

サドル型プローブの製作と小動物臓器 灌流実験への評価

藤瀬 裕¹, 岡山義美², 山田重行³, 和田英俊⁴,
松尾雅子⁵

¹浜松医科大学医学部化学 ²同 第3内科
³同 衛生学 ⁴同 第1外科
⁵同 実験実習機器センター

はじめに

生体の³¹P NMR スペクトルの測定には各種の動物や臓器を様々な実験条件に設定できるプローブが必要である。市販のものを選択する場合、溶液の高分解能測定用プローブを用いるか、サーフェス・コイルを装着したプローブを使うかのいずれかであり、目的に従って自作することも行われている¹⁾。試料管の径が5 mm径以上のプローブは感度、分解能共に溶液用として設計され、スピナーや温度可変のための装置が組み入れてあるので、スピンをかけない灌流実験や動物実験では様々な技術的問題を制限された空間で克服しなければならない。この点、上述のサーフェス・コイル用のプローブは空間的にかなりの余裕があり、各種配管も可能である。しかし、得られるスペクトルはコイル周辺の比較的小さな領域に制約され、試料全体を評価することはできず、各種のパルス系列への対応性にも問題がある。また、温度可変装置は装備されていない。例えば灌流実験を行なう場合、試料容器を自作する必要があるが、その形状についても形、大きさ等を考慮し研究者自らが工夫して設計製作する場合が多い。コイルの様式や形状につい

てのデータは体積磁化率との関係もあり、まちまちである。今回我々は普及度の比較的高いサーフェス・プローブが周辺装置の装着のために十分な空間と同調回路を持つことに着目、ラットの臓器灌流実験用のサドル型コイルを自作し、コイルの付け変えが可能なプローブとして使用した。製作過程と性能評価についてのべる。

コイルの製作

日本電子製GSX-270 WBNMR装置用のマルチ・サーフェス・プローブNM-G 27 TSPWから、装着されている径約10 mmのサーフェス・コイルを取り外し、そのネジ穴を利用して自作した様々な径のコイルを交換できるようにした。コイルの形については、サーフェス型、サドル型およびソレノイド型が考えられる。我々は灌流用試料管として、耐薬品性に秀れ、破損しにくいという点から、ポリエチレン系の注射筒を使用し、マグネット上部から試料管をプローブへ簡単に出し入れできるようにした。従って、磁場の方向からみてサドル型コイルが適し、その径および長さは試料の大きさを考慮して決定することにした。

キーワード construction of saddle probes, ³¹P MRS, surface probe, perfusion.

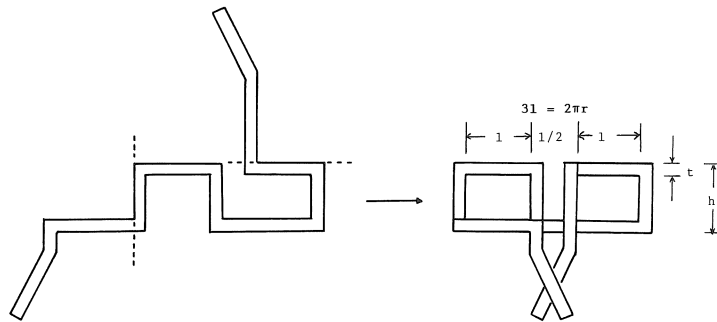


Fig. 1. Construction of saddle coil.

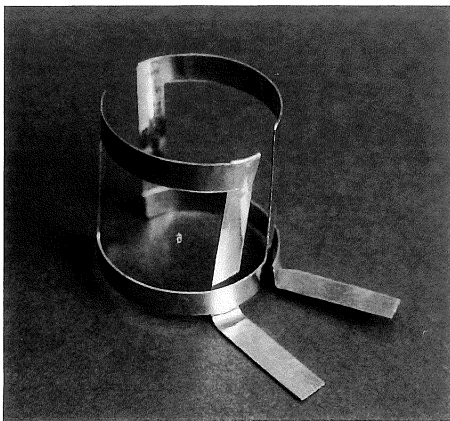


Fig. 2. Exploded view of saddle coil.

