

¹H-NMR法による家兎骨格筋の中の自由水の挙動に関する研究

¹H-NMR Investigation of the Motion of Free Water in Rabbit Skeletal Muscle

土橋宣昭 (福島県立医科大学 RI 研究室)

長谷部亨 (福島大学教育学部)

キーワード

¹H-NMR (プロトン核磁気共鳴), T_1 (スピナー格子緩和時間), FID (自由誘導減衰), DTA (示差熱解析), skeletal muscle (骨格筋), motion of free water (自由水の運動), temperature dependence of T_1 (T_1 の温度依存性), freezing temperature (凍結温度), activation energy (活性化エネルギー)

要 旨

筋肉中の水分の約90%を占める成分—自由水—について、この水分子の組織内での分子運動を明らかにするために、摘出兎大内転筋を試料に¹H-NMRの T_1 の温度依存性、示差熱解析(DTA)を行った。DTA装置は自作のもの、NMR装置はBruker Pulse NMR CXP 4-60で、パルス系列は $(\pi/2)_n - \tau - (\pi/2)$ 、15 MHzの周波数で観測した。試料は摘出後3~4時間以内に測定開始したもの、氷冷保存3日のもの、一度凍結乾燥したものに蒸留水を加え自由水を復元したものである。これらの T_1 の解析から、それぞれの試料の状態での水分子の運動について 10.6 ± 1.3 , 23.1 ± 4.1 , $17.9 \pm 3.3 \text{ kJmol}^{-1}$ の活性化エネルギーの値を得た。また、DTAに現われた熱異常と T_1 の温度依存性の異常とはよく一致し、これらは試料の状態変化によるものであることが明らかとなった。さらに、DTAと T_1 の温度依存性の併用観測が組織内の自由水の研究に有用であることも示された。

1 はじめに

NMR 法は生体組織を破壊することなく、その構成成分の化学分析、化学構造およびその動的情報を得ることが可能であり、医学応用の面からその有用性に期待できることが多い。

生体系の中で筋肉をとりあげた場合、組織成分の80%を占める水分のプロトン (^1H) が $^1\text{H-NMR}$ の良き観測対象となることは容易に理解できるところである。Hazlewood 等¹⁾ はラットの筋肉について、 $^1\text{H-NMR}$ 吸収線形の研究から筋肉中の水分に二種類あることを報告している。この二種類の水分とは、その一つが10%以下の量で組織内のタンパク質等生体高分子と結合して束縛度の高い成分 (A 成分)—普通一般に結合水とも呼ばれている—であり、もう一つはその大部分を占める比較的自由度の高い成分 (B 成分)—自由水とも呼ばれている—である。自由度の高い B 成分であっても純水と比較すると水分子の運動はかなり束縛されていることが、いくつかの緩和時間の測定研究²⁾ から明らかになっている。さらに、この A、B 両成分の間には、 $^1\text{H-NMR}$ の差ばかりではなく、重水との交換性、凍結温度等にも明確な差が見出されている。Hazlewood 等の報告をはじめ、通常、筋肉の $^1\text{H-NMR}$ 測定で問題となるのは、この B 成分 (以後これを自由水と呼ぶ) であり、他の軟部組織においてもほぼ同じことが言える。

Damadian が癌組織中で、この $^1\text{H-NMR}$ のスピナー格子緩和時間 (T_1) が増大することを発見³⁾ して以来、 $^1\text{H-NMR}$ の緩和時間の測定も、臨床上その有用性が明らかとなってきた。Damadian の報告した $^1\text{H-NMR}$ の T_1 は自由水のプロトンであり、この T_1 の測定から自由水の運動を研究することによって、正常組織と腫瘍組織とを分子レベルで比較できる。この意味で $^1\text{H-NMR}$ の緩和機構の解明も重要な課題となっている。

自由水のような比較的運動の自由度が高い状態では、その運動を研究するのに T_1 の温度依存性の測定が有効な手段である。また、自由水の状態変化に伴う熱変化の解析も有効である。

我々は摘出した家兎の正常大内転筋について、摘出後の履歴の差によって、自由水の状態がどのように変化するかを $^1\text{H-NMR}$ の T_1 の温度依存性と示差熱解析をもとに考察した。

