

— 総 説 —

核磁気共鳴分光法 (NMR) の生物への応用

心筋代謝研究を中心として

仲 澤 幹 雄, 今 井 昭 一

新潟大学医学部薬理学教室*

(昭和63年4月21日)

も く じ

I. はじめに	1
II. NMR の生物応用への歴史	1
III. NMR とは	2
IV. NMR で何ができるか	3
1) 代謝産物の濃度測定	3
2) 細胞内 pH 測定	4
3) イオン濃度測定	5
4) 代謝反応速度の測定	5
V. 灌流心臓における ^{31}P -NMR 測定法	6
1) 正常心の代謝測定への ^{31}P -NMR の応用	7
2) 病態時の心筋代謝への応用	7

I. はじめに

NMR (nuclear magnetic resonance) spectroscopy, 核磁気共鳴分光法はその名の示す如く赤外或いは紫外分光法などと基本的には同じ分光法 (Spectroscopy) の一つであり適当な条件が与えられると試料がその特性によって決まる一定の周波数の電磁波を吸収する性質を利用する解析手段である。NMR の近縁の手法としては ESR (electrospinresonance) があるが, ESR が核外電子の存在様式をあらわすのに対し NMR は原子核そのものについての情報を与える。1946年の Brock ら¹⁾ や Purcell ら²⁾ による NMR の発見後, 比較的早い時期に ^1H (プロトン)-NMR の測定という形で生物への応用が行なわれている (1950年既に馬鈴薯の水の含量を研究するためプロトン NMR が使用されている³⁾。動物組織のプロトン NMR シグナルの観測も 1955年に行われている⁴⁾。プロトンはそのシグナルが大きく当時の装置でも十分測定可能であったためである)。しかし生物への応用が飛躍的に進んだのはパルスフーリエ変換

(FT) が用いられるようになってからである。FT 法の採用により初期の NMR で用いられていた連続波 (CW) 法に比し S/N 比が向上し比較的短時間の観測で解析を行う事が出来るようになり, プロトンに比し感度は低いが生体の代謝情報という点ではより意義の大きい ^{31}P のような核についても観測が可能となった。 ^{31}P -NMR による最初の研究は1974年ラット後肢筋肉について行われているが, 現在では心臓, 脳, 腎臓, 肝臓あるいはその他の臓器についても種々の研究が精力的に行なわれている。最近はスペクトロスコピーによる代謝情報の獲得だけでなくコンピューター断層法と組み合わせる事によりイメージング (MRI) の武器としても目ざましい発展を遂げつつあり臨床診断に不可欠の道具となる日も近いものと思われる。

II. NMR の生物応用への歴史

上述した様にプロトン NMR の生物への応用は NMR の原理が考え出された後比較的早い時期に行われているが, 生体高分子の研究あるいは生きた生体そのものの研究への応用が飛躍的に旺んになったのは1960年の後半からで高磁場超伝導磁石の発展とフーリエ変換法の採用に

* 〒951 新潟市旭町通一番町757

依っている。1965年にはプロトンNMRによりカエルの筋組織に2種類の水の存在が示唆されている⁵⁾。プロトン以外の原子については1973年 Moon and Richards⁶⁾が行った赤血球の高分解能 ^{31}P -NMR による研究 (2,3-diphosphoglycerate, 無機リン及び ATP のシグナルを検出, 細胞内 pH の測定に NMR が利用可能であることを示した) を嚆矢とするが, 1974年には Hoult⁷⁾によりラット後肢筋肉から ^{31}P -NMR シグナルが記録されている。彼等の仕事は取り出した筋肉を少量の Locke Ringer 液に浸す形で行われて居りクリアチンリン酸 (CP) あるいは ATP が時間とともに減少するという状態での実験で生理的な状態での NMR 測定とは言いがたいが, 細胞内 pH の測定も行うなど現在行なわれているほぼ全ての項目が測定されているという点で筋代謝研究への功績は大きい。彼等の研究はその後より生理的な標本へと発展した。心臓における ^{31}P -NMR のシグナル測定は骨格筋への研究に少しおくれ Jacobus⁸⁾によって1977年に報告された。彼等は虚血によるシグナルの変化や細胞内 pH の変化の観察を行っている。同年 Oxford のグループからもラット灌流心での ^{31}P -NMR 測定の報告が出ているし⁹⁾、心筋代謝への薬物作用の研究^{3,10,11)}や cardioplegia の心筋保護作用の研究に対する応用¹²⁻¹⁴⁾も相前後して報告されている。心臓の他腎臓、肝臓あるいは脳における ^{31}P -NMR 測定も1970年の後半になされている。又、1978年にはこれまでの手法では不可能であった *in vivo* での酵素反応速度の測定に NMR が有用であることが Brown and Ogawa¹⁵⁾により報告され、1979年 Nunnally and Hollis¹⁶⁾により心臓への応用がなされている。現在では麻酔下の丸ごとの動物で各種臓器の ^{31}P -NMR 測定が可能となって居り種々の病態下での薬物作用の検討にも応用されている¹⁷⁾。

