

In situ ^{31}P -MRS による急性虚血障害肝のエネルギー代謝と組織 pH のモニタリング

中郡 聡 夫

千葉大学医学部第2外科

はじめに

核磁気共鳴法 (nuclear magnetic resonance, NMR) は生体の代謝動態を無侵襲に測定し得る新たな手法として、医学分野において注目されつつある¹⁾。NMR の原理を応用して生体内プロトン (^1H) の密度分布および緩和時間 T_1 , T_2 の差より断層画像を得る磁気共鳴画像診断装置 (MRI) は 1980 年代より臨床に導入され、現在では臨床医にとって不可欠の診断法とまでなっている。さらに、近年の MRI 装置の進歩は人体各部の磁気共鳴スペクトロスコピー (MRS) をも可能とし、臨床的に新たな手法として期待されている^{2),3),4)}。

なかでも ^{31}P -MRS 法は無侵襲に組織および臓器におけるエネルギー代謝の解析に有力な手法である^{1),5)}。

今回著者は ^{31}P -MRS 法を臨床応用するに先立ち、ラット急性虚血障害肝モデルを用いて実験的にその有用性を検討したので報告する。

対象および方法

1. 急性虚血障害肝モデルの作成

実験には 8-10 週齢のウィスター系雄性ラット (体重約 250 g) を用いた。急性虚血障害肝モデルは肝部分阻血法により、約 70% 部分の肝臓への血流を肝門部で遮断して阻血とした後一定時間して血流再開し、同時に約 30% の非阻血肝を切除して作成した。本法では肝阻血中も一部の正常肝葉を通じて門脈血が大循環系へ戻されるため、門脈のうっ滞は引き起こされず循環動態の変動が少ない利点がある。

2. 実験群

実験群は阻血時間により 3 群に分け、1 群：15 分阻血、2 群：30 分阻血、3 群：60 分阻血の 3 群とした。

3. *in situ* ^{31}P -MRS 測定法

血流再開後、10 分間隔で経時的に ^{31}P -MRS 測定を施行した。測定は直径 11 mm の表面コイルを図の如く (Fig. 1) 肝表面に当てておこなった。測定領域はコイル直下の半球状の肝組織である。

肝エネルギーレベルの指標である $\beta\text{-ATP}/\text{Pi}$ 比 (Pi ：無機燐) と肝組織 pH を同時測定し、その動的变化の検討から虚血障害の程度の評価を試みた。 $\beta\text{-ATP}$ および Pi シグナルのピークの高さの比から $\beta\text{-ATP}/\text{Pi}$ 比を求めた。

pH は C. R. Malloy らにより以下の式で算出

キーワード ^{31}P -MRS, hepatic ischemia, liver function

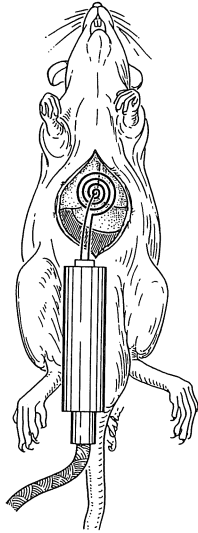


Fig.1. Schematic drawing of measurement of *in situ* ^{31}P -magnetic resonance spectroscopy using a surface coil.

した⁵⁾.

$$\text{pH} = 6.75 + \log (\sigma - 10.85) / (13.25 - \sigma)$$

(σ : Pi と α -ATP との化学シフト差)

使用した装置は JEOL JNM-GX 270 WB で、測定条件は ^{31}P 共鳴周波数 109.25 MHz, パルス幅 12 μs , 繰り返し時間 1.0 s, 積算回数 200 回とした。

4. その他の測定項目

血流再開後 1 時間に、後藤らにより考案された針生検による肝蛋白合成率 (hepatic protein synthesis rate, 以下 HPS)^{6),7)} を測定した。16 gage 生検針により 5 mg 前後の肝組織を採取し、37°C 95%O₂, 5%CO₂ の条件下で、 ^3H -leucine を含む Ries medium 内で 10 分間 incubation し、homogenize の後 TCA で boiling して TCA 不溶性分画すなわち蛋白質に合成された ^3H -leucine 量を液体シンチレーションカウンターにより測定した。

