、ドップラー血流計により測定された IR_{120} ($\square$, $n=7$) と IR_{150} ($\bullet$, $n=7$) の筋血流量比の経時的変化を Fig. 9a に示した. IR_{120} および IR_{150} の虚血10分の筋血流量比はそれぞれコントロール値の $4 \pm 1\%$, $3 \pm 0\%$ にまで低下していた. 虚血10分から虚血120分までの筋血流量比の平均値は2群とも $2 \pm 0\%$ を示し、2群の間に有意な差は認められなかった ($p=0.49$). なお、虚血120分から150分までの IR_{150} の平均値は $2 \pm 0\%$ であった. 次に、再灌流時を基準として、 IR_{120} と IR_{150} の再灌流後120分間のデータをそれぞれ Fig. 9b にプロットした. IR_{120} は、再灌流10分 ($122 \pm 14\%$) でコントロール値にまで回復し、さらに再灌流60分 ($136 \pm 34\%$) まで上昇した. また、再灌流60-120分では平均値 $137 \pm 12\%$ でほぼ定常状態を保った. 一方、 IR_{150} は、再灌流30分 ($108 \pm 26\%$) でコントロール値にまで回復し、さらに再灌流50分 ($137 \pm 35\%$) まで上昇した. また、再灌流50-120分では平均値 $136 \pm 7\%$ を示しほぼ定常状態を保った. IR_{120} および IR_{150} のコントロール値への回復速度は、それぞれ $12\%/min$ ($R^2=0.99$), $4\%/min$ ($R^2=0.97$) であり、再灌流後20分間では2群間に有意な差が認められたが ($p<0.05$), 再灌流開始から再灌流120分の期間においては2群間に有意な差は認められなかった ($p=0.31$).

反応速度 (V_{for})

^{31}P -NMR飽和移動法により得られた典型的なスペクトルと、式(5)によるカーブフィッティングのグラフを Fig. 10a-b に示した. また、Cont

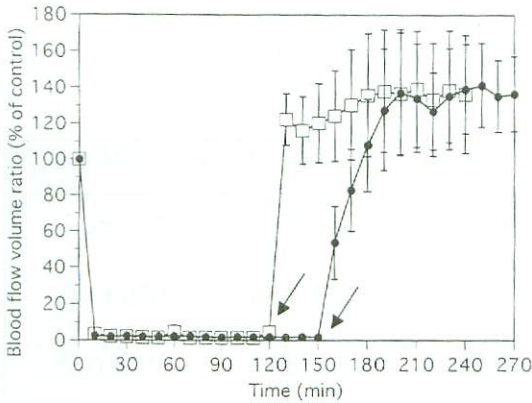


Fig.9a 虚血-再灌流中における筋血流量比の経時的変化

虚血開始時を基準として、 IR_{120} ($\square$, $n=7$) では虚血120分間と再灌流120分間のデータを、また IR_{150} ($\bullet$, $n=7$) では虚血150分間と再灌流120分間のデータをそれぞれプロットした。各データは虚血前値をコントロール値とする相対値(百分率, $\text{mean} \pm \text{S.E.}$)で表した。矢印はそれぞれの群の再灌流開始を示している。

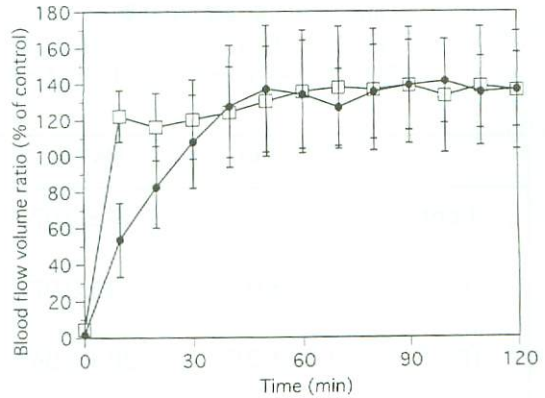


Fig.9b 再灌流中における筋血流量比の経時的変化

再灌流開始時を基準として、 IR_{120} ($\square$, $n=7$) および IR_{150} ($\bullet$, $n=7$) の再灌流120分間のデータをそれぞれプロットした。各データは虚血前値をコントロール値とする相対値(百分率, $\text{mean} \pm \text{S.E.}$)で表した。

