

心筋微小循環系の代謝機能動態イメージング

小笠原 康夫¹, 梶田 達也², 立花 博之¹
松本 健志¹, 梶谷 文彦³

Imaging of Myocardial Metabolic Activity

Yasuo OGASAWARA¹, Tatsuya KAJITA², Hiroyuki TACHIBANA¹
Takeshi MATSUMOTO¹ and Fumihiko KAJIYA³

キーワード：冠微小循環，ミトコンドリア，NADH，ポルフィリン

概 要

冠微小循環の病態生理学的特徴を解析するためには、局所での血流分布様式に加えて心筋での代謝機能を検討することが重要である。これまでの研究で心筋内血流分布は空間的に不均一であり、特に微小循環レベルでの著しい不均一性を呈することが報告され、冠微小循環障害との関連において注目されている。我々は心筋微小循環系において細動静脈血管の血管径動態を直接観察できる CCD 生体顕微鏡を開発し、冠微小循環の特徴を明らかにしてきた。本研究では、微小循環血流解析に加えて独自に開発した NADH 蛍光の観測システムを用いて冠微小循環レベルでの心筋局所代謝機能動態の解析を行った。あわせて血流トレーサを用いて心筋微小血管血流分布を計測し、正常および低酸素時の局所心筋代謝機能と血流分布の空間的対応性について検討した。

1. 緒 言

冠微小循環の病態生理学的特徴を解析するためには、局所での血流分布様式に加えて心筋での代謝機能を検討することが重要である。これまでの研究で心筋内血流分布は空間的に不均一であり、特に微小循環レベルでの著しい不均一性を呈することが報告され、冠微小循環障害との関連において注目されている^{1,2)}。一方、細胞内ミトコンドリア呼吸鎖のエネルギー代謝経路に存在する還元型 Nicotinamide adenine dinucleotide (NADH) の紫外線蛍光特性に着目し、NADH 蛍光強度を測定することで虚血心筋の代謝機能を明らかにし、局所での循環動態、灌流領域を明らかにしようとする試みは1976年のChance²⁾に始まり、最近ではInce³⁾らがビデオカメラシステムを使用して虚血時の血行動態の空間的不均一性を証明した。ミトコンドリアの呼

吸鎖では有酸素下で酵素を用い NADH を NAD⁺ に酸化する過程で、ADP をリン酸化しエネルギー伝達体である ATP の産生を行っている。したがって細胞への血流が低下し酸素供給不足が生じた場合、前駆物質である NADH は NAD⁺ に変換されずミトコンドリア内に蓄積され、ATP の産生が抑圧される。前述のとおり NADH は紫外線 (370 nm) に対して蛍光特性を有しておりその蛍光強度を測定することにより、心筋ミトコンドリア機能に反映される局所心筋代謝機能をイメージングすることが可能である。これら心筋細胞の代謝状況を規定する主たる因子に局所の血流供給状況が考えられる。したがって局所心筋代謝の状態と対応する微小血管血流分布をそれぞれイメージングし、空間的に両者を比較検討することで冠微小循環障害時の両者の関連を解明できる。これまで、我々は心筋微小循環系において細動静脈血管の血管径動態を直接観察できる CCD 生体顕微鏡を開発し、冠微小循環の特徴を明らかにしてきた。また松本⁴⁾らが³H-ラベルした desmethylimipramine (³H-DMI) を用いて左室心筋において、毛細管レベルに至る微小循環で、著しい血流の不均一性が存在し、この不均一性が動脈血酸素分圧に強く影響を受けることを明らかにした。本

(平成14年10月15日受理)

¹川崎医療短期大学臨床工学科, ²児島中央病院, ³岡山大学大学院医歯学総合研究科システム循環生理学

¹Department of Medical Engineering, Kawasaki College of Allied Health Professions

²Kojima Central Hospital

³Department of Cardiovascular Physiology, Okayama University Graduate School of Medicine and Dentistry

