

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 12 日現在

機関番号：82632

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25560346

研究課題名(和文) 磁気共鳴分光法を用いたリン酸化合物濃度の新規定量方法の確立とスポーツ科学への応用

研究課題名(英文) Development and application of a method for measuring the phosphorus compound concentration in human skeletal muscle by quantitative magnetic resonance spectroscopy

研究代表者

高橋 英幸 (TAKAHASHI, Hideyuki)

独立行政法人日本スポーツ振興センター国立スポーツ科学センター・スポーツ科学研究部・副主任研究員

研究者番号：00292540

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：領域選択法を用いたリン磁気共鳴分光法(31P-MRS)によるリン酸化合物濃度の新しい測定方法を確立させ、スポーツ科学への応用可能性を検証することを目的とした。標準溶液とヒト骨格筋を対象とした基礎的な実験により、31P-MRSを用いたリン酸化合物濃度測定の妥当性を検証することができた。さらに、鍛錬者と非鍛錬者の比較実験では、短距離走者がより高いクレアチンリン酸濃度とより低いアデノシン三リン酸濃度を有することを実証した。以上のことから、本研究で確立させた定量的31P-MRSにより、リン酸化合物濃度の非侵襲的評価が可能であることが示され、今後、スポーツ科学への広い応用が期待できる。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to establish a method for measuring the phosphorus compound concentration in human skeletal muscle by localized phosphorus magnetic resonance spectroscopy (31P-MRS) and apply it to sports science. We verified the validity of localized 31P-MRS to quantify phosphorus compounds such as phosphocreatine, adenosine triphosphate, and inorganic phosphate through a basic experiment. Moreover, we demonstrated that phosphocreatine and adenosine triphosphate concentrations in sprinters were significantly higher and lower, respectively, than those in untrained subjects and endurance runners. Therefore, the present results suggest that it is possible to measure the phosphorus compound concentration in human skeletal muscle using the developed 31P-MRS method, and that the method will become a useful tool for sports science.

研究分野：運動生理学

キーワード：磁気共鳴分光法 リン酸化合物 競技種目特性 クレアチンリン酸 アデノシン三リン酸

1. 研究開始当初の背景

アデノシン三リン酸(ATP)は、筋収縮(運動)のための唯一のエネルギー源である。筋に貯蔵されている ATP 量は限定されるため、運動を継続するには ATP を再合成する必要があり、そのために重要な役割を果たすのがクレアチンリン酸(PCr)である。したがって、これらリン酸化合物の含有量が、運動パフォーマンスに大きな影響を及ぼすことは想像に難くない。一方、ヒトの骨格筋は速筋線維と遅筋線維で構成されており、これらの構成比(筋線維組成)は先天的に決定され、競技種目特異性のあることが示されている。筋線維タイプとリン酸化合物濃度の関係に関しては、ATP 濃度は両筋線維間で差がないが、PCr 濃度は速筋線維の方が高いことが報告されている一方、PCr も両筋線維で差がないとする報告もある。このように、一致した見解が得られていない一つの背景要因として、リン酸化合物濃度や筋線維組成を測定するためには、筋生検により筋を摘出して分析しなければならないという実験上の制約があり、必ずしも十分な検討が行われているわけではないことが挙げられる。

リンの磁気共鳴分光法(^{31}P -MRS)は、磁気と電磁波を用いて生体内のリン酸化合物を非侵襲的に検出できる方法であるが、その測定値の評価は化合物間の相対評価に限定され、絶対的な濃度を算出できないことが欠点である。近年、ATP や PCr の絶対的な濃度の測定を可能とする、領域選択法を用いた定量的 ^{31}P -MRS が提案されているが¹⁾、この方法は、標準で付属しない特殊な検出コイルや領域選択プログラムを要するため、実施できる施設は限定される。

そこで、定量的 ^{31}P -MRS を用いた、非侵襲的な、リン酸化合物濃度の新しい測定法を確立すれば、筋線維組成の推定やトレーニング効果の評価、競技適性診断等に応用可能な、これまででない、リン酸化合物濃度を指標とした新たな評価システムを構築できると考えたのが本研究である。