2 実験

(i) 試料

日本白色家兎 (体重 3~4kg) の大内転筋を試料とし、見える範囲の脂肪や神経が混入しないように注意をはらいつつ、ペントバルビタールナトリウム麻酔下に放血して所要部を摘出した。特にことわらない限り試料は摘出後測定まで (この間 2~3 時間) 氷冷保存をした。試料の所要量を NMR 試料管 (外径 10mm, 内径 8mm) および DTA 試料管 (外径 8mm, 内径 6mm) に挿入し、それぞれ塩化ビニールのキャップを用い密栓した。

(ii) NMR

$^1\text{H-NMR}$ の T_1 の測定は Bruker Pulse NMR CPX4-60 を用い、共鳴周波数 15.0MHz で、 $\{(\pi/2)\text{comb}-\tau-(\pi/2)\}$ のパルス系列を用いた飽和磁化回復法によって行った。この場合、磁化の飽和に用いた $(\pi/2)\text{comb}$ では、パルス間隔 (t) はスピンスピン緩和時間 (T_2^*) よりも長く、 T_1 よりも充分短い時間 (5~10ms, 乾燥肉の場合は 200 μs) をとった。また磁化 (M_z) の回復は τ の値が T_1 の約 3 倍の長さまで測定した。以上をまとめて図 1 に示した。乾燥肉の場合は、信号強度が弱かったので 8 回の積算を行った。この時用いた装置は、川崎エレクトロニカ社製トランジェントメモリー (M-50E) と高速アベレージャー (TMS-400) である。 $\ln\{M_0 - M_z\}/M_0$ と τ のグラフ (ここで M_0 は磁化の完全回復値であ

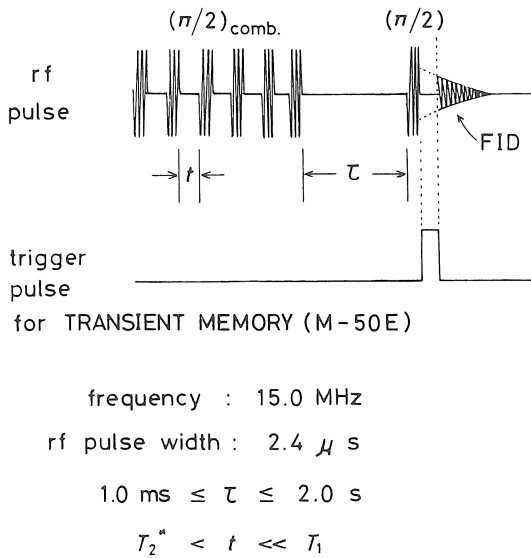


図 1 rf pulse sequence and experimental conditions () は、誤差の範囲では直線であったので、この傾きから T_1 の値を求めた。

T_1 は 245 K から約 320 K までの温度範囲を、自作の NMR 用クライオスタット⁴⁾ を用いて測定した。温度はクロメル P/コンスタンタン熱電対を試料管の底に密着して測定した。温度の確度は測定値の ±0.3 K 以内、 T_1 測定中の温度制御は設定値の ±0.1 K 以内で行った。

(iii) 示差熱解析 (DTA)

DTA は自作の装置⁵⁾ を用い、種々の試料に対して温度下降・上昇の両方向で測定し、温度変化は毎分 0.5~1.6 K の速さで行った。温度の測定は熱電対を毛细管に入れ、これを試料の中心部に挿入して行った。温度の確度は測定値の ±0.3 K 以内である。

3 結 果

新鮮な試料について、 T_1 の温度依存性を $\ln T_1$ と T^{-1} のグラフとして図 2 に示した。268.7 K から 318.3 K の温度範囲では、温度上昇に伴って T_1 の直線的増加がみられた。また、DTA の結

