

マウス移植腫瘍の増殖に伴う ^{31}P -MRS の変化

大久保真樹¹, 酒井邦夫², 伊藤 猛²
樋口健史², 木村元政², 藤田勝三¹

¹新潟大学医療技術短期大学部診療放射線技術学科

²新潟大学医学部放射線医学教室

はじめに

^{31}P MR Spectroscopy (^{31}P -MRS) は、腫瘍の悪性度判定、治療効果のモニタリング、再発予知等に関し有用な情報を提供するものとして期待されている^{1)~3)}。臨床的な報告^{4),5)}はまだ少ないが、実験腫瘍については、腫瘍の増殖過程^{6)~9)}および放射線^{10),11)}、温熱^{12),13)}、化学療法^{14),15)}等の各種治療後の ^{31}P -MRS の変化に関する報告がなされつつある。特に腫瘍の増殖に伴うスペクトルの変化は、種々の処置後の MRS データの解釈にあたり対照となる基礎データとして重要である。そこで本研究では、マウスの移植腫瘍を対象として腫瘍の増殖に伴う ^{31}P -MRS を測定し、腫瘍の生理学的な状態の変化に伴うエネルギー代謝、燐脂質代謝、細胞内 pH 等の変化につ

いて検討した。また今回は、 ^{31}P -MRS の測定において腫瘍の周辺組織からの信号の混入を低減するためにファラデー・シールドを行っており、その影響についても併せて検討した。

方 法

1. 実験腫瘍

実験腫瘍は、C 3 H/HeN₁ マウス乳癌 (adenocarcinoma) 由来の FM 3 A 細胞を同系雄性マウス (体重 23~25 g) の大腿部皮下に継代移植したものを使用した。移植 11~13 日後に腫瘍体積は約 200 mm³ に達する。 ^{31}P -MRS 測定は、腹腔内ネブタール麻酔下 (約 40 mg/kg) で行い¹⁸⁾、20 匹のマウスの種々の体積 (291~2,122 mm³) の腫瘍を対象として計 24 回測定した。腫瘍体積は、腫瘍の 3 方向の径 x, y, z を測定し、(x ×

キーワード ^{31}P -MRS, experimental tumor, growth-associated change, faraday shield

$y \times z) \pi / 6$ の式から算出した。

2. 装置および計測

使用した NMR 装置は JEOL 製 JMN-GX 270 (静磁場強度 6.3 T) である。rf 検出器は表面コイル型 JEOL 製 NM-G 27 TSPW プローブを用いた。表面コイルは直径 10 mm, 5 ターンであり, 送受信兼用である。コイルの中心を腫瘍の中央部に合わせるようにして測定した。

測定に先立ち, 付属のパワー・メータを用いてマニュアルでコイルのチューニング/マッチングを行い, 次いで ^1H の信号により静磁場均一度調整 (shimming) を行った。チューニング/マッチングおよび shimming の調整は各測定において最適化を図った。

^{31}P -MRS の測定条件は, 共鳴周波数 109 MHz, 繰返し時間 1.9 秒, rf パルス幅 13 μsec である。測定周波数帯域は phosphocreatine (PCr) のピークを基準 (0 ppm) としておよそ +45 ~ -45 ppm である。サンプリング間隔は 50 μsec で, 2,048 ポイント測定した。磷酸化合物を用いて調べた表面コイルの rf 磁場強度分布と感度分布を基に, 設定した繰返し時間と rf パルス幅および ^{31}P の共鳴信号の縦緩和時間を考慮すると, コイル面から 4~5 mm 離れた部分の信号が最大になると考えられる。得られた FID 信号を 400~1,000 回加算し, 30 Hz の exponential line broadening のフィルター関数をかけ S/N の向上を図った後, フーリエ変換してスペクトルを得た。スペクトルには位相補正 (0 次, 1 次), ベースライン補正の処理を行った。なお, スペクトル各成分の変化はそれぞれのピークの高さの比 (信号強度比) を用いて調べた。

