

〔原著〕

## ヒト骨格筋・肝臓における

## グリコーゲン代謝の検討

—  $^{13}\text{C}$ -MRS を用いて —

西 川 悟\* 池 平 博 夫\*\*

(平成6年10月11日受付, 平成6年11月2日受理)

### 要 旨

天然 $^{13}\text{C}$ -MRS法を用いて安全性を保ちつつ, 人体からカーボンスペクトルの測定を試みた。さらに本法を用いて, ヒト肝臓, 骨格筋におけるグリコーゲン代謝の食事, 運動などの影響を測定し, 臨床応用に向けて基礎的な検討を行った。使用装置は市販の1.5テスラMRIで, 送受信には肝臓, 骨格筋に合わせ $^{13}\text{C}$ 用コイルを作製して用いた。対象は健康男子ボランティアである。ヒト肝臓において, 脂肪酸アシルチェーンのスペクトルが12.4-39.3ppmに, グリセロールおよびグリコーゲン(C2-C6)が53.8-75.2ppm, グリコーゲン(C1)が95.6-106.3ppm, 脂肪酸二重結合が126.0-135.5ppm, クレアチンが158.3ppm, 脂肪酸, 蛋白, リン脂質などのエステル結合が172.9ppmに見られた。グリコーゲン(C1)スペクトルより, 肝臓グリコーゲンが食事により上昇しその後徐々に減少していく経過を, また運動により早期の段階から減少する様子をとらえた。グルコース投与例においては肝臓内に取り込まれたグルコースピークを, C1- $\alpha$ は88.0, 98.8ppmに, C1- $\beta$ は91.9, 102.1ppmに認めた。これらグルコースから肝臓内でグリコーゲンが合成され, それが時間と共に減少していく過程を追跡できた。骨格筋においては炭水化物ローディング法を用いて, グリコーゲン量の変化を測定可能であった。蛋白中心の食事と激しい運動により一時的に減少するものの, その後の高炭水化物食の投与で徐々に増加し, 第7日目には施行前の約130%を呈していた。 $^{13}\text{C}$ -MRS法を用いて, 骨格筋および肝臓内グリコーゲンの細胞レベルでの代謝や調節過程を, 瞬時にしかも無侵襲に測定できる可能性が示唆された。

**Key words:**  $^{13}\text{C}$ -MRS, グリコーゲン, 肝臓, 骨格筋, 炭水化物ローディング法

略語一覧: MRI: Magnetic resonance imaging, NMR: Nuclear magnetic resonance, MRS: Magnetic resonance spectroscopy, FID: Free induction decay, RF: Radiofrequency

### I. 緒 言

ヒト骨格筋・肝臓内のグリコーゲンの代謝動向が, 無侵襲にしかも即座に解明できれば, 臨床的にもまた, 昨

今盛んなスポーツ医学の分野においても多大な貢献をもたらす事はまちがいない。従来の生物化学的測定方法では, 組織を採取するなど *in vitro* での化学分析となるため, 一定の条件下での情報となり, またその過程で変

\* 千葉大学医学部整形外科講座

\*\* 千葉大学医学部放射線医学講座

(現: \*成田日赤病院整形外科)

Satoru NISHIKAWA\* and Hiroo IKEHIRA\*\*:  $^{13}\text{C}$ -MRS Study of Glycogen Metabolism in Human Skeletal Muscle and Liver

\* Department of Orthopaedic Surgery and \*\*Department of Radiology, School of Medicine, Chiba University, Chiba 260.

Received October 11, 1994, Accepted November 2, 1994.

化がおき、生体内での天然の代謝状況をとらえることは不可能であった。ところが最近急速に進歩してきたMRI装置を用いることにより、NMR本来のMRS法を利用し、組織の代謝状況を *in vivo* において無侵襲的にとらえることが可能となりつつある。

運動のエネルギー源はATPであり、その供給源の中に、クレアチンリン酸やグリコーゲンがある。リン酸化合物に関しては、 $^{31}\text{P}$  (磷) を核種としたMRS法を用いてその研究が可能となりつつあるが、グリコーゲンに関しては無侵襲に測定できる有効な手段がなかった。C (炭素) は人体の構成元素としてH (水素) の次に多く、解糖系などの代謝の中心となっている。そこで対象核種として自然界にわずかにしか存在しないが、 $^{13}\text{C}$  を選びMRS法を用いてグリコーゲンの測定を試みた。

人体における $^{13}\text{C}$ のNMR感度比はあまりにも低く、そのためスペクトルを測定しても臨床的应用は不可能とされてきた。しかし大型の高磁場装置の開発とコンピューター技術の著しい進歩があいまって、実験的にはその測定の有用性が報告されつつある。しかしそれらは極端な高磁場MRI装置を用いたり、プロトンデカップリング法<sup>2)</sup>などを応用したり、また高価な $^{13}\text{C}$ 標識化合物を投与するなど<sup>3,4)</sup>、その安全性はいまだ確立されておらず、また一般的には不可能な測定方法と言える。そこで我々は市販の1.5テスラMRI装置を用いて、しかも安全性を保ちながら人体からその測定を試みた。今回さらにその $^{13}\text{C}$ -MRS法を用いて、ヒト骨格筋、肝臓におけるグリコーゲン代謝の食事、運動などの影響を測定し、臨床応用の可能性に向けて基礎的な検討を行った。

## II. 材料と方法

### 1) 装置

使用装置は、市販のフィリップス社製 S15HP Gyroscan 1.5テスラである。また送受信には $^{13}\text{C}$ 用のコイルを製作して用いた。コイル部分には銅線を、チューニング、マッチング用には非磁性の可変サファイヤコンデンサーを用い、ユニバーサルジョイントでアクリル製の棒と接続し遠隔操作を可能とした。またより安定した共鳴を得るためにバランスシステムを組み込み、これらはアースした銅板の箱の中に入れた (図1)。

### 2) 材料および対象

ファントム用として、市販のてんぷら用サラダオイル、ムラサキイガイより抽出されたグリコーゲン試薬、ぶどう糖試薬を用意した。さらにこの研究の目的を説明しインフォームドコンセントの得られた健康男子ボランティアにより実際に測定を行った。

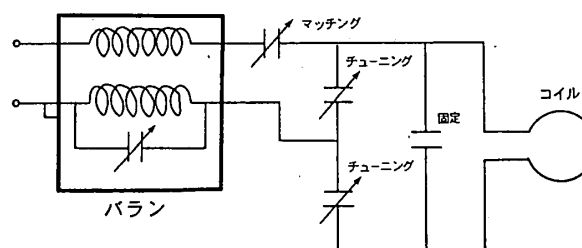


図1. 回路図

太線四角内はバランスを示し16.03 MHzに共鳴させてある。チューニング、マッチング用にはサファイヤコンデンサーを用いた。

### 3) 方法

シミングはこの装置のボディーコイルを利用し、プロトンによりオートシミングで行った。水のスペクトル半値幅が20Hz以下となるように磁場を均一化した。

①ファントムを用いたグリコーゲンピークの同定  
サラダオイル、5%グルコース溶液、2%グリコーン溶液それぞれ5ccをビニール性の容器に入れ、測には直径1.5cmの5重巻きソレノイド型コイルを用いた (図2右)。得られたNMR信号のスペクトルへの換は、装置付属のソフトウェアを用いてすべて同様に理した。スペクトルピークの同定はこれまでの実験データをもとに行った<sup>5-7)</sup>。

