

厚生科学研究費補助金（脳科学研究事業）

---

---

**$^{13}\text{C}$ -MRS を用いた痴呆性疾患に対する新しい  
診断技術と治療薬の開発に関する基礎的研究**

平成13年度 研究報告書

---

---

**$^{13}\text{C}$ -MRS study for the development of new diagnostic and therapeutic  
methods for neurological disorders associated with dementia**

主任研究者 大槻泰介  
国立精神・神経センター武蔵病院

平成14年3月

# 目 次

## 総括研究報告

主任研究者 国立精神・神経センター武蔵病院 大槻泰介

$^{13}\text{C}$ -MRS を用いた痴呆性疾患に対する新しい診断技術と治療薬の開発に関する基礎的研究

## 分担研究報告

無侵襲的  $^{13}\text{C}$ -MRS 測定による脳内グルタミン酸、グルタミン代謝率の測定—[1- $^{13}\text{C}$ ]—ブドウ糖経口投与方法に対するモデル式の構築—

創価大学生命科学研究所 金松知幸

実験的てんかん発作中のブドウ糖—アミノ酸代謝の変化  $^{13}\text{C}$ -MRS を用いた研究

国立精神・神経センター国府台病院 湯浅龍彦

$^{13}\text{C}$  標識神経伝達物質の作成

明治薬科大学薬品化学 梶原正宏

## 研究業績

厚生科学研究費補助金（脳科学研究事業）  
（分担）研究報告書

<sup>13</sup>C-MRS を用いた痴呆性疾患に対する新しい診断技術と治療薬の開発  
に関する基礎的研究  
—平成13年度研究報告—

分担研究者 大槻 泰介

国立精神・神経センター武蔵病院部長

研究要旨：<sup>13</sup>C-MRS 装置は非侵襲的に脳代謝を計測できる唯一の手法である。本研究は、NEDO プロジェクトで開発された装置を用いて、これを痴呆症疾患に対する診断や治療法開発に結び付けようとするものである。本年は、患者ボランティア試験を実施した。試験では、被験者に 1 位標識 <sup>13</sup>C グルコースを経口にて服用してもらったのち、全 3 時間（[ 30 分休憩-1 時間測定 ] × 2）にわたり後頭部の 2 箇所から <sup>13</sup>C グルコース代謝物の信号を MR スペクトルとして観測し、得られた <sup>13</sup>C グルタミン酸やグルタミン信号の時系列データから、脳細胞機能を知る上で重要な TCA 回路代謝速度などを算出した。その結果、痴呆症患者 1 例の計測結果では、0.21 μmol/g/分という値を得ており、昨年度同様に健常人に比べ脳代謝が低下する傾向にあることを示した。また、てんかんでは患側における代謝の低下を示すとともにグルタミン量の増大を示すデータが得られた。さらに MELAS では、投与した <sup>13</sup>C グルコースが旺盛に乳酸に代謝されていくことが確認された。

#### A, 研究目的

本研究は、NEDO プロジェクトで開発された <sup>13</sup>C-MRS 装置を用い、これまで不可能であったヒトの脳代謝過程を In vivo に解析し、痴呆症疾患に対する <sup>13</sup>C-MRS を用いた新しい診断技術と治療法の開発に結びつけることを目的としている。本研究で得られる知見は極めて新しく、ヒトの脳における神経伝達物質の合成・代謝過程を明らかにする上で、きわめて重要な成果をもたらすと考えられ、また、この検査の非侵襲性と簡便性から、痴呆症の早期診断と早期治療を行う上で、今後広く普及する検査となる可能性が予想される。

初年度は若年正常ボランティアでの脳代謝計測と疾患患者のパイロットスタディ、次年度は老年の正常ボランティアでの基礎データ収集と痴呆症患者などを対象とした患者試験、本年度はさらに MELAS 等多様な脳疾患に対しても評価を行った。

#### B, 研究方法

##### <対象>

痴呆症、てんかん、MELAS 患者で、耐糖異常症などの合併症を有さない者を対象とした。試験前日までに、全身状態の検査として、問診／一般血液生化学検査／尿糖／空腹時血糖値／耐糖能検査(GTT)／血圧測定／心電図、高次脳機能検査として、WAIS-R/WMS-R/Mini-mental Test 等を実施し、最終的に痴呆症患者 1 例、てんかん 2 例、MELAS 2 例を選定した。

##### <システム>

ヒト用 <sup>13</sup>C-MRS 装置は、東芝製 2T <sup>13</sup>C スペクトロスコープ研究用装置に NEDO プロジェクトで開発されたパルスシーケンス、高周波コイル、傾斜磁場コイルおよび電源、システムコントローラを組み込んだものである。パルスシーケンスとして組み込まれているマルチスライス HSQC 法は、高感度／良好な化合物の分離／同時複数箇所からのデータ収集を可能にしている。高周波コイルは、複数の表面コイルを関心領域周辺に配置するマルチ表面コイル方式を用い、関心領域から高感度に信号を検出できるようにした。傾斜磁場コイルに関しては、強力かつ時間幅の狭い傾斜磁場パルスを発生できるようにしたことでパルスシーケンスの更なる高感度化に役立っている。

今回関心領域を後頭部とした。マルチスライス HSQC 法では、左右の後頭部 2 箇所(64ml or 48ml)を計測領域として設定し、左右一組の <sup>13</sup>C スペクトルデータを 5 分で収集できるように調整した。また表面コイルとしては、後頭部支持用のヘッドレストに矩形表面コイル(110mm\*130mm)を 3 個配置した。頭部不動化のため後頭部および頸部にマットを置き、さらに額をカバーで固定した。

##### <試験>

被験者には、前夜 9 時までに食事を済ませ、当日は糖分を含まない飲み物を除き飲食を控えてもらった。試験では、まず被験者に耳栓をしてもらった後装置に入ってもらい、磁場均一性調整などのシステム調整を行った。その後、右手上腕静脈

に採血ラインを確保し、1位標識  $^{13}\text{C}$  グルコースを体重 1kg あたり 0.75g (水および炭酸水にて 30% 溶液に調整) を服用してもらった。約 5 分後、仰臥姿勢で装置に入ってもらい、磁場均一性の微調整、MRI 撮像などを行い、投与約 30 分後より 1 時間、30 分の休憩をはさんでさらに 1 時間、安静閉眼状態で  $^{13}\text{C}$  スペクトルデータ収集を行った。採血は、服用後 30 分までは 5 分おき、30-60 分の間は 15 分おき、さらに 60-180 分の間は 30 分おきで行い、グルコース濃度、 $^{13}\text{C}$  グルコース比 ( $^{13}\text{C}$ -Glc F.E.)、インシュリン値等を計測した。

#### <データ処理>

3 個の表面コイルから得られた  $^{13}\text{C}$  スペクトルは重み付け加算処理し、最終的に 2 個所の  $^{13}\text{C}$  スペクトルの時系列データを得た。得られたスペクトルすべてから、グルタミン酸の 4 位と 3 位、グルタミンの 4 位の  $^{13}\text{C}$  の信号値をデータ処理 (カーブフィッティング) により算出する一方、血中  $^{13}\text{C}$  グルコースの F.E. からそれぞれの  $^{13}\text{C}$  F.E. の最大値を決定し、最終的に各  $^{13}\text{C}$  化合物の F.E. の時系列データを得た。

次に、上記時系列データと血中グルコース量および血中  $^{13}\text{C}$  グルコース F.E. のデータを“1 位標識  $^{13}\text{C}$  グルコースの代謝モデル”に代入し、TCA 回路の代謝速度を算出した。代謝モデルは Masonらの方法 (J. Cereb. Blood Flow Metab., 15:12-25, 1995) に基づいている。まず、グルコースの  $^{13}\text{C}$  がグルタミン酸やグルタミンに取り込まれていくまでの過程を、比較的脳内に高濃度に存在するグルコース、乳酸 (ピルビン酸含む)、グルタミン酸、グルタミン、アスパラギン酸の各コンパートメントに分けて、各コンパートメント間の  $^{13}\text{C}$  のやり取りを微分方程式で表す。血中グルコース量やグルコースの  $^{13}\text{C}$  F.E. を入力として上記微分方程式をとき、グルタミン酸の 4 位や 3 位、グルタミンの 4 位の  $^{13}\text{C}$  F.E. の時間変化を計算する。計測値との差を求め、これが最小になるように方程式中のパラメータである“TCA 回転速度 ( $V_{\text{TCA}}$ )”や“グルタミン合成速度 ( $V_{\text{Gln}}$ )”の値を調整する (シンプレックス法)。最終的に計測値と計算値が合うように調整された時の TCA 回転速度が求めたい値となる。上記方程式中で用いる脳内グルタミン酸やグルタミン濃度、乳酸濃度やその脳と血液間の交換速度などは、現段階で計測できないため文献値を用いた。