III. NMR とは

既に述べたように NMR はその名の示す通り、分光法的測定手段のひとつであり磁場の中に置かれるとある種の原子核が FM の周波数程度の電磁波を共鳴吸収するという現象を利用するものであるから「核」という名前は付いているが放射性アイソトープとは全く関係がなく、高い磁場 (我々が使用している装置で約63,000ガウス) を使用することを除けば極めて安全な測定手段の一つである。共鳴吸収される電磁波の周波数がそれぞれの原子核に特異的であるため特定の原子核を選択して解析を行う事が出来るのである。共鳴吸収を起す原子核は所

謂スピン量子数が0でないものに限られるが表1に示す様に NMR の対象となる核は多数あり今後の進歩によりさらに応用範囲は広がるものと思われる。

さて、ここでスピン量子数 $I=1/2$ の原子核 (例えば ^{31}P の原子核) を例に NMR の原理についてその概略を説明しておく事とする。一般にスピン量子数 I の原子核を磁場 H_0 の中に置くと等間隔に分離した $2I+1$ 個のエネルギー準位に分裂することが知られている (ゼーマン分裂)。従って、 $I=1/2$ のリンの場合には原子核は $\Delta E = \mu H_0$ のエネルギーの差をもつ二つのエネルギー準位に Boltzmann の分布則に従って分布することとなるので、低いエネルギー状態に分布する原子核の方が少し多いため巨視的に見ると全体では方向を持つ微小磁石として振舞う事になり、磁場の中では才差運動 (コマのみそり運動) を行う。これを Larmor の才差運動と呼ぶが、その振動数 ν_0 は (1) 式に示す様に核の置かれた磁場の強さに比例する。

$$\nu_0 = \frac{\gamma}{2\pi} \times H_0 \quad (1)$$

(1) 式を角周波数で表すと

$$\omega_0 = 2\pi\nu_0 = \gamma H_0 \quad (2)$$

さてこの様な周波数で例えば z 軸の回りを回転している核磁石に外部から ν_0 に相当する電磁波が x 軸方向に加えられると共鳴が起こり電磁波の加えられている時間だけ x 軸のまわりで回転するようになる。電磁波をパルス状に加えるとパルスの持続時間に相当する回転角だけ x 軸を中心として回転する。FT-NMR (パルスフーリエ変換 NMR) で必ず出てくる「 α 度パルス」というのは核磁石を α 度だけ回転させるパルスの事である。この様に α 度だけ倒された (回転させられた) 核磁石はパルスが消失すると共鳴吸収した電磁波を放出し元の平衡状態へ戻る。放出される電磁波は適当な記録装置により自由減衰振動 (FID) として記録されるのでこれをフーリエ変換して NMR スペクトルを得る (図1)。式 (1) からわかるように ν_0 は H_0 に比例するが磁気回転比と呼ばれている比例定数 γ は核に固有の定数であり、そのため同じ強度の磁場に置かれても核によって ν_0 は異なるので適当な ν_0 を選べば特定の核だけを共鳴させる事ができるのである。共鳴吸収を起させるパルスの α が 90° に近くなればなるほど NMR シグナルは大きくなるがパルスを切った後平衡状態に戻るまでの時間が長くなるので繰り返し積算 (加算平均) を行うときには「飽和」という現象が起りシグナルの定量性が悪化する。平衡状態にもどる過程を緩和、それに要する時間を緩和時

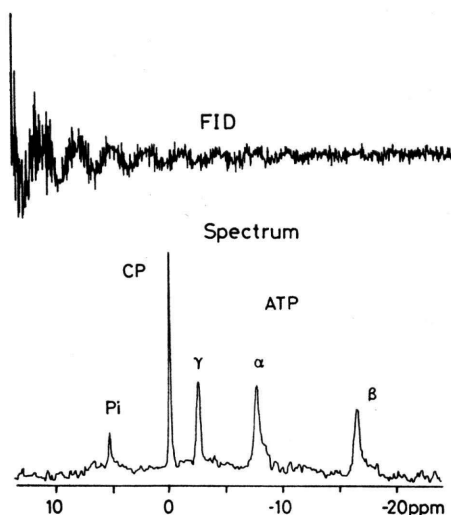


Fig. 1 Free induction decay (FID) and its Fourier transform (NMR-spectrum) recorded from the isolated perfused rat heart. NMR parameters: 45° pulse, 0.5 sec interval, 1,200 transients (10 min).

間という。緩和過程には二通りありひとつをスピン格子緩和(縦緩和とその時定数を T_1) もうひとつをスピン-スピン緩和(横緩和とその時定数を T_2)と呼んでいるが、ここで問題となるのは前者 T_1 である。飽和を起さず最大のシグナルを得るためには T_1 とパルスの繰り返し時間とを勘案して最善の α 度パルスを決める必要がある。P の NMR の場合には 45° パルスの使用が多い。

