³¹P nuclear magnetic resonance (NMR) を用いた腎保存の研究

III. 細胞内 pH による viability 判定法

近畿大学医学部泌尿器科学教室 国 方 聖 司
(主任: 栗田 孝教授)

THE ³¹P NUCLEAR MAGNETIC RESONANCE (NMR) STUDY OF THE PRESERVED KIDNEYS

III. Renal Viability Evaluated with Intracellular pH

Seiji Kunikata

Department of Urology, Kinki University Medical School
(Director: Prof. T. Kurita)

³¹P NMR (nuclear magnetic resonance) is a noninvasive method of studying the metabolic state of biological tissue. The energy metabolism of ischemic rabbit kidneys was studied by ³¹P NMR. Some phosphorylate metabolites including ATP and inorganic phosphate could be detected. It was also possible to determine intracellular pH. The ischemic kidneys showed a rapid depletion of energy stores. After ischemia the intracellular pH decreased as the ATP level in the renal tissue dropped. However, the intracellular pH decreased slowly before reaching the minimum value (pH 6.5). After ischemia the kidneys were perfused with the perfusate which included fluorocarbon emulsion. The perfused kidneys showed recovery from the ATP depletion and intracellular acidosis. However, the kidneys subjected to long ischemic periods could not regain the preischemic ATP levels and intracellular pH. Intracellular pH measured by ³¹P NMR was found to be a useful parameter of tissue viability. According to these experiments, ³¹P NMR, which is a noninvasive method, may be applied to the clinical practice of renal preservation.

要旨: 家兎腎を非破壊的に, ³¹P nuclear magnetic resonance (NMR) 測定した。家兎腎から各種磷酸代謝物が測定でき, 無機磷酸のシグナル位置から細胞内 pH が求められた。腎を阻血状態にすると ATP は急速に代謝され, このシグナルは30分以内に消失するが, 細胞内酸性化は比較的徐々に進行した。そして室温 (22℃) では, 阻血約100分で, 細胞内 pH はほぼ6.5と安定化した。また阻血腎を pH が7.4の灌流液にて灌流すると, ATP の再合成および細胞内酸性化の回復がみられた。そして細胞内酸性化は, ATP の再合成に相関して回復し, 長時間阻血ではほとんど回復しなかった。室温 (22℃) での阻血腎 (22℃単純保存腎) では, 細胞内 pH が6.6~6.5すなわち阻血90分~150分の間に, 阻血腎の回復の限界値があると考えられた。これらの実験結果, ³¹P NMR の非破壊的測定ということより, 細胞内 pH は, 臨床に即した保存腎の有効な viability の指標となると考えられた。

結 言

nuclear magnetic resonance (NMR) は, 生体の代謝を非破壊的に測定できる方法である。³¹P NMR を用いると, 腎組織の各種磷酸代謝物が測定でき, このエネルギーレベルが判明することをすでに報告した¹⁾。また無機磷酸のシグナル位置から, 測定している組織の細胞内 pH も測定できることも報告した²⁾。

最近, 生体エネルギー代謝の観点から, 阻血臓器の

adenosine triphosphate (ATP) 再合成能力がこの臓器の viability を反映する有効な指標であると報告されている^{3,4)}。しかし ATP 再合成能を測定するには, 阻血臓器への血流の再開通も必要であろうし, ATP 抽出のため組織の破壊が必要である。このため組織破壊が不可欠な従来の方法では, 臨床応用には限りがあった。そこで従来とは異なり非破壊的に生体エネルギーが測定できる³¹P NMR を用いて, 実験レベル

ではあるが、阻血腎ひいては腎移植に供する保存腎の viability 判定が可能かどうか検討したので報告する。

材料および方法

全実験には、家兎（1.0～1.5kg）を用いた。麻酔としてペントバルビタール静注後、腹部正中切開し、前回の報告²⁾と同様に、腹腔大動脈に逆行性にカニューレーション後、en bloc に左腎を摘出した。そしてただちにヘパリン5IU/ml を含む乳酸リンゲル液にて洗浄し、摘出した腎を径25mm NMR 試験管内に入れた。

NMR 測定には、日本電子 FX200パルス・フーリエ変換分光器（³¹P 共鳴周波数：80.76MHz）を用いた。NMR 条件は、45°パルス、2秒のくりかえしで1測定には、250回積算した。また化学シフトは、85%磷酸を基準として、これを0.0ppm で示した。細胞内 pH は、前回の報告²⁾のごとく、無機磷酸の化学シフト値から滴定曲線を用いて求めた。

