



Title	P-31 MR spectroscopyによるブタ摘出保存肝臓の基礎的研究
Author(s)	根岸, 幾
Citation	日本医学放射線学会雑誌. 1993, 53(5), p. 551-558
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/15796
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

P-31 MR Spectroscopy によるブタ摘出保存肝臓の基礎的研究

埼玉医科大学放射線医学教室 (主任：平敷 淳子教授)

根 岸 幾

(平成 4 年 7 月 7 日受付)

(平成 4 年 10 月 9 日最終原稿受付)

P-31 MR spectroscopy of Excised Pig Liver

Chikashi Negishi

Department of Radiology, Saitama Medical School

Research code No. : 514

Key words : liver, P-31

MR spectroscopy, ATP, perfusion

This study used P-31 MR spectroscopy (P-31 MRS) to evaluate the viability of a pig liver preserved with perfusate. Pig liver was excised and preserved in cooled Euro-Collins solution after cannulation of the portal vein and perfusion with the solution. P-31 MRS was performed on a 1.5 Tesla machine. P-31 MRS showed that the β -peak of ATP in the preserved pig liver diminished within two hours. P-31 MRS of pig liver with perfusion of cooled and oxygenated Euro-Collins solution revealed a significant increase in the β -peak in the pig liver preserved 7 hr compared with that preserved for a longer time. Assessing the β -peak of ATP by P-31 MRS with cooled and oxygenated Euro-Collins solution is valuable to evaluate the viability of preserved pig liver.

はじめに

P-31 phosphorus magnetic resonance spectroscopy (P-31 MRS) は、生体および臨床研究の手法として大脳、心臓、肝臓、腎臓、角膜、筋肉などの高エネルギーリン酸化合物代謝の評価法やその過程の研究に応用されている¹⁾⁻³⁾。肝の viability の指標として高エネルギーリン酸化合物 (ATP, ADP, AMP, エネルギーチャージ) を用いることも報告されている⁴⁾⁻⁶⁾。そのために現在一般化されている酵素法では肝をホモジェネートしなくてはならず、臨床的には実践的でなく、かつ時間も要する。本報では酸素化ユーロ・コリンズ液による灌流にて肝臓の高エネルギーリン酸化合物の経時の変化を P-31 MRS にて調べ、

保存肝臓の viability の指標として本法の意義について検討した。

対象と方法

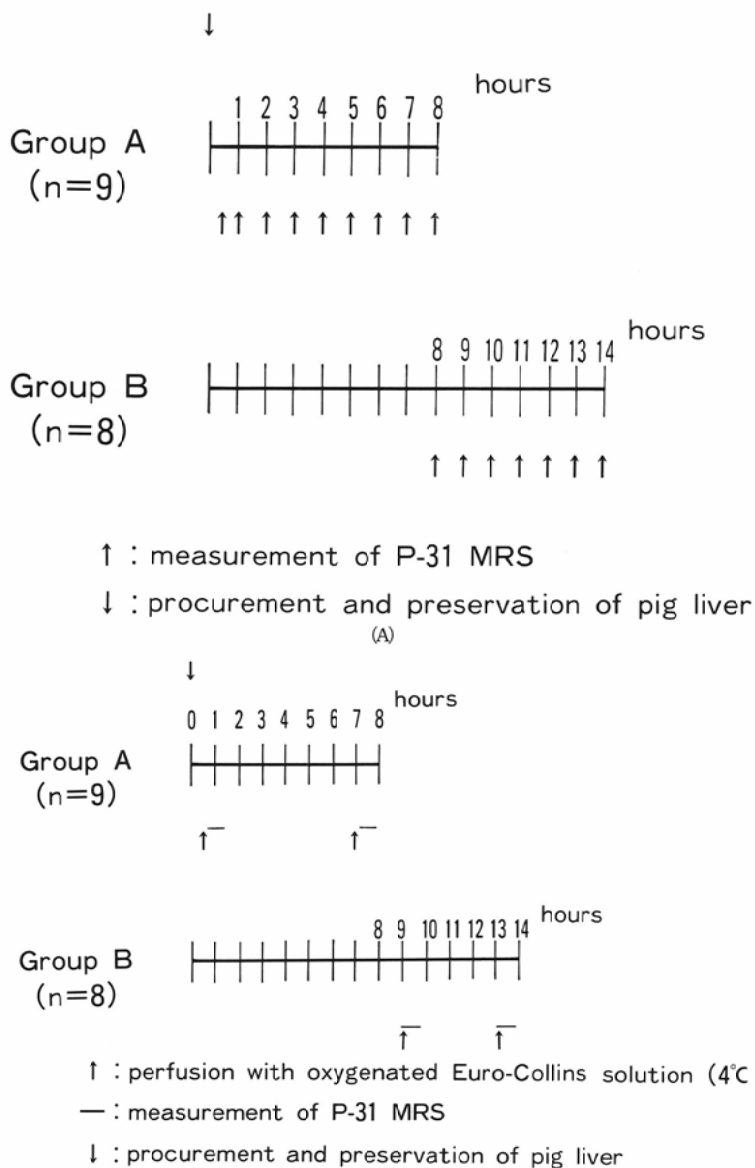
対象：体重は 15 から 20 kg の離乳後 1 から 3 ケ月の食用雑種ブタ雄雌を 22 頭用いた。そのうち 5 頭は摘出時温阻血を生じたか、摘出後 P-31 MRS がプロトコル通り完全に計測されなかったため除外した。プロトコルに一致した他の 17 例について検討した。

