

# 1. 虚血と生化学的变化

小沢高将\*

循環障害のモニタリングということに関しては、当然モニターすべき対象となるものとそれを測定するシステムの両者が問題になる。虚血に伴う臓器障害は多面的であり、モニターの対象となる物質の変化は数多くある。それぞれに対しいろいろな測定系が考えられている。その全部についてここで触れるのは出来ない所以ここでは、われわれが最近研究している虚血によるミトコンドリア障害について紹介したい。虚血によりミトコンドリアの機能が損われることは古くから知られた事実である。しかしこの障害がどういった機序で起こってくるかに関しては、まだ必ずしも十分解明されていない。われわれはここに2つの実験モデルを用い、特に心筋ミトコンドリアが行っている脂肪酸の燃焼の障害からくる機能障害とミトコンドリアにおけるミトコンドリア膜自身の脂質代謝の変化の2つを紹介したい。

## 1. ミトコンドリアの脂肪酸代謝の障害

心筋は主として脂肪酸をエネルギー源として燃焼している臓器である。心筋は必要なエネルギーの約60~70%を脂肪酸の燃焼から得ている<sup>1)</sup>。ところが虚血時では当然酸素の供給が不足する。一方脂肪酸の燃焼はミトコンドリアにおいてすべて好氣的に行われるので、酸素の供給が不足すると脂肪酸のβ酸化の進行が阻げられる。図1に示したように脂肪酸はまず細胞の中に入りアシルCoAとなり、ついでミトコンドリアの外膜面でカルニチンと結合しアシルカルニチンの形となり、この形でミトコンドリア膜を通過してミトコンドリアマトリックス内に運ばれ、カルニチンが外れ再びアシルCoAとなってβ酸化をうける。われわれは虚血時に長鎖アシルCoAがミトコンドリアに蓄積することを認めた<sup>2)</sup>。長鎖アシルCoAはミトコド

