

学位論文題名

発育ラット脳の水素および³¹Pの

磁気共鳴スペクトロスコピー

学位論文内容の要旨

I. 研究目的

脳の発育は、神経細胞及び神経膠細胞の増殖、移動、そして分化といった段階に分けられるが、ラットの脳は人間のそれと比較してかなり未熟な状態で生まれ、生後に神経細胞の分化及び神経膠細胞が起こっている。これら脳での形態変化は同時に劇的な質的变化、すなわち生化学的变化を伴っている。本研究は、著明な質的变化が起こる新生児期のラットの脳を材料に、生後28日までの脳の成熟の生化学的变化を、¹Hおよび³¹Pスペクトロスコピーを用いて、エネルギー代謝、磷脂質の代謝、脳内 pH、脳内各種アミノ酸の変化を無侵襲的に、かつ系統的に解明することを目的として行われた。

II. 方 法

1. 動物モデル

Sprague - Dawley ラットの雌（生後14-24週）を生殖可能な雄と交尾させ、腔スミアにて精子が陽性なのを確認した上で、雄より分離、飼育し、自然出産させた仔を使用した。発達による脳の変化をみるため、生後1, 4, 7, 10, 14, 18, 22, 28日目の（各5匹）計40匹を用いた。母親、仔ラット共に固定食、水共に自由に飲食させ、飼育した。測定の際は、Ketamine hydrochloride 50mg/kg腹腔内投与にて麻酔した上で、NMR プローベに設置した。なお生後10日以降の仔については、脳以外の信号の混入を防ぐために、頭皮と一部側頭筋を剥離して、実験に用いた。

2. MR spectroscopy

使用機種は、Nicolet 社製 NMR システム NTF - 200（静磁場強度4.7Tesla）である。スペクトロスコピーのコイルとして、テフロン防水した14Gauge の銅線にて作成した8×12mmの楕円形の自家製表面コイルを用い、¹Hと³¹Pの両方に同調可能なスイッチコイルを使用した。

a) ¹H 1331 - 2662 composite pulse により水及び脂肪の信号抑制を行い、spectra を得た。

1331pulse と 2662pulse の間には 68msec のエコー時間をおいた。繰り返し時間は 2.5 秒、掃引幅は 2000Hz, データポイント数は 4 K (4096), 加算回数は 512 回とした。信号の初期成分に残存する強い水および脂肪の信号を抑制するために、正弦関数の window を掛け、この信号を Fourier 変換して周波数領域の信号を得た。

b) ^31P H spectroscopy が終了したところで、次にコイルを ^31P に同調し、 ^31P の spectra を 1 pulse sequence により測定した。励起パルス幅は 20μ , 掃引幅は 6000Hz, データポイント数は 4 K (4096) とした。得られた自由減衰信号に雑音フィルターとして 30Hz の指数関数をかけ、Fourier 交換し、位相補正を行い、 ^31P の spectra を得た。

III. 結 果

新生児ラット脳の In vivo の ^1H の spectra の化学シフトでは、テトラメチルシランを基準 (0 ppm) として、2.02ppm に N - Acetyl - aspartate (NAA), 3.04ppm に Creatine, 3.21 ppm に Choline の各ピークを認めた。また ^31P では Phosphocreatine (PCr) を基準 (0 ppm) とするが、6.79ppm に Phosphomonoester (PME), 5.05ppm 前後に Inorganic phosphate (Pi), 2.6ppm に Phosphodiester (PDE), - 2.54ppm に γ - ATP, - 7.59 ppm に α - ATP, - 16.44ppm に β - ATP の各ピークを同定した。生後 1 日目の ^1H の spectra では NAA が非常に低く、Choline が高かった。また 3.47ppm の位置に Taurine によると考えられるピークが認められた。

^31P の spectra では PME のピークが高く、PCr のピークはまだ低い所見がえられた。生後 4 日目では ^1H の spectra で、NAA のピークが上昇し、Taurine のピークは同定不能となった。生後 7 日目では Choline のピークが Creatine と同レベルとなっており、 ^31P の spectra では PCr がやや上昇してきている。生後 10 日後では NAA の急激な上昇がみられた。生後 14, 18 日では Choline のピークがかなり減少し、NAA の一層の上昇がみられる。また PCr が上昇している。生後 22, 28 日では Choline のピークは非常に減少し NAA のピークは Creatine よりかなり高くなっている。また PCr が上昇し、PME の減少が著明となった。

