

令和 2 年 6 月 16 日現在

機関番号：17501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K16149

研究課題名（和文）電磁ホーン型ESRイメージング装置による高次脳機能障害の画像評価

研究課題名（英文）Image evaluation of higher cerebral dysfunction using an electromagnetic horn type ESR imaging device

研究代表者

杉田 憲司（Kenji, Sugita）

大分大学・医学部・客員研究員

研究者番号：00381046

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,100,000 円

研究成果の概要（和文）：生体におけるフリーラジカルの分布、発生量の画像化は、酸化ストレスが関与する疾患の病態の評価において有用と考えられる。本研究では、高次脳機能障害にターゲットを定め、フリーラジカルの関与に対し、電磁ホーン型ESR イメージング装置による測定を確立させ、臨床応用すべく基礎研究を行った。マウス脳虚血モデルを作成。電磁ホーン型ESR 装置や種々のスピンラベル剤を使用しマウス脳虚血モデルのフリーラジカルイメージングを試みたが、信号取得、画像化が困難であった。原因として、フリーラジカルの発生量、装置の感度不足などが考えられた。今後も、計測機器の改良によりイメージングの改善を図る方針である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

高齢化社会の加速により、認知機能低下を伴う脳梗塞、アルツハイマー病患者も増加し、介護需要増加への対応が喫緊の課題となっている。これら疾患にフリーラジカルの関与が示唆されており、その画像化技術の確立は、病態の評価、治療効果の判定等様々な臨床応用が望めるものである。本研究では、介入群にフリーラジカルスカルベンジャーとしての効果が示唆されるラモトリギンを用い、それによる脳梗塞モデルマウスの梗塞巣の減少、運動機能の改善が認められ、治療応用の可能性が示唆された。フリーラジカルイメージングについては画像化が困難であったが、その技術は有用と考えられ、今後の開発が期待される。

研究成果の概要（英文）：Imaging of free radical distribution and abundance in the living body is considered to be useful in evaluating the pathological condition of diseases associated with oxidative stress. In this study, we targeted high-order brain dysfunction, established the measurement with an electromagnetic horn type ESR imaging device for the involvement of free radicals, and conducted basic research for clinical application. Free radical imaging of mouse cerebral ischemia model was attempted using an electromagnetic horn type ESR device and various spin labeling agents, but signal acquisition and imaging were difficult. Possible causes were the amount of free radicals generated and insufficient sensitivity of the device. In the future, we plan to improve imaging by improving the measuring equipment.

研究分野：脳血管障害

キーワード：電磁ホーン型ESRイメージング装置 フリーラジカル マウス脳虚血モデル

1 . 研究開始当初の背景

わが国の全人口における高齢者割合は増加の一途をたどり、それに伴い脳梗塞やアルツハイマー病による高次脳機能障害を抱える患者も増加し、その対策は今後益々重要となってくる。これら高次脳機能障害の原因となる病態に関与する因子として、活性酸素種や活性窒素種などのフリーラジカルが挙げられる。脳梗塞により、増加したフリーラジカルが酸化ストレス状態を惹起し、虚血に陥った脳に更なる中枢神経損傷のカスケードを誘発する。特に脳塞栓溶解術後の再灌流脳に上記カスケードが深く関与している可能性がある。また、アルツハイマー病において、主たる病態であるアミロイド 蛋白の凝集にフリーラジカルが関与するとの報告や、酸化ストレスの軽減による病態改善の報告もある。以上より、脳内フリーラジカル分布の画像化は、かかる病態解明・診断・創薬における抗酸化能評価に期待される。生体試料でのフリーラジカルの画像化は、生体試料が誘電率の高い水分を多く含むことや、生成されるフリーラジカルが微量なことから、決して容易ではない。近年、生体試料への透過性が比較的高い低周波のマイクロ波を使ったループギャップ型電子スピン(ESR)イメージング装置にスピンプローブ法を使った手法が、多くの施設で開発、研究され、各種疾患の小動物モデルにおけるフリーラジカルの画像化が試みられている。しかし、これら従来の共振器では、測定時不対電子のトラップ量に限界があること、測定感度を上げるために高周波のマイクロ波を用いると試料への透過性が低下するだけでなく試料空間も小さくなることから、満足な画像解像度が得られていないのが現状である。先端的電磁ホーン型 ESR 装置を開発し、脳腫瘍や、てんかんモデルでの画像化を試み、良好な成績を上げてきた。本研究は、上記技術革新による電磁ホーン型 ESR イメージング装置を臨床実用機として成熟させ、上述の病態解明、治療へのフィードバックを図るための基礎研究である。

2 . 研究の目的

脳卒中、アルツハイマー病における高次脳機能障害にターゲットを定め、フリーラジカルの関与に対し、技術革新による電磁ホーン型 ESR イメージング装置による非侵襲的測定を確立させ、病態、進行度、治療に対する反応などに応用すべく基礎研究を行う。臨床実用機として必須である『機器の再現性と特異性・定量性』を脳虚血・再灌流モデル、アルツハイマー病モデルの生体の各種パラメーターの測定を用いて検証する。生体フリーラジカル計測結果のフィードバックと検証を行うことで工学的側面の解決すべき課題を側方支援しつつ、同時に脳虚血、アルツハイマー病の高次脳機能障害への病態解明・診断・創薬さらに、新規治療方法開発への戦略を探る。