研究では独自に開発した NADH 蛍光の観測システムを用いて冠微小循環レベルでの心筋局所代謝機能動態の解析を行った。同時に、血流トレーサを用いて心筋微小血管血流分布を計測し、正常および低酸素時の局所心筋代謝機能と血流分布の空間的対応性について検討した。

2. 研究方法

(1) NADH 蛍光観測システム

試作システムは、蛍光フィルタ付レンズ部(420~570 nm)、東芝製 CCD 撮像素子(40万画素)、紫外線励起光源(100W水銀キセノンランプ、370 nm)、テレビモニタ、ビデオレコーダ、および画像解析コンピューターシステムから構成されており(図1)、時間分解能は33 ms、空間解像度は42 μ m、視野は27mm \times 20mmである。励起光源から紫外線をラット摘出灌流心表面に照射することで生じた NADH 蛍光を CCD カメラで撮影する仕組みになっている。NADH 蛍光強度は gray scale (256階調)に線形変換し、gray の濃い領域を NADH 濃度の低い領域すなわち酸素不足に陥っていない領域に対応させた。本システムでは、解像度に制約のある高感度カメラ等を使用せずに通常の CCD カメラを用いるため、NADH 動態が蛍光により簡便に観測でき、解像度が高く時間分解能が良い点に特色がある。

(2) 分子血流トレーサ法

本法の詳細は松本⁴⁾らの報告にあるため、ここでは概要について述べる。本実験で使用された分子血流トレーサは³H-DMI を使用した。灌流液中に投与された³H-DMI の一部は心筋内に灌流され、血流分布に応じて冠毛細血管内皮細胞の α_2 受容体と選択的に結合し、静脈系の濃度は無視できるレベルである⁵⁾。すなわち、血管内皮細胞に取り込まれた分子トレーサの β 線放射活性

強度分布は局所血流分布に対応する。イメージングプレート(Fujix)を用いることにより、 β 線放射活性強度を高分解能、高精度で検出することが可能である。検出された β 線放射活性強度分布は、バイオイメージングアナライザにより空間分解能100 pixels/mm²でデジタル画像化される。心外膜側心筋切片デジタルラジオグラムを一例を図2に示す。 β 線放射活性強度は gray scale (256階調)に線形変換し、gray scale の濃い(黒い)領域を血流が多く、薄い(白い)領域は血流が少ない領域に対応させている。

(3) 実験動物・セットアップ・プロトコール

① ミトコンドリア NADH 蛍光イメージング

実験動物は正常ラット(6匹)である。エーテル吸入麻酔後、心臓を摘出後 Langendorff モードとして上行大動脈から逆行性に100 cmH₂Oの圧で酸素飽和度95%、温度37 $^{\circ}$ Cの Krebs-Henseleit bicarbonate 緩衝液を灌流し拍動状態を維持させた(図3)。無酸素および低酸素時のミトコンドリア代謝機能を検討するために灌流液を一時停止または酸素飽和度20%の低酸素灌流液に切り替える操作を行った。まず酸素飽和度95%の通常灌流を行い、ついで60秒間の灌流停止を行った後再び通常灌流に換え、心筋表面のミトコンドリア