#### C. 結果

痴呆症患者では  $V_{\text{TCA}}$  は  $0.21 \mu\text{mol/g/分}$ 、 $V_{\text{Gln}}$  は  $0.035 \mu\text{mol/g/分}$  であり、昨年度実施した正常老年ボランティアに対し TCA 回路の代謝速度の低下を示した。一方、前年度/前々年度に引き

続き、てんかん患者 2 例について患側と健側での代謝速度比較を行った結果、 $V_{\text{TCA}}$  は健側:  $0.25 \mu\text{mol/g/分}$ 、患側:  $0.19 \mu\text{mol/g/分}$  であった。これにより全 5 例となった  $V_{\text{TCA}}$  データの平均を取ると、健側:  $0.31 \mu\text{mol/g/分}$ 、患側:  $0.24 \mu\text{mol/g/分}$  で患側の脳代謝低下を示す結果となった。また患者脳では、患側/健側にかかわらずグルタミン酸濃度にはグルタミン濃度が高い傾向が見られ、グリオーシスを示すものと考えられる。一方 MELAS 患者では、投与後 30 分~60 分の  $^{13}\text{C}$  グルタミン酸および  $^{13}\text{C}$  乳酸濃度を健常人と比べると、前者の低下と後者の増大を示すデータが得られた。ミトコンドリア障害により、グルタミン酸合成が抑えられる一方、エネルギー獲得のために盛んに嫌氣的解糖が行われていることを示す知見となった。

#### D. 結論

$^{13}\text{C}$ -MRS 装置を用いることにより、1 位標識  $^{13}\text{C}$  グルコースを経口投与して TCA 回路の代謝速度などの脳代謝に関する重要な知見を得られることを確認した。痴呆症患者、てんかん患者、MELAS 患者でそれぞれの特徴的な脳代謝動態を計測できた。

#### E. 研究発表

1. 大槻泰介、松本暁子、金松知幸、塚田裕三、岡本和也、渡邊英宏、梅田匡朗:  $^{13}\text{C}$ -MRS による成人ヒト後頭葉グルタミン酸動態の検討.  $^{13}\text{C}$  医学, 11,20-21 (2001).
2. K. Okamoto, H. Watanabe, M. Umeda, M. Oda, T. Kanamatsu, Y. Tsukada, A. Matsumoto, T. Otsuki: Multivoxel Metabolic Rate Measurement in Human Brain Following Oral Administration of [ $^{13}\text{C}$ ] glucose with 2-T Highly Sensitive  $^{13}\text{C}$ -MRS System; 9<sup>th</sup> Meeting for ISMRM (p1656, 2001 年 4 月 23~29 日, Glasgow, Strathclyde, Scotland).
3. A. Matsumoto, T. Otsuki, T. Kanamatsu, Y. Tsukada, K. Okamoto, H. Watanabe, M. Umeda, T. Ohnishi, H. Matsuda: Non-invasive measurement of cerebral metabolic rates of glucose in human with  $^{13}\text{C}$ -MRS: Comparison with a PET study: XX<sup>th</sup> International Symposium on Cerebral Blood Flow, Metabolism and Function & V<sup>th</sup> International Conference on Quantification of Brain Function with PET (S20, 2001 年 6 月 9~13 日, Taipei,

Taiwan).

4. 金松知幸、大槻泰介、松本暁子、大西 隆、松田博史、岡本和也、渡邊英宏、梅田匡朗、塚田裕三：非侵襲的  $^{13}\text{C}$ -MRS による後頭葉ブドウ糖代謝測定：PET による測定との比較；第 29 回日本磁気共鳴医学会（2001 年 9 月 20～22 日、筑波国際会場）。
5. 岡本和也、渡邊英宏、梅田匡朗、大槻泰介、松本暁子、小田正記、金松知幸、塚田裕三： $^{13}\text{C}$ -MRS による脳内代謝の定量化に関する基礎的検討（2）；第 29 回日本磁気共鳴医学会（2001 年 9 月 20～22 日、筑波国際会議場）。
6. 金松知幸、大槻泰介、Graeme Mason, Kitt Petersen, Douglas Rothman：無侵襲的  $^{13}\text{C}$ -MRS 測定による脳内グルタミン酸、グルタミン代謝率の測定 -  $[1-^{13}\text{C}]$ -ブドウ糖経口投与方法に対するモデル式の構築 - ；第 17 回  $^{13}\text{C}$  医学応用研究会（2001 年 11 月 17 日、東京大学山上会館）。
7. 岡本和也、渡邊英宏、梅田匡朗、大槻泰介、小田正記、金松知幸、塚田裕三： $^{13}\text{C}$ -MRS による成人ヒト後頭部グルタミン酸代謝動態の検討（2）；第 17 回  $^{13}\text{C}$  医学応用研究会（2001 年 11 月 17 日、東京大学山上会館）。
8. 大槻泰介、金松知幸、塚田裕三、岡本和也、渡邊英宏： $^{13}\text{C}$ -MRS による後頭葉てんかん症例のグルタミン酸代謝動態の検討；第 17 回  $^{13}\text{C}$  医学応用研究会（2001 年 11 月 17 日、東京大学山上会館）。

厚生科学研究費補助金（脳科学研究事業）  
（総括）研究報告書

<sup>13</sup>C-MRS を用いた痴呆性疾患に対する新しい診断技術と治療薬の開発  
に関する基礎的研究  
—平成13年度研究総括報告—

主任研究者 大槻 泰介

国立精神・神経センター武蔵病院部長

研究要旨：<sup>13</sup>C は、自然界に約1%の割合で存在する炭素（<sup>12</sup>C）の非放射性安定同位体で、<sup>13</sup>C とは異なり核磁気共鳴スペクトルが観測できるため、生体に <sup>13</sup>C 標識物質を投与することにより、<sup>13</sup>C をいわば非放射性のトレーサーとして、物質の生体内における代謝動態を定量的に測定することができる。本研究は、<sup>13</sup>C 標識ブドウ糖の経口投与により、痴呆性疾患における脳物質代謝動態を、<sup>13</sup>C-MRS を用いて、非侵襲的に測定することを目的としている。本研究は、痴呆性疾患患者における臨床研究、動物を用いた基礎実験、<sup>13</sup>C 安定同位体開発の3つ研究チームより構成されるが、平成13年度の主な成果としては、臨床研究では、1) 軽度痴呆症患者における TCA 回路の代謝速度の低下、2) てんかん、MELAS 症例での脳代謝異常の存在が示された。またエール大学との共同研究で、<sup>13</sup>C 標識ブドウ糖の経口投与方法と持続静脈投与方法を比較し、両者ともほぼ同等の  $V_{TCA}$  値が得られることがわかった。また <sup>13</sup>C 安定同位体開発においては、光学活性アミノ酸の位置選択的合成法について検討がなされた。

分担研究者氏名：

大槻泰介 国立精神・神経センター武蔵病院部長  
金松知幸 創価大学生命科学研究所教授  
湯浅龍彦 国立精神・神経センター国府台病院  
部長  
梶原正宏 明治薬科大学薬学部薬品化学教授

痴呆性疾患に対する <sup>13</sup>C-MRS を用いた新しい診断技術と治療法の開発に結びつけることを目的としている。

A, 研究目的

高齢化社会をむかえ、痴呆の早期診断と治療法の開発が現在の課題となっている。痴呆症の病態を知り治療法を開発する上で、これまでポジトロンエミッショントモグラフィ（PET）を用いた研究が主に行われてきたが、PET は、放射性物質を用いること、投与薬物の合成にサイクロトロンが必要であることなど、広く行われるには制限がある。一方、<sup>13</sup>C-MRS は、自然界にも微量に存在する非放射性同位元素 <sup>13</sup>C を用い、核磁気スペクトロスコピー（MRS）にて生体に取り込まれた <sup>13</sup>C を検出する新しい方法であり、その非侵襲性が大きな特徴とされる。又、生体に取り込まれた <sup>13</sup>C は、自然の代謝経路に従って、様々な代謝産物に姿を変え消費されてゆくが、MRS はこの過程を経時的に測定することが可能であり、脳内の代謝経路及び代謝速度に関する様々な情報を *in vivo* で得ることができる画期的な方法である。本研究は、この <sup>13</sup>C-MRS を用い、これまで測定不能であったヒトの脳代謝過程を *in vivo* に解析し、

