

## 固体 NMR の臨床利用の可能性

池平博夫

千葉大学医学部附属病院放射線科

### 固体 NMR の生体計測は可能か

固体 NMR は本来固体環境の物質の NMR 信号を、マジックアングル (Fig. 1) 等の特殊な条件下で測定解析するための手法であり、本来生体を計測する目的手段としては相容れないものである。実際、蛋白質その他の化合物の解析に固体 NMR を応用した報告は多いが、固体そのものの NMR 計測を生体へ応用した研究報告は未だなされていない。生体計測に実験室で行っているような固体 NMR を使用することは始めから考えられないことであるだけに、従って本解説の表題は途方も無いものと思われるであろう。

このように現状では臨床診断への応用としてはどう考えても、いわゆる固体 NMR の測定環境をそのまま人体の計測に利用する事は不可能であるように思える。したがって、本稿では固体 NMR の測定方法や実験的な応用は基礎解説に譲り、もっぱら人体を測定対象として特に臨床診断への応用や可能性として考えられる範囲の固体環境下の物質の NMR 計測に関して最近の知見の紹介と解説を行った。

### 人体で NMR 計測が考えられる固体環境

人体内で固体 NMR 計測は現状では不可能

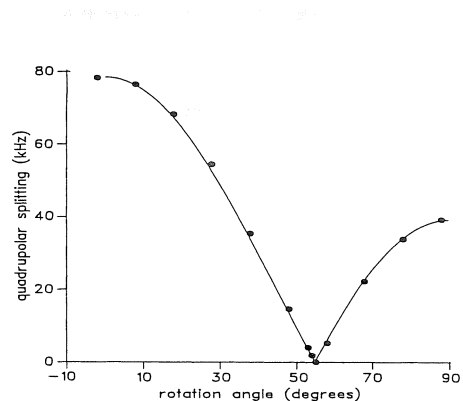


Fig. 1. Magic-angle experiment and a plot of  $(3 \cos^2\theta - 1)/2$  normalized to quadrupolar splitting is 78.4 KHz for  $\theta=0^\circ$ . (from reference 1)

であるが、NMR で観測可能であると考えられるのは生体膜やミエリンの形成、破壊のように、生体内で液相から固相へあるいはその逆方向へ変化する物質の液相状態であり、そのような物質は想像以上に多く存在する、逆説的に言えばいわゆる MRI では通常は観測できない硬い状態の物質で、ある種の環境下で液相に変移し得る物質がすべてその対象となる。ただし、骨組織や歯牙あるいは生体内に手術等で使用されている金属などは生体の環境では常に固体であるため、生体内での NMR 計測は不可能である。とすれば、人体内で NMR 計測の対象になりうる固体物質は、生体の環境の中で常時固体ではなく固体と液体の環境を行き来する物質が柔らかい固体 (ゲル) と言う表現が出来る

物質であり、これらは生体に本来存在する物質でなくても、外部から生体内に入れられた物質でもあっても構わない。Yang らの報告の Sephadex ゲルの固体とゲルでの T<sub>2</sub> 測定の結果を見れば、ゲル状態で約 15 ms の T<sub>2</sub> が固体では 1~2 μs となり固体相でいかに T<sub>2</sub> 時間が短く測定が困難であるか理解できる<sup>2)</sup>。

