

原著

In vivo ^{31}P NMR スペクト ロスコピ^ーによる脳代謝傷 害の検討

In vivo ^{31}P NMR Spectroscopic
Studies on Brain Metabolic De-
terioration

橋本隆裕 (千葉県がんセンター脳神経外科)

キーワード

brain injury, brain metabolism, nuclear magnetic resonance (NMR), *in vivo* ^{31}P NMR spectroscopy

要旨

A custom-built ^{31}P NMR spectrometer with 5.6 Tesla, horizontal magnet was used to determine the changes of *in vivo* phosphorus metabolism of the rat brain in various pathological conditions. ^{31}P NMR spectroscopy readily demonstrated cerebral metabolic deterioration and/or recovery *in vivo*, in terms of the changes in relative concentrations of phosphate metabolites such as adenosine triphosphate (ATP), phosphocreatine (PCr) and inorganic phosphate (Pi), and the alterations of intracellular pH (pH_i) calculated from the chemical shift of the Pi peak relative to the PCr peak, following different kinds of brain insults.

25-minute hypoxia caused the decrease in PCr and the increase in Pi with ATP's unchanged. After 15-minute global ischemia, PCr and ATP peaks completely disappeared, which recovered after the restoration of cerebral blood flow. ^{31}P NMR spectroscopy clearly showed metabolic deterioration associated with focal cerebral infarction in the rat with middle cerebral artery occluded 24 hours previously. Severe impact trauma provoked

progressive deterioration of cerebral phosphorus metabolism. This alteration was notified even at the first five-minute spectrum.

The author has demonstrated that *in vivo* ^{31}P NMR spectroscopic measurement would be useful and fascinating to evaluate *in vivo* phosphorus metabolism at various pathological states repeatedly and noninvasively.

1 はじめに

均一度の高い磁場の得られる超伝導マグネットの開発およびサーフィスコイルの導入といった近年の急速な Nuclear magnetic resonance (NMR) 技術の進歩により、 ^{31}P NMR スペクトロスコピーを用いて、従来の方法では困難であった生体内の種々の器官における高エネルギーリン酸代謝の変化を *in vivo* でしかも同一個体において繰り返し測定する事が可能である (1, 2, 3).

著者は *in vivo* ^{31}P NMR スペクトロスコピー (5・6 テストラの水平型マグネット) を用い脳虚血および低酸素など種々の脳傷害時における脳リン酸代謝の変化についての検討を行う機会を得たので、その結果および有用性について述べる。

2 方 法

1 ^{31}P NMR スペクトロスコピー

NMR スペクトロメーターは、特注の径およそ 9 cm の超伝導 5・6 テストラ、水平型マグネット (Nalorac Cryogenics, USA) より成り、NMR 信号の送受信には 2 回巻の直径約 1.4 cm のサーフィスコイルを用いた。サーフィスコイルをラット頭部に当てがいしっかりと固定後、 ^{31}P の共鳴周

受 付 1985 年 9 月 27 日

最終稿受付 1985 年 10 月 30 日

別刷請求先 (〒280) 千葉市亥鼻 1-8-1
千葉大学医学部脳神経外科

橋 本 隆 裕

波数 95.9 MHz のラジオ波をパルス時にあてた。37-38°C に保てるような温水回路付のプローブに動物を乗せてマグネット内に置き、最良のプロトトンスペクトルが得られるようにシム調整を行う事により、より高い磁場の均一度を得た。スペクトルは繰り返し時間約 1 秒で、300 回の free induction decay の加算 (約 5 分間) を行い、フーリエ変換して得た。データシステムは、Nicolet 1180 コンピューターを用いた。主に頭蓋骨のリンに由来する幅の広いシグナルは selective saturation 法 (4) を用いて除いた。得られたスペクトルはコンピューター処理 (NTCCAP プログラム, General Electric NMR, USA) を行って近似スペクトルを作成し、それぞれのピークのシグナル領域面積および化学シフト (σ , ppm) を求めた。脳リン酸代謝状態の指標として phosphocreatine (PCr) と inorganic phosphate (Pi) のシグナル領域面積の比である PCr/Pi (5, 6), および Pi の PCr ($\sigma = 0$ ppm) に対する化学シフトより次の式を用い、細胞内 pH (pHi) を算出した。

