

原 著

核磁気共鳴法による 骨格筋の発達に関する研究

Nuclear magnetic resonance
studies on maturation of skeletal
muscle

湯浅龍彦 (国立小千谷療養所神経内科)

桑原武夫 (新潟大学脳研究所神経内科)

大野享男 (新潟大学分析センター)

宮武 正 (新潟大学脳研究所神経内科)

キーワード

NMR (核磁気共鳴), water proton relaxation time (水プロトン緩和時間), ^{23}Na , Skeletal muscle (骨格筋)

要 旨

NMR spectrometry を鶏胸筋に応用し、筋の発育過程に伴う筋組織の水プロトン縦緩和時間と筋組織の ^{23}Na 濃度を測定した。NMR の計測は JEOL FX 900 FT-NMR spectrometer で行なった。検索の対象は白色レグホン系の鶏胸筋であり、水プロトン縦緩和 ($^1\text{H-T}_1$) 時間の測定は 12 日鶏胚, 19 日と 20 日鶏胚, 生後 8 日, 15 日, 22 日の雛で行なった。 ^{23}Na の測定には 12~14 日鶏胚, 19 日鶏胚, 4~6 日雛, 20 日雛を準備した。

$^1\text{H-T}_1$ 時間は発育段階に従って 2.082 ± 0.091 秒, 1.605 ± 0.106 秒, 1.321 ± 0.107 秒, 1.108 ± 0.038 秒, 1.087 ± 0.053 秒と漸次低下した。

^{23}Na 濃度も同様に低下し, $59.5 \pm 3.51 \mu\text{Eq/gm}$, $49.0 \pm 4.95 \mu\text{Eq/gm}$, $47.5 \pm 3.87 \mu\text{Eq/gm}$, $10.3 \pm 2.13 \mu\text{Eq/gm}$ であった。

骨格筋の含水量はその発育段階に従って低下し, $^1\text{H-T}_1$ 時間と含水量は指数関数的関係を呈した。水分量を種々に変えた gelatin 溶液の $^1\text{H-T}_1$ 時間は骨格筋のそれより常に延長しており, $^1\text{H-T}_1$ 時間に影響を及ぼす因子として含水量以外の他の因子の存在が示唆された。そこで除神経により萎縮をきたしたラットの腓腹筋の $^1\text{H-T}_1$ 時間を測定したが変化は認められなかった。

NMR で測定された筋組織の ^{23}Na 濃度と, flame photometry で計測した Na^+ 濃度を比

較したところ、NMRによる ^{23}Na の検出率は発育段階に従って81.9%から54.7%へと低下した。このことから水プロトンの存在様式だけでなく組織内の ^{23}Na の存在様式も、骨格筋の発育に伴う種々の変化により影響されることが推測された。

1. はじめに

核磁気共鳴 nuclear magnetic resonance (以下NMRと略す)は、今日医学生物学の新しい研究手段として脚光を浴びつつある¹⁾。医学への応用としてNMR映像法²⁾は最も進んだ分野であるが、NMRに期待されるもう1つの重要な側面は、従来の方法にない特質を有した生体の化学的分析法³⁾というところにある。

とはいえNMRの生物資料への応用は日も浅く方法論的にも改善が必要であらうし、1つ1つのデータについてその意味がより深く検討されなければならない。

著者らはNMR法が将来骨格筋病変の早期診断等に有力な手段となることを期待しつつ、まずは正常の骨格筋の発育経過について、水プロトン緩和時間並びに組織の ^{23}Na 濃度の変化を検討した。

2 検索対象

(1) 鶏胸筋: 水プロトン縦緩和($^1\text{H-T}_1$)時間測定のために白色レグホン系鶏の12日胚($n=12$)、19日と20日胚($n=12$)、8日雛($n=7$)、15日雛($n=10$)そして22日雛($n=6$)の胸筋を採取した。筋組織のNa濃度測定のためには12~14日胚($n=10$)、19日胚($n=12$)、4~6日雛($n=6$)、20日雛($n=8$)の胸筋を用いた。

(2) 除神経筋: 筋線維の萎縮に伴う $^1\text{H-T}_1$ 時間を検討するために、170~200gmのウイスター系ラットの一侧の坐骨神経を切断し、術後5週と17週に腓腹筋を生検した。健側を対照とした。

