

プロトン励起を用いた核磁気共鳴スペクトロスコピーによるヒト心筋代謝の研究

課題番号 09670712

平成9年～平成11年度科学研究費補助金（基盤研究(C)(2)）研究成果報告書

平成12年3月

研究代表者 三ッ浪 健一

（滋賀医科大学医学部教授）



核磁気共鳴スペクトロスコピー(以下MRS)は、非破壊的に生体内の代謝動態を把握できる優れた方法である。これまでヒトの心臓については主に³¹P MRSが行われ、phosphocreatine (PCr)やadenosine triphosphate (ATP)などのリン代謝物についての情報が、多くはPCr/ATPのように同じ³¹Pスペクトル内のピークの比の変化として蓄積されてきた。一部にはそれらの代謝物の絶対量定量を行った研究も発表されている。

ヒト心筋について、水素原子核(¹H, プロトン)をラジオ波で励起する方法を用いたMRSも極少数の施設で行われ始めている。これには¹H MRSとプロトン・デカップリング効果あるいは核オーバーハウザー効果を利用した³¹P MRSがある。いずれも単なる³¹P MRSよりも実施が困難なものであるが、リン代謝物以外の代謝情報を得たり、リン代謝物の信号をより精細に捉えることを可能にするものである。また¹H MRSにより得られた水の信号は代謝物の絶対量定量のための標準にも使用しうる。本研究ではこれらのプロトン励起を用いたヒト心筋MRSの実行可能性と有用性を検討したので以下に報告する。

研究組織

研究代表者： 三ッ浪 健一 (滋賀医科大学医学部教授)

研究経費

平成9年度	1,900 千円
平成10年度	700 千円
平成11年度	600 千円
計	3,200 千円

研究発表

(1) 学会誌等

- Mamoru Okada, Kenichi Mitsunami, Toshiro Inubushi, Masahiko Kinoshita
Influence of aging or left ventricular hypertrophy on the human heart: contents of phosphate metabolites measured by ³¹P MRS. *Magnetic Resonance in Medicine* Vol 39, No 5, Page 772-782, May, 1998
- Atsushi Takaoka, Ichiro Nakae, Kenichi Mitsunami, Takahiro Yabe, Shigehiro Morikawa, Toshiro Inubushi, Masahiko Kinoshita
Renal ischemia/reperfusion remotely improves myocardial energy metabolism during myocardial ischemia via adenosine receptors in rabbits: effects of "remote preconditioning" *J. Am. Coll. Cardiol.* Vol 33, No 2, Page 556-564, February, 1999.

(2) 口頭発表

- 三ッ浪健一・中江一郎・大村具子・木之下正彦・森川茂廣・犬伏俊郎
ヒト心筋¹H MRSによる心筋内総クレアチン定量の試み
日本磁気共鳴医学会, 2000年10月発表予定

研究の背景

水素原子核(^1H , プロトン)は天然存在比が高く、生体内に多量に存在し、核磁気共鳴(NMR)感度も高いので、NMRの格好の対象核である。しかし核磁気共鳴スペクトロスコピー(MRS)を行う時にはこれらの特性がむしろ欠点となるところがある。

その第1はスピン-スピン結合によるスペクトルの分裂である。すなわち多量に存在するプロトンのスピン状態が化学結合に関与している電子のスピンを通じて他の核(たとえば ^{31}P)に伝達され、 ^{31}P のスピン状態に影響することによりスペクトルが分裂して ^{31}P スペクトルの分離が悪くなる。 ^{31}P MRSのスペクトルの中で無機リン酸(Pi)のピークはpHなどの重要な情報を与えるが、ヒト心臓*in vivo* ^{31}P MRSではしばしば心腔内血液の2,3-diphosphoglycerate (2,3-DPG)のピークがPiに重なるためその評価が困難である。これに対して、 ^{31}P のNMR信号受信時にプロトンを励起しておくことと ^{31}P スペクトルが分裂せず(プロトン・デカップリング)、心筋内Piのピークが心腔内血液の2,3-DPGに由来する2つのピークから分離できる。

