

厚生科学研究費補助金（脳科学研究事業）

---

---

**$^{13}\text{C}$ -MRS を用いた痴呆性疾患に対する新しい  
診断技術と治療薬の開発に関する基礎的研究**

平成 1 1 年度 研究報告書

---

---

**$^{13}\text{C}$ -MRS study for the development of new diagnostic and therapeutic  
methods for neurological disorders associated with dementia**

主任研究者 大槻泰介  
国立精神・神経センター武蔵病院

平成 1 2 年 3 月

# 目 次

## 総括研究報告

主任研究者 国立精神・神経センター武蔵病院 大槻泰介

$^{13}\text{C}$ -MRS を用いた痴呆性疾患に対する新しい診断技術と治療薬の開発に関する基礎的研究

## 分担研究報告

$^{13}\text{C}$ -MRS を用いた脳代謝の測定

創価大学生命科学研究所 金松知幸

PET/ SPECT を用いた痴呆性疾患の評価

国立精神・神経センター武蔵病院 松田博史

難治性パーキンソン病の治療と病態研究

国立精神・神経センター国府台病院 湯浅龍彦

$^{13}\text{C}$  標識神経伝達物質の作成

明治薬科大学薬品化学 梶原正宏

## 文献

厚生科学研究費補助金（脳科学研究事業）  
（総括）研究報告書

$^{13}\text{C}$ -MRS を用いた痴呆性疾患に対する新しい診断技術と  
治療薬の開発に関する基礎的研究

主任研究者 大槻泰介 国立精神・神経センター武蔵病院部長

研究要旨  $^{13}\text{C}$ -MRS装置は非侵襲的に脳代謝を計測できる唯一の手法である。本研究は、NEDOプロジェクトで開発された装置を用いて、これを痴呆症疾患に対する診断や治療法開発に結び付けようとするものである。本年は、基礎データ収集を目的に正常ボランティアを主体とした脳代謝計測試験を実施した。試験では、被験者に1位標識  $^{13}\text{C}$  グルコースを経口にて服用してもらい、2-3時間にわたって後頭部の2箇所から  $^{13}\text{C}$  グルコース代謝物の信号をMRスペクトルとして観測し、得られた  $^{13}\text{C}$  グルタミン酸やグルタミン信号の時系列データから、脳細胞機能を知る上で重要なTCA回路代謝速度を算出した。その結果、正常ボランティア11例の平均として  $0.43(\text{SD}:0.11)\mu\text{ mol/g/分}$  という値を得た。これから推定されるグルコース代謝率は  $0.26\mu\text{ mol/g/分}$  であり、PETで得られている  $0.3\mu\text{ mol/g/分}$  とほぼ同等であることから本手法の妥当性を示せたといえる。今後、計測精度の検討を進めながら、正常ボランティアだけでなく患者データの取得を進め有用性を見極めていく。

A. 研究目的

本研究は、NEDOプロジェクトで開発された  $^{13}\text{C}$ -MRS装置を用い、これまで不可能であったヒトの脳代謝過程を *In vivo* に解析し、痴呆症疾患に対する  $^{13}\text{C}$ -MRSを用いた新しい診断技術と治療法の開発に結びつけることを目的としている。本研究で得られる知見は極めて新しく、ヒトの脳における神経伝達物質の合成・代謝過程を明らかにする上で、きわめて重要な成果をもたらすと考えられ、また、この検査の非侵襲性と簡便性から、痴呆症の早期診断と早期治療を行う上で、今後広く普及する検査となる可能性が予想される。

初年度は、研究の見通しを得るために、特に若年正常ボランティアでの脳代謝計測と疾患患者のパイロットスタディを実施して、 $^{13}\text{C}$  グルコース代謝における基礎データを収集し、得られる代謝速度の基礎検討を行うことを目的とした。また、動物モデルを用いた脳代謝計測・評価も重要と考え、

サルを用いて脳代謝計測に関する基礎検討を実施した。

B. 研究方法

人および動物に対し1位標識  $^{13}\text{C}$  グルコースを投与後、頭部より  $^{13}\text{C}$  スペクトルデータを取得し、得られたデータからTCA回路速度( $V_{\text{TCA}}$ )あるいはグルコース代謝率( $\text{CMR}_{\text{glc}}$ )を求める。

(1) 人ボランティア試験

正常ボランティア(20代)および脳片側に病変をもつ患者で、耐糖異常症などの合併症を有さない者を対象とした。試験前日までに、全身状態の検査として、問診/一般血液生化学検査/尿糖/空腹時血糖値/耐糖能検査(GTT)/血圧測定/心電図、高次脳機能検査として、WAIS-R/WMS-R/Mini-mental Test等を実施し、最終的に正常ボランティア11例、患者3例を選定した。

<システム>

ヒト用  $^{13}\text{C}$ -MRS 装置は、東芝製 2T  $^{13}\text{C}$  スペクトロスコーピー研究用装置に NEDO プロジェクトで開発されたパルスシーケンス、高周波コイル、傾斜磁場コイルおよび電源、システムコントローラを組み込んだものである。パルスシーケンスとして組み込まれているマルチスライス HSQC 法は、高感度/良好な化合物の分離/同時複数個所からのデータ収集を可能にしている。高周波コイルは、複数の表面コイルを関心領域周辺に配置するマルチ表面コイル方式を用い、関心領域から高感度に信号を検出できるようにした。傾斜磁場コイルに関しては、強力かつ時間幅の狭い傾斜磁場パルスを生産できるようにしたことでパルスシーケンスの更なる高感度化に役立っている。

今回関心領域を後頭部としたため、マルチスライス HSQC 法では、左右の後頭部 2 箇所(64ml or 48ml)を計測領域として設定し、左右一組の  $^{13}\text{C}$  スペクトルデータを 5 分で収集できるように調整した。また表面コイルとしては、後頭部支持用のヘッドレストに矩形表面コイル(110mm\*130mm)を 3 個配置した。頭部不動化のため後頭部および頸部にマットを置き、さらに額をカバーで固定した。

#### <試験>

被験者には、前夜 9 時までには食事を済ませ、当日は糖分を含まない飲み物を除き飲食を控えてもらった。試験では、まず被験者に耳栓をしてもらった後装置に入ってもらい、磁場均一性調整などのシステム調整と MRI 撮像を行った。その後、右手上腕静脈に採血ラインを確保し、1 位標識  $^{13}\text{C}$  グルコースを体重 1kg あたり 0.75g (水および炭酸水にて 30% 溶液に調整) を服用してもらった。約 5 分後、仰臥姿勢で装置に入ってもらい、安静閉眼状態で 2-3 時間にわたり  $^{13}\text{C}$  スペクトルデータ収集を行った。採血は、服用後 30 分までは 5 分おき、30-60 分の間は 15 分おき、さらに 60-180 分の間は 30 分おきで行い、グルコース濃度、 $^{13}\text{C}$  グルコース比 ( $^{13}\text{C}$ -Glc F.E.)、インシュリン値等を計測した。また、服用した  $^{13}\text{C}$  の排出を評価するため、服用前と服用後 1 日、3 日、7 日、14 日に呼気を

