

平成 21 年 4 月 23 日現在

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2006～2008

課題番号：18390329

研究課題名（和文） 生体発光・磁気共鳴融合画像法の開発と腫瘍モデル動物実験への応用

研究課題名（英文） An integrated imaging approach to tumor model animals using bioluminescence imaging and magnetic resonance imaging

研究代表者

井上 優介（Inoue Yusuke）

東京大学・医科学研究所・准教授

研究者番号 40232566

研究成果の概要：生体発光画像法と磁気共鳴融合画像法の融合画像システムを開発し、本システムを腫瘍モデル動物実験に応用して、詳細な病態解析に有用なことを示した。さらに、融合画像の作成のために、生体発光画像法や磁気共鳴融合画像法によるマウス撮影法についても技術開発・改良を行い、蛍光画像法の併用技術も開発した。これらの成果は、新規治療法の前臨床試験の信頼性向上に有益と考えられた。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	2,500,000	750,000	3,250,000
2007年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2008年度	1,800,000	540,000	2,340,000
年度			
年度			
総計	6,300,000	1,890,000	8,190,000

研究分野：画像医学

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：光画像、磁気共鳴画像、融合画像、造血管腫瘍、マウス、ルシフェラーゼ、マルチモダリティイメージング、分子イメージング

## 1. 研究開始当初の背景

近年、腫瘍モデル動物実験への画像技術の応用が広がっている。画像技術を用いると、深部病変を含めて病変の量・分布を全身的に評価でき、方法によっては三次元的、定量的評価も可能である。同一個体を繰り返し測定できるため、その個体自身をコントロールとして使用することができ、実験の効率化、実験データの信頼性向上に寄与すると期待される。我々は、基礎医学の成果の臨床応用を促進するために、小動物イメージングを病態解明・新規治療戦略開発に活用するシステ

ムを確立することを目指している。

小動物実験では、光画像法が重要な画像技術の一つになっており、蛍光画像法に加えて、生体発光画像法が特に腫瘍モデル動物実験にはよく用いられる。ルシフェラーゼ遺伝子を安定発現する腫瘍細胞をマウスに移植して腫瘍モデル動物を作成し、このマウスにルシフェラーゼの基質であるルシフェリンを投与すると腫瘍細胞において生体発光を生じる。組織を透過した微弱な光を高感度 CCD カメラで撮影することにより全身の腫瘍の分布・量を反映した画像を体外から撮像する

ことができる。生体発光画像法を用いると、腫瘍細胞を非侵襲的・全身的・高感度に検出でき、信号の定量も可能である。しかし、解剖学情報に乏しいために罹患臓器の同定には困難を伴い、光の深部減衰のために定量指標の信頼性は必ずしも保証されない。同一マウスを磁気共鳴画像法で撮像して生体発光画像と対比すれば、罹患臓器の同定が容易になるとともに、測定される腫瘍・臓器の大きさが信頼性の高い定量指標となる可能性がある。

## 2. 研究の目的

複数の画像技術を組み合わせるマルチモダリティイメージングでは、それぞれの技術の長所を生かし、短所を補うことが可能である。本研究では、光画像法と磁気共鳴融合画像法を用いたマルチモダリティイメージングの研究を行った。特に、生体発光・磁気共鳴融合画像法を開発し、腫瘍モデルマウスを用いた動物実験に応用して有用性を検討することが主たる目的であった。この目的を達成するため、個々のイメージング技術の向上もはかった。

## 3. 研究の方法

(1) ルシフェラーゼ安定発現血液腫瘍モデル細胞をヌードマウスに静注して、血液腫瘍モデル動物を作成した。生体発光画像法と磁気共鳴画像法で病変進行を追跡した。生体発光画像法では全身の発光量を疾患重症度の定量指標として算出し、磁気共鳴画像では肝、脾の体積を定量指標とした。両画像法で撮像した後に速やかに臓器を摘出して臓器毎の発光を測定し、罹患臓器や重症度のスタンダードを得た。

(2) 融合に適した生体発光画像と磁気共鳴画像を収集するために、光画像と磁気共鳴画像の共通マウス固定ホルダーを作成、画像歪みの影響が少ない領域を使用する位置決め法、位置合わせのためのマーカー作成、画像拡大率調整と位置合わせの自動処理、三次元磁気共鳴画像と二次元光画像の融合表示法について検討し、融合画像システムを確立した。

