

科学研究費補助金研究成果報告書

平成 23 年 6 月 10 日現在

機関番号: 82502
研究種目: 基盤研究 (B)
研究期間: 2008~2010
課題番号: 20390333
研究課題名 微小採血及び無採血化を含む PET によるマウス神経受容体定量画像手法の構築
Quantitative neuroreceptor imaging for mice using PET: development of micro litter ordered blood radioactivity counting system and the technique to omit arterial blood sampling
研究代表者 木村 裕一 (Kimura Yuichi)
独立行政法人 放射線医学総合研究所・分子イメージング研究センター・チームリーダー
研究者番号 60205002

研究成果の概要

本科研費では、小動物に対する微小体積の血中放射能濃度測定システムの開発、及び無採血化のためのデータ処理で必要となる小動物からの陽電子断層撮影画像 (PET) データに対する雑音削除アルゴリズムの開発を行った。システム開発では、数 [μ L] の血液に対して、血漿の分離、血漿及び全血の体積の測定、放射能の測定を行うためのシステムを開発した。その結果製品として発売し得るレベルでの完成を見た。また、事後確率最大化規範に基づいた雑音除去アルゴリズムを開発し、その実用性を示した。

In this study, the methods for radioactivity counting system for micro-liter ordered blood were investigated. Also, the algorithm to omit arterial blood sampling was studied. For fully quantitative functional imaging using positron emission tomography (PET), the radioactivity concentration in arterial blood is required, and therefore, arterial blood sampling should be conducted. However, due to the small size in mice, the arterial blood sampling is an issue for PET quantitative measurement. This study aimed to realize quantitative PET functional imaging for mice, the system to measure radioactivity concentration in a few micro-liter arterial blood and the algorithm to reduce the noise in PET data derived from mice based on MAP estimation were investigated.

交付決定額

(金額単位: 円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	8,500,000	2,550,000	11,050,000
2009 年度	3,200,000	960,000	4,160,000
2010 年度	2,900,000	870,000	3,770,000
総計	14,600,000	4,380,000	18,980,000

研究代表者の専門分野 核医学, 分子イメージング, 医用画像処理
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 分子イメージング, 核医学, 脳, トランスレーショナルリサーチ, マウス

1. 研究開始当初の背景

マウスなどの小動物は、取り扱いが容易、遺伝子改変や病態のモデルが利用可能、ライフサイクルが短いことから、医学生理学領域での実験に広く使用されている。

一方陽電子断層装置 (Positron Emission Tomography; PET) を用いることで、神経受容体の濃度や代謝酵素の活性といった生体機能を *in vivo* の下で画像として撮影が可能であり、ヒトや大型動物に対する研究に活用され

ている。

しかし PET による定量撮影では、一般に対象組織に運搬される放射性薬剤の量を得るために全血及び血漿中の放射能濃度 ($[Bq/\mu L]$) の測定が必要となる。そのためには、採血、血漿分離、体積の測定、放射能の測定 ($[Bq]$) を実施しなければならない。しかしマウスではその体格が小さいために、1 回当りの採血量は数 $[\mu L]$ に限定されることから、マウスに対する血中放射能濃度の測定を困難にしている。

また、一般に PET 定量 PET 撮影ではボラス投与によって放射性薬剤が投与されるが、小動物では投与後の血中放射能濃度の変化が速いために、10 秒程度の短い間隔での採血が必要となる。

その結果、PET を使った定量解析で必要となる動脈血液中の放射能濃度の測定は事実上不可能であり、このために小動物に対する PET 定量撮影は用途が極めて限定されているのが現状であった。

2. 研究の目的

そこで本研究では、以下の 2 つのアプローチによって小動物に対する PET 定量撮影を実現するための手法の開発を目的とした。

一方は数 μL の血液の血中放射能濃度を測定するためのシステムの開発であり、他方は PET によって撮影された組織中の放射能濃度の経時変化 (組織放射能時間曲線; tissue time activity curve; tTAC) から血液中の放射能濃度の経時変化を推定するアルゴリズムの開発である。

3. 研究の方法

(1) 微小体積血中放射能濃度測定システム

数 μL の血液を対象とし、採血、血漿分離、体積測定、放射能の測定を行うためのシステム、Microfluidic Mouse Blood Counting System ($\mu FmPC$) を開発した。

