

---

# ウサギ肝障害モデルにおける $^{31}\text{P}$ - NMRによる膜リン脂質代謝動態の研究

---

(課題番号 02807237)

平成2年度科学研究費補助金(一般研究 C)  
研究成果報告書

平成3年3月

研究代表者 森川茂廣

(滋賀医科大学・医学部・助手)

集密図書

K

SG

MOR

滋賀医科大学附属図書館



1990025182

研究成果報告書

1. 課題番号 02807237
2. 研究課題 ウサギ肝障害モデルにおける $^{31}\text{P}$ -NMRによる膜リン脂質代謝動態の研究
3. 研究代表者 森川 茂廣 (滋賀医科大学・医学部・助手)
4. 研究分担者 犬伏 俊郎 (滋賀医科大学・医学部・教授)
5. 研究経費 平成2年度 1,000 千円
- 計 1,000 千円

## 6. 研究発表

### (1) 学会誌等

1. Morikawa, S., Kido, C. and Inubushi, T.  
Observation of Rat Hind Limb Skeletal Muscle during Arterial Occlusion and Reperfusion by  $^{31}\text{P}$  MRS and  $^1\text{H}$  MRI.  
Magnetic Resonance Imaging (1991, in press)

### (2) 口頭発表

1. Inubushi, T., Morikawa, S. and Kido, C.  
MRI and MRS investigation of rat hind limb muscle by arterial occlusion and reperfusion.  
Workshop on "Special Topics in Medical Magnetic Resonance"  
July, 1990. Whistler, Canada.
2. Morikawa, S., Kido, C. and Inubushi, T.  
MRI and MRS analysis of rat hind limb muscle during temporary arterial occlusion and following reperfusion.  
Society of Magnetic Resonance In Medicine  
Ninth Annual Scientific Meeting and Exhibition  
August, 1990. New York, U.S.A.
3. Konishi, T., Nakamura, Y., Kawai, C. and Inubushi, T.  
Cumulative Effects of Repetitive Ischemia on ATP Depletion in Rat Hearts. -A  $^{31}\text{P}$  NMR Spectroscopic Study-  
American Heart Association, 63rd Scientific Sessions  
November, 1990. Texas, U.S.A.

4. Kato, T., Shioiri, T., Takahashi, S., Kido, C. and Inubushi, T.  
IN VIVO  $^{31}\text{P}$ -MAGNETIC RESONANCE SPECTROSCOPY OF BIPOLAR DISORDER  
17th Congress of Collegium Internationale  
Neuro-Psychopharmacologicum September, 1990
5. 椎野顕彦、岡田達也、松田昌之、半田譲二、森川茂広、木戸千絵、犬伏俊郎  
局所脳虚血急性期のMRI  
第52回日本神経学会 近畿地方会、1990年6月
6. 小西 孝、中村保幸、河合忠一、犬伏俊郎  
不安定狭心症モデルにおける $^{31}\text{P}$ NMRによるエネルギー代謝の検討  
第69回日本循環器学会 近畿地方会、1990年6月
7. 森川茂広、木戸千絵、犬伏俊郎  
 $^1\text{H}$ -MRI・ $^{31}\text{P}$ -MRSによるラット骨格筋虚血後再灌流障害の検討  
第16回日本磁気共鳴医学会大会 1990年9月
8. 岡田達也、椎野顕彦、半田譲二、森川茂広、木戸千絵、犬伏俊郎  
脳梗塞におけるGd-DTPAの造影効果の経時的変化  
-ラット中大脳動脈閉塞モデルによる研究-  
第16回日本磁気共鳴医学会大会 1990年9月
9. 椎野顕彦、岡田達也、松田昌之、半田譲二、森川茂広、木戸千絵、犬伏俊郎  
脳虚血に伴う $^{31}\text{P}$ -,  $^1\text{H}$ -MRSの経時的変化  
第16回日本磁気共鳴医学会大会 1990年9月
10. 小西 孝、森井 功、中村保幸、河合忠一、犬伏俊郎  
 $^{31}\text{P}$ NMRによる虚血心の検討-心機能とATPの相関について  
第16回日本磁気共鳴医学会大会 1990年9月