確立したシステムについて、マーカーおよび皮下移植腫瘍を使用して位置合わせの精度を評価した。肝への腫瘍細胞直接接種モデルを融合画像法で追跡し、画像融合の有用性を検討した。

(3) 量子ドットを径静脈投与した後に蛍光画像を撮影し、細網内皮系の画像化を行った。血液腫瘍モデル動物に量子ドットを投与して同じ CCD カメラで生体発光画像と蛍光画

像を収集し、蛍光画像を参照して発光信号源、すなわち腫瘍罹患臓器を同定し、生体発光・磁気共鳴融合画像法の代替手法としての有用性を検討した。

(4) 血液腫瘍モデル細胞の異なるクローンをヌードマウスに静注して画像的に追跡し、疾患進行を評価した。また、血液腫瘍モデルマウスにイマチニブ、全身放射線照射による治療を行い、治療効果を追跡した。

(5) 融合画像による詳細な評価のためには、個々の画像の画質が高いことが必要である。画質改善について検討した。蛍光画像法では消化管内容物の強い自家蛍光が目的とする蛍光の検出を妨げる。自家蛍光を低下させるためにアルファルファ抜きエサが使用されるが、細網内皮系蛍光画像の検討で自家蛍光低下効果が不完全であった。より良好な自家蛍光低下を得るために精製エサの使用を検討した。

磁気共鳴画像でも消化管高信号が画質低下の原因になる。様々な食事前処置後に腹部磁気共鳴画像を撮像し、消化管信号低下効果を調べた。さらに、磁気共鳴画像で肝臓を評価するために肝胆道系造影剤 Gd-EOB-DTPA の使用について検討した。

(6) 生体発光画像法では通常基質を腹腔内投与するが、時に腸管内注入を生じて有意の信号が得られない。腸管内注入を生じたのか本当にルシフェラーゼ発現が少ないのかを判定するのは困難なことが多く、実験の信頼性に大きな問題を生じる。基質を皮下注して生体発光画像を収集し、腹腔内投与法と比較した。

(7) 磁気共鳴画像には静磁場不均一性や傾斜磁場の非直線性に由来する画像歪みがあり、正確な画像融合の妨げになる。小型三次元格子ファントムを作成しているいろいろな条件で撮影し、歪みを評価した。このデータに基づいて歪み補正を行うソフトウェアを開発した。マウスを二次元格子ファントムとともに撮影し、得られた歪み補正を適用して有用性を評価した。

## 4. 研究成果

(1) 血液腫瘍モデルマウスの病変進行を画像で追跡したところ、生体発光画像では経時的信号増強が観察され、磁気共鳴画像では肝脾腫や肝結節の出現と増悪を同一個体内で観察できた。死亡時の全身発光信号量はマウス間で同等であり、全身発光信号量は疾患重症度のよい指標と考えられた。磁気共鳴画像から測定した肝、脾の体積は湿重量と高い相関

を示し、生体発光画像による肝、脾信号量ともよく相関した。全身信号量との相関もみられ、磁気共鳴画像による肝、脾体積が疾患重症度の指標となることが示された。従来の方法では血液腫瘍モデルマウスの疾患重症度判定は難しく、本成果は血液腫瘍モデル動物実験における画像技術の有用性を示したものと国際的に評価された。さらに、画像融合により、生きたまま収集された生体発光画像について肝信号、脾信号、骨髄信号の弁別が改善され、一部のマウスでは卵巣信号を同定することができた。磁気共鳴画像、生体発光それぞれの画像歪みを評価したところ、躯幹部の評価には大きな問題にならないが、四肢の検討では位置ずれの原因になり得ることが示唆された。

(2) 決定・作成した共通マウス固定ホルダー、位置決め法、マーカーを用いて良好な光画像と磁気共鳴画像を収集できた。光画像も磁気共鳴画像も視野中心で歪みが少ないことを確認し、歪みが少ない領域で撮影する位置決め法を確立した。蛍光色素と造影剤を封入した点マーカーを作成し、光画像と磁気共鳴画像の双方で可視化できた。点マーカーの座標に基づいて自動的にピクセルサイズ調整および位置合わせを行って磁気共鳴画像の全スライスと生体発光画像を融合して表示するソフトウェアを作成した。

