



Title	豚摘出保存肝を用いたProton magnetic resonance spectroscopy (1H-MRS)
Author(s)	田村, 綾子
Citation	日本医学放射線学会雑誌. 1996, 56(4), p. 183-186
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/19191
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

豚摘出保存肝を用いた Proton magnetic resonance spectroscopy (^1H -MRS)

田村 綾子

埼玉医科大学放射線医学教室 (主任: 平敷淳子教授)

Proton Magnetic Resonance Spectroscopy of Excised Pig Liver

Ayako Tamura

After evaluating ex vivo pig liver by ^1H magnetic resonance spectroscopy (^1H -MRS) using a 1.5 Tesla superconducting unit, the assignment of peaks was reevaluated in vitro using a 9.4 Tesla superconducting unit.

The portal vein was cannulated and perfused by cooled Euro-Collins solution, and pig liver was removed and preserved in the solution. Five to 8 g of the liver was excised before and after preservation, then extracted by perchloric acid (PCA).

In ^1H -MRS of PCA extracted pig liver, large peaks of fatty acid disappeared, while peaks of the choline group from 3.2–3.3 ppm were clearly observed.

Using high performance liquid chromatography (HPLC) and ^{31}P (phosphorus)-MRS, the 3.23 ppm peak was determined as glycerophosphorylcholine (GPC), which diminished after preservation.

The chronological change of GPC in PCA extracted pig liver was able to be observed by ^1H -MRS.

GPC peak may play a role as an indicator in evaluating preserved liver by ^1H -MRS.

はじめに

組織中の代謝物質を非侵襲的に測定することができる Magnetic Resonance Spectroscopy (MRS) の中でも, ^1H (proton) は感受性に優れ, 高い空間分解能を持つ核種で¹⁾主として脳疾患の診断や治療効果の判定に応用されている. 肝の ^1H -MRS は, 脂肪の高い信号のため通常使用されている 1.5T の臨床装置では他のシグナルが得にくく, ^{31}P -MRS による高エネルギーリン酸化合物代謝の評価¹⁾や, ^1H を用いた T1, T2 緩和時間測定による viability の評価^{2), 3)}に比して, ^1H -MRS の普及度は低い. 今回, 豚摘出保存肝を過塩素酸 (Perchloric acid, PCA) にて抽出し, その抽出物の ^1H -MRS を高磁場装置にて測定した. さらに保存前後のピークの変化を考慮し, 特に choline group のピークの同定を行った.

対象と方法

体重約 20kg の食用雑種豚 (メス) 3 頭を対象とした. 2 日間絶食後の豚を, 塩酸ケタミン 25mg/kg の筋注, ネンブタール 20–25mg/kg 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キュレを挿入留置し, 0°C 乳酸リンゲル 500ml, 続いて 0°C Euro-Collins 液 1000ml を急速静注した. 点滴下に, カニキュレ留置のまま門脈および脾静脈を結紮切除した. 上下大静脈は単純切除した. 摘出肝は, Euro-Collins 液を満たしたポリエチレンの保存袋に入れ, 0°C にて保存した. 摘出直後および 24 時間後に肝の一部を 5–8g 切除し, 直ちに液体窒素にて冷却凍結した. 凍結サンプルは -84°C にて保存した. 凍結保存肝から 2.5g ずつ測り取り, 液体窒素下に 0.5M 過塩素酸 12.5ml にて抽出した. 抽出時, MRS 測定時の内部基準として, 40mM/l の 3-(trimethylsilyl)propionic-2, 2, 3, 3- d_4 acid (TSP) 250 μl を加えた. その混合物を 4°C , 10000rpm, 15 分間遠心し, 上清をとり potassium bicarbonate (炭酸水素カリウム) にて中和した. 再び室温で, 2000rpm, 5 分間, 遠心した. 上清を, 10g の Chelex-100 (Bio-rad) を水に分散したカラムに加え, 水で溶離した. この溶離液を凍結乾燥し, 得られたサンプルの全粉末を 0.5ml の D_2O で溶かし, ^1H および ^{31}P -MRS

Research Code No. : 514

Key words : Liver, ^1H , Glycerophosphorylcholine
magnetic resonance spectroscopy

Received Sep. 7, 1994 ; revision accepted Feb. 22, 1995
Department of Radiology, Saitama Medical School