採取し、呼気中  $^{13}\text{CO}_2$  量の分析を行った。

#### <データ処理>

3 個の表面コイルから得られた  $^{13}\text{C}$  スペクトルは重み付け加算処理し、最終的に 2 箇所  $^{13}\text{C}$  スペクトルの時系列データを得た。得られたスペクトルすべてから、グルタミン酸の 4 位と 3 位、グルタミンの 4 位の  $^{13}\text{C}$  の信号値をデータ処理(カーブフィッティング)により算出する一方、血中  $^{13}\text{C}$  グルコースの F.E. からそれぞれの  $^{13}\text{C}$  F.E. の最大値を決定し、最終的に各  $^{13}\text{C}$  化合物の F.E. の時系列データを得た。

次に、上記時系列データと血中グルコース量および血中  $^{13}\text{C}$  グルコース F.E. のデータを“1 位標識  $^{13}\text{C}$  グルコースの代謝モデル”に代入し、TCA 回路の代謝速度を算出した。代謝モデルは Mason らの方法(J. Cereb. Blood Flow Metab., 15:12-25, 1995)に基づいている。まず、グルコースの  $^{13}\text{C}$  がグルタミン酸やグルタミンに取り込まれていくまでの過程を、比較的脳内に高濃度に存在するグルコース、乳酸(ピルビン酸含む)、グルタミン酸、グルタミン、アスパラギン酸の各コンパートメントに分けて、各コンパートメント間の  $^{13}\text{C}$  のやり取りを微分方程式で表す。血中グルコース量やグルコースの  $^{13}\text{C}$  F.E. を入力として上記微分方程式をとき、グルタミン酸の 4 位や 3 位、グルタミンの 4 位の  $^{13}\text{C}$  F.E. の時間変化を計算する。計測値との差を求め、これが最小になるように方程式中のパラメータである“TCA 回転速度”の値を調整する(シンプレックス法)。最終的に計測値と計算値が合うように調整された時の TCA 回転速度が求めたい値となる。上記方程式中で用いる脳内グルタミン酸やグルタミン濃度、乳酸濃度やその脳と血液間の交換速度などは、現段階で計測できないため文献値を用いた。

#### (2) サルを用いた脳代謝計測

システムは同じ装置を用いている。サル軽麻酔下に体重 1kg あたり 1g 量の 1 位  $^{13}\text{C}$  グルコースを静脈あるいは経口投与した後、うつ伏せ姿勢で固定し、頭部に設置した高周波コイルを用いて HSQC 法により  $^{13}\text{C}$  スペクトルデータを収集した。

### C. 研究結果

まずデータ処理法について、サル頭部  $^{13}\text{C}$ -MRS 実験で得られたデータをもとにその妥当性を検証した結果を示す。次に、正常ボランティアでの計測結果、さらに患者後頭部の健側と患側から得られたデータを示す。

#### (1) サル実験データを用いたデータ処理法の評価

採血サンプルから得られた血中グルコースやその  $^{13}\text{C}$  F.E. データと、 $^{13}\text{C}$  スペクトルデータを用いて、上述のデータ処理法に当てはめて TCA 代謝速度 ( $V_{\text{TCA}}$ ) およびグルコース代謝率 ( $\text{CMR}_{\text{Glc}}$ ) を算出した。その結果、 $V_{\text{TCA}} = 0.56 \pm 0.058$  ( $\mu\text{mol/g/分}$ )、 $\text{CMR}_{\text{Glc}} = 0.33 \pm 0.017$  ( $\mu\text{mol/g/分}$ ) となり、後者については PET で得られている値 0.3~0.4 に近い値となった。

#### (2) 正常ボランティアの脳代謝

算出された健常人の TCA 代謝速度は平均  $0.43$  (SD:  $0.11$ )  $\mu\text{mol/g/分}$  で、これから推定されるグルコース代謝率は  $0.26$   $\mu\text{mol/g/分}$  であり、PET で得られている値とほぼ同等の値であった。

#### (3) 患者ボランティアの脳代謝

患者は、てんかん(萎縮病変)2例と血腫1例であった。てんかん1例目では健側で  $0.6$   $\mu\text{mol/g/分}$  / 患側で  $0.91$   $\mu\text{mol/g/分}$ 、2例目で健側で  $0.41$   $\mu\text{mol/g/分}$  / 患側で  $0.43$   $\mu\text{mol/g/分}$ 、血腫患者では健側で  $0.91$   $\mu\text{mol/g/分}$  / 患側で  $0.51$   $\mu\text{mol/g/分}$  となり、少なくとも病変部で TCA 回路の代謝速度の低下は検出されなかった。

なお、呼気中の  $^{13}\text{CO}_2$  の割合は7日ではほぼ正常値となり、服用した  $^{13}\text{C}$  はほぼ1週間で体外に排出されるといえる。

### D. 考察

若年正常ボランティアでの計測結果は、PET による計測値と比べると若干低めではあるが、ほぼ妥当な代謝速度が算出できたといえる。特に、 $^{13}\text{C}$  グルコースの経口投与で計測が可能であることを

示したのは、臨床適用上意義深い。但し、TCA 代謝速度がやや低めであることやそのバラツキについては、スペクトルの S/N やグルタミン酸濃度や  $^{13}\text{C}$  分画算出法等に大きく依存するため、今後これらのより確度の高い算出法を検討していく必要がある。それにより、ニューロンとグリアの間のグルタミン酸-グルタミンサイクルの代謝速度のような、より脳機能に直結した代謝パラメータを算出することが可能となる。

一方てんかん患者データでは、患側で代謝の低下を示すよりも健側と同等かむしろ代謝亢進を示すデータが得られた。その機序については、上記のような計測精度の検討を進める一方、PET や  $^1\text{H}$ -MRS などのデータも取りながらさらに症例を重ね検討していく必要である。

### E. 結論

$^{13}\text{C}$ -MRS 装置を用いることにより、1位標識  $^{13}\text{C}$  グルコースを経口投与して TCA 回路の代謝速度などの脳代謝に関する重要な知見を得られることを確認した。今後、正常ボランティアについてさらに高齢者の基礎データ収集を進めるとともに、患者へも適用しその有用性を確立していく必要がある。

### F. 研究発表

#### 1. 論文発表

1) K.Okamoto, M.Yoshikawa, Y.Ishihara, H.Watanabe, M.Oda, K.Oshio, T.Kanamatsu, Y.Tsukada: Noninvasive Metabolic Measurement Using  $^{13}\text{C}$ -MRS. Toshiba Medical Review, No.68, P.44 (1999)

2) H. Watanabe, Y. Ishihara, K. Okamoto, K. Oshio, T. Kanamatsu, Y. Tsukada: 3D localized  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC correlation spectroscopy in vivo. Magn. Reson. Med., 43: 200-210 (2000)

3) H. Watanabe, Y. Ishihara, K. Okamoto, K. Oshio, T. Kanamatsu, Y. Tsukada: Human brain glucose metabolism mapping using multislice 2D  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  correlation HSQC spectroscopy.