### ②ヒト肝臓内グリコーゲンの測定

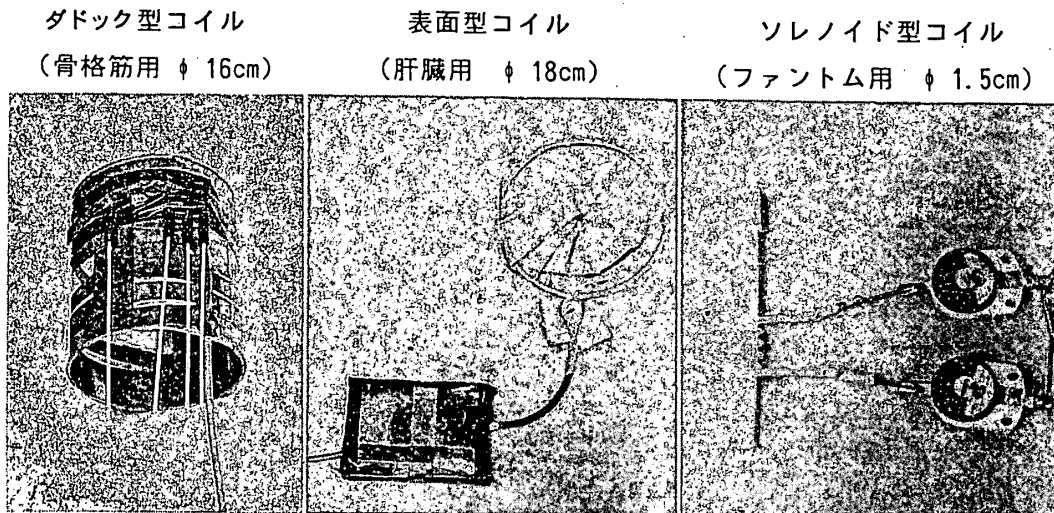
測定には直径18cmの円形2重巻き表面型コイルを用いた (図2中央)。MRIによりあらかじめ肝臓の位置確認し、コイルはその直下にあたるようにした。ボラティアは可能な限りそのコイルが磁場の中心に位置すよう腹臥位とした (図3上)。さらに2回目以降の測に際してはメルクマールを利用し、可能な限り同条件なるようにした。ファントムを用いた実験結果をふまえた上で、さらにボランティアによる測定を繰り返し、回の装置において肝臓からグリコーゲンピークが得られる最適と思われる条件を決定した。この結果、繰り返し時間300msec、加算回数4000回、測定ポイント数1024、測定帯域4000Hz、共鳴周波数16.03MHz、90°パルス0 msecとした。この条件で1回のスペクトルを得るの要する時間は約20分である。対象は男子4名で年齢20, 23, 26, 35歳である。

### ③肝臓内グリコーゲンの食事、運動による影響

実際にグリコーゲンスペクトルを用いて、以下の様食事、運動などの条件設定の際の肝臓内グリコーゲンの変化を検討した。

#### (1) 食事による影響 (3例)

食後2時間でグリコーゲンスペクトルを測定し、そ

図 2. 自作した  $^{13}\text{C}$  用コイル

左は骨格筋用, 中央は肝臓用, 右はファントム用である。肝臓用コイルの四角い箱は, 銅板で覆われており中にバランスシステム, 可変コンデンサーが収められている。

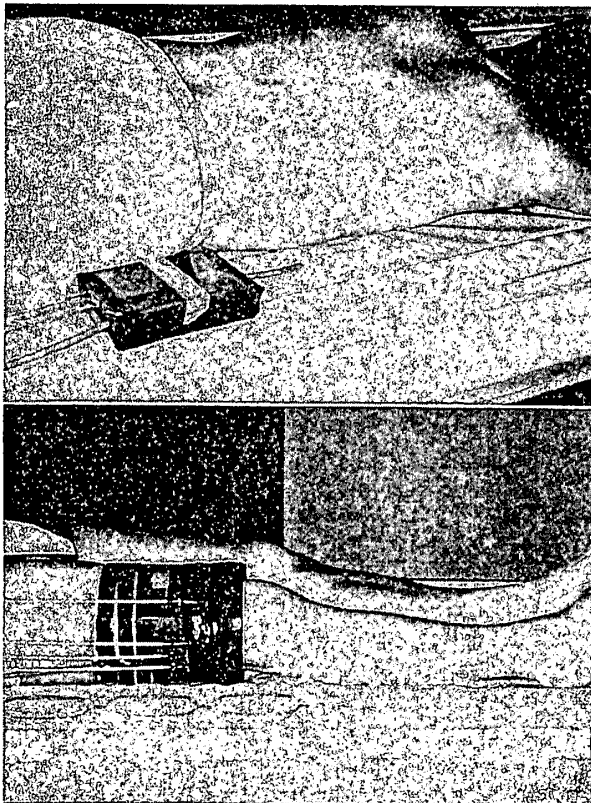


図 3. コイルの装着

上は表面型コイルを用いた肝臓からの測定, 下はダドック型コイルを用いた骨格筋からの測定状態を示している。

後12時間を絶食とし, 可能な限り前回と同様の条件として再び測定した。ただしこの間は通常の生活とした。この二つのスペクトルを比較検討した。

#### (2) 運動による影響 (2例)

食後3時間安静を保った後, 肝グリコーゲンスペクト

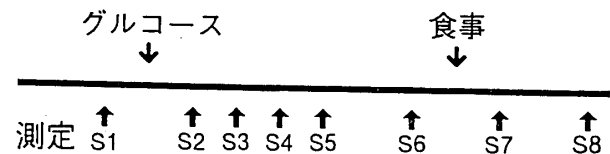


図 4. 100 g グルコース負荷時の肝グリコーゲンの測定

S1~S8 は図12のそれぞれのスペクトルに相当している。

ルを測定した。さらに1週間後同一被検者が同様の食事を取り, 今度は食後3時間運動を负荷した後に, 可能な限り前回と近い条件で再びグリコーゲンスペクトルを測定した。

#### (3) グルコース負荷による変化<sup>9)</sup> (2例)

肝臓内グリコーゲンを減少させるため1日の絶食をした後, 装置内に入り第1回目のスペクトルを測定した(S1)。そのままの姿勢でストローを用いて糖負荷試験に用いるグルコース100g (トレラン G50® 2本) を飲み, ただちに測定を開始し, 続けて80分間にわたり4回の測定を行った (S2-5)。食事をとらずに3時間後に再び測定し (S6), 次に食事をとった後2時間 (S7), 6時間 (S8) で測定した (図4)。

#### ④ 骨格筋内グリコーゲン量の測定

直径16cm ダドック型コイル (図2左) を下腿から通し, 膝上の大腿部に完全に密着される場所に固定した。毎回同じ位置に装着し, 主に大腿四頭筋, 大腿二頭筋よりスペクトルを測定した (図3下)。対象は健常男子で, 測定は右大腿部より連日食後に行った。

測定に際しては炭水化物ローディング法<sup>9-11)</sup> を応用し

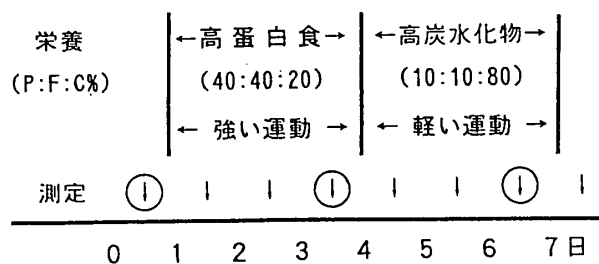


図 5. 骨格筋における炭水化物ローディング法

Pは蛋白, Fは脂肪, Cは炭水化物を示しており, 数値はそれぞれの割合を示している。↓は連日の測定を示し, 特に④は図14にそのスペクトルを示してある。

た。前半の3日間を, 蛋白 (P), 脂肪 (F), 炭水化物 (C) の割合がそれぞれ40, 40, 20%の高蛋白食とし, その間は激しい運動 (水泳毎日6 km) を負荷した。後半の3日間は蛋白, 脂肪, 炭水化物の割合を10, 10, 80%の高炭水化物食とし, この間は軽い運動のみを行った (図5)。食事は栄養士に作製を依頼し, 1日2100~2400カロリーのメニューを用いた。

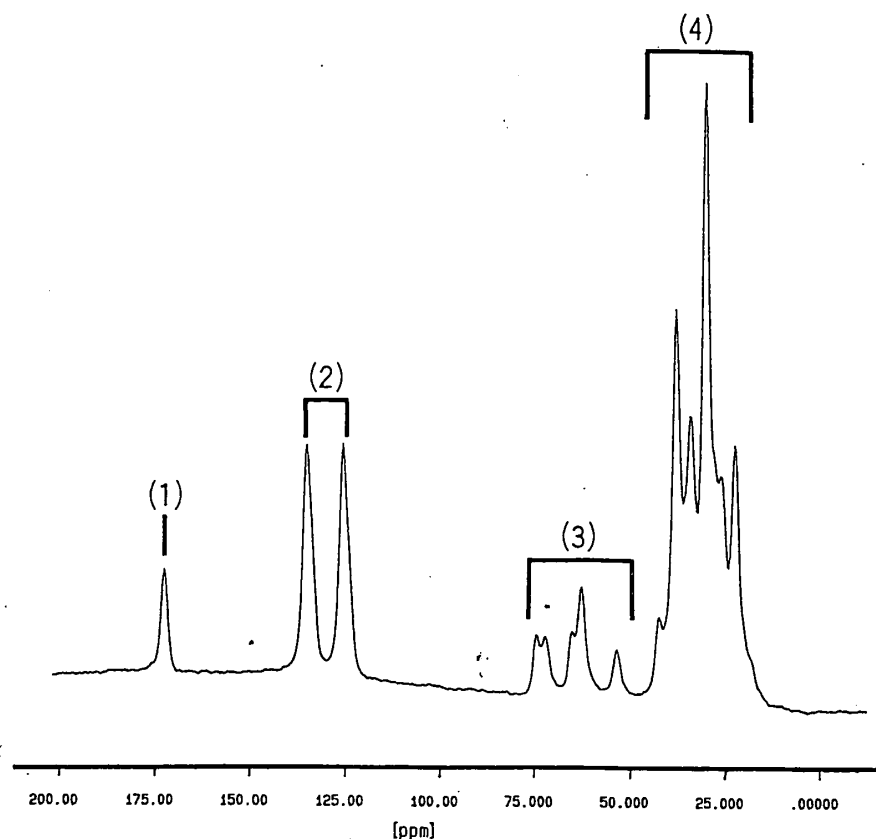
### III. 結 果

#### ①ファントムを用いたグリコーゲンピークの同定

図6にサラダオイルのスペクトルを示す。(1)はエステル結合 (COO), (2)は二重結合 ( $-\text{CH}=\text{CH}-$ ), (3)はグリセロールそして (4)はアシルチェーンから得られたピークである。化学シフトが200ppm以上と範囲が広い。