このように述べてくると読者は分子が違っても同一の核はすべて同じ共鳴周波数で共鳴してしまうので、例えば ATP の P とクレアチンリン酸 (CP) の P との区別が出来ないのではないかという疑問を持たれたのではないかと思う。幸いなことに、原子核の周囲に存在する電子の作る磁場が H_0 に影響を与えるので化合物の中の原子核に実際に作用する磁場の強さ H_0' は(3)式で示す様に H_0 と異なったものとなるので、同じ原子でもその化学結合状態が異なると共鳴周波数 ν_0 は式(4)に示すが如く少しずつ変わってくるのである。

$$H_0' = H_0 - \sigma H_0 = H_0 (1 - \sigma) \quad (3)$$

σ は磁気遮蔽定数と呼ばれるが化学結合の状態に因って定まる定数である。

$$\nu_0 = \frac{\gamma}{2\pi} \cdot H_0 (1 - \sigma) \quad (4)$$

この現象を化学シフト (chemical shift) と呼んでいる。NMR が同じ種類の原子核からなる化合物の分析定

量に使えるのは全く化学シフトの御蔭である。化学シフトの大きさはいろいろな方法で表現する事ができるが、通常用いられているのは下式に示す無次元の δ であり、ppm で表示される。

$$\delta = (H_0' - H_0) / H_0$$

この式で H_0 はある標準物質の ^{31}P 原子核の共鳴磁場 (共鳴周波数) であり、 H_0' は問題としている物質の ^{31}P 原子核の共鳴磁場 (共鳴周波数) である。IUPAC の合意では、スペクトルの右側を高磁場としているので ppm 表示では図 1 に示すごとく右側が負の値となる。図 1 に示す様に ATP の場合 P のシグナルは 3 種類検出される。生体スペクトルでは γ には ADP の β 位の P が、 α には NAD, NADH 等の P がシグナルとして重なるので ATP の定量には β 位のピークが使用される。

IV. NMR で何ができるか

NMR では化合物の置かれている環境によってシグナルの大きさが変化するので代謝産物の濃度の絶対量を測定することは非常に困難であるが、相対的な変化を追跡することは比較的たやすいし、完全に非破壊的な手法なので連続記録が可能であるから今まで良く分っていなかった組織代謝と機能との関係について詳細な研究を行うには恰好の道具である。ただ代謝研究にもっともよく用いられている ^{31}P -NMR はプロトン等に比較して相対感度が低い (表 1), P を含む物質として代謝研究上重要な ATP や CP の細胞内濃度は数 mM 程度と低いので s/n 比のよいシグナルを得るためには数分間のくり返し積算 (加算平均) が必要である。この問題はしかし後述する様にある程度まで方法論的に解決できる問題ではある。

1) 代謝産物の濃度測定

NMR では自由に運動している化合物からのみシグナルが得られ、運動が妨げられている化合物ではシグナルの broadening が起こってスペクトル上に検出出来なくなるので、運動の比較的自由的な化合物のみが測定対象となる。これも代謝研究を行う場合には利点となろう。これまで我々が組織代謝の研究に用いて来た液体窒素で瞬間凍結した組織から種々の代謝産物を抽出して測定するという方法では結合型であれ非結合型であれ全て測定されてしまうので実際に代謝に関与していない部分も測定していた可能性があるからである。この点を理解して頂くために NMR 的に測定した ATP, CP 濃度と従来の方法で得られた値との対応を表 2 に示す。CP や ATP については従来の酸抽出による値と大きな差がないが、

Table 1 NMR properties of nuclei commonly used in biomedical research

Nucleus	Resonance frequency (MHz) at 6.3 T.	Natural abundance (%)	Spin quantum number	Relative sensitivity
^1H	270	99.99	1/2	1.00
^{13}C	67.88	1.108	1/2	1.59×10^{-2}
^{15}N	27.35	0.37	-1/2	1.04×10^{-3}
^{17}O	36.61	3.7×10^{-2}	-5/2	2.91×10^{-2}
^{19}F	254.02	100	1/2	0.833
^{23}Na	71.42	100	3/2	9.25×10^{-2}
^{31}P	109.30	100	1/2	6.63×10^{-2}
^{35}Cl	26.46	75.53	3/2	4.70×10^{-3}
^{39}K	12.61	93.10	3/2	5.08×10^{-4}
^{59}Co	64.11	100	7/2	0.277

Table 2 Myocardial concentrations of ATP and creatine phosphate (CP) —Comparison of ^{31}P -NMR data with those obtained with acid extraction methods

Method	ATP		CP	
	$\mu\text{mol/g}$ wet wt	$\mu\text{mol/g}$ dry wt	$\mu\text{mol/g}$ wet wt	$\mu\text{mol/g}$ dry wt
^{31}P -NMR	5.09 ± 0.10	27.0 ± 0.5	5.85 ± 0.10	31.0 ± 0.5
Acid extraction methods				
Berne & Rubio	5.43 ± 0.42			
Kao et al.		21.0 ± 1.0		26.0 ± 1.0
Neely et al.		22.0 ± 1.0		25.0 ± 1.0
Reibel & Rovetto		23.2 ± 2.5		31.1 ± 2.8
Kannengiesser et al.	4.79 ± 0.14		6.19 ± 0.37	
Watts et al.		17.7 ± 0.6		34.2 ± 2.9

mean \pm S.E. Cited from Ref. 44)~49).