Magn. Reson. Med., in press

4) 渡邊英宏、梅田匡朗、石原康利、岡本和也、小田正記、金松知幸、塚田裕三: 13C 代謝物イメージング法の高感度化. 13C 医学、Vol.9,P.8(1999)

## 2, 学会発表

1) K. Okamoto, M. Umeda, Y. Ishihara, H. Watanabe, M. Oda, K. Oshio, T. Kanamatsu, Y. Tsukada: High performance coil system for 1H-observed 13C-MRS. Proceedings of the ISMRM 7th Annual Meeting, P.737 (1999)

2) H. Watanabe, M. Umeda, Y. Ishihara, K. Okamoto, M. Oda, T. Kanamatsu, Y. Tsukada: High Sensitive 1H-13C HSQC Spectroscopy Using a High Strength Gradient System. Proceedings of the ISMRM 7th Annual Meeting, P.1611(1999)

3) 渡邊英宏、梅田匡朗、石原康利、岡本和也、小田正記、金松知幸、塚田裕三: 高感度 13C 代謝物イメージング法 (第 3 報)、第 27 回日本磁気共鳴医学会大会講演抄録集、Vol.19 supplement,P.191 (1999)

4) 梅田匡朗、石原康利、渡邊英宏、岡本和也、小田正記、金松知幸、塚田裕三: 送信用 1H-13C 2 重同調 QD コイル—受信用 6 チャンネルフェーズドアレイコイルの開発、第 27 回日本磁気共鳴医学会大会講演抄録集、Vol.19 supplement,P.265 (1999)

5) 渡邊英宏、梅田匡朗、石原康利、岡本和也、小田正記、金松知幸、塚田裕三: マルチスライス HSQC 法を用いた高感度 in vivo 13C 代謝物イメージング (第 3 報)、第 38 回 NMR 討論会講演要旨集、P.271(1999)

6) 渡邊英宏、梅田匡朗、石原康利、岡本和也、小田正記、金松知幸、塚田裕三: 13C 代謝物イメージングの高感度化 (第二報)、第 15 回 13C 医学応用研究会抄録集、P.15(1999)

## $^{13}\text{C}$ -MRS を用いた脳代謝の測定

分担研究者 金松知幸 創価大学生命科学研究所助教授

研究要旨  $[2-^{13}\text{C}]$ -ブドウ糖をラットに投与した後、脳内アミノ酸画分を抽出し、分析用 NMR で測定したところ、glutamate (Glu), GABA の 3 位の炭素に  $^{13}\text{C}$  が組み込まれており、また、 $[2-^{13}\text{C}]$ -Gln をラットに投与したところ、Gln の 2 位、GABA の 4 位に  $^{13}\text{C}$  が認められたことから、astroglia で合成された Gln が神経伝達物質である Glu や GABA の前駆体として利用されていることが明らかとなった。

### A. 研究目的

I. Astroglia での PC 活性 (anaplerotic pathway: AP) と Gln 合成の関係、そしてこれら代謝系の脳での役割を明らかにするために、 $[2-^{13}\text{C}]$ -ブドウ糖をラット尾静脈より投与 (1g/kg) し、ブドウ糖の 2 位由来の  $^{13}\text{C}$  が、脳内遊離アミノ酸に組み込まれる量を経時的に、分析用 NMR で測定した。また、ammonia によって脳内の Gln 合成が促進される事から、ammonium acetate (3.7mmoles/kg) を  $[2-^{13}\text{C}]$ -ブドウ糖と同時投与し、 $[2-^{13}\text{C}]$ -ブドウ糖由来の  $^{13}\text{C}$  の各アミノ酸への組込量がどのように変化するかを調べた。 $[2-^{13}\text{C}]$ -ブドウ糖が解糖系を経て  $[2-^{13}\text{C}]$ -pyruvic acid になりこれが PC によって oxaloacetic acid になり (AP)、TCA 回路に入る (astroglia 特異的) と  $[3-^{13}\text{C}]$ -Glu が生成され、さらに  $[3-^{13}\text{C}]$ -Gln が合成される。この代謝系を介して g-aminobutyric acid (GABA) が合成されるとすれば、3 位が  $^{13}\text{C}$  でラベルされる ( $[3-^{13}\text{C}]$ -GABA)。一方、 $[2-^{13}\text{C}]$ -

pyruvic acid が pyruvic acid dehydrogenase によって acetyl-CoA になり、TCA 回路に入る (neuron, glia ともに) と  $[5-^{13}\text{C}]$ -a-kg になり、これより Glu が生成され、さらに Gln または GABA が合成されると、それぞれ、5 位、5 位、1 位が  $^{13}\text{C}$  でラベルされる。したがって、 $[2-^{13}\text{C}]$ -ブドウ糖を用いることにより、AP による代謝経路を acetyl-CoA を介す経路と区別して、別個に調べることが可能である。

II. 脳内において Gln が GABA の前駆体に成り得るか否かを検討するために、 $[2-^{13}\text{C}]$ -Gln をラット尾静脈より投与 (3.5mmoles/kg) し、経時的に脳内 Glu, GABA への  $^{13}\text{C}$  の組込量を調べた。

脳内に取り込まれた  $[2-^{13}\text{C}]$ -Gln は glutaminase (neuron 特に synaptosome に局在) によって  $[2-^{13}\text{C}]$ -Glu になり、さらに glutamate decarboxylase (synaptosome に局在) によって  $[4-^{13}\text{C}]$ -GABA になる。

### B. 研究方法

ラット (Sprague Dawley; 180-220g; 雄) に無麻酔下で、尾静脈より  $[2-^{13}\text{C}]$ -ブドウ糖、sodium acetate、 $[2-^{13}\text{C}]$ -Gln をそれぞれ投与し、7.5、15、30、60 分後に頭部のみ microwave を照射し、瞬時に脳内代謝を固定した。外標である TSP の peak height を 100 とし、各アミノ酸の各位の相対 peak height を脳組織量 300mg 当たりで求めた。