$$\text{pHi} = 6.803 + \log[(\sigma - 3.22)/(5.73 - \sigma)] \quad (3)$$

コントロールスペクトルが得られた後、以下の実験を行った。

2 実験動物の準備

Sprague-Dawley 雄性ラット、200-400 g を用いた。動物を isoflurane (Forane) にて麻酔し、16 ゲージの静脈留置カテーテルを用いて挿管後、30% 酸素下に麻酔器に接続し、持続調節呼吸した。また平均動脈圧を大腿動脈に置いたカニューレより

持続的に観察した。必要に応じて動脈血液ガス分圧測定を行った。

A. 低酸素症 (N=8)

約30%の吸入酸素分圧下でコントロールスペクトルを得た後、吸入酸素濃度を下げ、動脈酸素分圧 (PaO_2) を30 mmHg で25分間維持し、その後 PaO_2 を100 mmHg 以上に戻して、低酸素時および回復期のスペクトルの変化を調べた。別のグループでは、同様な方法で、 PaO_2 40 mmHg で15分間の低酸素状態におきスペクトルの変化を測定した。

B. 全脳虚血 (N=4)

Pulsinelli et al. の方法(7)に準じて、実験の24時間前に予め両側椎骨動脈を顕微鏡下に電気凝固したラットで、両側頸動脈を剥離し、その周囲に細いナイロンの糸を置きコントロールスペクトルを得た。マグネットの外より糸を牽引する事により両側頸動脈を縛り、15分後動物をマグネット内に置いたまま遠隔操作にて血流を再開通させた。その間スペクトルを持続的に測定した。

C. 両側大脳半球虚血 (N=8)

両側頸動脈を周囲組織より剥離し、その周囲にシリコンで出来た非常に細いチューブを置き、マグネットの外より頸動脈の閉塞および再開通が自由に行えるようにした。また両側大腿動脈にカニュレーションを行い、一側は持続的動脈圧測定用とし、他側は頸動脈閉塞開始と同時に鴻血して平均動脈血圧を50 mmHg に保ち、60分後に両側頸動脈の血流を再開通させると共に正常血圧に戻すために用いた。同様の方法で、別の群では正常血圧を保ったまま60分間の両側頸動脈の閉塞のみを行い、全身血圧低下の、脳血流低下時に於ける脳代謝障害への関与について検討した。

D. 局所脳虚血 (N=4)

左側頭下アプローチにて、顕微鏡下で左中大脳動脈が嗅神経を横切る中枢側で電気凝固した(7)。24時間後、傷害側および健常側半球でそれぞれスペクトルを測定した。

E. 外傷 (N=4)

ラットの右側頭部に直径およそ4mmの穿頭を硬膜を傷つけないように行い、生理食塩水で満たしたインパクトチューブをデンタルセメントで固定し、マグネットの外に置いた fluid percussion 装置につないだ。コントロールスペクトルを得た後、7-8気圧の外傷を与え、以後60分に至るまで持続的にスペクトルを測定した。

