

2.0-T 全身用 MRI 装置によるウサギ肝の *in vivo* ^{31}P -MR スペクトロスコピー

In Vivo ^{31}P -MR Spectroscopic Study of Phosphorus Compounds in Rabbit Liver Using 2.0-T Whole-Body MR Imager

伴 信之 (京都大学医学部第一内科)
森安史典 (同 上)
玉田 尚 (同 上)
川崎俊彦 (同 上)
宋 泰成 (京都大学医学部老年科)
中村武史 (京都大学医学部第一内科)
西田 修 (同 上)
三浦賢佑 (同 上)
酒井正彦 (京都大学病院検査部)
内野治人 (京都大学医学部第一内科)
三宅健夫 (京都大学医学部老年科)
飯島直人 (島津製作所医用事業部)
藤田明德 (同 上)
橋本泰司 (同 上)

キーワード

^{31}P -NMR spectroscopy, liver, whole-body MR imager, rabbit

要 旨

A 2.0-T magnetic resonance (MR) imager was used to perform *in vivo* ^{31}P -MR spectroscopic study of phosphorus compounds in rabbit liver. Static magnetic field homogeneity was found to be adequate over a region 10 cm in diameter and, using a solenoid surface coil, useful spectra could be obtained within several minutes.

The spectra showed 6 peaks, which were assigned, from left to right, to phosphomono-

ester, inorganic phosphate, phosphodiester, γ -ATP, α -ATP, and β -ATP.

The pattern, however, varies significantly according not only to pulse repetition time but also to the starting point of signal sampling.

It should be emphasized that the pulse conditions are important in analyzing ^{31}P -MR spectra.

1 緒言

肝の ^{31}P -MR スペクトロスコピー（以下、 ^{31}P スペクトロスコピー）による研究は、超電導磁石の大きさの制限のため、*in vitro* の研究^{1)~4)} が主で、*in vivo* では、ラットなどの小動物に限られていた⁵⁾。一方、最近の全身用 MRI 装置においても高磁場化がはかられ、静磁場強度 1.5 Tesla の装置が臨床に使用され、プロトン MR imaging ばかりでなく、 ^{31}P スペクトロスコピーも試みられている^{6)~8)}。

今回著者らは、高磁場の全身用 MRI 装置による肝の ^{31}P スペクトロスコピー研究の基礎的検討を目的として、ウサギ肝の ^{31}P スペクトロスコピーを実施した。本論文では、 ^{31}P スペクトロスコピーに全身用 MRI 装置を使用する際の測定上の問題、および同装置で得られた *in vivo* のウサギ肝 ^{31}P スペクトルの特徴について述べる。

2 対象と方法

使用した装置は、島津製作所製の全身用 MRI 試作装置で、仕様は以下の通りである。マグネットはオックスフォード社製で、静磁場強度 2.0 Tesla (^{31}P の共鳴周波数 34.47 MHz)、ボア径

740 mm の超電導マグネットである。静磁場の均一性は、今回の実験のスペクトル関心領域内 (10 cm 球内) で 1 ppm 以下に保たれている。検波方式は複素検波方式が使用されている。パルスの形状は SINC 波形で、パルス幅は 1.8 msec である。

対象は、体重約 2 kg の家兎 6 匹である。1 晩絶食し、ネブタール (25 mg/kg) の静脈麻酔を行い、補助麻酔としてエーテルを適宜吸入させた。固定板に固定後、腹部正中の縦切開を行い、ソレノイド型コイルを肝の 2~3 葉に装着した。

他組織との比較のため、ウサギ後肢の筋肉のスペクトルを同じコイルで得た。

^{31}P スペクトルの測定は、imaging 用のパルス幅の広い 90° RF パルスに対する FID からフーリエ変換法で求めた。シグナルのサンプリングレートは 1 point/100 μsec 、サンプリングポイント数は 512 points とした。サンプリングの開始は本装置最短の 90° パルスの中心から 2.4 msec とした。また、サンプリング開始時間の相違がスペクトルに及ぼす影響をみるため、4.4 msec の場合もスペクトルの測定を行った。以下のスペクトルではとくにことわりがなければ、サンプリングの開始は 2.4 msec のものである。

