

^{31}P -MRS による胃潰瘍モデルラット胃壁の 高エネルギー燐化合物の動態に関する検討

新潟大学医学部内科学第三講座 (主任: 朝倉 均教授)

柳澤 善計

Dynamic Study on High-Energy Phosphate
Compounds in Experimental Ulcer
Stomach Assessed by ^{31}P -MRS

Yoshikazu YANAGISAWA

*The Third Department of Internal Medicine,
Niigata University School of Medicine
(Director: Prof. Hitoshi ASAKURA)*

In order to investigate the energy metabolism of the gastric wall, ^{31}P -magnetic resonance spectroscopy (^{31}P -MRS) with surface coil was performed in the rat stomach under the following conditions. By reducing the systemic blood pressure to 50% below (hemorrhage from the artery), the blood flow of the gastric wall decreased less than 50%, and recovered to normal range after retransfusion. In such ischemic condition, phosphocreatine (PCr)/inorganic phosphate (Pi) ratio and β -ATP/Pi ratio of the gastric wall decreased, and their ratio recovered to previous values after retransfusion. Intracellular pH of gastric wall decreased during hypotension and recovered to previous after retransfusion. After administration of the endothelin in the artery, the blood flow of the gastric wall also decreased to 50~60% of that before administration. Also this condition induced PCr/Pi ratio and β -ATP/Pi ratio decreased. In summary, experimental ulcer stomach showed negative response of high-energy phosphate compounds when it was assessed by ^{31}P -MRS.

Key words: ^{31}P -MRS, endothelin, ischemia-retransfusion

磁気共鳴スペクトロスコピー, エンドセリン, 脱血—再輸血

^{31}P -MRS は, 生体内の高エネルギー燐化合物を生きたままの状態で測定できることから種々の臓器の病態解明に利用されつつある^{1)~6)}. しかし消化管においては, 腫瘍の ^{31}P -MRS を測定した報告は散見されるが, 胃の実験潰瘍モデルにおける ^{31}P -MRS 測定を行なった

報告はほとんど見られない. 著者はラットに, 1) 動脈より脱血する, 2) endothelin 動注投与を行うことにより胃壁の血流が低下することに着目し, これらのモデルにおいて胃壁の ^{31}P -MRS を測定し知見を得たので報告する.

Reprint requests to: Yoshikazu YANAGISAWA,
The Third Department of Internal Medicine,
Niigata University School of Medicine,
1-754 Asahimachi-dori Niigata, 951,
JAPAN.

別刷請求先: 〒951 新潟市旭町通1-754
新潟大学医学部内科学第三講座
柳澤 善計

実験方法

実験はすべて300g前後のWistar系雄性ラットを用いた。これらのラットを24時間絶食にしたのち、ペントバルビタール腹腔内投与による麻酔下にて以下の実験を行なった。

1. 胃壁の³¹P-MRSの測定方法

ラットの上腹部に正中切開を加え胃を露出しこれを反転、胃の前壁を胸壁に接着固定した。この際、胸壁の信号を拾うことのないよう、胃と胸壁の間には厚さ約5mmの発泡スチロール片をはさんだ。次に腺胃の後壁の漿膜側に³¹P-MRS測定用のサーフェスコイル(5-turned, 直径10mm)を接着、³¹P-MRSを測定した。測定条件はMRS測定装置として日本電子製GX-270(中心静磁場強度6.35テスラ)を用い、パルス幅13 μ s, パルスくりかえし時間2秒, 400回積算してフーリエ変換を行ない³¹P-MRSのスペクトルを求めた。この条件で1回の測定に13分を要した。

2. 胃壁内血流測定

1) 大腿動静脈からの脱血, 再輸血時における胃壁内血流の変化

ラットの右大腿動静脈, 左大腿動脈にそれぞれ1本ずつカニューレを挿入し, 動脈カニューレの一方は血圧測定用, 他方は脱血用とした。また静脈カニューレは再輸血用とした。上腹部正中切開を行い胃を露出後, ³¹P-MRS測定と条件を同一にするために, 胃の漿膜側にレーザードップラー血流計(PERIMED社製PERIFLUX)のプロベを固定し, 胃壁の血流を測定した。しかるのち脱血用カニューレから脱血を開始, 血圧を前値の50%以下に保持し胃壁の血流を測定した。約50分間の脱血後, 脱血した血液を再輸血し, 同様に胃壁の血流を測定した。