さらに水素ガスクリアランス法による肝組織血流量 (tissue blood flow, 以下 TBF), 血液生化学検査および組織学的検討も併せておこない比較検討した。

結 果

1. ^{31}P -MRS シグナルの経時的変化

Fig. 2, 3, 4 は、測定で得られた 1, 2 および 3 群の代表的な ^{31}P -MRS シグナルの経時的変化を示したものである。

1 群シグナルの経時的変化をみると (Fig. 2), 最上段の血流再開後 10 分の時点で軽度の β -ATP シグナルの低下は認めるものの Pi で示される無機燐は上昇していない。さらに上段より下段へと時間の経過を見てゆくと、その後早期に β -ATP は回復している。

2 群 (Fig. 3) では、血流再開後早期では無機燐シグナルがかなり高値であり、同時に β -ATP シグナルも低下している。しかし血流再開後の時間の経過とともに、無機燐は低下し、一

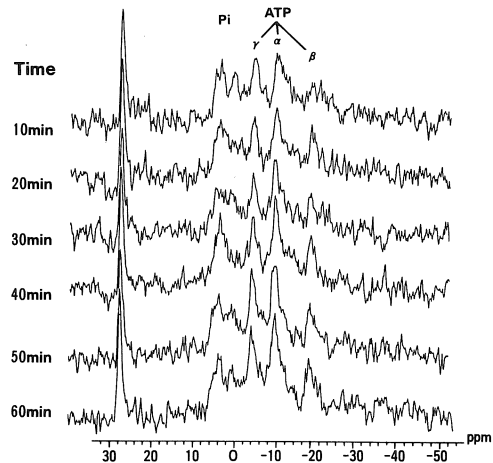


Fig.2. Changes of ^{31}P -MRS spectrum from a rat liver after revascularization in group 1.

1990年11月21日受理 1990年12月17日改訂

別刷請求先 〒360 熊谷市中西4-5-1 熊谷総合病院外科 中郡聡夫

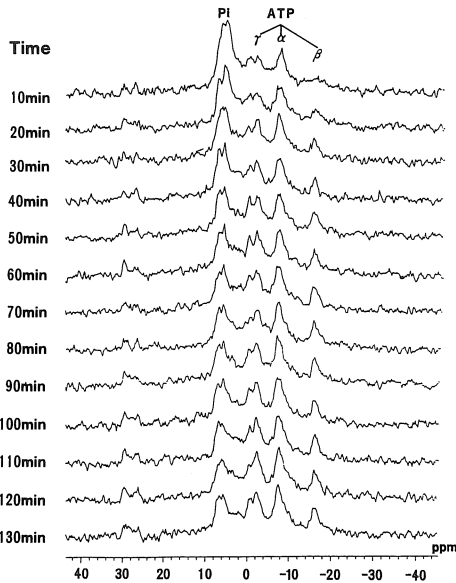


Fig.3. Changes of ^{31}P -MRS spectrum from a rat liver after revascularization in group 2.

方 ATP が回復していくことがわかる。

3 群 (Fig. 4) では、全体に無機燐シグナルが高く、ATP シグナルは低下しており回復も認められなかった。

なお血流再開後、測定開始までの 10 分の間に測定条件の設定 (シミング、チューニング等) を終了させねばならず、その結果 S/N 比の異なったシグナルが得られたことを付記する。

2. β -ATP/Pi 比

ついで Fig. 5 に 1 群 ($n=5$), 2 群 ($n=6$) および 3 群 ($n=4$) につき群別に、肝 energy status の指標である β -ATP/Pi 比の経時的変化を示した。