問題は ADP である。ADP 濃度については ATP の γ ピークから β ピークを差し引くことで測定できる筈であるが多くの場合 γ ピークと β ピークは通常ほぼ同じ大きさであって非結合型の ADP 濃度は ^{31}P -NMR の測定限界以下である事になる。ADP については従来から酸抽出法で得られた濃度と creatine phosphokinase (CPK) の平衡から算出した値とが大きく離れている事が問題とされて居り、ADP の多くは細胞内大分子 (収縮タンパク) に結合しているという仮説が Kohn ら¹⁸⁾ によって提出されているが NMR で求められた ATP/ADP 比約80と我々がモルモット灌流心の酸抽出液について求めた ATP, ADP の比4.3¹⁹⁾とから算出すると細胞内 ADP はその約95%が結合状態にあるという事になる。

2) 細胞内 pH 測定

pH 5~8 の領域で細胞内無機リン (Pi) のケミカルシフトが pH 依存性に変化し、CP のそれはほとんど変化しない事を利用する事により、 ^{31}P -NMR により細胞内 pH を測定する事が可能である。細胞内 pH は種々の酵素の細胞内での活性を知るために重要であるし、種々の病態における細胞の障害程度を知るためにも有用なパラメーターであるから細胞内 pH を連続的に測定できる事は ^{31}P -NMR を代謝測定に応用する大きな利点の一つであるといえる。この方法により測定された灌流心筋の細胞内 pH は7.0~7.2 の範囲にある^{10~14, 20~22)}。 ^{31}P -NMR による細胞内 pH の測定は 2-deoxyglucose を投与し、その代謝産物である 2-deoxyglucose-6-phosphate のケミカルシフトを使用して測定する事もできる。この方法

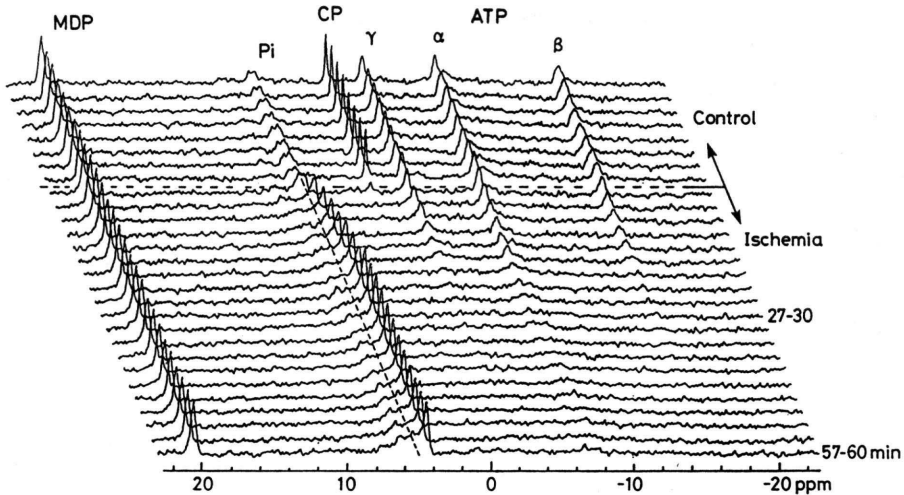


Fig. 2 Effect of global ischemia on the high energy phosphate compounds in the rat heart as studied with ^{31}P -NMR.

で得られる pH は細胞質のそれを表わしているものと思われるが³, ラット灌流心で 7.01²³⁾, モルモット灌流心で 6.98²⁴⁾ という値が報告されている。2-deoxyglucose-6-phosphate による代謝障害のため、CP ピークが減少しているの、果して完全に正常な心臓の値としてよいかどうか多少疑問があるが細胞内 Pi から求めた pH と良く一致しているので Pi から得られた pH も細胞質の pH と考えられる²³⁾。Pi による pH 測定の精度については種々の議論がなされているが、ほぼ 0.1 pH ユニット以内には入る様であり、実用上問題はないと思われる²⁵⁾。図 2 に灌流心臓の虚血時の ^{31}P -NMR スペクトルを示す。虚血により Pi のシグナルが高磁場側 (CP の方) に移動している事、すなわち細胞内 pH の低下が生じている事が分かる。最近 Garlick ら (1983)²⁶⁾ は Pi-free の液で灌流されたラット心でミトコンドリア由来と思われる Pi ピークの検出に成功している。彼らは細胞質 Pi の低磁場側 (pH 7.38 に対応) にもう 1 つの Pi のピークを見出し、このピークがパリノマイシンで大きくなることなどからミトコンドリア由来と考えたのである。彼等の報告に少し遅れて Brooks and Willis (1983)²⁷⁾ もミトコンドリア由来と思われる Pi ピークを観察している。ただ彼等の場合その pH は 7.97 である。このように ^{31}P -NMR を用いれば細胞内の小さなコンパートメントの pH についての情報を入手する事も可能である。