$\mu FmPC$ では微小流体素子で使用されている精密微小加工技術を活用し、以下の仕様の実現を図った。

① 採血の最短間隔 小動物では体格が小さいために、投与直後の血中放射能の変化が速い。また PET 機能画像の撮影を正確に行うためには、血中放射能濃度曲線のピーク付近を正確に測定する必要がある。以上より、最短で 10 [sec] 間隔の採血が可能となるようシステムを構成した。

② 最長測定時間 PET の撮影時間は一般的に 90 [min] 程度であることから、少なくとも 90 [min] の測定が可能となるようシステムを構成した。特に $\mu FmPC$ では 90 [min] の撮影後に血漿を分離するための遠心分離を実施することから、凝血が発生しないように留意した。

③ 最大測定点数 投与直後は採血を頻繁に行う必要があることから、少なくとも 30 点以上の測定が可能となるようにシステムを構成した。

④ 血漿分離 数 μL の全血から血漿の分離が可能となるように、システム内で血漿分離が可能な構成とした。

⑤ 体積測定 数 μL の全血及び血漿の体積を直接測定するようシステムを構成した。

⑥ 放射能の測定 血液試料の体積は数 μL であることから、放射能も微小となる。従って、微小放射能の測定を考慮したシステム構成とした。

⑦ 小型化 測定システムの採血部は動物直近に設置可能となるように、十分な小型化を図った。

動物直近に採血部を設置することへの必要性は以下の通り。小動物を対象とするために、消費する血液はできるだけ少ない方が好ましい。従って動物から血液を導出するためのカテーテルは、短い方がカテーテル内に残留する血液が少なくなり、出血量の低減に寄与する。

また血液がカテーテルを通過する過程でカテーテル内に既に存在している血液と徐々に混合することで、放射能時間曲線の波形に歪みが発生する、いわゆる dispersion が問題となる。一般に dispersion は時間曲線の“鈍り”として観測されることから血中放射能濃度のピーク付近の形状が歪む。Dispersion は、血流が速いほど、また流路が短いほど影響は小さくなることから、カテーテルによる流路の抵抗を小さくし、また流路を短くするためには、採血部を小さく造ることでシステムを動物直近に設置し、短いカテーテルによって血液をシステムに導く必要がある。

⑧ システム 開発したシステムは、Fig. 1-(A) に示す円盤状の採血部に血液を保存した後、その上で血漿分離のための遠心分離を実施し、分離状況を市販のフラットベッドスキャナで撮影することで全血及び血漿の体積を、またイメージングプレートを使って放射能を測定するようになっている。

採血部はコンパクトディスクに似た寸法のアクリル樹脂製の円盤であることから CD-Well と呼ぶ。Fig. 1-(A) に示すように、表面には血液を保持するための溝が 10° 毎に合計 36 本刻まれている。Fig. 1-(B) に溝の拡大図を示す。溝には CD-Well の中心寄りに血液を投下するための投下孔が設けられており、U 字型の形状を描き、他端に開口している。この開口部は、遠心分離の際に溝内の空気の逃げ口となる。

血液投入孔及び流路の内壁面には親水性処理が施されている。また投入孔の断面は上に開いた楕円状となっている。従って血液を 1 滴投入孔に落とすことで、血液は自動的に溝の内部に進入する。