2) endothelin 動注による胃壁内血流の変化

ラットの右大腿動脈からカニューレをなるべく中枢に近い位置まで挿入, このカニューレからendothelin 4nmol/kg (Sigma社製Endothelin-1)をワンショットで動注。2.1)に示したごとくレーザードップラー血流計を用いてendothelin動注前後の胃壁内の血流を経時的に測定した。

3. 胃壁における³¹P-MRS測定

1) 大腿動静脈からの脱血, 再輸血時における胃壁³¹P-MRS測定

ラット7匹に対し, 2.1)で述べたごとくカニューレを挿入した。次に脱血用のカニューレから脱血を開始, 血圧を前値の50%以下に保持し, 1.の測定条件で³¹P-MRS

を3回測定した。しかるのちに静脈カニューレより再輸血を行ない, ここから計4回の³¹P-MRS測定を行なった。得られたMRSスペクトルよりそれぞれPi, PCr, β -ATPの各ピークの高さを求め, PCr/Pi, β -ATP/Piを計算し, 前, 脱血時, 再輸血時におけるこれらの変化をpaired t-testにより検定した。またPiのPCrに対するchemical shiftからHenderson-Hasselbalchの式($\text{pH}=6.77+\log((\text{Pi shift}-3.29)/(5.68-\text{Pi shift}))$)によりpHを計算し¹⁾, これについてもpaired t-testにて検定した。

2) endothelin 動注による胃壁³¹P-MRS測定

ラット5匹に2.2)で述べたごとくカニューレを挿入した。1.の方法と同様に, 胃をサーフェスコイルに接着し, endothelin動注前と動注後の³¹P-MRSを測定した。得られたMRSスペクトルより前述のごとく, Pi, PCr, β -ATPの各ピークの高さを測定し, PCr/Pi, β -ATP/Piを計算し, 前, 投与後のこれらの変化をpaired t-testにて検定した。

結 果

1. 正常胃壁の³¹P-MRS

Fig. 1に示すごとく, 胃壁の³¹P-MRSは右から β , α , γ のATP, phosphocreatine (PCr) phosphodiester (PDE), inorganic phosphate (Pi), phosphomonoester (PME)の7つの波が得られた。一番左に認められる波は, 外部標準としてprobe内に入れてあるhexamethyl phosphoramidateのピークである²⁾。

2. 胃壁内血流測定

1) 大腿動静脈からの脱血, 再輸血時における胃壁内血流の変化

レーザードップラー血流計を用いて行なった脱血, 再輸血時の胃壁の血流の変化はFig. 2に示した。脱血前値に比し, 脱血後は前値のほぼ50%以下になり再輸血とともにほぼ前値にまで回復した。

2) endothelin 動注による胃壁内血流の変化

同様にレーザードップラー血流計を用いて行なったendothelin動注前後の胃壁の血流をFig. 3に示した。endothelin動注後の胃壁の血流は一過性に急激な低下を示した後, 徐々に回復するが前値にまでは戻らず, 動注前に比べ約60~50%程度になり, この値が1時間以上持続した。

