

機関番号：16101

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008 ~ 2010

課題番号：20591445

研究課題名 (和文) 高磁場 MR 装置を用いた炭素同位体測定による新たな臨床評価指標の確立

研究課題名 (英文) Evaluation of new clinical biomarkers of carbon isotope using high field MR equipment.

研究代表者

久保 均 (KUBO HITOSHI)

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・准教授

研究者番号：00325292

研究成果の概要 (和文)：本研究課題では、炭素同位体を用いた MR 診断における新たな臨床評価指標の確立を目指した。基礎的な検討として、600MHz NMR 装置および超変極装置を用いることにより、がん細胞における炭素化合物の代謝を測定した。また、臨床応用への一歩として臨床用 3T MR 装置で使用できる炭素、水素用の表面コイルの作成と評価を行った。新たな臨床指標の確立には至らなかったが、炭素化合物の特性および臨床機における炭素測定の特性を解析することができた。

研究成果の概要 (英文)：In this project, new clinical biomarkers of carbon isotope using high field MR equipment had been evaluated. We evaluated metabolism of some carbon compounds on cancer cell using 600MHz NMR equipment with hyperpolarizer as basic study. A new $1H-13C$ surface coil for clinical MR equipment had been made and evaluated as for preparation of clinical study. Analyses of the properties of carbon isotope and the measurement of carbon isotope using clinical MR equipment had been succeeded.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2009 年度	800,000	240,000	1,040,000
2010 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：磁気共鳴医学

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：磁気共鳴医学，代謝物，炭素同位体，超変極

1. 研究開始当初の背景

近年の画像診断における MR 検査の有用性は衆目の認めるところであるが、3T(tesla)の臨床用 MR 装置の普及により、より高い空間分解能の画像や様々なコントラスト画像を用いた画像診断が可能となってきた。一方、分子生物学的発想による組織や細胞レベルでの生体内における代謝・機能に関する分子画像的情報の非侵襲的取得法の研究も

進んでおり、超高磁場 MR 装置を用いた研究が有力な一手法として注目され研究が始まっている。これら代謝・機能情報の取得に、従来から用いられているプロトンのみでなくリンや炭素などの安定同位体を対象にすることで、プロトンでは得られない代謝過程の動態情報を可視化することが可能となる。

炭素同位体 ($13C$) を用いた標識化合物は $12C$ と同等の生化学的性質を有し、非常に安

定かつ安全である。また、これを用いたトレーサ法では標識化合物がクエン酸回路などの代謝経路に直接入って回転するため、代謝速度や代謝回路の状態を直接観察することができる。13C 標識化合物は数多くの種類が比較的容易に入手でき、それらの代謝についてはこれまでの生化学的な検討で明らかになっているものも多い。神経系では神経細胞とグリア細胞の間で神経伝達物質であるグルタミン酸の合成および分解回路が存在するが、これらを 13C グルコースおよび 13C 酢酸同時投与による神経細胞およびグリア細胞での代謝回路の活性評価より間接的評価が可能と考える。

特に、近年では自然存在比がプロトンの 1.1% に過ぎないために非常に感度の悪い炭素同位体 (13C) を超偏極することにより、通常の 10,000 倍にも上る感度を得ることができる手法について研究が進んでいる。これにより、スペクトルの変化のみならず *in vivo* での 13C の代謝画像 (13C-MRI) を得ることが可能となってきた。現在、本法について様々な手法が動物実験によって試みられているほか、一部では臨床への応用が始まっている (Kohler et al. MRM. 58, p65-69, 2007)。

このような 13C を用いた手法は、従来から用いられている核医学での PET (positron emission computed tomography) を用いた方法に比して、1) 被曝の心配がない、2) 核医学ほど大規模な施設が必要ない、などの利点があるが、何より 3) 動的な解析により代謝速度や代謝回路の評価が容易に行え、4) 高精細な解剖学的情報も同時に得ることができることが最も大きな利点となる。