細胞内 pH (pHi) は, PCr を基準 (0 ppm) として inorganic phosphate (Pi) の化学シフト (δ ppm) から, 以下の式を用いて算出した²⁾。

$$\text{pHi} = 6.80 - \log \frac{(5.73 - \delta)}{(\delta - 3.22)}$$

PCr のピークが低くて位置が確認できない場合には, α -ATP の化学シフトを 7.5 ppm として 0 ppm を設定した。

3. ファラデー・シールド

^{31}P -MRS の測定において, 表面コイルの直径に比べて腫瘍径が小さい場合には腫瘍の周辺組織からの信号が混入すると考えられる。そこで, Ng ら^{16),17)} が報告したファラデー・シールドの方法を本システムに適したものに改良して用いた (Fig. 1)。使用した銅板は, 蒸留水と無機磷酸溶液を用いたファントム実験において ^1H および ^{31}P の共鳴信号の遮蔽効果が充分にあることが確認されたものである。また銅板と表面コイルは絶縁されているので, コイルの感度分布には影響しない。今回は, 腫瘍体積が約 850 mm³ 以下の場合のみにシールドを行った。

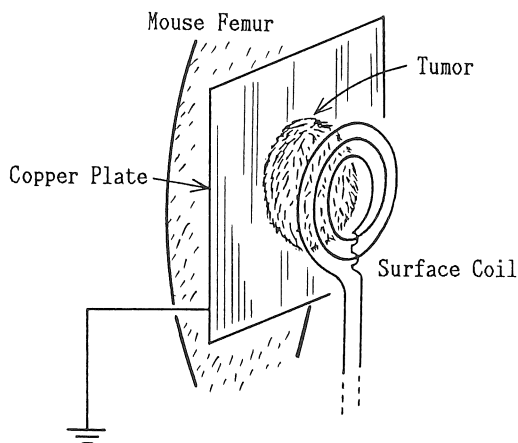


Fig. 1 Schematic representation of a Faraday shield consisting of a grounded copper plate of 0.25 mm thickness which has a center hole fitting to the size of the tumor.

結 果

1. ファラデー・シールドの効果

腫瘍体積が 291 mm^3 , 515 mm^3 および 874 mm^3 の腫瘍を対象とし、それぞれについてファラデー・シールドをしない場合とした場合の ^{31}P -MRS を同一条件下で測定した。その結果、 291 mm^3 および 515 mm^3 の腫瘍では、シールドにより PCr のピークが著明に減少することが判明した (Fig. 2 (a), (b) 矢印↓)。特に、 219 mm^3 の小さい腫瘍ではこの傾向が大きい。このようなシールドによる PCr の減少は、体積が約 850 mm^3 以下の腫瘍では一様に認められた。しかし、体積が 874 mm^3 と大きい場合には、シールドの影響はほとんど認められない (Fig. 2 (c))。

2. 腫瘍体積の増加に伴う変化

1) スペクトルの変化

Fig. 3 に、この腫瘍の増殖曲線を示す。腫瘍は、移植後 10~12 日頃に触知できるようになり、16~17 日後くらいまでは急激に増殖し約 $800\sim 1,000\text{ mm}^3$ に達する。その後は緩やかに増

加する傾向がみられる。

腫瘍の増殖に伴う代表的な ^{31}P -MRS の変化を Fig. 4 に示す。 $1,000\text{ mm}^3$ 以下では腫瘍体積

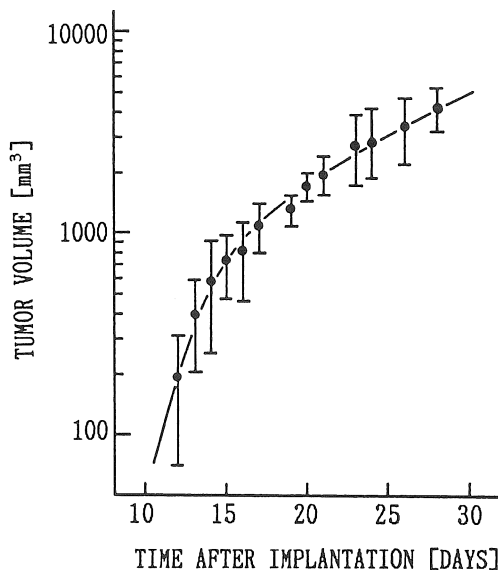


Fig. 3 Tumor growth in mice. Vertical bars indicate means \pm S.D. (n=5).