パルス繰返し時間 (Tr) は 200, 1,000 msec の 2 種類とした。また、信号強度が $M_0 [1 - \exp(-\text{Tr}/T_1)]$ (M_0 : 熱平衡磁化) の式に従うと仮定して、Tr 200 と 1,000 msec の 2 点から T_1 値を求めた。

スペクトル上 inorganic phosphate (Pi) のピークの同定のため肝動脈および門脈の同時結紮を行った。

受 付 1986年9月9日
最終稿受付 1986年9月20日
別刷請求先 (〒606)京都市左京区聖護院川原町 54
京都大学医学部第一内科
伴 信 之

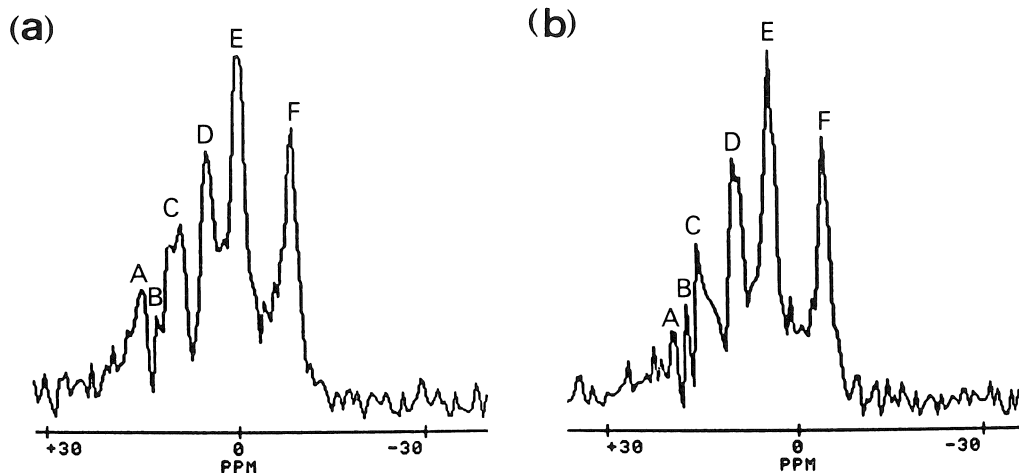


図 1 ^{31}P -MR spectra from a rabbit liver. Spectra were obtained in 6 min 40 sec with Tr of 1000 msec (a) and in 30 sec with Tr of 200 msec (b). The side at the bottom is in ppm, measured with respect to α -ATP(a). The six peaks were assigned to the following. A: phosphomonoester, B: inorganic phosphate, C: phosphodiester, D: γ -ATP, E: α -ATP, F: β -ATP.

表 1 Chemical shifts of phosphorus compounds in the rabbit liver (ppm)

Rabbit No.	PME	Pi	PDE	Pcr	γ -ATP	α -ATP	PP'	β -ATP
1	15.29	13.03	10.76, 9.06	—	5.10	0	—	-8.49
2	14.73	13.03	10.76	—	5.66	0	—	-8.49
3	15.29	13.03	10.76	—	5.66	0	—	-8.49
4	15.29	13.03	10.76, 9.06	—	5.66	0	—	-8.49
5	15.29	—	10.76	—	5.10	0	—	-8.49
6	14.73	13.03	10.20	—	5.10	0	—	-9.06

Chemical shifts of phosphorus compounds in the rabbit liver are shown relative to α -ATP. PME: phosphomonoester, Pi: inorganic phosphate, PDE: phosphodiester.