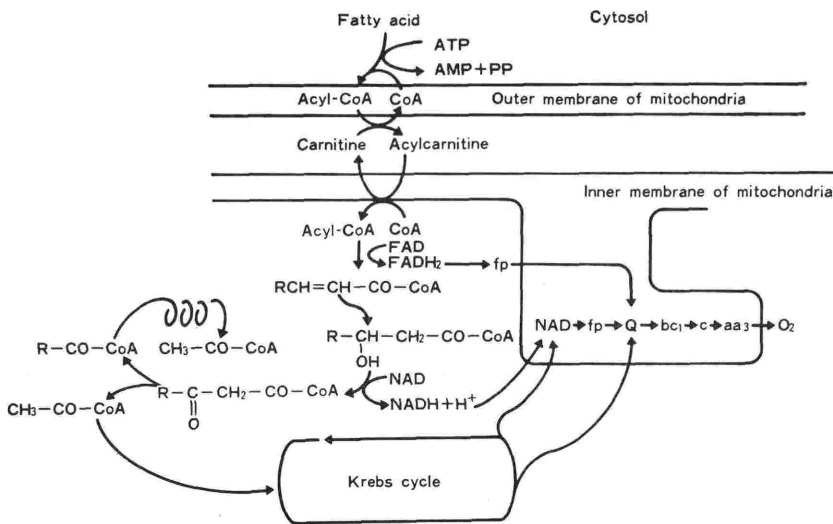


図1. 脂肪酸の代経路

\* 名古屋大学第二生化学

リア膜での ADP-ATP の転換反応を障害し<sup>3,4)</sup>, ミトコンドリアで作られた ATP がミトコンドリアの外に輸送されなくなり, その結果としてエネルギー産生系の障害を引き起こす. ここでわれわれの実験結果を示す. イヌの心臓で15分間冠血流を遮断して, 虚血部から得られたミトコンドリアでは長鎖アシルCoAは $0.71 \pm 0.10$  n mol/mg protein と非虚血部の  $0.18 \pm 0.03$  に比べ大きく上昇した. 虚血時間を30分にすると  $0.85 \pm 0.08$  とアシルCoAの蓄積はより大きくなった. 30分間冠血流を遮断する前に脂肪乳剤 (1ml/kg) を静注しておくくと虚血部ミトコンドリア中の長鎖アシルCoAは  $1.16 \pm 0.08$  と更に増加した. 一方 L-カルニチン (150mg/kg) を投与しておくくとアシルCoAの増加は,  $0.61 \pm 0.04$  と減少した (表 1). ミトコンドリア機能のひとつ, state III の酸素消費速度 (St. III O<sub>2</sub>) とこのアシルCoA量のあいだには  $y = -121.9x + 341.9$  ( $r = -0.976$ ) のよい負の相関が認められた (図 2). このことから心筋虚血の早い時期においては, アシルCoAの蓄積がミトコンドリア機能障害を引き起こす主因のひとつと考えられる. 更に  $\beta$  遮断剤は虚血心筋の保護作用<sup>5,6)</sup>があり, 日常臨床に広く使われている.  $\beta$  遮断

表 1. 各群のミトコンドリア中のアシルCoA, 遊離 L-カルニチン量

		アシルCoA (n mol/mg protein)	遊離L- カルニチン (n mol/mg protein)
15min	N	$0.18 \pm 0.03$	$1.74 \pm 0.17$
Occlusion	I	$0.71 \pm 0.10^*$	$2.08 \pm 0.21^*$
30min Occlusion			
Control	N	$0.19 \pm 0.03$	$1.76 \pm 0.21$
	I	$0.85 \pm 0.08^*$	$2.33 \pm 0.33^*$
Lipid 1ml/kg	N	$0.39 \pm 0.02$	$1.86 \pm 0.17$
	I	$1.16 \pm 0.08 \#$	$2.65 \pm 0.24$
L-Carnitine 150mg/kg	N	$0.19 \pm 0.03$	$3.01 \pm 0.16$
	I	$0.61 \pm 0.04 \#$	$4.33 \pm 0.30 \#$

(mean±SD)

N: 非虚血部ミトコンドリア I: 虚血部ミトコンドリア

\* P<0.01: 各群の非虚血部ミトコンドリアと比べて

# P<0.01: コントロール群の虚血部ミトコンドリアと比べて.

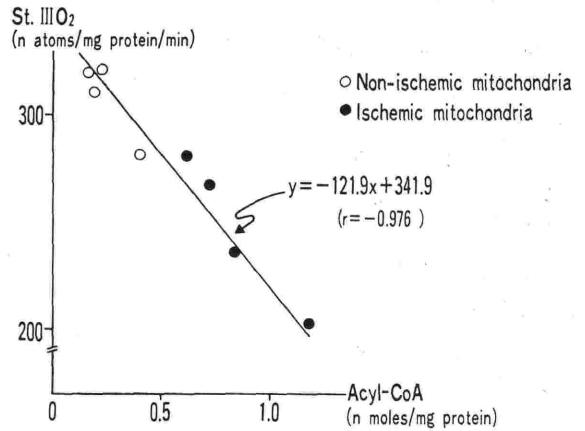


図 2. アシル CoA 量とミトコンドリア機能 (St. III O<sub>2</sub>) との相関

両者間には明らかな負の相関が存在する.

剤の作用機序は, カテコラミンの作用を抑えることによると考えられるが,  $\beta$  遮断剤の投与によって虚, 血時に見られるミトコンドリア中のアシルCoAの蓄積が抑制されると同時に, ミトコンドリア機能障害が抑えられることが認められた<sup>7)</sup>. この作用は  $\beta$  遮断剤の膜安定化作用, 内因性交感神経刺激作用あるいは心臓選択作用にかかわらず同じように認められた (表 2). すなわち,  $\beta$  遮断剤の虚血心筋の保護作用の機序のひとつはアシルCoAの蓄積を抑えることによることが考えられる.