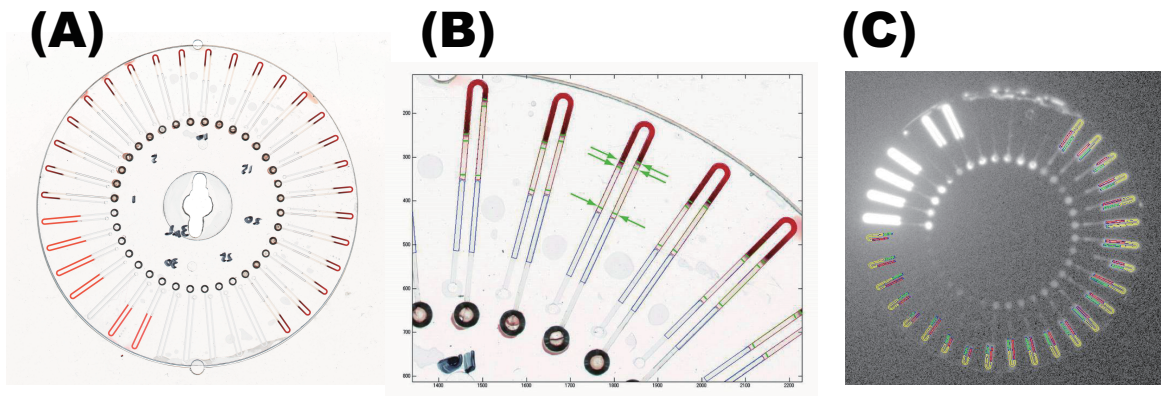


Figure 1: CD-Well とイメージングプレート

全ての採血が終了した後、CD-Well を遠心分離器に装着して回転させることで溝の内部で血漿を分離する。その状況は Fig. 1-B に示した。U 字型の流路の突き当りに比重の大きい血球が集まり、流路の中心側に血漿が分布していることが分る。

市販のフラットベッドスキャナによってこの状況を画像として取得し、画像上で血漿及び血球の境界を検出する。検出された境界線は図中の緑の矢印として示した。中心から順に、血漿の先頭、血漿と血球側の終点、血球の始点を示している。

溝は精密加工技術によって断面は幅 0.5 [mm]、深さ 0.2 [mm] の $\pm 10\%$ の精度の長方形となっていることから、検出点を元に血漿及び全血の部分の長さを得ることで、全血及び血漿の体積が測定できる。

続いて CD-Well をイメージングプレート上に置き、10 [min] 露光することで放射能に関するイメージングプレート上の画像 (Fig. 1-(C)) が得られる。ここに先に検出した血球・血漿の領域を重ねることで、血漿及び全血の放射能量が得られる。図では、検出された領域が赤及び黄色の領域として重ねて表示してある。

尚、流路のうち 3 ないし数本にはイメージングプレートの値を放射能値の変換するための検量線の作成のために、既知の放射能濃度を持つ溶液を投入する。Fig. 1-(A) の左下の 7 本の、赤色のインクが入っている流路がこれに該当し、Fig. 1-C では左上の 6 本の溝がこれに該当する。

Fig. 2 に CD-Well を使ったマウスからの採血の場をを示す。動物用 PET 装置のガントリー内に置いたマウスの下腿動脈に PE-10 カテーテルを挿入し、ここから動脈血を CD-Well まで導き出している。右手で保持した鉗子でカテーテルを閉塞・開放することで、CD-Well の血液投入口へ血液を投下する。CD-Well 自身は小型に設計されていることから、図のようにマウスの直近に設

置することが可能であり、従ってカテーテルは 15 [cm] 程度と十分短くすることができる。

(2) 雑音除去アルゴリズム

小動物からの PET データに対して、定量データ解析や血液放射能濃度曲線を推定するアルゴリズムを実行する際には、小動物 PET データに含まれる雑音の大きさが問題となる。小動物線用 PET では撮影対象のサイズを考慮して画素の体積が 1 ないし 2 [mm] の小体積となるように設定されていることから、画素に含まれる放射能が少なくなり、その結果、PET データの雑音が大きくなる。

そこで本研究では、MAP 推定に基づいたノイズ除去アルゴリズムを提案した。MAP 推定では、Bayes の定理によって事後確率 $p(C|\tilde{C})$ が先験確率 $p(C)$ と尤度 $p(\tilde{C}|C)$ の積に比例することを利用する。ここで C , \tilde{C} はそれぞれノイズを含まない真の PET データ及び、雑音を含む実測された PET データを表わす。従って事後確率を最大化するようなモデルパラメータを求めることで、モデルパラメータに対する先験的な情報と、測定の状況を表わす尤度とを共に最大とするような推定値を得ることができる。

PET では、投与された薬剤の組織における動態はコンパートメントモデルによって記述されることが知られており、

$$C(t) = \frac{K_1}{\alpha_2 - \alpha_1} \left\{ (k_3 + k_4 - \alpha_1) e^{-\alpha_1 t} + (\alpha_2 - k_3 - k_4) e^{-\alpha_2 t} \right\} \otimes C_P(t) \quad (1)$$