B, 研究方法

本研究プロジェクトは、I) 痴呆性疾患患者における臨床研究、II) 動物を用いた基礎実験、III) <sup>13</sup>C 安定同位体開発、の3つ研究チームより構成され、臨床研究チーム（国立精神・神経センター）は、1) 痴呆性疾患の臨床的神経放射線の評価、2) 健常ボランティアでの検討、及び3) 痴呆性疾患患者での検討を行い。また、基礎実験チーム（創価大学生命科学研究所）は、健常及び疾患モデル動物での検討、<sup>13</sup>C 安定同位体開発チーム（明治薬科大学）は、新しい <sup>13</sup>C-化合物の合成を行う。

C, 平成13年度研究結果

1、<sup>13</sup>C-MRS を用いた痴呆性疾患の評価

本年度は、痴呆症、てんかん、MELAS 患者を対象とした。痴呆症患者では  $V_{TCA}$  は  $0.21 \mu\text{mol/g/分}$ 、 $V_{\text{glu}}$  は  $0.035 \mu\text{mol/g/分}$  であり、昨年度実施した正常老年ボランティアに対し TCA 回路の代謝速度の低下を示した。一方、前年度/前々年度に引き続き、てんかん患者2例について患側と健側での代謝速度比較を行った結果、 $V_{TCA}$  は健側： $0.25 \mu\text{mol/g/分}$ 、患側： $0.19 \mu\text{mol/g/分}$ であった。これにより全5例となった  $V_{TCA}$  データの平均

を取ると、健側：0.31  $\mu\text{mol/g/分}$ 、患側：0.24  $\mu\text{mol/g/分}$ で患側の脳代謝低下を示す結果となった。また患者脳では、患側/健側にかかわらずグルタミン酸濃度に比べグルタミン濃度が高い傾向が見られ、グリオーシスを示すものと考えられる。一方 MELAS 患者では、投与後 30 分～60 分の  $^{13}\text{C}$  グルタミン酸および  $^{13}\text{C}$  乳酸濃度を健常人と比べると、前者の低下と後者の増大を示すデータが得られた。ミトコンドリア障害により、グルタミン酸合成が抑えられる一方、エネルギー獲得のために盛んに嫌氣的解糖が行われていることを示す知見となった。

## 2、[1- $^{13}\text{C}$ ]-ブドウ糖経口投与法と静脈内投与法の比較：

Yale 大学との共同研究として、経口投与法と静脈内連続投与法の測定を、4 人の健常ボランティアで行った。その結果、静脈内連続投与法では、投与開始後 5～10 分で血中[1- $^{13}\text{C}$ ]-ブドウ糖分画は 20～60%に達するのに対し、経口投与法では 10% 以下であった。しかし投与後 60～90 分後では静脈内連続投与法、経口投与法ともにほぼ等しい値を示した。

Vglu、Vgln は経口投与法、静脈内連続投与法ともにほぼ等しい値を示したが、経口投与法において 4 被検者の値の標準誤差が大きかった。

## 3、 $^{13}\text{C}$ 標識神経伝達物質の作成

本年度は、脳研究に際し安全性が高く脳幹を通過する光学活性アミノ酸を効率良く、安価に  $^{13}\text{C}$  標識合成出来る位置選択的合成法を検討した。脳内の  $^{13}\text{C}$  標識神経伝達物質を簡便、安価に生成することが、本研究課題達成に必須であり、 $^{13}\text{C}$  標識アミノ酸の同一合成法によるフェニルアラニン、チロシン、アスパラギン酸等の簡便高選択的  $^{13}\text{C}$  標識アミノ酸合成法の開発を達成しており、 $^{13}\text{C}$  メチオニンの合成も達成した。これらの  $^{13}\text{C}$  標識アミノ酸の医学応用を検討した。うつ病患者の初期においては従来考えられていなかった肝臓でフェニルアラニンの脱炭酸反応は健常人に比して 2 倍に達する活性が  $^{13}\text{C}$  呼気試験結果から認めた。また、合成した  $^{13}\text{C}$  標識アミノ酸の活用例としてラット脳内への移行について検討した。投与した  $^{13}\text{C}$  フェニルアラニン、 $^{13}\text{C}$  メチオニンが脳幹を通過して、脳内に移行し存在することを  $^{13}\text{C}$ -NMR のスペクトルから確認した。

## D、結論

$^{13}\text{C}$ -MRS 装置を用いることにより、1 位標識  $^{13}\text{C}$  グルコースを経口投与して TCA 回路の代謝速度な

どの脳代謝に関する重要な知見を得られることを確認した。痴呆症患者、てんかん患者、MELAS 患者でそれぞれの特徴的な脳代謝動態を計測できた。

## E. 研究発表

### 論文発表

- 1) 渡邊英宏、梅田匡朗、岡本和也、小田正記、金松知幸、塚田裕三、松本暁子、大槻泰介： $^1\text{H}$  MRS による GABA 観測法の開発。 $^{13}\text{C}$  医学, **11**,18-19 (2001).
- 2) 大槻泰介、松本暁子、金松知幸、塚田裕三、岡本和也、渡邊英宏、梅田匡朗： $^{13}\text{C}$ -MRS による成人ヒト後頭葉グルタミン酸動態の検討。 $^{13}\text{C}$  医学, **11**,20-21 (2001).
- 3) 金松知幸、南部 篤、大槻泰介、渡邊英宏、岡本和也、梅田匡朗、塚田裕三：片側性内頸動脈 MPTP 投与によるサル脳 Vtca の変化—非侵襲的  $^{13}\text{C}$ -MRS マルチボクセル法による研究—。 $^{13}\text{C}$  医学, **11**,22-23 (2001).

### 学会発表

- 1) Multivoxel Metabolic Rate Measurement in Human Brain Following Oral Administration of [1- $^{13}\text{C}$ ] glucose with 2-T Highly Sensitive  $^{13}\text{C}$ -MRS System; K. Okamoto, H. Watanabe, M. Umeda, M. Oda, T. Kanamatsu, Y. Tsukada, A. Matsumoto, T. Otsuki: 9<sup>th</sup> Meeting for ISMRM (p1656, 2001 年 4 月 23～29 日、Glasgow, Strathclyde, Scotland).
- 2) GABA detection in the human brain using a 3D localized selective double quantum filter; H. Watanabe, M. Umeda, K. Okamoto, T. Kanamatsu, Y. Tsukada, A. Matsumoto, T. Otsuki: 9<sup>th</sup> Meeting for ISMRM (p963, 2001 年 4 月 23～29 日、Glasgow, Scotland).
- 3) Non-invasive measurement of cerebral metabolic rates of glucose in human with  $^{13}\text{C}$ -MRS: Comparison with a PET study: A. Matsumoto, T. Otsuki, T. Kanamatsu, Y. Tsukada, K. Okamoto, H. Watanabe, M. Umeda, T. Ohnishi, H. Matsuda: XX<sup>th</sup> International Symposium on Cerebral Blood Flow, Metabolism and Function & V<sup>th</sup> International Conference on Quantification of Brain Function with PET (S20, 2001 年 6 月 9～13 日、Taipei, Taiwan).
- 4) 片側性頸動脈 MPTP 投与によるサル脳グルタミン酸、グルタミン代謝速度の変化：非侵襲的 2T,  $^{13}\text{C}$ -磁気共鳴スペクトロスコピー法による研究；金松知幸、大槻泰介、南部 篤、高田昌彦、徳野博信、岡本和也、渡邊英宏、