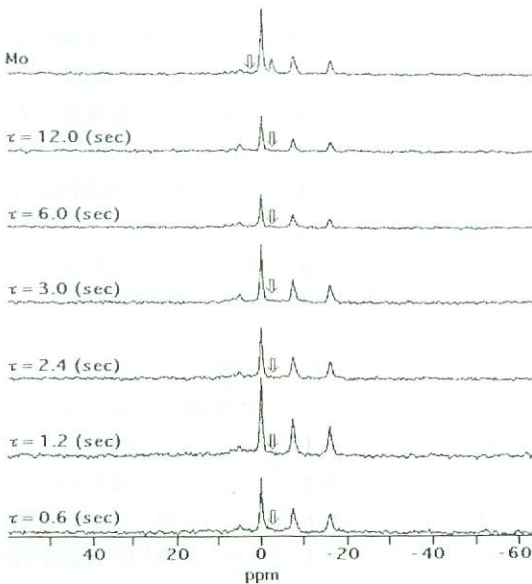


Fig.10a ^{31}P -NMR 飽和移動法により得られたスペクトル

矢印($\downarrow$)はSP照射部位を示す。Moでは+2.4ppmに、それ以外は-2.4ppm (ATP (γ -P)) に照射した。詳細は本文参照。

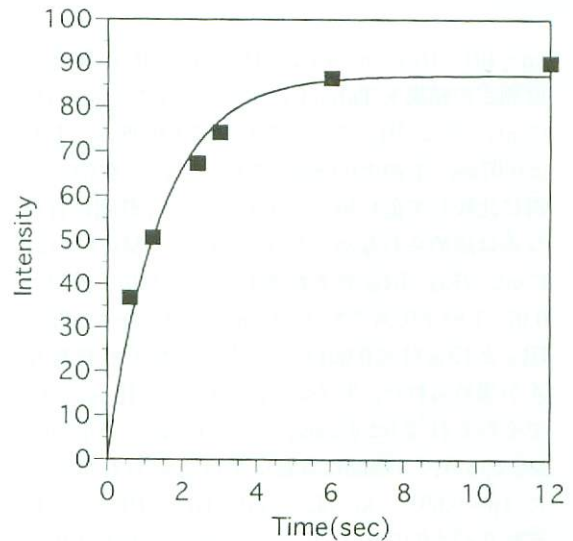


Fig.10b T_1^* 測定のためのカーブフィッティング

^{31}P -NMR 飽和移動法により測定された異なる τ での PCr のピーク面積を、式 (5) によりカーブフィッティングした図を示す。詳細は本文参照。

Table 1 反応速度測定結果

Cont (n=10), IR₁₂₀ (n=10), IR₁₅₀ (n=10) の T_1^* , M_0/M_∞ , T_1 , k_{for} , V_{for} の値をそれぞれ示す。なお、各データは mean $\pm$ S.E. で表している。

	T_1^* (sec)	M_0/M_∞	T_1 (sec)	k_{for} (sec ⁻¹)	V_{for} (mM $\cdot$ sec ⁻¹)
Cont	1.24 $\pm$ 0.05	2.14 $\pm$ 0.07	2.6 $\pm$ 0.2	0.43 $\pm$ 0.02	15.2 $\pm$ 0.7
IR ₁₂₀	1.07 $\pm$ 0.07	2.29 $\pm$ 0.07	2.4 $\pm$ 0.2	0.54 $\pm$ 0.03 ^b	16.6 $\pm$ 1.0
IR ₁₅₀	1.29 $\pm$ 0.08	1.88 $\pm$ 0.04 ^a	2.4 $\pm$ 0.2	0.37 $\pm$ 0.02	7.2 $\pm$ 0.5 ^c

(mean $\pm$ S.E.)a : $p < 0.05$ (対Cont) , $p < 0.001$ (対IR₁₂₀)b : $p < 0.05$ (対Cont) , $p < 0.001$ (対IR₁₅₀)c : $p < 0.001$ (対Cont) , $p < 0.001$ (対IR₁₅₀)