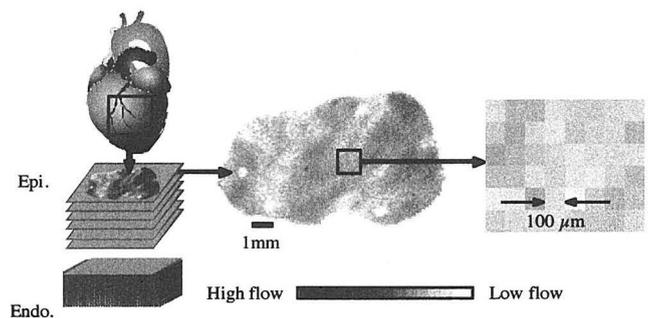


図2 心外膜側心筋切片デジタルラジオグラムの一例

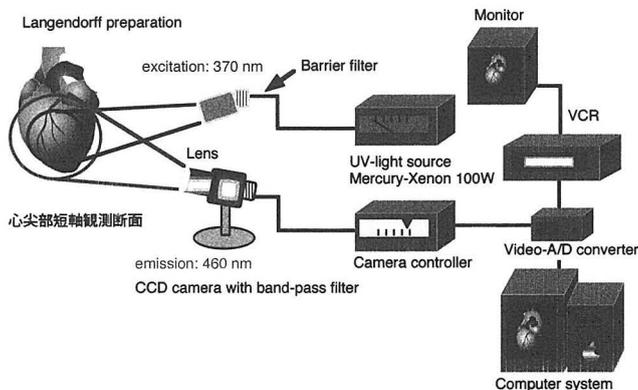


図1 NADH 蛍光観測システム

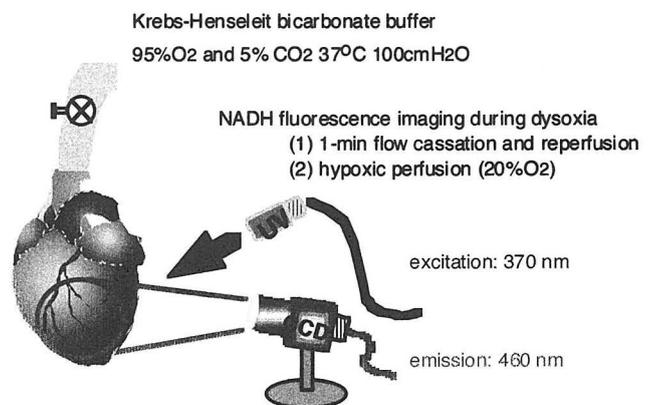


図3 NADH 蛍光観測実験セットアップ

NADH 蛍光イメージを撮像した。この操作を2回繰り返し、ミトコンドリア NADH 蛍光イメージの再現性を検討するとともに、灌流条件の変化に伴う時定数を求めた。心筋表面での蛍光測定部位は像の動きが比較的小さい心臓中央の左室前壁付近を選び、記録した観測画像はビデオ信号用 A/D コンバーターで A/D 変換し、拡張末期の観測像だけを抽出し画像解析コンピュータで解析を行った。

② NADH 蛍光パターンと分子トレーサを用いた血流分布パターンの同時イメージング

同じ心臓で酸素飽和度20%の低酸素灌流と分子血流トレーサを併せて灌流させ、NADH 蛍光イメージによる局所心筋代謝イメージングと空間的に対応する血流分布イメージングの同時計測を行った。すなわち、低酸素灌流液と共に³H-DMI (50 μCi) を投与し1分後、KCl 投与によって心拍動を停止させ、続いて心筋弛緩の維持と心筋内血液洗浄の目的で EGTA+ペルジピン (1 mM+0.2mg/l), 2, 3-ブタニジオンモノオキシウム (1.5 g/l) を灌流させた。左室自由壁の NADH 蛍光観測領域を切り出し圧迫しないようにアルミ板で挟み、直ちに-80℃のフリーザ内で板状に凍結させた後、クリオスタット (Zeiss) により心筋を心外膜側表面から、深さ200μm未満までの間にわたって20μm厚にスライスしプレパラート上に皺がでないように張り付け乾燥させ、デジタルラジオグラフィを行った。スライス標本は各心臓につき6~8枚作製した。

3. 結果

(1) ミトコンドリア NADH 蛍光イメージング (灌流停止, 再灌流) の観察

全例で灌流を停止した直後から心筋表面 NADH 蛍光強度はミトコンドリア内の NADH 蓄積に応じて増強を示した (図4)。灌流停止から50秒付近では NADH 蛍光強度は最大でほぼ均一となった。再灌流を開始すると NADH の減少に伴い蛍光強度の消退が観察された。最大 NADH 蛍光強度から再灌流により control 値に復するまでの時間は、虚血時間に比して約10数秒

