

機関番号：32666

研究種目：基礎研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20590690

研究課題名(和文)

MRI装置を用いた死後画像診断におけるスペクトルデータの活用に関する基礎研究

研究課題名(英文)

Basic research on the use of postmortem MRI especially using spectroscopic data.

研究代表者

平川 慶子 (HIRAKAWA KEIKO)

日本医科大学・医学部・助教

研究者番号：30165162

研究成果の概要(和文)：MRI装置を用いた死後画像診断におけるスペクトルデータの活用に関する基礎研究を行なった。ラット死体の骨格筋および脳組織の死後早期の代謝物質の変化について、¹H NMR スペクトルデータをパターン認識した結果、死後経過時間の推定や死因の検索に有用な解析結果を得た。また、死体のMRI画像測定データを用いて、組織内の温度分布の時間変化を可視化することができた。

研究成果の概要(英文)：We studied on the use of postmortem MRI especially using spectroscopic data. Pattern recognition of spectra derived from ¹H NMR spectroscopy was used to investigate metabolic disturbances after death in the rat skeletal muscles and brain. NMR based metabolomic data may provide useful informations to estimate postmortem interval and to investigate the cause of death of the cadaver. Magnetic resonance imaging thermometry was newly introduced into measurement of temperature changes in cooling dead rats.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2009年度	900,000	270,000	1,170,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：法医学

科研費の分科・細目：社会医学・法医学

キーワード：MRI、死後画像診断、NMR スペクトル、メタボロミクス、死後経過時間、温度画像、核磁気共鳴法、死後硬直

1. 研究開始当初の背景

オートプシーイメージング(Ai)は、剖検とCT、MRIといった死後画像診断を併用することで、より詳細な死因解明をめざすものである。欧米で提唱されているバーチャルオートプシー(仮想剖検)は、剖検を行わずにマルチスライスのCTとMRIを組み合わせて3D画像を構築することにより死体に関するさまざまな情報を収集するのに対し、剖検施行前

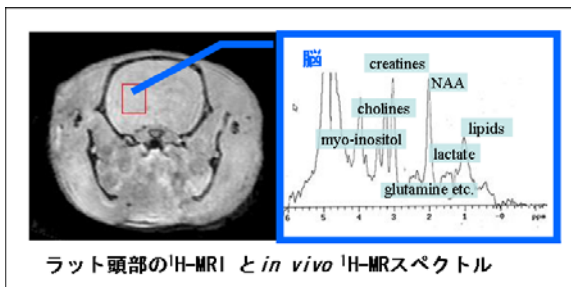
に画像診断を行う検査法であり、剖検所見と画像を対応させることで、死因のより精密な解明が可能となる。2000年に日本で提唱された新しい学問概念であるが、2004年には法医学、病理学、救急医学、放射線医学の研究者らによりオートプシー医学会が設立され、すでに「画像診断を使用した低侵襲剖検システム」も開発されている。

現在活用されている画像診断はCTがほと

んどであり、MRI および超音波診断法などは高い有用性が認められているが、死後変化の影響など、正しい読影を行うための基盤技術の確立に向けた研究が各分野で進められている段階にあり、発展途上である。

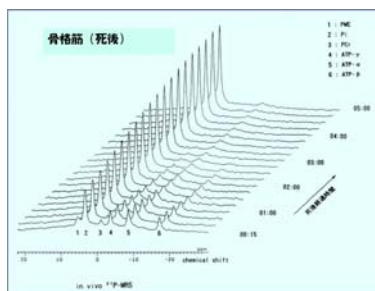
一般に行われている CT 中心の死後画像診断では形態学的な情報しか得られないのが難点とされており、2007 年の第 76 回日本法医学会関東地方会での Ai に関するシンポジウムでも複数の講演者が Ai の難点として指摘していた。

一方、MRI は化学物質や生体高分子の分子構造の解析に広く使われている NMR スペクトル法と原理を同じくする画像診断技術であり、さまざまなパラメータの組み合わせにより多彩な情報を得ることができる。MRI 装置を用いた *in vivo* MR スペクトル法 (MRS) により、生体から直接 NMR スペクトルを観測することも可能である。近年臨床用 MRI 装置の高磁場化とスペクトル解析技術の進歩により、MRI の画像上で選択した特定の領域に含まれる代謝産物の種類や量を直接観測できるようになったことから、新しいバイオマーカー物質の発見につながる新技術としても注目されている。すでに脳梗塞や脳腫瘍、乳癌や前立腺疾患などの分野では新しい診断技術としての臨床応用が進んでいる。