3 成 績

ウサギ肝臓のスペクトルの典型例を図 1 に示した。B のピークについては、肝動脈、門脈の結紮による虚血後上昇してくることから Pi とした。他のピークの帰属については、これまでに報告されている化学シフトの位置¹²⁾⁹⁾に基づいて、左側のピークから、A: phosphomonoester (PME), C: phosphodiester (PDE), D: γ -ATP, E: α -ATP,

F: β -ATP とした。表 1 に、生理的 pH の範囲内では化学シフトの変化が少ないといわれている α -ATP¹⁰⁾¹¹⁾ のピークを基準にしたときの各ピークの化学シフトを示した。6 羽のウサギの間で各ピークの化学シフトの位置はほぼ一致した。

スペクトル上明らかな phosphocreatine (Pcr) のピークは認められなかった。PME のピークは非対称で左側になだらかな傾斜をもっていた。PDE のピークは右側に肩をもち、個々のウサギによってはピークは二つに分離されるものがあ

表 2 T_1 values of phosphorus compounds in the rabbit liver

Rabbit No.	PME	Pi	PDE	γ -ATP	α -ATP	β -ATP
2	270	260	740	150	260	220
4	360	380	690	130	190	160
5	300	140	820	130	170	160
6	300	190	1,000	100	190	140
mean \pm S.D.	308 \pm 38	243 \pm 104	813 \pm 136	128 \pm 21	203 \pm 40	170 \pm 35 msec

The T_1 value of phosphorus compounds in the rabbit liver was calculated by fitting the signal intensities with Tr of 200 msec and of 1000 msec to the formula: $M_0 [1 - \exp(-Tr/T_1)]$. The T_1 value of each peak shows that γ -ATP < β -ATP < α -ATP < Pi < PME < PDE.

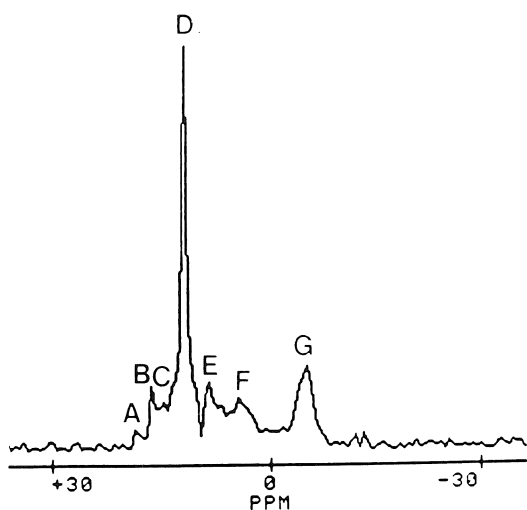


図 2 ³¹P-MR spectrum from a rabbit leg. Spectrum was obtained in 6 min 40 sec with Tr of 1000 msec. The seven peaks were assigned to the following. A: phosphomonoester, B: inorganic phosphate, C: phosphodiester, D: γ -ATP, E: α -ATP, F: β -ATP, G: β -ATP.

た。

肝と同様の条件で得た後肢の筋肉のスペクトルを図 2 に示した。後肢のスペクトルのパターンは肝と著しく異なり、著明な Pcr のピークが認められた。また、ATP の三つのピークのパターンも異なっていた。

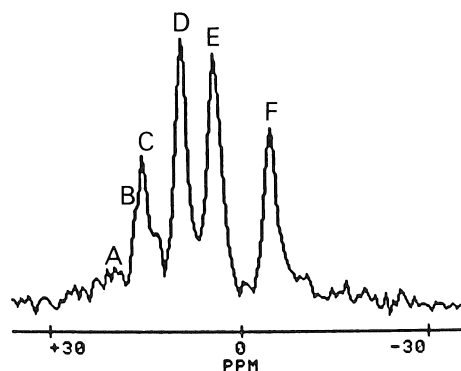


図 3 ³¹P-MR spectrum which was obtained with the same pulse sequence as that in Fig. 1, except that starting point of FID sampling was 4.4 msec. A: phosphomonoester, B: inorganic phosphate, C: phosphodiester, D: γ -ATP, E: α -ATP, F: β -ATP

