

AMCoR

Asahikawa Medical University Repository <http://amcor.asahikawa-med.ac.jp/>

あたらしい眼科 (1991.05) 8巻5号:823～825.

保存角膜におけるリン酸化合物代謝の観察

五十嵐弘昌, 吉田晃敏, 田中邦雄

保存角膜におけるリン酸化合物代謝の観察

五十嵐弘昌*¹ 吉田晃敏*¹ 田中邦雄*²*¹ 旭川医科大学眼科学講座 *² 同 機器センター

Assessment of Preserved Corneal Viability via Phosphorus-31 Nuclear Magnetic Resonance

Hiromasa Igarashi¹⁾, Akitoshi Yoshida¹⁾ and Kunio Tanaka²⁾Department of Ophthalmology¹⁾, Central Laboratory for Research and Education²⁾, Asahikawa Medical College

³¹P-NMR スペクトロスコピーにより保存角膜のリン酸化合物代謝動態を観察し、本法の有用性について検討した。

ブタ眼球を bicarbonate free glucose-phosphate Ringer (EP-II®), 乳酸リンゲル (LACTEC®) および生理食塩水 (PS) に 4°C で保存し、保存 5 時間後と 24 時間後に測定を行った。さらに、EP-II® については角膜のみの保存も行った。

EP-II®による角膜のみの保存がもっともすぐれた保存状態を維持した。また、LACTEC®による保存では保存数時間以内であれば EP-II®とほぼ同等の効果が得られるが、PS による保存では保存数時間でかなり低下した。これらの結果は、今日までの基礎的研究とほぼ同様な結果である。したがって、本法が生標本の測定が可能なことより、移植角膜片の viability の評価への応用が期待された。

Using fresh porcine eyeballs preserved in EP-II®, LACTEC® or isotonic sodium chloride at 4°C, preserved corneal viability was studied via phosphorus-31 nuclear magnetic resonance, with particular emphasis on changes in phosphate compound dynamics.

Results indicate that preservation of the cornea alone in EP-II® provides the best results, as previously reported; it is therefore concluded that phosphorus-31 nuclear magnetic resonance is useful for investigating the viability of preserved corneas.

[Journal of the Eye (Atarashii Ganka) 8 (5) : 823~825, 1991]

Key words: ³¹P-NMR スペクトロスコピー, 角膜移植, アデノシン三リン酸 (ATP), 糖リン酸, phosphorous-31 magnetic resonance spectroscopy, corneal transplantation, adenosine triphosphate, sugar phosphate.

はじめに

³¹P-NMR スペクトロスコピーを用いることにより、生体組織のリン酸化合物代謝を *in vivo* で測定することが可能であり、今日まで心筋、肝臓などのリン酸化合物を高濃度に含有する組織を中心に多数の研究が行われて

きた¹⁾。一方、眼内組織はリン酸化合物の含有量が乏しいため、本法を用いるためには抽出による測定が主流であった²⁾。しかし、筆者らは霊長類を除きもっとも人に近いとされるブタ角膜を用い、生標本での測定法を報告した³⁾。今回筆者らは、この方法を用いて、各種の角膜

〔別刷請求先〕 五十嵐弘昌：〒078 旭川市西神楽 4-5-3-11 旭川医科大学眼科学講座

Reprint requests: Hiromasa Igarashi, M.D., Department of Ophthalmology, Asahikawa Medical College, 4-5-3-11 Nishikagura, Asahikawa 078, JAPAN

保存液によって保存された角膜のリン酸化合物代謝を観察し、本法の有用性について検討した。

I. 方法

成熟ブタ（体重約 80 kg）の角膜を対象とし用いた。ブタ角膜は近郊の屠殺場にて採取した。

ブタを屠殺後、すみやかに眼球を摘出し、眼球を bicarbonate free phosphate Ringer (EP-II®) とグルコースリンゲル (LACTEC®) および生理食塩水 (PS) の3種類の溶液に 4°C で保存した。そして、保存5時間後および24時間後に角膜のみを摘出し、リン酸化合物代謝の測定に用いた。また、EP-II® で保存した眼球については、保存5時間後に角膜のみを摘出し、再度 EP-II® に保存し、眼球摘出から24時間後に測定を行った。各保存液は、角膜2個につき 100 ml ずつ使用した。

³¹P-NMR 測定に、リン共鳴周波数 109.25 MHz, 静磁場強度 6.3 Tesla の JEOL GX-270 WB, FT-NMR 装置を使用した。

