

総説

生物水の基礎と NMR-CT(1)

The Foundation of Biological Water and Nuclear Magnetic Resonance (NMR)-CT (1)

片山誠二 (静岡薬科大学物理化学)

キーワード

生物水, NMR-CT, 結合水, 水和水, 構造水, タンパク質, アミノ酸, 不凍水, 緩和時間 (T_1 , T_2), FPD モデル

要旨

生体内の水は生命を支えるうえで重要な役割を演じているといわれている。この水、生物水は、生体内で起こる酵素反応、代謝、物質輸送、その他生体内諸機能と密接に関連している。ある時には、これらの反応を円滑に推進する単なる溶媒として、またある時には、これらに直接関連した働きをしていると考えられている。しかし、このような生体内の水（生物水）の役割の重要性は古くから指摘されてきたにもかかわらず一向に進展してこなかった。専ら、タンパク質、脂質、糖といった明確な機能を有する生体高分子についての研究に集中し、生体内の水の機能に視点を置いた研究例は皆無に近いものであった。その理由は、水が生体内にきわめて多量に存在し、しかも生体組織のすみずみまで多種多様の構造形態で入り込んでいて、その機能を一義的に規定することがきわめて難しいため、したがって、的確な情報を引き出しにくいといった難点にあった。

しかし近年、磁気共鳴法 (NMR) の目覚しい発達に伴って、ようやくこの方面の研究に手が届くようになってきた。この過程は、次の三段階に分けられる。まず、その第一段階においては、タンパク質、脂質、糖といった生体高分子水溶液についての研究が行われ、相互作用した水 (結合水) の基本的諸性質の理解が進んだ。次の段階において、細胞組織内の水についての研究が行われ、実際の生物水についての理解が進展した。以上の兩段階において、*in vitro* のデータの蓄積が進み、生物水の基礎的基盤が築かれた。NMR-CT の登場により、生物水の研究は第三段階に入る。生きたままの系の細胞組織中の生物水の研究が可能となったため、生物水の機能と生体内諸現象とを結びつけた分子レベルの研究が大いに期待されるようになってきた。プロトン密度、 T_1 、 T_2 といった NMR-CT の諸量が適当な標準 (規格化) によって、その絶対値としての評価ができるようになれば、それぞれの物理量の持つフィジカルミーングを生かした議論が可能となり、上記観点に立った研究が大いに発展するものと思われる。筆者は、このような観点に立った研究の突破口として、生物水の機能と関連付けた老化の研究を進めている。

本編では、水、相互作用した水、組織細胞中の生物水などの基礎的諸性質について述べ、次編においては、NMR-CT による老化研究を中心に、生物水の機能と生体内諸現象を結びつけた研究の可能性について言及する。

1 水の構造と物性

水分子の構造は、図 1 のように正確に与えられる。しかし、集団としての水は必ずしも単純ではない。この時の水の構造は、氷の正四面体構造のような氷様構造 (ice-like structure) をとるといわれている。氷の構造は酸素原子を中心に、二本の共有結合と二本の水素結合によってつながった網目状立体構造をとっている (図 2)。したがって、最近接配位数は氷の 4 に対して、水のそれは 4.4 と 0.4 の差がある。この 0.4 の差が液体構造の無秩序性を表して、空孔の多いかさばった構造を示唆している。氷の融解のエネルギーは 1.44 Kcal/mol、氷中の全水素結合エネルギーは 9.2

Kcal/mol であるため、氷の融解によって切断された水素結合のエネルギーは全水素結合エネルギーのわずか 15% 程度にしかすぎない。したがって、水の構造はほとんど氷に近い構造をしていて、一部単量体水分子と氷構造の混ざった平衡混合物とみなされる。このように、単純な分子にもかかわらず水の構造は複雑であり、種々のモデルがたてられ、いまだに理論的な研究の対象となっている^{1),2)}。水は構造化した状態を取り “ice-like” なクラスターを形成している。このクラスターはたえず流動的で生成消滅を繰返し、水素結合と共有結合がめまぐるしく入れ替わり、またたいているといわれている。この時、水分子はクラスターの空孔から空孔へと飛躍し、運動すると考えられている。このクラスターの平均寿命は、中性子散乱の結果によれば 1.7×10^{-12} sec (25°C)³⁾ であり、また、水-グリセリンの系の超音波吸収の結果は、 0.9×10^{-12} sec (20°C)⁴⁾ である。この平均寿命は水の自己拡散係数 ($D = 2.3 \times 10^{-5}$ cm²/sec, 25°C) から求められ、 $\tau = 6 \times 10^{-12}$ sec が得られてい

受 付 1986年3月3日
 最終稿受付 1986年3月3日
 別刷請求先 (〒422) 静岡市小島 2-2-1
 静岡薬科大学物理化学
 片山 誠二

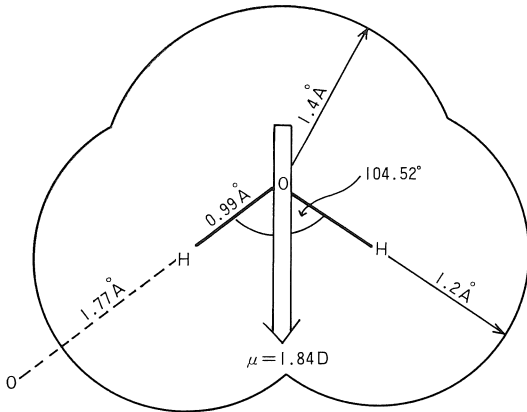


図 1 水分子の形

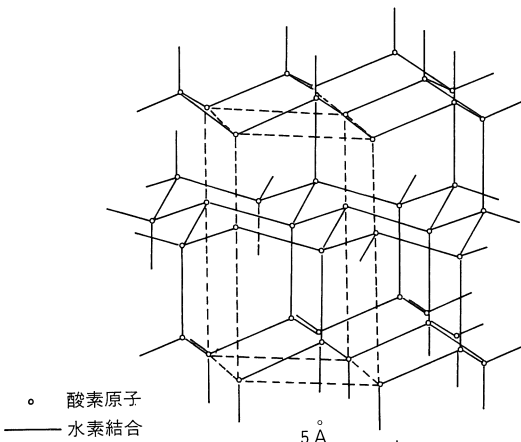


図 2 氷 I の構造

る。また、NMR の緩和時間の測定からも同じオーダーの結果が得られている。

2 生物水の物性

生物水の物理的性質は純水のものにくらべて著しく変化する。この変化は、生物水を構成する自由水と結合水に由来する。生物水は、この両成分の間の相補的な協同効果によって、単一の成分の

表 1 生物水の物性

| 純水 → 生物水 (結合水) | |
|---|--|
| 蒸気圧 17 mmHg (20°C) | → 小 |
| 融点 0°C | → 低 (-8, -30, -80°C) |
| 融解熱 1.44 Kcal/mol | → 小 |
| 誘電率 (ε) 80 | → 小, 7.2 (イオン) |
| 粘度 (η) 1 | → 大 |
| 屈折率 1.333 | → 大 |
| 磁気緩和時間 T_1 3.6 S | → 小, ≤ 1 S |
| T_2 3.6 S | → 小, 10 mS, 40 mS, 200 mS |
| 相関時間 (τ_c) 10^{-12} S | → 大, $10^{-9} \sim 10^{-6}$ S |
| 拡散係数 (D) 10^{-5} cm ² /S | → 小, $\leq 10^{-6}$ cm ² /S |

