

## 核磁気共鳴法の生体系への応用

### — スペクトルスコピーにおける最近の進歩〔II〕 —

中澤知男<sup>\*</sup>, 杉山宏<sup>\*\*</sup>

前号〔I〕に続いて、<sup>1</sup>H以外の核種のNMRスペクトルスコピーの生体系への応用について概説する。細胞は緩衝液中での懸濁状態、臓器や組織は臓器灌流法、生体局部測定法で測定を行なう。<sup>31</sup>P-NMR法では、ATP、クレアチリン酸などの高エネルギー化合物、無機リン、糖リン酸など観測され、これらのシグナルは生体の代謝状態をよく現わし、酸素欠乏、運動などに敏感に応答する。<sup>13</sup>Cは天然存在比1%で、感度の悪い核であるが、二、三の臓器の自然存在<sup>13</sup>Cのスペクトルはその臓器の*in vivo*でのグリコーゲン、脂質等に関する貴重な情報を提供する。<sup>13</sup>C高濃度化合物を生体系に導入し、<sup>13</sup>C-NMRスペクトルで<sup>13</sup>C化合物の変化をモニターすることにより、代謝過程を追跡、解明できる。麻酔剤等のフッ素化合物には<sup>19</sup>F-NMRが役立つ。<sup>23</sup>Na-や<sup>39</sup>K-NMR法はシフト試薬を用いると、細胞内、細胞外のイオン濃度が測定でき、イオン輸送等に関連し、有力な研究手段となる。

キーワード：<sup>31</sup>P NMR, <sup>13</sup>C NMR, <sup>19</sup>F NMR, <sup>23</sup>Na NMR, <sup>39</sup>K NMR,  
Tissue, Metabolism

前稿〔I〕では、NMRスペクトルスコピーの原理と最近の<sup>1</sup>H-NMR法について概説したが、本稿〔II〕では他のNMRスペクトルスコピーの生体系への応用について紹介する。

#### 7. <sup>31</sup>P-NMR法の生体系への応用

NMRにおける<sup>31</sup>Pの検出感度は<sup>1</sup>Hの1/15程であるが、その天然同位対比は100%であるので、<sup>31</sup>P-NMRの通常測定では現在の機器を用いれば数分で測定できる。生体系の試料ではATP(アデノシン三リン酸、より一般的にはNTP:ヌクレオシド三リン酸)、ADP(アデノシン二リン酸、NDP)、NAD(H)(ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド(その還元型))、Pi(無機リン酸)、PDE(ホスホジエステル)、PME(ホスホモノエ

ステル)などの低分子量リン化合物のP原子は鋭いシグナルを与え、同定、定量することができる(肝組織では全体のおよそ70%のリン原子に相当)。DNA、RNA、リン脂質などの巨大分子は運動が制限されているため、〔I〕で記したようにスピンスピン緩和時間が短くなり、巾の広い同定の難しいシグナルとして観測される。組織の抽出液には巨大分子が含まれていないので、鋭いシグナルだけからなるスペクトルが得られ、*in vivo* スペクトルのシグナルと比較し、それらを同定するのによく測定される。またスペクトル解釈の時には、0.2~0.5mM/ml以下のリン化合物は検出されにくいというNMR法の欠点を考慮することを忘れてはならない。<sup>31</sup>P-NMRスペクトルスコピーから得られる生体系の情報は、イ)シグナルの面積比よりリン化合物の生成比、Pi(無機リン酸)の化学シフトより系(細胞内・外)のpHがわかる。([I]の3参照)。NMR法で求めたADP、Piの濃度は凍結-抽出法で求めた値より小さい。これはADP、Piが細胞中の巨大分子に結合し、NMR的に“silent”になっているためではない

\* 山梨医科大学化学

\*\* 東北大学非水溶液化学研究所

(受付: 昭和62年10月3日)

かと考えられている。ロ)リン化合物のシグナルの強弱、変化より生体系のエネルギー状態がわかる。即ちこれらは活動状況を示すマーカーとなる。例えば虚血状態になると酸素欠乏のため、その組織の高エネルギーリン化合物(ATP、PCr:クレアチンリン酸)は減少し、Pi、PME(ホスホモノエステル)は増加する。またこのとき乳酸が生成するため、系は酸性になり、Piの化学シフトは高磁場に移る。一般に筋肉の場合、虚血状態や、酸素欠乏状態では、ATPはPCrがある濃度まで下がるまではほぼ変らないが、そのPCrが消費されてしまうと、糖分解がATPのレベルを保つことができず、次第に減少しはじめる。ラットの脳などの場合のようにこの二つのシグナルが同時に下る場合もある。筋肉が運動する場合も酸素欠乏と同様な変化を示す。

(ハ)遊離の $Mg^{2+}$ の濃度([I])の3参照 (ニ)飽和移動法によって酵素反応速度を決定する。PCr + ADP  $\rightleftharpoons$  Cr(クレアチン) + ATPのクレアチンキナーゼ反応ではATPの $\gamma$ 位のPのシグナルに選択的に高周波を照射すると、そのシグナルは磁氣的に飽和され、見えなくなる(即ち高周波を吸収しなくなる)。この時、同時に $\gamma$ 位のPが素速く変るPCrのPのシグナルも飽和を記憶しているため強度が減少する。この原理を利用してPCr  $\rightleftharpoons$  ATPの反応のフラックスが計算できる。この反応では正方向、逆方向の反応は筋肉や脳のATPの消費より充分に速く、平衡関係が成立している。即ちPCrが“energy buffer”の役目をしている。

この10年の間に多くの生体系の $^{31}P$ スペクトルが測定されている。大腸菌、イースト菌、真正粘菌、エーリッヒ腹水ガン細胞などの細菌、細胞、ミトコンドリア、赤血球、血小板、血液等は10~20mm測定管中培養液に懸たくさせ、好氣的条件下で測定されている。マウス、ラット等の小動物の摘出された臓器(心臓、腎臓、筋肉、肝臓、脳、眼の角膜やレンズ、皮膚)は、培養液や血液で灌流しながら測定されている。*in vivo*測定としては、局所スペクトルコピー法(表面コイル法やフィールドプロファイリング法等)で動物、ヒトの特定の部位が測定できる。以上の結果については個々文献を挙げないが最近の総説、成書を参照されたい。<sup>1~7)</sup> $^{31}P$ スペクトルの最近のいくつかの報告を紹介する。

ヒトの大腸の腺ガン細胞( $2.5 \times 10^6$  cells)を培養液中20mm測定管で灌流下測定した。図1Aは25 mMのグル

コースを含む培養液中十分な好氣的条件下測定したもので、DPDE(ヘキソズニリン酸誘導体:ウリジンニリン酸-N-アセチルヘキソースアミンが主成分)、PME(ホスホモノエステル:ホスホリルコリンやグルコース-6-リン酸)のシグナルが強いのが特徴的で、この点他の哺乳動物の細胞とは違っている。これはグリコーゲン代謝酵素の活性が大きいことを示している。雰囲気 $N_2-CO_2$ の無酸素下にかえると、図1Bに示したようにNTP(ヌクレオシド三リン酸)のレベルは2時間後には、はじめの60%まで下り、細胞内Pi( $Pi^{in}$ )は増加し、細胞外Pi( $Pi^{ex}$ )と $Pi^{in}$ (はじめpHは7.1)の化学シフトの差は0.5であったのが、1くらいまで広がり、pH<sub>in</sub>が酸性になることを示している。これらのシグナルに対するグルコース欠乏効果をみると、グルコース欠除培養液中ではNTPは下りはじめ、2時間後にははじめの10%程になる。ところがDPDE(ウリジンニリン酸誘導体など)は60%のレベルで一定になる。再び含グ

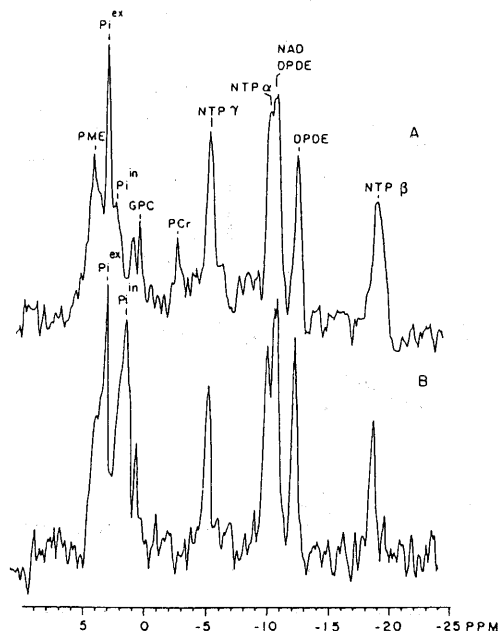


図1 人の大腸の腺ガン細胞( $2.5 \times 10^6$  cell)の $^{31}P$ -NMR. A:好氣的条件下25mMグルコースを含む培養液で灌流し測定。B: $N_2-CO_2$ (95:5)の雰囲気下1時間後測定。GPC;グリセロホスホリルコリン、DPDE;ウリジンニリン酸ヘキソズ誘導体、PME;ホスホモノエステル、NTP;ヌクレオシド三リン酸など。文献8)より引用。