### C. 研究結果

#### I-1. $[2-^{13}\text{C}]$ -ブドウ糖投与実験

1) Gln-3, Glu-3, GABA-3 への  $^{13}\text{C}$  組込量の経時変化 (astroglia の代謝) : Glu, Gln, GABA の 3 位への  $^{13}\text{C}$  の組込量の経時変化を見ると、Glu, Gln, GABA とともに 60 分後まで組込量が増加していた (Fig. 1-A)。Glu-3 への組込量に対する Gln-3 への組込量の割合 (Gln-3/Glu-3) を見ると、60 分後まではほぼ 1 であった。このように、 $[2-^{13}\text{C}]$ -ブドウ糖投与後、GABA-3 の peak が認められたことから、astroglia の AP を介した代謝系を経て GABA へ  $^{13}\text{C}$  が組み込まれていることが明らかとなった。また、astroglia では Glu と Gln のプールがほぼ等しいことが示された。

2) Acetyl-CoA を介する代謝の経時変化 (neuron と glia の代謝) : Glu-5, Gln-5, GABA-1 への  $^{13}\text{C}$  の組込量を経時的に見ると、Glu への組込量は 30 分で最高値を示し、60 分では減少していた。Gln, GABA への組込は 60 分まで増加していた (Fig. 2-A)。Gln-5/Glu-5 は時間とともに増加 (0.126 ~ 0.311) していた。Gln-3/Glu-3 比はほぼ 1 であるのに対し、Gln-5/Glu-5 比は 0.126 ~ 0.311 であ

ることから、neuron の Glu プールが astroglia のプールに比べ著しく大きいことが示された。

#### I-2. $[2-^{13}\text{C}]$ -ブドウ糖と ammonium acetate の同時投与実験

1) PC による AP の経時変化 (astroglia の代謝) : Ammonia 投与により Gln-3 への  $^{13}\text{C}$  の組込量は著しく増加し、GABA-3 への組込量も増加していたが、Glu-3 への組込量にはほとんど変化が認められなかった (Fig. 1-B)。Ammonia 投与により Gln 合成が著しく増加するに伴い Glu および a-kG が減少することから、それらを補うために AP が促進され、Gln-3 への  $^{13}\text{C}$  の組込量が増加したものと考えられる。また、AP が促進されるにともない、GABA-3 への  $^{13}\text{C}$  の組込量が増加していることから、AP を介した代謝系を経て GABA が合成されることが実験 I-1-1) 同様に示された。

2) Acetyl-CoA を介する代謝の経時変化 (neuron と glia の代謝) : Glu-5, GABA-1 への  $^{13}\text{C}$  の組込量は、ammonia 投与によっても変化はなく、Gln-5 への組込量のみが増加していた (Fig. 2-B)。

#### II. $[2-^{13}\text{C}]$ -Gln 投与実験 (Fig. 3)

$[2-^{13}\text{C}]$ -Gln を尾静脈より投与し、15、30、60 分後に脳を frontal cortex と brain stem に分け、それぞれの部位よりアミノ酸分画を抽出した。 $[2-^{13}\text{C}]$ -Gln 投与後速やかに脳中の  $[2-^{13}\text{C}]$ -Gln は減少して行くが、 $[2-^{13}\text{C}]$ -Glu は 30 分後に最高値を示し、 $[4-^{13}\text{C}]$ -GABA は 60 分後まで上昇していた。また、frontal cortex では brain stem に比べ  $[2-^{13}\text{C}]$ -Glu の値が高いにも拘わらず、



[4-<sup>13</sup>C]-GABA は低い値を示した。このことは、frontal cortex に比べ brainstem に GABAergic neuron が多く存在することを示すものである。

Astroglia の TCA 回路に取り込まれた、glucose 由来の炭素 (<sup>13</sup>C) が neuron に移行する経路として、1) astroglia で合成された Gln が synapse 部へ移行する、2) astroglia の TCA 回路中間代謝物 (α-kgo や malate 等) が synapse 部へ移行する、の 2 通りが考えられる。投与された [2-<sup>13</sup>C]-Gln 由来の [2-<sup>13</sup>C]-Glu、[4-<sup>13</sup>C]-GABA が脳内で認められたことは、astroglia で合成された Gln が synapse 部へ移行し、そこで、Glu さらに GABA へと代謝される可能性を、直接的に示すものである。

#### D. 結論

グリアで合成されたグルタミンが GABA 合成系ニューロンに移行し、グルタミン酸に変化した後、GABA になっていることが明らかとなった。従って、GABA 合成は、1) ニューロンで合成されたグルタミン酸を基質とする経路と 2) グリア由来のグルタミンを直接グルタミン酸にし、それを基質として合成する経路と、3) グリア由来のグルタミンがグルタミン酸になった後に、GABA ニューロンの TCA 回路に入り、再度グルタミン酸になり、それが GABA 合成の基質となる場合の、3つの代謝系が存在することが明らかとなった。

#### E. 研究発表

論文発表：

- 1) In vivo investigation of

glutamate-glutamine metabolism in hyperammonemic monkey brain using <sup>13</sup>C magnetic resonance spectroscopy: Y. Tsukada, T. Kanamatsu, H. Watanabe, K. Okamoto; *Dev. Neurosci.*, 20, 427-433 (1998).

- 2) Neurotransmitter release from the medial hyperstriatum ventral of the chick forebrain accompanying filial imprinting behavior measured by in vivo microdialysis: Y. Tsukada, T. Kanamatsu, H. Takahara; *Neurochem. Res.*, 24, 315-320 (1999).

- 3) Effects of ammonia on the anaplerotic pathway and amino acid metabolism in the brain: an ex vivo <sup>13</sup>C NMR spectroscopic study of rats after administering [2-<sup>13</sup>C] glucose with or without ammonium acetate: T. Kanamatsu, Y. Tsukada; *Brain Res.*, 841, 11-19 (1999).

- 4) 電気刺激による脳内代謝の変化 - <sup>13</sup>C-MR スペクトロスコピー法 (<sup>13</sup>C-MRS) による研究 - : 金松知幸、湯浅龍彦; *神経内科*, 51, 405-412 (1999).

- 5) 3D localized <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C Heteronuclear Single-Quantum Coherence correlation spectroscopy in vivo: H. Watanabe, Y. Ishihara, K. Okamoto, K. Oshio, T. Kanamatsu, Y. Tsukada; *Mag. Reson. Med.*, 43, 200-210 (2000).

6) Human brain glucose metabolism mapping using multislice 2D  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  correlation HSQC spectroscopy: H. Watanabe, M. Umeda, Y. Ishihara, K. Okamoto, T. Kanamatsu, Y. Tsukada; *Mag. Reson. Med.*, In press.