ラット頭部の¹H-MRI と *in vivo* ¹H-MRSスペクトル

平川は、NMR データから得られる豊富な情報に着目し、本技術を用いた早期死体現象の数値化に関する基礎研究を続けてきた。*in vivo* MRS 計測手法を用いた研究では、死体ラットの大腿部の ³¹P 連続計測を行い、骨格筋中に含まれるリン化合物の量的変化と死後経過時間に関連づけることができた (下図および *Advances in Legal Medicine* 3, 464-467 (1997) 参照)



また、平川、大野、小池らは、NMR 技術を医学領域で大いに活用しようと、新しい臨床応用をめざした研究を進めてきた。なかでも「NMR スペクトルデータを用いた病態解析」は主要な研究課題のひとつであり、疾患モデル動物の *in vivo* MRS 測定や、尿・血液などの体液や、脳・心臓・肝臓といった臓器試料の抽出物の高分解能 NMR 測定から得られるスペクトルデータ解析による代謝学的アプローチによる研究を推進してきた。

法医学領域では、摘出脳・骨格筋試料の ¹H NMR データによる検討を行った結果、スペクトル上で観測可能な数種の代謝物質のうち、アラニンや酢酸などの分析値が死後経過時間と高い相関関係を示すことを明らかにすることができた。これらの分析値を用いて死後経過時間の推定法の確立を目指したが、残念ながら正確な予測モデルを作成するにはいたらなかった。

平川は小池らと、パターン認識を用いたスペクトル解析手法である NMR メタボロミクスの救急医学領域における病態解析への応用に取り組み、世界でもオリジナリティーの高さが評価されたメタボロミクス用 NMR データ処理ソフトウェア「Alice2 for metabolome™」を開発し、製品化 (JEOL) に貢献した (The 46th Experimental Nuclear Magnetic Resonance Conference 2005, USA にて発表)。(メタボロミクスとは、ゲノミクス、トランスクリプトミクス (mRNA)、プロテオミクスと共にシステム生物学の中の重要な学問で、細胞・組織・血液・尿・等に含まれる代謝産物を包括的・網羅的に解析することにより、生体内での反応や制御システムを理解しようとするものである。) この結果、救急領域においては各種ショックモデルの病態評価に関して新しい知見が次々に得られるようになった。本研究では死体現象の数値化に関して、この技術を十分に活用し、MRI 装置を用いた *in vivo* MRS への応用というかたちでオートプシーイメージングにおけるスペクトルデータの活用として発展させたいと考えた。

2. 研究の目的

小動物を用いた死因モデル実験によって、以下の項目に関する基盤的な研究を行い、すべてのデータを活用できるデータマイニングシステムによる死亡時画像診断用 MRI システムの完成を最終目標とした。

- (1) MRS 測定データについて、死因、死後変化および死後経過時間との関連を明らかにする。
- (2) MRI 画像所見と MRS データの関連を明らかにする。
- (3) 剖検データと MRI および MRS データと

- の関連を明らかにする。
- (4) 各種分析データと MRI および MRS データとの関連を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 急死モデル動物の死体データの収集

Wistar ラット (体重 約 200g) 94 匹を、窒息 (100%N₂ ガスチャンパー内に放置)、コカイン投与 (塩酸コカイン 200 mg/kg i.p)、筋弛緩剤投与 (臭化パンクロニウム 1 mg/kg i.p) にて屠殺し、20°C チャンパー内に放置した。心拍停止確認後、15 分以内、30 分後、1 時間、2 時間、4 時間、8 時間、16 時間、24 時間、48 時間に以下の実験を行なった。

