

研究課題名

虚血による心筋内脂肪酸の蓄積と
その抑制物質に関する研究

研究課題番号

60480124

昭和61年度科学研究費補助金
(一般研究B)研究成果報告書

昭和62年3月

研究代表者 安孫子 保

(旭川医科大学医学部薬理学講座)

は し が き

心筋が虚血になると、さまざまな変化がおこる。すなわち、心筋収縮力の低下、心筋糖代謝の変動、心筋エネルギー代謝の変化、組織学的変化などである。我々の教室では、虚血になると心筋のpHが低下することに注目し、たくさんの実験を行なってきた。まず、心筋pHが心筋の虚血のパラメータとして役に立つこと、またこのパラメータを利用して抗虚血薬または抗狭心症薬の薬効評価をすることができることを報告してきた。

ところで、虚血になると心筋のpHがなぜ低下するのかという基本的な問に対しては、まだ直接的な答は得られていない。虚血によって糖代謝が亢進し、そのために乳酸が心筋に蓄積することがpH低下の原因であろうという説が有力であるが、虚血によるpHの低下を乳酸の蓄積のみで説明することは不可能である（水素イオンの上昇に見合うだけの乳酸の上昇がない）。虚血による心筋遊離脂肪酸の蓄積も水素イオンの上昇につながるので、本実験では虚血になると心筋の遊離脂肪酸が実際に上昇するのか、また虚血による心筋pHの低下を抑制する β -アドレナリン遮断薬は、虚血による心筋遊離脂肪酸の上昇をも抑制するのか否かを検討した。虚血による心筋遊離脂肪酸の上昇は、虚血による心筋細胞膜の脂質の分解と結びついているので、この研究は虚血による心筋膜の障害に関係するものであり、虚血の病態生理を解明し、虚血からの心筋保護のメカニズムを知る上においても重要であるということが出来る。

研究組織

安孫子 保 (旭川医科大学医学部 教授)

酒井 兼司 (旭川医科大学医学部 助手)

橋爪 裕子 (旭川医科大学医学部 助手)

(旧姓 指田)

研究経費

昭和 60 年度 5,000 千円

昭和 61 年度 900 千円

合計 5,900 千円

研究発表

(1) 学会誌等

Miura, I., Hashizume, H., Akutsu, H. and Abiko, Y.: A simple method for the determination of non-esterified fatty acids in the myocardium. Amer. J. Physiol. (in preparation)

Miura, I., Hashizume, H. and Abiko, Y.: Effects of dl- and d-propranolol on the increase in non-esterified fatty acids during ischemia in the dog myocardium. J. Pharmacol. and Exper. Ther. (in preparation)

(2) 口頭発表等

三浦 格、指田 裕子、安孫子 保： ADAM 試薬を用いた心筋脂肪酸の定量法について 第37回 日本薬理学会北部会（昭和61年8月2日、札幌市）

Miura, I., Hashizume, H., Akutsu, H. and Abiko, Y.: Inhibitory effect of propranolol on accumulation of non-esterified fatty acids in the dog myocardium during ischemia (to be presented at the VIIIth European Congress of International Society for Heart Research, Sep. 14, 1987, Budapest, Hungary)

虚血による心筋内脂肪酸の蓄積とその抑制物質に関する研究

1 目的

冠動脈の閉塞によって心筋が虚血になると、嫌氣的代謝が活発となり、その中間体が心筋に蓄積する。この中間体の蓄積は、心筋の機能に対して大きな影響を与える筈である。例えば、嫌氣的糖代謝の亢進によって心筋に乳酸が蓄積すれば、心筋組織はアシドーシスとなり、心筋の収縮力は低下する。

ところで、心筋が虚血になると、脂質代謝にも変動がおり、心筋内に遊離脂肪酸が蓄積することが確かめられている (Chien, et al., 1984)。心筋内に遊離脂肪酸が蓄積すれば、心筋を障害する可能性が出てくる。遊離脂肪酸は、心筋を障害する可能性があるからである (Van Der Vusse, 1983)。

この実験の目的は、虚血による心筋障害を軽減する Propranolol (Reimer et al., 1973) は、虚血による心筋内脂肪酸蓄積も抑制するのか否かを検討することである。さらに、Propranolol のようなアドレナリン β -受容体遮断作用をもたないが、Propranolol と同様の膜安定化作用をもち、しかも虚血による心筋障害を軽減しない d-Propranolol (Reimer et al., 1976) の虚血による心筋内脂肪酸蓄積に対する作用も検討した。Propranolol と d-Propranolol の虚血による心筋内脂肪酸蓄積に対する作用を比較検討することによって、虚血による心筋内脂肪酸蓄積が、アドレナリン β -受容体を介してひきおこされているのか否かがわかるからである。

2 実験材料ならびに方法

2-1 動物の処理

雑種成犬をペントバルビタールナトリウム (30 mg/kg) で静脈麻醉し、人工呼吸下に左第5肋間を開き、心臓を露出した。

左冠動脈前下行枝(LAD)を剥離し、LADを90分間結紮した。薬物は、LAD結紮5分前に静脈内に投与した。Propranolol および d-Propranolol は塩酸塩のものを用い、投与量は塩酸塩としての量であらわした。90分の結紮直後に、虚血心筋を取り出し、液体窒素によって冷凍固定した。対照実験には、sham operation をした心臓を用いた。この心筋サンプルも液体窒素で冷凍固定した。冷凍固定後、次のような方法によって、心筋に含まれる遊離脂肪酸を定量した。

2-2 遊離脂肪酸の定量

冷凍固定した心筋約2000 ngを取り、これをあらかじめ液体窒素で冷却しておいた乳鉢の中に入れ、液体窒素下で砕き、細粉とした。この粉末にクロロホルム・メタノール・水(8:4:3)の混液(40 ml)、アンチオキシダントのbutylated hydroxytoluene(0.01%), ならびに内部標準物質のC17:0(ヘプタデカン酸)2000 ngを加え、ホモゲナイズして抽出した。(この抽出方法は原理的には、Folchの方法(Folch et al., 1957)によっている。抽出物を20分間振盪し、2000 gで10分間遠心し、クロロホルム層 5 mlを取り、これを減圧下に蒸発乾固した。次いで、その抽出物に 9-アンスリルジアゾメタン(ADAM)試薬(0.05%メタノール)0.1 mlを加え、混和したあと、

