論 説

in vivo NMR の耳鼻咽喉科領域における研究

村上 政隆・瀬尾 芳輝・亘 弘

Bioenergetics of Living Organs**Examined by in vivo Nuclear Magnetic Resonance****Masataka Murakami, Yoshiteru Seo and Hiroshi Watari**

(National Institute for Physiological Sciences)

The energy metabolism in living organs (salivary gland and inner ear) was studied by both conventional and topical ^{31}P -nuclear magnetic resonances (NMR and TMR) as non-invasive procedures. In isolated perfused salivary glands of the rat and dog, cessation of perfusion caused the tissue level of creatine phosphate (PCr) to decrease rapidly and that of ATP to decrease moderately. Restarting the perfusion caused PCr to recover rapidly with a time constant of 40 sec. Acetylcholine (ACh; 5×10^{-6} M) induced massive salivation and a simultaneous decrease of PCr. The removal of ACh resulted in a prompt recovery of PCr, with 45 sec of decay, to the resting value. During Na-free perfusion, even in the presence of ACh, only minimal salivation and no decrement of PCr were noted. The surface coil (1.3 cm in diameter) was set on the mandibular gland of the dog, in the magnet of TMR. The results of the gland in situ were similar to those of the perfused gland. The ^{31}P -TMR was also applied to the inner ear of the guinea pig. Resonances of PCr, ATP, ADP, inorganic phosphate and sugar phosphates were observed. Destruction of the inner ear caused these signals to disappear. By intravenous injection of furosemide did not change the resonances of PCr or ATP.

緒 言

核磁気共鳴 (NMR) 法の医学生理学への応用は近年急速に展開されたが、摘出組織における水分子の緩和時間の測定を主体に行われたものである。とくに腫瘍組織の緩和時間が長くなるという事実の発見がNMR法の医学への応用を急速に進展させた¹⁾²⁾³⁾。その測定対象は摘出組織から生きたままの動物というように広められてきた。さらに画像化の技術の導入によって生きたままの状態、しかも空間的に連続な情報が簡単に得られることから診断の新たな手法として脚光をあびるにいたった⁴⁾。

水分子の緩和時間は生理現象の物理的背景を反映しているとはいえ、生理機能的な面での情報が

欠如している。非破壊的に計測できる特徴を持つこの方法は、測定核種が ^{13}C , ^{23}Na , ^{31}P と広げられてきたが、とくに ^{23}Na , ^{31}P の自然存在比は100%であって、しかも生体内での含量が高いため応用の可能性が高かった。燐原子は骨や軟骨の構成成分であるし、また膜の構成成分である燐脂質の中にも含まれる。さらに生体には解糖の際に見られる各種の燐糖化合物や、さらにATP, ADP, AMP, NAD^+ , NADH, クレアチン燐酸など、エネルギー代謝に関与する燐化合物や無機燐酸がある。骨や軟骨を構成する燐酸カルシウムや燐脂質の燐原子は固体的挙動を示し、高分解能 ^{31}P -NMRの対象とならないが、高エネルギー燐化合物は運動性が高いので高分解能NMRの対象となる。しかしながら、NMRの専門家らは燐化合物の化学シフト異方性が大きいことから、高分解能 ^{31}P -NMRの生体に適用をあやぶみ、消極的であった。これの進展を計ったのは生物学者や医学者である⁵⁾⁶⁾。従って摘出組織、灌流臓器、さらには生きたままの動物においてエネルギー代謝燐化合物のNMRスペクトルを測定して、機能的な情報を求めるようになってきた。灌流や血流の再開にあたって、ATPの元のレベルへの復帰と、クレアチン燐酸の急速な回復、即ちエネルギー貯留が見出された。ローマン反応(ATP+クレアチン→ADP+クレアチン燐酸)によりエネルギー貯留が行なわれるが、これは生理機能の不応期の短縮あるいは不応期をなくするために必要な機能であり、この機構の解明は生理機能理解の基本的なものである。さらに現在核オーバーハウザー効果(NOE)を用いて組織あるいは臓器の生きたままの状態、細胞内に存在する燐化合物間の交換反応を検出し、さらに縦緩和時間に対する影響を求め、これらより心臓、唾液腺、脳、腎臓のエネルギー貯留機構の解明をすることが可能となった⁷⁾⁸⁾。

一方最近では高磁場化の発達と磁場口径の拡大化に伴って ^{31}P -NMRが組織あるいは器官のエネルギー代謝の *in vivo* 測定法として用いることが可能となってきた。生きた動物の局所のNMRスペクトルを選択的に測定することができる局所核磁気共鳴法(TMR, topical magnetic resonance)⁹⁾¹⁰⁾が開発され、動物はもちろん人間の筋肉中に含まれるATP, ADP, クレアチン燐酸などのエネルギー代謝産物の測定が行なわれるようになった。またこの方法から局所磁場を排除した表面コイルNMR(surface coil-NMR)が開発された¹¹⁾。

NMRの進歩は目覚ましく、画像化の試みがなされてから10年足らずで診断の有力な手段となりつつある。現在得られているNMR画像は、生体中の水の量、その縦緩和時間(T_1)および横緩和時間(T_2)、あるいはこれらの混じり合った情報の空間的分布であって、主として構造的情報を提供している。しかし水の量および緩和時間の分布は生体中での種々の生化学的および生理学的反応の結果であり、従って間接的に機能的情報の空間的分布を提供しているともいえる。特にNMR映像法では任意の方向の断面における画像を求めることができるという利点を持っている為、診断的価値は高い。

しかし生体には水分子以外にプロトンを含む分子が大量に存在するに拘らず、何故水分子の画像にのみ執着しなければならないのかという疑問がある。これに応えるに化学シフト・イメージング法¹²⁾¹³⁾を用いる事により、水分子以外のプロトンを含む分子、例えば脂肪分子を除外した画像作成は可能であるし、また脂肪分子の画像を作ることができる。さらにプロトン以外の核スピンを含む分子の画像化も可能である。例えば、個々のエネルギー代謝燐化合物の画像が別々に求められ、生きたままでの機能的情報が得られる事になる。