水の分子運動は (並進, 回転) により束縛される。

ようにふるまい、その結果、生物水固有の物性が決まる (表 1)。まず、生物水の蒸気圧は、水の 17 mmHg より小さくなり、蒸発しにくくなる。融点は 0°C よりも小さくなり、氷結しにくくなる。融解熱は水の 1.44 Kcal/mol より小さくなり、容易に溶解しやすくなる。誘電率は水の 80 より小さくなり電気を通しにくくなる。粘度は、一般に水の 1 より大きくなり、粘性が増す。NMR 緩和時間は純水の 3.6 s より短くなる。分子の相関時間 (τ_c) は、水の 10^{-12} sec より大きくなり、 $10^{-9} \sim 10^{-6}$ sec となる。したがって、結合水の並進や回転の分子運動は、純水にくらべて緩慢になり、より束縛された状態をとる。また、拡散係数 (D) は水の 10^{-5} cm²/s より小さくなり、 10^{-6} cm²/s 以下となる。

3 生体中の水の状態

生体内の水、生物水は一体どのような形態で体のなかに存在し、どのような機能を持っているのであろうか？ これを理解するためには、生物水の置かれている場、すなわち、生体そのものの理解から始めなければならない。

生体内にはほぼ 60% の水で占められている。その水の分布は一様ではなく、組織の種類によ

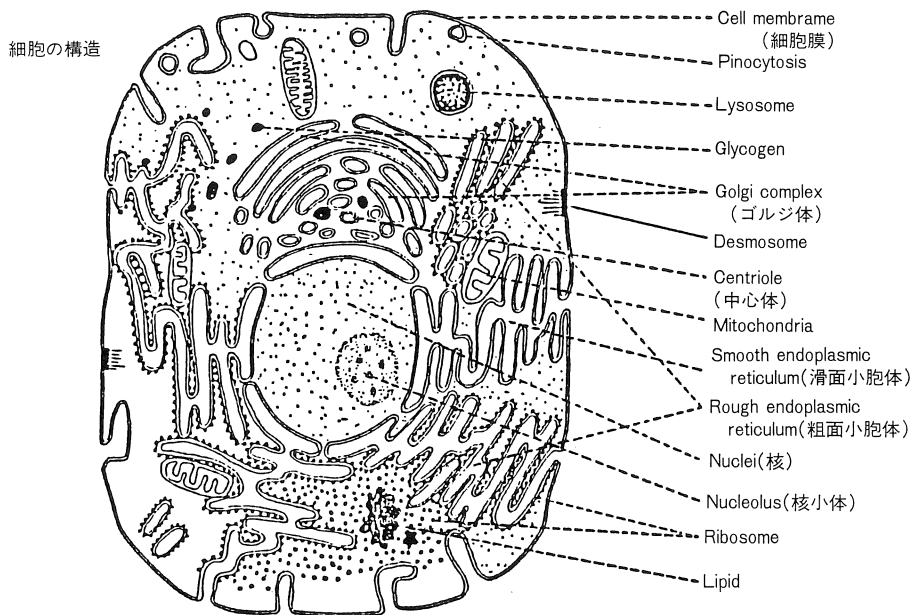


図 3 細胞模式図

て異なる。一方、生体内の水は、細胞内の水と細胞外の水に大別される。細胞膜によってしきられた細胞内は、そのなかにミトコンドリア、リゾーム、核、ゴルジ体、滑面および粗面小胞体、リボゾーム、中心体といった細胞内諸器官（オルガネラ）がある。さらに、そのオルガネラの間には微小管（マイクロチューブリン）や微小繊維（アクチンフィラメント）などの種々のファイバーが網目状にはりめぐらされている。それらの間隙の隙々まで粘性の水溶液が浸み込んでいる（図3）。このように、細胞は生体のあらゆる機能を集約した形で存在するため、生体を代表する最小単位とみなすことができる。細胞は、その構成成分でみれば、大量の水とタンパク質、脂質、糖といった生体高分子および無機イオンとからなっている。したがって、結局細胞内の生物水は、これら生体高分子や無機イオンとの相互作用によって特徴付けられる。

生物水は、純水に近く、イオンや生体高分子と

相互作用せず、比較的自由に運動している“自由水”と、イオンや生体高分子と何らかの相互作用をし、束縛状態にある水、“結合水”、“水和水”、“構造水”等々に大別される。後者の、この何らかの束縛状態にある水は、その束縛の程度や相互作用の種類や程度の違いによって、また、視点の違いによって呼び方が異なったにすぎず、本質的には互いに重複したものと考えられる。

“結合水”とは、結合の様式に視点を置いた呼称であり、たとえば、水素結合のような分子間力によって水が生体高分子の極性基に結合したような場合をいう。一般には分子運動の速さの相異（束縛の自由度）を時間スケールで考えて扱う場合が多く、結合によって水の分子運動の自由度が失われ、束縛された状態の水を呼んでいる。

“構造水”は、分子間の幾何学的な関係に視点を置いた場合の呼称のしかたで、生体高分子に接している水、すなわち、そのまわりの水の構造状態をみたもので、生体高分子の存在によっ

て、純水の氷様 (ice-like) 構造の状態が破壊され、再配向して、よりエントロピーの低い structural order な水に変わると考えられる。この時、水の運動は束縛され、氷結しにくくなっている。

“水和水”は、電荷間のクローン力のような分子間力に視点をおいた呼びかたで、イオン性水と疎水性水とに分けて考えられている。一般には、漠然と使う場合も多く、必ずしも明確なものではない。

生物水には、定義のしかたによって、上記以外にもいろいろな束縛状態の水の呼称が用いられているが、いずれにしてもこれらの束縛された成分の水は生体系で重要な役割を演じるのである。

実際の生体系中において、これらの束縛水は、さらに、束縛の程度、相互作用の種類や程度の異なる状態が共存し、互いに交換し、協同的に一つの bio-system を形成している。このことが、生物系中の水が単なる溶媒としてでなく、生体系の機能機作と密接に関連しているといえるのであるが、逆に生物水の研究を複雑にしている原因ともなっている。

以下、便宜的に“結合水”に統一して論を進める。

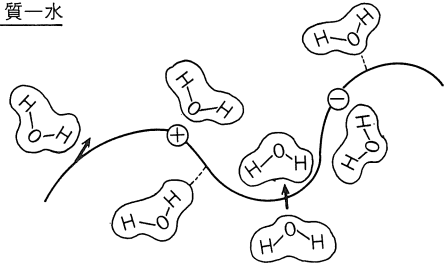
4 生体高分子への結合様式

生物水が生体高分子や無機イオンにどのような形態で相互作用するかをみてみよう。

生体高分子鎖中には、イオンに解離し、電荷を帯びた部位や、分極して部分的に電気双極子になった部位、および $-OH$ 、 $-NH$ 、 $-C=O$ などの水素結合しやすい官能基を有する部位がある。水はそれらの部位との間に分子間力が働き、結合する。この時の分子間力は、電荷相互作用、van der Waals 力、交換斥力、電荷移動力などによって支配されている。

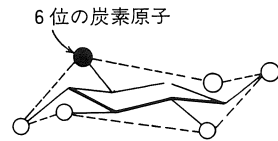
タンパク質に相互作用した水は、電荷相互作用によって生じた結合水、双極子-双極子相互作用

