

令和 2 年 6 月 11 日現在

機関番号：23803

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2016～2018

課題番号：16H05113

研究課題名（和文）新規臨床用ラジカルイメージング装置開発に向けた非臨床基礎研究

研究課題名（英文）Studies on the Development of Clinical Free Radical Imaging Systeme

研究代表者

内海 英雄 (Utsumi, Hideo)

静岡県立大学・薬学部・客員教授

研究者番号：20101694

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,800,000円

研究成果の概要（和文）：種々の酸化ストレス疾患の発症・病態悪化に深くかかわるフリーラジカルをイメージングする臨床画像化装置の開発を目指して、動的核偏極を利用したDNP-MRI装置の高感度化に向けた基礎研究を行った。既に試作してあった装置の画像データを詳細に解析しDNP-MRI装置の特性を検証すると共に諸外国からの研究報告を含めて原理に遡って数理モデルで解析した。更に新たな基礎データを取得することで、合成体内診断薬を必要としないフリーラジカルイメージング法の開発に有用な基礎情報を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

生体内レドックス代謝の画像診断装置の開発は未だ成功していない。本研究では酸化ストレスの画像診断法を開発するための基礎研究を行った。具体的には、動的核偏極を利用したMRIでレドックス代謝を可視化するためにDNPの原理に基づいて画像データを解析し、数理モデルを作成し他機関からの報告結果を含め検証した結果、高感度化に必要な基礎情報が取得できた。また、新たな「生体内常磁性物質の画像化手法技術」が開発され、新たなMRI画像化法として活用されることが期待される。

研究成果の概要（英文）：The dynamic nuclear polarization (DNP) MRI, a new imaging method for observing free radical species in vivo, has higher spatiotemporal resolution than that of ESR imaging, but no clinical system is developed because of the large difference in magnetic resonance conditions between nuclear and electron spins. The field-cycling is very effective to increase its sensitivity by achieving the both resonance conditions in DNP-MRI. Here we performed the basic researches about the theory of the field-cycling DNP, and obtained the fundamental results needed for the development of clinical DNP-MRI.

研究分野：物理薬学

キーワード：MRI DNP フリーラジカル 動的核偏極 常磁性物質 イメージング 画像診断

1. 研究開始当初の背景

生体内における酸化還元（レドックス）代謝はミトコンドリアでのエネルギー産生など生命の維持に不可欠である。一方、その代謝異常は種々の酸化ストレス疾患の発症・病態悪化に深くかかわることが報告されている。レドックス代謝のイメージングが可能になれば、多くの酸化ストレス疾患の診断・予防・治療・新規医薬品の開発に極めて有効な手段となる。

生体内常磁性物質はレドックス代謝反応に大きく関わる。常磁性物質(フリーラジカル)の画像化法として、常磁性物質を直接観測する生体計測 ESR 画像化法と、電子スピン(常磁性物質)と核スピンの超微細結合を介した核スピンの分極(DNP, dynamic nuclear polarization)を利用した DNP-MRI がある。オランダ Philips 社は DNP-MRI をガン組織酸素濃度イメージング法として開発したが、十分な感度が得られず開発を中断した。我々は Philips 社から試作装置を導入し生体計測 ESR 法で用いたスピンプローブ法を利用し種々の病態モデルでレドックス動態の画像解析を行った結果、DNP-MRI が酸化ストレス疾患の診断に有用であることを見出した。Philips 社の DNP-MRI 装置は 7mT で電子スピン共鳴を行い 15mT で MRI 撮像を行う低磁場変換法を用いているため MRI の感度が非常に悪い。そこで、MRI 共鳴磁場を高磁場に変換することで高感度化する研究が欧米を中心に進められたが、様々な問題点があり臨床用装置の開発は成功していない。

一方、米国 GE 社は炭素 13 で標識した乳酸やピルビン酸を生体外で DNP することで高感度化し担癌マウスでの解糖系代謝反応を可視化する方法を開発し前立腺がんでの治験を開始した。DNP は 1953 年に見出された現象であるが、その他にも構造生物学で MAS-NMR の高感度化などに盛んに利用されるようになり、磁気共鳴分野のルネッサンスとして注目されている。