コイルの形状と性能に関しては、成書でも述べられている^{2),3)}。理論的にはコイルの長さが直径の2倍で片側のコイルと向い側のコイルとの交差角が 120° の場合磁場の均一度が最も良い筈である⁴⁾。本装置のマグネットの場合、均一度の高い領域は4 cm程度と考えられるが、小動物関係の実験には充分である。我々はコイルの高さおよび直径を試料の大きさを考慮してきめた。交差角は 120° である。市販の0.1~0.3 mm厚銅板から Fig.1 のような形状の素材を糸鋸またはナイフで切り出し、点線の部分を2ヶ所で折り返すと Fig.1 の右のような1ターンずつの8の字型の

コイルができる。折り返し部分はハンダを流して一体とし、試料管よりひとまわり大きい同じ材質のチューブ（瓶や写真のフィルムケース等が利用できる）に巻き付ける。この時の形状は Fig.2 のようになる。この際、内巻きに取り付けた方が試料管に近く、感度の面で有利である。接着はゴム系の接着剤を用い、更に全体にニス塗布して固定した。図中、幅 t は3 mm 或いは5 mm とすると l の長さはほぼコイルの直径に近くなる。今回作成したのは径17 mm と25 mm で高さ h はそれぞれ25 mm, 30 mm である。コイル外側にはシリコンチューブを密に巻きつけ、これに定温装置から導いた任意の温度の水を通すことによって試料管の温度設定ができるようにした。ラット心臓の勧流実験に使用する場合は周辺機器も多い。ブロックダイアグラムを Fig.3 に示す。一定温度の水はコイル周辺のヒートパイプのみならず、灌流液への酸素導入系、およびコイル近くの熱交換器にも流し、一定の温度を保つようにした。

コイルの性能

$\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-KH}_2\text{PO}_4$ 系緩衝液を12 mM, 120 mM 濃度で調整し、この溶液でのS/N比⁵⁾とQ値を検討した。自作したコイルは、200~280 g の

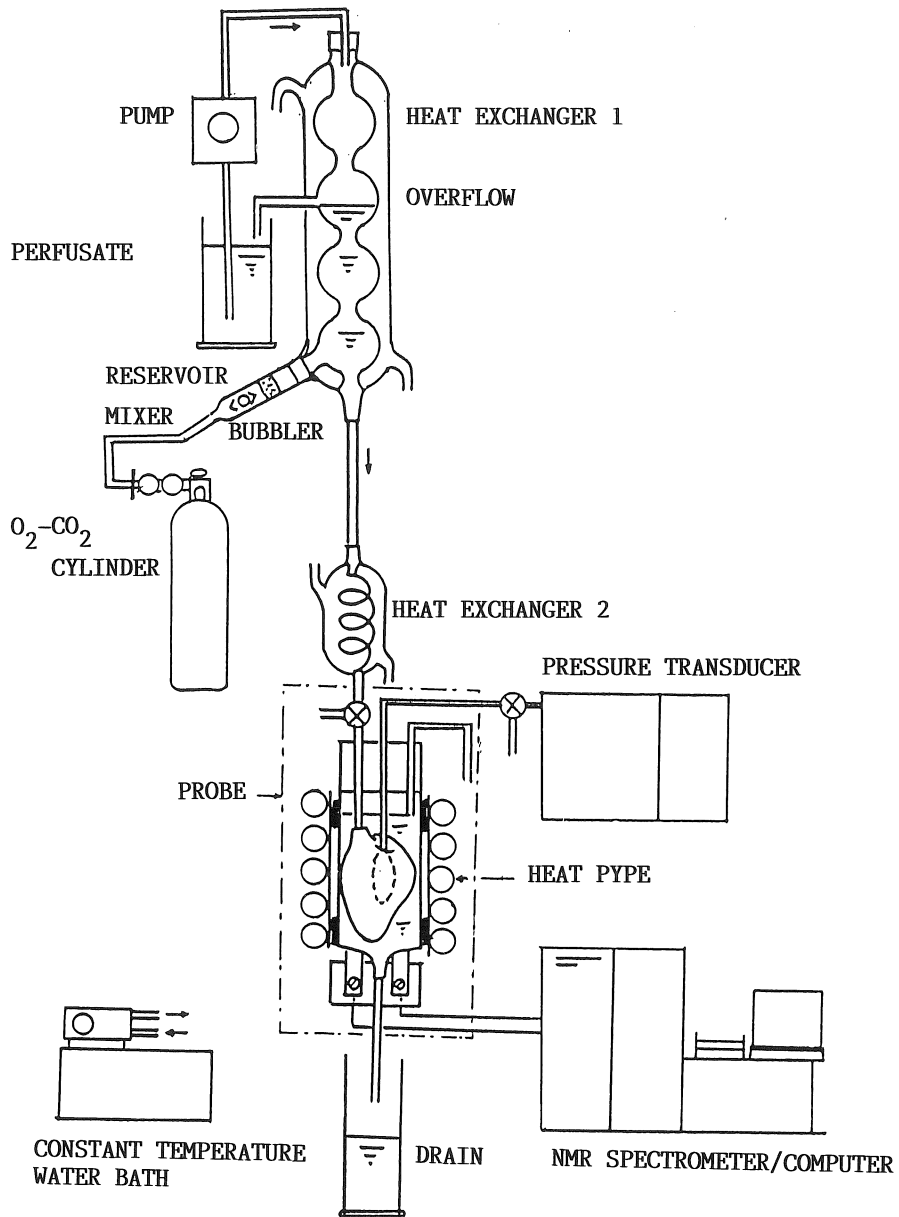


Fig.3. Block diagram of the ^{31}P NMR working heart perfusion apparatus.

