

マウス下顎切歯における生体高分子より水への 磁化移動現象—500 MHz ^1H -NMR による解析

中村浩二¹, 恵良聖一¹, 曾我美勝², 高崎昭彦³,
永井直樹¹, 加藤一夫⁴

¹岐阜大学医学部第2生理学教室 ²岐阜大学

³藤田保健衛生大学総合医科学研究所 ⁴藤田保健衛生大学衛生学部臨床病理学教室

はじめに

生体組織は一般に水を含む生体高分子系で、そのような生体組織を高磁場 NMR によって観測しようとする場合、交差緩和なる緩和過程を十分に考慮することが重要とされ、かつその結果生じるスピン拡散を積極的に利用することによって、高分子—低分子間の相互作用の検出に有用であることが Akasaka によって報告された^{1)~4)}。高分子のある特定の部位をラジオ波照射 (f_2 照射) したとき、分子間のスピン拡散によってその飽和が高分子から低分子へと伝わる際の NMR 緩和パラメーターに、プロトンスピン交差緩和時間 (T_{1s}) がある^{1)~4)}。筆者らは 1982 年頃から現在までに、360 MHz ^1H -NMR による生体組織内における水性状研究の一環として、そのモデル系として血清アルブミン (ウシ) のゾル・ゲル変換^{5)~8)}、正常肝、腫瘍肝組織 (ラット)⁹⁾、脳組織 (ラット)^{10),11)}、迷走神経線維束 (ラビット)¹²⁾、関節軟骨組織 (ラビット)¹³⁾ 及び鎖状合成高分子ゲル (ソフトコンタクトレンズ材料) と水晶体 (マウス)^{14),15)}、さらに植物組織としてマダ

ケ (*Phyllostachys reticulata* C. Koch)¹⁶⁾ などにおける水性状の変化について、主に縦緩和時間 (T_1) 及び T_{1s} を測定し、特に T_{1s} が生体組織内の水性状の変化 (生体高分子と水分子との相互作用の変化) を非常に鋭敏に反映する NMR 緩和パラメーターであることを見だし、さらにこの T_{1s} の MRI への応用として、交差緩和イメージング法を開発してきた^{17)~19)}。

これらの研究と合い前後して、筆者らと全く同様に RF パルスをオフ・レゾナンス照射することによって、従来にない画像コントラストが得られるという撮像法が 1989 年に Wolff と Balaban²⁰⁾ によって報告され、磁化移動コントラスト (Magnetization Transfer Contrast; MTC) 法と名づけられた。以後この方法は、画像コントラストの鮮明化に有用であるとして現在広く普及しつつあるが、その磁化移動現象の本質についてはいまだ論議の余地がある。

ところで生体組織は、その構成成分や発生学的相違によって、一般に骨や歯牙などの硬組織とそれ以外の軟組織とに大別される。そのうち骨や歯牙などの硬組織内の水分子に関する研究は、比較的低磁場強度の ^1H -NMR 装置によって、摘出歯牙より単離したエナメル質、象牙質

キーワード cross-relaxation time, hard tissue, magnetization transfer, soft tissue, water-macromolecule interaction

中における水の静的な存在状態に関してのみ行われてきた^{21)~25)}。しかし最新の高性能¹H-NMR装置を用いての分子間交差緩和現象を初めとする生体高分子—水分子間相互作用の動的な研究はこれまでほとんど行われていなかった。そこで、生体硬組織における高分子より水への磁化移動現象の分子機構を研究するために、ddYマウスの下顎切歯をそのモデル系として用い、500 MHz ¹H-NMRによって切歯内の水分子の T₁, T_{1s}を測定し、軟組織モデルとしてのマウス水晶体における水性状と比較研究した。

材料と方法

硬組織のモデル系としての歯牙試料は、次のように作成した。ddYマウス(雄; 2, 4, 8週齢)をペントバルビタール腹腔内投与にて屠殺後、歯根部を含めて下顎切歯を速やかに抜歯した。ロック氏液中にて歯根部周辺に付着する歯周組織を丁寧に除去した後、2 mm程の細片に切断し、それら複数個(同一週齢)を内径1.1 mmのNMR用ガラス細管内にできるだけ隙間が生じないように詰めて、細管の開口部をプラスチックペーストにて封入した。また切歯の抜髄は、試料調製における大きさの関係上、8週齢のマウス切歯のみを対象とし、リーマー(#15 mm, #20 mm)を用いて根尖部より丁寧にいった。

軟組織のモデル系としての水晶体試料は、次のように作成した。ddYマウス(雄; 2, 4, 8週齢)をペントバルビタール腹腔内投与にて屠殺後、眼球を速やかに摘出した。ロック氏液中にて顕微鏡下で強膜を切開し、硝子体を切除した後、水晶体を全摘出した。このとき水晶体嚢を破損したものは使用しなかった。このようにして摘出した水晶体を、内径3.2 mmのNMR用ガラス細管に複数個(2週齢の場合は約40

