

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 21 日現在

機関番号：21601

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23602009

研究課題名(和文) マルチモーダルイメージングによる小動物生体機能定量評価システムの開発

研究課題名(英文) Development of quantitative functional evaluation system for small animals using multi-modal imaging system

研究代表者

久保 均 (Kubo, Hitoshi)

福島県立医科大学・公私立大学の部局等・准教授

研究者番号：00325292

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではマルチモーダルマウス無麻酔測定用固定装置を開発し、蛍光イメージングと陽電子放出断層撮影(PET)を行って麻酔によるトレーサーの動態変化を評価した。固定装置は、マウス頭蓋骨に固定する固定用プレートおよび固定用フォルダで構成した。

開発した固定装置を用い、PETと蛍光イメージングでグルコースアナログの動態変化をマウスで評価した。その結果、無麻酔時に比して麻酔時は脳における取り込みが減少し、その変化は蛍光イメージングの方が大きかった。これは、脳血流の変化やトレーサーの違い等が原因と考えられた。イメージングデバイスにより麻酔の影響の現れ方が異なるため、評価の際に十分留意すべきである。

研究成果の概要(英文)：Mouse fixation device for multi-modal imaging with no anesthesia was developed in this study. Fixation device was made with fixation plate using acrylic board and fixation folder using 50ml centrifuge tube. The changes of kinetics of glucose analogue tracer in vivo with and without anesthesia were evaluated using fluorescent imaging (FLI) and positron emission tomography (PET) with this fixation device.

The uptake of the tracer in the brain measured with anesthesia was decreased in compared with non anesthesia and the decrease rate in FLI was higher than that in PET. It was thought that the reasons of it were the changes of cerebral blood flow and the differences of the tracers. It should be attention that a change may be occurred if the imaging device is changed for the imaging without anesthesia.

研究分野：時限

科研費の分科・細目：医学物理学・放射線技術学

キーワード：分子イメージング 陽電子放出断層撮影 光イメージング 無麻酔 小動物イメージング

1. 研究開始当初の背景

近年、生体における様々な分子の機能を生きたまま可視化および評価する分子イメージング技術の開発が進んできており、本邦においても装置の普及が始まったところである。研究開始当初、徳島大学に分子イメージング研究ができる動物用 MRI (7T)、動物用 PET/CT、動物用マイクロ CT および蛍光発光イメージング装置などが設置され、特にマウスやラットなどの小動物を対象としたマルチモーダルイメージングが可能な環境が整備された。この環境は本邦の中でも未だに有数なものであるが、それだけにそれぞれのモダリティを融合した精度の高い定量画像を取得し解析する技術の開発は未だ進んでおらず、臨床で用いられている解析技術を転用・応用しているところである。そのため、ヒトに比して圧倒的に小さい動物を扱うためのノウハウの蓄積は少なく、特にマルチモーダルイメージングを精度良く行うための技術開発が必要であった。

2. 研究の目的

本研究では、マルチモーダルインビボ分子イメージング研究を行う上で必要な各モダリティにおける高精度生体機能定量画像構築技術の開発を行い、各モダリティの画像を融合化して多次的に評価する技術の開発を行うとともに、小動物の研究で最も問題となる麻酔の影響を排除できる無麻酔測定法の開発およびそれに必要な固定具の開発を行い、真の前臨床あるいはトランスレーショナルリサーチが行える実験系の構築を目指した。

なお、研究期間内に研究者が所属を変更したため、本報告書においては両所属先における事項についてまとめて記載する。現所属である福島県立医科大学にも、動物用 MRI、動物用 PET/SPECT/CT、動物用マイクロ CT、蛍光発光イメージングシステムなど多種のイメージングデバイスが設置されている。そのため、本研究課題は、問題なく継続することが可能であった。

3. 研究の方法

本研究では、(1) 各モダリティにおける定量測定技術の確認を行い定量性を確保した後に、(2) 無麻酔測定に必要な固定具の開発を行い、(3) 固定具を用いた麻酔薬の影響について評価した。

使用装置は、X線 CT および PET 測定に関しては小動物用 PET/SPECT/CT 装置 (Inveon PET/SPECT/CT, Siemens healthcare)、蛍光イメージング測定については光イメージング装置 (IVIS Lumina, Perkin elmer) であった。また、ドーズメーターは CRC-55tPET を、麻酔器は夏目製作所 NARCOBIT-E (PET/CT 測

定)、NARCOBIT-KN470 (IVIS 測定) を用いた。

(1) 定量測定技術の確認については、PET 等のイメージング装置を用いて測定したピクセル値から、放射能濃度など定量的な値を計算するために必要な技術の確認と装置の評価を行った。

まず、PET 装置の経時的安定性を確認するために、⁶⁸Ge-Ga 密封線源を用いた daily quality control を毎日行うと共に、個々のイメージング装置に関して以下の調整を行った。次に X 線 CT における定量化に関して、CT 値の調整 (HU calibration)、X 線管と検出器の回転中心の調整 (center offset calibration) を行った。PET における定量化に関しては、PET 検出器の正規化 (normalization)、ドーズメーターとの換算係数を求める Cross calibration を行った。IVIS に関しては、特に定量評価に調整すべき事項はなかった。