図7に5%グルコース溶液のスペクトルを示す。(1)はC1 $\beta$  (88.8, 98.5ppm), (2)はC1 $\alpha$  (84.6, 95.1ppm)を示している。 $\alpha$ ,  $\beta$ はグルコースのアノマーである。デカップリングしていないため2本に分裂している。僅かにC1 $\beta$ のピークがC1 $\alpha$ のピークより高い。(3)はC2-C6から得られたピークである。

図8は2%グリコーゲン溶液のスペクトルを示す。対象が100mgと極微量で, 良好なS/N比が得られるのに2万回の加算を要した。(1)は $\alpha$ 結合したC1のピークで, 分裂したピークは約10ppmの幅を持っておりそれぞれ91.9, 103.9ppmであった。(2)はC2-C6のスペクトルである。

図 6. サラダオイルの  $^{13}\text{C}$ -MRS

(1)はエステル結合, (2)は二重結合, (3)はグリセロール, (4)はアシルチェーンから得られたスペクトルを示している。横軸は化学シフト値である。

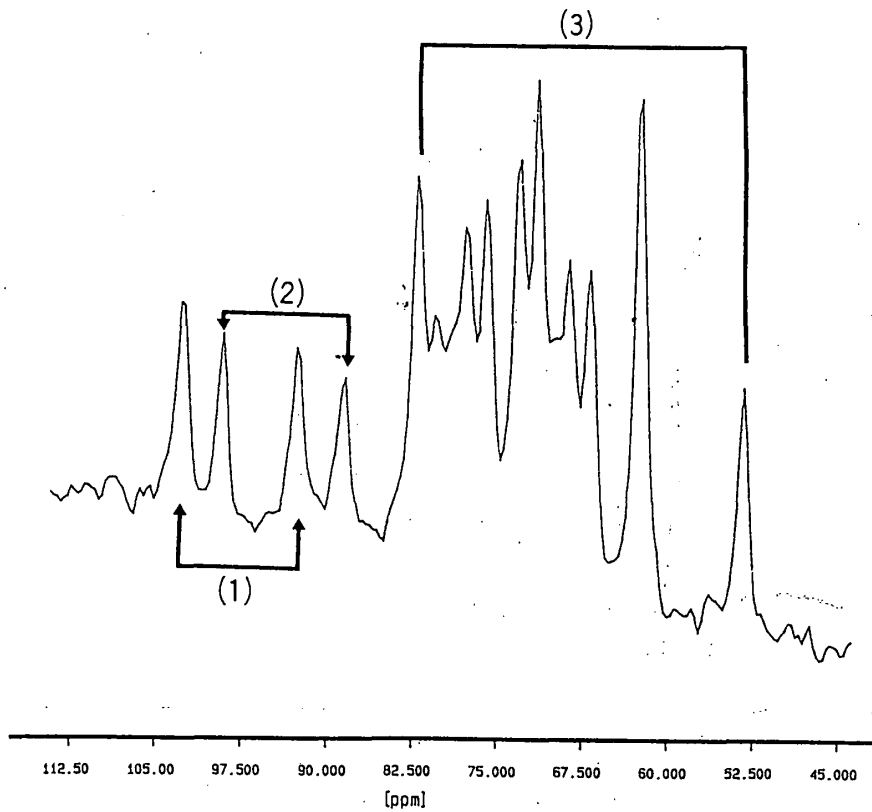


図 7. グルコースの  $^{13}\text{C}$ -MRS

(1) は  $\text{C1}\beta$ , (2) は  $\text{C1}\alpha$  として (3) は  $\text{C2-C6}$  のスペクトルを示している。

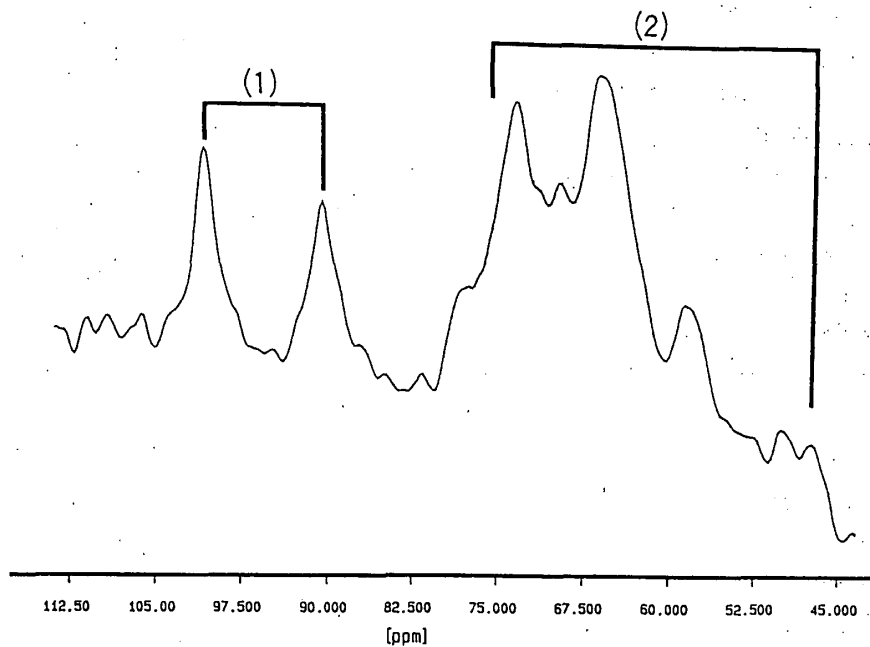


図 8. グリコーゲンの  $^{13}\text{C}$ -MRS

(1) は  $\alpha$  結合した  $\text{C1}$  から得られたスペクトルであり, (2) は  $\text{C2-C6}$  のピークである。

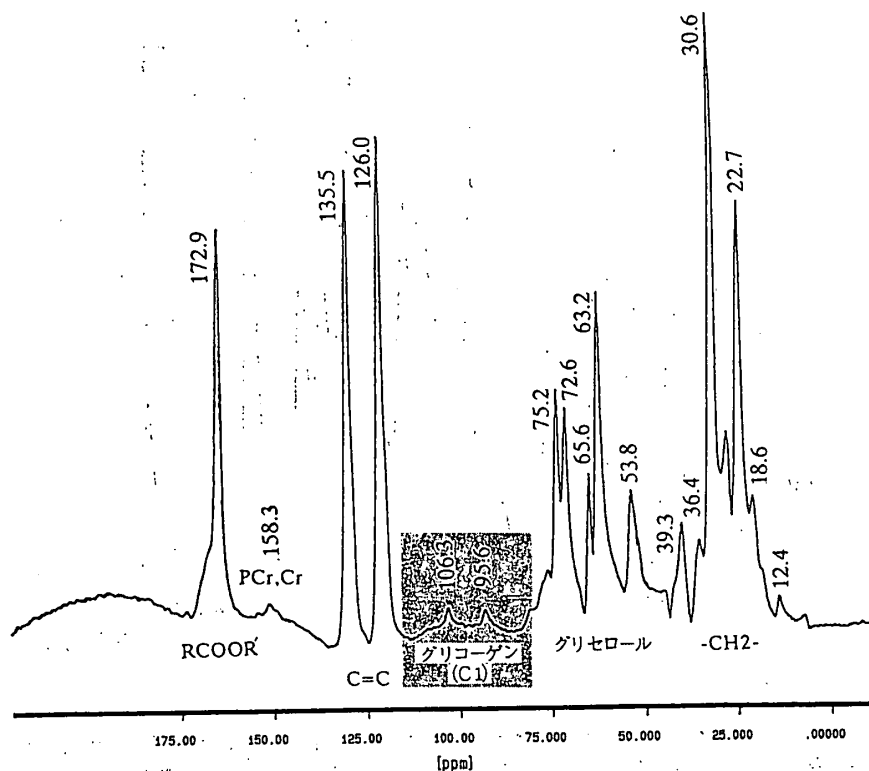


図 9. 健康なヒト肝臓より得られた  $^{13}\text{C}$ -MRS

ピーク横の数値は化学シフト値を示している。斜線は  $\alpha$  結合したグリコーゲンの C1 ピークである。

## ②ヒト肝臓内グリコーゲンの測定

図 9 は実際に健康人の肝臓から得られたスペクトルである。ピーク横の数値は化学シフト値を示す。脂肪酸のアシルチェーン ( $-\text{CH}_2-$ ) 由来のスペクトルが 12.4–39.3ppm に、グリセロールおよびグリコーゲン (C2–C6) が 53.8–75.2ppm、脂肪酸の二重結合 ( $\text{C}=\text{C}$ ) が 126.0–135.5ppm、クレアチンが 158.3ppm、脂肪酸、蛋白、リン脂質などのエステル結合 ( $\text{RCOOR}$ ) 由来が 172.9ppm に見られる<sup>6,7)</sup>。これら脂肪のピーク<sup>5)</sup>の間に、斜線にみられるようなグリコーゲン (C1) ピークが見られた。そのピークは、約 10ppm 離れて 95.6, 106.3 ppm の 2 本に分裂していた。