NMRのもたらす情報

①共鳴周波数

NMRは核スピンをもつ原子の分光測光の一種であるが、使用する波長が電波領域である点が、普通の吸収スペクトルと異なる。この原理は

$$\omega_0 = \gamma H_0 \cdots \cdots \cdots (1)$$

という共鳴条件に基礎をおいている。ここに ω_0 は核スピン ($\frac{1}{2}$ の整数倍)の共鳴周波数(ラーモア周波数あるいは歳差運動周波数)で、静磁場 H_0 に比例する。この比例定数 γ は核の種類によって決まり、磁気回転比と呼んでいる。静磁場に84.5キログauss (8.45テスラーあるいはT)の超伝導磁石を用いたとき、 ω_0 は ^1H で360MHz、 ^{31}P は145.728MHz、 ^{23}Na は95.24MHz、 ^{13}C は90.544MHz、 ^{43}Ca は24.225MHzのように、核種によって γ は異なっており、周波数領域が大きく異なっている。従って、 ^1H を観測する場合には他種の核は検出されない。

ここで、つぎのことに注意したい。 ω_0 に $2\pi h$ (h : プランク定数)を乗じるとエネルギーの単位となるから、周波数によってもエネルギー

を表していることになる。共鳴周波数をゼーマン・エネルギーと呼ぶ。

②緩和定数

測定に当ってはラーモア周波数を持つ短時間のパルス (H_1) を静磁場 H_0 に直角に試料に作用させる。これの応答として、観測用コイルには自由誘導減衰 (free induction decay, FID) と呼ばれる電流が流れる。これは時間領域でのスペクトルであり、これをフーリエ変換して、周波数領域でのスペクトルを得ることができる。このようにしてスペクトルを得る方法をパルスFT-NMRという。これに対して静磁場を変化させてスペクトルを求める方法が continuous wave NMR (CW-NMR) である。当然、周波数領域のスペクトルは逆フーリエ変換して、時間領域のスペクトルに変換する事が可能であり、時間領域と周波数領域とをむすびつけるのがフーリエ変換であるといえる。複数種類の核のある場合それぞれのラーモア周波数で減衰し、これらの合成したものがFIDとなる。

表1. 生体に関係する核の異なった種々の磁場における共鳴周波数。

NUCLEUS	SPIN	ABUND.	Ho=2.3T	Ho=3.5T	Ho=4.7T	Ho=7.05T	Ho=8.45T
H—1	1/2	99.985	100.038	150.057	200.068	300.060	360.060
H—2	1	0.015	15.356	23.034	30.711	46.060	55.270
Li—7	3/2	92.58	38.877	58.316	77.749	116.610	139.928
C—13	1/2	1.108	25.157	37.735	50.311	75.456	90.544
N—14	1	99.63	7.227	10.840	14.452	21.676	26.010
F—19	1/2	100	94.113	141.169	188.217	282.287	338.733
Na—23	3/2	100	26.461	39.692	52.920	79.370	95.241
P—31	1/2	100	40.496	60.744	80.987	121.466	145.754
Cl—35	3/2	75.53	9.802	14.703	19.603	29.401	35.280
K—39	3/2	93.10	4.668	7.002	9.336	14.002	16.802
Ca—43	-7/2	0.145	6.731	10.096	13.461	20.189	24.225

生体での測定対象となる核のスピン数 ($\frac{1}{2}$ の整数倍)、自然存在比 (natural abundance) およびこれらの核の異なった静磁場 H_0 における共鳴周波数を示してある。

励起パルス (H_1) を照射した後は、核スピ
ン系は 2 つの緩和過程によって平衡状態に戻ろ
うとする。これらは 2 つの時定数、縦緩和時間
あるいはスピナー格子緩和時間 (T_1) と横緩
和時間あるいはスピンスピン緩和時間 (T_2)
によって特徴づけられる。この時定数とは信号
が減衰して $1/e$ (約 37%) になるのに必要な時
間であり、一般に $T_1 \geq T_2$ である。ラーモア
周波数で Z 軸のまわりに回転する回転座標系
($X'Y'Z$ と表示) をもちいると、 T_1 とは X'
- Y' 平面よりの Z 軸への磁化ベクトルの戻り
を示すことになる。また $X'-Y'$ 平面上で観測
すると、個々の核の持つ磁化ベクトルの進行速

度が異なり、互いに位相がずれる (dephase)
様になり、このばらつきの度合が横緩和 (T_2)
の本態である。しかし実際には横緩和時間の逆
数に静磁場 H_0 の不均一 (ΔH) の項が加えら
れ、見掛け上の $T_2^* (1/T_2^* = 1/T_2 + \gamma \Delta H/2)$
によって緩和することになる。このように F I
D は T_2^* の緩和定数によって減衰されるので、
F I D の緩和がおそい程フーリエ変換後の線幅
が狭く、磁場の均一度がよいことを示す。

核と格子 (核を取巻く環境) との相互作用が
大きければ縦緩和時間は短縮し、またスピ
ン間の相互作用が増せば横緩和時間は短縮する。
したがって縦緩和時間と横緩和時間の測定から、

図 1. ATP 溶液の時間領域スペクトル (F I D) .