11. 加藤忠史、高橋三郎、塩入俊樹、森川茂広、木戸千絵、犬伏俊郎  
 リチウム服用中躁うつ病患者の $^{31}\text{P}$ -MRS  
 -イノシトールリン脂質系代謝回転の測定-  
 第16回日本磁気共鳴医学会大会 1990年9月
12. 岡田 護、三ツ波健一、木之下正彦、高橋雅士、村田喜代史、木戸千絵、  
 森川茂広、犬伏俊郎  
 心筋 $^{31}\text{P}$ -MRSにおける $^{31}\text{P}$ ,  $^1\text{H}$ -double-tuned surface coilの  
 有用性  
 第16回日本磁気共鳴医学会大会 1990年9月
13. 荒井俊之、中尾慎一、森健次郎、石森浩一郎、森島 績、森川茂広、  
 犬伏俊郎  
 酸素-17 核磁気共鳴分光法  
 第16回日本磁気共鳴医学会大会 1990年9月
14. C.Kido, S.Morikawa, T.Inubushi  
 $^{31}\text{P}$  and  $^1\text{H}$  NMR Metabolite Imaging with CSI  
 第16回日本磁気共鳴医学会大会 1990年9月
15. 椎野顕彦、松田昌之、半田譲二、森川茂広、木戸千絵、犬伏俊郎  
 脳虚血に伴う $^{31}\text{P}$ -,  $^1\text{H}$ -MRSの変化  
 第5回 Brain Hypoxia 研究会、 1990年9月
16. 森川茂広、木戸千絵、犬伏俊郎  
 MRS・MRIを併用したラット後肢骨格筋の急性虚血・再灌流に伴う  
 変化の検討  
 第31回日本脈管学会総会 1990年10月

17. 椎野顕彦、松田昌之、半田譲二、森川茂広、木戸千絵、犬伏俊郎  
局所脳虚血急性期におけるカルシウム拮抗剤の有用性の検討  
第2回日本脳循環代謝学会総会 1990年11月
18. 椎野顕彦、松田昌之、半田譲二、森川茂広、木戸千絵、犬伏俊郎  
脳虚血急性期のMRIとカルシウム拮抗剤  
第53回日本神経学会 近畿地方会、1990年11月
19. 犬伏俊郎  
特別講演: *in vivo* NMR Spectroscopy From Animal Physiology to Human  
Diagnostics  
第29回NMR討論会 1990年11月
20. 鍛 利幸、田中明、寺崎充洋、岡本亮爾、森川茂広、犬伏俊郎、小澤和恵  
31-P核磁気共鳴スペクトロスコピー及び血中ケトン体比を用いたドナー  
肝 Viability 評価法  
第37回日本消化器外科学会総会 1991年2月
21. 森川茂広、木戸千絵、犬伏俊郎  
wirelessサーフェスコイルによるウサギ肝31P-NMRスペクトル測定  
第17回日本磁気共鳴医学会大会 1991年3月
22. 犬伏俊郎、森川茂広、木戸千絵  
*in vivo* 31P NMRスペクトルの自動解析  
第17回日本磁気共鳴医学会大会 1991年3月
23. 三ツ浪健一、岡田護、木之下正彦、木戸千絵、森川茂広、犬伏俊郎  
31PMRSによる心筋内高エネルギーリン酸の半定量的評価の試み  
第17回日本磁気共鳴医学会大会 1991年3月

24. 岡田護、三ツ浪健一、木之下正彦、高橋雅士、村田喜代史、木戸千絵、森川茂広、犬伏俊郎  
ヒト心筋及び骨格筋の $31\text{P}$ -MRS化学シフトの検討  
第17回日本磁気共鳴医学会大会 1991年3月
25. 岡田達也、木村亮之、椎野顕彦、半田譲治、森川茂広、木戸千絵、犬伏俊郎  
脳虚血に伴う $31\text{P}$ -,  $1\text{H}$ -MRSの経時変化 -ネコ前脳虚血モデルによる検討-  
第17回日本磁気共鳴医学会大会 1991年3月
26. C. Kido, S. Morikawa, T. Inubushi, A. Shiino, J. Handa  
1H and 31P NMR Metabolite Imaging in CSI with Practical Application to Animal Models.  
第17回日本磁気共鳴医学会大会 1991年3月
27. 加藤忠史、塩入俊樹、高橋三郎、森川茂広、木戸千絵、犬伏俊郎  
 $7\text{Li}$ -MRSによる脳内リチウム濃度の測定  
第17回日本磁気共鳴医学会大会 1991年3月
28. 荒井俊之、中尾慎一、渡辺興次、森健次郎、森川茂広、犬伏俊郎  
酸素- $17$ 核磁気共鳴分光法 -第2報- 測定時間の短縮化について  
第17回日本磁気共鳴医学会大会 1991年3月
29. 三ツ波健一、岡田護、木之下正彦、木戸千絵、犬伏俊郎  
虚血性心疾患における心筋 $31\text{P}$ 磁気共鳴スペクトロスコピーの有用性の検討  
第55回日本循環器学会総会 1991年3月