発育の時期によっても脳の細胞内 ATP のレベルは不変であると言う多くの報告より β - ATP を指標 (ratio の分母) として、Phosphocreatine (PCr), Phosphomonester (PME), 無機磷 (Pi), pH の変化、さらに NAA, Choline の脳の成熟に伴う変化をまとめると、 PCr/β - ATP は生後 28 日間直線状に増加を示し、一次回帰直線による解析でも明らかな相関係数

を認め、相関係数は0.99であった。PMEは生下時に高く、生後およそ10日後にピークを示し、その後減少している。NAAは生下時には低く、その後著しく増加し、生後28日後にはおおよそプラトーに達した。Cholineは生下時には高く、生後7日後そして20日後と2段階で減少していた。Taurineは生後1日目のみ認められたが、その後は認められなかった。なお生後の脳の成熟に伴う脳内のpHの変化ならびにPiのレベルの変化は認められなかった。

IV. 考 案

本研究ではIn vivo¹H, ³¹Pの spectroscopyによりPCr, NAAが生下時には低く、その後発達と共に増加すること。Choline, Taurineは逆に生下時には高く、その後減少していくこと。PMEは生後10日頃にピークを示すこと。また、pH, Piなどは新生児期の maturation では変化しない等がわかった。ラット脳の形態的発達には4つの時期にわけることができる。すなわち、第1期は（出生前）は神経細胞の増加がみられ、第2期（生後1日から10日）は軸索の成長と樹状突起の増加がみられ、第3期（生後10日から20日）では急速な髄鞘形成、そして第4期（生後20日から30日）は緩徐な髄鞘形成がみられる最終成熟期と言われている。本研究でみられる物質の変化は、これら発達の時期を反映していると言える。

生後の発達期に於いて自由エネルギーの基本単位であるATPは一定レベルを示すと言われる。それとは対照的に、PCrは日令と直線的増加をしめた（相関係数0.99）。PCrの脳の成熟に伴う増加は、神経運動の増加によるエネルギー消費の増大を反映していると思われる。磷脂質は全脳の脂質の60%以上を占める腫瘍成分であり、細胞膜の構成に関与している。その磷脂質の前駆体にあたるのがPMEであり、Phosphoethanolamine, Phosphocholineに代表されるが、本研究に於いても、PMEは生後10日目に最も高く、これは脳細胞の増殖が細大となる時期とよく一致している。NAAは成熟した哺乳動物のなかで2番目に多いアミノ酸であるにもかかわらず、脳での役割は依然として不明である。しかしながらその急激に増加する時期が脳内の髄鞘形成の盛んな時期と一致することから、NAAのアセチル化した物が、脂肪酸の生合成の原料として、発育する脳の髄鞘形成に於いて重要な役割を果たしている可能性が示唆される。

VI. 結 論

新生児のラットの生後28日までの脳の成熟の生化学的変化を¹Hおよび³¹Pスペクトロスコピーを用いて、経時的に観察することにより、次の結論を得た。

1) PCr/ β -ATPは生後28日間直線状に増加を示した（相関値=0.99）。PME/ β -ATP

は生下時に高く、生後およそ10日後にピークを示し、その後減少していた。2) 脳内 pH 及び Pi のレベルは生後28日間では変化はなかった。3) NAA は生下時には低く、その後増加し、生後28日後におおよそプラトーに達していた。4) Choline は生下時には高く、生後7日後そして20日後と2段階で減少していた。5) Taurine は生後1日目のみ認められたが、その後は認められなかった。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 阿 部 弘
副 査 教 授 石 橋 輝 雄
副 査 教 授 阿 部 和 厚

脳の発育は、神経細胞及び神経膠細胞の増殖、移動、そして分化といった段階に分けられる。ラットでは生後速やかに神経細胞の分化および神経膠細胞の増殖、分化がおこっている。本研究は、急速に質的变化が起こる新生児期のラットの脳を材料に、生後28日までの脳の成熟の生化学的变化を、 ^1H および ^{31}P スペクトロスコピーを用いて、エネルギー代謝、磷脂質の代謝、脳内 pH、脳内各種アミノ酸の変化を非侵襲的に、系統的に解析した。