ATP 50mM 溶液に pH 7 の磷酸緩衝液 (50mM) を加えて、F I D を 0.63 秒間にわたって測定した。

図 2. 緩和の様相。ラーモア周波数で Z 軸のまわりに回転する回転座標系 ($X'Y'Z$) で表示してある。
(a): 縦緩和 (T_1) (b): 横緩和 (T_2)

分子の運動性に関する情報を提供するし、また分子内の個々の原子の運動性に関する情報を提供する (図4 参照)。

③化学シフト (周波数領域)

測定する核においては、原子核自身の電子密度の大きさ、隣接原子の磁気異方性、環状化合物における環電流や他原子の電荷の影響によって静磁場 H_0 をあたえても測定核における実際の磁場 H_{loc} は

$$H_{loc} = H_0 (1 - \sigma) \dots\dots\dots (2)$$

のように小さくなる。ここに σ を遮蔽定数といって ppm で表わす。 σ は磁場の方向によって変化し、テンソル量であるが、核の運動が早い場合、平均化して観測される。この様に核におけるエネルギー的にどんな小さな変化も歳差運動周波数に変化をもたらし、これを化学シフトと言っている。一般には σ は 100ppm 以内にあり、 1H -NMR ではせいぜい 20ppm で 360MHz の装置を用いたときには H_0 σ は 10KHz の範囲にある。従って化学シフトの大きさはゼーマン・

エネルギーの一万分の一以下であるといえる。化学シフトは磁場の大きさに依存するので、高い静磁場を用いた NMR 装置の利用によって異なった状態にある核の信号を高分解能で分離させることができ、解析が容易となる。

④スピンスピン相互作用

測定する核の周辺に同種あるいは他種の核スピをもつ原子が存在し、共有結合しているとき、対象としている原子と他の原子との間には磁気相互作用 (スピンスピン相互作用) によりその吸収線は 2 本の吸収線に解裂する。cis 型の $H-C=CH$ における相互作用のエネルギーは 6~8 Hz であるのに対し、trans 型の $H-C=CH$ では 17~18Hz と大きい値を示す。このことは、NMR が化学構造解析に有益な情報を提供してくれることを意味している。磷の場合に例をとると、図4に示すように、 $[\gamma-P]$ ATP の磷原子は β 位の磷原子の影響を受け、 $[\alpha-P]$ ATP は β 位の磷原子の影響を受け、さらに $[\beta-P]$ ATP は α 位と γ 位の二つの

図3. ATPの周波数領域スペクトル。

図1のFIDをフーリエ変換して周波数領域スペクトルを求めた。信号は左より磷酸、 $[\gamma-P]$ ATP、 $[\alpha-P]$ ATPおよび $[\beta-P]$ ATPの信号を示す。

磷原子の影響を受ける結果、吸収線は各々 2 本、2 本および 3 本に解裂する。このスピンスピン相互作用の大きさは図 4 に見られるように、20Hz 程度であり、化学シフトのエネルギーに比して数十分の一程度である。また〔 γ -P〕ATP の吸収幅は〔 α -P〕ATP のそれに比し狭いことが見られるが、同一分子内でも核の運動性が異なっている事を示している。このスピンスピン相互作用は静磁場 H_0 の大きさには関係しない。

^1H の自然存在比が 99.985% であるので、一般に多くの ^1H を含む分子では、分子内の ^1H 間での相互作用が多岐にわたって存在し、かつ化学シフトとあいまって複雑なスペクトルを示す。これに対し、 ^{13}C の自然存在比は 1.108% と低く測定感度の点では ^{13}C -NMR は不利であるが、 ^{13}C の原子が隣り合って結合する確率は $(0.01108)^2$ と低くなり、単純なスペクトルとなって解析が有利である。

⑤ 速い化学交換速度

二つの核が化学的に交換している場合で、両

者の交換速度が測定する周波数より速い時には、別々の吸収として観測されず、1 本の吸収となってしまう。例えば第一磷酸イオン (H_2PO_4^-) と第二磷酸イオン (HPO_4^{2-}) はある pH では解離平衡が存在する。これらにおける磷原子は化学シフトが異なり、それぞれ ν_1 と ν_2 に共鳴周波数をもつ。プロトンの交換が非常に速いため、両者は別々の信号として観測されず、1 本の信号として観測される。測定される共鳴周波数を ν_m とすると

$$\nu_m = (\nu_1 \cdot m_1 + \nu_2 \cdot m_2) / (m_1 + m_2) \cdots (3)$$

で表される。ここに m_1 および m_2 はそれぞれの H_2PO_4^- と HPO_4^{2-} の濃度である。

一方、 H_2PO_4^- と HPO_4^{2-} との間の解離平衡は Henderson-Hasselbalch の式により表され

$$\text{pH} = \text{pK}_2' + \log(m_1/m_2) \cdots (4)$$

の関係がある。ここに pK_2' は磷酸の第 2 段の見掛けの解離定数である。化学シフト ν_m と pH の関係は式(3)と(4)より

$$\text{pH} = \text{pK}_2' + \log \left(\frac{\nu_2 - \nu_m}{\nu_m - \nu_1} \right) \cdots (5)$$

図 4. ATP の周波数領域スペクトル。

図 3 の無機磷との ATP の三つの信号を拡大した。信号は左より磷酸、〔 γ -P〕ATP、〔 α -P〕ATP および 〔 β -P〕ATP の信号を示す。

となる。したがって ν_1 と ν_2 および pK_2' が与えられ、化学シフト ν_m が求められれば、pHの測定が可能となる。この結果を図5に示す。生体組織のpH測定は色素を用いる方法や、微小ガラスpH電極を挿入する方法があるが、手技的に非常に困難である。 ^{31}P -NMRを用いた場合、組織全体のグローバルな測定であるが、非破壊的である点特徴がある¹⁴⁾¹⁵⁾。

⑥化学反応速度

核オーバーハウザー効果 (nuclear Overhauser effect, NOE, 飽和移動法)⁷⁾⁸⁾を利用すると、測定する周波数より遅い化学反応速度をもとめることができる。例えば、カエル縫工筋中の〔 r -P〕ATPとクレアチン磷酸とはクレアチン・キナーゼを介するローマン反応により化学交換している。

反応は平衡状態にあるので、〔Cr〕と〔PCr〕および〔ATP〕と〔ADP〕をあらかじめ求めておく。それぞれの速度を k_1 と k_2 とすると、〔ADP〕および〔Cr〕が一定であるとして、フラックスを $K_1(=k_1[\text{ADP}])$ および $K_2(=k_2[\text{Cr}])$ とする。PCrの磷原子をAと