第2は双極子カップリングによる信号減弱である。 ^{31}P などのスピン量子数が1/2の核では近接する核スピン間の双極子-双極子相互作用が緩和の最も重要な源泉であるため、 ^{31}P の近くにプロトンが多量に存在すると ^{31}P の信号が減弱する。これに対して、 ^{31}P を励起する前からプロトンを飽和しておいてこのカップリングをなくすと ^{31}P のシグナルが増強する。これを核オーバーハウザー効果という。比較的低磁場の1.5テスラ装置で行われるヒト ^{31}P MRSでは双極子カップリングがスペクトルの線幅を決める重要な因子になるといわれ、核オーバーハウザー効果を利用すれば感度と分離の良いスペクトルが得られる。

さらに第3はプロトンが体内に多量に存在する水や脂肪の中にたくさん含まれるため、 ^1H MRSを行ってそれら以外の化合物からのより微弱な信号を観察しようとするときには水や脂肪の信号を抑制する必要があること、そして第4には生体分子の中にプロトンが普遍的に存在するためピークが混み合っただけでスペクトルが大変複雑なことである。これらの困難性によりヒト心筋*in vivo* ^1H MRSの報告はこれまでのところ多くないが、心筋代謝に重要な総クレアチンを測定できる優れた方法である。心筋内クレアチンは心筋内で生成されたものではなく、腎から肝を経由して合成されたものが心筋に取り込まれたもので、その一部分がリン酸化されてホスホクレアチン(PCr)として存在し心筋の重要なエネルギー貯蔵源となる。

我々がヒトの肥大心を定量的*in vivo* ^{31}P MRSで検討したところ、左室の収縮能と拡張能はいずれも心筋内Pi含量と逆相関し、心筋内Pi含量が収縮・拡張能を規定する重要な1因子である可能性が示唆された(第69回American Heart Association学術集会, New Orleans, 1996年11月)。しかしPiのピークへの2,3-DPGの重なりは否定はできずそれらを詳細に検討する必要性を認めた。また不全心でPCr/ATP比が低下しているのは虚血ではなく心筋内総クレアチンが低下しているためであるとの説(J.S. Ingwall)があり、各種心疾患において心筋内総クレアチンを測定することはその病態生理を解明する上で重要である。

研究の目的

本研究ではプロトン・デカップリング、核オーバーハウザー効果および ^1H MRSといういずれもラジオ波によりプロトンを励起する方法を用いてヒト心臓MRSを行う。これにより、従来の ^{31}P MRSによるPCrやATPの情報のみならず心筋内PiおよびpHをより正確に測定でき、さらに心筋内総クレアチンをも測定することができる。ある心疾患の病態が純然たる虚血であれば心筋内総クレアチンは正常だが、PCrとpHが低下し、Piは増加すると考えられる。一方、病態に心筋細胞のクレアチンの取り込みあるいは保持障害が関与していれば、心筋内総クレアチンとPCrは低下するがPiとpHは正常にとどまると考えられる。従って、この研究を行えば、各種心疾患において虚血が関与しているのかどうか、そして虚血が関与している場合にはその強さはどの程度であるのかを明確にすることができる。また病態の把握のためには代謝物の心筋内含量が測定できることが望ましいので、関心領域内の水のプロトン共鳴を内部標準とした定量的 ^1H および ^{31}P MRSを行う。

研究の方法

1. プロトン・デカップリングと核オーバーハウザー効果を利用した ^{31}P MRS

General Electric Medical Systems社製磁気共鳴装置Signa 1.5Tにプロトン・デカップリングおよび核オーバーハウザー効果のための第2ラジオ波送信チャンネルを装着する。仰臥位の被検者の前胸部に送受信両用、直径15cm、円形の ^{31}P MRS用表面コイルを装着し、その上に全体として長方形の8字型コイル(シミングとプロトン・デカップリングおよび核オーバーハウザー効果に用いる)を同軸となるように重ねて装着する。

Depth-resolved surface-coil spectroscopy (DRESS)により左室前壁心筋部にスライス厚25mmの関心領域を設定し、この部のプロトンについてシミングを行う。WALTZ-16 sequenceを用いて、心電図同期で収縮期に、核オーバーハウザー効果を得るためにまず100msec、1Wのプロトン励起を行い、この直後にDRESS法による ^{31}P MRSを行ってその信号の受信中には150 msec、5Wのプロトン・デカップリングを行う。DRESS法は、中心周波数25.8538 MHz, spectral width 4000 Hz, data point数1024, パルス繰り返し時間は心電図のRR間隔の2倍で、信号を256回加算平均して行う。