表 2 にはウサギ肝の ³¹P スペクトルの各ピークの T_1 値を示した。平均値で見ると、 γ -ATP < β -ATP < α -ATP < Pi < PME < PDE の順に T_1 が長くなり、とくに PDE の T_1 が他ピークに比して著しく長いのが特徴であった。

図 3 には、Tr 1,000 msec であるが、シグナルのサンプリングを図 1 の場合より 2 msec 遅らせて開始して得られたスペクトルを示す。スペクトルのパターンは大きく変化し、とくに ATP の三つのピークは、図 1 の α -ATP がもっとも高値を

示すパターンから γ -ATP がもっとも高値を示すパターンになった。

4 考 察

最近の全身用超電導 MRI 装置でも高磁場化が行われ、中心部での静磁場の均一性も改善され(1 ppm 以下)、化学シフトの大きい生体内リン化合物の *in vivo* の ^{31}P スペクトロスコーピーが可能になった^{6)~8)}。

全身用超電導 MRI 装置による *in vivo* の ^{31}P スペクトロスコーピーには、*in vitro* の研究と共通する問題として、① S/N およびシフト分解能、② RF パルスおよびパルスシーケンス、*in vivo* の問題としては、③ localization に関する問題がある。

^1H に比して ^{31}P は sensitivity が著しく低いいため、よい ^{31}P -MR スペクトルを得るためには静磁場の均一性ばかりでなく、RF コイルの性能、RF コイルと対象臓器の位置関係も重要な問題となる。

大口径の超電導 MRI 装置の特徴の一つは、動物実験の際より大きな動物を使用することによって、対象臓器が大きくなり、S/Nの改善が期待されることである。しかし、通常表面コイルではカバーできる範囲が狭くなり、臓器が大きくなることをあまり生かせない。一方、今回の実験のように、腹腔内に広い遊離面をもつ肝臓のような臓器については、ソレノイドコイルを使用することによって肝臓を大きくカバーでき、S/Nの上昇が実現できた。また、ソレノイドコイルを肝臓の形に合わせて扁平にすることによって filling factor も上昇させることができ、Tr 200 msec 積算 150 回の 30 sec の短時間スキャンでも明瞭なスペクトルを得ることができた(図 1-b)。

スペクトルの localization について、直接目的臓器に表面コイルを使用する方法と、体表からアプローチする方法とがある。体表からの方法として

は TMR 法や sectorial resonator を使用する方法などが研究されている⁸⁾¹³⁾。直接臓器に表面コイルを使用する方法は、一般にスペクトルの localization については問題は少ないが、周囲に多くの筋組織、他臓器が存在する肝臓に使用する場合はまだ問題があり、Quistorff ら⁵⁾のラットの報告では、まだ周囲組織からの Pcr のシグナルの混入が認められている。しかし今回、ソレノイドコイルをより大きなウサギの肝臓に使用することによってスペクトル上 Pcr の混入は認められなくなった。すなわち、周囲組織からの Pcr シグナルの混入は相対的に低く押さえられ、スペクトルは主として肝臓からのシグナルからなると考えられた。

今回の実験では、RF パルスにプロトンの imaging 用の sinc 関数によるパルス幅 1.8 msec の幅広いパルスが使用されているため、signal のサンプリングの開始は RF 90° パルスの中心から最短で 2.4 msec である。スペクトルはシグナルのサンプリングの開始の時間を 2 msec 遅らせただけでも大きく変わり、ウサギ肝臓の ATP の各ピークの T_2 が互いに異なることを示した。Tr によってもスペクトルのパターンは大きく変化し⁴⁾、今回の検討でも、PDE の T_1 値は 816 ± 136 msec と長く、saturation の影響を受けないように Tr を 4T にすると Tr が 3,000 msec 以上となり、スペクトルを得るために時間を要するようになる。

