

# 豚摘出保存肝の Proton Magnetic Resonance Spectroscopy ( $^1\text{H}$ -MRS) —保存温度による検討—

田村綾子<sup>1</sup>, 小山 勇<sup>2</sup>, 平敷淳子<sup>1</sup>

<sup>1</sup>埼玉医科大学放射線医学教室 <sup>2</sup>同 第一外科学教室

## はじめに

Magnetic resonance spectroscopy (MRS) に使用されている核種のうち、 $^1\text{H}$  は感受性が高く様々な分野で組織中の代謝物質の測定に応用されている。しかし肝臓は、脂肪の大きなピークのために、他のピークの同定が困難であることが多い。そのため肝  $^1\text{H}$ -MRS では、脂肪に着目した報告<sup>1)</sup>はあるが、その他については報告は少ない。

今回、豚摘出保存肝抽出物の $^1\text{H}$ -MRS を測定し、glycerophosphorylcholine (GPC) のピークを同定した。GPC は細胞膜の合成に関与しており、GPC のピークの変動が摘出肝の保存状態の指標となるのではないかと推測し、さらに摘出肝の保存温度を変え GPC のピークの経時変化を検討した。乳酸のピークの経時変化、病理組織像についても検討を加えた。

## 1. ピークの同定

### 対象と方法

対象は体重約 20kg の食用雑種豚 (メス) 3 頭で、2 日間絶食後の豚を、塩酸ケタミン 25mg/kg 筋注、ネンブタール 20-25mg/kg 静注にて麻酔し、気管挿管後人工呼吸下に実験を行なった。

開復後、脾静脈より門脈へカニューレを挿入留置し、 $0^\circ\text{C}$  乳酸リンゲル 500ml、 $0^\circ\text{C}$  Euro-Collins 液 1000ml を急速静注し、点滴下にカニューレ留置のまま門脈および脾静脈を結紮切除した。上下大静脈は単純切除した。摘出肝は Euro-Collins 液を満たしたポリエチレンの保存袋に入れ、 $0^\circ\text{C}$  にて保存した。摘出直後および 24 時間後に肝の一部を 5-8g 切除し、直ちに液体窒素にて冷却凍結した。凍結サンプルは $-84^\circ\text{C}$  にて保存した。凍結保存肝から 2.5g ずつ測り取り、液体窒素下に 0.5M 過塩素酸 12.5ml にて抽出した。抽出時、MRS 測定時の内部基準として、40mM/l の 3-(trimethylsilyl) propionic-2, 2, 3, 3- $d_4$  acid (TSP) 250 $\mu\text{l}$  を加えた。その混合物を  $4^\circ\text{C}$ 、10000rpm、15 分間遠心し、上清をとり potassium bicarbonate (炭酸水素カリウム) にて中和した。再び室温で、2000rpm、5 分間、遠心した。上清を、10g の Chelex-100 (Bio-rad) を水に分散したカラムに加え、水で溶離した。この溶離液を凍結乾燥し、得られたサンプルの全粉末を 0.5ml の  $\text{D}_2\text{O}$  で溶かし、 $^1\text{H}$  および  $^{31}\text{P}$ -MRS を測定した。 $^1\text{H}$ -MRS は、日本電子株式会社 (JEOL) JNM-EX400 (9.40T) にて測定した。観測周波数は 399.65MHz、加算回数 32 回、測定時間は約 3.69 分であった。5mm 径の NMR tube を用い、フリップ角 45

キーワード liver,  $^1\text{H}$ -MRS glycerophosphorylcholine, transplantation

度, TR 7 秒, 32K データポイントにてデータ収集を行なった。 $^{31}\text{P}$ -MRS は JNM-EX270 (6.35 T) を用いた。観測周波数は 109MHz, 加算回数 256 回, 測定時間は約 10.26 分。フリップ角 45 度, TR 2 秒, 16K データポイントとした。 $^{31}\text{P}$ -MRS 測定時, 外部基準として phosphocreatine (Pcr) を加えた。測定時, 各サンプルの pH は, 8.2-8.8 とアルカリ性を示していた。MRS で得られた各スペクトルは面積計算にて比較した。ピークの同定のために, 同サンプルの high performance liquid chromatogram (HPLC) を測定した。測定装置は CLASS-LC10A (島津), 検出器は示差屈折計 (Waters R401) である。各サンプル  $10\mu\text{l}$  を  $40^\circ\text{C}$  の Partisil 10 SCX (Whatman, Clifton, New Jersey) カラム ( $4.6\text{mm}\times 25\text{cm}$ ) に注入した。溶離液は  $5\text{mM NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$  (pH 2.4) を用いた。分析条件は, chart speed  $1\text{cm}/\text{min}$ , flow rate  $1.0\text{ml}/\text{min}$  とした。