(3) gelatin 溶液: 水分量の変化による $^1\text{H-T}_1$ 時間の動きをみるために含水量90%, 80%, 70%, 60%に調整されたgelatin溶液を作成した。

3 方 法

(1) 資料の保存: 資料である骨格筋の採取はハロセン麻酔下で行ない、筋切片は直ちに計測に供されるか、或いは、一旦湿潤箱に収め氷冷しつつ保存された。この際あらかじめ同一資料によって採取後8時間迄 $^1\text{H-T}_1$ 時間の変動を追跡したが、この時間内においては値の変化はなかった。今回の実験はこの時間内に終了したものである。

(2) 計測用分光器並びに計測の条件: 全ての計測はJEOL FX 90Q FT-NMR spectrometerで行なわれた。 $^1\text{H-T}_1$ 時間の測定には5mm ϕ 資料管を、 ^{23}Na の計測には10mm ϕ 管を準備した。用いた資料の量は、5mm ϕ 管では、管高10mm迄とし、10mm ϕ 管では0.5g以下とした。

資料管をNMR probe内に静置し無回転で計測した。probe内の温度は $^1\text{H-T}_1$ 時間測定時には29°C、 ^{23}Na 測定は室温とした。用いたラジオ波の共鳴周波数は、プロトンでは89.6MHz、 ^{23}Na では23.65MHzであった。

$^1\text{H-T}_1$ 時間の測定は、 $180^\circ-\tau-90^\circ$ パルス系列によるinversion recovery法を用い、 180° パルスの幅は資料ごとにシグナル強度をみながら決定した。 τ 時間を0.1秒、0.2秒、0.4秒、0.6秒、1秒、2秒、3秒、(20秒)と変化させた7(8)本のシグナルを検出した(図1)。これより得られた縦緩和曲線より非線型最少二乗法により T_1 時間を算定した。

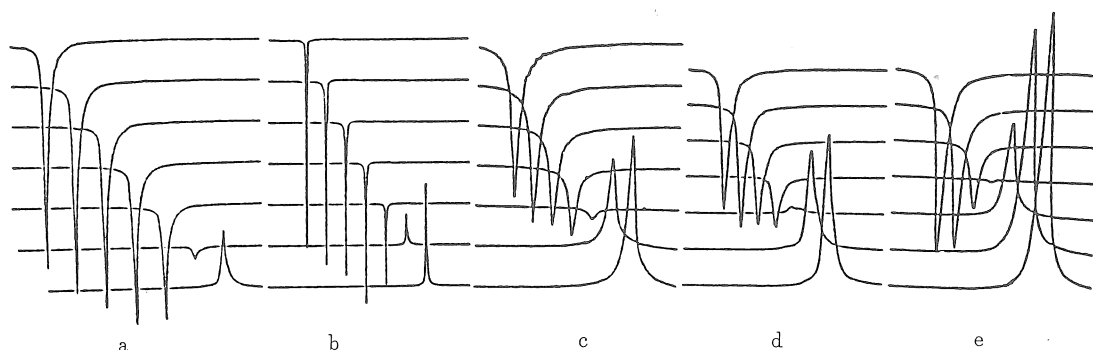


図1 Samples of spectra for measurements of water proton T_1 time by inversion recovery method: a; pure water, b; amniotic fluid, c; 12-day chick embryo's muscle, d; 20-day chick's muscle, and e; 15-day chick's muscle.

組織の ^{23}Na 濃度の測定のために予め既知の Na^+ を含有する生理食塩水から希釈溶液を作り、これより検量線を作成した。筋組織より得られた ^{23}Na のスペクトラムを図2に示した。このシグ

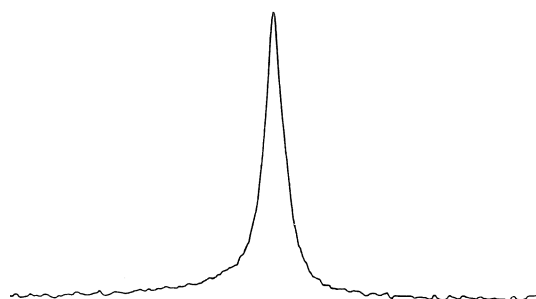


図2 The ^{23}Na NMR spectrogram in pectoral muscle of an 8-day-chick: 1200 scans and the operating field for sodium-23 was set to 23.65 MHz.

