

骨格筋循環・代謝の非侵襲測定的确立と 脈管学領域への応用

浜岡 隆文^{*,**} 佐古 隆之^{***}

要 旨：ヒトの骨格筋エネルギー代謝の研究は従来、バイオプシーにより採取した筋標本による分析化学的手法が用いられており、高エネルギーリン酸化合物、NAD⁺/NADH比あるいはミオグロビン酸素飽和度等^{1,2)}の重要な代謝指標がその対象であった。バイオプシー法の利点は非常に多種類の代謝物質の評価が可能ることにより特定の代謝経路を調べることができることである。その一方で、侵襲的であるという欠点以外に、化合物が遊離体であるか否かの区別が困難であり、生体内における実際の活性を必ずしも反映していない等の欠点を有している。

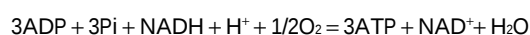
磁気共鳴分光法(MRS)は遊離のリン酸化合物の測定法として開発され、1970年後半からは非侵襲的な骨格筋エネルギー代謝研究においては「ゴールドスタンダード」として発展してきた方法である^{3,4)}。一方、光学的手法である近赤外分光法(NIRS)はヒト骨格筋のエネルギー代謝研究においては、MRSに比較してより簡便で安価であるという特徴を活かして、筋での酸素の需要と供給動態の相対的な評価法として用いられてきた⁵⁻⁸⁾。さらに近年になり、ヘモグロビン/ミオグロビン量あるいは酸素飽和度の定量的測定が可能なNIRSが開発された⁹⁾。本稿ではMRSおよびNIRSを用いた骨格筋エネルギー代謝および酸素動態の評価法について焦点をあて解説する。(J. Jpn. Coll. Angiol., 2003; 43: 239-244)

Key words: Near infrared spectroscopy, Magnetic resonance spectroscopy, Muscle oxygenation, Muscle metabolism, Noninvasive procedure

1. 骨格筋エネルギー代謝の制御

骨格筋は酸素供給量において安静時の数10倍、代謝率においては最大で安静時の100倍以上にまで急激に変化させることのできる非常にユニークな臓器である。それゆえ骨格筋の代謝コントロールはMeyerhofやKrebsをはじめとした多くの歴史的な生化学者達の興味の対象となってきた。

骨格筋における正味の酸化的リン酸化の経路は以下の式により示される。



酸化的エネルギー代謝速度に影響する基質濃度に対する速度コントロールモデルはMichaelis-Menten式を用い

て示され¹⁰⁾、

$$V/V_m = 1 / (1 + k_1/\text{ADP} + k_2/\text{Pi} + k_3/\text{O}_2 + k_4/\text{NADH})$$

ここでVは測定された速度、V_mは最大速度、k₁-k₄はそれぞれの基質に対する親和定数、Piは無機リン酸、PCrはクレアチンリン酸、NADHは還元型ニコチンアデニンジヌクレオチド、NAD⁺はニコチンアデニンジヌクレオチドを示す。

上記式の中で生体におけるミトコンドリア内の濃度が実験的に確かめられたK_m値に最も近い濃度であることから、ADPは酸化的代謝率を制御している第一の候補として考えられている。ミトコンドリアでの呼吸速度はミトコンドリア内膜を介してのアデニンヌクレオチドの移動速度により決定されうることから、生理学的条件下においては細胞質内の[ATP濃度]/[ADP濃度]が呼吸速度をコントロールしていることとなる¹¹⁾。またMeyerら¹²⁾は

* 鹿屋体育大学スポーツ科学講座

** 東京医科大学衛生学公衆衛生学

*** 日本女子大学家政学部食物学科

2003年3月24日受付 2003年3月27日受理

Evaluation of Skeletal Muscle Function

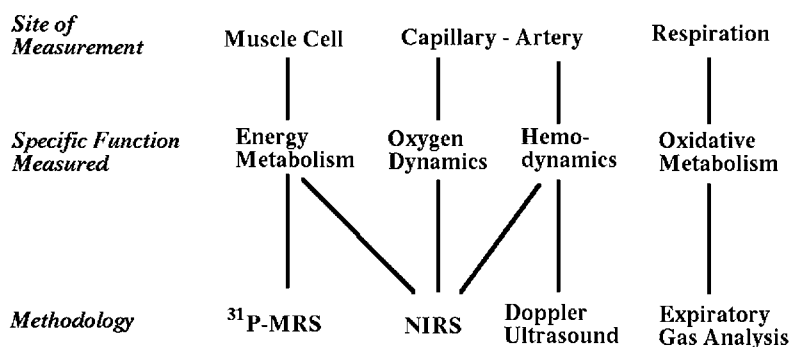


Figure 1 Noninvasive procedure for evaluation of muscle metabolism.