2. 研究の目的

本研究目的は「新規臨床用ラジカルイメージング装置開発に向け、磁場変換 DNP-MRI に関する非臨床基礎研究」を行うことである。我々も欧米での研究と並行して種々の磁場変換 DNP-MRI 装置の開発研究を進めてきた。特に臨床応用を指向した装置開発では膨大な量の画像データを取得したが解析が出来ていなかった。本研究では、これらのデータを詳細に解析し有用性を検証すると共に DNP の原理に遡って他機関からの研究報告も含め実験結果を検証することで臨床用装置開発への新たな情報を取得すること、及び内因性物質及び市販医薬品などを試料とし DNP-MRI でラジカル可視化の科学的知見を得ることが具体的な目的である。

3. 研究の方法

大きく分け次の 3 つの研究方法で研究を遂行する。

(1) 臨床応用を指向した装置での画像データを詳細に解析し有用性を検証

対象装置は九州大学レドックスナビ拠点の甲府分室で試作を進めた MRI 磁場 0.3 テスラ・ESR 磁場 5 ミリテスラの試作機で、種々の条件で取得したデータを画像として解析すると共に、臨床 MRI 学会で提唱されているガイドラインに基づいて数値解析する。その上で高磁場変換の特性を明らかにし磁場変換 DNP-MRI の有用性を検証する。

(2) 欧米からの研究報告も含め実験結果を DNP の原理に基づいて再検証

背景に記したように、磁場変換 DNP-MRI の開発に関し他研究機関を含め種々の研究がなされてきた。これらの実験結果について実験条件を対比しつつ、問題点を整理する。加えて、DNP の原理に遡ってこれまでの報告結果を解析し、上記方法で得られた結果を検証する。

(3) 内因性物質及び市販医薬品などを試料とし DNP-MRI でラジカル可視化

生体内に存在する常磁性物質や生体内で常磁性に代謝される医薬品を試料として磁場変換 DNP-MRI で可視化を検討し、臨床応用の可能性を探ると共に、装置開発の方向性と画像化条件を検証する。

4. 研究成果

具体的に得られた成果を研究方法に記した項目に沿って示す。

(1) 臨床応用指向装置の画像データ解析と有用性の検証

図 1 に用いた装置の概略図を示す。

本装置は 0.3 テスラの MRI 用永久磁石と 5 ミリテスラの ESR 用永久磁石を 2 枚の円形ジャケット内に装着し、両ジャケットを回転することで磁場変換を行うものである。朱色で示すユニット内に MRI コイルと ESR 照射コイルおよび傾斜磁場コイルが設置してある。この磁場変換方式は新たな試みで画像を得るために電気回路の改良を含め一年以上の試行錯誤が開発に要した。その結果、本試作機で具体的に画像データが得られ始めたのは、この科学研究費助成研究を開始する一年前からであり、本研究開始以前には詳細なデータ解析は



殆ど出来ていなかった。

そこで、本磁場変換方式による MRI 画像を臨床 MRI 学会で提唱されているガイドラインに基づいて数値解析した。その結果、図 2 に示すように MRI 感度は高磁場に変換しても直ちに高感度になることなく磁場変換から MRI 撮像までの時間に大きく依存することが明らかとなった。この結果は、欧米での先行研究が磁場変換直後に MRI 撮像しているために高感度化が得られていないことを示唆するもので、DNP-MRI での高感度化に新たな可能性を加えるものと考えられる。

次にニトロキシラジカルを試料とし電子スピン励起条件を変えて DNP-MRI 撮像を行った。その結果、ESR 照射パワーやラジカル濃度に応じて画像輝度が変化し、DNP が少ない状態では輝度の減衰が DNP を強くした場合には輝度の増加が認められた。また、磁場変換条件により DNP 効果が増加することが示され、臨床用磁場変換 DNP-MRI の開発に有用な知見が得られた。

