

核磁気共鳴からみた赤血球内外の水の動態

明治鍼灸大学 生理学教室

福田 耕治

要旨: 血液中の水分子は自由に運動できる水分子(自由水)と、赤血球膜や血中蛋白質に結合しているそれら(結合水)に大別できる。空間的には赤血球内と外の水分子に分けることが出来る。本稿では膜内外の自由水の動態および膜内外の水の透過を核磁気共鳴ではどのようにして観測するか概観する。対象とする測定量は緩和時間と自己拡散係数である。

Behaviour of Water Molecules in/out Erythrocyte from a View Point of NMR.

FUKUDA Kohji

Department of Physiology, Meiji College of Oriental Medicine.

Summary: Water molecules in blood can be classed as free water molecules and bound water molecules. The bound water molecule combines itself with the membrane of a erythrocyte or protein in blood. The free water molecules are separated by the membranes. In this report discussion will be done about how to measure the relaxation times and self-diffusion coefficient of proton nuclear system in free water molecules in/out erythrocyte using by a pulsed NMR method. Permeability coefficient of the membrane of the erythrocyte will be also discussed from the point of view of a pulsed NMR.

Key Words: Pulsed NMR, 赤血球 Erythrocyte, 緩和時間 Relaxation time, 透過係数 Permeability coefficient, 自己拡散係数 Diffusion coefficient

I はじめに

生命の最小単位は細胞であり、細胞の基本的生命活動の一つは細胞の内と外での物質の輸送である。細胞膜を介する物質の輸送には種々の形態があるが、これらの輸送に際し水の役割と振舞いを知ることは重要である。これらに関する知見を得

るために、研究者はいくつかの実際手段を用いる。NMR(核磁気共鳴)¹⁾もその一つである。

水分子の運動がどの様にNMRの信号に反映するかの研究は比較的早く、NMRの歴史と共に始まっている。NMRの信号強度の減衰や回復となって現れる水分子中の水素原子核スピン系の緩和

和の機構の研究は steady (定常法あるいはCW法) NMRを用いて Bloembergen ら²⁾ によって行われた。Pulsed NMRが開発された後、同方法は緩和現象と共に水の自己拡散等のより動的な現象解明への適応にも用いられるようになった^{3,4,5)}。これらの研究では対象となる系としては、均質な液体等を用い、試料全体のどの水分子も同等のものとして取り扱った。

生体では血液のように比較的簡単な系であっても、十分に不均質である。血液中の水分子はいくつかの仕方で分類することが出来る。即ち、自由水(自由に運動できる水分子)と、結合水(赤血球膜や血中蛋白質に結合している水分子)に分けることができ、また赤血球膜内外の水分子に分けることが出来る。さらに赤血球内外の水分子は互いに膜を介して出入りすることもできる。これらの水分子の動きには個々の分子の速い並進・回転運動、分子同志の不規則な衝突を原因とする拡散、流体粒子としてみたときの流れ、高分子や膜に束縛された水分子のゆっくりした運動、自由水と結合水の入れ替わりの運動等がある。NMRの信号から得られる共鳴周波数、信号強度、共鳴線の線幅、緩和時間にこれらの運動の効果が現れる。

NMRではどのようにしてこれらの水分子の動態を弁別して観測するのだろうか。

II 緩和時間と赤血球膜の水透過率

静磁場 H_0 ($x-y-z$ 座標系で z 方向に磁場ベクトルは向いている)中に置かれた核スピン系に rf pulse (ラジオ波帯域の周波数を持ったパルス磁場、その周波数は静磁場 H_0 の大きさと原子核の種類で決まる。水素原子核では1テスラの静磁場に対して42.5MHzである)を照射したとき、核スピン系はラジオ波磁場からエネルギーを吸収する。rf pulse を切った後、核スピン系は二つの過程を並行して経て rf pulse を照射する前の状態(熱平衡状態)に戻る。核スピン系内の位相の coherency (試料中のすべての核スピンの回転の位相に相関が保たれている状態)の崩壊

の過程(T_2 : スピン-スピン緩和過程)と核スピン系が吸収したエネルギーの放出の過程(T_1 : スピン-格子緩和過程)である。それぞれの緩和過程は標準的な pulsed NMRの方法¹⁾で観測することが出来る。