ここで

$$\alpha_1, \alpha_2 \triangleq \frac{k_2 + k_3 + k_4 \mp \sqrt{(k_2 + k_3 + k_4)^2 - 4k_2k_4}}{2} \quad (2)$$

である。 C , C_P はそれぞれ組織及び動脈血漿中での時間放射能曲線であり、 $K_1 \sim k_4$ は速度定数と呼ばれるモデ

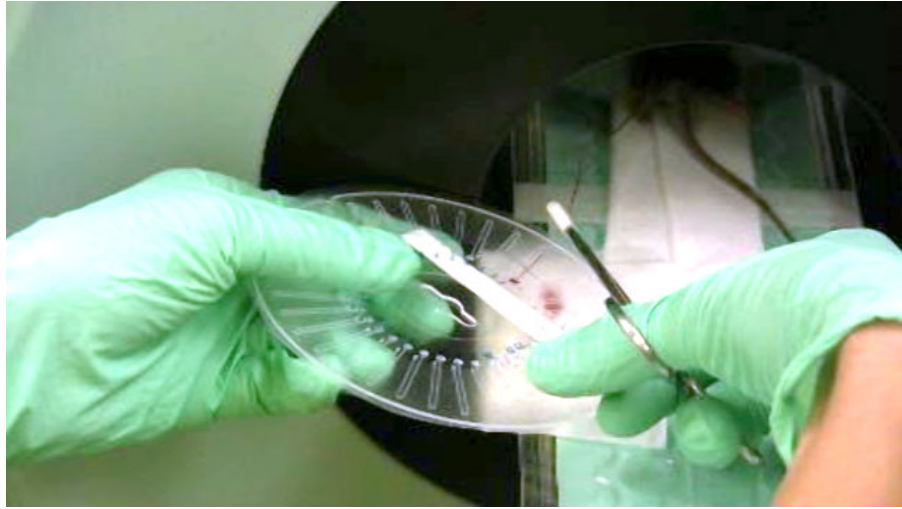


Figure 2: CD-Well を用いたマウスからの採血の実際

ルパラメータである。従って Eqn. 1 は、動脈血漿中の時間放射能曲線と組織放射能曲線との関係を示している。

先験確率 $p(C)$ としては、予め速度定数を先行研究から取得し、その範囲内で一様分布すると仮定して想定される速度定数の組を発生し、これと実測された C_P を Eqn. 1 に代入することで、想定された組織放射能曲線の組 $\{C\}$ を得る。

続いて $\{C\}$ を特徴量空間に投影した後、Gaussian 核を用いた Parzen 推定によって、 $\{C\}$ の特徴量空間での特徴点の密度として $p(C)$ を求めた。

速度定数は放射性薬剤の生化学的な特性を反映したものであり、新規の PET 製剤が公開された際に速度定数の値の範囲が通常記されている。そこで先験情報としてこれを使用する。

尤度関数 $p(\tilde{C}|C)$ の定義に当っては、PET データに対して知られているノイズモデル

$$p(C(\tilde{t}_j)|C(t_j)) = \mathcal{N}(C(t_j), \sigma^2(t_j)) \quad (3)$$

$$\sigma = \nu \sqrt{\frac{e^{\lambda t} C(t_j)}{\Delta_j}} \quad (4)$$

を採用する。ここで ν はノイズの大きさを規定するパラメータであり、提案アルゴリズムの中で推定される。 λ は使用する放射性同位元素の崩壊係数、 Δ_j は j 番目の PET 撮影における撮影時間である。

アルゴリズムは以下の通り。

- (1) 先験確率 $p(C)$ を求める。
- (2) ν の初期値として 5 を与える。
- (3) 現在の ν を用いて、尤度関数 $p(C|\tilde{C})$ を定義する。
- (4) $p(C)p(C|\tilde{C})$ が最大となるような先験確率を定義する \hat{C} を求める。

(5) $\tilde{C} - \hat{C}$ に基づいて ν を更新する。

(6) ν の変化が十分小さくない場合には (3) に戻る。

4. 研究の成果

(1) 微小血中放射能濃度測定

小動物に対する採血を選定とした仕様を満たすシステムを開発した。全血の血中放射能濃度を測定するシステムは既に存在するが、 μL 程度の血液に対して、血漿及び全血中の放射能濃度を測定するシステムは、本システムが最初のものである。開発システムをマウス 5 匹に対する ^{18}F -FDG を用いた測定に適用したところ、真の放射能濃度に対して $\pm 5\%$ の精度で放射能濃度の測定が可能となり、また投与直後の急峻な血中放射能濃度の変化を良く捉えることができた。