#### 結果および考察

摘出直後および 24 時間後の  $^1\text{H}$ -MRS を示す (Fig.1)。3.2-3.3ppm の間に 2-4 個のピークを認

め, 3.23ppm に認められたピークは, 24 時間保存後平均 46% 減少した (ピーク X)。HPLC にてサンプルを測定すると, 保持時間 6.60 分の位置に, 24 時間保存後に減少するピークが得られた (Fig.2)。

3.2-3.3ppm の間のピークは choline group と同定されており<sup>2)</sup>, 主に glycerophosphorylcholine (GPC), phosphorylcholine (PC), carnitine (CA), choline (CHO) によるピークと考えられている<sup>3)</sup> これらの溶液を HPLC にて測定すると, GPC 6.60 分, PC 6.65 分, CA 17.05 分, CHO 3.52 分にピークを認めた。抽出したサンプルに GPC, PC をそれぞれ加えて HPLC を測定すると, いずれの場合も 6.60 分のピークの上昇が認められ, 保存によって減少するピークは, 両者のどちらかであると考えられた。

そこで GPC と PC との同定のために, 抽出したサンプルの  $^{31}\text{P}$ -MRS を測定した (Fig.3)。24 時間保存後では摘出直後に比べ, GPC は減少し, PC は軽度上昇した。

以上より, 保存によって減少するピークは GPC

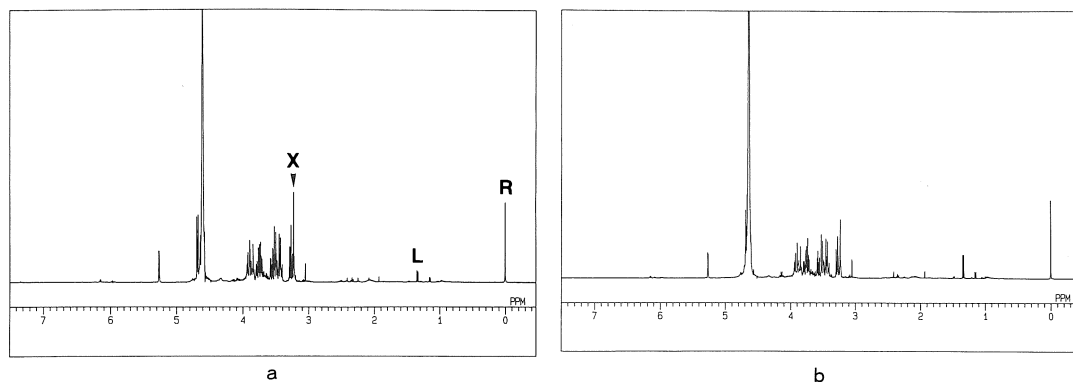


Fig.1.  $^1\text{H}$ -MRS of perchloric acid (PCA) extracted pig liver : (a)  $^1\text{H}$  spectrum of excised pig liver. (b)  $^1\text{H}$  spectrum of 24-hours-preserved pig liver. Peak X at 3.23ppm diminished after preservation for 24 hours in cooled Euro-Collins solution. Peak R represents 3-(trimethylsilyl) propionic-2,2,3,3- $\text{d}_4$  acid (TSP) as reference. Peak L represents lactate.

1995年5月16日受理 1995年8月21日改訂

別刷請求先 〒350-04 埼玉県入間郡毛呂山町毛呂本郷38 埼玉医科大学放射線医学教室 田村綾子

と考えられ、確認のために抽出したサンプルに GPC(商品名 glycerophosphorylcholine phosphodiesterase, SIGMA, MW 257.2) を 0.57 $\mu$ M 加えて<sup>1</sup>H-MRS を測定した。その結果 3.23ppm

のピークが上昇し (Fig.4), ピーク X を glycerophosphorylcholine と同定した。ただし、<sup>1</sup>H-MRS では GPC と PC のピークは近接するため、ピーク X が GPC のみのものか疑問が残る。実際