方法：2 日間絶食後のブタを、塩酸ケタミン 25 mg/kg の筋注とペントバルビタール 12 mg/kg を耳介静脈からの静注にて麻酔し、気管挿管後人工呼吸下にて実験を行った。開腹後脾静脈より門脈へカニューレを挿入留置、4℃乳酸リンゲル液

2000 ml を急速点滴し肝臓を灌流冷却した。用手にて肝臓が十分冷却されたことを確認し、灌流下にカニューレ留置のまま門脈および脾静脈を結紮離断した。上下大静脈は単純切除した。摘出後肝臓は直ちに氷水中に移し更に冷却し、門脈内カニューレより 4°C ユーロ・コリンズ液で灌流冷却した。

摘出肝臓を 2 つのグループに分け、冷阻血下にて P-31 MRS を計測した。グループ A (n=9) では肝臓は摘出直後から 7 時間まで、グループ B (n=8) は 8 時間の冷阻血後から 14 時間までの 1 時間毎に経時的 P-31 MRS を測定した (Table 1(A))。経時的測定に加え、グループ A およびグループ B の同一対象すべてに対して計測の始

Table 1 Protocol for P-31 MR spectroscopy of preserved pig liver
(A) P-31 MRS of the liver for ten minutes at every hour, (B) P-31 MRS during perfusion with cooled Euro-Collins solution for thirty minutes.



めと終わりの2回、酸素化4℃ユーロ・コリンズ液1000 mlで10分間灌流し、灌流中にP-31 MRSを30分間施行した (Tab. 1(B))。灌流時の計測としては、グループAでは摘出後30分と7時間後に、グループBでは9時間後と13時間後に測定した。肝臓は各グループとも全ての計測が終了するまで、ポリエチレンの保存袋にユーロ・コリンズ液を満たし、袋ごと氷水中にて保存した。1頭のブタにおいて、経時的に肝臓の一部を1g切除し、ホモジェネート後酵素法にて高エネルギーリン酸化合物を測定し、P-31 MRSによる値と対比した。肝組織は切除後2秒以内に液体窒素にて冷却した。

実験装置は静磁場強度1.5 Tesla Siemens社製Magnetom H 15 SP、直径8 cmのP-31用表面コイルを用いた。水素によるシミング後信号は90°パルスによる自由誘導減衰法 (FID) にて収集した。共鳴周波数は25.74 MHz、パラメータは繰り返し時間3秒、収集データ数2048、周波数幅2000 KHz、加算回数32回である。経時的測定は1回、灌流時は18回の計測を施行した。ただし灌流時の計測結果の統計処理のために最初の6回、次の6回、最後の6回のFIDを加算しそれぞれ開始から10分間、次の10分間および最後10分間の3つのスペクトルとした。