マウスに多数のマーカーをつけて蛍光画像法と磁気共鳴画像法で撮影して、位置合わせが良好に行えることを確認した。皮下移植腫瘍の発光と磁気共鳴画像上の腫瘍の位置はよく一致した。肝に腫瘍細胞を接種して生体発光・磁気共鳴融合画像で追跡すると、肝および腹腔内に結節を形成した。生体発光画像だけでは明かでなかった発光の由来臓器・病変が明らかになり、一方、磁気共鳴画像単独では指摘できなかった結節を指摘でき、判定の正しさが屠殺後に確認された。生体発光・磁気共鳴融合画像の腫瘍モデル動物実験における有用性・信頼性が示唆された。生体発光画像法は既に新規治療法評価に広く用いられており、本法は生体発光画像による評価の可能性をさらに広げると期待される。

(3) 量子ドット静注後に蛍光画像法で撮影すると、肝、脾、骨髄、リンパ節といった細網内皮系臓器が描出された。静注3時間程度で良好な細網内皮系画像が得られたが、28日後でも臓器同定は十分可能であった。量子ドットによる細網内皮系画像を参照することで、血液腫瘍モデル動物の罹患臓器の同定は容易になり、正しい判定が得られることが屠殺後の局所撮影で証明された。量子ドット投与は発光信号に影響しなかった。生体発光・蛍

光融合画像は CCD カメラだけで施行でき、撮影・処理に特別な物品・技術を必要としない。簡便な発光臓器同定法として有用と考えられた。この成果は学会発表および論文に加え、CCD カメラ製造メーカーからも広く紹介され、注目されている。

(4) 血液腫瘍モデル細胞の異なるクローンをヌードマウスに静注したところ、臓器間の分布には大きな違いはみられなかったが、進行速度は明らかに異なり、腫瘍遺伝子発現レベルとの関連が示唆された。使用した血液腫瘍モデル細胞はインビトロではイマチニブ感受性であったが、インビボではイマチニブ感受性はみられず、インビボ評価の必要性が確認された。

血液腫瘍モデルマウスに亜致死線量の全身放射線照射を施行したところ、軽度ながら生存期間が延長した。発光信号は照射直後は増加するものの、一時低下し、その後再度増加した。照射線量に関わらず同等の全身信号強度で死亡すること、照射後早期の信号量と生存期間はよく相関すること、効果の線量依存性は生存期間より信号量の方が明瞭なことから、治療効果の画像評価の有用性が示唆された。致死線量の全身放射線照射と骨髄移植を行ったところ、生存期間は大幅に延長し、死亡時の発光信号量は無治療の場合と同等であった。致死全身放射線照射単独では信号は低下したままで早期に死亡し、生体発光画像法で腫瘍死と治療関連死の鑑別が可能なが示唆された。培養細胞の放射線照射直後には、生細胞1個当たりの発光は増加し、マウスに照射した直後の信号増加は必ずしも生細胞数の増加を意味しないと考えられた。本成果は血液腫瘍に対する新規治療における生体発光画像法の有用性と注意点を実証したものである。

(5) 消化管自家蛍光はアルファルファ抜きエサ摂取後よりも精製エサ摂取後に低く、精製エサを使用すると少量の量子ドット投与で良好な細網内皮系画像が得られた。従来から多くの研究でアルファルファ抜きエサが使用されており、本研究の成果は様々な研究の質を上げることに貢献すると考えられる。

磁気共鳴画像における消化管高信号はジャガイモもしくはサツマイモを1日摂取させると明らかに軽減し、アーチファクトによる画質低下も少なくなった。磁気共鳴画像の腫瘍実験における有用性を向上させると期待される。絶食には消化管高信号低下効果はない一方、脂肪肝を生じた。前処置として絶食が行われることがあるが、有害無益と考えられた。Gd-EOB-DTPAを皮下注すると肝臓の描出が改善した。麻酔下では覚醒下と比べて信号増強効果が遷延することが示唆された。

