

総説

医学，生理，薬理の分野における new device としての NMR

NMR Spectroscopy as a New Device in the Medical, Physiological and Pharmacological Field

三浦 巖 (大塚製薬(株)徳島研究所)
中山夏樹 (同 上)
長本 尚 (同 上)
細川哲見 (同 上)
山下修司 (同 上)
藪内洋一 (同 上)
中川量之 (同 上)

キーワード

^{31}P NMR, high-energy metabolite, intracellular pH, Perfused beating animal heart

要旨

The NMR spectrometer which is commonly used in chemical research was modified to be used on physiological studies of cell function in animal organs and other intact tissues. The new system was applied to continuously and non-invasively monitor the levels of phosphorus compounds, intracellular pH, cardiac functions and coronary flow of perfused beating guinea pig heart. The levels of intracellular pH and phosphorus compounds were possibly monitored in as little as 0.5 to 1 minute period. In the ischemic heart, ventricular contractility and creatin phosphate decreased remarkably and pH was shifted to acid value. In addition, the stimulation of heart rate or ventricular contractility showed greater influence on levels of pH and high-energy metabolites in the ischemic condition than those in normal condition.

1 はじめに

NMR スペクトルは様々な原子核に固有な化学シフト, スピン-スピンカップリングとか緩和時間等の物理定数を示し, その値から試料中に含まれる原子核の種類, 数, 電子状態さらには相互の結合関係とか立体的環境等いわゆる, 分子構造の知見を得ることができる. 従って, これまでは複雑なタンパクを含む天然物や合成化合物の構造研究をはじめとする化学交換とか分子間相互作用の研究など主として化学の分野で応用されていた. NMR の最大の特徴は測定の対象となる試料の形状や色にこだわることがなく, しかも無侵襲でかつ連続的な観測の可能な点があげられる. この特徴は化学物質を対象とする場合よりも, むしろ生体試料に大きなメリットとなり, 以前から医学や生理ならびに薬理の分野の研究者から注目されていた. しかしながら, 従来の装置は磁場の均一な面が狭く, 不均一で大きな生体試料では満足なデータを得ることはできなかった. 最近の装置は均一な面の広い超伝導磁石を採用して上にも, パルス NMR 法による高速積算が可能になっているため, 低感度でしかも微量の物質の検出ができる様になり, 動物の摘出臓器や犬とか猫さらには人体の臓器や器官内の水素原子をはじめとするリン, 炭素, ナトリウム等の観測がまるごとの状態でできる様になった. それは生体の解剖学的情報や細胞の機能と密接に関係する生化学的情報を得るための新しい研究手段として注目され始め, 応用研究も盛んに行われている. 中でも生体の活力と密接な関係にあるエネルギー代謝に關与する ATP 等のリン酸化化合物の代謝および細胞内 pH

に関する重要な知見を提供する可能性を秘めたリンの検出感度の改善に努力がそそがれている^{1), 2)}. ³¹P NMR のもたらす情報は病気で悩む患者を救うための診断や治療効果の判定とか基礎医学から薬理にわたる広い分野に共通する情報を提供するものとしての期待も大きい³⁾. 最近我々は灌流心臓のいろいろな生理的条件変化に伴う代謝の変化を 0.5 分-1 分間隔でしかも物理的運動機能と冠血流に関する情報が同時にかつ連続的に得ることの可能な装置を製作したので, それから得られる基本的な情報をここに紹介する.

2 NMR で検出可能な原子核

NMR シグナルとして検出の可能な原子核には, ¹H, ²H, ¹³C, ¹⁴N, ¹⁵N, ¹⁷O, ¹⁹F, ²³Na さらには ³¹P など多くのものがあるが, 現在の技術で生体から感度良く測定できるのはプロトンやリン, ナトリウム, そしてフッ素ぐらいで, 化合物としては表 1 に示すものが観測できる.

表 1 NMR で観測できる生体内物質

原子核	NMR の種類	化 合 物
¹ H	¹ H NMR	水, 脂質, ラクテート
²³ Na	²³ Na NMR	Na イオン
³¹ P	³¹ P NMR	ATP, ADP, Pcr, Pi, Ps, NADH
¹³ C	¹³ C NMR	糖, 脂質, アミノ酸
¹⁹ F	¹⁹ F NMR	薬物

また, NMR から得られる情報は NMR シグナルを画像化した解剖学的情報と機能変化をもたらす化学反応を捉えた生化学的情報の二つに大別され, その応用としてはそれぞれ図 1 と図 2 に示すものが期待されている. 図 2 に示す生化学的情報は細胞機能の根幹を示すものであり, それは, 臨床から基礎にわたり共通する情報であることから, 相互の結びつきを強めるものとして期待できる.