オープンサークルで示した 1 群では早期より回復が良好で、血流再開後 1 時間で 0.90 ± 0.11 とほぼ正常値まで回復しているのに対し、オープントライアングルで示した 2 群では回復は認められるものの 1 群に比して低値に留まっていた。血流再開後 1 時間の β -ATP/Pi 比は 0.55 ± 0.18 であった。クローズドサークルで示した 3 群では低値が持続して回復は極めて不良で

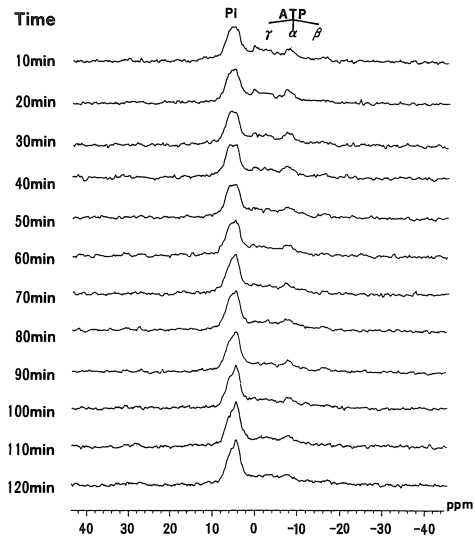


Fig.4. Changes of ^{31}P -MRS spectrum from a rat liver after revascularization in group 3.

あり、1 時間後でも β -ATP/Pi 比は 0.24 ± 0.13 にすぎなかった。血流再開後 1 時間の時点で、各群間には Fig. 5 に示した如き有意差を認めた。

3. 肝組織 pH

^{31}P -MRS シグナルの Pi と α -ATP の化学シフト差から、前述の計算式に従って肝組織 pH を求めた。なお S/N 比の不良なスペクトルでは Pi のピーク判定は困難であり、従って一部で pH の測定が不可能であった。

Fig. 6 は各群の経時的変化を示したものである。オープンサークルで示した 1 群ではほぼ正常範囲で経過したのに対し、オープントライアングルで示した 2 群では早期にはアシドーシスを示したが時間の経過とともに正常化した。一方クローズドサークルで示した 3 群ではアシドーシスが持続遷延した。

血流再開後の肝組織 pH と β -ATP/Pi 比の変化を同時に示すと Fig. 7 の如く各群の虚血障害からの回復経過が明瞭に示される。X 軸に β -ATP/Pi 比、Y 軸に肝組織 pH をとって、10 分から 60 分への変化を矢印で示してある。オー

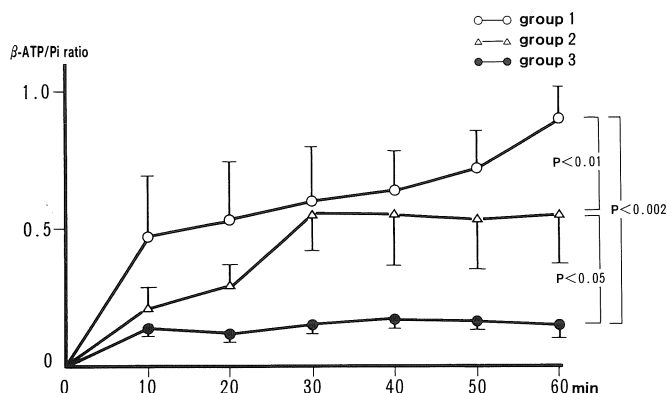


Fig.5. Changes of β -ATP/Pi ratio obtained by ^{31}P -MRS after revascularization. There were significant differences among each three groups 1 hour after revascularization.

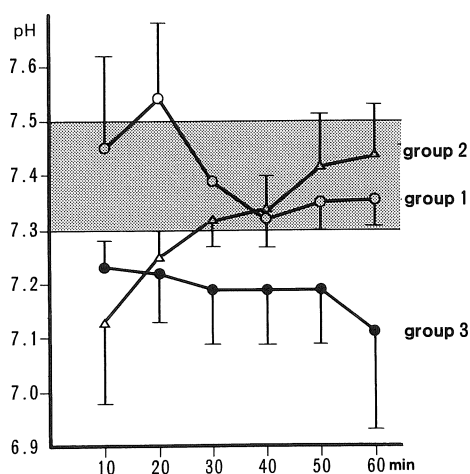


Fig.6. Changes of liver pH after revascularization.