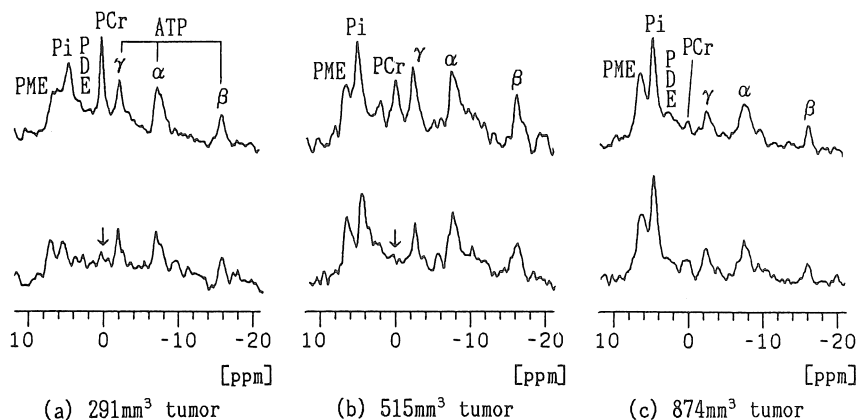


Fig. 2 Comparison of ^{31}P -MRS spectra obtained without (upper) and with (lower) a Faraday shield of (a) 291 mm^3 , (b) 515 mm^3 and (c) 874 mm^3 tumors respectively.

の増加に伴い Pi および phosphomonoester (PME) のピークが adenosine - triphosphate (ATP) よりも相対的に高くなり、1,000 mm³ を越えると ATP のピークが低下し雑音レベル以下になっていくように見える。PCr および phos-

phodiester (PDE) のピークの変化は ATP と同様の傾向を示すが、信号レベルが低いため充分には確認できない。

2) 各種ピークの信号強度比の変化

腫瘍増殖に伴うスペクトル変化を半定量的に評価するために、スペクトル上の種々のピークの信号強度比を用いた。今回は、Pi/ β -ATP, PME/ β -ATP, PCr/Pi, PDE/PME, PDE/Pi および Pi/PME の6種の信号強度比について平均と標準偏差を求め、これらの値と腫瘍体積(平

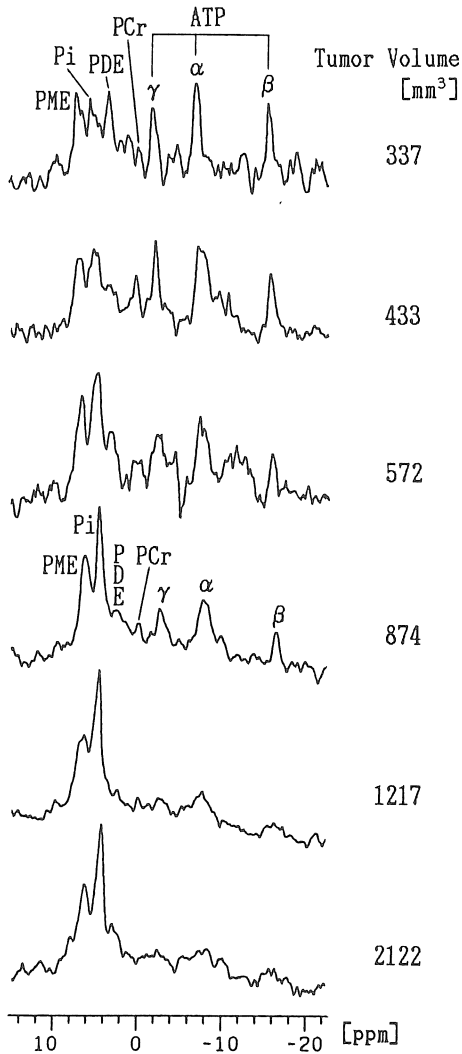


Fig. 4 Effect of increasing tumor volume (337-2,122 mm³) on ³¹P-NMR spectra. Spectra are individually scaled for better demonstration.

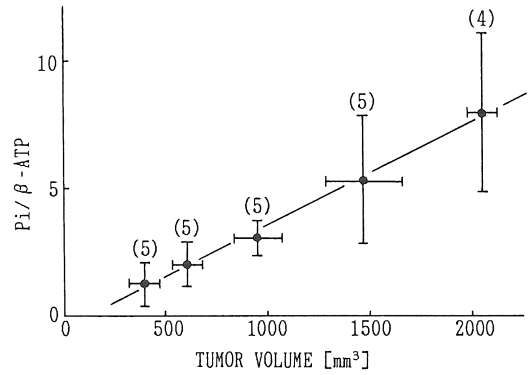


Fig. 5 Pi/ β -ATP ratio as a function of tumor volume. Numbers in parentheses are numbers of tumors investigated. Vertical and horizontal bars indicate means \pm S.D.. All these values are same in Fig. 5~10.