① 早期死体現象の観察

デジタル温度計によるチャンパー内温度と直腸温度の測定し、肉眼的に死後硬直の発現と緩解の有無を観察した。

② NMR メタボロミクスによる死体組織内成分の分析データと死因および死後経過時間との関連に関する検討

骨格筋、脳等の組織を採取し、液体窒素中で速やかに凍結、80°Cにて保存した。液体窒素中で凍結プレス破碎 (クライオプレス™ (マイクロテックニチオン製) 使用)、0.6N 冷過塩素酸を加えて攪拌し、遠心後の上清にロック用の重水と内部標準物質を添加したものを NMR 測定試料とした。FT-NMR 装置 ((GX-270WB および LA-300WB、JEOL)) にて、軽水信号抑制プログラムを用いて ¹H 測定を行った。1 検体あたり 128 回の積算を行なった。平川、小池らが開発した「Alice2 for metabolome™」(JEOL 製) にて NMR スペクトルデータをメタボロミクス用に加工、数値化した。Alice2 for metabolome™、ADMEWORKS / Modelbuilder™ (富士通九州システムエンジニアリング 製)、等の多変量解析用ソフトウェアを用いて、パターン認識によるデータの特徴抽出、可視化、モデル化などを行なった。解析結果から、死因実験群の NMR データと死因、死後経過時間との関連づけを行ない、k-NN 法、SVM 法を用いて死体組織の NMR データによる死後経過時間推定の可否に関する検討も行なった。本研究の目的を達成するために、混合物の NMR データの数値化およびパターン認識手法を最適化するべく検討および改良を行なった。

(2) 実験用 MRI 装置による各種死体現象データの収集

S-D ラット (体重 約 200g) をイソフルレンにて麻酔、実験用 MRI 研究施設の小動物用 MRI 装置 (7T、ボア内径 210mm、UNITY INOVA (バリアン社製)) を用いて、麻酔時、過麻酔による安楽死 (心拍停止確認) 後、

頭部、腹部について以下の測定を行った。



³¹P MRS 測定には頭部および大腿部測定用に作成した専用のサーフェイスコイルを使用した。本格的なデータ収集に入る前に、基礎的な測定条件の確立を行った。本研究に最適化した測定パラメータを設定するなどの MRI 測定技術に関しては、研究協力者栗林秀人 (バリアン社) に協力を依頼した。計測データはすべて装置付属のデータ処理システムに保存し、ファイル形式の変換などを行った後 PC に出力した。温度画像の算出および可視化については、栗林氏が作成した PC 用プログラム (matlab™、mathworks にて稼働) を使用した。

① ¹H MRI 撮像

T1 および T2 計算画像・拡散強調画像上の信号強度の変化の観察と温度画像計測に関する基礎的検討

② ¹H in vivo MRS 測定

脳および骨格筋の組織内代謝産物の測定

③ ³¹P in vivo MRS 測定

脳および骨格筋のエネルギー代謝・リン脂質代謝関連物質の測定

4. 研究成果

(1) 急死モデル動物の死体データの収集

① 早期死体現象の観察

ラットは小動物であるために、いずれの屠殺条件においても冷却が早く、直腸温は死後すみやかに降下し始め、心停止確認後 30 分程度で環境温である 20°C 付近で一定の値となった。

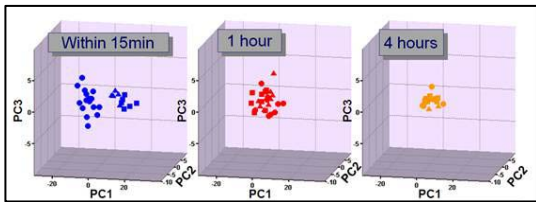
死後硬直の発現の開始時間、強さについては、屠殺条件による相違が認められた。

いずれの条件でも、死後硬直の強さは心停止確認後 4 時間で最大となり、8 時間以降緩解した。(下記表参照)

屠殺条件	生存時間 (分)	運動量	痙攣	死後硬直	
				発現時期	硬直の強さ
窒息	3	+++	-	早い	+++
コカイン投与	4-11	+++	+++	早い	++++
筋弛緩剤投与	1.5-4	-	-	遅い	±

② NMR メタボロミクスによる死体組織内成分の分析データと死因および死後経過時間との関連に関する検討

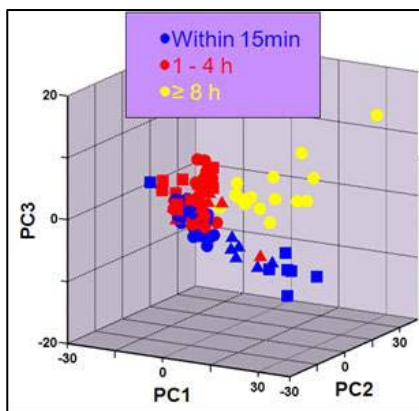
骨格筋抽出物については、主成分分析 (PCA) の結果、心停止 15 分以内でのデータ群では、score plot 上で屠殺条件の違いによる明らかなクラスター化が視覚的に観察された。時間の経過に伴って屠殺条件による score の差は小さくなり、4 時間後では屠殺条件を特徴づける代謝像を抽出することは困難であった (下図参照)。