(n=10), IR₁₂₀ (n=10), IR₁₅₀ (n=10)の反応速度測定の結果を Table 1 に示した。 T_1^* (sec) は、Cont, IR₁₂₀, IR₁₅₀ でそれぞれ 1.24 $\pm$ 0.05sec, 1.07 $\pm$ 0.07sec, 1.29 $\pm$ 0.08sec であり、IR₁₂₀ が他の 2 群に比較して低い値を示すものの、3 群間に有意な差は認められなかった ($p=0.07$)。 M_0/M_∞ は、Cont, IR₁₂₀, IR₁₅₀ でそれぞれ 2.14 $\pm$ 0.07, 2.29 $\pm$ 0.07, 1.88 $\pm$ 0.04 であり、Cont と IR₁₅₀ ($p < 0.05$)、IR₁₂₀ と IR₁₅₀ ($P < 0.001$) との間でそれぞれ有意な差が認められた。 T_1 (sec) は、Cont, IR₁₂₀, IR₁₅₀ でそれぞれ 2.6 $\pm$ 0.2 sec, 2.4 $\pm$ 0.2 sec, 2.4 $\pm$ 0.2 sec であり、3 群間に有意な差は認められなかった ($p=0.60$)。 k_{for} は、Cont, IR₁₂₀, IR₁₅₀ でそれぞれ 0.43 $\pm$ 0.02sec⁻¹, 0.54 $\pm$ 0.03sec⁻¹, 0.37 $\pm$ 0.02 sec⁻¹ であった。 Cont と IR₁₂₀ ($p < 0.05$)、IR₁₂₀ と IR₁₅₀ ($p < 0.001$) の間でそれぞれ有意な差が認められた。

IR₁₂₀ および IR₁₅₀ の再灌流後定常状態での PCr は、それぞれコントロール値の 87.1 $\pm$ 1.3%, 55.2 $\pm$ 1.9% であった (Fig. 6b, 7b)。これらの結

果から Cont, IR₁₂₀, IR₁₅₀ のコントロール値のそれぞれ 100%, 87%, 55% と仮定して各群での PCr 濃度を概算し、反応速度 (V_{for}) を算出した (式 6)。 V_{for} (mM $\cdot$ sec⁻¹) は cont, IR₁₂₀, IR₁₅₀ でそれぞれ 15.2 $\pm$ 0.7mM $\cdot$ sec⁻¹, 16.6 $\pm$ 1.0mM $\cdot$ sec⁻¹, 7.2 $\pm$ 0.5mM $\cdot$ sec⁻¹ であった。

また、Cont と IR₁₅₀ ($p < 0.001$)、IR₁₂₀ と IR₁₅₀ ($p < 0.001$) の間でそれぞれ有意な差が認められた。

考 察

本研究は、 ^{31}P -NMR 飽和移動法を用いたラット骨格筋の CK 反応の正方向への反応速度 (V_{for}) を測定した。他の報告からすると、安静時のラット骨格筋より得られた T_1^* と M_0/M_∞ ではその値にかなりのばらつきが見られ、最終的に算出される T_1 および k_{for} は、それぞれ 2-5 sec, 0.2-0.5 sec⁻¹ の範囲にある^{10, 11, 14, 15}。本研究で得られたコントロール群の T_1 は、これらと比較するとやや低い値を示すものの k_{for} はほぼ一致していた。これらの数値のばらつきは、測定条件、特にパルスシー

ケンスの違いによるものと考えられるが、通常、サーフェイスコイルを用いた生体系での実験では正確な 90° パルスの測定が困難であることから、結果として算出される反応速度 (V_{for}) に差が生じることが予想される。本研究では、PCrの縦緩和時間をより正確に測定し、かつ、より少ないパワーのSPでATP (γ -P) ピークを飽和させるために、まず初めに presaturation pulses および gradient pulses を照射し、見かけ上すべてのピークを飽和させ、 τ の期間に回復する信号のみを観測し行った。しかし、本研究では他のパルスシーケンスとの比較は行っておらず、正確な反応速度 (V_{for}) の測定は今後より詳細な検討が必要であると考えられる。一方、CK 反応の負方向への反応速度 (V_{rev}) は、Yoshizaki らが述べているように ATP の分画化や他の反応経路の関与があるため ^{31}P -NMR 飽和移動法で決定することはできず、本研究においても測定は行っていない¹²⁾。

通常、ドップラー血流計では骨格筋表層部 (約 1 mm) の血流量しか測定することはできず、その深層部の血流量を知ることはできない。しかしながら、サーフェイスコイルを用いた本研究では ^{31}P の信号を骨格筋表層部 (約 3 mm) の領域から受信していることから、得られた高エネルギーリン酸化合物と筋血流量比の経時的変化はほぼ対応するものと考えた。

