

令和 4 年 6 月 17 日現在

機関番号：10101

研究種目：国際共同研究加速基金（国際共同研究強化(B））

研究期間：2018～2021

課題番号：18KK0304

研究課題名（和文）マルチファンクション電子・核磁気共鳴イメージング法の開発

研究課題名（英文）Development of multifunctional electron/nuclear magnetic resonance imaging

研究代表者

平田 拓（Hirata, Hiroshi）

北海道大学・情報科学研究所・教授

研究者番号：60250958

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,700,000円

研究成果の概要（和文）：本課題では、米国ウエストバージニア大学のKhramtsov教授グループと共に、核スピンおよび電子スピンの磁気共鳴分光技術を用いて生体組織の酸素分圧、細胞外pH、酸化還元状態を可視化するイメージング技術の進展に取り組んだ。具体的には、悪性腫瘍の生物学的情報を可視化することを目標に、核スピンおよび電子スピンによる個別のイメージング技術の開発を日本国内で進めた。開発したイメージング技術の検証実験を行い、開発したイメージング技術が実現可能性を有していることを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本課題の学術的意義は、悪性腫瘍の生物学的情報を多面的な方法を用いて可視化する技術を開発することにある。個別のイメージング技術で多種類の情報を同時に可視化することは一般的に困難であるため、電子スピンおよび核スピンによる複数のイメージング技術の開発に取り組んだ。また、悪性腫瘍を多面的に可視化できるイメージング技術は、悪性腫瘍とその治療に関連する研究に貢献することができる。そのため、日本国内で死亡原因の一位である悪性腫瘍の研究に、イメージング技術の面から貢献するところに社会的意義がある。

研究成果の概要（英文）：We aimed to develop multiple imaging techniques for the partial pressure of oxygen, extracellular pH, and reduction-oxidation (redox) status using magnetic resonance techniques. This program was conducted internationally with Prof. Valery V. Khramtsov at West Virginia University, WV, USA. In Japan, each imaging technique for electron spins and nuclear spins was developed to visualize malignant tumors' physiological parameters. The developed imaging techniques were tested and demonstrated in their feasibility studies.

研究分野：計測工学

キーワード：磁気共鳴イメージング 電子スピン 核スピン pH 酸素分圧 酸化還元状態

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

我が国において悪性新生物(がん)で死亡する人の数は年々増加しており、日本人の二人に一人はがんに罹患し、三人に一人はがんで死亡する(悪性新生物による死亡 37.3 万人、死亡総数に占める割合 28.5%、平成 28 年度人口動態統計、厚生労働省)。このような状況から、固形腫瘍を対象として、悪性腫瘍の生物学的状況を理解し、診断、治療に資するためにバイオイメージング技術が盛んに研究されている。また、病院では X 線トモグラフィ(CT)、磁気共鳴イメージング(MRI)、ポジトロン断層法(PET)、超音波 CT など、多様なイメージング手法が診断に使用されている。しかし、悪性腫瘍の生物学的なメカニズムに関連する機能的情報の可視化手法は限られており、新規な機能的情報の可視化技術の開発が求められている。特に、複数の機能的画像を得るマルチモーダルイメージングは多面的な計測により新しい知見を得られることから、バイオイメージング技術の今後進むべき方向と言える。

2. 研究の目的

本研究の目的は、複数の機能的イメージング法を融合したマルチファンクショナル電子・核磁気共鳴イメージング法を開発することである。具体的には、電子スピン共鳴(ESR or EPR)分光によるイメージングとオーバーハウザー効果を用いた MRI による pH、酸素分圧、酸化還元状態のイメージング法を融合した複数手法によるイメージング技術の開発を目指す。

3. 研究の方法

本研究課題では、複数のイメージング手法を取り扱うことから、統合イメージングの実現に先立ち、個別のイメージング技術を確立することが必要である。また、国際共同研究を推進する観点から、米国ウエストバージニア大学のグループと連携して、イメージング技術を開発することを目指した。