## ③肝臓内グリコーゲンの食事、運動による影響

### (1) 食事による影響

図 10 はグリコーゲンスペクトルのみを示している。方法③–(1) により食後 2 時間、絶食後 12 時間のグリコーゲンを比較してある。食後高値を示していた肝臓内グリコーゲンは、長時間の絶食によりそのほとんどが消失していた。同様の検討を同一人に 3 度施行したが同様の再現性が得られ、また他の 2 名においても同様の結果を得た。

### (2) 運動による影響

方法③–(2) により測定したスペクトルを図 11 に示す。食後 3 時間安静を保持した場合、食後 3 時間運動を负荷した場合を比較してある。運動の负荷により肝臓内グリコーゲン量は、安静時より明らかに低下していた。

### (3) グルコース负荷による変化

図 12 は方法③–(3) によって得られたグルコース投与後のスペクトルを時間の経過と共に手前から並べたものである。S1 から S8 は図 4 による。G はグリコーゲン、 $\alpha$ ,  $\beta$  はそれぞれグルコースのアノマーを示す。S1 は絶食後で肝臓内グリコーゲンは低下している。S2 は 100g のグルコースが负荷された直後で、グリコーゲンおよびグルコースのピークがただちに見られた。S3, 4, 5 はその後 20 分間ごとの経時的変化をとらえている。そのまま食事をとらずに 3 時間後に測定したスペクトル S6 ではグリコーゲンの低下が見られ、食事後の S7 では高値を示した。その後再び絶食とした S8 では、やはりグリコーゲンピークの低下が見られた。グルコース负荷の検討は他の一名の被検者においても行い、同様の結果を得た。

### ④骨格筋内グリコーゲン量の測定

図 13 は健康男子の右大腿部骨格筋より得られたスペク

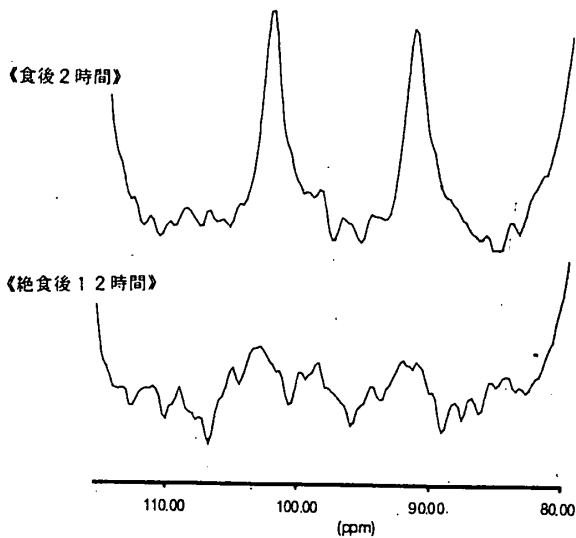


図 10. 肝臓内グリコーゲンの食事による影響  
上は食後2時間の肝臓内グリコーゲンを示しており、  
下は同一人で絶食後12時間で測定したものである。  
絶食後にグリコーゲンのスペクトルはほぼ消失して  
いる。

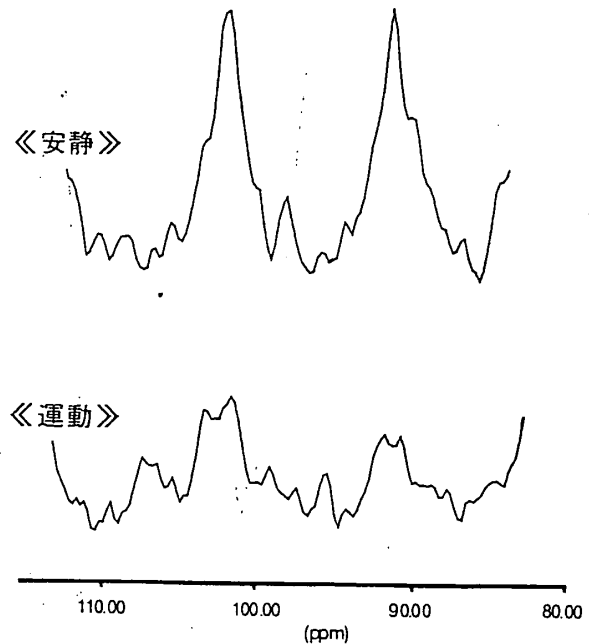


図 11. 肝臓内グリコーゲンの運動による影響  
上は食後3時間安静を保った後、下は食後3時間運  
動を負荷した後に測定した。運動により肝臓内グリ  
コーゲンは早期より消費されている。

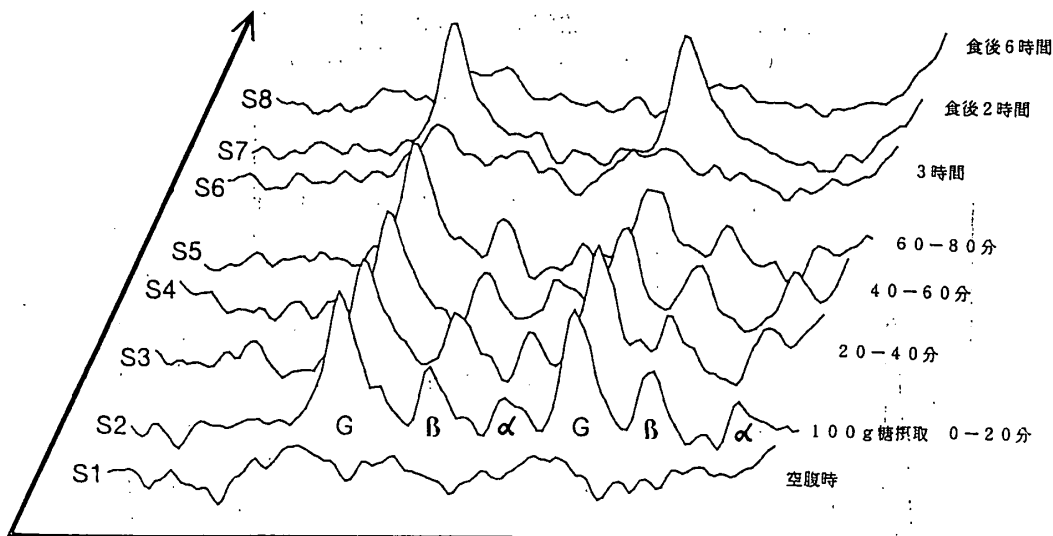


図 12. 100g グルコース負荷後の肝臓内グリコーゲンの変化

図 4 により、S1 は絶食後、S2-S5 は100g グルコース投与後20分毎に測定、S6 はその3時間後、  
S7 は食後そして S8 は再び絶食後に測定している。

トルである。二重結合とグリセロールのピーク間にグリ  
コーゲン (C1) のピークがみられた。このグリコーゲン  
ピークに注目し炭水化物ローディング法を行った結果を  
図14に示す。これは図5の④の時点のスペクトルを並べ  
たものである。第3日目においてグリコーゲンピークは  
施行前より減少していたが、第7日目においてはそのピ  
ークはかえって施行前より増加していた。

図15は図5 ↓の時点で測定されたグリコーゲンスペク  
トルの面積から、施行前を100%としてそれぞれの割合  
を示したものである。今回の結果では高蛋白食を続けた  
3日間の内、第2日目でグリコーゲン量は最低を記録し  
(60%)、その後徐々に上昇し、4日目においてほぼ施行  
前と同値を示し、高炭水化物食を終えた翌第7日目で最  
高値 (130%) を示していた。