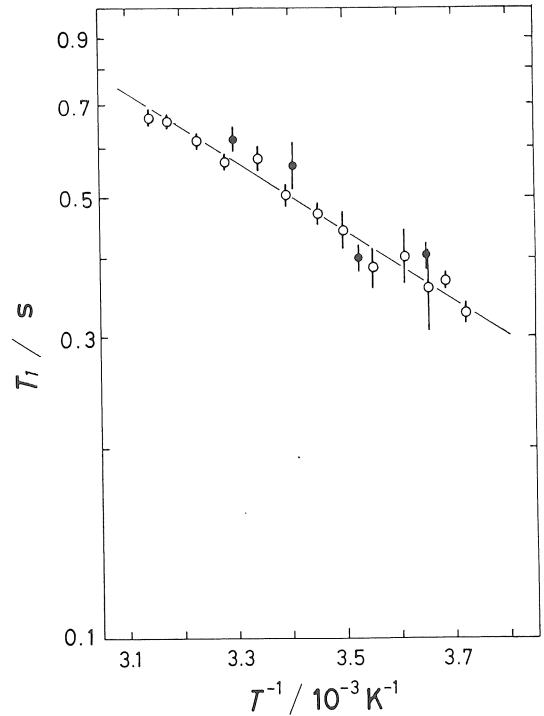


図 2 Temperature dependence of the T_1 for free water in adductor femoris magnus of a rabbit. The tissue was stored on ice for three hours after dissection. Open and closed circles are data from two muscle samples.

果は 261 K~264 K で凍結し、313 K~323 K でごく小さな熱異常を示した。温度下降の方向で、凍結点における T_1 の値は約一桁小さくなり、高温側の熱異常点付近においては直線的増加からややはずれてきた。

摘出後 190 K で凍結保存した試料の場合は、図 3 に示すように T_1 の温度依存性の傾きは、新鮮な試料の場合と同じであったが、その値は 20% 程度小さく得られた。また、温度上昇に伴って 303 K 付近から T_1 の直線的増加がにぶり、0.5 s 程度の値で一定になった。DTA の結果は温度上昇方向に 306 K で発熱の異常がみられ、また、下降方向では、前者の凍結温度よりはやや高い 267 K で凍結による発熱がみられた。

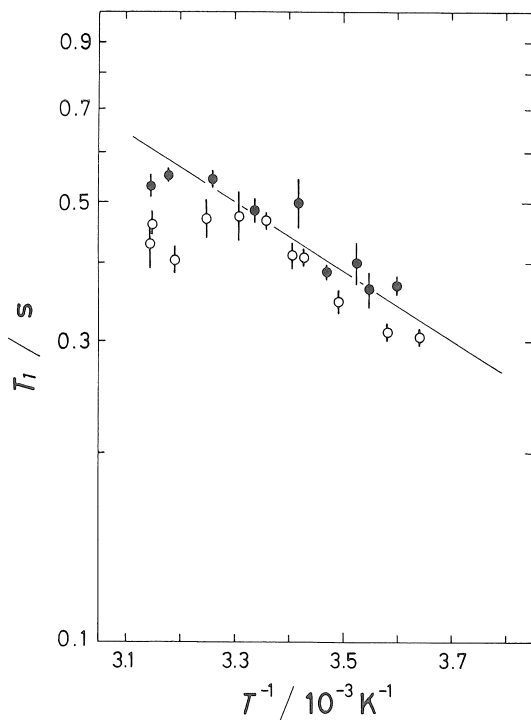


図 3 Temperature dependence of the T_1 for free water in adductor femoris magnus of a rabbit. The tissue was stored at 190 K overnight. Open and closed circles are data from two muscle samples.

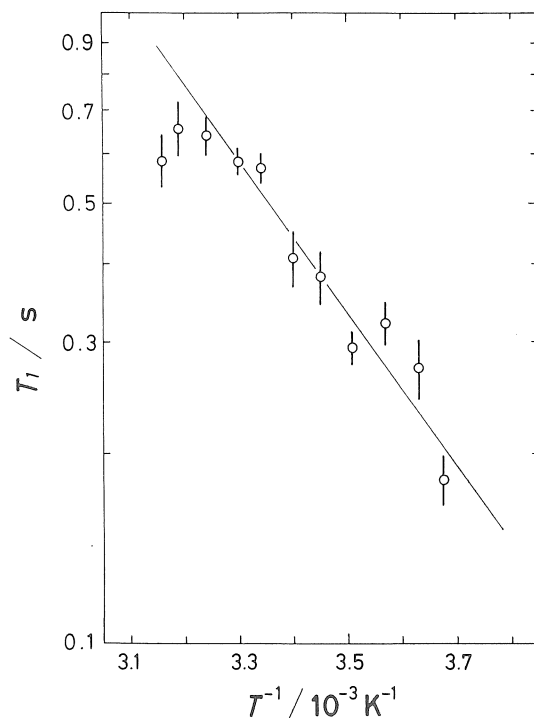


図 4 Temperature dependence of the T_1 for free water in adductor femoris magnus of a rabbit. The tissue was stored on ice for three days.

