家兎膀胱における VX2癌増殖過程の水プロトン核磁気共鳴 緩和時間に関する実験的研究

	佐	藤	一	成
	加	藤	哲	郎
秋田大学医学部泌尿器科 (主任: 土田正義教授)	森			久
	阿	部	良	悦
	守	山	正	胤
秋田大学医学部付属病院薬剤部	鈴	木	敏	夫

¹H NUCLEAR MAGNETIC RESONANCE RELAXATION TIMES THROUGH VX CARCINOMA GROWTH IN RABBIT BLADDER

Kazunari Sato, Tetsuro Kato, Hisashi Mori, Ryoetsu Abe and Masatsugu Moriyama

Department of Urology, Akita University, School of Medicine Akita, Japan

(Director: Prof. Seigi Tsuchida)

Toshio Suzuki

Department of Pharmacy, Akita University Hospital, Akita, Japan

Growth of VX2 carcinoma transplanted in the rabbit bladder was monitored by measuring nuclear magnetic resonance (NMR) relaxation times in the tumor, non-tumorous tissue of the tumor-bearing animals and serum. Rabbits injected with saline into the bladder wall were used as the control animals. The sampled materials were kept frozen with dry-ice until NMR analysis. Spin-lattice relaxation time (T1) and spin-spin relaxation time (T2) were measured with FT-NMR spectrometer at 2.1 tesla and 27°C within 24 hours after sampling.

T1 values of tumor tissue gradually increased along with tumor growth, being greater than the control values which remained constant. T1 values of the non-tumorous bladder tissue were lower than those of the tumor throughout the middle stage of tumor growth (4 week), and then showed prominent increase at the end stage of tumor growth (5–6 weeks). Advanced tumor growth may have caused water retention in the surrounding non-tumorous tissue.

T2 values of the tumor tissue did not show any characteristic changes as compared with the controls throughout the progress of the tumor. T2 values of the non-tumorous bladder tissue also presented no peculiar change until the middle stage, but again showed a rapid increase as observed in T1 monitoring, in the end stage.

T1 and T2 values in both the non-tumorous tissue and the control bladder tissue well correlated with the tissue water content throughout the tumor growth, while these on the tumor tissue represented no significant correlation with the water content as a whole. However, the relaxation times in the tumor tissue well correlated with water content in the individual tumor stage, suggesting that relaxation times in tumor is influenced not only by water content but also by water-macromolecular interaction.

T1 and T2 in the serum of both the tumor-bearing and control animals showed no characteristic changes with unstable fluctuation of the values, but these of the tumor-bearing rabbit increased rapidly in the end stage of the tumor. Changes of T1 and T2 well correlated with total serum protein, indicating that prolongation of serum T1 and T2 reflects the nutritional condition.

要旨：家兎膀胱に V2 腫瘍を移植して、腫瘍、非腫瘍部膀胱組織ならびに血清を経時的に採取し、腫瘍の発育に伴う ^1H の核磁気共鳴 (NMR) 緩和時間の変化を検討した。緩和時間はパルス FT-NMR 分光計を用いて、T1 (縦緩和時間) は Inversion Recovery 法、T2 (横緩和時間) は Curr-Purcell-Meiboom-Gill 法で測定した。腫瘍の成長、動物の体重変化ならびに転移の発生状況から 1 週から 4 週までが早期から中期、5 週と 6 週が末期とした。

腫瘍 T1 は病期とともに徐々に延長する傾向をみせた。これに対して非腫瘍部 T1 は中期まで腫瘍の T1 より短かったが、末期になるとむしろ腫瘍 T1 より著しく延長した。一方、腫瘍 T2 は病期による変化を示さなかったが、非腫瘍部 T2 は T1 と同様に、末期には著明に延長した。非腫瘍部と対照群の緩和時間の延長は組織の水分含量の増加と平行した変化をみせた。これに対して、腫瘍の緩和時間と水分含量の間には、腫瘍成長の全期間を一括してみると有意な相関はなかった。しかし、各病期ごとにみると T1 と水分含量とはよく相関した。これは腫瘍の緩和時間に影響する因子は水分含量だけでなく、水と高分子の相互作用、すなわち水の構造化も少なからず関与していることを示唆している。

血清緩和時間は腫瘍末期に延長した。この変化は血清蛋白濃度の低下と一致しており、血清緩和時間の変化が腫瘍に特異的現象とは考えられなかった。

緒 言

核磁気共鳴 (Nuclear Magnetic Resonance, NMR) 現象とは、ある原子核が磁場中で特定周波数の電磁波エネルギーを共鳴吸収し、次にこれを電磁波として放出する現象をいう。この現象を解析することによって物質の物理化学的性質を知ることができる。また NMR 現象は対象とする検体を非侵襲的に測定するので、生体試料をより生理的な条件下で分析できるという特徴をもっている。このようなことから近年 NMR 現象が医学領域にも応用されるようになり、種々の病態解析が試みられている。悪性腫瘍もその重要な対象疾患である。