●窒息 ▲コカイン ■筋弛緩剤
主成分分析の結果 (score plot)

また、窒息のみのデータでは、死後 1 時間以内、4~8 時間後、16~24 時間後および 48 時間のデータ群でそれぞれクラスター化が認められ、死後硬直発現開始前、死後硬直発現期および緩解期から腐敗開始に至るまでの骨格筋の死後変化を特徴づける代謝像を抽出することができた。

以上の結果をふまえ、すべての屠殺条件のデータを心停止確認後 15 分以内、1~4 時間、8 時間以降にグループ分けし、主成分分析によるマッピングを行なったところ、各グループは主成分 1 (pc1)、主成分 2 (pc2)、主成分 3 (pc3) による score plot 上でクラスター化して分布した。(下図)



主成分分析の結果 (score plot)

k-NN 法および SVM 法を用いて本データを用いた死後経過時間の推定モデルに関する検討を行なった結果も良好であった。(下表)

死後経過時間	ラット (匹数)	Wrong		% Correct	
		k-NN	SVN	k-NN	SVM
15 分以内	31	9	1	70.97	96.77
1-4 時間	46	2	2	95.65	95.50
8 時間以上	17	4	0	76.47	100.00
計	94	15	3	84.04	96.81

k-NN; K = 5

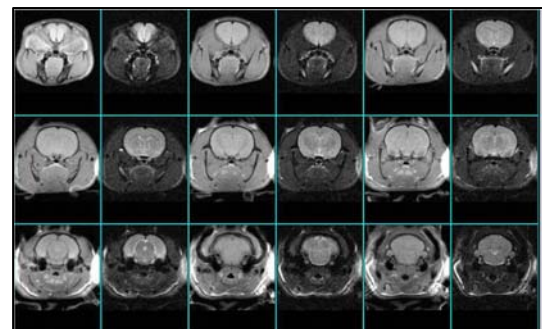
脳抽出物については、主成分分析 (PCA) の結果、今回の屠殺条件では、脳組織に関しては、同一の死後経過時間で死因を特徴づけるような score の違いは観察されなかった。同一死因 (窒息) では、心停止後 15 分以内、1 時間後、4~16 時間後、24 時間および 48 時間後のデータ群でクラスター化が認められ、死後経過時間にもなう組織の死後変化を特徴づける代謝像を抽出することが可能であった。

以上の結果から、死体組織中の代謝物を NMR メタボローム解析法によって網羅的に分析することにより、死後経過時間をより客観的に推定しうる可能性が示された。

(2) 実験用 MRI 装置による各種死体現象データの収集

①¹H MRI 撮像

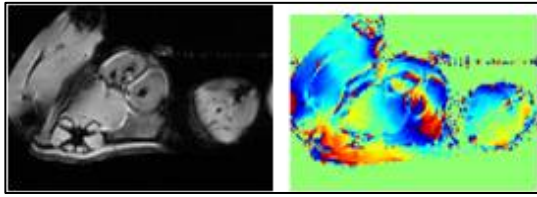
volume coil を用いて、頭部、腹部について、麻酔時、心停止確認後、経時的に T1 強調像、T2 強調像、拡散強調像の計測を行なった。データは収集したが、残念ながら、本研究期間中に詳細な解析を行うには至らなかった。



ラット頭部の MRI (プロトン密度画像)

栗林考案による温度画像計測を行なったところ、心停止後の腹部組織内の温度分

布の時間変化を可視化することができた。
(下図右)



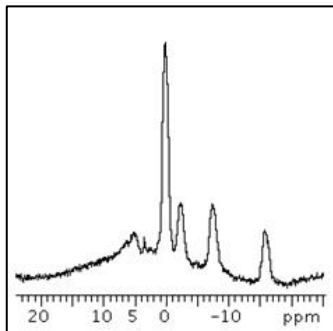
ラット腹部のMRIと温度計算画像

②¹H in vivo MRS 測定

脳および骨格筋の組織内代謝産物の測定をめざしたが、volume coilによる測定では、狭い領域では、乳酸、NAA等のピークは確認できたが、十分な分解能およびS/N比を得られることができなかった。今後surface coilを用いた測定による検討を行う予定である。