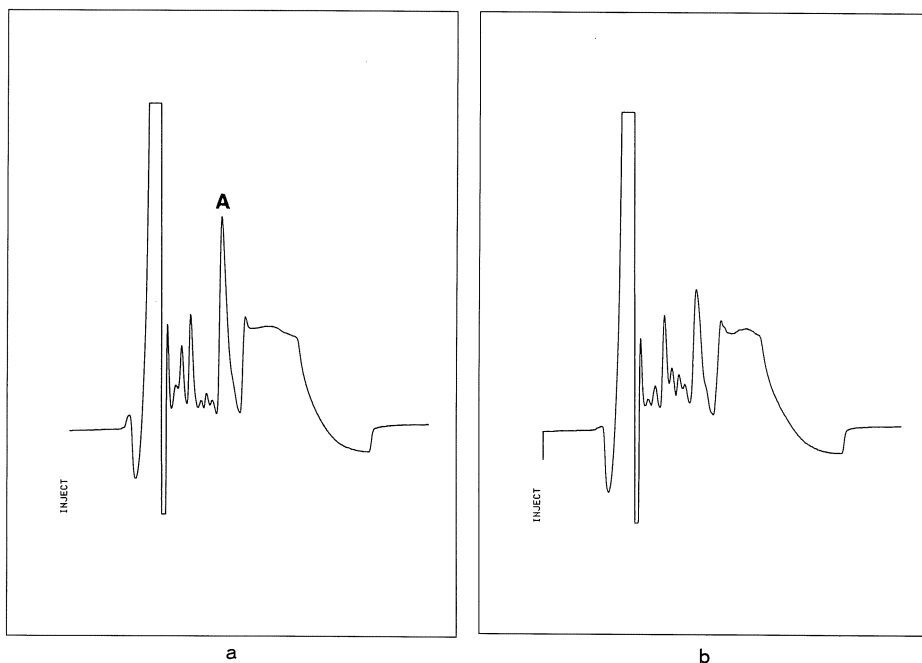


Fig.2. High performance liquid chromatogram (HPLC) of PCA extracted pig liver : (a) HPLC of excised pig liver. (b) HPLC of 24-hours-preserved pig liver. Peak A is at 6.60 minutes of retention time. The peak decreased after preservation for 24 hours.

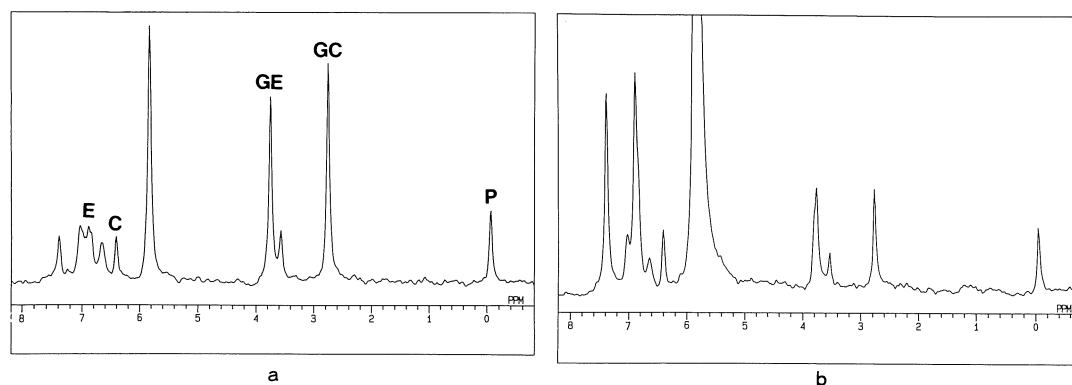


Fig.3. <sup>31</sup>P MRS of PCA extracted pig liver, PME and PDE region. : (a) <sup>31</sup>P spectrum of excised pig liver. (b) <sup>31</sup>P spectrum of 24-hours-preserved pig liver. Peaks represent : E=Phosphorylethanolamine, C=Phosphorylcholine, GE=Glycerophosphorylethanolamine, GC=Glycerophosphorylcholine, P=Phophocreatine as reference. Concerning about the peaks of choline group, peak GC decreased after preservation for 24 hours. Peak C slightly increased after preservation.

に、GPCとPCそれぞれの溶液の<sup>1</sup>H-MRSを測定するとGPC3.23ppm、PC3.22ppmにピークを認め、混合液の<sup>1</sup>H-MRSでは両者は分離して認められた (Fig.5)。一方摘出保存肝から得られた抽出液サンプルの<sup>1</sup>H-MRSでは、3.23ppmと3.22ppmとの2つのピークが分離して認められることは少ない。しかし、頻度は少ないながらも両者のピークを分離できることがあるということは、多くの分離不可能な場合においては、GPCとPCのピークを同時に見ていると思われる。これは測定時のpHが関与しているものと思われるが、前出のGPCとPCとの標準物質混合溶液のpHは未測定であり、pHによるピークの分離の可否については今後の課題と考えている。さらに人正常肝では、GPCとPCの存在比は約15:

1 (2.46:0.17)の割合であり<sup>2)</sup>、PCの絶対量の低さからも、PCのピークを分離しがたい要因となっていると考えられる。しかし、GPCに対しPCはごく少量であるので、両者のピークを同時にみているとしても、3.23ppmのピークにPCは大きな影響は与えないと推測される。このため、3.23ppmのピークをGPCとして以下の実験を行った。