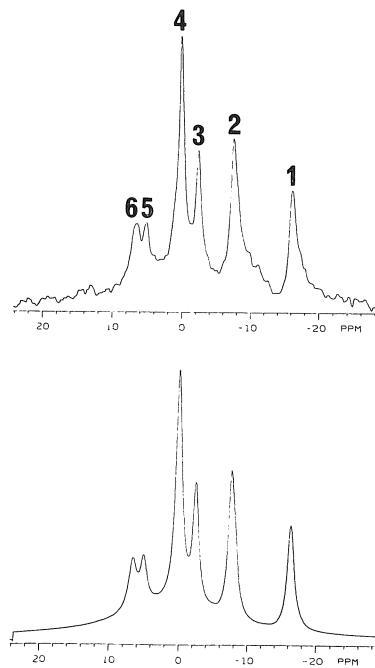


図 1 Control ^{31}P NMR spectrum of the anesthetized rat brain at 5.6 Tesla (upper) and computer fitted spectrum (lower), providing the signal intensity (area) and the chemical shift of each resonant peak. Each numerical number has been assigned as follows: 1; β -ATP, 2; α -ATP together with α -ADP, NAD, and NADH, 3; γ -ATP and β -ADP, 4; phosphocreatine, 5; inorganic phosphate, 6; sugar phosphate and phosphomonoester.

3 結 果

正常ラット脳のコントロールスペクトルを図1(上図)に示す。スペクトル中央に高いphosphocreatine (PCr) のピークが、その右側にadenosine triphosphate (α -, β -, γ -ATP) の3つのピークが、またそれらに比べ高さの低いinorganic phosphate (Pi) およびsugar phosphate (SP) のピークがそれぞれ明瞭に認められる。また得られたスペクトルをコンピューター処理する事により得られた近

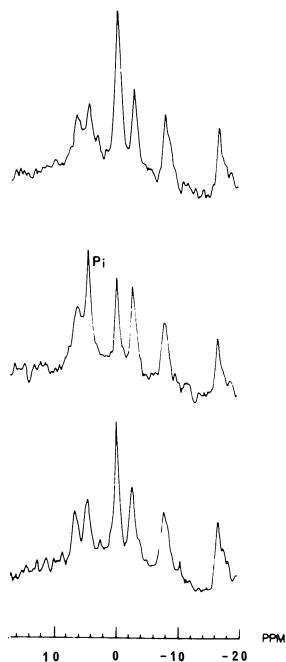


图 2 ^{31}P NMR spectrum of control(lower) and at the end of 25-minute hypoxia as low as 30 mmHg of PaO_2 (middle), showing the decrease in the PCr peak and the increase in the Pi peak with the ATP's peaks unchanged. 30 minutes after the recovery from hypoxia, the spectrum (upper) is identical as the control.

似スペクトルを図1(下図)に示す。コントロールスペクトルより得られたPCr/PiおよびpHiの平均値はそれぞれ、2.5(N=28)および7.29(N=28)であった。

A. 低酸素(図2)

PaO_2 30 mmHg で 25 分後のスペクトル(中図)は、 PCr の低下および Pi の増加が見られたが、明らかな ATP の変化はみられなかった。回復後

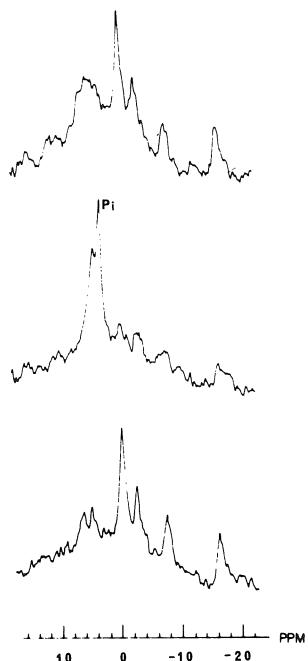


図 3 ^{31}P NMR spectral changes following global ischemia in the 4-vessel occlusion rat model. a, control spectrum (lower). b, 15 minutes after global ischemia, the Pi peak showed the marked increase in its peak height and severe brain acidity compatible with the decrease in the Pi chemical shift relative to the PCr peak(middle). c, 30 minutes after the restoration of bilateral carotid artery flow, the PCr and ATP's peaks appeared again, comparable with control spectrum, though the Pi peak slightly shifted (upper).

