

原 著

生体試料用改良型 NMR プローブの作製と評価

北村 光夫¹⁾, 早野 尚志²⁾, 吉崎 和男¹⁾

¹⁾徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部生理機能学分野

²⁾大津市民病院小児循環器科

(平成25年2月1日受付) (平成25年3月4日受理)

生体試料用に NMR 信号検出器 (プローブ) を作製した。コイルを保持する支柱に非磁性であるアルミ製円筒を用いて作製したプローブでは, パルス傾斜磁場印加後の静磁場への回復が既製品のマイクロ MRI プローブより10倍以上遅くなった。回復時間の短縮にプローブを再設計し, 支柱材質をアクリルへ変更, 渦電流対策用補正回路の再調整により, 既製品と同程度の1 msec 以下に短縮できた。パルス傾斜磁場スピンエコー法を用いカエル骨格筋の Na⁺ イオンの拡散係数を求めると, Ringer 溶液中の0.6倍となり, 骨格筋内の粘性は高いことが示唆された。

はじめに

核磁気共鳴 (Nuclear Magnetic Resonance ; NMR) は, 原子核の磁気モーメントがゼロでない核種であれば測定可能であり, 医学分野では¹H, ¹³C, ¹⁹F, ²³Na, ³¹P が観測対象となる機会が多い。非破壊的な計測法である特徴を有するが, 市販の NMR プローブでは構造的制約のために摘出した生体試料を生きのまま計測することが困難な場合が多い。そのため, 液灌流や栄養補給・薬剤投与などによる生理的条件下での NMR 測定を可能とするために, ワイドボア超伝導磁石用³¹P-NMR 信号検出器 (プローブ) を作製^{1,2)}, 灌流心臓のクレアチンキナーゼ反応について報告した³⁾。しかし作製したプローブにパルス傾斜磁場を印加すると静磁場への回復に数 msec 以上を要し, 拡散係数の測定には至らなかった。

今回, スーパーワイドボア超伝導磁石を使用する機会が得られたので, ³¹P ならびに²³Na-NMR 用プローブを

作製し, パルス傾斜磁場印加後の静磁場への回復時間の短縮のためにプローブ設計を見直した結果, Na⁺ イオンの拡散係数測定が可能となったので報告する。

方 法

NMR 装置は米国 Varian 社製 Unity INOVA 300swb である。¹H の共鳴周波数は300MHz, ³¹P 120MHz, ²³Na 80MHz である。この装置には英国 Oxford 社製縦型スーパーワイドボア (口径12cm) 超伝導磁石 (7 Tesla), そのボア内に磁場の均一性を調整する室温シムコイル, さらにその内側に米国 Doty 社製¹H-マイクロ MRI 用傾斜磁場コイルが設置されている。これらの最内部に NMR プローブを超伝導磁石の下側から上へ挿入し, マイクロ MRI 測定をする。今回, Doty 社製マイクロ MRI 用プローブの代わりに自作した NMR プローブを用いた。磁場の均一性の調整には試料中の水の信号を用い, 測定試料に85% H₃PO₄ 溶液, カエル用 Ringer 液 (NaCl 111, KCl 1.3, CaCl₂ 0.9, NaHCO₃ 1.2mM), およびウシガエル下肢より摘出した骨格筋を用いた。

結 果

スーパーワイドボア超伝導磁石用 NMR プローブの試作
最初に試作したスーパーワイドボア超伝導磁石用 NMR プローブは以前に報告したワイドボア超伝導磁石用³¹P-NMR プローブを基にコイル形状の違う²³Na-NMR プローブおよび³¹P-NMR プローブを各々作製した¹⁻⁴⁾。試作プローブは銅線 (直径 2 mm) で形成したコイル,

その保持にテフロン製円盤，円盤を支えるプラスチック支柱ならびにコイルを覆う最上段のアルミ製円筒，さらに中段および下段の合計3個のアルミ製円筒からなる（図1参照）。具体的には ^{23}Na 用に巻数を多くしたソレノイド型コイルを作製し，短くしたNMR用ガラス試料管（直径10mm）を試料管に， ^{31}P 用にはサドル型コイルで10ml ディスポーザブル注射筒（直径16mm）を試料管に用いた。コイルと並列にセラミックコンデンサと可変コンデンサを同調用に，直列に整合用可変コンデンサを取り付けた。これらの可変コンデンサは非磁性高耐電圧（0.8~10pF，定格電圧500V DC：米国 Johanson 社#5341）を用いた。同軸ケーブルにはインピーダンス50 Ω のケーブル（RG58AUなど）とテレビアンテナ配線等に用いられる75 Ω ケーブル（3C2Vなど）がある。NMR信号導出に50 Ω 同軸ケーブルを用い整合性コンデンサを介してコイルにつなぎ，アース線は銅箔にも接続した。なお，同軸ケーブルには磁性のものがあるので注意が必要であった。