このあと内部標準を得るために、同一の関心領域に対して、同一条件で同じ ^{31}P MRS用表面コイルを用いて、十分長いパルス繰り返し時間で水のプロトンの信号を収集する。この時、ある物質の含量[P]は、

$$\frac{S_P \cdot [W] \cdot C_{PH} \cdot F_P \cdot E_P}{S_W \cdot E_W}$$

で表される。ただし、 S_W はその代謝物を含有する水の ^1H NMR信号、 S_P は S_W と同じ標本スライスから得られた ^{31}P の信号、 $[W]$ は組織の水のプロトン濃度、 C_{PH} は ^1H と ^{31}P のNMR感度の差を補正するための定数、 F_P は ^{31}P 信号の通常の縦緩和飽和因子、 E は横緩和やrephasing lobeの間の欠落データによる信号減弱を補正する係数である。 E はrephasing lobeが十分短ければ無視できる。 C_{PH} は各測定毎に既知濃度の無機リン酸水溶液を被検者の心臓と同じ部位において被検者と同様に ^1H と ^{31}P MRSを行って算出する。内部標準の水の ^1H NMR信号をとったときに脂肪の(CH₂)共鳴が大きいときには、脂肪内の水の関与を是正するために(CH₂)共鳴の15%(脂肪の水分含有率)を S_W から差し引く。また血液内の水の

^1H NMR信号S(blood)の関与を是正するためこれをもSwから差し引く。S(blood)は、

$$\frac{S(\text{DPG}) \cdot [\text{WB}] \cdot \text{CPH} \cdot \text{FDPG} \cdot \text{EDPG}}{2[\text{DPG}] \cdot \text{EB}}$$

で表される。ただし、S(DPG)は血液からの2,3-DPGの ^{31}P 信号，[WB]は血液の水のプロトン濃度で，Bは血液を表す。

II. ^1H MRS

仰臥位の被検者の左前胸部に受信専用で形状可変型のgeneral purpose flex coilを装着してstimulated echo acquisition mode (STEAM)法あるいはpoint-resolved spectroscopy (PRESS)法によるヒト心筋 ^1H MRSを行い、心室中隔部に設定した2cm x 2cm x 2cmのsingle voxelからtotal creatine (creatine + PCr)を測定する。STEAM法、PRESS法ともに中心周波数63.8736 MHz, spectral width 2500 Hz, data point数2048, パルス繰り返し時間1.5秒で行い、エコー時間TEはSTEAM法では12msec, PRESS法では25msecとする。いずれの場合も、はじめの16回の信号収集では水信号抑制を行わずに水のプロトンの信号を収集し、それに続いて水信号抑制下に128回積算して信号を収集する。これにより水のプロトンの信号を内部標準として心筋内総クレアチン含量[CR]を定量する。

総クレアチンはおよそ3ppmのところと同定されるN-methyl基の共鳴に基づいて測定する。得られたfree induction decay (FID)は2個ずつで1ブロックとし、各ブロックについて5Hzのline broadening・Fourier変換・自動位相合わせを行ってから、水非抑制下および抑制下のそれぞれについてblock averagingを行う。心筋の水分含有率は72.7%とし、水およびクレアチンのN-methyl基のプロトンの数はそれぞれ2および3であることから、心筋内総クレアチン含量[CR]は、

$$\frac{0.727 \cdot 2\text{SCR} \cdot [\text{W}] \cdot \text{FCR} \cdot \text{ECR}}{3\text{Sw} \cdot \text{Fw} \cdot \text{Ew}}$$

で求められる。ただし、SCRはクレアチンの信号強度，Swはその代謝物を含有する水の信号強度，[W]は組織の水のプロトン濃度(111 mol/kg)である。FCR/FwとECR/Ewはそれぞれ縦緩和と横緩和による飽和因子を補正するための比で、文献 (Bottomley PA et al: Non-invasive magnetic-resonance detection of creatine depletion in non-viable infarcted myocardium. Lancet 351:714-18, 1998)に基づき、それぞれ1および0.7として計算する。