2. 研究の目的

本研究の目的は高磁場 MR 装置を用いることにより、特に炭素同位体 (13C) 測定における更なる高感度化、高精度化手法を開発し、13C 標識化合物によるトレーサ法による動的代謝解析手法を開発し臨床応用するとともに、超偏極 13C による *in vivo* MRI を臨床応用するために必須な新たな臨床評価指標の確立を目指す、ものである。

3. 研究の方法

本研究においては、基礎的な検討として様々な炭素化合物を超偏極させた際の T1 緩和時間を測定するとともに、グルコース有およびグルコースなしで培養したがん細胞に抗がん剤である 5FU を投与したものと投与しない群に分け、代謝状態の変化を NMR 装置で測定した。使用 NMR 装置は 600MHz の DRX600

(Bruker) であり、超偏極には Hypersense (Oxford) を用いた。超偏極を行った炭素化合物の T1 値の変化を測定するため、1-13C-Pyruvate, 1-13C-Glycine, 1-13C-Acetate, 1-13C-Glutamate, 1-13C-Glucose を用いた。

また、生体内での代謝変化を可視化するための予備実験として、*in vitro* における細胞での代謝測定を行った。使用したがん細胞は、C3H マウス由来の FM3Amammary carcinoma である。がん細胞は RPMI1640 培地を用いて 48 時間培養したが、その際にグルコースのない培地も作成してその有無による代謝の違いを比較した。また、培養時に抗がん剤である 5FU を投与したものと、対照群として Uracil を投与したものも作成し、1-13C-pyruvate を投与して NMR スペクトルを測定し、その変化を観察した。

臨床応用のための準備として、臨床用 MR 装置で使用できる 1H-13C 表面コイルの製作とその評価を行った。使用 MR 装置は GEHC 社製 SIGNA 3T HDx である。表面コイル製作のための材質として、様々な樹脂およびスポンジ材料を対象に 13C スペクトルを得、アーチファクトとなるようなピーク信号を持たないか測定した。また、製作したコイルの安全性を確認するため、RF 負荷時の温度上昇試験も行った。

4. 研究成果

超偏極した種々の炭素化合物の T1 値を測定した結果、以下ようになった。
1-13C-Pyruvate = 51.5 ± 0.8sec,
1-13C-Glycine = 42.9 ± 0.5sec,
1-13C-Acetate = 51.5 ± 1.3sec,
1-13C-Glutamate = 17.6 ± 0.1sec,
1-13C-Glucose < 2sec. 特にグルコースは T1 値が非常に短く、超偏極の対象にはなりにくいことが示されるとともに、1-13C-Pyruvate や Acetate が良い対象になることが示唆された。

これらの結果を基に、本研究では 1-13C-Pyruvate を用いることとし、培養したがん細胞へ投与してそのスペクトルを観察した。その結果を図 1 (a) - (d) に示す。