共鳴周波数の調整には，試料をコイルに装着して最上

段のアルミ円筒を被せ，リターンロスブリッジ（米国 Hewlett Packard 8721A）を介して，周波数掃引器（米国 Wavetek 1062）に接続し，コイルからの反射が最小になるようにアルミ円筒上部の開口部から容量可変コンデンサを調整した^{1,3,4}。ついでNMRプローブを超伝導磁石の下から中央部にまで上げ，その際に反射増加や周波数ずれがないことを確認した。

プローブ設計におけるスーパーワイドボア超伝導磁石用への主な変更点は，ワイドボア超伝導磁石底面から中央部まで415mmであったのが703mmと長くなったことである。そのためワイドボア超伝導磁石用に作成したアルミ円筒2個を3個に変更して長くしたが，超伝導磁石の高さ制限のためにアルミ円筒保持台の高さを低くする必要があった。一方，ボア径については，室温シムならびに傾斜磁場コイル設置のため利用可能な径は5mm大きくなったにすぎない。アルミ円筒の外側にスペーサとしてアクリル円筒を挟んで使用した。作製した ^{31}P および ^{23}Na -NMRプローブの各々でNMR信号を検出することができ，90°パルス幅は，38 μsec および30 μsec であった。

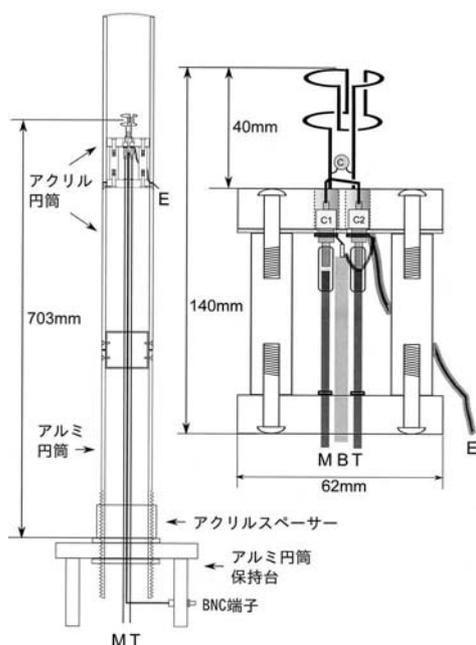


図1 改良型 ^{31}P -NMRプローブ
右側にコイル部分の拡大図を示す。鞍型コイルに同調用のセラミックコンデンサ(C)と容量可変コンデンサ(C2)，整合用に容量可変コンデンサ(C1)が結線され，下向きに配置した非磁性高耐電圧コンデンサ(C1, C2)の容量がロッドの回転で調節できる。B：50 Ω 同軸ケーブル，T：同調用ロッド，M：整合用ロッド，E：銅箔接地。本文参照。

パルス傾斜磁場印加後の静磁場への回復遅延の改善： 試作 ^{31}P -NMRプローブの改良

試作したNMRプローブでパルス傾斜磁場NMR法による拡散係数測定を試みた。しかし，静磁場方向(Z軸)にパルス傾斜磁場をかけたがNMR信号を計測できなかった。パルス傾斜磁場印加後の静磁場への回復の待ち時間を ^{31}P -NMRプローブで実測してみると，1msec以下ではNMR信号を全く計測できず，10msecでNMR信号を計測できたが位相変化が認められた（図2a）。既製品の ^1H -マイクロMRIプローブでパルス傾斜磁場印加後の静磁場への回復を測定すると0.8msecであり，今回の試作プローブでは静磁場への回復が10倍以上も遅く，そのためにスピンエコー信号が減弱し，拡散係数が計測できないのであった。

