

平成 22 年 5 月 14 日現在

研究種目：基盤研究 (B)
 研究期間：2007 ～ 2009
 課題番号：19390322
 研究課題名 (和文) 完全一体型 ESR・MRI 融合装置による機能イメージングの研究
 研究課題名 (英文) Functional imaging studies of small rodents by ESR・MRI combined system
 研究代表者
 藤井 博匡 (FUJII HIROTADA)
 札幌医科大学・医療人育成センター・教授
 研究者番号：70209013

研究成果の概要 (和文)：活性酸素で代表されるフリーラジカルを画像化する ESR イメージング法は、分子イメージングの研究にはなくてはならないイメージング技法である。本研究課題では、実験動物の解剖画像を高解像度でイメージングできる MRI と ESR イメージング法とを融合し、実験動物の生理機能を画像表示できる ESR・MRI 融合装置を試作した。本装置を活用して生理機能のイメージングを行い、生活習慣病やメタボリックシンドローム抑制のためのスクリーニング法の開発に利用する。

研究成果の概要 (英文)：Electron Spin Resonance Imaging is a versatile imaging method of visualizing free radicals that are so called reactive oxygen species generated in biological systems. In this project, we have developed the ESR・MRI combined system which is capable of visualizing both ESR image and MR image. With this newly developed system, we plan to do the diagnostic study to screen the metabolic syndrome.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	7,600,000	2,280,000	9,880,000
2008 年度	3,600,000	1,080,000	4,680,000
2009 年度	3,200,000	960,000	4,160,000
年度			
年度			
総計	14,400,000	4,320,000	18,720,000

研究分野：磁気共鳴

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・放射線科学

キーワード：ESR、MRI、フリーラジカル、活性酸素、酸化ストレス、分子イメージング

1. 研究開始当初の背景

(1) 遺伝情報を解き明かすゲノムプロジェクトは 20 世紀で終結し、21 世紀はいよいよ生体分子の振る舞いを生物が生きている状態で解明することが可能な“分子イメージング研究”の時代へと発展してきた。

(2) 分子イメージングには、解剖学的画像化と

体の生理機能の画像化、という二つの方向性で研究が進められている。現在日本の社会では高齢化が進み、医療費の高騰を抑える事が急務となっている。新たな分子イメージング技術の発展により、脳機能の早期診断が可能となれば、高齢化社会での予防医学の発展に寄与するものと思われる。

2. 研究の目的

(1)生理機能の画像化をめざした機能イメージングを可能とするために、測定物体（動物）を一切移動させない、完全一体型 ESR・MRI 融合装置を開発する。

(2)本装置を用いて、活性酸素フリーラジカルの生理機能を視覚化する機能イメージングの応用研究をめざす。

3. 研究の方法

(1)完全一体型 ESR・MRI 融合装置の開発：750MHz で稼働する ESR イメージング装置と 1Tesla(43.6MHz)で画像化できる MRI 装置との融合装置を製作する。

(2)生理機能をイメージングするマルチモダリティ・プローブの開発と応用研究：酸素測定用プローブと活性酸素測定用プローブを調整し、実験動物（マウス）を用いて実証研究を行う。また、病態モデル動物（炎症モデル・虚血モデル）を用いて酸素濃度、活性酸素測定の実証試験を行う。

(3)生理機能イメージング研究：代謝リックシンドローム対策に向けた活性酸素の視覚化・脳疾患モデル動物での生理機能イメージングを行う。具体的には、代謝リックシンドローム抑制に向けた検査・スクリーニング手法の開発と脳疾患モデル動物における機能イメージングを実施する。

4. 研究成果

(1)脳内イメージング化に向けたナイトロオキシドの脳内分布について

①使用したナイトロオキシド化合物について：代表的な親水性、疎水性ナイトロオキシドを用いた。親水性ナイトロオキシドは、**3-carboxy-2,2,5,5-tetramethylpyrrolidine-1-oxyl (COP)**で、疎水性ナイトロオキシドは**3-hydroxymethyl-2,2,5,5-tetramethylpyrrolidine-1-oxyl (HMP)**である。COP および HMP の分子構造を図 1 に示した。