個; 4週齢, 約25個; 8週齢, 約22個)挿入した後、細管の開口部をプラスチックペーストにて封入した。

NMR測定は、ブルカー社製AM500 NMRスペクトロメーター(500 MHz)により、予めロック用のdimethylsulfoxide-d₆(DMSO-d₆)を入れた5 mmφ NMR試料管内に、上記の試料を封入したガラス細管を挿入して、25.0 ± 0.05°Cにて速やかに行った。化学シフトは、trimethylsilyl propionate-d₄(TSP)を外部基準として、ppm単位で表示した。T₁は、通常のインバージョン・リカバリー法、[180°-τ-90°-acquisition-T]_nのパルス系列で、acquisition timeを0.344秒、TをT₁の5倍以上として測定した。生体高分子プロトンから水分子プロトンへの分子間交差緩和時間(T_{1s})は、Akasaka^{1)~4)}の方法に準拠して測定した。即ち今回の研究では、これまでの研究結果と比較検討できるように、タンパク質分子の芳香環プロトン(7.13 ppm)または水シグナルより離れた部位(-4.00 ppm)をf₂照射部位とした。これらの部位を選択的に充分f₂照射し、系全体が平衡に達した後、インバージョン・リカバリー法を用いて、(1)式で表される見かけの縦緩和時間(T₁^{*})を測定した。

$$I = I_{\infty} [1 - 2 \exp(-\tau/T_1^*)] \dots\dots\dots (1)$$

ここで、I_∞はf₂照射後充分な時間経過したときの信号強度である。T₁^{*}, T₁, T_{1s}間には1/T₁^{*} = 1/T₁ + 1/T_{1s}なる関係がある^{1)~4)}ので、実測したT₁とT₁^{*}からT_{1s}値を得た。f₂照射強度はこれまでに得られたデータとも比較検討できるように、69 Hz(γH₂/2π単位)とした。飽和移動作用スペクトル(saturation transfer action spectrum; 以下、作用スペクトル)及び交差緩和スペクトル(cross-relaxation spectrum)は、飽和移動法を用い、種々の部位(ppm)を照射強度69 Hzで10秒間(T₁値の

約5倍) f_2 照射することによって得た。

それぞれの組織内含水量(%)は、[(湿重量-乾燥重量)/湿重量] × 100 として求めた。即ち、 $^1\text{H-NMR}$ 測定したそれぞれの試料の湿重量を測定後、試料を 60°C 、12 時間、次いで 110°C 、48 時間乾燥後、乾燥重量を測定した⁹⁾。

得られたデータの統計処理は対応のない Student の t 検定を用い、平均値 ± 標準偏差で表した。

結 果

Fig. 1 に、8 週齢のマウス下顎切歯の $^1\text{H-NMR}$ スペクトルの一例を示す。4.90 ppm にみられるピークが切歯内の水分子、4.29 ppm にみられる★マークのピークは、NMR ロック用の DMSO-d_6 中に含まれる微量の不純物のピークである。「材料と方法」の項でも述べたが、2 mm 程の細片にした切歯(複数個)を NMR 用ガラス細管にできるだけ隙間が生じないように詰めたものを測定試料としたので、試料によってはそれらの間隙にある空気の影響のため、必ずしもこのようなスペクトルがいつも得られたわけではなかった。しかし、この水分子のピークより得られた T_1 値、 T_{1s} 値はいずれも、これまでに研究してきた軟組織の場合と同様に、

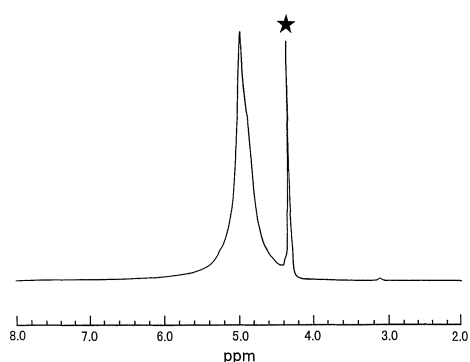


Fig. 1. 500 MHz $^1\text{H-NMR}$ spectrum of mouse lower incisors obtained using a glass capillary (inner diameter, 1.1 mm). ★-marked signal indicates protons in dimethylsulfoxide- d_6 , used for locking ($25.0 \pm 0.05^\circ\text{C}$).

一成分であった(但し、ラビット迷走神経線維束(平均外径が $1.0 \mu\text{m}$ の無髄神経線維の束)内の水の T_1 値は、速い成分と遅い成分の二成分であった¹²⁾).

硬組織のモデル系として用いたマウス下顎切歯 ($n=14$) と、その比較対照として今回軟組織のモデル系として用いたマウス水晶体 ($n=15$) におけるそれぞれの組織内含水量(%), 組織内水分子の T_1 , T_{1s} (7.13 ppm を 69 Hz で f_2 照射), T_{1s} (-4.00 ppm を 69 Hz で f_2 照射) の平均値をまとめたものを、Table 1 に示す。

Table 1. 500 MHz $^1\text{H-NMR}$ Data for Water Protons in Mouse Lower Incisors and Lenses

	lower incisors	lenses
n	14	15
water content (%)	16.02 ± 2.39	67.20 ± 4.60
$\bar{T}_1(\text{H}_2\text{O})$ (s)	1.37 ± 0.15	1.83 ± 0.18
	[————— ** —————]	
$\bar{T}_{1s}(\text{H}_2\text{O})$ (s)	1.57 ± 0.52	1.52 ± 1.30
($f_2=7.13 \text{ ppm}$ $\gamma \text{ Hz}/2 \pi \sim 69 \text{ Hz}$)	[————— NS —————]	
$\bar{T}_{1s}(\text{H}_2\text{O})$ (s)	4.01 ± 1.79	4.17 ± 2.74
($f_2=-4.00 \text{ ppm}$ $\gamma \text{ Hz}/2 \pi \sim 69 \text{ Hz}$)	[————— NS —————]	