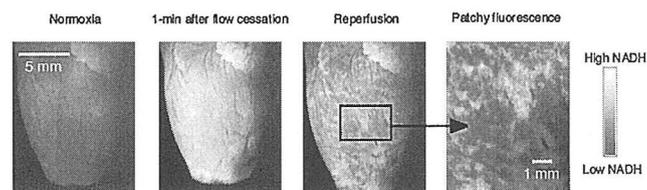


図4 心外膜側心筋での NADH 蛍光変化

と短かった。この際、再灌流早期に速やかに NADH 蛍光が消失する部分と蛍光が遷延する不均一な蛍光パターンが縞状に生じた (図4)。縞状模様のサイズは最小血流調節ユニットの大きさとほぼ一致する300~500μmであった。縞状パターンは灌流停止、再灌流の操作を繰り返し行っても同部位に再現されることが確認された。再灌流時 NADH 蛍光が速やかに減少する暗い部分 (低輝度) は虚血からの回復が速く、一方 NADH 蛍光が残存する明るい部分 (高強度) は虚血が遷延していることを表しており、虚血時、局所心筋代謝の程度およびその時間的変化には空間的不均一性が存在することが分かった。

(2) NADH 蛍光イメージングと分子血流トレーサイメージングの比較解析

低酸素灌流を行うと、不均一な NADH 蛍光パターンが持続して出現することが確認された (図5)。この蛍光パターンは灌流停止、再灌流後に一過性に見られた蛍光パターンと同一であることがわかった (図6)。低酸素灌流時の NADH 蛍光パターンと同一心臓で同時期に計測された分子トレーサによる血流分布パターンの比較を図7に示す。NADH 蛍光強度は強い領域ほど白く、蛍光強度の弱い領域ほど黒く表される (図7A)。一方、血流分布は血流の多い領域は黒く、血流の少ない領域は白く表されている (図7B)。両イメージをそれぞれ解像度100, 200, 400μmにそろえて比較解析した。低酸素灌流時の NADH 蛍光と血流分布パターンは互いに類似しており、両者の空間的相関係数の平

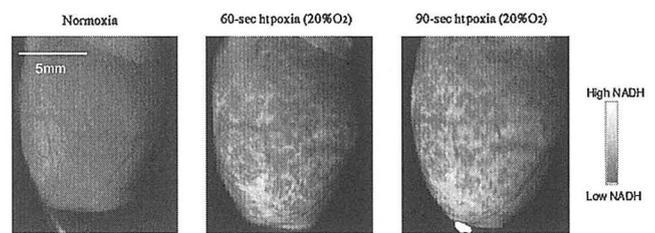


図5 低酸素灌流時の NADH 蛍光イメージ

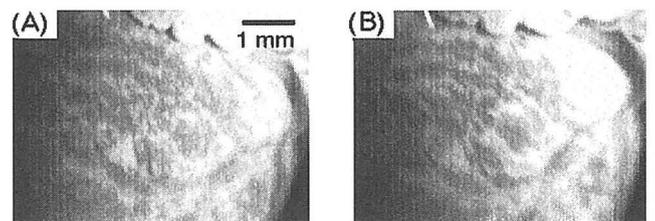


図6 (A) 灌流停止・再灌流時および (B) 低酸素灌流時の NADH 蛍光イメージ

均値は分解能が $100\mu\text{m}$ では0.49であったが、最小血流調節ユニットサイズとほぼ同じ $400\mu\text{m}$ では0.56と有意に増加した(表1, $P < 0.01$)。酸素不足のため NADH 蛍光強度の強い領域は血流分布が少なく、酸素供給が温存され NADH 蛍光強度の低い領域は血流分布が多いことが分かった。