得られた自由誘導減衰は10 Hzのウィンドウ関数を乗算し高速フーリエ変換した。位相補正後、Hanningによるスムージングを行いスペクトルのピークを観察した。参照を無機リンピークとし、各ピークの化学シフト δ を計測した。pHは下記の式を用い、ホスホクレアチニンリン酸とATPの β ピーク間の化学シフトを17.51 ppmとして計算した⁷⁾。

$$\text{pH} = 6.77 + \log\{(\delta - 3.29) / (5.68 - \delta)\}$$

各ピークの積分値 (面積) を計測し、各々の値の無機リンに対する積分比を求め時間軸にプロッ

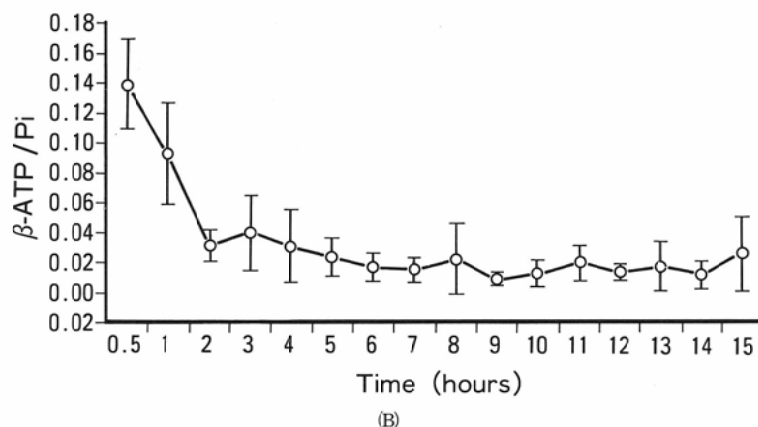
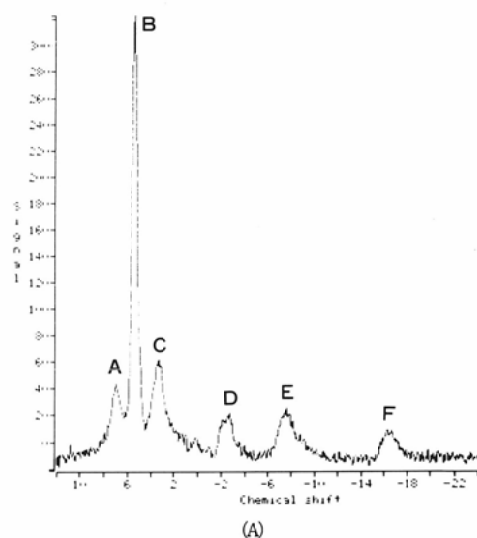


Fig. 1 P-31 MRS of preserved pig liver: (A) P-31 spectrum of the excised pig liver and (B) chronological change in the ratio of β -ATP peak to Pi peak. Peaks represent: A=phosphomonoester (PME), B=inorganic phosphate (Pi), C=phosphodiester (PDE), D=gamma peak of ATP, E=alpha peak of ATP, and F=beta peak of ATP

トした。上記の化学シフト値、各ピークの積分比（面積比）を時間軸にプロットした。統計学的考察は、まずそれぞれの灌流群内の経時的变化について有意差の有無を調べるために F 分布を用いた multiple measures analysis of variant を行った。すべてに灌流後 β ピークの増加に有意が認められたため、各灌流群間に有意差がないとし仮