3. 胃壁における³¹P-MRS測定

1) 大腿動静脈からの脱血, 再輸血時における胃壁³¹P-MRS測定

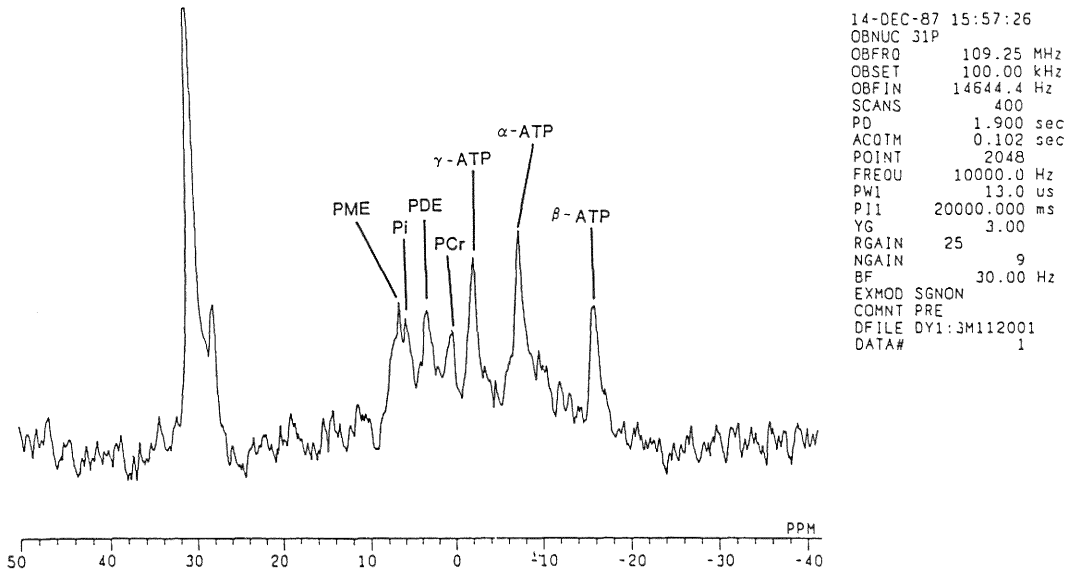


Fig. 1 ³¹P-MRS obtained from the rat stomach
 PCr; phosphocreatine, Pi; inorganic phosphate
 PME; phosphomonoester, PDE; phosphodiester
 ATP; adenosine triphosphate

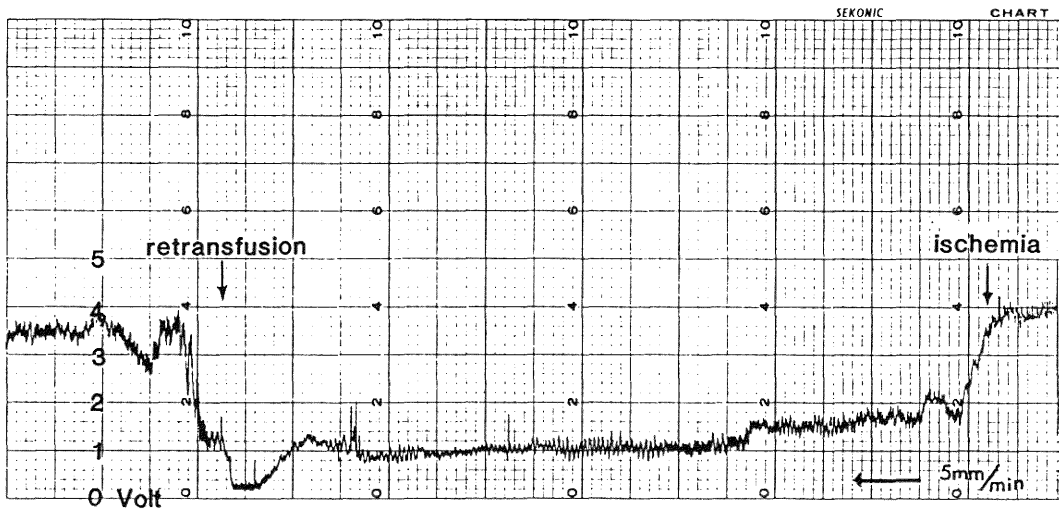


Fig. 2 The record of gastric blood flow under ischemia-retransfusion

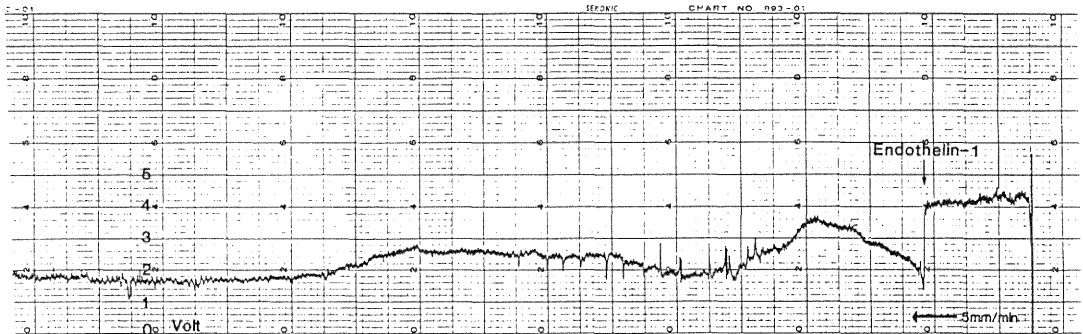


Fig. 3 The record of gastric blood flow following administration of the endothelin

脱血を開始すると前値に比し P_i が増加し, PCr , β -ATP の減少が認められる. この変化は脱血中は持続するが, 再輸血をすることにより徐々に元の状態に回復する (Fig. 4). この結果 PCr/P_i は Fig. 5 に示すように, 脱血後すぐに有意差をもって低下しはじめ, 再輸血を行なうことにより回復しはじめ, 26分以降に前値と有意差が認められなくなった. また β -ATP/ P_i も脱血直後から低下が認められた. 再輸血後は徐々に β -ATP は回復してくるが, 52分後でも β -ATP/ P_i は前値に比し有意差が存在した (Fig. 6).