結果と考察

1. プロトン・デカップリングと核オーバーハウザー効果を利用した³¹P MRS

1.5Tの磁気共鳴装置にプロトン励起のための第2ラジオ波送信チャンネルを装着し、まずファントム実験を行った。表面コイルには、直径15cm、リン用の送受信両用の円形コイルと、その上に同軸となるように重ねて装着してプロトン励起に用いる全体として長方形の8字型コイルを使用した。ファントムには、hexamethylphosphoric triamide (HMPT)と無機リン酸 (Pi)の原液1mlをそれぞれアンプルに封入したものを水で満たした容器の中に固定したものを使用した。まず、WALTZ-16 sequenceを用いて、連続的なプロトン励起を行った。この時の電力はwattmeterで測定して0.5W以下であった。一定のパルス繰り返し時間(2秒)を用いてDRESS法による³¹P MRSを行った。この時のスペクトルの実例を図1に示す。

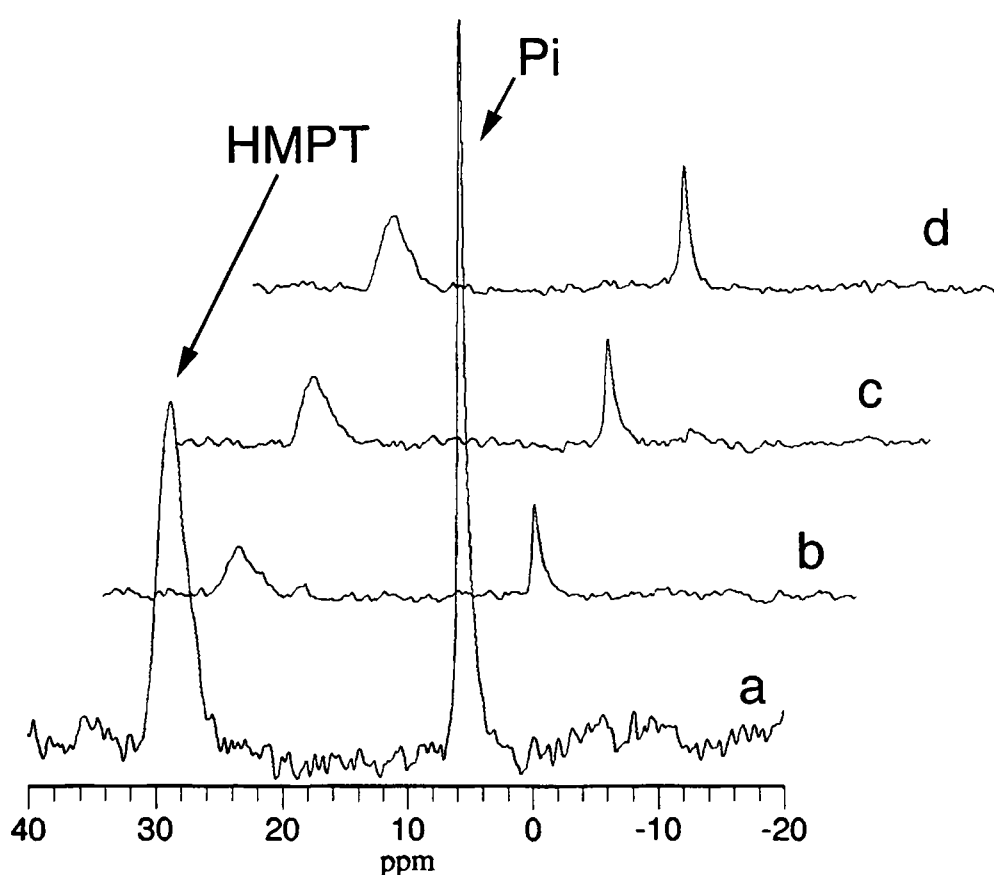


図1 プロトン・デカップリングの効果

DRESS法によりファントム内のhexamethylphosphoric triamide (HMPT)と無機リン酸 (Pi)について測定した³¹P MRSスペクトル。aはデカップリング（プロトン励起）なしのスペクトル。b～dはデカップリングを行ったもので、bからdにかけてデカップリング出力を少しずつ増加させた。

これらのスペクトルを検討したところ、HMPTとPiのピークの高さの比 (HMPT/Pi)は、

プロトン励起無しでは 0.498 ± 0.022 に対して、励起後 0.688 ± 0.025 と有意($p < 0.001$)に増加した。一方、HMPTとPiのピークの半値幅の比 (HMPTW / PiW)は、プロトン励起無しで 3.193 ± 0.044 、励起有りでは 3.050 ± 0.678 と有意差を認めなかった。これによりプロトンの励起で相対的なHMPTの信号強度の増加が得られることが判明したが、その機序は、HMPTとPiのいずれにおいてもリン原子と水素原子が直接結合していないことや半値幅が変化しなかったことから推測して、デカップリング効果よりむしろ核オーバーハウザー効果によるものが大きいと考えられた。