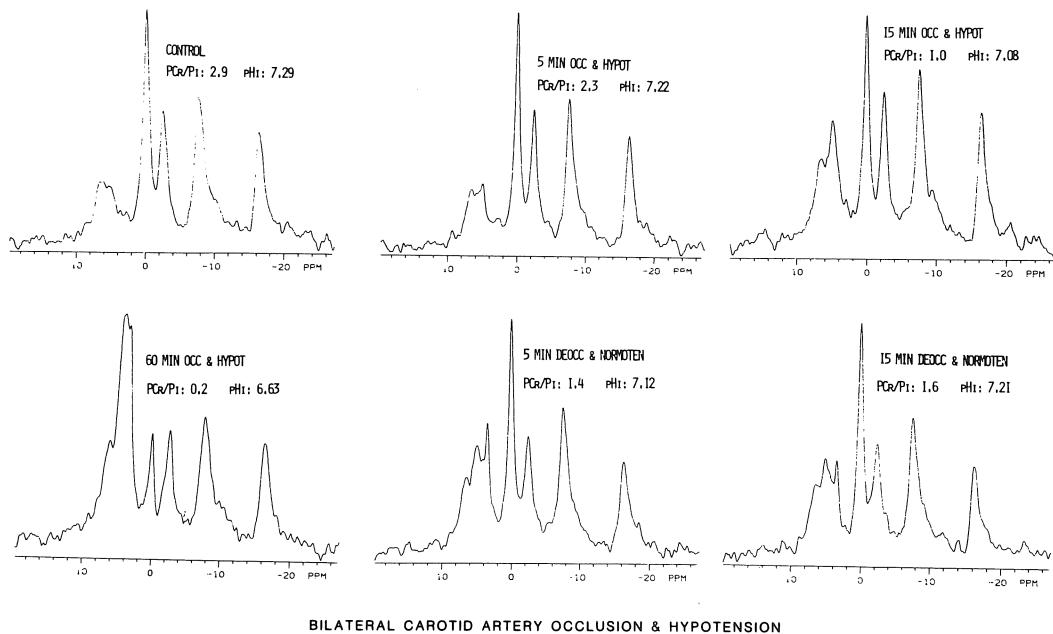


FIG 4 Up to 60 minutes after the occlusion of bilateral carotid arteries and hemorrhagic hypotension as low as 50 mmHg of mean arterial blood pressure, the PCr/Pi ratio decreased to 0.2 and pH became 6.63 (left lower). Following the restoration of bilateral carotid artery flow and normal blood pressure, the PCr peak almost returned to control, otherwise the PCr/Pi ratio and pH remained lower (right lower).

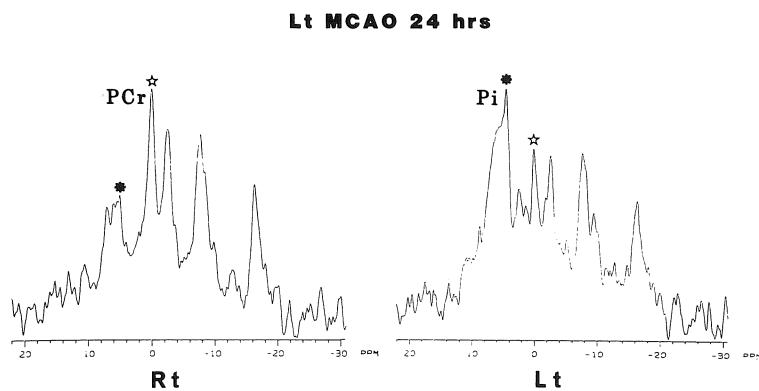


図 5 ^{31}P NMR spectra obtained from the injured hemisphere (right figure) with middle cerebral artery occlusion done 24 hours previously and from the contralateral intact hemisphere (left figure). Note the apparent differences between spectrum in each hemisphere.