1971 年 Damadian が癌の水プロトン (^1H) の NMR 緩和時間が正常組織に比して延長することを発見し、NMR による癌診断の可能性を報告した¹⁾。これを契機として、腫瘍組織と正常組織の緩和時間に関する数多くの研究がなされ、両者の NMR 上の特徴が詳しく検討されるようになってきた。すなわち諸家の報告をまとめると対象臓器や測定法に違いはあるが、腫瘍の緩和時間は正常組織に比べて 1.1 から 3.0 倍に延長するとされる^{2,3)}。また細胞の増殖速度が大きいほど⁴⁾、あるいは組織の分化度が低いほど緩和時間が延長することが知られている^{5,6)}。さらに、担癌動物の健常部組織の緩和時間は非担癌動物の同一組織の緩和時間に比較して延長し⁷⁾、同様の変化は血清でも認められるという^{8)~10)}。これらは脱分化に伴って当該細胞の緩和時間が延長するが、その変化は健常組織あるいは生体全体にも及ぶことを示唆し、NMR による腫瘍の早期発見、ならびに組織診への応用が期待されている。

しかし、腫瘍の NMR による解析にはまだ解決されない多くの問題が残されている。その例として病期とともに癌の緩和時間がいかなる変化を示すか、正常組織の緩和時間が癌組織のそれより延長する例があるが、それはいかなる場合かなどである。また、最近急速に発展しつつある NMR-CT は生体組織の緩和時間の分布を画像上に表現できるため、病変の形態的のみならず質的解析ができる可能性を有しているが、その基礎的資料はいまだ充分とはいえない。

このような現状を考慮して、本研究では移植実験腫瘍の成長に伴う腫瘍、健常組織ならびに血清のプロトン ^1H の NMR 緩和時間の変化を検討してみた。

実験対象ならびに方法

緩和現象について：陽子数と中性子数のいずれか一方、あるいは両者が奇数であるような原子核は、磁場中である特定周波数の電磁波を共鳴的に吸収する。次に電磁波照射を中断するとこの原子核は受け取ったエネルギーを同一周波数の電磁波として放出しながら、元の熱平衡状態に戻っていく。この過程は緩和現象 (Relaxation) と呼ばれ、2 つの機構が介在している。ひとつは縦緩和あるいはスピン-格子緩和と呼ばれ、その時定数は T_1 で表わされる。これは激しく攪乱されて平衡状態から逸脱した原子核が平衡状態にもどる過程に相当する。他は横緩和あるいはスピン-スピン緩和と呼ばれ、その時定数は T_2 で表わされる。これは電磁波照射中止直後にそろっていた個々の原子核スピンの位相が無秩序にずれる過程に相当する。これらはいずれも種々の要因で変化するが、水では分子運動が自由な場合に延長する。

1. 移植膀胱腫瘍の作製：日本白色家兎（体重2.7～3.2kg, 雌）を使用し、移植膀胱腫瘍を作製した。根本ら¹¹⁾の方法に準じ、家兎の下腿に継代した VX₂腫瘍を摘出し、眼科剪刀で細切して糊状にした。これを Hanks buffered saline（ハックス液）で希釈してガーゼで濾過し、 1.5×10^6 個/ml の細胞浮遊液を調整した。この間、トリプシン処理ならびに抗生物質の添加は行わなかった。

ペントバルビタール（25mg/kg 静注）麻酔下で家兎下腹壁に正中切開をおき、膀胱前壁漿膜下の2カ所に前述の細胞浮遊液0.2ml を注入した。これを移植膀胱腫瘍群とし、20頭の家兎を使用した。いっぽう対照群とした15頭の家兎には、同様の手術操作で細胞浮遊液のかわりにハックス液0.2ml を膀胱前壁漿膜下に注入した。両群ともに感染防止のため、チカルシンナトリウム50mg/kg を手術終了時に筋注した。なお未処置の家兎3頭を実験開始時の対照例とした。

2. 試料の採取と処置：腫瘍移植後1週, 2週, 4週, 5週ならびに6週に、両実験群から無作為にそれぞれ3ないし4頭の家兎を抽出し、ペントバルビタール250mg を急速静注して剖検し、腫瘍の増殖および転移を観察した。腫瘍の計測は一对の膀胱腫瘍のうち大型のものを対象とし、その長径、短径と厚さの積で表示した。膀胱腫瘍の一部と所属リンパ節、ならびに遠隔転移が疑われた部位の組織はホルマリン固定し、病理組織学的検索に供した。

移植膀胱腫瘍群では膀胱腫瘍の大きさを計測したのち、ただちに腫瘍2個と非腫瘍部膀胱後壁2カ所から小切片を摘出し、対照群では膀胱後壁2カ所から検体を摘出した。この際、試料に付着した尿や血液は生理食塩水で洗滌のうえガーゼで完全に除去し、膀胱周囲の脂肪組織、結合組織ならびに腫瘍壊死部も鋭的に可能なかぎり除去した。同時に下大静脈から静脈血10ml を採取し、血清を遠心分離した。膀胱からの NMR 測定用検体は湿重量を測定したのち、ただちに10φの NMR 試料管に入れ、血清は0.2ml を5φの NMR 試料管に入れ、ドライアイスで充填した魔法ビンで凍結保存した。