図 1. 磁場変換 DNP-MRI 装置

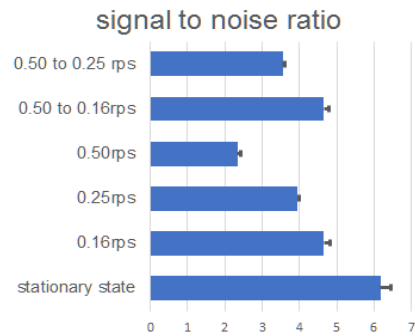


図 2. 磁場変換下での MRI 画像輝度

(2) 他研究機関からの研究論文結果も含めた実験結果の再検証

臨床応用を志向した場合には生体内の常磁性物質を対象とすることから溶液 DNP 現象を利用することになる。溶液 DNP に関して 1960 年代に多くの基礎研究がなされ、Hausser と Stehlik により核スピンの高感度化係数(E; Enhancement factor)として式； $E=(I_z-I_0)/I_0=\rho fs*(\gamma_e/\gamma_n)$ (但し、 ρ =coupling factor, f =leakage factor, s =saturation factor, γ_e & γ_n =gyromagnetic ratios for electron and nuclear spin))が提唱された。その後の欧米を含めた全ての研究では、この式を基本原理として用いて実験結果の解析がなされてきた。しかし、この式は定常状態、即ち核磁化の時間変化はないことを仮定しマクロ解析している。磁場変換下で核磁化が時間変化する場合の DNP 現象の解析にこの式を適用する妥当性には問題があると考えられる。そこで、Hausser と Stehlik も引用している Overhauser(1953 年)や Solomon(1955 年) の論文に遡り、磁場変換化での DNP 現象を量子力学的にミクロ解析した。その結果、式； $E=(I_z-I_0)/I_0=\rho fs*(\gamma_e/\gamma_n)$ での記述では表れてこない電子スピン励起を適切に導入することが不可欠となり、新たに ESR 飽和実験を行った。その結果、ラジカルの種類・濃度により電子スピン励起が大きく異なることが明らかとなり、申請者らが報告してきた固定外部磁場での成果とも一致することが明らかとなった。さらに、ミクロ解析理論解析結果を参考に、数理モデルを作成し種々の条件化で DNP-MRI の画像輝度をシミュレーション解析した結果、これまで得られた磁場変換 DNP-MRI の結果と一致することが明らかとなり、新たな画像化手法を見出した(特許出願中)。これらの結果は臨床応用を指向した磁場変換 DNP-MRI 装置開発に有用な技術となる。

(3) 内因性物質及び市販医薬品などを試料とし DNP-MRI でラジカル可視化

生体内に存在する常磁性物質の標準としてメラノーマに存在するメラニンを、生体内で常磁性に代謝される医薬品として FAD を試料として、磁場変換 DNP-MRI で可視化を試みた。これらの試料では合成ニトロキシラジカルと可視化条件が異なることが明らかとなり、画像化条件を最適化することで、0.5 ミリ以下の空間分解能を有する明瞭な画像が得られた。これらの結果は、本研究の目的である臨床応用を志向したフリーラジカルイメージング装置の開発で合成体内診断薬を使用せずに画像が得られる可能性を強く示唆するものである。

以上の(1)～(3)に示したように、本研究を通じて臨床応用可能な磁場変換型 DNP-MRI 装置開発に必要な基礎知見が取得できたことは、今後の装置開発並びに臨床応用に向け大きく貢献するものと考えられる。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 8 件)

- ① Yasukawa Keiji, Hirago Akinobu, Yamada Kazunori, Tun Xin, Ohkuma Kenji, Utsumi Hideo; *In vivo* redox imaging of dextran sodium sulfate-induced colitis in mice using Overhauser enhanced magnetic resonance imaging, *Free Radical Biology and Medicine*, 査読有 136, 1-11 (2019)
DOI:10.1016/j.freeradbiomed.2019.03.025
- ② Hyodo Fuminori, Naganuma Tatsuya, Eto Hinako, Murata Masaharu, Utsumi Hideo, Matsuo Masayuki; *In vivo* melanoma imaging based on dynamic nuclear polarization enhancement in melanin pigment of living mice using in vivo dynamic nuclear polarization magnetic resonance imaging, *Free Radical Biology and Medicine*, 査読有 134 99-105 (2019)
DOI:10.1016/j.freeradbiomed.2019.01.002
- ③ Kishimoto Shun, Krishna Murali C., Khramtsov Valery V., Utsumi Hideo, Lurie David J. *In Vivo*

Application of Proton-Electron Double-Resonance Imaging, Antioxidants & Redox Signaling, 査読有 28 1345-1364 (2018)