リコース培養液に移すと、糖分解が活発に働き始め、乳酸生成のためpHは一気に下る<sup>8)</sup>。ヒトの網膜色素上皮細胞のスペクトルも測られ、スペクトル上の種々のリン化合物がこの細胞が正常か、異常かの判断の基礎データになることを指摘している<sup>9)</sup>。

次に臓器のスペクトルであるが、摘出したラットの肝臓を灌流下測定すると(図2A)、細胞質基質中のATP(アデノシン三リン酸)は7.4mM、Pi(無機リン)5.3mM、ADP(アデノシン二リン酸)0.9mM、pH  $7.25 \pm 0.05$ 、遊離の $Mg^{2+}$  0.5mMと求められる。Krebs灌流液を0.4%エタノールを含むものに換えると、図2B、Cに示したようにATP、Piはそれぞれ25%減少する。この肝を凍結し、抽出した代謝物のスペクトルよ

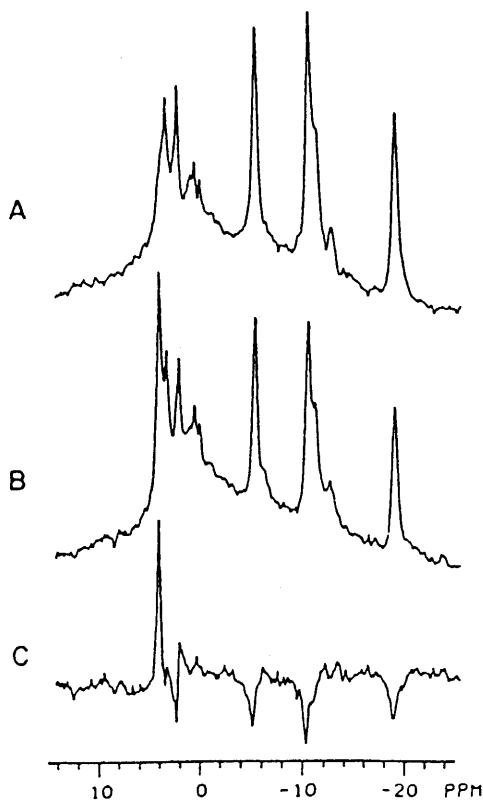


図2 A: Krebs培養液で、灌流したラット肝のスペクトル  
B: 70mMのエタノールを含む灌流液での灌流ラットのスペクトル  
C: AとBの差スペクトル(B-A)  
文献10)より引用。

りsn-グリセロール-3-リン酸(11mM)が生成していることがわかった。図3にはこの時のリン化合物の濃度変化を示したが、pHiはほとんど変らない。エタ

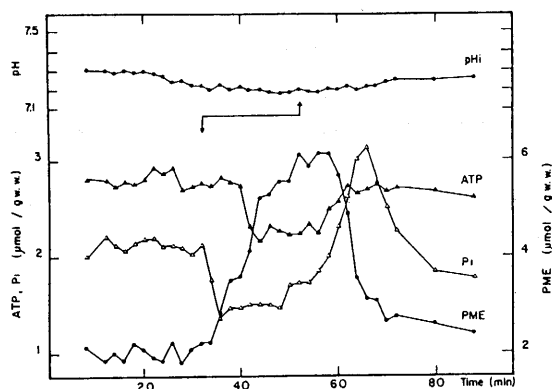


図3 エタノール投与の細胞内リン代謝物に対する影響。30分Krebs灌流液で灌流し、20分70mMエタノールを含む液で灌流(矢印の間)、再度はじめのように灌流。  
文献10)より引用。

ノール酸化の間、PME(ホスホモノエステル)が増加し、そのためPi、ATPは減少する。その後細胞膜を通してPiをとりこみ、Piは1.5倍位の値になってからもとの値にもどる。リン化合物に対する絶食の効果をみると、48時間絶食したラットの肝では、ATP、Pi、ADPはそれぞれ5.3mM、11.5mM、0.8mMと通常のものよりATPは小さく、Piは大きい。この肝をエタノールを含む灌流で灌流すると、ATPのレベルは変わらないが、Piは10%減少する<sup>10)</sup>。

ホルモンの代謝に及ぼす影響を調べるためメスのラットに対し、 $17\beta$ -エストラジオールを注入し、0~48時間後子宮を摘出し、Krebs-Ringer緩衝液中で測定している。コントロールに比べ、ホルモンを注入されたものはATP、遊離 $Mg^{2+}$ の濃度が増加しており、クレアチンキナーゼ反応の平衡に影響を及ぼしていることがわかる。ラットの腎臓のスペクトル[帰属されたシグナルとしてはAMP、Sugar-P:糖リン酸、ATP、グリセロホスホリルコリンなど]も報告されており、飽和移動法により腎臓におけるADPとPiよりのATPの生成速度が求められ、この値は酸素の消費速度とパラレルである<sup>11)</sup>。飽和移動法に関連して、ラットの心

臓の心筋層のPCr  $\rightleftharpoons$  ATPの反応で、PCr $\rightarrow$ ATPの速度の方がATP $\rightarrow$ PCrの速度より大きな値が求められている。平衡関係が成立しているならこの二つの速度は同じになるはずである。この矛盾はPCr  $\rightleftharpoons$  ATP  $\rightleftharpoons$  Piの平衡関係に由来すると考え、PiとATPまたはPCrを同時に飽和する方法(Multiple saturation transfer)でATP  $\rightleftharpoons$  Piの効果を除いて測ると、先の二つの反応速度は等しく求められ、心筋層におけるリン原子の三分子間の平衡が証明された。<sup>13)</sup>

筋肉へのNMR応用研究例を挙げると、麻酔したラットの腓腹筋に強縮性刺激を与え、収縮をおこさせた時の変化を測定している。収縮をくり返すことにより、次第にPCrのレベルが下り、Piのレベルは上り、酸性になっていく。ATPのレベルはそれ程変わらず、PCrの減少はPiの増加とはほぼ一致する。<sup>14)</sup> 指の屈筋を運動させた時のPi, PCr, pHとの間の関係を 図4 に示した。10人の被験者(うち5人女性)により得られたデータ(X印静止時、○印は運動した後の値。詳しくは図4 説明文参照。)で、pHは運動のはじめほとんど変わらないが、PCrが50~70%なくなってからようやく速い解糖回路

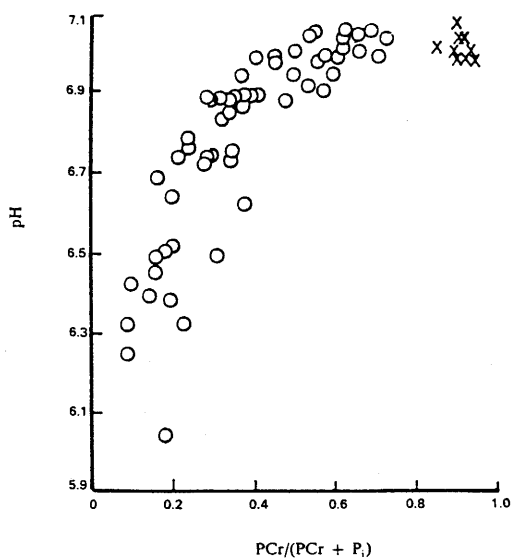


図4 指の屈筋を運動させた時のpHとPCr濃度との関係

10人の被験者(5人女性)により測定された。X印は静止している時の値。O印はゴム球を圧する(100-150mmHg)ように指を曲げる運動を7.5分くり返し、その後測定(測定時間64s)。文献15)より引用。

が動き出し、乳酸の生成のためpHが6位まで下っていく。<sup>15)</sup>

血液で灌流した豚の肺(磁場を均一にするため *in vivo* の状態で脱気。)のスペクトルでは、ATP、PDE (ホスホジエステル)、Pi、PME (ホスホモノエステル)のシグナルは見えるが、PCrのシグナルは観測されない。即ち平滑筋、肺動脈、気道のPCrの濃度は検出されない程小さい。よい条件で灌流すると、肺の状態を示すマーカーとなるこれらの代謝物のシグナルは4時間は安定している。酸素欠乏、虚血の条件のもとでは他の生体系と同様な処動を示す(図5)。<sup>16)</sup>

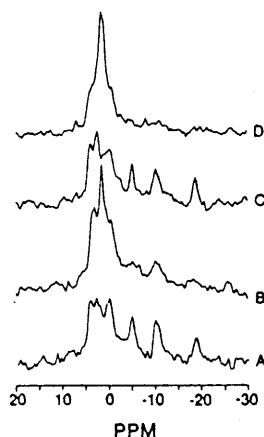


図5 豚の灌流した肺の虚血の効果  
A: コントロールスペクトル (左肺)  
B: 虚血15分後のもの ( " )  
C: 再灌流10分後 ( " )  
D: 4時間以上灌流しなかった右肺のスペクトル  
文献16)より引用。

7人の健康な被験者(25~40才、6人男性、1人女性)を1.6T 全身用磁石と表面コイルを用い、測定した代表的な肝臓のスペクトル(図6)はラットの肝臓のそれ図2Aと似ており、ATP、Pi、PDE (ホスホジエステル、ラットの場合にはグリセロール-3-リン酸がコリンとエタノールアミンでエステル化されたものと同定されている。)、PME (ホスホモノエステル、糖リン酸)のピークが帰属され、肝細胞基質のpHは7.18、遊離のMg<sup>2+</sup>は300  $\mu$ Mと求められた。これらの被験者にフラクトースを静脈に注入(250mg/kg体重)すると、5分後、Sugar-P (糖リン酸)は7倍に増え、