血清については市販の血清総蛋白濃度測定キット（A/G B-test Wako, 和光純薬工業株式会社, 大阪）を用いて、Biuret 法で血清総蛋白濃度を測定した。また NMR 緩和時間測定後、膀胱の検体は60℃で重量が一定になるまで乾燥し、先に求めた湿重量との比から水分含量（W/W%）を求めた。

3. 緩和時間の測定：凍結保存した検体は18時間から24時間後に室温で徐々に解凍し、¹H の NMR 緩和時間を測定した。NMR 緩和時間の測定はパルス・フーリエ変換 NMR 分光計（FX-90Q, 日本電子株式会社製, 東京）を用い、27℃, 共鳴周波数89.6MHz で行った。T₁（スピン—格子緩和時間）は Inversion Recovery 法（180°-τ-90° pulse sequence）、T₂（スピンスピン緩和時間）は CPMG（Curr-Purcell-Meiboom-Gill）法を用いた。

予備実験として VX₂膀胱腫瘍と非腫瘍部膀胱の緩和時間を、組織摘出直後と24時間凍結解凍後の2回にわたって測定し、凍結保存が緩和時間に及ぼす影響を検討した。摘出直後に対して24時間凍結解凍後に、T₁ は 0.97 ± 0.002 (n=15), T₂ は 0.97 ± 0.007 (n=15) となり変化は極めて小さかった。

結 果

腫瘍は指数関数的な増殖を示し、4週以降になると所属リンパ節、さらには肺への転移が順次発生した。これに伴って体重は5週後から明らかに減少しはじめ、6週目には悪液質に陥った。組織学的には移植後1週で、膀胱粘膜下に限局する多数の腫瘍細胞集団を認め、2週後には膀胱粘膜下に結節状腫瘤を形成し、4週以後になると膀胱粘膜面に潰瘍を形成するとともに、中心壊死による陥凹とそれを囲む結節状隆起を認めた。なお腫瘍の組織像には、成長過程において特記するような変化はみられなかった。

非腫瘍部の膀胱は4週まで組織学的にも特記すべき変化を示さなかったが、5週以後になると間質の浮腫が著明となった。対照群の膀胱組織には全期間を通じて病的変化をみなかった。

1. 組織 T₁ の経時的变化：Fig. 1に腫瘍、非腫瘍部膀胱ならびに対照群膀胱の T₁ の経時的变化を示した。対照群膀胱の T₁ は実験開始時に 1.37 ± 0.01 sec (Mean±S.E) であったが、経時的な変化はほとんどなく、全観察期間を通じて腫瘍ならびに非腫瘍部膀胱の T₁ より短かった。腫瘍部 T₁ は移植後1週目に 1.43 ± 0.03 sec であったが、徐々に延長して6週目には 1.52 ± 0.03 sec となった。しかし1週と6週の T₁ を比較すると統計学的に有意な延長とはいえなかった。非腫瘍部膀胱の T₁ は4週までは腫瘍より短い、それ以後は著明に延長し、5週目 (1.54 ± 0.03 sec) と6週目 (1.72 ± 0.02 sec) は腫瘍部 T₁ より長くなった。

つぎに各群の組織の水分含量の変化と T₁ を比較してみた。腫瘍では1週から6週にかけて T₁ 値は徐々に

Fig. 1 T₁ in VX2 bladder tumor (●—), non-tumorous tissue in the tumor-bearing bladder (▲—), and normal bladder with saline injection (○—). Significant differences between tumor and others were marked as *(p<0.05), ***(p<0.001) and ***(p<0.001).

延長するのに対し、水分含量は逆に1週84.7±0.5% (Mean±S.E.)をピークとして、6週82.5±0.2%まで次第に減少した (Fig. 2)。これに対して非腫瘍部膀胱と対照群膀胱においては、それぞれ T₁値と水分含量はほぼ平行した変動をみせた (Fig. 3, 4)。とくに非腫瘍部膀胱組織では5週と6週の T₁の延長が著しかったが、このとき水分含量も4週82.4±0.6%から6週86.8±0.1%まで大きく増加した。

2. 組織 T₂の経時的変化: Fig. 5は腫瘍、非腫瘍部膀胱、ならびに対照群膀胱の T₂の経時的変化を示したものである。実験開始時の膀胱組織の T₂は91.5±5.4 msec (Mean±S.E)であり、その後1週から4週までは腫瘍ならびに非腫瘍部に比して対照群膀胱の T₂がやや短いものの、各群の T₂に大きな差はみられなかった。しかし4週以後になると非腫瘍部膀胱の T₂が明ら

Fig. 2 T₁(●—) and water content(○—) in VX2 rabbit bladder tumor.