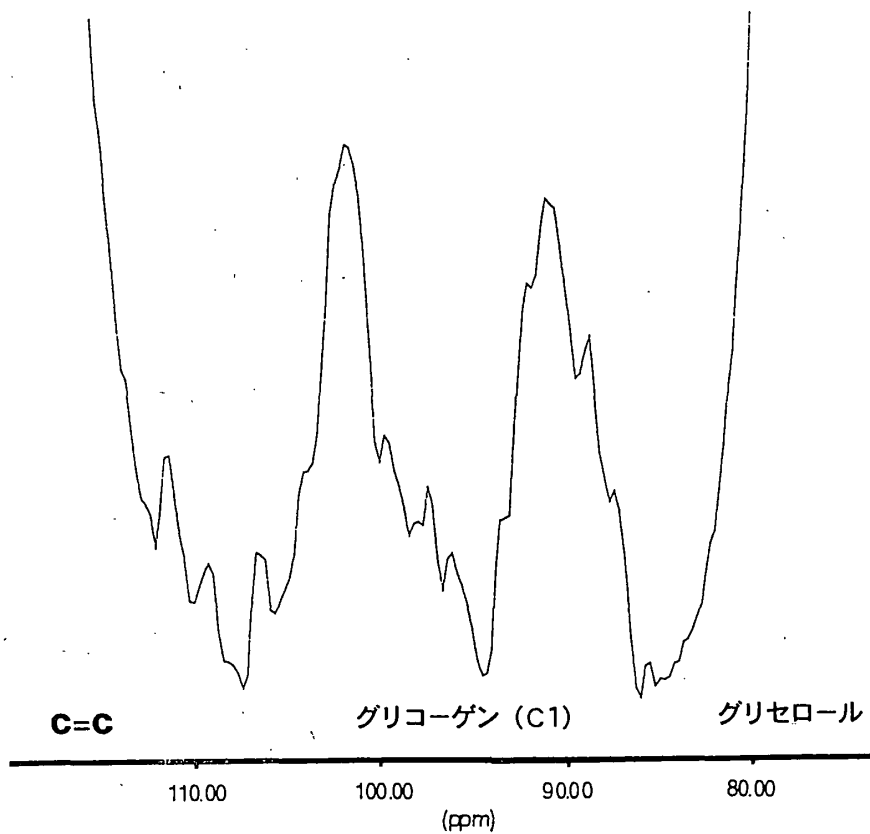


図13. 健常なヒト骨格筋より得られた  $^{13}\text{C}$ -MRS  
肝臓同様にグリコーゲンスペクトルが見られた。

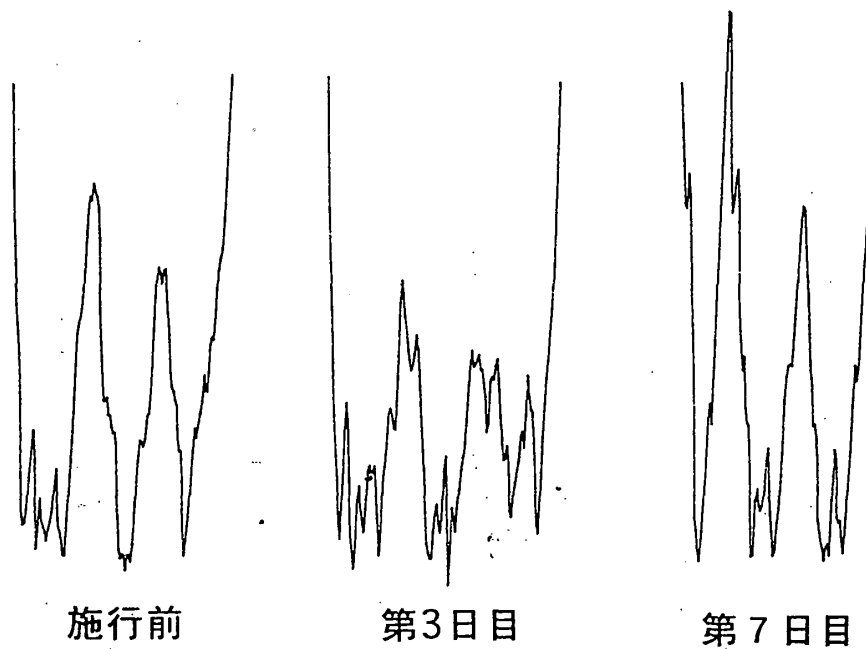


図 14. 炭水化物ローディングの際、骨格筋より得られた  $^{13}\text{C}$ -MRS

図5の④の3ヶ所の時点のスペクトルを並べている。左はローディング前、中央は枯渇期、右は過補償期である。

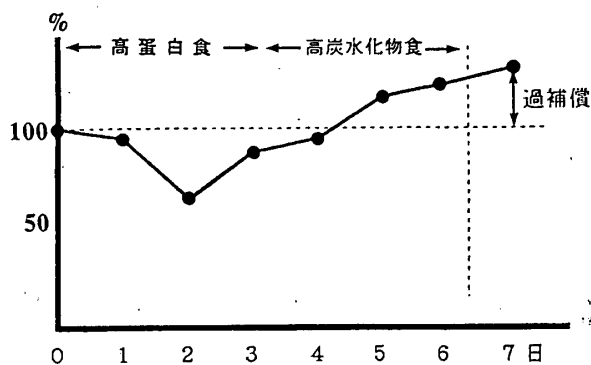


図 15. 炭水化物ローディング法の際見られたグリコーゲンの過補償

図 5 の ↓ の時点で測定されたグリコーゲンスペクトルの面積からその変化をグラフにした。施行前を 100% としている。第 7 日目で最高値 130% を示していた。

#### IV. 考 察

グリコーゲンは D-グルコースが  $\alpha$  (1, 4) 結合で連結し、十数個の連結ごとに  $\alpha$  (1, 6) 結合で枝別れた構造で、分子量  $10^6 \sim 10^8$  という巨大な多糖の分子である<sup>12)</sup>。筋肉、肝臓で最も多く、湿重量あたり筋では 0.5 ~ 2%, 摂取時の肝では 5 ~ 7% もの高濃度で存在し、細胞内では小胞体にグリコーゲン顆粒として存在している<sup>13)</sup>。グリコーゲンは言うまでもなくエネルギー代謝の中心的な役割を演じている。従来からの研究により、グリコーゲンの合成、分解のメカニズムは生化学的にはよく知られてきた<sup>14)</sup>。しかし実際にその生体内での瞬時の変化や臓器間での調節の様子は、従来の穿刺生検法では知り得なかった。この点では本来、エネルギー代謝の解析は *in vivo* でのみ可能と言える。今回試みた NMR 信号を利用したスペクトロスコピーは、現状においては唯一の人体における代謝の実態を *in vivo* で解明できる方法<sup>15)</sup>と言える。

1981年 Cohen ら<sup>8)</sup>が、*in vitro* にマウスの肝臓からグリコーゲンの  $^{13}\text{C}$ -NMR の信号を測定して以来急速な進歩を遂げ、Alger ら<sup>4)</sup>は、ついに *in vivo* でラットからの測定に成功している。国内において  $^{13}\text{C}$ -MRS の試みは、池平ら<sup>16)</sup>によってグルコースの代謝およびその画像化まで試みられている。これらの報告はいずれも標識  $^{13}\text{C}$  化合物を投与した動物実験であった。 $^1\text{H}$  の自然存在比がほぼ 100% なのに対し、天然  $^{13}\text{C}$  の存在比は約 1.1% しかなく、しかもその人体組織内での NMR 感度比は、 $^1\text{H}$  を 1 とすると  $2.5 \times 10^{-4}$  とあまりにも低い<sup>17-19)</sup>。そのため人体からのグリコーゲンピークの測定は 1987 年に入り T. Jue ら<sup>20)</sup>が報告しているが、2.1 テスラの高

磁場装置を用い、しかもデカップリングを行っており一般的には到底不可能な方法であった。しかし今回の報告は、市販の 1.5 テスラの装置を用い、デカップリングや  $^{13}\text{C}$  標識化合物の投与をしておらず、一般的に可能な方法である点が特徴と言える。

MRS の測定の際に対象となるのは、自由に動きうる分子である。ところが先に述べたように、グリコーゲンは巨大な分子であり、そのため  $^{13}\text{C}$ -MRS によってそのすべてを測定しているか疑問視されてきた。しかし Shulman らのグループは<sup>21)</sup>、 $^{13}\text{C}$ -MRS により全てのグリコーゲン分子の信号を観察していることを動物実験から証明している。この結果、スペクトルの信号強度の積分値は原子の量に比例しており、すなわち量的な情報と言える。最近ではあらかじめ濃度のわかっているグリコーゲンファントムの信号強度と比較することによりその定量化も試みられている<sup>22)</sup>が、安静時の骨格筋のグリコーゲン濃度は  $^{13}\text{C}$ -MRS 法を用いても 50-100mM glucosyl units/kg であり生検による従来の報告<sup>1)</sup>と一致している。