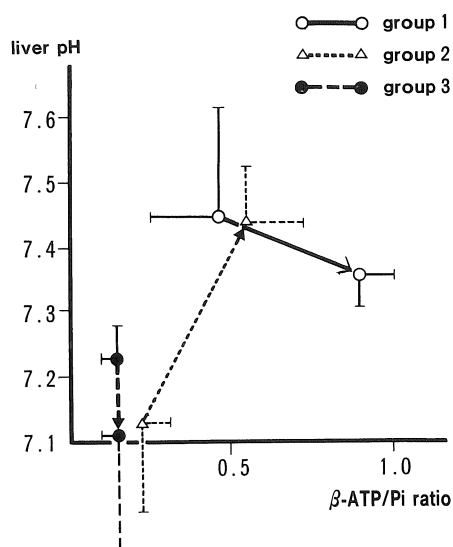


Fig.7. Changes of both β -ATP/Pi ratio and liver pH. The arrow shows the change from 10 min after revascularization to 60 min after revascularization.

プンサークル実線で示した1群では右方向すなわちエネルギー代謝が改善している。オープントライアングル点線で示した2群は右斜め上方、すなわちエネルギー代謝の改善と同時にアシドーシスからの回復が認められた。クローズドサークル波線で示した3群では下方すなわちアシドーシスが進むばかりで、エネルギー代謝の改善も認められない。このように ^{31}P -MRSにより虚血

障害からの回復過程を無侵襲に観察し得た。

4. その他の測定結果

a) 生存率と GPT (glutamate pyruvate transaminase)

今回用いた部分肝阻血モデルの24時間生存率と、血流再開後1時間の血清GPT値をTable 1に示した。肝細胞の崩壊により血中に逸脱するGPTは1群 883 ± 112 U/L, 2群 2816 ± 719 U/L, 3群 6163 ± 684 U/Lと阻血時

間が延長するに従い高値となり、各群間には肝細胞障害の程度に有意な差のあることが裏付けられた。24時間後の生存率からも3群が高度障害モデルであることがわかる。

b) 肝蛋白合成率 (HPS)

正常肝のHPS 37.9 ± 12.5 nmol-leucine/mg wet wt. /10 min. に対し、1群 (n=5) 27.3 ± 4.2 , 2群 (n=15) 19.7 ± 11.1 , 3群 (n=16) 7.1 ± 3.0 と阻血時間の延長に従い低下した。

各群間にはFig. 8に示す如き有意差を認めた。

Fig. 9の上段にHPS下段に β -ATP/Pi比を同時に示し比較すると、阻血時間が延長するに従い両パラメーターは同様の低下を示していることがわかる。

c) 肝組織血流量 (TBF)

Fig.10に血流再開後1時間の時点におけるTBFの測定結果をまとめて示した。正常肝 (n=10) 78.0 ± 11.7 ml/min./100 g に対し、1群 (n=5) では 52.7 ± 10.6 ml/min./100 g, 2群 (n=15) では 50.1 ± 15.2 ml/min./100 g と両群とも軽度の低下が認められ、軽度の組織循環障害の存在を伺わせた。3群 (n=16) では 28.6

Table 1. GPT 1 hour after revascularization and 24 hour survival rate.