ウイスター系ラットの場合、心臓用の 17 mm 径、肝臓用の 25 mm の 2 種、比較対照は元のサーフェス・プローブおよび本装置付属の 10 mm 径のマルチ・プローブ G 27 T 10/HSW とし、スピンをかけない状態で測定値を求めた。

コイルの取り付けは、元のサーフェス・コイルの中心位置をサドル型コイル高さの中心に揃えると共に、プローブの切口に対し同心円とな

るようにコイルの足の高さを定めた。

S/N 比は 45° および 90° パルスについて 1 回または 180 回積算した。測定結果を Table 1 に示す。実用上の条件に近い 12 mM, 180 回での 45° パルスの値をみると、自作サドル型コイルは径 17 mm のものでサーフェス・コイルに比べ 4.5 倍 (Fig.4), 径 25 mm で 3.8 倍である。市販の 25 mm 径プローブでの S/N 比は 1% H_3PO_4 (10.2 mM)

Table 1. S/N ratio for different probe configurations
*PD=120s **PD=1.5s

PW=90°, Phosphate solution					
Conc.	Scans	17mm Saddle	25mm Saddle	Surface 10mm G27TSPW	10mm G27T10/HSW
120mM	* 1	196.7	162.5	32.5	167.6
120mM	** 180	607.0	481.6	206.8	836.0
12mM	* 1	19.7	26.6	2.7	30.3
12mM	** 180	37.9	41.4	16.6	54.0

PW=45°, Phosphate solution					
Conc.	Scans	17mm Saddle	25mm Saddle	Surface 10mm G27TSPW	10mm G27T10/HSW
120mM	* 1	161.6	123.0	19.8	105.2
120mM	** 180	758.3	590.3	165.5	1300
12mM	* 1	16.3	20.7	2.7	26.5
12mM	** 180	76.3	65.4	17.0	93.5

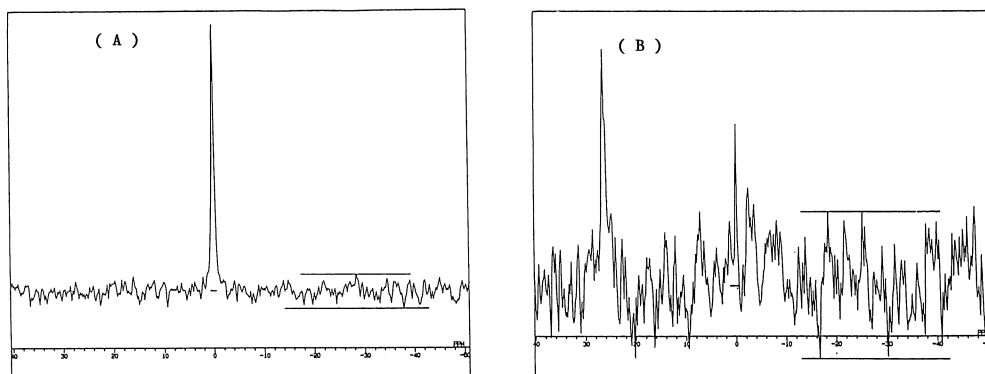


Fig.4. Single-pulse ^{31}P NMR spectra from the 12mM standard phosphate solution. (A) 17mm saddle probe. (B) 10mm surface probe.

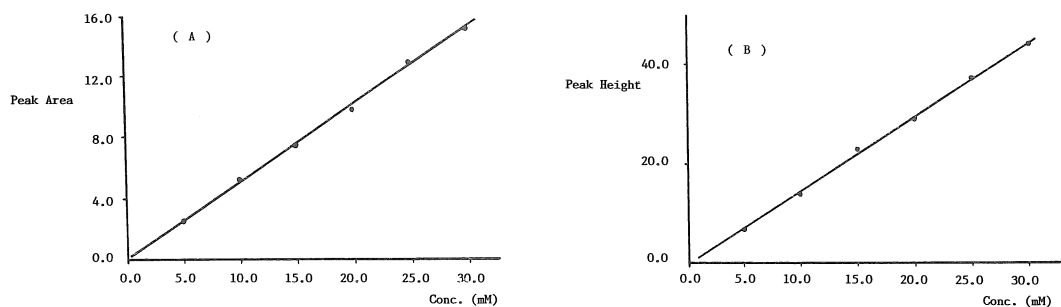


Fig.5. (A) Plots of peak areas versus sample concentrations. (B) Plots of peak heights versus sample concentrations. All peak heights have been normalized to the HMPA standard.

