In vivo 炭素-13 核磁気共鳴法によるラット脳内グルコース代謝の解析

藤原 直士^{®*}, 湯浅 龍彦^{**}, 下地 恒毅^{*}

(1989 年 6 月 20 日受理)

In vivo における糖代謝動態の非侵襲的検索を目的として, 小動物に¹³C 濃縮グルコースを投与し, ¹³C-NMR 測定によって脳内グルコースの消長や代謝を経時的に観察した. NMR プローブとして表面コイル型 C/H デュアルプローブを用い, 単一のコイルで ¹H デカップリングと ¹³C シグナルの検出を行った. 天然存在比では脂質やタンパク質のシグナルが観察され, グルコースのシグナルは認められなかった. [1-¹³C] グルコース投与により α -グルコース及び β -グルコースの C1 シグナルがそれぞれ 93 ppm と 97 ppm に観察され, [1-¹³C] グルコースの代謝により生成したグルタミン酸 C2, C3 及び C4 に帰属されるシグナルも検出された. 吸気酸素濃度 6% の低酸素条件では, 乳酸の C3 シグナルが増大し, 又, β -グルコースのシグナル強度が維持されているのに対して, α -グルコースのシグナル強度は減少した. 以上, *in vivo* における ¹³C-NMR 測定の技術とその代謝研究への応用について論ずる.

1 緒 言

生体内物質の動態を無侵襲でしかも連続的に測定する手段として NMR spectroscopy (MRS) がある. 化学者にはなじみ深い NMR 測定を生体に応用しようという試みは目新しいものではないが, *in vivo* でラットやウサギにそして人間にも適用できる超伝導 NMR 装置の発達によって急速に進展してきた. 最近では, ³¹P を対象とするエネルギー代謝研究ばかりでなく, 他の核種の MRS 研究も注目され, 特に, ¹³C は生体物質を研究するうえで魅力的な核種として, ¹³C-MRS の研究が行われるようになってきている^{1)~5)}.

¹³C は天然同位体存在比 1.08% であり, 通常, *in vivo* ¹³C-NMR 測定では生体を構成する脂質やタンパク質以外の成分のシグナルは極めて小さくノイズに隠れてしまう. そこで, ¹³C 濃縮化合物を“probe material”として生体に投与し, その ¹³C シグナルを検出すれば, 生体内での物質の消長や代謝を追跡^{6)~12)}できることになる. そのうえ, 放射性同位体 ¹⁴C の標識によるトレーサー法とは異なり, *in vivo* のままで代謝物の化学情報を得ることも可能となる.

この報告では, ¹³C 濃縮化合物を利用する *in vivo*

¹³C-MRS として, 特に, [1-¹³C] グルコースを投与した小動物における脳のグルコース代謝研究について, その方法や測定結果を検討すると共に, *in vivo* ¹³C-MRS の課題について考察する.

2 装置と方法

2・1 装 置

NMR 測定には JEOL JNM GX270 NMR Spectrometer を用いた. この装置は基本的には化学研究用の装置であり, 磁石は vertical bore 型超伝導磁石 (中心磁場強度 6.35 T) である. 磁石の bore 径が 7 cm なのでマウスからラット程度の大きさの動物に限られ, しかも, この vertical bore タイプの磁石の中ではネズミは直立した状態となる. 普通, 動物は垂直に立って生活をしていないので生理的には適切とは思われないが, 装置の都合上やむをえない.