タンパク質-水



水素結合、イオンや双極子への配向

糖-水



β -D-グルコース (Cl)

水素結合

脂質-水



$\Delta G > 0$
 $\Delta H < 0$
 $\Delta S < 0$

イオン-水

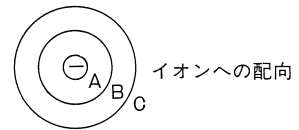


図 4 生物水の生体高分子への結合様式

によって生じた結合水、および水素結合によって生じた結合水の三つのタイプに分けられる (図 4)。

糖質に相互作用した水は、ほとんどが水素結合によって特徴付けられる。その相互作用は糖の骨格構造と $-OH$ 基のコンホメーションがアキシヤル (ax) およびエクワトリアル (eq) とによって決まる⁵⁾。この糖の構造と水の構造との類似性によっ

て水和の程度が決まる。糖の OH 基がエカトリアル構造をとるほど水の氷様構造にすっぽりとはまり込みやすくなる。エカトリアル構造をとる糖は、D-マンノース 3.3, D-カラクトース, D-キシロース 3.6, D-グルコース 4.6 となり、実際の順に水に水和しやすくなっている。

脂質と生物水の関係は次のように理解される。アルキル鎖からなる高分子鎖は、水に溶解せず疎水的性質を持っている。しかし、生体内の脂質は親水性の残基を有するものが多い。この親水基は疎水部を無理やり水層に引きずり込んで溶解させる。一般にこの時、疎水基は疎水部分同志が集まり、ミセルや二重膜を形成する。もし、脂質がミセルや二重膜を形成せず、水層に直接むき出しになっている場合には、疎水基の界面に接する水はより構造化された氷様構造をとる⁶⁾。この時、自由エネルギー変化は正 ($\Delta G > 0$) となり、この油層から水層への移行は自発的に進行しない。またこの時、エンタルピー変化は負 ($\Delta H < 0$) となり、したがって発熱を伴う。さらにこの時、エントロピー変化は負 ($\Delta S < 0$) となり、疎水鎖周辺の水の構造はより秩序立った状態になる¹⁰⁾。さらに、脂質の親水部に結合した水の研究も注目されており、ミセル内部や膜表面への水和は、ミセルや膜の機能と関連して重要視されている⁷⁾。

細胞内液には、さまざまな無機イオンが含まれている。そのイオンのまわりに水が構造化して配位する。これは、原理的にはイオンと双極子の相互作用に基づく。Frank, Wen⁷⁾ によると、もっとも構造化され、束縛された A 層、その次に構造化された B 層、ほとんど自由に運動している C 層とに区分されている。イオン種によってまわりの水の雰囲気異なる。タンパク質分子にイオンが接近するとタンパク質のまわりの水の構造をこわし、その結果、タンパク質は凝縮を起こす。この凝縮能力は著しくイオン種に依存する。このイオンの性質は、原理的にホーフマイスター系列とか離液系列に基づく。生化学者はカオトロピックイ

オンと呼び、これらの性質を生かした buffer 操作により、タンパクの分離抽出に広く応用している。

5 生物水の状態モデル

今日、いろいろな生体系に対して、種々の物性の異なる生物水について研究がなされ、いくつかのモデルが提唱されている。

1 一状態モデル

生物系の水は、自由水と氷状態との中間の状態

表 2 アミノ酸への水と量⁹⁾

| アミノ酸 | 水と量 mol H ₂ O/mol/amino acid |
|---------------------------|--|
| Acidic groups | |
| Asp ⁻ | 6.0 |
| Glu ⁻ | 7.5 |
| Tyr (uncharged) | 3 |
| Asp (pH 4) | 2 |
| Glu (pH 4) | 2 |
| Tyr ⁻ (pH 12) | 7.5 |
| Basic groups | |
| Arg ⁺ | 3.0 |
| His ⁺ | 4 |
| Lys ⁺ | 4.5 |
| Arg (pH 10) | 3 |
| Lys (pH 10-11) | 4.5 |
| Hydrophilic groups | |
| Asn | 2.0 |
| Glu | 2 |
| Pro-OH | 4 |
| Pro | 3 |
| Ser, thr | 2 |
| Trp | 2 |
| Hydrophobic groups | |
| Ala | 1.5 |
| Lys, met | 1 |
| Gly | 1 |
| Ile, leu | 1 |
| Phe | 0 |
| Val | 1 |

にあるとする立場で, Hechter ら¹¹⁾ は, 生体膜中の水について研究した.

2 二状態モデル

生物系の水を自由水と結合水とに大別して考える立場で, 両者の間には早い交換が成立しているのが特徴であり, NMR のタイムスケールでは, この両相の水を区別して観測できず, 一相のようにふるまう. 両相の水の NMR 緩和時間の間に, Zimmerman-Britten¹²⁾ の相モデルが多用された. Kuntz ら^{13),14)} は, 種々のタンパク質アミノ酸について, Berendsen ら¹⁵⁾, Dehl¹⁶⁾ はコラーゲンについて, Cyr ら¹⁷⁾ はトロポシオミンについて, 以下 Finch ら¹⁸⁾, Cope¹⁹⁾, Hazlewood ら²⁰⁾, Cooke ら²¹⁾, Bystrov ら²²⁾, Outhred ら²³⁾, Abetse-

darskaya ら²⁴⁾, Ishmhametova²⁵⁾ らの多くの研究者によってこの二状態モデルの立場から生物水が研究された.

3 三状態モデル

生物中の水を, 強く結合した水, 弱く結合した水, 自由水の三状態に分けて考える立場で, Sterling ら²⁶⁾ は寒天ゲルについて, Tait ら²⁷⁾ はデンプンについて, Clifford ら²⁸⁾ はヒトの赤血球膜について, このような立場をとって研究した. なお, 強く結合した水は, 弱く結合した水や自由水とは交換しにくいと考えられている.

さらに, Hazlewood ら²⁹⁾, Belton ら³⁰⁾ のカエルの骨格筋について, 互いにまったく交換しない水(水和水, 細胞内の水, 細胞外の水)を緩和時

表 3 ポリペプチドへの水含量

| ポリペプチド | pH | 水 和 量 | | | 誤差 | コンフォメーション |
|-------------------------------------|---------|-------|------|------|------|-------------|
| | | -25° | -35° | -45° | | |
| L-Glu | 7-12 | 8.3 | 7.7 | 6.3 | ±1.0 | Coil |
| L-Glu | 4.5 | | 1.8 | | ±0.5 | Helix |
| L-Asp | 8-12 | 8.1 | 6.0 | 4.8 | ±1 | Coil |
| L-Asp | 4.5 | 2.1 | | | ±0.5 | Helix |
| L-Tyr | 11.5-12 | | 8.5 | 6.5 | ±1.5 | Coil |
| L-Tyr | 11.3 | | 5.5 | 5.1 | ±1 | Helix |
| DL or L-Lys | 3-9 | 5.0 | 4.3 | 3.8 | ±1 | Coil |
| DL or L-Lys | 10-12 | 5.0 | 4.5 | 3.7 | ±1 | Helix |
| L-Orn | 1.5-9 | 4.0 | 3.4 | 3.5 | ±1 | Coil |
| L-Orn | 10-12 | 4.5 | 3.7 | 3.5 | ±1 | Helix |
| L-Arg | 3-8 | 3.1 | 2.7 | | ±1 | Coil |
| L-Arg | 10 | 3 | | | ±1 | Helix |
| L-Pro | | 3.1 | 2.8 | | ±1 | |
| L-Asn | | 2.0 | | | ±0.5 | ? |
| DL-Ala | | 1.4 | | | ±0.5 | Helix |
| L-Val | | 0.9 | | | ±0.5 | Coil, Helix |
| Gly | | 0.9 | | | ±0.5 | ? |
| 共重合ポリペプチド | | | | | | |
| Lys ⁴⁰ Glu ⁶⁰ | 2-4 | 2.5 | 2.4 | | ±0.5 | Helix |
| Lys ⁴⁰ Glu ⁶⁰ | 11-12 | 7.8 | 7.5 | | ±1 | Coil |
| Lys ⁵⁰ Phe ⁵⁰ | 2-9 | 2.6 | 3.8 | | ±0.5 | |
| Lys ³³ Phe ⁶⁷ | | 1.2 | | | ±0.5 | ? |