を測定した。¹H-MRSは、日本電子株式会社(JEOL)JNM-EX400(9.40T)にて測定した。5mm径のNMR tubeを用い、観測周波数は400MHz、パルス角45度、パルス間隔7秒、32Kデータポイントにてデータ収集を行った。加算回数32回、測定時間は約4分であった。³¹P-MRSはJNM-EX270(6.35T)を用いた。観測周波数は109MHz、パルス角45度、パルス間隔2秒、16Kデータポイントとした。積算回数256回、測定時間は約9分。³¹P-MRS測定時、外部基準としてphosphocreatine(Pcr)を加えた。測定時、各サンプルのpHは、8.2-8.8とアルカリ性を示していた。MRSで得られた各スペクトルは面積計算にて比較した。ピークの同定のために、同サンプルのHigh Performance Liquid Chromatogram(HPLC)を測定した。測定装置にはCLASS-LC10A(島津)を用い、検出器は示差屈折計(Waters R401)である。各サンプル10 μ lを40℃のPartisil 10 SCX(Whatman, Clifton, New Jersey)カラム(4.6mm $\times$ 25cm)に注入した。溶離液は5mM NH₄H₂PO₄(pH 2.4)を用いた。分析条件は、chart speed 1cm/min, flow rate 1.0ml/minとした。

結 果

摘出直後および24時間後の¹H-MRSを示す(Fig.1)。3.2-3.3ppmの間に2-4個のピークを認めた。3.23ppmに認めら

れたピークは、24時間保存後減少した(ピークX)。3頭の減少率は平均46%であった。さらにHPLCにてサンプルを測定すると、保持時間6.60分に24時間保存後に減少するピークが得られた(Fig.2)。

3.2-3.3ppmの間のピークはcholine groupと同定されており⁴⁾、主に glycerophosphorylcholine(GPC), phosphorylcholine(PC), carnitine(CA), choline(CHO)によるピークと考えられている³⁾。そこでこれらの溶液をHPLCにて測定すると、GPC 6.60分、PC 6.65分、CA 17.05分、CHO 3.52分にピークを認めた。抽出したサンプルにGPC、PCをそれぞれ加えてHPLCを測定すると、いずれの場合も6.60分のピークに一致して上昇を認めた。このことより、保存によって減少するピークは、両者のどちらかであると考えられた。

そこでGPCとPCとの同定のために、抽出したサンプルの³¹P-MRSを測定した(Fig.3)。これまでに報告された、肝組織の³¹P-MRSで得られるピークにもとづいて各ピークを同定し、保存前後で比較した⁴⁾。24時間保存後では摘出直後に比べ、GPCは減少し、PCは軽度上昇した。

以上より、保存によって減少するピークはGPCと考えられ、抽出したサンプルにGPC(商品名 glycerophosphorylcholine phosphodiesterase, SIGMA, MW 257.2)を0.57 μ M加えて¹H-MRSを測定した。その結果

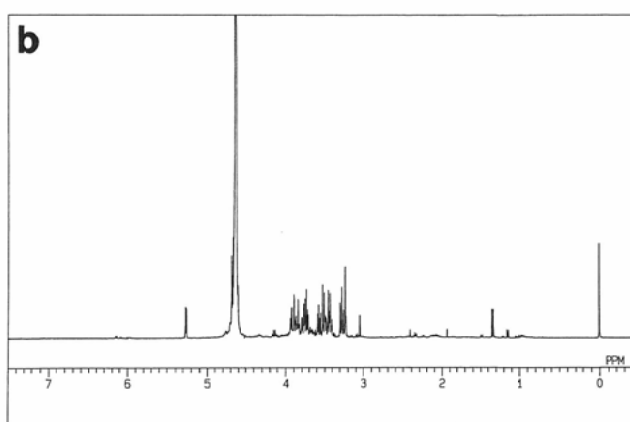
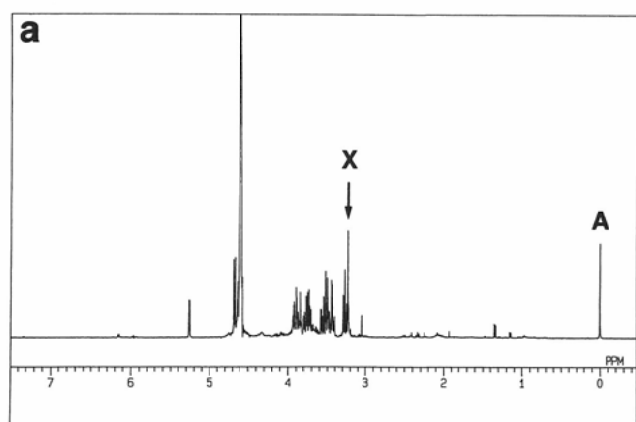


Fig.1 ¹H-MRS of perchloric acid (PCA) extracted pig liver : (a) ¹H spectrum of excised pig liver. (b) ¹H spectrum of 24-hours-preserved pig liver. Peak X at 3.23ppm diminished after preservation for 24 hours in cooled Euro-Collins solution. Peak A represents 3-(trimethylsilyl)propionic-2, 2, 3, 3-d₄ acid (TSP) as reference.