説を立て F 分布を用いた分散分析を行った⁸⁾。次いで有意差が認められた場合には、各灌流群 2 組ずつに分けて paired t test を行った。

結 果

1. 経時的な計測で、ATP の β ピークの Pi に対する面積比は、肝臓摘出後 2 時間で初期値の 78% に減少し、4 時間から 5 時間ではスペクトル

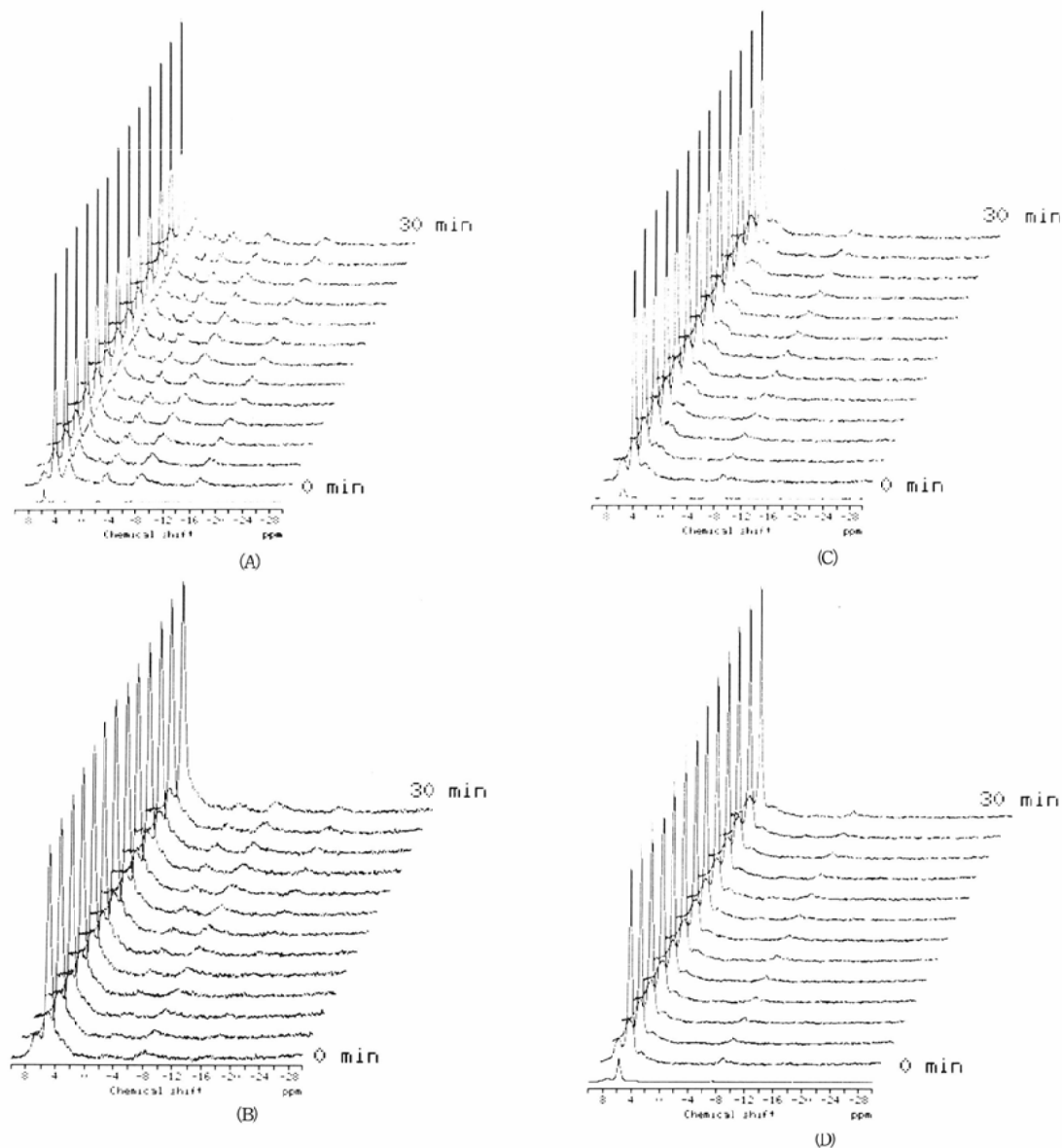


Fig. 2 P-31 MR spectra of the pig liver during perfusion with cooled and oxygenated Euro-Collins solution: (A) preserved at one hour, (B) at seven hours, (C) at nine hours, and (D) at fourteen hours.

として認められなかった (Fig. 1(A), 1(B)).

2. 酸素化ユーロ・コリンズ液 (4°C) による灌流では (Fig. 2(A)–2(D)), ATP の β ピーク

と無機リンとの面積比は, グループ A の 30 分後で有意な減少 ($P < .01$) を, 7 時間後で有意な増加 ($P < .05$), グループ B の 9 時間後 ($P < .01$)