学会発表

- 1) 反復電気痙攣刺激に伴う脳内アミノ酸代謝の変化- $^{13}\text{C}$ -ブドウ糖を用いて- (1999) 湯浅龍彦、金松知幸; 厚生省特定疾患調査研究重点研究事業, 「パーキンソン病の定位脳手術お適応と手技の確立に関する他施設共同研究」、平成10年度研究報告 p24-25.
- 2)  $^{13}\text{C}$  代謝物イメージング法の高感度化 (1999) 渡邊英宏、梅田匡朗、石原康利、岡本和也、小田正記、金松知幸、塚田裕三;  *$^{13}\text{C}$  医学*, 9: 8-9.
- 3) 反復電気痙攣刺激に伴う脳内ブドウ糖、アミノ酸代謝の変化- $^{13}\text{C}$ -ブドウ糖を用いて- (1999) 金松知幸、高原ひろみ、塚田裕三、湯浅龍彦;  *$^{13}\text{C}$  医学*, 9: 10-11.
- 4) High-performance coil system for  $^1\text{H}$ -observed  $^{13}\text{C}$ -MRS (1999) K. Okamoto, M. Umeda, Y. Ishihara, H. Watanabe, M. Oda, T. Kanamatsu, Y. Tsukada; *Proc. of*

*ISMRM, 7th Annual Meeting*, p737.

- 5) High sensitive  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC spectroscopy using a high strength gradient system (1999) H. Watanabe, M. Umeda, Y. Ishihara, K. Okamoto, M. Oda, T. Kanamatsu, Y. Tsukada; *Proc. of ISMRM, 7th Annual Meeting*, p1611.
- 6) マルチスライス HSQC 法を用いた高感度 in vivo  $^{13}\text{C}$  代謝物イメージング (第3報) (1999) 渡邊英宏、梅田匡朗、石原康利、岡本和也、小田正記、金松知幸、塚田裕三; 第38回 NMR 討論会, p44-47.
- 7) 学習・記憶におよぼす長期高磁場暴露の影響 (1999) 堀 耕治、金松知幸、野村正彦、塚田裕三; 第76回日本生理学会大会.
- 8) Bicuculline によって誘発されたてんかん発作中のブドウ糖-アミノ酸代謝の変化 (1999) 金松知幸, A. Patel, J. Wal, D. Rothman, K. Behar, R. Shulman; 第15回  $^{13}\text{C}$  医学応用研究会.
- 9)  $^{13}\text{C}$  代謝物イメージング法の高感度化 第2報 (1999) 渡邊英宏、梅田匡朗、石原康利、岡本和也、小田正記、金松知幸、塚田裕三; 第15回  $^{13}\text{C}$  医学応用研究会.

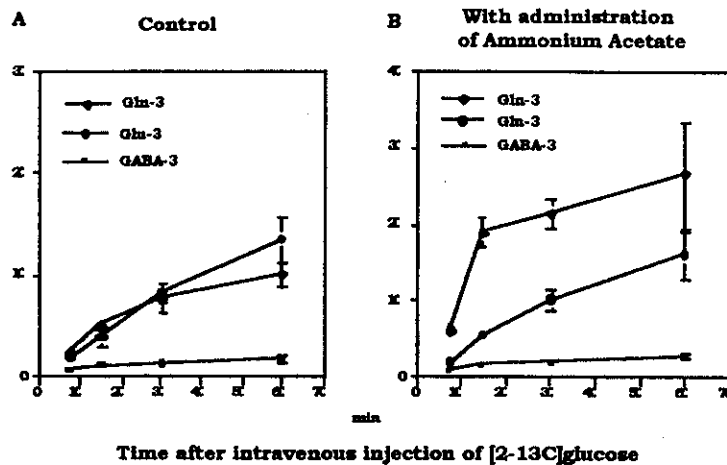


Fig. 1 Time course of  $^{13}\text{C}$  label incorporation into glutamate, glutamine and GABA from [2- $^{13}\text{C}$ ]glucose via anaplerotic pathway

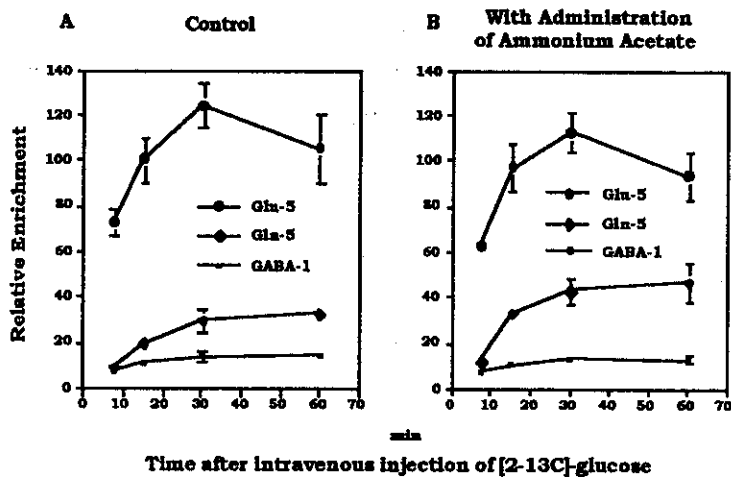


Fig. 2 Time course of  $^{13}\text{C}$  label incorporation into glutamate, glutamine and GABA from [2- $^{13}\text{C}$ ]glucose via acetyl-CoA pathway

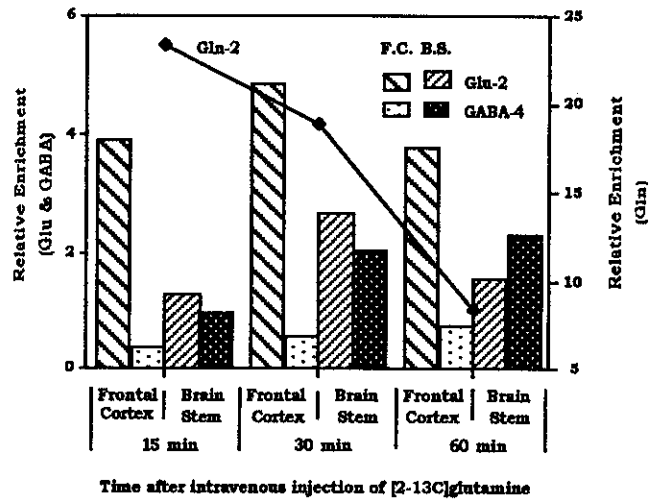


Fig. 3 Time course of  $^{13}\text{C}$  incorporation into C2-glutamate and C4-GABA in the frontal cortex and brain stem of rat brain from  $[2-^{13}\text{C}]$ glutamine

## PET/SPECT を用いた痴呆性疾患の評価

分担研究者 松田博史 国立精神・神経センター武蔵病院病院部長

研究要旨 13C-MRS を用いた痴呆性疾患に対する新しい診断技術の確立、あるいは病態に迫る上には、まず既存の確立された方法による客観的評価法を確認しておく必要がある。そこで初年度の今年、痴呆性疾患の約半数を占めるとも言われている、アルツハイマー病(AD)に注目し、SPECT による脳機能画像診断及び、各種神経心理学的検査、を Apolipoprotein E(APOE) による影響も交えて縦断的に検討した。