しかし、問題は図1にも示されているように、デカップリングを行うとスペクトルの大きさが減ってしまうことであった。この原因はおそらく第2ラジオ波送信チャンネルからプロトン励起を行うときにノイズが混入するためと考えられたため、様々なフィルターを用いて改善を試みたが困難であった。このため、この方法のヒト心筋への応用は不可能と判断された。

従って、プロトン・デカップリングを行った ^{31}P MRSによる心筋内代謝物の定量は不可能となったが、この研究の遂行期間中に、我々が以前より行ってきた通常のDRESS法による ^{31}P MRSで心筋内高エネルギーリン酸化合物を定量した研究成果を論文発表することができたので、以下に掲載する。

さらに、本研究の遂行中に論文発表することができたMRSを用いた動物実験データをも参考までに掲載する。

II. ^1H MRS

General Electric Medical Systems社製磁気共鳴装置Signa Horizon LX 1.5T内で仰臥位の被検者の左前胸部に、受信専用で形状可変型のgeneral purpose flex coilを装着し、ヒト心筋のプロトン(^1H)核磁気共鳴スペクトロスコピー(MRS)を行った。被検者には十分な説明を行った後に同意を得た。まずbody coilにて、心電図同期でエコー時間(TE) 1.6 msec, フリップ角30度のFast-Card SPGR法にて心臓部を撮影し、その像の上でプロトンMRSの信号収集領域を設定した。その部についてbody coilで励起しgeneral purpose flex coilで受信するstimulated echo acquisition mode (STEAM)法あるいはpoint-resolved spectroscopy (PRESS)法を行った。はじめに水信号抑制を行わずに積算回数16回で内部標準用の水信号を収集し、その後水信号抑制下に積算回数128回で信号を収集した。水信号の化学シフトを4.75 ppmとし、これを基準にしてクレアチンの化学シフトを計算した。

健常者について上記の条件で測定したところ、STEAM法・PRESS法とも信号収集領域を2cm×2cm×2cm以上とすると十分なS-N比(signal-to-noise ratio)の信号が得られた。健常者の心室中隔からSTEAM法で得られた ^1H MRSスペクトルを図2に示す。STEAM法によるスペクトルの中でのクレアチンの化学シフトは 3.06 ± 0.07 ppmであった。図2とは別の健常者の心室中隔からPRESS法により得られた ^1H MRSスペクトルを図3に示す。PRESS法によるスペクトルの中でのクレアチンの化学シフトは 3.18 ± 0.07 ppmであった。

健常者について水の信号を内部標準として心筋内クレアチン含量を定量したところ、STEAM法では 36.5 ± 6.2 $\mu\text{mol/g wet weight}$ であった。一方、PRESS法では 27.6 ± 10.0 $\mu\text{mol/g wet weight}$ であった。二つの方法による心筋内クレアチン含量の間に有意差はなかった。ちなみに、BottomleyらがSTEAM法により求めた心筋内クレアチン含量は健常者で 28 ± 6 $\mu\text{mol/g wet weight}$ であった(Bottomley PA et al: Non-invasive magnetic-resonance detection of creatine depletion in non-viable infarcted myocardium. Lancet 351:714-18, 1998)ので、我々の値とよく一致している。

図4に急性心筋梗塞(前壁中隔)発症後4か月の陳旧性心筋梗塞例(51歳男性)の心室中隔から得られたSTEAM法による ^1H MRSスペクトルを示す。スペクトルではクレアチンの共鳴はノイズ・レベルに近いが、含量を計算すると 25.7 $\mu\text{mol/g wet weight}$ であった。我々のSTEAM法による健常値 36.5 ± 6.2 $\mu\text{mol/g wet weight}$ に比べて低いとはいえ、かなり高い濃度に計算されており、梗塞巣の水分含有率が正常心筋と同じとしてよいのかを含めて、今後さらに検討する必要を認めた。

結語

1. ヒト心筋のプロトン(^1H)核磁気共鳴スペクトロスコピー(MRS)は実行可能である。
2. ^1H MRSの方法はSTEAM法とPRESS法のいずれでも明らかな差はないようである。
3. ヒト心筋 ^1H MRSにより心筋内クレアチン含量の定量が可能である。
4. プロトン・デカップリングを行うヒト心筋リン(^{31}P) MRSは実行困難であった。おそらく既存の装置に新しく装着した第2ラジオ波送信チャンネルからプロトン励起を行うときにノイズが混入するためと考えられた。今後何とかこれを克服したい。