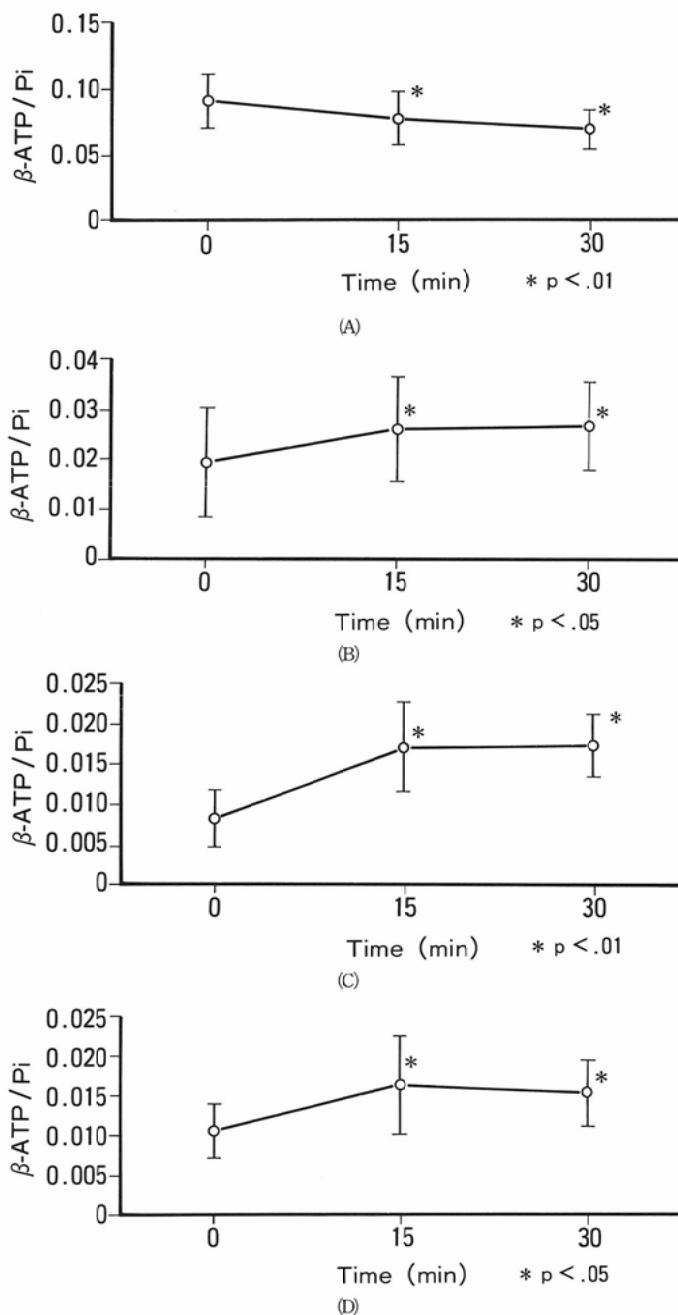


Fig. 3 The ratio of β -ATP peak to P_i peak before and after perfusion with cooled Euro-Collins solution: (A) preserved at one hour, (B) at seven hours, (C) at nine hours, and (D) at fourteen hours.

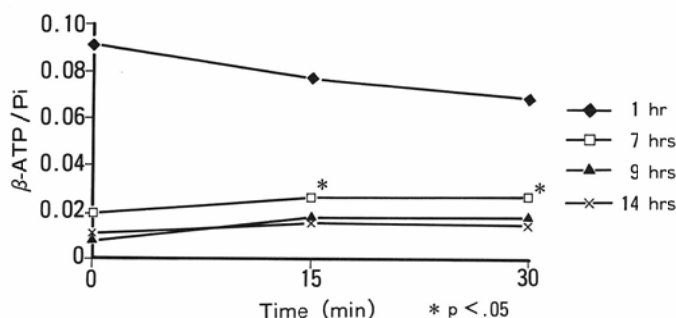


Fig. 4 Significant increase in the ratio of β -ATP peak to Pi peak at seven-hour preservation in comparison to the increase at longer preservation times