し、〔 r -P〕ATPをBとし、Aの縦緩和時間を T_{1A} とし、Bのそれを T_{1B} と書くとき、これらの磁化の振舞いは図6にて示され、次のブロホの方程式にて記述される。ここに A_0 と B_0 は時間零の時のAおよびBの濃度である。

$$\frac{dA}{dt} = -\frac{A - A_0}{T_{1A}} - K_1A + K_2B \cdots \cdots (6)$$

$$\frac{dB}{dt} = -\frac{B - B_0}{T_{1B}} + K_1A - K_2B \cdots \cdots (7)$$

飽和移動法を用いることにより交換反応の化学的緩和時間およびフラックスを求めることができる。すなわちまずAからBが生成される反応、つまりPCrからATPが生成される反応(正反応)をみるには、〔 r -P〕ATPの信号を選択的に照射し、その磁化を飽和させるようにする。この操作は図7に見られるようにBの濃度を零としたことに相当し、式(6)はつぎのようになる。

$$\frac{dA}{dt} = -\frac{A - A_0}{T_{1A}} - K_1A \cdots \cdots (8)$$

飽和移動の時間(τ_{1A})を延長して行くと共にクレアチン磷酸の信号(A τ)が減少してゆくが、この減衰($1/\tau_{1A}$)は縦緩和時間の逆数($1/T_{1A}$)および化学的緩和時間(K_1)との

図5. 化学シフトとpHとの関係。

種々のpHの磷酸緩衝液(0.01M)にKCl(0.15M)を加えた溶液の化学シフトを室温にて測定したものをプロットした。実線は式(5)を使用し、 ν_1 と ν_2 とはそれぞれ-3.23ppmおよび-5.73ppm、および pK_2' 6.79として計算した。

図 6. 化学反応のある場合の緩和.

図 7. 飽和移動法を適用したときの緩和.

和となっている. したがって T_{1A} の正確な測定により, フラックス $K_1 A$ が計算される. また充分飽和したのちの信号強度 A_∞ と平衡磁化 A_τ との比は τ_{1A} を T_{1A} で除したものとなっている. また逆に B から A への反応, ATP から P

Cr が生成される反応 (逆反応) をみるには, P Cr の信号を選択的に照射し, その磁化を飽和させるようにして, τ_{1B} を求めてフラックス K_{2B} が求まる.

実 験 装 置

① 高分解能 NMR 装置

静磁場 H_0 を作るには常伝導磁石, 永久磁石や超伝導磁石が用いられるが, 磁場の均一度の良いものを選ばねばならない. 測定感度は観測周波数に比例するので, 磁場の大きいことが要求されるが, 常伝導磁石や永久磁石は 2.3 T 以上にはできないため, 磁場安定性の良い超伝導磁石が選定される. しかし超伝導磁石の超伝導状態を維持するために 4°K に保つ必要があり, とくに人体用の NMR—CT の超伝導磁石には液体ヘリウムの蒸発量が数百リットル/月に及ぶものがあり, 保守や維持費の面で問題がある. しかしほとんどのメーカーは液体ヘリウム回収装置の開発に全力をつくしているので, 保守の問題も早急に解決されることと思われる. 従来は静磁場を変化させてスペクトルを求めるいわゆる continuous wave NMR (CW-NMR) が用いられたが, 現在ではパルス FT—NMR の方式に置き換ってしまった. この理由は測定時間が約十分の一に短縮されたからであ

る. 測定に当たっては, パルス H_1 の強さと形状 (パワーと位相) の厳密性が強く要求される.

② 磁場焦点法

TMR (topical magnetic resonance) 装置は磁場口径の大きい横置型超伝導磁石を使用する¹⁰⁾. 図 8 に示すように本装置では静磁場 (H_0) の中心部に磁場磁場焦点コイル (profile coil) を置き, 空間的にはほぼ球状の焦点 (局所) 磁場 ($H_0 + \Delta H_s$) を形成させて, 信号選択領域 (sensitive volume) を形成させる. したがって共鳴周波数は式(1)の関係から ω_0 でなく $\omega_0 + \Delta\omega_s$ となる. 焦点磁場の直径を変えるために磁場焦点コイルに流す電流を変えられる様になっている. RF パルスの送信および信号の受信は表面コイル (図 8 では surface coil) にて行う. このコイルにより被測定領域 (detective area) が作られる. これら二つの領域の設定によって測定部位を限局する訳である.

図 8. 局所磁場NMR (TMR) の原理図.

超伝導磁石の中心部に焦点磁場コイル (profile coil) により信号選択領域 (網目の球) を形成させて、焦点磁場 ($H_0 + \Delta H_s$) をつくる。焦点磁場の形状はほぼ球状で直径を4.0cmから1.5cm迄変えるため、焦点磁場コイルに流す電流を0から20Aまで変える。この領域をモルモット内耳の部位に一致させる。表面コイル (surface coil) で被測定領域 (波線の部分) からNMR信号の検出を行う。

③表面コイルNMR (surface coil-NMR) 法

この方法は局所磁場NMR (TMR) から磁場焦点コイルを除き、ソレノイド・コイルの替わりに、比較的直径の大きい表面コイルを用いたものと考えてよい¹¹⁾。構造的にはTMRより簡単となるので、体表面より浅い部分の局部

的なNMR情報を取るのに将来よく利用されるであろう。また表面コイルを用いたNMRイメージングも開発されている。表面コイルとともに反射板を利用して利得を稼ぐ等の方法で、内耳など体表面より浅い部位で、しかも解像度をあげた画像をとるのにも利用されるものと思われる。

唾液腺におけるエネルギー貯留の研究

外分泌腺は、その分泌過程において酸素消費速度が著しく上昇し、熱産生も増加して、エネルギー代謝が活発になることが知られている。ここで消費されるエネルギー (酸素、ブドウ糖等) はそのエネルギー形態を様々な形に変え、

物質輸送に供給されると予想される。さらに、分泌圧と分泌速度の関係を調べてみると、このエネルギーのうち分泌仕事として外界にする仕事はごくわずかで、 Na^+ 等電解質の輸送に供されるエネルギー流がかなりあると予想される。

図9. 摘出灌流犬顎下線における ^{31}P -NMRスペクトル測定概念図.