	GPT	24 hour survival rate
group 1	883 ± 112	100%
group 2	2816 ± 719	100%
group 3	6163 ± 684	63.6%

*P<0.01

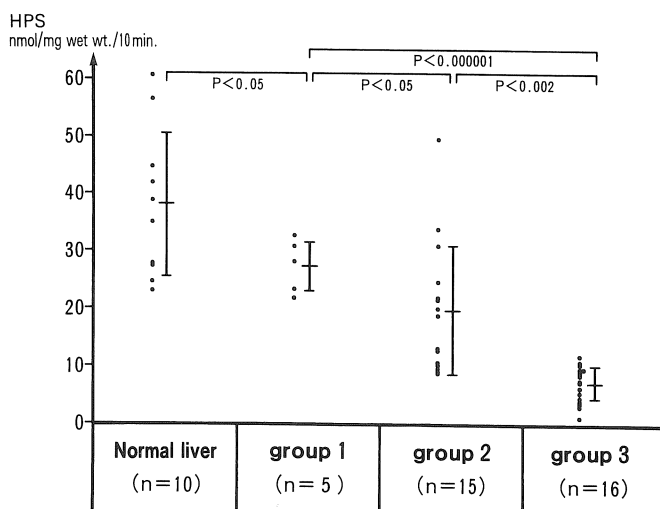


Fig.8. Hepatic protein synthesis rates (HPS) 1 hour after revascularization. HPS in group 1 recovered, but HPS in group 3 did not. HPS in group 2 varied.

$\pm 10.9 \text{ ml/min./100 g}$ と著明に低下しており、高度の組織循環障害が惹起されていた。

d) 組織学的検討

血流再開後 1 時間における各群の組織像を検討すると、1 群及び 2 群における組織学的変化は乏しく両群間にも明かな差を認めなかった。

しかし 3 群では Fig.11 の如く広範の出血および肝細胞の壊死を認めた。

考 察

現在 MRI 装置により人体各部の ^{31}P および ^{13}C

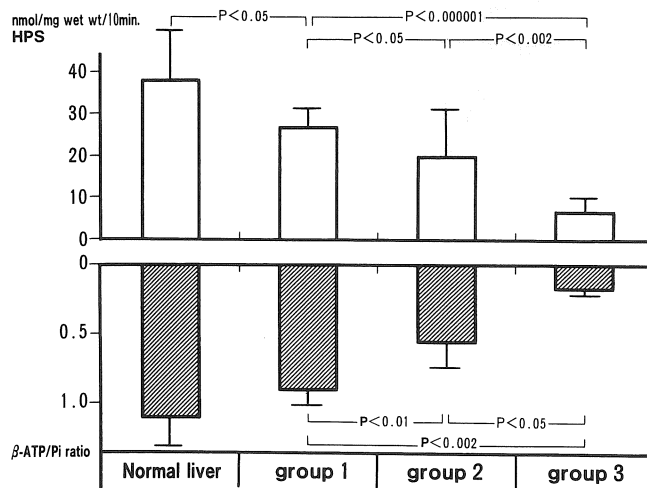


Fig.9. Comparison of HPS (upper) and $\beta\text{-ATP/Pi ratio}$ (lower).

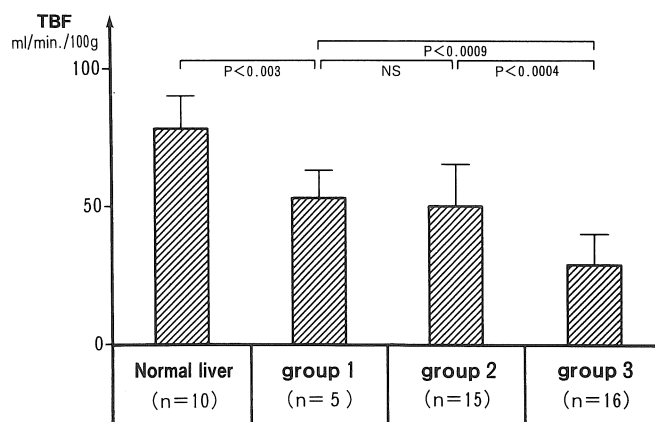


Fig.10. Hepatic tissue blood flow (TBF) measured by hydrogen clearance method.