Pi、ATPは1/3～1/4に減少する。この代謝は20分で終る。Piは肝臓に集まったフラクトースにトラップされるため減少する。細胞質基質のPiが減少すると、ATP分解の主要な酵素であるアデノシンリン酸デア

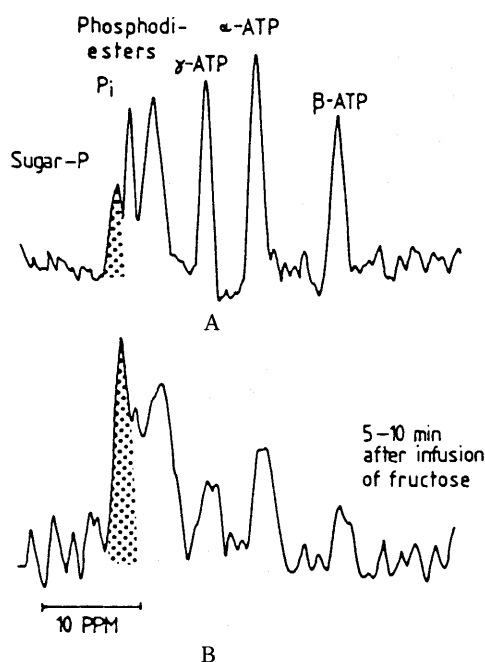


図6 健康な被験者の肝代謝に対するフラクトース静脈注入の効果

A: フラクトース注入前

B: フラクトース(250mg/kg体重)を注入後5～10分のもの

ミナーゼが活性になり、ATPは分解して、尿酸になる。その結果ATPは減少する。<sup>17)</sup> McArdle 症候群、<sup>18)</sup> ミトコンドリアミオパチー、<sup>19)</sup> ホスホフラクトキナーゼ欠乏症<sup>20)</sup>、Duchenne 筋ジストロフィー<sup>20,21)</sup> についても<sup>31</sup>P-NMRスペクトルが報告されている。

## 8. <sup>13</sup>C-NMR法の生体系への応用

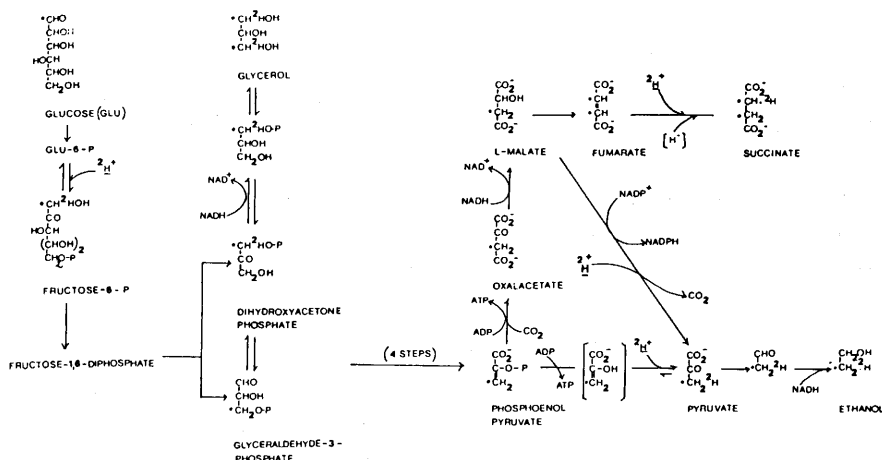
生体関連物質の多くは炭素原子を骨格としてもっているため、生体系における物質の流れを炭素原子を通して追跡することができる。即ち生体内の代謝研究にこの方法は最も適している。代謝物の一部しかP原子を含まないので<sup>31</sup>P-NMR法はこの目的のためには力不足である。<sup>13</sup>Cの感度は<sup>31</sup>Pの1/4程であるが、天然

存在比1.1%(大部分は<sup>12</sup>Cで、磁石の性質はない。)でしかない。生体系に含まれる代謝物の濃度が $10^{-1} \sim 10^{-2}$  mM/ml程度のもので、測定時間は10～40分程度かかる。このため<sup>13</sup>C高濃度化合物(例えばグルコースのC-1を<sup>13</sup>Cに置き換えた化合物、高価だが市販されており、合成することもできる。)を生体系に入れ、その<sup>13</sup>Cを含む化合物の変化を<sup>13</sup>C-NMRで追跡し、代謝研究を行う方法がよく行われる。<sup>13</sup>C-NMR法の長所の一つは<sup>13</sup>Cの化学シフトが0～200ppmの範囲に及び、化合物の同定がより確かで、より容易である点にある。( <sup>1</sup>H-NMRではシグナルは10ppm、<sup>31</sup>P-NMRは50ppmの範囲に現われ、<sup>13</sup>Cに比べ、せまい。)

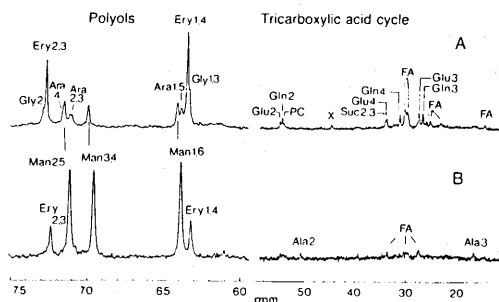
測定法は<sup>31</sup>Pの場合と同じで、測定管中、臓器灌流法、生体局部測定法により行う。測定対象となる化合物は、低分子量含炭素化合物( $10^{-2}$  mM/ml以上)グリコーゲン、厳密な構造解析はむずかしいが、脂質、ポリペプチド等である。

今まで多くの代謝研究が報告されている。大腸菌を用いたグルコースの代謝<sup>23)</sup>、酵母を用いた嫌気性解糖、<sup>24)</sup> ラット肝細胞による[1, 3-<sup>13</sup>C<sub>2</sub>]グリセリンによるグルコースの合成<sup>25)</sup>、同細胞にエタノールと[3-<sup>13</sup>C]アラニンを加えた時の代謝<sup>26)</sup>、この仕事の延長としてマウス肝を<sup>13</sup>Cでラベルしたアラニンとエタノールで灌流した時の代謝<sup>27)</sup>、甲状腺機能亢進ラット肝細胞の糖新生反応<sup>28)</sup>、肝代謝研究で<sup>13</sup>C-NMRと<sup>14</sup>C-トレーサー実験との結果がよく一致すること<sup>29)</sup> 等である。最近の論文を紹介する。

真菌 (*Aspergillus nidulans*) の菌糸体を種々の炭素源を含む培養液中で育て、菌糸を集め、培養液中の炭素源の違い、培養条件の違いにより、どのような代謝物が得られるかを調べている。図7Aは *A. nidulans* を好氣的条件下で蔗糖/酢酸イオン(0.1M/0.01M)中で育てたもののNMRである。スペクトルではポリオールの部分とトリカルボン酸(TCA)回路(またはクエン酸回路)の部分とに分れる。不十分な好氣的条件下(図7B)ではエリトリール(Ery)が少なくなり、マンニトール(Man)が多くなる。TCA回路からの部分はほとんど見えない。代謝分解の概略図も図7に示したが、酸素が十分供給されると、ペントースリン酸経路と解糖回路を通してフラックスが刺激され、両経路からの分解物(エリトリール、アラビトール、グリセロール)が多量生成する。酸素が十分供給されないと、酸

スキーム1 *C. fasciculata*のEmbden-Meyerhof解糖回路

グルコースの $^{13}\text{C}$ -1( $\bullet$  C)の代謝の流れと排泄物での分布および $^2\text{H}_2\text{O}$ (重水) 25%を含む培養液中での $^1\text{H}$ (重水素)の分布。文献31)より引用。

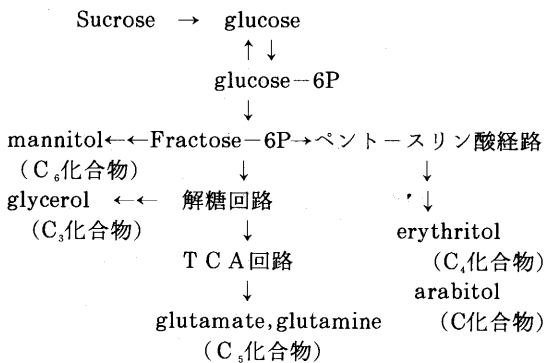
図7 *A. nidulance*の $^{13}\text{C}$ -NMRスペクトル

FA ; fatty acyl chain, PC; phosphatidyl choline, PE ; phosphatidyl ethanolamine, Man ; mannitol, Gly ; glycerol, Ery; erythritol, Ara; arabitol, Te ; trehalose, Suc; succinate,