検出プローブは単一の表面コイル (直径 15 mm) を取り付けた C/H dual tuned probe を用いた. このプローブは Fig. 1 の回路図に示すように, 単一のコイルで ¹H デカップリングのための rf 照射と ¹³C シグナルの検出ができるようになっている. このコイルはコイル表面から離れるにつれて rf 照射パワーが減衰し, コイル表面で 90° パルスを与えるとき, 表面から 10 mm 離れると信号はほとんど検出されなくなる. 従って, ラットの頭骨上からの測定では, 主として大脳皮質からの信

* 新潟大学医学部麻酔学教室: 951 新潟県新潟市旭町通 1-757

** 新潟大学脳研究所神経内科: 同上

Fig. 1 Circuit diagram of a C/H dual probe equipped with a 15 mm-diameter surface coil

号を検出していると考えられる。

2.2 動物の操作と ^{13}C シグナルの検出

体重 100~120 g のラットをケタミン麻酔下に、気管切開し、ハロセン 0.5% を含む 30% O_2 ・70% N_2 混合気体で人工呼吸を行った。大腿静脈にカテーテルを留置し、頭皮を一部除去し、頭部が動かないようにプローブに保定して、頭頂部を検出コイルに密着させた。プローブごと磁石の bore 中に挿入し、分解能調整後、 ^{13}C -NMR 測定を行った。

分解能は頭部の水の ^1H シグナルの半値幅を目安に調整した。ラットの頭部の *in vivo* 測定では半値幅を 40 Hz 以下にするにはかなりの努力を要し、時間もかかることから、40~50 Hz 程度となるように調整した。

^{13}C -NMR スペクトル測定は FID を 1200 回、10 分間積算平均して記録した。まず、天然存在比での測定を行い、それから、カテーテルより体重 1 kg 当たり 500 mg の $[1-^{13}\text{C}]$ グルコースを 10% 水溶液として投与し、順次経時的にスペクトルを記録した。又、 $[1-^{13}\text{C}]$ グルコース投与後に 30 分間吸入酸素濃度を 6% に低下させ、再び酸素濃度を 30% に戻したときの経時変化についても観察した。

^{13}C -NMR 測定モードは核オーバーハウザー効果 (NOE) を除去した ^1H デカップリング法を採用した。測定パラメーターを Table 1 に示す。この測定では主に大脳皮質からのシグナルを検出するため、コイル表面で 90° パルスを与えるパルス照射時間 (PW1) を選択した。PW1 を長くすることによって、脳のより深部からのシグナルを得ることも可能である。又、パルス遅延時間 (PD) を 0.4 s より短くするとシグナルの積算効率が低下することから PD=0.4 s を採用した。

Table 1 Parameters for ^{13}C -NMR measurements

^{13}C resonance frequency	67.8 MHz
^1H decoupling mode	Complete (non NOE)
Pulse width (PW 1)	11 μs
Pulse delay (PD)	0.4 s
Acquisition time (ACQST)	0.1 s
Accumulation of FIDs	1200 time

又、この測定モードは PW1 とデータ取り込み時間 (ACQST) においてのみ ^1H 照射を行い、パルス遅延時間 (PD) では ^1H 照射を行わない。すなわち、この方法では ^1H 照射の時間が短いので照射による発熱がほとんどない。このことは動物を生きのまま測定するうえで重要なことである。実際、直径 10 mm の NMR 試料管に 1 ml の水を入れて 2 時間連続測定をしたが、水温の上昇は 1°C 以内であった。

化学シフト値は、天然存在比で必ず観測される脂質のシグナルを規準として決定した。なおこの脂質のシグナルの化学シフト値はあらかじめキャピラリーに封入したテトラメチルシラン (TMS) を試料 (ラット頭部) の反対側に置き、これを外部規準 (0 ppm) として算出した。

3 結果と考察

3.1 脳の ^{13}C -NMR スペクトルとグルコース代謝

ラットの脳から得られた ^{13}C -NMR スペクトルを Fig. 2 に示す。A は天然同位体存在比でのスペクトルで、TMS を基準にして、30 ppm 付近 (C-C 単結合)、60 ppm 付近 (C-N)、130 ppm (C=C 二重結合) 及び 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。B は $[1-^{13}\text{C}]$ グルコース投与後

Fig. 2 ^{13}C -NMR spectra obtained from rat brain

Spectrum A shows naturally abundant ^{13}C in the brain. After the intravenous infusion of $[1-^{13}\text{C}]$ glucose, α - and β -glucose-Cl signals appeared at 92.7 and 96.7 ppm, respectively in spectrum B. Spectrum C is a differential spectrum generated by subtraction of spectrum A from spectrum B. The signals of glutamate 55 ppm (C2), 27 ppm (C3) and 34 ppm (C4) became more clear.