電子スピンによるイメージングの対象として、細胞外 pH、酸化還元状態(以下、レドックス状態)、酸素分圧の計測を目標とした。また、核スピンによるイメージングの対象として、pH、レドックス状態、酸素分圧の計測を目標とした。これらの計測対象を可視化するためのイメージング技術の開発および改良を行い、複数の計測対象を重ね合わせる統合イメージングの実現を目指した。

電子スピンおよび核スピンの機能的磁気共鳴イメージング(ESR イメージング、オーバーハウザー効果磁気共鳴イメージング OMRI)では、計測対象に感受性を持つ分子プローブの使用が必須である。各々のイメージング法と分子プローブの組合せが実際の計測において有効に機能することを示す必要があり、個別のイメージング法ごとに実現可能性を検証する実験が求められる。本成果報告書では、イメージング法毎に得られた成果を説明する。

4. 研究成果

(1) ESR による細胞外 pH イメージング

悪性腫瘍の細胞外 pH イメージングには、pH 感受性のニトロキシラジカルプローブ dR-SG を使用した。この分子プローブは 37°C での酸解離定数 pKa が 6.6 であり、悪性腫瘍の細胞外液が正常な pH の状態から酸性に傾くことを検出できる。また、この分子プローブは細胞膜を透過しないため、マウスの静脈に投与された dR-SG は細胞外に分布するため、細胞外の pH を反映した計測が実現できる。

750MHz ESR イメージング装置を用いて、様々な方向に印加された磁場勾配の下で、dR-SG の ESR スペクトルを取得し、そのスペクトルデータからコンピュータ上で画像を再構成した。また、各ボクセルのスペクトル情報から pH の情報を抽出し、それを三次元マップとすることにより細胞外 pH イメージングを実現した。この計測において、マウスに投与する dR-SG を低減することが課題の一つであった。先行研究では高濃度(150 mmol/L)の dR-SG を投与しており、イメージング装置の高感度化により dR-SG の投与量を低減できると予想した。ESR イメージング装置の高感度化には、マルチハーモニック検波法を用いる受信システムを構築し、検出感度の向上を実現した(図 1)。

マルチハーモニック検波法について説明する。通常の ESR 分光装置では、磁場変調と位相検波(ロックインアンプ)を用いて高感度に一次微分 ESR 吸収曲線を取得している。この位相検波方式では、磁場変調を行う周波数(基本波)の情報のみを受信している。一方、マルチハーモニック検波方式は、磁場変調の周波数(基本波)とその高調波を受信し、一次微分スペクトルを取得する方式である(図 1)。マルチハーモニック検波方式は、スペクトルの吸収線幅と比較して大きな磁場変調振幅を印加することが可能である。そのため、受信信号を増大させることに加え、複数の高調波に含まれる情報もスペクトル計測に利用するため、高感度化が実現できる。

dR-SG の ESR スペクトルを計測する検証では、従来の検出感度の 2 倍の感度を実現することに成功した。この感度向上は、冒頭で述べた課題(マウスへ投与する dR-SG の量を低減させる