受 付 1985 年 11 月 19 日
 最終稿受付 1985 年 11 月 19 日
 別刷請求先 (〒771-01) 徳島市川内町加賀須野
 463-10
 大塚製薬 (株) 徳島研究所
 三 浦 巖

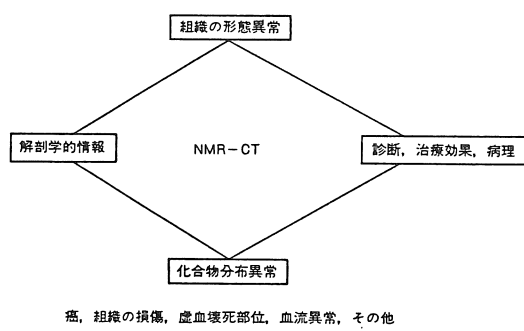


図 1 生体用 NMR の期待される応用-1

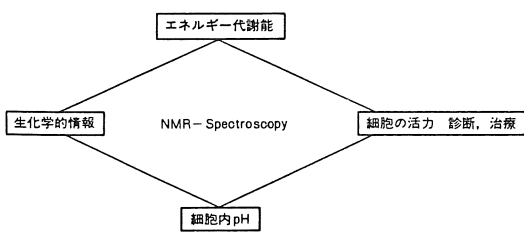


図 2 生体用 NMR の期待される応用-2

3 ³¹P NMR によるエネルギー代謝能の観測

細胞の生命力は高エネルギーリン酸である ATP のたゆまなき供給によって支えられており、ATP とその関連物質である Pcr や ADP, AMP, Pi 等のレベルさらには細胞内の酵素活性の指標

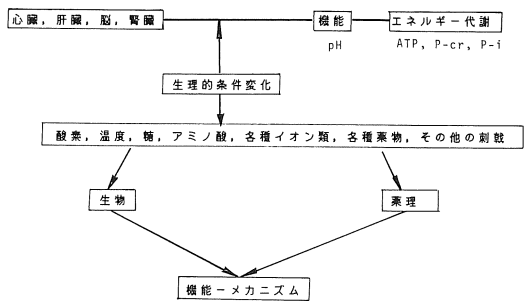


図 3 まるごとの生化学の試み
動物臓器の各種生理的条件変化に伴う機能とエネルギー代謝の関係の解析

とも考えられる細胞内 pH が観測できれば、その細胞の活力を知ることができる。従って、もし、色々な生理的条件変化に伴う体内臓器や器官の機能とリン酸化合物の変化を同時に無侵襲でかつ連続的な観測が可能になるなら、生理ならびに医学的に有用なまったく新しい情報を提供する可能性がある。その可能性を秘めているのが以下に述べる ³¹P NMR 法である。以下、NMR という手法によって生体内の生化学的情報をどの程度知ることが可能かと言う点について実験事実を述べる。

4 生体の示す ³¹P NMR スペクトル

図 4 は上記の目的で開発した装置で測定した、摘出心筋の示すリンの NMR スペクトルである。このスペクトルは心筋細胞内に含まれるリン酸化合物の含量と細胞内の pH に関する情報を示している。スペクトルの横軸は化学シフトと呼び各々のリン原子の共鳴点を示し、それは電子密度や磁気的環境によって支配されるもので分子の同定に利用できる。縦軸はシグナルの強度でその積分値から化合物の含量を知ることができる。各々のシグナルの帰属は既知物質のものとの比較によって行うが、左側から Ps, AMP, Pi, P_α, ADP (2.44, 7.59), ATP (2.44, 7.59, 16.07) と帰属される^{3),5)}。Pi のシグナルが 2 本観測されているが、高磁場(右)側のシグナルが細胞内の Pi で左側のシグナルが外のものである。Pi の化学シフトは pH 変化に依存することが知られており²⁾、その変化から細胞内 pH の変動を知ることができる。

従来、このようなエネルギー代謝に関与するリン酸化合物の情報を得るためには、生化学的手法しか無く、色々な生理的条件下におけるデータを得るのは大変困難なことと言われていた。しかし、上のスペクトルに見る様に、NMR によってその様な情報が容易に、しかも、無侵襲でかつ連続的に得られる可能性が示唆された。

