2版

様　式　C－１９、F－１９－１、Z－１９　（共通）

科研費 KAKENHI

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

平成 ３０ 年　 ６ 月 １２ 日現在

機関番号：３３９１６
研究種目：若手研究(B)
研究期間：2015～2017
課題番号：１５Ｋ１９８２３
研究課題名（和文）小動物PET/CTによるマウス脳ブドウ糖代謝測定の研究

研究課題名（英文）Study on measurement of mice brain glucose metabolism by small animal PET / CT

研究代表者
竹中　章倫（takenaka, akinori）

藤田保健衛生大学・医学部・助教

研究者番号：２０７４８６８６

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　3,000,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は、マウスPET試験における動態解析のための完全自動採血システムの評価を目的としています。近年、我々は全自動血液採取システム(ABDS; Automatic Blood Dispensing System)を開発しました。ABDSの操作性を検証し、ABDSを使用した最初のマウスにおけるグルコースの脳代謝速度（CMRGlc）の完全定量的測定を行い、この有用性を報告します。
マウスにおけるCMRGlcは、過去に報告された手採血法での結果と一致していました。自動化されたマイクロリットルオーダーの血液サンプリングシステムは、マウスのPET研究における絶対定量化に有用です。

研究成果の概要（英文）：This study aims at evaluating fully automated blood sampling system for kinetic analysis in mice PET studies.Recently, we have developed fully automated blood sampling system (ABDS; Automatic Blood Dispensing System). We verified the operability of ABDS and performed a complete quantitative measurement of glucose cerebral metabolic rate (CMRGlc) in mice using ABDS for the first use, and its usefulness is reported here.
CMRGlc in mice was in agreement with the results in the manual blood sampling method reported in the past. The automated micro-liter ordered blood sampling system would be useful for absolute quantification in mice PET studies.

研究分野：radiology

キーワード：FDG　小動物PET　小動物　CD-Well　μFmPC

１．研究開始当初の背景

PET では生体への親和性の高い放射性同位元素が使用できることから、糖代謝や神経受容体濃度といった様々な生体機能の測定が可能であり、新規薬剤や治療法の効果を ***in vivo*** の画像として得られる(Wagner Jr.，J Nucl Med 48:15N, 2007)。また、小動物用 PET カメラが商業化されたことから、ヒトや大型動物に対して確立された動態解析法を、マウスやラットへ応用する試みがなされるようになった(Toyama, Curr Med Img Rev 1:245, 2005)。特にマウスでは、様々な遺伝子改変モデルや病態モデルが利用可能であることから、PET を用いた定量分子イメージングの、創薬や診断治療法開発への寄与が期待されている(Hume, Curr Pharmac Des 8 :1497, 2002; Toyama, Euro J Nucl Med Mol Imaging 32:593, 2005)。しかし、対象が小さいことから、小動物 PET による生体の生理学的機能や疾患モデルの定量評価方法が確立されたとは言い難い。

２．研究の目的

我国で小動物 PET は普及しつつあるが、生体の全身分布の評価に主に用いられており、生体の生理学的機能や疾患モデルの定量評価方法が確立されたとは言い難い。我々が開発してきた小動物に対する PET 定量撮像を実現し、必要な要素技術を医学研究での一般的なツールとして確立するために、マウスの脳ブドウ糖代謝測定について、微量血漿中放射能濃度測定の自動化システムと小動物用 PET/CT 装置で撮像プロトコルを最適化し、有用性を確立する。

３．研究の方法

初年度は、小動物の動脈にカテーテル刺入する手技、道具の確立、総出血量が 100μL 以下となる撮像プロトコルの開発、正常マウスの脳ブドウ糖代謝測定、再現性の評価を行い、実験手技を確立する。

(1) 小動物動脈にカテーテルを刺入する手技、道具を確立する。PET で使用する核種は短半減期であり、撮像のための薬剤が供給されるまでに、確実に、動物に対する動脈へのカテーテル挿入等の処置を終えておく必要がある。特にマウスでは精密手術が必要であり、また血管壁が薄く脆弱であることから、血管に刺入するカテーテルは、十分に細く、且つ適切な弾力と柔軟性を兼ね備える必要がある。そこで市販品に対する改良を行い、手術用顕微鏡下に確実に挿入できる手技を確立する。