間 T_2 から見出ししている。これは、互いに交換しないことから本来の三相モデルとは若干異なっているといえる。

4 四状態モデル

束縛状態の水をさらに詳しく分け、四状態とする立場で、Finer³¹⁾ はレシチンについてこの立場で研究した。

5 τ_c に連続分布 (多成分) モデル

生物水をいろいろな τ_c をもった水からなるとし、それらの間に早い交換を仮定する立場で、Noak³²⁾, Ling³³⁾, Woessner³⁴⁾, Outhred³⁵⁾ によって研究された。

6 結合水量

生体高分子に結合した結合水量は NMR 不凍水法によって求められる。これは、結合水が氷点下になっても氷結しにくい性質を利用したもので、 -35°C における NMR シグナルの面積強度から見積られる。このようにして求めた結果は、他の

手段で求めた結果と良い一致を示す。

アミノ酸に結合した結合水量(表2)によれば、Asp⁻などの酸性グループに属するアミノ酸は最高 7.5 M/M もの多量の結合水を有する。Arg⁺などの塩基性グループに属するアミノ酸は、4.0 (M/M) 前後の結合水量を有する。次に、Asn 以下の親水性グループに属するアミノ酸の結合水量は比較的少ない。Ala などの疎水性グループに属するアミノ酸の結合水量は極めて少ない。

ポリペプチドに結合した結合水量は、表3に示した。Glu や Lys の例にみられるように、同じポリペプチドにおいても、その水溶液の pH の違いによって結合水量が異なる。その理由は、ポリペプチドの構造が pH によって決まり、Helix (ヘリックス) 状態や Coil (コイル) 状態などのコンフォメーションをとるためである。この時、どちらのコンフォメーションが結合水を有するのに有利であるか決まっていない。むしろ、その時のコンフォメーションがいかにか結合水を有するに有利な構造をとっているかが重要な因子となって

表 4 高分解能 NMR で -35°C でも凍結しない水として求めたタンパク質の水和量¹³⁾

| 試料 | 濃度 (mg/ml) | 線幅 (Hz) | スペクトル強度 | 水和量 (gH ₂ O/g タンパク質) |
|-------------------------|------------|---------|---------|---------------------------------|
| 蒸留水中のゼラチン | 100 | 800 | 5.2 | 0.4~0.5 |
| | 50 | 900 | 2.9 | 0.4~0.5 |
| | 25 | (900) | 1.4 | 0.4~0.5 |
| リゾチーム | 100 | 400 | 11 | 0.36 |
| α -キモトリブシン | 100 | 460 | 9 | 0.37 |
| ウシ血清アルブミン | 100 | 480 | 11 | 0.43 |
| オキシヘモグロビン | 100 | 480 | 11.5 | 0.45 |
| オパールブミン | 100 | 620 | 8 | 0.31 |
| tRNA, 変性 | 100 | 250 | 140 | 1.7 |
| α -キモトリブシン, 変性 | 100 | 630 | 7.5 | 0.4 |
| オパールブミン, 変性 | 100 | 880 | 5.5 | 0.3 |
| ウシ血清アルブミン pH 4.5~5.3 | 100 | 510 | 11.2 | 0.37 |
| | 100 | 580 | 8.2 | 0.31 |
| | 100 | 670 | 6.4 | 0.28 |

いる。したがって、構造と結合水量の相関関係は、ポリペプチドの種類によって状況が異なる。

タンパク質に結合した結合水量は表4に与えられる。いずれのタンパク質もほぼ0.3 g/g 前後の結合水量を有する。α-キモトリプシン、オバアルブミンの例にみられるように、同一のタンパク質においてもpHや塩濃度などの条件によって結合水量が異なる。これは、液性条件に応じて、変性、凝縮などのタンパク質に構造変化が起こるためと考えられる。しかし、変性したタンパク質が必ずしも未変性のものにくらべて結合水量が多いとは限らない。変性、未変性にかかわらず、どちらのコンフォメーションが結合水を持つのに有利な構造をとることができるかどうかによって結合水量が決まる。

ポリアクリルアミドゲル中の結合水量は、ゲル濃度の増加とともに増える(図5)³⁶⁾。この時、広い濃度領域にわたって、0.3 g/g の結合水を持つことがわかる。

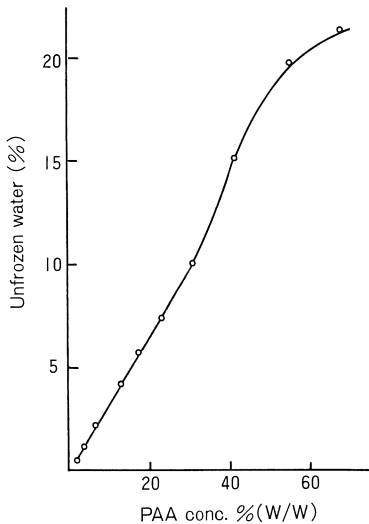


図5 アクリルアミド重合度ゲル中の不凍水量³⁶⁾

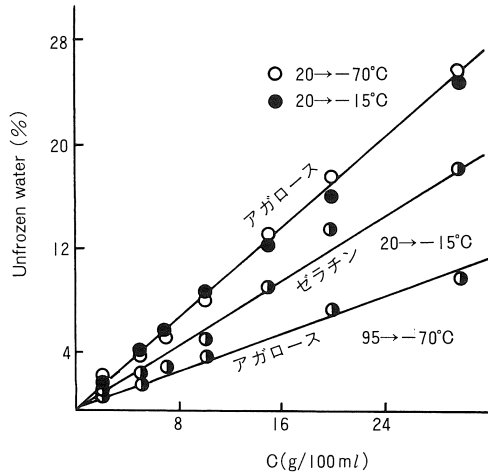


図6 アガロースおよびゼラチンの不凍水量の濃度および温度依存性³⁷⁾

ゼラチンやアガロースに結合した結合水量は、図6に示される³⁷⁾。ゼラチンに対しては0.5 g/g、アガロースについては0.4 g/g (95°C → -70°C)、および0.8 g/g (20°C → -15°C or -70°C)の結合水量を持つ。アガロースの例にみられるように、結合水の量は測定前のサンプルがどのような温度に保たれていたかによって異なる。測定前の温度が高いほど結合水量は少なくなる。その理由は、高分子鎖は結合水によって層状におおわれているが、温度が高いほど熱エネルギー (kT) によって、結合水が表層より剥脱され、その結果、正味の結合水が少なくなると解される。