虚血期間中、 IR_{120} および IR_{150} の筋血流量比は共にコントロール値の $2 \pm 0\%$ にまで低下していたことから、本研究で用いた駆血方法はラット骨格筋に対して十分な虚血負荷を与えていたものと考えられる。これは、PCr および pH_i が虚血開始より減少し始めたことから支持される。嫌気的条件下において、ATP は主に PCr および解糖系から供給されるため、虚血状態では PCr と pH_i の低下が観察される。本研究では虚血開始に伴い PCr は指数関数的に、また pH_i は直線的な減少を示した。一方、ATP は虚血90分まではほぼコントロール値を保っており、この時点まで、CK 反応を介した PCr からの ATP 供給は十分に保たれていたことが示唆される。これは、筋収縮負荷中

においても ATP は減少せずほぼ一定値を保つという実験結果と一致する^{8,16)}。しかし、ATP は PCr がコントロール値の約10%にまで低下した虚血開始100分あたりから減少を開始し、PCrからのエネルギー供給は徐々に低下し始めたことが示唆された。虚血期間中のPCr とATP および pH_i の経時的変化は、他の報告とほぼ一致していたが、その減少速度は本研究の方が速い傾向にあった^{4,17)}。これは、本研究で用いた駆血法がラット骨格筋に対してより厳しい虚血負荷を与えたためであると推測されるが、他の研究で用いられたラット (Sprague Dawley rat) は本研究で用いた系統 (Wistar rat) と異なっており、測定部位の筋線維タイプ (遅筋および速筋) の構成の差異がその原因である可能性も否定できない^{4,7,17)}。再灌流後20分間の筋血流量比では、 IR_{120} と IR_{150} との間に有意な差が認められ、コントロール値への回復速度は IR_{150} の方が IR_{120} よりも低いという結果を得た。放射性物質 (radiolabeled microspheres) を用いた Hardy らの実験によれば、虚血-再灌流後における筋血流量の回復の遅延は "low reflow" と呼ばれ、これは先行する虚血時間に比例して増加し、虚血5時間まで正常状態に回復すると報告している⁹⁾。レーザードップラー血流計で測定された IR_{150} の回復速度の低下もこの "low reflow" である可能性が示唆される。しかしながら、再灌流120分間において2群間に有意な差が認められなかったことから、再灌流後の2群の筋血流の回復はほぼ同等であると考えられた。一方、再灌流後定常状態における筋血流量比は、2群ともコントロール値の約1.4倍にまで上昇していたが、その反応機序の詳細は明らかではない。

再灌流後定常状態において、 IR_{120} の PCr と ATP および pH_i は、再灌流70-80分でほぼコントロール値にまで回復した。この結果は、本研究と同様の実験を行った他の報告とよく一致していた^{4,7)}。一方、 IR_{150} では PCr、ATP、pH_i のいずれもコントロール値にまで回復することなく、再灌流後60分以降、定常状態を保っていた。 IR_{150} における再灌流後の細胞内の酸性化は、乳酸の wash out の

低下もしくは嫌氣的解糖系の亢進がその主な原因であると考えられるが、本研究ではその詳細を検討することはできない。再灌流120分間において、2群の筋血流量比に有意な差が認められないにも関わらず、 IR_{150} の高エネルギーリン酸化合物は不完全な回復を示した。これは細胞内の酸化的リン酸化能の低下を示唆するもので、ミトコンドリアの障害、反応物質および酵素の減少等が生じていると推測される。LindsayらHPLC (high-performance liquid chromatography) 法を用いた犬骨格筋の虚血-再灌流実験(虚血4時間と5時間)によれば、虚血中に分解されたATPの前駆物質は、再灌流に伴い細胞外に流出し、再度ATP合成に利用することはできないとしており¹⁸⁾、また、Idströmらのラット骨格筋を用いた実験(虚血2, 4, 6時間)においても同様の結果を報告している⁷⁾。虚血期間中、ATPはADPとAMPを介してadenosine, inosine, IMP (inosine 5'-monophosphate), hypoxanthine, xanthineなどの前駆物質に分解されるが、HPLC法および ^{31}P -NMR法を用いたSoussiらの実験によれば、虚血中のラット骨格筋から得られたスペクトルのPME (phosphomonoester) ピークには、IMPが強く関与していると考察しており、本研究においてもPMEピークは、虚血および再灌流中にほぼすべてのスペクトルに観察された⁹⁾。 IR_{150} の高エネルギーリン酸化合物の不完全な回復は、ATP前駆物質の流出による反応物質の減少が原因であると推測される。また、虚血期間中、前駆物質であるhypoxanthineおよびxanthineの細胞内への蓄積や、エネルギー供給の低下による細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇は、再灌流に伴うfree radicalsの生成に大きく関与すると言われており、その生成されたfree radicalsは、強力な酸化力で細胞膜および準細胞膜を脂質酸化し、細胞に種々の損傷を与えるとされている¹³⁾。本研究においてもfree radicalsによる細胞損傷の可能性があり、これらが IR_{150} の不可逆的な回復を説明できるかもしれない。