3 時間室温で放置し、2-4 μl を高速液体クロマトグラフィーに注入して分析した。

抽出の手順は、図 1 に示されている。図 2 は Nimura and Kinoshita (1980) によって開発されたADAM試薬による脂肪酸の蛍光ラベルの原理を示す。ADAM試薬は、溶液中で安定で、カルボン酸とよく反応する。このエステル化反応は室温で進行し、触媒を必要としない。

蛍光ラベルされた脂肪酸は、メタノールと水を移動相とする逆相分配系HPLCで分離され、分光蛍光スペクトロメーターで感度よく検出される。この方法によればpicomoleレベルの脂肪酸の検出が可能である。ADAM試薬と脂肪酸の反応は図 2に示されている。HPLCによる分析の条件は、図 3に示されている。HPLCは島津製作所製のLC-4 A 型で、カラムはゾルボックスODS(4.6 mm x 25 cm)、カラム恒温槽はCTO-2AS で、その温度は60 $^{\circ}\text{C}$ に設定した。溶媒相はメタノール：水 比 90:10とし、流速は1.2 ml/min とした。蛍光分光スペクトロメーターは島津製作所のRF-530を用い、励起波長365 nm 、蛍光波長412 nm で抽出物の分析を行なった。図 4は標準物質をADAM試薬で処理した後のHPLCによる蛍光分析のクロマトグラフである。C12:0 を先頭に、C14:0, C16:1, C20:4, C18:2, C16:0, C18:1, C17:0, C18:0 と連続的に脂肪酸が検出されている。図 5は 内部標準物質であるC17:0 の2000 $\text{ng}/100 \text{ ul}$ (74.0 nmol/ml) の蛍光の強さ(Hr) に対する各標準物質 ($\text{ng}/100 \text{ ul}$) の蛍光の強さ(H) の比(H/Hr)を示す。この標準曲線から、各脂肪酸の定量が可能である。

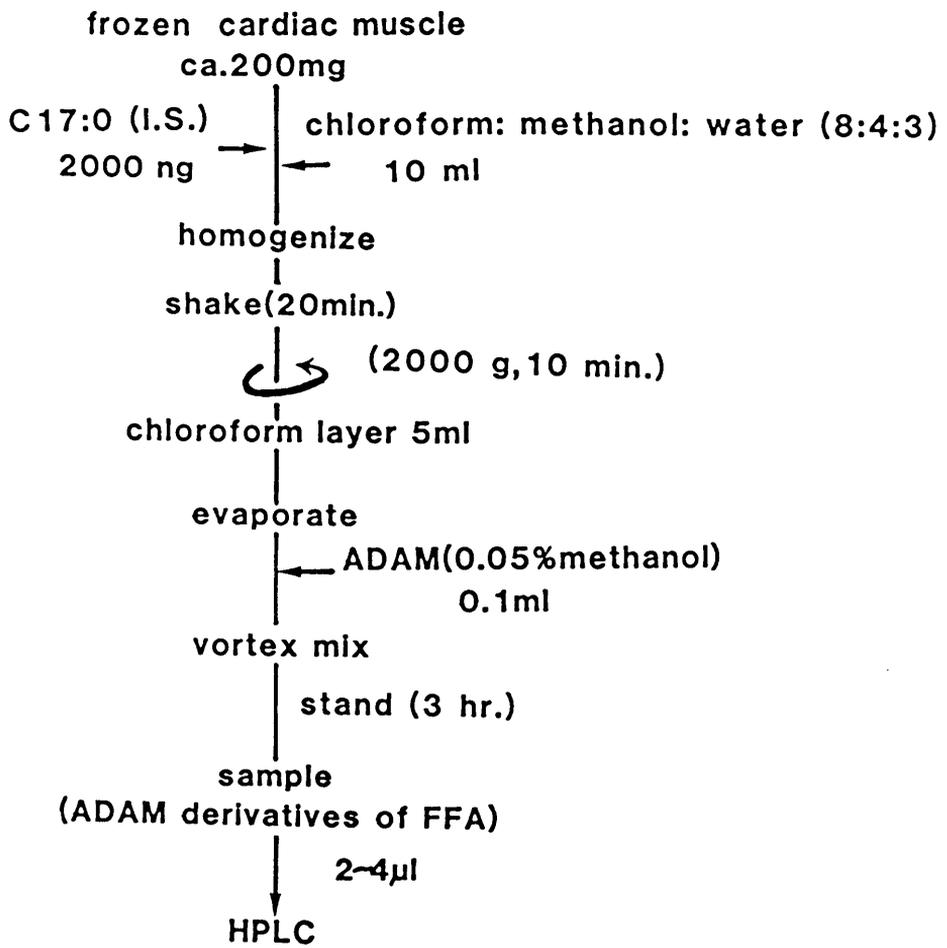


図 1 心筋の抽出と高速液体クロマトグラフィーによる分析にかけるまでの抽出液の前処理。 C:17(ヘプタデカン酸)は内部標準物質(I.S.)として抽出の途中で抽出液中に入れた。遊離脂肪酸(FFA)に蛍光標識するための蛍光試薬ADAMもこの操作の途中で入れてある。蛍光標識したサンプル2-4 µlをHPLCに注入した。

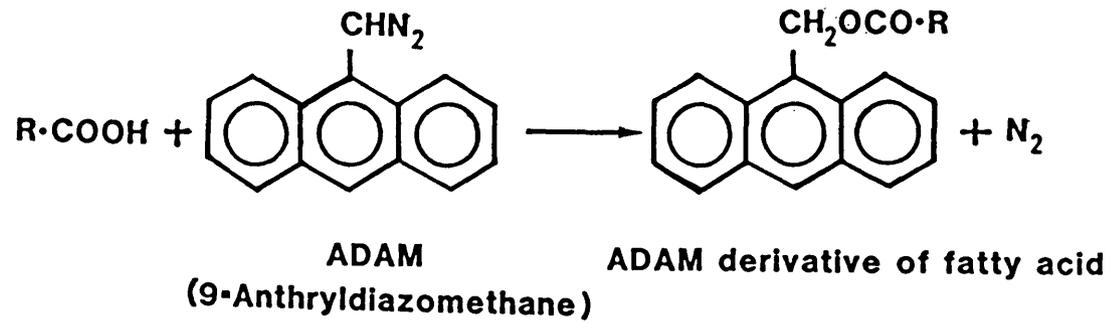


図 2 遊離脂肪酸 (R-COOH) と ADAM 試薬 (9-Anthryldiazomethane) との反応式。

Analytical conditions

HPLC Shimadzu LC-4A

flow rate 1.2 ml/min.