### A. 研究目的

我が国では、世界の他の国にはかつてない速度で老年人口が増加しており加齢と共に痴呆性疾患の発生率は高くなるので、当然、痴呆性老人の数も増加し、約 10 年前には 100 万人に達していなかった痴呆性老人の数は、約 10 年後に 200 万人を越えると言われていた。こうしたことから、その約半数を占めるとも言われる AD 患者への対応は現代社会の火急の課題となっている。AD の多くはいつとはなしに発症し、初期には記憶障害のみが目立ち、漸次進行し、知的レベルが全体的に低下して行く。その進行速度は、症例によってもちろん異なるも、症例の多くは、初めは徐々に進行し数年続き、脳の機能低下が脳全体に広がり始めると進行は速くなり、その後数年で高度痴呆に達する。そこで AD の治療においては、極めて初期の段階で発見して治療することが治療戦略という視点からは、重要になってくる。そこで、今年度は、高次脳機能の重症度評価として各種神経心理学的検査を施行した初期AD患者のSPECTによる縦断的

検討を、APOE による影響も交えて行った。

### B. 研究方法

対象は、当センター武蔵病院 物忘れ外来を受診し DSM-IV 及び、NINCDS-ADRDA にて、経時的に AD と最終的に診断され、初回時 MMSE 検査にて 24 点以上を満たした初期 AD 患者 36 例に対し、APOE を測定 (APOE  $\epsilon$  4(+);4+AD;15 例 男 8 例 女 7 例 year+/-sd 68.4+/-7.5、APOE  $\epsilon$  4(-);4-AD;21 例 男 9 例 女 12 例 year+/-sd70.5+/-8.1)、約 1 年の間隔を空け、3 回の脳血流 SPECT (99mTc-ECD、PatlakPlot 法) 及びほぼ同時期に神経心理学的検査を施行した。これらにつき Statistical Parametric Mapping96 (SPM96) を用いた血流変化の統計的解析及び、神経心理学的検査の縦断的検討を行った。

### C. 研究結果

APOE 各群と Normal DataBase 群 (NDB 群は年令を match させた 95 例) との SPM によ

る約2年間の相対的血流量の縦断的解析では、4+AD群は、どの時点でも両側帯状回後部、楔前部を中心とした両側頭頂葉の有意な血流低下にとどまったのに対し、4-AD群では、初回時にて両側帯状回後部、楔前部を中心とした右頭頂葉の有意な血流低下を示し、4+AD群の全経過と大差がなく、14カ月後には、両側海馬、両側海馬傍回、右側頭葉外側部、両側頭葉下面、右下前頭回にも有意な血流低下が加わり、26カ月後には、両側頭葉下面から外側、さらには右側頭頂連合野へと有意な血流低下が広がっていった。

その結果、初期AD患者全体としては、はじめは、両側帯状回後部、楔前部を中心とした頭頂葉で有意な血流低下を認め、その後、海馬を含む側頭葉、そして側頭頂連合野、前頭葉へと有意な血流低下が広がっていく。

また4+AD群と4-AD群との交互作用による検討では、4-AD群は4+AD群と比べ右頭頂葉の有意な血流低下を認めた。一方で4+AD群は4-AD群と比べ有意な血流低下を示す部位は同一条件下では見いだせなかった。

神経心理学的検査の結果を下記表に示す。4+AD群と4-AD群との比較で有意差のあった検査は、太字、斜字で表す。有意差をもって低下していたものは全て4-AD群である。

#### D. 考察

ADは一種の蛋白蓄積症の一種と現時点では言われている。現在同定されているADの最も早期の病理学的変化は、大脳皮質の $\beta$ アミロイド(A $\beta$ )、特にA $\beta$  1-40、A $\beta$  1-42の2つの分子種のうち、A $\beta$  1-42の蓄積である。それに引き続き、タウの蓄積といった神経原線維変化やシナプス減少が続発する。よって少なくとも初期AD脳ではA $\beta$ の蓄積

は進んでいるが、神経原線維変化はまだ進んでいない状態と考えられている。

もちろんこれら剖検脳による神経病理学的検査は、疾患による長期の病理過程の最終像を示すもので、必ずしも正常から異常へ推移する過程、あるいは疾患の途中経過を正確に示すものではない。そこで途中経過については神経病理学的方法よりも脳機能画像診断法が多く情報をもたらし得る。SPECT/PETといった脳機能画像診断における血流・代謝低下は、神経細胞の脱落・変性と相関している。また、神経原線維変化と糖代謝、あるいは<sup>11</sup>Cmethionineで評価された局所の組織量と糖代謝とは相関しないとの報告もある。その結果、脳機能画像診断で得られる血流・代謝低下は、神経細胞の脱落・変性、およびシナプス結合の減少を反映していることが示唆される。

これらのことより、APOE  $\epsilon$  4と初期ADの脳血流変化を考える上には、APOE  $\epsilon$  4と初期AD脳の病理学的変化を反映するA $\beta$ の蓄積、および脳血流を反映するシナプス結合で介される神経ネットワーク、といった関係を明らかにする必要がある。もちろんAD脳の神経ネットワークにはコリン作動性神経、セロトニン作動性神経やノルアドレナリン作動性神経等も含むが、ADで代表的に研究され、記憶と関連するコリン作動性神経について考察する。

1. ADの早期発症型原因遺伝子であるpresenilin1、presenilin2およびAPPは、A $\beta$  1-42の分泌高進を誘導するが、APOE  $\epsilon$  4はA $\beta$  1-42には作用しない(ただしA $\beta$  1-40には作用する)。

2.A $\beta$ は自己会合し不溶性のfibrilになって初めて急性毒性を示すが、A $\beta$  1-42はA $\beta$

1-40 に比して不溶性の fibril に非常になりやすい (in vitro での結果)。

3. ある種の A $\beta$  1-42 は細胞内アセチルコリン量を低下させるが A $\beta$  1-40 にはそのような活性はない。

4. AD においては前脳基底野の一群の起始核に由来するコリン作動性神経が選択的に脱落しており、投射先の大脳皮質ではアセチルコリン合成酵素とアセチルコリン分解酵素がともに顕著に低下する。

5. マイネルト核を刺激するとその線維の投射する大脳皮質のアセチルコリン放射量が増え大脳皮質の血流が増加する。

以上より AD 発症初期には A $\beta$  1-42 による神経細胞の機能障害が先行しておこり、コリン作動性神経の伝達物質であるアセチルコリンの合成が低下し、神経終末でのシナプス結合が弱まり、入力刺激に応じて投射先から神経栄養因子を受け取ることで維持されてきたネットワークが壊れ、投射先より逆行性にコリン作動性神経が脱落している可能性があることが考えられる。