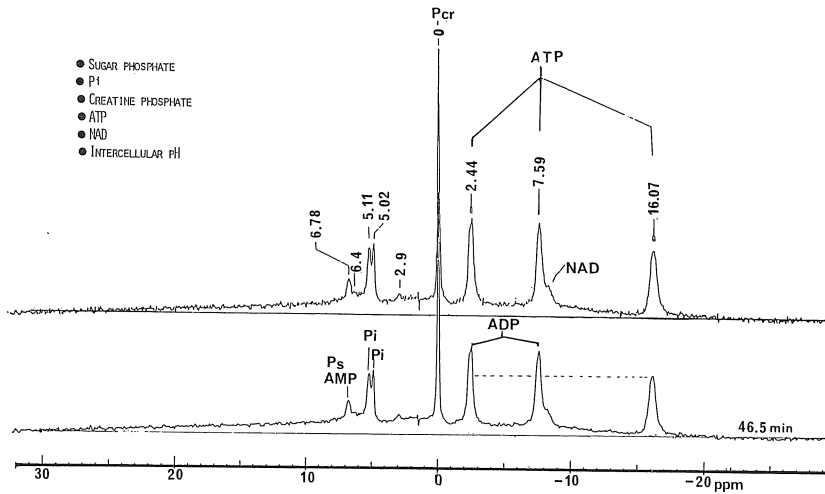


図 4 灌流心臓の示す ^{31}P NMR スペクトル

- A New Multipurpose Biological (NMR) Research System -

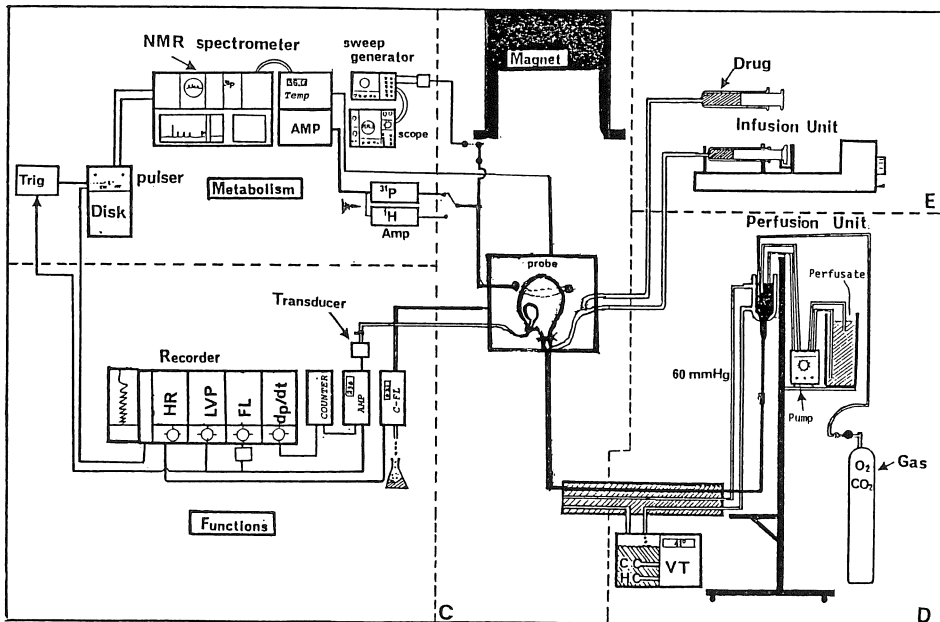


図 5 エネルギー代謝研究用 NMR の概略図

5 NMR の装置

NMR を生体のエネルギー代謝に関する研究に
 応用する場合、細胞自身の仕事量を知ることは不
 可欠と考えられるが、図5はその目的に合せて製
 作した装置の概略図であり、心筋の物理的機能と
 リン酸化合物を中心とする細胞の生化学的情報も
 同時に観測のできる多重機能測定装置になってい
 る。物理的機能は左心室に挿入した風船に加わる
 圧力を圧トランスデューサーで電気信号に変換し
 て記録し、生化学的变化は ^{31}P NMR のシグナル
 の変化から観測できる。なお、嫌氣的代謝で産
 生する乳酸のレベルは ^1H NMR で観測ができる。
 均一性に乏しい生体試料の場合は通常の化学物質
 とは異なり、とかく静磁場の均一性を大きくみだ
 するため、口径の小さい磁石の場合には一定の分解
 能を得るには大変な熟練を要するが我々の用いた
 口径が9cmの磁石では2g程度の臓器の測定が
 可能である。しかし、成人の手足や新生児とか犬
 や猫の脳や臓器の測定にはボア径が30cm程度
 のものが必要となる。

6 NMR シグナルの検出感度

心筋の生理的条件変化に伴う機能の変化は図6
 に示す様に非常に速い、従って、機能変化に呼応し
 て変る代謝系の情報を得るためには高感度な ^{31}P
 NMR 検出器が要求される。図7は高度に調整し
 た装置で測定した摘出心筋のスペクトルを示して
 いるが、このスペクトルから明らかな様に、NMR
 は1分間隔での測定も可能な十分な検出感度を有
 していることが明らかとなった⁴⁾。これは生体細胞
 の虚血の影響とか薬物の影響が通常の方法に加
 えて、エネルギー代謝という新しいマーカーで、
 しかも無侵襲での研究が可能であることを示唆し
 た。