Fig. 3 T₁(●—) and water content(○—) in non-tumorous tissue of the tumorbearing rabbit bladder.

Fig. 4 T₁(●—) and water content(○—) in normal rabbit bladder tissue with saline injection.

Fig. 5 T₂ in VX2 bladder tumor(●—), non-tumorous tissue in the tumor-bearing bladder(▲—), and normal bladder with saline injection (○—). Significant differences between tumor and others were marked as ***(p<0.01) and *** (p<0.001).

かに延長し、5週140.3±5.8msec、6週185.2±7.4 msec となって、他の2群に比較して著しく増大した。

3. 組織の緩和時間 (T₁, T₂) と水分含量: Fig. 6は

Fig. 6 Relationship between T1 and water content in non-tumorous bladder tissue of the VX2 tumor-bearing rabbit (▲, —) and normal rabbit bladder tissue (○, ·····) with saline injection. Significant correlations were observed in both groups ($p < 0.001$). Correlation coefficient of the former was $r = 0.87$ and that of the latter was $r = 0.71$.

非腫瘍部膀胱と対照群膀胱における、 T_1 と水分含量の関係を示したものである。非腫瘍部膀胱の水分含量は対照群膀胱に比べて広い分布をとった。しかし両者ともに水分含量が多いものほど T_1 値も延長しており、相関係数はそれぞれ非腫瘍部膀胱では $r = 0.87$ ($p < 0.001$)、対照群膀胱では $r = 0.71$ ($p < 0.001$)であった。

Fig. 7 Relationship between T1 and water content in bladder tumor at 1 (○), 2 (●), 4 (□), 5 (■) and 6 (◻) weeks after VX2 tumor inoculation. Significant correlations ($p < 0.05$) were observed at the 2nd, 4th and 5th week, respectively.

これに対して腫瘍では観測期間全体の測定値を一括してみると、 T_1 と水分含量には有意な相関がみられなかった ($r = 0.06$)。そこで各観測病期別に T_1 と水分含量を分析してみた (Fig. 7)。その結果、いずれの病期においても水分含量の増加とともに T_1 が延長し、とくに2週、4週、ならびに5週では T_1 と水分含量との間に統計学的に有意な相関を認めた ($p < 0.05$)。また

Fig. 8 Relationship between T2 and water content in non-tumorous bladder tissue of the VX2 tumor-bearing rabbit (▲, —) and normal rabbit bladder tissue with saline injection (○, ·····). Significant correlations were observed in both groups ($p < 0.001$). Correlation coefficient of the former was $r = 0.86$ and that of the latter was $r = 0.82$.

Fig. 9 Relationship between T2 and water content in bladder tumor at 1 (○), 2 (●), 4 (□), 5 (■) and 6 (◻) weeks after VX2 tumor inoculation. Significant correlation ($p < 0.05$) were observed at the 2nd, 4th and 6th week, respectively.

各々の回帰直線は観察された水分含量の範囲内では、病期があとのものほど図の左方に位置する傾向がみられた。

非腫瘍部膀胱ならびに対照群膀胱の T_2 は T_1 と同様に、水分含量の増加とともに延長し、それぞれの相関係数は $r=0.86$ ($p<0.001$), $r=0.82$ ($p<0.001$) であった (Fig. 8)。一方腫瘍では前二者のような関係は明らかではなかった ($r=0.48, p<0.05$)、さらに各病期別に T_2 と水分含量の相関を調べた (Fig. 9)。その結果いずれの病期でも、水分含量の増加とともに T_2 の延長がみられたが、とくに2週、4週ならびに6週では有意な相関が認められた ($p<0.05$)。また得られた回帰直線は、病期があとのものほど左方に位置する傾向があったが、 T_1 についてみられたほど明かではなかった。

4. 血清の T_1 と T_2 の経時変化：移植膀胱腫瘍群と対照群の血清の T_1 と T_2 の経時変化を、それぞれ

Fig. 10 T_1 in rabbit serum with (●) or without (○) VX2 bladder tumor. Significant difference was marked as * ($p<0.05$).

Fig. 11 T_2 in rabbit serum with (●) or without (○) VX2 bladder tumor.

Fig. 10ならびに Fig. 11に示した。全期間を一括すると移植膀胱腫瘍群の血清 T_1 は 2.30 ± 0.16 sec (Mean $\pm$ S.D.), 血清 T_2 は 0.68 ± 0.07 sec (Mean $\pm$ S.D.) であり、対照群の血清 T_1 (2.32 ± 0.11 sec) と T_2 (0.72 ± 0.06 sec) との間に差はみられなかった。経時の変化をみると1週から4週までは、 T_1 と T_2 のいずれも移植膀胱腫瘍群よりも対照群で延長していたが、両群の差は統計学的に有意ではなかった。また、この時期の緩和時間は両群ともほぼ同様な変動を示していた。これに対して4週以後になると移植膀胱腫瘍群の緩和時間が速やかに延長し、 T_1 では5週以後、また T_2 では6週目に対照群の緩和時間よりも増大した。