新生児期のラット脳の *In vivo* の ^1H の化学シフトでは、テトラメチルシランを基準として 2.02ppm に N - acetyl - aspartate (NAA), 3.04ppm に Creatine, 3.21ppm に Choline の各ピークを認めた。また ^{31}P では Phosphocreatine (PCr) を基準として、6.79ppm に Phosphomonoester (PNE), 5.05ppm 前後に無機磷 (Pi), 2.6ppm に Phosphodiester, -2.54ppm に γ - ATP, -7.59ppm に α - ATP, -16.44ppm に β - ATP の各ピークを同定した。生後1日目の ^1H では NAA が非常に低く、Choline が高かった。また 3.47ppm の位置に Taurine によると考えられるピークが認められた。 ^{31}P では PME のピークが高く、PCr のピークはまだ低い所見がえられた。生後4日目では ^1H で、NAA のピークが上昇し、Taurine のピークは同定不能となった。生後7日目では Choline のピークが Creatine と同レベルとなっており、 ^{31}P では PCr がやや上昇してきている。生後10日後では NAA の急激な上昇がみられた。生後14, 18日では Choline のピークがかなり減少し、NAA の一層の上昇がみられた。また PCr の上昇がみられた。生後22, 28日では Choline のピークは非常に減少し NAA のピーク

は Choline よりかなり高くなっていた。また³¹Pでは PCr が上昇し、PME の減少が著明であった。 β -ATP を指標 (ratio の分母) として Phosphocreatine (PCr), Phos-phomonoester (PME), 無機磷 (Pi, pH の変化, さらに NAA, Choline の脳の成熟に伴う変化をまとめると, PCr/ β -ATP は生後28日間直線状に増加を示し, 一回帰直線による解析でも, 明かな相関係数を認め, 相関係数は0.99であった。PME は生下時に高く, 生後およそ10日後にピークを示し, その後減少していた。脳内 pH および Pi のレベルは生後28日間では変化はなかった。NAA は生下時には低く, その後著しく増加し, 生後28日後にはおおよそプラトーに達した。Choline は生下時には高く, 生後7日後そして20日後と2段階で減少していた。Taurine は生後1日目のみ認められたが, その後は認められなかった。

ラット脳の形態的発達には4つの時期に分けることができる。すなわち, 第1期は(出生前)は神経細胞の増加がみられ, 第2期(生後1日から10日)は軸索の成長と樹状突起の増加がみられ, 第3期(生後10日から20日)では急速な髄鞘形成, そして第4期(生後20日から30日)は緩徐な髄鞘形成がみられる最終成熟期と言われている。本研究でみられる物質の変化は, これら発達の時期を反映していると言える。

生後の発達期に於いて自由エネルギーの基本単位である ATP は一定レベルを示すと言われている。それとは対照的に, PCr は日令と直線的増加をしめした(相関係数0.99)。この PCr の脳の成熟に伴う増加は, 神経活動の増加によるエネルギー消費の増大を反映していると思われる。

磷脂質は全脳の脂質の60%以上を占める主要成分であり, 細胞膜の構成に関与している。その磷脂質の前駆体にあたるのが PME であり, Phosphoethanolamine, Phosphocholine に代表される。本研究に於いても, PME は生後10日目に最も高く, これは神経細胞及び神経膠細胞の増殖が細大となる時期とよく一致していた。

NAA は成熟した哺乳動物になかで2番目に多いアミノ酸であるにもかかわらず, 脳での役割は依然として不明である。しかしながらその急激に増加する時期が脳内の髄鞘形成の盛んな時期と一致することから, NAA のアセチル化した物が, 脂肪酸の生合成の原料として, 発育する脳の髄鞘形成に於いて重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

口頭発表の審査会において, 阿部和厚教授より¹H及び³¹Pスペクトロスコピーの各ピークとその絶対値との関係, またラット脳での髄鞘形成と N-acetyl-aspartate (NAA) のピークとの関係, さらに Phosphocreatine, ATP などの高エネルギー磷酸化合物とラットの脳の発達についての質問がなされた。また石橋輝雄教授より, β -ATP が³¹Pの各ピーク(すなわち PME, Pi, PCr)との比の分母として適当か, 磷脂質の前駆体と PME, Choline の関係について

て、 ^{31}P スペクトロスコピーでのPCrと ^1H スペクトロスコピーでのCrの関係について質問がなされた。さらに藤本征一郎教授より、ラットの脳代謝にたいする麻酔薬の影響、MRスペクトロスコピー検査時の周囲の温度、発育ラットの栄養について質問がなされた。最後に、寺沢浩一教授より臨床に於ける研究の可能性について質問がなされた。これらについて、申請者は概ね適切な回答を行った。

本研究は発育ラット脳に於いて水素及び ^{31}P の磁気共鳴スペクトロスコピーを用いて、各種アミノ酸等の変化を明らかにしたものであり、有意義な研究と考えられ、学位授与に値する。