mobile phase methanol : water (90 : 10)

column Sorbax ODS (4.6 mm X 25 cm)

Column oven Shimadzu CTO-2AS

temp. 60°C

Fluorescence spectrometer Shimadzu RF-530

excitation wavelength 365 nm

emission wavelength 412 nm

図 3 ADAM試薬で蛍光標識した遊離脂肪酸サンプルのHPLC分析条件。
カラムはSorbax ODSの4.6 x 25cmを用いている。励起波長365 nm、
蛍光波長412 nmで蛍光分析をしている。用いたHPLCは島津のLC-4A
である。

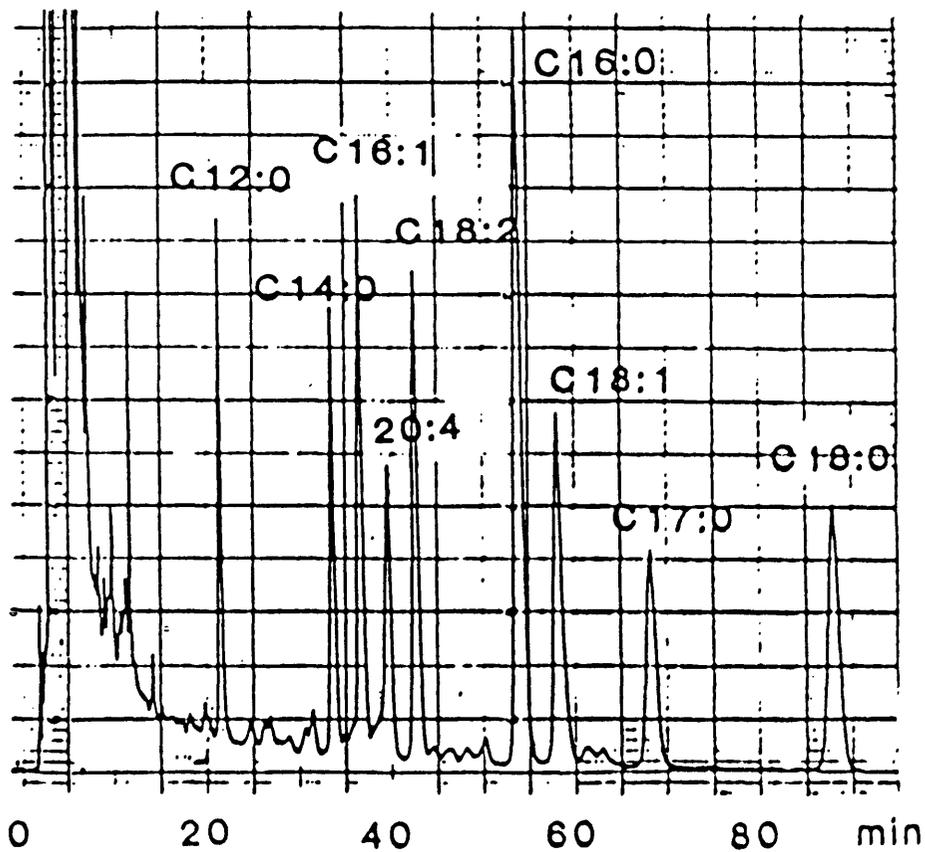


図 4 蛍光標識した標準の脂肪酸のクロマトグラム。C17:0 は生体内には含まれていないので、内部標準物質として用いた。

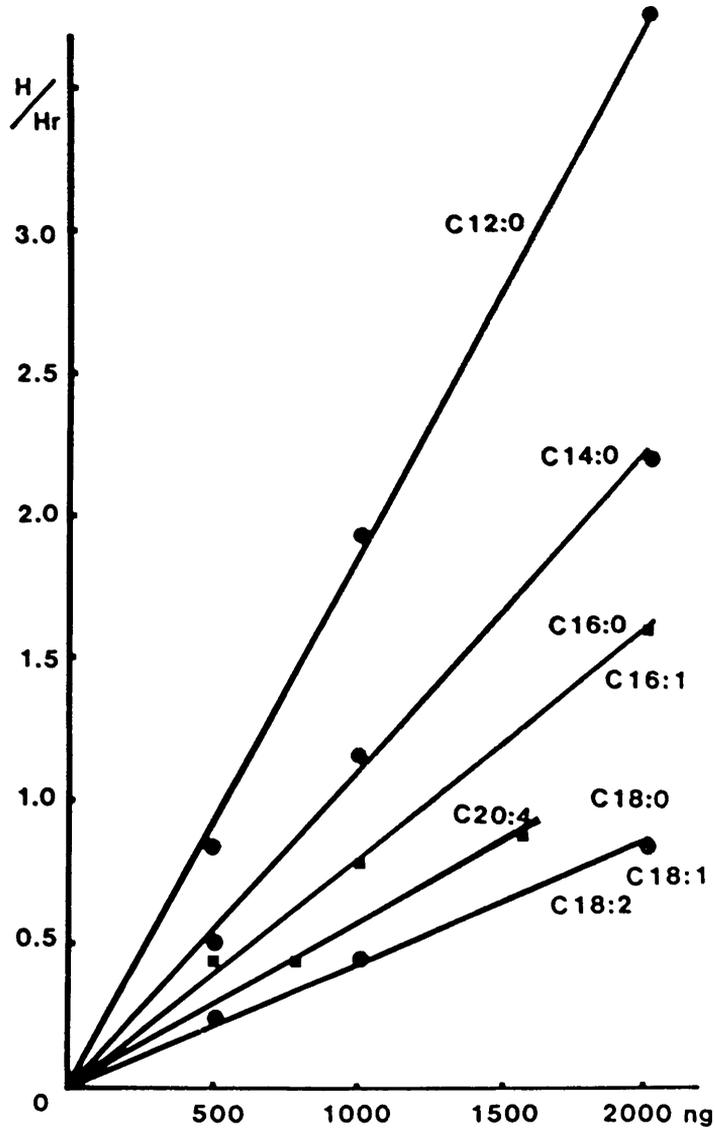


図 5 脂肪酸標準物質の標準曲線。H は各脂肪酸の蛍光光度。Hr は C17:0 の蛍光光度。すなわち、各脂肪酸の量は C17:0 に対する比としてあらわしてある。横軸は、サンプル 100 μ l 中の量をあらわす。従って、2000 ng とあるのは、2000 ng/100 μ l サンプルのことで、20 μ g/ μ l サンプルのことである。