2. 研究の目的

本研究では、新しい領域選択法を用いた定量的 ^{31}P -MRS によるリン酸化合物(ATP、PCr、無機リン酸(Pi))濃度の新しい測定方法を確立させるための用具とプログラムの作製・開発を行い、確立した方法を用いて測定される値の妥当性を検証する。さらに、競技種目特性の違いによりリン酸化合物濃度が異なるかどうかを明らかにする。

3. 研究の方法

上記の目的を達成するために以下の実験を実施した。

(1)実験 1: ファントムを対象とした定量的 ^{31}P -MRS の妥当性の検証

定量的 ^{31}P -MRS の測定を実施するために、検出コイルを固定するための装置を作製し

た(図1)。

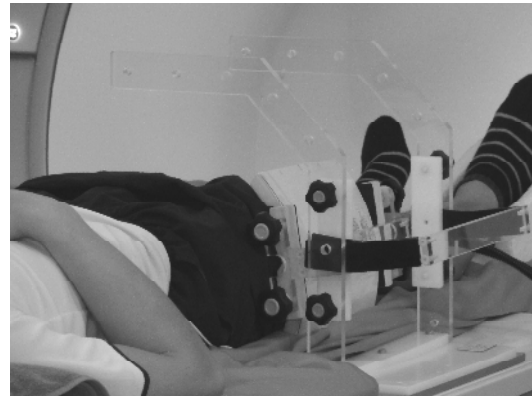


図1. 作製したコイル固定装置概観図

新しい領域選択法(Extended ISIS 法)による領域選択精度を検証するために、異なる大きさの立方体(内寸: 25×25×25mm、35×35×35mm、45×45×45mm)を内包したファントムを作製した(図2)。この異なる大きさの立方体中に 50mM フェニルホスホン酸、その周囲にリン酸二水素カリウム(KH_2PO_4)を注入し、25×25×25mm、35×35×35mm、45×45×45mm の関心領域(ROI)を設定して ^{31}P -MRS の測定を行った。 ^{31}P -MRS の測定には 3 テスラの超電導 MR 装置(MAGNETOM Verio, シーメンス社製)と直径 10cm の ^{31}P - ^1H サーフェスコイル(高島製作所)を用い、Bogner ら²⁾により提案された Extended ISIS 法を用いて領域選択を行った。測定条件は、繰り返し時間=6s、バンド幅=3,000Hz、データポイント=2,048、積算=32回、プレスキャン=4回で、データ収集時間は 3.6 分であった。

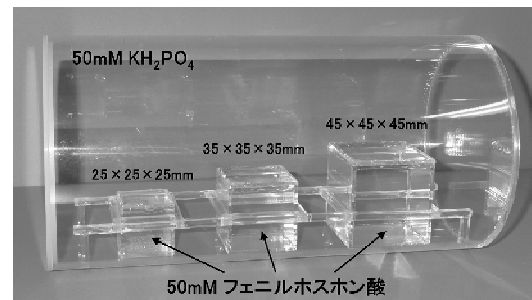


図2. 領域選択精度検証用ファントム

次に、定量性の確認を行うために、4 種類の異なる濃度(25mM、50mM、75mM、100mM)の KH_2PO_4 溶液ファントム(500mL)を作製し、35×35×35mm の ROI で ^{31}P -MRS 測定を行った。

(2)実験 2: ヒト骨格筋を対象とした定量的 ^{31}P -MRS の妥当性の検証

ヒト骨格筋への定量的 ^{31}P -MRS の応用可能性を検証するために、健康成人男性 18 名(27.7±6.2 歳、172.6±4.6cm、64.7±10.1kg)を対象として、右脚の外側広筋・中間広筋に 30×35×40cm の ROI を設定して ^{31}P -MRS 測定を行った。測定条件は(1)と同様であり、1人あたり 2 回の測定を行った。骨格筋の測定後に、ファントム(50mM KH_2PO_4)の測定を行っ