虚血-再灌流後のラット骨格筋のエネルギー代

謝をさらに検討するために、再灌流後定常状態におけるCK反応の正方向への反応速度(V_{for})を求めた。 IR_{150} の反応速度(V_{for})はコントロール群および IR_{120} に比較して有意に低い値を示していたことから、細胞内の正味のエネルギー回転速度は IR_{150} において低下していることが示唆された。反応速度(V_{for})の低下の原因として、pHiの低下あるいは反応物質の減少等が挙げられる。反応物質の減少については上記で述べたと同様であるが、ウサギの筋creatinekinaseを用いたWilliamsらのin vitro実験によれば、 k_{for} はPiに関係なくpHの低下により著しく低下したことから、CK反応の速度の減少はpHの低下によるものと考察している¹⁹⁾。しかし、カエル骨格筋を用いたYoshizakiらの実験によれば、反応速度(V_{for})はpHi (pH6.8-7.2)に関係なく一定であったことから、pHiだけでは生体系の酵素活性を説明することはできないとしており¹²⁾、その見解は一致していない。結果として、本研究では反応速度(V_{for})の低下の原因を詳細に検討することはできなかった。しかしながら、細胞内のエネルギー回転速度は、高エネルギーリン酸化合物の動態に深く関与していると考えられることから、反応速度(V_{for})の著しい低下は、高エネルギーリン酸化合物の不完全な回復に寄与しているものと推測された。

ラット骨格筋を用いた他の報告では、虚血2時間、4時間および6時間の虚血負荷で比較検討する場合が多く、通常、虚血4時間で高エネルギー酸化合物の不完全な回復が認められる^{4, 7, 17)}。しかし、本研究において虚血150分間ですでにPCr, ATP, pHiの不完全な回復が観察されたことから、再灌流後のエネルギー状態は、虚血時間というよりはむしろ虚血中のエネルギー状態に依存すると考えられた。また、その原因として本研究では、虚血時間120分と150分との間におけるATPの減少が大きく関与しているものと考えた。虚血中のATPの低下つまりATP前駆物質の増加は、再灌流に伴う流出をより多く受ける可能性があり、結果として再灌流後の高エネルギーリン酸化合物の

不完全な回復を引き起こすものと推測された。また、反応速度 (V_{for}) の低下はATPの不完全な回復に関与するものと考えられた。今後、このような変化を引き起こす詳細なメカニズムの解明が必要であると考えられる。