T_1 と T_2 の長さは水分子の運動の状態と水素原子核スピン同志、および他の核スピン系、電子スピン系との相互作用によって決まる。結合水では緩和時間は短く数十 μ sec以下の程度であり、赤血球膜内外の自由水では十分長く数100msecの程度である。(純粋な水では2secの程度である。)従って通常の pulsed NMRから得られるスピネコー信号には、自由水の寄与のみが含まれるとしてよい。結合水のみからの寄与による信号を取り扱うには工夫が必要である。ここでは触れない。

血液を試料として磁化の回復や減衰(緩和時間を測定)を調べてみるとあたかも均質な系であるかのようなふるまい(単純指数関数的減衰等)を見せる。これは赤血球内外の水が比較的似かよった緩和時間を持つ(血球内ではヘモグロビンの存在のため血漿に比べ緩和時間は短い)と共に膜に大きい水の透過率があることを示している。そこで70年代に pulsed NMRを用いた赤血球膜の水の透過率の測定がいくつか行われた^{6,7,8,9)}。大方の方法は次の通りである。

常磁性イオン(例えば Cu^{2+} , Cr^{2+} , Fe^{3+} , Mn^{2+})は、緩和時間を減少させることが知られている。 $MnCl_2$ をドープした試料では、 $MnCl_2$ は膜を透過しにくいので、膜外の自由水の緩和時間のみを減少させる。 T_1 の測定を行うために飽和回復法(saturation recovery: saturation pulse に続く $90^\circ - 180^\circ$ pulse によるスピネコーの信号強度測定)による磁化強度 $M(t)$ の測定を行えば、それは次式で与えられる。

$$M(t) = M_0 - A \exp(-\phi t) - B \exp(-\psi t) \quad (1)$$

$$\begin{aligned} \phi &= 1/T_{1r} + k_r, \\ \psi &= 1/T_{1p} + k_p \end{aligned} \quad (2)$$

ここで M_0 は熱平衡にあるときの全磁化の大きさ、 T_{1r} と T_{1p} はそれぞれ赤血球内と血漿中のスピン-格子緩和時間、 k_r と k_p はそれぞれ膜の内から外および外から内への水の単位時間当りの透過率である(第1図)。AとBはそれぞれ膜の内外の水の量に比例する量である。常磁性塩によって血漿中の T_{1p} を減少させることにより、条件

$$1/T_{1p} \gg k_r, k_p \gg 1/T_{1r} \quad (3)$$

を作ることができれば、(1)式は簡単になり、

$$M(t) = M_0 - A \exp(-k_r t) - B \exp(-1/T_{1p} t) \quad (4)$$

で与えられる。測定のを第2図に示した。第2図で速い減衰は血漿中の緩和時間を示し、遅い減衰は膜の水透過率を反映したものである。第3図に緩和時間の $MnCl_2$ 濃度依存性を示した¹⁰⁾。1 mM程度より高濃度で条件(3)を満たし始めることが分かる。こうした結果の解析を行うことで

膜の水の透過率を定量するのである。

種々の環境(浸透圧、糖濃度、温度、膜を修飾する物質の存在等)のもとで観測が行われてきた。V.V.Morariu ら¹¹⁾は少量(1-10 mM)のプロカインの存在は膜の透過性を高めるが、それ以上の濃度では下げることが報告した。G. Benga ら¹²⁾は赤血球およびそのゴーストの膜の透過率の温度依存性を測定することにより膜の透過拡散の活性化エネルギーを求め赤血球膜とそのゴーストで差が無いことを示した。また $MnCl_2$ は透過性に影響を与えないことを示し、パラクロルメルクリ安息香酸(PCMBs)は一定の条件のもとで透過性を下げることが示した。

膜の透過性を調べるために必要とされる種々の常磁性イオンの影響を調べることで、膜を修飾する物質の研究は今後も重要な課題である。さらにNMRによる測定が本当に水分子の透過率を測定しているのかどうかを検討する必要もある。なぜならば、膜の内外の水素原子核スピン系間のスピン拡散からの寄与も考えられる。スピン拡散の効果を考えるためには膜に束縛されている結合水と