3 実験結果

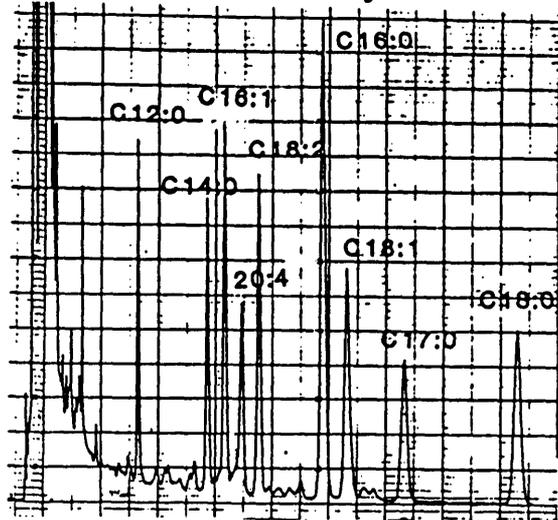
3-1 非虚血心筋の遊離脂肪酸

図6は脂肪酸の標準物質(上)と非虚血正常心筋から得たサンプル(下)のHPLC分析結果を示す。C 17:0(ヘプタデカン酸)は心筋には含まれていないので、内部標準物質として使用した。この図からわかるように、心筋の抽出液中にC 12:0(ラウリン酸), C 14:0(ミリスチン酸), C 16:1(パルミトレン酸), C 20:4(アラキドン酸), C 18:2(リノレン酸), C 16:0(パルミチン酸), C 18:1(オレイン酸), および C 18:0(ステアリン酸)を検出し得た。非虚血心筋(8例)に含まれる各脂肪酸の含量は次の通りである。

ラウリン酸	5.73 ± 0.70	(nmol/g wet tissue)
ミリスチン酸	23.57 ± 3.44	
パルミトレン酸	2.94 ± 0.48	
アラキドン酸	7.54 ± 0.80	
リノレン酸	48.80 ± 5.42	
パルミチン酸	79.32 ± 9.00	
オレイン酸	38.64 ± 7.52	
ステアリン酸	32.92 ± 3.36	

この分析結果からわかるように、パルミチン酸の含量が一番多く、次いでリノレン酸、オレイン酸が続いた。測定した遊離脂肪酸の総和は239.5 nmol/g wet tissueであった。この値は van der Vusse(1980)の29 nmol/gや Huneman et al. (1981)の56 nmol/g, Weglicki et al. (1973)の175 nmol/gよりも高いが、Weishaar et al. (1979)の900 nmol/gや Weishaar et al. (1977)の

Chromatogram of ADAM derivatives
of authentic fatty acids



Chromatogram of ADAM derivatives of FFA
derived from nonischemic cardiac muscle

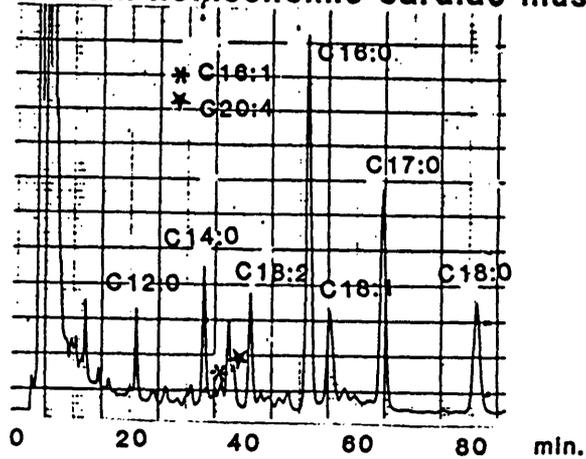


図 6 脂肪酸のHPLCクロマトグラム。(上)脂肪酸標準物質のクロマトグラム。(下)非虚血正常心筋内遊離脂肪酸のクロマトグラム。

1240 nmol/g よりも低い。

Kramer and Hulan (1978) はラットの心筋に含まれる遊離脂肪酸を注意深く抽出し定量したところ40 ug/g (すべてパルミチン酸だったとして計算すると約156 nmol/g)であったという。この値は我々が犬心筋で得た値に近い。多くの研究者たちは、ガスクロマトグラフィーを用いているが、我々は高速液体クロマトグラフィー(HPLC)を用いた。HPLCによる方法は、前処理が簡単であり、さらにADAM試薬を使うことによって測定感度が高くなっている。従って、このような方法で我々が得た犬心筋遊離脂肪酸の値は真の値に近いものと思われる。

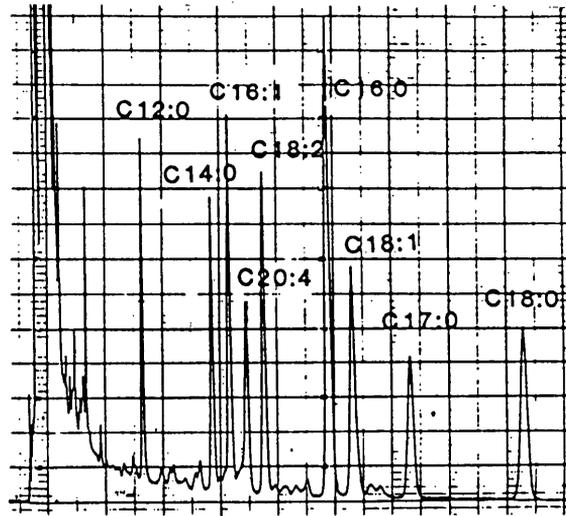
3-2 虚血心筋の遊離脂肪酸

図7は脂肪酸の標準物質(上)と虚血心筋(LADを90分間完全結紮)(下)のクロマトグラフを示す。各遊離脂肪酸の測定結果(7例)は次の通りである。

ラウリン酸	10.23	±	1.69	(nmol/g wet tissue)
ミリスチン酸	48.29	±	11.20	
パルミトレン酸	7.53	±	1.24	
アラキドン酸	25.48	±	3.18	
リノレン酸	106.61	±	12.28	
パルミチン酸	135.02	±	21.29	
オレイン酸	78.58	±	8.00	
ステアリン酸	57.47	±	3.23	