** , $P < 0.01$; NS, not significant. Data listed as mean \pm SD.

今回得られた両組織の含水量は、これまでに報告されている値²⁶⁾に良く一致していた。統計学的検定を行うまでもなく、含水量は下顎切歯の方が水晶体よりも明らかに低値であった。両組織の $\bar{T}_1(\text{H}_2\text{O})$ 値は、含水量の少ない下顎切歯の方が水晶体よりも有意に低値であった ($P < 0.01$)。さらに $\bar{T}_{1s}(\text{H}_2\text{O})$ 値は、7.13, -4.00 ppm のいずれの部位を f_2 照射した場合でも、両組織間で有意差は認められなかった。

8週齢のマウス水晶体の作用スペクトルと交差緩和スペクトルを、それぞれ Figs. 2A, 2B に示す。作用スペクトル (Fig. 2A) 及び交差緩和スペクトル (Fig. 2B) の形状は、水分子のピーク (4.90 ppm) を中心にして左右の照射部位方向に裾野を持った非対称的な広がりを示していた。これは、これまでの報告^{1), 4), 8)}と同様に、高分子の $^1\text{H-NMR}$ スペクトル及び高分子集合体によるブロードな吸収帯を反映したものであった。これらの両スペクトルから、 f_2 照射部位に関して、-4.00 ppm よりも 7.13 ppm での f_2 照射の方が、磁化飽和が水分子へ伝わり易いということが分かった。

水分子の T_1 の測定結果として、2, 4, 8週齢のマウス下顎切歯 (歯髄を除去していないもの, ○; 除去したもの, ●) とマウス水晶体 (●) での水分子の T_1 の逆数 ($1/T_1(\text{H}_2\text{O})$), 即

ち縦緩和速度 (秒⁻¹) を両組織の乾燥重量 ($W(\%)$) に対してプロットしたものを、Fig. 3A に示す。また、7.13, -4.00 ppm を 69 Hz で f_2 照射したときの、両組織内の水分子の T_{1s} の逆数 ($1/T_{1s}(\text{H}_2\text{O})$), 即ち交差緩和速度 (秒⁻¹) を $W(\%)$ に対してプロットしたものの (以下、 $1/T_{1s}(\text{H}_2\text{O})$ vs $W(\%)$ プロット) を、それぞれ Figs. 3B, 3C に示す。作用スペクトル (Fig. 2A) 及び交差緩和スペクトル (Fig. 2B) の結果と同様に、-4.00 ppm (Fig. 3C) よりも 7.13 ppm (Fig. 3B) を f_2 照射したときの方が水分子への交差緩和速度は大きく、かつ $W(\%)$ 依存性も大であった。このような磁化移動現象における $1/T_{1s}(\text{H}_2\text{O})$ vs $W(\%)$ プロットの勾配には、両組織間で特に差は認められなかった。また歯牙では、抜髄した切歯 (●) の方がそうでない切歯 (○) に比べて、交差緩和速度は小さい傾向にあった (Figs. 3B, 3C)。

考 察

生体組織は、その構成要素の組成の相違とそれに起因する機能的側面から、一般に、骨や歯牙などの硬組織とそれ以外の軟組織とに大別される。軟組織に比べて硬組織は、硬く冷たい沈

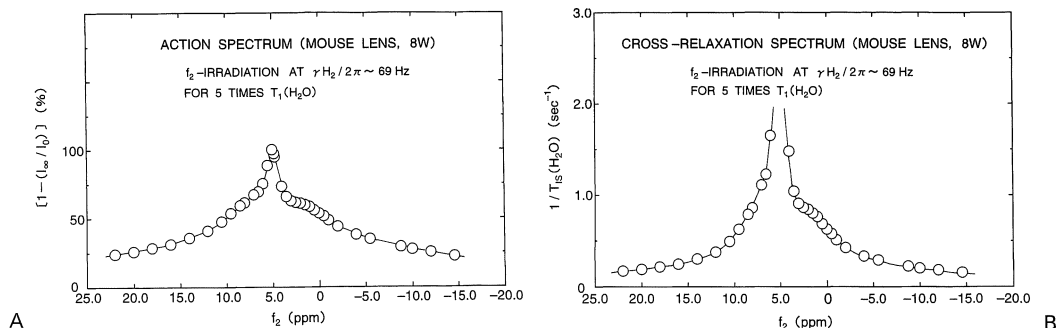


Fig. 2. A : The saturation transfer action spectrum of 8-week-old mouse lenses for the saturation of water signal when the macromolecule signals are irradiated at a constant power (69 Hz) for 5 times $T_1(\text{H}_2\text{O})$ value ($25.0 \pm 0.05^\circ\text{C}$). B : The cross-relaxation spectrum of 8-week-old mouse lenses for the saturation of water signal when the macromolecule signals are irradiated at a constant power (69 Hz) for 5 times $T_1(\text{H}_2\text{O})$ value ($25.0 \pm 0.05^\circ\text{C}$).