マイネルト核から大脳皮質へ向かう投射線維のルートは細かくは 5 群に分類され、例えば anteroventral (av) 群は、帯状回、大脳半球内側面皮質へ投射される。大きく分類すれば内側路と外側路がある。内側路は帯状束に入り帯状回、大脳半球内側面、大脳半球背側部を支配し、外側路は外包に入り放線冠のなかで扇状に広がって頭頂葉、側頭葉、後頭葉のそれぞれ外側面に分布する。ただしそれらは一様の分布を示すのではなく、例えば帯状回や海馬傍回は密度が特に高い領域の一つである。

AD 群(4-AD 群+4+AD 群)と ND 群との脳血流の SPM による検討では、初回時はおもに、

両側帯状回後部、楔前部といった主に av 群の投射先、および頭頂葉皮質の有意な血流低下を示し、14 カ月後には、両側海馬、両側海馬傍回、側頭葉外側部から下面、下前頭回にも有意な血流低下が加わり、26 カ月後には、側頭頭頂連合野へと有意な血流低下が広がっていった。これら血流の低下部位は上述しており、コリン作動性神経が関係する領域であり、脳血流がシナプス結合で介される神経ネットワークを反映していることが示唆される。

また APOE 群間による比較では、結果に示すように 4-AD 群は 4+AD 群と比べ、有意な血流低下部位はより広範囲で経時的な広がりも激しい。その結果 4-AD 群と 4+AD 群との交互作用による検討では、4-AD 群は 4+AD 群と比べ右帯状回後部、右楔前部から右上部頭頂葉で有意な血流低下を認めている。このことは上述するように、APOE  $\epsilon$  4 が A $\beta$  の特に A $\beta$  1-42 に及ぼす作用がないこと、あるいはそれとは別に、APOE の抗酸化作用の検討で、AD 発症に対して抑制的に働く可能性が指摘されている APOE  $\epsilon$  2 で抗酸化作用が最も強く、APOE  $\epsilon$  4 で最も弱かったという報告もあり、なんらかの関連が示唆される。しかし、APOE は本来コレステロールなどの脂質の代謝に関与する血清リポ蛋白であり、A $\beta$  蓄積とコレステロール代謝との関連を示唆する報告もあり、慎重に検討していく必要が有る。

神経心理学的検査の縦断的検討では、4-AD 群は 4+AD 群より、AD で特徴的とされる遅延再生が Rey の図検査で有意に低下しており、このことは Rey の図検査が反映する特に位置記憶と 4-AD 群で有意に低下していた右頭頂の関連を示唆するものであった。

最後に MRS による NAA(N-

acetylaspartate)の検出は神経ネットワークの障害を評価する指標となり AD への応用性を強調した報告は少なくない。MRSで観察できる代謝物のなかで、最も神経伝達物質の情報を提供する可能性を有する代謝物の一つであるグルタミン酸は、Ach が海馬でムスカリン受容体を介してグルタミン酸神経伝達を促進することにより作業記憶過程の形成に関与していると推察されている他、細胞レベルでの学習・記憶の基礎過程と考えられている海馬での長期増強現象にグルタミン酸受容体が促進的に関与しているという報告もあり今後本研究が発展していくことを期待したい。

そのために今年度は、健常者を中心に測定条件の制限から後頭葉における解析をおこなったが、今後、初期アルツハイマー病に応用していくには、受信コイル等を改良し頭頂葉あるいは更にはより内側部の帯状回、海馬へと迫る必要があることがわかった。またその他多くの痴呆性疾患で、ますますPETで基礎研究を築き MRS に応用していく必要がある。



## 難治性パーキンソン病の治療と病態研究

分担研究者 湯浅龍彦 国立精神・神経センター国府台病院部長

**研究要旨** 本研究では、薬物治療に抵抗性を示すパーキンソン病や、鬱状態あるいは幻覚・妄想などの陽性精神症状などを呈す難治性パーキンソン病の病態解明と治療法の解決を目的とする。本年度はこのような難治性のパーキンソン病に対して非薬物的非観血的療法として無けいれん性通電療法あるいは、経頭蓋的磁気刺激療法を実施し、その効果を検討した。

### A. 研究目的

パーキンソン病(PD)では振戦、固縮、寡動などの運動症状に加え、鬱状態、幻覚、妄想などの陽性精神症状な様々な精神症状を合併することがある。また、長期の薬物療法が実施された例では、薬剤の効果の現弱ないし不安定性、あるいは、薬剤に関連する異常運動の出現などを来し、治療が著しく困難となる場合がある。これらの難治性のPDについては、その背景にある病態解明と治療法の確立が急務である。

現在臨床現場において鬱症状を伴うパーキンソン病(PD+D)例においては、従来の薬物療法のみでは対処が難しいことが多く、無けいれん性通電療法(m-ECT)が少数例で実施され良い効果が報告されている。一方、様々な抗パーキンソン薬に対して効果の減弱したPDに対して経頭蓋的磁気刺激療法(TCMS)が試みられるようになりつつある。本研究では、当科において実施した m-ECT の治療経過、そしてTCMSを実施した難治性PD例の治療結果を述べ、今後 13C-MRS を用いた病態研究のスタートとしたい。

### B. 研究方法

ここでは m-ECT を実施した 5 例の PD+D 例の経過と、TCMS を実施した 2 例の PD 例について報告する。これらの治療は、前者は既に治療法として承認された方法であり、また、後者は院内の倫理委員会の審査を経た後、本人にインフォームドし、同意を得た上で実施されたものである。

### C. 研究結果

D) うつ状態を伴うパーキンソン病(PD+D)に対する m-ECT の効果

(a) 対象となった PD+D 例は 53 歳から 55 歳の PD 患者 5 例で、全例が女性であった。

(b) m-ECT の実施方法は、他所に述べてあるが、全身麻酔下に 100~115volt で 3~8sec の通電を行う。この利点はけいれんを伴わずまた、患者に通電時の負の記憶を留めないことにある。通電の回数は週 3 回、計 3~9 回とした。

(c) m-ECT の治療効果

(1) 治療を受けた患者の中では、施術前の Hoehn-Yahr 分類で 3~4 であったが、術後に

はいずれも1段階以上の改善をみとめた。

(2)一方、Hamilton depression scaleによるうつ状態の評価では、著明な改善が得られた。

(3)さらにこれらの3例中2例において高次脳機能の改善をみとめた。

## II) 進行パーキンソン病患者に対する経頭蓋的磁気刺激療法(TCMS)の初期効果

(a)TCMS療法の対象となった難治性PDは、69歳女性と64歳男性の2例であり、前者が発症後19年経過例、後者が17年経過の終日臥床状態を余儀なくされている進行例で薬物難治例である。