図8は非虚血心筋の遊離脂肪酸含量と虚血心筋の遊離脂肪酸含量とを比べた図である。この図からわかるように、虚血によって心筋

Chromatogram of ADAM derivatives
of authentic fatty acids



Chromatogram of ADAM derivatives of FFA
derived from ischemic cardiac muscle

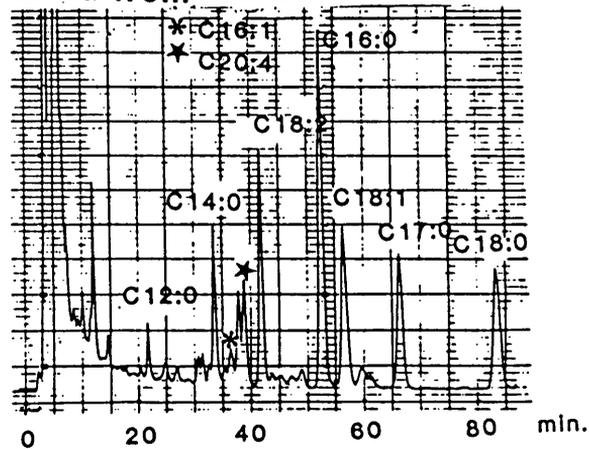


図 7 脂肪酸のHPLCクロマトグラム。(上)脂肪酸標準物質のクロマトグラム。(下)虚血心筋(90分間のLAD完全結紮)の遊離脂肪酸クロマトグラム。

Saline (0.5 ml/kg)

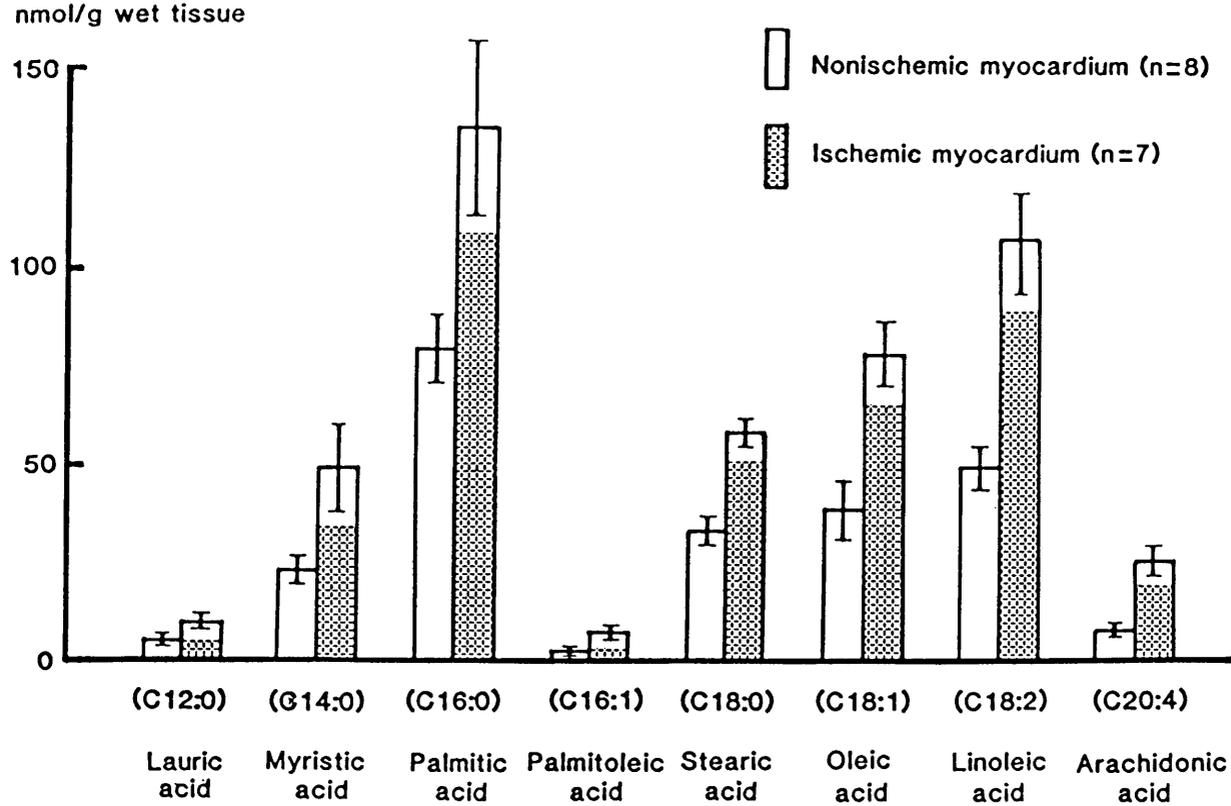


図 8 非虚血心筋(Nonischemic myocardium)と虚血心筋(Ischemic myocardium)の遊離脂肪酸含量の比較。生理的食塩水(Saline)は虚血(LADを90分間完全結紮)5分前に静脈内に投与した。

内の遊離脂肪酸の含量が上昇することがわかった。虚血による各遊離脂肪酸の上昇の程度は次の通りである。

ラウリン酸	1.79 倍
ミリスチン酸	2.05 倍
パルミトレン酸	2.56 倍
アラキドン酸	3.38 倍
リノレン酸	2.18 倍
パルミチン酸	1.70 倍
オレイン酸	2.03 倍
ステアリン酸	1.75 倍

この実験結果から、虚血による心筋の遊離脂肪酸の上昇の程度は各脂肪酸によって異なり、上昇の程度が最も高かったのはアラキドン酸で、その上昇は3倍以上であった。これに反して、ラウリン酸、パルミチン酸、ステアリン酸の上昇の程度は低く、1.70 - 1.80 倍程度であった。ミリスチン酸、パルミトレン酸、リノレン酸、オレイン酸の上昇の程度は、アラキドン酸の上昇の程度とラウリン酸群の上昇の程度との中間にあった。

