原著

^{31}P-NMRを用いたラット眼球内リン酸化合物代謝の観察

五十嵐弘昌[1]，　吉田晃敏[1]，　田中邦雄[2]

[1]旭川医科大学眼科学講座　[2]旭川医科大学実験実習機器センター

はじめに

核磁気共鳴映像法（MRI）の飛躍的進歩に伴い，眼科領域においてもCT画像診断に代わる方法としてMRIが急速に普及し始めている[1)~3)]．一方，核磁気共鳴分光法，すなわちMRSは，生体組織の代謝を*in vivo*で経時的な測定が可能であり，最近，眼科領域でもその応用に強い関心を集めている[4)~7)]．しかし，現在の生体系MRSの対象核種の主流であるリン酸化合物は，眼内組織において含有量が非常に乏しく，本法を用いた測定は，多数の眼球を用いて抽出標本を作製し，さらにこれを数十時間にわたって積算することを必要としてきた[4)~7)]．著者らは，測定方法を改良することにより，ラット水晶体1個の未処置標本を用い，1時間以内での測定を可能とした[8)]．そこで今回著者らはその延長として，ラットの全眼球，水晶体および水晶体に比べリン酸化合物含有量に乏しい角膜の未処置標本のリン酸化合物代謝を^{31}P-MRSを用いて観察し，それらのスペクトルの差異を明らかにし，さらに眼内における血流途絶（眼球摘出）によるリン酸化合物の代謝過程を検討した．

方　法

1．対象およびサンプルの摘出

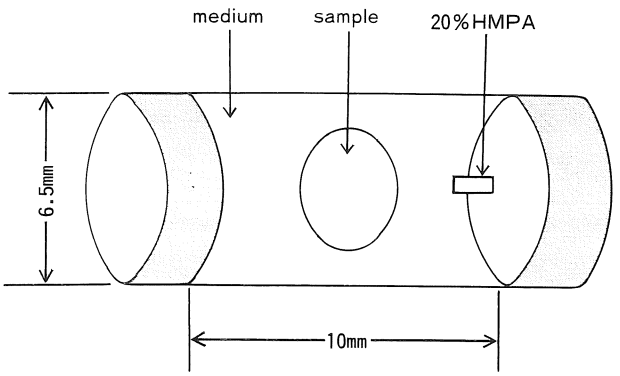
対象として生後7週齢のウィスター系ラット（n＝78）を用いた．全眼球および水晶体の測定には片眼のみ，角膜の測定には3匹，計6眼の角膜を1回の測定に用いた．

サンプルの摘出方法として，全眼球はラットにエーテル麻酔を行った後，生体顕微鏡を用いて結膜を輪部切開で強膜より剥離し，外眼筋，視神経の順に切断して摘出した．水晶体は眼球摘出後，眼球後極部より強膜を放射状に切開し，硝子体を除去後，チン小帯を切断して摘出した．角膜は角膜のみを輪部より直接摘出した．

2．^{31}P-NMRスペクトルの測定

測定装置としては，静磁場強度6.3 TのGX-270 WB FT-NMR装置（日本電子）を用いた．サンプル管として，外径10×6.5 ㎜ϕのアクリル製サンプル管を作製して，その内に外部標準として20％ヘキサメチルホスホロアミド（HMPA）を封入した微小ガラス管（5.5×0.7 ㎜ϕ）を装着した（図1）．このサンプル管内をリン酸を含まないクレブス重炭酸培地（pH 7.35）で満たした後，全眼球および水晶体はそれぞれ1個，角膜は6個を挿入し，さらにこれを1.7 ㎜ϕのエナメル線で作製した4回巻きソレノイド

キーワード　^{31}P NMR, adenosine triphosphate, phosphomonoester, inorganic phosphate, central retinal artery occlusion



HMPA : Hexamethyl phosphoroamide
medium : phosphate free bicarbonate krebs medium

図 1. サンプル管の模式図

コイルに装着して測定を行った.

測定条件としては，既報[8]に従い30°パルスを用い，パルス繰り返し時間（TR）を0.5 s，積算回数を7200回とした．従って，測定時間は1スペクトル1時間である．また，観測幅は8000 Hz，データポイント数は2048，broadeningは20 Hzとした．

ここで，水晶体における各リン酸化合物のT_1実測結果では，無機リン酸が約5秒と最も長く，従って上記のTRが0.5 sのもとでは，各共鳴ピークは部分的飽和の条件下とならざるを得ない．そこで，90°パルスを用い，無機リン酸のT_1の約3倍のTR（15 s）として，積算回数240回（1スペクトル1時間）でほぼ完全緩和に近い状態での測定をあわせて行い，両条件下での比較を行った.