A: 充分な好氣的条件下蔗糖/酢酸イオン(0.1M/0.01M)中で育てた *A. nidulance* のスペクトル

B: 不十分な好氣的条件下でのスペクトル

## 代謝系の概略図



文献30)より引用

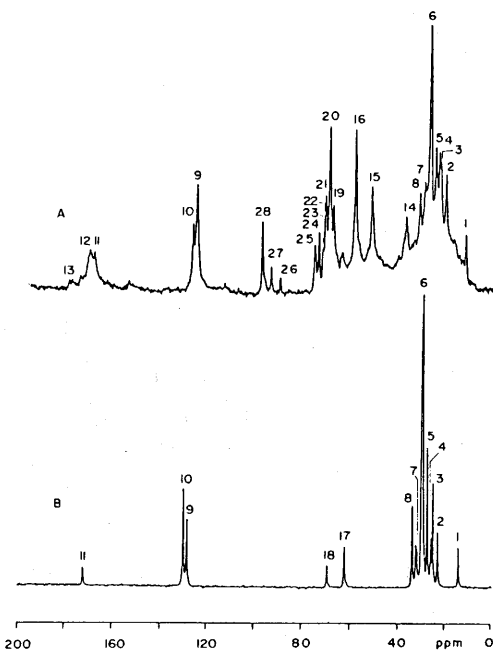


図8 ラット肝臓(A), 脂肪組織(B)の $^{13}\text{C}$ -NMR 1~11はfatty acyl chainsのC, 12~15はphospholipids, free carboxylate groupsのC, 16, 19-28はcarbohydrates 17, 18はtriglycerides, phospholipidsのグリセリンのC骨格。

文献32)より引用。

化的条件を必要としないマンニトール(フラクトースの還元体相当する。)が多くなる。当然グルタミン酸イオン(Glu)等のTCA回路を経たものも十分な好氣的条件下では生成しにくくなる<sup>30)</sup>。

昆虫の寄生虫 *Crithidia fasciculata* ではグルコースの分解は好氣的条件下でもCO<sub>2</sub>に分解するのは一部で、コハク酸、酢酸を排泄する。この *C. fasciculata* (3 × 10<sup>7</sup> cells/3 ml) を好氣的条件下[1-<sup>13</sup>C]グルコースを含む培養液中で培養し、その上澄液の<sup>13</sup>C-NMRを測ると、[2-<sup>13</sup>C]エタノール、[1, 3-<sup>13</sup>C<sub>2</sub>]グリセロー

ル、[2-<sup>13</sup>C]コハク酸イオン、[3-<sup>13</sup>C]リンゴ酸イオンが観測され、これらが排泄されていることがわかる。細胞のHC l O<sub>2</sub>抽出物のスペクトルには[3-<sup>13</sup>C]ホスホエノールピルビン酸が上記の化合物の他に含まれている。25%重水(<sup>2</sup>H<sub>2</sub>O)を含む培養液中での解糖経路をスキーム1に示した。このスキームの主要な点はコハク酸の生成機構にある。<sup>2</sup>H、<sup>13</sup>Cの分布より[2-<sup>13</sup>C、2-<sup>2</sup>H]コハク酸イオンは[3-<sup>13</sup>C]ピルビン酸イオンにCO<sub>2</sub>が反応したのでは説明できず、<sup>2</sup>Hを含まない[3-<sup>13</sup>C]ホスホエノールピルビン酸イオンにCO<sub>2</sub>が反応し、固定化され、[3-<sup>13</sup>C]リンゴ酸を経て、生成することが証明された。<sup>31)</sup>

次に臓器の<sup>13</sup>C-NMRであるが、図8はラットから摘出した灌流肝臓と脂肪組織のスペクトルで、シグナルの脂質、炭水化物への帰属を示した。図9は特殊配合飼料により飼育されたラット肝の *in vivo* <sup>13</sup>C-NMRである。当然のことながら図9Aのコントロールラットの肝のスペクトルと図8Aの灌流肝のそれとはよく

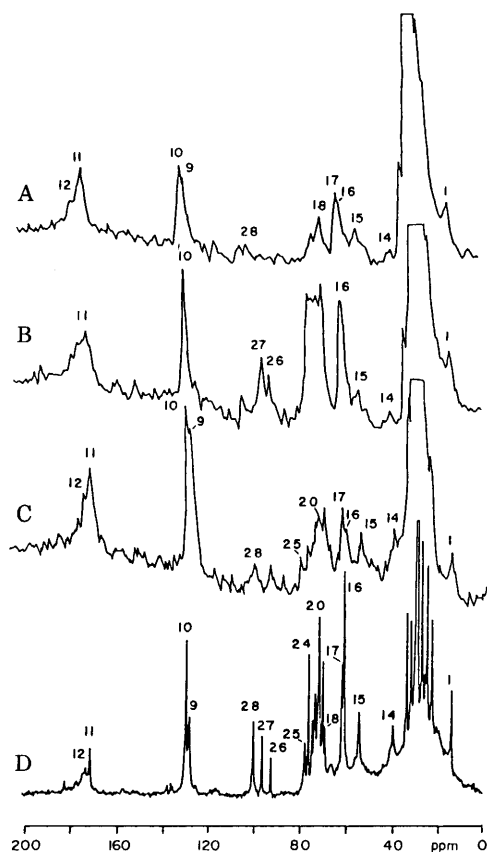


図9 特殊配合飼料により飼育されたラット肝の<sup>13</sup>C-NMR

- A: コントロール、
- B: 無脂肪、高炭水化物食、飼育のラットの肝臓
- C: 高ポリ不飽和脂肪酸よりなる高脂肪食、飼育のラットの肝臓
- D: Cのラットからの摘出肝。(Cのスペクトル解析のため)

文献32)より引用。

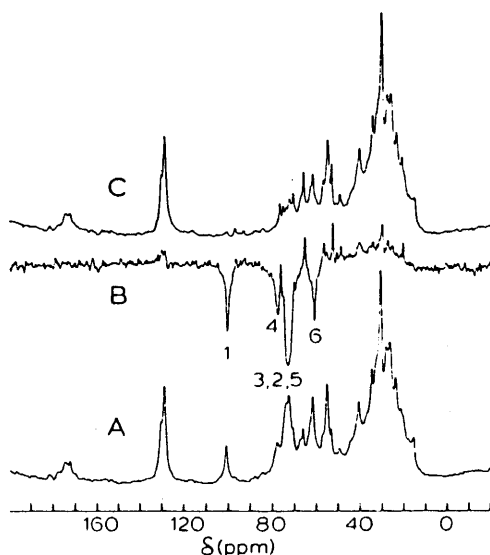


図10 灌流ラット肝におけるグルカゴン刺激によるグリコーゲン分解

- A: 通常食で飼育した灌流ラット肝の<sup>13</sup>C-NMR
- B: C-A 負のシグナルはCで消失したグリコーゲンに相当する。
- C: 20nMグルカゴン処理5時間後の灌流ラット肝の<sup>13</sup>C-NMR

文献33)より引用。

似ている。図9Bは無脂肪、高炭水化物食飼育のラット肝のスペクトルで、大量の炭水化物、モノ不飽和脂肪酸(シグナル10)の存在を示す。図9Cはポリ不飽和脂肪酸脂質より成る高脂肪食飼育のラット肝のスペクトルで、図9Bでは見られなかったポリ不飽和脂肪酸の存在を示すシグナル9が強くあらわれ、飼料の違いによる影響がはっきりでている。図10Aはコントロールの灌流ラット肝のNMRであるが、図10Cはこの肝臓を20nMグルカゴンで5時間処理して測定したスペクトルである。図9BはC-Aの差スペクトルで、グリコーゲンに相当するシグナルが負にあらわれ(グリコーゲンは図8のシグナル16、20、22、25、27)、A→グルカゴン処理→グリコーゲン分解→Cの *in vivo* の証明である。図11は逆に肝でのグリコーゲン合成を示したものである。図11Aは $[1-^{13}\text{C}, 26\%]$ グルコース(Glc)(30.6mM)を含むKrebs緩衝液で20分間灌流後の肝ス

ペクトル、11Cはさらに6.2時間灌流した時のスペクトルである。11BはC-Aの差スペクトルで、グリコーゲンのC-1、6位に $^{13}\text{C}$ が導入されていることがわかる。 $^{13}\text{C}$ のC-6位へのスクランプリングは $[1-^{13}\text{C}]$ Glcが解糖回路で三糖類に分解され、この際C-1、6位が等価になり、糖新生反応により $[6-^{13}\text{C}]$ Glcが再合成されるためである。肝臓では前記のように糖尿病に関連した細胞レベル、臓器レベルの研究が報告されているが Streptozotocin で処理した糖尿病ラットと通常のラットの摘出灌流肝で $[3-^{13}\text{C}]$ アラニンと $[2-^{13}\text{C}]$ エタノールを含む培養液で灌流したスペクトルが報告されている。図12Aはコントロールとして通常のラットを24時間絶食後、摘出した肝臓を前記ラベル化合物