$^{13}\text{C}$  用のコイルは市販されていないため、グリコーゲン濃度の高い肝臓、骨格筋に合わせ作製した。この装置での  $^{13}\text{C}$  の共鳴周波数は 16.03MHz と低いため、径の大きいコイルでは共鳴点を得難い。今回は、バランを組み込み、より安定した共鳴コイルを作製することができた。このシステムは電流が同方向に流れるのを防ぎ、またバランを 16.03MHz に共鳴させることにより、 $^{13}\text{C}$  から得られる信号電流を流れやすくしたものである。コイルは人体に接するとその共鳴点がずれるため、実際に人に接した状態でコンデンサーの容量を調節することにより、装置内での共鳴点を得ることに成功した。またコンデンサーの位置の僅かな違いにより共鳴点が不安定になるため、コンデンサーを銅板の箱の中に入れる事によりこの問題を解決した。しかし実際には MRI 装置内に奥深く入ってからの調整となるため、可変コンデンサーにアクリル製の長い棒をユニバーサルジョイントを用いて接続し、MRI 装置の外からモニターテレビを見ながら調整した。この表面コイルによりその直下のほぼ半球状の部分から信号を得ている<sup>2, 23)</sup>と考えられた。骨格筋用コイルは直径 16cm のアクリル製の筒に薄い銅板を巻き作製したが、その他基本的構造は肝臓用と同じである。

人体から得られる  $^{13}\text{C}$ -MRS のほとんどが脂肪組織由来のものである。そのためグリコーゲンのスペクトルは相対的にごく小さいものとなり、その測定は困難を極める。そこでまずグリコーゲンおよびグルコースのスペクトルと脂肪のスペクトルの位置関係をファントムを用

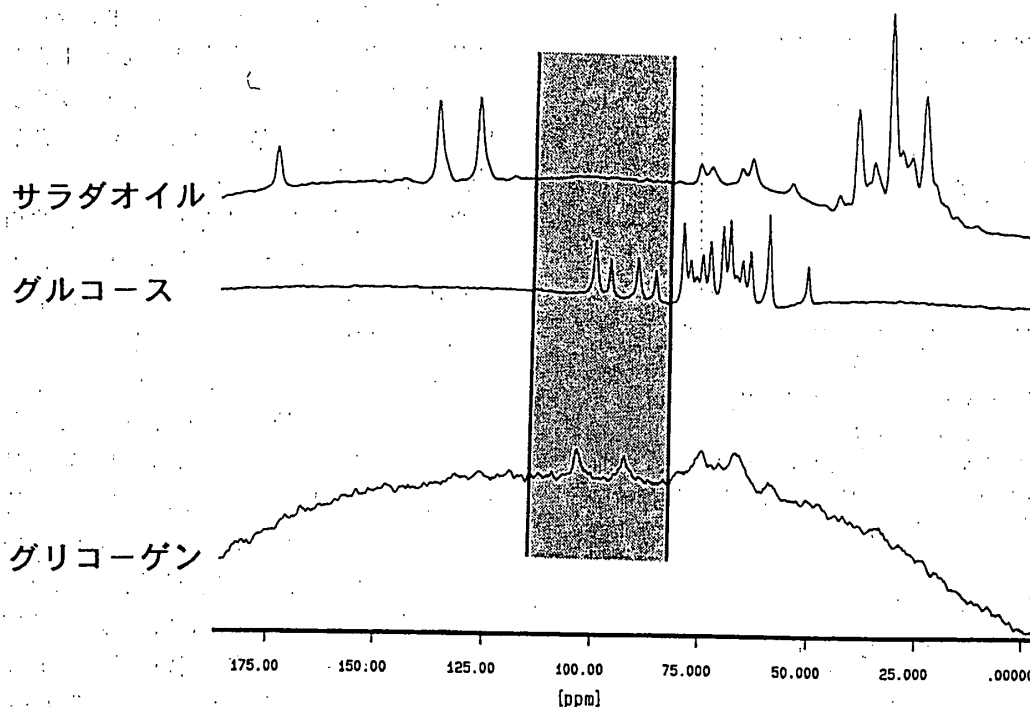


図 16. サラダオイル、グルコース、グリコーゲンスpekトルの位置関係

斜線に見られるようにサラダオイルのpekトルが存在しない 90から 110ppm の間に、グルコースおよびグリコーゲンの C1 spekトルが存在していた。

いて検討した (図16)。ここで注目されるのは脂肪を代表するサラダオイルのpekトルが存在しない 80から 110ppm の間に、グルコースの C1 $\alpha$ , C1 $\beta$ , およびグリコーゲンの C1 ピークが見られる点である。残念ながらこれらの C2 から C6 のpekトルは脂肪のグリセロールpekトルに重なっている為、その判別は不可能である。この結果約90-110ppm 間のpekトルに注目し (図16斜線部分), 増幅, 解析を行えばグリコーゲン, グルコースのpekトルをとらえることが可能で, その代謝状況が把握できることが予想された。

1.5テスラにおいてグリコーゲンの T1 値は数~数十 msec とされている<sup>24)</sup>。そのため繰り返し時間はこの装置の限界と思われる 300msec に設定し時間短縮を図った。条件の決定に際してはグリコーゲンピークが高感度に得られることを最大目標とし, さらに時間的にもできる限り短縮した。励起にはアディアバティックパルスを用い, また90度パルスを発してから FID 情報を収集し始めるまでの時間をできる限り短くなるように設定した。今回はあくまで市販の装置で測定する方法をとったため, 現時点において安全性の保証されていないデカップリング法は行わなかった。この条件で実際にヒト肝臓から天然  $^{13}\text{C}$ -MRS の測定に成功し, 予想通りグリコーゲンピークを観察できた (図9)。先に述べたようにこれはグリコーゲン全体の量を反映しているものであり,

今回のシステムを用いる事により様々な状況下でのグリコーゲン動態を知り得る事が判明した。

実際に食後2時間と絶食後12時間に, 肝臓内グリコーゲンを測定し比較した結果 (図10), 食後高値を示していたグリコーゲンは長時間の絶食によりそのほとんどが消失しており, 肝グリコーゲンの量は食事により大きく左右されている事が立証された。この変化は運動を负荷することによりさらに顕著に見られた (図11)。運動のエネルギーとなる ATP の源として, 無酸素的代謝ではクレアチンリン酸などの高エネルギー磷酸化合物がまずあげられるが, その他に筋肉内のグリコーゲンが乳酸へ分解される解糖過程にも依存している。有酸素的代謝ではその他にも脂質, アミノ酸なども利用される。いずれにしても運動時に利用できる糖質エネルギーは血糖と筋グリコーゲンで, 肝グリコーゲンはその血糖レベルを維持するために重要な供給源となっているものと思われた<sup>25,26)</sup>。今回の結果では肝グリコーゲンも運動のエネルギー源として早期より利用され, 骨格筋で ATP を供給していると思われた。

肝グリコーゲンが枯渇した状態にグルコースを负荷することにより, 肝グリコーゲンの合成過程と糖質の関係を検討する事ができた (図12)。S1 は絶食後で肝臓内グリコーゲンは消失している。そこに100g のグルコースが负荷されるとグリコーゲンはただちに合成された。