た。また、繰り返し時間 6 秒と 30 秒の ^{31}P -MRS スペクトルの比較を行うことにより飽和係数を算出した。骨格筋とファントムのスペクトルピーク面積と飽和係数を用いることにより、PCr、ATP および Pi の濃度を算出した。

(3) 実験 3 : 鍛錬者と非鍛錬者の比較

男性の陸上競技短距離走者 12 名 (ST 群)、長距離走者 10 名 (ET 群)、非鍛錬者 9 名 (UT 群) を対象として、右脚の外側広筋・中間広筋に $30 \times 35 \times 40\text{cm}$ の ROI を設定して定量的 ^{31}P -MRS の測定を行った。測定条件は (1) および (2) と同様であり、1 人あたり 2 回の測定を行い、その平均値を算出した。

4. 研究成果

(1) 3 つの異なる立方体を含むファントムを対象として、それぞれの大きさに合わせた 3 種類の大きさの ROI で ^{31}P -MRS 測定を行った結果を図 3 に示す。それぞれのスペクトルにおいて、フェニルホスホン酸ピークが明瞭に示され、ROI 外の KH_2PO_4 ピークはほとんど検出されなかった。このことは、本研究で用いた Extended ISIS 法を用いた領域選択法の精度が良好であり、ROI 外の信号の影響は小さく、定量評価を行うための領域選択法として十分利用可能であることを示している。

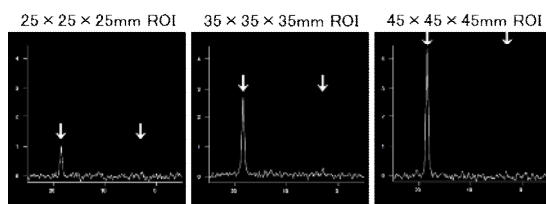


図 3. 3 種類の ROI で測定したファントムの ^{31}P -MRS データ

左矢印 : フェニルホスホン酸、右矢印 : KH_2PO_4

4 種類の異なる KH_2PO_4 濃度のファントムを対象として測定した ^{31}P -MRS スペクトルを図 4 に、スペクトルから算出した KH_2PO_4 ピーク面積と KH_2PO_4 濃度との関係を図 5 に示す。 KH_2PO_4 ピーク面積と濃度との間には有意な非常に高い相関関係が認められた。

以上の結果から、本研究で確立させた Extended ISIS 法を用いた定量的 ^{31}P -MRS により、特定領域のリン酸化合物濃度を精度良く評価可能であることが示された。

(2) ヒトの外側広筋・中間広筋を対象として実施した ^{31}P -MRS 測定において、高い PCr 濃度と低い PCr 濃度を示したスペクトル例を、ファントムのスペクトル高を同一にして表示した例を図 6 に示す。このように、被検者により濃度の異なるスペクトルを高い信号/ノイズ比で描出することができた。

