

## In vivo $^{13}\text{C}$ NMR スペクトロス コピー

### ——ラット脳内[ $1-^{13}\text{C}$ ]glucose の検出——

藤原直士 (新潟大学医学部麻酔学教室)  
湯浅龍彦 (新潟大学脳研究所神経内科学部門)  
羽柴正夫 (新潟大学医学部麻酔学教室)  
五十嵐博中 (新潟大学脳研究所神経内科学部門)  
下地恒毅 (新潟大学医学部麻酔学教室)  
宮武正 (新潟大学脳研究所神経内科学部門)

#### キーワード

in vivo  $^{13}\text{C}$  NMR,  $^{13}\text{C}$ -labeled glucose

#### 要旨

ラットの静脈あるいは腹腔より [ $1-^{13}\text{C}$ ] glucose を投与して脳内 in vivo  $^{13}\text{C}$  NMR 測定により [ $1-^{13}\text{C}$ ] glucose シグナルを検出し、その経時変化を観察した。検出器には単一表面コイル型 C-H デュアルプローブを用い、 $^1\text{H}$  デカップリング測定を行った。静注(250 mg/kg, bolus) では投与直後から 15 分間の測定で [ $1-^{13}\text{C}$ ] glucose の  $\alpha$  および  $\beta$ -form に帰属される明瞭なシグナルが観察され、45~60 分ではほとんど消失した。腹腔投与(350 mg/kg) では投与後 30~60 分において、静注時に比較して強度は小さいが、比較的安定したシグナルが観察された。

#### はじめに

核磁気共鳴 (NMR) 法による in vivo での脳代謝基質や代謝物 (例えば、グルコースや乳酸等) の測定においては、対象となる核が  $^1\text{H}$  や  $^{13}\text{C}$  であるが、とくに、 $^{13}\text{C}$  NMR はケミカルシフトの広がりが大きく、化学的にも有用な情報が得られるという利点がある。しかし、 $^{13}\text{C}$  の天然同位体存在比は 1.1% と低く、そのままでは in vivo  $^{13}\text{C}$  NMR 測定によって、脳内のグルコースや乳酸など代謝関連物質を検出するのは困難

である。

そこで、 $^{13}\text{C}$  濃縮化合物を利用した  $^{13}\text{C}$  NMR 測定が検討され、動物に投与した  $^{13}\text{C}$  濃縮化合物の肝や心筋での代謝を in vivo で測定することが試みられている<sup>1-6)</sup>。とりわけ、Behar ら<sup>7)</sup> はウサギに [ $1-^{13}\text{C}$ ] glucose を持続静注し、さらに、低酸素を負荷して脳からの [ $1-^{13}\text{C}$ ] glucose およびその代謝物の  $^{13}\text{C}$  NMR シグナルを in vivo で検出している。これらの測定では  $^{13}\text{C}$  シグナルを効率よく検出するため  $^1\text{H}$  デカップリングを行っており、 $^1\text{H}$  照射用と  $^{13}\text{C}$  検出用の 2 つのコイルを持つプローブを使用している。

このように、いくつかの試みはなされているにしても、in vivo での  $^{13}\text{C}$  NMR 測定例は少なく、測定装置や測定方法等について検索すべき課題は多い。著者らは単一表面コイル型の C-H デュアルプローブを用いて、静脈あるいは腹腔より  $[1-^{13}\text{C}]$  glucose を投与したラットの脳から  $[1-^{13}\text{C}]$  glucose の  $^{13}\text{C}$  NMR シグナルを検出し、その経時変化を調べた。その方法と結果、および、in vivo における脳代謝研究への  $^{13}\text{C}$  NMR の応用可能性について検討する。

## 方法

### (1) 測定装置、測定法およびプローブの特性

NMR 装置は JEOL JNM-GX-270 (磁場強度 6.3 T) を用い、rf 検出器として単一表面コイル型 JEOL NM-G27-PSPC C-H デュアルプローブを用いた。コイルの直径は 15 mm である。 $^1\text{H}$  デカップリングのための  $^1\text{H}$  照射および  $^{13}\text{C}$  検出はこの単一コイルで行った。