(3) ミトコンドリア NADH 蛍光強度動態解析

ミトコンドリア NADH 蛍光イメージングの観察から同一心表面上であっても灌流停止、再灌流の一連の操作に対する NADH 蛍光強度の経時変化の異なる領域が混在することが分かった。灌流停止後に NADH 蛍光強度が早く増強する領域(図8挿図内領域B)は再灌流時の蛍光消失が遅い。これに比べて灌流停止後の NADH 蛍光強度の増強が緩慢な領域(図8挿図内領域

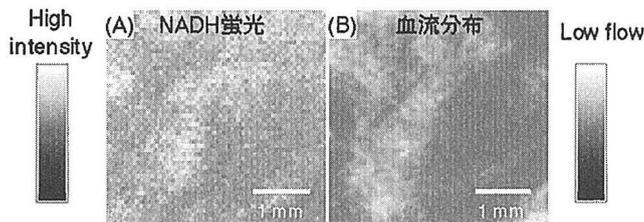


図7 低酸素灌流時に同一心表面上で観察された NADH 蛍光と血流分布パターン

表1 NADH 蛍光と血流分布イメージの空間的相互相関

★ $p < 0.01$ vs $100\mu\text{m}$, (paired t-test)

Rat Number	Correlation Coefficient Spatial Resolution	
	$100\mu\text{m}$	$400\mu\text{m}$
Rat #1	0.361	0.449
Rat #2	0.367	0.485
Rat #3	0.437	0.508
Rat #4	0.473	0.504
Rat #5	0.607	0.686
Rat #6	0.669	0.746
Mean \pm SD	0.485 ± 0.126	$0.563 \pm 0.122^*$

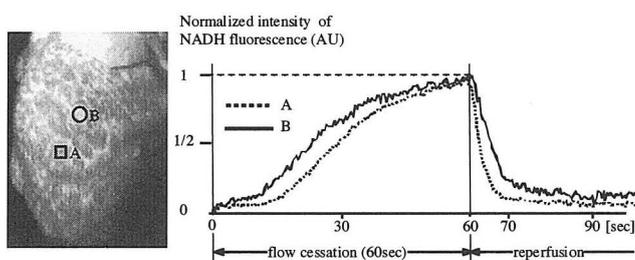


図8 心表面での灌流停止・再灌流時の NADH 蛍光強度経時変化

A) は再灌流後の蛍光消退が早く、代謝が障害されやすい領域ほど再灌流時の正常代謝への復帰が遅延することが確認された。灌流停止後、蛍光強度が増加する時定数 $T_c 0\%$ (sec.)、再灌流後蛍光強度が消退する時定数 $T_c 95\%$ (sec.) (図9を各心臓でそれぞれ求め比較すると両者間には有意な負の相関があることが分かった(表2)。すなわち $T_c 0\%$ が短い場合には、 $T_c 95\%$ が長く逆に $T_c 0\%$ が長ければ、 $T_c 95\%$ が短いことがいえる。

4. 考 察

(1) 方法論の評価

① NADH 蛍光観測 CCD ビデオカメラシステムと蛍光イメージング

本システムでは通常の CCD カメラにより簡便かつ高解像度で拍動心における心筋 NADH 蛍光をイメージングした。心表面が球面状であることや解剖学的バリエーションから、記録画像の心臓周縁部での NADH 蛍光強度の定量解析は困難である。このため心臓の形状や励起光源の位置などの光学的配置の影響を受けにくい相対的な NADH 蛍光強度の時間空間的变化に注目し、形状がほぼ平坦とみなせる左室前壁中央部 4mm ほどの領域を対象に血流、蛍光パターンの相関解析を行い、併せて灌流停止時および再灌流時の NADH 蛍