(2) 無麻酔測定用固定具は、マウスの頭部に接着する固定用プレートと、それを固定する固定用フォルダの 2 つから成り立っている。固定用プレートは押し出し形成アクリル板を用い、マウスの頭部にフィットし、通常飼育時に視界を妨げず不快感を増加させない造りとした。また、固定時の術者の操作性を向上させるために、ピンセットでつかむことができる穴を用意した。固定用フォルダは、以下の条件を満たす形状を考えた。a) X 線、 γ 線および光の吸収が小さいもの、b) 非磁性体のもの、c) MR 用表面コイルをできる限り近づけて固定できるもの、および d) 糞尿などが外に漏れない構造であること。これらの条件に基づき、入手および加工の容易性も考えて、市販の 50mL の遠沈管を基に加熱塑性加工により加工することとした。また、固定具をフォルダに固定するために必要なねじも、X 線吸収などが少ないものにする必要があるため、その検討も行った。

使用機器は以下の通りである。

- ・固定用プレート作成：押し出し形成アクリル板 (クラレ、パラグラス)、レーザー加工機 (コマックス、VD7050、35W モデル)、ねじ切り (ハンドタップ)
- ・固定用フォルダ作成：遠沈管 (コーニング遠沈管 50mL)、加工機 (オークマ、マシニングセンタ MB-56VA およびアマダマシニングツール 旋盤 LR-55A)

固定用フォルダ作成に使用した金型は、全て切削加工により製作した。また、窓形状や穴の加工も切削加工により行った。

(3) 固定具を用いた麻酔薬の影響については、蛍光イメージングと陽電子放出断層撮影 (PET) を用いて評価した。使用機器、方法は

以下の通りである。

- ・ 光イメージング装置：IVIS Lumina (Caliper), 光イメージング用トレーサー：XenLight RediJect 2-DeoxyGlucosone (DG)-750 Probe 8nmoles/80uL を尾静脈より投与。
- ・ PET 装置：Inveon PET/SPECT/CT (Siemens), PET 用トレーサー：FDG スキャン注 (^{18}F -FDG), $10.13 \pm 1.09\text{MBq}$ を尾静脈より投与。
- ・ ドーズメーター：CRC-55tR (Capintec)
- ・ 麻酔：イソフルランを吸入投与
- ・ 固定プレートの頭蓋骨への固定：スーパーボンド C&B セット (サンメディカル株)
- ・ 対象：ICR マウス (オス) 5 匹
- ・ 測定スケジュール：マウスを 4 週齢で導入し，馴化後固定用プレート取付の手術を麻酔下で行った。手術後 2-4 日後から IVIS で 1 回目の測定を行い，その後 4 日間あけて 2 回目の測定を行った。1 回目に麻酔下測定を行った個体は，2 回目には無麻酔で測定を行った。IVIS の 2 回目の測定終了後，3 日間あけて PET の 1 回目の測定を行った。その後 2 日間あけて PET の 2 回目の測定を行った。PET でも同様に，1 回目に麻酔下測定を行った個体は 2 回目には無麻酔で測定を行った。

各イメージングデバイスでの測定条件は以下の通りである。

IVIS: Exposure time=1sec, Binning=small, F/stop=2, Excitation filter=745, Emission filter=820

PET: Uptake time = 40min, Scan duration = 20min, Image reconstruction = FBP, CT-based attenuation correction, scatter correction

画像解析は，IVIS の画像データは Living image (64bit) を，PET の画像は Inveon viewer を用いた。IVIS のデータでは投与前後のシリンジの蛍光量，マウス脳の左脳，右脳および小脳部分に関心領域 (ROI) をとり，蛍光量を測定した。PET のデータでは投与前後のシリンジの放射能をドーズメーターで測定すると共に，マウス脳の左脳，右脳および小脳部分に ROI をとり，FDG の集積量を測定した。IVIS および PET それぞれの値は，全て投与量で除することで比として算出した。

4. 研究成果

作成した固定用プレートを図 1 に示す。



図 1：作成した固定用プレート

固定用フォルダとは 4 本のねじで固定する

ように設計した。また，無麻酔のマウスを固定用フォルダに入れるのは非常に難しいため，マウスの姿勢制御用に前方側にピンセットで持つことができる穴を用意した。この結果，固定用フォルダに入ったマウスがいやがって前に進めなくなり，固定が不完全になることがなくなった。

50mL 遠沈管より作成した固定用フォルダを図 2 に示す。



図 2：固定用フォルダ

固定用フォルダは 50mL 遠沈管を用いたためにチューブ型となり，万が一固定用プレートが外れた際の逃亡防止，糞尿の閉じ込めによる RI 汚染拡大の防止が可能となった。サイズの関係上，大型のマウスの固定は無理であるが，40g 程度までのマウスであれば，十分に使用可能であると思われる。