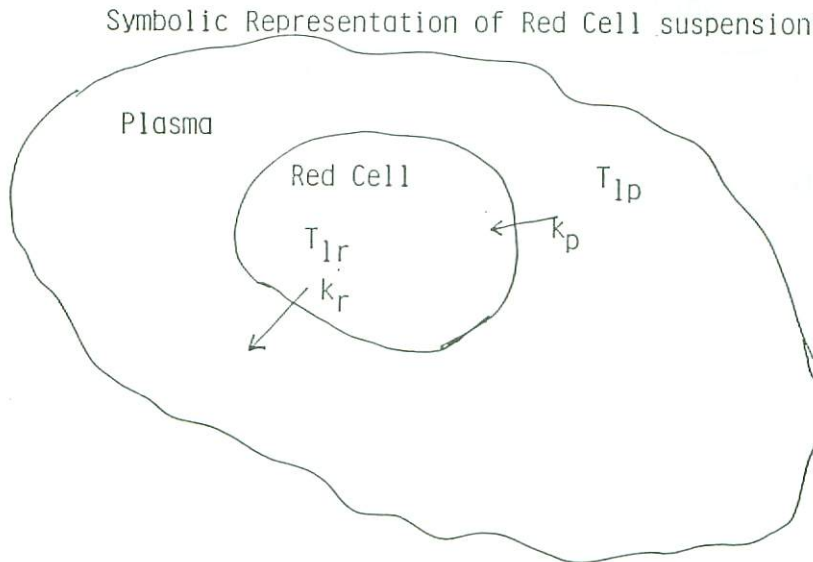
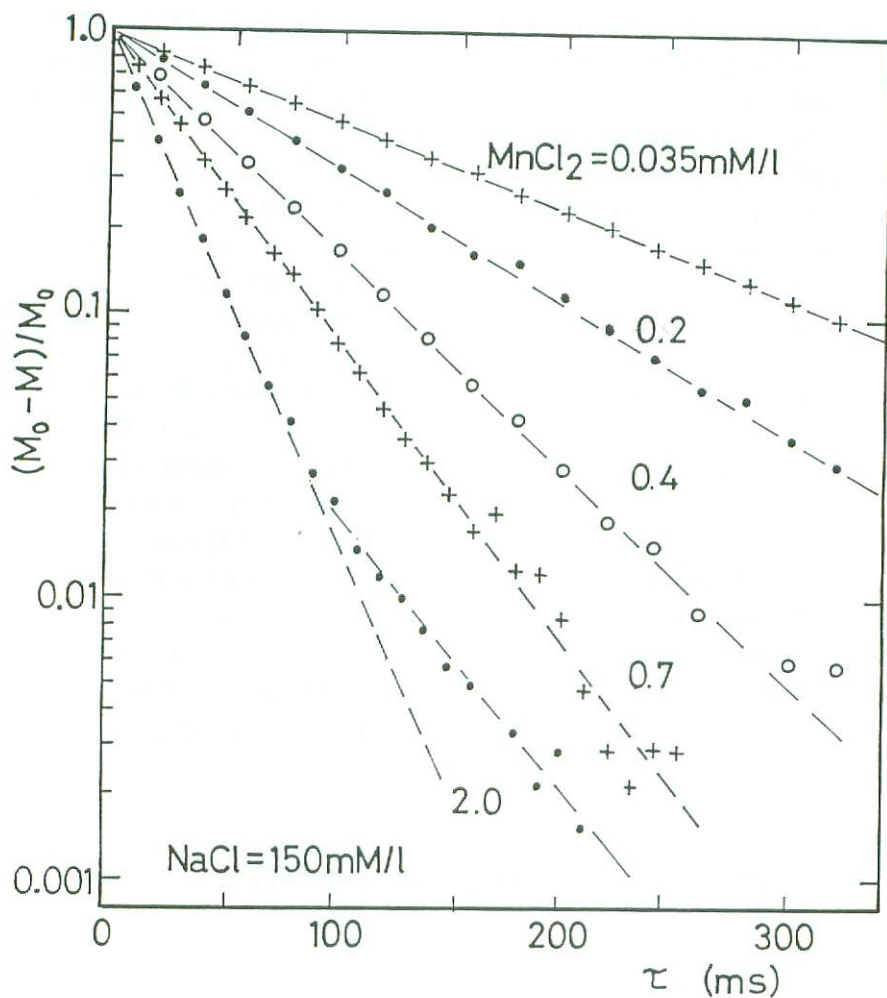