また，全眼球と水晶体については，経時変化を観察するために，TRを0.5 s，積算回数1800回（1スペクトルの測定時間を15分）とし，これを4回連続して1時間の測定を行った.

結　　果

図2の上段に全眼球，中段に水晶体，下段に角膜をTR 0.5 sで1時間測定して得られたスペクトルの代表例を示す．各スペクトルとも左から順に，HMPA，リン酸モノエステル（PME），無機リン酸（Pi），γ-ATP，α-ATP，ヂヌクレオチド（DN），β-ATPである．なお，図示はしていないが，TP 15 sで1時間測定して得たスペクトルも積算回数が少ないので若干S/N比は劣るが，TR 0.5 sの場合とほぼ同様であった.

次に，TR 0.5 sおよびTR 15 sで測定されたスペクトルの各ピークのうち，PME，Piおよびβ-ATPについて，HMPAのピークの高さを1として換算した時の各ピークの平均値および標準偏差を表1および表2に示す．また，これをもとに全眼球のPME，PiおよびATPをそれぞれ100%とした時の水晶体および角膜のPME，PiおよびATPの相対値を表3に示す．なお，角膜については，角膜1個の値に換算して示した．表3から明らかなように，TR 0.5 sとTR 15 sでは，全眼球，水晶体および角膜のPME，PiおよびATPの相対値はほぼ等しいことがわかる．従って，以下の各ピークの検討は積算効率の高いTR 0.5 sのみについておこなった.

1990年12月4日受理　1991年4月15日改訂
別刷請求先　〒078　旭川市西神楽4線5号3番地11　旭川医科大学眼科学教室　五十嵐弘昌

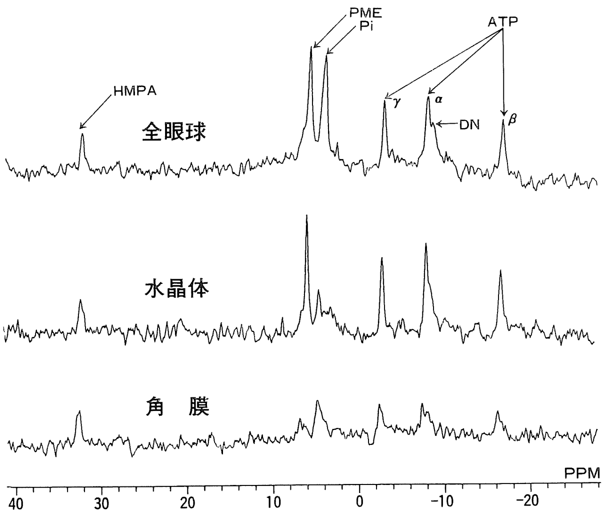


図 2.　ラット全眼球、水晶体および角膜のスペクトル（TR 0.5 s）
HMPA：ヘキサメチルホスホロアミド　PME：リン酸モノエステル
Pi：無機リン酸　α, β, γ-ATP：α, β, γ アデノシン三リン酸　DN：
ジヌクレオチド

表 1. 各スペクトルの HMPA に対する割合（TR 0.5 s）

	P M E	P i	A T P
全 眼 球 (n＝8)	3.80 ± 0.32	3.40 ± 0.32	1.57 ± 0.20
水 晶 体 (n＝8)	3.07 ± 0.12	1.24 ± 0.14	1.63 ± 0.07
角　膜 (n＝8)	0.11 ± 0.02	0.18 ± 0.03	0.11 ± 0.02

(HMPA＝1)

表 2. 各スペクトルの HMPA に対する割合 (TR 15 s)

	P M E	P i	A T P
全 眼 球 (n＝5)	3.14 ± 0.22	2.03 ± 0.22	0.69 ± 0.06
水 晶 体 (n＝5)	2.70 ± 0.31	0.79 ± 0.13	0.77 ± 0.08
角　膜 (n＝4)	0.07 ± 0.01	0.14 ± 0.02	0.06 ± 0.02

(HMPA＝1)