表 2. 各  $\beta$  遮断剤投与時のアシル CoA 量とミトコンドリア機能 (St. III O<sub>2</sub>)

		アシルCoA (n mol/mg protein)	St. III O <sub>2</sub> (n atoms/mg protein/min)
Control group	N	$0.19 \pm 0.03$	$313 \pm 19$
	I	$0.85 \pm 0.08 \#$	$238 \pm 25 \#$
D, L-Propranolol group	N	$0.17 \pm 0.02$	$320 \pm 21$
	I	$0.65 \pm 0.44^{**}$	$265 \pm 19^*$
D, L-Acebutolol group	N	$0.16 \pm 0.02$	$316 \pm 22$
	I	$0.65 \pm 0.22^{**}$	$267 \pm 20^*$
D, L-Pindolol group	N	$0.17 \pm 0.01$	$310 \pm 24$
	I	$0.64 \pm 0.03^{**}$	$269 \pm 19^*$

(mean±SD)

N: 非虚血部ミトコンドリア I: 虚血部ミトコンドリア

# : P<0.01. コントロール群の非虚血部ミトコンドリアと比べて.

\* : P<0.05, \*\* : P<0.01. コントロール群の虚血部ミトコンドリアと比べて.

2. ミトコンドリア膜リン脂質の変化

虚血の後に血行を再開させて再灌流を行うと、それに伴ってミトコンドリアのより大きな機能障害が作られることが注目されている。一見パラドキシカルなこのミトコンドリアの機能障害の機序に関しては不明な点が多い。われわれはミトコンドリア膜の障害、特にホスホリパーゼの活性化による膜のリン脂質の障害が起こるのではないかと考えている。15分間冠血流の遮断後、5分間冠血流を再開させ、ミトコンドリア機能を測定した。図3にミトコンドリアの St. III O<sub>2</sub> を示した。15分間冠血流の遮断を行った時の虚血部ミトコンドリアの St. III O<sub>2</sub> は、274±23 n atoms/mg protein と非虚血部の 318±16 と比べ有意に低下した。15分間冠血流遮断後、5分間再灌流を行った群では再灌流部のミトコンドリア St. III O<sub>2</sub> は216±17と更に大きく低下した。表3に示したように再灌流部のミトコンドリアでカルシウムの有意の増加が認められた。更に再灌流部ミトコンドリアではリン脂質の有意の減少が認められた(表4)。表5にミトコンドリア中の各種遊離脂肪酸量を示した。ミトコンドリア中にはラウリン酸、ミリスチン酸、パルミチン酸、パルミトオレイン酸、ステアリン酸、オレイン酸、リノール酸、アラキドン酸、ドコサヘキサエン酸の9種の脂肪酸が検出された。再灌流部ミトコンドリアでは9種脂肪酸すべての増加が認められた。更に再灌流を行わな

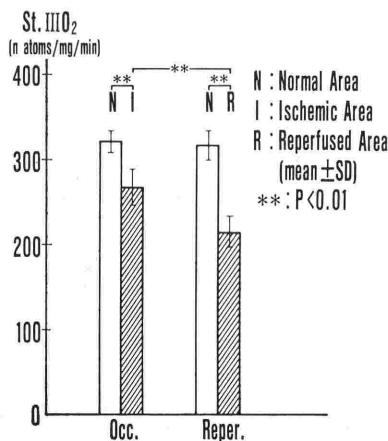


図3. 15分間の冠血流遮断を行っただけの群 (Occlusion) と15分間の冠血流遮断に引き続き5分間冠血流を再開 (Reperfusion) した時のミトコンドリア機能 (St. III O<sub>2</sub>) 再灌流によってミトコンドリア機能はより増悪した。

表3. ミトコンドリア中のカルシウム量

		Ca <sup>++</sup> (n moles/mg protein)
Occlusion group	N	9.0±2.7
	I	9.2±3.0
Reperfusion group	N	9.9±2.0
	R	15.0±3.0*

(mean±SD)  
 N: 非虚血部ミトコンドリア I: 虚血部ミトコンドリア  
 R: 再灌流部ミトコンドリア \* P<0.01

表4. ミトコンドリア中のリン脂質量

		Phospholipids. (μ moles/mg protein)
Occlusion group	N	0.41±0.03
	I	0.40±0.05
Reperfusion group	N	0.43±0.08
	R	0.31±0.05*