## 2. 保存温度によるピークの経時変化の検討

### 対象と方法

対象は体重約20kgの食用雑種豚(メス)10頭で、麻酔、肝摘出はピーク同定時と同じ方法で行なった。保存温度によって摘出肝を2グループに分け、グループA(n=5)は灌流液、保存

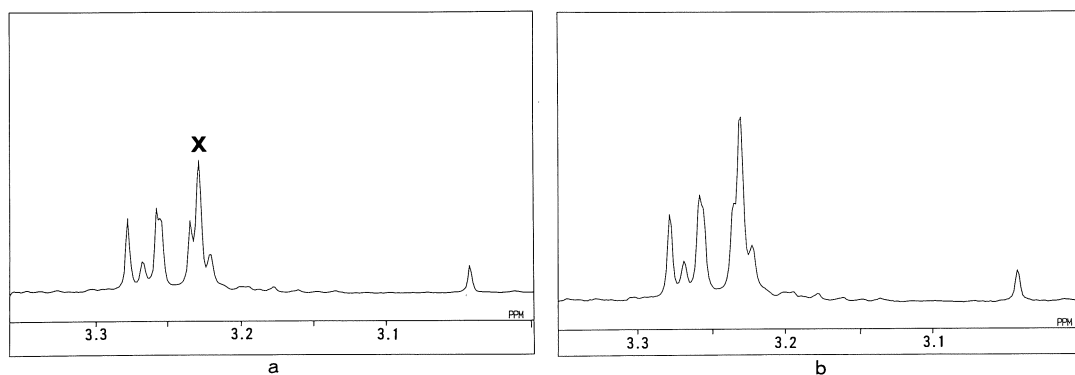


Fig.4. <sup>1</sup>H MRS of PCA extracted pig liver, choline group region : (a) <sup>1</sup>H spectrum of preserved pig liver. (b) <sup>1</sup>H spectrum of preserved pig liver added glycerophosphorylcholine (GPC, 0.00072μM). X is the same as the peak X in Fig.1. Peak X increased after adding GPC.

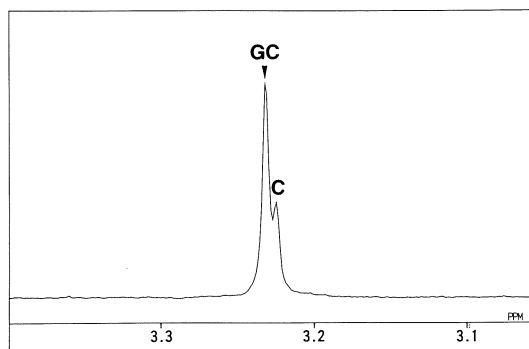


Fig.5. <sup>1</sup>H MRS of mixture of GPC and phosphorylcholine (PC) : Two peaks are identified very nearly on <sup>1</sup>H spectrum. They can be defined as another peak when the mixture is composed only by pure GPC and pure PC. Peaks represent : GC=GPC, C=PC.



液共に0°C, グループ B (n=5) は共に 36°C とした. 肝 5-8g を経時的 (Fig.6) に切除し, 直ちに液体窒素にて冷却凍結, それぞれの凍結肝を-84°C に保存した. 各凍結保存肝から 2.5g を測り取り, PCA によると抽出から<sup>1</sup>H-MRS 測定までピーク同定時と同様に行なった.

全てのサンプルについて 3.23ppm のピーク (GPC) の積分値 (面積) を計測し, 各々の値の TSP に対する面積比 (積分比) を求めた. それぞれのグループで, 各切除時間毎に, 少なくとも 3 つ以上の値の平均値を計算した. 摘出時の面積比の平均値を 1 とし, 経時的な変化を時間軸にプロットした. 経時変化を 0 度, 36 度で比較した.

1.33ppm の乳酸についても同様に面積比を求め, 3 つ以上の値の平均値をそのまま時間軸にプロットした. 2 つの保存温度間で比較した.

肝サンプル切除時に, Fig.6 に矢頭で示す時点で Turner needle を用い針生検を行なった. 生検組織はホルマリン固定し, 光学顕微鏡にて組織上の変化を検討した.

## 結 果

グループ A, B ともに GPC の TSP に対する

面積比は, 経時的に減少した (Fig.7). どちらのグループも, 肝摘出後 1 時間では摘出時の約 75% まで減少し, 両者の差は見られなかった. グループ A では, その後 7 時間までわずかに減少しながらもほぼ平衡を保ち, 7 時間を越えると明瞭な減少をはじめ, 12 時間以降は値の変動も大きく再び平衡状態になった. 再平衡時, 摘出時の約 53.6% であった. グループ B では, 1.5 時間まではゆるやかに減少したが, 1.5 時間から 2 時間にかけて大きく減少し, 2 時間で摘出時の 55.9% であった. その後も減少を続け, 4 時間で摘出時の約 50.6% まで減少し平衡状態となった. 摘出時と比較した平衡時の GPC の面積比は 2 group ほぼ同等であった. またグループ B では, 7 時間で腐敗臭が感じられ, 12 時間では完全腐敗であった.