平均出血量は、30 回の採血に元で $287 [\mu\text{L}]$ となり、マウスの全血の 10% 以内に収まっている。また凝血によるトラブルは発生しなかった。

以上より、開発システムは性能的に実用に耐えうるものであると結論できる。

本システムを使用することによって、PET 定量撮影に不可欠である動脈血液中の放射能時間曲線が得られることから、これまで不可能であったマウスに対する PET 定量撮影が可能となり、病態モデルや遺伝子改変モデルを使った分子イメージング研究への寄与が期待できる。

今後は、採血の自動化を実現することで、より簡便かつ着実な小動物定量測定システムの実現を図る。

(2) 雑音除去アルゴリズム

Fig. 3 に、提案アルゴリズムによるノイズ除去の結果を示す。左のグラフはシミュレーションによる結果であり、黒線で示した真の時間放射能曲線に対して実測相当

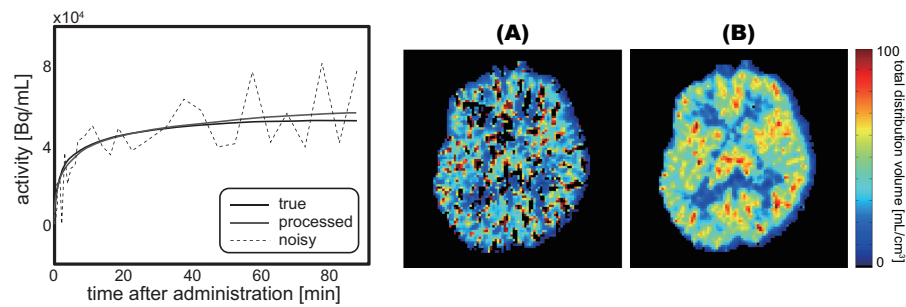


Figure 3: ノイズ除去の結果

の雑音を重畳した破線の曲線を作成し、これに提案アルゴリズムをかけた結果が灰色の曲線となる。雑音は良く除去されており、また真の時間放射能曲線と良く一致した結果が得られている。

σ_1 受容体プローブである ^{11}C -SA4503 を用いて撮影した臨床データに対して提案アルゴリズムを適用した結果が (A) と (B) である。いずれも Logan plot を用いて、神経受容体の濃度を反映する総分布体積の画像を計算したものである。(A) は雑音除去を行わなかった場合の画像であり、PET データの含まれる雑音のために神経受容体濃度画像には雑音を含むものとなっており、また、雑音による過小評価が現れている。しかし雑音除去を行った (B) では、画像中の雑音も良く抑制されており、また過小評価も改善されている。

以上より、提案アルゴリズムは雑音除去に対して十分な性能を持つと考えられる。今後は、既存の採血省略アルゴリズムを適用することで、小動物に対する動脈採血省略の可能性を検討する必要がある。

5. 主な発表論文など

(1) 雑誌論文 (計 2 件)

- ① 星野 直輝, 本谷 秀堅, 坂口 和也, 坂田 宗之, 石渡 喜一, 木村裕一, “パラメトリック固有空間を利用した PET 動態データの雑音除去”, *Med Image Tech*, 査読有り, 28, 2010, pp. 362–370.
- ② 外山 宏, 旗野 健太郎, 鈴木 弘美, 工藤 元, 野村 昌彦, 山田 貴司, 木村 裕一, 市瀬 正則, 澤田 誠, “小動物における定量的画像解析”, 25, pp. 50–57, 脳循環代謝, 2010.

(2) 学会発表 (計 9 件)

- ① Naoki Hoshino, Hidekata Hontani, Kazuya Sakaguchi, Muneyuki Sakata, Kiichi Ishiwata, Yuichi Kimura, “MAP-based Denoising of Dynamic PET Data for Quantitative Receptor

Imaging”, *Conference of Biomedical Applications in Molecular, Structural, and Functional Imaging (Conference 7965)*, SPIE Medical Imaging 2011, Orland, FL, USA, 12–17, Feb, 2011, pp. 7965–7943.