測定条件としては、パルス幅 5 μsec の 30° パルスを用い、パルスくり返し時間 0.5 sec, 積算回数 7,200 回とした。

サンプル管は、直径 1 cm の NMR 用ガラス管で、この中には外部標準として HMPA (hexamethyl phosphoroamide) を封入した微量ガラス管を4本装置した。さらに、このサンプル管内に buffer (phosphate free Krebs bicarbonate medium) および角膜2個を挿入し、これを鞍型コイルプローブ内に装着して測定を行った。

II. 結果

図1に ³¹P-NMR 法により測定されたスペクトルの代表例を示す。各ピークを HMPA を1として換算し、これらのピークのうち今回は糖リン酸 (SP) とアデノシン三リン酸 (ATP) について検討した。

図2に SP, 図3に ATP の経時変化を示す。なお、縦軸は EP-II® で5時間保存したときの値を 100% とした。

各保存液別に、保存5時間後と24時間後の値を比較

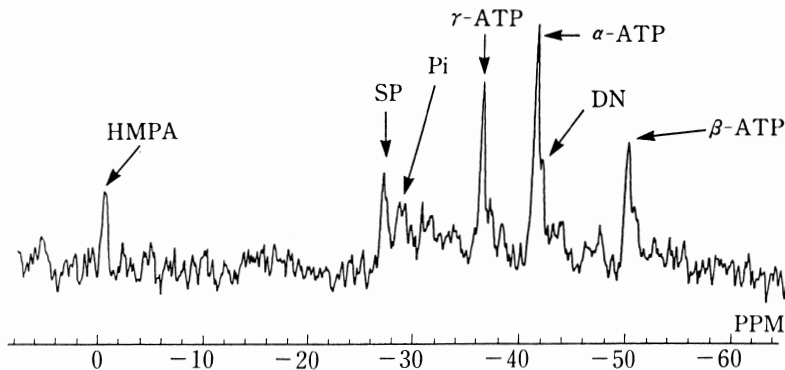


図1 ブタ角膜の ³¹P-NMR スペクトル
HMPA : hexamethyl phosphoroamide.
SP : sugar phosphate.
Pi : inorganic phosphate.
 α, β, γ -ATP : α, β, γ -adenosine triphosphate.
DN : dinucleotide.