3) イオン濃度測定

NMR は細胞内イオン濃度の測定にも利用可能であ

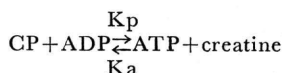
る。 ^{31}P -NMR を利用した心筋細胞内 Mg 濃度測定あるいは、シフト試薬を使用した ^{23}Na -NMR あるいは ^{39}K -NMR による Na あるいは K イオン濃度の測定、さらにはキレート試薬を使用した細胞内 Ca イオンの測定などが報告されている²⁸⁻³¹⁾が、これらの測定の心臓への応用はまさに始まったばかりである。Mg イオンは種々の酵素反応に必須の金属でありその細胞内濃度変化で代謝過程が調節されている可能性もあるので細胞内遊離 Mg の濃度測定は重要であるが ATP シグナルの化学シフトが Mg 濃度により変化する事を利用し、 ^{31}P -NMR により測定することが出来る。Wu ら³²⁾はラット灌流心を用いて、虚血により細胞内 Mg イオン濃度が変化するかどうかについて検討し、正常灌流時の非結合型の Mg イオン濃度は 2.5 mM であり、虚血によってもその値は変化しないと報告し、虚血時の代謝変化が Mg イオン濃度の変化による可能性を否定した。最近 Ingwall のグループ²⁸⁾から Dy (ジスプロシウム) をキレート試薬に結合させたシフト試薬を使用した心筋細胞内 Na イオン濃度の測定が報告されている。我々も最近同様の実験を行い虚血により細胞内 Na 濃度が上昇するのをみとめた。なお Ingwall らのデータでも我々のデータでも正常灌流心では細胞内 Na のシグナルが検出できていない。すなわち NMR 的に見える Na は検出限界以下であるという事になっているが、この点に関してさらに詳細な研究が必要であると思われる。

4) 代謝反応速度の測定

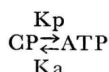
無傷の細胞あるいは in vivo の状態での酵素反応の

解析は NMR によって始めて可能となったといっても過言ではない。この方法は最初 ^1H -NMR による溶液系でのプロトンの交換速度測定に使用されたもので ^{31}P -NMR への適用は 1977 年 Brown and Ogawa¹⁵⁾ が酵母の adenylate kinase の反応速度の測定に応用した事をもって始めとする。次いで 1979 年 Nunnally and Hollis¹⁶⁾ により灌流心の CPK 反応への適用が行われた。CPK 反応を例にとってこの方法について少し述べてみたい。

CPK 反応は、



で表されるがリンの移動は CP の P と ATP の γ -P との間で起こっているのも簡単



と表してもよい。さて NMR では“緩和”という現象が原子核の状態を知るための良い情報源となるが、酵素反応による原子核の移動は緩和機構と原理的に同次元で考えられるので T_1 緩和の微分方程式に酵素反応の項を加えて

$$\frac{d\text{CP}_t}{dt} = (\text{CP}_t - \text{CP}_0)/T_{1cp} - \text{K}_p \text{CP} + \text{K}_a \text{ATP} \quad (5)$$

と表すことが出来る。ATP の γ -P の核スピンの存在数が等しくなるように、その部位の共鳴周波数で照射して NMR 的にピークの存在を消してしまうと (5) 式は

$$\frac{d\text{CP}_t}{dt} = \frac{(\text{CP}_t - \text{CP}_0)/T_{1cp} - \text{K}_p \text{CP}}{\quad} \quad (6)$$

となりこれを解くと

$$\text{CP}_t = \text{CP}_0 / (1 + \text{K}_p T_{1cp}) + \text{Cexp}[-(1/T_{1cp} + \text{K}_p)t]$$

となるので CP のシグナルは時定数 $1/\tau = 1/(T_{1cp} + \text{K}_p)$ で指数関数的に減少していく、この τ の中に反応定数 K_p が入っているのをこれを実験的に求めるわけである。

もう少し具体的に説明すると、(スピン数を等しくされ) NMR 的に見えなくなった ATP の γ -P が CPK により CP の P へ移されると ATP から移転した NMR 的に見えない P の量だけ CP のピーク強度は小さくなる。この減少の程度を測定して ATP から CP へのリンの移動速度を求めるわけである。逆に CP の P を照射して NMR 的にシグナルを消す事で CP から ATP へのリンの移動速度を求める事も出来る。さらにこの方法

に通常の ^{31}P -NMR を組合せ、ATP, CP の量の測定を行えば正味の移行量が求められることとなる。

先に述べたごとく飽和移動法の心筋代謝への応用は 1979 年 Nunnally and Hollis¹⁶⁾ により始めて報告された。彼等の研究の真の目的は心筋の ATP-CP 交換系が一つでは無いという事を証明する事であった。CPK がミトコンドリアにも存在し、細胞質の CPK と明確に区別出来ること、心筋のミトコンドリアに ^{31}P でラベルした ATP を添加しても CP には放射能が入らないこと、ミトコンドリアの CPK は CP が高濃度に存在していても、クレアチンのリン酸化を起こす事などから彼等は、心筋に CPK のコンパートメントが二つあることを想定し、それを証明するために正常灌流時と虚血後再灌流時の ATP-CP 交換反応に、 ^{31}P -NMR による飽和移動法を使用したのである。実験は、ウサギ灌流心を用い 25 mm の NMR 管を使用して行なわれている。彼等は正常灌流と虚血後再灌流時の CPK 反応の速度を求めその結果から、確かにコンパートメントが存在すると結論している。しかも彼等のデータは虚血後再灌流により ATP-CP のコンパートメントの一つが消えてしまうことを示唆している。これは非常に興味深い事実である。再灌流により心筋 CP は比較的良く回復するのに ATP の回復は悪い事がすでに多くのデータにより示されているが、彼らのデータはその機序を示したものと考えられる。Mathews ら³³⁾ は ATP 合成反応速度測定に飽和移動法を応用し ATP の γ -P を飽和させ P_i および CP から ATP γ -P への移動速度を測定し、無機リン (P_i) からの ATP 合成は $2.8 \mu\text{mol/sec}$ であるのに対し CP からのそれは $14.6 \mu\text{mol/sec}$ であるという結果を得て、灌流ラット心において CPK 反応は酵素反応として平衡状態に有ると推論している。最近 Kingsley-Hickman ら³⁴⁾ も灌流ラット心を使用し Mathews らと同様な研究を行い ATP 合成速度は $7.2 \mu\text{mol/sec}$ であったと報告している。両者の差は計算に用いた P_i の T_1 によっているが基本的な結論は同じである。

