

766

多核種MRスペクトロスコピーによる
移植臓器の非侵襲的代謝解析



(80261410)

平成8年度～平成9年度科学研究費補助金（基盤研究(C)(2)）研究成果報告書

平成10年3月

研究代表者 棟方 隆
(旭川医科大学医学部助教授)

I. はしがき

1) 研究の目的と意義

近年欧米を中心に移植治療が積極的に行われ、その生存率も上昇してきたが、Primary Non-functionやドナー不足などが大きな問題となっている。非常に近い将来、我が国でも移植治療の普及が見込まれるが、上記問題はさらに深刻化することが予測される。従って有効な移植治療の普及には、いかにして移植に適する臓器を判定するか、また移植後の生着や機能発現状態を把握するかが重要な課題である。しかし現状では、生検による組織学的検査や間接的生化学的手法が用いられているに過ぎず、臓器から直接かつ非侵襲的に行える手法の出現が待望されている。一方、近年磁気共鳴分析法(MRS)が非侵襲的な代謝解析手段として臨床医学分野にも応用され、疾患

特有の脳代謝状態や虚血再灌流におけるエネルギー代謝変動の解析など相次いで報告され、我々も早期よりこの分野の研究に従事してきた。MRSの直接かつ非侵襲的に代謝解析ができるという利点は、臓器移植治療における解析手段として最適でありその応用が期待される。現在までのMRSの医学応用は主に ^1H 及び ^{31}P 核種が用いられてきた。しかし本来MRSはより多面的解析が可能であり、緩和時間、 ^{13}C 、 ^{23}Na 、 ^1H 及び ^{31}P -MRSが移植治療のモニター法として応用可能である。本研究の目的は、1)臓器保存に伴う緩和時間の変化、 ^1H -MRSによる乳酸の蓄積状態の解析、 ^{13}C -MRSによる糖代謝解析及び ^{23}Na -MRSによる細胞内外のNa勾配など従来にない移植臓器のviability判定法を開発すること、及び2)移植後のin vivoの状態では ^{13}C 、 ^{23}Na 、 ^1H 及び ^{31}P -MRSを用い臓器特有の機能発現と生着拒絶との関連を検討することである。

このように本研究では、今まで検討されていなかった組織の浮腫によって変化する緩和時間、嫌気性代謝で蓄積される乳酸、細胞膜の変化を反映する細胞内外Na勾配等を多核種MRSを用いて解析し、保存臓器のViability判定を行い、さらに移植された臓器から直接的に糖代謝、Na代謝及びエネルギー代謝を解析し、その生着や拒絶との関連性を検討することに重要な意義を持つ。

2) 研究組織

研究代表者：棟方 隆（旭川医科大学医学部助教授）

研究分担者：稲垣光裕（旭川医科大学医学部助手）

3) 研究計費

平成8年度 1、200千円

平成9年度 600千円

計 1、800千円

4) 研究発表

ア. 学会誌等

① Yasunori NISHIDA, M.D., PH.D., Kunio TANAKA, PH.D., Takashi

MUNAKATA, M.D., PH.D., and Shinichi KASAI, M.D., PH.D.

Evaluation of functional recovery of regenerating rat liver after

partial hepatectomy using ³¹P-NMR spectroscopy

Journal of Surgical Research, Volume 61, No.2 ,385-390, 1996

②Ichiro TOMITA, Masayuki SAWA, Takashi MUNAKATA, Kunio
TANAKA, and Shinichi KASAI

The beneficial effects of dibutyryl cyclic adenosine monophosphate
on warm ischemic injury of the liver induced by cardiac arrest

Transplantation Volume 62, No.2, 167-173, 1996.

II. 研 究 成 果

1) 保存肝のMRS（エネルギー状態）と緩和時間の変化及び心臓死からの臓器移植を想定した DBcAMP の肝バイアビリティー維持に対する有効性の検討

平成8年度は当大学に既存する超伝導 NMR 装置を用い、保存肝の NMR スペクトル測定に必要な諸条件を検討した。³¹P-MRS では、繰り返し時間 0.5sec, 積算回数 600 回(測定時間 5 分)で、PME (phosphomonoesters), Pi (無

機リン), γ -ATP; β -ATP, α -ATP+ α -ADT, NAD⁺/NADH, UDP-sugar, β -ATP の各ピークが得られた。¹H-MRS を用いた保存中の緩和時間の変化では、保存液としては不適である Krebs-Henseleit 液では保存時間とともに延長した(保存前 274.5±21.3ms (Mean±SD), 24 時間保存 402.6±35.2ms)。通常臨床に用いられる UW 液では逆に、12 時間保存までは軽度短縮したが、それ以降はほぼ一定の値であった(保存前 254.5±21.3ms, 12 時間保存 242.6±31.8ms)であった。さらにこれらの緩和時間の変化は、保存肝の水分量(g%)と相関していた。このことから保存に伴う細胞内浮腫が緩和弛緩の変化と関連があることが示唆された。またエネルギー代謝の面からみると、保存時間の延長とともに再灌流後の高エネルギー燐代謝物の回復は低下しており、細胞内 pH は保存に伴う肝細胞内の乳酸の蓄積とともにアシドーシスに傾いた。以上の

