

平成 30 年 6 月 25 日現在

機関番号：82502

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K19875

研究課題名(和文)小動物PETと蛍光顕微鏡の次世代同時測定システムの開発

研究課題名(英文)Development of a Simultaneous fluorescence microscope and PET Imaging System for Awake Mice

研究代表者

田桑 弘之(Takuwa, Hiroyuki)

国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構・放射線医学総合研究所 脳機能イメージング研究部・研究員(任常)

研究者番号：40508347

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文): PETと蛍光顕微鏡は、生きた動物の体内の分子動態をそれぞれマクロレベルとミクロレベルで可視化できることから両者は理想的な補完関係にあるといえる。PETと蛍光顕微鏡の同時測定を実現すれば生体マルチスケールイメージングが可能となる。そこで本研究では、申請者らが開発したPETと蛍光顕微鏡と覚醒動物実験系の3つの要素技術を組み合わせることで、覚醒マウスを対象とした小動物PETと蛍光顕微鏡の同時測定装置の開発を行い成功した。次年度は、FDG-PET(グルコース代謝)とフラビン蛍光イメージング(酸素代謝)との同時測定による脳活動のマルチスケールイメージングを目的とした蛍光顕微鏡の補正法を開発に成功した。

研究成果の概要(英文): In this study, we developed a system for simultaneous optical and PET imaging of awake mice. The key element is an open PET scanner (Open PET), which allows it to be combined with another device. A custom made fluorescence microscope was placed inside the open space of the open PET. The apparatus successfully simultaneously measured cerebral blood flow (CBF) and radioactivity concentration with ^{11}C -raclopride PET.

In order to perform simultaneous FDG-PET measurement and flavoprotein autofluorescence imaging (FAI), we developed a method to correct for the effect of CBF on FAI. FAI is generally weak during changes of blood flow because hemoglobin absorbs fluorescent light. However, our correction method ignores the effects of CBF on FAI during neural activation.

研究分野：神経生理学、神経行動学、循環生理学

キーワード：PET 蛍光顕微鏡 生体脳イメージング マルチスケールイメージング 画像補正

1. 研究開始当初の背景

近年、複数の測定機器を組み合わせて多角的に生命現象を調べるマルチモダルイメージングが盛んに進められており、また、研究側の要請に伴って多くのマルチモダルイメージング機器が現在までに開発されている。特に Positron Emission Tomography (PET) は、ヒトを対象として生体内から分子動態を画像化できるという点で極めて有効であるが、画像解像度に測定原理上の制約がある。より空間解像度の高い Computed Tomography (CT) や Magnetic resonance imaging (MRI) と PET を組み合わせた PET/CT や PET/MR も存在するが、CT や MRI の解像度では組織形態を詳細に描出するにとどまり、個々の細胞レベルの形態や機能を可視化するまでには至らない。また、もう1つの問題点として CT や MRI が主に生体内の内因性信号をとらえる測定法であるため、PET トレーサーなどの薬剤動態そのものを画像化するのは不向きな点があげられる。顕微鏡を用いた光イメージングは、生きた動物の体内の蛍光標識薬剤の動態を検出することに優れている。さらに頭蓋窓（動物の頭蓋骨に円形のガラス窓を設置する方法）などの侵襲性の高い処置が必要なことから主に実験動物を対象とするが、PET で得られるデータの真値といえる微細構造や高速で生じる生命現象をとらえる時空間解像度を持つ。蛍光顕微鏡と小動物 PET との同時測定システムが開発されれば、これまで得られなかった PET 測定値の生物学的な根拠が得られるようになり、臨床 PET と広範な基礎研究とをつなぐトランスレーショナルリサーチを飛躍的に向上させる。

2. 研究の目的

これまでに、いくつかの先行研究で小動物 PET と光イメージングとの同時測定を報告しているが^{1, 2}、いずれの研究も光イメージングに顕微鏡を用いていないため、空間解像度は小動物 PET と大きく変わらず組織レベルで

あった。そのため、1細胞を可視化できる光イメージングの空間解像度を最大限に生かし切れていない。そこで本申請研究では、覚醒状態のマウスの脳を対象とした小動物 PET と蛍光顕微鏡との同時測定システムを開発した。さらに、蛍光顕微鏡と PET との融合研究の効率性を高める観点から、蛍光顕微鏡測定系の改良を進めた。特にフラビン蛍光イメージングは、ミトコンドリアを介した酸素代謝量に関連した測定値が得られ、FDG-PET などのブドウ糖代謝との比較解析研究に有効であると考えられる。一方で、フラビン蛍光イメージングの蛍光波長域は、ヘモグロビンの吸収・散乱の影響を強く受けてしまうため、脳血流変動に伴うノイズ補正が重要となる。特に脳血管機能障害のモデル動物を評価する場合、血流変動の影響の補正が正確な脳機能評価に必須といえる。脳卒中や認知症など多くの脳疾患で脳血管機能障害が生じることから、フラビン蛍光イメージングにおける脳血流影響の補正法の開発は重要である。