この様に飽和移動法を使用することにより平衡状態における反応速度の測定が組織レベルで可能となるので種々の代謝異常時の酵素反応速度に対する薬物作用の研究への応用が期待される。

V. 灌流心臓における ^{31}P -NMR 測定法

^{31}P -NMR の灌流心への応用には 2 種類の検出コイルが使用されている。即ちヘルムホルツ型 (サドル型) コイルとソレノイド型コイルとである。ソレノイド型のプ

Heart perfusion apparatus used for NMR measurement

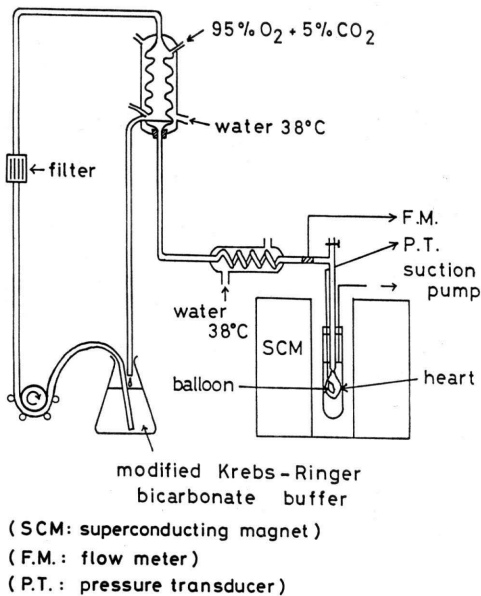


Fig. 3 Schematic illustration of experimental set-up of our NMR experiments.

ローブの方が検出感度が約3倍良いと言われているが³⁵⁾通常の NMR 機器に用いられているのはヘルムホルツ型のコイルであり、我々もヘルムホルツ型のプローブを使用し図3に示した様なシステムで実験を行なっている。心機能の測定のため、左房から左心室内へ生食を満たしたバルーンを挿入し、圧力トランスデューサーを介して左心室内圧を測定、冠流入量は、電磁流量計により測定している。高磁場の中でこれらの装置が正常に作動するかどうか不安であったが案ずるより産むがやすしの諺の通り何れも正常に作動することを確認した。Langendorff法ではなくいわゆる working model による実験も行なわれている³⁶⁾。灌流心の場合 s/n 比を向上させる為、大抵の実験は心臓を灌流液に浸した状態で行なわれている。

1) 正常心の代謝測定への ^{31}P -NMR の応用

Fossel ら³⁷⁾はラットの working model 灌流心を使用して、時間分解能を向上させるため NMR パルスを中心拍でトリガーして積算し (gated NMR) 心周期の中での CP, ATP 濃度の変化について研究を行ない ATP, CP 共に収縮期に低く拡張期に高くなることを報告している。この様に変化が繰り返し起る現象であれば gated NMR により見掛けの時間分解能を向上させる事が可能

である。さらに、同じ変化を繰返し起こす事が可能ならば、例えば短時間の虚血による代謝変化を知るため、虚血を繰返し起こして積算するという方法も s/n 比を向上させる為の手段として用いる事ができる²⁷⁾。

2) 病態時の心筋代謝への応用

虚血時に心筋細胞内 pH が低下することは早くから知られていたが³⁷⁾、これらは間接的な実験方法で得られた結果に基づくものであり、より直接的なしかも連続的な測定は NMR により始めてなされた。細胞内 pH は心筋の収縮性や代謝状態に多くの影響を与えるが、虚血による H^+ の由来については未だに明確になってはいない。1979年 Radda のグループ³⁸⁾は ^{31}P -NMR を利用し虚血による pH 低下について解析を行い、① glycogen を枯渇させると pH 低下が抑制されること、② 100 mM Hepes を加え灌流液の緩衝能を増加させて pH 低下を抑制すると虚血の間の ATP 等の低下が抑制され、再灌流した後の機能回復も良好である事を見出し pH の低下は lactate の蓄積によるものであり Hepes の保護効果は pH 低下による glycogenolysis の抑制が解除されるため ATP 合成が保持されて現われたものと考えている。