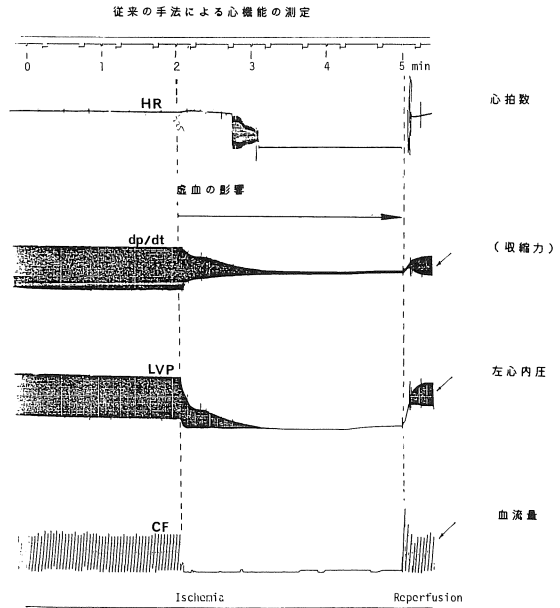


図6 心筋の物理的機能の変化

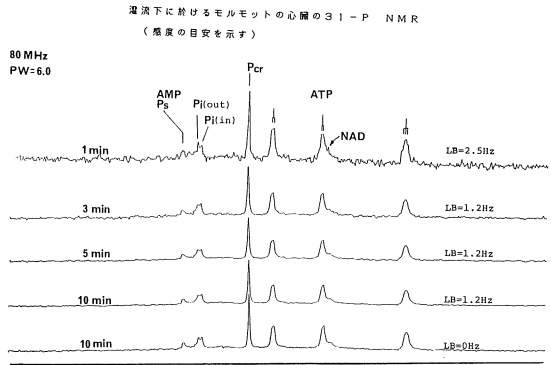


図7 ^{31}P NMR の検出感度および安定性

7 生体機能変化に対する NMR シグナルの 応答性

次の重要課題は NMR の機能変化に対するレ
 スポンスである。図9は冠血管に入る灌流液をス
 トップし、虚血にした摘出心筋の機能変化に対す

Stability of MBR System

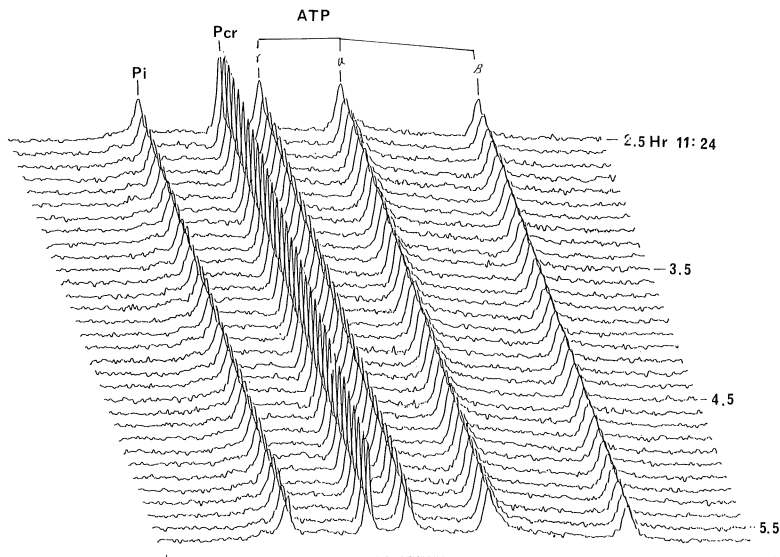


図 8 31-P NMR の検出感度および安定性

る NMR の応答性を示すものである。上から 3 つのスペクトルはコントロールで、4 つ目から 10 番目までが虚血後の経時変化で、11 番からは再灌流後の変化を記録したものであるが、図 10 にも示す様に Pi や Pcr のレベルさらには Pi シグナルの共鳴位置（化学シフト）の大きな変化等機能変化に呼応したスペクトル変化を示しており、生体機能のモニターとして十分な応答性を有することも明らかとなった。なお、このスペクトルから次のことを知ることができる。

- a 虚血により細胞内の ATP の合成能が低下すると Pcr のレベルが低下する⁶⁾。従って、Pcr レベルは細胞のエネルギーチャージの指標として利用できる。
- b 再利用されなくなった無機リンは機能が上がるまで細胞内に蓄積する。
- c 虚血後の Pi レベルの上昇に伴い細胞内 pH が次第に低下するが、Pi レベルが安定後もそ

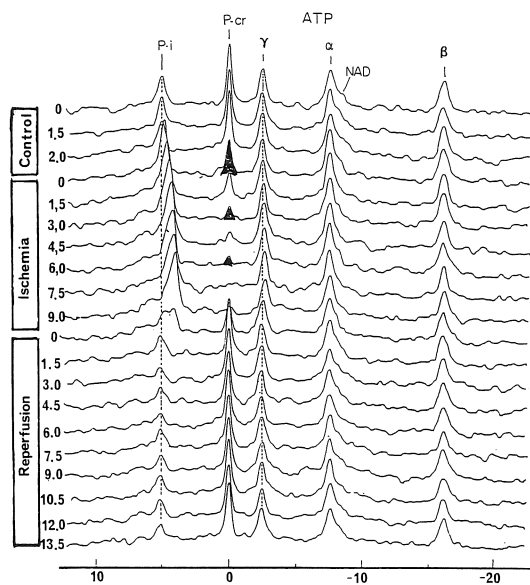


図 9 虚血に伴う ³¹P NMR スペクトルの変化 (マウス, 室温下)