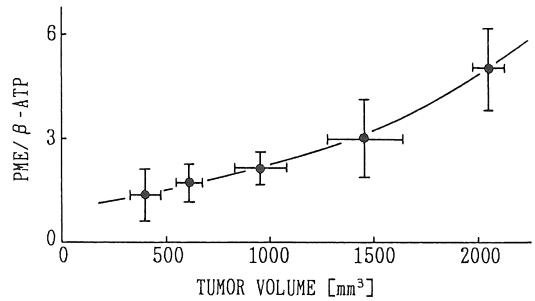


Fig. 6 PME/ β -ATP ratio as a function of tumor volume.

均±標準偏差)との関係を検討した(Fig. 5~10). ピークの信号強度が低く確認できない場合には、雑音レベルの信号強度と考え、その値を用いて各比を算出した。

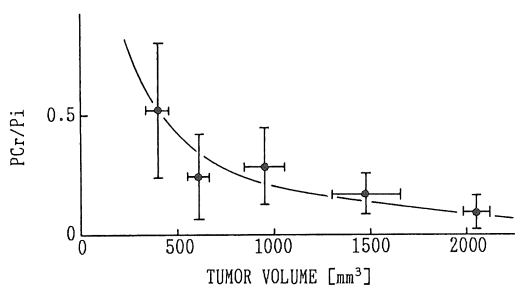


Fig. 7 PCr/Pi ratio as a function of tumor volume.

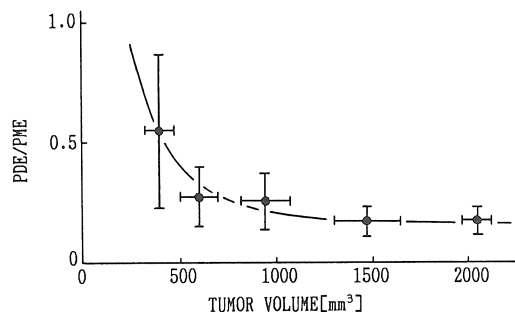


Fig. 8 PDE/PME ratio as a function of tumor volume.

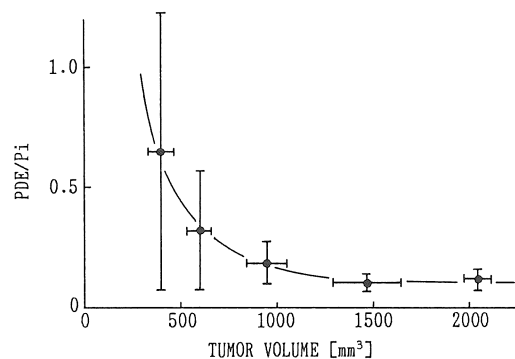


Fig. 9 PDE/Pi ratio as a function of tumor volume.

Pi/ β -ATP および PME/ β -ATP は、腫瘍増殖と共に明らかに増加していることがわかる(Fig. 5, 6). 標準偏差は、他の信号強度比に比べ小さい。

一方、PCr/Pi, PDE/PME および PDE/Pi には、いずれも腫瘍増殖に伴う減少傾向がみられる(Fig. 7, 8, 9). しかし、いずれの信号強度比も腫瘍体積が約 1,000 mm³ を越えるとその変化は緩やかになり一定の値に近づく。

Pi/PME は腫瘍体積が約 1,000 mm³ までは増加し、その後は一定となることがわかる(Fig. 10).

3) pHi の変化

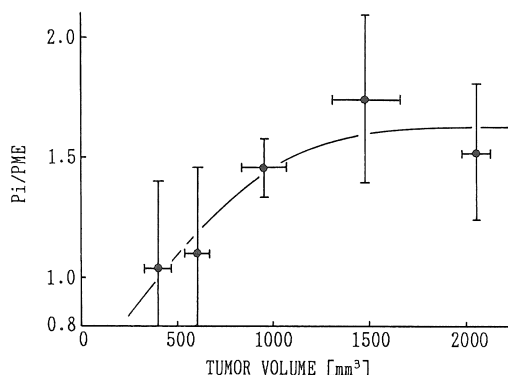


Fig. 10 Pi/PME ratio as a function of tumor volume.