サンプリングの開始時間によってもスペクトルが大きく変化することと合わせて考えると、スペクトルの各ピークの信号強度比から得られる値は、物質の相対的な存在化として考えて、比較的短い妥協的 Tr でスペクトルを得た方が、とくに dynamic な変化を追跡する際には ^{31}P スペクトロスコーピーの特性を生かせると考えられる。

肝臓の ^{31}P スペクトルの帰属については Ogawa ら¹⁾、Cohen¹²⁾ が詳細に検討しているが、シフトの記載のあるものについて表 3 に示した。

今回、著者らの 2.0 T whole body MR imager

表 3 Chemical shifts of phosphorus compounds in frog muscle, rat liver and mouse liver

	PME	Pi	PDE	Pcr	γ -ATP	α -ATP	PP'	β -ATP
dissected frog leg muscle by C.T. Burt et al ⁹⁾	14.4 (SP)	12.4	10.7	7.5	5.1	0	—	-8.4
isolated rat liver cells by S.M. Cohen et al ²⁾	? 13.8 (SP) (PC)	?	11.12 (GPE)	10.59 (GPC)	— 4.7	0	-0.5-1.0	-8.8
perfused rat liver by J.M. Salhany ³⁾	? 13.6 (SP) (PC)	? (external)	11.1 (GPE)	10.6 (GPC)	— 4.6	0	—	-8.8
perfused mouse liver by A.C. McLaughlin ⁴⁾	14.2 (SP & AMP)	12.6	—	—	4.8	0	—	-8.8
<i>in vivo</i> rat liver by B. Quistorff et al ⁵⁾	14.8~14.2 (SP & AMP)	12.6	11.5~11.0 (GPE & GPC)	?	5.2	0	—	-8.6

Chemical shifts of phosphorus compounds reported by the other workers are shown relative to α -ATP. PME: phosphomonoester, Pi: inorganic phosphate, PDE: phosphodiester, PP': PP'-diesterified pyrophosphate.

によるウサギ肝スペクトルでは、左側から PME, Pi, PDE, γ -ATP, α -ATP, β -ATP の 6つのピークが認められ、スペクトル上明らかな Pcr のピークは認められなかった。

PME のピークについては、左側になだらかな傾斜を持ち、いくつかの物質のシグナルからなると思われるが、分離はされなかった。

PDE のピークについては、Tr 1,000 msec では、6例中4例は右側に肩を持ち、2例では二つのピークに分離され、そのシフトの位置は α -ATP を基準として 10.76 ppm と 9.06 ppm であった。これらのピークは Ogawa ら¹⁾, Cohen¹²⁾ の glycer-3-phosphoethanolamine (G3PE), glycer-3-phosphocholine (G3PC), phosphoenol-pyruvate (PEP) のピークに相当すると思われたが、確定はできなかった。

α -ATP については、その右側にピークや肩が認められず、Salhany ら³⁾, Cohen¹²⁾ の灌流肝でみられた NAD はスペクトル上明らかでなかった。シフト分離能の相違によるものか、*in vivo* と灌流肝ほか、測定条件の相違によるものか、今後検討が必要であると考えられる。

肝の ³¹P スペクトルの特徴について、これま

で Pcr が認められないこと以外に、ATP の緩和時間が他組織に比して短いことが指摘されている⁴⁾¹³⁾。McLanghlin ら⁴⁾ は、ATP の T_1 が 100 msec 以下で free の ATP に比して短いことを述べ、その理由として、肝細胞内の Mg, Ni, Co などの常磁性体の存在によるものとしている。

今回の著者らの検討でも、ウサギの肝と後肢では ATP のピークのパターンは異なり、両組織で ATP の緩和時間が異なることを示していた。また、肝の ATP の T_1 は 100~200 msec と PME, PDE に比して短く、ATP の三つのピーク間でも異なっていた。