パルス傾斜磁場後の静磁場への回復遅延はアルミ円筒に流れる渦電流が原因と考え，コイルを覆う最上段のアルミ円筒をアクリル円筒に変更した。ところが，このアクリル円筒プローブを磁石中央部に設置すると共鳴周波数が著明にずれ，NMR信号自体が検出不可能となった。対策として磁石中央部に設置したままでコイルの同調・

整合を調整できるように、コンデンサの容量可変軸を下向きに配置し、可変軸の長いコンデンサ（米国 Voltronics 社 NMAP10HVE：1～10pF、非磁性高耐電圧、定格電圧500V DC）に変更した（図1）。可変軸に直径4 mm 円柱ロッドを肉厚シリコンチューブで接続し磁石下面から調整できるようにした。コイルを保持するテフロン製円盤は片面ガラスエポキシ基盤を付着させ全面アースとし、コイルとコンデンサ部分のみ剥離・絶縁させた。アース線はエポキシ基盤ならびに銅箔に接続した。その結果、共鳴周波数のずれを調整でき、NMR 信号が検出できた。

しかし、パルス傾斜磁場印加後の静磁場への回復の改善は見られず、渦電流対策用補正回路を調整しても無効であった。最上段のみをアクリル円筒で構成したプローブでは無効であったので、コイルを支える中段アルミ円筒もアクリル円筒で構成しなすと、パルス傾斜磁場印加後の静磁場への回復が著明に改善した。³¹P-NMR プローブで実測してみると、回復の待ち時間100 μ sec で NMR 信号が検出できた。しかし、位相変化が認められ、均一な静磁場への回復が不十分であった（図2 b）。

さらに装置に付加されている渦電流対策用補正回路を調整し、均一な静磁場への回復時間の短縮化を検討した。この回路はパルス傾斜磁場を形成させるための電流駆動回路に立ち上げ増強（pre-emphasis）機能を付加したものであり、渦電流による静磁場の歪みの影響を小さくするように設けられたものである。傾斜磁場を生じる X、Y、Z 軸の電流駆動回路に各々備わっている。今回は Z 軸にのみ、パルス傾斜磁場を印加したので、Z 軸につい

ての渦電流対策用補正回路を調査すると、立ち上げ増強後に5種類の時定数（47, 30, 4, 0.5, 0.2msec）で減衰する成分の振幅強度を調節できることが明らかとなった。その再調整を検討した結果、時定数30msec のみの寄与率を大きくすることにより、位相のずれが改善でき（図2 c）、均一な静磁場への回復の待ち時間は1 msec 以下となった。

改良型 NMR プロープを用いた²³Na-NMR による拡散係数の測定

前項の改良点を基に、アクリル円筒で作製した²³Na-改良型 NMR プロープを用い、Ringer 溶液中の Na⁺イオンの T₁、T₂時間を求めた。T₁測定は反転回復法（IR: inversion recovery）を用い、180°パルスで反転した縦磁化が静磁場方向に回復する過程の信号強度を90°パルスで測定した。両パルスの時間間隔（inversion time）を変えて信号強度を求め、Microsoft 社の表計算ソフト MS-Excel を用いて最小二乗法で非線形近似式のパラメータを導き出す Solver 解析を利用して T₁時間を求めた⁵⁾。T₂時間はスピネコー法である90°- τ -180°- τ のパルス系列を用い、2 τ （echo time）を変えて信号強度を求め、同様に Excel で処理した（図3）。その結果、Ringer 溶液中の Na⁺イオンの T₁時間55.3 \pm 0.6msec、T₂時間55.9 \pm 0.8msec（n=3）となった。

Ringer 溶液中の Na⁺イオン拡散係数をパルス傾斜磁場スピネコー法で測定した。スピネコー信号の前後に一对のパルス傾斜磁場を印加してエコー信号の減衰度（M/M₀）を求める^{6,7)}。M は傾斜磁場印加時、M₀は印