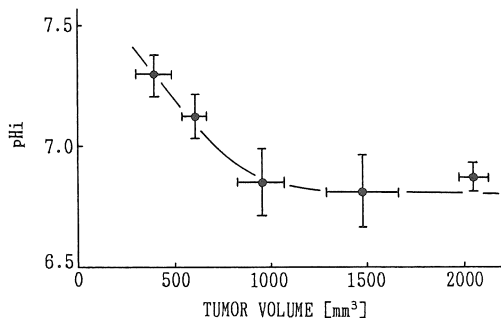


Fig. 11 pHi as a function of tumor volume. Values are means±S.D..

腫瘍体積と pHi (平均±標準偏差) との関係
を Fig. 11 に示す。体積の増加に伴い pHi は減少
するが、約 1,000 mm³ 以上で一定となる傾向が
みられる。標準偏差は比較的小さい。

考 察

体積の小さい腫瘍の ³¹P-MRS 測定では、腫瘍
の周辺組織からの信号の混入 (contamination)
が問題となる。特に今回は移植部位が大腿部で
あり、周辺には高エネルギー燐酸化合物を多量
に含む筋肉組織が存在する。また、使用した表
面コイルの直径は 10 mm であるが、燐酸化合物
を用いたファントム実験により得られた実際の
感度分布はコイル径よりも 1~2 mm 広い範囲に
及んでおり、rf パルス幅も併せて考えると、体
積が約 850 mm³ 以下の腫瘍では contamination
の影響があると想定された。そこで、より小さ
い腫瘍の測定に際しては、ファラデー・シールド
の方法を導入した。その結果、シールドによ
って周辺組織、特に筋肉由来と考えられる高い
PCr のピークが抑えられることが判明した。こ
の傾向は腫瘍の体積が小さい場合により顕著で
あり、シールドによる contamination の低減効
果が確認された。腫瘍の形状にもよるが、本シ
ステムでは体積が約 850 mm³ 以下の腫瘍では、
シールドにより測定精度が向上するものと考え
られる。

腫瘍の増殖に伴うスペクトルの変化を評価す
るために各種ピークの信号強度比および pHi を
用いたが、これらのパラメータに関してはいく
つかの問題がある。まず信号強度が低く雑音と
判別できないピークについては、雑音レベルの
信号とみなして信号強度比を算出した。そのた
め、信号強度が低くピークの確認が困難な PCr
や PDE のピークを用いた信号強度比 (Fig. 7,
8, 9) では標準偏差がかなり大きくなっている。
また各ピークの高さを信号強度としたが、より

正確な計測には、ガウス関数や lorentz 関数等
による curve fitting を行ってから積分値を求め
ピークの信号強度とする必要がある。pHi の算出
では、PCr のピークが低く位置が確認できない
場合に α -ATP の位置を利用した。しかし、 α -
ATP のピークはいくらかシフトする可能性があ
り、また 30 Hz の exponential フィルターをか
けた後ではカップリングもみえていないことか
ら、pHi の正確な算出は難しい。Fig. 11 から pHi
の変化の傾向を把握することは可能であるが、
絶対値の精度は悪いと考えられる。

腫瘍増殖に伴う ³¹P-MRS の変化をエネルギー
代謝および pHi の面からみると、PCr/Pi と pHi
は減少し Pi/ β -ATP は増加する傾向が認められ
た。この傾向は、これまでの報告^{6)~9)} と同様であ
る。Evelhoch⁹⁾ と Vaupel⁷⁾ は、このようなスペ
クトルの変化と腫瘍組織の血流、酸素状態との
関係を検討し、腫瘍の増大に伴う血流低下およ
び低酸素化によりエネルギー状態は低下し、高
エネルギー燐酸化合物である PCr と ATP の減
少、ATP の代謝産物である Pi の増加がおり、
同時に代謝経路が嫌氣的代謝に移行して乳酸が
蓄積され pHi が減少すると述べている。今回用
いた実験腫瘍におけるエネルギー代謝状態の変
化も、同様の機序によるものと考えられる。