このプローブを用いた場合の  $^1\text{H}$  デカップリングの効果を直径 1 cm の試験管中に入れた 1 mg/ml  $[1, 2, 3, 4, 5, 6-^{13}\text{C}_6]$  glucose (MERCK FROSST CANADA INC., 99%  $^{13}\text{C}$ ) の  $^{13}\text{C}$  NMR スペクトル測定によって調べた。また、シグナル強度に及ぼすコイルに対する試料の位置の依存性を調べるため、直径 1 mm のガラス細管に 10%  $[1-^{13}\text{C}]$  glucose (MERCK FROSST CANADA INC., 99%  $^{13}\text{C}$ ) を 20  $\mu\text{l}$  封入し、コイルと試料の距離を変えて、検出される  $^{13}\text{C}$  NMR 信号強度を比較した。測定モードはシングルパルスで、パルス幅 (PW) 15  $\mu\text{s}$ 、パルス遅延時間 (PD) 1.9 s とし、 $^1\text{H}$  完全デカップリングを行なった。デカップリングのための  $^1\text{H}$  照射出力は FID サンプリグ時 (ACQTM) 9 W、PD では 4 W とした。

### (2) In vivo $^{13}\text{C}$ NMR 測定

Wistar 系ラット (♂, 約 120 g) をペントバルビタール麻酔下 (40 mg/kg, i. p.) に頭皮を直径約 1 cm ほどの円形に切除し、大脳部分の頭骨に検出コイルを密着させた。分解能調整 (シム調整)、天然存在比での  $^{13}\text{C}$  NMR 測定を行った後、 $[1-^{13}\text{C}]$  glucose を腹腔より 350 mg/kg あるいは大腿静脈より 250 mg/kg 投与し、経時的に  $^{13}\text{C}$  NMR 測定を行った。

パルス系列はシングルパルスを用い、PW を 15  $\mu\text{s}$ 、パルス繰り返し時間を 1 s とした。FID 積算回数を 900 回とし、1 回の測定には 15 分を要した。 $^1\text{H}$  照射は PW と ACQTM においてのみ行い、パルス遅延時間 (PD) では照射を行わない測定モード (SGNNE) を用いた。この測定モードでは  $^1\text{H}$  照射による水の発熱は起こらないので、in vivo での測定に適していると思われる。

## 結果と考察

### (1) $^1\text{H}$ デカップリングの効果

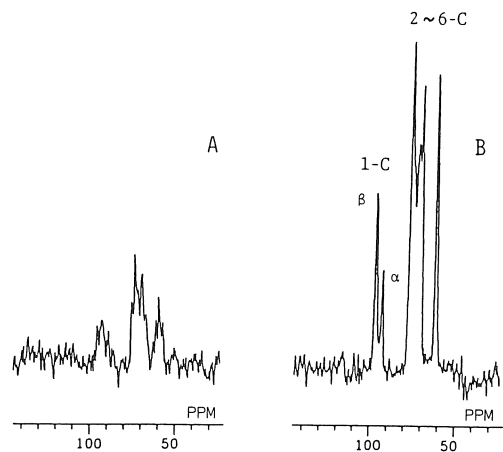


図1 非  $^1\text{H}$  デカップリング (A) および  $^1\text{H}$  完全デカップリング (B) により測定された  $[1, 2, 3, 4, 5, 6-^{13}\text{C}_6]$  glucose (1 mg/ml) の  $^{13}\text{C}$  シグナルにおける S/N 比の比較 (FID 1000 回積算)。  $^1\text{H}$  完全デカップリングにより S/N 比は大きく向上しシグナルも単純になる。

$^{13}\text{C}$  シグナルに及ぼす  $^1\text{H}$  デカップリングの効果を図 1 に示す。A は非  $^1\text{H}$  デカップリング測定、B は  $^1\text{H}$  完全デカップリング測定による [1, 2, 3, 4, 5, 6- $^{13}\text{C}_6$ ] glucose の  $^{13}\text{C}$  NMR スペクトルである。 $^1\text{H}$  デカップリング測定では  $^1\text{H}$  による  $^{13}\text{C}$  シグナルの分裂がなくなり S/N 比が大きく向上し、スペクトル上のシグナルの形も単純になった。

通常、生体中の  $^{13}\text{C}$  濃度は低く、測定感度向上のためには  $^1\text{H}$  デカップリングが不可欠であると考えられる。著者らが用いた単一表面コイル型プローブによる  $^1\text{H}$  デカップリング測定においても、濃度の低い物質の測定感度向上がもたらされることがわかった。