ナルの面積から先の検量線に基づいて資料中の ^{23}Na 濃度を算出した。

(3) 筋組織の含水量の測定: 筋切片の一部を 70°C のオープンで乾燥し、6時間と24時間後に重量を測定し、湿重量と乾燥重量の差から含水量を算出した。

4 結果

(1) 水プロトン T_1 時間: 胎生期から生後へと发育しつつある動物の骨格筋の $^1\text{H}-T_1$ 時間の変化を表1に示した。 $^1\text{H}-T_1$ 時間は发育経過に従って指数関数的に低下しており、12日鶏胚胸筋では、 2.082 ± 0.091 秒、12日と20胚で 1.605 ± 0.106 秒、8日雛で 1.321 ± 0.107 秒、15日雛で 1.108 ± 0.038 秒、20日雛で 1.087 ± 0.053 秒であった。この際筋の含水量も93%から76%へと低下した。

表1 Changes of proton T_1 time and water content in pectoral muscles of chick embryos and chicks.

| stage | 12-day chick embryo (n=12) | 19 & 20-day chick embryo (n=12) | 8-day chick (n=7) | 15-day chick (n=10) | 22-day chick (n=6) |
|-------------------------|-------------------------------|------------------------------------|----------------------|------------------------|-----------------------|
| pectoral m. | | | | | |
| Preton T_1 time (sec) | 2.082 ± 0.091 | 1.605 ± 0.106 | 1.321 ± 0.107 | 1.108 ± 0.038 | 1.087 ± 0.053 |
| Water content (%) | 93.0 | 86.0 | 83.0 | 78.0 | 76.0 |

gelatin 溶液で $^1\text{H-T}_1$ 時間を測定すると、含水量 90% の gelatin 溶液では 2.12 秒, 80% で 1.40 秒, 70% で 0.96 秒, 60% で 0.62 秒であった。

筋組織と gelatin 溶液の含水量と $^1\text{H-T}_1$ 時間の関係を図 3 に示した。両者は同一の含水量であっても $^1\text{H-T}_1$ 時間は筋組織においてより短縮していた。

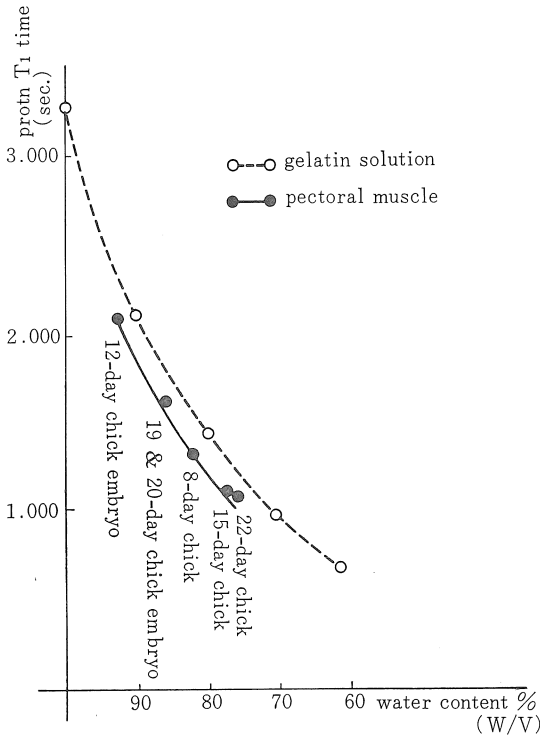


図 3 Two exponential curves represented gelatine solutions (○) and pectoral muscles (●) respectively.