3. 研究の方法

a) PET と蛍光顕微鏡の同時測定系の作成

放医研で開発された開放型 PET (OpenPET) は、検出器を斜めにすることにより検出器と測定対象動物との間に広いスペースができる³。我々は、蛍光顕微鏡を OpenPET の検出器と対象動物との間のスペースに組み込むことで PET と光イメージングの同時測定装置を作成した。光イメージングでは、微弱な蛍光を検出するために対物レンズを測定対象（例えば動物の脳表）に可能な限り近づける必要がある。そのため、OpenPET の形状に適合する細長い顕微鏡を自作して PET 検出器と検出器の間に挿入した。動物は、専用の覚醒マウス用固定具を自作したものを設置した（図1）。装置性能の評価・検証として、覚醒マウスを用いた [¹¹C]Raclopride-PET とレーザースペckル血流光イメージングの同時測定を行った。

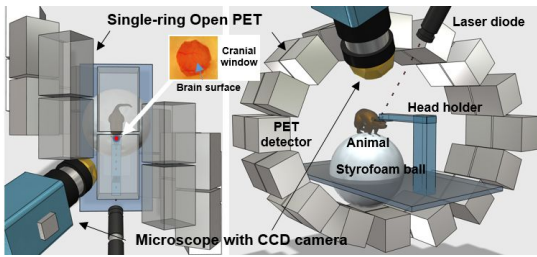


図 1 PET と蛍光顕微鏡の同時測定装置 (Takuwa et al., 2016, Phys Med Biol. 61(17):6430-40)

b) フラビン蛍光イメージングにおける脳血流補正法の開発

フラビン蛍光イメージングは、脳賦活に伴う酸素代謝変化率を求めることができる。一方で、神経活動に伴う脳血流上昇によりヘモグロビンの吸光と散乱が増加してフラビン蛍光の減衰が生じる。この脳血流によるフラビン蛍光の減衰を除去するための補正法を構築する。図 2 の装置を用いて、フラビン蛍光イメージングと内因性信号イメージングを同時測定する。内因性信号イメージングは、脳血流に関連したパラメーターのため、その値を指標として脳血流によるフラビン蛍光の減衰率を求めて、それをフラビン蛍光輝度に加えることで本来の値を求めた。

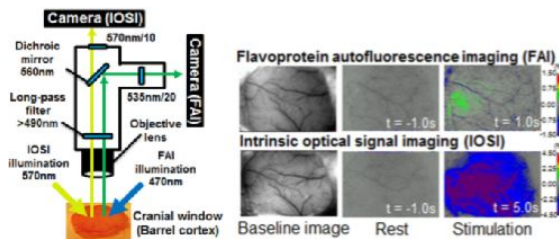


図 2 フラビン蛍光と内因性信号イメージングの同時測定系 (Takahashi et al., 2018 Front Neurosci. 4;11:723.)

4. 研究成果

a) PET と蛍光顕微鏡の同時測定系の検証

覚醒マウスからの¹¹C]Raclopride-PET とレーザースペckル血流イメージングの同時測定結果を、図 3 に示す。レーザースペckル血流イメージングでは、ベースとなる安静時脳血流と Hypercapnia 時の脳血流の上昇を捉えている (図 3 上段)。また PET 測定では、小脳と比較して線条体における ¹¹C]

raclopride の高い集積を示している。上記の同時測定データは、レーザースペckル血流イメージング⁴と¹¹C] raclopride-PET⁵のそれぞれ個別に測定された先行研究ともよく一致していた。

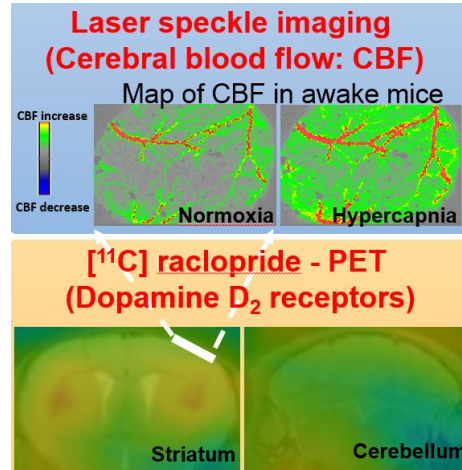


図 3 PET と蛍光顕微鏡の同時測定データ (Takuwa et al., 2016, Phys Med Biol. 61(17):6430-40)

b) フラビン蛍光イメージングにおける脳血流補正法の動物実験による検証

覚醒マウスの脳表よりフラビン蛍光と内因性信号の同時測定を行った。2 秒間の感覚刺激を含む 20 秒間を測定した。刺激から 1 秒以降に脳血流によるフラビン蛍光の減衰が見られるが、本補正法を用いることでこの減衰を排除することができた (図 4 A)。補正前後の時間反応曲線でも刺激後の脳血流による蛍光の減衰効果を排除できていることがわかる (図 4 B, C)。