### 人体内在物質で測定可能な固体物質

さて、現実には人体内で測定できる固体物質として何があるか？生体組織の中で固相と液相を変移する代表的なものが生体膜である、生体膜は <sup>31</sup>P-MRS の PDE (phosphodiester) あるいは PME (phosphomonoester) のピークとして観察されるがこれらの信号は主に液相の生体膜前駆物質あるいはその破壊物質であると言われている。しっかりとした生体膜の信号はほとんど捉えられていないので、膜が合成あるいは破壊されている状況を NMR で把握することになる。これと同じような現象が、脳組織のミエリン脂質の融解が生じた場合に <sup>1</sup>H-NMR で観察される脂肪の信号である。脳組織中のミエリンは通常では硬い組織でありその信号は <sup>1</sup>H-NMR では捉えられないが、髄鞘融解により脂質の信号としてとらえられるようになるので、脳の障害部分に髄鞘の融解が伴っているかないかの判定に使用できる。このように臨床診断法としては、固体そのものの信号を観察することは出来ないが、本来固体であるべきものが融解する場合や、最終産物である固体の合成途上にある場合などの変化を、液体相で NMR 信号が出現することによりその判定が可能となり、診断に利用できる。

Volke らは膜類似物質を水の含有率の違いによる緩和時間の変化を <sup>1</sup>H-と <sup>13</sup>C-MRS による 2 次元計測を行っている、彼らの報告にある膜モデル(POPC ; 1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-

3-phosphocholine, Avanti Polar Lipids, Birmingham, AL) の <sup>1</sup>H-MRS パターンとピークの帰属を参考のために Fig. 2 と Table に示した<sup>3)</sup>。Fenske らも重水素標識膜モデルを作成し、膜の固体 NMR による解析を重水素 NMR で実験的に行い報告している<sup>1)</sup>。Guo らによる <sup>13</sup>C-

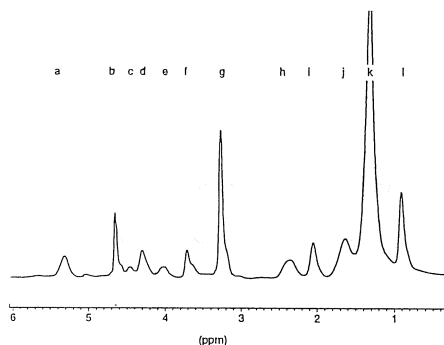


Fig. 2. One-dimensional proton NMRMAS (magic-angle spinning) spectrum of a lamellar, liquid crystalline POPC (1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine). (from reference 3, compare with Table)

Table Assignment of Proton Resonances of POPC Obtained from <sup>1</sup>H-NMR-MRS Measurements<sup>(3)</sup>. (from reference 3 and shortened by author)

Peak	Chemical shift (ppm from TMS)	Group assignment
POPC		
a	5.3	-CH=CH and CH
b	4.7	HDO
c	4.5	Glyc. -CH <sub>2</sub>
d	4.3	α-CH <sub>2</sub>
e	4.0	Glyc. -CH <sub>2</sub>
f	3.7	β-CH <sub>2</sub>
g	3.3	N(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>
h	2.4	CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> COO
i	2.1	CH <sub>2</sub> CH=CHCH <sub>2</sub>
j	1.6	CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> COO
k	1.3	(CH <sub>2</sub> ) <sub>n</sub>
l	0.9	CH <sub>3</sub>

1996年11月6日受理

別刷請求先 〒260 千葉市中央区玄鼻 1-8-1 千葉大学医学部附属病院放射線科 池平博夫

MASNMR による動物モデルを基にした実験手法での様々な形態のコレステロールエステルの解析<sup>4)</sup>や Naito らによる固体 <sup>15</sup>N-NMR でのコラーゲンの解析、乾燥時と加湿の際のスペクトルパターンからの解析も行われている<sup>5)</sup>。しかし、いずれも *in vitro* のデータの域を出ていない。

### 蛋白質、抗生物質等

固体蛋白質の計測等、不均一系の環境下での生体資料（膜結合蛋白質、構造化蛋白質等）の NMR 計測がここ 20 年くらいで可能になってきた。このような固体 NMR は実際の計測に広帯域共鳴を観測するのが通常なので、'wide-line' NMR スペクトロスコピーと通称される。しかし、今日では固体 NMR によって高分子量の生体化合物の高分解能測定が試みられ、蛋白質局所構造の動態が解析できるようになりこのことが蛋白質機能の解明に重要な情報をもたらしている。