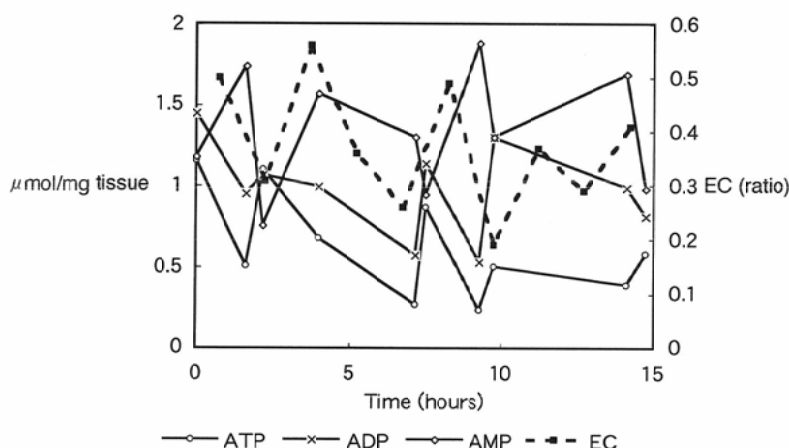


Fig. 5 The concentration of phosphorus metabolites in the preserved pig liver at every hour. Adenosine triphosphate (ATP), adenosine diphosphate (ADP), adenosine monophosphate (AMP), and energy charge (EC). $EC = (ATP + ADP) / (AMP + Pi)$

と14時間後 ($P < .05$) で有意な増加が認められた (Fig. 3(A)–3(D)). グループ A の7時間後, グループ B の9時間後と14時間後の各3者を比較するとグループ A の7時間後はグループ B の9時間後と14時間後に比べその増加の程度は有意に高かった ($P < .05$) (Fig. 4).

3. 酵素法による切除肝組織中 ATP, ADP の濃度およびエネルギーチャージは経時的な減少がみられた. 逆に AMP は増加傾向を示した (Fig. 5). 酸素化ユーロ・コリンズ液 ($4^{\circ}C$) による灌流では酵素法による ATP, ADP の濃度

およびそれらの計算値であるエネルギーチャージの値は灌流直前に比べ増加した. 灌流に対する ATP, ADP およびエネルギーチャージの増加量は保存時間の短いものほど大きかった.

4. 経時的および灌流時の P-31 MRS 計測にて肝組織の pH に大きな変化は認められなかった.

考 察

肝移植時の viability に影響を与える因子として, 摘出時の温阻血の有無, 保存時間, および保存液の3つが挙げられる. 温阻血とは正常体温で

組織が突然阻血された状態をさし、正常の活動状態にある細胞に対し突然酸素供給が無くなるため細胞障害は短時間で起こり程度も強い。これに対し組織をあらかじめ灌流液で冷却し細胞の活動を一時休止させ、酸素必要量を減少させてから阻血すると細胞障害の発生を遅らせることができる。従って今回の実験は冷阻血でおこなった。移植肝の生着率を左右する最大の因子として摘出から移植までの保存時間が挙げられるが、肝臓移植実験では摘出冷却保存後6時間と12時間とで有意の差を認めた報告がある^{4)~6)}。従って実験モデルには肝摘出後6時間から14時間までを選んだ。摘出肝の保存液は死体腎保存液として一般的であるユーロ・コリンズ液を用いた。

ユーロ・コリンズ液とはリン酸を緩衝液とした高カリウム濃度の細胞内液組成であり、虚血時に細胞膨化による細胞膜障害を防ぐためにブドウ糖を加えた高張液である。細胞内液組成の液体で細胞外液をおきかえ濃度勾配をなくし、細胞膜のATP依存のナトリウム-カリウムポンプによるエネルギー消費をおさえる液体である。ユーロ・コリンズ液中のリンは H_3PO_4 の形で存在し、P-31 MRSで認められたリンのピークは細胞外液に存在する H_3PO_4 由来である。経時のおよび灌流時の実験共にpHは変化はなかった。

我々のP-31 MRSによる計測では、ATPの β ピークは肝臓摘出後2時間以内で急激に減少し、酵素法によるATPの実測値でも同様に減少していた。灌流では摘出後7時間後のATP実測値は摘出時の値の77.4%以上まで回復したが、P-31 MRSでは摘出時の β ピークの値に対して18.7%であった。実際の肝細胞中のATPの濃度の増加はP-31 MRSで測定された増加分よりも大きかったことになる。Murphyらによると肝の全ATPのうち細胞質内のATPはP-31 MRSにて観察され得るが、ミトコンドリア内のATPは測定できないと結論している⁹⁾。とすれば、酸素化ユーロ・コリンズ液による灌流は肝細胞の細胞質よりはミトコンドリア内のATP増加に寄与しているといえる。移植実験では、摘出冷却保存後6時間と12時間とで肝のviabilityに有意の差を認