結果から多核種 MR スペクトロスコピーが、保存中の肝臓のエネルギー代謝、緩和時間及び細胞内 pH など変化を非侵襲的に測定でき移植モニター法として有用なことが確認できた。

次に心臓死からの臓器移植を想定し、DBcAMP が心停止後摘出肝のバイアビリティー維持に対する有効性を検討した。250-280g の Wistar 系ラットを用い DBcAMP を前投与し、心停止後室温 (22-25℃) で 90 分間放置し、³¹P-MRS を用い再灌流後の肝内 ATP の回復、血中 transaminases 及び灌流液中の endothelin-1 (ET-1) の変動を検討した。DBcAMP 心停止前 60 分に 15mg/kg 投与することがバイアビリティー維持に対し有効であった。

2) 移植臓器を想定した *in vivo* サーフェイスクoil法の確立及び肝切除後の肝再生における機能的回復過程の

検討

平成9年度は前年度の結果に基づき、移植後の臓器を想定した検討として *in vivo* 状態で麻酔下ラットの体表から肝臓の MRS を測定する法を検討した。*in vivo* 測定用のプローブ及びコイル等の作成を行った。腹壁を外科的に除去した状態でのサーフェイスコイル法では灌流肝と同様の MRS スペクトルが得られた。本法を用いて肝切除後の肝再生における機能的回復過程を ^{31}P -NMR スペクトルによって評価し、形態学的再生過程との相違を検討した。Wistar 系ラットを用い 65%肝切除を行い、肝切除後1週間から5週間で外科的に腹壁を除去し、20分間の門脈血流遮断による肝虚血後の ATP の回復過程及び 250mg/kg の fructose 経静脈的負荷後の肝内エネルギー代謝動態の変化を検討した。形態及び肝重量からは肝切除後1週間で回復するが、肝エネルギー代謝面からみた

回復は1週間では不十分で4週間後に正常肝と同様に結果を示した。

3) 介在組織の影響

次に *in vivo* サーフェイスコイル法で問題となる介在組織の影響を検討した。この検討に関しては、信号強度や、サンプル取扱いの問題からリンを核種として行った。ラット肝を想定したファントムを用い、シム調整によって測定部位の磁場強度の均一性を高めた後に、無機リンを封入した微小サンプル(1.0mm 径)を用い、サーフェイスコイル下での信号強度分布を測定した。信号強度別(100, 50, 0%)に等高線用に信号強度分布図を作成すると、コイル表面から 4.0-6.0mm の領域が最高信号強度に対して 50%以上の信号を与えており、またこの部位はラット肝領域にほぼ対応する深度であった。つまりサーフ

ェイスコイル法による測定では、空間的に完全な非測定部位の選択は困難であるが、測定条件の選択によって限局性を持たせることが可能であり、代謝変化の追跡には十分応用可能である。

4) *in vivo* 測定における血流遮断の影響及び移植肝における検討

実際に肝での代謝状態の変動を測定するために、*in vivo* 状態で肝血流遮断に伴うエネルギー状態の変化を検討した。灌流状態では血流遮断後 30 分でほぼ消失したが、*in vivo* では 30 分で遮断前値の 80%まで低下した。以上の測定条件を踏まえて、移植肝での検討を試みたがラット移植手技が煩雑なためデータが安定せず移植状態を想定した上記結果に止まった。

III. 考 察 と 今 後 の 展 望

本研究では肝臓の MRS 測定に関する基礎的検討を行い、摘出肝及び *in vivo* での測定方法に関する手技を確立できた。それらの結果を踏まえ保存肝の MRS（エネルギー状態）と緩和時間の変化及び心臓死からの臓器移植を想定した DBcAMP の肝バイアビリティー維持に対する有効性の検討を行った。次に移植臓器を想定した *in vivo* サーフェイスコイル法の確立及び肝切除後の肝再生における機能的回復過程の検討を行った。さらに *in vivo* サーフェイスコイル法で問題となる介在組織の影響を検討や *in vivo* 測定における血流遮断の影響及び移植肝における検討を行った。これらの結果から多核種 MRS が臓器保存状態の変化や移植後の肝内代謝動態のモニター法として実用可能であり、移植治療における本法の有用性が確認された。今後実際のラットにおける移植肝を対象と

した検討が必要であり、さらにヒトにおける肝移植の臨床における有用性を視野に入れた展開が必要である。