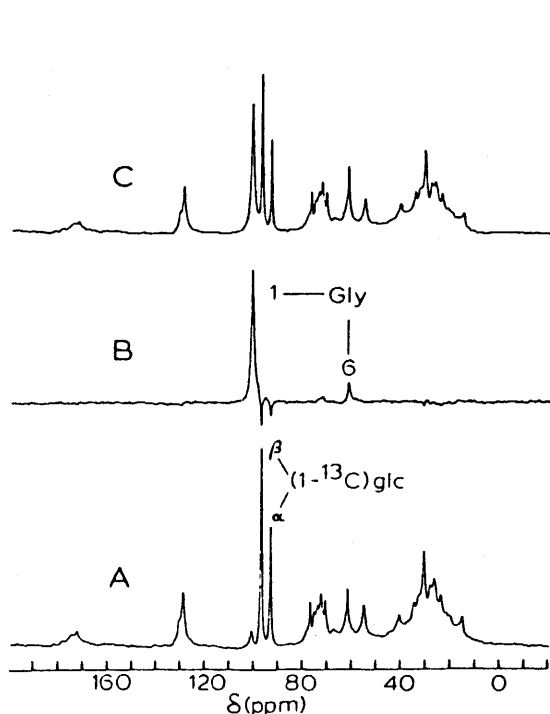


図11 ラット摘出灌流肝における $[1-^{13}\text{C}]$ グルコース(Glc)よりグリコーゲンの合成

A:  $[1-^{13}\text{C}]$  Glc(30.6mM)含有のKrebs緩衝液による灌流20分後の $^{13}\text{C}$ -NMR

C: さらに灌流6.2時間後の $^{13}\text{C}$ -NMR

B: C-Aの差スペクトル

文献33)より引用。

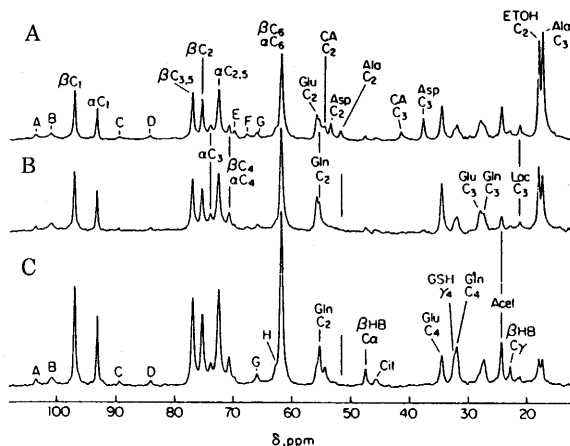


図12  $[3-^{13}\text{C}]$  アラニンと $[2-^{13}\text{C}]$  エタノールで灌流した時の摘出ラット肝の $^{13}\text{C}$ -NMR

A: 24時間絶食後の通常のラットより摘出した肝臓の $^{13}\text{C}$ -NMR(ラベル化合物を加えてから190~200分の間に測定)

B: 糖尿病ラットより摘出した肝臓の $^{13}\text{C}$ -NMR(ラベル化合物を加えてから110~120分の間に測定)

C: 同肝臓(190~200分の間に測定)

$\alpha\text{C}_1, \beta\text{C}_1, \alpha, \beta$ -グルコースのC-1, Glu; グルタミン酸イオン, Gln; グルタミン, Asp; アスパルギン酸イオン, Ala; アラニン, CA; N-カルバモイルアスパラギン酸イオン, GSHr; グルタチオン還元型のC-4(酸化型のC-4とoverlap), Acet; 酢酸イオン, Cit; クエン酸イオン, Lac; 乳酸イオン、他は文献参照。文献34)より引用。



で灌流し、190~200分の間に測定した結果である。図12B,Cは糖尿病ラットよりの肝臓を同濃度のラベル化合物で灌流し、それぞれ110~120分、190~200分の間に測定した。なおスペクトルを簡単にするため自然存在の $^{13}\text{C}$ によるシグナルは差し引いてある。12A,B,Cのチャートと比較すると、糖尿病肝の方がグルコース生成速度はほぼ2倍速い。灌流液中のグルコース濃度も同様な結果を示す。図12ではその他20~55ppmの範囲にいくつかのアミノ酸のピークが見えるが、AとCのスペクトルでは $^{13}\text{C}$ の分布のし方が違う。<sup>34)</sup> 図13にはStreptozotocin処理糖尿病ラットの摘出灌流肝に対するインシュリンの効果を示した。図13Aは、灌流液に10mM[3- $^{13}\text{C}$ ]アラニン、7.3mM[2- $^{13}\text{C}$ ]エタノールを加えて、灌流し、その170~180分の間のスペクトルで、図13Bはまず7nMのインシュリンで35分間灌流し、その後、13Aと同様な操作で測定したスペクトルである。この13Aと13Bのスペクトルを比較すると、インシュリン処理をしていない13Aでは見られないアスパラギン酸イオン(Asp)、N-カルバモイルアスパラギン酸イオン(CA)がインシュリン処理をした13B

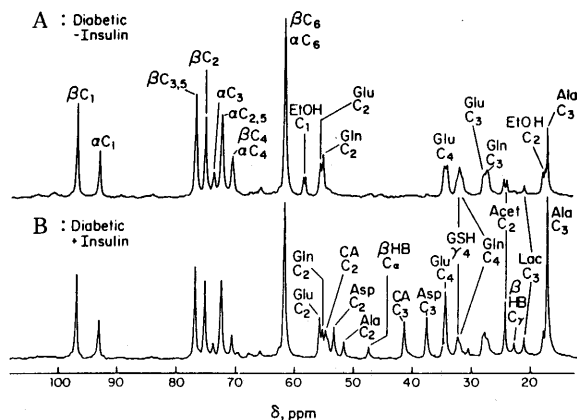


図13 糖尿病ラットの肝臓の $^{13}\text{C}$ -NMR

A:インシュリン処理をせず、10mM [3- $^{13}\text{C}$ ]アラニン、7.3mM [2- $^{13}\text{C}$ ]エタノールを加えて灌流。170~180minの間に測定

B:インシュリン(7nM)を含む灌流液で35分灌流し、その後(A)と同条件で測定。

文献35)より引用。

では観測される。この二つのシグナルは正常肝のスペクトルには含まれるので、インシュリン処理は代謝をより正常に近づけていることを示している。しかしスペクトル的にみて、最も顕著なインシュリンの効果は、糖尿病によって増大したピルパートキナーゼ反応のフラックスを十分にコントロールレベルまで下げていることである。<sup>35)</sup>

心臓のスペクトルとしては、モルモットの *in vivo* プロトン照射 $^{13}\text{C}$ -NMR(プロトンを照射すると、プロトンによる $^{13}\text{C}$ シグナルの分裂がなくなり、より鋭いピークが得られる。)が測定されている(図14)。D-[1- $^{13}\text{C}$ ]グルコース(0.75g)とインシュリン(50単位)を静脈内に同時注入し、測定した。シグナルI、II、Vは脂肪酸に由来し、IIIaはグリコーゲンC-1、IIIb,cは $\beta$ -および $\alpha$ -D-グルコースのC-1に基づく。IVa,b,cの帰属は不明である。このスペクトルをもとに酸素欠乏の心筋グリコーゲンに与える効果を示したのが図15である。図15Aは図14の一部で、図15Bは呼吸装置停止、酸素欠乏3.5分後のスペクトルである。図15C(B-A差スペクトル)はグリコーゲン(グリ

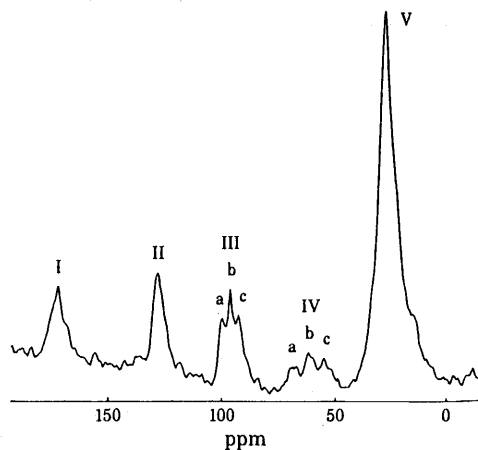


図14 モルモットの *in vivo* 心臓のプロトンテカッブル $^{13}\text{C}$ -NMR。

D-[1- $^{13}\text{C}$ ]グルコース0.75g、インシュリン50単位を静脈内に同時注入し、44~86分後の間に測定。I(?C=O)、II(?C=C?)、V(-CH<sub>2</sub>-)は脂肪酸、IIIb,cは $\beta$ -、 $\alpha$ -D-グルコースのC-1、IIIaはグリコーゲンのC-1に帰属される。IVの帰属は不明である。

文献36)より引用。

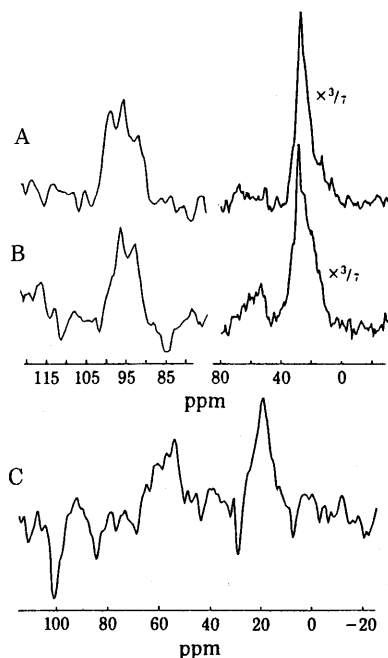


図15  $^{13}\text{C}$ でラベルした心筋グリコーゲンに対する酸素欠乏の結果

A: 図14の一部

B: 呼吸装置停止、酸素欠乏3.5分後から6分間のスペクトル

C: B-A 差スペクトル

文献<sup>36)</sup>より引用。

コーゲンのC-1=101ppmの負のシグナル)が分解し、乳酸(乳酸のC-3=21.0ppmの正のシグナル)が生成していることを示している。<sup>36)</sup> モルモットの心臓を5mMグルコースと5mM[3- $^{13}\text{C}$ ]乳酸で灌流すると、スペクトル上にはグルタミン酸イオンだけが代謝物として観測される。 $^{13}\text{C}$ はグルタミン酸イオンのC-4位にTCA回路でまづ入る。この回路がくり返されると、 $^{13}\text{C}$ は次第にスクランプリングをおこし、グルタミン酸イオンのC-3、C-2等にも入り定常状態になる。この定常状態での同イオン上の $^{13}\text{C}$ の分布の割合より、TCA回路に入る $^{12}\text{C}$ -対 $^{13}\text{C}$ -アセチルCoAの割合が報告されている。<sup>37)</sup>