謝 辞

稿を終えるにあたり、多大なる御助言を頂きました明治鍼灸大学脳神経外科教室田中忠蔵教授、東洋医学基礎鍼灸学教室 篠原 鼎 講師に深謝いたします。

参考文献

- 1) J. N. Crinnion, S. Homer-Vanniasinkam, M. J. Gough : Skeletal muscle reperfusion injury : Pathophysiology and clinical considerations. *Cardiovasc Surg*, **1** : 317-324, 1993.
- 2) B. B. Rubin, S. Liauw, J. Tittley, et al : Prolonged adenosine nucleotide resynthesis and reperfusion injury in postischemic skeletal muscle. *Am J Physiol*, **262** : H1538-H1547, 1992.
- 3) F. Sabido, V. J. Milazzo, R. W. Hobson, et al : Skeletal muscle ischemia-reperfusion injury : A review of endothelial cell-leukocyte interactions. *J Invest Surg*, **7** : 39-47, 1994.
- 4) B. Soussi, J. -P. Idström, A. -C. Bylund-Fellenius, et al : Dynamics of skeletal muscle energetics during ischemia and reperfusion assessed by in vivo ^{31}P NMR. *NMR Biomed*, **3** : 71-77, 1990.
- 5) C. E. Murry, V. J. Richard, K. A. Reimer, et al : Ischemic preconditioning slows energy metabolism and delays ultrastructural damage during a sustained ischemic episode. *Circ Res*, **66** : 913-931, 1990.
- 6) S. C. Hardy, S. Homer-Vanniasinkam, M. J. Gough : The triphasic pattern of skeletal muscle blood flow in reperfusion injury. An experimental model with implications for surgery on the acutely ischemic lower limb. *Eur J Vasc Surg*, **4** : 587-590, 1990.
- 7) J. -P. Idström, B. Soussi, A. Elander, et al : Purine metabolism after in vivo ischemia and reperfusion in rat skeletal muscle. *Am J Physiol*, **258** : H1668-H1673, 1990.
- 8) M. J. Dawson, D. G. Gadian, D. R. Wilkie : Contraction and recovery of living muscles studied by ^{31}P nuclear magnetic resonance. *J Physiol*, **267** : 703-735, 1977.
- 9) D. G. Gadian, G. K. Radda : The activity of creatine kinase in frog skeletal muscle studied by saturation-transfer nuclear magnetic resonance. *Biochem J*, **194** : 215-228, 1981.
- 10) E. Le. Rumeur, L. Le Moyec, J. D. De Certeaux : Creatine kinase activity in rat skeletal muscle with intermittent tetanic stimulation. *Magn Reson Med*, **24** : 335-342, 1992.
- 11) J. A. Bittl, J. DeLayre, J. S. Ingwal : Rate equation for creatine kinase predicts the in vivo reaction velocity : ^{31}P NMR surface coil studies in brain, heart, and skeletal muscle. *Biochem*, **26** : 6083-6090, 1987.
- 12) K. Yoshizaki, H. Nishikawa, S. Naruse : Effect of anaerobic metabolic changes on the creatine kinase reaction in frog muscle studied by ^{31}P saturation transfer NMR. *NMR in Biomedicine*, **4**, 25-30, 1994.
- 13) S. P. Bessman, P. J. Geiger : Transport of energy in muscle: The phosphorylcreatine shuttle. *Science*, **211** : 448-452, 1981.
- 14) E. A. Shoubridge, J. L. Bland, G. K. Radda : Regulation of creatine kinase during steady-state isometric twitch contraction in rat skeletal muscle. *Biochim. Biophys. Acta*, **805** : 72-78, 1984.
- 15) K. M. Brindle, M. J. Blackledge, R. A. J. Calliss, et al : ^{31}P NMR magnetization-transfer measurements of ATP turnover during steady-state isometric muscles contraction in the rat hind limb in vivo. *Biochem*, **28** : 4887-4893, 1989.
- 16) M. L. Blei, K. E. Conley, M. J. Kushmerick : Separate measures of ATP utilization and recovery in human skeletal muscle. *J Physiol*, **465** : 203-222, 1993.
- 17) K. Lergewall, P. Daneryd, T. Scherstén, et al : In vivo ^{31}P nuclear magnetic resonance evidence of the salvage effect of ascorbate on the postischemic reperfused rat skeletal muscle. *Life Sciences*, **56** : 389-397, 1995.
- 18) T. Lindsay, S. Liauw, A. D. Romaschin, et al : The effect of ischemia/reperfusion

- on adenine nucleotide metabolism and xanthine oxidase production in skeletal muscle. *J Vasc Surg*, 12 : 8-15, 1990.
- 19) G. D. Williams, B. Enders and M. B. Smith: Effect of pH and inorganic phosphate on creatine kinase inactivation: An in vitro ^{31}P NMR saturation-transfer study. *Biochem Int*, 26 : 35-42, 1992.

In Vivo ^{31}P -NMR Study of Energy Metabolism in Rat Skeletal Muscle during Ischemia and Reperfusion

SHINBARA Hisashi¹, UMEDA Masahiro², NISHIKAWA Hironobu¹

¹ Department of Physiology, Graduate School of Acupuncture and Moxibustion,
Meiji University of Oriental Medicine

² Department of Neurosurgery, Meiji University of Oriental Medicine

Summary: High-energy phosphate compounds (PCr, ATP) and intracellular pH (pHi) in two groups undergoing ischemia for 120 min or 150 min were observed by in vivo ^{31}P -NMR spectroscopy, and the forward reaction velocity of the creatine kinase reaction (V_{for}) during reperfusion was measured by in vivo ^{31}P -NMR saturation transfer. Under the same protocol, muscle blood flow was also monitored using a laser Doppler flow meter.

The facts suggest that recovery of high-energy phosphate compounds and pHi during reperfusion may be related to a decrease in ATP between 120 and 150 min after the onset of ischemia and that the fall in the forward reaction velocity (V_{for}) during reperfusion may contribute to incomplete recovery of ATP.