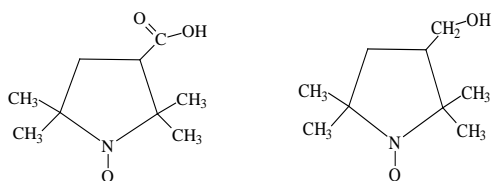


図 1 COP および HMP の分子構造

これらのナイトロオキシド以外に、親水性の**3-carbamoyl-2,2,5,5-tetramethylpyrrolidine-1-oxyl (CAP)**、疎水性化合物である **methoxycarbonyl-2,2,5,5-tetramethylpyrrolidine-1-oxyl (MCP)**を用いた。これらはリン酸緩衝液 (pH7.4、0.9%NaCl) に溶解させ、実験動物に投与して用いた。

②MRI による撮像結果について

造影剤ナイトロオキシドの COP や HMP をマウスに投与し、我々が開発した MRI 装置によりマウス脳内がどのように観測できるか、撮像結果を以下図 2 に示した。

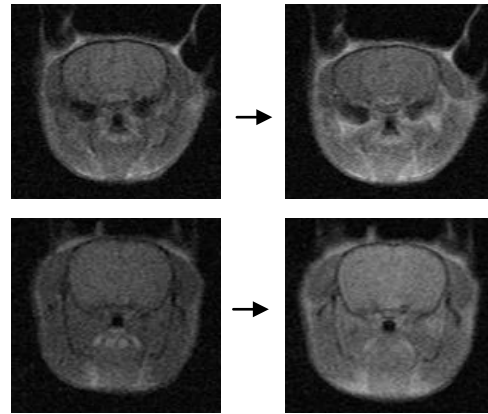


図 2 COP(上段)、HMP(下段)投与前後の MRI 撮像結果

COP 投与結果(図 2 上段)では、ナイトロオキシドが脳内へは進入していない事が分かる。一方、HMP 投与結果(図 2 下段)では、マウス脳内の画像強度が著しく上昇しており、HMP は脳内へ進入可能である、つまり、HMP は血液脳関門 (Blood-brain barrier: BBB) を自由に通過すると言える。他のナイトロオキシドを用いて同様の実験を行ったところ、CAP および MCP でも上記と同様の結果を得ることができた。上記の実験では、ナイトロオキシド化合物を腹腔内投与、尾静脈投与の二つの投与ルートで実施したが、結果的には同等の結果が得られた。

③ESR イメージング法による撮像結果

BBB 透過性に差のある HMP、COP を使い、ESR イメージング装置により撮像を行った。今回用いた CW-ESR 装置は、750MHz で稼働するイメージング装置で、磁場掃引を 100ms まで短縮することも可能で、プロジェクション数の低減と合わせて従来より大幅に計測時間を短縮できるシステムにしている。

プロジェクションの取得については、従来のように偏角を均等に变化させるのではなく均一に方向を取ることで、プロジェクション数を 2/3 以下に低減できただけでなく、画像再構成の効率も低下することはなかった。

撮像結果を以下の図 3 に示した。ICR マウス

(a) に COP、HMP を尾静脈投与し、得られた ESR スペクトル (プロジェクションスペクトル) から 3 次元画像再構成を行ってマウス頭部の 3 次元画像 (b) を得た。図 3b 左は COP 投与時の、右は HMP 投与時のマウスの 3 次元画像を示している。BBB 非透過性である COP で