5. 血清の緩和時間と血清総蛋白濃度：血清中の最大成分である血清総蛋白と血清緩和時間との関係を検討した。はじめに移植膀胱腫瘍群と対照群の血清総蛋白濃度の変化をみた (Fig. 12)。両群の血清総蛋白濃度は中期までほとんど差がなかったが、4週以後には移植腫瘍群の血清総蛋白濃度が急速に減少する傾向を示した。

つぎに血清総蛋白濃度と T_1 とを比較した (Fig. 13)。両群の相関係数は移植腫瘍群では $r=-0.56$ ($p<0.05$)、対照群では $r=-0.60$ ($p<0.01$) であり、両群の血清 T_1 は血清総蛋白の増加に伴って短縮した。同様に血清 T_2 も血清総蛋白濃度の増加にともなって短縮し (Fig. 14)、その相関係数は移植腫瘍群では $r=-0.67$ ($p<0.01$)、対照群では $r=-0.69$ ($p<0.01$) であった。

考 察

生体高分子と水は相互作用のある協同系を形成しているとされ、細胞内の水は生体高分子表面に結合して運動が強く束縛された成分 (結合水) とその周りを取

Fig. 12 Serum protein in rabbits with (●) or without (○) VX2 bladder tumor.

Fig. 13 Relationship between T1 and serum protein in tumor-bearing rabbit (●, —) and rabbit with saline injection into the bladder (○,). Significant correlations were observed in both groups. Correlation coefficient of the former was $r = -0.56$ ($p < 0.05$) and that of the latter was $r = -0.60$ ($p < 0.01$).

Fig. 14 Relationship between T2 and serum protein in tumor-bearing rabbit (●, —) and rabbit with saline injection into the bladder (○,). Significant correlations were observed in both groups ($p < 0.01$). Correlation coefficient of the former was $r = -0.67$ and that of the latter was $r = -0.69$.

り巻く比較的自由度の高い成分（自由水）にわかれると考えられている。水分子と結合する高分子としては、蛋白質やグリコーゲン¹²⁾、ならびに核酸、細胞膜、細胞微小管、細胞微小繊維¹³⁾があげられている。さらに、細

胞内の水の大部分は自由水とされるが、この自由水にしても純水よりは運動が束縛されており、細胞内の水はすべて大なり小なり構造化されているという¹⁴⁾。物理化学的な作用により組織内高分子の構造が変化すると、水の構造化の程度に変化が生じ、同時に自由水の運動性も変化を受ける。緩和現象は原子核がエネルギーを周囲へ放出して元の熱平衡状態へ戻る過程であるから、それは水の運動性によって大きく影響を受けることになる。例えば水分子の運動性が増加すると緩和時間は延長する。

近年、緒言に述べたように、腫瘍組織ではNMR緩和時間が延長するということが定説化されつつある。その理由として次の2つの可能性が提示されている。第一に、腫瘍組織内の含水量が一般に正常組織より増加しているため、自由水が増えて相対的に結合水が減少するというもの。第二は腫瘍組織中では、細胞内の水の構造化の程度が正常組織にくらべて小さいため、水の運動性が大いとするものである。前者は早くから多くの研究者^{15)~17)}によって指摘され、最も有力な説と考えられてきた。しかし腫瘍の水分含量が正常組織に比較して増加していない場合でも、緩和時間の延長することが指摘され⁶⁾、自由水の増量のみでは腫瘍の緩和時間延長は説明されない。これに対して Beall らは、培養腫瘍細胞の水分含量を変えずに染色体のみを濃縮し、有意に緩和時間が延長することを認めた¹³⁾。この所見については彼らは、染色体が濃縮するとその表面積が減少し、水分子の結合度が低下して運動性が高まるため、結果的に緩和時間が延長すると説明した。さらに、Ling & Tucker は正常細胞と癌細胞の T_1 の差について、両者の水分含量の違いによってもたらされる T_1 の変化は平均10%以下に過ぎず、残りは他の原因によって生ずることを指摘し、細胞内の水と高分子の相互作用が緩和時間の変化に重要な役割をもつと強調した¹⁸⁾。このように現在では、前述した2つの理由がともに腫瘍の緩和時間の延長に関与していると考えられている。

しかし、腫瘍の緩和時間が常に非腫瘍組織に比べて延長しているわけではなく、逆に非腫瘍組織の緩和時間が腫瘍より延長している場合があることも指摘されている⁴⁾⁵⁾⁹⁾。このような現象を解析するには、腫瘍の成長に伴う緩和時間の変化を系統的に検討することが必要である。Davis らはラットに腫瘍を移植し、8週まで経時的に緩和時間を追跡したが有意な変化を認めなかった¹⁹⁾。Floyd らは腹水癌移植マウスの血清と肝の