ことに輸送機構とエネルギー供給機構の接点には、ATPの加水分解により駆動されるNa/K ATP-Paseが存在しており、種々の分泌条件下でNa/K ATPaseと腺の高エネルギー磷酸化合物(ATP, クレアチン磷酸等)の働きを知ることが重要となる。

外分泌腺のモデル臓器としてイヌ顎下腺をKrebs Henseleit Ringerで血管灌流し、これに ^{31}P 核磁気共鳴法を適用し、灌流停止による ^{31}P 化合物の変動や、アセチルコリン刺激時の分泌量とATP、およびクレアチン磷酸の組織レベルを経時的に測定した¹⁶⁾。実験装置を図9に示す。

図10に摘出灌流した犬顎下線の ^{31}P -NMRスペクトルを5分ごとに測定したものを示すが、ここで注意すべきことは、図3に示されたATPの三つの ^{31}P 原子の化学シフトとは異なることである。これは生体内では Mg^{++} イオンとATPの ^{31}P 原子とが結合している結果、この様に変化したものである。図11に結果をまとめた

が、灌流停止によりATP、クレアチン磷酸の減少、ADP、Piの増加のように ^{31}P 化合物の変動を示している。灌流の再開により各 ^{31}P 化合物のレベルは元に戻る。

これらのデータより、クレアチン磷酸を基準とした無機磷酸の化学シフトを求め、図5を用いて細胞内pHを同定した。これからわかるように灌流停止による酸素欠乏によりpHが0.5pHユニットも低下することが明らかになった。

灌流液に $5 \times 10^{-6}\text{M}$ のアセチルコリン(Ach)を加えると、腺から著明な唾液分泌が観察できる。この様な分泌状態にある腺ではATP、クレアチン磷酸の減少とpHの低下、ADP、Piの増加が観察された。灌流液からアセチルコリンを除去すると、唾液分泌は停止し、各 ^{31}P 化合物のレベルは元に戻る。この様にアセチルコリンによる分泌刺激はATP、PCrの消費とADP、Piの産生を促進し、エネルギー代謝が昂進するものであることが示された。

さらに ^{31}P -TMR法により in situ 状態で

図10. 摘出灌流犬顎下腺虚血時における ^{31}P -NMRスペクトル測定.

正常血流条件下のイヌ唾液腺の燐化合物の動態を調べた結果、人工的に灌流した唾液腺と同様の結果が得られ灌流条件が適切であることが示された。灌流液の Na^+ を完全に Li^+ で置換すると、アセチルコリン刺激をしても少量の唾液が一過性に分泌するのみで、腺組織のATP、PCrは変化しない。ATP、PCrレベルが減

少しないことは細胞外に Na^+ のない条件下ではアセチルコリンによる刺激もエネルギー代謝を昂進しないことを示すもので興味深い⁽¹⁷⁾⁽¹⁸⁾。 Na^+ を含む灌流液に戻すと刺激がないにもかかわらず、僅かな分泌とATP、PCrレベルの減少がみられた。これらの結果は、NaClおよび水の輸送を主たる機能とする唾液腺上皮膜

図11. 灌流停止による犬顎下線内燐化合物の変動.

組織における燐代謝にとって Na^+ は必須のイオンであり, Na^+ を完全に Li^+ で置換するとATP, PCrの消費は抑制されることを示し, 分泌機構の解明に役立つ情報となる.

灌流イヌ顎下腺を材料にした場合, 1)腺が大きく, 30mm径の試料管を用いねばならず, 2)腺

の大きさや血管構築に個体差があり, 3)手術に時間がかかる等の欠点があった. 最近, ラット顎下腺 (0.15~0.2g) を灌流しつつ10mm径の試料管を用い ^{31}P -NMRの測定が可能となった. この結果, 1)腺の個体差が少なく, 2)手術時間が短縮し, 3)10mmの試料管内での灌流

図12. 犬顎下腺の ^{31}P -NMR スペクトルからもとめたpH変化.

図13. 灌流ラット顎下腺の ^{31}P -NMR スペクトル.

のため磁場の均一度が良くなって図13に示す様に, 分解能が向上し, 4) ^{31}P のみならず, これ以外の核種 ^1H , ^7Li , ^{13}C , ^{23}Na , ^{35}Cl 等の測定ができ, 5)飽和移動の実験が可能となる, 等の利点を得られた。

しかし腺が小さいので分泌量が少なく, 超伝導磁石の外部に唾液を導出しての分泌量同時測定ができない欠点がある。腺は HEPES で pH 7.4にした Krebs 液で 2 ml/ 分の流速で灌流

し, イヌ顎下腺と同様の燐化合物 (糖燐化合物, 無機燐 P_i , クレアチン燐酸, ATP等)の吸収を同定した。灌流停止により, クレアチン燐酸, ATP, 減少, P_i 増加が観測され, これは灌流再開で元のレベルに回復した。 10^{-6}M アセチルコリン 刺激では クレアチン燐酸が減少, P_i が増加したが ATP は僅かな減少にとどまった。

NMRによる内耳燐代謝の研究

内耳における代謝の研究はこれまで内耳の解剖学的環境, あるいは量的な制約よりもっぱら形態学的なアプローチ, または生理実験より得られたデータからの間接的な類推などが主に行なわれてきた。肥塚らとともに TMR 法を用い, ^{31}P -NMRによりモルモット内耳のクレアチン燐酸, ATPなどの高エネルギー燐化合物の測定を行い, NMR法の内耳代謝研究への応用の可能性について検討を行った¹⁹⁾。プライエール反射正常の体重300g~400gのモルモット11匹について実験を行った。モルモットをネンブタール 30mg/kg 腹腔内投与麻酔して, 側頭骨削開を行い蝸牛を露出後, 図7のように, 直径 8mm 4 ターンのソレノイドコイルを挿入しマグネットボア内に固定した。パルス幅は18 μs , パルス間隔は 0.5秒, スキャン回数は 2048回にて測定を行った。測定は正常コントロール群2匹, 内耳破壊群2匹, 頸静脈留置カテーテルよりフロセマイド (60mg/kg) を60分間の間隔をあけて2回投与した群7匹について行った。