- 梅田匡朗、塚田裕三：第 44 回日本神経化学・第 24 回日本神経科学合同大会（2001 年 9 月 26 日～28 日、国立京都国際会館）。
- 5) 選択的二量子遷移を用いた GABA 観測における巨大分子除去法の開発；渡邊英宏、岡本和也、小田正記、金松知幸、塚田裕三、大槻泰介：第 29 回日本磁気共鳴医学会（2001 年 9 月 20～22 日、筑波国際会議場）。
- 6) 非侵襲的  $^{13}\text{C}$ -MRS による後頭葉ブドウ糖代謝測定：PET による測定との比較；金松知幸、大槻泰介、松本暁子、大西 隆、松田博史、岡本和也、渡邊英宏、梅田匡朗、塚田裕三：第 29 回日本磁気共鳴医学会（2001 年 9 月 20～22 日、筑波国際会場）。
- 7)  $^{13}\text{C}$ -MRS による脳内代謝の定量化に関する基礎的検討（2）；岡本和也、渡邊英宏、梅田匡朗、大槻泰介、松本暁子、小田正記、金松知幸、塚田裕三：第 29 回日本磁気共鳴医学会（2001 年 9 月 20～22 日、筑波国際会議場）。
- 8)  $^{13}\text{C}$ -MRS による脳内代謝の定量化に関する基礎的検討（2）；岡本和也、渡邊英宏、梅田匡朗、大槻泰介、松本暁子、小田正記、金松知幸、塚田裕三：第 29 回日本磁気共鳴医学会（2001 年 9 月 20～22 日、筑波国際会議場）。
- 9) Changes in cortical glutamate metabolism in the monkey brain after the infusion of MPTP into the unilateral internal carotid artery – studies using non-invasive [ $^{13}\text{C}$ ] glucose magnetic resonance spectroscopy –; T. Kanamatsu, M. Oda, Y. Tsukada, T. Otsuki, A. Nambu, M. Takano, H. Tokuno, M. Umeda, H. Watanabe, K. Okamoto: 31<sup>st</sup> Annual Meeting, Society for Neuroscience (2001 年 11 月 10～15 日、San Diego, CA, USA).
- 10) 無侵襲的  $^{13}\text{C}$ -MRS 測定による脳内グルタミン酸、グルタミン代謝率の測定 - [ $^{13}\text{C}$ ]-ブドウ糖経口投与方法に対するモデル式の構築 - ;金松知幸、大槻泰介、Graeme Mason, Kitt Petersen, Douglas Rothman : 第 17 回  $^{13}\text{C}$  医学応用研究会（2001 年 11 月 17 日、東京大学山上会館）。
- 11)  $^{13}\text{C}$ -MRS による成人ヒト後頭部グルタミン酸代謝動態の検討（2）；岡本和也、渡邊英宏、梅田匡朗、大槻泰介、小田正記、金松知幸、塚田裕三：第 17 回  $^{13}\text{C}$  医学応用研究会（2001 年 11 月 17 日、東京大学山上会館）。
- $^{13}\text{C}$ -MRS による後頭葉てんかん症例のグルタミン酸代謝動態の検討；大槻泰介、金松知幸、塚田裕三、岡本和也、渡邊英宏：第 17 回  $^{13}\text{C}$  医学応用研究会（2001 年 11 月 17 日、



## 「無侵襲的 $^{13}\text{C}$ -MRS 測定による脳内グルタミン酸、グルタミン代謝率の測定 — $[1-^{13}\text{C}]$ -ブドウ糖経口投与方法に対するモデル式の構築—

分担研究者 金松知幸

所属 創価大学生命科学研究所

研究要旨  $^{13}\text{C}$ -MRS による無侵襲的脳内グルタミン酸、グルタミン代謝率 (Vglu, Vgln) 測定における、 $[1-^{13}\text{C}]$ -ブドウ糖経口投与 (PO) 法と静脈内連続投与 (IV) 法の比較検討を行った。4 人の健常ボランティアでの PO 法と IV 法による Vglu はそれぞれ、 $0.41 \pm 0.16$ 、 $0.61 \pm 0.11$  ( $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$ ) であり、Vgln はそれぞれ  $0.24 \pm 0.25$ 、 $0.30 \pm 0.19$  ( $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$ ) であった。PO 法、IV 法ともにほぼ等しい Vglu, Vgln を示したが、PO 法において測定値の標準誤差が大きくなることが示された。その要因として、PO の場合測定初期の血中ブドウ糖  $^{13}\text{C}$  濃度が低いため、 $[4-^{13}\text{C}]$ -グルタミン酸、グルタミンのシグナルが弱く、SN の影響を強く受けることが考えられた。その解決策として、1) より高磁場の装置を使用する、2)  $[1,6-^{13}\text{C}]$ -ブドウ糖を利用する、3) inverse detection 法で測定する、4) bolus の IV による  $[1-^{13}\text{C}]$ -ブドウ糖投与を PO 法に併用する、等が考えられた。

### A. 研究目的

我々は、 $[1-^{13}\text{C}]$ -ブドウ糖を経口投与後、脳内のグルタミン酸、グルタミンの 4 位炭素への  $^{13}\text{C}$  の流れを経時的に無侵襲的に  $^{13}\text{C}$ -MRS で測定し、ヒト脳内グルタミン酸、グルタミンの代謝率 (Vglu, Vgln) をモデル式より算出してきた。このモデル式の基本は Yale 大学の Mason 等が、 $[1-^{13}\text{C}]$ -ブドウ糖の静脈内連続投与方法に対し構築したものである。 $^{13}\text{C}$ -ブドウ糖経口投与方法で求められたヒト脳 Vglu, Vgln は静脈内連続投与方法により求められたそれらの値より低い傾向にある。そこで、その差異が  $^{13}\text{C}$ -ブドウ糖投与方法に依るものか、それ以外の要因が関与しているのかを明らかにする目的で、同一被検者で、同一測定技術で経口投与方法と静脈内連続投与方法による測定を行い、Vglu, Vgln の比較検討を行った。

### B. 研究方法

Yale 大学 Human Investigations committee の承認のもと、各ボランティアより Informed Consent を得た後、最低 3 日間の期間をあげ、

経口投与方法と静脈内連続投与方法の測定を、4 人の健常ボランティア (内 2 名は日本人) で行った。経口投与は  $0.75 \text{ g}/\text{kg}$  (15% 溶液) の 99%  $[1-^{13}\text{C}]$ -ブドウ糖をガントリー内でチューブにより吸飲した。静脈内投与は、肘窩正中静脈より 99%  $[1-^{13}\text{C}]$ -ブドウ糖の 20% 溶液 (1.1M) を投与し、血糖値が  $200 \text{ mg}/\text{dl}$  (11 mM) に達した後、60%  $[1-^{13}\text{C}]$ -ブドウ糖の 20% 溶液を可変連続的に投与し、同時に somatostatin を  $0.1 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$  で、insulin を  $24 \text{ pmol}/\text{kg}/\text{min}$  で投与し続け、血糖値を  $200 \text{ mg}/\text{dl}$  に維持した。 $^{13}\text{C}$ -MRS 測定は 2.1T 1 m bore magnet (Oxford Magnet Technologies)、Biospec spectrometer (Bruker Instruments) 装置を使用し、分極移動シーケンスと断熱パルスを併用した。データ積算回数は 128 回、計測時間は 5 分であった。得られたスペクトルに対し、LCModel によるカーブフッティングを行い、グルタミン酸の 4 位の面積は 5 分毎に、グルタミンの 4 位の面積は 15 分毎に積算した。

グルタミン酸、グルタミンの 4 位への  $^{13}\text{C}$  の流入がプラトーに達した時点 (ブドウ糖投与開始後

約2時間)でのそれらの<sup>13</sup>C濃度を、血糖<sup>13</sup>C濃度の50%、さらにその濃度が15%希釈された値と同等と見なし、それぞれの最終 fractional enrichment を求めた。

### C. 研究結果

各ボランティアにおけるPO法およびIV法での<sup>13</sup>C-ブドウ糖投与後の血糖<sup>13</sup>C濃度の経時変化を図-1に示した。血糖<sup>13</sup>C濃度は、i) IV法では投与開始後5~10分で20~60% (atom excess) に達するのに対しPO法では10%以下であった、ii) 投与後60~90分後でPO法、IV法ともにほぼ等しい値を示した。