## (2) 試料の位置

試料のコイルに対する位置と検出される  $^{13}\text{C}$  NMR シグナル強度の関係を図 2 に示す。PW 15

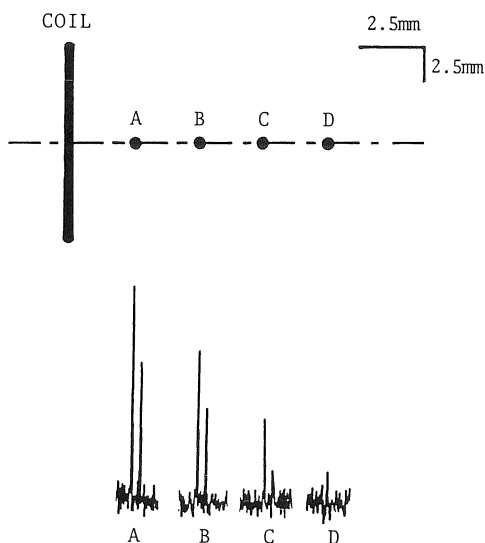


図 2 コイルからの距離と検出されたシグナル強度との関係。試料は 10% [1- $^{13}\text{C}$ ] glucose 20  $\mu\text{l}$  (FID 100 回積算)。コイル表面に近い部分のシグナルが強調される。

$\mu\text{s}$  ではコイル表面から離れるにつれて、シグナル強度が低下し、コイル表面から 10 mm ぐらいでは A の位置に比較してほとんど無視できる程度に小さくなった。このことは、ラットの頭皮上からの測定では頭皮からのシグナルを強く検出することを示している。頭皮を切除し、直接頭骨にコイルを密着させることによって、大脳では主に皮質からのシグナルを得ることができると考えられる。

## (3) ラット脳の $^{13}\text{C}$ NMR 測定

大腿静脈より [1- $^{13}\text{C}$ ] glucose 250 mg/kg を bolus で投与したときの 15 分毎の経時的  $^{13}\text{C}$  NMR スペクトルを図 3 に示す。投与前の天然存在比での  $^{13}\text{C}$  NMR スペクトルでは TMS (tetramethylsilane) を基準として、30 ppm 付近 (C-C 単結合)、60 ppm 付近 (C-N)、130 ppm 付近 (C=C 二重結合) そして 175 ppm 付近 (C=O) に脂質やタンパク質によるシグナルが検出された。[1- $^{13}\text{C}$ ] glucose 投与後速やかに 93 ppm と 97 ppm にそれぞれ  $\alpha$ -form と  $\beta$ -form の [1- $^{13}\text{C}$ ] glucose に帰属されるシグナルが検出され始め、15 分の測定では S/N 比もよく明瞭に検出された。このシグナルの強度は時間の経過とともに減少し、投与後 45~60 分の測定ではほとんど検出されなくなった。

一方、腹腔より [1- $^{13}\text{C}$ ] glucose 350 mg/kg を投与したときの経時的な  $^{13}\text{C}$  NMR スペクトルを図 4 に示す。投与後、[1- $^{13}\text{C}$ ] glucose のシグナルはしだいに増加し、30~60 分で最も強く検出され、その後ゆっくり減少し、静注時より強度は小さいものの、腹腔投与によっても比較的安定したシグナルが得られた。

このように、静注のみならず、腹腔投与によっても数十分の間、[1- $^{13}\text{C}$ ] glucose 測定が可能であり、脳虚血実験等との組み合わせも可能になるものと考えられる。ただ、投与された [1- $^{13}\text{C}$ ] glucose は血中や組織中グルコースの

$^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ 比を上昇させるが、同時に、血糖値を大きく上昇させる。すなわき、シグナルを検出している過程ではラットはかなりの高血糖状態にあると考えられる。この点では、血糖値を安定に維持するため持続注入<sup>7)</sup>等の投与方法も検討する必要があると思われる。

以上、単一表面コイル型 C-H デュアルプローブを用い、 $^1\text{H}$  デカップリング法により、静注のみならず腹腔より  $[1-^{13}\text{C}]$ -glucose を投与した

ラットの脳から  $^{13}\text{C}$  NMR スペクトルを測定し、 $[1-^{13}\text{C}]$  glucose シグナルの経時変化を観察することができた。今後、 $[1-^{13}\text{C}]$  glucose 投与による血糖値や  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  比の変化、また、循環動態への影響を併せ検索することにより、 $^{13}\text{C}$  NMR 法の脳代謝研究への応用について検討する予定である。