次に、3日間水中にて保存した肉では、268.6 K から 316.7 K までの T_1 の温度依存性が前二者と全く異なった。図 4 に示したように、270 K の T_1 の値は、前二者の場合の 1/2 の 0.2 s 程度であるが、室温付近の 300 K ではほぼ等しい 0.5 s の値をとった。また、DTA の結果では温度下降方向で 266 K ~ 267 K の範囲に凍結による発熱がみられ、この凍結点においては T_1 の値がおよそ一桁小さくなった。高温側では新鮮な試料の場合よりもかなり低い 300 K で熱異常を示し、 T_1 の温度依存性も直線的増加をやめ、0.6 s 程度の一定値を示した。

摘出後直ちに凍結乾燥し、組織中の自由水を除去して得た試料の T_1 の温度依存性を図 5 に示し

た。この試料の FID 信号の長さは前三者と異なり約 1/20 に減少し、かつ、図 5 の上部に示したように、 T_2^* の異なる二成分が観測された。この二成分のそれぞれの T_1 測定には図 1 に示したトリガーパルスの幅を利用し二成分の重なり部分をさけた。そして T_2^* の短い成分と長い成分について T_1 の温度依存性を求め、それぞれ ○ 印と ● 印で示した。これらの T_1 には誤差の範囲をこえた差は見られなかったが、前三者の T_1 の値よりもおよそ一桁小さかった。また、明確な温度依存性もみられなかった。一方、これら T_2^* の長い成分、短い成分は吸収線幅に換算するとそれぞれ 10^3 Hz と 10^4 Hz のオーダーとなり、Hazlewood 等¹⁾ の報告している水分の A 成分と生体高分子物質等

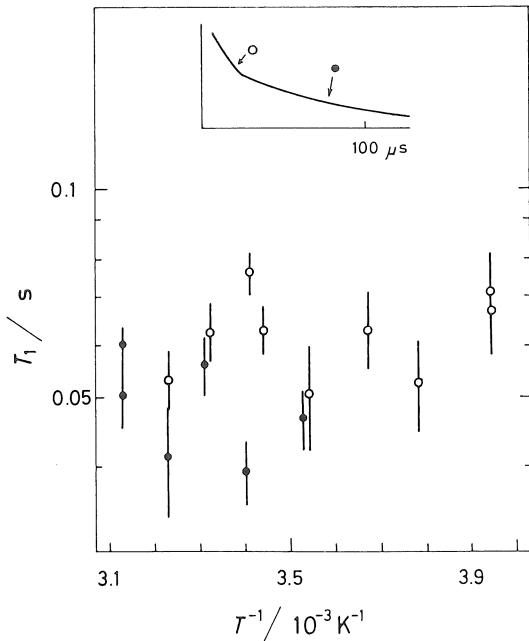


図 5 Temperature dependence of the T_1 for lyophilized adductor femoris magnus of a rabbit. The FID signal is illustrated in the upside part of this figure. Open and closed circles denote the short T_2^* component and the long T_2^* component, respectively.

に含まれる ^1H の吸収線幅に対応している。

この乾燥肉を蒸留水に浸し、ろ紙を用いて不用の水分を十分に除去した試料について、 T_1 の温度依存性の測定を 247.9 K から 315.4 K の範囲で行った。 T_1 の測定中温度下降の方向で 265.3 K に凍結に伴う発熱がみられたが、FID 信号に変化はみられなかった。しかし、 T_1 の温度依存性にはこの温度を境に変化がみられた (図 6 参照)。 T_1 において、この試料と前三者との大きな差は温度依存性の傾きもそうであるが、凍結後の温度依存性にその特徴的变化がみられたことである。DTA では、温度下降方向で 265.9 K に凍結に伴う発熱がみられ、温度上昇で 306.7 K に熱異常が観測された。