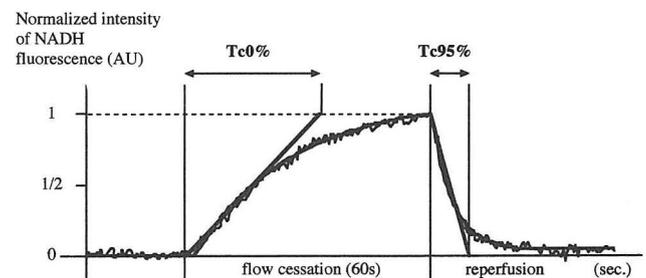


図9 灌流停止時 ($T_c 0\%$) および再灌流時の時定数 ($T_c 95\%$)

表2 各心臓での灌流停止時 ($T_c 0\%$) および再灌流時時定数 ($T_c 95\%$) の相関

Rat No.	$T_c 0\%$ (sec)	$T_c 95\%$ (sec)	r
No. 1	40.16 ± 12.46	7.67 ± 0.69	-0.69
No. 2	38.23 ± 6.02	17.97 ± 1.58	-0.67
No. 3	31.04 ± 14.2	17.21 ± 6.37	-0.87
No. 4	38.98 ± 9.26	10.51 ± 3.65	-0.56
No. 5	51.02 ± 4.85	7.74 ± 3.01	-0.73
No. 6	49.46 ± 8.72	3.59 ± 0.5	-0.86
mean	41.48 ± 9.25	10.78 ± 2.63	-0.73

光変化の時定数の評価を行った。励起光である紫外線や NADH 蛍光の組織透過深度は数100 μm である。心筋表面下の200 μm の深度にわたって心筋灌流分布がほぼ一定であったことから、心筋表面で記録された NADH 蛍光分布イメージは心筋表面から深さ200 μm までの間ではほぼ一定と考えられる。

心臓表面への紫外線照射により心外膜側心筋のミトコンドリア NADH の他に脂肪組織から蛍光が発せられる可能性があるが、まず正常酸素灌流時の心外膜側心筋表面に蛍光がほとんど無く、そして無酸素、低酸素および再灌流の酸素供給条件を換える操作に対応して蛍光強度がダイナミックかつ速やかに変化することが観察されたことから、蛍光の空間的、時間的解析には問題ないレベルと考えられた。

② 分子トレーサと冠毛細管血流分布イメージング

NADH 蛍光イメージングから局所心筋代謝は、最も末梢の毛細血管に分岐する直前の細動脈（前毛細血管細動脈）が支配する最小血流調節ユニットサイズのレベル（数100 μm ）で不均一性を呈した。このため心筋代謝機能の不均一性と血流分布との関連を検討するためには、このサイズの領域の心筋灌流動態をイメージングすることが必要である。現在までの血流分布の計測に用いられてきたマイクロスフェア法では、微小塞栓により微小循環レベルの血流に影響を与えるため³⁾、数mmオーダーの分解能しか得られなかった。さらにマイクロスフェア粒子の集積には偏りが生じ、微小循環レベルの血流を正當に評価することはできない問題点があった^{6,7)}。今回分子トレーサに用いた³H-DMIはその98%以上が冠毛細血管内皮細胞の α_2 レセプターと結合する。トリチウムから発する β 線放射活性強度分布は、心筋切片表面の³H-DMI分子の密度分布に極めて良く一致するため、心筋切片表面の血流分布を正確に反映する。これに定量デジタルラジオグラフィを組み合わせることによって従来よりはるかに小さい100 μm サイズの心筋領域で血流分布を計測することができた。このサンプルボリュームは最小血流調節ユニットのサイズである数100 μm より有意に小さい。

(2) 局所心筋代謝の空間的不均一性発現と血流分布、組織内酸素濃度との相互関連

心筋内の血流分布が特に微小循環レベルで著しい不均一性を呈することは以前から報告されている^{1,2,3,7)}。心筋の最小血流調節ユニットは独立した血液灌流調節を受ける最小単位であり、そのサイズは最も末梢の毛細血管に分岐する直前の細動脈（前毛細血管細動脈）