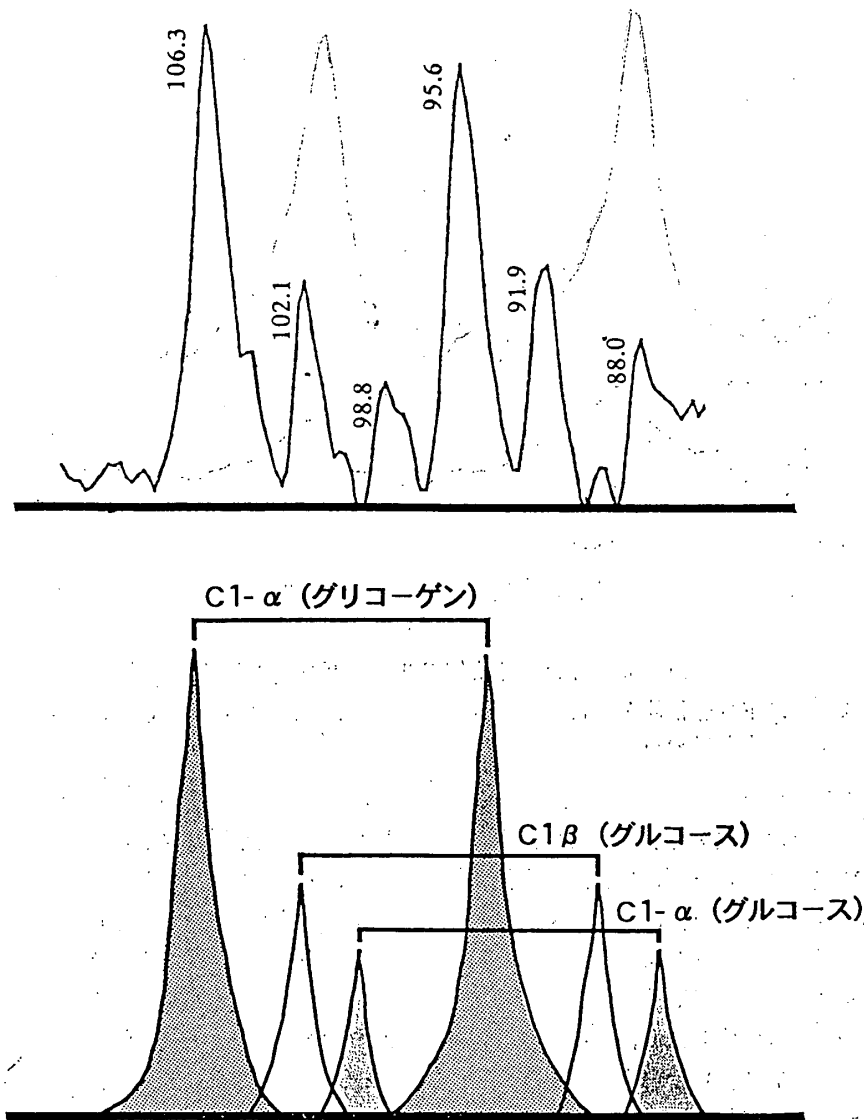


図 17. グルコース投与直後の肝臓内グリコーゲン、グルコーススペクトル。  
グリコーゲンの C1 ピークそしてグルコースの C1 $\alpha$  および C1 $\beta$  のピークが同  
時にとらえられている。下はそのシェーマを示す。

S2 は肝臓内に吸収されたグルコースとそれをもとに合成されたと思われるグリコーゲンを同時にとらえているものと思われる。そのスペクトルの詳細とシェーマを図 17 に示す。グルコース (C1- $\alpha$ ) が 88.0 と 98.8 ppm に、グルコース (C1- $\beta$ ) が 91.9 と 102.1 ppm に、グリコーゲン (C1) が 95.6 と 106.3 ppm にみられ、それぞれ約 10 ppm の幅を有していた。アノマーである  $\alpha$ ,  $\beta$  グルコースのうち、 $\beta$  が高値を示したのは  $\beta$  グルコースが熱力学的に、より安定している<sup>27)</sup> 為と推測された。このグルコーススペクトルが胃内グルコースの信号である可能性は、コイルの位置とその RF 分布から考えると低く、ほとんど肝内のグルコースの信号と考えられた。また 90 度パルスから FID 測定までの時間が約 0.05 msec と極端に短

いため、肝臓内の血管および細胞内のグルコースを測定しているものと考えられた。消化管より吸収されたグルコースは最初に通過する肝臓で、一部はただちにグリコーゲンに合成され貯蔵されるものと考えられた。S2-5 においてグリコーゲンはほぼ一定値を示しており、その貯蔵量には限界があることが示唆された。一方、グルコースのピークは徐々に減少していた。そのまま食事をとらずに 3 時間後に測定した S6 のグリコーゲンスペクトルはほぼ消失していたが、食事をとると S7 に見られるようにやはりただちに合成された。ここにグルコースのピークが同定できないのは、その合成がグルコースばかりではなくその基質となるアミノ酸、乳酸などから徐々になされたものと推測している。その後絶食を続けると

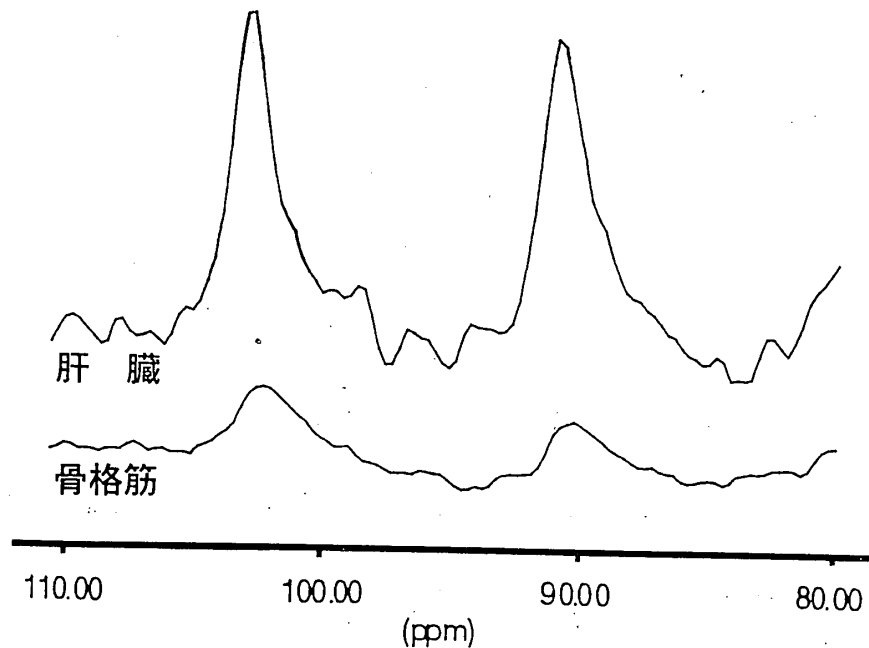


図 18. 肝臓、骨格筋グリコーゲン量の比較

上は肝臓、下は骨格筋から得られたスペクトルで、同一人から測定されまったく同様に処理されている。

S8に見られるようにグリコーゲンピークは消失し、食事と肝臓グリコーゲン量との密接な関係が再確認された。このように糖負荷後のグリコーゲン代謝過程を侵襲を加えることなく追跡できる事は、肝機能の評価や運動時の栄養補給法などの有効な指標となる事が考えられた。

骨格筋にも大量のグリコーゲンが貯蔵されている<sup>28)</sup>。図18では同条件で同一人より測定した肝、筋のグリコーゲンスペクトルを比較している。いずれも食後2時間に測定した。筋グリコーゲンは単位体積あたりでは摂取時の肝より少ないと思われ、今回の測定では約5分の1を示し、従来の生検などによる結果<sup>11)</sup>とほぼ一致していた。

当初、食事および簡単な運動が筋グリコーゲンに及ぼす影響を検討したが、その有為差は見られなかった。食事は直ちに筋グリコーゲン量に影響しないものと思われた。また運動はその程度により筋グリコーゲンの利用率が大きく変化するため、脂肪など他のエネルギー源が利用されたものと推測された<sup>26,29)</sup>。さらに筋内にはグルコース6フォスファターゼを欠いており、血糖維持には筋グリコーゲンが利用されないことも一因していると考えられた。

運動強度が増すにしたがって脂肪の利用率が減り、炭水化物の利用が増してくる<sup>28)</sup>。そして最大酸素摂取量の65~85%範囲の運動強度においては、炭水化物が主たるエネルギー産生源となるとされている。また持続性の運動能力については筋肉内グリコーゲンの量が大きな決定

因子となるとされている<sup>26,29-31)</sup>。そのため骨格筋内のグリコーゲン量を増加させる事が重要な課題となり、マラソンやトライアスロンなどの競技の現場においては炭水化物ローディング法が試みられている。これは筋グリコーゲン量の変化を観察する絶好の方法と思われ、今回の実験に応用した。図15に見られたように蛋白中心の食事と激しい運動により一時的に筋グリコーゲン量は減少するものの、その後の高炭水化物食の投与で除々に増加し、競技日と設定した第7日目には、施行前の約130%を呈しており、いわゆる過補償を生じていた。この結果は従来の生検による報告<sup>30,31)</sup>を支持するもので、このように炭水化物ローディングによる骨格筋内のグリコーゲンの変化を、本法により無侵襲に把握し得た事は、今後個人レベルでの適切な運動および栄養処方などを行いうる可能性を示唆している。

## V. まとめ

本研究では天然  $^{13}\text{C}$ -MRS により市販の MRI 装置を用いて、しかも安全性に配慮し、ヒト肝臓、骨格筋のスペクトルを測定するのに成功した。この測定方法により、肝臓グリコーゲンが食事により上昇し、その後徐々に減少していく経過、また肝臓グリコーゲンも運動によって早期の段階から利用されている事実をつかんだ。特にグルコース投与後ただちに、肝臓内でグルコースからグリコーゲンが合成されており、それが時間と共に減少していく過程を追跡できた。また骨格筋グリコーゲン量