また PCr と P_i の chemical shift から求めた pH_i は, 脱血前に平均 7.341 ± 0.226 であったものが脱血直後に 7.021 ± 0.235 にまで減少し, その後もさらに低下が続くが, 再輸血することによりすぐに前値と有意差のない 7.161 ± 0.091 にまで回復がみられた. その後も pH_i は引き続き回復し, 前値との有意差を認めなかった (Fig. 7).

2) endothelin 動注による胃壁 ^{31}P -MRS 測定

endothelin 動注によって, PCr , β -ATP には著変は認められなかったが, P_i の上昇が認められた. この結果, PCr/P_i は Fig. 8 に示すように動注直後より引き続き低下傾向を示し, また β -ATP/ P_i についても動注後13分後の測定値から有意差をもって低下していた (Fig. 9).

考 察

細胞内の高エネルギー燐化合物を測定する方法は従来凍結組織を対象として酵素を用いる測定法⁷⁾, あるいは高速液体クロマトグラフィー⁸⁾を用いて検討されてきた. しかし ^{31}P -MRS は高エネルギー燐化合物を *in vivo* で経時的に測定することができるため, 近年, 脳

²⁾⁶⁾⁹⁾, 心臓³⁾⁴⁾ などいろいろな臓器において ^{31}P -MRS を用いた研究がなされている. 消化器病の分野でも, 肝臓の虚血⁵⁾ や薬物投与時¹⁰⁾¹¹⁾ における ^{31}P -MRS 測定が行なわれているが, 消化管において ^{31}P -MRS を測定した報告はあまり多くみられていない¹²⁾¹³⁾. これは消化管が管腔臓器であり, 得られる signal が実質臓器に比べ弱いためと考えられる. この欠点を改善すべく, Nakada ら¹²⁾ は Zig-Zag 状のサーフェスコイルを用いることによって, サーフェスコイルから 4 mm の深さが測定できることを利用し, 胃のみのピークを取りだすようにした結果, 繰り返し時間 1 秒, 128 回の積算 (2.13 分) で良好な signal が得られたとしている. 著者はサーフェスコイルとして 5-turned のコイルを用いたが, 繰り返し時間 2 秒, 400 回の積算をすることにより比較的良好的な signal が得られた. ただしこの測定条件では 1 回の測定に 13 分と比較的長時間の scan となるため, 短時間の間にもっと違った変化が起きているかどうかの判断がつかかねる. また今回の実験では胃粘膜のみには存在しないと考えられる PCr ⁷⁾ が認められたことから筋層を含めた胃壁をすべて scan しているものと思われ, 今後サーフェスコイルの改良により scan 時間の短縮と測定場所の限局化をすすめる必要があるものと思われた.

消化器の分野において ^{31}P -MRS を測定した報告は前述のごとく肝臓が主であり, 虚血肝の ^{31}P -MRS を測定した報告もみうけられ, 測之上⁵⁾ によると虚血状態においた肝臓は ATP の減少, P_i の増加が認められ, 短い間の虚血であれば血流を再開することによりこれらの改善が認められたと報告している.