3-3 非虚血心筋に及ぼすプロプラノロールの作用

図9は非虚血正常心筋の遊離脂肪酸含量におよぼすプロプラノロールの影響を示している。プロプラノロールを1 mg/kg (アドレナリン β -受容体を抑制するのに充分の量) を投与して90分間経過してから心筋を採取して、その中に含まれる遊離脂肪酸を定量した。その結果によれば、プロプラノロールは心筋の遊離脂肪酸含量に対

Nonischemic myocardium

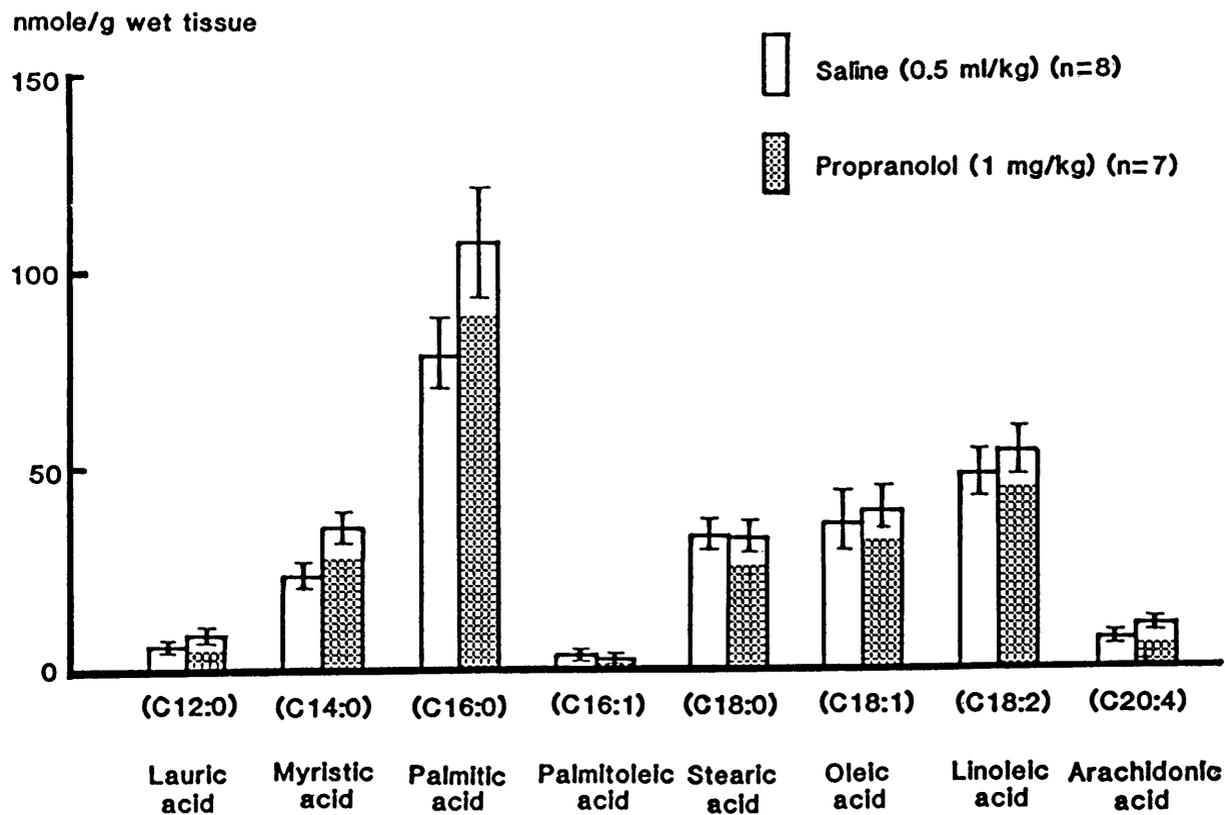


図 9 非虚血心筋の遊離脂肪酸含量。 虚血5分前に生理的食塩水またはプロプラノロール溶液を静脈内に投与した。

して大きな変化を与えなかった。ただし、パルミチン酸だけは、プロプラノロールによって、やや上昇した。

3-4 虚血心筋に及ぼすプロプラノロールの作用

図10は虚血心筋におよぼすプロプラノロールの作用を示している。この図からわかるように、LADの結紮5分前にプロプラノロール1 mg/kgを静脈内に投与してからLADを90分間結紮した群(7例)とプロプラノロールを投与しないでLAD結紮のみを行なった群(7例)の間では、心筋内各遊離脂肪酸含量に差がなかった。つまり、プロプラノロールは虚血による心筋脂肪酸の上昇をほぼ完全に抑制した。右旋性のプロプラノロールについても同じ実験を行なっているが、ラセミ体のプロプラノロール(一般的には単にプロプラノロールと呼ばれている)で得られた成績と同じ成績が得られつつある。