が支配する毛細血管床の大きさ約400 μm であると考えられる⁸⁾。これは松本らなど^{6,9)}が明らかにした機能的な血流調節の最小ユニットのサイズ（数100 μm ）ともほぼ一致し、冠血流はこのサイズを単位として不均一性を呈すると考えられている。心表面に観察された不均一な NADH 蛍光パターンは低酸素灌流の際、そして灌流停止一再灌流の操作を繰り返した際のいずれの場合も各々の心臓で同一であることが確認された。NADH 蛍光の明るい領域ほど酸素供給不足による心筋代謝機能障害は重度である。低酸素灌流下において局所心筋代謝機能を反映する NADH 蛍光イメージと局所血流分布イメージは互いに類似し、有意な空間的相互相関を認めたことから（図7、表1）、毛細血管床レベルの血流分布が心筋代謝障害の空間的不均一性を規定している主たる要因と考えられる。また、低酸素灌流時に代謝機能障害を受けやすい領域は、酸素供給停止に伴う代謝機能易障害性と再酸素化による回復遅延の特性を示す領域と同一であったことから、トランジェントな酸素供給不全に対しても、同じ毛細血管床レベルでの局所血流分布が心筋代謝に異常をもたらしていると考えられた。なお両イメージの比較解析の分解能を100 μm から最小血流調節ユニットサイズとほぼ同じ400 μm に下げることによって両者の空間的相関が0.49から0.56まで有意に高まった（表1）ことは、局所的な心筋代謝機能の異常が血流よりも酸素の局所供給に強く依存していることによる。すなわち、組織内酸素拡散によって血流と酸素供給の不均一性は異なり、この違いは分解能の減少と共に軽減される傾向にある。このため400 μm サイズの分解能で血流分布と NADH 蛍光の相互相関を評価した場合に相関値が上昇したと考えられる。

微小循環レベルでの血流の空間的不均一性分布は冠細動脈トーンヌスに最も強く影響を受ける¹⁰⁾。心筋内冠動脈から細動脈までの血管構築は樹枝状構造を、毛細血管はネットワーク構造を示し、冠細動脈トーンヌスによる血流のコントロールは主として小動脈および細動脈で行われ、灌流圧を有効に利用して血流を個々の心筋細胞近傍の毛細血管まで保つ血流路として機能する¹¹⁾。冠血管トーンヌスを介した局所血流調節の働きは、解剖学的な構造に基づく血流の局所的なアンバランスを少なくし、局所心筋の酸素需要に応じた局所血流配分を行うことである。例えばこのトーンヌスは動脈血酸素分圧により変化し血流分布パターンを変えることが報告されている¹²⁾。本実験で低酸素灌流時、再灌流時において同様の NADH 蛍光パターンが再現されたことは、

これらの灌流条件下では冠血管トーンスの状態も同程度であることが推測される。すなわち冠血管トーンスが低下しているランゲンドルフ心標本³⁾では、供給酸素の減少により冠血管はほぼ最大限に拡張していると思われ、低酸素灌流時および再灌流時のいずれの場合も、局所血流分布は主として冠血管の解剖学的分岐構造によって決められていると推論される。しかし、正常酸素灌流においては、局所血流を調節し解剖学的な構造に基づく血流の局所的なアンバランスを是正するように冠血管トーンスが働く。したがって、この場合は低酸素灌流下および再灌流時の島状の不均一な NADH 蛍光パターンが現れなかったものと考えられた。

