

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 Deterioration

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 (pHi) 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 9cm の超伝導 5.6 テスラ、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 1.4cm 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

波数 95.9MHz 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プに動物を乗せてマグネット内に置き、最良のプロ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 ($\sigma = \text{Oppm}$) 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, 200-400g 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

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

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

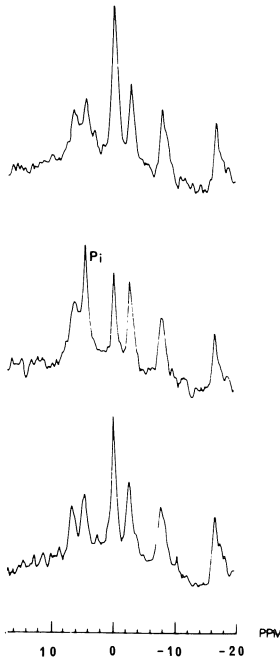


図2 ³¹P NMR spectrum of control(lower) and at the end of 25-minute hypoxia as low as 30 mmHg of PaO₂(middle), showing the decrease in the PCr peak and the increase in the Pi peak with the ATP's peaks unchanged. 30 minutes after the recovery from hypoxia, the spectrum (upper) is identical with the control.

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)

PaO₂ 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

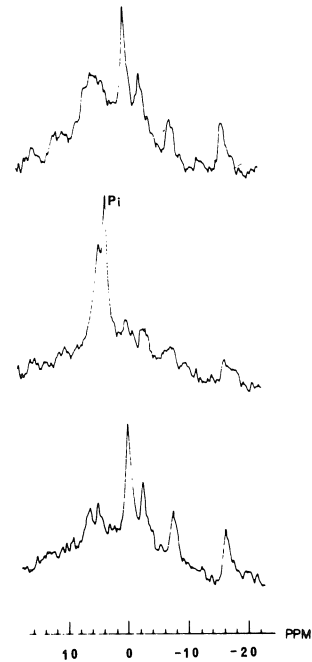


図3 ³¹P NMR spectral changes following global ischemia in the 4-vessel occlusion rat model. a, control spectrum (lower). b, 15 minutes after global ischemia, the Pi peak showed the marked increase in its peak height and severe brain acidity compatible with the decrease in the Pi chemical shift relative 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).

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

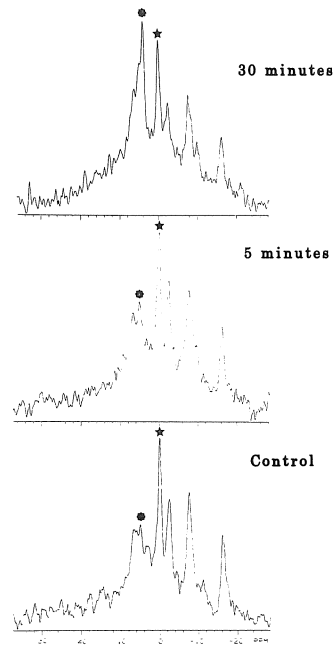


図6 Changes in ³¹P NMR spectra following severe fluid percussion impact of 7-8 atmosphere. The PCr and ATP's peaks progressively decreased and the Pi peak became dominant. These changes never returned to control during the experiments.

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ブィティーは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

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、同じ理由によるのかもしれない。

以上 *in vivo* ^{31}P NMR スペクトロスコープによる、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)。家兎、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 スペクトロスコープを用い、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リューション

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 スペクトロスコープによる脳代謝マップの作成が臨床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.: Nonin-