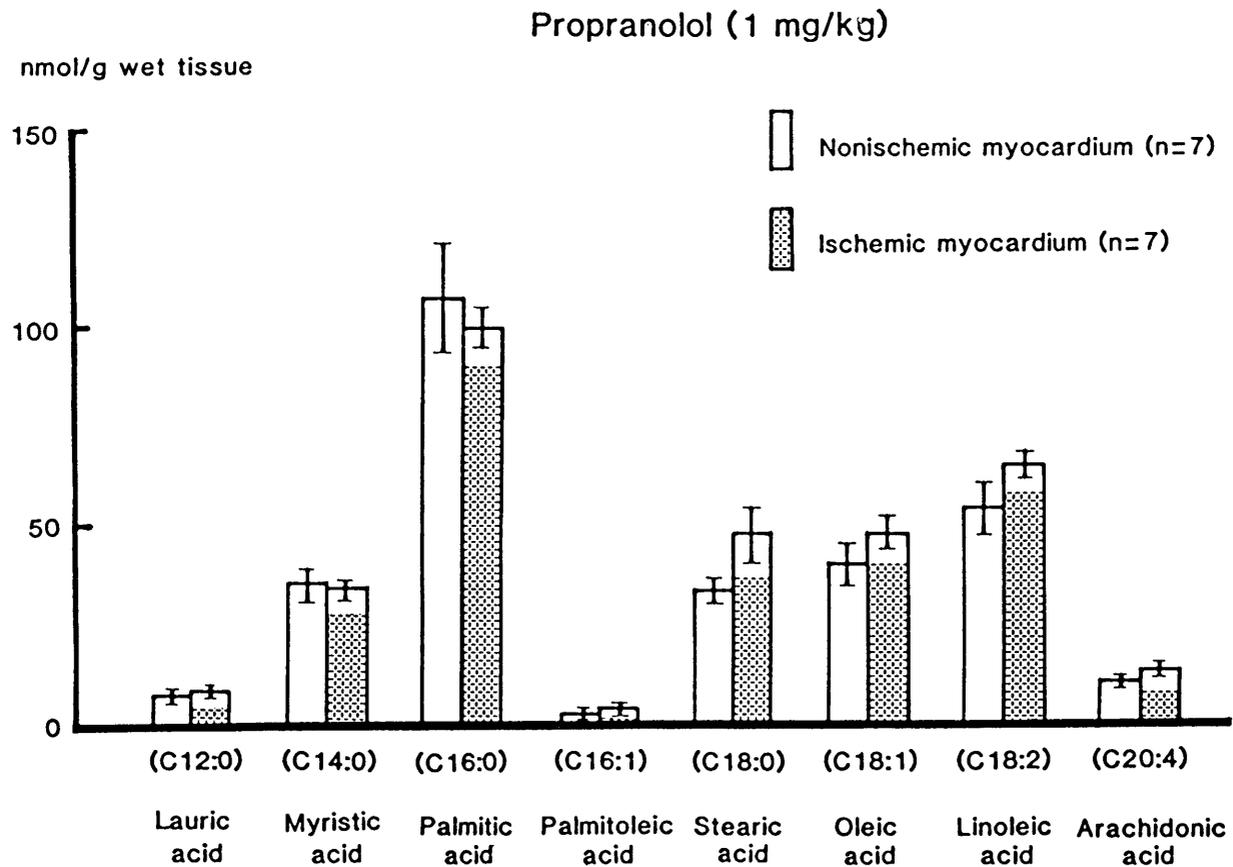


図 10 プロプラノロール存在下での非虚血心筋の遊離脂肪酸含量と虚血心筋内遊離脂肪酸含量との比較。

4 考察

従来、心筋の遊離脂肪酸はガスクロマトグラフィーを用いて測定されてきた。本実験では、HPLCを用いて測定を行なった。サンプルの前処理の煩雑さという点からみれば、HPLCを用いる方法の方が簡単であり、まさっている。本実験の一つの特徴は、ADAM試薬を用いて脂肪酸を定量したという点にある。ADAM試薬を用いることによって、測定感度が上り、心筋内遊離脂肪酸の安定した測定ができるようになった。従って、ADAM試薬にHPLCを組合せた方法は、心筋の遊離脂肪酸を測定するのに、簡便でしかも感度の高い、優れた方法である。

心筋内遊離脂肪酸の正常値は、研究者によって大きく異なり、29 nmol/g wet tissue から11,000 nmol/g wet tissue までの報告がある (Van der Vusse, 1983)。このように値が大きく異なるのは、心筋サンプルの採取方法の違いにあることが指摘されてきた。すなわち、心筋サンプルを室温で放置しておくことlipolysis が起こり、次第に遊離脂肪酸の含量が増加してくる。故に、心筋サンプルは採取後すぐに凍結しなければならない (Fairbairn, 1945)。注意深く分析した Kramer and Hulan (1978) のラット心筋での遊離脂肪酸の値は約150 nmol/g wet tissue であった。この値は、本実験で得られた値に近い。また、犬の心筋で得られた Weglich et al. (1973) の値 (175 nmol/g wet tissue)、および Chien et al. (1984) の値 (約350 nmol/g wet tissue) も本実験で得られた値に近い。

本実験で得られた重要な知見の一つは、心筋を90分間虚血にすると遊離脂肪酸が1.70から3.38倍にまで増加するということである。

この増加の程度は脂肪酸の種類によって異っており、アラキドン酸の増加は一番大きかった。これらの結果は、Van der Vusse et al. (1982)やChien et al.(1984)の結果に似ている。

虚血による心筋の遊離脂肪酸増加に対して β -遮断薬の効果を見た報告は、知る限りにおいて、この報告が初めてである。 β -遮断薬であるプロプラノロール(1 mg/kg)は、虚血による心筋遊離脂肪酸の増加をほぼ完全に抑制した。この事実は、プロプラノロールの虚血による心筋内遊離脂肪酸増加を抑制する作用は、プロプラノロールの抗虚血ないしは抗狭心症作用に関連していることを示唆する。プロプラノロールがどのような機序で抗虚血作用をあらわすのかについては、まだ完全な解答が得られていない。虚血になると心筋内にカテコールアミンが放出されるので(Sakai and Abiko, 1982)、プロプラノロールはこのカテコールアミンの β -受容体刺激作用に拮抗することによって、虚血から心筋を保護する作用をあらわすのであろう。しかし、どのようなメカニズムでカテコールアミンが心筋細胞に障害をあたえるのかはわからない。

この疑問に対する一つの考え方としては、カテコールアミンが β -受容体を刺激し、そのために心筋細胞の収縮力と興奮性が増加し、その結果ATPの消費が高まり、エネルギーの収支バランスが悪化するという考え方が成りたつ。エネルギーの収支バランスが悪化すれば細胞膜に障害がおこる。この考え方が正しければ、プロプラノロールの虚血からの心筋保護作用は理解できる。しかし、遊離脂肪酸とプロプラノロールとの関係はいぜんとして不明である。

カテコールアミンは脂肪組織においてリパーゼの活性を上昇させ、中性脂肪を分解して遊離脂肪酸を生成する作用のあることがわかっている。たしかにイソプロテレノールを静脈内に投与すれば血漿遊離脂肪酸の濃度は上昇し、この脂肪酸上昇はプロプラノロールによって遮断される(Nishimura et al., 1983)。これと同じことが心筋細胞内でもおこれば、プロプラノロールが虚血による心筋遊離脂肪酸上昇を抑制するという作用は理解できる。しかし、細胞内には中性脂肪よりもリン脂質の方が多いので、本実験の結果をこのメカニズムのみですべて説明できるとは思えない。