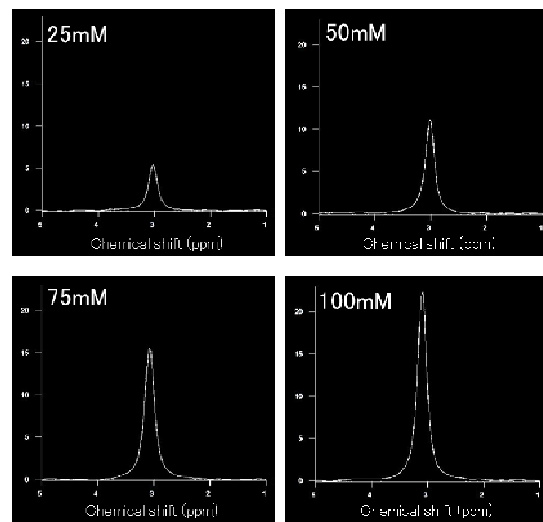


図 4. 異なる KH_2PO_4 濃度のファントムの ^{31}P -MRS スペクトル

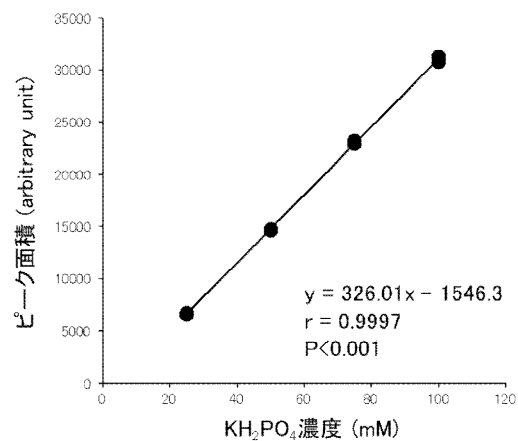


図 5. ^{31}P -MRS における KH_2PO_4 ピーク面積と KH_2PO_4 濃度との関係

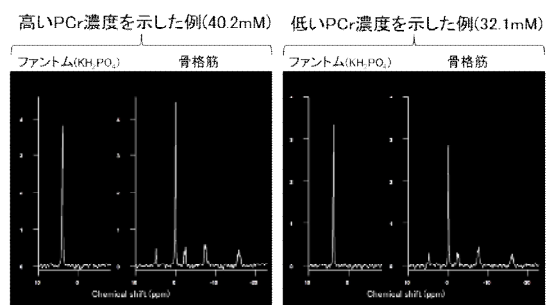
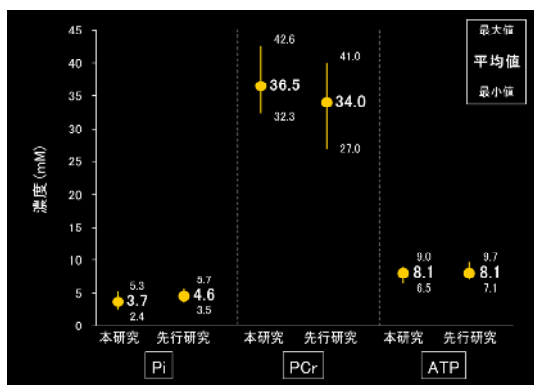


図 6. 異なる PCr 濃度を示した被検者の ^{31}P -MRS スペクトル例

各被検者で 2 回行った測定間の相関係数と有意水準、変動係数 (CV) は PCr が $r=0.881$, $P<0.01$, 2.1%、ATP が $r=0.635$, $P<0.01$, 5.0%、Pi が $r=0.694$, $P<0.01$, 10.5% であった。それぞれの化合物とも 2 回の測定間で有意な相関が認められたが、ピーク面積が少ない ATP や Pi の方が相関係数が低く、CV も大きい傾向が認められた。これらのことは、定量的 ^{31}P -MRS によるリン酸化合物定量は一定の再現性を有するが、より信頼性のあるデータを

得るためには、複数回測定して平均することが必要であることを示唆している。

図7に、本研究で得られたリン酸化合物濃度の平均値、最大値、最小値と先行研究(Kempら、2007)¹⁾のデータを示す。本研究と先行研究は類似した値を示し、特に、ATPは先行研究と同じ平均値を示した。これらの結果は、本研究で確立させた定量的³¹P-MRSにより、ヒト骨格筋のリン酸化合物濃度を妥当性のある値として評価することが可能であることを示している。



(先行研究: Kemp et al. NMR in Biomed. 2007)