めており^{4)~6)}。今回の実験で経時的なP-31 MRSではATPの β ピークは2時間で減少するので実際のviabilityの指標になるとは考えにくい。摘出保存時間7から14時間では、灌流によるATPの β ピークの上昇が認められており、摘出後7時間とそれ以降では β ピークの上昇の程度に有意差がある。灌流による β ピークの上昇に着目することで摘出保存肝のviabilityの評価が可能になると考えられる。 β ピークの上昇の機序としては、酸素化冷却ユーロ・コリンズ液での灌流によって供給された酸素により乳酸解糖系に留まっていた過程がTCAサイクルに進み新たなATPが産生され、細胞質内に補給され、灌流前では観測できなかった β ピークが認められるようになったと考えられた。Fig. 3(A)で摘出1時間後の灌流のみP-31 MRSの減少を認めたが理由はわからない。

データ上 β ピークの変化が1~3%とわずかであるが、統計的有意差が認められたので、この実験手法が“可能”である。ただし実験手技の煩雑さ、実際の移植前の保存肝臓でP-31 MRSを施行するだけで時間的余裕が、ユーロ・コリンズ液による保存では制限されるので、“実用性”は時間的余裕のある場合に限られる。

P-31 MRSは肝に直接侵襲を加えることなく肝細胞のATPの活性を捉えられ、かつ保存時間によるviabilityの差の評価を可能とし定量化の可能性が示唆された。皮膚、腹壁筋肉と肋骨からのリン信号を防ぐvolume-selected P-31 MRSを併用すれば、臨床肝移植後の経過観察および予後評価に大きな可能性を発揮すると考えられる。

ま と め

P-31 MRSによると、摘出保存肝のATPの β ピークは約2時間で消滅する。酸素化冷却ユーロ・コリンズ液の灌流により摘出7時間後とそれ以降でATPの β ピークの上昇に有意差が認められた。P-31 MRSと酸素化冷却ユーロ・コリンズ液を用いて灌流による β ピークの上昇に着目すると摘出保存肝のviabilityが評価でき、非侵襲的な点において本法の存在意義、発展性があると考えられた。

本論文の主旨は第 50 回日本医学放射線学会総会（平成 2 年 4 月 7 日，神戸），第 16 回磁気共鳴学会（平成 2 年 9 月 20 日，名古屋）及び第 51 回日本医学放射線学会総会（平成 3 年 4 月 9 日，京都）で発表した。

謝 辞

ご指導，ご校閲を賜りました恩師平敷淳子教授に深謝致します。また，実験手技をご指導下さった東京警察病院外科の星野高伸先生に深謝します。さらに本研究にご協力戴いた山崎富雄技師，山口和弘技師，成田政広技師に感謝致します。

文 献

- 1) Pettegrew JW: NMR: Principles and Applications to Biomedical Research. 1989, Springer Verlag, New York
- 2) Gorenstain DG: Phosphorus-31 NMR Principles and Applications. 1984, Academic Press, New York
- 3) Gardian DG: Nuclear Magnetic Resonance and Its Applications to living systems. 1982, Oxford University Press, London
- 4) Hoshino T, Maley WR, Stump KC et al.: Evaluation of core cooling technique for liver and kidney procurement. *Transplant Proc* 19: 4123-4128, 1987
- 5) Hoshino T, Koyama I, Nagashima N, et al.: Liver transplantation from non-heart beating donors by core cooling technique. *Transplant Proc* 21: 1206-1208, 1989
- 6) Hoshino T, Maley WR, Labs JD et al.: Core cooling technique is superior to flush techniques for liver procurement. *Transplant Proc* 21: 3517-3518, 1989
- 7) Welch KMA: P-31 in vivo spectroscopy of the adult human brain. (In) Pettegrew JW ed: NMR: Principles and Applications to Biomedical Research. 429-467, 1989, Springer Verlag, New York
- 8) Glantz SA: Primer of biostatistics 2nd ed. 245-286, 1987, McGraw Hill, Inc., New York
- 9) Murphy E, Gabel SA, Funk A, London RE.: NMR observability of ATP: Preferential Depletion of Cytosolic ATP during Ischemia in Perfused Rat Liver. *Biochemistry* 27: 526-528, 1988