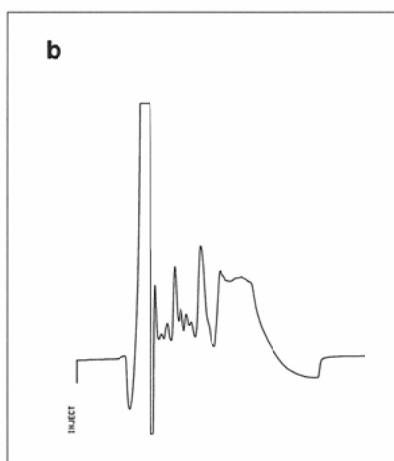
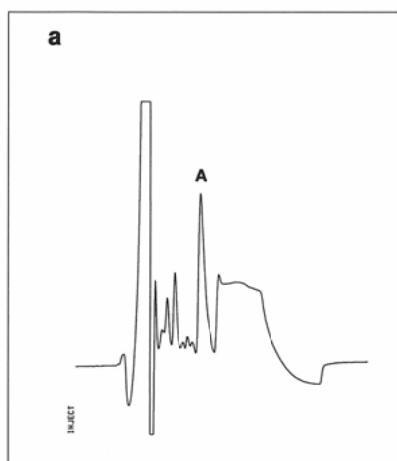


Fig.2 High performance liquid chromatogram (HPLC) of PCA extracted pig liver : (a) HPLC of excised pig liver. (b) HPLC of 24-hours-preserved pig liver. Peak A is at 6.60 minutes of retention time. The peak decreased after preservation for 24 hours.

3.23ppmのピークの上昇が認められた(Fig.4).

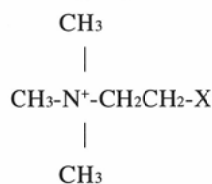
GPC, PCの溶液の¹H-MRSを測定すると, それぞれ, 3.23ppm, 3.22ppm, にピークを認めた. また, GPCとPCとの混合溶液の¹H-MRSを測定すると, 両者は分離が可能であった(Fig.5).

考 察

豚摘出保存肝サンプルの¹H-MRSにて, 3.2ppm-3.3ppmに認められるピークはcholine groupのピークであるというこ

とはすでに知られている⁴⁾. 今回, 摘出保存肝において, 保存中に変化する3.23ppm(ピークX)のピークの同定を行った.

Choline groupは,



という構造を有し⁵⁾, 主にGPC, PC, CA, CHO等が考えられる. これら4種の物質は, Xの位置が異なるのみであるた

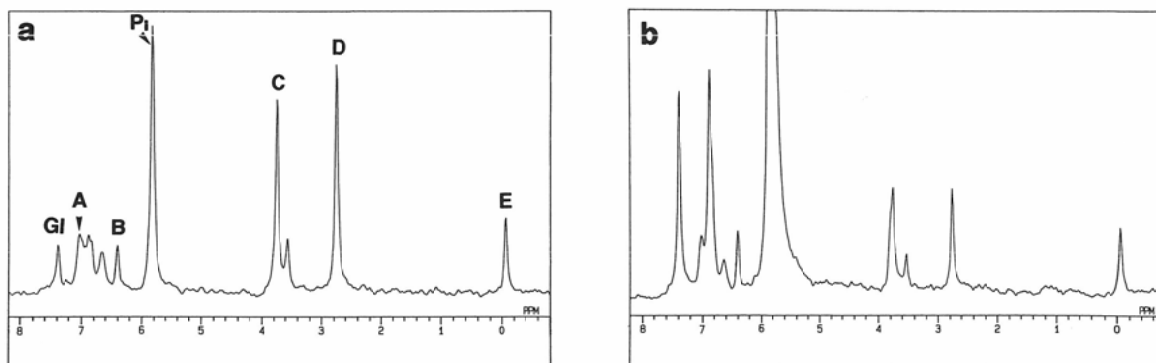


Fig.3 ³¹P MRS of PCA extracted pig liver, PME and PDE region. : (a) ³¹P spectrum of excised pig liver. (b) ³¹P spectrum of 24-hours-preserved pig liver.