が、炭水化物ローディング法により一旦減少するが、その後かえって上昇し過補償を生ずるという従来の報告を証明する事ができた。この研究によって今後  $^{13}\text{C}$ -MRS 法を用いて、骨格筋および肝臓内グリコーゲンの細胞レベルでの代謝、調節過程を、瞬時にしかも無侵襲に測定できる可能性が示唆された。

#### 謝 辞

稿を終えるにあたり、終始御指導、御校閲を賜りました千葉大学医学部整形外科教室守屋秀繁教授ならびに千葉大学医学部放射線科学教室有水 昇名誉教授に深甚なる謝意を表します。また本研究にご援助いただいた舘野之男、福田 寛、橋本隆裕（放射線医学総合研究所）、山田一孝（第一製薬中央研究所）、山井 智（シーメンス旭）、脇元幸一（船橋整形外科）の各位に深謝致します。なお本論文は学位審査論文である。

#### SUMMARY

Measurement was made of carbon spectrums with a human body, while maintaining the safety by use of a natural abundance  $^{13}\text{C}$ -MRS method. The apparatus employed was a 1.5 tesla MRI which was commercially available, and a  $^{13}\text{C}$  coil was fabricated in accordance with the liver and the muscle for the use of transmitting/receiving of the measurements. The subjects were healthy male volunteers. From the spectrum of glycogen (C1), it was observed that the liver glycogen increased by intake of meals followed by a progress of gradual decrease, while a phase of decrease was observed from an earlier stage which resulted from the exercise. With the case to which glucose was administered, glucose peaks taken into the liver were observed with C1- $\alpha$  and C1- $\beta$ . A progress could be traced in that the glycogen was synthesized from glucose in the liver and then decrease in accordance with the time elapses. With the muscle, changes in the quantity of glycogen were measured by use of a carbohydrate loading method. It was suggested that the method using the  $^{13}\text{C}$ -MRS was capable of measuring instantly and noninvasively the metabolism and adjusting process at a cell level of glycogen in the muscle and the liver.

#### 文 献

1) Price TB, Rothman DL, Avison MJ, Buonamico P and Shulman RG:  $^{13}\text{C}$ -NMR measurements of muscle glycogen during low-intensity exercise. *Am Physiol Soc*: 1836-1844, 1991.

2) Bottomley PA, Hardy CJ, Roemer PB and Mueller OM: Proton-decoupled, overhauled-enhanced, spatially localized carbon-13 spectroscopy in humans. *Magn Reson Med* 12: 348-363, 1989.

3) Cohen SM, Rognstad R, Shulman RG and Katz J: A comparison of  $^{13}\text{C}$  nuclear magnetic resonance and  $^{14}\text{C}$  tracer studies of hepatic metabolism. *J Biol Chem* 256: 3428-3432, 1981.

4) Alger JR, Sillerud LO, Behar KL, Gilles RJ and Shulman RG: In vivo Carbon-13 nuclear magnetic resonance. *Science* 214: 660-662, 1981.

5) Beckmann N, Seelig J and Wick H: Analysis of glycogen storage disease by in vivo  $^{13}\text{C}$  NMR: Comparison of normal volunteers with a patient. *Magn Reson Med* 16: 150-160, 1990.

6) Canioni P, Alger JR and Shulman RG: Natural abundance carbon-13 nuclear magnetic resonance spectroscopy of liver and adipose tissue of the living rat. *Am Chem Soc* 22: 4974-4980, 1983.

7) Barany M, Doyle DD, Graff G, Westler WM and Markley JL: Natural abundance  $^{13}\text{C}$ -NMR spectra of human muscle, normal and diseased. *Magn Reson Med* 1: 30-43, 1984.

8) Ishihara M, Ikehira H, Nishikawa S, Hashimoto T, Yamada K, Shishido F, Ogino T, Cho K, Kobayashi S, Kawana S, Matumoto T, Iinuma TA, Arimizu N and Tatenno Y: Dynamic human glycogen and glucose metabolism detection utilizing in vivo  $^{13}\text{C}$  NMR. *Am J Phys Imag* 7: 32-35, 1992.

9) Higuchi M, Iwaoka K: マラソンと炭水化物ローディング, *Japanese Journal of Sports Science* 8-11: 733-741, 1989.

10) Hultman E, Bergstrom J: Muscle glycogen synthesis in relation to diet studied in normal subjects. *Acta Med Scand* 182: 109-117, 1967.

11) Sherman WM, Costill DL, Fink WJ and Miller JM: Effect of exercise-diet manipulation on muscle glycogen and its subsequent utilization during performance. *Int J Sports Med* 2: 114-118, 1981.

12) Goldsmith E, Sprang S and Fletterick R: Structure of maltoheptaose by difference Fourier methods and a model for glycogen. *J Mol Biol* 156: 411-427, 1982.

13) Howell RR: The glycogen storage disease. In: *The metabolic basis of inherited disease*, Standbury JB, Wyngaarden JB and Fredrickson DS, eds., pp. 149-173, McGraw-Hill.

- ll, New York, 1972.
- 14) Newsholme EA and Start C: Regulation of glycogen metabolism, chapter 4. In: Regulation in metabolism, pp. 146-194, Wiley, New York, 1974.
  - 15) 三浦 巖: 医学におけるスペクトロスコピー, MRI 診断学, 永井輝夫編集, pp. 182-200, 朝倉書店, 東京, 1988.
  - 16) Ikehira H, Hashimoto T, Fukuda H, Ueshima Y, Yamai S, Maki T, Iinuma TA, Tatenno Y: Carbon-13 NMR imaging study of in-vivo glucose metabolism. *Am J Phys Imag* 5: 50-54, 1990.
  - 17) Jardetzky O, Roberts GCK: Fundamental principles. In: NMR in molecular biology, pp. 10-19, Academic Press, New York-London, 1981.
  - 18) Gadian DG: Introduction. In: Nuclear magnetic resonance and its applications to living systems, pp. 1-22, Clarendon press, Oxford, 1982.
  - 19) Kramer DM: Imaging of elements other than hydrogen. In: Nuclear magnetic resonance imaging in medicine, Kaufman L, Crooks LE, Margulis AR, eds., pp. 184-203, Igaku-Shoin, New York-Tokyo, 1981.
  - 20) Jue T, Rothman DL, Tavittian BA and Shulman RG: Natural-abundance  $^{13}\text{C}$  NMR study of glycogen repletion in human liver and muscle. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 1439-1442, 1989.
  - 21) Sillerud LO and Shulman RG: Structure and metabolism of mammalian liver glycogen monitored by carbon-13 nuclear magnetic resonance. *Am Chem Soc* 22: 1087-1094, 1983.
  - 22) Shulman GI, Rothman DL, Jue T, Stein P, DeFronzo RA and Shulman RG: Quantitation of muscle glycogen synthesis in normal subjects and subjects with non-insulin-dependent diabetes by  $^{13}\text{C}$  nuclear magnetic resonance spectroscopy. *N Engl J Med* 322, No. 4: 223-228, 1990.
  - 23) Evelhoch JL, Crowley MG and Ackerman JJH: Signal-to-noise optimization and observed Volume localization with circular surface coils. *J Magn Reson* 56: 110-124, 1984.
  - 24) Zang LH, Laughlin MR, Rothman DL and Shulman RG:  $^{13}\text{C}$  NMR relaxation times of hepatic glycogen in vitro and in vivo. *Biochemistry* 29: 6815-6820, 1990.
  - 25) 井川幸夫: 運動と代謝, 代謝27, No. 4: 335-341, 1990.
  - 26) 大西祥平: 炭水化物ローディングの考え方と実際, 臨床栄養 78: 41-45, 1991.
  - 27) Conn EE and Stumpf PK: Outline of biochemistry. 田宮信雄, 八木達彦 (訳) 第4版 pp. 21-50, 東京化学同人, 東京, 1978.
  - 28) Avison MJ, Rothman DL, Nadel E and Shulman RG: Detection of human muscle glycogen by natural abundance  $^{13}\text{C}$  NMR. *Proc Natl Acad Sci USA* 85: 1634-1636, 1988.
  - 29) Hultman E: Nutritional effects on work performance. *Am J Clin Nutr* 49: 949-957, 1989.
  - 30) Bergstrom J and Hultman E: A study of the glycogen metabolism during exercise in man. *Scand J Clin Lab Invest* 94 (suppl): 1-63, 1967.
  - 31) Karlsson J and Saltin B: Diet, muscle glycogen, and endurance performance. *J Appl Physiol* 31: 203-206, 1971.