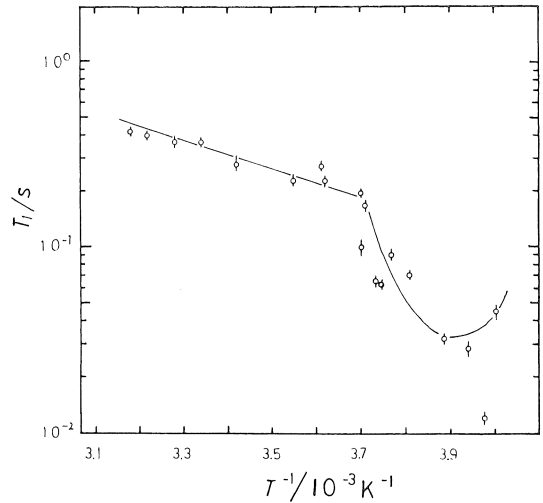


図 6 Temperature dependence of the T_1 for free water restored in lyophilized adductor femoris magnus by soaking it in distilled water (see text).

4 考察

本研究では一試料の測定に数時間以上を要した上、著者らの所在の位置的環境から摘出直後の測定は行い得なかった。Chang 等⁶⁾の報告している二成分の $^1\text{H-NMR}$ の T_1 については、これらの成分が混入しないようにパルス系列、パルス間隔等測定条件の設定に注意をばらうと共に、摘出後 4 時間以降のデータを用いた。

各種試料における T_1 の温度依存性は、乾燥肉を除けば温度上昇に伴って T_1 の対数的増加となった。このような現象は種々の実験および経験から、 T_1 を支配する緩和が磁気双極子相互作用であり、試料中の水分子の運動がかなり励起しているということがわかる。しかし一方では、摘出した組織の温度変化による破壊等を考慮にいれなければならないが、この点については DTA—これは組織の破壊等構造上の変化および状態の変化が生じた時は熱異常として観測できる—を行い確認しておいた。これら DTA のチャートを図 7 に

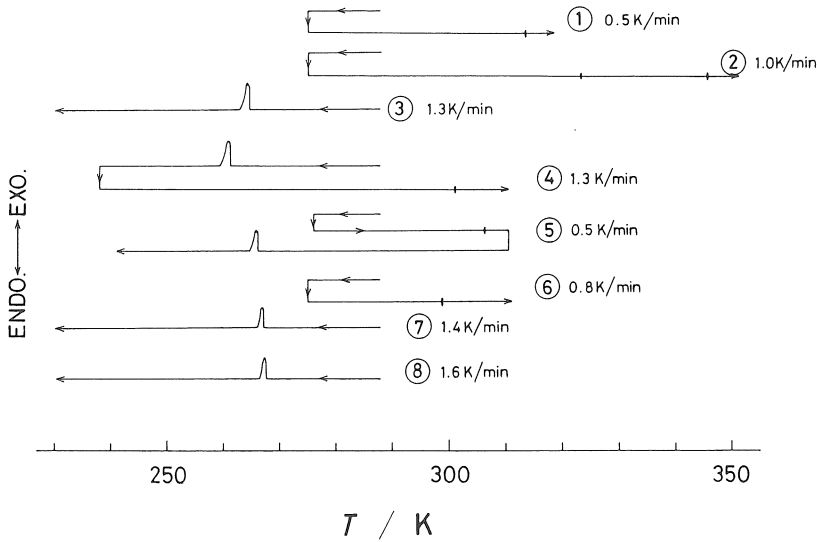


図 7 DTA chart of various conditions of adductor femoris magnus of rabbits. The mark (—|—) denotes the temperature of thermal anomaly. The samples were stored after dissection on ice for ① 1.5 hrs., ② 3.5 hrs., ③ 6 hrs., ④ 9 hrs., ⑤ 4 hrs., ⑥ 13 days, ⑦ 9 days, and ⑧ overnight at 190 K, respectively.