固定用プレートを固定用フォルダに固定するねじの種類についても検討した。(図 3) 本研究では X 線， γ 線等を使用するため，それらが低吸収なものを選ばなければならない。比較したねじは，PEKE, PPSE および RENE で，全て同じサイズにした。Inveon の CT において 80kV, 500 μA の投影像を得た。(図 4)



図 3：固定用ねじの X 線吸収の評価

X-ray photo (80kV)

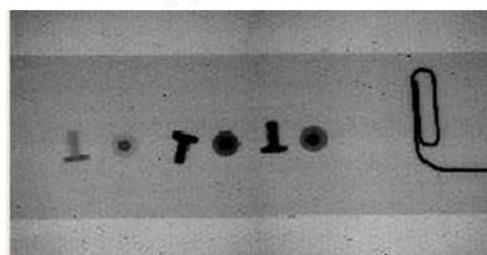


図 4：固定用ねじの X 線像

この結果、PEKE が最も吸収が少ないことが分かったため、ねじの材質として PEKE を採用した。

作成した固定具を用いて、マウスの固定を行った。(図 5)



図 5：固定具で固定したマウス

固定の状態は良好で、マウスの環境も悪化せず、呼吸や体温などの変化もほとんどなかった。また、固定具内でのマウスはおとなしく、ストレスが一段と増加したというようなことは見受けられなかった。

本固定具を用いて、IVIS および PET の測定を行った。得られた画像の例を図 6 に示す。また、ROI 測定の結果を図 7 に示す。

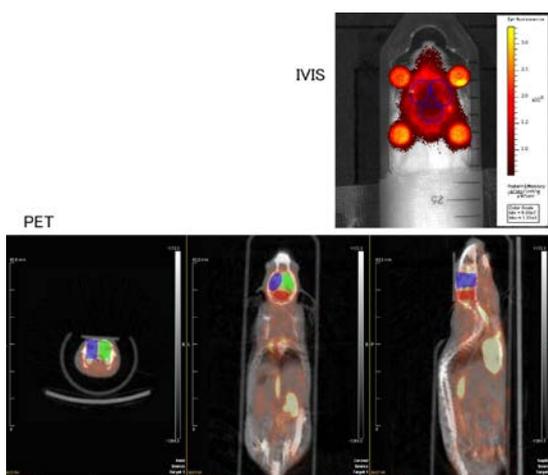


図 6：IVIS および PET を用いた無麻酔測定のための画像。なお、本画像には画像解析用の ROI も描出されている。

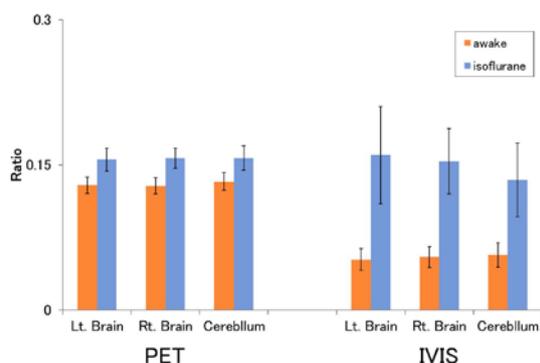


図 7：麻酔下および無麻酔におけるトレーサーの投与量に対する脳における集積比

これらの結果を見ると、無麻酔時に比して麻酔時は PET, IVIS 共に集積量が低下していることが示された。また、その変化は PET では小さいが、IVIS では非常に大きく変化していることがわかった。

この原因には、麻酔による脳血流の変化が考えられるが、他にトレーサーの違いによる変化である可能性が示唆された。PET で用いる ^{18}F -FDG は GLUT によって細胞内に取り込まれ、リン酸化された後に蓄積するが、IVIS で用いられる蛍光色素を持つ 2-DG は分子量が通常より非常に大きく (グルコースが 180.16 なのに対して 600-700 の大きさである)、細胞内へ取り込まれない。これらの差が、本研究の結果につながった可能性があると考えられた。

PET および IVIS とも、基本的には定量的な評価が可能なデバイスである。しかし、IVIS は投影像しか測定できず、PET が可能な断層像による三次元的な計測ができないため、測定精度が低下している可能性はある。しかし、放射性同位元素を用いる PET に比して簡便かつ頻回に使用可能なため、目的に応じた使用法の選択が重要な事が示唆された。ただし、麻酔を用いる際はその効果がデバイスによって異なって測定されるものあることを認識しなければならない。

本研究によって、麻酔の有無による生体機能の変化が、イメージングデバイスの違いによって異なって測定されることが明らかにされた。本研究成果は、薬効評価や創薬などでイメージングデバイスを用いる際に必要となる基礎的知見を得ることができた。

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)

・ Kubo H, Otani T, Otsuka H, Harada M, The impact of self-shielded cyclotron operation on small-animal PET/CT equipment installed nearby, on the floor just above. Journal of Medical Investigation, 61(1.2):46-52, 2014.

[雑誌論文] (計 1 件)

[学会発表] (計 0 件)

[図書] (計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

久保 均 (KUBO, Hitoshi)

福島県立医科大学・先端臨床研究センター・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