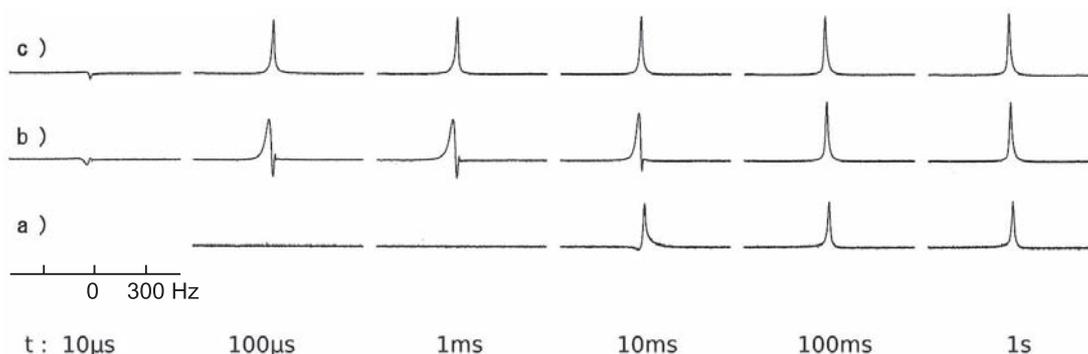


図2 ³¹P-NMR プロープによるパルス傾斜磁場後の静磁場回復の測定。

a) アルミ円筒製 NMR プロープ、b) アクリル円筒製の改良型 NMR プロープ、c) 改良型 NMR プロープに渦電流対策用補正回路使用。85% H₃PO₄を球形試料管（直径8 mm）に入れ、パルス傾斜磁場（Z 軸方向に30gauss/cm、パルス幅10msec）を印加後、下に示した待ち時間(t)後に90°パルスをかけて³¹P-NMR スペクトル測定。積算回数1回、繰り返し時間20secにて測定。本文参照。

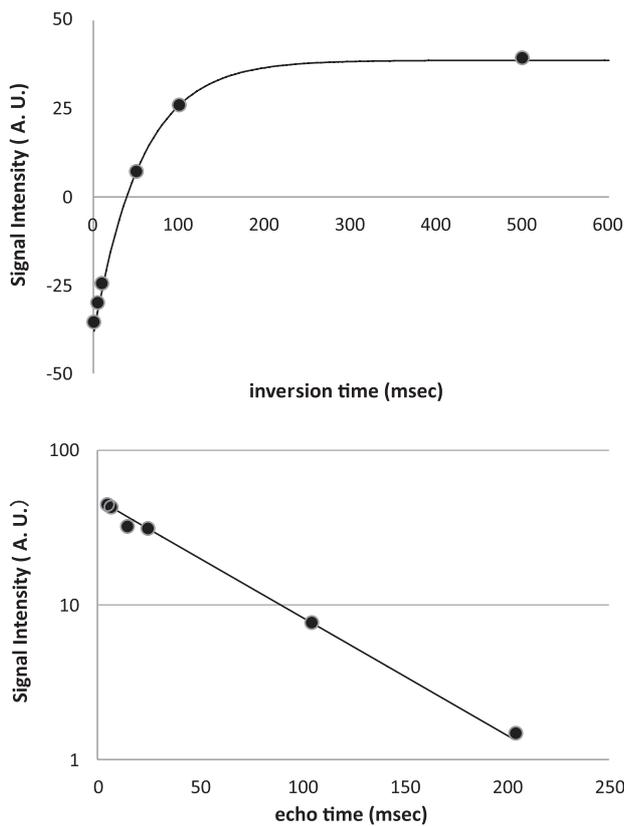


図3 ^{23}Na -NMRによる T_1 および T_2 時間の計測。
MS-ExcelのSolver解析により、Ringer溶液中の Na^+ イオンの T_1 55.1msec (上) および T_2 56.9msec (下)を得た (A.U.: 任意単位)。 T_1 は積算回数1回、繰り返し時間30sec、 T_2 は積算回数16回、繰り返し時間60secの条件にて測定。

加しなかった時のエコー信号強度である。傾斜磁場強度 (G)を最大30gauss/cmまでの範囲で変化させ、印加強度と時間のパラメータである b value ($=\gamma^2 G^2 \delta^2 (\Delta - \delta/3)$) に対してエコーの減衰度を対数プロットし、その直線の勾配から拡散係数を求めた⁸⁾。ここで、 γ は ^{23}Na 核スピンの磁気回転比 ($7076.1 \text{ rad} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{G}^{-1}$)、 δ はパルス傾斜磁場印加時間 (15msec)、 Δ は一对のパルス傾斜磁場の間隔 (17msec)である。

Ringer溶液中の Na^+ イオンの拡散係数は $1.7 \pm 0.1 \times 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{sec}$ ($n=3$)となった。生体試料としてウシガエル骨格筋の ^{23}Na の拡散係数を同様に測定した結果、 $1.0 \pm 0.1 \times 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{sec}$ ($n=3$)の値を得た (図4)。骨格筋における拡散係数はRinger溶液中の約0.6倍であり、拡散の遅いことは骨格筋では粘性の高いことが示唆される。なお、筋細胞内の Na^+ イオンの拡散係数を測定するために、細胞外の ^{23}Na -NMR信号を Mn^{2+} イオン