30. 小西 孝、森井 功、中村保幸、河合忠一、犬伏俊郎  
短時間反復虚血における低カルシウム再灌流の心筋保護効果  
-  $^{31}\text{P}$  NMR Spectroscopy による検討 -  
第55回日本循環器学会総会 1991年3月



## 7. 研究成果

### 研究目的

本研究はin vivo の $^{31}\text{P}$ -NMRスペクトロスコピーで得られる情報のうち、生体膜リン脂質代謝産物として、漠然とphosphodiester, phosphomonoesterとして認識されているシグナルなどについてさらに詳細な分析をおこない、細胞障害に際して膜リン脂質において起こる代謝動態の変化について検討することを目的としている。現在、in vivoでの $^{31}\text{P}$ -NMRスペクトロスコピーによって、無侵襲に細胞のエネルギーレベルの指標となるATPや、組織内のpHなどを測定することが可能となっている。生体におけるエネルギー代謝の主たる場である肝臓にもこの手法が導入され、基礎医学のみならず、最近の肝臓外科の進歩にともない臨床医学の面からも高い関心が寄せられている。しかし、ATPレベルに変動をきたすような状況は、細胞死に近い状態においてはじめて出現すると考えられ、この様な情報のみでは、複雑な病態との関連を論ずることはできないのが現状である。本研究では、in vivo NMR、高分解能NMR、化学分析などを多角的に組み合わせて、エネルギーレベル以外にも、生体膜リン脂質代謝産物や、糖代謝の中間体などの物質を検出、同定、定量し、肝臓の障害に際して起こるこれらの物質の変化と、病態との関連を解析する。このような結果をもとに、現在人体にも適用可能な無侵襲のNMRスペクトロスコピーを、臨床医学の分野で、より有用な情報を提供する手段として利用することを目指すものである。

### 研究成果

#### 1. 肝障害モデルの作成

肝臓における $^{31}\text{P}$ NMRスペクトルを測定し、あわせて、リン脂質代謝産物の検討を行うため各種の動物モデルを作成した。

### (a) ウサギ慢性肝障害モデル

ウサギに四塩化炭素を最初の2週間は0.2ml/kg、以後0.1ml/kgを週2回皮下注射した。注射開始直後から血清検査で肝機能異常と脂質の上昇が認められ、4週間で脂肪肝が完成した。また総胆管に予めチューブを挿入しておき、これを2週間閉鎖した後、これを解除するという、閉塞性黄疸、胆管ドレナージモデルを作成した。これらの慢性モデルにおける変化は、後述するwirelessの埋め込みコイルにより経時的に同一個体で観察した。(参考資料1)

### (b) ラット再生肝モデル

ラットのleft lateral lobeのみを残して肝臓の約60%を切除した後の再生過程の肝臓を検討の対象とした。(参考資料2)

### (c) 犬脳死モデル

脳死肝移植を想定し、犬の頭蓋内に挿入したバルーンカテーテルを膨らませ、脳死状態とし、その際の循環動態の変化に伴う肝臓の変化を検討した。(参考資料3)