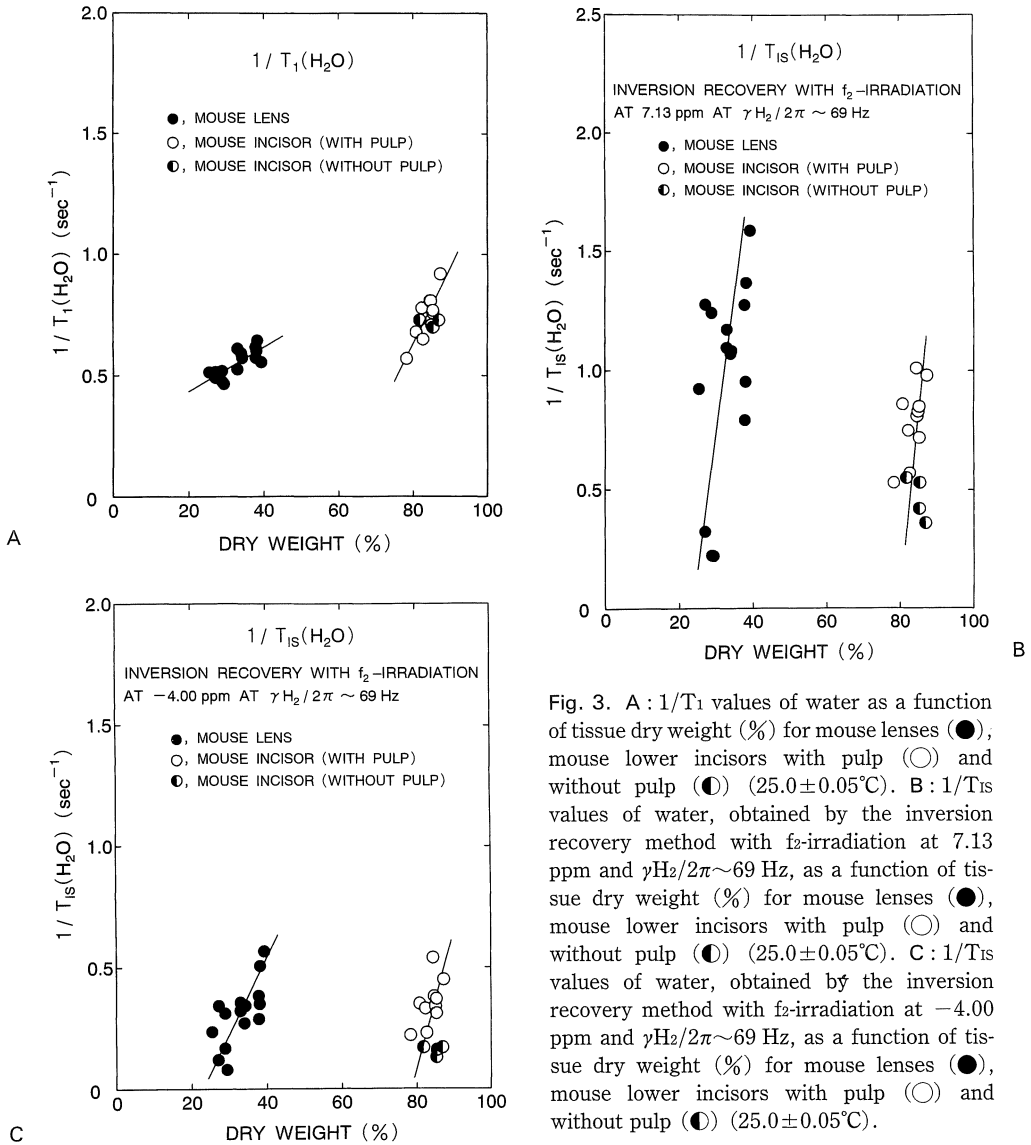


Fig. 3. A : $1/T_1$ values of water as a function of tissue dry weight (%) for mouse lenses (●), mouse lower incisors with pulp (○) and without pulp (◐) ($25.0 \pm 0.05^\circ\text{C}$). B : $1/T_{IS}$ values of water, obtained by the inversion recovery method with f_2 -irradiation at 7.13 ppm and $\gamma\text{H}_2/2\pi \sim 69$ Hz, as a function of tissue dry weight (%) for mouse lenses (●), mouse lower incisors with pulp (○) and without pulp (◐) ($25.0 \pm 0.05^\circ\text{C}$). C : $1/T_{IS}$ values of water, obtained by the inversion recovery method with f_2 -irradiation at -4.00 ppm and $\gamma\text{H}_2/2\pi \sim 69$ Hz, as a function of tissue dry weight (%) for mouse lenses (●), mouse lower incisors with pulp (○) and without pulp (◐) ($25.0 \pm 0.05^\circ\text{C}$).