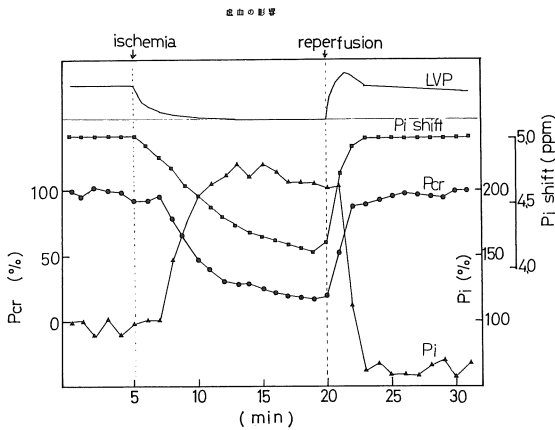


図 10 虚血に伴う機能及びエネルギー代謝の変化 at RT.

の低下が持続する。

d ATP レベルは 10 分程度の虚血ではほとんど

変化しない (室温では)。

8 心筋細胞の仕事量の上昇とエネルギー代謝

前項で紹介したものは虚血という極端な機能変化を生じさせた時のものであるが、次に細胞の仕事量の上昇とエネルギー消費に関する NMR スペクトルから得られる情報について述べる。図 11 は強心剤を持続注入した正常心筋の、仕事量とエネルギー代謝との関係を NMR を活用した多重心機能解析装置で観測した結果を示したものである。Pcr のレベルは急激な仕事量の上昇により一時は大きく低下するが暫時上昇し 20 分後にはコントロールのレベルまで回復する。しかし、薬物の注入を停止するとそのレベルは大きく上昇す

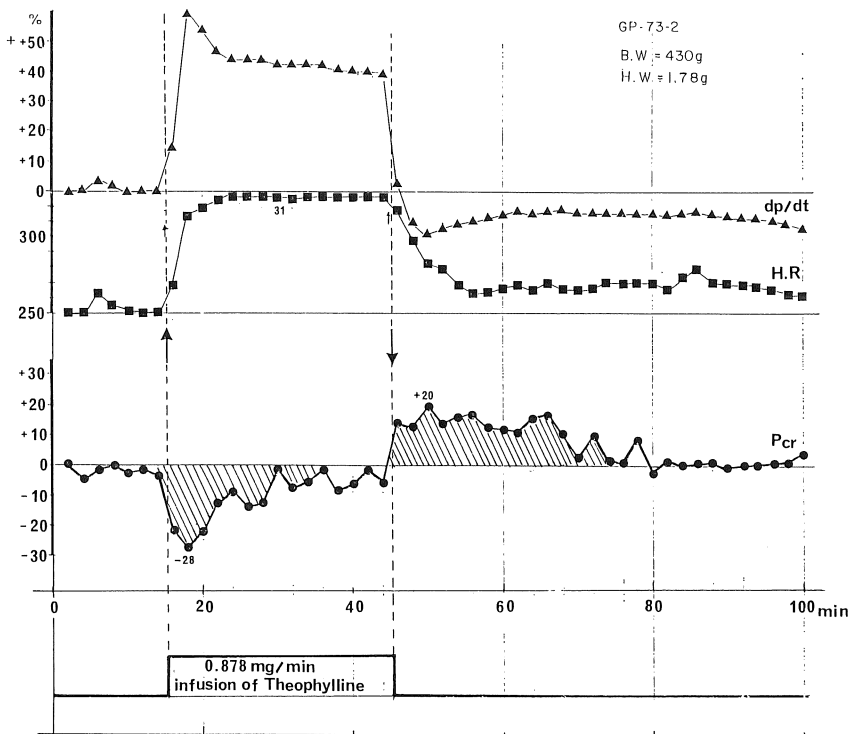


図 11 心筋の仕事量の上昇と細胞内の Pcr レベル (モルモット, 生理的溫度下)

る。このような変化は心筋細胞のエネルギー消費と産生能の関係を示すもので、薬物の種類で大きな差があり薬理機序の研究手段としても興味もたれる。

9 ³¹P NMR の応用価値

これまで述べたものは NMR の生体計測の装置としてのレスポンスの紹介が主体であったが、次にその実際的な応用を紹介する。

1 血流量の低下と心機能

酸素や糖等エネルギー産生に必要な成分を運搬する血液の流量は心臓に限らず、他の臓器や器官においてもその機能を大きく左右していると言われている。従って、その辺の情報を得ることは病体から健康体へ改善する手立てを考えるときに大きな手助けになることは言うまでもない。図 12 は我々の製作した多重機能測定装置で捉えた心筋における血流量の低下とは何かと言う質問に対する