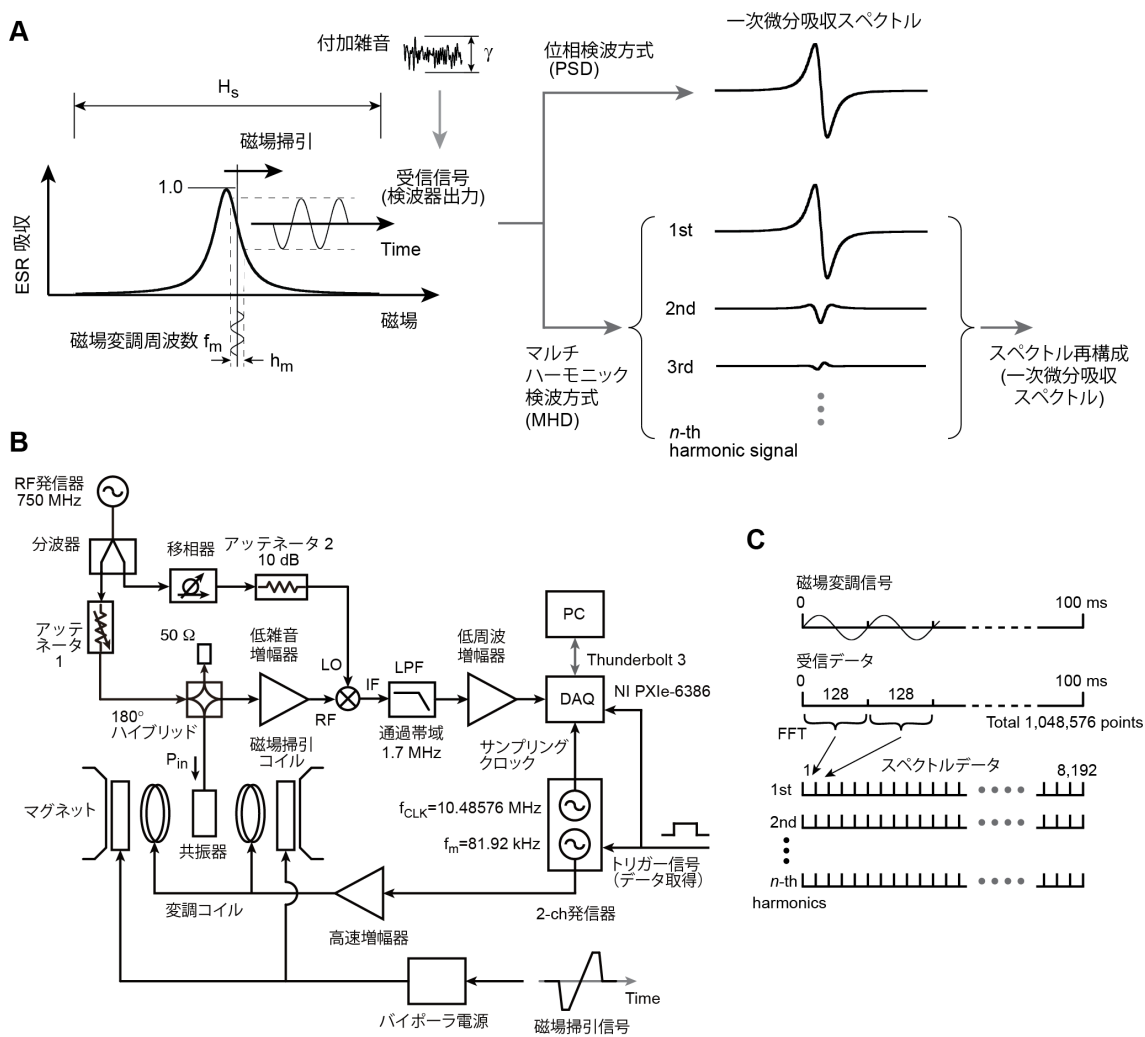


図 1 マルチハーモニック検波方式 (A) ESR 吸収曲線と磁場変調、(B) マルチハーモニック受信システムを組み込んだ ESR 分光装置のダイアグラム、(C) 受信信号のデジタル化と信号処理

こと) を解決することに貢献できる。マウス (BALB/c-nu/nu) に作製した腫瘍 (ヒト由来膀胱がん MIA PaCa-2) の細胞外 pH イメージングでは、先行研究よりも低濃度の 120 mmol/L の dR-SG 投与で pH イメージングを実現した。また、先行研究では約 1.0 cm³ の腫瘍体積での pH イメージングが報告されていたが、本研究では 0.4 から 0.5 cm³ の腫瘍体積での pH イメージングを達成した (図 2)。

(2) ESR による腫瘍組織のレドックスイメージング

腫瘍組織のレドックス状態は、正常組織と異なることが知られている。レドックス状態に感受性のあるニトロキシラジカルの ESR 信号消失速度を可視化することにより、腫瘍組織のレドックス状態をイメージングすることが可能である。このレドックスイメージングでは、信号消失よりも早いタイミングで複数回のイメージングを行い、各ピクセル (ボクセル) 毎に信号消