表 3. TR 0.5 s と TR 15 s における各ピーク（PME, Pi, ATP）の全眼球に対する水晶体および角膜の割合

	TR　0.5 sec			TR　15 sec		
	PME(%)	Pi(%)	ATP(%)	PME(%)	Pi(%)	ATP(%)
全 眼 球	100	100	100	100	100	100
水 晶 体	80.8	36.5	103.8	86.0	38.9	111.6
角　膜	2.9	5.3	7.0	2.2	6.9	8.7

PME は全眼球を 100%とすると水晶体で 80.8%であり，PME は眼球中の主として水晶体に高濃度に存在していることがわかる．また，Pi は水晶体では 36.5%であり，全眼球は水晶体の約 2.5 倍の値を示すのに対し，ATP は水晶体で 103.8%と，全眼球と水晶体ではほとんど差異を認めない．また，角膜についてはリン酸化合物含有量がかなり少なく，全眼球の測定では角膜の代謝はほとんど影響していないものと考えられる．

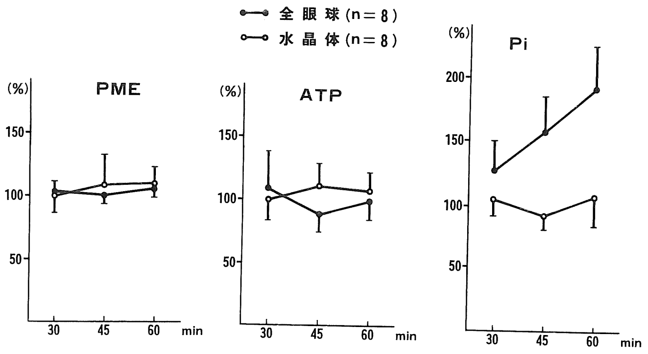


図 3. 全眼球および水晶体中の PME, Pi および ATP の経時的変化

次に，全眼球および水晶体より得られたスペクトルの経時変化を示す（図 3）．それぞれのピークを，測定開始直後から最初の 15 分までの値を 100% として示した．全眼球では Pi が徐々に増加するが，PME および ATP には変化が認められなかった．これに対し水晶体では，PME, Pi，ATP ともにほとんど変化を認められなかった．

考　　察

眼球組織はリン酸化合物含有量に乏しく，特に角膜では少ない[9]．従って，^{31}P-MRS を用いた従来の方法によって，角膜や水晶体などの眼内組織の測定を行うためには，リン酸化合物の信号強度を増加するため，一度に多数の眼球を過塩素酸で抽出し，数十時間に及ぶ測定が必要であった[4)~7)]．しかし，本法は生化学的手法と異なり，測定のための前処理や測定中の試料の破壊や侵襲がないといった特徴を有し，生理的条件下で連続的に代謝動態を測定できる．従って，試料に特別な処置を加えた測定では，本法の利点を十分に利用しているとはいえない．既報[8)]の水晶体に続き，今回，著者らが眼球内組織のなかでも，特にリン酸化合物含有量に乏しい角膜を *extra vivo* で，生標本のまま 1 時間以内で測定を行えたことは，今後，本法を用いた眼内組織の代謝研究の可能性を拡大するものと考えられ，さらに本研究がサーフェイスコイルを用いた *in vivo* での測定を行うための基礎データとしての意義も大きいものと考えている．

生体標本を用いての測定は，測定中の試料の劣化のため測定時間を極力短縮する必要があり，さらに S/N 比を向上させるために，限られた時間内に積算回数をできるだけ多くする必要がある．そこで著者らは，既報[8)]および今回，30°パルスで TR を 0.5 s と極力短くし，積算回数を 7200 回とした．しかし，各リン酸化合物の T_1 を考慮すると部分飽和条件下での測定とならざるを得ない．また，今回は既報[8)]とは異なり，全眼球，水晶体および角膜といった T_1 の異なる可能性のある組織の測定を行っており，これらの組織間でのスペクトルの単純な比較を困難とする．そこで今回は，水晶体での著者らの T_1 測定結果を考慮し，TR を 15 s（積算回数を 240 回）としたほぼ完全緩和に近い条件下での測定もあわせて行い，部分的飽和下での測定結果と比較検討した．その結果，表 1 および表 2 に示したように HMPA に対するそれぞれのピークの値は，TR 0.5 s に比較し TR 15 s で全て小さくなるのがわかる．これは，T_1 の長い HMPA のピーク（約 9 秒）が TR の延長にともなって増加し，各組織中のそれぞれのピークの値が TR 0.5 s の場合に比べて相対的に低下したものと考えられ