(mean±SD)  
 N: 非虚血部ミトコンドリア I: 虚血部ミトコンドリア  
 R: 再灌流部ミトコンドリア \* P<0.01

った群では検出されなかったパルミトオレイン酸が再灌流を行った群では検出された。図4に示したように細胞膜は主としてタンパク質とリン脂質から出来ている<sup>8)</sup>。リン脂質はホスホリパーゼによって分解されるがホスホリパーゼはその作用部位の違いによってA<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>, B, C, Dの5種が知られている(図5)。ここで示した再灌流に伴うリン脂質の減少、遊離脂肪酸の増加という事実はホスホリパーゼが活性化され、その結果ミトコンドリア膜が破壊されたことによると考えられる<sup>9)</sup>。実際単離したミトコンドリアにホスホリパーゼA<sub>2</sub>(1U)。またはホスホリパーゼC(2U)を加えインキュベートすると、図6に示したようにミトコンドリアの St. III O<sub>2</sub> が低下した。この時のミトコンドリア中の遊離脂肪酸の変化を表6に示した。ホスホリパーゼA<sub>2</sub>を作用させた場合は、パルミトオレイン酸、オレイン酸、リノール酸、アラキドン酸、ドコサヘキサエン酸の不飽和脂肪酸だけの上昇が認められた。これに対して、ホスホリパーゼCを作用させた場合は、再灌流の実験と同じくすべての脂肪酸の増加が認められた。このことは再灌流に伴ってホスホリパーゼCが活性化され、ミトコンドリア機能障害が引き起こされた可能性を強く示唆する。

表 5. ミトコンドリア中の遊離脂肪酸量

Free Fatty Acids ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ protein)	Occlusion		Reperfusion	
	N	I	N	R
Lauric Acid	0.06 $\pm$ 0.03	0.06 $\pm$ 0.02	0.05 $\pm$ 0.01	0.12 $\pm$ 0.08*
Myristic Acid	0.20 $\pm$ 0.04	0.22 $\pm$ 0.05	0.19 $\pm$ 0.04	0.32 $\pm$ 0.08**
Palmitic Acid	1.32 $\pm$ 0.11	1.34 $\pm$ 0.14	1.31 $\pm$ 0.17	1.91 $\pm$ 0.40**
Palmitoleic Acid	<0.02	<0.02	<0.02	0.06 $\pm$ 0.02
Stearic Acid	0.58 $\pm$ 0.10	0.62 $\pm$ 0.07	0.56 $\pm$ 0.07	1.08 $\pm$ 0.41**
Oleic Acid	0.46 $\pm$ 0.05	0.49 $\pm$ 0.08	0.48 $\pm$ 0.06	0.79 $\pm$ 0.20**
Linoleic Acid	0.28 $\pm$ 0.06	0.29 $\pm$ 0.06	0.29 $\pm$ 0.05	0.44 $\pm$ 0.12**
Arachidonic Acid	0.28 $\pm$ 0.05	0.32 $\pm$ 0.09	0.26 $\pm$ 0.05	0.39 $\pm$ 0.12**
Docosahexaenoic Acid	0.12 $\pm$ 0.02	0.12 $\pm$ 0.02	0.12 $\pm$ 0.01	0.17 $\pm$ 0.04**
	3.34 $\pm$ 0.18	3.46 $\pm$ 0.21	3.26 $\pm$ 0.21	5.28 $\pm$ 0.56**

(mean  $\pm$  SD)