失速度を求め、それをマッピングすることによりレドックス状態を可視化した。このイメージングでは、一回のイメージングに必要な計測時間が課題となる。信号の消失が早い (レドックス感受性の高い) 分子プローブを使用する場合には、より短時間での画像取得が必要となる。この課

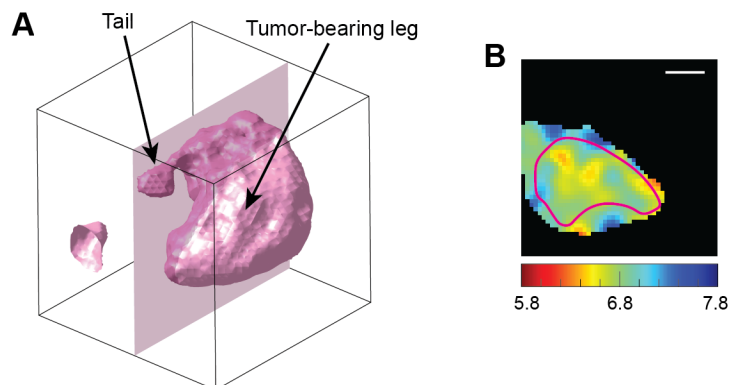


図 2 腫瘍モデルマウスの三次元細胞外 pH イメージング (A) マウス右後肢に作製した腫瘍のサーフェスレンダリング画像、(B) スライス面の細胞外 pH マップ、スケールバーは 5 mm。

題を解決するために、スパースモデリングの技術を用いて取得するデータ数を低減し、計測時間の短縮を行った。L₁ ノルムを正則化に用いる圧縮センシングのアプローチを用いて画像再構成を行なった。

従来は、三次元 ESR イメージングの計測時間が律速となっていたことから、生体内で比較的信号消失が遅いニトロキシラジカルが計測に使用されてきた。今回の研究では、レドックス感受性がより高いニトロキシラジカル **Tempone** を用いたレドックスイメージングに挑戦した。2分程度で信号が生体内で消失することから、従来は三次元イメージングが難しい分子プローブである。計測時間が短縮されたことから、**Tempone** の三次元イメージングを信号消失までに複数回実施することが可能になり、腫瘍モデルマウスのレドックスイメージングを **Tempone** により実現した (図 3)。

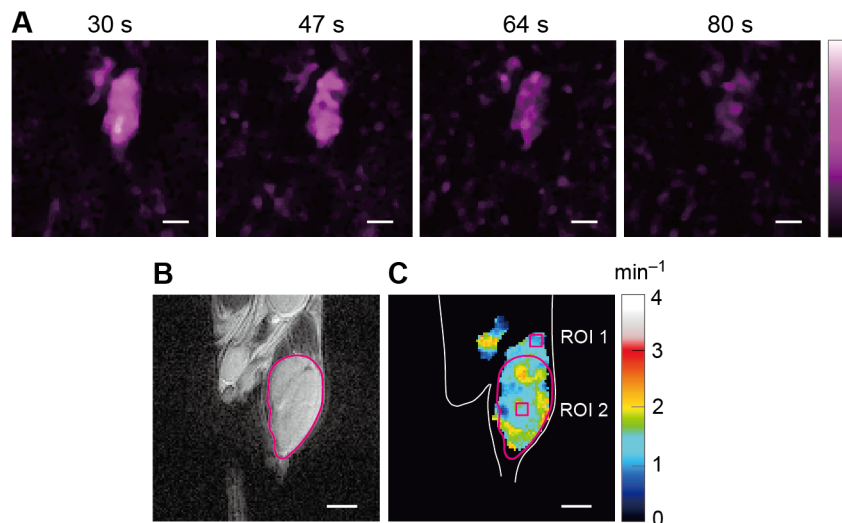


図 3 腫瘍モデルマウスのレドックスイメージング (A) ESR 信号マップの時間経過、(B) ¹H-MRI による腫瘍の形態画像 (T2 強調画像)、(C) レドックスマップ、スケールバーは 5 mm。