局所血流は心筋代謝機能の規定に関与する重要な一因と考えられるが、その寄与度は十分高いとはいえず、他の因子の関与が示唆される。まずその因子の一つとして心筋酸素消費の局所的不均一性が^{13,14)}があげられる。すなわち局所血流が相対的に高くとも酸素需要がそれを上回る領域、あるいは低血流域でも酸素需要が低い領域があり、これがネットとして見た血流と心筋代謝との相関を低下させていると考えられる。また毛細血管からミトコンドリアに至るまでの酸素供給過程も心筋代謝機能に影響を及ぼす可能性がある。ミトコンドリアへの酸素供給は毛細血管から拡散、心筋ミオグロビンによる運搬によって行われる。毛細血管から心筋細胞内に至るまでの酸素分圧較差の不均等に起因する酸素拡散の違い¹⁵⁾やミトコンドリアの酸素貯蔵力や運搬能の局所的な差異等も NADH 蛍光イメージの不均一性に寄与するものと推論された。このためにも今後はポルフィリン燐光を用いた組織内酸素濃度イメージングの解像度の向上と NADH 蛍光および血流分布との空間的比較解析が必要であると考えられる。

5. 文 献

- 1) Ellis CG, Wrigley SM and Groom AC : Heterogeneity of red cell perfusion in capillary networks supplied by a single arteriole in resting skeletal muscle, *Circ. Res.* 75 : 357-368, 1994.
- 2) Barlow CH and Chance B : Ischemic areas in perfused rat hearts : measurement by NADH fluorescence photography, *Science*. 193 : 909-911, 1976.
- 3) Ince C, Ashruf JF, Avontuur JA, Wieringa PA, Spaan JA and Bruining HA : Heterogeneity of the hypoxic state in rat heart is determined at capillary level, *Am. J. Physiol.* 264 : H294-H301, 1993.
- 4) Matsumoto T, Goto M, Tachibana H, Ogasawara Y, Tsujioka K and Kajiya F : Microheterogeneity of myocardial blood flow in rabbit hearts during normoxic and hypoxic states, *Am. J. Physiol.* 270 : H434-H441, 1996.
- 5) Little SE and Bassingthwaite JB : Plasma-soluble marker for intraorgan regional flows, *Am. J. Physiol.* 245 : H707-H712, 1983.
- 6) Matsumoto T, Ebata J, Tachibana H, Goto M and Kajiya F : Transmural microcirculatory blood flow distribution in right and left ventricular free walls of rabbits, *Am. J. Physiol.* 277 : H183-191, 1999.
- 7) Fung YC : Stochastic flow in capillary blood vessels, *Microvasc. Res.* 5 : 34-48, 1973.
- 8) Kassab GS and Fung YC : Topology and dimensions of pig coronary capillary network, *Am. J. Physiol.* 267 : H319-325, 1994.
- 9) Steenbergen C, Deleeuw G, Barlow C, Chance B, and Williamson JR : Heterogeneity of the hypoxic state in perfused rat heart, *Circ. Res.* 41 : 606-615, 1977.
- 10) Austin RE, Smedira NG, Squiers TM and Hoffman JI : Influence of contraction and coronary vasomotor tone on regional myocardial blood flow, *Am. J. Physiol.* 266 : H2542-2553, 1994.
- 11) 梶谷文彦 : 心筋内冠循環研究の進歩, *脈管学*, 38 : 261-270, 1998.
- 12) 江幡淳, 松本健志, 千葉容子, 仲本 博, 豊田英嗣, 立花博之, 辻岡克彦, 梶谷文彦 : 血中酸素分圧が微小心筋血流の不均一性に与える影響 — 分子血流トレーサー法による微小心筋血流パタンの解析, *電子情報通信学会技術研究報告*, 95 : 75-80, 1995.
- 13) Schwanke U, Deussen A, Heusch G and Schipke JD : Heterogeneity of local myocardial flow and oxidative metabolism, *Am. J. Physiol.* 279 : H1029-1035, 2000.
- 14) van Beek JH, van Mil HG, King RB, de Kanter FJ, Alders DJ, Bussemaker J : A¹³C NMR double-labeling method to quantitate local myocardial O₂ consumption using frozen tissue samples, *Am. J. Physiol.* 277 : H1630-1640, 1999.
- 15) Takahashi E and Doi K : Impact of diffusional oxygen transport on oxidative metabolism in the heart, *Jpn. J. Physiol.* 48 : 243-252, 1998.