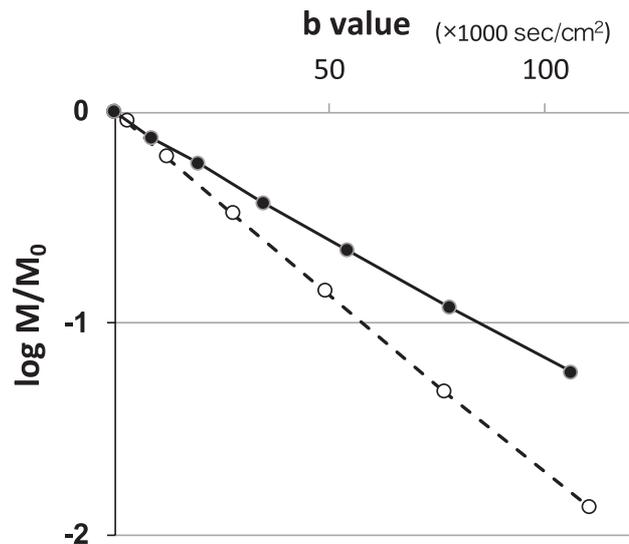


図4 パルス傾斜磁場スピンエコー法による Na^+ イオン拡散係数の測定。
Ringer溶液 (○)：傾斜磁場強度 $G=0, 4, 8, 12, 16, 20, 24, 28 \text{ gauss/cm}$ 、パルス傾斜磁場印加時間 $\delta=15 \text{ msec}$ 、一对のパルス傾斜磁場間隔 $\Delta=17 \text{ msec}$ 、積算回数16回、繰り返し時間3secの条件にて、拡散係数 $1.70 \times 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{sec}$ を得た。カエル骨格筋 (●)： $G=0, 8, 12, 16, 20, 24, 28 \text{ gauss/cm}$ 、 $\delta=15 \text{ msec}$ 、 $\Delta=22 \text{ msec}$ 、積算回数512回、繰り返し時間300msecの条件にて、拡散係数 $1.15 \times 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{sec}$ を得た。 M/M_0 ：一对のパルス傾斜磁場印加による Na^+ イオンのスピンエコー信号減衰度。b value：本文参照。

添加で消去しようと試みたが、Ringer溶液に Mn^{2+} イオンを1mM添加しても T_2 時間の短縮化がみられず、筋細胞内 Na^+ イオンの拡散係数測定には成功しなかった。

考 察

NMRプローブ作製には、共鳴周波数を調整するための周波数掃引装置が必要であり、非磁性高耐電圧で容量可変軸の長いコンデンサなどの特殊な電気部品が要求されるが、比較的安価にNMR信号を検出するプローブを作製することができた。銅線で作製したコイルの形状を試料に合わせることができ、しかも特定核種の共鳴周波数に調整できるので高感度のプローブが作製できる^{1,2)}。既製品のNMRプローブでは困難な生体試料の灌流なども可能となった。プローブ内に灌流用チューブならびに拍動している灌流心臓を保持できるように配置して、その ^{31}P -NMRスペクトルが測定できる。プローブ材質として強度の点からアルミ円筒をRFシールドに用いると、同調・整合をとった後にプローブを磁石内に装着しても

周波数ずれをおこさない。磁気飽和とその磁化移動を利用したクレアチンキナーゼ酵素反応のフラックス測定が拍動心臓で可能である³⁾。

ところがこの自作したアルミ製 NMR プロープを用いて拡散係数を測定すると、全く NMR 信号は検出できなかった。パルス傾斜磁場印加直後に RF パルスを印加しても NMR 信号は検出できなかったため、静磁場への回復時間が遅延しているため全く信号が検出できなかったと考えられた。そこで材質に注目し、絶縁体であるアクリル円筒に材料を変えてみたところ、NMR 信号が検出された。アルミは導体であるため傾斜磁場の高速切り替えによって渦電流が発生し、静磁場の均一性を乱し、信号が検出できなかったと考えられる。さらに渦電流対策補正回路のパラメータを変更すると位相のズレも改善した。この改良を基に、²³Na-NMR による拡散係数の測定が可能となった。