(3) ESR による酸素分圧イメージング

酸素分圧のイメージングでは、酸素感受性ラジカルプローブの緩和時間または線幅の変化を検出することで酸素分圧を測定する。事前に酸素分圧が制御された標準試料を用いて、酸素分圧とスペクトルの吸収線幅の検量線を取得しておき、得られたスペクトルの線幅から酸素分圧を測定する手法を採用した。腫瘍組織の酸素分圧が低下すると、放射線照射や抗がん剤の効果が低下することが知られており、腫瘍内の酸素状態を可視化することにより、患者ごとの治療計画の立案に役立つと考えられる。

酸素感受性分子プローブとして p₁TAM-D を用いて酸素分圧イメージングを行なった。この p₁TAM-D プローブは、米国ウエストバージニア大学の B. Driesschaert 博士から提供を受けた。四次元スペクトル空間イメージング法により、各ボクセルでの ESR スペクトルを再構成し、各ボクセルのスペクトル情報から酸素分圧の情報を抽出した。この実験は水溶液で行い、四次元スペクトル空間イメージング法を用いてどの程度の酸素分圧計測の精度が実現するかを検証した。

水溶液サンプルの酸素分圧イメージングでは、±5 mmHg (標準偏差) のバラツキを持つ計測結果が得られた。この分散の程度は、測定対象とする低酸素状態の腫瘍組織の酸素分圧 (10 mmHg またはそれ以下) と比較して大きいと、よりバラツキの少ない酸素分圧測定を実現する必要がある。

(4) OMRI による pH イメージング

共同研究先であるウエストバージニア大学では、OMRI 等の装置を利用し、様々な生体内情報を取得してきた。長崎国際大学グループでは、ウエストバージニア大学のグループと共に、主として OMRI を用いた pH 計測、レドックス、酸素分圧の各生体内情報の同時イメージングを可能にする機器及び計測手法の開発と最適化を行った。

ウエストバージニア大学が開発した pH 計測法では、pH 変化により、異なる 2 つの周波数での電磁波吸収量が変化することを利用して pH を算出する。この手法では、2 つの電磁波吸収ピークに応じた磁場の切り替えを行い、Q 値の低い共振器を利用することで 2 つの電磁波吸収ピークでの信号取得を達成した。しかし低 Q の共振器を利用しているため、pH 計測精度を高めるためには高 Q 化かつ複数の周波数で信号取得が可能な共振器による信号強度向上が必要であった。そこで、長崎国際大グループでは各電磁波吸収ピークに対応する共振周波数を自動切換えする機器を作製し、高い Q 値を有する共振器の開発を行った (図 4)。具体的には、周波数を可変できる共振器及び自動周波数スイッチ回路の開発、周波数をスイッチングしながら波数 (k) 空間を埋める撮像法により同時イメージングを可能にした。

周波数可変な共振器については、回路中にPINダイオードを用いたスイッチを導入することで、1台で複数の共振周波数を設定可能な共振器を実現した。なお、共振周波数差の可変幅は0.7 MHz ~ 5 MHz程度であり、pHイメージングだけではなく、他の生体内情報取得にも適用可能とした。

また、自動周波数切り替えのための回路について、OMRIコンソールから得るトリガー信号に応じたPINダイオードの動作、およびESR励起のための発振周波数の変更を可能にした。経時的な影響を抑制するために撮像時には、両pH計測に相当するk空間の1ラインごとにESR励起周波数を切り替えながらk空間を埋め、全データ取得後、データ処理により各ESR励起周波数で取得した画像を各々再構成する。図5に本手法により、異なる電磁波吸収ピークを持つ2種のラジカルを含む模擬試料を用いて同時イメージングを行なった結果を示す。図5に示した通り、周波数切り替えながら撮像した場合においても、ノイズの増加はあったものの、周波数切り替えずに撮像した場合と信号強度、画像位置ともほぼ同等の画像が取得可能であり、本手法の有効性が示された。