T_1 を5日間追跡し、血清では1日目と観察期間の後半に対照マウスに比し16%から18%の延長を認めた。この時胆癌マウスと対照マウスの肝の T_1 はいずれも漸減したが、胆癌マウスの肝の T_1 が常に対照より延長していた⁸⁾。また、Kodamaらはアゾ色素含有餌で飼育したラットの肝、腎ならびに血清の緩和時間を追跡し、標的臓器である肝の T_1 が観察期間中に2つのピークをとることを認めた。最初のピークは未成熟な肝細胞過形成性結節の発生、後半のピークは肝腫瘍の成長の結果によるものと説明している。これに対して血清 T_1 には有意な変化を認めなかったと述べた²⁰⁾。さらに最近では放射線治療による腫瘍の緩和時間の変化が検討されるようになり、腫瘍縮小とともに腫瘍の緩和時間が短縮すると報告されている²¹⁾²²⁾。しかしながら、実験モデルあるいは臨床例のいずれにおいても、腫瘍の緩和時間の自然経過に関する情報はまだ不十分である。

そこで本研究では VX_2 膀胱腫瘍の発育、遠隔転移、ならびに宿主の全身状態を指標として、腫瘍成長と緩和時間の経時変化を対比した。 VX_2 腫瘍は根本らの報告にあるように、移植細胞の数によって目的にあった成長速度が得られ、再現性のある均一な膀胱腫瘍モデルとすることができる¹¹⁾。本研究におけるモデルでは、腫瘍の成長、転移の発生ならびに宿主の体重変化から1週から4週を早期から中期、また5週と6週を末期とすることができる。この実験モデルにおいて早期から中期に限ってみれば、既に諸家の報告にみられるように、腫瘍の緩和時間とくに T_1 が非腫瘍部組織ならびに正常組織に比較して延長することが認められた。しかし末期になると非腫瘍部組織の緩和時間が著明に増大し、腫瘍の緩和時間より明らかに延長した。これは腫瘍と非腫瘍部組織の緩和時間の関係は一定ではなく、腫瘍組織の成長に伴ってそれぞれ別々に変化し、しかも非腫瘍部組織の緩和時間の変化が大きいため、腫瘍組織緩和時間より延長する場合があることを示している。非腫瘍部組織における緩和時間と水分含量は平行して変動しており、かつ腫瘍の成長につれて周囲健常組織の浮腫が組織学的にも観察された。このことから、末期における非腫瘍部組織の著明な水分含量の増加が、同部の緩和時間の延長に大きく関与したものと考えられる。

これに対してFig. 2にみるように、腫瘍における緩和時間と水分含量の相関は低く、とくに T_1 についてはゼロ相関に近かった。しかし、腫瘍の緩和時間と水分含量の関係を腫瘍成長の病期ごとに分けて検討する

と、各病期においては水分含量の増加とともに、緩和時間が延長する傾向がみられた。すなわち、 T_1 では2週、4週、ならびに5週で、 T_2 では2週、4週、ならびに6週でそれぞれ統計学的に有意な正の相関を認めた。この時、各回帰直線は病期とともにおおむね左方に移動する傾向をみせた。この結果は、腫瘍の緩和時間は同一病期についてみれば水分含量に相関するが、一方では腫瘍は発育とともに以前とは異なるNMR上の新たな性質を獲得するようになることを示唆している。

Ling & Tuckerによると、ラットおよびマウスの正常の肝、腎、脾、脳ならびに筋について、各臓器に電解質液を添加して4から5段階に水分含量を変化させると臓器ごとに緩和時間の変化の度合いが異なったため、 T_1 と水分含量の関係を表す直線は臓器の数に別れたと報告した¹⁸⁾。この結果は、腫瘍の成長時期ごとに緩和時間と水分含量の相関が異なるという前述の自験成績とよく似ている。Ling & Tuckerの結果は、組織水分含量に対応する緩和時間の変化が各臓器で特有のパターンをとり、それは各臓器の組織構築の基本をなす高分子構築の差異によることを強く示唆している。本研究の VX_2 膀胱腫瘍では、その成長過程において光学顕微鏡レベルでの組織構築の変化はみせなかったが、水分含量とは無関係に緩和時間が次第に延長した。これらの知見を総括すると、腫瘍の成長が進むにつれて組織高分子の構築が水分子の運動性を高める方向に変化し、その結果腫瘍の緩和時間が徐々に延長すると解釈できよう。

Grösch & Noackは蛋白(ウシアルブミン)溶液中の 1H は蛋白分子中、蛋白分子に随伴した水ならびに蛋白分子から離れた水のいずれかに属するという3相モデルを提唱した。そして、実際に観測される T_1 緩和率(T_1 緩和時間の逆数)は各相の成分比率ならびに T_1 緩和に依存することを示した²³⁾。さらにKoivulaらはGrösch & Noackの説をもとに、蛋白溶液の T_1 緩和率が蛋白濃度に相関することを理論的ならびに実験的に証明した¹⁰⁾。本研究でも担癌家兎における血清緩和時間がいずれも血清蛋白濃度の経時変化とほぼ逆の変動を示し、かつ血清緩和時間と血清蛋白濃度とは有意な負の相関関係にあることが明らかに示された。血清の成分は蛋白を除外すれば大部分が水なので、自験成績は血清の T_1 が水分含量に間接的に正の相関をすることを意味している。