今回は²³Na-NMR による拡散係数を測定したが、³¹P-NMR でも同様に拡散係数の測定が可能である。以前に電磁石 NMR 装置を用いてカエル骨格筋の細胞内リン化合物の拡散係数が水溶液中の値よりも小さいことをすでに報告した⁷⁾。²³Na-NMR を用いて A. M. Babsky らはラット骨格筋の Na⁺イオンの拡散係数が $0.88 \pm 0.05 \times 10^{-5} \text{cm}^2/\text{sec}$ であり、生理食塩水中の値の0.7倍で筋肉内での拡散係数の小さいことを報告している⁹⁾。さらにシフト試薬の添加によって細胞外²³Na-NMR 信号を筋細胞内の信号から分離して各々の拡散係数を測定した結果、両者に差異がないことを報告している⁹⁾。しかし、細胞外 Na⁺イオンの拡散係数が水溶液中の値よりも小さいのはシフト試薬と Na⁺イオンとの相互作用のために Na⁺イオンの拡散がおそくなっている可能性があり、細胞内外の拡散係数の差異の有無についてさらなる検討が必要であると思われる。

文 献

- 1) 吉崎和男, 早野尚志: 筋肉の実験 MRS. 磁気共鳴スペクトルの実際—臨床応用マニュアル— (成瀬昭二 編), 医学書院, 東京, 1995, pp. 190-200
- 2) Gadian, D. G.: Nuclear magnetic resonance and its application to living systems. Oxford University Press, U. K., 1982, pp. 8-10
- 3) 早野尚志: ³¹P-NMR による灌流心クレアチン・キナーゼ反応の解析. 京府医大誌, 103(2): 289-299, 1994
- 4) 大河原浩: NMR 装置のプロープ作製方法について. 生理研技報告, 4: 28-30, 1989
- 5) 川又渉, 豊嶋英仁: 汎用表計算ソフトを用いた T1, T2推定法の検討. 日放技学誌, 65(3): 306-311, 2008
- 6) Stejskal, E. O., Tanner, J. E.: Spin diffusion measurements: spin echoes in the presence of a time-dependent field gradient. J. Chem. Phys., 42: 288-292, 1965
- 7) Yoshizaki, K., Seo, Y., Nishikawa, H., Morimoto, T.: Application of pulsed-gradient ³¹P NMR on frog muscle to measure the diffusion rates of phosphorus compounds in cells. Biophys. J., 38: 209-211, 1982
- 8) 吉崎和男, 早野尚志: 筋肉の実験 MRS. 磁気共鳴スペクトルの医学応用—MRS の基礎から臨床まで (成瀬昭二 監著), インナービジョン, 東京, 2012, pp. 114-120
- 9) Babsky, A. M., Topper, S., Gao, H. Z., James, J. R., *et al.*: Evaluation of extra-and intracellular apparent diffusion coefficient of sodium in rat skeletal muscle: Effects of prolonged ischemia. Magn. Reson. Med., 59: 485-491, 2008

Re-design and evaluation of the NMR probes for living organs and tissues

Mitsuo Kitamura¹⁾, Takashi Hayano²⁾, and Kazuo Yoshizaki¹⁾

¹⁾*Department of Physiology, Institute of Health Biosciences, the University of Tokushima Graduate School, Tokushima, Japan*

²⁾*Otsu Municipal Hospital, Otsu, Shiga, Japan*

SUMMARY

We have constructed NMR signal detectors (probes) to measure the NMR spectra of living organs and tissues kept under physiological conditions. The probes consisted of non-magnetic aluminum alloy cylinder to support the detection coil made of copper, mounted on a Teflon plate with acrylics plates and rods, however, the recovery time to the static magnetic field after turning-off of the pulsed gradient field was more than 10 times longer than that of the micro-MRI probe available commercially.

The re-design of our probes, such as acrylics cylinder to support the coil, together with readjustment of the eddy current compensation circuit, provided us the recovery time to the static field less than 1msec, making it possible to measure the diffusion coefficient of Na⁺ ion using the pulsed field gradient spin echo method. The diffusion coefficient of Na⁺ ion in skeletal muscle isolated from bullfrog was 0.6 time larger than that in Ringer's solution, suggesting a high viscosity in the skeletal muscle.

Key words : nmr probe, diffusion, Na, muscle