モルモットの脳のスライスを[1- $^{13}\text{C}$ ]グルコース中で1~2時間培養した後、プロトン照射 $^{13}\text{C}$ スペクトルが測定された。グルコースの $^{13}\text{C}$ -1が代謝分解物の相当するCに導入され、グリコーゲン(C-1)、グルタミン酸イオン(C-2,4)、グルタミン(C-2)、 $\gamma$ -アミノ酪酸イオン(C-3)、乳酸イオン(C-3)、アラニン(C-3)が含まれている。グルタミン酸イオン、 $\gamma$ -アミノ酪酸イオンは神経伝達物質として重要な代謝物である。<sup>38)</sup>

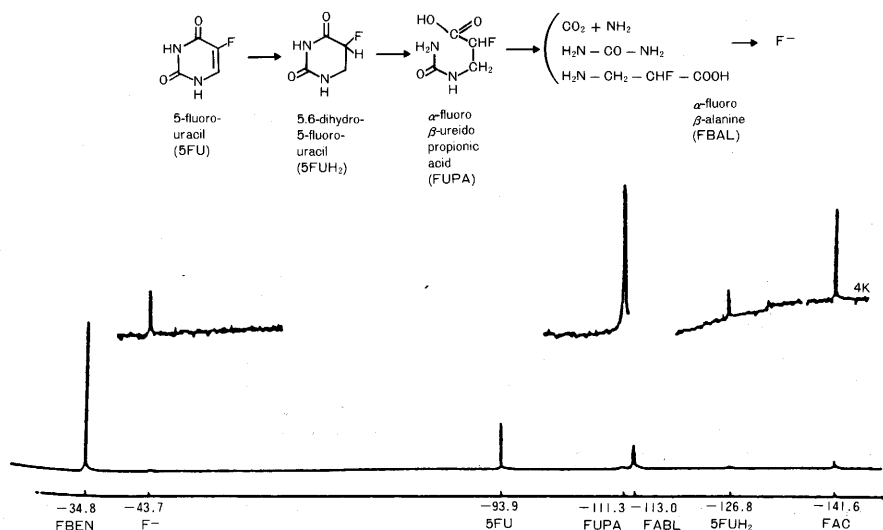


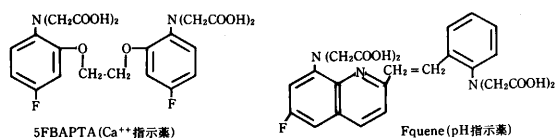
図16 5-フルオロウラシル(5-Fu)の分解過程と5-Fu投与5日目の0および2時間後の尿の $^{19}\text{F}$ -NMR(化学シフトの基準は $\text{CF}_3\text{COOH}$ )  
FBEN;4-フルオロ安息香酸ナトリウム,FAC;フルオロ酢酸ナトリウム。  
文献<sup>41)</sup>より引用。

9.  $^{19}\text{F}$ -NMR法の生体系への応用。

$^{19}\text{F}$ は天然存在比100%の核種で、 $^1\text{H}$ に対して83%の感度をもっている。本来生体系には存在しない核種なので、測定を行ってもバックグラウンドはない。従って生体系に注入されたフッ素化合物を追跡するのに $^{19}\text{F}$ -NMRはたいへん適している。脳における代謝が報告されている2-フルオロ-2-デオキシグルコース(グルコースの2位の水酸基をフッ素に置き換えたもの)のように代謝分解がグルコースと比較し、興味もたれている物質や、含フッ素麻酔剤、含フッ素制ガン剤、人工血液としての多フッ化炭素化合物の研究や、含フッ素化合物を利用した細胞内pH、 $\text{Ca}^{2+}$ イオン濃度測定に $^{19}\text{F}$ -NMRは応用されている。<sup>39, 40)</sup>

制ガン剤の5-フルオロウラシル(5-FU)を結腸ガン患者に6日間投与(750mg/day)し、尿(0.7mlで十分)の $^{19}\text{F}$ -NMRを測定して5-FUの代謝分解が調べられている。主たる排泄物は $\alpha$ -フルオロ- $\beta$ -アラニン( $\text{H}_2\text{N}\cdot\text{CH}_2\cdot\text{CHF}\cdot\text{COOH}$ )で、代謝経路、分解物、尿のスペクトルを図16に示した。<sup>41)</sup> いもりをハローセンで麻酔し、測定管に尾を下にして入れ、その尾の*in vivo* NMRを測っている。全体的に $^{31}\text{P}$ -NMRは、

麻酔前後ではあまり変らないが、注目すべきは、 $\text{Pi}$ (無機リン酸)のシグナルが麻酔前では2本(おそらくミトコンドリアと細胞質基質の2つのプール中の $\text{Pi}$ に由来:化学シフトよりpHは7.08と7.31)であったのが、麻酔後は1本(pH 7.05)になる。 $^{19}\text{F}$ -NMRは2本のピークが見え、ハローセンが筋肉と脂質の2つのプール中に存在するためと考えている。フッ素置換アミノ酸エステル $[\text{CHF}_2\text{C}(\text{CH}_3)(\text{NH}_2)\text{COOCH}_3]$ が細胞膜を通過し、細胞内でエステラーゼにより加水分解され、生じたアミノ酸の $^{19}\text{F}$ の化学シフトより細胞内pHが求められ、 $^{31}\text{P}$ の結果ともよい一致を示す。<sup>43)</sup>



細胞質基質中の遊離  $\text{Ca}^{2+}$  濃度測定に 5 FBAPTA、pH測定にFqueneの $^{19}\text{F}$ -NMRが利用される。例えば5FBAPTAのアセトキシメチルエステル( $-\text{COOCH}_2\text{OCO}-\text{CH}_3$ )を細胞に浸し、細胞内に入ったエステルは加水分解され、5FBAPTAになる。5FBAPTAは $\text{Ca}^{2+}$ と錯体をつくり、

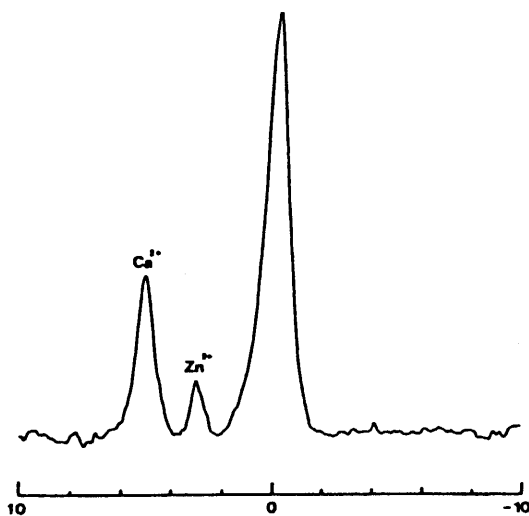
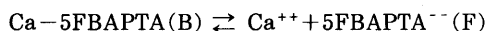


図17 0.15mM 5FBAPTAで処理したエーリッヒ腹水ガン細胞の $^{19}\text{F}$ -NMR シグナルは左から $\text{Ca}^{2+}$ 5FBAPTA、 $\text{Zn}^{2+}$ 5FBAPTA、遊離の5FBAPTA (0ppm)  
文献44)より引用。

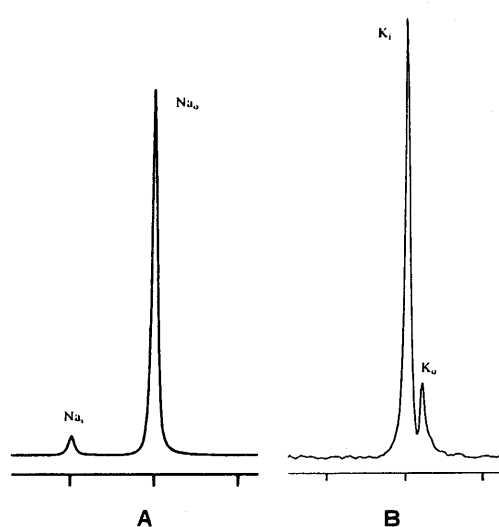


図18 A: ヒト赤血球の $^{23}\text{Na}$ -NMR (緩衝液に懸たく)  
 $\text{Na}_o$ : 細胞外 $\text{Na}^+$ ,  $\text{Na}_i$ : 細胞内 $\text{Na}^+$  イオン (Hematocrit, 52.2%)  
 B: 同細胞の $^{39}\text{K}$ -NMR (Hematocrit, 61.2%)  
 文献46)より引用。