さて、一般に担癌動物の血清蛋白濃度の変化は早期

ではみられないことが多く、かつ癌の存在を直接示すものではない。本研究でも早期から中期まで担癌家兎の全身状態は良好で、血清蛋白濃度は対照群と差がなく、末期に至って血清蛋白濃度の低下と同様に緩和時間間の延長をみた。血清の緩和時間に影響を与える因子は、単に血清の蛋白濃度だけでなく、蛋白組成⁹⁾ならびに電解質の濃度と組成⁸⁾も考えられているが、少なくとも本研究の結果は血清の緩和時間の変化に対して血清蛋白濃度が重要な因子であることを示している。しかし血清蛋白濃度が低下するのは腫瘍の末期であり、発癌あるいは担癌状態を反映する指標とはならないことは明らかである。

本研究は移植実験腫瘍の NMR 緩和時間を *in vitro* で解析したものであるが、一般に *in vitro* と *in vivo* の緩和時間測定値はよく相関することが明らかにされている²⁴⁾²⁵⁾。したがって自験成績は、NMR-CT 上における緩和時間から腫瘍を識別することが必ずしも容易ではないことを示唆するものとする。また生体においては腫瘍の中心部変性壊死、周囲組織の反応、局所の血流状態などが緩和時間に複雑に影響することが想定され²⁶⁾²⁷⁾、これら諸因子を含めた多角的な基礎研究がさらに必要になると思われる。

総 括

家兎移植膀胱腫瘍の増殖過程における¹H の NMR 緩和時間の変化を検討した。

1. 腫瘍の T_1 は腫瘍の成長とともに徐々に延長する傾向をみせた。非腫瘍部膀胱の T_1 は中期までは腫瘍の T_1 より短い。末期になるとこの関係は逆転して腫瘍の T_1 より延長した。

2. これに対して腫瘍の T_2 の病期に伴う変化は認められなかったが、非腫瘍部膀胱の T_2 は T_1 と同様に末期になると著明に延長した。なお対照群の緩和時間には、 T_1 ならびに T_2 ともに経時的変化は見られなかった。

3. 緩和時間の延長には水分含量の増加と水と高分子の相互作用の変化との両者が関与するが、腫瘍では後者の影響をより強く受けることを示す成績が得られた。

4. 血清の T_1 ならびに T_2 緩和時間は早期から中期には移植膀胱腫瘍と対照群の間で差がなく、担癌末期になると初めて移植膀胱腫瘍群が対照群に比して延長した。この血清緩和時間の延長は、血清蛋白の低下とよく相関した。

5. 以上の所見は、NMR-CT による腫瘍診断法を確

立する上で、重要な参考資料になるものと思われる。

本研究の遂行にあたり技術上の指導を頂いた日本電子株式会社医用技術科の江口恵二氏、梅田雅宏氏に深く感謝した。

なお本研究は昭和59年度文部省科学研究費(59480324)により行った。

文 献

- 1) Damadian, R.: Tumor detection by nuclear magnetic resonance. *Science*, **171**, 1151—1153, 1971.
- 2) de Certaines, J., Herry, J.Y., Lancien, G., Benoist, L., Bernard, A.M. and Le Clech, G.: Preliminary notes Evaluation off human thyroid tumors by porton nuclear magnetic resonance. *J. Nucl. Med.*, **23**, 48—51, 1982.
- 3) 清水哲也, 田中邦雄: NMR 断層画像の集検への期待. *総合臨床*, **31**, 1797—1800, 1982.
- 4) Hollis, D.P., Saryan, L.A. and Morris, H.P.: A nuclear magnetic resonance study of water in two Morris hepatomas. *Hopkins Med. J.*, **131**, 441—444, 1972.
- 5) Schara, M., Sentjurc, M., Auersperg, M. and Golouh, R.: Characterization of malignant thyroid gland tissue by magnetic resonance methods. *Br. J. Cancer*, **29**, 483—486, 1974.
- 6) Beall, P.T., Asch, B.B., Chang, D.C., Medina, D. and Hazlewood, C.F.: Distinction of normal, preneoplastic, and neoplastic mouse mammary primary cell cultures by water nuclear magnetic resonance relaxation times. *J. Natl. Cancer Inst.*, **64**, 335—338, 1980.
- 7) Hazlewood, C.F., Cleveland, G. and Medina, D.: Relationship between hydration and proton nuclear magnetic resonance relaxation times in tissue of tumor-bearing and non-tumor-bearing mice: Implications for cancer detection. *J. Natl. Cancer Inst.*, **52**, 1849—1853, 1974.
- 8) Floyd, R.A., Leigh, J.S. Jr., Chance, B. and Miko, M.: Time course of tissue water proton spin-lattice relaxation in mice developing ascites tumors. *Cancer Res.*, **34**, 89—91, 1974.
- 9) de Certaines, J., Rivet, P., Bernard, A.M., Gaillet, J., Benoist, L. and Morin, P.: Nuclear magnetic resonance study of cancer: Systemic effect on the proton relaxation time (T_1 and T_2) of human serum. *Cancer Detection and prevention*, **4**, 267—271, 1981.
- 10) Koivula, A., Suominen, K., Timonen, T. and Kiviniitty, K.: The spin-lattice relaxation time in the blood of healthy subjects and patients with malignant blood disease. *Phys.*