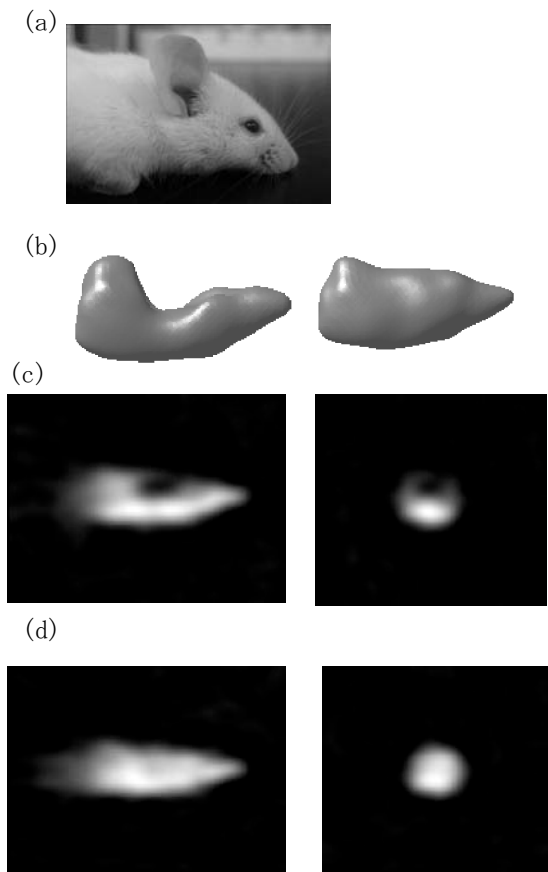


図3 ナイトロオキシド化合物を造影剤としたマウス頭部でのESRイメージング画像
 (a)ICRマウス頭部の写真(体重3.2g)
 (b)COP(左)、HMP(右)投与時の3次元画像
 (c)COP投与時の2次元画像(左:Sagittal画像、右:axial画像)
 (d)HMP投与時の2次元画像(左:Sagittal画像、右:axial画像)
 実験条件:ナイトロオキシド分子は、200mMで調整し、尾静脈より投与した(200mM, 100μL)。撮像条件:磁場勾配:0.6mT/cm、246 projections、撮像時間:140秒、FOV:50mm(128×128 pixels)。

は、脳組織部分が欠落した画像が得られていることが分かる。その一方、BBB透過性のHMPでは、脳組織の欠落のない3次元画像が得られていることがわかる。

図3の(c)および(d)に2次元ESR画像(スライス画像)を示した。Sagittal画像(左)においてもaxial画像(右)に於いてもCOPは脳組織には進入していないのが分かり、また、HMPはBBBを透過して脳内に進入していることが画像から分かる。

④生理機能イメージングについて:

生理機能イメージングの代表例として、脳内における酸化ストレス状態のイメージング、いわゆるレドックスイメージングを行った。

ナイトロオキシドは体内に投与されると体内のレドックス状態に依存して代謝される。つまり、常磁性から反磁性に変化し、ESRスペクトルは消失する(図5)。ESR信号は1次反応速度式に従って減少し、減衰直線の傾きから減少速度定数あるいは半減時間が評価可能である。

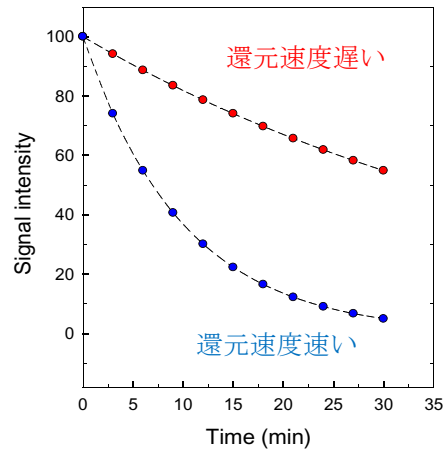


図5 ナイトロオキシド還元反応挙動(ESRスペクトルの減衰挙動)

ナイトロオキシドの減衰挙動を利用して体内のレドックス状態のマッピングをすることが可能である。2次元ESRイメージング画像の各ピクセル上での信号強度を時間に対してプロットしてその半減時間あるいは速度定数を求めると、半減期マッピングあるいは速度定数マッピング表示が可能となり、レドックス状態を定量的に画像判定する事が可能となる。