20~30 min の 10 分間に得られたスペクトルで、グルコースの α -及び β -アノマーの C1 位のシグナルがそれぞれ 93 ppm と 97 ppm に観察された。このグルコースシグナルの α/β 強度比は投与した $[1-^{13}\text{C}]$ グルコース溶液の ^{13}C -NMR スペクトルにおける α/β 強度比にほぼ一致した。

C は投与後のスペクトル B から天然存在比のスペクトル A を差し引いた差スペクトルである。脂質やタンパク質のピークが除かれて、グルコースの C1 シグナルのほかに 27 ppm, 34 ppm 及び 55 ppm にそれぞれグルタミン酸の C3, C4 及び C2 位に帰属されるシグナルが見いだされた。グルタミン酸は血液脳関門を通りにくいので、 ^{13}C シグナルを示すグルタミン酸は脳内で $[1-^{13}\text{C}]$ グルコースから生成したものと考えられる。

3.2 低酸素の影響

吸入酸素濃度を 6% にして低酸素を負荷したときのスペクトルの変化を Fig. 3 に示す。 $[1-^{13}\text{C}]$ グルコース投与後、二つのグルコースアノマーのシグナルが現れ (Fig. 3B), 低酸素負荷 20~30 min では β -アノマーのシグナルが維持されているのに対して α -アノマーのシグナル強度は低下することが認められた (Fig. 3C)。

Fig. 3 ^{13}C -NMR spectra obtained from a hypoxic brain

Spectrum A shows naturally abundant ^{13}C in the brain. Spectrum B was obtained just after administration of ^{13}C -labelled glucose. The signal of α -glucose-Cl accumulated over 20~30 min during hypoxia diminished in spectrum C whereas that of β -glucose-Cl maintained its intensity. The signal of lactate-C3 (marked with an asterisk) increased during hypoxia. After 20 min of reoxygenation, the signal of α -glucose-Cl recovered and that of lactate-C3 disappeared for the most part (spectrum D).

又、低酸素負荷により、21 ppm に乳酸-C3 シグナルが出現、増大し、脳内で嫌気解糖がこう進んでいることが確認された。低酸素負荷後、酸素濃度を再び 30% に戻してから 20~30 min に記録されたスペクトル (Fig. 3D) では α -グルコースのシグナルが回復し、乳酸-C3 シグナルはほぼ消失した。

これらのスペクトル変化は低酸素負荷により脳内で嫌気解糖がこう進んでいることを明らに示している。そして、このときグルコースの α -アノマーが β -アノマーよりも消費されやすいことを示唆している。

このように、 $[1-^{13}\text{C}]$ グルコースとその主要な代謝物の ^{13}C シグナルから、脳のグルコース代謝の経路や変化を直接的に観察できることが示された。

以上、 ^{13}C -MRS により脳内グルコース代謝を生きたまま、化学分析操作なしに観察できることを示してきたが、 ^{13}C -MRS をより広範に応用するためにはハード・ソフト両面での進展が必要であろう。

例えば, MRS によって得られたデータを適切に評価するには, NMR 測定と同時に呼吸・循環・神経活動などの生理的状態をモニターすることが必要と思われる。それには, より大型の動物での研究が望ましく, bore 径の大きな水平型磁石を持つ NMR 装置の利用が期待される。

又, $[1-^{13}\text{C}]$ グルコースばかりでなく種々の ^{13}C 濃縮化合物を利用し, それらの代謝プロセスを観察することが期待される。このことは負荷試験等の臨床応用にも利用できる可能性を含んでおり, 積極的に検索してゆくべき課題と思われる。