また、求めた速度定数の比 kP/kL を図 2 に、細胞の生存率を図 3 に、別に測定した LDH 活性度を図 4 に示す。

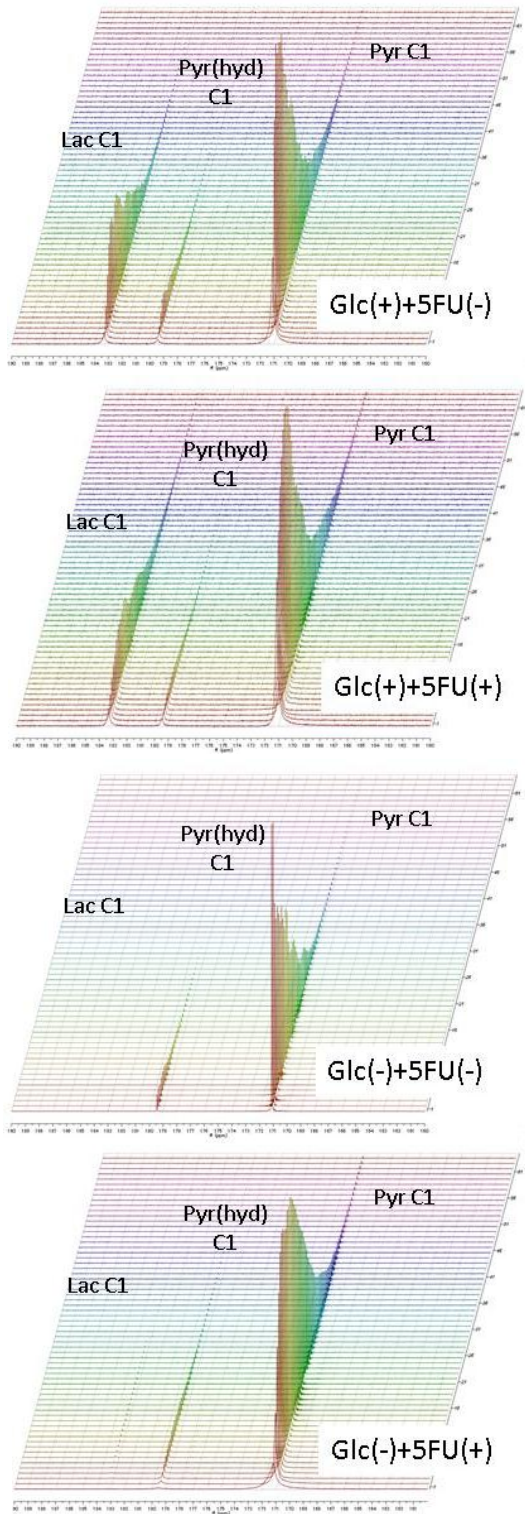


図1 (a)-(d) : 1-13C-Pyruvate 投与時の観測スペクトル ; (a)Glc(+)+5FU(-), (b)Glc(+)+5FU(+), (c)Glc(-)+5FU(-), (d)Glc(-)+5FU(+).

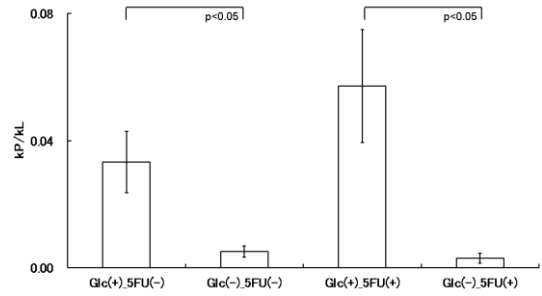


図2 : 各条件における kP/kL.

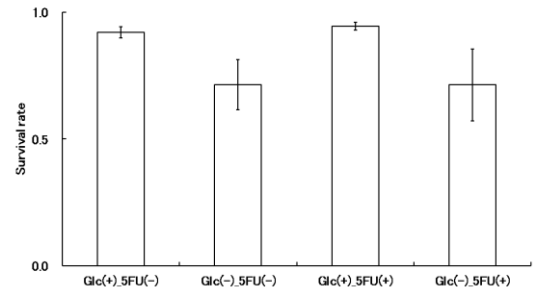


図3 : 各条件における細胞の生存率.

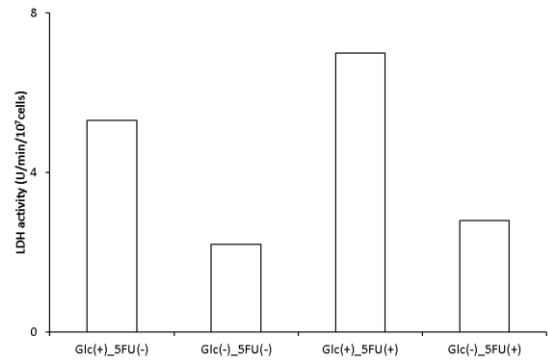


図4 : 各条件における LDH 活性度.

