The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	NMRにて観測されない心筋細胞内ATPとその阻血時の変動
Author(s)	高見, 宏
Citation	大阪大学, 1988, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/36509
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

【35】

氏名・(本籍)	高見　宏（たかみ　ひろし）
学位の種類	医学博士
学位記番号	第　8271　号
学位授与の日付	昭和63年6月9日
学位授与の要件	学位規則第5条第2項該当
学位論文題目	**NMRにて観測されない心筋細胞内ATPとその阻血時の変動**
論文審査委員	(主査) 教授　川島　康生 (副査) 教授　田川　邦夫　　教授　多田　道彦

論文内容の要旨

〔目　的〕

心筋細胞内 adenosine triphosphate（ATP）は従来化学的方法により測定され，虚血時における心筋 viability の指標として用いられてきたが，心筋ATP量と再灌流時の心機能との相関性に関しては未だ明確ではない。さらに阻血・再灌流時における心筋ATPの変動も心筋細胞内において均一ではない事（compartmentalization）が示唆されている。この心筋細胞内におけるATPの compartmentalization を把握する事は，阻血時の critical level や再灌流時の機能回復との関連性を検討するうえで重要と考えられるがその詳細は未だ不明である。一方 high energy phosphate（HEP）の測定において化学的測定法は心筋内のすべてのHEPを測定するのに対し，燐の核磁気共鳴法（^{31}P－NMR）には運動性の低いタンパク結合型の燐化合物やミトコンドリア内ATP等は観測しない特異性があることが示唆されてきた。本研究は^{31}P－NMR法と化学的測定法を対比する事により心筋細胞内ATPの compartmentalization とその阻血時の変動を明らかにする事を目的とするものである。

〔対象及び方法〕

体重約180 g の雄性 Sprague－Dawley ラットの摘出心を用いてランゲンドルフ灌流を行い，心筋内HEPの測定法により化学的測定群とNMR測定群に分け，正常灌流時および33℃の阻血時における心筋内HEP量を測定した。

心筋内HEPの化学的測定法

正常灌流時（n＝9）および阻血時（n＝3）において，心筋内ATPおよびクレアチン燐酸（Cr－P）をそれぞれ上池および金香等の方法に準じて測定した。即ち心筋を液体窒素にて凍結固定し過塩素

酸による抽出の後，心筋内ＨＥＰを高速液体クロマトグラフィーを用いて測定し心筋乾燥重量あたりのモル数（μmol／g．dry wt.）で表した。

心筋内ＨＥＰのNMR測定法

WM－360NMR spectrometer（Brucker）を用い，正常灌流時における心筋内ＨＥＰの測定（n＝5）に関しては亘等の方法により以下の如く定量化した。まず^{31}P－NMR法にて灌流心内のＡＴＰとCr－Ｐのスペクトルを得てこれを標準溶液と対比した。つぎに同一灌流心の^{23}Na－NMRスペクトルを観測する事により観測視野中における灌流心の細胞内容積比を求め，これにて先に^{31}P－NMRで求めた心筋のＨＥＰ量を補正し細胞内容積あたりのモル数（μmol／mℓ V_{IC}）で表した。さらにsucroseを細胞外スペースマーカーとして用いた灌流実験より心筋の乾燥重量と細胞内容積の比率を求め（n＝5），NMR測定値を心筋乾燥重量あたりのモル数（μmol／g．dry wt.）に換算した。阻血時における心筋内ＨＥＰの測定においては，積算時間１分にて連続的に^{31}P－NMRスペクトルを得て正常灌流時のスペクトルとの比較により心筋内ＨＥＰ量を求めた。

〔結　　果〕

１）正常灌流時における心筋内ＨＥＰ量

正常灌流時におけるＡＴＰとCr－Ｐの化学的測定値はそれぞれ22.4±0.71と22.9±5.1μmol／g．dry wt.であった。一方^{31}P－NMRより求め^{23}Na－NMRにて補正したＡＴＰとCr－Ｐの細胞内容積あたりのモル数は3.38±0.53と5.61±1.41μmol／mℓ V_{IC}であった。sucroseを用いた灌流実験よりこの灌流心における心筋乾燥重量と細胞内容積の比率は0.246±0.037 g．dry wt.／mℓ V_{IC}と求められたため，これより先の値を換算するとNMR測定によるＡＴＰとCr－Ｐはそれぞれ13.7±2.2と22.8±5.8μmol／g．dry wt.となった。このNMR測定によるCr－Ｐ値は化学的測定値と有意差はなかったが，ＡＴＰのNMR測定値は化学的測定値に比し有意に低く（$P<0.01$）その61％であった。

２）阻血時におけるＡＴＰの変動

阻血時には^{31}P－NMR測定におけるＡＴＰのシグナルは次第に減少し阻血開始後16分にて完全に消失した。同時点における化学的測定では5.7±1.7μmol／g．dry wt.のＡＴＰが測定された。すなわちNMR法にてＡＴＰが観測されなくなった時点において化学的測定では正常灌流時の25％のＡＴＰが残存していた。

〔総　　括〕

1．心筋内ＡＴＰを測定するに際しNMR法と化学的測定法を対比させることにより，心筋内ＡＴＰにはNMRにて観測し得る分画（全体の約60％）と観測されない分画（約40％）の二種類の存在様式がある事が明らかとなった。NMRの特徴より前者は細胞質の遊離型として存在し，後者はミトコンドリア内ＡＴＰまたはタンパク結合型ＡＴＰとして存在しているものと推察される。

2．阻血時においてNMRにて観測される細胞質の遊離型ＡＴＰがより早く枯渇したことより，阻血時におけるＡＴＰの減少は心筋細胞内において均一ではないことが示された。

論文の審査結果の要旨

心筋内ＡＴＰ量は阻血時における心筋 viability の指標として広く用いられているが，阻血によるＡＴＰの心筋細胞内における変動は不明であった。本研究は心筋内ＡＴＰの測定において^{31}Ｐ－ＮＭＲスペクトルを定量化するとともに化学的測定値と対比することにより以下の点を明らかにした。すなわち心筋細胞内ＡＴＰにはＮＭＲにて観測される分画と観測されない分画の二種類の存在様式があり，且つ前者は阻血時においてより速く枯渇することが示された。

本研究は従来困難であった^{31}Ｐ－ＮＭＲスペクトルの定量化を可能にするとともに，阻血による心筋障害の機序を解明し心筋保護法を確立する上で重要な知見を与えるものと考えられる。