(2) 総出血量が 100μL 以下となる撮像プロトコルを開発する。採血に伴って発生する出血はできるだけ少ない方が良く、一方で血中放射能濃度曲線を正確に得るためにはある程度の回数の採血が必要となることから、実験を通して最適な採血プロトコルを検討する。60 分の PET 撮像で 100μL 以下の出血を目標とする。産学協同研究として開発し、商品化準備中の微量血漿中放射能濃度測定の自動化システムを利用したプロトコルを確立する。

(3) 正常マウスの脳ブドウ糖代謝を測定する。イソフルレン麻酔下、手術用顕微鏡下に正常マウスの大腿動脈にカテーテルを挿入する。小動物用 PET/CT 装置（FX3200, GMI)の寝台にマウスをイソフルレン麻酔下に固定する。^{18}F-FDG をボーラス静注し、直後から微量血漿中放射能濃度測定の自動化システムで経時的に採血を行う。採血ラインから途中で数回別に採血チューブに手採血を行い、平均血漿グルコース濃度を求める。また、自動化システムで得られた血漿中放射能濃度曲線の正当性を検証するため血漿中放射能濃度を測定する。ランプ定数は、マウスの値は報告されていないため、ラットの値を用いる

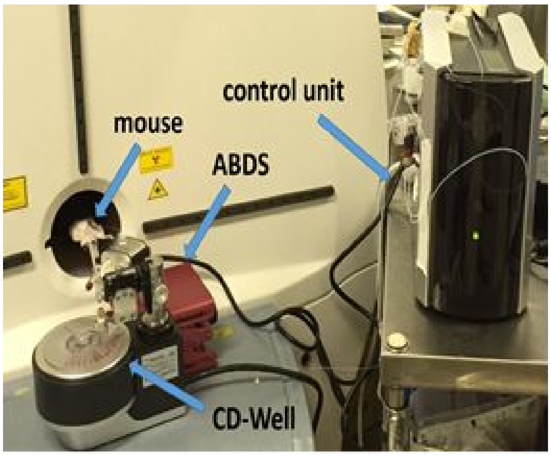
(Ackermann,J Cereb Blood Metab 9:774, 1989,Toyama, J Nucl Med 45:1398, 2004)。脳ブドウ糖代謝測定は Patlak Plot で算出する。数匹の正常マウスで実験を行い、実験手技を確立する。正常値を求め、過去の報告と比較し検証する。1 回目の実験後、大腿動脈に挿入したカテーテルをヘパリンロックし、皮下に植え込み数日後に 2 回目の実験を行い再現性の検討を行う。

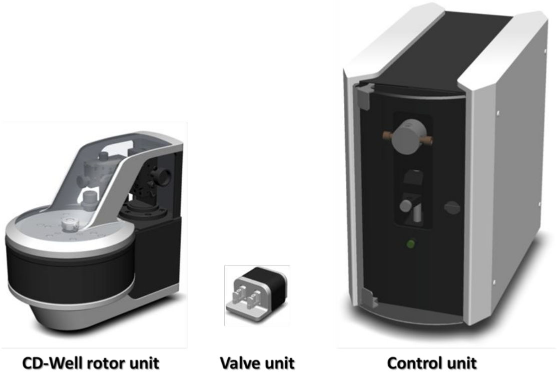
翌年度以降は、前年度に開発した動物実験系を用いて、PET 定量撮影を実施し、その結果を評価し、適宜改良を加える。提案する撮像手技を評価するため、共同研究者が作成した遺伝子改変マウス、ノックアウトマウスで実験する。一方、論文等での発表及び、インターネットを介しての配布を通して、当該分野への還元を図る。

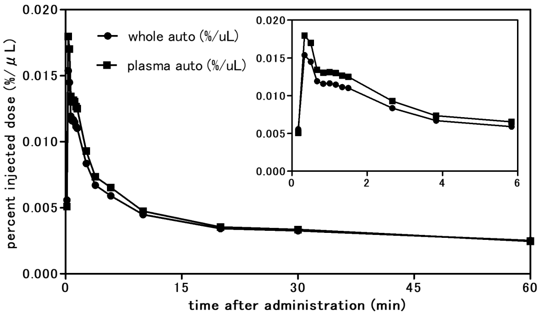
本研究組織及びその妥当性であるが、研究代表者が所属する放射線医学教室主任教授の外山は、2001 年～2003 年、NIH に留学中及び帰国後もマウス、ラットに対する定量 PET 撮像の経験が豊富であり、また、マウスに対する実験手技の開発も行ってきたことから、十分な指導を得られる。近畿大学生物理工学部教授（藤田保健衛生大学客員教授）木村は、2008 年度からの一連の小動物 PET に関する科研費の研究代表者を務め、微少採血血中放射能濃度曲線測定システムの開発を主導してきた。また、工学系研究者として PET 定量アルゴリズムの開発を進めていることから、動物実験のプロトコルの策定、定量データ解析を指導する