本実験の成績の中で、虚血による遊離脂肪酸上昇の中で一番上昇が著明だったのは、アラキドン酸の上昇であった。Van der Vusse et al. (1982)によれば、心筋を虚血にしても動脈血と冠静脈血中のアラキドン酸濃度較差は変化しないということなので、虚血による心筋内アラキドン酸の上昇は血液中的アラキドン酸の心筋内に蓄積したからではない。またアラキドン酸は主としてリン脂質の中に見出されるので、虚血で心筋のアラキドン酸が上昇したということは、虚血によって心筋細胞膜内にあるリン脂質の分解がおこったことを示唆する。心筋内には、ホスホリパーゼ A もホスホリパーゼ C も存在する(Weglicki, 1980)。また細胞膜のホスホリパーゼ活性はイソプロテレノールによって3-4倍上昇し、この上昇はプロプラノロールによって遮断されることがわかっている (Franson et al., 1977)。従って、虚血によってまずカテコールアミンが心筋内に遊離し、このカテコールアミンが β -受容体を刺激してホスホリ

パーゼの活性を上昇させ、その結果リン脂質の分解がおこり、心筋内に遊離脂肪酸が蓄積すると考えられる。また、虚血による遊離脂肪酸の心筋内蓄積は、プロプラノロールの前投与によって防止されるということになる。

プロプラノロールは β -受容体遮断作用の他に膜安定化作用(局所麻酔作用)ももっている。故に、プロプラノロールの作用のうち、 β -遮断作用が虚血による心筋内遊離脂肪酸の上昇抑制に役立っているのか、膜安定化作用が役立っているのかわからない。このため、プロプラノロールの光学異性体であるd-プロプラノロールを用いて同じ実験を現在行なっている。現在までに得られた成績によれば、d-プロプラノロールもプロプラノロール同様虚血による心筋内遊離脂肪酸増加を抑制する。従って、プロプラノロールの膜安定化作用も β -遮断作用同様に虚血による心筋内遊離脂肪酸の蓄積に貢献していると思われる。しかし、膜安定化作用がどのようにして虚血による遊離脂肪酸の蓄積防止に役立っているのかについてはまだ不明である。

5 要約

(1) ADAM試薬と高速液体クロマトグラフィーを用いることによって、心筋内遊離脂肪酸が比較的簡単に定量できるようになった。同定、定量した犬心筋遊離脂肪酸はラウリン酸、ミリスチン酸、パルミトレン酸、アラキドン酸、リノレン酸、パルミチン酸、オレイン酸、ステアリン酸の8種であった。これら遊離脂肪酸の合計は 239.5 nmol/g wet tissue であった。

(2) 犬の冠動脈前下降枝(LAD)を90分間完全結紮すると、虚血になった部位の心筋内の遊離脂肪酸の含量が1.70 - 3.38倍増加した(とくにアラキドン酸の増加が著明であった)。

(3) 虚血による心筋内遊離脂肪酸の増加は、プロプラノロール(1 mg/kg, i.v.)によってほぼ完全に抑制された。

(4) LADを結紮すると、虚血になった心筋内にカテコールアミンの遊離がおこり、このカテコールアミンがホスホリパーゼの活性を上昇させ、このために遊離脂肪酸が心筋内に蓄積することが示唆された。

6 文献

- Chien, K. R., Han, A., Sen, A., Buja, L. M. and Willerson, J. T.: Accumulation of unesterified arachidonic acid in ischemic canine myocardium: Relationship to a phosphatidylcholine deacylation-reacylation cycle and the depletion of membrane phospholipids. *Circulation Res.* **54**, 313-322 (1984).
- Fairbairn, D.: Free fatty acids in animal tissues. *J. Biol. Chem.* **157**, 645-650 (1945).
- Folch, J., Lees, M. and Sloane Stanley, G. H.: A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J. Biol. Chem.* **226**, 497-509 (1957).
- Franson, R. C., Pang, D. C. and Weglicki, W. B.: Modulation of sarcolemmal lipoxic activity by isoproterenol and propranolol. *Circulation* **56**, (Suppl. III), 236 (1977).
- Hunneman, D. H., Schweickhardt, C., Gebhard, M. M., Preusse, C. J. and Bretschneider, H. J.: Intramyocardial FFA concentration after treatment with verapamil. *Pflügers Arch. Europ. J. Physiol. Suppl.* **391**, R12 (1981).
- Nimura, N. and Kinoshita, T.: Fluorescent labeling of fatty acids with 9-anthryldiazomethane (ADAM) for high performance liquid chromatography. *Anal. Letter.* **13**, 191-202 (1980).
- Nishimura, T., Kita, S.-I. and Abiko, Y.: Effect of

- 1-(4-nitrophenyl)-2-isopropylaminoethanol (INPEA) and propranolol and their dextro isomers on hemodynamic and metabolic responses to isoproterenol in dogs. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **226**, 595-602 (1983).
- Reimer, K. A., Rasmussen, M. M. and Jennings, R. B.: Reduction by propranolol of myocardial necrosis following temporary coronary artery occlusion in dogs. *Circulation Res.* **33**, 353-363 (1973).
- Sakai, K. and Abiko, Y.: A neural factor involved in increase of the glycogen phosphorylase activity after coronary ligation in both ischemic and nonischemic areas of the dog heart. *Circulation Res.* **51**, 733-742 (1982).
- Van der Vusse, G. J.: Are free fatty acids harmful for the myocardium? *J. Drug Res.* **8**, 1578-1583 (1983).
- Van der Vusse, G. J., Roemen, T. H. M. and Reneman, R. S.: Assessment of fatty acids in dog left ventricular myocardium. *Biochim. Biophys. Acta* **617**, 347-352 (1980).
- Weglicki, W. B.: Degradation of phospholipids of myocardial membranes. In *Degrative Processes in Heart and Skeletal Muscle*, edited by K. Wildenthal, Amsterdam, Elsevier/North Holland, pp. 377-388 (1980).
- Weglicki, W. B., Owens, K., Urschel, C. W., Serrur, J. R. and Sonnenblick, E. H.: Hydrolysis of myocardial lipids during acidosis and ischemia.

Recent Adv. Stud. Cardiac Struc. Metab. **3**,
781-793 (1973).

Weishaar, R., Ashikawa, K. and Bing, R. J.: Effect
of diltiazem, a calcium antagonists, on
myocardial ischemia. Am. J. Cardiol. **43**,
1137-1143 (1979).

Weishaar, R., Sarma, J. S. M., Maryama, Y., Fisher,
R. and Bing, R. J.: Regional blood flow,
contractility and metabolism in early myocardial
infarction. Cardiology **62**, 2-20 (1977).