黙の臓器であるというイメージから、その代謝や生理機能も静的なものと考えられがちであった。Table 1 に示すように、硬組織内含水量は軟組織のそれに比べて明らかに少ない。しかし水分子が全く存在しないわけではないので、そこには生体高分子と水分子との相互作用が必ず存在し、その生理機能の一翼を担っているはずである。筆者らは、硬組織における水分子への

磁化移動現象の分子機構を研究する目的で、500 MHz $^1\text{H-NMR}$ を用いて、ddY マウスの下顎切歯内の水分子の T_1 , T_{IS} を測定し、マウス水晶体のそれらと比較検討した。

歯牙はその構成要素の組成の相違から、エナメル質、象牙質、セメント質に分けられる²⁷⁾。今回測定試料とした ddY マウスの下顎切歯は、エナメル質、象牙質及び歯髄から成っている。

発生学的には、エナメル質のみが外胚葉性の上皮組織由来、他は中胚葉系由来²⁸⁾のため、象牙質、セメント質、さらに骨組織はある程度の共通性を有しているが、エナメル質はそれらとは明らかに区別される。即ち、エナメル質は鉱物といえるほどその組成のほとんど大部分が無機質から成り (95%)、有機質含有量 (1%) や含水量 (4%) は非常に低い²⁷⁾。その無機質成分の主体はリン酸カルシウムで、ハイドロキシアパタイト ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) と呼ばれる結晶を基本構造としている²⁷⁾。象牙質の無機質含有量 (69%) はエナメル質ほど多くはないが、通常の骨組織と同程度で、かつ含水量 (11%) は軟組織よりはるかに少ない²⁷⁾。また歯髄は軟組織と本質的な差異はないとされる²⁷⁾。

Fig. 1 に示すように、8 週齢のマウス下顎切歯の $^1\text{H-NMR}$ スペクトルは 4.90 ppm 付近に水分子のピークが観測され、さらにこの水のピークより求められる $T_1(\text{H}_2\text{O})$ 、 $T_{1s}(\text{H}_2\text{O})$ は、肝臓⁹⁾、脳^{10),11)}、関節軟骨¹³⁾、水晶体^{14),15)}などの他の軟組織の場合と同様に、一成分であった。筆者らがこれまでに得た研究結果によると、ラビット迷走神経線維束での $T_1(\text{H}_2\text{O})$ 値のみに、緩和の速い成分と遅い成分の二成分が観測された¹²⁾。また、下顎切歯試料における隙間の空気の影響を検討するため、円柱状 (1 × 30 mm) のソフトコンタクトレンズ材料 (特に、比較的含水量の少ない材料) を、下顎切歯よりも少し大きい小片にカットした後、同一の NMR 用ガラス細管に複数個入れて、同様に $T_1(\text{H}_2\text{O})$ 、 $T_{1s}(\text{H}_2\text{O})$ を測定したが、スペクトル線幅の若干の増加以外には有意な変化は観測されなかった。

生体組織を構成している生体高分子、即ちタンパク質領域のさまざまな部位をラジオ波で f_2 照射して、その部位の磁化飽和度がどの程度水分子に伝わっているのかを知るのに、水分子磁化の飽和度 ($[1 - (I_\infty/I_0)](\%)$) 及び $1/T_{1s}(\text{H}_2\text{O})$ をそれぞれ $f_2(\text{ppm})$ に対してプロット

する作用スペクトル^{1),4)}及び交差緩和スペクトルがある。Figs. 2A, 2B に示すように、得られた作用及び交差緩和スペクトルの形状は、高分子の $^1\text{H-NMR}$ スペクトルに加えて、高分子集合体によるブロードな吸収帯を反映したものであった^{1),4),8)}。これらのスペクトルから、 f_2 照射部位に関して、-4.00 や 7.13 ppm では磁化飽和が水分子へ非常に伝わり易いが、一方水シグナルよりかなり離れた部位、例えば -15.0, 20.0 ppm の部位でも、磁化飽和が水分子へ伝わり得る (磁化移動が起こり得る) ということが分かった。また、高分子を含まない水溶液 (ロック氏液) を 69 Hz で f_2 照射 (-8.79, -4.00, 7.13 ppm の各部位) した場合、 I_T/I_0 値は 16 秒間にわたって一定で、その平均値は $1.01 \pm 4.83 \times 10^{-3}$ となり、飽和移動は全く観測されなかった。これらの結果から、生体組織での磁化飽和の移動現象において、タンパク質などの高分子の存在が非常に重要であることが示唆された。

Figs. 3A, 3B, 3C の結果を比較すると、磁化飽和移動によって測定される両組織内の水分子の $1/T_{1s}(\text{H}_2\text{O})$ vs $W(\%)$ プロット (Figs. 3B, 3C) の勾配の方が $1/T_1(\text{H}_2\text{O})$ のそれ (Fig. 3A) よりもより急峻である。このことから、硬組織においても軟組織同様、 $T_1(\text{H}_2\text{O})$ よりも $T_{1s}(\text{H}_2\text{O})$ の方が組織内の水分子の挙動の相違をより鋭敏に反映しているといえるであろう。さらに、7.13 または -4.00 ppm を f_2 照射したときの $\bar{T}_{1s}(\text{H}_2\text{O})$ 値は両組織間で有意差がみられなかった (Table 1) ことから、組織内含水量の相違のみならず、無機質や有機質の組成がかなり異なった歯牙でさえも軟組織の場合と同程度の磁化移動現象が観測されることが明らかになった。

$^1\text{H-NMR}$ による歯牙組織内の水性状に関する研究は、これまで主に低磁場 NMR 装置によって行われてきた^{21)~25)}。即ち、摘出歯牙 (健康人) より単離したエナメル質の水性状に関して、Myers²¹⁾は NMR スペクトル (測定周