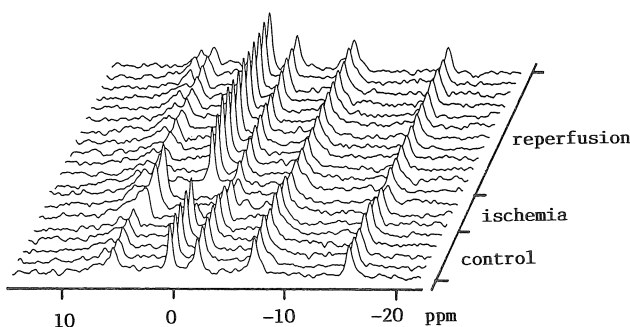


Fig.6. Successive ^{31}P NMR spectra of heart reperfusion. $\text{PW}=45^\circ$, $\text{PD}=1.5\text{s}$, 180 scans, at 5min. intervals.

で 20 : 1 とされており、自作コイルの実測値 26.6 は良好な結果と思われる。尚、 90° パルスでは待ち時間を 45° パルスと同じにとつたため、S/N 比は 45° の値より小さくなっている。また、外部基準として HMPA (hexamethylphosphoric triamide) をキャピラリーに入れ、リン酸の濃度を変化させた場合、外部基準とのシグナル強度の割合は濃度の変化に対しピーク面積、ピーク高さのいずれにおいてもよい比例関係を示し、相関関係は 0.999 という値が得られている (Fig.5)。しかし、外部基準としてキャピラリーを使用すると試料管内の位置によってシグナルが乱れる場合もある (Fig.7)。試料管の外側に基準物質の溶液を満たした径 1 mm 程度のテフロンチューブを密に巻くと二重構造となって基準のシグナル

Table 2. Peak height/half-width ratio for the qualification of different probe configurations. (cf. Table 1.)

Probe	$h/\Delta\nu_{1/2}$
G27T10/HSW (10mm)	156.3
G27TSPW (Surface, 10mm)	117.6
Saddle coil (17mm)	97.1
Saddle coil (25mm)	59.5

の形を改善できるが感度は低くなる。

自作コイルによって得られた吸収の波形から、Q に相当する吸収強度を半値幅で割った値を算出した。平均の結果を Table 2 に示す。

自作コイルは幅が広いが、生体測定で ^{31}P が

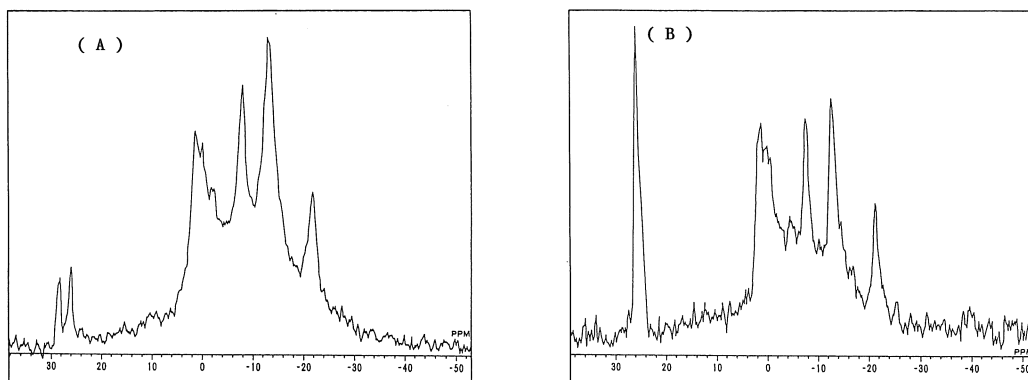


Fig.7. (A) ^{31}P NMR spectra from the perfused rat liver using 25mm saddle probe. 512 scans.
 (B) ^{31}P NMR spectrum from the rat liver under open-chest preparation during pentobarbital sodium anaesthesia using 10mm surface probe.