活性酸素による酸化ストレスからの影響を画像表示する目的で、レドックス状態の画像表示をナイトロオキシドの半減時間をマッピングする手法により行った。この試みは世界で最初のものである。

HMPをコントロールマウスと炎症モデルマウスに投与し、axial方向での半減期マッピングを表示した。コントロールでのマッピングに比し、炎症モデルでは半減期が長くなっており、ナイトロオキシドの還元速度が低下している、つまり、酸化ストレスの効果が増加していることを示している。このように、定量的な判定が可能となる。

⑤結論

以上の結果から、ESR・MRI融合装置を活用することにより、酸化ストレスの影響をナイトロオキシドの半減期マッピングという形で定量的に表示できることを示した。

今後はこの手法を使って、病態のモニタリングや解析に活用したい。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計7件)

- ①Sato-Akaba H, Kuwahara Y, **Fujii H**, **Hirata H**. Half-life mapping of nitroxyl radicals with three-dimensional electron paramagnetic resonance imaging at an interval of 3.6 seconds.査読有 Anal Chem. 2009; 81: 7501-6.
- ②Ikebata Y, Sato-Akaba H, Aoyama T, **Fujii H**, Itoh K, **Hirata H**. Resolution-recovery for EPR imaging of free radical molecules in mice.査読有 Magn Reson Med. 2009; 62: 788-95.
- ③Sato-Akaba H, Abe H, **Fujii H**, **Hirata H**. Slice-selective images of free radicals in mice with modulated field gradient electron paramagnetic resonance (EPR) imaging. 査読有 Magn. Reson. Med. 2008; 59, 885-890.
- ④**Fujii H**, Sakata K, Katsumata Y, Sato R, Kinouchi M, Someya M, Masunaga S, Hareyama M, Swartz HM, **Hirata H**. Tissue oxygenation in a murine SCC VII tumor after X-ray irradiation as determined by EPR spectroscopy.査読有 Radiother Oncol. 2008; 86, 354-360.
- ⑤Itoh K, Sakata M, Watanabe M, Aikawa Y, **Fujii H**. The entry of manganese ions into the brain is accelerated by the activation of N-methyl-D-aspartate receptors.査読有 Neuroscience 2008; 154, 732-740.
- ⑥ Sato-Akaba H., **Fujii H.**, **Hirata H**. Development and testing of a CW-EPR apparatus for imaging of short-lifetime nitroxyl radicals in mouse head. 査読有 J. Magn. Reson. 2008; 193, 191-8.
- ⑦ Sato-Akaba H, **Fujii H**, **Hirata H**. Improvement of temporal resolution for three-dimensional continuous-wave electron paramagnetic resonance imaging.査読有 Rev Sci Instrum. 2008; 79, 123701.

[学会発表] (計4件)

- ①Hirotsada Fujii, Mapping of redox status in mouse brain by EPR imaging and MRI, SFRBM2009, Nov. 19 '2009, San Francisco
- ②平田拓、高速電子常磁性共鳴イメージング法の進展、SEST2009、2009年11月12日、神戸市
- ③伊藤良平、EPRを用いた2分子同時イメージング法の基礎的実験—15N-TEMPOLとTAMを用いた実験—、SEST2009、2009年11月12

日、神戸市

- ④藤井博匡、高速EPRイメージング装置による脳疾患モデル動物での抗酸化マッピング、SEST2009、2009年11月11日、神戸市

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤井 博匡 (FUJII HIROTADA)
札幌医科大学・医療人育成センター・教授
研究者番号：70209013

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

伊藤 康一 (ITO KOUICHI)
徳島文理大学・薬学部・教授
研究者番号：30291149
平田 拓 (HIRATA HIROSHI)
北海道大学・大学院情報科学研究科・教授
研究者番号：60250958
黄田 育宏 (KIDA IKUHIRO)
(財)東京都医学研究機構・東京都精神医学総合研究所・研究員
研究者番号：60374716