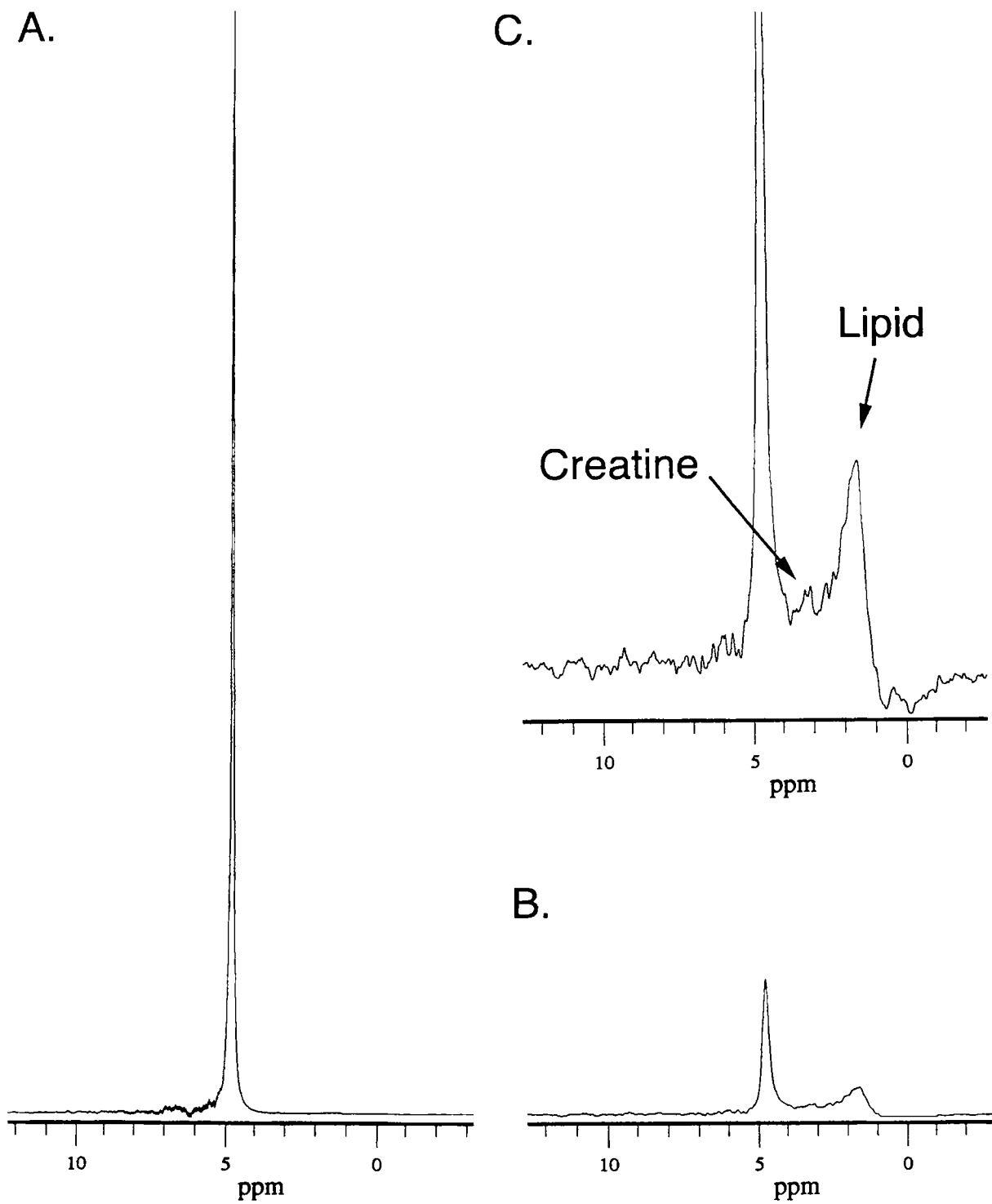


図2 STEAM法による健常者心室中隔 ^1H MRSスペクトル

Aは水抑制を行わずに撮った心室中隔の水の信号. Bは同部位で水抑制を行って得られた ^1H MRSスペクトルで, Aと同じスケールで表示してある. CはBを拡大表示したもので, クレアチンと脂肪の共鳴が見える.