４．研究成果

小動物に対する PET 撮像で最大の障害となる、μL オーダーの血液に対する血漿分離及び放射能の測定は、共同研究者の木村が 2008 年度から 2010 年度まで実施した科研費・基盤(B)“微少採血系開発及び無採血化を含む PET によるマウス神経受容体定量画像手法の構築”において解決し(Kimura, Toyama ***et.al.***, Physics Med Biol 58:7889-7903,2013; 特許 8 件)、微量血漿中放射能濃度測定システム「μFmPC」(μ-Fluidic Micro Plasma Radioactivity Counting System)は島津製作所より製品化済みである (2013 年、超モノづくり部品大賞：健康・医療機貴器部品賞受賞、(http://www.an.shimadzu.co.jp/bio/clairvivo/index_mprc.htm)。また、2012 年度から 2014 年度にかけて実施中の科研費・基盤(C)“マウス PET 定量分子イメージングへの μL 自動採血・代謝物分析・雑音低減法の開発”において、採血の自動化、代謝物分析については一応の目処が付きつつある。被ばく線量の低減、実験に必要な人員の削減も可能な微量血漿中放射能濃度測定の自動化システムは島津製作所より製品化の目処が立っている。我々はこの自動化システムを ABDS(Automatic Blood Dispensing System)と命名した。以下の図に、ABDS(Automatic Blood Dispensing System)の概要を示す。







マウスの尾静脈より ^{18}F-FDG をボーラス静

注し、注射直後から 60 分後までの percent injected dose (%/μL)を ABDS を使用して測定した。上記グラフに、percent injected dose (%/μL)の time activity curve を示す。^{18}F-FDG 投与直後の測定でピークに達し、その後急激に減衰し、プラトーなグラフを示している。本研究で得られたマウスの脳ブドウ糖代謝は、過去に手採血法で測定された結果の範囲内であり、自動採血系の有用性が確立できたと考えられる。

マウスでは様々な遺伝子改変モデルや病態モデルが利用可能であることから、PET を用いた定量分子イメージングの、創薬や診断治療法開発への寄与が期待されている。しかし、マウスなどの小動物は対象が小さいことから、小動物 PET による生体の生理学的機能や疾患モデルの定量評価方法の確立が困難である。本研究で使用した自動採血系の有用性が確立され、多くの研究施設で実用化が進めば、診断治療法開発の更なる発展が期待できる。

本研究では、マウスの失血量が多いと、測定中に死亡し、最後まで実験が遂行できない個体が幾つか存在した。手技中の出血や自動採血系のトラブルなどで予期せぬ出血過多があるため、今後は出血量を少なくし、マウスの生理的変化に影響を及ばさない量に留める技術とプロトコルの改善が課題となる。

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）

〔学会発表〕（計 3 件）

(1) 竹中章倫、Quantification of CMRGlc of mice with fully automated arterial blood sampling system、SNMMI2016、2016 年 6 月 11 日～6 月 14 日

(2) 竹中章倫、Quantification of CMRGlc of mice with fully automated arterial blood sampling system、第56回日本核医学会学術総会、2016年11月3日～5日

(3) 竹中章倫、Quantification of CMRGlc of mice with fully automated arterial blood sampling system、第 12 回小動物インビボイメージング研究会、2016 年 7 月 30 日

６．研究組織

(1)研究代表者

竹中　章倫（takenaka akinori）
藤田保健衛生大学・医学部・助教
研究者番号：20748686

(2)研究分担者

（　　　）

研究者番号：

(3)連携研究者

（　　　）

研究者番号：

(4)研究協力者

外山　宏（toyama hiroshi）
藤田保健衛生大学・医学部・教授
研究者番号：90247643
木村　裕一（kimura yuichi）
近畿大学・生物理工学部・教授
研究者番号：60205002