30分(上図)では、コントロール(下図)と同様であり、スペクトル上脳代謝が回復している事が分かる。PaO₂ 40mmHgの下では明らかなスペクトルの変化は認められなかった。

B. 全脳虚血(図3)

虚血後15分で、スペクトル上はdead brainと言える、唯一高くそびえるPiが認められ、PCrおよびATPのピークは消失したが(中図)、再開通後30分のスペクトル(上図)ではコントロール(下図)のそれに戻った。

C. 両側大脳半球虚血(図4)

虚血作成後60分に至るまで、経時的なPCrの低下、Piの増加(PCr/Piの減少)、および脳組織の酸性化が明白で、PCr/Piはコントロール(左上図)の2.9が60分後(左下図)に0.2となり、pHiも6.63まで低下し続けている。しかしATPは、全経過を通して明らかな変化は見られていない。両側頸動脈の再開通および血圧の正常化後5分(中下図)で、PCrの増加およびPiの低下といった回復がみられ、15分後(右下図)さらにPiは低下している。しかしながら、PCr/PiおよびpHiは依然1.6および7.21と低値であった。正常血圧を維持したままの両側頸動脈閉塞のみの群では、明らかなスペクトルの変化は認められなかった。

D. 局所虚血(図5)

左半球傷害側(右図)では、対側健常側(左図)に比してPCrの低下、およびPiの増加と化学シフトの減少がみられた。傷害側および対側のPCr/Piはそれぞれ0.5および2.4であり、またpHiも6.89と対側の7.29に比して明らかな低値を示した。

E. 外傷(図6)

外傷後5分(中図)でPiの軽度の上昇が認められるが、30分後(上図)PiはPCrより高くなり、pHiも低下している。ATPもコントロールより低下している様子が分かる。これらの変化は、外傷後60分に至るまで続き、PCr/Piはコントロ

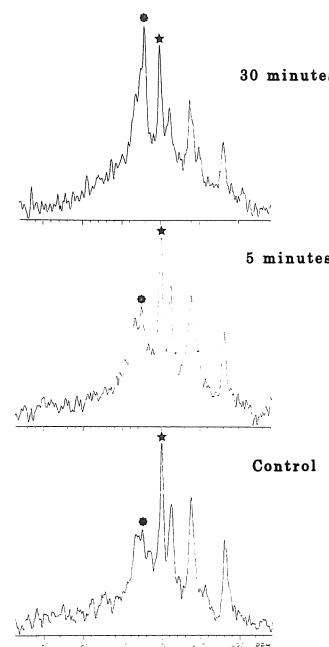


図6 Changes in ³¹P NMR spectra following severe fluid percussion impact of 7-8 atmosphere. The PCr and ATP's peaks progressively decreased and the Pi peak became dominant. These changes never returned to control during the experiments.

ールの約40%に、pHiは6.30の低値となったが、回復はみられなかった。

4 考 案

³¹Pは100%天然に存在する同位元素である。そのNMRスペクトルのセンシティビティーは¹Hの約十分の一以下であるが、他の核種のNMRスペクトル、例えば¹Hのそれにくらべて、図1に示したようにリン酸化合物由来のピークが少なくその同定はより容易である(2)。高い均一度の得られる高磁場マグネットの開発およびサーフィスコイルの導入といった近年のNMR技術の進歩により脳、筋肉、心臓、肝臓等の色々な器官の

リン酸代謝を非侵襲的にしかも同一個体で繰り返し測定することが可能となり、従来の方法では得ることの困難であった情報を得る事が可能となつた(1, 2, 3, 5, 6)。

低酸素状態における脳代謝の変化は、よく研究されており、Siesjo, B. K. et al. (9, 10) は、従来の酵素学的方法を用いて、段階的な PaO_2 レベルでの脳リン酸化合物の濃度変化を検討し、正常脳が PaO_2 30 mmHg 以上では脳代謝は明らかな傷害を受けることなく耐えうる事を示したが、これは PaO_2 40 mmHg で ^{31}P NMR スペクトルの変化がみられず、 PaO_2 30 mmHg で PCr の低下および Pi の増加を認めた今回の結果とよく符合すると言えよう。Hilberman, M. et al. (11) は、 ^{31}P NMR スペクトロスコピーを用いて、低酸素症の実験を犬で行い、正常脳がこの程度の低酸素に十分耐え得ること、またそれ以下の PaO_2 においては、ATP は PCr が約 1/2 になるまで変化が見られない事を報告している。