PO法、IV法による脳内グルタミン酸、グルタミンの4位の<sup>13</sup>C濃度の経時変化(1例)を図-2に示した。図中の点は測定値を、曲線はモデル式によって算出されたフィテングカーブを示す。このフィテングカーブを算出する過程で、Vglu、Vglnが求まる(表-1)。PO法、IV法ともにVglu、Vglnはほぼ等しい値を示したが、PO法において4被検者の値の標準誤差が大きかった。(しかし、被検者の一人のデータを処理対象外とすると、PO、IV法ともに平均値はほぼ等しい値を示した。)

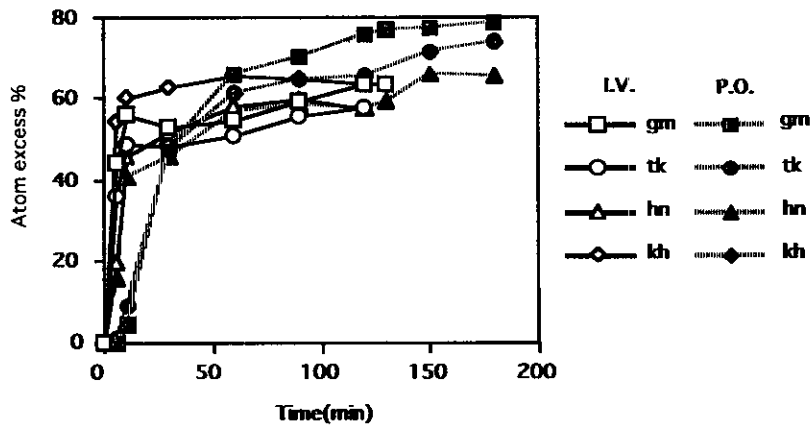


Fig.1. Time courses of <sup>13</sup>C-fractional enrichment of plasma glucose after administration of [1-<sup>13</sup>C]glucose by I.V. and P.O.

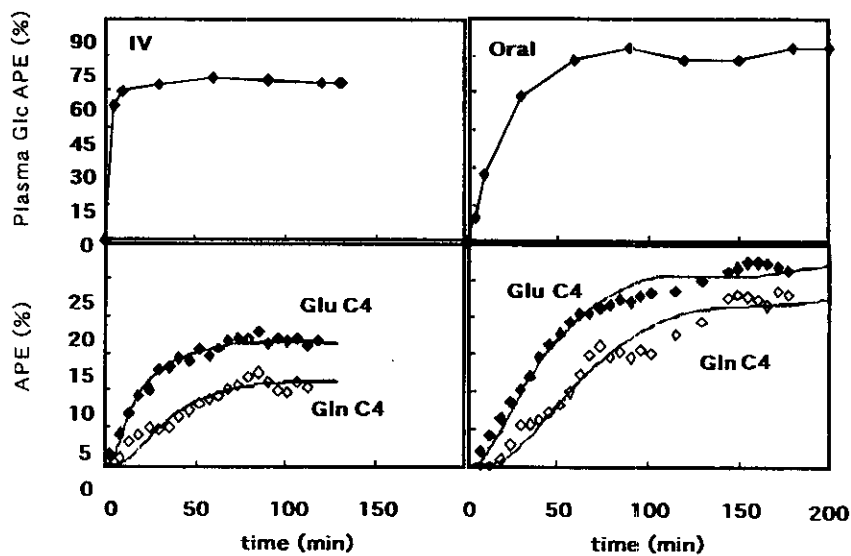


Fig. 2. The time courses of plasma glucose [1-<sup>13</sup>C]enrichment and the concentrations of glutamate and glutamine C4 with the IV (left) and oral (right) routes of administration of glucose.

Table 1. Values of the TCA cycle rate and glutamine synthesis obtained for each subject using the IV and oral routes of administration of [1-<sup>13</sup>C]glucose.

Subject	Vgln (μmol/min/g)		Vtca (μmol/min/g)	
	IV	Oral	IV	Oral
1	0.20	0.36	0.42	0.31
2	0.27	0.19	0.60	0.53
3	0.27	0.38	0.53	0.67
4	0.46	0.04	0.87	0.11
mean ± sd	0.30 ± 0.19	0.24 ± 0.25	0.61 ± 0.11	0.41 ± 0.16

#### D. 結論

1. I.V.と P.O.ともに、血中ブドウ糖の <sup>13</sup>C-fractional enrichment の変化、特に立ち上がり時期の time course (初期変化) が正確に測定できれば、同じモデル式で Vglu, Vgln を求めることが可能である。
2. 今回の測定では、I.V.と P.O.の間で、Vglu に大きな差は認められなかったが、P.O.の場合、Vglu 値の S.D.が大きな値を示した。
3. P.O.の場合、Vglu の S.D.が大きくなる原因として、Glu C-4 の <sup>13</sup>C-F.E.の初期変化が、(血中ブドウ糖の <sup>13</sup>C-F.E.が低いために) 正確に測定出来ないことがあげられる。

その解決方法として、以下の 4 点が考えられる。

- i) より高磁場の装置を使用する。
- ii) [1,6-<sup>13</sup>C]-ブドウ糖を利用する。
- iii) Inverse detection 法で測定する。
- iv) Bolus の I.V.による [1-<sup>13</sup>C]-ブドウ糖投与を P.O.法に併用する。

#### E. 研究発表

##### 論文発表

- 1) 渡邊英宏、梅田匡朗、岡本和也、小田正記、金松知幸、塚田裕三、松本暁子、大槻泰介：<sup>1</sup>H MRS による GABA 観測法の開発. <sup>13</sup>C 医

学, 11,18-19 (2001).

- 2) 大槻泰介、松本暁子、金松知幸、塚田裕三、岡本和也、渡邊英宏、梅田匡朗：<sup>13</sup>C-MRS による成人ヒト後頭葉グルタミン酸動態の検討. <sup>13</sup>C 医学, 11,20-21 (2001).
- 3) 金松知幸、南部 篤、大槻泰介、渡邊英宏、岡本和也、梅田匡朗、塚田裕三：片側性内頸動脈 MPTP 投与によるサル脳 Vtca の変化—非侵襲的 <sup>13</sup>C-MRS マルチボクセル法による研究—. <sup>13</sup>C 医学, 11,22-23 (2001).

##### 学会発表

- 1) Multivoxel Metabolic Rate Measurement in Human Brain Following Oral Administration of [1-<sup>13</sup>C] glucose with 2-T Highly Sensitive <sup>13</sup>C-MRS System; K. Okamoto, H. Watanabe, M. Umeda, M. Oda, T. Kanamatsu, Y. Tsukada, A. Matsumoto, T. Otsuki: 9<sup>th</sup> Meeting for ISMRM (p1656, 2001 年 4 月 23~29 日、Glasgow, Strathclyde, Scotland).
- 2) GABA detection in the human brain using a 3D localized selective double quantum filter; H. Watanabe, M. Umeda, K.