今後は、ウェストバージニア大学が開発した複数の生体情報が取得可能な分子プローブを用いて、生体(マウス)での本手法の有効性を検証する予定である。

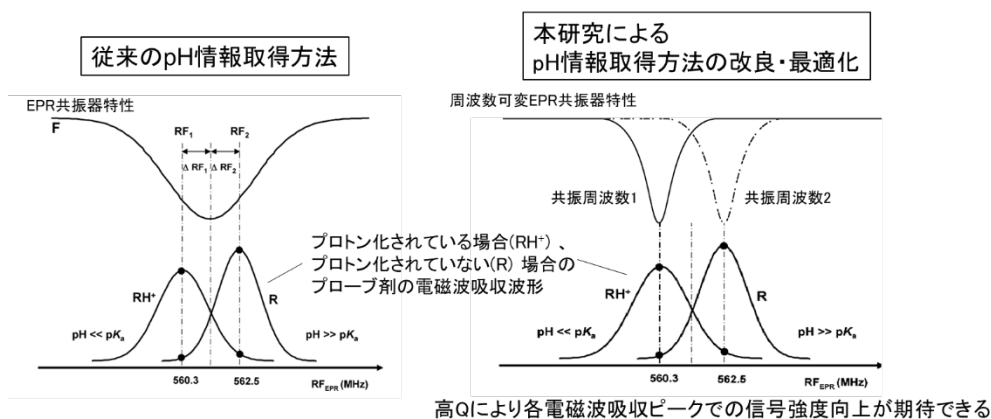
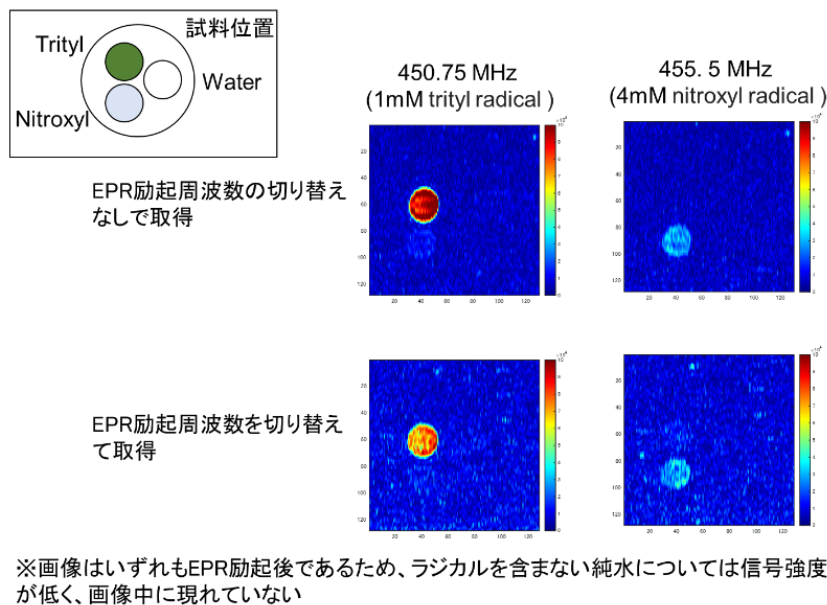