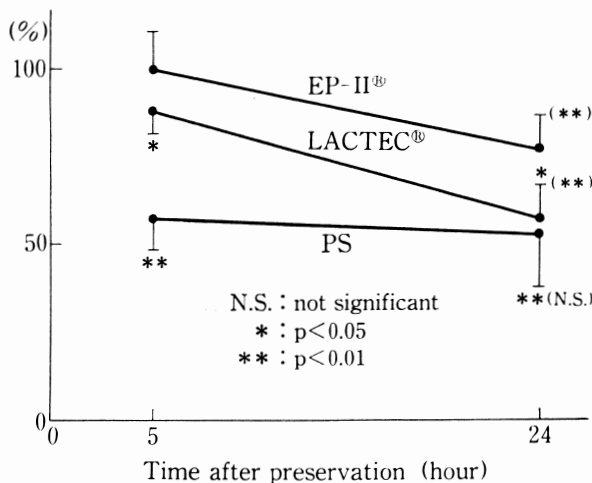


図2 SP の経時変化

カッコ内の有意差は各保存液別の保存後5時間と24時間の比較を示す。

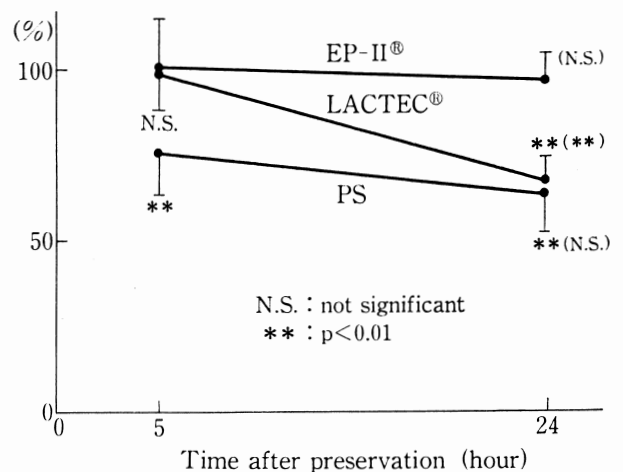


図3 ATP の経時変化

カッコ内の有意差は各保存液別の保存後5時間と24時間の比較を示す。

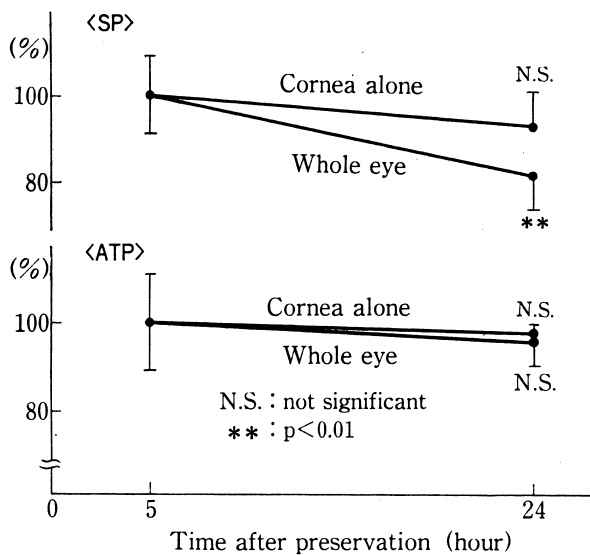


図4 EP-II®による全眼球保存と角膜のみの保存との比較

すると、EP-II®ではSPだけが、LACTEC®ではSPおよびATPの両方が有意に低下したが、PSではSP、ATPとも有意な変化を認めなかった。

さらに、EP-II®とLACTEC®、EP-II®とPSをそれぞれ保存5時間後と24時間後と比較すると、SPはEP-II®に比べLACTEC®およびPSとも保存5時間後および24時間後に有意に低下した。しかし、LACTEC®による保存では、PSによる保存に比べよりEP-II®に近い状態を維持していることがわかった。また、ATPはLACTEC®による保存では保存5時間後ではEP-II®による保存と有意な変化を認めず、24時間後に有意な低下を認めるのに対し、PSでは、保存5時間後にはすでに有意な低下を示した。

つぎに、全眼球保存と角膜のみの保存について比較すると(図4)、角膜のみの保存では、SPおよびATPとも保存5時間後と24時間後の間に有意な変化を認めなかった。したがって、全眼球の保存より角膜のみの保存のほうが角膜のリン酸化合物代謝を維持するうえでよりすぐれた手法であることがわかった。

III. 考 按

SPは、ペントースリン酸を主体とするリン酸化合物で構成されている。これらの化合物は解糖系の中間代謝産物で、とくにペントースリン酸は脂肪酸の合成に必要なNADPHや核酸の合成に必要なリボース5リン酸を供給する。したがって、ペントースリン酸化合物の低下は、角膜の脂肪酸や核酸の生合成が低下したことを間接

的に表している。また、ペントースリン酸回路は、グルコースの炭素原子をATPを産生することなく完全に燃焼するため、生体内においてエネルギーを多量に必要とする組織(心臓、骨格筋)では存在しない。今回の結果から、SPはATPの低下する以前に低下することより、グルコースは本回路を経由することなく、そのほとんどがATPの産生に供給されていることが示唆される。

長時間を要する手術の際、角膜に混濁が生じ、手術操作が困難となることは、日常の臨床の場においてしばしば遭遇する状況である。また、保存角膜のviabilityが低下すると、角膜が混濁することもよく知られている⁴⁾。今回の結果では、PSによる保存は、EP-II®に比べ保存後5時間でリン酸化合物代謝のかんりの低下を認めた。したがって、移植角膜片の保存はもとより、術中の角膜湿潤の目的でもPSの使用は避けたほうがよいと考えられた。

今回の研究を施行するにあたって、今日までの研究および実際の臨床の場から、EP-II®による角膜のみの保存がもっとも良好な結果となることは容易に想像される⁴⁾。そして、今回の³¹P-NMR法によるリン酸化合物代謝動態の観察では、予想どおりの結果であった。さらに本法は、保存角膜を生標本のままリン酸化合物代謝動態を観察することが可能である。したがって、保存角膜のviabilityの評価に、本法の応用が期待される。しかし、今回の測定法では、1回の測定に角膜が2枚必要なことや、測定時間が1時間と長時間を要するなどの問題があり、今後、本法をより臨床的な手法とするため、測定法の改良を検討中である。

文 献

- 1) Haselgrove, J.C., Harihara, J.V. et al.: In vivo one-dimensional imaging of phosphorus metabolites by phosphorus-31 nuclear magnetic resonance. *Science* **220**: 1170~1173 (1983)
- 2) Greiner, J.V., Kopp, S.J. et al.: Phosphatic metabolites of the intact cornea by phosphorus-31 nuclear magnetic resonance. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **24**: 535~542 (1983)
- 3) 五十嵐弘昌, 吉田晃敏ほか: ³¹P-NMR法を用いたラット角膜およびブタ角膜のリン酸化合物代謝の観察. *眼紀* **41**: 727~730 (1990)
- 4) 増田 清, 松山隆志ほか: 新しい角膜保存液“New-EP液”の開発-全眼球から保存液へのHCO₃⁻の推移. *眼臨* **78**: 720~727 (1984)