## 2. in vivo NMR

in vivo NMR測定には、GE社製2テスラCSI Omega Systemを用いた。この装置は1989年に滋賀医科大学に導入され、実際に稼動を始めたのは、同年の10月頃であった。in vivo<sup>31</sup>P-NMRスペクトロスコピーを始めるにあたり、骨格筋のリンのシグナルが、最も観察し易いと考え、ラット後肢骨格筋での検討から始めた。先ずラットの後肢骨格筋用に<sup>1</sup>H、<sup>31</sup>Pダブルチューンの、直径1.5cmのサーフェスコイルと直径23mmのボリュームコイルを作成し、NMRの測定を始めた。ラット後肢の様な小さなサンプルに対しても、良好な<sup>31</sup>Pスペクトルと<sup>1</sup>Hイメージを得ることができた。ラット後肢骨格筋の一時虚血モデルにおいて、虚血中と再灌流時のリンのNMRスペクトルと、<sup>1</sup>Hのイメージを同時に測定した。虚血中には、リンのスペクトロスコピーでは、Piの増加と、クレアチンリン酸、次いでβ-ATPの減少が認められ、6時間の虚血によりほとんどPiのピークが観

察されるのみとなった。P i のケミカルシフトから算出した組織内 pH は、7.2 から 6.2 に減少した。一方、<sup>1</sup>H イメージでは、虚血中には、T 1 強調、T 2 強調画像で信号強度の比較的均一な増強が認められた。虚血を解除し、いわゆる再灌流の状態にするとリンのスペクトルパターンと組織内 pH は、数時間以内にほぼ虚血前の状態に戻ったが、クレアチンリン酸の信号の強さは虚血前の約 80% にとどまり、一部不可逆的な変化が起こっていることが想像された。再灌流時の <sup>1</sup>H イメージでは大部分の筋肉の信号強度は、元の値に戻っていったが、T 2 強調画像では、前脛骨筋、腓腹筋など一部分では、再灌流によって信号強度がかえって増強し、明らかに不均一な画像を呈した。この T 2 - 強調画像での信号強度の増大は、再灌流によって引き起こされた組織の浮腫に起因するものと考えられた。(参考試料 4-7)

この様な成果を踏まえ、ウサギ用、ラット用、イヌ用、それぞれに、<sup>1</sup>H、<sup>31</sup>P 二重同調の表面コイルを作成した。また、慢性の肝障害を追跡する目的で、wireless の二重同調表面コイルを作成し、これをウサギ肝臓に埋め込んだ。それぞれ良好な in vivo の <sup>31</sup>P NMR スペクトルが得られた。これを独自に開発したソフトウェアで phosphomonoester (PME), phosphodiester (PDE) 等のピークに分解し、解析を行った。(参考試料 8)

ウサギの四塩化炭素中毒、閉塞性黄疸モデルにおいては、まだ例数が少ないものの、同一の個体で、経時的に無機リンの増加が観察された(図 1)。

ラットの再生肝モデルでは肝切除後 48 時間の時点で無機リンの増加が観察されたが、ATP、フォスホモノエステル (PME)、フォスホディエステル (PDE) のピークには差を認めなかった(図 2)。(参考試料 10)

イヌの脳死モデルの肝臓においては、脳死の初期には ATP/P i が減少し、エネルギーレベルの低下が観察されたが、短時間で回復し、以後良好に推移していた。(参考試料 3)

### 3. <sup>1</sup>H decoupling

ウサギ用の <sup>1</sup>H decoupling coil を作成し、decoupling を試みた。燐酸トリメチルを用いたファントム実験では、in vivo NMR 用の装置でも、良好な <sup>1</sup>H decoupling