熱力学モデルを用いてPCr濃度とミトコンドリア呼吸速度とが直線的な関係にあることを示した。

骨格筋エネルギー代謝の研究には大きく分けると侵襲的および非侵襲的方法がある。侵襲的方法としてはカテーテルによる動静脈血酸素濃度較差の評価、マイクログラフによる組織内の酸素濃度のモニター等がある。非侵襲的方法としてはプレチスモグラフィやドップラー法による血流量測定、MRSによるリン酸化化合物濃度測定、NIRSによる酸素動態測定等がある。また心拍出量測定や呼気ガス分析法は全身の呼吸循環機能を対象とした方法である。非侵襲的方法についてはFig. 1にまとめた。

2. 磁気共鳴分光法

(Magnetic Resonance Spectroscopy: MRS)

磁気共鳴法は1980年代に初めてヒトを対象として用いられたのを境に¹³⁾、生理学および医療の分野で非常に盛んに用いられるようになった。磁気共鳴イメージング(MRI)が解剖学的構造の評価において非常に有用であるのに対し、磁気共鳴分光法(MRS)は豊富な生化学的情報の評価が可能である。Fig. 2に示したように ^{31}P -MRSはPi, PCr, 三つのATPのピークが測定される。骨格筋細胞内のADP濃度は少量過ぎるために直接測定することは困難であるが、クレアチンキナーゼ平衡反応を応用することで算出可能である。さらにPiピークの化学シフトをもとに細胞内pHの評価を行うことができる。

原理的にはMRSを用いると核スピンをしているすべての核について測定することができるが、一般的なものは ^1H , ^2H , ^7Li , ^{13}C , ^{14}N , ^{19}F , ^{23}Na 等である。 ^{31}P がよく用いられる理由として、リン酸化化合物と化学的・物理的エネルギー伝達物質としての筋の機能との強い関連性、 ^{31}P が自然界に存在する唯一のリン酸同位元素であること、 ^1H に比較すると1/15程度の感度ではあるものの、MRSに対して最も感度の高い核のひとつであることがあげられる。

ヒトを対象とした研究で用いられる一般的なMRS装置の特徴として、マグネットのボア径は30cmおよび100cm、磁場強度は1.5および2.0Teslaである。測定部位がマグネットの中心になければならないという制限のために、小さなマグネットサイズでは測定部位が前腕あるいは下腿に限定される。一般的に磁場強度は大きいほうがS/Nが良いことから、4.7Teslaという非常に強磁場のマグネットを用いた研究もある。

骨格筋有酸素代謝能の評価

1) 定常状態での評価

定常状態での運動中は骨格筋内のATP濃度はほぼ一定の値8.3mMを維持し、運動強度の増加に伴いPCr濃度の低下が認められる。さらに運動時の筋pHが安静時の7.0から低下しない条件下においては、Pi/PCrはミトコンドリアの酸化的リン酸化速度のコントロール因子である筋内ADP濃度を反映していると考えられている。実際Pi/PCrと外的仕事量との関係は放物曲線を示し、