分子溶液の NMR スペクトロスコピーでは分子の動きが線幅の縮小に効いているので、固体 NMR の分解能を上げるためには、機械的に回転を与えるか自然の回転を利用するかであり、高速資料回転法がしばしば利用されている。もう一つの方法が資料に沿った均一性が配向によって達成される場合である、この配向現象によって化学シフト等の様々な原子間の影響を観察できるようになる。さらに、これらの関係が分子構造を反映していることから、分子の軸を静磁界と特殊な状態（マジックアングル）におくことによってこのような環境を達成できる。このような特殊な条件下では、標本資料としてウイルスの膜蛋白、絹の繊維等の特殊な構造情報を決定することが可能で、固体相のペプチドの合成の研究、ポリペプチドや蛋白分画研究の大変重要な手段である。2重標識（たとえば <sup>13</sup>C と <sup>15</sup>N の 2重標識）法も使用され、NMR 核種の標識が自由に出来るので、様々な

蛋白質やペプチドあるいは脂質等の構造の静的動的解析に利用されている<sup>3),6)~8)</sup>。

### 無機物質等

Si（シリコン）も生体で使用される物質で、人体での固体（ゲル状態）NMR の測定で有用な例の1つである。Dorne らは固体乳房形成術に使用されるシリコンゲル（Si を含んだ有機化合物）の状態を固体 NMR で測定したところ Si（59.6 MHz, <sup>1</sup>H 周波数 300 MHz）の信号は 22.26 ppm にのみ見られ変化をしていないこと、さらに製造元が異なったものでは違った化学形態のゲルが供給されていることも報告している<sup>9)</sup>。MacKenzie らはチタン化合物の固体 NMR をマジックアングルスピニングで行い、<sup>13</sup>C の化学シフトが <sup>15</sup>N に影響されることやチタンの ESR が金属系の典型的な振舞いをする事確認した<sup>10)</sup>。

Wu らは <sup>31</sup>P-NMR によるひよこの骨組織のミネラル代謝の解析で、骨組織のリン化合物の主体である PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> を抑制して含有率の少ない HPO<sub>4</sub><sup>2-</sup> の測定を行っている<sup>11)</sup>。

その他炭化物質あるいは窒素化合物としての <sup>47,49</sup>Ti（11.7 T で <sup>47</sup>Ti, <sup>49</sup>Ti の共鳴周波数はそれぞれ 28.184 MHz, 28.191 MHz）の計測に関する報告も見られる<sup>10)</sup>。

### 測定時間短縮の試み

3D-MEPSI（magic-echo phase-encoding solid imaging）法は非常に時間のかかる方法であるので、Hafner らはこれを投影再構成法に置き換えることで4分の1程度にまで高速化出来たが、それでも測定時間は16時間かかっている<sup>12)</sup>。

### 人体での固体 NMR は可能か

人体を対象とした場合、固体成分で重要な生

物学的作用をしている物質は、大量に存在する骨組織から極微量な蛋白質やペプチドまで非常に多いが、*in vivo* で固体相にある物質を臨床診断に耐える時間内に行うことは現状ではどの様に考えても不可能であると言わざるを得ない。その様な技術環境の下で、臨床診断に利用できるのであれば、摘出した標本を測定すること、これについては技術的限界まで十分に利用できる。しかし、*in vivo* での測定に限定する限り固体相の物質のNMR計測は無理なので、ゲル状態の物質もしくは固体相と液体相を行き来する物質の液体相の評価は可能であるので、生理的環境下で固体であるものが病的状態において液化するような物質については、すぐにもNMRスペクトロスコピーで利用できる。NMRは物質の化学形態を把握するのに有力な手法であるので、将来*in vivo* で人体の固体成分の評価が可能になることを期待したい。