その他、多糖類では0.2~0.4 g/g^{38),39)}、ムコ多糖類では0.7 g/g⁴⁰⁾の結合水量をもつことが知られている。

7 生物水の低温における挙動

生体高分子に結合した水は0°Cにいたっても氷結せず、0°Cよりはるかに低い温度(通常-5~-15°Cの広い範囲にわたっている)にいたり氷結する。しかしこの時、まだ氷結しない液体状

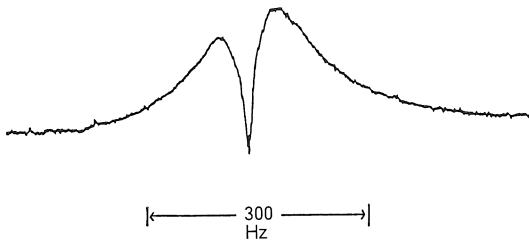


図 7 不凍水の NMR 信号³⁶⁾

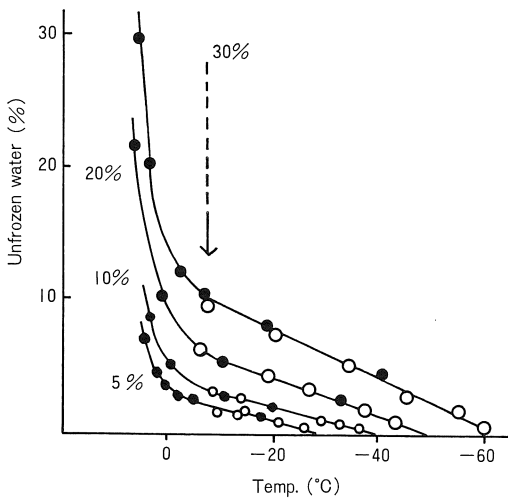


図 8 アクリルアミド重合度ゲル中の不凍水量の温度依存性³⁶⁾
 30% ゲル, 20% ゲル, 10% ゲル, 5% ゲル
 —○—: 降温過程 —●—: 昇温過程

態の水が存在し、これを“不凍水 (unfrozen water or, unfreezable water)”と一般に呼んでいる。この不凍水は、系と相互作用し、氷結しにくくなった束縛水に由来したものと考えられている。この不凍水は、ブロードな NMR 信号を与える (図 7)。結合水量はこのブロードな不凍水のシグナルの面積強度から求められる。不凍水量 (≒結合水量) は測定温度に依存して変化する。その例として、ポリアクリルアミドゲルについての低温に

おける挙動が詳細に調べられている (図 8)³⁶⁾。その結果によれば、ゲルサンプルを室温より下げていくと、 $-7 \sim -8^{\circ}\text{C}$ 付近にいたって、信号強度は急激に減少し、結合水に由来するブロードな不凍水信号が現れる。さらに、温度を下げていくと、線幅はますます広くなり、信号強度はリニアに減少する。そして、ある温度にいたり、ついにその信号は消失してしまう。一方、低温より温度を上げていくと、最初ブロードな信号が現れ始める。さらに、その線幅および信号強度は降温過程と同じパスを通過して、線幅は狭まり、信号強度は大きくなりながら変化していく。 -7°C から 0°C にかけては、降温過程とは別のパスを通り、次第に元の状態へと戻っていく。この温度範囲における降温-昇温過程の違いは温度ヒステリシスループとして理解される。さらに、ゲル中の水の緩和時間 (T_1) や線幅、 ^{17}O 信号などにおいても、同様の温度依存性の挙動が得られている³⁶⁾。これらの結果は、次のような氷融解機構によって理解されている。ゲル中の自由水成分は -7°C にて氷結し、広幅成分 ($< 20 \text{ KHz}$) として消失する。この時、未だ氷結しない残された結合水成分は交換相手 (自由水) を失わない物性が著しく変化される。これがブロードな不凍水成分として観測される。さらに、温度を下げていくと、ポリマー鎖を覆っている不凍水が表層より内層に向けて逐次氷結していく。このようにして、すべての不凍水が氷結してしまう。昇温過程においては、この逆の現象が進む。まず、ポリマー鎖にもっとも近接した氷 (もっとも強固に結合した結合水に由来) の溶解が始まる。さらに、次第に表層成分の水 (結合水由来) の溶解へと進む。 -7°C にいたると自由水成分由来の水が溶解し始め、不凍水成分と結合水成分の交換が始まり、元の状態に復帰していくのである。

以上の考察は生体高分子全般に適用できる氷融解機構として理解されている。

このような分子レベルの解釈は、食品の冷凍保

存, 生物の耐凍性などと密接に関連しており, 微生物 (ビールス, 細菌) や生物組織 (血液, 骨髄細胞, 精子, 角膜, 受精卵, 腎臓など) の保存技術の理論的根拠を与えている。

8 生物水の分子運動と NMR

NMR 緩和時間は, 分子の運動を測る方法としてよく知られている。分子運動の尺度, τ_c (相関時間) と緩和時間の間には, 次の関係がある。

$$1/T_1 = A \{ 2\tau_c / (1 + \omega^2\tau_c^2) + 8\tau_c / (1 + 4\omega^2\tau_c^2) \}$$

$$1/T_2 = A \{ 3\tau_c + 5\tau_c / (1 + \omega^2\tau_c^2) + 2\tau_c / (1 + 4\omega^2\tau_c^2) \}$$

$$1/T_{1\rho} = A \{ 3\tau_c / (1 + 4\omega^2\tau_c^2) + 5\tau_c / (1 + \omega^2\tau_c^2) + 2\tau_c / (1 + 4\omega^2\tau_c^2) \}$$

$$A = (3/4) \frac{\gamma^4 \hbar^2}{20 r^6}$$

したがって, 緩和時間は τ_c に対して図9のようにふるまう。AやBの領域では, $\omega^2\tau_c^2 \gg 1$, したがって $T_1 > T_2$ となり, 固体状態に対応する。Cの領域は $\omega_0^2\tau_c^2 \approx 1$, したがって $T_1 \approx T_2$ となり,

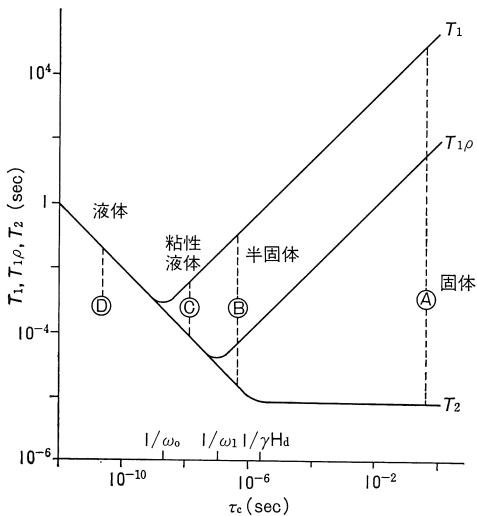


図9 緩和時間 ($T_1, T_{1\rho}, T_2$) 対相関時間 (τ_c)