(6) 皮下移植腫瘍マウスに基質を皮下注して生体発光画像を収集すると腹腔内投与後よりも強い信号が得られ、注射部位に組織障害はみられなかった。腹腔内投与で無信号になったマウスを除外すると、両投与法の信号はよく相関し、再現性は同等だった。腹腔内投与では腹膜播種や脾臓病変を過大評価することが示唆され、基質が血流を介さずに腹腔内病変に直接到達するためと考えられた。生体発光画像法における基質投与法として、腹腔内投与よりも皮下投与がすぐれていることが示唆された。生体発光画像法では、従来ほとんどの研究で基質腹腔内投与法が用いられており、本研究の成果は多くの研究に貢献する有益なものと考えられる。

(7) 磁気共鳴画像の視野辺縁領域で傾斜磁場の非直線性に由来すると思われる画像歪みがみられた。歪みの強さは撮像パラメータを変えても余り変わらなかったが、軽度のエコー時間依存性があった。このデータに基づいて補正を行う歪み補正ソフトウェアを用いて、独立して撮像した三次元格子ファントム画像やマウスとともに撮影した二次元格子ファントム画像の歪みを良好に除去することができ、歪み補正の信頼性とマウス画像の補正に適用可能なことが示唆された。ここで開発した方法を適用することは融合画像による複数の情報の比較検討の精度を向上し、マルチモダリティイメージングの有用性を増すと期待される。画像融合以外でも、磁気共鳴画像法による臓器・腫瘍の径・体積測定の精度を改善すると期待される。

#### 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 11 件)

Yusuke Inoue, Kiyoko Izawa, Shigeru Kiryu, Seiichiro Kobayashi, Arinobu Tojo, Kuni Ohtomo. Bioluminescent evaluation of the therapeutic effects of total body irradiation in a murine hematological malignancy model. *Exp Hematol*. 36:1634-41, 2008 (査読有)

井上優介、東條有伸．生体イメージング技術を用いた疾患モデルマウスの病態解析．*臨床血液* 49, 437-444, 2008 (査読無)

Yusuke Inoue, Kiyoko Izawa, Kohki Yoshikawa, Haruyasu Yamada, Arinobu Tojo, Kuni Ohtomo. In vivo fluorescence imaging of the reticuloendothelial system using quantum dots in combination with bioluminescent tumour monitoring. *Eur J*

*Nucl Med Mol Imaging* 34:2048-56, 2007 (査読有)

Yusuke Inoue, Kiyoko Izawa, Arinobu Tojo, Yukihiko Nomura, Rieko Sekine, Naoki Oyaizu, Kuni Ohtomo. Monitoring of disease progression by bioluminescence imaging and magnetic resonance imaging in an animal model of hematological malignancy. *Exp Hematol* 35:407-15, 2007 (査読有)

〔学会発表〕(計 12 件)

Yusuke Inoue. In vivo bioluminescence imaging in hematological malignancy. *Hwasun Molecular Imaging Symposium*, December 5, 2008, Hwasun

井上優介．光イメージング(シンポジウム)．第 27 回日本画像医学会、平成 20 年 2 月 22 日、東京

井上優介、東條有伸．生体イメージング技術を用いた疾患モデルマウスの病態解析(シンポジウム)．日本血液学会・日本臨床血液学会合同総会．平成 19 年 10 月 11 日、横浜

〔その他〕

ホームページ

<http://www.ims.u-tokyo.ac.jp/radiology/index.html>

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

井上優介 (Inoue Yusuke)

東京大学・医科学研究所・准教授

研究者番号：40232566

##### (2) 研究分担者

2006 年度および 2007 年度

東條有伸 (Tojo Arinobu)

東京大学・医科学研究所・教授

研究者番号：00211681

吉川宏起 (Yoshikawa Kohki)

駒澤大学・医療健康科学部・教授

研究者番号：10272494

増谷佳孝 (Masutani Yoshitaka)

東京大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：20345193

2008 年度

なし

##### (3) 連携研究者

2006 年度および 2007 年度

なし

2008 年度

東條有伸 (Tojo Arinobu)

東京大学・医科学研究所・教授

研究者番号：00211681

吉川宏起 (Yoshikawa Kohki)

駒澤大学・医療健康科学部・教授

研究者番号：10272494

増谷佳孝 (Masutani Yoshitaka)

東京大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：20345193