図1: 赤血球と血漿の模式図。図中の記号は本文中で説明。



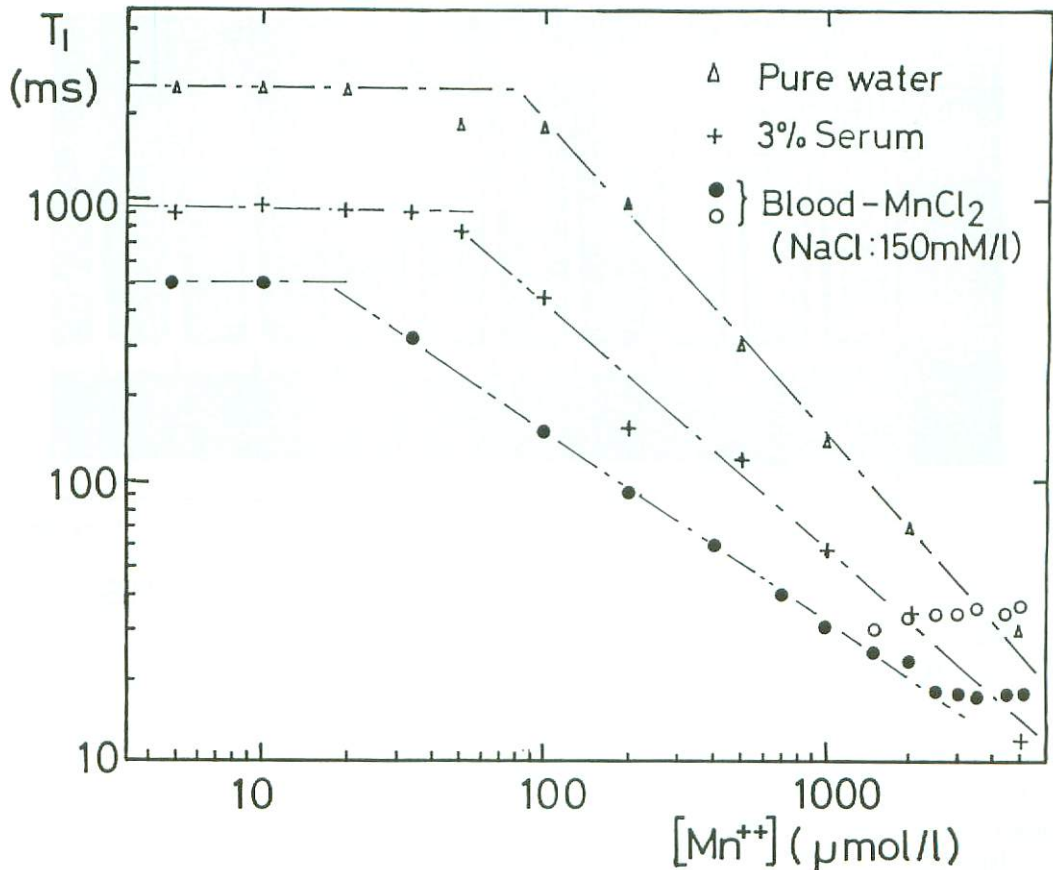
2 図：飽和回復法によるスピネコー信号強度 $M(t)$ 。 t は飽和パルス照射した後スピネコー信号が出現するまでの時間。 $MnCl_2$ の濃度が 2.0 mM では、信号強度は単純指数関数的な減衰からずれて来る。2種類の緩和時が観測される。

自由水との相互作用を調べる必要がある。

Ⅲ 自己拡散係数と赤血球内の水分子

pulsed NMRを用いて自己拡散係数を精度良く測定することが可能になった⁴⁾。自己拡散係数はラベルされた水分子がブラウン運動等によって、単位時間当りにどれだけの広さの空間まで広がるかの目安を表す。この物理量の測定を行う

時、pulsed NMRでは z 軸方向の静磁場 H_0 に加えて勾配磁場 $G \cdot z$ を用いる。空間的に静磁場の大きさが連続的に変化しているため、核スピンの共鳴周波数が空間的に変化することになる。これは水分子にラベルを付けることと同等である。 $90^\circ - 180^\circ$ pulse 法や Carr-Purcell 法⁴⁾ ($90^\circ - \tau - 180^\circ - 2\tau - 180^\circ - 2\tau - \dots$) によるスピネコー信号強度を測定する。 T_2 が短い試



3 図: スピン-格子緩和時間の Mn^{2+} イオン濃度依存性. Δ は純水, $+$ は 3% の牛血清アルブミン溶液, 低濃度の Mn^{2+} では緩和時間に影響を与えない. 1 mM 以上の濃度では 2 種類の緩和時間が観測される. $\bullet$ と $\circ$ は血液 ($H_t=65\%$). $\bullet$ は磁化の速い回復を示し, 血漿中の水の Mn^{2+} による緩和時間の減少を示す. $\circ$ は膜の水透過率を反映する.