粘性液体の状態に対応する。Dでは, $\omega_0^2\tau_c^2 \ll 1$, したがって $T_1 = T_2$ となり, 液体状態に対応する。生物水の自由水成分は D領域, 結合水成分は C領域, 強く結合した結晶様結合水成分はB領域でのふるまいに対応している。したがって, 水の分子運動の評価の際, この緩和時間の取扱いに留意を要する。

生物水は自由水と結合水とに大別されることを既に述べてきた。これらの個々の生物水を区別し, その物性を直接測定することは難しい。NMRによる緩和時間 (T_1, T_2) の測定は, この個々の成分の水の分子運動を関接に評価することのできるよい方法である。

結合水と自由水との間の交換速度が各状態のNMR緩和時間に比較して短ければ, Zimmerman, Brittin の理論より¹²⁾,

$$(1/T_{1,2})_{\text{obs}} = \sum_i q_i (1/T_{1,2})_i \dots \dots \dots (1)$$

で与えられ, 単一の緩和時間が観測される。既知の水分量 q_i と自由水の緩和時間などを代入すれば, 結合水成分の緩和時間が導き出せる。このようにして, 結合水の分子運動が評価できる。もし, 状態間の交換速度が遅ければ状態間の平均化が起こらず, 各成分の信号が独立に観測され, 式(1)は成立しなくなる。従来のNMRや誘電緩和などの結果を総合すると, タンパク質水溶液中の

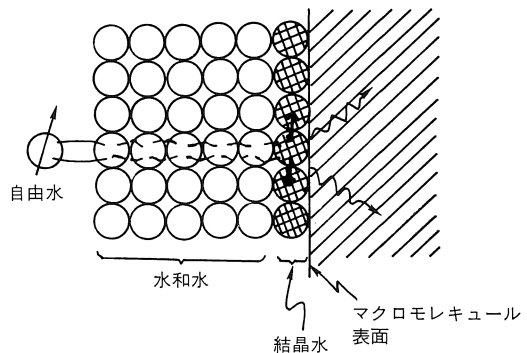


図10 FPD モデル⁴³⁾

生物水の分子運動（相関時間 τ_c ）は次のように要約される。

タンパク質そのものは 10^{-5} ~ 10^{-7} のオーダーで運動している。したがって、そのタンパク質に強固に結合した結合水はタンパク質と同じオーダーで運動する。その外側を覆った結合水は 10^{-9} s 程度の分子運動をしていて、強く結合した成分との間の交換速度は μ s 程度である。結合水の外側にほとんど純水に近い運動をする自由水 (10^{-11} ~ 10^{-12} s) がとり囲んでいる。

組織細胞内の生物水の分子運動は、上記、高分子水溶液中のものとは多少異なる。Hazlewood ら⁴²⁾ その他多数の研究者によって研究されてきたが、その結果は次のようになる。

細胞外の水の分子運動（並進、回転）は 10^{-9} s 程度である。細胞内の水においては、タンパク質溶液の場合と同様に、細胞諸器官や生体高分子に結合した水は 10^{-5} ~ 10^{-6} s のオーダーの運動をしている。細胞内の自由水は 10^{-8} ~ 10^{-9} s のオーダーの分子運動をしており、結合水との間の交換速度は非常に長く day のオーダーだと推定されている。この細胞内の自由水成分の分子運動はタンパク質水溶液中の自由水のものにくらべて千倍程度遅くなっている。この原因は、細胞内液に溶存する無機イオンの効果や、細胞壁で囲まれたコンパートメントの効果が効いているといわれている⁴³⁾。

表 5 *In vitro* における正常組織中の水の緩和時間⁴⁶⁾

| 種 | 組織 | T_1 (ms) | T_2 (ms) | Temp. (°C) | Freq. (MHz) | Reference |
|-----|--------|---------------|---------------|---------------|----------------|--|
| ヒト | 肝 | 394~740 | — | 26 | 100 | Damadian et al. (1973 a) ⁵¹⁾ |
| ヒト | 肝 | 473±9.0 | 36±1.0 | 3~4 | 100 | Mathur-De Vré et al. (1983) ⁵²⁾ |
| マウス | 肝 | 531±6 | — | 27 | 60 | Bakker (1982) ⁵³⁾ |
| ウサギ | 肝 | 311±15 | — | 23 | 24 | Ling et al. (1980) ^{54),55)} |
| ラット | 未成熟肝 | 527 | 42 | 20 | 60 | Kiricuta & Simplaceanu (1975) ⁵⁶⁾ |
| | 正常肝 | 340 | 30 | 20 | 60 | |
| マウス | 肝 | 496±10 | 30±1.0 | 3~4 | 100 | Mathur-De Vré et al. (1983) |
| ウサギ | 脳 | 644±40 | — | 23 | 24 | Ling et al. (1980) |
| ラット | 未成熟脳 | 1,361 | 149 | 20 | 60 | Kiricuta & Simplaceanu (1975) |
| | 正常脳 | 866±42 | 71±7 | 20 | 60 | |
| マウス | 脳 | 711±14 | 73±1.5 | 3~4 | 100 | Mathur-De Vré et al. |
| ヒト | 筋 | 773~1,196 | — | 26 | 100 | Damadian et al. (1973 a) |
| マウス | 骨格筋 | 740±24 | — | 27 | 60 | Bakker (1982) |
| ウサギ | 筋 | 554±32 | — | 23 | 24 | Ling et al. (1980) |
| ラット | 未成熟筋 | 1,206±55 | 127±9 | 28±2 | 30 | Hazlewood et al. (1971) ⁵⁷⁾ |
| | 成熟筋 | 723±49 | 47±4 | | | |
| マウス | 脾臓 | 762±35 | — | 27 | 60 | Bakker (1982) |
| ウサギ | 脾臓 | 509±11 | — | 23 | 24 | Ling et al. (1980) |
| マウス | 脂肪 | 245±6 | — | 27 | 60 | Bakker (1982) |
| ヒト | 血清（動脈） | 559 | — | — | 6 | Brooks et al. (1975) ⁵⁸⁾ |
| トリ | 血清 | 920 | — | 25 | 32 | Ratkovic & Rusov (1974) ⁵⁹⁾ |
| ウサギ | 血清 | 867 | — | 23 | 24 | Ling et al. (1980) |
| ラット | 胚 | 1,422±7 | 200±4 | 20 | 60 | Kiricuta & Simplaceanu (1975) |

9 FPD モデル

現在、細胞内の生物水に対するもっとも新しいモデルは次のように理解されている(図10)。

細胞内には、まず細胞諸器官や生体高分子に強固に結合したクリスタル状の結合水があり、その外側に層状に結合水が覆っている。さらに、その外側に自由水がある。自由水は、まず表層の結合水と早い交換をする。その結合水は、次の内層の結合水と早い拡散による交換で入れ変わる。このように、順次内層へと早い拡散による交換が進行する。最後に、結合水と強く結合したクリスタル状の結合水との交換は非常に遅い。早い拡散による交換(Fast Proton Diffusion)⁴³⁾が特徴となっているため FPD モデルなどと呼ばれている。

10 生物組織中の水の NMR 緩和時間

生体高分子水溶液のような均一な系についての基礎研究は Kuntz, Woessner らの多くの研究者によって行われ、1975 年頃までには、ほぼやりつくされ、生体高分子と相互作用する生物水についての基本的な理解が確立された。本説のこれまでの大半のものは、これに関するものであった。