109 MHz という周波数でもあり，実用上の支障はない。

測定例－灌流ラット心および肝への適用

再灌流障害モデルとしての虚血－再灌流実験について検討した結果を示す⁶⁾。

ウイスターラットの摘出心（約 2g）をランゲンドルフ法により 37°C で灌流した。心臓は 15 分間灌流後，灌流回路をクランプすることによって虚血状態とし，15 分間虚血を保った後，60 分間再灌流した。コントロール群はこの過程を通常の灌流液のみで行なったものである。 ^{31}P NMR は 109 MHz，17 mm のサドル型コイルを用い，45° パルスを 1.5 秒間隔で 180 回積算，5 分毎にスペクトルを測定した。試料管は径 17 mm のポリエチレン系の注射器を利用し，シリコーンゴムのキャップに灌流液，圧トランスデューサー，オーバーフローのための配管を取り付けた。ドレインのチューブをコイルを通して外部に出しておけば試料管の出し入れはマグネット上部から配管を付けたまますべりこませることによって簡単に行える。

スペクトルの変化を Fig.6 に示す。各スペクト

ルは定量可能な状態であり，ATP は虚血により低下し再灌流後低下したままの値にとどまることがわかる。クレアチンリン酸は虚血により急激な低下がみられ再灌流後一時的にオーバーシュートすることが認められた。また，無機リン Pi についても虚血時での増加と pH が低下する動きを示している。ATP と PCr について分散分析を行い，更に各時点において unpaired test を行なった。いずれも 5% の危険率をもって有意差の有無が判定できた。肝についても同様の実験を径 25 mm のコイルで行なうことができた。臓器重量は約 13 g である。測定結果を Fig.7 に示す。512 回積算で 15 分毎の測定を行なったものであり，サーフェスコイルを用いた生体肝に比べ摘出肝が良好な灌流状態にあることが判る。

ま と め

以上のごとく，サーフェス・プローブを利用したサドル型コイルを装着したプローブは容易に自作できる。また，今回紹介した仕様のコイルはチューニング，マッチングのための補償回路を新たに接続する必要はない。灌流，虚血実験について各種の配管や装置の組み入れが容易

であり、コイル内の試料全体の評価が可能である。代謝研究、臓器保存状態の評価、薬物の投与効果等に簡便に利用できることを紹介した。灌流実験のほかに、小動物の各部位、或いは全体など、さまざまな試料にも応用できる。稿を終えるにあたり、終始懇切なる御指導とご協力を頂きました日本電子㈱の小川秀次郎氏に深甚なる謝意を表します。

文 献

- 1) Kost GJ, Anderson SE, Matson GB, et al. : A Cylindrical-window NMR probe with extended tuning range for studies of the developing heart. J Magn Reson, 82 : 238-252, 1989.
- 2) ガーディアン DG (今井昭一訳) : 医学・生物学のための NMR—生体系への応用, 西村書店, 新潟, 1985, p.169-193.
- 3) 荒川光明 : 4. 2, in NMR 医学 (核磁気共鳴医学研究会編). 丸善, 東京, 1984, p.99-106.
- 4) Ginsberg DM, Melchner MJ : Optimum geometry of saddle shaped coils for generating a uniform magnetic field. Rev Instrum, 41 : 122-123, 1970.
- 5) Hoult DI, Richards RE : The signal-to noise ratio of the nuclear magnetic resonance experiment. J Magn Reson. 24 : 71-85. 1976.
- 6) 岡山義美, 小林 明, 山崎 昇, 他 : 再灌流障害に対する活性酸素消去酵素および ACE 阻害薬の効果— ^{31}P -NMR による検討. 薬理と治療, 18 : 3385-3394, 1990.

Design and Construction of Saddle Type ^{31}P NMR Probes in Graduated Sizes and Their Assembly on Commercially Available Surface Coil System

Yutaka FUJISE¹, Yoshimi OKAYAMA², Shigeyuki YAMADA³,
Hidetoshi WADA⁴, Masako MATSUO⁵

¹Department of Chemistry, ²Department of Internal Medicine III, ³Department of Hygiene, ⁴Department of Surgery I, ⁵Department of Equipment Center, Hamamatsu University School of Medicine, 3600 Handa-Cho, Hamamatsu, Shizuoka 431-31

Design and construction of single-turn saddle probe in graduated sizes for rat heart and liver ^{31}P NMR at 109.25MHz, based on commercially available surface system was reported. The saddle probes, equipped with 17mm or 25mm diameter radio-frequency coil were designed and made of copper sheet and the coil was mounted on the surface probe apparatus. A variety of NMR probes so assembled was inexpensive to construct and showed reasonable signal-to-noise ratios and half width-to-height characteristics. These probes facilitated perfusion experiments using hearts and livers with a broad range of sizes. Probe design, examples of phosphorus-31 spectra from standard solutions, perfused rat heart and liver, and analysed data for probe qualification were presented.