消化管, 特に胃においても脱血による胃粘膜障害の研究は行なわれており, 急性胃潰瘍のモデルとして水浸拘

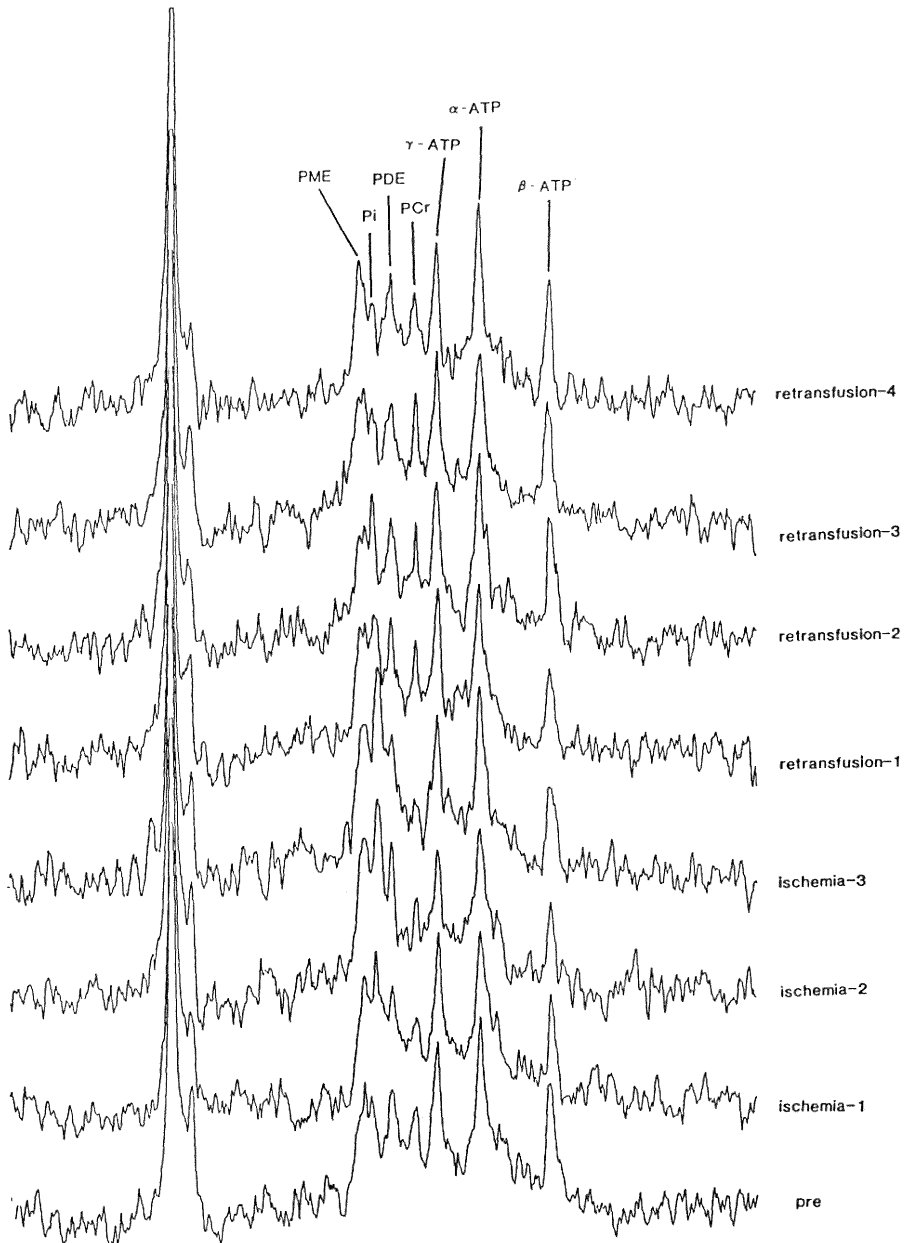


Fig. 4 Changes of the ³¹P-MRS under ischemia-retransfusion

束ラットは有名であるが、脱血による低血圧状態において胃粘膜障害を起こす実験⁷⁾¹⁴⁾¹⁵⁾も報告されている。Menguy ら⁷⁾は体重の2%の血液の脱血をおこない、この際の胃粘膜における高エネルギーリン化合物の測定を生化学的に分析し、脱血することにより ATP, ADP

が減少することを報告している。今回、著者の検討でも脱血により ATP の減少, Pi の増加を認め、この報告と矛盾しなかった。

一方、endothelin は1988年柳沢ら¹⁶⁾により発見されたペプチドで強力な血管収縮作用を有する物質である。

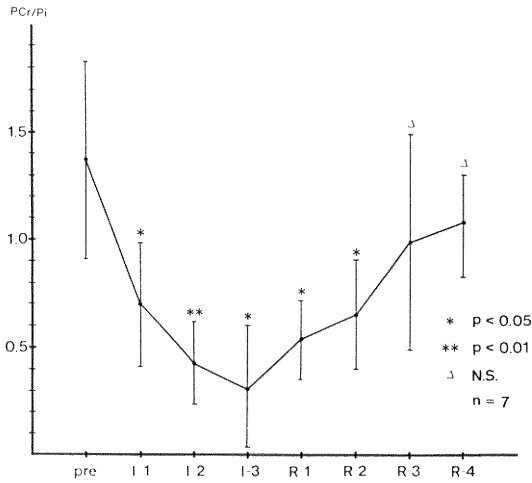


Fig. 5 Changes of the PCr/Pi ratio under ischemia-retransfusion I-; ischemia R-; retransfusion