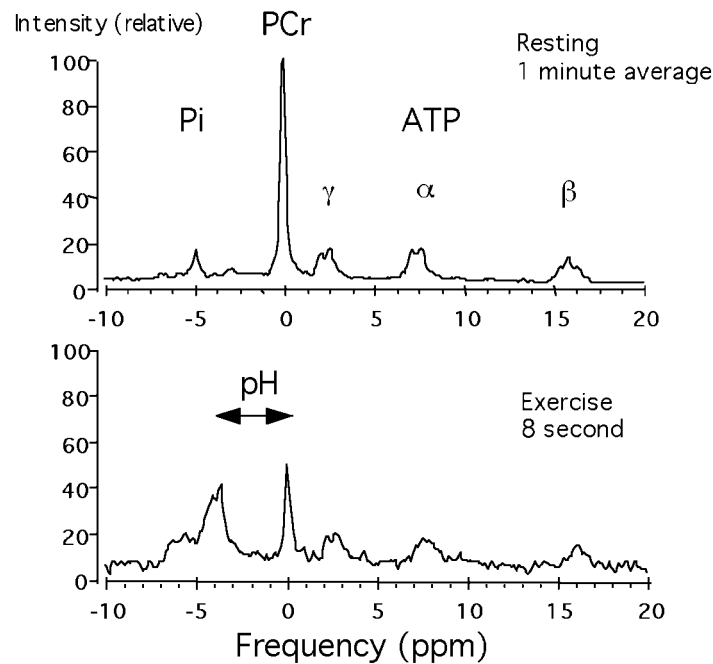


Figure 2 Typical ^{31}P -magnetic resonance spectroscopy (^{31}P -MRS) spectra at rest (top) and after strenuous exercise (bottom). Both spectra have 5-Hz line broadening and are presented in arbitrary units of intensity on the Y-axis. Pi, inorganic phosphate; PCr, phosphocreatine.

健常者 (Normals) での漸近線の値は Michaelis-Menten モデルでいう $V_{\max}$ を示す (Fig. 3)¹⁰⁾。この評価法の利点は比較的長い測定時間 (3 ~ 6 分間) でのデータを加算平均することが可能なことから、それほど高い時間分解能が必要とはならず、高い S/N のデータが得られるということである。

2) 回復期での評価

MRS を用いると、有酸素代謝能は最大下運動後の PCr の再合成速度のような非定常状態における評価も可能である¹⁴⁾。運動後の PCr の回復は酸素消費量を反映しており、さらに PCr の回復時定数の逆数は前述の定常状態下において評価される $V_{\max}$ と対応する¹⁵⁾。筋の酸性化はミトコンドリア呼吸を抑制することから、本指標が筋の有酸素能を反映するのは筋内 pH が低下しない条件下である。McCully ら¹⁶⁾ は MRS で測定した PCr の回復速度と筋バイオプシーにより得られたミトコンドリアの酸化系酵素活性値との間に有意な相関関係が認められることを報告している。一方、末梢血管障害患者

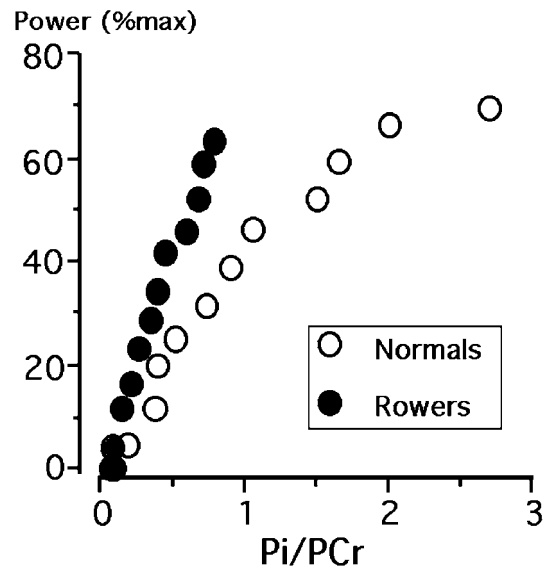


Figure 3 Power output as a function of the ratio of inorganic phosphate to phosphocreatine.

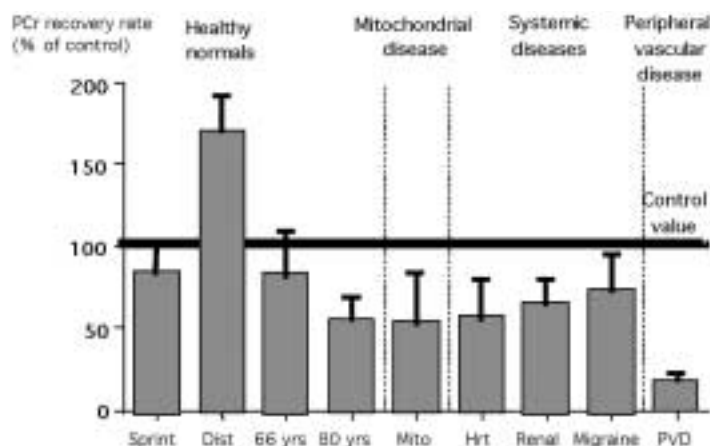


Figure 4 PCr recovery rates in subjects with varied muscle function. PCr, phosphocreatine; Sprint, sprinter; Dist, distance runner; Mito, mitochondria disease; Hrt, heart failure; Renal, renal dysfunction; PVD, peripheral vascular disease.