3 . 研究の方法

C57Bl/6J マウスを使用。0.3mg/kg メデトミジン・4mg/kg ミダゾラム・5mg/kg ブトルファノール腹腔内投与による麻酔下に、25 mm の閉塞用 3-0 ナイロン糸を、右総頸動脈分岐部より 2 mm 近位部から頭蓋内へ、右の前大脳動脈に向けて同側の中大脳動脈が起始部で閉塞されるよう 18 mm 挿入し、内頸動脈起始部を 6-0 ナイロン糸で縛り固定した。虚血時間 60 分後再灌流した。再灌流より 30 分後、フリーラジカル測定のため、スピンラベル剤 (50mg/kg) を腹腔内投与した。再灌流からの時間から、30 分、1 時間後、2 時間後より、電磁ホーン型 ESR 装置によるフリーラジカルイメージングを行った。再灌流より 24 時間後、ペントバルビタール (200mg/kg) 腹腔内投与による深麻酔下に、断首し、脳を摘出した。摘出後脳は、TCC 染色により梗塞の範囲を確認した。脳梗塞病変の体積・浮腫性変化・フリーラジカルの測定・画像化による評価を行った。また、摘出脳におけるフリーラジカルイメージングを行った。1 時間の中大脳動脈閉塞・再灌流後、再灌流より 30 分後にスピンラベル剤 (50mg/kg) を腹腔内投与した。スピンラベル剤投与後、30 分、1 時間、2 時間と時間を変更し、ペントバルビタール (200mg/kg) 腹腔内投与による深麻酔下に、断首し、脳を摘出した。摘出脳を 1mm 幅で slice し、液体窒素にて急速冷凍し、電磁ホーン型 ESR 装置によるフリーラジカルイメージングを行った。いずれも対照群、脳梗塞群、脳梗塞+フリーラジカルスカベンジャーによる介入群、との比較検討を行った。フリーラジカルスカベンジャーには、ラモトリギン (20mg/kg、腹腔内投与) を用いた。その投与のタイミングは、中大脳動脈閉塞の 30 分前の投与とした。対照群は、0.3mg/kg メデトミジン・4mg/kg ミダゾラム・5mg/kg ブトルファノール腹腔内投与による麻酔下に、前頸部を縦切開し、縫合閉鎖した。また、アルツハイマー病動物モデルを用いて、同様の評価を行った。同モデルには、0.3mg/kg メデトミジン・4mg/kg ミダゾラム・5mg/kg ブトルファノール腹腔内投与による麻酔下に、人工髄液で希釈した Streptozotocin (25mg/ml) を両側脳室内に第 1、3 実験日に注入し作成した。

4 . 研究成果

マウス脳虚血モデルを作成した。Q-band 電磁ホーン型 ESR 装置に冷却装置付き 3 次元 MRI コイルを組み込み、スピンラベル剤 (MC-PROXYL) を用いマウス脳虚血モデルの生体イメージングを再灌流から評価までの時間による変化により計測を試みたが、信号取得、画像化が困難であった。虚血時間の変更も加えて試みたが、結果は同様であった。in vivo におけるフリーラジカルイメージングについては、当研究室で L-band ループギャップ共振器を用い、マウス悪性脳腫瘍

モデルにスピンラベル剤を投与し、ESR 計測に成功している。同様の手法を用いマウス脳虚血モデルの生体 ESR 計測を試みたが、信号取得、画像化が困難であった。また、スピンラベル剤、マウス脳虚血モデルにも変更を加えてフリーラジカルイメージングを試みた。スピンラベル剤には Carbamoyl-PROXYL を使用した。脳虚血モデルにはフリーラジカルスカベンジャーとして Lamotrigine 投与による介入を行い、その梗塞体積計測、酸化ストレスマーカーの計測、電磁ホーン型 ESR 装置によるフリーラジカルイメージングを行った。対照群と比較し、Lamotrigine 投与群においては、神経所見の改善、脳梗塞体積の減少が認められた(n=5、Fig.1、2)。フリーラジカルイメージングについては、信号取得、画像化が困難であった。アルツハイマー病モデルについても作成行ったが、安定したモデルが作成困難であり、フリーラジカルイメージングについても画像化が困難であった。これら画像化が困難であった原因として、フリーラジカルの発生量が少ないこと、装置の感度不足などが考えられた。今後も、計測機器の改良によりイメージングの改善を図る必要があると考えられた。

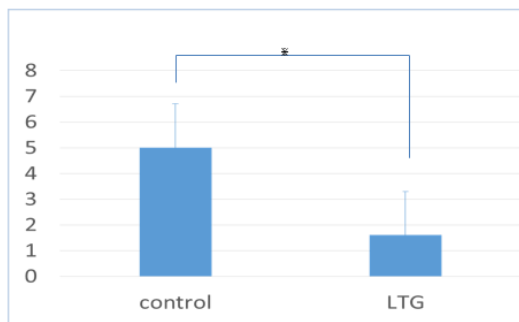


Fig. 1. focal sign score

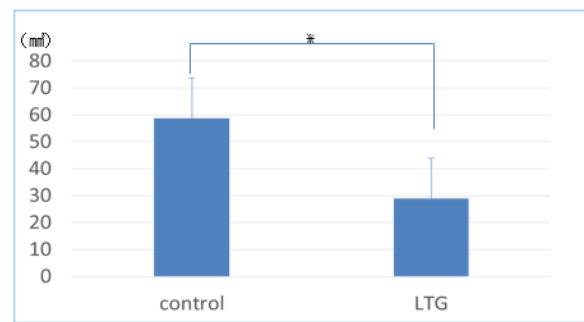


Fig. 2. infarction volume

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
研究協力者	上田 徹 (Kamida Tohru)		