## 文 献

- 1) Fenske DB, Thewalt JL, Bloom M, Kitson N : Models of stratum corneum intercellular membranes :  $^2\text{H}$ -NMR of macroscopically oriented multilayers. *Biophys J*, 67 : 1562-1573, 1994.
- 2) Yang H, Schleich T : Modified Jeener solid-echo pulse sequences for the measurement of the proton dipolar spin-lattice relaxation time ( $T_{1D}$ ) of tissue solid-like macromolecular components. *J Magn Reson Series B*, 105 : 205-210, 1994.
- 3) Volke F, Pampel A : Membrane hydration and structure on a subnanometer scale as seen by high resolution solid state nuclear magnetic resonance : POPC and POPC/C12EO4 model membranes. *Biophys J*, 68 : 1960-1965, 1995.
- 4) Guo W, Hamilton JA : Phase behavior and crystalline structures of cholesteryl ester mixtures : a C-13 MASNMR study. *Biophys J*, 68 : 2376-2386, 1995.
- 5) Naito A, Tuzi S, Saito H : A high-resolution  $^{15}\text{N}$  solid-state NMR study of collagen and related polypeptides. The effect of hydration on formation of interchain hydrogen bonds as the primary source of stability of the collagen-type triple helix. *Eur J Biochem*, 224 : 729-734, 1994.
- 6) Grabias T, Pislewski N : Proton dynamics in solid noradrenaline hydrochloride. *Solid State Nuclear Magn Reson*, 4 : 327-330, 1995.
- 7) Chu SS, Velde DV, Shobe D, Balse P, Doughty MB : Conformational properties of the proline region of porcine neuropeptide Y by CD and  $^1\text{H}$ -NMR spectroscopy. *Biopolymers*, 35 : 583-593, 1995.
- 8) Ketchem RR, Hu W, Tian F, Cross TA : Structure and dynamics from solid state NMR spectroscopy. *Structure*, 2 : 699-701, 1994.
- 9) Dorne L, Alikacem N, Guidoin R, Auger M. High resolution solid-state  $^{29}\text{Si}$  NMR spectroscopy of silicone gels used to fill breast prostheses. *Magn Reson Med*, 34 : 548-554, 1995.
- 10) MacKenzie KJD, Meinhold RH, McGavin DG, Ripmeester JA. Titanium carbide, nitride and carbonitrides : a  $^{13}\text{C}$ ,  $^{14}\text{N}$ ,  $^{15}\text{N}$  and  $^{47,49}\text{Ti}$  solid-state nuclear magnetic resonance study. *Solid State Nuclear Magn Reson*, 4 : 193-201, 1995.
- 11) Wu Y, Glimcher MJ, Rey C, Ackerman JL. A unique protonated phosphate group in bone mineral not present in synthetic calcium phosphates. Identification by phosphorus-31 solid state NMR spectroscopy. *J Mol Biol*, 244 : 423-35, 1994.
- 12) Hafner S, Barth P. Magic-echo phase-encoding solid imaging with improved time resolution. *Magn Reson Imag*, 13 : 441-445, 1995.

## **Clinical Application Possibility of the Solid State NMR**

Hiroo IKEHIRA

*Department of Radiology, Chiba University Hospital  
1-8-1 Inohana, Chuo-ku, Chiba 260*

The solid state NMR methods used to be called wide-line NMR spectroscopy because usual observations were of very broad resonances, but today, there are approaches for achieving high resolution structures of high molecular weight biological complexes using solid state NMR. Then, these days, we can observe biological samples in anisotropic environments, for example membrane-bound proteins or some other proteins, as NMR methods were designed for these purposes.

However, it is very difficult to observe crystallized complexes in vivo, because it takes much time to get enough signal and also it looks like impossible to do suitable preparation of the human body. If it will be possible to observe solid state complex in the human body, we may be able to observe gel-phase or liquid phase complex of the soluble compounds.

I hope it will be possible to be available to apply solid state NMR for the human body in near future, because of much information which will be given by solid state NMR.