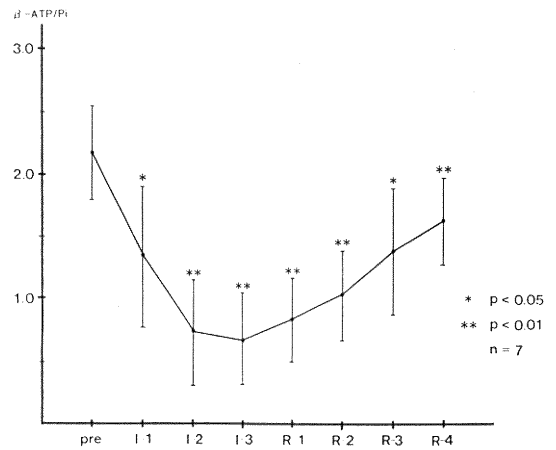


Fig. 6 Changes of the β -ATP/Pi ratio under ischemia-retransfusion

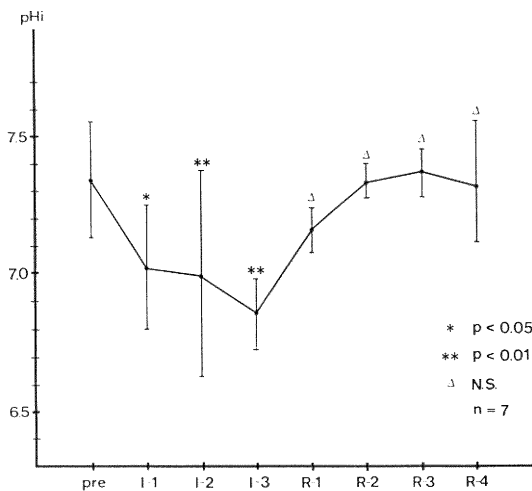


Fig. 7 Changes of the PHI under ischemia-retransfusion

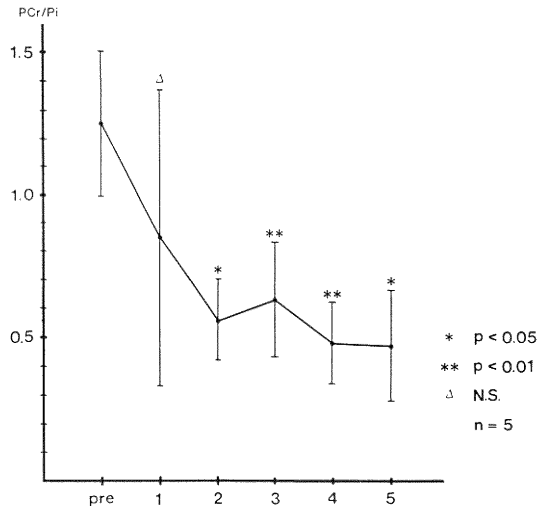


Fig. 8 Changes of the PCr/Pi ratio following administration of the endothelin

この物質を動脈内あるいは静脈内に投与することによって、胃内にびらんが生ずることが報告されている¹⁷⁾。秋本ら¹⁸⁾は endothelin 4 nmol/kg を動脈内に投与することにより、びらの形成までは至らなかったが胃粘膜血流の著明な低下を認め、この低下は90分後まで認められたとしている。著者の検討でも 4 nmol/kg の動脈内投与で胃壁の血流の低下を認めた。この endothelin 投与時の ³¹P-MRS を測定したところ、脱血時と同様 PCr/Pi, β -ATP/Pi の減少が認められた。以上より、

endothelin 投与時には、脱血と同様、血流の低下により胃壁の虚血が生じ、これによって PCr/Pi, β -ATP/Pi の減少が起ったと考えてよいものと思われる。

脱血時における胃粘膜障害発生の機序については、free radical の関与が考えられている¹⁹⁾⁻²¹⁾が、この free radical の産生源として xanthine-xanthine oxidase が重要視されている。これは虚血などにもなる ATP の分解から hypoxanthine の増加、xanthine oxidase の活性の亢進が生じ、この結果 super-oxide anion の

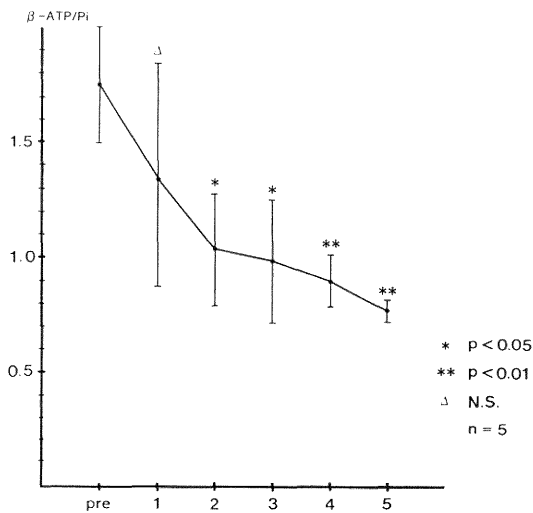


Fig. 9 Changes of the β -ATP/Pi ratio following administration of the endothelin

産生亢進が引き起こされ、胃粘膜障害を起こすとする説である。今回の研究で脱血時および endothelin 投与時に ATP の減少、Pi の増加が認められたことは、この説を支持するものと考えられる。