$[Ca^{++}]_i = K_d(B/F)$ ,  $K_d$ : 解離定数 = 708 nM

$^{19}F$ -NMR上で錯体(B)と遊離の5FBAPTA(F)の面積比と $K_d$ より直接 $[Ca^{++}]_i$ を求められる。エーリッヒ腹水ガンでは $[Ca^{++}]_i = 200$  nMと求められ、図17に示したようにZn5FBAPTAも別のシグナルとして表われる。この指示薬を用いれば細胞分裂性の刺激に<sup>44)</sup>応答して、 $[Ca^{++}]_i$ が増加するのも追跡することができる。

#### 10. $^{23}Na$ -, $^{39}K$ -NMR法の生体系への応用

生体はその重さの60~80%は水で、 $Na^+$ 、 $K^+$ 、 $Cl^-$ 等の主要電解質を含んでいる。これらのイオンの細胞内外の分布、細胞膜を通しての輸送は神経、筋肉の基本的な機能に関連しているの、 $Na^+$ 、 $K^+$ のNMRもたいへん興味深い。 $^{23}Na$ 、 $^{39}K$ の天然存在比はそれぞれ100%、93.1%であるが、 $^1H$ に比べ感度は0.0925、0.0005と $K^+$ は $Na^+$ より2桁も悪い。 $^{39}K$ の良好なスペクトルを得るにはさらに測定に長時間を要する。異なるプール(区画、例えば細胞内と外)の $Na^+$ 、 $K^+$ などのイオンの濃度をそれぞれ測定するために、それぞれ違った位置にシグナルが現れるようにしなければならない。このためシフト試薬( $Dy^{3+}$ : ジスプロシウムのような常磁性イオンと $P_3O_{10}^{5-}$ : トリポリリン酸のようなキレート<sup>45)</sup>剤との錯体)を用いる。この方法の生体系へ応用を紹介する。ヒトの赤血球にシフト試薬: $Dy(P_3O_{10})_2^{7-}$ を加えて測定したのが図18A、Bの $Na^+$ 、 $K^+$ のスペクトルである。ヒトの新鮮な血液では、細胞内 $Na^+$ ( $Na_i^+$ )、 $K^+$ ( $K_i^+$ )はそれぞれ $8.1 \pm 0.8$  mM、 $110 \pm 12$  mMと求められた。 $Na^+$ を含まないコリン緩衝液中に赤血球を加え、イオノホアのgramicidineによりイオン輸送をおこさせ、その様子を $^{23}Na$ -NMRで追跡している。なおこの実験では、シフト試薬を加える前後に $^{31}P$ -NMRを測り、そのスペクトルが変らないことから、この試薬が生体系の活動にはほとんど影響がないことを確認<sup>46)</sup>している。同じ方法でガン化した大食細胞中の $Na^+$ <sup>47)</sup>は3.01 mMと報告された。

#### 11. その他

$^{14}N$ -,  $^{35}Cl$ -,  $^{15}N$ -NMR法の報告があるが、紙面の都合で省略する。文献を参照されたい。<sup>48,49)</sup>

以上〔I〕、〔II〕で最近のNMRスペクトロスコープについて概説した。生体測定の観点からはNMR法は非侵襲的で、経時測定ができ、大部分の場合測定の前処理が不要かまたは非常に簡単であるので、装置の普及と相まって今後よりroutineな手段になっていくと思われる。またNMR-CTより得た空間的情報のある部分をより厳密に、化学的に解析するため、多核種のスペクトロスコープの情報が必要になってくるであろう。今回ふれなかったが、より複雑な物質の解析可能な二次元NMR法も一般的になりつつあり、NMRの専門家以外も使い始めつつある。生体にとって重要なCa, Mg, Znについても応用が始まりつつあり、Ca<sup>50)</sup>結合蛋白の研究に $^{43}Ca$ -NMRが成果をあげている。NMRイメージングの多核種への応用、イメージングとスペクトルスコープの結合したスペクトルスコープイメージング等はNMR法を生体系研究に一層強力な手段にしていくであろう。

最後に有益なご助言をいただいた本学生物学南澤教授、志田助教授、病理学須田助教授に感謝いたします。

#### 文 献

- 1) 吉崎和男、西川弘恭: *in vivo* NMRスペクトル. 斉藤 肇、森島積編、高分解能NMR、p.213-227. 東京化学同人、1987.
- 2) 松井茂: NMRイメージング/スペクトルスコープ. 斉藤 肇、森島積編、高分解能NMR、p.58-70. 東京、東京化学同人、1987.
- 3) Williams, S.R. and Gadian, D.G. (1986) Tissue metabolism studied *in vivo* by nuclear magnetic resonance. Q.J. Exp. Physiol., 71, 335-360.
- 4) Brown C.E., Battocletti, J.H., and Johnson, L.F. (1984) Nuclear magnetic resonance in clinical pathology: Current trends. Clin. Chem., 30, 606-618.
- 5) Battocletti, J.H. (1984) Medical applications of NMR spectroscopy. 1. Clinical applications of phosphorus-31 NMR. CRC Crit. Rev. Biochem. Eng., 10, 1-26.

- 6) D.G. ガーデアン著、今井昭一訳： 医学と生物学のためのNMR、p.1-213.東京、西村書店、1985.
- 7) 吉岡 享、今成司著： ライフサイエンスのためのNMR、p.1-214.東京、産業図書株式会社、1982.
- 8) Desmoulin, F., Galons, J.-P., Canioni, P., Marvaldi, J., and Cozzone, P.J. (1986)  $^{31}\text{P}$  Nuclear magnetic resonance study of a human colon adenocarcinoma cultured cell line. *Cancer Res.*, 46, 3768-3774.
- 9) Miceli M.V., Kan L.-S., and Newsome, D.A. (1987) Phosphorus-31 NMR spectroscopy of cultured human retinal pigmented epithelial cells. *Invest. Ophthalmol. Visual. Sci.*, 28, 70-75.
- 10) Desmoulin, F., Cozzone, P.J., and Canion, P. (1987) Phosphorus-31 nuclear magnetic resonance study of phosphorylated metabolites compartmentation, intracellular pH and phosphorylation state during normoxia, hypoxia, and ethanol perfusion, in the perfused rat liver. *Eur. J. Biochem.*, 162, 151-159.
- 11) Degani, H., Shaer, A., Victor, T.A., and Kaye, M. (1984) Estrogen-induced changes in high-energy phosphate metabolism in rat uterus:  $^{31}\text{P}$  NMR studies. *Biochemistry*, 23, 2572-2577.
- 12) Freeman, D.M., Chan, L., Yahaya, H., Holloway, P., and Ross, B.D. (1986) Magnetic resonance spectroscopy for the determination of renal metabolic rate *in vivo*. *Kidney Int.*, 30, 35-42.
- 13) Ugürbil, K., Petein, M., Maindan, R., Michurski, S., and From, A.H.L. (1986) Measurement of an individual rate constant in the presence of multiple exchange: Application of myocardial creatine kinase reaction. *Biochemistry*, 25, 100-107.
- 14) Kushmerick, M.J., and Meyer, R.A. (1985) Chemical changes in rat leg muscle by phosphorus nuclear magnetic resonance. *Am. J. Physiol.*, 248, C542-C549.
- 15) Taylor, D.J., Bore, P.J., Styles, P., Gadian, D.G., and Radd, G.K. (1983) Bioenergetics of intact human muscle. A  $^{13}\text{C}$  Nuclear magnetic resonance study. *Mol. Biol. Med.*, 1, 77-94.
- 16) Pillai, R.P., Buescher, P.C., Pearse, D.B., Sylvester, J.T., and Eichhorn, G.L. (1986)  $^{31}\text{P}$  NMR Spectroscopy of isolated perfused lungs. *Mag. Reson. Med.*, 3, 467-472.
- 17) Oberhaensli, R.D., Galloway, G.J., Taylor, D.J., Bore, P.J., and Radda, G.K. (1986) Assessment of liver metabolism by phosphorus-31 magnetic resonance spectroscopy. *Br. J. Radiol.*, 59, 695-699.
- 18) Ross, B.D., Radda, G., Gadian, D.G., Rocker, G., Esiri, M., and Falconer-Smith, J. (1981) Examination of a case of suspected McArdle's syndrome by  $^{31}\text{P}$  nuclear magnetic resonance. *N. Engl. J. Med.*, 304, 1338-1343.
- 19) Gadian, D., Ross, B., Bore, P., Radda, G., Hockey, J., Taylor, D., and Styles, P., (1981) Examination of a myopathy by phosphorus NMR. *Lancet*, 2, 774-775.
- 20) Edward, R.H.T., Wilkie, D.R., Dawson, M.J., Gordon, R.E., and Shaw, D. (1982) Clinical use of NMR in the investigation of myopathy. *Lancet*, Mar 27, 725-730.
- 21) Newman, R.J., Bore, P.J., Chan, L., Gadian, D.G., Styles, P., Taylor, D. and Radda, G.K. (1982) NMR studies of forearm muscle in Duchenne dystrophy. *Br. Med. J.*, 284, 1072-1074.
- 22) Alger, J.R., Gathering metabolic information using  $^{13}\text{C}$  and  $^1\text{H}$  high resolution spectra of living systems. Axenrod, T. and Ceccarelli, G. (eds), *NMR in living system*, P. 231-264. D.Reidel Publ Comp. 1986.
- 23) Ugürbil, K., Brown, T.R., den Hollander, J.A., Glynn, P., and Shulman R.G. (1978) High resolution  $^{13}\text{C}$  nuclear magnetic resonance studies of glucose metabolism in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 75, 3472-3476.
- 24) den Hollander, J.A., Brown, T.R., Ugürbil, K., and Shulman, P.G. (1979)  $^{13}\text{C}$  nuclear magnetic resonance studies of anaerobic glycolysis in suspensions of yeast cells. *Proc. Natl. Acad.*