本研究を進めるにあたりご助力を下された新潟大学分析センター大野享男氏及び日本電子(株)医用技術課小川秀次郎氏に深謝する。なお, 本研究は文部省科学研究費(61480329)の助成を受けたことを付記する。

文 献

- 1) J. R. Alger, K. L. Behar, D. L. Rothman, R. G. Shulman : *J. Magn. Reson.*, **56**, 334 (1984).
- 2) N. V. Reo, C. S. Ewy, B. A. Siegfried, J. J. H. Ackerman : *J. Magn. Reson.*, **58**, 76 (1984).
- 3) M. Bárány, C. Arus, Yen-C. Chang : *Magn. Reson. Med.*, **2**, 289 (1985).
- 4) 藤原直士, 湯浅龍彦, 羽柴正夫, 五十嵐博中, 下地恒毅, 宮武 正 : 日本磁気共鳴医学会雑誌, **7**, 74 (1987).
- 5) T. Jue, A. B. Lohman, R. J. Ordidge, R. G. Shulman : *Magn. Reson. Med.*, **5**, 377 (1987).
- 6) J. R. Alger, L. O. Sillerud, K. L. Behar, R. J. Gillies, R. G. Shulman, R. E. Gordon, D. Shaw, P. E. Hanley : *Science*, **214**, 660 (1981).
- 7) R. A. Shalwitz, N. V. Reo, N. N. Becker, J. J. H. Ackerman : *Magn. Reson. Med.*, **5**, 462 (1987).
- 8) K. J. Neurohr, E. J. Barrett, R. G. Shulman : *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, **80**, 1603 (1983).
- 9) T. A. Cross, C. Pahl, R. Oberhänsli, W. P. Aue,

- U. Keller, J. Seelig : *Biochemistry*, **23**, 6398 (1984).
- 10) M. E. Stromski, F. Arias-Mendoza, J. R. Alger, R. G. Shulman : *Magn. Reson. Med.*, **3**, 24 (1986).
- 11) K. L. Behar, O. A. C. Petroff, J. W. Prichard, J. R. Alger, R. G. Shulman : *Magn. Reson. Med.*, **3**, 911 (1986).
- 12) B. D. Ross, R. J. Higgins, J. E. Boggan, J. A. Willis, B. Knittel, S. W. Unger : *NMR in Biomed.*, **1**, 20 (1988).

☆

***In vivo* C-13 NMR study on glucose metabolism in rat brain.** Naoshi FUJIWARA*, Tatsuhiko YUASA** and Koki SHIMOJI* (*Department of Anesthesiology, Niigata University School of Medicine; **Department of Neurology, Brain Research Institute, Niigata University, 1-757, Asahimachi, Niigata-shi, Niigata 951)

Glucose metabolism in the rat brain was investigated by ^{13}C -NMR spectroscopy. Rats were intravenously infused with $[1-^{13}\text{C}]$ glucose. ^{13}C -NMR spectra were measured by a gated ^1H -decoupling method without nuclear overhauser effect. Infusion of $[1-^{13}\text{C}]$ glucose gave apparent signals of glucose-C1 carbon in the α - and β -anomer forms and those of C2, C3 and C4 carbon in glutamate. During hypoxia, the signal of lactate-C3 increased, and the α -glucose signal diminished while the β -glucose signal maintained its intensity. These changes in ^{13}C signals reflect glucose metabolism in the brain. Although the amplitudes of signals do not directly correspond to the concentrations of metabolites, chemical and other information on biological substances could be obtained in living systems by *in vivo* ^{13}C -NMR spectroscopy.

(Received July 20, 1989)

Keyword phrases

in vivo ^{13}C -NMR using surface coil; glucose metabolism in rat brain; ^{13}C -labeled glucose as a tracer.