これらの結果, ①正常コントロール群については図14(a)に示すように, クレアチン燐酸のシグナルの化学シフトを0ppmとして, 2.5ppm付近に $[\gamma\text{-P}] \text{ATP}$ と $[\beta\text{-P}] \text{ADP}$, 8.0ppm 付近に $[\alpha\text{-P}] \text{ATP}$ と $[\alpha\text{-P}] \text{ADP}$, 16.5ppm 付近に $[\beta\text{-P}] \text{ATP}$ のシグナルが良好に観察された。②内耳破壊群では図14(b)に示すように, 正常コントロール群で観察された各種高エネルギー燐代謝物のシグナルは消

失し, 脳, 周辺の筋組織に由来すると思われるバックノイズのみが残存して認められた。

また③フロセマイド投与群では1回投与時は ATP由来のシグナルに顕著な変化は認められなかったが, 2回投与後は ATPシグナルの増加傾向が認められた。しかし, この増加は投与前に比し, 統計学的な有意差は認められなかった。④これまで内耳における代謝研究の多くはその量的な, あるいは解剖学的な制約より, *in vivo* はもちろんのこと, *in vitro* においても形態学的手法に頼らざるを得なかった。

内耳においては内リンパ液, および外リンパ液の特異な組成の維持には Na-K ポンプの存在が大きく関与していることは古くから知られており, 様々なアプローチにより ATPクレアチン燐酸, などの測定が行われてきた。NMR法による測定でもこれらに由来するシグナルが良好に観察された。また, これらのシグナルは内耳破壊により消失し, 本方法でもこれらエネルギー燐化合物の存在が再確認された。なお, ADPおよびAMPについては, これらに由来するシグナルは $[\gamma\text{-P}] \text{ATP}$, $[\alpha\text{-P}] \text{ATP}$ および糖燐酸に重複して出現する事, また分解能の問題により確認されなかった。フロセマイド投与群では, ATPレベルの有意な変化は認められなかった。フロセマイドは腎ヘンレ係蹄上行脚における Na の化学ポテンシャルを利用した C1 の二次性能動輸送担体を阻害することが, その利尿機序と考えられて

図14. 内耳のTMRスペクトル.

(a): 正常コントロール群 (I): 無機磷, (II): クレアチン磷酸, (III): γ -P ATP, (IV): α -P ATP, (V): β -P ATP, (b): 内耳破壊群

いる. Naの化学ポテンシャルはNa-K-ATPaseによって維持されており, Naの化学ポテンシャル利用系が阻害されることは, Na-K-ATPaseにおけるATPの利用の低下を意味する. つまりエネルギー代謝の内エネルギー利用系が障害される事により, フロセמיד投与後でもATPクレアチン磷酸の量は変わらないとされている. 我々の実験に於いてもフロセマイ

ド投与後, ATPの変動が見られなかったのはこれを支持するものと思われる. しかし, フロセמידの耳毒性の機序についてはエネルギー産生系を障害し, その障害部位はGAPDH (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) とする説もあり, 今後の検討が必要と思われる.

脳におけるエネルギー貯留の研究

動物を生かしたまま、局所のエネルギー代謝を測定できる *in vivo* ^{31}P -NMR を用いて実験的脳虚血の代謝動態を成瀬らとともに研究した^{20) 21) 22) 23)}。脳虚血モデルは体重約80 gの25尾の Mongolian gerbil を用い、pentobarbital 35 mg/kg 腹腔内投与またはエーテル麻酔下に、右総頸動脈を露出し、その周囲に外科用結紮糸を回してかけた。この糸を結紮する前後(虚血前・後)および、結紮した糸を再び解いた後(再開通後)の脳内エネルギー代謝変化を連続的に *in vivo* ^{31}P -NMR で測定した。なお、虚血時間を30分間～6時間まで種々に変化させて、観察を行った。実験中、右総頸動脈結紮後 *in vivo* ^{31}P -NMR 測定中に死亡したものが6尾あり、結紮しても ^{31}P -NMR に変化のなかったものが11尾あった。残りの8尾に、結紮後 ^{31}P -NMR スペクトル変化が認めている。すなわち、総頸動脈を結紮すると、ATP、クレアチン磷酸(PCr)の吸収が低下し、Piの吸収の増大と高磁場側へのシフトが認められた。

しかし、それらの変化の程度および時間的経過は個体によりばらつきがあり、結紮直後から ATP, PCr のピークは消失し、Pi のピークのみになるものもあれば、一過性に ATP, PCr の低下と Pi の増大を示し、その後正常のスペクトルに戻るものなど、種々であった。虚血にて Pi のみのスペクトルを示していても、再開通を行うと、全例で1時間以内に ATP, PCr は回復し、Pi は減少し元のスペクトルパターンに戻った。このスペクトル回復は、虚血時間が6時間に及ぶ例でも、認められた。これはウイスターラットの4動脈結紮による脳虚血モデルによる再開通後の ^{31}P -NMR スペクトル変化とは異なった所見を呈している。この相違は、虚血中のわずかな側副血行路の多少の差に起因すると考えられた。脳虚血状態ではエネルギー代謝の回復が可能となる臨界の血液量の存在が考えられる。今後、血流量とエネルギー代謝との関連について、より詳細な *in vivo* の検討が必要となろう。

NOEを用いた複合反応系における反応経路検索の手法

—ローマン反応とミオキナーゼ反応の検討—

生化学的に知られているローマン反応は生体内部においても同じ物理定数を持つのは当然であるが、生理的状态によってどのように影響を受けるのかを検索する。このため図6に示したように飽和移動法を利用する。以前報告の方法でカエル縫工筋をもちい口径15mmの試料管内に設置し、リンガー液を外部灌流し ^{31}P -NMR スペクトルを測定した²⁴⁾。〔 γ -P〕ATP とクレアチン磷酸の磷とはクレアチン・キナーゼを介して互いに化学交換しており静止筋においてはクレアチン磷酸は24mmol/kg、ATPは5mmol/kgであった。クレアチン磷酸からATPが生成される反応(正反応)をみるには、〔 γ -P〕ATPの信号を選択的に照射し、その磁