\*P < 0.05    \*\*P < 0.01

N : 非虚血部ミトコンドリア    I : 虚血部ミトコンドリア    R : 再灌流部ミトコンドリア

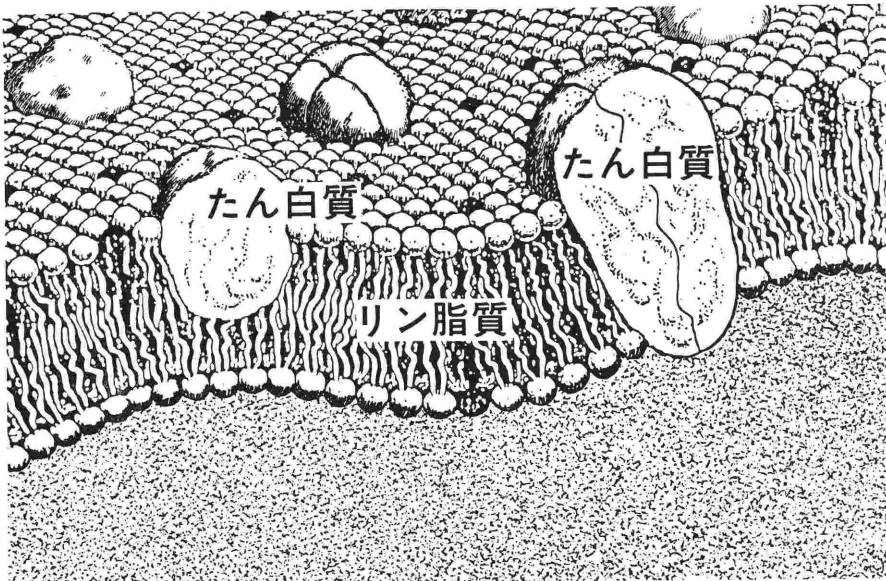


図 4. 生体膜のモデル

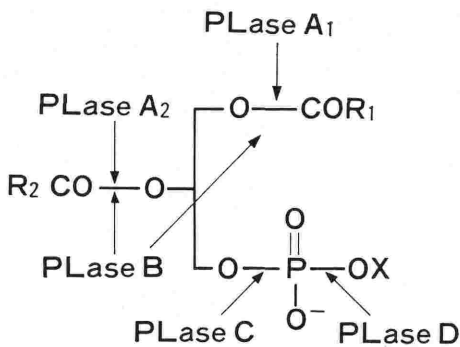


図 5. ホスホリパーゼの作用部位

3. 虚血時のエネルギー代謝

ミトコンドリア機能障害がなにゆえ臓器に重要かというそれは当然ミトコンドリアが細胞の必要とする ATP を供給していることによる。虚血の程度と ATP の減少の程度を関係を表7に示した、局所心筋血流量が20(ml/min/100g心筋)以下では虚血後10分で ATP の有意の低下が認められた。20以上の場合は、虚血20分までは有意の低下は認められなかったが60分を過ぎると有意の低下が認められた。局所心筋血流量40以上では虚血90分

表 6. ホスホリパーゼ A<sub>2</sub>(1U) と同 C(2U) とミトコンドリアをインキュベートした時のミトコンドリア中の遊離脂肪酸変化

Free Fatty Acids ( $\mu$ g/mg protein)	Control	Ph C	Ph A <sub>2</sub>
Lauric Acid	0.05±0.02	0.11±0.07*	0.05±0.01
Myristic Acid	0.19±0.06	0.31±0.05**	0.20±0.03
Palmitic Acid	1.32±0.27	1.66±0.11**	1.32±0.12
Palmitoleic Acid	<0.02	0.05±0.03	0.62±0.12
Stearic Acid	0.57±0.05	1.03±0.16**	0.54±0.03
Dleic Acid	0.47±0.11	0.78±0.12**	6.87±0.36**
Linoleic Acid	0.29±0.04	0.41±0.05**	8.08±1.36**
Arachidonic Acid	0.26±0.05	0.39±0.04**	14.8±1.59**
Decosahexaenoic Acid	0.11±0.02	0.20±0.06**	1.80±0.69**
	3.26±0.31	4.94±0.26**	34.28±2.28

\*P<0.05, \*\*P<0.01 (mean±SD)

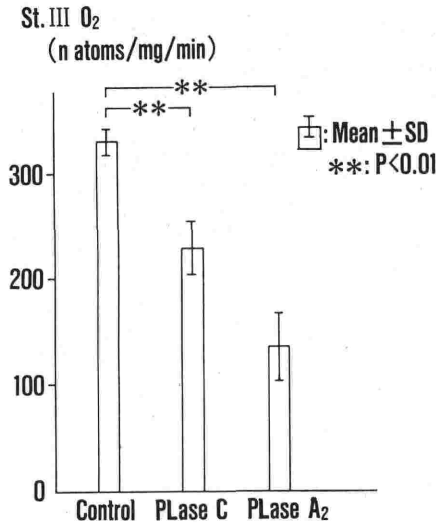


図 6. ホスホリパーゼ A<sub>2</sub>(1U) 同 C(2U) とミトコンドリアをインキュベートした時の St. III O<sub>2</sub> の変化