図7. 本研究と先行研究の測定値の比較

(3) 鍛錬者と非鍛錬者の骨格筋を対象とした定量的³¹P-MRS測定に関して、各群の典型的なスペクトル例を図8に、本研究で算出されたリン酸化合物濃度と相対的含有量、筋細胞内pHを表1に示す。算出されたPCr、ATP、Pi濃度の範囲は、それぞれ、32.4-43.8mM、5.0-9.3mM、2.4-5.1mMであった。ST群はUT群、ET群よりも有意に高いPCr濃度と低いATP濃度を示した(P<0.05)(表1)。先行研究において、遅筋線維よりも速筋線維の方が高いPCr濃度を有していること、短距離走者の筋では速筋線維の割合が高いこと、そして、短距離走者が頻繁に実施する高強度スプリントトレーニングによりPCr濃度が増加することが示されていることから考えると、ST群における高いPCr濃度は、遺伝的な要因とトレーニング効果の両者が反映された結果であると推察される。一方、ATP濃度は遅筋線維と速筋線維で差がないこと、そして、スプリントトレーニングによりATP濃度が減少することが報告されていることから、ST群の低いATP濃度は、遺伝的な要因よりはむしろトレーニングの効果が反映されていると考えられる。

リン酸化合物濃度の相対的な割合では、ST群がUT群、ET群よりも有意に高いPCr/ATPを示した。一方、PCr/Piは群間で差は認められなかった。この相対的な割合と各リン酸化合物濃度との関係では、PCr/ATPとPCr濃度およびATP濃度との間に有意な相関が認められたが、その相関係数はPCr濃度よりもATP濃度の方が高値を示した(表2)。PCr濃度よりもATP濃度の方が低値を示すため、PCr/ATP

比に対する影響が大きくなることは当然ではあるが、ATP濃度自身がこの相対比に大きく関係することは明らかである。

以上のことから、定量的³¹P-MRSを用いた鍛錬者と非鍛錬者のリン酸化合物の比較により、ST群がUT群やET群よりも高いPCr濃度と低いATP濃度を有していること、そして、ST群の高いPCr/ATP値には、より高いPCr濃度だけではなく、より低いATP濃度が大きく関係することを初めて明らかにすることができた。これらのことは、特に、鍛錬者を被検者としてトレーニング効果を調べるために、³¹P-MRSデータをリン酸化合物の相対値で表したり、ATP濃度を仮定してリン酸化合物を算出するような場合には、その結果の解釈には注意が必要であることを示唆している。

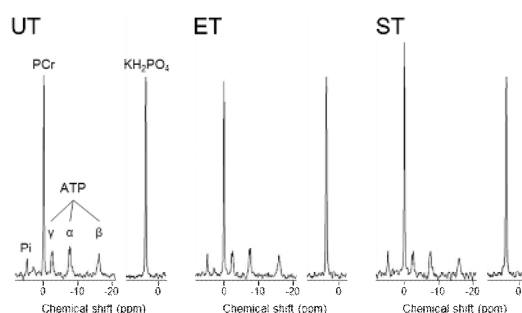


図8. 各群で得られた骨格筋(左)とファントム(右)のスペクトル例

表1. 各群における定量的³¹P-MRSデータ

	UT (n=9)	ET (n=10)	ST (n=12)
PCr (mM)	36.5±3.3	34.8±1.3	39.8±2.1**††
ATP (mM)	8.2±0.9	7.9±0.7	6.7±0.9**†
Pi (mM)	3.4±0.6	3.7±0.7	3.7±0.7
PCr/ATP	4.5±0.5	4.5±0.3	6.1±1.0**††
PCr/Pi	11.3±2.3	9.6±1.8	11.1±2.0
pH	7.03±0.03	7.01±0.03	7.05±0.02††

Means±SD, **P<0.01 vs. UT

†P<0.05 and ††P<0.01 vs. ET

表2. PCr/ATPおよびPCr/Piとリン酸化合物濃度との間の相関係数

	All		UT		ET		ST	
	PCr/ATP	PCr/Pi	PCr/ATP	PCr/Pi	PCr/ATP	PCr/Pi	PCr/ATP	PCr/Pi
PCr (mM)	0.633**	0.306	0.342	0.324	-0.275	0.749*	0.394	-0.235
ATP (mM)	-0.879**	0.133	-0.720**	-0.005	-0.930**	0.743*	-0.936**	0.241
Pi (mM)	0.287	-0.862**	-0.106	-0.820**	0.565	-0.962**	0.395	-0.953**
pH	0.329	0.468**	0.505	0.433	-0.599	0.388	-0.396	0.425