波数は未記載)の分散波形の解析から自由水と結合水の2種類の水相の存在を、LittleとCasciani²²⁾及びDibdin²³⁾は、それぞれNMRスペクトル(30 MHz)の一次微分曲線のピーク間距離及びNMRスペクトル(100 MHz)の吸収波形の解析から、さらにFundukら²⁴⁾は40 MHz ¹H-(FT)NMRによってT₁(H₂O)を測定し、T₁(H₂O)値の速い成分(～80ミリ秒)と遅い成分(～480ミリ秒)との二成分の解析から、含水量が非常に少ないエナメル質でさえも、自由水の他にハイドロキシアパタイト結晶中のOH基と緩く結合した水、強固に結合した水の3種類の水相の存在を報告した。T₁(H₂O)値が二成分というFundukら²⁴⁾の結果と筆者らの結果(一成分)との相違は、測定試料の相違かあるいは用いたNMR装置の磁場強度(40 MHzと500 MHz)に起因するT₁緩和機構の相違によるものであろう。象牙質の場合は、ハイドロキシアパタイト結晶以外に象牙細管内には象牙芽細胞の象牙線維が存在し、その線維と細管壁の間隙を歯液が満たしているので、有機質や組織水の比率はエナメル質よりはむしろ骨組織に近くなっている²⁷⁾が、同様な3種類の水相が存在していることが、40 MHz ¹H-(FT)NMR測定によって報告されている²⁵⁾。

組織内含水量が非常に大きく異なっても、軟組織と同程度の磁化移動現象が下顎切歯で観測されたのは、これら両組織内の水分子の質的な存在状態や高分子—水分子間の相互作用はそれほど大きく異なっていないのであろうと推察される。生体組織内におけるこのような磁化移動現象、即ち高分子—水分子間相互作用に関する動的情報は、赤坂¹⁾の指摘にもあるように、高磁場NMR装置を用いた場合にのみ得られる有力な情報であり、本研究のように高磁場NMR装置を用いることによって初めて定性的に明らかにされた。

歯髄は歯肉に類似した結合組織を主体とする軟組織である。歯髄がある切歯(n=10)と抜

髓した切歯(n=4)とでの測定結果は、それぞれ、組織内含水量(%)は16.34±2.48と15.15±1.87、 $\bar{T}_1(\text{H}_2\text{O})$ (秒)は1.36±0.18と1.39±0.03、 $\bar{T}_{1s}(\text{H}_2\text{O})$ (f₂=7.13 ppm)(秒)は1.32±0.29と2.21±0.39、 $\bar{T}_{1s}(\text{H}_2\text{O})$ (f₂=-4.00 ppm)(秒)は3.02±0.85と6.50±0.85であった。抜髓した切歯の例数が少なかった(n=4)ので、両者の統計学的検定は行わなかった。しかし、それらの1/T₁(H₂O)と1/T_{1s}(H₂O)の値のW(%)に対する結果を比較すると、1/T₁(H₂O) vs W(%)プロット(Fig. 3A)ではその差は見られなかったが、1/T_{1s}(H₂O) vs W(%)プロット(Figs. 3B, 3C)では、歯髄がある切歯(○)に比べて、抜髓した切歯(●)の方が交差緩和速度の値は若干小さい、即ち、軟組織と同様と考えられている歯髄を除去して、そのほとんど大部分が無機質成分のハイドロキシアパタイト結晶より成るエナメル質と象牙質のみの硬組織では、水分子への磁化移動現象が相対的に生じ難くなっていることが分かる。

これまでに高分解能¹H-NMRを用いて、生体組織、特に軟組織内の水性状の研究を行ってきた際、そこで生じている磁化移動現象の分子機構を考察するために、そのモデル系として、タンパク質の溶液・ゲルやソフトコンタクトレンズ材料の鎖状合成高分子ゲルなどを用いてきた。即ち、それらのT₁(H₂O)値、T_{1s}(H₂O)値及びFigs. 2A, 2Bに示すような作用スペクトル、交差緩和スペクトル(f₂, -100～100 ppm; f₂照射強度, 69～350 Hz)を測定し、水分子への磁化飽和移動の機序を研究してきた^{7), 8), 15)}。その結果、例えばタンパク質ゲル、即ちウシ血清アルブミン・ゲル(重水中)においては、1/T_{1s}(HDO)値はタンパク濃度(W(%)依存的に、下に凹状のカーブに沿って連続的に急峻に増加し、高タンパク濃度(含水量は低値)においては、水への交差緩和速度の値が非常に大きくなった^{7), 8)}。このような磁化移動現象は、ゲル状態になると非常に高分子

量のタンパク質凝集体が生じ(動的光散乱法による粒径分布の測定), かつゲル内での結合水量の増加によって, f_2 照射による水への磁化飽和移動が効率よく生じることによるものと説明されている^{7),8)}. また筆者らは, 水晶体の研究中に, 水晶体は損傷を受けると同時に粘調で乳白色のゲル状態に変化し, 大きな高分子集合体が生じることを見いだした. このような損傷水晶体の $1/T_{1s}(H_2O)$ 値を正常水晶体と比較したところ, その値は顕著に増加した²⁹⁾. 同様の現象は, 鎖状合成高分子ゲルや植物組織のマダケの稈壁内の水分子の T_{1s} 測定でも観測され, いずれの場合もタンパク質ゲルと同様の分子機構によって生じていると解釈されている. 即ち, 鎖状合成高分子ゲルには種類の異なった単量体同士の共重合による鎖状高分子集合体^{14),15)}が, マダケの稈壁内にはリグニン・ヘミセルロースによって構成される高分子量の重合体¹⁶⁾が存在しているので, これらの存在が, 特にオフ・レゾナンス照射領域での水分子への磁化移動現象の分子機構の主要因となっている.