図4 従来のpH計測手法と本研究が提案するpH計測精度向上方法。異なる電磁波周波数で高いQ値を保持したまま測定を可能にする。



※画像はいずれもEPR励起後であるため、ラジカルを含まない純水については信号強度が低く、画像中に現れていない

図5 周波数切り替えによる同時イメージング結果 (ESR (EPR) 励起後)。トリチルラジカル、ニトロキシルラジカル、水が含まれるファントムを用いた。上はESR励起周波数を切り替えずに撮像、下は周波数を切り替えて撮像した結果である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kimura Kota, Iguchi Nami, Nakano Hitomi, Yasui Hironobu, Matsumoto Shingo, Inanami Osamu, Hirata Hiroshi	4. 巻 36
2. 論文標題 Redox-Sensitive Mapping of a Mouse Tumor Model Using Sparse Projection Sampling of Electron Paramagnetic Resonance	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Antioxidants and Redox Signaling	6. 最初と最後の頁 57 ~ 69
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1089/ars.2021.0003	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Taguchi Akihiro, DeVience Stephen, Driesschaert Benoit, Khramtsov Valery V., Hirata Hiroshi	4. 巻 145
2. 論文標題 In vitro simultaneous mapping of the partial pressure of oxygen, pH and inorganic phosphate using electron paramagnetic resonance	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Analyst	6. 最初と最後の頁 3236 ~ 3244
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/d0an00168f	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Hirata Hiroshi, Swartz Harold M.	4. 巻 53
2. 論文標題 RF/Microwave Resonators for Preclinical and Clinical EPR Applications: Current Status and Challenges	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Applied Magnetic Resonance	6. 最初と最後の頁 167 ~ 191
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00723-021-01413-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 4件/うち国際学会 7件）

1. 発表者名 木村洸太, 平田拓
2. 発表標題 圧縮センシングによる3次元CW-EPRイメージングの画像品質評価
3. 学会等名 第59回電子スピンサイエンス学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 中岡梨々子, 平田拓
2. 発表標題 マルチハーモニックデジタル位相検波法による750 MHz EPR分光装置の高感度化
3. 学会等名 第59回電子スピンサイエンス学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 H.Hirata
2. 発表標題 In vivo three-dimensional extracellular pH mapping of tumors using EPR
3. 学会等名 21st ISMAR - 15th EUROMAR Joint Conference (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 D. A. Komarov, Y. Ichikawa, K. Yamamoto, N. J. Stewart, S. Matsumoto, H. Yasui, I. A. Kirilyuk, V. V. Khramtsov, O. Inanami, H. Hirata
2. 発表標題 In vivo extracellular pH mapping of tumor mouse models using EPR
3. 学会等名 XI-th Conference of the European Federation of EPR groups (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 H. Hirata
2. 発表標題 Recent Progress in 3D Extracellular pH mapping of Tumors using EPR
3. 学会等名 International Conference Magnetic Resonance: Current state and future perspectives (EPR-75) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 榎本彩乃, 市川和洋
2. 発表標題 OMRI可視化範囲拡大のための多チャンネルEPR励起用コイルアレイの開発
3. 学会等名 第58回電子スピンサイエンス学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 R. Nakaoka, H. Hirata
2. 発表標題 EPR-based pH measurements using multiple harmonic detections
3. 学会等名 22nd International Society of Magnetic Resonance Conference (ISMAR) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 H. Hirata
2. 発表標題 Simultaneous mapping of the partial pressure of oxygen and pH using electron paramagnetic resonance
3. 学会等名 Modern Development of Magnetic Resonance 2021 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 A. Taguchi, S. DeVience, B. Driesschaert, V. V. Khramtsov, H. Hirata
2. 発表標題 Simultaneous mapping of the partial pressure of oxygen, pH and inorganic phosphate using electron paramagnetic resonance
3. 学会等名 22nd International Society of Magnetic Resonance Conference (ISMAR) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 A. Taguchi, S. DeVience, B. Driesschaert, V. V. Khramtsov, H. Hirata
2. 発表標題 Simultaneous mapping of the partial pressure of oxygen, pH and inorganic phosphate using electron paramagnetic resonance: in vitro experiments
3. 学会等名 International Society on Oxygen Transport to Tissue 2021 (ISOTT 2021) (国際学会)
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>The Catalyst https://medicine.hsc.wvu.edu/media/366018/catalyst-w2018s2019.pdf</p>
--

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	市川 和洋 (Ichikawa Kazuhiro) (10271115)	長崎国際大学・薬学部・教授 (37303)	
研究分担者	榎本 彩乃 (Enomoto Ayano) (30826186)	長崎国際大学・薬学部・講師 (37303)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
米国	West Virginia University			