まとめた。この結果から摘出後の履歴のちがいは組織の温度変化に対する抵抗力の度合の差がわかる。すなわち、温度下降時の凍結温度と温度上昇時の高温側の熱異常との間隔は新鮮なもののほど広く、凍結することや、時間経過によってこの温度幅がせまくなっている。DTA で観測された熱異常の温度と、 T_1 の温度依存性にみられた異常とがよく対応していることなどから、 $\ln T_1$ と T^{-1} のグラフの直線範囲では、 T_1 の温度依存性と水分子の運動とを結びつけた議論が十分に妥当なことであると言える。また、乾燥肉以外で測定した $^1\text{H-NMR}$ の信号が自由水のものであることは、乾燥肉の $^1\text{H-NMR}$ の FID 信号と T_1 の温度依存性の比較からも明確なことである。

水分子の運動が充分速く起っている場合、 T_1 と運動の相関時間 $\alpha\tau_c$ との間には、

$$T_1^{-1} \propto \tau_c \quad (1)$$

の関係が成り立つ。また、 τ_c に Arrhenius 型の温度依存性

$$\tau_c = \tau_0 \exp(E_a/RT) \quad (2)$$

を仮定すると、(1), (2) 式を用いて

$$\ln T_1 = -E_a/RT + C \quad (3)$$

の関係式が得られる。ここで、 E_a は水分子の運動の活性化エネルギー、 R は気体定数、 C は温度・活性化エネルギーに関係しない定数である。(3) 式を用い $\ln T_1$ と T^{-1} のグラフの傾きから各試料の E_a を求めその結果を表 1 に示した。

表 1 Activation energies of motion of free water in rabbit adductor femoris magnus

specimen	activation energy E_a/kJmol^{-1}
fresh sample	10.6 ± 1.3
nonfresh sample	23.1 ± 4.1
water-soaked	
lyophilized sample*	17.9 ± 3.3

*See the caption of Fig.6

新鮮な肉の場合 $10.6 \pm 1.3 \text{ kJ mol}^{-1}$ の E_a の値を得たが、これは純水について報告されている値 (20 kJ mol^{-1})²⁾ に比べると約 1/2 である。このことは、この自由水が純水の水分子の運動とは異なっていることを意味している。Hazlewood 等¹⁾ が $^1\text{H-NMR}$ の吸収線形の研究でも指摘しているように、 $^1\text{H-NMR}$ で観測している水分子の運動は純水中で観測されるような自己拡散ではないと考えられる。すなわち、生体高分子物質と A 成分を通しての水素結合等の分子間結合のため、自己拡散が純水のように自由に起り得ず、水分子はかなり束縛された運動をしているものと考えられる。このような状況下での分子運動は水分子の回転的再配向運動 (molecular reorientation) と考えるのが妥当であり、水素結合を切断しなければならぬ自己拡散の場合の活性化エネルギー ($20 \sim 30 \text{ kJ mol}^{-1}$) と比較しても十分に理解できる。

さて、鮮度の低い肉に関しては、まさに時間経過に伴う生体内物質の化学的变化がおこっていることが NMR による吉川等⁸⁾ の報告にもみられるが、このような成分の変化によって、組織内の高分子物質の自由水に対する束縛力が劣り、運動の自由度は増す。すなわち、温度上昇に伴って分子運動の励起が顕著になることが予想される。これは図 4 に示した T_1 の温度依存性に著明に現われている。また、得られた活性化エネルギーの値が $23.1 \pm 4.1 \text{ kJ mol}^{-1}$ と新鮮な試料の場合と比べてかなり大きくて純水のそれに近く、水素結合のエネルギーと対応している事等、この場合は T_1 を支配する運動が束縛された分子の再配向ではなく、自己拡散によるものと考えられる。これらの運動の相異は、図 2、図 4 にみられるように、室温付近の T_1 の値のみの議論からでは明確に結論できないことである。

自由水の T_1 を議論する際に、Fung 等^{2b)} のラット骨格筋についての報告にもあるように、A 成分の効果も考慮しなければならない。そこで自由

水と、自由水成分を除いた成分 (A 成分、その他生体高分子) との信号強度を比較するために凍結乾燥肉の T_1 の温度依存性の測定を行った。同じ体積の試料では、積算をしなければ FID 信号が雑音レベルの中に入ってしまうこと、FID の長さが約 1/25 に短くなってしまうこと、また、 $\ln T_1$ と T^{-1} のグラフの直線部分を議論の対象としたことなどから、我々は、Fung 等のような T_1 の解析法は用いなかった。