サンプリングの開始時間を遅らせると、ATP の三つのピークは γ -ATP がもっとも高値を示すパターンになったが、これは γ -ATP が α -ATP, β -ATP に比して T_2 が長いことを示していると考えられた。

Quistorff ら⁵⁾ によると、ピーク値の比である $\frac{(\alpha\text{-ATP}) - (\beta\text{-ATP})}{\beta\text{-ATP}}$ は hypoxia で増加し、その

反対では減少することを述べ、 $T_1 \cdot T_2$ 値の変化に鋭敏であることを指摘している。このことは、肝の ³¹P スペクトル上、ATP 各ピークの緩和時

間が hypoxia という病的状況を反映していることを示している。すなわち、種々の病態でのスペクトルの変化が、単に物質の量的変化ばかりでなく、緩和時間の変化によってもたらされる可能性を示しており、緩和時間測定が意義を持つものと考えられる。

5 結 論

^{31}P スペクトロスコピーによる肝のエネルギー代謝レベル、pH の研究は、これまで、主として *in vitro* で行われてきた。しかし、今回著者らが示したウサギ肝の *in vivo* ^{31}P スペクトルは、高磁場全身用 MRI 装置が肝の *in vivo* ^{31}P スペクトロスコピーによる研究に有用であり、肝の病態生理の把握に新しい有力な手段となることを示していると考えられた。

文 献

- 1) S. Ogawa, H. Rottenberg, T.R. Brown, et al.: High-resolution ^{31}P nuclear magnetic resonance study of rat liver mitochondria, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75: 1796-1800, 1978.
- 2) S.M. Cohen, S. Ogawa, H. Rottenberg, et al.: ^{31}P nuclear magnetic resonance studies of isolated rat liver cells, Nature, 273: 554-556, 1978.
- 3) J.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.
- 4) 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.
- 5) B. Quistorff, A. Engkagul, B. Chance: ^{31}P NMR in the study of liver metabolism *in vivo*, Pharm. Biochem. Behav., 18 [Suppl. 1]: 241-244, 1983.
- 6) P.A. Bottomley, H.R. Hart, W.A. Edelstein, et al.: NMR imaging spectroscopy system to study both anatomy and metabolism, Lancet, 2: 273-274, 1983.
- 7) T.C. Ng, A.W. Majors, T.F. Meany: *In vivo* MR spectroscopy of human subjects with a 1.4-T whole-body MR imager, Radiology, 158: 517-520, 1986.
- 8) T.M. Grist, A. Jesmanowicz, W. Froncisz, et al.: 1.5 T *in vivo* ^{31}P NMR spectroscopy of the human liver using a sectorial resonator, Mag. Reson. Med., 3: 135-139, 1986.
- 9) C.T. Burt: Analysis of living tissue by phosphorus-31 magnetic resonance. Phosphorus nuclear magnetic resonance is a new method for observing in the internal milieu of intact cells, Science, 195: 145-149, 1977.
- 10) R.B. Moon, J.H. Richards: Determination of intracellular pH by ^{31}P magnetic resonance, J. Biol. Chem., 248: 7276-7278, 1973.
- 11) 今井昭一: 第2章. *in* ガーディアン (今井昭一・訳). 医学・生物学のため NMR 生体系への応用, 西村書店, 新潟, 1985, P. 36-38.
- 12) S.M. Cohen: Simultaneous ^{13}C and ^{31}P NMR studies of perfused rat liver. Effects of insulin and glucagon and a ^{13}C NMR assay of free Mg^{2+} , J. Biol. Chem., 258: 14294-14308, 1983.
- 13) R.E. Gordon, P.E. Hanley, D. Shaw, et al.: Localization of metabolites in animals using ^{31}P topical magnetic resonance, Nature, 287: 736-738, 1980.