除神経後 5 週と 17 週の筋組織の $^1\text{H-T}_1$ 時間を図 4 に示した。術後 5 週において萎縮筋の $^1\text{H-T}_1$ 時間が延長する傾向があったが、5 週, 17 週のいずれにおいても除神経による影響に有意の結果は得られなかった。

(2) 筋組織の Na 濃度: 骨格筋の発育に伴う筋組織内の ^{23}Na 濃度を NMR で測定し、従来の方

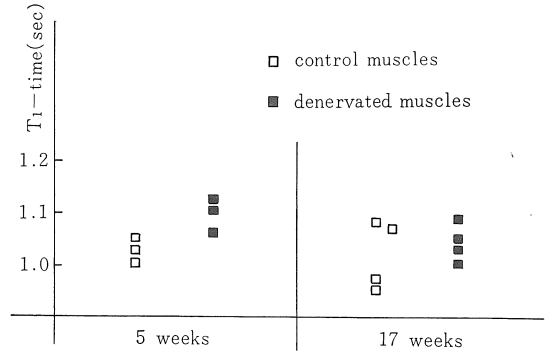


図 4 Proton T₁ time in the denervated gastrocnemius muscles of rats. The muscles were examined at 5 & 17 weeks after the operation.

法である flame photometry による Na^+ 濃度と比較した(表 2)。いずれの測定法においても筋組織のナトリウムは筋の発育に伴って低下した。いずれの段階においても flame photometry による値が $^{23}\text{Na-NMR}$ によるものより高い値を示したが、注目されたことは、 $^{23}\text{Na-NMR}$ の検出率が胎生期の 81.9% から生後の 54.7% へと変化したことである(図 5)。

表 2 Sodium concentration in developing chicks, pectoral muscles, measured by sodium-23 NMR spectrometer and by flame photometer.

| Pectoral muscles | $^{23}\text{Na-NMR}$ spectrometry ($\mu\text{Eq/gm}$) | Flame photometry ($\mu\text{Eq/gm}$) | NMR/Flame (%) |
|-------------------------------|---|--|---------------|
| 12-14 day chick embryo (n=10) | 59.5=3.51 | 72.6=1.76 | 81.9=4.74 |
| 19-day chick embryo (n=12) | 49.0=4.95 | 68.3=4.22 | 73.4=4.29 |
| 4-6-day chick (n=6) | 47.5=3.87 | 71.0=3.63 | 65.2=4.69 |
| 20-day chick (n=8) | 10.3=2.13 | 18.8=1.61 | 54.7=7.35 |

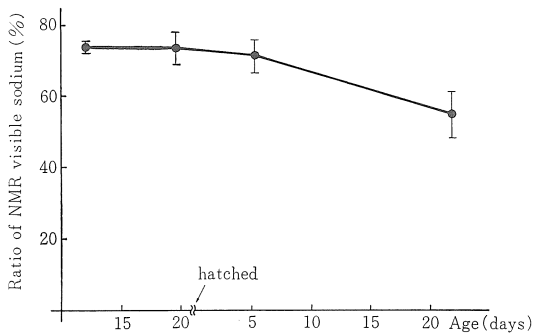


図 5 Change of ratio of NMR visible sodium in the course of maturation of pectoral muscles from chick embryos and chicks.

5 考 察

骨格筋の発育には、形態的、機能的、生化学的諸現象が含まれる。NMR は将来的には、これらの諸現象を同一資料において同時に計測しうる能力を有す方法として期待される。

骨格筋の発育に伴う筋の含水量や電解質の変化については組織からの抽出物について正常の動物⁴⁾や筋ジストロフィー症動物^{5,6)}で調べられて来た。この様な研究分野にも NMR が応用されるようになり、骨格筋のプロトン緩和時間^{7,9)}や²³Na 濃度^{8,9)}が測定された。これらの論文で扱われた発育はいずれも生後からのものであり、本研究の様に胎生期からの発育経過を NMR で追跡したのは我々の報告が最初である。鶏においては孵化という現象は、ドラマチックな事実であるが、¹H-T₁ 時間の変化、含水量の変化から見る限りでは胎生から雛への変化は図 3 に示された様なただらかな量的変化の 1 点として理解されるのである。

¹H-T₁ 時間の変化は組織の含水量の関係で表わされることは既に知られていた^{7,9)} ことであるが、

我々は同じ条件で測定した gelatin 溶液の ¹H-T₁ 時間と筋組織のそれを比較することによって、¹H-T₁ 時間は含水量のみでなく他の因子の影響を受けることを示した。NMR により組織水は、高分子物質との結合水 8%、その他の細胞内液 82%、細胞外液 10% に区分されるとい⁷⁾。