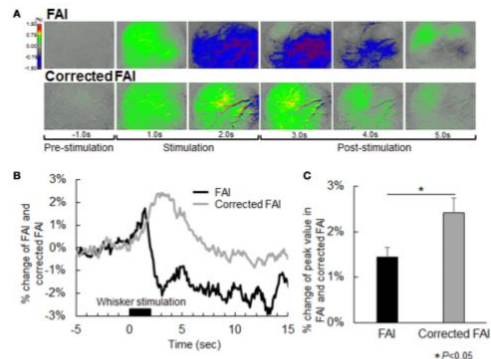


図 4 補正法前後のフラビン蛍光イメージングの比較。(Takahashi et al., 2018 Front Neurosci. 4;11:723.)

また、5 %CO₂ 吸入負荷に伴う脳血流上昇を

利用して、安静時と神経活動時に付加的な脳血流変動を加えた実験を行ったが、我々の補正法を用いることで、付加的な脳血流によるフラビン蛍光の減衰効果をほぼ完全に排除することができた(図5)。

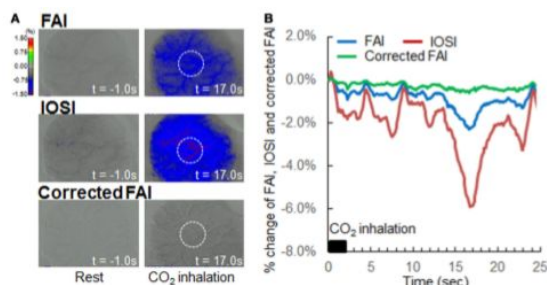


図5 5%CO2吸入負荷に伴う脳血流上昇によるフラビン蛍光イメージングへの影響を補正(Takahashi et al., 2018 Front Neurosci. 4;11:723.

以上の結果から、我々は既存の方法よりも正確に脳細胞の酸素代謝変化率を測定することができると示された。これらの補正法は、今後、PETと蛍光顕微鏡の同時測定に応用する予定であるが、単独の測定系としても認知症モデル動物を対象とした慢性実験に有効であると考えられる。

参考文献：1) Prout et al., 2004 IEEE Trans Nucl Sci. 51 752-756, 2) Li et al., 2009 Opt Lett. 34 2933-2935, 3) Tashima et al., 2012. Phys. Med. Biol. 57: 4705-4718. 4) Nishino et al., 2015, Microcirculation 22(8):744-52, 5) Takuwa et al., 2015 Synapse. 69(12):600-6.

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4件)

1. Takuwa H(責任著者), Ikoma Y, Yoshida E, Tashima H, Wakizaka H, Shinaji T, Yamaya T. (2016) Development of a simultaneous optical/PET imaging system for awake mice. Phys Med Biol. 61:6430-6440]
2. Takahashi M, Urushihata T, Takuwa H(責

任著者), Sakata K, Takado Y, Shimizu E, Suhara T, Higuchi M, Ito H. (2017) Imaging of Neuronal Activity in Awake Mice by Measurements of Flavoprotein Autofluorescence Corrected for Cerebral Blood Flow. Front Neurosci. 2018 Jan 4;11:723.

3. Sahara N, Shimojo M, Ono M, Takuwa H, Marcelo F, Higuchi M, Suhara T (2018) In vivo tau imaging for a diagnostic platform of tauopathy using the rTg4510 mouse line. Frontiers in Neurology, 8(663), 2017-12,
4. Yoshii Y, Yoshimoto M, Matsumoto H, Tashima H, Iwao Y, Takuwa H, Yoshida E, Wakizaka H, Yamaya T, Zhang M, Sugyo A, Hanadate S, Tsuji A, Higashi T (2018) Integrated 64Cu therapy: a novel treatment for peritoneal dissemination with intraperitoneal radioimmunotherapy and PET-guided surgery. Oncotarget In press.

〔学会発表〕(計3件)

1. 田桑 弘之(招待講演)「同一のトレーサーによるタウ病変モデルのマルチスケールイメージング」第60回日本循環器学会学術総会
2. 田桑 弘之(教育講演)「PETと生体光イメージングの融合研究 覚醒マウスの脳機能測定」第12回小動物インビボイメージング研究会,
3. 田桑 弘之(招待講演)「PET技術と生体光イメージング技術の融合と脳疾患研究」JAEA放射光科学シンポジウム2016

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計1件)

名称:「四足動物保定装置」

発明者:正山、小橋、樋口、田桑、高堂、漆畑

権利者：量子科学技術研究開発機構
種類：特許願
番号：特願 2017-164080
出願年月日：2017年8月29日
国内外の別：国内

取得状況（計 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田桑弘之 (Hiroyuki Takuwa)
国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構・放射線医学総合研究所・脳機能イメージング研究部・研究員
研究者番号：40508347

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()