の回復時定数は一般健常者の約30秒間，アスリートの約18秒間に比較して200～250秒間と遅延することが報告されている¹⁷⁾。本評価法の利点は筋内pHが安静時値の7.0より大幅に低下しない条件下であれば，PCrの回復時定数は運動強度に依存しないということである。これはヒトを対象とした随意運動ではよくあることであるが，対象となる筋の行った仕事量の正確なコントロールが困難な場合には非常に有効な評価法といえる。ただし，運動後のPCr濃度の回復時定数を得るためには4～10秒間に1データポイントを測定しうる高い時間分解能を有する測定環境が必要となる。

3) MRS測定の応用例

運動後のPCr濃度の回復時定数を指標として，アスリート，ミトコンドリア疾患患者，循環器疾患患者，末梢循環障害患者など，さまざまな対象の骨格筋代謝能が評価されている(Fig. 4)。また14日間の足底屈トレーニングによりPCrの回復時定数が有意に短縮すること，ディトレーニングによりトレーニング前のレベルに戻ることが確認されている¹⁸⁾。

3. 近赤外線分光法 (Near Infrared Spectroscopy: NIRS)

Jobsisら⁵⁾により近赤外線が生体組織の測定に応用されて以来，近赤外線分光法(NIRS)は1980年代に多くの研究者によって生体応用へ向けての開発が進められ

た。ヒトを対象とした研究で現在最も広く用いられているのは連続光を用いたNIRcwsである。近赤外線領域とは700～3000nmの波長であり，このうちNIRSに用いられるのは700～900nmの波長である。測定対象は毛細血管および細静脈内のヘモグロビン，細胞内のミオグロビンとされており，現在のところこれらの情報を区別することは困難である。本稿では便宜的にヘモグロビン/ミオグロビンをHbと表記する。NIRcwsによる情報は，筋への酸素の供給と消費のバランスを反映した筋酸素化レベルとして測定される。

NIRcwsにより測定されるHbO₂の変化はBeer-Lambert則を基に計算されるが，生体内での光路長の測定が困難であることから，定量的測定ができない。このことは，連続した測定内でのみHbO₂量の大小を比較可能ということである。そのためわれわれは生理学的キャリブレーションの方法として，安静時のHbO₂レベルを100%，動脈血流遮断時の最低値を0%として異なる個人間あるいは実験間での比較を試みている¹⁹⁾。

1) 骨格筋酸素消費量の評価

NIRcwsにより骨格筋酸素消費量を測定するためには，筋への酸素供給量を正確に把握する必要がある。一時的動脈血流遮断法は，筋への酸素の供給を遮断することでそのときのHbO₂の低下率が筋での酸素消費量を反映することを応用した方法である。運動時の酸素消費量は安静時および運動終了直後に一時的動脈血流

遮断を行い、安静時のHbO₂の低下率に対する比として評価される(Fig. 5)。この方法で評価した運動時の骨格筋酸素消費量の測定の妥当性についてはSakoら²⁰⁾により検証されているものの、その際の注意点としては、HbO₂が低下している最中にNIRcwsによりモニターされる総ヘモグロビン量が一定であること、運動後の一時的動脈血流遮断時のHbO₂レベルが低下しすぎていないこと、短時間の遮断により評価すること等があげられる^{20, 21)}。

また一定強度以上での等尺性収縮時には活動筋への血流が遮断されることを利用して、漸増負荷運動における骨格筋酸素消費量の評価の試みもなされている^{22, 23)}。

2 筋酸素化レベルによる評価

運動後のHbO₂レベルの回復動態による骨格筋の有酸素能の評価が試みられている。Hamaokaら⁸⁾は最大下の自転車運動後のHbO₂レベルの回復時間において、一般健常者に比べてトライアスロン選手のほうが34%程度優れており、さらにこの違いは両群間の最大酸素摂取量の違いと同等であることを報告している。Nishioら²⁴⁾は骨折後の3週間のギブス固定により萎縮した筋を対象として、運動後の筋酸素下レベルの回復時間に対する影響について検討した結果、コントロール群に比べておよそ4倍遅延したことを報告している。さらに、ギブス固定終了後に行ったりハビリテーションにより、3~4週間で健常レベルにまで回復した。運動後のHbO₂レベルの回復動態については高齢者および末梢血管障害(PVD)患者を対象とした研究が数多く行われている。McCullyら²⁵⁾は若年群(26.2歳)と高齢者群(68.9歳)では下腿三等筋群におけるHbO₂レベルの回復動態には違いが認められないことを報告している。さらに高齢のPVD患者(71.6歳)のPVD脚においては、健常高齢者群に比べて5倍の遅延が認められることが確認されている。