エナメル質の無機質, 有機質及び水分含量は, それぞれ 95, 1, 4%, 象牙質のそれらは, それぞれ 69, 20, 11%である²⁷⁾. また象牙質の場合, ハイドロキシアパタイト, タンパク質, 水の相対的なプロトン・スピン密度の比率は, それぞれ 5, 45, 50%と報告されている²⁵⁾. Table 1 に示すように, マウス下顎切歯の $\bar{T}_{1s}(H_2O)$ 値が水晶体のそれとほぼ同値で, しかも $1/T_{1s}(H_2O)$ vs $W(\%)$ プロット (Figs. 3B, 3C) の勾配も水晶体とほぼ同一であるということは, 歯牙の特定の部位が水分子への磁化飽和の移動に関与しているのであろうが, その分子機構は, 水晶体の場合と同様に, 有機質から成る超高分子量の集合体の寄与が示唆される.

文 献

- 1) 赤坂一之 : 生体高分子系のプロトンと核磁気緩和. 交叉緩和とその応用. NMR 医学 1984 ; 4 : 48-56
- 2) Akasaka K : Longitudinal relaxation of protons under cross saturation and spin diffusion. J Magn Reson 1981 ; 45 : 337-343
- 3) Akasaka K : Spin diffusion and the dynamic structure of a protein. J Magn Reson 1983 ; 51 : 14-25
- 4) Akasaka K, Ishima R, Shibata S : Proton spin relaxation in biopolymers at high magnetic fields. Physica B 1990 ; 164 : 163-179
- 5) Sogami M, Nagaoka S, Era S, Inouye H, Kuwata K, Kida K, Watari H, Shiga K, Akasaka K : Water structure in modified bovine plasma albumin (BPA*) gel and bovine mercaptalbumin solution. Int J Peptide Protein Res 1986 ; 28 : 130-140
- 6) Era S, Sogami M, Kuwata K, Fujii H, Suzuki E, Miura K, Kato K, Watari H : ¹H-n. m. r. studies on cross-relaxation phenomena in bovine mercaptalbumin (BMA) solution and partially hydrolyzed bovine plasma albumin (BPA*) gel. Int J Peptide Protein Res 1989 ; 33 : 214-222
- 7) 曾我美 勝, 恵良聖一, 桑田一夫, 他 : ウシ血漿アルブミン溶液, ゲル状態における分子間交差緩和現象の研究—Magnetization Transfer Contrast (MTC) Imaging の基礎的研究. 第 32 回 NMR 討論会講演要旨集 1993 ; 341-344
- 8) 曾我美 勝, 加藤一夫, 恵良聖一, 桑田一夫, 上坂伸宏, 梶原孝彦, 中上 寧 : 新しい分子間交差緩和時間測定法とその応用. 第 34 回 NMR 討論会講演要旨集 1995 ; 249-252
- 9) Era S, Kato K, Sogami M, et al. : Comparative ¹H NMR studies on water structure in hepatic tissues and protein gel. Biomed Res 1986 ; 7 (Suppl 2) : 41-46
- 10) Iwama T, Yamada H, Era S, Sogami M, Andoh T, Sakai N, Kato K, Kuwata K, Watari H : Proton nuclear magnetic resonance studies on water structure in peritumoral edematous brain tissue. Magn Reson Med 1992 ; 24 : 53-63
- 11) Iwama T, Yamada H, Andoh T, Sakai N, Era S, Sogami M, Kuwata K, Watari H : Proton NMR studies on ischemic rat brain tissue. Magn Reson Med 1992 ; 25 : 78-84