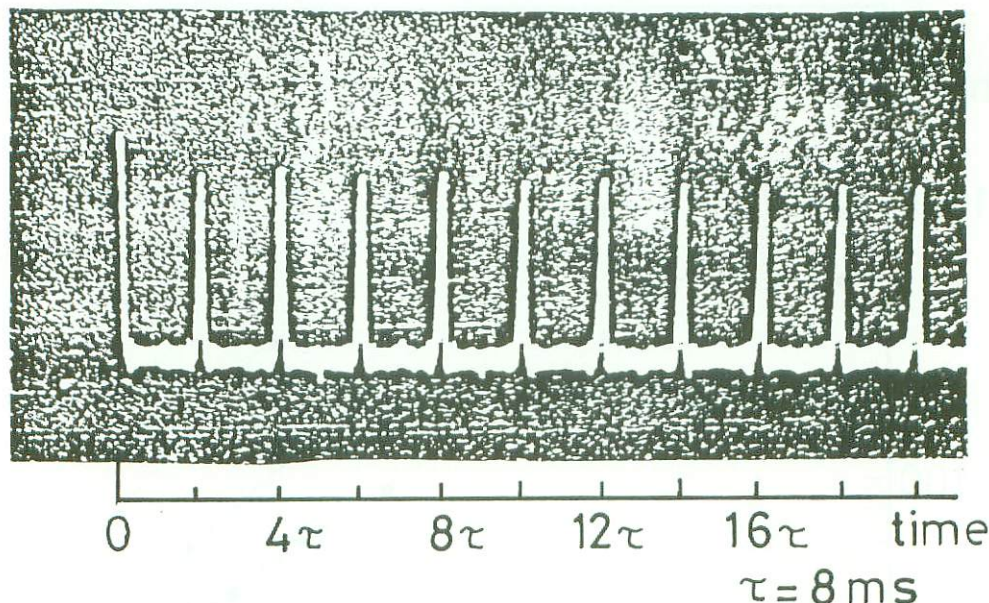
料に対してはパルス勾磁場を用いた stimulated echo 法¹³⁾を用いる. Carr-Purcell 法 スピンエコー信号強度は

$$M(t) = M_0 \exp\left\{(-t/T_2) + (-\gamma^2 G^2 D \tau^2 / 3)t\right\} \quad (5)$$

で与えられる. スピンエコー信号は n を正の整数として, $t = 2n\tau$ の時刻に現れる (第 4 図). ここで τ は rf pulse の間隔, D は拡散係数, γ

は水素原子核の磁気回転比である. 式(5)は水分子の不規則な運動 (ブラウン運動) と均質な系を仮定している. 均質な気体や液体での拡散現象の研究は古くから行われ, 古典となり教科書も多くある.

血液中の水分子は上記したようにいくつかに分類できる. スピンエコー信号には結合水は関与しないが膜の内外の自由水は両者とも信号に寄与するので, なんらかの方法でそれぞれを弁別する必要がある. 血球成分のみで測定したデータと全血



4 図: Carr-Purcell 法によるスピネコー信号列. この例では勾配磁場が小さいため信号強度の減衰は少ない.

でのデータを比べるのも一つの方法である.

血液中の水分子の運動は血球膜と血中蛋白質によって制限されている. こうした制限された領域内での拡散係数の測定が式(5)の通りになるという保証はない. 式(5)とは異なった結果が得られたとき, その結果を解析することによって, 細胞内の水の動態をより詳しく知る材料となる. 拡散現象を調べることから自由水と膜や蛋白に束縛している結合水の関係も調べることが可能になる.

近年種々の分野で制限された領域内(例えばゼオライトや多孔質ガラス等の細孔内)での拡散現象等に興味がもたれ, 研究法も開発されてきている^{14,15,16)}.

IV おわりに

1940年代にNMRの技術が開発されて以来この技術は主として物理, 化学の研究手段として成長してきた. NMRは物質の構造や機構を解明する道具としては, よく他の大掛かりな測定手段に比

べてあたかも“メス”のようだと言われてきた.