今回の研究において、脱血によって胃壁の pHi は低下し、再輸血することによってもとの値に回復した。脳の虚血においてこの変化を論じた五十嵐⁹⁾は、虚血直後は pHi が低下するが、その後軽度の上昇が認められ、また血流再開通によって pHi はもとの値に回復し、その後一過性にアルカリ側にシフトしたとしている。これは、虚血時には低酸素状態から嫌気性解糖が起り、乳酸が産成されるため酸性に傾き、血流再開後、bicarbonate buffer の働きにより、CO₂ が急激に wash out され、H⁺ が消費されることによって、アルカリにシフトするためである。そして虚血時に酸性に傾いた後の軽度のアルカリ側へのシフト、血流再開後の一過性のアルカリ側へのシフトは creatine kinase による PCr の脱炭酸、虚血により細胞内に蓄積された乳酸の細胞外への移動、Na⁺/H⁺ antiporter による細胞内 H⁺ の細胞外への移動などが関与している可能性のあることを示している。著者の実験では、虚血後の軽度のアルカリ側へのシフトも、再輸血後の一過性のアルカリ側へのシフトも有意な差としては認められなかったが、これは実験自体が全身の虚血状態を引き起こしているため乳酸が胃以外の場所でも多量に産成され、細胞内の乳酸が wash out されにくいのが一つの原因ではないかと考えられた。

また、今回 endothelin 投与における細胞内 pH の変化は一定の傾向が認められなかったため呈示しなかったが、これは胃内にびらんなどの病変を起こさない程度の endothelin 負荷下での実験であったためであり、負荷量をさらに多くすることにより、細胞内 pH の変化が起こる可能性がある。

ま と め

脱血再輸血、あるいは endothelin を動脈内に投与することにより以下の結論をえた。

1. 全身血圧を前値の50%以下にする脱血により、胃壁の血流は前値のほぼ50%に保たれ、再輸血により胃壁の血流は回復した。

2. endothelin 4 nmol/kg 動脈内投与により胃壁の血流は前値の50~60%に減少した。

3. 脱血時には Pi の上昇、PCr、 β -ATP の減少が認められ、PCr/Pi、 β -ATP/Pi は有意に減少した。再輸血することによりこれらの値は回復した。また Pi と PCr の chemical shift から求めた細胞内 pH も、脱血により有意に低下し、再輸血により回復した。

4. endothelin 投与により PCr/Pi、 β -ATP/Pi は有意に減少した。

以上により、胃の虚血は胃壁のエネルギー代謝に負の影響を与え、細胞内 pH を低下させて、胃防御機構の低下を招くと思われる。

稿を終えるにあたり、ご指導くださいました新潟大学医学部内科学第三講座朝倉均教授、研究の機会を与えてくださいました新潟大学医学部脳研究所神経内科宮武正教授、辻省次教授、湯浅龍彦助教授に深く謝意を表します。

参 考 文 献

- 1) Petroff, O.A.C., Prichard, J.W., Behar, K.L., Alger, J.R., den Hollander, J.A. and Shulman, R.G.: Cerebral intracellular pH by ³¹P nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Neurology*, **35**: 781~788, 1988.
- 2) 湯浅龍彦: in vivo NMR スペクトロスコピーによる脳代謝の研究。新しい生体計測法としての展望。新潟医学会雑誌, 104: 214~224, 1990.
- 3) Stein, P.D., Goldstein, S., Sabbah, H.N., Liu, Z., Helpen, J.A., Ewing, J.R., Lakier, J.B.,