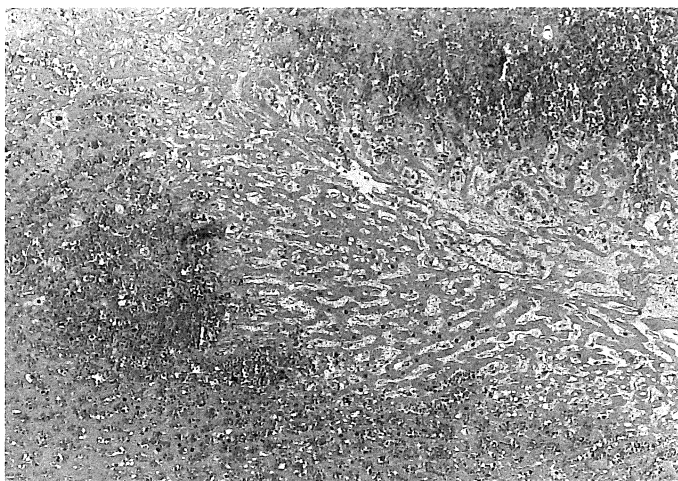


Fig.11. Histological finding of a liver in group 3. Marked hemorrhagic necrosis is observed.

等の核種の磁気共鳴スペクトロスコピー (MRS) 測定が可能となりつつあり^{2),3),4)}, 臨床的にもその有用性が期待されている。なかでも³¹P-MRS は、測定対象の磷酸化合物が生体におけるエネルギー代謝、酸塩基平衡および膜の構成成分等の重要な役割を担っており貴重な情報が得られると考えられる。

従来、肝臓に関しては遊離肝細胞⁹⁾ および摘出肝の灌流モデル^{10),11),12)} を用いた実験から³¹P-MRS 測定の有用性が示されてきた。今回著者は *in vivo in situ* の条件下、すなわち対象が生きたままの状態において急性虚血障害肝モデルの MRS 測定を経時的連続的に施行し、エネルギー代謝と組織 pH の動的变化のモニタリングが可能であることを示した。特に³¹P-MRS スペクトルから求めた β -ATP/Pi 比は肝組織エネルギーレベルの指標となり、簡便でしかも感受性の高いパラメーターであった^{13),14)}。この実験結果から人においても特定臓器、特に mass として大きく均一である肝臓からは連続的に³¹P-MRS 測定を施行することが十分可能と考えられる。

³¹P-MRS 法は無侵襲な検査法でもあり肝疾患の臨床においての有用性が期待される。

実際、近年肝臓病診療は急速に進歩しており

TAE、肝切除術などが一般病院でも日常的に施行される様になった結果、肝エネルギー代謝障害を伴う病態の症例も飛躍的に増加しつつある¹⁵⁾。小沢らは、肝ミトコンドリアの酸化還元状態を反映し肝細胞のエネルギー状態の指標であるケトン体比 (AKBR) の測定が肝機能の把握に重要であるとしており、AKBR による肝臓外科手術後の metabolic intensive care という概念を提唱している¹⁶⁾。確かに AKBR は採血によって肝臓のエネルギー状態を簡便に把握できることから臨床的に優れた指標といえる。しかし³¹P-MRS 法は一度測定環境を設定すれば測定はごく短時間で可能であり、しかも連続的に繰り返すことができる。例えば本実験では一回の測定に 200 秒しか要していない。また本法は肝臓から直接シグナルを得るため他臓器の代謝や全身状態の影響を受けない利点がある。さらに、³¹P-MRS は肝の特定部分からの情報を選択的に得ることが可能という特性を持っている。従って、門脈塞栓や血管浸潤例さらに血管合併切除後などでは肝区域別のエネルギー状態が測定可能となり、さらに肝門部胆管癌や胆嚢癌では肝葉別の黄疸による障害程度の差も将来測定可能とおもわれる。

欧米で末期肝不全に対する治療として多数施行されている肝臓移植においては、肝保存時だけでなく donor 手術および recipient 手術操作中にも肝虚血は避けられず、従って大きなエネルギー代謝変動を伴っている。Lanir¹⁷⁾ および Kamiike¹⁸⁾ らは肝組織 ATP 濃度の測定が移植肝の viability および移植後早期の肝機能の指標として有用な指標であると報告している。従って、著者の実験結果と併せると ^{31}P -MRS は移植臓器の viability の評価および移植後早期の臓器機能のモニタリングに応用の可能性が高いと思われる。