解答である。低圧灌流下では、 β -スチムラントによるエネルギー代謝のバランスの乱れや細胞内 pH の低下等、心筋の物理的機能の上昇 (LVP の上昇) とは裏腹な現象を検出した。この現象は労作性狭心症の発作とか、心不全や心筋梗塞の悪化のプロセスと関連させて見ると大変興味深い。

2 虚血のカテコールアミンによる悪化とは何か? (NMR からの情報)

血栓の形成、怪我あるいは癌細胞の増殖、さらには脳溢血に伴う血管の損傷等による、細胞の虚血もまた重要な研究課題であるが、その方面への NMR の利用価値についてもふれてみたい。図 13 は opie⁷⁾ 等の提唱した虚血心筋のカテコールアミンによる悪化の径路を示すものであるが、その悪化の度合をまるごとの状態で、何を指標にどう見るとなるとプラクティカルな方法はなさそうである。図 14 は正常心筋 (A) の虚血への移行 (B) と β -スチムラントによる虚血の進行 (D) を NMR で観測したものを示している。スペクト

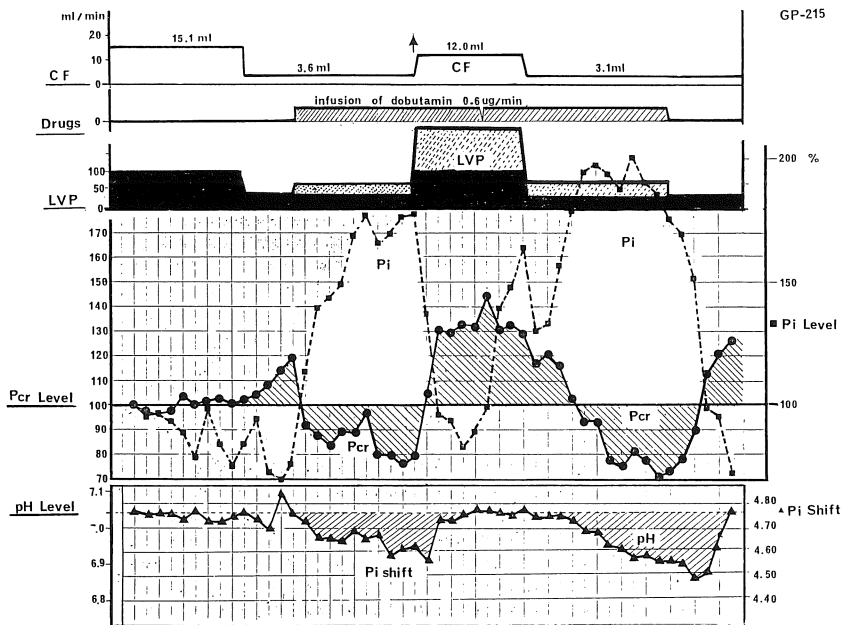


図 12 低圧灌流と心筋のエネルギー代謝および細胞内 pH

ル-Bは微小なビーズを血管に注入した虚血モデルから得たものでPiシグナルの強度は(A)よりも大きくなり、ピークも複雑なパターンになっている。ピークの変形はpHレベルの異なった細胞の出現を意味し、正常時よりも高磁場(右側に)に

移動したものが多くことからpHレベルの低下した細胞が多くなったことを示している。スペクトル-Cは(B)の状態にある心筋にβ-スチムラントを持続注入した時のもので、Piレベルの大きな上昇が観測される⁹⁾。一番下の(D)は薬物の中止後のスペクトルで、そのシグナルの形は(B)のものよりもさらに複雑になった上、pHのより低下した細胞に由来するPiシグナルが多く見られる。細胞内pHの低下はPiとかラクテートのレベルの上昇に依存すると考えられており(B)から(D)への変化を虚血の悪化を示すものとして考えることができる。このような実験事実はNMRが生体の虚血に関する基礎研究とか虚血細胞を有する患者に対する治療方法の研究等に役立つ強力な手段になり得ることを示唆していると考える。

3 心筋細胞の仕事量の低下とエネルギー代謝

β-ブロッカーやカルシウムアンタゴニストは心筋細胞の仕事量を抑制する。従って、それらはエネルギーの枯渇とそれによる不可逆的損傷の発生と進行を抑制すると信じられている。ここでは、そのような微妙な薬理効果に対する³¹P NMRの応答性

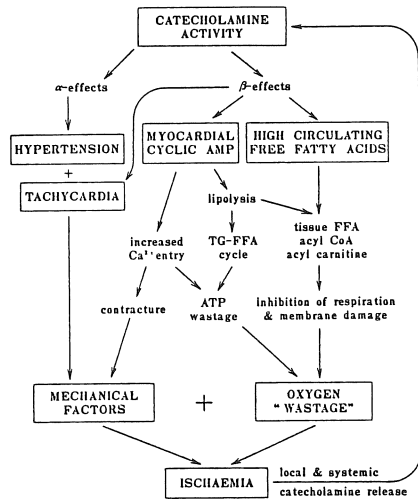


図 13 カテコールアミンによる虚血増悪の経路 (opie 等による)