乳酸の TSP に対する面積比はグループ B で保存時間とともに有意に増加した (Fig.8). 摘出時と比較して摘出後 2 時間までに約 5.3 倍, 2 時間から 7 時間までの 5 時間で約 8.8 倍, 12 時間後の値は 10.7 倍となった. これら 3 つの時間における乳酸の増加率は初めの 2 時間で著明であった. 一方, グループ A では, 摘出時から 30 分で 0.26 から 0.33 とわずかに増加したが, その後 2 時間まではほとんど変化はなかった. 2 時間後か

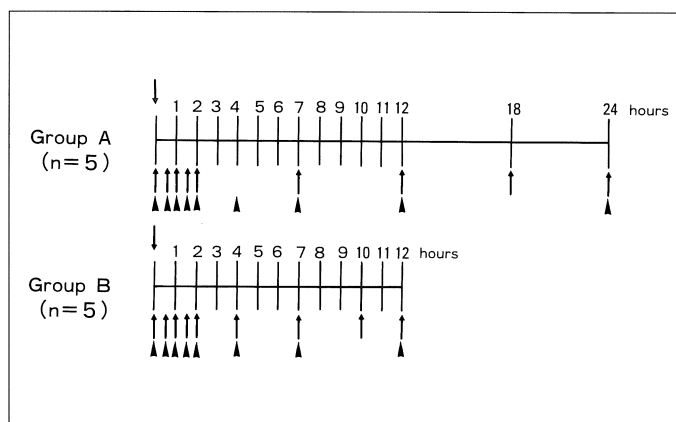


Fig.6. Protocol for <sup>1</sup>H-MRS of preserved pig liver. ↓ : excised and preserved the pig liver. ↑ : excised 5-8 g of the pig liver. ▲ : needle biopsy.

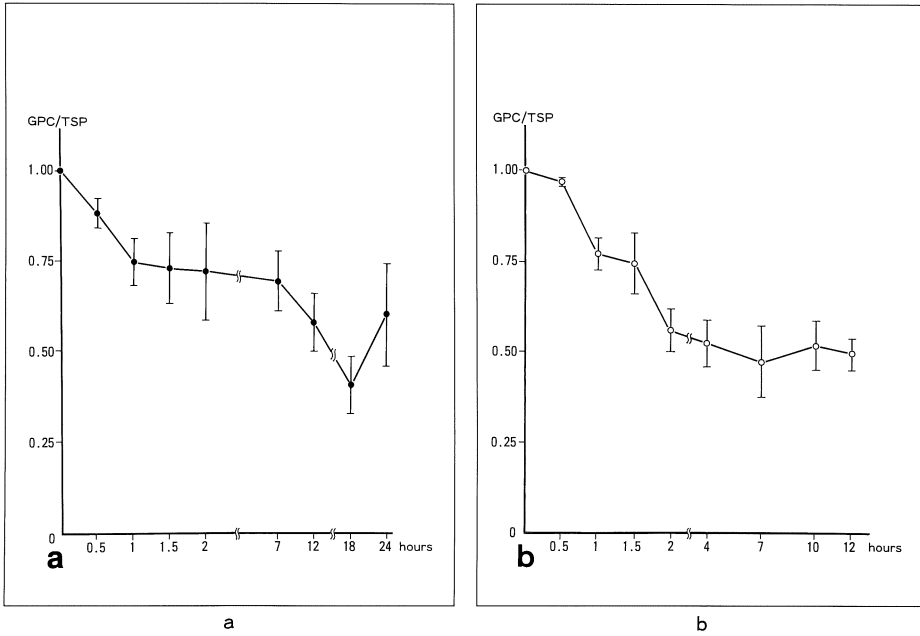


Fig.7. The change of the ratio of GPC to TSP peak. (a) preserved in cooled Euro-Collins solution (0°C, group A). (b) preserved in warmed Euro-Collins solution (36°C, group B). GPC decreased rapidly in group B. GPC of both groups finally reached equilibrium at almost the same levels.