化を飽和する。4個の筋について求めた τ は2.9で、飽和時の信号強度比は 0.66 ± 0.05 であった。逆の場合、すなわちATPからクレアチン磷酸が生成される反応(逆反応)では、クレアチン磷酸の磷の信号を選択的に照射し〔 γ -P〕ATPの信号の減衰を測定すると、 τ は1.0で飽和時の信号強度比は 0.48 ± 0.12 となった。以上の結果より、〔 γ -P〕ATPとクレアチン磷酸の磷の正確な縦緩和時間と化学的緩和時間を求めてフラックスを計算すると正および逆反応ではそれぞれ2.8および2.6mmol/sec/kgであった。もし、ミオキナーゼ反応(2ADP→ATP+AMP)において〔 β -P〕ADPと、〔 α -P〕ATPとの間に化学交換反応がおこ

っているとすると、ATPはローマン反応とミオキナーゼ反応の各々に平衡しているコンパートメントが存在することになる。このような場合ローマン反応の正、逆反応のフラックスを測定すると、正反応のフラックスは正しく求まるが、逆反応のフラックスは実際よりも小さく測

定される。ローマン反応のフラックス測定の結果は測定誤差範囲内ではほぼ平衡状態にあるといえる。なお〔 β -P〕ADPと〔 γ -P〕ATPの化学シフト値は極めて近く、飽和移動NMR法による測定は困難である。

化学シフト・イメージング

NMRイメージングは一種類の核について空間的分布を画像化するものである。種類の異なるスピンのどのような部位に、どのような状態でかつどのような濃度で分布しているかの情報を知ることは、生体のように空間的に不均一な系の研究においては不可欠である。最近多次元フーリエ変換NMR法を応用してスピンの位置情報と化学シフトの情報を同時に測定するという新しい方法（化学シフト・イメージング）が提案されている¹¹⁾。この方法は、互いに重畳する磁場勾配を印加することによりスピンに位置情報を phase-encoding した後、均一な静磁場のもとでFID信号を観測するものであり、多次元フーリエ変換NMR法の常として長大な測定時間を要するという欠点を持っている。そこで、この長大な測定時間の短縮化を目的として、磁場勾配を周期的に反転させることにより生ずるマルチプルエコー信号を用いた化学シフト・イメージングが試みられている¹³⁾。この方法によれば、多次元フーリエ変換NMRを用いた測定法にくらべ、1次元分の測定回数を節約することができるため、高速で化学シフト・イメージングが可能となる非常に賢明な方法である。

一般に2種の情報を表わすハミルトニアンを各々 H_1 、 H_2 とし、これらがいずれも inhomogeneous な相互作用があり、 H_2 のみが時間依存性を持っている場合、観測される複素NMR信号 $S(t)$ は密度行列を用いて

$$S(t) = \exp(i/h \| H_1(t) \| t + i/h \int \| H_2(t') \| dt') \dots\dots(9)$$

のように計算できる。ここで $\| H \|$ はハミルト

ニアン of the Zeeman 項以外の部分を示している。

(9)式から解るように $\| H_2(t') \|$ が周期的に振動あるいは反転している場合には $\int \| H_2(t') \| dt' = 0$ となるような時点で、信号をサンプリングすれば $\| H_1(t) \|$ のみに関する情報が得られること、さらにその様なサンプリング・シーケンスの時間原点を Δt だけシフトして得られた信号は、 $\| H \|$ に関して識別される各信号成分にたいして等しく、かつ Δt 時間だけ($\| H_1 \| + \| H_2 \|$)の情報を phase-encoding したものととなる、という事がわかる。 $\| H_1 \| \ll \| H_2 \|$ の時には phase-encoding は実質上 $\| H_2 \|$ に支配される。従って、 Δt シフトを行って得られる各信号を2次元的に配列し、これを2次元フーリエ変換することにより、(9)式のような1次元信号を H_1 、 H_2 の2次元情報に変換することができる。

化学シフト・イメージングでは $H_1 = \gamma h H_0 \sigma I_z$ 、 $H_2 = \gamma h x \cdot G_x(t) I_z$ である。ここで σ は化学シフト、 X はスピンのX座標であり、 $G_x(t)$ が周期的に反転するX方向の磁場勾配である。従って位置Xにあり、化学シフト σ のスピンの対して $G_x(t)$ を印加して得られる信号 $S_{\sigma x}(t)$ は

$$S_{\sigma x}(t) = \exp \{ i \gamma (H_0 \sigma t + X \cdot \int G_x(t') dt') \} \dots\dots(10)$$

となる。(10)式から上述のようなデータ処理により、 σ およびXの2次元情報を一挙に得ることができる。この結果、多次元フーリエ変換NMR法を応用したイメージング手法において、測定回数を1次元分だけ減少させることが可能となる。

このような多次元フーリエ変換イメージング法に対して、投影再構成法においても本方法の適用も可能である。例えば 2 次元 (X, Y) 物体のイメージングにおいて $G_x(t)$ を印加して得られる信号に上述のデータ処理を施したもの

は、各々の化学シフトを示す信号についてのスピン分布を各々 Y 方向へ投影したものとなっている。従って、投影再構成法により 2 次元物体の化学シフト・イメージが得られる訳である。

未来への展望

我々は、大口径プローブの高磁場超伝導磁石を用いた NMR で摘出灌流臓器を用い、また局所磁場核磁気共鳴 (TMR) 法や表面コイル核磁気共鳴 (Surface coil NMR) 法により麻酔下の臓器を使用し、灌流や血流の停止による無酸素状態での燐化合物の消長を観測した。また、核オーバーハウザー効果 (NOE) を用いた 2 次元化学交換 NMR 法、飽和移動 NMR 法を用い、組織あるいは臓器の生きたままでの状態で、細胞内に存在するローマン反応 ($ATP + \text{クレアチン} \rightarrow ADP + \text{クレアチン燐酸}$) による燐化合物の交換反応を検出しつつある。さらに in vivo における複合反応系の解析を展開するために、 ^{31}P のみならず、これ以外の核種 1H , 7Li , ^{13}C , ^{23}Na , ^{35}Cl 等の多核種にわたる核磁気共鳴スペクトルを短い時間分解で観測することや、3 次元化学シフト・イメージング NMR 法や高空間分解能イメージング NMR (NMR 顕微鏡) を用いた複合反応系の解析法の発展が同時に展開しつつある。さらに技術的に進展すれば、NMR は耳鼻咽喉科領域においても有力な診断手法となるであろうことを確信している。