までは ATP の有意の低下は認められなかった<sup>10)</sup>. すなわち、虚血時の ATP の低下は、ATP の生成に必要な物質の供給の減少と、虚血によるミトコンドリア自身の破壊の組合わせと考えられる。

#### 4. 生化学的変化のモニタリング

虚血に伴う上記の生化学的変化を捉えるシステムは種々考案されている。動物実験では、心筋切片を採り、そこに含まれる物質、たとえば ATP、あるいは遊離脂肪酸の中間代謝産物であるアシル CoA を測定することにより、あるいは直接針電極

表 7. 局所心筋血流量と ATP

虚血時間	10min	20min	60min	90min
0 ≤ MBF < 20	3.38 ± 0.80 *	2.77 ± 0.74 * ☆	1.67 ± 0.81 * ○	1.97 ± 1.05 *
20 ≤ MBF < 40	4.51 ± 1.19	4.28 ± 0.63	3.47 ± 1.33 *	3.35 ± 1.01 *
40 ≤ MBF < 60	4.91 ± 0.75	4.51 ± 1.24	4.39 ± 0.51	4.21 ± 0.58
60 ≤ MBF < 80	4.34 ± 0.61	4.25 ± 0.96	4.94 ± 1.21	5.00 ± 0.42
80 ≤ MBF	5.06 ± 0.70	5.35 ± 0.99	5.11 ± 0.92	4.94 ± 0.67
非虚血部	5.24 ± 1.08	4.97 ± 1.06	5.01 ± 0.94	4.90 ± 0.80

mean ± SD

MBF: 局所心筋血流量 (ml/min/100g)

ATP: ( $\mu$  moles/g wet weight)

\*: P<0.01 VS 非虚血部心筋 ☆: P<0.05 10min VS 20min ○: P<0.01 20min VS 60min

を挿入もすることによって、酸素濃度を測定し得るが、臨床応用上は非侵襲的な方法が必要とされる。最近、光計測が進歩し NADH の蛍光の変化からミトコンドリアの酸化還元状態を測定する法<sup>11,12)</sup>、更には吸収スペクトルを用い、チトクローム類の酸化還元状態<sup>13)</sup>、ミオグロビン酸素飽和度の変化を測定する<sup>14)</sup>ことが出来る。しかしこれらの方法はいずれも、心臓を露出せねばならず、手術中の心筋の代謝の変化を追うことは出来ても、それ以外の臨床の場で応用することはむずかしい。全く非侵襲的に行う方法としては NMR (核磁気共鳴)-CT とポジトロン-CT がある。NMR は原子の核スピン量子数が 0 でない場合はその原子を一定の

磁場におくと、核磁気共鳴することを利用したものである。NMRによって生体内 $^1\text{H}$ 、 $^{31}\text{P}$ の分布を知ることが出来る。すなわち $^{31}\text{P}$ から高エネルギーリン酸化合物の代謝を知ることが可能であるが、このために必要な強力な磁場の発生装置の開発、また強力な磁力の生体に及ぼす影響など未知の点も多く、生体内の代謝の変化を捉えるNMR-CTの実用化にはなお解決すべき点も多い。ポジトロン-CTはサイクロトロンで作られたポジトロンでラベルした物質を生体内に投与して、この物質の組織への取り込み、代謝を追うものである。たとえば $^{11}\text{C}$ -パルミチン酸を与えた場合、虚血部では $\beta$ 酸化が抑制されるため、虚血部では代謝されずに $^{11}\text{C}$ -パルミチン酸の形でとどまる。これを利用して代謝面から虚血の判定が出来る<sup>15)</sup>。NMR-CT、ポジトロン-CTのいずれを用いても、心臓が拍動し続ける組織であることを考えると、拍動に同期したCT像が得られないと、その情報も十分に生かすことが出来ない。この点心臓への応用が、脳などと比べ一歩遅れているのが現状である。