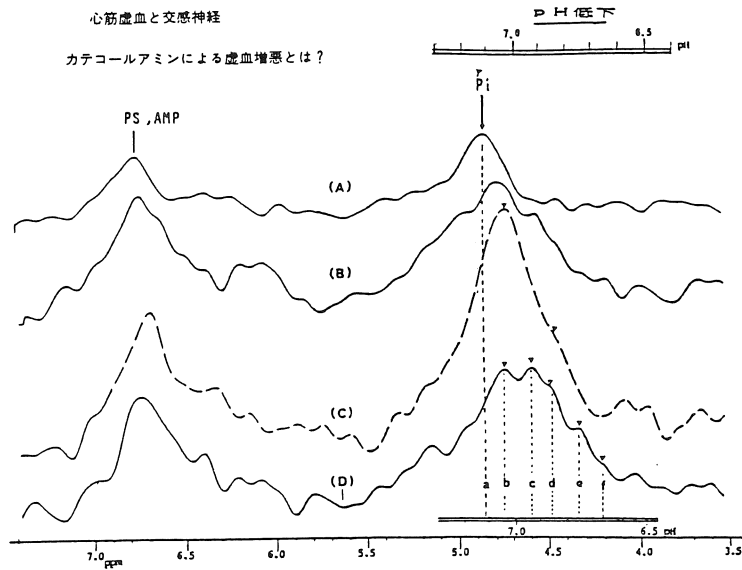


図 14 NMR で見る細胞の虚血度の進行

と情報について述べる. 図 15 および図 16 は灌流心臓の虚血による, 細胞内の Pcr や pH レベルの低下に対する verapamil の影響を示している.

Pcr のレベルは細胞のエネルギー供給の指標なるものであるが, 薬物の投与によってその低下速度が抑制されるのを観測できた. また, エネルギー消費の低下の結果そして, 解糖系の作動が遅くなり, pH レベルの低下も抑制された. この様に ^{31}P NMR 法は薬物による代謝変動を鋭敏に反映しており, 標的細胞の保護作用の研究のみならず, 毒性試験法にも利用できる新しい強力な薬物評価手法としての, 将来性が期待できる.

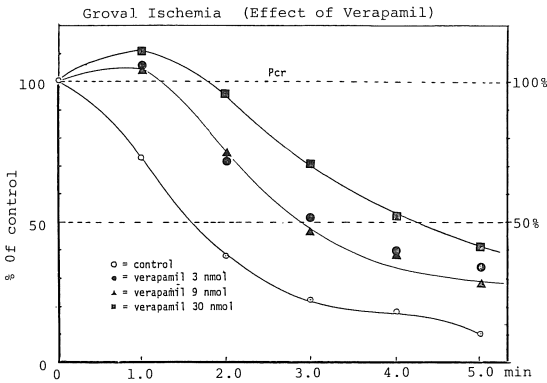


図 15 虚血による Pcr レベルの低下とそれに対する薬理効果

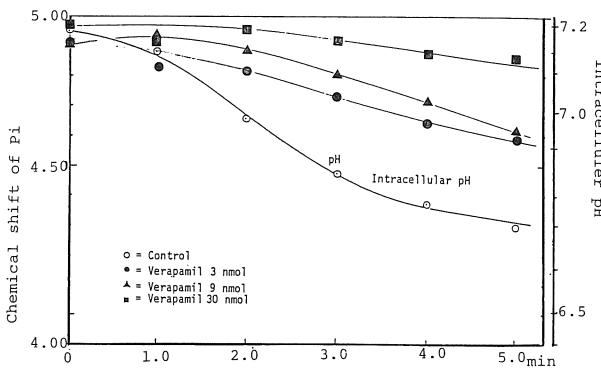


図 16 虚血による細胞内 pH の変化とそれに対する薬理効果

10 臨床への応用の可能性

ここまでに紹介したデータは灌流下における心筋から得たものであるが, NMR でとらえた細胞内 pH やエネルギー代謝に対する血流や薬物の影響は *in vivo* においても当然有り得ることで, 図 17 に示す様に心臓, 脳, 肝臓, 腎臓や四肢の筋肉さらには癌細胞などの *in vivo* での活力の測定手段としての利用が期待できる. 現に Dr. Chance や Dr. Radda のグループは人や動物モデルでの脳の低酸素症¹⁰⁾, 癌¹¹⁾, 心筋障害^{12), 13)}, 末梢血管障害, 遺伝性酵素欠損¹⁴⁾ とか脳血管障害等の診