（実験 I）

家兎腎の摘出、洗浄後、ただちに37℃の設定温度下のもとに400ml/時の定常流量にて灌流をおこなった（図1）。灌流液は、FC-43 fluorocarbon を含む oxy-pherol®を用い、これにヘパリン5IU/ml を加え、NaOH にて pH を7.4に調整した（表1）。最初に1時間灌流し、代謝状態が安定したところで、ローラーポンプを停止させ、阻血状態を作製した。一定期間（30分、45分、60分）の阻血後、再灌流を同条件でおこなった。灌流、阻血、再灌流の間、連続的に³¹P NMR 測定をおこなった。

（実験 II）

家兎腎の摘出、洗浄後、室温（22℃）下にて灌流す

ることなく一定期間（5分～150分）の間、阻血状態とし、この後灌流を開始した。灌流は、室温にておこなった以外、実験 I とすべて同条件でおこなった。阻血、灌流の間、連続的に³¹P NMR 測定をおこなった。

結 果

（実験 I）

図2は、最初の灌流にて比較的代謝状態が安定している家兎腎の³¹P NMR スペクトラムである。ATP（α, β, γ）, ADP（α, β）, AMP, 無機磷酸（Pi）, 糖磷

表1 灌流液組成（pH 7.4）

Perfluorotributylamine (FC-43)	10.00	w/v %
Pluronic F-68	1.28	w/v %
NaCl	0.539	w/v %
KCl	0.080	w/v %
MgSO ₄	0.040	w/v %
Na ₂ HPO ₄	0.0142	w/v %
NaHCO ₃	0.0240	w/v %
Glucose	0.600	w/v %
Human serum albumin	5.00	w/v %

electrolyte	mEq/l
Na ⁺	124
K ⁺	11
Mg ⁺⁺	7
Cl ⁻	122
HCO ₃ ⁻	3
HPO ₄ ⁻⁻	2
SO ₄ ⁻⁻	7
Organic compounds	8

図1 灌流模式図

図2 灌流家兎腎の ^{31}P NMR スペクトラム 図3 実験 I, 45分阻血モデルの連続的 ^{31}P NMR スペクトラム

酸 (SP) のシグナルが認められる。筋肉組織で著明に認められるクレアチン燐酸のシグナルは、ほとんど認められず、腎組織でのクレアチン燐酸の低濃度がわかる¹⁾。図3は、45分阻血モデルでの連続的 ^{31}P NMR スペクトラムである。1時間の灌流により代謝状態は、ほぼ安定している。しかしこの後、ローラーポンプを停止し阻血状態をつくると、ATPのシグナルは30分以内に消失し、無機燐酸の上昇が認められる。そして

図4 実験 I, 45分阻血モデルでの各種燐酸代謝物、細胞内 pH の推移

再灌流により ATP の再合成がおこなわれる。図4の連続的スペクトラムの各シグナルの intensity と無機燐酸の化学シフト値から求めた細胞内 pH をプロットしたものが、図5である。阻血により細胞内酸性化が進み、45分阻血では細胞内 pH が6.6まで下降している。そして再灌流により細胞内酸性化は回復するが、ATP 量と同様に阻血以前のレベルまでは回復しない。各阻血時間モデルにおける初期灌流1時間、再灌流1時間での ATP、細胞内 pH を示したのが図5である。阻血時間が長いほど細胞内酸性化は強度となり、再灌流により細胞内 pH の回復は弱い。また ATP のシグナルは、すべて阻血30分以内に消失し、阻血時間が長いほど再灌流による ATP の再合成量は少ない。

(実験II)

図5 実験I, 各阻血モデルでの ATP, 細胞内 pH の回復程度

図6 実験II, 阻血腎（5分～150分）における、灌流による細胞内酸性化の回復程度

本実験では、最初に灌流していないため阻血前の ATP 量は、不明である。しかし全例、阻血30分後には、ATP のシグナルは消失していた。阻血腎および各阻血時間後の灌流中の細胞内 pH を、図 6 に示す。阻血中は、ATP が急速に減少するのに比較して、細胞内酸性化は徐々に進行し、約100分で細胞内 pH はほぼ6.5に安定化する。この酸性化は、阻血時間が短かく、酸性化程度が小さいと、灌流によりほぼ回復する。しかし阻血以前のレベルまでは、回復しない。また阻血時間

が長く、酸性化程度が大きいもの、とくに阻血時間が150分をこえ、細胞内 pH が6.5まで下降したものは、再灌流しても ATP の再合成は小さく、細胞内酸性化の回復はほとんどみられない。これらのことより細胞内 pH が6.6と6.5、すなわちこの実験系では阻血時間が90分～150分の間に、阻血腎の回復の限界点があると推測される。

これらの実験から、³¹P NMR を用いれば、保存腎の細胞内 pH が、また灌流すれば ATP 再合成能が測定

できることが示された。しかし ATP 量は、相対的評価しかできず若干の問題がある。この点、細胞内 pH は絶対値を示しており、保存腎の viability をより正しく知る簡便な指標である。