③³¹P in vivo MRS 測定

麻酔時、安楽死直後の脳および骨格筋について測定を行なったところ、ATP、クレアチンリン酸(PCr)といったエネルギー代謝関連化合物について、感度、S/N比よくデータ収集することができた(下図)。今後、本研究で使用した測定条件を用いてデータ蓄積を行う予定である。



ラット骨格筋の in vivo ³¹P MRS

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計2件)

- ① Kawaguchi H, Hirakawa K, Miyauchi K, Koike K, Ohno Y and Sakamoto A, Pattern Recognition Analysis of Proton Nuclear Magnetic Resonance Spectra of Brain Tissue Extracts from Rats Anesthetized with Propofol or Isoflurane, PLoS ONE, 査読有、5(6)、2010、e11172

- ② Keiko Hirakawa, Kaoru Koike, Kyoko Uekusa, Makoto Nihira, Kohtaro Yuta, Youkichi Ohno, Experimental estimation of postmortem interval using multivariate analysis of proton NMR metabolomic data, Legal Medicine, 査読有、11、2009、S282-S285

[学会発表] (計9件)

- ① 平川慶子、核磁気共鳴技術を用いた新しい医学検査と診断技法の開発、イノベーション・ジャパン2010、2010.10、東京
- ② 宮内健佑、NMRメタボロミクスを用いた麻酔薬のラット脳における作用、第17回日本静脈麻酔学会、2010.10、弘前
- ③ K Nakata, PATTERN RECOGNITION USING ¹H-NMR OF THE INTESTINAL EPITHELIAL CELL (IEC-6) UNDER OXIDATIVE STRESS, 33rd Annual Conference on Shock (session:P1)、2010.6、Portland
- ④ 金涌佳雅、MRIを用いた死体内温度分布の実験的連続撮像、第94次日本法医学会学術全国集会、2010.6、東京
- ⑤ 平川慶子、NMRメタボロミクスを用いた疾患解明システム-臨床応用をめざして、第9回バイオテクノロジー国際会議、2010.6、東京
- ⑥ H. Kuribayashi、The Use of MR Thermometry in Legal Medicine: A Feasibility Study utilizing Rat Rectal Temperature.、ISMIRM-ESMRMB Joint Annual Meeting、2010.5、Stockholm
- ⑦ 平川慶子、高磁場環境対応の高性能非磁性薬液注入装置の開発、第48回NMR討論会、2009.11、福岡市
- ⑧ 平川慶子、Experimental trial of the estimation of postmortem interval using multivariate analysis of proton NMR based metabolomic data.、7th International Symposium ADVANCES IN LEGAL MEDICINE、2008年9月3日、Osaka
- ⑨ 栗林秀人、Rectal temperature measurement in cooling dead rats using MR thermometry、7th International Symposium ADVANCES IN LEGAL MEDICINE、2008年9月3日、Osaka

[産業財産権]

○出願状況 (計1件)

名称：薬液注入装置

発明者：大野曜吉、平川慶子、増野智彦、佐藤格夫、森川秀行、村木秀樹

権利者：学校法人日本医科大学、(株)ユニフローズ

種類：特許

番号：特願2009-143488
出願年月日：2009年6月16日
国内外の別：国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

平川 慶子 (HIRAKAWA KEIKO)
日本医科大学・医学部・助教
研究者番号：30165162

(2) 研究分担者

小池 薫 (KOIKE KAORU)
京都大学・医学研究科・教授
研究者番号：10267164

(3) 連携研究者

大野 曜吉 (OHNO YOUKICHI)
日本医科大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号：70152220
(H20 研究分担者→H21 連携研究者)

崔 范来 (SAI HANRAI)
日本医科大学・医学部・助教
研究者番号：60424751
(H20 研究分担者→H21 連携研究者)

金涌 佳雅 (KANAWAKU YOSHIMASA)
防衛医科大学校・医教育学部医学科専門課程・助教
研究者番号：80465343
(H20 研究分担者→H21 連携研究者)

佐藤 格夫 (SATO NORIO)
日本医科大学・医学部・助教
研究者番号：30409205
(H20 研究分担者→H21 連携研究者)

増野智彦 (MASUNO TOMOHIKO)
日本医科大学・医学部・助教
研究者番号：00318528
(H20 研究分担者→H21 連携研究者)

(4) 研究協力者

栗林秀人 (KURIBAYASHI HIDETO)
アジレント・テクノロジー株式会社
ライフサイエンス部門
リサーチプロダクト営業部
MRI アプリケーションエンジニア