この生物水の基礎的な理解は、次のステップの組織中の生物水の研究や、NMR-CT による *in vivo* の組織中の生物水の研究に対する基礎的な基盤を与えるものとして重要な役割を果たしている。

生物組織のような不均一かつ異方性のある系の NMR 研究が盛んに行われたのは 1980 年頃まで

表 6 *In vitro* における病態組織中の水の緩和時間⁴⁶⁾

| 種 | 組織 | 病 態 | T_1 (ms) | T_2 (ms) | Temp. (°C) | Freq. (MHz) | Reference |
|-----|---|------------------|---------------|---------------|---------------|-------------------------------------|--|
| ヒト | 胸 皮膚 筋 胃 GI 管 肝 脾臓 骨 | 腫瘍 | 644~1,561 | — | 26 | 100 | Damadian et al. (1973a) ⁵¹⁾ |
| | | | 830~1,236 | — | | | |
| | | | 1,030~1,645 | — | | | |
| | | | 1,025~1,387 | — | | | |
| | | | 737~1,363 | — | | | |
| | | | 820~ 844 | — | | | |
| | | | 1,107~1,118 | — | | | |
| | | | 763~1,623 | — | | | |
| | 甲状腺軟骨 | ガン | 700 | — | 32 | Schara et al. (1974) ⁶⁰⁾ | |
| ラット | 脳 {皮質 白質} | 脳水腫 | 651±47 | 115±3.9 | 20 | 14 | Gwango & Edzes (1975) ⁶²⁾ |
| | | | 591±22 | 131.5±7.4 | 20 | 14 | |
| | | | 736±2 | 100 | | 24 | |
| | 肝 | Walker 肉腫 | 826±13 | 118 | | | Damadian (1971) ⁶³⁾ |
| | | Novikoff ヘパトーマ | | | | | |
| | トリ | 血液 | 白血病感染 | 1,320±130 | — | 25 | 32 |
| ラット | 腫瘍 | Ehrlich 腹水 | 1,150 | — | 20 | 60 | Kiricuta & Simplaceanu (1975) ⁵⁶⁾ |
| | | Walker 256 | 1,093 | 77 | 20 | 60 | |
| | | Walker ガンのリンパ腺転移 | 916±45 | 65±6 | 20 | 60 | |

である。Hazlewood⁴⁴⁾, Mathur-De Vré^{45),46)}らの多数の研究者によって研究され、生物組織中の水の理解が進んだ。生物組織中の生物水の研究の

表 7 ヒトの正常および腫瘍組織の T_1 値 (100 MHz)⁴⁷⁾

| 組織 | 腫瘍組織 | 正常組織 |
|---------------|--------------------|------------------------------------|
| 乳房 | 1.080 ± 0.08 (13) | 0.367 ± 0.079 (5) |
| 皮膚 | 1.047 ± 0.108 (4) | 0.616 ± 0.019 (9) |
| 筋肉 (悪性) | 1.413 ± 0.082 (7) | 1.023 ± 0.029 (17) |
| (良性) | 1.307 ± 0.1535 (2) | |
| 食道 | 1.04 (1) | 0.804 ± 0.108 (5) |
| 胃 | 1.238 ± 0.109 (3) | 0.765 ± 0.075 (8) |
| 腸管 | 1.122 ± 0.04 (15) | 0.641 ± 0.080 (8) (small bowel) |
| | | 0.641 ± 0.043 (12) (colon) |
| 肝臓 | 0.832 ± 0.012 (2) | 0.570 ± 0.029 (14) |
| 脾臓 | 1.113 ± 0.006 (2) | 0.701 ± 0.045 (17) |
| 肺 | 1.110 ± 0.057 (12) | 0.788 ± 0.063 (5) |
| リンパ管 | 1.004 ± 0.056 (14) | 0.720 ± 0.076 (6) |
| 骨 | 1.027 ± 0.152 (6) | 0.554 ± 0.027 (10) |
| 膀胱 | 1.241 ± 0.165 (3) | 0.891 ± 0.061 (4) |
| 甲状腺 | 1.072 (1) | 0.882 ± 0.045 (7) |
| 神経 | 1.204 (1) | 0.557 ± 0.158 (2) |
| 脂肪 | 2.047 (1) | 0.279 ± 0.008 (5) |
| 卵巣 | 1.282 ± 0.118 (2) | 0.989 ± 0.047 (5) |
| 子宮 (悪性) | 1.393 ± 0.176 (2) | 0.924 ± 0.038 (4) |
| (良性) | 0.973 (1) | |
| 首 | 1.101 (1) | 0.827 ± 0.026 (4) |
| 睪丸 | 1.223 (1) | 1.200 ± 0.048 (4) |
| 前立腺 | 1.110 (1) | 0.803 ± 0.014 (2) |
| 副腎 | 0.683 (1) | 0.608 ± 0.020 (5) |
| 腹膜 | 1.529 (1) | 0.476 (1) |
| 悪性黒腫 | 0.724 ± 0.147 (6) | |
| 舌 | 1.288 (1) | |
| 心のう層 (中皮腫) | 0.758 (1) | |
| 腎臓 | | 0.862 ± 0.033 (13) |
| 脳 | | 0.998 ± 0.016 (8) |
| 脾臓 | | 0.605 ± 0.036 (10) |
| 心臓 | | 0.906 ± 0.046 (9) |

流れは、①正常組織についての研究、②異常組織(病態)についての研究、③培養組織細胞 (cell line) についての研究などに区分される。ヒト、ラット、マウスなどにおける脳、肝臓、筋肉、血液、脾臓などの正常組織中の水の NMR 緩和時間が観測され、データの蓄積が進んだ。ここでは、その典型的な例の一部を表 5 に表した^{51)~59)}。

何らかの疾病状態にある異常組織は、そこに含まれる NMR 緩和時間 (T_1 , T_2) の値も正常のものとは異なった値を示す(表 6, 7)^{59)~63)}。特にガンや腫瘍などの組織は正常のものにくらべて緩和時間 (T_1 , T_2) が著しく増大する。この理由は、ガン化などにより細胞の生理活動が活発になり、それに伴ってそこに含まれる生物水の分子運動が速くなることを示唆している。このように、正常組織と異常組織との間の緩和時間の差異に注目した研究が進み、この流れは臨床的な応用への足がかりともなった。この流れに沿った Damadian ら⁴⁷⁾の初期の研究は、Lauterbur⁴⁸⁾の磁場勾配の技術と相俟って、NMR-CT の技術開発の発端となった。

近年、バイオテクノロジーの発展とともに、種々の細胞組織が培養されている。この cell line における水の緩和時間の測定も盛んに行われている^{42),49),50)}。

以上、細胞組織内の生物水についての結果は、*in vitro* の域を出ず、生きたままの状態における結果とは状況が著しく異なっている。

1980年代に入り、NMR-CT の目覚ましい技術開発により生きたままの生体組織についての研究が行われるようになってきた。次編で、NMR-CT により得られる生きたままの生体系中の生物水の NMR 諸量の評価とその問題点についてふれ、さらに、老化研究に照準を当て、NMR-CT による生体内諸現象と生物水の機能とを関連付けた研究の可能性について述べる予定である。