考 察

腎細胞中の ATP は、温阻血により最初の30分以内に消費されてしまい、以降は比較的一定レベルを保つ³⁾。このため阻血腎の ATP 量は、腎の viability を反映するとは言い難い。血流再開後の機能発現には、当然、細胞内のエネルギーレベルの回復が必要である。このエネルギーレベルを知る指標として、エネルギーチャージが知られているが⁴⁾、クレアチン磷酸が低濃度である肝臓、腎臓では、ATP 再合成能がこれらの臓器の viability を知る簡便な指標であると報告されている⁵⁾⁶⁾。しかし阻血腎の ATP 再合成能を知るためには、血流の再開通だけでなく、従来の生化学的測定法に依存する限り、ATP 抽出のための組織凍結が必要である。このため ATP 再合成能を直接確かめるのは、腎移植に供する保存腎では、今までは事実上不可能であった。そこで竹中ら (1980)⁷⁾は、保存腎を灌流し、初期灌流液中の磷酸代謝物の核酸中間代謝産物を測定するのが保存腎の viability を知る指標となると報告している。しかし直接的に ATP 再合成能が測定できるに、優るものはない。この点、³¹P NMR は、非破壊的に ATP を測定できる画期的な測定法である。それでも若干の問題が残る。その一つに、移植前に灌流だけは必要とすることである。また³¹P NMR では、絶対量の測定は困難で、各種磷酸代謝物からの相対的評価、経時的な相対的推移しか測定できないことである。このために³¹P NMR に即したパラメーターを工夫する必要がある⁸⁾。

³¹P NMR は、磷酸代謝物を測定できる以外に、測定する組織の平均的細胞内 pH が測定できる。それもきわめて短時間に測定でき、本実験では、250回積算にて1測定に8分20秒を要するのみであった。この短時間での測定は、実際の臨床で十分に許容できる時間であろうし、ATP 量は測定せず細胞内 pH のみを測定するならば、100回程度の積算で可能である。また細胞内 pH は、磷酸代謝物が相対的評価しかできないのに対して、絶対値としてあらわせる。このことは、個々の保存腎相互間の比較をも可能にしている。

生理学的パラメーターである細胞内 pH の、生体組織における意義の詳細は、いまだ不明である。しかし Orbán ら (1979)⁹⁾は、筋肉の組織 pH をガラス電極を

用いて測定し、この組織 pH が阻血筋肉の障害程度を判定するのに有効であると報告している。また Chan ら (1983)¹⁰⁾は、³¹P NMR を用いて腎の細胞内 pH を測定し、H⁺の細胞機能への障害を強調している。そしてこれを防止する方法として、クエン酸塩での保存腎の洗浄の有効性を報告している。本実験では、腎の細胞内 pH が6.6~6.5すなわち阻血時間が90分~150分の間に阻血腎の回復の限界点があったが、この限界時間は常温 (22℃) のために、37℃阻血のものより少し延長していると思われる。また150分阻血でも細胞内 pH の回復が少しみられるのは、腎血管に流れる pH 7.4の灌流液の影響によるみかけ上のものであろう。

細胞内酸性化は、嫌氣的解糖による乳酸の産出によりおこる。冷阻血では、この速度は遅く、細胞内 pH の低下も緩徐である¹⁾。そして冷阻血すなわち低温単純保存腎では、比較的長時間の阻血後でも、ATP の再合成がおこり機能は回復するのも事実である¹¹⁾。この細胞内酸性化が、ある限度をこえた長時間阻血後では、なぜ回復しないのかは疑問である。これは、阻血後の血流動態の変化に起因しているのかもしれない。一般に、長時間の阻血腎では組織障害が強く、この腎を灌流すると灌流圧が高い。これは、長時間阻血による腎灌流動態の悪化によるものである。また当教室の辻橋ら (1984)¹²⁾は、阻血腎での血流再開後の組織血流量を水素クリアランス法にて測定し、長時間阻血腎での組織血流量の低下を報告している。一方、細胞内酸性化が細胞小器官におよぼす影響も考えられる。Fry ら (1980)¹³⁾は、肝、腎細胞内ミトコンドリアにおよぼす細胞内酸性化の影響を検討し、酸性化が oxidative phosphorylation 機能を極端に悪化させることを報告している。

いずれにしろ³¹P NMR にて測定できる細胞内 pH は、短時間に測定でき、阻血腎ひいては保存腎の viability の有効な指標となろう。しかし今回使用した、³¹P NMR 分光器は、化学分析用のものを使用したもので、装置の構造上の制約から、ヒト腎の大きさでは測定管内に挿入が困難であった。このため測定は、家兎腎の大きさまでに限られ、今のところ臨床応用にいたっていない。しかし現在、生体系の測定を目的とした topical magnetic resonance (TMR) 分光器が開発されており、腎保存への臨床応用へむけて、研究をすすめている。