NMR技術が使える分野が非常に広くかつ大変細かい情報を精密に得られることによって, この様に変有用な測定手段を有効に駆使するために多くの工夫やその周辺の開発も行われ, また各分野でNMR信号から得られる情報の解析法の研究がなされてきた.

近年コンピューター技術と超伝導磁石の普及と共にMRIやMRSの大型の装置が登場し医学, 生物の分野にも進出し目覚し成果をあげてきている. MRIやMRSを用いた研究から今後も多くの成果が得られるものと確信しているが, 医学や生理学の分野に限ったとしてもそれらはNMRの限られた一部である. NMRははるかに広い守備範囲を持っている. 生体のように不均質な対象に対してもその動的な振舞いをNMRでは取り扱えるよう研究が進められてきている. 緩和現象や拡散現象の解析によって生体の中の水の基本的な働きが解明されるという期待がもたれる. これらの

研究のためには、むしろもっと小廻りのきくNMRの装置が有効である。

文 献

- 1) 標準的な教科書として
 Abragam A: The Principle of nuclear magnetism. Clarendon Press, Oxford, 1961. 「核の磁性」(上下) 富田和久, 田中基之共訳, 吉岡書店.
 Slichter C P: Principles of Magnetic Resonance. Harper & Row Publishers Inc, New York, 1963. 「磁気共鳴の原理」益田義賀, 雑賀亜幌共訳, 岩波書店.
 Farrar T C, Becker E D: Pulse and Fourier Transform NMR. Academic Press, New York, 1971. 「パルスおよびフーリエ変換NMR」赤坂一之, 井元敏明共訳, 吉岡書店.
 Gadian D G: Nuclear Magnetic Resonance and its Applications to Living Systems. Oxford University Press, New York, 1982. 「医学・生物学のためのNMR生体系への応用」今井昭一訳, 西村書店.
- 2) Bloembergen N, Purcell E M, Pound R V: Relaxation Effects in Nuclear Magnetic Resonance Absorption. Phys Rev 73: 27~60, 1948.
- 3) Hahn E L: Spin Echoes. Phys Rev 80: 580~594, 1950.
- 4) Carr H Y, Purcell E M: Effects of Diffusion on Free Precession in Nuclear Magnetic Resonance Experiments. Phys Rev 94: 630~638, 1954.
- 5) Torrey H C: Bloch Equations with Diffusion Terms. Phys Rev 104: 563~566, 1956.
- 6) Conlon T, Outhred R: Water Diffusion Permeability of Erythrocytes using an NMR Technique. Biochim. Biophys. Acta 288: 354~361, 1972.
- 7) Outhred R, Conlon T: The Volume Dependence of the Erythrocyte Water Diffusion Permeability. Biochim. Biophys. Acta 318: 446~450, 1973.
- 8) Shporer M, Civan M M: NMR Study of ^{17}O from H_2^{17}O in Human Erythrocytes. Biochim. Biophys. Acta 385: 81~87, 1975.
- 9) Fabry M E, Eisenstadt M: Water Exchange between Red Cells and Plasma. Biophys J 15: 1101~1110, 1975.
- 10) 福田耕治: パルス核磁気共鳴法による赤血球膜の水透過の観測. 日本物理学会予稿集 3: 328, 1979.
- 11) Morariu V V et al: NMR Investigation of the Influence of Procaine and its Metabolites on Water Exchange through Human Erythrocyte Membranes. Biochim. Biophys. Acta 900: 73~78, 1987.
- 12) Benga G et al: Effects of Temperature on Water Diffusion in Human Erythrocytes and Ghosts. Biochim. Biophys. Acta 905: 339~348, 1987.
- 13) Tanner J E: Use of the Stimulated Echo in NMR Diffusion Studies. J Chem Phys 52: 2523~2526, 1970.
- 14) Klafter J et al: Transport and Relaxation in Random Materials. World Scientific, Singapore, 1986.
- 15) Tarczón L C, Halperin W P: Interpretation of NMR Diffusion Measurements in Uniform- and Nonuniform-profiles. Phys Rev B32: 2798~2807, 1985.
- 16) Fukuda K et al: Study of Self-Diffusion Process of Water Molecules in Porous Glass by Stimulated Spin Echo Method with Pulsed Field Gradients. J Phys Soc Jpn 58(5): 1662~1666, 1989.