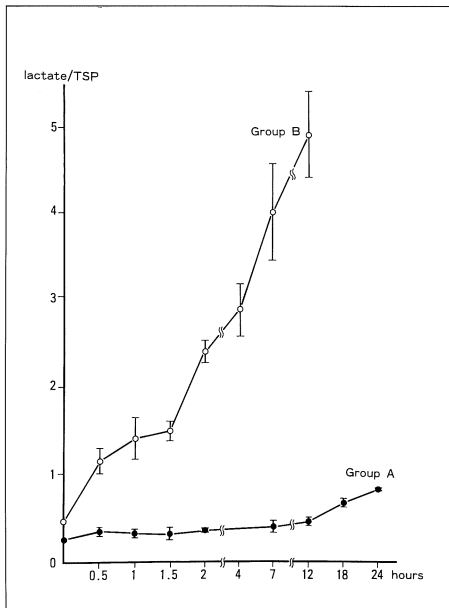


Fig.8. The change of the ratio of lactate to TSP peak. (—●—) preserved in cooled Euro-Collins solution (group A). (—○—) preserved in warmed Euro-Collins solution (group B). Lactate increased rapidly in group B. It increased slightly after 24 hours preservation in group A.

ら徐々に増加を始め、2時間から12時間までの10時間で約1.8倍となり、24時間後で3.3倍であった。

生検組織は、H.E.染色し、光学顕微鏡にて観察した。グループA、グループBいずれでも、類洞内皮細胞の核の濃縮と細胞質の減少、類洞内皮細胞の肝細胞からの剝離、肝細胞細胞質の水腫状変性、肝細胞内の空泡形成などが種々の頻度で認められた。摘出後1時間まではグループA、グループBに組織上大きな違いはなかった。グループBでは1.5時間および2時間で、肝細胞索間が疎となり、断裂も認められた。肝細胞内に中等度の空泡が目立ち、肝細胞と類洞の解離がみられた (Fig.9a)。4時間後の組織では肝細胞索は消失し、肝細胞壊死による cell debris が出現し (Fig.9b)、7時間では一部融解を伴っていた。

グループA 2時間後の組織では、肝細胞内に小さな空泡はあるものの、肝細胞索は連続し、肝細胞と類洞の解離は認められなかった (Fig.10a)。4時間、7時間でも肝細胞質の水腫状変性、空泡化はやや進行したが、大きな変化はなかった (Fig.10b)。12時間後になると肝細胞内に空泡が目立ったが、12時間、24時間いずれでも肝細胞索は連続し、断裂は見られなかった。

## 考 察

臓器移植では、臓器の冷却保存が一般的である。冷却保存によって、酵素の働き、および代謝速度を遅らせることができ、より長時間の保存が可能となる。保存温度が10°C下がるごとに酵素の働きは2分の1となり、温度を37°Cから0°Cに下げることによって、代謝は12から13分の1になるといわれている<sup>4)</sup>。

今回の豚摘出肝抽出液の<sup>1</sup>H-MRSでは、グループA、グループBいずれにおいても保存によって3.23ppmの glycerophosphorylcholine (GPC) のピークは減少した。測定した範囲内では、2グループとも肝摘出時の約50%の値で平

衡となったが、グループAでは摘出後1時間から7時間まで約70%と高いレベルで平衡状態を保ち、7時間を過ぎてから再び減少を始めたのに対し、グループBでは摘出後1時間から2時間の間でほぼ平衡に近い55.9%まで減少した。今回使用したEuro-Collins液では、摘出肝の保存は8-10時間可能だと報告されており<sup>5)</sup>、GPCの減少と摘出肝の同液の保存可能時間は関連があると考えられる。

保存中の嫌気性糖代謝による乳酸の増加をみると、グループBでは摘出後2時間までの増加が顕著で摘出時の約6倍に増加したのに対し、グループAでは2時間ではわずかな上昇が見られたのみであった。2時間以降、グループBでは引き続き著明に増加したが、グループAでは12時間を越えて増加速度がやや速くなったものの、24時間保存後も摘出時の3.3倍にとどまった。これは、低温保存で組織の代謝が遅くなっていることを裏付ける。

組織像では、摘出後1時間まではグループA、Bに明かな差はなかった。その後グループBでは、2時間で肝細胞索の断裂、肝細胞内の空泡化、肝細胞と類洞の解離等がおこり、4時間で肝組織の正常の構築は失われた。一方グループAは、2時間では肝細胞内に小さな空洞が認められる程度であり、グループB 2時間と類似した所見が摘出後12時間になって認められた。12時間後でも肝細胞索の連続性は保たれていた。1時間から2時間までの両者の変化の差が著明であった。肝保存時、低温保存では類洞内皮細胞に、高温保存では肝細胞に障害がおこるといわれている<sup>6),7)</sup>が、やや程度の差はあるもののグループA、Bともに両細胞に変化が認められ、保存温度による障害を受ける細胞の違いは今回の組織所見からは得られなかった。