- Okamoto, T. Kanamatsu, Y. Tsukada, A. Matsumoto, T. Otsuki: 9<sup>th</sup> Meeting for ISMRM (p963, 2001年4月23~29日、Glasgow, Scotland).
- 3) Non-invasive measurement of cerebral metabolic rates of glucose in human with <sup>13</sup>C-MRS: Comparison with a PET study: A. Matsumoto, T. Otsuki, T. Kanamatsu, Y. Tsukada, K. Okamoto, H. Watanabe, M. Umeda, T. Ohnishi, H. Matsuda: XXth International Symposium on Cerebral Blood Flow, Metabolism and Function & Vth International Conference on Quantification of Brain Function with PET (S20, 2001年6月9~13日、Taipei, Taiwan).
  - 4) 片側性頸動脈 MPTP 投与によるサル脳グルタミン酸、グルタミン代謝速度の変化: 非侵襲的 2T, <sup>13</sup>C-磁気共鳴スペクトロスコピー法による研究; 金松知幸、大槻泰介、南部 篤、高田昌彦、徳野博信、岡本和也、渡邊英宏、梅田匡朗、塚田裕三: 第 44 回日本神経化学・第 24 回日本神経科学合同大会 (2001年9月26日~28日、国立京都国際会館)。
  - 5) 選択的二量子遷移を用いた GABA 観測における巨大分子除去法の開発; 渡邊英宏、岡本和也、小田正記、金松知幸、塚田裕三、大槻泰介: 第 29 回日本磁気共鳴医学会 (2001年9月20~22日、筑波国際会議場)。
  - 6) 非侵襲的 <sup>13</sup>C-MRS による後頭葉ブドウ糖代謝測定: PET による測定との比較; 金松知幸、大槻泰介、松本暁子、大西 隆、松田博史、岡本和也、渡邊英宏、梅田匡朗、塚田裕三: 第 29 回日本磁気共鳴医学会 (2001年9月20~22日、筑波国際会場)。
  - 7) <sup>13</sup>C-MRS による脳内代謝の定量化に関する基礎的検討 (2); 岡本和也、渡邊英宏、梅田匡朗、大槻泰介、松本暁子、小田正記、金松知幸、塚田裕三: 第 29 回日本磁気共鳴医学会 (2001年9月20~22日、筑波国際会議場)。
  - 8) <sup>13</sup>C-MRS による脳内代謝の定量化に関する基礎的検討 (2); 岡本和也、渡邊英宏、梅田匡朗、大槻泰介、松本暁子、小田正記、金松知幸、塚田裕三: 第 29 回日本磁気共鳴医学会 (2001年9月20~22日、筑波国際会議場)。
  - 9) Changes in cortical glutamate metabolism in the monkey brain after the infusion of MPTP into the unilateral internal carotid artery - studies using non-invasive [1-<sup>13</sup>C] glucose magnetic resonance spectroscopy - ; T. Kanamatsu, M. Oda, Y. Tsukada, T. Otsuki, A. Nambu, M. Takano, H. Tokuno, M. Umeda, H. Watanabe, K. Okamoto: 31<sup>st</sup> Annual Meeting, Society for Neuroscience (2001年11月10~15日、San Diego, CA, USA)。
  - 10) 無侵襲的 <sup>13</sup>C-MRS 測定による脳内グルタミン酸、グルタミン代謝率の測定 - [1-<sup>13</sup>C]-ブドウ糖経口投与方法に対するモデル式の構築 - ; 金松知幸、大槻泰介、Graeme Mason, Kitt Petersen, Douglas Rothman: 第 17 回 <sup>13</sup>C 医学応用研究会 (2001年11月17日、東京大学山上会館)。
  - 11) <sup>13</sup>C-MRS による成人ヒト後頭部グルタミン酸代謝動態の検討 (2); 岡本和也、渡邊英宏、梅田匡朗、大槻泰介、小田正記、金松知幸、塚田裕三: 第 17 回 <sup>13</sup>C 医学応用研究会 (2001年11月17日、東京大学山上会館)。
  - 12) <sup>13</sup>C-MRS による後頭葉てんかん症例のグルタミン酸代謝動態の検討; 大槻泰介、金松知幸、塚田裕三、岡本和也、渡邊英宏: 第 17 回 <sup>13</sup>C 医学応用研究会 (2001年11月17日、東京大学山上会館)。

実験的てんかん発作中のブドウ糖-アミノ酸代謝の変化  
13C-MRS を用いた研究

分担研究者 湯浅龍彦 国立精神・神経センター国府台病院部長  
金松知幸 創価大学生命科学研究所助教授

**研究要旨** てんかん発作中の脳内ブドウ糖-アミノ酸代謝の変化、特にグリアと神経細胞の代謝的交流の変化を調べる目的で、ラットに bicuculline を投与し (Bic 群)、3 分後から [2-13C]-ブドウ糖を 20 分間にわたり連続投与し、脳内アミノ酸の各位の炭素への 13C 組込量を分析用 NMR スペクトログラフィー法で測定し Sham 群と Bic 群で比較検討した。Bicuculline (Bic) 投与直後から EEG 上でてんかん発作波が記録され実験終了時まで続いた。13C 組込量の Glu-3/Glu-5 と Gln-3/Gln-5 の比及び、Gln-3/Glu-3 と Gln-5/Glu-5 の比のいずれも Sham 群と Bic 群の間で差が認められなかったことから、グリアに局在している pyruvate carboxylase (PC) の活性及び、Glutamate-glutamine cycle の活性のいずれも、てんかん発作中に変化しないことが明らかとなった。GABA-3/Glu-3 及び GABA-3/Gln-3 の比は Bic 群 (0.310, 0.337) で Sham 群 (0.144, 0.135) に比べ 2 倍強に増加しており、また、GABA-1/Glu-5 および GABA-1/Gln-5 の比も Bic 群 (0.127, 0.475) で Sham 群 (0.066, 0.265) に比べ 2 倍弱に増加していた。一方、GABA-3/GABA-1 の比は両群で差がなかったことから、グリア由来の Gln を基質とした GABA (GABA-Glutamine cycle) 合成が、てんかん発作中に著しく増加していることが明らかとなった。

**A. 研究目的** てんかん発作中に cerebral blood flow (CBF)<sup>1, 2</sup>, cerebral metabolic rate for oxygen (CMRO<sub>2</sub>)<sup>1, 2</sup>, cerebral metabolic rate for glucose (CMRgl)<sup>3</sup> が著しく上昇すること、アミノ酸濃度が変化すること<sup>4</sup> 等が知られているが、ブドウ糖-アミノ酸代謝に関する報告はほとんどされていない。また、近年、13C でラベルされたブドウ糖を生体に投与した後、脳内アミノ酸への 13C の組込み量を NMR で測定することにより、脳内アミノ酸代謝特に、ニューロンとグリア間での代謝的交流を測定することが可能になってきている<sup>5, 6</sup>。そこで我々は、てんかん発作が Glutamate-glutamine cycle や GABA-Glutamine cycle 及び PC 活性に与える影響について調べた。

**B. 実験方法** 70% NO<sub>2</sub>, 30% O<sub>2</sub> ガスに 4% のハローセンを加えた経気管ガス麻酔下で、股大動、静脈にカニューレを挿入し、動脈から血圧をモニターするとともに、適時血液を採取し、血中ガス濃度、血糖量、血糖の 13C 濃度 (F.E.) 測定を行った。ハローセン濃度を 1% に減少し、tubocurarine を皮下

投与した後、静脈より 1.2 mg/kg の bicuculline を投与し、3 分後に [2-13C]-ブドウ糖投与を開始し、Mason の方法に従い 20 分間の連続投与を行った。ブドウ糖投与開始 20 分後に頭蓋 (1 cm 径に頭皮を切開) に液体窒素を掛け、冷凍した。凍結脳よりアミノ酸を、酸・アルコール抽出し凍結乾燥後、重水にて溶き分析用 NMR で測定した。

**C. 結果及び考察** Bic 投与直後より EEG 上でてんかん発作波が記録され実験終了時まで続いた。血圧は Bic 投与直後に 180~200 mmHg に達し、実験終了直前で 120~130 mmHg を示した。Bic 群で、脳の酸・アルコール抽出画分のアラニンは 2.4 倍、GABA は 1.7 倍に上昇し、グルタミンはやや増加し、グルタミン酸はやや減少していた (表-1)。[2-13C]-ブドウ糖は解糖系を経て [2-13C]-ピルビン酸を合成する。このピルビン酸がアセチル CoA を介して TCA 回路に入ると、Glu, Gln の 5 位及び GABA の 1 位に 13C が組み込まれる。

また、PC を介して TCA 回路に入ると、Glu, Gln 及び GABA の 3 位に 13C が組み込まれる。従っ

て、Glu-3/Glu-5やGln-3/Gln-5の値が大きくなればPC活性が活発になったことを示している。また、Gln-5/Glu-5比はglutamine-glutamate cycleを示しており、この値が高値を示せばcycleが促進されたことを示す。これらの比はいずれもBic群とSham群の間に差が認められず(表-2)、bicuculline誘発性てんかん発作がPC活性、glutamine-glutamate cycle活性に影響を与えていないことが示された。GABA-1/Glu-5およびGABA-1/Gln-5の比を調べたところ(表-2)、いずれもBic群でSham群の1.8~1.9倍に増加していた。同様に、GABA-3/Glu-3, GABA-3/Gln-3の比もそれぞれ、Bic群で2.15、2.5倍に増加していた。これらのことから、てんかん発作にともないGABA-Glutamine cycleが活発になっていることが明らかとなった。GABA合成の基質として、神経細胞で合成されたGluとグリア由来のGlnが神経細胞へ移行しGluに代謝されたものがそれぞれ利用されることが知られているが7, 8)、両者のGluがどのような割合で利用されているかは明らかにされていない。神経細胞で合成されたGluは3位が<sup>13</sup>Cでラベルされていない(glutamine-glutamate cycleでラベルされていたとしてもその量は神経細胞全体のGluに比べればわずかである)ことから、てんかん発作中に増加したGABAがもし、神経細胞由来のGluを基質としていたならば、GABA-3/GABA-1の比はBic群でSham群より小さくなるはずである。しかし、今回の実験結果はGABA-3/GABA-1値が両群で等しかった。このことは、発作中のGABA合成はグリア由来のGlnを基質として行われていることを示しているものと思われる。