Peaks represent : Gl = *sn*-Glycerol 3-phosphate, A = Phosphorylethanolamine, B = Phosphorylcholine, Pi = inorganic phosphate, C = Glycerophosphorylethanolamine, D = Glycerophosphorylcholine, E = Phosphocreatine as reference. In peaks of choline group, peak D decreased after preservation for 24 hours. Peak B increased slightly after preservation.

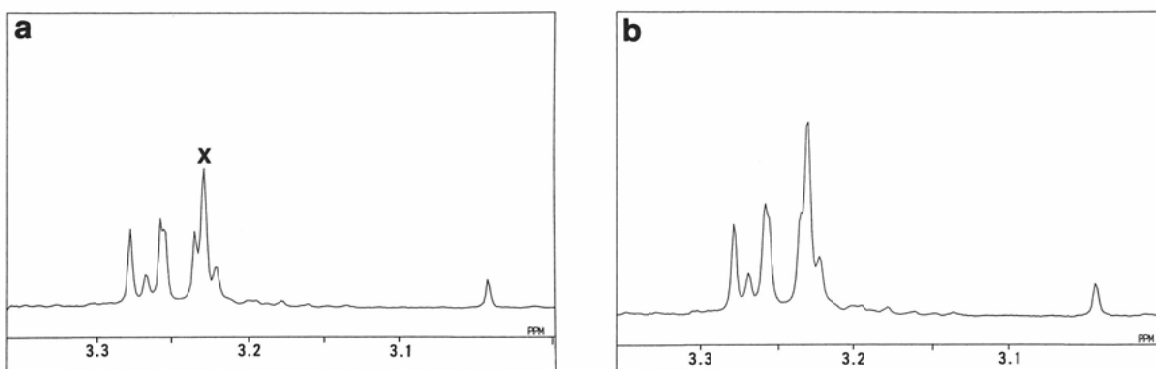
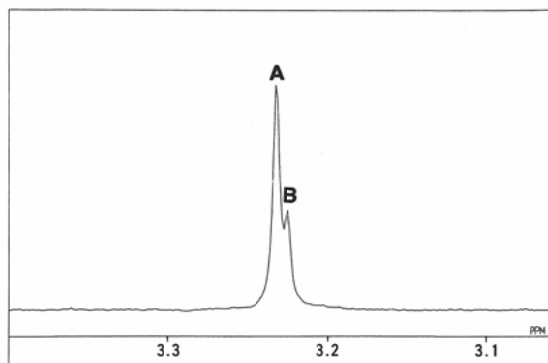


Fig.4 ¹H MRS of PCA extracted pig liver, choline group region : (a) ¹H spectrum of preserved pig liver. (b) ¹H spectrum of preserved pig liver added glycerophosphorylcholine (GPC, 0.00072 μM). X corresponds to peak X in Fig.1. Peak X increased after adding GPC.

Fig.5 ¹H MRS of mixture of GPC and phosphorylcholine (PC): Two peaks are presented closely together. They can be defined as another peak when the mixture is composed only by pure GPC and pure PC. Peaks represent : A = GPC, B = PC



め、¹H-MRSでは近接したピークを持ち、分離は困難である。

そのため、まずHPLCにて、抽出したサンプルおよびこれらの溶液を測定した。サンプルの測定結果、保持時間6.60分に保存後減少するピークを認め、¹H-MRS上ピークXを示す物質と考えた。Choline groupの4種の物質の溶液についてそれぞれHPLCを測定し、GPC 6.60分、PC 6.65分にピークを得た。CHO 17.05分、CA 3.52分のためピークXとしては除外し、サンプルにGPC、PCをそれぞれ加えて再びHPLCを測定した。いずれの場合も6.60分のピークが上昇し、HPLCではピークXはGPC、PCのどちらかであるという結果になった。

これらの2種の物質は³¹P-MRSでは明瞭に区別されるため、サンプルの³¹P-MRSを測定した。保存前後の³¹P-MRSを比較すると、GPCが減少、PCが上昇し、保存によって減少するピークはGPCと考えられた。なお、その他sn-Glycerol 3 phosphate (7.4ppm) inorganic phosphate (5.8ppm)らの保存によって増加するピークに関して今回は特に検討は加えなかった。虚血によって増加するといわれているが、増加の機序の解明は十分ではなく、今後の課題と思われる。

さらにピークXの確認のために、サンプルにGPCの溶液を加えて¹H-MRSを測定した。Fig.4に示すごとく、3.23ppmのピークが上昇した。GPCの定量的評価や測定中の分解の有無について等、今後さらなる実験が必要と思われるが、以上より、ピークXはglycerophosphorylcholineと同定した。