全脳虚血モデルは、扱いや入手が容易なラットを用いて Pulsinelli, W. A. et al. (7) により報告された方法で、症状、血流、代謝等広く検討されているが(12, 13, 14)、本邦においても Naruse, S. et al. (15) は ^{31}P NMR スペクトルと脳波の変化について検討し、後者は前者より早期に異常を呈し、またその異常は遷延すると報告している。興味あることは、PCr および ATP はスペクトル上一旦消失したにも拘わらず、血流の再開後コントロールと同様のスペクトルに回復した点で、ある濃度以下になるとスペクトル上検出が不可能になる false negative の要素もあり、スペクトル上 PCr および ATP が消失した時点で果たして全くの零であったかは疑問であり、今後解決されるべき問題である。また虚血脳は、血流の再開通により傷害を受けるとされるが、少なくとも正常脳にあっては 15 分間の完全虚血に耐え、再開通後 30 分までにスペクトル上傷害を残さず回復したと言える。

Eklof, B. et al. (16) は、ラットで酵素学的方法を用いて、正常血圧下では両側頸動脈閉塞は脳血流の低下は招くが脳代謝は傷害されず、動脈圧の低下を伴ってはじめて PCr の低下、lactate の上昇および pH 的低下などの傷害が起こる事を示し、今回の結果とよく一致している。また Delpy, D. T. et al. (17) は、家兎を用い両側頸動脈閉塞と 35 mmHg 以下の平均動脈圧を組み合わせた実験を行い、持続する pH 的低値は、細胞傷害の存在を示唆するとしているが、今回の実験で両側頸動脈の血流再開と正常血圧に戻した後も pH は依然低値であったのはこの由かもしれない。

局所脳虚血は脳血管傷害のうち臨床最も頻繁に見られ、その症状、予後は、collateral circulation および local perfusion pressure に左右されるために脳代謝傷害の程度の正確な把握は容易ではない。今回中大脳動脈閉塞後 24 時間での傷害半球および対側で明らかなスペクトル上の相違を認めたが、将来 ^{31}P NMR スペクトロスコピーの臨床応用が期待される疾患のひとつであろう。また、従来 ^{31}P NMR スペクトロスコピーを用いた報告は Thulborn, K. R. et al. (18) の行った gerbil の一側頸動脈閉塞の実験を除いて、先に示した如く低酸素(11)、全脳虚血(15)などや、けいれん重積状態(19)といった脳全体の傷害に対して用いられているが、今回の結果は局所性病変にも ^{31}P NMR スペクトロスコピーは応用され得る事を示したと言える。

外傷後に起こる脳代謝傷害については外傷自体に起因する一次的脳傷害と二次的脳傷害として低酸素、低血圧、虚血、浮腫などにより修飾されるために両者を厳密に区別することは困難である。Hashimoto, T. et al. (20) により ^{31}P NMR スペクトロスコピーを用い、一過性の頭蓋内圧上昇後の脳リン酸代謝傷害について報告されており、外傷後きわめて早期より脳代謝傷害が起こり、しかも経時に増悪していく様子が窺われる。今回示した低酸素、全脳虚血、両側大脳半球虚血で見ら

れたものとは異なり、スペクトル上の回復はみられず、重症頭部外傷においては一次的脳傷害の程度がその予後を大きく左右する事を示唆しているのかもしれない。Nilsson, B. et al. (21) はラットの concussion モデルを用いて、外傷後 15 分までの脳リン酸化合物を定量測定し、脳幹での変化に比し大脳皮質では明らかな変化を認めていないが、非常に軽度の concussion レベルでの外傷後では ^{31}P NMR スペクトルの変化が見られなかった(Hashimoto, T., unpublished data) 事は、同じ理由によるかもしれない。