[ 文 献 ]

1) Plum, F., et al. (1968) Cerebral metabolic and circulatory responses to induced convulsions in animals. *Arch. Neurol.* 18, 1-13. 2) Meldrum, B.S. et al. (1976) Cerebral blood flow and metabolic rate early and late in prolonged epileptic seizures induced in rats by bicuculline. *Brain* 99, 523-542. 3) Hawkins, R.A. et al. (1974) Neasurement of the rate of glucose utilization by rat brain in vivo. *J. Neurochem.* 23, 917-923. 4) Chapman, A.G. et al. (1977) Cerebral metabolic changes during prolonged epileptic seizures in rats. *J. Neurochem.* 28, 1025-1035. 5) Shank, R.P. et al. (1993) Cerebral metabolic compartmentation as revealed by nuclear magnetic resonance analysis of D-[<sup>13</sup>C] glucose metabolism. *J. Neurochem.* 61, 315-323. 6) Sonnewald, U. et al. (1996) Portacaval anastomosis results in altered neuron-astrocytic metabolic trafficking of amino acids: evidence from <sup>13</sup>C-NMR studies. *J. Neurochem.* 67, 1711-1717. 7) Hassel, B. et al. (1995) Glia-neuronal interactions as studied by cerebral metabolism of [2-<sup>13</sup>C] acetate and [1-<sup>13</sup>C] glucose: an ex vivo <sup>13</sup>C NMR spectroscopic study. *J. Neurochem.* 64, 2773-2782. 8) Kanamatsu, T. et al. (1999) Effects of ammonia on the anaplerotic pathway and amino acid metabolism in the brain: an ex vivo <sup>13</sup>C NMR spectroscopic study of rats after administering [2-<sup>13</sup>C] glucose with or without ammonium acetate. *Brain Research* 841, 11-19.

表-1 酸-アルコール抽出画分のアミノ酸濃度

	Sham 群	Bicuculline 群	Ratio
	Mean ± SEM	Mean ± SEM	Bicu/Sham
Alanine	0.65 ± 0.04	1.54 ± 0.14	2.38
GABA	1.68 ± 0.11	2.98 ± 0.21	1.77
Glutamine	5.38 ± 0.33	6.11 ± 0.28	1.14
Glutamate	12.95 ± 0.66	10.68 ± 0.47	0.83

表-2

Bicuculline 投与にともなうグルタミン酸、グルタミン、  
GABA の 2、3、4 位への<sup>13</sup>C 組込量の変化

	Sham 群	Bicuculline 群	Ratio
	Mean ± SEM	Mean ± SEM	Bicu/Sham
Glu-3/Glu-5	0.150 ± 0.021	0.144 ± 0.008	0.96
Gln-3/Gln-5	0.456 ± 0.051	0.506 ± 0.073	1.11
Gln-5/Glu-5	0.307 ± 0.022	0.300 ± 0.029	0.98
GABA-1/Glu-5	0.066 ± 0.012	0.127 ± 0.022	1.92
GABA-1/Gln-5	0.265 ± 0.047	0.475 ± 0.123	1.79
GABA-3/Glu-3	0.144 ± 0.032	0.310 ± 0.055	2.15
GABA-3/Gln-3	0.135 ± 0.014	0.337 ± 0.075	2.50

厚生科学研究費補助金（脳科学研究事業）  
（分担）研究報告書

分担研究課題名  $^{13}\text{C}$  標識神経伝達物質の作成

分担研究者 梶原正宏 所属 明治薬科大学・薬品化学教室

研究要旨 脳研究に際し安全性が高く脳幹を通過する光学活性アミノ酸を効率良く、安価に  $^{13}\text{C}$  標識合成出来る位置選択的合成法を検討する。脳内の  $^{13}\text{C}$  標識神経伝達物質を簡便、安価に生成することが、本研究課題達成に必須であり、 $^{13}\text{C}$  標識アミノ酸の同一合成法によるフェニルアラニン、チロシン、アスパラギン酸等の簡便高選択的  $^{13}\text{C}$  標識アミノ酸合成法の開発を達成しており、 $^{13}\text{C}$  メチオニンの合成も達成した。これらの  $^{13}\text{C}$  標識アミノ酸の医学応用を検討した。うつ病患者の初期においては従来考えられていなかった肝臓でフェニルアラニンの脱炭酸反応は健常人に比して2倍に達する活性が  $^{13}\text{C}$  呼気試験結果から認めた。また、合成した  $^{13}\text{C}$  標識アミノ酸の活用例としてラット脳内への移行について検討した。投与した  $^{13}\text{C}$  フェニルアラニン、 $^{13}\text{C}$  メチオニンが脳幹を通過して、脳内に移行し存在することを  $^{13}\text{C}$ -NMR のスペクトルから確認した。

A. 研究目的

比較的安価な  $^{13}\text{C}$  標識原料を用いて、短工程で効率よく、安価に脳内の  $^{13}\text{C}$  標識神経伝達物質や有用薬物を  $^{13}\text{C}$  標識位置選択的に合成し、その医学応用を開発する。

B. 研究方法

$^{13}\text{C}$  標識アミノ酸合成は光学活性 *Dellaria's oxazinone* を塩基触媒でエノール化を行い、 $^{13}\text{C}$  標識ハロゲン化アルキル、又は  $^{13}\text{C}$  標識ハロゲン化アリルを立体選択的にカップリングさせ、開環反応、脱保護反応を行って  $^{13}\text{C}$  標識アミノ酸合成を簡便に合成する一般化法の開発を行った。また、C-1 ユニットを簡便に導入する方法として、無標

識メチオニンを液体アンモニア中、NMR で経時的に追跡し、脱メチル化反応を確認後、 $^{13}\text{C}$  ヨウ化メチルでメチル化を完結し、立体選択的に  $^{13}\text{C}$  メチオニン合成を簡便に行った。

C. 研究結果

各種  $^{13}\text{C}$  標識アミノ酸合成は光学活性 *Dellaria's oxazinone* から合成した。収率も満足できるものになった。

D. 結論

$^{13}\text{C}$ -フェニルアラニンを使用して肝機能検査を行ってきているが、うつ病患者初期について検討した。うつ病患者の初期においては従来考えられていなかった肝臓でフェ



ニルアラニンの脱炭酸反応は健常人に比して2倍に達する活性が $^{13}\text{C}$ 呼気試験結果から認められた。今後この原因について詳細に検討することが必要である。

また、 $^{13}\text{C}$ -NMRを用いて合成した $^{13}\text{C}$ 標識アミノ酸の活用例としてラット脳内への移行について検討した。投与後、15分で肝臓で極大になり、30分後に脳内で極大に達することを認めた。投与した $^{13}\text{C}$ フェニルアラニン、 $^{13}\text{C}$ メチオニンが脳幹を通過して、脳内に移行し存在することを $^{13}\text{C}$ -NMRのスペクトルから確認した。

#### E. 研究発表

論文発表：

- 1) T. Ishii, M. Furube, S. Hirano, K. Takatori, K. Iida, M. Kajiwara, 'Evaluation of  $^{13}\text{C}$ -Phenylalanine and  $^{13}\text{C}$ -Tyrosine Breath Tests for the Measurement of Hepatocyte Functional Capacity in Patients with Liver Cirrhosis', *Chem. Pharm. Bull.*, **49**, 1507-1511., (2001).
- 2) 梶原正宏 "21世紀の innovation, -安定同位体の医学薬学応用-"、「消化と吸収」24, No2-'01, 115-119, (2001).
- 3) 高取和彦、千代田健志、石井敏浩、山崎真雄、梶原正宏、" $^{13}\text{C}$ 呼気試験用新規非分散型赤外分析計(HBP-100)の開発"、*RADIOISOTOPES*, (in press).
- 4) K. Iida, S. Tokiwa, T. Ishii and M. Kajiwara, "Synthesis of 5-[4,5- $^{13}\text{C}_2$ ]- and 5-[1,5- $^{13}\text{C}_2$ ]Aminolevulinic acid', *Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals* (in press).