*P<0.05, **P<0.01

以上の実験(1)~(3)の結果から、本研究で確立させた定量的³¹P-MRSにより骨格筋のリン酸化合物濃度を非侵襲的に測定可能であることが示された。今後、スポーツ科学分野において、そして、こどもから女性を含めた多くの対象者を対象として、リン酸化合物濃度の視点から骨格筋特性やトレーニング効

果を客観的に評価する上で、本研究で確立させた定量的 ^{31}P -MRS がおおいに役立つことが期待できる。

<引用文献>

- ① Kemp GJ, Meyerspeer M, Moser E. Absolute quantification of phosphorus metabolite concentrations in human muscle in vivo by ^{31}P MRS: a quantitative review. *NMR Biomed.* 2007; 20(6): 555-565.
- ② Bogner W, Chmelik M, Andronesi OC, Sorensen AG, Trattnig S, Gruber S. In vivo ^{31}P spectroscopy by fully adiabatic extended image selected in vivo spectroscopy: a comparison between 3T and 7T. *Magn Reson Med.* 2011; 66: 923-930.

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表] (計5件)

- ① 高橋英幸, 大澤拓也, 鈴木康弘, 後藤一成, 笠井信一, 丸山克也. 定量的 ^{31}P -MRS による鍛錬者と非鍛錬者の骨格筋リン酸化化合物含有量の比較. 第43回日本磁気共鳴医学会大会, 2015年9月, 東京ドームホテル (東京).
- ② Hideyuki Takahashi, Takuya Osawa, Yasuhiro Suzuki, Kazushige Goto, Nobukazu Kasai, Katsuya Maruyama. Quantitative ^{31}P -MRS Reveals Different Phosphorus Compound Contents in the Muscle between Trained and Untrained Subjects. 62th Annual Meeting of American College of Sports Medicine and 5th World Congress. 2015年5月, San Diego (USA).
- ③ 高橋英幸, 有光琢磨, 大澤拓也, 大岩奈青, 中嶋耕平, 丸山克也, 瀧澤修. Extended ISIS 法を用いた ^{31}P -MRS による骨格筋リン酸化化合物の定量方法の検討. 第42回日本磁気共鳴医学会大会, 2014年9月, ホテルグランヴィア京都 (京都).
- ④ 高橋英幸, 有光琢磨, 大澤拓也, 大岩奈青, 中嶋耕平, 丸山克也. リン磁気共鳴分光法を用いた骨格筋リン酸化化合物濃度の非侵襲的定量. 第69回日本体力医学会大会, 2014年9月, 長崎大学 (長崎).
- ⑤ 高橋英幸. 新たな視点からの筋コンディショニングの可能性. シンポジウム: トップアスリートにおけるコンディショニング—JISS の取り組みを中心に—, 第69回日本体力医学会大会, 2014年9月, 長崎大学 (長崎).

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高橋 英幸 (TAKAHASHI, Hideyuki)
日本スポーツ振興センター・国立スポーツ

科学センター・スポーツ科学研究部・副主任
研究員

研究者番号: 00292540

(2) 研究分担者

中嶋 耕平 (NAKAJIMA, Kohei)
日本スポーツ振興センター・国立スポーツ
科学センター・メディカルセンター・副主
任研究員
研究者番号: 50292925

大岩 奈青 (OIWA, Nao)
日本スポーツ振興センター・国立スポーツ
科学センター・スポーツ科学研究部・研究
員
研究者番号: 50443247

有光 琢磨 (ARIMITSU, Takuma)
日本スポーツ振興センター・国立スポーツ
科学センター・スポーツ科学研究部・契約
研究員
研究者番号: 00616021

(3) 連携研究者

(4) 研究協力者

瀧澤 修 (TAKIZAWA, Osamu)
シーメンス・ジャパン株式会社・リサーチ
& コラボレーション部・研究員

丸山 克也 (MARUYAMA, Katsuya)
シーメンス・ジャパン株式会社・リサーチ
& コラボレーション部・研究員