NMR-CT は、まだ技術開発の途上にあり、その利用方法も高度化する傾向にある。それに伴って、本質的な原理や知識がブラックボックスにな

ってしまう可能性がある。したがって、NMR-CT がプロトンをプローブとし、生体を対象とする限り、背景となっている生物水の基本的諸性質の理解は、正しい取扱いや評価のうえで必須であると考えられる。本編がそのような要請に役立てられれば幸いである。

文 献

- 1) J. Morgan, B.E. Warren: *J. Chem. Phys.*, 6: 666, 1938.
- 2) J.A. Pople: *Proc. R. Soc. Lond.*, A 205: 163, 1951.
- 3) G.S. Safford, et al.: *J. Chem. Phys.*, 50: 2140, 1969.
- 4) W.M. Slie, R.A. Danfer, T.A. Litovitz: *J. Chem. Phys.*, 44: 3712, 1966.
- 5) M.J. Tait, A. Suggett, F. Franks, S. Abett, et al.: *J. Sol. Chem.*, 1: 131, 1972.
- 6) H.S. Frank, M.W. Evons: *J. Chem. Phys.*, 13: 507, 1945.
- 7) 上平 恒: 油化学, 32: 459, 1983.
- 8) H.S. Frank, W.-Y. Wen: *Discuss. Faraday Soc.*, 44: 133, 1957.
- 9) I.D. Kuntz, Jr.: *J. Am. Chem. Soc.*, 93: 514, 1971.
- 10) F. Franks: *Water*, Vol. 1-5: Prenum 1975.
- 11) O. Hechter, et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 46: 783, 1960.
- 12) J.R. Zimmerman, W.E. Brittin: *J. Phys. Chem.*, 61: 1328, 1957.
- 13) I.D. Kuntz, Jr., et al.: *Science*, 163: 1329, 1969.
- 14) I.D., Kuntz, Jr., et al.: *Arch. Biochem. Biophys.*, 142: 660, 1971.
- 15) C. Migcheelsen, H.J.C. Berendsen: 'Magnetic Resonance and Relaxation.' Proceeding of the XIVth Colloque Ampere, Ljubjama, pp.761, 1967.
- 16) R.E. Dehl: *Science*, 170: 738, 1970.
- 17) T.J.C. Cyr, et al.: *Trans. Faraday Soc.*, 583: 1887, 1971.
- 18) E.D. Finch, et al.: *Arch. Biochem. Biophys.*, 147: 299, 1971; *Biophys. J.*, 14: 907, 1974.
- 19) F.W. Cope: *Biophys. J.*, 9: 303, 1969.
- 20) C.F. Hazlewood, et al.: *Nature*, 222: 747, 1969.
- 21) R. Cooke, R. Wien: *Biophys. J.*, 11: 1002, 1971.
- 22) G.S. Bystrov, et al.: *Biofizika*, 18: 484, 1973.
- 23) R.K. Outhred, et al.: *Biophys. J.*, 13: 97, 1973.
- 24) L.A. Abetsedarskaya, et al.: *Biofizika*, 13: 630, 1975.
- 25) N.N. Ishmkhametova: Thesis Kazan, 1971.
- 26) C. Sterling, M. Masuzawa: *Macromol. Chem.*, 116: 140, 1968.
- 27) M.J. Tait, et al.: *J. Colloid Interface Sci.*, 41: 594, 1972.
- 28) J. Clifford, et al.: "Membrane Models and the Formation of Biological Membrane." North-Holland, Amsterdam, 1968, p.19.
- 29) C.F. Hazlewood, et al.: *Biophys. J.*, 14: 583, 1974.
- 30) P.S. Belton, et al.: *Biochem. Biophys. Acta*, 286: 16, 1970.
- 31) E.G. Finer: *JCFBTS*, 69: 1590, 1973.
- 32) G. Held, F. Noak: *Z. Naturforsch.*, 28c: 59, 1973.
- 33) G.N. Ling: *Intern. J. Neuroscience*, 1: 129, 1970.
- 34) D.E. Woessner, et al.: *J. Colloid Interface Sci.*, 34: 283, 1970.
- 35) K. Outhred, E.P. George: *Biophys. J.*, 13: 97, 1973.
- 36) S. Katayama, S. Fujiwara: *J. Phys. Chem.*, 84: 2320, 1980.
- 37) 佐藤和夫: 第 15 回 NMR 討論会要旨集, 1976.
- 38) K. Gekko, H. Noguchi: *Biopolymers*, 10: 1513, 1971.
- 39) H. Shiio, T. Ogata, H. Yoshihashi: *J. Am. Chem. Soc.*, 77: 4980, 1955.
- 40) Y. Suzuki, H. Uedaira: *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 43: 1892, 1970.
- 41) 片山誠二: 化学の領域, 36(2): 26, 1982.
- 42) C.F. Hazlewood, G. Cleveland, D. Medina: *J. National Cancer Institute*, 52: 1849, 1974 b.
- 43) G.D. Fullerton, J.L. Potter, N.C. Dornbluth: *Magnetic Resonance Imaging*, 1: 209, 1982.
- 44) C.F. Hazlewood: Cell-Associated Water (ed. by W. Drost-Hansen), Academic Press, 1979, pp. 165-260.
- 45) R. Mathur-De Vré: *Prog. Biophys. Molec. Biol.*,

- 35: 103-134, Pergamon 1979.
- 46) R. Mathur-De Vré: *Br. J. Radiol.*, 57: 955, 1984.
- 47) R. Damadian, K. Zanar, D. Hor, et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 71: 1471, 1974.
- 48) P.C. Lauterbur: *Nature*, 242: 190, 1973.
- 49) G. Valensin, E. Gaggelli, E. Tiezzi, et al.: *Microbiologica*, 5: 195, 1982.
- 50) R. Ader, J.S. Cohen: *J. Magnetic Resonance*, 34: 349, 1979.
- 51) R. Damadian, K. Zaner, D. Hor, et al.: *Physiological Chemistry and Physics*, 5: 381, 1973 a.
- 52) R. Mathur-De Vré, R. Grimeé, M.P. Rosa: *Bioscience Reports*, 3: 599, 1983.
- 53) C.J.C. Bakker: Proceedings of Symposium on Physics and Clinical Impact of NMR Imaging. Nederlandse Vereniging Voor Klinische Fysica, Amsterdam, April 27, 1982.
- 54) C.R. Ling, M.A. Foster: *Br. J. Cancer*, 42: 148, 1980.
- 55) C.R. Ling, M.A. Foster, J.M.S. Hutchison: *Phys. Med. Biol.*, 25: 748, 1980.
- 56) I.C. Kiricuta, V. Simplaceanu: *Cancer Res.*, 35: 1164, 1975.
- 57) C.F. Hazlewood, B.L. Nichols, D.C. Chang, et al.: *Johns Hopkins Med. J.*, 128: 117, 1971.
- 58) R.A. Brooks, J.H. Battocletti, S. Sances, et al.: *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, **BM E-22**: 12, 1975.
- 59) S. Ratkovic, C. Rusov: *Periodicum Biologorum*, 76: 19, 1974.
- 60) M. Schara, M. Sentjurc, M. Auersperg, et al.: *Br. J. Cancer*, 29: 483, 1974.
- 61) J.C. Eggleston, L.A. Saryan, D.P. Hollis: *Cancer Res.*, 35: 1326, 1975.
- 62) K. Gwango, H.T. Edzes: *Arch. Neurol.*, 32: 462, 1975.
- 63) R. Damadian: *Science*, 171: 1151, 1971.