また、この自由水の運動と生体内物質の変化に関する情報を得るためにも、摘出後直ちに凍結乾燥した肉 (この試料では自由水以外の成分の化学変化が少ないと考えられる) に蒸留水を加え、その水について T_1 の温度依存性の測定を行ったのであるが、この試料の外見および $^1\text{H-NMR}$ の FID 信号は新鮮な肉とあまり変わらなかった。しかし、その温度依存性は鮮度の低い肉と良く似ていたが、凍結による発熱がみられたにもかかわらず前二者の試料とは異なって FID 信号には大きな変化がみられなかった。凍結以前の領域の温度依存性から求めた E_a の値は $17.9 \pm 3.3 \text{ kJ mol}^{-1}$ と純水のそれとかなり近いこと等から、凍結乾燥によって「生体」という状態を変え、そこに再び自由水を再現しても、その自由水は新鮮な肉の自由水とはだいぶ異なることが明らかとなった。この実験からもわかるように、自由水の運動におよぼす摘出後の履歴の効果は生体組織内成分の化学的变化ばかりでもないように考えられるが、これまでの実験結果のみからは、これ以上の議論はつづみたい。

吉川等^{8,9)} は、このようなことを議論する際には、トリグリセリドやグルコースのように水よりも T_1 が短く化学シフトが異なる成分をも考慮した解析の必要性を指摘している。しかし、本研究では観測周波数が 15.0 MHz と低く、高分解能で測定したとしてもこれらの化学シフトは明確には観測されないこと、また乾燥肉の $^1\text{H-NMR}$ の信号からも明らかのように、自由水を除いた成分の

信号強度が極端に小さいこと等から、これらの成分の FID 信号への寄与は誤差の範囲とみなされよう。したがって、自由水の運動に関するこれまでの議論は充分になされているものと考え、しかし、自由水に由来する以外の ^1H の信号が大きいような組織に関して、 T_1 の緩和機構を解釈する際には、彼等の指摘するような点は充分に考慮されなければならないと思う。

自由水に関して、生体組織内での動的情報等新しい知見を得るためには、本研究で行ってきたように、 T_1 の温度依存性の測定が有効な手段であることは明らかである。さらに、DTA 法との比較等も加味すれば腫瘍³⁾、浮腫⁸⁾ 等で T_1 の値が変化する現象の原因を解明するための一助となることも明白である。現在、我々自身は腫瘍化による緩和時間の変化について以上述べてきた方法と観点から考察してみようと準備中である。

兎筋肉試料の提供を受けた福島県立医科大学薬理学教室 中畑則道博士、生体中の水に関して有益な助言を頂いた福島大学教育学部 小田健二教授に対し謝意を表す。

本研究は昭和 57 年度文部省科学研究費補助

金の交付を受けて行われた。

文 献

- 1) C.F. Hazlewood and B. L. Nichols: *Nature* **222**, (1969) 747
- 2) a) P.S. Belton, R.R. Jackson and K.J. Packer: *Biochim. Biophys. Acta* **286**, (1972) 16
b) B.M. Fung and T.W. McGaughy: *ibid* **343**, (1974) 663
c) C.F. Hazlewood, D.C. Chang, B.L. Nichols et al.: *Biophys. J.* **14**, (1974) 583
- 3) R. Damadian: *Science* **171**, (1971) 1151
- 4) 植野松男, 佐藤修一, 長谷部亨: 福島大学理科学報告 32 号, (1982) 29
- 5) 小針 剛, 長谷部亨: 同誌 30 号, (1980) 23
- 6) D. C. Chang, C. F. Hazlewood and D. E. Woessner: *Biochim. Biophys. Acta* **437**, (1976) 253
- 7) G. S. Bystrov, N. I. Nikolaev and G. I. Romanenko: *Biofizika* **18**, (1973) 484
- 8) 吉川研一, 逢坂 昭, *化学の領域* **35**, (1981) 174
- 9) K. Yoshikawa and A. Ohsaka: *Physiol. Chem. & Physics* **12**, (1980) 515