- Med. Biol., 27, 937-947, 1982.
- 11) 根本良介, 森 久, 岩田克夫, 加藤哲郎, 阿部良悦, 原田昌興: 膀胱癌の局所治療に関する実験的研究1. 家兎移植腫瘍 (V_2 carcinoma) を用いた膀胱癌実験モデルの確立. 日泌尿会誌, 72, 1113-1119, 1981.
 - 12) Block, R.E., Maxwell, G.P. and Branam, D.L.: Nuclear spin relaxation in solutions prepared from normal and tumor hepatic tissues: Brief communication. J. Natl. Cancer Inst., 59, 1731-1735, 1977.
 - 13) Beall, P.T., Hazlewood, C.F. and Rao, P.N.: Nuclear magnetic resonance patterns of intracellular water as a function of Hela cell cycle. Science, 192, 904-907, 1976.
 - 14) 上平 恒: 生体中の水. 蛋白質核酸酵素, 21, 575-582, 1976.
 - 15) Hollis, D.P., Saryan, L.A., Eggleton, J.C. and Morris, H.P.: Nuclear magnetic resonance studies of cancer. VI. Relationship among spin-lattice relaxation times, growth rate, and water content of Morris hepatomas. J. Natl. Cancer Inst., 54, 1469-1472, 1975.
 - 16) Eggleton, J.C., Saryan, L.A. and Hollis, D.P.: Nuclear magnetic resonance investigations of human neoplastic and abnormal nonneoplastic tissues. Cancer Res., 35, 1326-1332, 1975.
 - 17) Inch, W.R., McCredie, J.A., Kinspel, R.R., Thompson, R.T. and Pinter, M.M.: Water content and proton spin relaxation for neoplastic and non-neoplastic tissues from mice and humans. J. Natl. Cancer Inst., 52, 353-356, 1974.
 - 18) Ling, G.N. and Tucker, M.: Nuclear magnetic resonance relaxation and water contents in normal mouse and rat tissues and in cancer cells. J. Natl. Cancer Inst., 64, 1199-1207, 1980.
 - 19) Davis, P.L., Sheldon, P., Kaufman, L., Crooks, L., Margilis, A.R., Miller, T., Watts, J., Arakawa, M. and Hoenninger, J.: Nuclear magnetic resonance imaging of mammary adenocarcinomas in the rat. Cancer, 51, 433-439, 1983.
 - 20) Kodama, M., Ohki, T., Saittô, H., Nagata, C. and Tagashira, Y.: Biphasic change of proton magnetic relaxation times during azo-dye hepatocarcinogenesis. Br. J. Cancer, 37, 233-236, 1978.
 - 21) Bakker, C.J.G. and Vriend, J.: Proton spin-lattice relaxation studies of tissue response to radiotherapy in mice. Phys. Med. Biol., 28, 331-340, 1983.
 - 22) 田中邦雄, 日下部光俊, 菊池雄三, 山田芳文, 清水哲也, 阿部養右衛門: 磁場焦点法 NMR による放射線照射前後における緩和時間の無侵襲計測. NMR 医学 (予稿集), 4, 246-247, 1984.
 - 23) Grösch, L. and Noack, F.: NMR relaxation investigation of water mobility in aqueous bovine serum albumin solutions. Biochem. Biophys. Acta, 453, 218-232, 1976.
 - 24) 堀川義治, 成瀬昭二, 田中忠蔵, 平川公義, 西川弘恭, 清水公治, 喜利元貞: NMR-CT 像の基礎的解釈-in vitro 緩和時間との対比. NMR 医学, 4, 57-65, 1984.
 - 25) Ling, C.R. and Foster, M.A.: Changes in NMR relaxation time associated with local inflammatory response. Phys. Med. Biol., 27, 853-860, 1982.
 - 26) 山田 進, 山浦玄嗣, 山田健嗣, 吉岡清郎, 松沢大樹: 悪性腫瘍の診断と NMR. 医学のあゆみ, 127, 1392-1398, 1983.
 - 27) Moon, K.L. Jr., Davis, P.L., Kaufman, L., Crooks, L.E., Sheldon, P.E., Miller, T., Brito, A. C. and Watts, J.C.: Nuclear magnetic resonance imaging of a fibrosarcoma tumor implanted in the rat. Radiology, 148, 177-181, 1983.

(1984年12月24日受付)