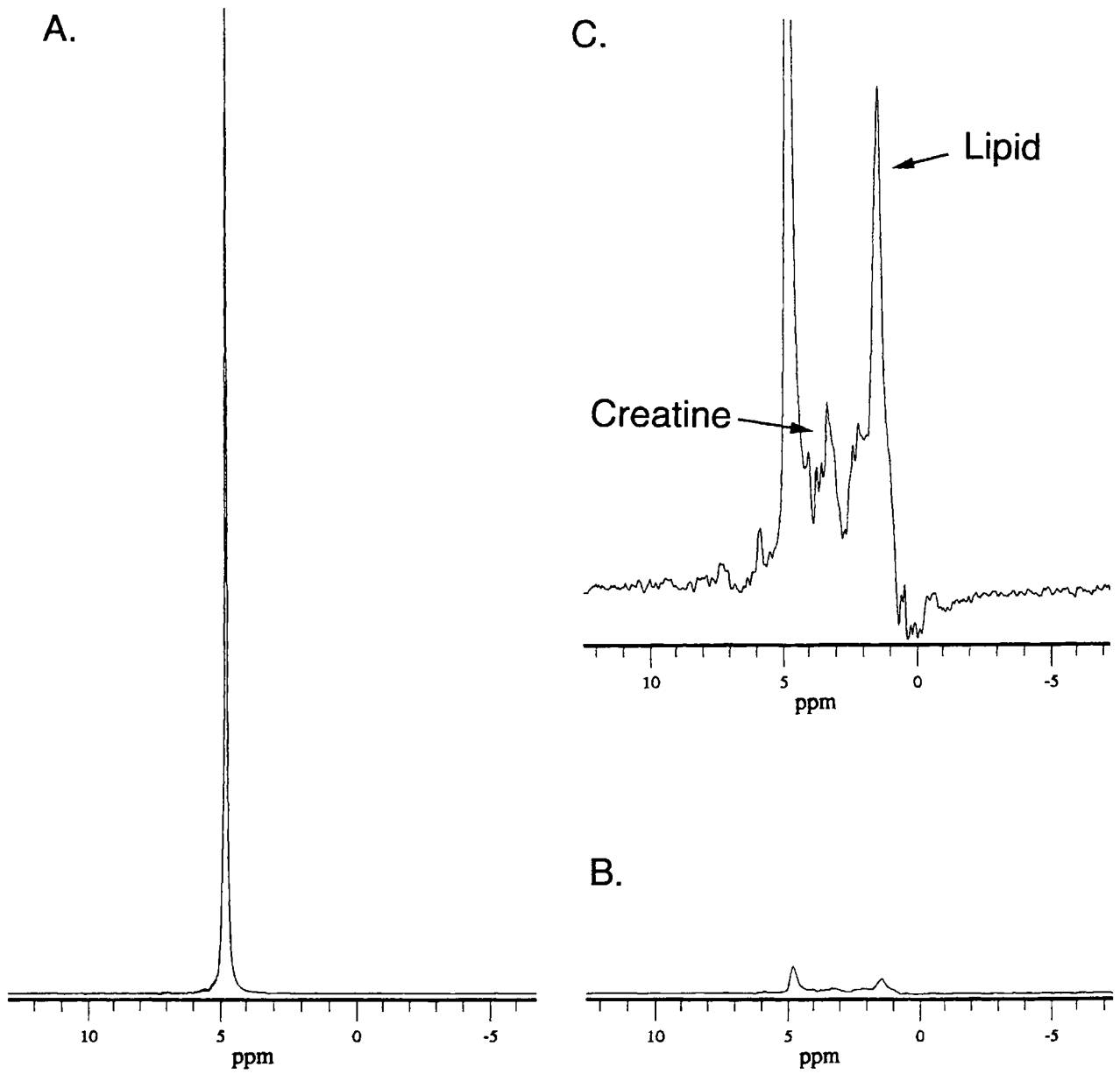


図3 PRESS法による健常者心室中隔¹H MRSスペクトル

Aは水抑制を行わずに撮った心室中隔の水の信号。Bは同部位で水抑制を行って得られた¹H MRSスペクトルで、Aと同じスケールで表示してある。CはBを拡大表示したもので、クレアチンと脂肪の共鳴が見える。