- 12) Kuwata K, Ueki S, Era S, Sogami M, Watari H : Spin-lattice relaxation times of water in polarized and depolarized rabbit vagus nerves. *Biochem Biophys Res Commun* 1995 ; 215 : 459-466
- 13) Kuwata K, Sato S, Era S, Sogami M, Kida K, Iwama T, Kato K, Matsunaga T, Watari H : Cross-relaxation times of normal and biochemically induced osteoarthritic rabbit knee cartilages. *Jpn J Physiol* 1997 ; 47 : 291-297
- 14) Kuwata K, Era S, Sogami M, Amano H, Nagaoaka S, Kato K, Takahashi K, Kitazawa Y, Watari H : Comparative ¹H-NMR studies on the physical state of water in soft contact lens and mouse lens. *Biochim Biophys Acta* 1996 ; 1289 : 369-376
- 15) 恵良聖一, 中村浩二, 曾我美 勝, 高崎昭彦, 中上 寧 : 交差緩和時間測定による合成高分子ゲル及びマウス水晶体内の水構造の研究. 第 32 回 NMR 討論会講演要旨集 1993 ; 179-182
- 16) 曾我美 勝, 恵良聖一, 松岡三良, 加藤一夫, 永井直樹 : 磁化移動法による植物組織・水性状の研究. 第 35 回 NMR 討論会講演要旨集 1996 ; 191-194
- 17) 上嶋康裕, 豊島日出夫, 牧 壯, 曾我美 勝, 桑田一夫, 恵良聖一, 加藤一夫, 亘 弘 : 交差緩和時間イメージング. *日磁医誌* 1989 ; 9 (S2) : 169
- 18) Ueshima Y, Sogami M, Kato K, Kuwata K, Iwama T, Yamai S, Maki T, Era S, Watari H : New IR imaging under cross-saturation-Cross relaxation from protein to water. *SMRM, 9th Annual Meeting* 1990 ; 585
- 19) Iwama T, Era S, Kuwata K, Sogami M, Kato K, Ueshima Y, Watari H, Yamada H, Maki T : Inversion recovery under cross-saturation imaging of cerebral cold injury and brain tumor. *SMRM, 10th Annual Meeting* 1991 ; 687
- 20) Wolff SD, Balaban RS : Magnetization transfer contrast (MTC) and tissue water relaxation in vivo. *Magn Reson Med* 1989 ; 10 : 134-144
- 21) Myers HM : Trapped water of dental enamel. *Nature* 1965 ; 206 : 713-714
- 22) Little MF, Casciani FS : The nature of water in sound human enamel. *Arch Oral Biol* 1966 ; 11 : 565-571
- 23) Dibdin GH : The stability of water in human dental enamel studied by proton nuclear magnetic resonance. *Arch Oral Biol* 1972 ; 17 : 433-437
- 24) Funduk N, Kydon DW, Schreiner LJ, Peemoeller H, Miljković L, Pintar MM : Composition and relaxation of the proton magnetization of human enamel and its contribution to the tooth NMR image. *Magn Reson Med* 1984 ; 1 : 66-75
- 25) Schreiner LJ, Cameron IG, Funduk N, Miljković L, Pintar MM, Kydon DN : Proton NMR spin grouping and exchange in dentin. *Biophys J* 1991 ; 59 : 629-639
- 26) Animal tissues and organs : water content. In : Altman PL, Dittmer DS, ed. *Biology Data Book. Federation of American Societies For Experimental Biology*, 1964 ; 401-404
- 27) 早川太郎, 須田立雄 : 口腔生化学. 第 2 版. 東京 : 医歯薬出版, 1994 ; 57-87
- 28) Bhussry BR. Development and growth of teeth. In : Bhaskar SN, ed. *ORBAN'S oral histology and embryology*. 8th ed. St. Louis, USA : The CV Mosby Co, 1976 ; 23-44
- 29) Nakamura K, Era S, Sogami M, Takasaki A. Comparative ¹H-NMR studies on the state of water in intact and scratched mouse lenses. In : Seo Y, Murakami M, Ichikawa O, ed. *Molecular Environment of Intra- and Extracellular Sodium (International Workshop on MRI&S)*. Okazaki, Japan : Kenbun Printing Co, 1993 ; 109-112

Magnetization Transfer from Macromolecules to Water Protons in Murine Dental Tissues as Revealed by 500 MHz ^1H -NMR

Koji NAKAMURA¹, Seiichi ERA¹, Masaru SOGAMI²,
Akihiko TAKASAKI³, Naoki NAGAI¹, Kazuo KATO⁴

¹*Department of Physiology, Gifu University School of Medicine
40 Tsukasa-machi, Gifu 500*

²*Gifu University*

³*NMR Laboratory, Institute for Comprehensive Medical Science, Fujita Health University*

⁴*Department of Clinical Pathology, School of Health Sciences, Fujita Health University*

Although much is known about magnetization transfer phenomena in biological soft tissues, little is known about those in hard tissues. Using a 500 MHz ^1H -NMR spectrometer, we studied the spin-lattice relaxation time ($T_1(\text{H}_2\text{O})$) and the intermolecular cross-relaxation times ($T_{1s}(\text{H}_2\text{O})$) from irradiated macromolecular protons to observed water protons in murine lower incisors (hard tissue) and compared with those in murine lens tissue (soft tissue).

Mean values for the water content (%) of murine lower incisors and lens tissue were 16.02 ± 2.39 ($n=14$) and 67.20 ± 4.60 ($n=15$), respectively. These findings were consistent with the large difference in water content between soft tissues and hard tissues. $\bar{T}_{1s}(\text{H}_2\text{O})$ values obtained by f_2 -irradiation at 7.13 or -4.00 ppm showed no significant difference between lower incisors and lens tissue. Plots of $1/T_{1s}(\text{H}_2\text{O})$ values vs. tissue dry weight ($W(\%)$) for lower incisor tissue approximated a straight line with slope approximately equal for that obtained for lens tissue. These results suggest that the state of water in hard tissue may be similar to that in soft tissues, in spite of the significant difference in water content. Thus, saturation transfer NMR techniques such as measurement of $T_{1s}(\text{H}_2\text{O})$ values may be applicable to the study of water-macromolecule interactions in both biological soft and hard tissues.