- Chopp, M., LaPenna, W.F. and Welch, K.M.A.:** In vivo evaluation of intracellular pH and high-energy phosphate metabolites during regional myocardial ischemia in cats using ^{31}P nuclear magnetic resonance. *Magnetic resonance in medicine*: 3, 262~269, 1986.
- 4) **Matsubara, T.:** Beneficial effects of low-flow perfusion resumed early after zero-flow ischemia on myocardial energy metabolism and mechanical function: ^{31}P -NMR study in the isolated perfused rat heart. *Tohoku Journal of Experimental Medicine*, 161: 241~250, 1990.
- 5) 測之上昌平: ^{31}P -NMR spectroscopy を用いた保存肝細胞内高エネルギー磷酸化合物の変動に関する研究. *東京女子医科大学雑誌*, 59: 1239~1247, 1989.
- 6) 湯浅龍彦, 山室 学, 梅田雅宏: 磁気共鳴スペクトロスコピー (MRS) の脳疾患研究への応用. *神経内科*: 32(6), 570~581, 1990.
- 7) **Menguy, R., Desbaillets, L. and Masters, Y.F.:** Mechanism of stress ulcer: influence of hypovolemic shock on energy metabolism in the gastric mucosa. *Gastroenterology*: 66, 46~55, 1974.
- 8) 清澤智晴, 石川詔雄, 田中栄之介, 河野真弓, 脇本佳代子, 深尾 立, 岩崎洋治, 添田周吾: 高速液体クロマトグラフィーによる簡便な組織スクレオチドの測定. *肝臓*, 29: 117~118, 1988.
- 9) 五十嵐博中: 多核種磁気共鳴スペクトル法による砂ネズミ脳虚血モデルにおける脳代謝の経時的観察. *日本医科大学雑誌*, 56: 339~348, 1989.
- 10) 可知謙治, 荒木 力, 内山 暁: 肝硬変症におけるフルクトース負荷肝 P- ^{31}P MR spectroscopy. *日本医学放射線学会雑誌*, 51: 127~132 1991.
- 11) 小野成樹, 森安史典, 玉田 尚, 伴 信之, 宋 安成, 梶村幸三, 川崎俊彦, 木村 達, 山下幸孝, 染田 仁, 内野治人, 飯島直人, 藤田明德, 橋本泰司: in vivo ^{31}P -MRS でみたバンプレッション 投与時の肝エネルギー代謝. *日本消化器病学会雑誌*, 86: 2204~2209, 1989.
- 12) **Nakada, T., Kwee, I.L., Miyazaki, T., Iriguchi, N. and Maki, T.:** ^{31}P NMR Spectroscopy of the stomach by Zig-Zag Coil. *Magnetic resonance in medicine*, 5: 449~455, 1987.
- 13) **Karczmar, G.S., Tavares, N.J. and Weiner, M.W.:** A ^{31}P NMR study of the GI tract: Effect of fructose loading and measurement of transverse relaxation times. *Magnetic Resonance in medicine*, 9: 8~15, 1989.
- 14) **Morishita, T. and Guth, P.H.:** Effect of exogenous acid on the rat gastric mucosal microcirculation in hemorrhagic shock. *Gastroenterology*, 92: 1958~1964, 1987.
- 15) **Smith, S.M., Holm-Rutigli, L., Perry, M.A., Grisham, M.B., Arfors, K., Granger, D.N. and Kvietys, P.R.:** Role of neutrophils in hemorrhagic shock-induced gastric mucosal injury in the rat. *Gastroenterology*, 93: 466~471, 1987.
- 16) **Yanagisawa, M., Kurihara, H., Kimura, S., Tomobe, Y., Kobayashi, M., Mitsui, Y., Yazaki, Y., Goto, K. and Masaki, T.:** A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature*, 332: 411~415, 1988.
- 17) **Wallace, J.L., Cirino, G., De Nucci, G., Mcknight, W. and MacNaughton, W.K.:** Endothelin has potent ulcerogenic and vasoconstrictor actions in the stomach. *American Journal of Physiology*, 256:G661~G666, 1988.
- 18) 秋本真寿美, 重本六男, 石川雅枝, 山縣英晴, 栗原毅, 高田茂登子, 三輪洋子, 赤上 晃, 勝 健一, 山内大三, 前田 淳, 山下克子, 横山 泉, 竹本忠良: 内皮細胞由来血管収縮因子 endothelin によるラット胃粘膜障害とその発生機序に関する検討. *日本消化器病学会雑誌*, 87: 1364~1370, 1990.
- 19) 鈴木雅之, 末松 誠, 三浦総一郎, 永田博司, 森下鉄夫, 織田正也, 土屋雅春: 急性胃粘膜病変形成時の活性酸素産生における xanthine oxidase 系および好中球の役割. *日本消化器病学会雑誌*, 85: 835~842, 1988.
- 20) **Granger, D.N., Rutigli, G. and McCoord, J.M.:** Superoxide radicals in feline intestinal ischemia. *Gastroenterology*, 61: 22~29, 1981.
- 21) **Granger, D.N., McCoord, J.M., Parks, D.A. and Hollwarth, M.E.:** Xanthine oxidase inhibitors attenuate ischemia-induced vascular permeability changes in the cat intestine. *Gastroenterology*, 90: 80~84, 1986.

(平成4年2月6日受付)