なお、本研究の一部は文部省科学研究費 (61480329) の助成を受けたことを付記する。

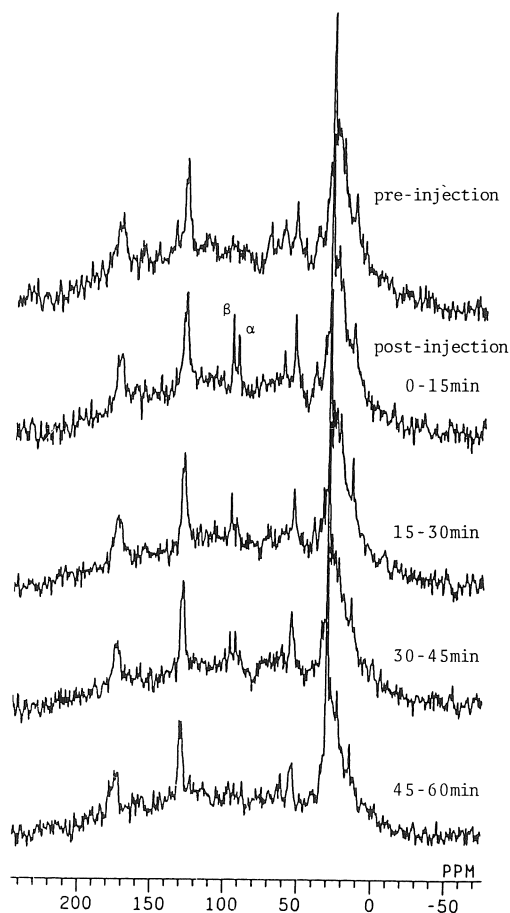


図3  $[1-^{13}\text{C}]$  glucose 250 mg/kg 静注によるラット脳 $^{13}\text{C}$  NMR スペクトルの経時変化 (FID 900 回積算).

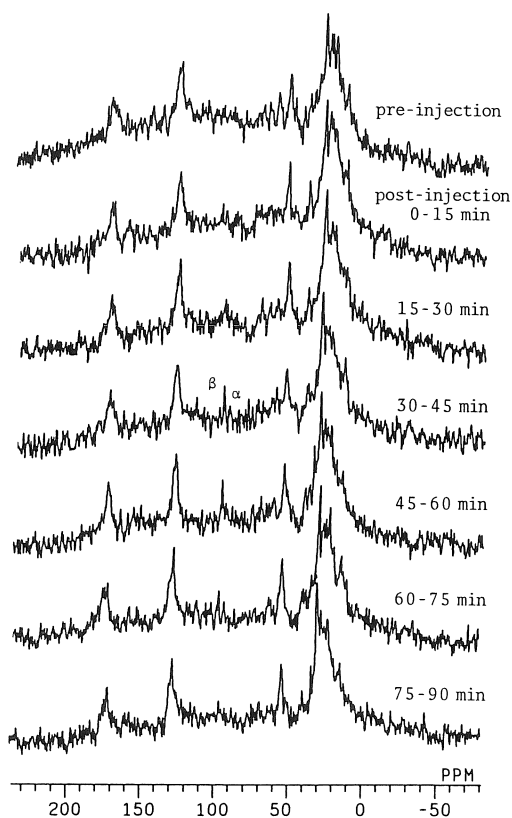


図4  $[1-^{13}\text{C}]$  glucose 350 mg/kg 腹腔投与によるラット脳 $^{13}\text{C}$  NMR スペクトルの経時変化 (FID 900 回積算).

## 文 献

- 1) J.R. Alger, L.O. Sillerud, K.L. Behar, et al.: In vivo Carbon-13 Nuclear Magnetic Resonance Studies of Mammals, *Science*, 214 : 660-662, 1981.
- 2) N.V. Reo, C.S. Ewy, B.S. Siegfried: High-Field  $^{13}\text{C}$  NMR Spectroscopy of Tissue in vivo. A Double-Resonance Surface-Coil Probe, *J. Magn. Reson.*, 58 : 76-84, 1984.
- 3) K.J. Neurohr, E.J. Barrett, and R.G. Shulman : In vivo Carbon-13 Magnetic Resonance Studies of Heart Metabolism, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80 : 1603-1607, 1983.
- 4) K.J. Neurohr, G. Gollin, J.M. Neurohr, et al.: Carbon-13 Nuclear Magnetic Resonance Studies of Myocardial Glycogen Metabolism in Live Guinea Pigs, *Biochemistry*, 23 : 5029-5035, 1984.
- 5) T.A. Cross, C. Pahl, R. Oberhansli, et al.: Ketogenesis in the Living Rat Followed by  $^{13}\text{C}$  NMR Spectroscopy, *Biochemistry*, 23 : 6398-6402, 1984.
- 6) M.E. Stromski, F. Arias-Mendoza, J.R. Alger, et al.: Hepatic Gluconeogenesis from Alanine :  $^{13}\text{C}$  Nuclear Magnetic Resonance Methodology for in vivo Studies, *Mag. Reson. Med.*, 3 : 24-32, 1986.
- 7) K.L. Behar, O.A.C. Petroff, J.W. Zrichard, et al.: Detection of Metabolites in Rabbit Brain by  $^{13}\text{C}$  NMR Spectroscopy Following Administration of [1- $^{13}\text{C}$ ] Glucose, *Mag. Reson. Med.*, 3 : 911-920, 1986.