腫瘍の体積増加に伴う PME/ β -ATP、PDE/
PME および PDE/Pi の変化から、PME は増加
し、PDE は減少する傾向があると思われた。PME
の共鳴信号は、主に燐脂質の前駆物質である
phosphocholine と phosphoethanolamine から
構成されており、また PDE は燐脂質の異化作用
による生成物である glycerophosphocholine と
glycerophosphoethanolamine からの信号に相
当すると考えられている^{7,11)}。従って、PME と PDE
の割合は燐脂質の合成・異化の相対的な程度を
表わし、腫瘍増殖に伴う PME の増加と PDE の
減少は燐脂質代謝の障害あるいは抑制によるも
のと推定される。

腫瘍の増殖曲線をみると体積約 1,000 mm³ までは急激に増加し、その後緩やかな増加を示す。また³¹P-MRS の変化は、体積 1,000 mm³ 以上で Pi, PME 以外のピークが著明に減少する傾向がみられる。これは、おそらく腫瘍の necrosis の影響を反映しているものと思われる。

今回検討した³¹P-MRS の各種ピークの信号強度比および pHi は、腫瘍の体積増加に伴い変化することが示された。特に、体積が小さい場合には変化の程度が大きい。今後、各種治療によるスペクトルの変化を検討していく場合には、比較的小さい腫瘍を対象とすることも予想されるので、体積によるスペクトルの違いは十分に考慮に入れる必要がある。

まとめ

1. 表面コイルによる³¹P-MRS の測定では、腫瘍の体積が小さい場合、周辺組織からの信号の混入を低減するのにファラデー・シールドが有効であった。
2. スペクトルの各種のピークの信号強度比および pHi は、腫瘍体積と密接に関係することが示された。特に、Pi/ β -ATP, PME/ β -ATP および pHi は比較的標準偏差が小さく、統計的に有意なパラメータになると考えられた。
3. 腫瘍の増殖に伴い、エネルギー状態と pHi の低下および磷脂質代謝の障害、抑制等が生ずるものと思われた。

本研究は、文部省科学研究費総合研究 (A) 高橋睦正班 (課題番号 63304043)、一般研究 (A) (課題番号 01440046) および平成元年度新潟県成人病等治療研究事業の援助を受けた。

文献

- 1) J.P. Wehrle, C.P. Martin, J.D. Glickson : NMR spectroscopy and its application to the study of cancer, in J.H. Anderson ed: Innovations in Diagnostic Radiology. Springer-Verlag, Berlin, 1989, p. 93-116
- 2) T.C. Ng, W.T. Evanochko, R.N. Hiramoto, et al. : ³¹P NMR spectroscopy of in vivo tumors. J. Magn. Reson. 49 : 271-286, 1982
- 3) W.T. Evanochko, T.C. Ng, J.D. Glickson : Application of in vivo NMR spectroscopy to cancer. Magn. Reson. Med. 1 : 508-534, 1984
- 4) M.W. Dewhirst, H.D. Sostman, K.A. Leopold, et al. : Soft-tissue sarcomas : MR imaging and MR spectroscopy for prognosis and therapy monitoring. Radiology 174 : 847-853, 1990
- 5) B. Hubesch, D.S. Marinier, K. Roth, et al. : P-31 MR spectroscopy of normal human brain and brain tumors. Radiology 174 : 401-409, 1990
- 6) P. Okunieff, P. Vaupel, R. Sedlacek, et al. : Evaluation of tumor energy metabolism and microvascular blood flow after glucose or mannitol administration using ³¹P nuclear magnetic resonance spectroscopy and laser doppler flowmetry. Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. 16 : 1493-1500, 1989
- 7) P. Vaupel, P. Okunieff, F. Kallinowski, et al. : Correlations between ³¹P-NMR spectroscopy and tissue O₂ tension measurements in a murine fibrosarcoma. Radiat. Res. 120 : 477-493, 1989
- 8) P.G. Okunieff, J.A. Koutcher, L. Gerweck, et al. : Tumor size dependent changes in a murine fibrosarcoma : Use of in vivo ³¹P NMR for non-invasive evaluation of tumor metabolic status. Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. 12 : 793-799, 1986
- 9) J.L. Evelhoch, S.A. Sapareto, G.H. Nussbaum, et al. : Correlations between ³¹P NMR spectroscopy and ¹⁵O perfusion measurements in the RIF-1 murine tumor in vivo. Radiat. Res. 106 : 122-131, 1986
- 10) J.A. Koutcher, P. Okunieff, L. Neuringer, et al. : Size dependent changes in tumor phosphate metabolism after radiation therapy as detected by ³¹P NMR spectroscopy. Int. J. Radiat. Oncol. Phys 13 : 1851-1855, 1987