乳酸の増加および組織所見より、高温保存(グループB)では保存初期の1時間から2時間間に肝組織変化が進行し、4時間を超えるとほぼ肝壊死の状態であると思われる。高温保存(グループB)のGPCの減少は、摘出後1.5時間か

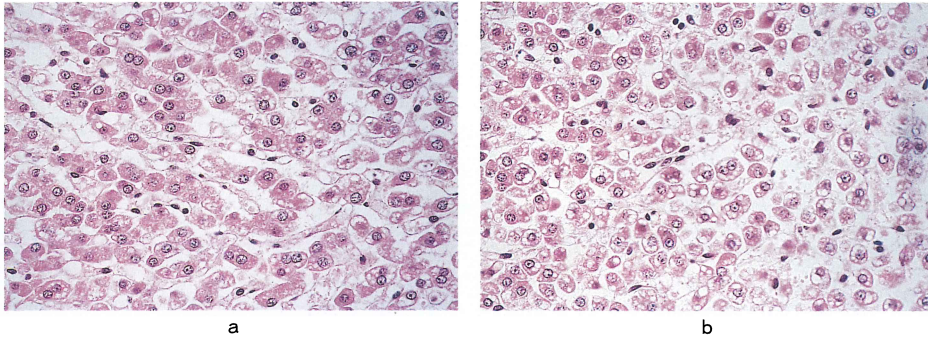


Fig.9. Light microscopic appearance of pig liver preserved in warmed (36°C) Euro-Collins solution (group B) : (a) Preserved for 2 hours. Vacuoles are noted within hepatocytes. Hepatic cell lining is partly disrupted. Dissociation between hepatocytes and sinusoids are demonstrated. (b) Preserved for 4 hours. Normal hepatic cell linings have disappeared and the architecture of the lobule is markedly distorted.

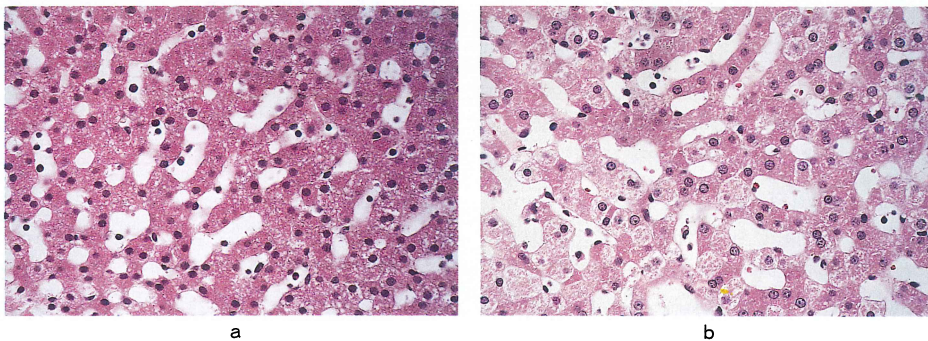


Fig.10. Light microscopic appearance of pig liver preserved in cooled (0°C) Euro-Collins solution (group A) : (a) Preserved for 2 hours. Small vacuoles are noted. No dissociation between hepatocytes and sinusoids is detected. (b) Preserved for 7 hours. Slight swelling of hepatocytes is noted. Hepatic cell lining is continuously demonstrated.

ら2時間までが著明で4時間でほぼ平衡に達した。一方、低温保存(グループA)では、組織上の変化が見られ、乳酸の増加速度が速まる12時間を超えてGPCはほぼ平衡となった。12時間は、Euro-Collins液の保存可能時間を超えており、低温保存でも肝組織変化は進行していると思われる。以上より、GPCの減少は組織変化を反映していると考えられる。

肝保存時の障害として、ATP産生低下に続く $\text{Na}^+\text{K}^+\text{-ATPase}$ の活性低下による細胞膜障害

が報告されている<sup>4),5),8)</sup>。GPCは細胞膜の合成に関与しており<sup>2)</sup>、肝組織変化の進行と関連して減少していることから、その減少は細胞膜の障害を反映しているのではないかと推測した。

肝移植において、移植後のprimary nonfunctionは現在でも大きな問題の1つであり<sup>9)</sup>、その発生をできるだけ早期に発見することが望まれている。肝保存時、類洞内皮細胞の細胞膜障害のため類洞の血流障害が生じ、これが血流再開時、微小循環障害を引き起こしprimary non-

functionの重要な要因となると考えられている<sup>10),11)</sup>。GPCが細胞膜の障害を反映するとすれば、<sup>1</sup>H-MRSにて、血流再開前の保存の時点でprimary nonfunctionの発生の予想が可能となると現時点では結論できる。