以上のように、磁気共鳴分光装置による骨格筋エネルギー動態および近赤外分光装置による酸素動態の同時計測により、骨格筋エネルギー代謝の非侵襲的および総合的評価が可能となる。

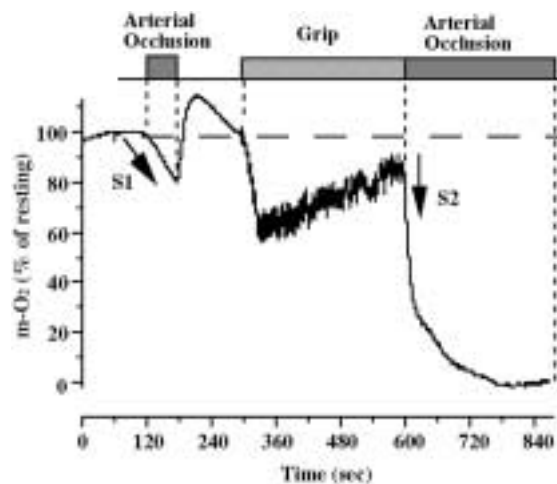


Figure 5 Muscle oxygenation kinetics in arterial occlusion during rest and at 3 minutes of exercise. Oxygen consumption at 3 minutes of exercise was 8.3 times higher than that at rest. The muscle oxygenation level at rest was defined as 100%, while that of the minimum value during arterial occlusion was defined as 0%.

文 献

- 1) Guezennec CY, Lienhard F, Louisy F et al.: In situ NADH laser fluorimetry during muscle contraction in humans. *Eur. J. Appl. Physiol.*, 1991, **63**(1): 26-42.
- 2) Gayeski TEJ and Honig CR: Direct measurements of intracellular O₂ gradients. Role of convection and myoglobin. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 1983, **159**: 613-621.
- 3) Gadian DG, Hoult DI, Radda GK et al.: Phosphorus nuclear magnetic resonance studies on normoxic and ischemic cardiac tissue. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1976, **73**: 4446-448.
- 4) Chance B, Eleff S, Leigh JS et al.: Non-invasive, non-destructive approaches to cell bioenergetics. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1980, **77**: 7430-7434.
- 5) Jobsis FF: Noninvasive infrared monitoring of cerebral and myocardial oxygen sufficiency and circulatory parameters. *Science*, 1977, **198**: 1264-1267.
- 6) Hampson NB and Piantadosi CA: Near-infrared monitoring of human skeletal muscle oxygenation during forearm ischemia. *J. Appl. Physiol.*, 1988, **64**(6): 2449-2457.
- 7) Chance B, Dait MT, Zhang C et al.: Recovery from exercise-induced desaturation in the quadriceps muscle of elite competitive rowers. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, 1992, **262**(31): C766-775.
- 8) Hamaoka T, Albani C, Chance B et al.: A new method for the evaluation of muscle aerobic capacity in relation to physical activity measured by near-infrared spectroscopy. In: *Integr. Med. Sport Sci.*, 1992, **37**: 421-429.
- 9) Chance B, Nioka S, Kent J et al.: Time resolved spectroscopy