結 語

現在まで、ラット腎を用いて、³¹P NMR 測定法を報

告してきた¹⁾²⁾。今回、家兎腎を用いて、³¹P NMR にて測定できる細胞内 pH が、阻血腎ひいては保存腎の有効な viability の指標となるかどうか検討し、次の結果を得た。

1) 腎を阻血すると、阻血の30分以内に組織 ATP 量は急速に減少するのに対して、細胞内酸性化は徐々におこり、室温 (22℃) では、阻血約100分で細胞内 pH は6.5とほぼ安定化した。

2) 阻血腎を灌流すると、組織 ATP 量、細胞内 pH は回復するが、回復程度は、両者とも長時間阻血になるにつれ、この程度は悪化した。

3) 各阻血モデルでの細胞内酸性化の回復程度をみるに、室温 (22℃) では、阻血腎の回復の限界点は、細胞内 pH が6.6~6.5すなわち阻血時間が90~150分の間にあると考えられた。

本論文の要旨は、第33回泌尿器科中部連合総会および第6回磁気共鳴医学会において発表した。この研究の一部は、大阪腎臓バンクの昭和59年度腎疾患研究助成金によっておこなわれた。

稿を終えるにあたり、oxypherol®の提供を受けたミドリ十字株式会社に感謝します。また御指導、御校閲を賜った恩師栗田孝教授に深く深謝の意を表しますとともに、種々御教示、御助言を頂いた秋山隆弘助教授に感謝します。

文 献

- 1) 国方聖司, 井口正典, 秋山隆弘, 栗田 孝, 柴田 進: ³¹P nuclear magnetic resonance (NMR) を用いた腎保存の研究. I. 単純保存腎のエネルギー代謝. 日泌尿会誌, 74, 698-703, 1983.
- 2) 国方聖司, 井口正典, 秋山隆弘, 栗田 孝: ³¹P nuclear magnetic resonance (NMR) を用いた腎保存の研究. II. 腎組織の細胞内 pH の変化. 日泌尿会誌, 75, 1274-1279, 1984.
- 3) Hems, D.A. and Brosnan, J.T.: Effects of ischaemia on content of metabolites in rat liver and kidney in vivo. Biochem. J., 120, 105-111, 1970.
- 4) Reed, E.B.: Coordination of adenylate energy charge and phosphorylation state during ischemia and under physiological conditions in rat liver and kidney. Life Science, 19, 1307-1322, 1976.
- 5) Marubayashi, S., Takenaka, M., Dohi, K., Ezaki, H. and Kawasaki, T.: Adenine nucleotide metabolism during hepatic ischemia and subsequent blood reflow periods and its relation to organ viability. Transplantation, 30, 294-296, 1981.
- 6) Collins, G.M., Green, R.D., Carter, J.N. and Halasz, N.A.: Adenine nucleotide levels and recovery of function after renal ischemic injury. Transplantation, 31, 295-296, 1981.
- 7) 竹中正治, 辰川自光, 山根修治, 田中一誠, 土肥雪彦, 江崎治夫, 山田一夫, 川崎 尚: 温阻血腎の viability の判定, 灌流液中の流出核酸中間代謝産物を指標として. 医学のあゆみ, 112, 257-259, 1980.
- 8) 国方聖司: ³¹P nuclear magnetic resonance (NMR) を用いた腎保存の研究. IV. ³¹P topical magnetic resonance (TMR) を用いた阻血腎の in vivo での測定. 日泌尿会誌, 投稿中.
- 9) Orbán, I., Regös, J., Havas, J. and Dárdai, E.: Tissue pH in the assessment of ischemic muscle damage. Acta Chir. Acad. Sci. Hung. Tomus, 20, 269-274, 1979.
- 10) Chan, L., Bore, P. and Ross, B.: Possible new approaches to organ preservation. In Renal Preservation 8, edited by Marberger, M. and Dreikorn, K., p323-337, Waverlt Press, Baltimore, 1982.
- 11) Dreikorn, K., Jorsh, R. and Röhl, L.: 48-to 96-hour preservation of canine kidneys by initial perfusion and hypothermic storage using the Euro-Collins solution. Eur. Urol., 6, 221-224, 1980.
- 12) 辻橋宏典, 井口正典, 国方聖司, 秋山隆弘, 栗田 孝: 水素ガスクリアランス法による腎血流量の測定. 泌尿紀要, 30, 729-733, 1984.
- 13) Fry, D.E., Ratcliffe, D.J. and Yates, J.R.: The effects of acidosis on canine hepatic and renal oxidative phosphorylation. Surgery, 88, 269-273, 1980.

(1986年7月4日受付, 特別掲載)