- 11) G.M. Tozer, Z.M. Bhujwalla, J.R. Griffiths, et al. : Phosphorus - 31 magnetic resonance spectroscopy and blood perfusion of the RIF-1 tumor following X-irradiation. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 16 : 155-164, 1989
- 12) P.E. Sijens, W.M.M.J. Bovée, D. Seijkens, et al. : Murine mammary tumor response to hyperthermia and radiotherapy evaluated by in vivo ³¹P-nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Cancer Res.* 47 : 6467-6473, 1987
- 13) M.B. Lilly, T.C. Ng, W.T. Evanochko, et al. : Loss of high-energy phosphate following hyperthermia demonstrated by in vivo ³¹P-nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Cancer Res.* 44 : 633-638, 1984
- 14) M. Itoh, S. Shibui, K. Yoshikawa, et al. : Early stage detection of chemotherapeutic effect on 203 GL glioma in mice as studied by P-31 NMR and flow cytometry. *Radiat. Med.*, Vol. 6, No. 4 : 192-196, 1988
- 15) R.G. Steen, R.J. Tamargo, K.A. McGovern, et al. : In vivo ³¹P nuclear magnetic resonance spectroscopy of subcutaneous 9L gliosarcoma : Effects of tumor growth and treatment with 1, 3-Bis (2-chloroethyl)-1-nitrosourea on tumor bioenergetics and histology. *Cancer Res.* 48 : 676-681, 1988
- 16) T.C. Ng, W.T. Evanochko, J.D. Glickson : Faraday shield for surface-coil studies of subcutaneous tumors. *J. Magn. Reson.* 49 : 526-529, 1982
- 17) T.C. Ng, J.D. Glickson : Shielded solenoidal probe for in vivo NMR studies of solid tumors. *Magn. Reson. Med.* 2 : 169-175, 1985
- 18) P. Okunieff, E. Rummeny, P. Vaupel, et al. : Effects of pentobarbital anesthesia on the energy metabolism of murine tumors studied by in vivo ³¹P nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Radiat. Res.* 115 : 361-372, 1988
- 19) J.A. Koutcher, A.A. Alfieri, D.C. Barnett, et al. : Changes in ³¹P nuclear magnetic resonance with tumor growth in radioresistant and radiosensitive tumors. *Radiat. Res.* 121 : 312-319, 1990

Growth-Associated Changes in the Phosphate Metabolism of Experimental Tumors Detected by ^{31}P -MR Spectroscopy

MASAKI OHKUBO,¹ KUNIO SAKAI²
TAKESHI ITOH,² TAKESHI HIGUCHI²
MOTOMASA KIMURA,² SHOZO FUJITA¹

¹*Department of Radiological Technology, College of Biomedical Technology,
Niigata University*

2-746, Asahimachi-dori, Niigata 951

²*Department of Radiology, Niigata University School of Medicine*

1-757, Asahimachi-dori, Niigata 951

In vivo ^{31}P -MR spectroscopy of various sizes of experimental tumors were performed to study changes in the phosphate metabolism and in the intracellular pH (pHi) associated with tumor growth.

^{31}P -MR spectra of FM3A tumor (C3H/HeN mouse mammary adenocarcinoma) grown subcutaneously in the femur of a male C3H mouse were obtained by the JEOL JMN-GX270 spectrometer (6.3 T) using JEOL NM-G27TSPW surface coil probe. A total of 24 measurements were made on 20 different mice. The tumor volume ranged from 291 to 2,122 mm³. In small tumors less than approximately 850 mm³, the Faraday shield method was effective for eliminating contaminations of signals from normal tissues outside the tumor, probably primarily from muscles. Progressive decrease of PCr, ATP and ADP peaks with concomitant increase of Pi and PME peaks were shown during the growth of these tumors. The Pi/ β -ATP, PME/ β -ATP and Pi/PME ratios increased in proportion with the tumors increasing in size, on the other hand, the PCr/Pi, PDE/PME, PDE/Pi ratios and pHi declined. These spectral changes were considered to suggest the changes in the phosphate metabolism associated with the tumor growth.