以上 *in vivo* ^{31}P NMR スペクトロスコピーによる、種々の病態におけるリン酸代謝傷害の検討を行ったが、繰り返し示した如く、脳代謝傷害の程度の指標として極めて有用であること、また各種治療の評価判定にも応用され得ることが示唆された。

本論文では、サーフィスコイルを用いたラットの脳における ^{31}P NMR スペクトルについて検討したが、対象とする臓器、年齢および種属によりスペクトルは異なり、判読にあたり注意が必要である。脳の PCr/Pi 値は安静時の筋肉のそれより明らかに低値であり(1, 2, 5, 6)、また幼児では大人より低値を呈する(22, 23)。家兔、犬、およびヒトの脳では rodents の脳にくらべ、より明瞭な phosphodiester のピークが認められる(11, 17, 24, 25) 等である。また用いるコイルの大きさおよびその位置により異なったスペクトルが得られる事も考慮されなくてはならない。

^{31}P NMR スペクトロスコピーを用い、Bottomley, P. A. et al. はヒトの脳のスペクトルを測定している(24, 25)。すでに臨床にも応用され、Cady, E. B. et al. (22) は出生時低酸素のエピソードのあった新生児の脳で ^{31}P NMR スペクトルを測定し、臨床症状および予後との比較検討を行い、特に治療に伴うスペクトルの変化が見られたと報告し、機能予後判定の有用な指標となる可能性があるだろう。また画像自体のリゾルーション

は未だ満足できるものではないが Maudley, A. A. et al. (26) は猫の脳虚血モデルを用いて、ATP, PCr, Pi 等のリン酸化合物のイメージングを報告しており、近い将来 ^{31}P NMR スペクトロスコピーによる脳代謝マップの作成が臨床上可能となることが期待される。

5 謝 辞

稿を終えるにあたり、本研究の機会をお与えくださいましたカリフォルニア大学サンフランシスコ校脳神経外科、vice chairman, L. H. Pitts 博士および千葉大学医学部脳神経外科、山浦 晶助教授に深謝致します。

文 献

- 1) Ackerman, J. J. H., Grove, T. H., Wong, G. G., et al.: Mapping of metabolites in whole animals by ^{31}P NMR using surface coils, *Nature*, **283**: 167-170, 1980.
- 2) Gadian, D. G.: Nuclear magnetic resonance and its applications to living systems, Clarendon Press, Oxford, 1982.
- 3) James, T. L.: *In vivo* nuclear magnetic resonance spectroscopy, in Moss, A. A., Ring, E. J., Higgins, C. B. (eds): NMR, CT, and Interventional Radiology. San Francisco: Department of Radiology, University of California, 1984, pp. 235-244.
- 4) Gonzalez-Mendez, R., Litt, L., Koretsky, A. P., et al.: Comparison of ^{31}P NMR spectra of *in vivo* rat brain using convolution difference and saturation with a surface coil. Source of the broad component in the brain spectrum, *J. Mag. Res.*, **57**: 526-533, 1984.
- 5) Chance, B., Nakase, Y., Bond, M., et al.: Detection of ^{31}P nuclear magnetic resonance signals in brain by *in vivo* and freeze-trapped assays, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **75**: 4925-4929, 1978.
- 6) Chance, B., Eleff, S., Leigh, Jr. J. S.: Noninv-