今回の実験では、グループAにおいて、GPCが減少して平衡になったと思われる12時間以降も乳酸の増加や組織上の変化はグループBと比較して少なく、グループAは保存12時間で確かに平衡に達したのか疑問が残る。また、他の生化学的なデータがないことから、今回の実験結果のみからは実際にGPCの減少と肝組織変化の程度が直接結びつくとも断定し難い。しかし、高感度の<sup>1</sup>Hを用いることができれば、より少量のサンプルでより短時間での評価が可能となり、その点で、今回の手技は保存肝の評価に有用と思われる。今回は9.4Tという高磁場の装置を用いての結果であるが、上記の問題点を順次解決し、現在主に用いられている1.5Tの臨床装置への発展が期待される。

## 結 語

1. 豚摘出保存肝抽出液の<sup>1</sup>H-MRSにて認められる経時的なGPCの減少は、乳酸の増加、組織学的変化と関連し、肝組織変化を反映していると考えられた。
2. <sup>1</sup>H-MRSは保存肝の評価への応用が可能であると思われる。

稿を終えるにあたり終始御指導いただきました埼玉医科大学化学教室矢野一行教授、第2病理学教室高浜素秀教授、清水禎彦講師に心より深く感謝いたします。

## 文 献

- 1) 丁子 卓：<sup>1</sup>H-MRSによる肝実質内および肝腫瘍内脂質の検出、定量。日本医学会放射線学会誌，53(12)：1408-1414, 1993.
- 2) Jimmy D. Bell, I. Jane Cox, Janet Sargetoni, et al. : A <sup>31</sup>P and <sup>1</sup>H-NMR investigation *in vitro* of normal and abnormal human liver. *Biochim. Biophys. Acta*, 1225 : 71-77, 1993.
- 3) Soher BJ, Chatham JC, Barker PB : *In vivo* proton NMR spectroscopy of the human liver. *Proceedings of the society of magnetic resonance in medicine*, volume 1 : 87, 1993.
- 4) Claivien PA, Harvey PRC, Strasberg SM : Preservation and reperfusion injuries in liver allografts. *Transplantation*, vol.53 : 957-978, 1992.
- 5) Jamieson NV, Sundberg R, Lindell S, et al. : Preservation of the canine liver for 24-48 hours using simple cold storage with UW solution. *Transplantation*, 46 : 517-522, 1988.
- 6) Mckeown CMB, Edwards V, M.J. Phillips, et al.: Sinusoidal lining cell damage : the critical injury in cold presevation of liver allografts in the rat. *Transplantation*, vol. 46 : 178-191, 1988.
- 7) Momii S, Koga A : Time-related morphological changes in cold-stored rat livers. *Transplantation*, vol. 50 : 745-750, 1990.
- 8) 鈴木伸一, 近藤治郎, 井元清隆, 他：ラット分離肝細胞保存—Eurocollins液とUniversity of Wisconsin液の比較検討—。移植, vol. 28 No.4 : 419-428, 1993.
- 9) 大塚健二：温阻血肝のViability判定における肝組織血流量測定の意義とLipo-Prostaglandin E<sub>1</sub>の効果。移植, Vol.28 No.6 : 687-692, 1993.
- 10) Rauen U, Hansen M, Lauchart W, et al. : Energy-dependent injury to cultured sinusoidal endothelial cells of the rat liver in UW solution. *Transplantation*, Vol.55 No.3 : 469-473, 1993.
- 11) Caldwell KJC, Currin RT, Tanaka Y, et al. : Reperfusion injury to endothelial cells following cold ischemic storage of rat liver. *Hepatology*, 10 : 292-299, 1989.

## Proton Magnetic Resonance Spectroscopy of Excised Pig Liver —Evaluation of preservation temperature—

Ayako TAMURA<sup>1</sup>, Isamu KOYAMA<sup>2</sup>, Atsuko HESHIKI<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Department of Radiology, <sup>2</sup>Department of First Surgery, Saitama Medical School  
38 Morohongo, Moroyama machi, Iruma gun, Saitama 350-04*

This study was performed for the investigation of the chronological glycerophosphorylcholine (GPC) changes in preserved pig liver using proton magnetic resonance spectroscopy (<sup>1</sup>H-MRS). The perchloric acid (PCA) extracted pig liver was evaluated by <sup>1</sup>H-MRS using 9.4T superconducting unit. Pig liver was excised and preserved in the Euro-Collins solution at cooled (0°C, group A) and warmed (36°C, group B) states. GPC changes were evaluated in each states.

GPC in group B markedly decreased within 4 hours after removal. Otherwise GPC in group A kept equilibrium in high level until 7 hours. Finally both states reached almost the same levels.

The lactate rapidly increased in group B. Histopathological changes were also evident and significant in group B.

GPC changes may reflect the histopathological changes of preserved pig liver. <sup>1</sup>H-MRS to evaluate viability of preserved pig liver is felt to be possible.