我々は、筋の発育に伴って Na 濃度も低下することを報告したが、特に重要と思われた現象は NMR で検出される ²³Na 濃度の検出率が発育経過に従って低下したことである。このことは恐らくプロトン緩和時間が変化することと同様の意義を持つ現象と考えられるが、はっきりとした原因は今のところ尚不明である。考えられる理由としては、細胞内の高分子化合物の増加に伴って ²³Na がそれにトラップされたということである。

我々が示した興味深い実験事実として、除神経による萎縮筋では ¹H-T₁ 時間が変化しないということがある。筋の発育が筋の構造蛋白が増加して行く過程であるに対し萎縮は蛋白が減少して行く過程である。前者では ¹H-T₁ 時間が変化し後者で何ら変化しなかった事実は、筋構造蛋白がプロトン緩和時間に与える影響は少ないことを示すものと考えられた。むしろ ¹H-T₁ 時間や ²³Na 濃度を変化させる重要な因子は、細胞内環境の変化よりもナトリウム・ポンプに代表される様な細胞膜の構造と機能の発達が重要と考えられた。

NMR の医学への応用としては、¹H-NMR による骨格筋の断層線¹⁰⁾が呈示されたり、TMR による進行性筋ジストロフィー症やミオパチーの診断¹¹⁾などその応用は徐々に広がりつつある。

文 献

- 1) Gadian DG: Nuclear magnetic resonance and its application to living systems. Clarendon press, Oxford, 1982.
- 2) Kaufman L, Crooks LE, Margulis AR (editors): Nuclear magnetic resonance imaging in medicine. Igaku-Shoin, Tokyo, 1981.

- 3) Urry DJ: On the role of molecular biophysics in biomedical research. *Ala J Med Sci* 13: 260-267, 1976.
- 4) Hazlewood CF, Nichols BL: Changes in muscle sodium, potassium, chloride, water and voltage during maturation in rat: An experimental and theoretical study. *Johns Hopkins Med J* 125: 119-133, 1969.
- 5) Hazlewood CF, Ginski JM: Skeletal muscle electrolytes as a function of age in normal and dystrophic mice of strain 129. *Johns Hopkins Med J* 124: 132-138, 1969.
- 6) Hoh JFY, Salafsky B: Intracellular electrolytes in dystrophic mouse muscles. *Exp Neurol* 37: 639-642, 1972.
- 7) Hazlewood CF, Chang DC, Nichols BL et al: Nuclear magnetic resonance transverse relaxation time of water protons in skeletal muscle. *Biophys J* 14: 583-606, 1974.
- 8) Czeisler JL, Swift TJ: A comparative study of sodium in muscle tissue and ion exchange resins through the application of nuclear magnetic resonance. *Ann N Y Acad Sci* 204: 261-273, 1973.
- 9) Hazlewood CF, Nichols BL, Chang DC et al.: On the state of water in developing muscle: A study of the major phase of ordered water in skeletal muscle and its relationship to sodium concentration. *Johns Hopkins Med J* 128: 117-131, 1971.
- 10) Ordidge RJ, Mansfield P, Coupland RE: Rapid biochemical imaging by NMR. *Br J Radiol* 54: 850-855, 1981.
- 11) Edwards RH, Dawson MJ, Wilkie DR et al: Clinical use of nuclear magnetic resonance in the investigation of myopathy. *Lancet* 27: 725-730, 1982.

会 員 募 集 に つ い て

本研究会では、会員を募集しております。入会御希望の方は下記宛お申し込み下さい。
入会申込書をお送りします。

〒280 千葉市亥鼻 1-8-1
千葉大学医学部放射線医学教室内
核磁気共鳴医学研究会
電話 0472-22-7171

本会は核磁気共鳴の医学利用およびこれに関連のある研究の連絡提携および促進をはかり、もって学術の発展に寄与することを目的として、その達成のためにつきのような事業を行ないます。

- (1) 研究会等の学術的会合の開催
- (2) 会誌等の発行
- (3) その他目的達成に必要な事業