- asive, nondestructive approaches to cell bioenergetics, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**: 7430-7434, 1980.
- 7) Pulsinelli, W. A., Brierley, J. B.: A new model of bilateral hemispheric ischemia in the unanesthetized rat, *Stroke*, **10**: 267-272, 1979.
- 8) Tamura, A., Graham, D. I., McCulloch, J., et al.: Focal cerebral ischemia in the rat. I. Description of technique and early neuropathological consequences following middle cerebral artery occlusion, *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, **1**: 53-60, 1981.
- 9) Siesjö, B. K., Folbergrová, J., MacMillan, V., The effect of hypercapnia upon intracellular pH in the brain, evaluated by the bicarbonate-carbonic acid method and from the creatine phosphokinase equilibrium, *J. Neurochem.*, **19**: 2483-2495, 1972.
- 10) Siesjö, B. K.: Brain energy metabolism, John Wiley and Sons, New York, 1978.
- 11) Hilberman, M., Subramanian, V. H., Haselgrave, J., et al.: *In vivo* time-resolved phosphorus nuclear magnetic resonance, *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, **4**: 334-342, 1984.
- 12) Pulsinelli, W. A., Levy, D. E., Duffy, T. E.: Regional cerebral blood flow and glucose metabolism following transient forebrain ischemia, *Ann. Neurol.*, **11**: 449-509, 1982.
- 13) Pulsinelli, W. A., Duffy, T. E.: Regional energy balance in rat brain after transient forebrain ischemia, *J. Neurochem.*, **40**: 1500-1503, 1983.
- 14) Volpe, B. T., Pulsinelli, W. A., Tribuna, J., et al.: Behavioral performance of rats following transient forebrain ischemia, *Stroke*, **15**: 558-562, 1984.
- 15) Naruse, S., Horikawa, Y., Tanaka, C., et al.: *In vivo* measurement of energy metabolism and the concomitant monitoring of electroencephalogram in experimental cerebral ischemia, *Brain Res.*, **296**: 370-372, 1984.
- 16) Eklof, B., Siesjö, B. K.: The effect of bilateral carotid artery ligation upon the blood flow and the energy state of the rat brain, *Acta Physiol. Scand.*, **86**: 155-165, 1972.
- 17) Delpy, D. T., Gordon, R. E., Hope, P. L., et al.: Noninvasive investigation of cerebral ischemia by phosphorus nuclear magnetic resonance, *Pediatrics*, **70**: 310-313, 1982.
- 18) Thulborn, K. R., du Boulay, G. H., Duchen, L. W., et al.: A ^{31}P nuclear magnetic resonance *in vivo* study of cerebral ischaemia in the gerbil, *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, **2**: 299-306, 1982.
- 19) Petroff, O. A. C., Prichard, J. W., Behar, K. L., et al.: *In vivo* phosphorus nuclear magnetic resonance spectroscopy in status epilepticus, *Ann. Neurol.*, **16**: 169-177, 1984.
- 20) Hashimoto, T., Pitts, L. H., Pogliani, L., et al.: Changes in brain high energy metabolism in rats following fluid percussion injury, Intra-cranial Pressure VI, Miller, D. J., Teasdale, G. M., Galbraith, S. L., Mendelow, A. D. (eds), Springer-Verlag (in press)
- 21) Nilsson, B., Pontén, U.: Experimental head injury in the rat, Part 2: Regional brain energy metabolism in concussive trauma, *J. Neurosurg.*, **47**: 252-261, 1977.
- 22) Cady, E. B., Costello, A. M., Dawson, M. J., et al.: Non-invasive investigation of cerebral metabolism in newborn infants by phosphorus nuclear magnetic resonance spectroscopy, *Lancet*, **1**: 1059-1062, 1983.
- 23) Norwood, W. I., Ingwall, J. S., Norwood, C. R., et al.: Developmental changes of creatine kinase metabolism in rat brain, *Am. J. Physiol.*, **244**: 205-210, 1983.
- 24) Bottomley, P. A., Hart, H. R., Edelstein, W. A., et al.: NMR imaging/spectroscopy system to study both anatomy and metabolism, *Lancet*, **30**: 273-274, 1983.
- 25) Bottomley, P. A., Hart, Jr. H. R., Edelstein, W. A., et al.: Anatomy and metabolism of the normal human brain studied by magnetic resonance at 1.5 Tesla, *Radiology*, **150**: 441-446, 1984.
- 26) Maudsley, A. A., Hilal, S. K., Simon, H. E., et al.: *In vivo* MR spectroscopic imaging with P-31, Work in progress, *Radiology*, **153**: 745-750, 1984.