今回著者の実験結果から、Fig. 9 に示したように虚血障害肝においては虚血時間が延長するに従って β -ATP/Pi 比が低下し、その低下の程度に一致して肝蛋白合成率 (HPS) も障害されていることが明かとなった。蛋白合成においては messenger RNA 合成, aminoacyl tRNA 合成および ribosome translocation などの過程で多くの ATP を必要とするために、肝組織 ATP 濃度の低下が直接肝蛋白合成能の低下に結び付いたものと思われる⁷⁾。従って肝虚血障害においては、肝細胞機能の障害の程度はエネルギー代謝の障害度すなわち β -ATP/Pi 比の低下として把握し得ることが示唆された。

また同時に肝組織 pH の経時的変化のモニタリングによつて、阻血障害の高度なものではアシドーシスが持続遷延することが観察され、軽度の阻血障害ではアシドーシスからの回復過程を観察し得た。肝エネルギー代謝のモニタリングに加えて、肝組織 pH の測定からも組織障害の程度を推定することが可能であり ^{31}P -MRS 測定の有用性が示された¹⁹⁾。

以上の検討から肝虚血障害における障害度の評価に ^{31}P -MRS 法は有用な検査法であることが示され、さらに本法は *in situ* において肝代謝機能が無侵襲に測定し得る新たな検査法であることから今後の臨床への応用が期待される。

ま と め

- 1) *in situ* ^{31}P -MRS により、実験的に肝組織エネルギーレベルと肝組織 pH を測定して虚血障害度の評価を試みた。
- 2) 肝エネルギーレベルの指標である β -ATP/Pi 比は、阻血時間の延長にともなって有意に低下し、虚血障害度の評価が可能であった。肝組織 pH についても同様、障害の程度と回復過程を観察し得た。
- 3) 代表的肝細胞機能である肝蛋白合成率を測定すると阻血時間の延長に従って低下し、これは β -ATP/Pi 比と同様の変化を示した。従って、虚血肝障害の程度はエネルギー代謝の障害度として把握し得ると考えられた。
- 4) *in situ* ^{31}P -MRS は肝虚血障害の程度を無侵襲に測定し得る新たな検査法であり、肝切除、肝移植、TAE 等の肝エネルギー代謝障害を伴う病態に際し新たな肝機能モニタリング法として期待し得る。

謝辞 稿を終えるに当たり、本研究の機会を与えて下さり、御指導御校閲を賜りました千葉大学第 2 外科磯野可一教授、並びに終始直接御指導頂きました同助手浅野武秀先生に深謝致します。また実験に協力して頂きました千葉大学第 2 外科剣持敬先生、後藤剛貞先生、日本電子松下和弘氏ならびに千葉大学第 2 外科の諸先生に心から感謝致します。

文 献

- 1) D. G. Gadian, 今井昭一訳:「医学・生物学のための NMR」西村書店, 新潟, 1985
- 2) B. Quistorff, A. Engkagul, B. Chance: ^{31}P -NMR in the study of liver metabolism *in vivo*. Pharmacol Biochem Behav, 18: Suppl, 241-244, 1983
- 3) T. M. Grist, A. Jesmanowicz, W. Fzencisz, et al.: 1.5T *in vivo* ^{31}P NMR spectroscopy of the human liver using a sectorial resonator. Magn Reson Med, 3: 135-139, 1986
- 4) T. C. Ng, A. W. Major, T. F. Meany: *In vivo* MR