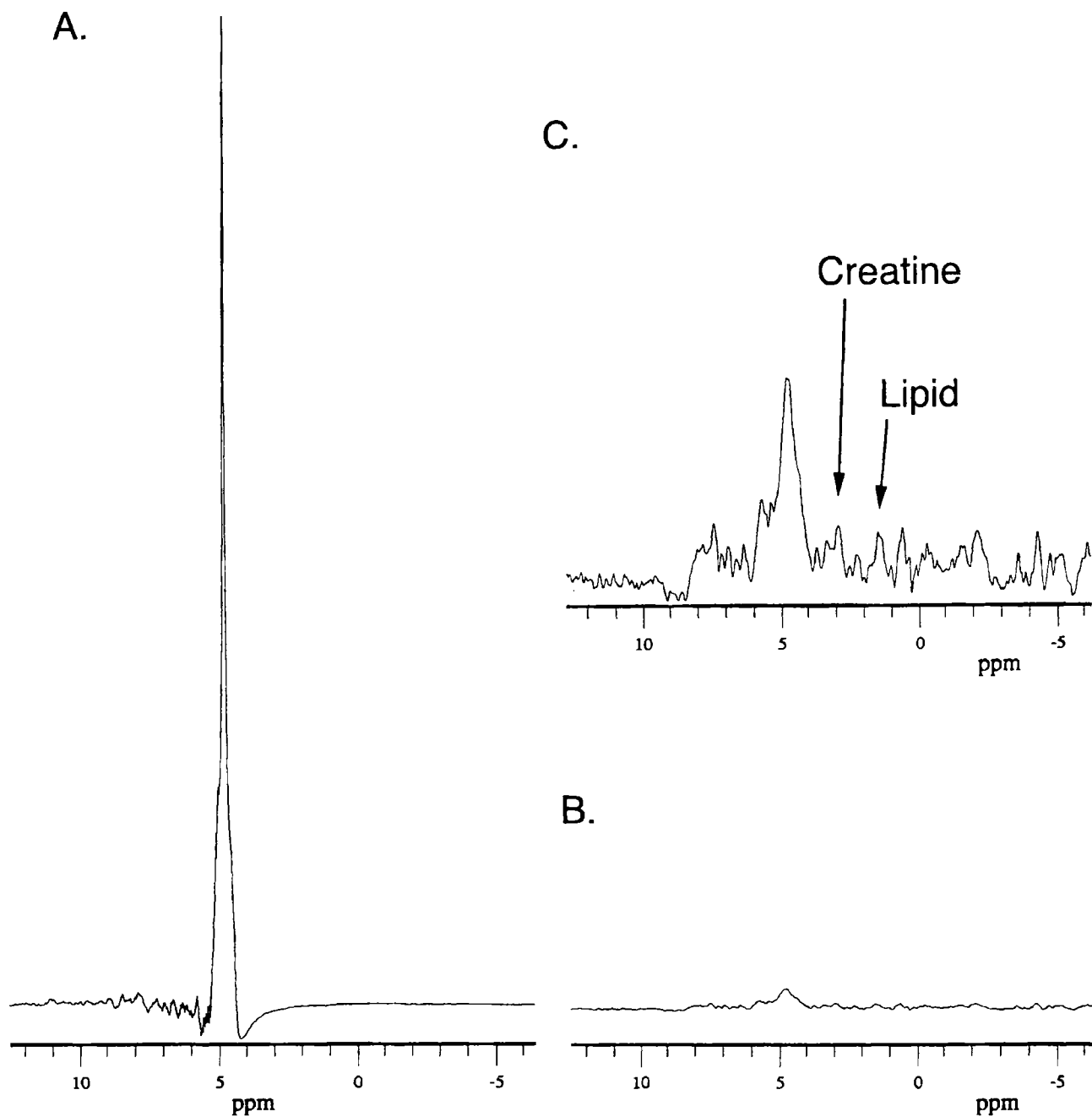


図4 STEAM法による心筋梗塞部心筋¹H MRSスペクトル

Aは水抑制を行わずに撮った梗塞部心室中隔の水の信号。Bは同部位で水抑制を行って得られた¹H MRSスペクトルで、Aと同じスケールで表示してある。CはBを拡大表示したもので、抑制しきれていない水の信号以外はクレアチンと脂肪の共鳴を含めてノイズ・レベルに近い。