る．しかし，表3に示したように，それぞれのピークの全眼球，水晶体および角膜の相対値には差異が認められなかった．従ってリン酸化合物の絶対量を定量するためには完全緩和条件下での測定が必要であるが，その相対量の比較を行うのであれば，既報[8]および今回の研究に用いた TR 0.5 s，積算回数7200回の測定が，今後の研究に有用であると考えられる．

1スペクトル1時間の測定で，全眼球と水晶体のPMEおよびATPはともに近似した値を示した．さらにPMEおよびATPともに全眼球と水晶体で経時的に変化が認められなかった．これらの結果から，全眼球の測定で得られたPMEとATPの値は，ほとんどが水晶体由来であることが推測される．水晶体は房水によって栄養補給されているため血流途絶の影響も受けづらく，さらに嫌気性解糖が主体であるためATPの代謝速度は他の眼内組織に比べて非常に緩慢である[10]．従って，水晶体は他の眼内組織に比べ低酸素，低栄養で比較的安定な状態を保つと言える．これらより，水晶体ではATPおよびPiに経時的変化が認められなかったものと考えられる．

一方，眼内血流は，角膜，水晶体を除きほとんどが網膜中心動脈によって供給されている．従って，角膜，水晶体以外のほとんどの眼内組織は，血流によって直接栄養されているため，血流途絶後すみやかに既存のATPの脱リン酸化反応が進行し，ATPの消費に平行した組織の壊死性変化の進行が予想される．今回観察された全眼球の経時変化で，Piが徐々に上昇していくのはこれを裏づけるものと推測される．

また，脳神経系は他の臓器より虚血に対する抵抗性に乏しく[11]，脳神経系である眼内組織も数分の虚血によって不可逆性の変性壊死に至ることが推測される．眼内の血流途絶は，臨床的には網膜中心動脈閉塞症としてよく知られている[12]．しかし，この網膜中心動脈閉塞症は発症後数時間以内で血流の回復に成功すれば，眼機能はもとの状態に回復する．従って，眼内には血流途絶にともなったエネルギー（ATPなど）供給のための補助機構や血液のバイパス機構の存在が示唆される．今回著者らの行った摘出眼球による経時変化の観察は，眼球の血流停止モデルとして最も原始的ではあるが，完全な血流の停止が行えるため，眼内における血流停止時の代謝動態を調べるためには最も確実なモデルである．今回の結果では，全眼球の経時変化ではPiは徐々に増加するにもかかわらず，ATP量に変化が認められなかった．これはATPの消費と同量のATPが産生されていることを示しており，かつPiを用いないATPの産生経路が眼内に存在することが推測される．このような代謝動態を満足する経路としては，クレアチンリン酸からATPが産生される経路が考えられる．クレアチンリン酸は，通常，抽出標本によるNMRスペクトル上でわずかに観察されている[6),7),9),13)~15)]．今回の生標本を用いた測定では，スペクトル上にクレアチンリン酸によるピークは観察されなかった．しかし，クレアチンリン酸の産生および消費のturn overが速く，産生されても速やかに代謝されてしまうと考えると，摘出眼球におけるATPの補充に，クレアチンリン酸が関与している可能性も推測される．この血流途絶にともなうATPの代謝機構については，不明な点が多い．しかし，中心動脈閉塞症による網膜障害の機構やその治療法に密接に関連する問題であり，今後さらに検討したい．

まとめ

ラット眼球の角膜，水晶体および全眼球のリン酸化合物代謝を^{31}P-MRSを用いて比較し，さらに血流途絶時よりのリン酸化合物代謝の経時的変化を観察した．その結果，角膜，水晶体および全眼球より得られたスペクトルは，すべてリン酸モノエステル（PME），無機リン酸（Pi），ヂヌクレオチド，α，β，γの各ATPであった．PME，PiおよびATPの全眼球，水晶体および角膜の割合は，PMEが100：80.8：2.9，Piが

100：36.5：5.3，ATP が 100：103.8：7.0 であった．また，水晶体および全眼球の Pi のみが徐々に増加した．以上より，摘出眼球における PME および ATP はほとんどが水晶体由来であることを明らかにした．しかし，摘出眼球における ATP の補充経路については，今回明らかにすることはできなかった．

本論文の要旨は，第 14 回日本磁気共鳴医学大会（1989 年，東京）にて発表した．

本研究に際し，御協力を頂いた本学実験実習機器センター日下部光俊技官に深謝いたします．また，御校閲頂きました本学眼科学講座保坂明郎教授に深謝いたします．

文　献

1) D. F. Sobel, W. Kelly, B. O. Kjos, et al. : MR imaging of orbital and ocular diseases. AJNR, 6: 259-264, 1985.