文 献

- 1) Damadian R: Tumor detection by NMR. *Science* 171: 1151~1153, 1971.
- 2) 亘 弘, 西川弘恭: パルス核磁気共鳴法による腫瘍の診断. *医学のあゆみ* 87: 537~542, 1973.
- 3) Naruse S, Horikawa Y, Tanaka C, Hirakawa K, Nishikawa H and Yoshizaki K: Proton nuclear magnetic resonance studies on brain edema. *J Neurosurg* 56: 747~752, 1982.
- 4) Lauterbur PC: Image information by induced local interactions: examples employing NMR. *Nature* 242: 190~191, 1981.
- 5) 亘 弘, 吉崎和男, 田中邦雄, 山田芳文, 阿部善右衛門: 核磁気共鳴による生理機能の観察 (I). *総合臨床* 30: 2391~2399, 1981.
- 6) 亘 弘, 瀬尾芳輝: 生体臓器代謝研究への NMR の応用. *代謝* 20: 85~93, 1983.
- 7) Gadian DG, Radda GK, Brown TR, Chance EM, Dawson MJ and Wilkie DR: The activity of creatine kinase in frog skeletal muscle studied by saturation-transfer nuclear magnetic resonance. *Biochem J* 196: 215~228, 1981.
- 8) Balaban RS and Rerretti JA: Rates of enzyme-catalyzed exchange determined by 2-D NMR: a study of glucose 6-phosphate anomerization and isomerization. *Proc Nat Acad Sci USA* 80: 1241~1245, 1983.
- 9) 山本悦治, 山田芳文, 阿部善右衛門: 核磁気共鳴現象による生体計測用磁場焦点法の研究. *計測自動制御学会論文集* 14: 163, 1978.
- 10) Shaw D: In vivo topical magnetic resonance. In *Nuclear Magnetic Resonance Imaging*. pp 152~167 Saunders, Philadelphia, 1983.
- 11) Ackerman JJH, Grove TH, Wong GG, Gadian DG and Radda GK: Mapping of metabolites in whole animals by ^{31}P -NMR using surface coils. *Nature* 283: 167~170, 1980.
- 12) Pykett IL and Rosen BR: Nuclear magnetic resonance: In vivo proton chemical shift imaging. *Radiology* 149: 197~201, 1983.
- 13) 松井 茂, 関原雄介, 塩野英己, 河野秀樹: マル

- チプル・エコーを用いた高速ケミカルシフト・イメージング. 第23回 NMR 討論会予稿集 263~266, 1984.
- 14) Moon RG and Richards JH: Determination of intracellular pH by ^{31}P magnetic resonance. *J Biol Chem* 248: 7276~7278, 1973.
- 15) Seo Y, Murakami M, Watari H, Imai Y, Yoshizaki K, Nishikawa H and Morimoto T: Intracellular pH determination by a ^{31}P -NMR technique. The second dissociation constant of phosphoric acid in a biological system. *J Biochem* 94: 729~734, 1983.
- 16) Murakami M, Imai Y, Seo Y, Morimoto T, Shiga K and Watari H: Phosphorus nuclear magnetic resonance of perfused salivary gland. *Biochim Biophys Acta* 762: 19~24, 1983.
- 17) Murakami M, Seo Y, Nakahari T, Mori H, Imai Y and Watari H: Effects of Na^+ depletion on fluid secretion and on levels of ATP and creatine phosphate in perfused canine salivary gland using ^{31}P -NMR. In "Secretion: mechanisms and control" eds, Case, Lingard & Young, pp 17~21. Manchester University Press, 1984.
- 18) Murakami M, Seo Y, Nakahari T, Mori H, Imai Y and Watari H: Effects of Na^+ depletion on fluid secretion and levels of phosphorus compounds as measured by ^{31}P -NMR in perfused canine mandibular gland. *Jpn J Physiol* 34: 587~597, 1984.
- 19) 肥塚 泉, 久保 武, 佐野光仁, 松永 亨, 亘 弘: TMR による内耳代謝測定. 日本耳鼻咽喉科学会第85回総会発表, 1984.
- 20) Naruse S, Horikawa Y, Tanaka C, Hirakawa K, Nishikawa H and Watari H: In vivo measurement of energy metabolism and the concomitant monitoring of electroencephalogram in experimental cerebral ischemia. *Brain Research* 296: 370~372, 1984.
- 21) Naruse S, Horikawa Y, Tanaka C, Hirakawa K, Nishikawa H and Watari H: Measurement of in vivo energy metabolism in experimental cerebral ischemia using ^{31}P -NMR for the evaluation of protective effects of perfluorochemicals and glycerol. *Neurol Res* 6: 169~175, 1984.
- 23) Naruse S, Horikawa Y, Hirakawa K, Tanaka C, Higuchi T, Ueda S and Watari H: Observations of energy metabolism in neuroectodermal tumors using in vivo ^{31}P -NMR. *Magnetic Resonance Imaging* 3 (in press), 1985.
- 24) Seo Y, Yoshizaki K, Nishikawa H, Morimoto T, Naruse S, Koizuka I and Watari H: In vivo ^{31}P -NMR studies on aerobic recovery of frog muscle following tetanus. *Jpn J Physiol* 34: 927~931, 1984.

原稿到着: 昭和60年4月26日

別刷請求先: 村上政隆

〒444 岡崎市明大寺町字西郷中38番地

岡崎国立共同研究機構生理学研究所

分子生理研究系