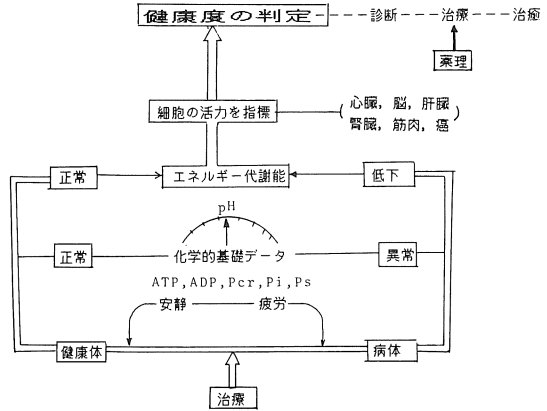


図 17 NMR の医療への応用

断と治療効果の判定さらには移植臓器の活力の判定等への応用を試み, 多数の有用な情報を見出しており, MRI と並ぶ無侵襲な医療機器の一つとしての発展が期待されている. 特に ^{31}P NMR 法によって得られる情報は画像診断が可能になる段階以前の病気の異変を検出する手段としての期待も大きい.

11 結論

^{31}P NMR は色々な生理的条件変化に伴う細胞内 pH と生体細胞のエネルギー代謝に関する生

化学的变化, すなわち, 生体の活力の変化を無侵襲でかつ連続的に観測できる有力な研究手段であることが明らかとなった。これは ^{31}P NMR という手法が医療の分野における, 診断と臨床経過の確認(細胞の活力を反映する同一の化学的基礎データに基づいて行うと言う新しい医療方法として)のための新しい手段, あるいは, 真に患部の細胞の活力を上昇させる薬物を見出す研究手段として大変に有力なものになる可能性を示唆しているものと考えられる。

文献

- 1) D. I. Hoult, S. J. W. Bashy, G. G. Radda et al.: Observation of tissue metabolites using ^{31}P Nuclear Magnetic Resonance: *Nature* **252**, 285-287, 1974.
- 2) R. G. Moon, J. H. Richards: Determination of intracellular pH by ^{31}P magnetic resonance: *J. Biol. Chem.*, **248**, 7276-78, 1973.
- 3) J. T. Flaherty, M. L. Weisfeld, B. H. Bulkey et al.: Mechanisms of Ischemic Myocardial cell Damage Assessed by Phosphorus-31.: *Circulation* **65**, No. 3, 561-571, 1982.
- 4) 中山夏樹, 三浦 巖, 市川靖二他.: ^{31}P NMR の心筋エネルギー代謝研究への応用(その1): 第68回 日本薬学会中国四国支部例会, 1984.
- 5) P. B. Garlick, G. K. Radda et al.: Phosphorus NMR studies on perfused heart: Biochemical and Biophysical Research Communication vol. 74, 1256-1262, 1977.
- 6) Kumei Kobayashi, J. R. Neely: Effects of Ischemia and Reperfusion on Pyruvate Dehydrogen Activity in Isolated Rat heart: *J. Mol.*

Cell Cardiol **15**, 395-369, 1983.

- 7) L. H. Opie: Myocardial infarct size Part L, Basic Consideration: *Am. Heart J.*, **100**, 355, 1980.
- 8) O. A. Smiseth, O. D. Mjos: A reproducible and stable model of acute ischemic left ventricular failure in dogs: *Physiol.*, **2**, 225-239, 1982.
- 9) 山下修司, 三浦 巖, 細川哲見他.: ^{31}P NMR による新強心薬 OPC-8212 の虚血心筋のエネルギー代謝に対する作用検討: 第36回日本薬理学会北部会, 1985年.
- 10) J. C. Haselgrove, S. Eleff, J. S. Leight et al.: Continuous non-invasive Organ Biochemistry and NMR Imaging: Brain Imaging and Brain Function, Raven Press, New York, 273-268, 1985.
- 11) J. M. Maris, A. E. Evance, A. C. McLaughlin et al.: ^{31}P Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopic Investigation of Human Neuroblastoma in situ: The New England Journal of Medicine, **312**, No. 23, 1500-1505, 1985.
- 12) J. R. Glenn, Whitman, B. Chance, H. Bode et al.: Diagnosis and Therapeutic Evaluation of a Pediatric Case of Cardiomyopathy Using Phosphorus-31 Nuclear Magnetic Resonance: *J. Am. College of Cardiology*, **5**, No. 3, 745-9, 1985.
- 13) J. R. Wilson, L. F. Fink, J. Maris et al.: Evaluation of energy metabolism in skeletal muscle of patients with heart failure with gated phosphorus-31 nuclear magnetic resonance, *Circulation*, **71**, No. 1, 57-62, 1985.
- 14) S. Eleff, N. G. Kennaway, N. R. Buist, et al.: ^{31}P NMR study of improvement in oxidative phosphorylation by vitamin K_3 and C in a patient with a defect in electron transport at complex III in skeletal muscle: *Proc. Natl. Acad. Sci.* **81**, 3529-3533, 1984.