学会発表

- 1) 日本薬学会第122年会、梶原正宏

千代田健志、高取和彦、木村健、" $^{13}\text{C}$ -尿素呼気試験を用いたヘリコバクターピロリ除菌検査"

2) 日本薬学会第123年会、梶原正宏、石井敏浩、高取和彦、古部勝、" $^{13}\text{C}$ -Phenylalanine,  $^{13}\text{C}$ -Tyrosine を活用した肝機能検査"

## 論文発表

- 1) 渡邊英宏、梅田匡朗、岡本和也、小田正記、金松知幸、塚田裕三、松本暁子、大槻泰介：<sup>1</sup>H MRS による GABA 観測法の開発. *<sup>13</sup>C 医学*, **11**,18-19 (2001).
- 2) 大槻泰介、松本暁子、金松知幸、塚田裕三、岡本和也、渡邊英宏、梅田匡朗：<sup>13</sup>C-MRS による成人ヒト後頭葉グルタミン酸動態の検討. *<sup>13</sup>C 医学*, **11**,20-21 (2001).
- 3) 金松知幸、南部 篤、大槻泰介、渡邊英宏、岡本和也、梅田匡朗、塚田裕三：片側性内頸動脈 MPTP 投与によるサル脳 Vtca の変化—非侵襲的 <sup>13</sup>C-MRS マルチボクセル法による研究—. *<sup>13</sup>C 医学*, **11**,22-23 (2001).
- 4) T. Ishii, M. Furube, S. Hirano, K. Takatori, K. Iida, M. Kajiwara, "Evaluation of <sup>13</sup>C-Phenylalanine and <sup>13</sup>C-Tyrosine Breath Tests for the Measurement of Hepatocyte Functional Capacity in Patients with Liver Cirrhosis", *Chem. Pharm. Bull.*, **49**, 1507-1511., (2001).
- 5) 梶原正宏 "21 世紀の innovation,—安定同位体の医学薬学応用—", 「消化と吸収」24, No2-'01, 115-119, (2001).
- 6) 高取和彦、千代田健志、石井敏浩、山崎真雄、梶原正宏、"<sup>13</sup>C 呼気試験用新規非分散型赤外分析計(HBP-100) の開発", *RADIOISOTOPES*, (in press)
- 7) K. Iida, S. Tokiwa, T. Ishii and M. Kajiwara, "Synthesis of 5-[4,5-<sup>13</sup>C<sub>2</sub>]- and 5-[1,5-<sup>13</sup>C<sub>2</sub>]Aminolevulinic acid", *Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals* (in press).

## 学会発表

- 1) Multivoxel Metabolic Rate Measurement in Human Brain Following Oral Administration of [1-<sup>13</sup>C] glucose with 2-T Highly Sensitive <sup>13</sup>C-MRS System; K. Okamoto, H. Watanabe, M. Umeda, M. Oda, T. Kanamatsu, Y. Tsukada, A. Matsumoto, T. Otsuki: 9<sup>th</sup> Meeting for ISMRM (p1656, 2001 年 4 月 23~29 日、Glasgow, Strathclyde, Scotland).
- 2) GABA detection in the human brain using a 3D localized selective double quantum filter; H. Watanabe, M. Umeda, K. Okamoto, T. Kanamatsu, Y. Tsukada, A. Matsumoto, T. Otsuki: 9<sup>th</sup> Meeting for ISMRM (p963, 2001 年 4 月 23~29 日、Glasgow, Scotland).
- 3) Non-invasive measurement of cerebral metabolic rates of glucose in human with <sup>13</sup>C-MRS : Comparison with a PET study: A. Matsumoto, T. Otsuki, T. Kanamatsu, Y. Tsukada, K. Okamoto, H. Watanabe, M. Umeda, T. Ohnishi, H. Matsuda: XX<sup>th</sup> International Symposium on Cerebral Blood Flow, Metabolism and Function & V<sup>th</sup> International Conference on Quantification of Brain Function with PET (S20, 2001 年 6 月 9~13 日、Taipei, Taiwan).
- 4) 片側性頸動脈 MPTP 投与によるサル脳グルタミン酸、グルタミン代謝速度の変化：非侵襲的 2T, <sup>13</sup>C-磁気共鳴スペクトロスコピー法による研究；金松知幸、大槻泰介、南部 篤、高田昌彦、徳野博信、岡本和也、渡邊英宏、梅田匡朗、塚田裕三：第 44 回日本神経化学・第 24 回日本神経科学合同大会（2001 年 9 月 26 日~28 日、国立京都国際会館）。
- 5) 選択的二量子遷移を用いた GABA 観測における巨大分子除去法の開発；渡邊英宏、岡本和也、小田正記、金松知幸、塚田裕三、大槻泰介：第 29 回日本磁気共鳴医学会（2001 年 9 月 20~22 日、筑波国際会議場）。

- 6) 非侵襲的  $^{13}\text{C}$ -MRS による後頭葉ブドウ糖代謝測定：PET による測定との比較；金松知幸、大槻泰介、松本暁子、大西 隆、松田博史、岡本和也、渡邊英宏、梅田匡朗、塚田裕三：第 29 回日本磁気共鳴医学会（2001 年 9 月 20～22 日、筑波国際会場）。
- 7)  $^{13}\text{C}$ -MRS による脳内代謝の定量化に関する基礎的検討（2）；岡本和也、渡邊英宏、梅田匡朗、大槻泰介、松本暁子、小田正記、金松知幸、塚田裕三：第 29 回日本磁気共鳴医学会（2001 年 9 月 20～22 日、筑波国際会議場）。
- 8)  $^{13}\text{C}$ -MRS による脳内代謝の定量化に関する基礎的検討（2）；岡本和也、渡邊英宏、梅田匡朗、大槻泰介、松本暁子、小田正記、金松知幸、塚田裕三：第 29 回日本磁気共鳴医学会（2001 年 9 月 20～22 日、筑波国際会議場）。
- 9) Changes in cortical glutamate metabolism in the monkey brain after the infusion of MPTP into the unilateral internal carotoid artery – studies using non-invasive [1- $^{13}\text{C}$ ] glucose magnetic resonance spectroscopy – ; T. Kanamatsu, M. Oda, Y. Tsukada, T. Otsuki, A. Nambu, M. Takano, H. Tokuno, M. Umeda, H. Watanabe, K. Okamoto: 31<sup>st</sup> Annual Meeting, Society for Neuroscience (2001 年 11 月 10～15 日、San Diego, CA, USA).
- 10) 無侵襲的  $^{13}\text{C}$ -MRS 測定による脳内グルタミン酸、グルタミン代謝率の測定 - [1- $^{13}\text{C}$ ]-ブドウ糖経口投与方法に対するモデル式の構築 - ；金松知幸、大槻泰介、Graeme Mason, Kitt Petersen, Douglas Rothman：第 17 回  $^{13}\text{C}$  医学応用研究会（2001 年 11 月 17 日、東京大学山上会館）。
- 11) 日本薬学会第 122 年会、梶原正宏千代田健志、高取和彦、木村健、“ $^{13}\text{C}$ -尿素呼気試験を用いたヘリコバクターピロリ除菌検査”
- 12) 日本薬学会第 123 年会、梶原正宏、石井敏浩、高取和彦、古部勝、“ $^{13}\text{C}$ -Phenylalanine,  $^{13}\text{C}$ -Tyrosine を活用した肝機能検査”
- 13)  $^{13}\text{C}$ -MRS による成人ヒト後頭部グルタミン酸代謝動態の検討（2）；岡本和也、渡邊英宏、梅田匡朗、大槻泰介、小田正記、金松知幸、塚田裕三：第 17 回  $^{13}\text{C}$  医学応用研究会（2001 年 11 月 17 日、東京大学山上会館）。  
 $^{13}\text{C}$ -MRS による後頭葉てんかん症例のグルタミン酸代謝動態の検討；大槻泰介、金松知幸、塚田裕三、岡本和也、渡邊英宏：第 17 回  $^{13}\text{C}$  医学応用研究会（2001 年 11 月 17 日、東京大学山上会）