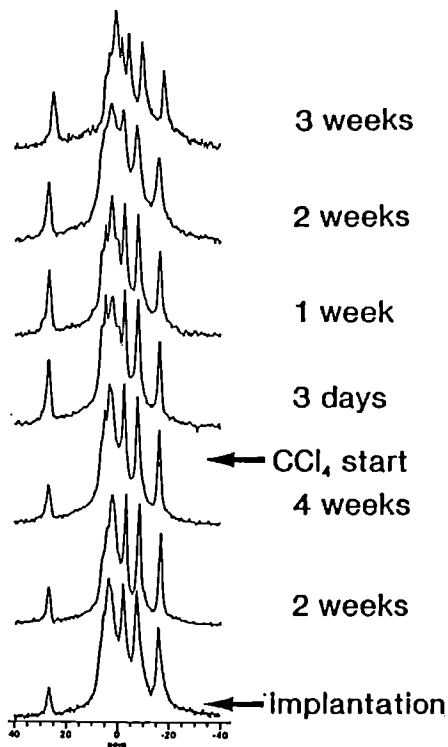


図1 四塩化炭素投与によるウサギ肝臓<sup>31</sup>P NMRスペクトルの変化

wirelessの表面コイルをウサギ肝臓に埋め込み、四週間後より四塩化炭素0.2ml/kgの皮下注を開始した。

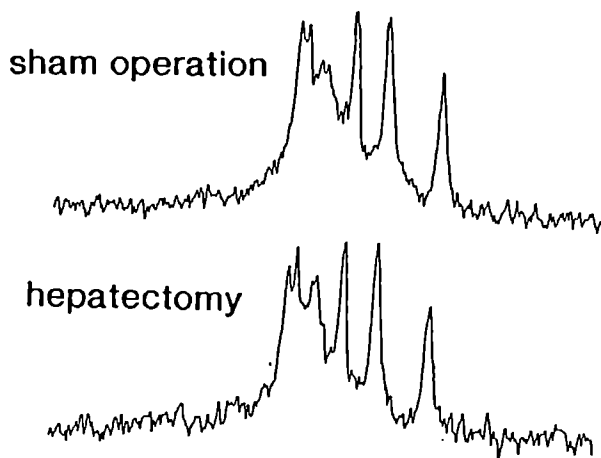


図2 ラット再生肝のin vivo <sup>31</sup>P NMRスペクトル 60%肝切除の48時間後に表面コイルを用いて測定し、sham operationと比較した。

ingが得られた(図3)。しかし、ウサギの肝臓に用いると、大きな出力を要し、ノイズも増大して、PMEやPDEのピークの分解能を向上させるまでには至らなかった。この問題は、<sup>1</sup>Hのカットフィルターと<sup>31</sup>Pのパスフィルターを作成し、回路に組み込むことによりある程度改善されたが、まだ十分な結果が得られておらず、decouplingについては、現在ラット肝臓用のデカップリングコイルを作成して検討を行っている。

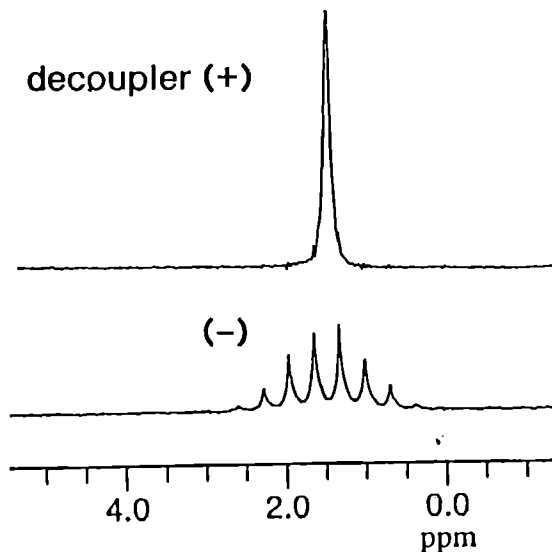


図3  $^1\text{H}$  decouplingの効果  
 生体用のNMR装置（GE社製、2テスラCSI Omega System）を用いて、磷酸トリメチルのリンのスペクトルへの  $^1\text{H}$  decouplingの効果を検討した。

#### 4. in vitro NMR

肝臓組織をfreeze clampにて採取し、過塩素酸抽出液をJ E O L - G X 2 7 0 高分解能NMR装置を用いて、 $^{31}\text{P}$ スペクトルを109.25 MHzにて測定した。in vitro NMRを用いる実験には、主としてラット再生肝モデルを用いた。肝臓にはクレアチン磷酸が含まれていないので、これをサンプルに一定量加え、濃度とケミカルシフトの算定のためのスタンダードとして用いることとした。肝切除後48時間では、PMEのうちphosphorylethanolamine(PE)が約2倍に増加していた（図4）。しかし、増加した場合であってもそのシグナルの全体のリン化合物に対する割合は、3%以下であった。またin vivoの測定では、PDEは全体の20-30%を占める大きな信号を示したが、in vitroの測定では、PDEに相当するglycerophosphorylethanolamine(GPE), -choline(GPC)は、それぞれ2-3%、1-2%に過ぎず、2種類のNMR測定間で大きな相違を見せた。（参考試料2）