- Sci. USA., 76,6096-9100.
- 25) Cohen, S.M., Ogawa, S., and Shulman, R.G. (1979)  $^{13}\text{C}$  NMR Studies of gluconeogenesis in liver cells: Utilization of labeled glycerol by cells from euthyroid and hyperthyroid rats. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 76,1603-1607.
  - 26) Cohen, S.M., Glynn, P., and Shulman, R.G., (1981)  $^{13}\text{C}$  NMR study of gluconeogenesis from labeled alanine in hepatocytes from euthyroid and hyperthyroid rats. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 78,60-64.
  - 27) Cohen, S.M., Shulman, R.G., and McLaughlin, A.C. (1979) Effects of ethanol on alanine metabolism in perfused mouse liver studied by  $^{13}\text{C}$  NMR. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 76,4808-4812.
  - 28) Cohen, S.M., and Shulman R.G.  $^{13}\text{C}$  NMR study of gluconeogenesis in hepatocytes from euthyroid and hyperthyroid rats and in perfused mouse liver. In situ measurements of pyruvate kinase flux and pentose cycle activity. Cohen, J.S. (eds) Noninvasive probes of tissue metabolism, P. 119-147. John Wiley and Sons, NY, 1982.
  - 29) Cohen, S.M., Rogstad, R., Shulman, R.G., and Katz, J. (1981) A comparison of  $^{13}\text{C}$  nuclear magnetic resonance and  $^{14}\text{C}$  tracer studied by hepatic metabolism. J. Biol. Chem., 256,3428-3432.
  - 30) Dijkema, C., Kester, H.C.M., and Visser, J. (1985)  $^{13}\text{C}$  NMR studies of carbon metabolism in the hyphal fungus *Aspergillus nidulans*. Proc. Acad. Sci. USA., 82,14-18.
  - 31) Santos, C. de los, Buldain, G., Frydman, B., Cannata, J.J.B., and Cazzulo, J.J. (1985) Carbon-13 nuclear magnetic resonance analysis of  $[1-^{13}\text{C}]$  glucose metabolism in *Crithidia fasciculata*. Eur. J. Biochem., 149,421-429.
  - 32) Canioni, P., Alger, J.R., and Shulman, R.G. (1983) Natural abundance carbon-13 nuclear magnetic resonance spectroscopy of liver and adipose tissue of the living rat. Biochemistry., 22,4974-4980.
  - 33) Sillerud, L.O., and Shulman, R.G. (1983) Structure and metabolism of mammalian liver glycogen monitored by carbon-13 nuclear magnetic resonance. Biochemistry., 22,1087-1094.
  - 34) Cohen, S.M. (1987)  $^{13}\text{C}$  and  $^{31}\text{P}$  NMR study of gluconeogenesis: Utilization of  $^{13}\text{C}$ -labeled substrates by perfused liver from streptozotocin-diabetic and untreated rats. Biochemistry, 26,562-572.
  - 35) Cohen, S.M. (1987) Effects of insulin on perfused liver from streptozotocin-diabetic and untreated rats:  $^{13}\text{C}$  NMR assay of pyruvate kinase flux. Biochemistry, 26,573-580.
  - 36) Neurohr, K.J., Barret, E.J., and Shulman, R.G. (1983) *In vivo* carbon-13 nuclear magnetic resonance studies of heart metabolism. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 80,1603-1607.
  - 37) Sherry, A.D., Nunnally, R.L., and Peshock, R.M. (1985) Metabolic studies of pyruvate- and lactate-perfused guinea pig hearts by  $^{13}\text{C}$  NMR. J. Biol. Chem., 260,9272-9279.
  - 38) Morris, P.G., Bachelard, H.S., Cox, D.W.G., and Cooper, J.C. (1986)  $^{13}\text{C}$  nuclear magnetic resonance studies of glucose metabolism in guinea-pig brain slices. Biochem. Soc. Trans., 14,1270-1271.
  - 39) Thomas, S.R., The applications of fluorine-19 NMR in medicine. SPIE Vol. 625 Medicine XIV/PACS IV p.7-17, 1986.
  - 40) Nakada, T., Kwee, I.L., and Conboy, C.B. (1986) Noninvasive in vivo demonstration of 2-fluoro-2-deoxy-D-glucose metabolism beyond the hexokinase reaction in brain by  $^{19}\text{F}$  nuclear magnetic resonance spectroscopy. J. Neurochem., 46,198-201.
  - 41) Bernadou, J., Aramand, J.P., Lopez, A., Malet-Martino, M.C., and Martino, R. (1985) Complete urinary excretion profile of 5-fluorouracil during a six-day chemotherapeutic schedule, as resolved by  $^{19}\text{F}$  nuclear magnetic resonance. Clin. Chem., 31,846-848.
  - 42) Burt, C.T., Roberts, J., and Hitzig, B.M.,

- (1986) Phosphorus and fluorine NMR examination of the anesthetized NEWT (*notophthalmus viridescens*). Comp. Biochem. Physiol., 85c, 409-412.
- 43) Civan, M.M., Lin, L.-E., Pterson-Yantorno, K., Taylor, J., and Deutsch, C. (1984) Intracellular pH of perfused single frog skin: combined  $^{19}\text{F}$ - and  $^{31}\text{P}$ -NMR analysis. Am. J. Physiol., 247, C506-C510.
- 44) Metcalfe, J.C., Hesketh, T.R., and Smith, G.A. (1985) Free cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  measurements with fluorine labeled indicators using  $^{19}\text{F}$ -NMR. Cell Calcium, 6, 183-195.
- 45) 村上政隆、瀬尾芳輝、亘 弘. (1986) 代謝研究とその周辺の先端技術、代謝、23、89-98.
- 46) Ogino, T., Shulman, G.I., Avison, M.J., Gillans, S.R., den Hollander, J.A., and Shulman, R.G. (1985)  $^{23}\text{Na}$  and  $^{39}\text{K}$  NMR studies of ion transport in human erythrocytes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 82, 1099-1103.
- 47) Sillerud, L.O., Heyser, J.W., Han, C.H., and Bitensky, M.W., Applications of C-13 and Na-23 NMR in the study of plants, animals, and human cells. Axenrod, T., and Ceccarelli, G. (eds) NMR in living system, p.309-333. Reidel Publ. Comp., 1986.
- 48) Lutz, O. (1986) Multinuclear approach to nuclear magnetic resonance investigation in tissue with heteronuclei:  $^{14}\text{N}$   $^{35}\text{Cl}$   $^{39}\text{K}$ . Naturwissenschaften, 73, 97-99.
- 49) Juretschke, H.P. (1986)  $^{15}\text{N}$ -NMR studies of living systems. 2nd symposium on progress of NMR in medicine, 141-150.
- 50) Vogel, H.J and Braulin, W.H. (1985) Shift reagents for calcium-43 NMR studies of calcium-binding proteins. J. Mag. Reson., 62, 42-53.

### Abstract

## The application of nuclear magnetic resonance to intact biological systems.

### Recent developments in the spectroscopic studies [II]

Tomoo NAKAZAWA\* and Hiroshi SUGIYAMA\*\*

This continued review [II] describes mainly on the metabolic applications of NMR spectroscopies of  $^{31}\text{P}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{19}\text{F}$ , and other nuclei. The measurements have been carried out of cell suspensions in the buffered solutions, perfused organs, and the part of living animals and humans.  $^{31}\text{P}$ -NMR spectra exhibit the signals of the energy-rich phosphorus compounds such as ATP, PCr and inorganic phosphate and phosphomonoesters, which give us direct informations on the metabolic levels in the steady state and metabolic changes caused by ischaemia, anoxia, hypoxia, and work. The saturation transfer technique have been employed for studying the steady state kinetics of fast enzymatic reactions concerning phosphorus compounds.  $^{13}\text{C}$  is a less sensitive nucleus than  $^{31}\text{P}$  with only 1% natural abundance, but natural  $^{13}\text{C}$ -NMR spectra from several organs have been reported, offering the possibilities of non-invasive rough estimation on the lipid and the glycogen contained. The  $^{13}\text{C}$  spectra obtained by introducing  $^{13}\text{C}$ -enriched substances into the intact systems are able to monitor the fate of the labeled compounds and demonstrate the catabolic pathway precisely.  $^{19}\text{F}$ -NMR serves for the non-invasive monitoring of the fluorinated compounds used as anaesthetic and pharmacologic agents.  $^{23}\text{Na}$ - and  $^{39}\text{K}$ -NMR spectra, measured with paramagnetic shift reagent, discriminate separately individual signals from intra- and inter-cells, providing valuable informations on ionic concentration and ion transport.

\* Department of Chemistry

\*\*Chemical Institut of Nonaqueous Solution, Tohoku University