虚血による代謝障害及び再灌流による機能障害に対する薬物作用については (±)-propranolol の作用についての Pieper ら²⁰⁾の報告が最初である。さらに1981年 Nunnally and Bottomley¹⁰⁾はウサギ灌流心の虚血による代謝障害に対する verapamil の保護効果についてサーフェイスコイルを用いて評価している。彼等は前下行枝を結紮して作った虚血領域の ^{31}P -NMR シグナルをその領域に近接して置いた直径 8 mm のサーフェイスコイルを用いて連続的に記録しさらに心臓全体の ^{31}P -NMR シグナルも同時に記録している。サーフェイスコイルの検出感度が低く時間分解能が悪いため積算に25分を費しているが、心臓局所の ATP 等を測定出来るという事は大きな意味を持つと思われるし、global ischemia と regional ischemia では代謝面や機能面で差が有ると思われるので、さらに多くの研究が行なわれることを期待したい。このような虚血による心筋エネルギー代謝変化に対する薬物作用の研究への NMR の応用はカルシウム拮抗薬等を含め数多く報告されている^{11-14, 39, 40)}。我々は代謝変化と機能変化を同時に測定出来るという NMR の利点を利用して虚血による心筋代謝変化に対する薬物作用と虚血前の心機能に対する薬物作用との関連を検討し、虚血心筋保護の最も有効な手段は虚血前の心機能を抑制しておく事であるという結論を

得ている⁴¹⁾。最近 Lavanchy ら⁴²⁾は同様に NMR を用いて diltiazem の虚血心筋代謝に対する作用を検討し diltiazem が心筋代謝に対して直接的な作用を有する様に報告しているが、彼等のデータを見ると心筋抑制作用が明らかに発現しており diltiazem に代謝に対する直接作用があるという結論は首肯できない。いずれにせよ NMR は代謝変化を手軽に経時的に測定することが出来る上、心機能との同時測定も可能なのでスクリーニング的な使用も出来る便利な方法と言える。

以上紙面の都合で ¹³C あるいは ¹H などについては割愛させていただいたが、これらの核を使用した心筋代謝のさらに詳細な研究が期待される⁴³⁾。大口径マグネットあるいはプローブの改良などにより、丸ごとの動物あるいはヒトを対象とした研究の発展が期待される。

文 献

- 1) Brock, F., Hansen, W.W. and Packard, M.: *Phys. Rev.* **70**, 474 (1946)
- 2) Purcell, E.M., Torrey, H.C. and Pound, R.V.: *Phys. Rev.* **69**, 37 (1946)
- 3) Shaw, T.M. and Elsken, R.H.: *J. Chem. Phys.* **18**, 1113 (1950)
- 4) Odeblad, E. and Lindstrom, G.: *Acta Radiol.* **43**, 469 (1955)
- 5) Bratton, C.B., Hopkins, A.L. and Weinberg, J.W.: *Science* **147**, 738 (1965)
- 6) Moon, R.B. and Richards, J.H.: *J. Biol. Chem.* **248**, 7276 (1973)
- 7) Hoult, D.I., Busby, S.J.W., Gadian, D.G., Radda, G.K., Richards, R.E. and Seeley, P.J.: *Nature* **252**, 285 (1973)
- 8) Jacobus, W.E., Taylor, G.J., IV, Hollis, D.P. and Nunnally, R.L.: *Nature* **265**, 756 (1977)
- 9) Garlick, P.B., Radda, G.K., Seeley, P.J. and Chance, B.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **74**, 1256 (1977)
- 10) Nunnally, R.L. and Bottomley, P.A.: *Science* **211**, 177 (1981)
- 11) Nakazawa, M., Katano, Y., Imai, S., Matsushita, K. and Ohuchi, M.: *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **4**, 700 (1982)
- 12) Pernot, A.C., Ingwall, J.S., Menasche, P., Grousset, C., Bercot, M., Mollet, M., Piwnica, A. and Fossel, E.T.: *Ann. Thoracic Surg.* **32**, 536 (1981)
- 13) Flaherty, J.T., Weisfeldt, M.L., Bulkley, B.H., Gardner, T.J., Gott, V.L. and Jacobus, W.E.: *Circulation* **65**, 561 (1982)
- 14) Pernot, A.-C., Ingwall, J.S., Menasche, P., Grousset, C., Bercot, M. and Piwnica, A. and Fossel, E.T.: *Circulation* **67**, 1296 (1983)
- 15) Brown, T.R. and Ogawa, S.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **74**, 3627 (1977)
- 16) Nunnally, R.L. and Hollis, D.P.: *Biochemistry* **18**, 3642 (1979)
- 17) Tamatsu, H., Nakazawa, M., Imai, S. and Watari, H.: *Japan. J. Pharmacol.* **34**, 375 (1984)
- 18) Kohn, M.C., Achs, M.J. and Garfinkel, D.: *Am. J. Physiol.* **232**, R158 (1977)
- 19) Imai, S., Katano, Y., Shimamoto, N. and Sakai, K.: *In Ischemic Myocardium and Anti-anginal Drugs*, Edited by Winbury, M.M. and Abiko, Y., p. 185, Raven Press (1979)
- 20) Pieper, G.M., Todd, G.L., Wu, S.T., Salhany, J.M., Clayton, F.C. and Eliot, R.S.: *Cardiovasc. Res.* **14**, 646 (1980)
- 21) Salhany, J.M., Pieper, G.M., Wu, S., Todd, G.L., Clayton, F.C. and Eliot, R.R.: *J. Mol. Cell. Cardiol.* **11**, 601 (1979)
- 22) Hoerter, J.A., Miceli, M.V., Renlund, D.G., Jacobus, W.E., Gerstenblith, G. and Lakatta, E.G.: *Circ. Res.* **58**, 539 (1986)
- 23) Bailey, I.A., Williams, S.R., Radda, G.K. and Gadian, D.G.: *Biochem. J.* **196**, 171 (1981)
- 24) Brooks, W.M. and Willis, R.J.: *J. Mol. Cell. Cardiol.* **17**, 747 (1985)
- 25) Roberts, J.K.M., Wade-Jardetzky, N. and Jardetzky, O.: *Biochemistry* **20**, 5389 (1981)
- 26) Garlick, P.B., Brown, T.R., Sullivan, R.H. and Ugurbil, K.: *J. Mol. Cell. Cardiol.* **15**, 855 (1983)
- 27) Brooks, W.M. and Willis, R.J.: *J. Mol. Cell. Cardiol.* **15**, 495 (1983)
- 28) Pike, M.M., Frazer, J.C., Dedrick, D.F., Ingwall, J.S., Allen, P.O., Springer, C.S. Jr. and Smith, T.W.: *Biophys. J.* **48**, 159 (1985)
- 29) Gullans, S.R., Avison, M.J., Ogino, T., Giebisch, G. and Shulman, R.G.: *Am. J. Physiol.* **249**, F160 (1985)
- 30) Rayson, B.M. and Gupta, R.K.: *J. Biol. Chem.* **260**, 7276 (1985)
- 31) Adam, W.R., Koretsky, A.P. and Weiner, M.W.: *Biophys. J.* **51**, 265 (1987)
- 32) Wu, S.T., Pieper, G.M., Salhany, J.M. and Eliot, R.S.: *Biochemistry* **20**, 7399 (1981)
- 33) Mathews, P.M., Bland, J.L., Gadian, D.G. and Radda, G.K.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **103**, 1052 (1981)
- 34) Kingsley-Hickman, P., Sako, E.Y., Andreone, P.A., St. Cyr, J.A., Michurski, S., Foker, J.E., From, A.H.L., Pettein, M. and Ugurbil, K.: *FEBS Letter* **198**, 159 (1986)
- 35) Hoult, D.I. and Richards, R.E.: *J. Magn. Reson.* **24**, 71 (1976)
- 36) Fossel, E.T., Morgan, H.E. and Ingwall, J.S.:

- Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **77**, 3654 (1980)
- 37) Poole-Wilson, P.A.: J. Mol. Cell. Cardiol. **10**, 511 (1978)
- 38) Garlick, P.B., Radda, G.K. and Seeley, P.J.: Biochem. J. **184**, 547 (1979)
- 39) Pieper, G.M., Wu, S.T. and Salhany, J.M.: J. Mol. Cell. Cardiol. **17**, 775 (1985)
- 40) Dhasmana, J.P., Digerness, S.B., Geckle, J.M., Ng, T.C., Glickson, G. and Blackstone, E.H.: J. Cardiovasc. Pharmacol. **5**, 1040 (1983)
- 41) Nakazawa, M., Tamatsu, H., Tsuchihashi, H., Nagatomo, T. and Imai, S.: Japan. J. Pharmacol. **39**, 51 (1985)
- 42) Lavanchy, N., Martin, J. and Rossi, A.: J. Mol. Cell. Cardiol. **18**, 931 (1986)
- 43) ガーディアン, D.G.: NMR 生体系への応用, 今井昭一訳, 西村書店, 新潟 (1985)
- 44) Berne, R.M. and Rubio, R.: Circ. Res. **34** and **35**, Suppl. III, 109 (1974)
- 45) Kao, R.D., Rannels, D.E. and Morgan, H.E.: Circ. Res. **38**, Suppl. I, 124 (1976)
- 46) Neely, J.R., Rovetto, M.J., Whitmer, J.T. and Morgan, H.E.: Am. J. Physiol. **225**, 651 (1973)
- 47) Reibel, D.K. and Rovetto, M.J.: Am. J. Physiol. **234**, H620 (1978)
- 48) Kannengiesser, G.J., Opie, L.H. and Van der Werff, T.J.: J. Mol. Cell. Cardiol. **11**, 197 (1979)
- 49) Watts, J.A., Koch, C.D. and La Noue, K.F.: Am. J. Physiol. **238**, H909 (1980)

Abstract—Nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy and its application to biomedical research. Mikio NAKAZAWA and Shoichi IMAI (Department of Pharmacology, Niigata University School of Medicine, 757, Asahimachi-dori 1, Niigata 951, Japan). *Folia pharmacol. japon.* **92**, 1~9 (1988)

The principles of nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy were explained and its application to biomedical research discussed. With ^{31}P -NMR, it is feasible to conduct a continuous, non-invasive measurement of the contents of myocardial high-energy phosphate compounds and the intracellular pH (determined by monitoring the pH dependent shift of the inorganic phosphate peak relative to that of creatine phosphate), and to correlate them with the mechanical function. The determination of the free magnesium concentration is also possible on a similar principle to that for pH determination (the shift of MgATP peaks relative to ATP is utilized in this case). It is estimated to be 0.3 mM and was found not to be changed during ischemia. Several examples of studies including our own conducted to delineate the ischemic derangements of the myocardial energy metabolism and the effects of various interventions thereupon were illustrated. Finally a brief mention was made of the saturation transfer technique. This is the only method with which one can study the kinetics of the enzyme reactions under in vivo conditions. The application of the method for analysis of the creatine kinase reaction and the ATP synthesis was demonstrated.