- copy of hemoglobin and myoglobin in resting and ischemic muscle. *Anal. Biochem.*, 1988, **174**: 698-707.
- 10) Chance B, Leigh JS, Kent J et al.: Multiple controls of oxidative metabolism in living tissues as studied by phosphorus magnetic resonance. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1986, **83**: 9458-9462.
- 11) Kushmerick MJ: Energetics of muscle contraction. In: *Handbook of Physiology*. New York: Oxford, 1983, 189-236.
- 12) Meyer RA: A linear model of muscle respiration explains monoexponential phosphocreatine changes. *Am. J. Physiol.*, 1988, **254**(23): C548-553.
- 13) Chance B, Eleff S, Leigh JS et al.: Mitochondrial regulation of phosphocreatine/inorganic phosphate ratios in exercising human muscle: a gated ³¹P NMR study. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1981, **78**: 6714-6718.
- 14) Berbiroli B, Nontagna P, Cortelli P et al.: Cephalalgia, 1990, **10**: 264-272.
- 15) Mahler M: First-order kinetics of muscle oxygen consumption, and equivalent proportionality between QO₂ and phosphoryl-creatine level. *J. Gen. Physiol.*, 1985, **86**: 135-165.
- 16) McCully K, Fielding R, Evans W et al.: Relationships between in vivo and in vitro measurements of metabolism in young and old human calf muscles. *J. Appl. Physiol.*, 1993, **75**(2): 813-819.
- 17) McCully K, Vandenborne K, De meirleir K et al.: Muscle metabolism in track athletes, using ³¹P magnetic resonance spectroscopy. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, 1992, **70**: 1353-1359.
- 18) McCully K, Kakihiira H, Vandenborne K et al.: Noninvasive measurement of activity-induced changes in muscle. *J. Biomech.*, 1991, **24**(1): 153-161.
- 19) Hamaoka T, Iwane H, Shimomitsu T et al.: Noninvasive measures of oxidative metabolism on working human muscles by near-infrared spectroscopy. *J. Appl. Physiol.*, 1996, **81**(3): 1410-1417.
- 20) Sako T, Hamaoka T, Higuchi H et al.: Validity of NIR spectroscopy for quantitatively measuring muscle oxidative metabolic rate in exercise. *J. Appl. Physiol.*, 2001, **90**(1): 338-344.
- 21) 佐古隆之, 浜岡隆文, 勝村俊仁: 近赤外分光法による骨格筋酸素消費量の妥当性. *体育の科学*, 2002, **51**: 531-535.
- 22) van Beekvelt MCP, van Engelen BGM, Wevers RA et al.: In vivo quantitative near-infrared spectroscopy in skeletal muscle during incremental isometric handgrip exercise. *Clin. Physiol. & Func. Im.*, 2002, **22**: 210-217.
- 23) Hamaoka T, Katsumura T, Nishio S et al.: Muscle oxygen consumption at onset of exercise by near infrared spectroscopy in humans. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 2003 in press.
- 24) Nishio S, Iwane H, Hamaoka T et al.: *Med. Sci. Sports Exerc.*, 1994, **26**(5): S98.
- 25) McCully K, Halber C, Posner J: Exercise-induced changes in oxygen saturation in the calf muscles of elderly subjects with peripheral vascular disease. *J. Geront. Biol. Sci.*, 1994, **49**(3): 128-134.

Establishment of Noninvasive Measures of Skeletal Muscle Circulation and Metabolism: Application to Angiology

Takafumi Hamaoka^{*,**}, Takayuki Sako^{***}

^{*} National Institute of Fitness and Sports, Kagoshima, Japan

^{**} Department of Preventive Medicine and Public Health, Tokyo Medical University

^{***} Exercise Physiology, Department of Food & Nutrition, Japan Women's University, Tokyo, Japan

Key words: Near infrared spectroscopy, Magnetic resonance spectroscopy, Muscle oxygenation, Muscle metabolism, Noninvasive procedure

Muscle biopsies that have been used in the field of analytical biochemistry have provided meaningful information about muscle energy metabolism. However, obtaining a biopsy specimen requires an invasive procedure and includes information on the less biochemically active forms. Magnetic resonance spectroscopy (MRS) can detect free forms of phosphate compounds and provides the gold standard for noninvasive evaluation of skeletal muscle bioenergetics, both during exercise and recovery from exercise. MRS has afforded not only evaluation in the area of training status but also diagnosis and therapy for peripheral vascular disease and mitochondrial genetic deficiency. Near infrared spectroscopy (NIRS) can be used to evaluate the kinetics of oxygenation in working human muscle. The oxygenation level measured by NIRS reflects the relative difference between oxygen (O₂) supply to the muscle and O₂ consumption in the muscle. NIRS can also evaluate muscle oxygen consumption through the rate of decline in the HbO₂ level during arterial occlusion. Simultaneous monitoring of muscle bioenergetics by MRS and O₂ kinetics by NIRS can provide a comprehensive, noninvasive evaluation of muscle energy metabolism. (J. Jpn. Coll. Angiol., 2003; **43**: 239-244)