生体への代謝の状態を解明するシステムは、大きく進歩してきているが、最初に触れたように虚血に伴う代謝の変化は多面的であり、相互に原因となり結果となり複雑な様相を呈している。したがって心筋代謝の変化をリアルタイムに追う方法が確立されるには、なお乗り越えねばならぬハードルは多いようである。

## 文 献

- 1) Neely, JR., Rovetto, MJ. and Oram, JF. : Myocardial utilization of carbohydrate and lipids. *Prog. Cardiovasc. Dis.* **15** : 289~327, 1972.
- 2) Sugiyama, S., Miyazaki, Y., Kotaka, K. and Ozawa, T. : On the mechanism of ischemia-induced mitochondrial dysfunction. *Jpn. Circ. J.* **46** : 296~302, 1982.
- 3) Pande, SV. and Blanchaer, MC. : Reversible inhibition of mitochondrial adenosine diphosphate phosphorylation by long chain acyl coenzyme A esters. *J. Biol. Chem.* **246** : 402~411, 1971.
- 4) Kato, T., Suzuki, S., Kambe, T., Sakamoto, N., Sugiyama, S. and Ozawa, T. : Arrhythmogenic effect of free fatty acids in relation to heart mitochondrial function. *J. Appl. Biochem.* **1** : 139~147, 1979.
- 5) Vatner, SF., Baig, H., Manders, WT., Ochs, H. and Pagani, M. : Effects of propranolol on regional myocardial infarction, electrograms, and blood flow in conscious dogs with myocardial ischemia. *J. Clin. Invest.* **60** : 353~360, 1977.
- 6) Fox, K., Welman, E. and Selwyn, A. : Myocardial infarction in the dog: Effects of intravenous propranolol. *Amer. J. Cardiol.* **45** : 769~774, 1980.
- 7) Nagai, S., Miyazaki, Y., Ogawa, K., Satake, T., Sugiyama, S. and Ozawa, T. : The effects of  $\beta$ -blocking agents on mitochondrial function in ischemic myocardium. *Jpn. Circ. J.* **48** : 32~36, 1984.
- 8) Singer, SJ. and Nicolson, GL. : The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science* **175** : 720~731, 1972.
- 9) Miyazaki, Y., Nagai, S., Ogawa, K., Satake, T., Sugiyama, S. and Ozawa, T. : The role of phospholipase in mitochondrial dysfunction after coronary reperfusion in canine myocardium. *Jpn. Circ. J.* (in press)
- 10) 伊藤健一, 松原達昭, 南木道生, 柳沢 潔, 日比範夫, 西村欣也, 神戸 忠, 坂本信夫, 杉山 理, 小沢高将 : 実験犬における急性心筋虚血時の局所心筋血流とエネルギー代謝。心筋の構造と代謝。-1981-(心筋代謝研究会編) p. 97~106.
- 11) Barlow, CH. and Chance, B. : Ischemic areas in perfused rat hearts: Measurement by NADH fluorescence photography. *Science* **193** : 909~910, 1976.
- 12) Kanno, T., Ikei, N. and Nakase, Y. : Simultaneous measurements of cholecystokinin-induced changes in absorption spectrum of cytochromes, NAD(P)H-fluorescence, and enzyme output in isolated perfused rat pancreas. *Biomed. Res.* **2** : 281~389, 1981.
- 13) Kanno, T. and Saito, A. : Direct effect of CCK-8 stimulating respiratory chain in bullfrog brain. *Biomed. Res.* **3** : 313~318, 1982.
- 14) Tamura, M., Oshino, N., Chance, B. and Silver, IA. : Optical measurement of intracellular oxygen concentration of rat heart *in vitro*. *Arch. Biochem. Biophys.* **191** : 8~22, 1978.
- 15) Brownell, GL., Budinger, TF., Lauterbur, PC. and McGreen, PL. : Positron tomography and nuclear magnetic resonance imaging. *Science* **215** : 619~626, 1982.