(b)磁気刺激方法としては、患者はベット上に横臥位安静位をとり、磁気刺激コイルの中心をvertexから正中2~3cm前方の頭蓋上に当て、充電電圧700V、0.2Hz(5秒に1回)で計60回単発刺激を与えた。

(c)TCMS療法の治療効果 経頭蓋的磁気刺激療法(TCMS)を実施した2名では、どちらも施術後運動症状に明らかな改善が見られた。昭和56年発症の69歳女性患者では、磁気治療施行前のUPDRS 74点(1-0, 2-21, 3-39, 4-0, 5-14)から施行後54点(1-1, 2-19, 3-25, 4-1, 5-9)に改善。H-Y stageはVからIVに改善した。高次機能検査では前頭葉機能検査で若干の改善、一般知能検査及び一般記憶検査では著明な改善が認められた。

昭和58年発症の64歳男性では、磁気治療施行前のUPDRS 64点(1-4, 2-17, 3-24, 4-7, 5-12)から施行後42点(1-0, 2-8, 3-24, 4-2, 5-8)に改善。H-Y stageはIVからIIIに改善した。

## C. 考察

精神症状を伴うPDや、進行し薬物療法の

効果の得られなくなったPDの次の治療をどうするのかということは、臨床現場におけるまことに切実な大問題である。このような時、今回、前者に対しては、無けいれん性通電療法(m-ECT)が一定の効果を示し、後者に対しては、経頭蓋的磁気刺激療法(TCMS)に治療効果が期待されることが明らかにされた。

パーキンソン病は黒質から線条体にいたるドパミン神経の脱落による疾患であり、L-DOPAを中心とした補充療法が治療の根幹である。このことは初期のPDの治療としてはその通りである。しかし、パーキンソン病の20-40%に様々な精神症状を合併することが知られていて、その一部は確かに薬剤に関連した譫妄を主体とした意識障害でもあるが、中には明らかなうつ傾向を示し、真に治療の困難な事例が存在する。また、パーキンソン病も進行すると殆どあらゆる抗パ療法に対して効果が殆ど得られなくなる例が多数存在する。これらの例においては、薬物療法のみでは治療が困難で、薬物以外の治療法の開発が望まれる。そのような時、今回示した2つの治療法は、難治性のパーキンソン病の治療に新たな局面を開くものとして期待される。

問題は、これらの治療法がどのような機序で効果が発揮するか、難治例の病態の解明と治療根拠の解明が重要である。現時点での推論としては以下のようなものである。パーキンソン病は、単に黒質線条体ドーパミン神経の異常という単純な図式に留まらず、そこから派生する大脳基底核、視床、前頭葉に至る広汎な神経ネットワークの機能障害を推定しなければならないということであろう。より上位の障害により次々と引き起こされる下位のニューロンの機能障害がパーキンソン病の病態発現に重要であり、それ故にm-ECTやTCMS

が効果を発揮する所以が存在するものと推測されるのである。

今後、以上の仮説をどのようにして証明するのかということが問題となる。その為に<sup>13</sup>C-MRS、<sup>1</sup>H-MRS、MEGなど非侵襲的脳代謝検査法の臨床応用への期待が膨らむのである。<sup>13</sup>C-MRSは現在非侵襲的にヒトの脳代謝を計測できる唯一の方法である。その意味から測定条件を整えて、パーキンソン病における病態を解明し、さらに、各種の治療前後における脳代謝の変化を観測し、治療薬や治療法の機序を解明できるものと考えらる。

#### D. 結論

精神症状を伴うパーキンソン病や重症化し薬物の効果の減少したターキンソン病に対するm-ECTやTCMSなど非薬物療法の今後の期待を述べた、また、<sup>13</sup>C-MRSを応用することによりパーキンソン病の病態の理解が進むであろうという推論を述べた。今後このような難治例の背景にある病態を<sup>13</sup>C-MRS、<sup>1</sup>H-MRS、MEGなど非侵襲的脳代謝計測法を用いて検討する。

E. 研究発表 1.論文発表渡辺崇、塚田和美、湯浅龍彦、西宮仁、吉野英 :Parkinson 病に対する修正電気けいれん療法の適応について、医療 53 (11) 703-707.1999

## 13 C 標識神経伝達物質の作成

分担研究者 梶原正宏 明治薬科大学薬品化学教授

研究要旨 脳内の神経伝達物質として知られているグルタミン酸やアスパラギン酸は市販品があっても 13C 標識体が極めて高価なため、精度の高い繰り返し実験の妨げになっている。このため比較的安価な 13C 標識体を出発原料にし、同一合成ルートによる多種類のアミノ酸を立体選択的に合成、およびそのアミノ酸の任意な位置に 13C 選択的標識する簡便な合成法を開発研究することにした。

### A. 研究目的

各種アミノ酸の一般的合成法を確立する目的で 13 C 標識原料として比較的安価な 13 C 標識原料酢酸塩を用い、アルキルハロゲン体に誘導し、グリシン等価体で光学活性体 Deltaria, s oxazinone と高立体選択的に反応させ、続いて脱保護反応を行い、中枢神経のニューロンに強力な脱分極作用を有する脳内神経伝達化合物である 13 C 標識目的化合物 L-[2-13C]アスパラギン酸の高立体・位置選択的簡便合成法開発を研究目的とした。

### B. 研究方法

各種アミノ酸の一般的合成法を確立する目的で 13 C 標識原料として比較的安価なから臭化酢酸エステルへと導き、光学活性 Deltaria, s oxazinone とカップリングさせ高立体選択的に反応する反応条件を開発検討し、続いて開環反応、脱保護反応を行い、13 C 標識目的化合物 L-[2-13C]アスパラギン酸の高立体・位置選択的簡便合成法開発を実施した。

### C. 研究結果

比較的安価な出発原料[2-13C]酢酸ナトリウムより 13 C 標識目的化合物 L-[2-13C]アスパラギン酸の高立体・位置選択的簡便合成法開発に成功した。本標的化合物は 13 C-NMR において標識シグナル 55.9ppm を観察し、各種機器データからその構造および 13 C 標識位置ならびに光学純度については HPLC-CD 測定値から 99% ee と高立体選択合成が達成されたことを確認した。

### D. 考察

本合成法により出発標識酢酸ナトリウム物の 13 C 位置を変更するか、Deltaria, s oxazinone 側に 13 C 標識化することにより、アスパラギン酸の 1 位から 4 位まで高立体・位置選択的標識合成法の確立ができた。

### E. 結論

神経伝達物質やその候補化合物としてアミノ酸やアミンは重要で 13C 標識アミノ酸やアミンは 13C-NMR や LC-MS-MS によって詳細な作用が明らかにされようとしている。