## 5. 化学分析

リン脂質代謝に関連する物質では、PMEとして、PEとphosphorylcholine(PC)が、PDEとして、GPEとGPCが知られている。PEとPCは、リン脂質合成経路の中間体であり、GPEとGPCはリン脂質の分解産物と考えられている。PEとGPEはOPA検出のアミノ酸分析法をmodifyして、HPLCを用いて高感度で測定することができた(図5)。PCとGPCは、AG50w x 8のカラムでこれらを含む分画を採取し、それぞれアルカリフォスファターゼ、塩酸処理にてコリンに分解した後、コリンオキシダーゼを用いて定量する方法を確立した。同時に、phosphoenergeticsに関するATP、ADP、AMP、も逆相カラムとイオンペア剤を用いたHPLCにて定量した。

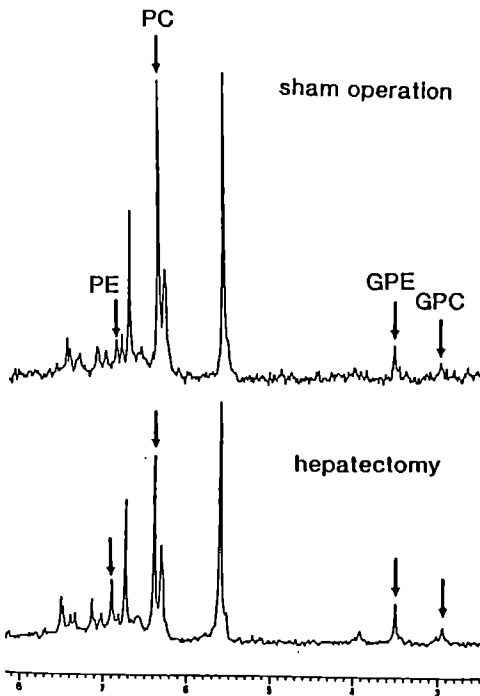


図4 ラット再生肝のin vitro  $^{31}\text{P}$ NMRスペクトル  
60%肝切除の48時間後にfreeze clampで再生肝を採取し過塩素酸で抽出しJ EOL-GX270高分解能NMR装置でin vitro  $^{31}\text{P}$ スペクトルを測定した。

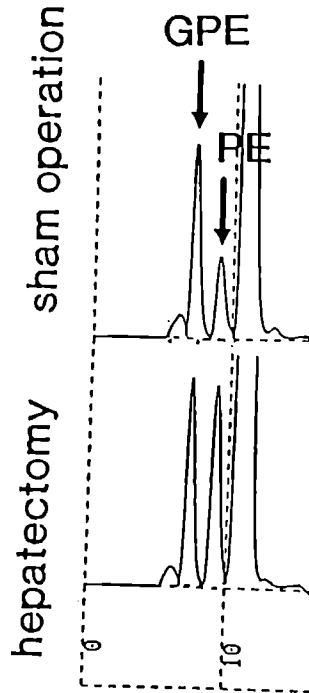


図5 HPLCによるGPE、PEの定量  
アミノ酸分析法を改良し、GPEとPEをオルソフタルアルデヒドで検出した。  
肝切除48時間後とsham operationの肝臓の分析結果を示す。

## 6. 比較検討

ラット再生肝を用いた実験では、ATPについて、*in vivo* NMR、*in vitro* NMR、化学分析の3種の測定結果はよく一致した。PMEについては、*in vitro* NMR、化学分析で認められたPEの増加は、*in vivo* NMRでは検出できなかった。これはPEの絶対量が少ないため、現在の、*in vivo* NMRの分解能では検出できないのは止むを得ないと考えられるので、この様な微細な変化を捉えるためには、*in vivo*の測定法を更に工夫する必要がある。PDEに関しては、*in vivo* NMRではそのピークは全体の20-30%を占めるのに対し、*in vitro* NMR、化学分析のいずれでも5%以下に過ぎなかった。膜のリン脂質がこの部分に信号を有することは以前から指摘されており、このことは、*in vivo* NMRで得られたPDEの信号を解析する上で留意すべき点であることが確認された。

最後に、文部省科学研究費の補助金の交付に対し、深く感謝の意を表します。