ただし、¹H-MRSではGPCとPCのピークは近接するため、ピークXがGPCのみのものか疑問が残る。実際に、GPCとPCそれぞれの溶液の¹H-MRSを測定するとGPC 3.23ppm、PC 3.22ppmにピークを認め、混合液の¹H-MRSでは両者は分離して認められた。摘出保存肝から得られた抽出液サンプルの¹H-MRSでは、3.23ppmと3.22ppmとの2つのピークが分離して認められることは少ない。しかし、頻度は少ないながらも両者のピークを分離できることがあるということは、多くの分離不可能な場合においては、GPCとPCのピークを同時に見ていると思われる。これは主として、測定時のpHが関与しているものと思われる。今回の実験では、抽出時の中和にpotassium bicarbonateを用いており、液体を固体で中和したため、中和時に溶解が不完全だったと思われる、¹H-MRS測定時にはサンプルはアルカリ性を示した。前

出のGPCとPCとの標準物質混合溶液のpHは未測定であり、pHによるピークの分離の可否については今後検討を加えたい。さらに人正常肝では、GPCとPCの存在比は約15:1 (2.46:0.17)の割合であり⁴⁾、PCの絶対量の低さからも、PCのピークを分離しがたい要因となっていると考えられる。しかし、GPCに対しPCはごく少量であるので、両者のピークを同時に見ているとしても、3.23ppmのピークにPCは大きな影響は与えないと思われる。

肝においてGPC、PCはそれぞれ細胞膜リン脂質の分解、生成に関与しており、これらの変化は、細胞膜の合成、分解を反映するといわれている⁴⁾。単純浸漬保存肝の障害として細胞膜の透過性亢進による障害が⁶⁾いわれているが^{6), 7)}、これらの物質の変化が肝の細胞膜レベルでの変化を示唆できないだろうか。高感度、高分解能の¹H-MRSを用いて保存肝の状態がとらえられれば、より短時間で保存肝の評価が可能となると思われる。現在、摘出肝の保存温度を0℃、36℃とし、主としてGPCを中心に、経時的变化をとらえる実験を行っている。保存状態によって、GPCやその他のピークがどのように変化するのか、またそれらを¹H-MRSでどの程度とらえられるのか、検討をすすめたい。

結 語

1. 正常食用豚の摘出保存肝を、PCAにて抽出し、抽出物の¹H-MRSを9.4Tの高磁場装置を用いて測定した。
2. 保存前後の¹H-MRSを比較し、3.2ppm-3.3ppmに認めるcholine groupのピークの同定を行った。
3. 3.23ppmに得られたピークは主にglycerophosphorylcholineと同定した。このピークは0℃24時間保存後、平均46%減少した。
4. Phosphorylcholineは3.22ppmにピークを持つが、測定時のpHの違いによって、GPCと重なって認められることが多く、常に完全に分離することは困難であった。

稿を終えるに当たり、ご指導、ご校閲を賜りました平敷淳子教授に深甚なる謝意を表します。また終始ご指導いただきました埼玉医科大学化学教室 矢野一行教授、第一外科学教室 小山 勇助教授に心より深く感謝いたします。

文 献

- 1) 根岸 幾: P-31 MR Spectroscopyによるブタ摘出保存肝臓の基礎的研究。日本医放会誌 53: 551-558, 1993
- 2) E Moser, P Holzmüller, H Reckendopfer, et al: Cold-preserved rat liver viability testing by proton nuclear magnetic resonance relaxometry. Transplantation 53: 536-540, 1992
- 3) BJ Soher, JC Chatham, PB Barker: In vivo proton NMR spectroscopy of the human liver. Proceedings of the Society of Magnetic Resonance in Medicine 1: 87, 1993
- 4) Jimmy D, I Jane, Janet Sargetoni, et al: A 31P and 1H-NMR investigation in vitro of normal and abnormal human liver.

Biochim Biophys Acta 1225: 71-77, 1993

- 5) 藤野安彦: 生物化学実験法9 脂質分析法入門。14-16, 学会出版センター
- 6) Pierre-Alain C, P Robert C, Steven M: Preservation and reperfusion injuries in liver allografts. Transplantation 53: 957-978, 1992
- 7) 鈴木伸一, 近藤治郎, 井元敬二, 他: ラット分離肝細胞保存; Eurocollins液とUniversity of Wisconsin液の比較検討。移植 28: 419-428, 1993