- spectroscopy of human subjects with a 1.4T whole body MR imager. Radiology, 158 : 517-520, 1986
- 5) C. R. Malloy, C. C. Cunningham, G. K. Radda : The metabolic state of the rat liver *in vivo* measured by ^{31}P -NMR spectroscopy. Biochem Biophys Acta, 885 : 1-11, 1986
- 6) 後藤剛貞, 浅野武秀, 森田哲生, 他 : 針生検採取肝における蛋白合成率の測定. 肝臓, 28 : 1664-1665, 1987
- 7) T. Nakagohri, T. Asano, T. Goto et al. : Use of hepatic protein synthesis rate in acute ischemic liver to assess degrees of ischemic injury. Transplant Proc, 21 : 2292-2293, 1989
- 8) 松下和弘 : 核磁気共鳴 (NMR) 装置. 日本造船学会誌, 717 : 158-165, 1989
- 9) S. M. Cohen, S. Ogawa, H. Rottenberg et al. : ^{31}P -nuclear magnetic resonance study of isolated rat liver cells. Nature, 273 : 554-556, 1978
- 10) I. M. Salhany, S. J. Stohs, L. A. Reinke et al. : ^{31}P -nuclear magnetic resonance of metabolic changes associated with cyanide intoxication in the perfused rat liver. Biochem Biophys Res Commun, 86 : 1077-1083, 1979
- 11) S. M. Cohen : Simultaneous ^{13}C and ^{31}P NMR studies of perfused rat liver. J Biol Chem, 258 : 14294-14308, 1983
- 12) A. C. McLaughlin, H. Takeda, B. Chance : Rapid ATP assays in perfused mouse liver by ^{31}P NMR. Proc Natl Acad Sci USA, 76 : 5445-5449, 1979
- 13) 中郡聡夫, 浅野武秀, 榎本和夫, 他 : 虚血肝の *in situ* ^{31}P -MRS. 肝臓, 29 : 124, 1988
- 14) C. E. Haug, J. I. Shapiro, R. L. Cosby et al. : ^{31}P -nuclear magnetic resonance spectroscopy of heart, heart-lung and kidney allograft rejection in the rat. Transplant Proc, 20 : 848-855, 1988
- 15) M. Makuuchi, T. Mori, P. Gunven et al. : Safety of hemi hepatic vascular occlusion during resection of the liver. Surg Gynecol Obstet, 164 : 155-164, 1987
- 16) J. Tanaka, K. Ozawa, R. Tobe : Significance of blood ketone body ratio as an indicator of jaundiced rabbits. Gastroenterology, 76 : 691-696, 1979
- 17) A. Lanir, R. L. Jenkins, C. Caldwell et al. : Hepatic transplantation survival ; Correlation with adenine nucleotide level in donor liver. Hepatology, 8 : 471-475, 1988
- 18) W. Kamiike, M. Burdelski, G. Steinhoff et al. : Adenine nucleotide metabolism and its relation to organ viability in human liver transplatation. Transplantation, 45 : 138-143, 1988
- 19) 棟方隆, 田中邦雄, 水戸廸郎 : ^{31}P 核磁気共鳴法による急性肝障害における肝内エネルギー代謝動態の解析. 日外会誌, 91 : 77-85, 1990

**Experimental Study on Monitoring of Energy Status
and pH by *in Situ* ^{31}P -MRS
in Acute Ischemic Liver Injuries**

Toshio NAKAGOHRI

*Second Department of Surgery,
Chiba University School of Medicine.
1-8-1 Inohana, Chiba-shi, Chiba 280*

Changes of energy status and pH of the rat ischemic liver were measured by *in situ* ^{31}P -magnetic resonance spectroscopy (MRS) to assess degrees of ischemic injury. Male Wistar rats were used for a model of acute ischemic liver injury and were divided into three groups : 15 minutes hepatic ischemia (group 1), 30 minutes ischemia (group 2) and 60 minutes ischemia (group 3). One hour after revascularization, β -ATP/Pi ratio, which represented mitochondrial energy status was 0.86 in group 1, 0.48 in group 2 and 0.10 in group 3. There were significant differences among each three groups. The pH measured by ^{31}P -MRS was normal in group 1, acidosis in group 3. Immediately after the revascularization pH was acidosis in group 2, but it recovered to the normal range. Clinically both β -ATP/Pi ratio and pH obtained by ^{31}P -MRS would be good indices to assess degrees of ischemic injury.