3) 田中　修，大沢　忠，宮倉幹夫：眼窩の MRI（正常解剖と眼窩疾患の MRI）．画像診断，6 : 723-730, 1986.

3) 日下部隆則，福田信男：MRI の原理と応用．神経眼科，4 : 132-138, 1987.

4) J. V. Greiner, S. J. Kopp, T. Glonek, et al. : Phosphatic metabolites of the intact cornea by phosphorus-31 nuclear magnetic resonance. Invest Ophthalmol Vis Sci, 24 : 535-542, 1983.

5) J. V. Greiner, L. S. Braude, T. Glonek, et al. : Distribution of phosphatic metabolites in the porcine cornea using phosphorus-31 nuclear magnetic resonance. Exp Eye Res, 40 : 335-342, 1985.

6) K. Hayashi, H. M. Cheng, K. R. Kenyon, et al. : Metabolic changes in the cornea of vitamin A-deficient rats. Invest Ophtahlmol Vis Sci, 30 : 769-772, 1989.

9) K. Tsubota, H. M. Cheng, K. R. Kenyou, et al. : Hard contact lens-induced metabolic changes in rabbit corneas. Exe Eye Res, 49 : 769-775, 1989.

8) 吉田晃敏，五十嵐弘昌，田中邦雄：^{31}P-NMR spectroscopy を用いたガラクトース白内障の代謝研究．日眼会誌，93 : 722-726, 1989.

9) J. V. Greiner, S. J. Kopp, T. Glonek, et al. : Phosphorous nuclear magnetic resonance and ocular metabolism. Surv Ophthalmol, 30 : 189-202, 1985.

10) O. Hockwin, G. Blum, I. Korte, et al. : Studies on the citric acid cycle and its portion of glucose breakdown by calf and bovine lenses *in vitro*. Ophthalmol Res, 2 : 143-148, 1971.

11) 小野江為則：血行障害，新病理学総論第 13 版，武田勝男編．南山堂書店，東京，1985, P-103.

12) 松井瑞夫：網膜動脈閉塞症，蛍光眼底アトラス第 2 版，松井瑞夫編，南山堂書店，東京，1988, p. 59-63.

13) T. Glonek, S. J. Kopp, J. V. Greiner, et al. : Phosphorus-31 NMR of the intact crystalline lens: 1. The living lens spectrum. 2. The spectroscopic effects of deuterium oxide incubation. Phosporus and Sulfur, 18 : 329-332, 1983.

14) J. V. Greiner, J. Lass, T. Glonek, et al. : Interspecies analysis of colnear phosphate metabolites. Exp Eye Res, 49 : 523-529, 1989.

15) J. V. Greiner, S. J. Kopp, D. R. Sanders, et al. : Organophosphates of the crystalline lens : A nuclear magnatic resonance spectroscopic study. Invest Ophthalmol Vis Sci, 21 : 700-713, 1981.

Organophosphate Compounds in the Enucleated Eye Observed by ^{31}P-NMR Sepctroscopy

Hiromasa IGARASHI[1], Akitoshi YOSHIDA[1], Kunio TANAKA[2]

[1]*Department of Opthalmology, Asahikawa Medical College*
4-5 Nishikagura, Asahikawa, Hokkaido 078
[2]*Central Laboratory for Research and Education, Asahikawa Medical College*

We observed the metabolic changes of organophosphate compounds in enucleated rat eyes. The following results were obtained : In each spectrum of all measurements, the peaks of phosphomonoesters (PME), inorganic phosphate (Pi), dinucleotide and α-, β-, γ- adenosine triphosphate (ATP) were obtained.

The ratio of the whole eye, the lens or the cornea in each peak (PME, Pi, ATP) were 100 : 80.8 : 2.9 in PME, 100 : 36.5 : 5.3 in Pi and 100 : 103.8 : 7.0 in ATP, respectively. In the metabolic changes of PME, Pi and ATP, the only Pi in the whole eye increased significantly with the time lapse.

It was concluded that almost all of PME and ATP in the enucleated eye were originated from the lens.