これらの結果より、1-13C-Pyruvate を投与することにより 1-13C-Lactate への代謝が生じ、それらを観測できることが明らかになった。また、Glc(+)の場合は(-)に比して Lac C1 が強く観測されることが示された。これらの速度定数を Day ら(Nature Medicine, 2007) の理論式を元に算出すると、5FU 投与群は非投与群に比してほとんど差がないこと、および Glc(-)で培養されたものは Glc(+)に比して Lactate の速度定数が非常に長いことが示された。また、kP/kL は LDH 活性度と同様の傾向を示し、Glc(-)の時に Glc(+)に比して有意に低下し、これらは細胞生存率に依らなかったことがわかった。これらの結果は、炭素化合物を用いた代謝状態の可視化の可能性を示唆するものであると考えられた。

臨床機で行う 13C 高感度測定法開発の一環として、臨床用 3T MR で使用可能な 1H-13C

表面コイルの製作を行った。従来使用していたコイルは、深部まで十分な感度を維持することが困難であったため、本コイルでは 1H および 13C 用のそれぞれのエレメント径を大きくすることにより、より深部における感度向上を図った。また、1H 用エレメントを 8 の字型に配置することにより、1H と 13C の磁氣的結合を物理形状で切断することによりデカップラー使用時の性能向上が可能となった。製作に必要なケース用材質選定のために、樹脂材料やスポンジ材料等で評価実験を行った結果、樹脂材料では 13C 測定においていくつかのピーク信号が見られ、アーチファクトとなることがわかった。そこで、13C 測定において不要信号を出さない材質としてスポンジ材料を選定するべきであると結論づけた。また、これに防水処理のためのディッピング塗装を行う必要があるため、強度・加工の容易さも含めて勘案して一つの材料を選択し、コイルを作製した。本コイルの完成により、従前よりより深い位置まで感度域を持ち、かつ高感度な 13C 測定が可能となった。また、RF 負荷時のコイル温度上昇試験も行ったが、エレメントや給電点での温度上昇なども見られず、一般的な使用においては十分に安全性が担保されることが示された。本成果により、臨床評価指標の確立に向けた基盤が整備された。

これらの研究成果により、炭素同位体を用いた生体機能の可視化が臨床現場でも行うことができる可能性を示すことができ、診断精度の高度化やより早期の疾患発見、分子イメージング技術への応用など多岐にわたる将来性があることが示唆された。

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 3 件)

- ① Harada M, Kubo H, Abe T, Maezawa H, Otsuka H. Selection of endogenous 13C substrates for observation of intracellular metabolism using the dynamic nuclear polarization technique. Jpn J Radiol. 28(2), 173-9, 2010. 査読有り
- ② 久保均, 原田雅史, 前澤博, 阿部孝政, 13C-NMR 測定による代謝情報可視化の試み, 放射線生物研究, 44(4), 447-459, 2010.

査読有り

- ③ 久保均, 原田雅史, 阿部孝政, 西谷弘, 基礎から臨床へ, MR を用いた代謝機能可視化の最前線, 四国医学雑誌. 64(5,6), 170-174, 2008. 査読有り

[学会発表] (計 3 件)

- ① 久保均, 原田雅史, 阿部孝政, 前澤博, 超偏極 13C ビルビン酸を用いた乳がん細胞における乳酸脱水素酵素活性度の評価, 第 38 回日本磁気共鳴医学会大会 (つくば), 2010. 9.30~10.2
- ② 久保均, 原田雅史, 西谷弘, MRS を用いた代謝機能の定量評価と画像化, 日本機械学会第 22 回バイオエンジニアリング講演会 (岡山), 2010. 1.9~1.10
- ③ 久保均, 原田雅史, 阿部孝政, 前澤博, 西谷弘, 超偏極 13C ビルビン酸を用いた 5FU による乳がん細胞での代謝変化の検出, 第 37 回日本磁気共鳴医学会大会 (横浜), 2009. 10.1~10.3

6. 研究組織

(1) 研究代表者

久保 均 (KUBO HITOSHI)

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス
研究部・准教授

研究者番号：00325292

(2) 研究分担者

原田 雅史 (HARADA MASAFUMI)

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス
研究部・教授

研究者番号：20228654

(3) 連携研究者

()

研究者番号：