DOI:10.1089/ars.2017.7341

- ④ Yasukawa Keiji, Shigemi Ryota, Kanbe Tomomi, Mutsumoto Yusaku, Oda Fumiko, Ichikawa Kazuhiro, Yamada Ken-Ichi, Tun Xin, Utsumi Hideo, *In Vivo* Imaging of the Intra- and Extracellular Redox Status in Rat Stomach with Indomethacin-Induced Gastric Ulcers Using Overhauser-Enhanced Magnetic Resonance Imaging, Antioxidants & Redox Signaling, 査読有 30(9) 1147-1161(2018)
DOI:10.1089/ars.2017.7336
- ⑤ D. David Jeberaj, Utsumi Hideo, A. Milton Franklin Benial, Low-frequency ESR studies on permeable and impermeable deuterated nitroxyl radicals in corn oil solution, Magnetic Resonance in Chemistry, 査読有 56 (4) 257-264 (2018)
DOI: 10.1002/mrc.4686
- ⑥ D. David Jeberaj, Utsumi Hideo, A. Milton Franklin Benial, Electron spin resonance on deuterated nitroxyl spin probes used in Overhauser-enhanced magnetic resonance imaging, Magnetic Resonance in Chemistry, 査読有 55(8) 700-705 (2017)
DOI: 10.1002/mrc.4576
- ⑦ D. David Jeberaj, Utsumi Hideo, A. Milton Franklin Benial, Dynamic nuclear polarization studies on deuterated nitroxyl spin probes, Magnetic Resonance in Chemistry, 査読有 55(11) 1022-1028 (2017)
DOI: 10.1002/mrc.4626
- ⑧ Meenakumari V, Utsumi Hideo, A. Jawahar, A. Milton Franklin Benial, Concentration dependence of nitroxyl spin probes in liposomal solution: Electron spin resonance and Overhauser-enhanced magnetic resonance studies, Journal of Liposome Research, 査読有 28(2) 1-37 (2016)
DOI: 10.1080/08982104.2016.1264960

[学会発表] (計 8 件)

- ① 内海英雄; 電子スピン(共鳴)と生命医科学、第57回電子スピンサイエンス学会(札幌) 2018年11月(招待講演)
- ② Hideo Utsumi, Toshiki Masumizu, Ryoma Kobayashi, Utaroh Motosugi, Tatsuya Shimizu, Tomoko Tahira, Hidenori Kajiwara, Atsushi Iikura Development and Proof of Principle for Free Radical Imaging with the Novel Field-cycling in vivo DNP-MRI, Annual meeting ISMRM, June 2018, Paris
- ③ 内海英雄, 増水章季, 小林竜馬, 梶原秀則, 飯倉淳, 兵藤文紀, 田平知子; 臨床用DNP-MRIの開発とフリーラジカルの可視化、第56回電子スピンサイエンス学会(東京)、2017年11月
- ④ Hideo UTSUMI, Toshiki MASUMIZU, Ryoma KOBAYASHI, Utaroh Motosugi, Tatsuya Shimizu, Fuminori Hyodo, Tomoko Tahira, Hidenori KAJIWARA, Atsushi IIKURA; Development and Clinical Trial of Novel Field-cycling DNP-MRI for Free Radical Imaging, SfrBM2017, Nov. 2017 Baltimore, USA
- ⑤ 内海英雄, 本杉宇太郎, 清水辰哉, 田平知子; 新規フリーラジカルイメージング装置の開発と健常人介入試験 第45回日本磁気共鳴医学会(栃木)、2017年9月
- ⑥ Hideo UTSUMI, Toshiki MASUMIZU, Ryoma KOBAYASHI, Hidenori KAJIWARA, Atsushi IIKURA, Fuminori HYODO, Tomoko TAHIRA; Development of New Field-cycling DNP-MRI for Free Radical Imaging; International Conference on Electron Paramagnetic Resonance Spectroscopy and Imaging of Biological Systems, July 2017 Morgantown WV USA (invited lecture)
- ⑦ 内海英雄, 増水章季, 小林竜馬, 梶原秀則, 飯倉淳, 兵藤文紀, 田平知子; 臨床応用を指向したフリーラジカルイメージング・DNP-MRI装置の開発; 第70回日本酸化ストレス学会(筑波) 2017年6月
- ⑧ 小林竜馬, 内海英雄; 磁石回転型Field cycle MRIにおけるEddy Currentの効果と補正、第44回日本磁気共鳴医学会、2016年9月

〔図書〕（計0件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計0件）

名称：常磁性物質の画像化及び分析方法並びにプログラム

発明者：内海英雄

権利者：株式会社 ReMI

種類：特許

番号：2019-216166

出願年：2019年

国内外の別：国内

○取得状況（計0件）

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：橋本 博

ローマ字氏名：Hashimoto Hiroshi

所属研究機関名：静岡県立大学

部局名：薬学部

職名：教授

研究者番号（8桁）：40336590

研究分担者氏名：賀川 義之

ローマ字氏名：Kagawa Yoshiyuki

所属研究機関名：静岡県立大学

部局名：薬学部

職名：教授

研究者番号（8桁）：90397505

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。