- ② 木村 裕一, 橋爪 宣弥, 関 千江, 脇坂 秀克, 西本 尚弘, 北村 圭司, 菅野 巖, “小動物血液血漿分離・放射能濃度測定システム”, *核医学*, 47, 2010, pp. JSNM-OSIX0103, 第 50 回日本核医学会学術総会, 11/11–13, さいたま市.
- ③ N Hashidume, Y Kimura, C Seki, H Wakizaka, T Nishimoto, K Kitamura, I Kanno, “Micro-liter Order Blood Sampling System for Small Animal Molecular Imaging Using PET — Validation with Animal Study —”, *Proceedings of 2010 World Molecular Imaging Congress*, p. P0331B, Kyoto, Japan, 8–11, Sep, 2010.
- ④ 星野 直輝, 本谷 秀堅, 坂口 和也, 坂田 宗之, 石渡 喜一, 木村裕一, “パラメトリック固有空間を利用した PET 動態データの雑音除去”, 第 29 回日本医用画像工学会大会, p. OP5-1, 東海大学伊勢原キャンパス, 伊勢原市, 神奈川, 2010.7.30–31.
- ⑤ 橋爪 宣弥, 木村 裕一, 関 千江, 脇坂 秀克, 西本 尚弘, 北村 圭司, 菅野 巖, “小動物 PET 用微量採血装置の開発 — 動物実験による全血及び血漿中放射能濃度測定系の評価 —”, *日本分子イメージング学会機関誌*, 3, p. 44, 日本分子イメージング学会 第 5 回総会・学術集会, 大津市, 2010.5.22–23.
- ⑥ 星野 直輝, 本谷 秀堅, 長縄 美香, 坂口 和也, 坂田 宗之, 石渡 喜一, 木村 裕一, “PET 受容体解析法 MA1 の計測データの誤差分布特性に基づく改善の試み”, *信学技報*, pp. 7–12, MI2009–76, 電子情報通信学会 医用画像研究会, 那覇, 2010.1.27–28.
- ⑦ Y Kimura, N Hashizume, T Nishimoto, K Kitamura, I Kanno, “Development of Mi-

crofluidic Plasma Counting System for Small Animal Molecular Imaging Using PET — Measurement of Small Radioactivity Concentration —”, *Proc 2009 World Molecular Imaging Congress*, p. 1172, Sep 23–26, 2009, Montreal, Canada.

⑧ M Hashidume, Y Kimura, T Nishimoto, K Kitamura, I Kanno, “Development of Microfluidic Plasma Counting System for Small Animal Molecular Imaging Using PET — Principle Validation for Blood Transportation System —”, *Proc 2009 World Molecular Imaging Congress*, p. 1158, Sep 23–26, 2009, Montreal, Canada.

⑨ 木村 裕一, 関 千江, 橋爪 宣弥, 西本 尚弘, 北村 圭司, 菅野 巖, “小動物用微少容量採血・血漿分離システムの開発—遠心分離システムへの血液の移行性の検討—”, 第2回日本分子イメージング学会総会・学術集会予稿集, 日本分子イメージング学会, 2009.5.14–15, 2009, 千代田区, 東京.

(3) 産業財産権 (計 5 件)

① “測定システム”, 発明者: 木村 裕一, 橋爪 宣弥, 北村 圭司, 西本 尚弘, 関 千江, 菅野 巖, 権利者: 同上, 特許, 国内, 特願 2010-068152, PCT/JP2010/007603. 2010/12/28 出願.

② “測定システム”, 発明者: 木村 裕一, 橋爪 宣弥, 北村 圭司, 西本 尚弘, 関 千江, 菅野 巖, 権利者: 同上, 国内, 特願 2010-68151, PCT/JP2010/007602, 2010/10/28 出願.

③ “Measuring Apparatus, and Liquid Collecting and Measuring System Having the Same”, 発明者: Yuichi Kimura, Keishi Kitamura, Takahiro Nishimoto, Chie Seki, Iwao Kanno, 権利者: 同上, 特許, PCT 国際出願番号: PCT/JP2008/050803. EU 特許申請識別番号: 087036471. EU 特許公開: 2010/10/13. USA 特許申請番号: 12/863,968, 国外, 2010.6.

④ “液体採取装置、測定装置並びにそれらを備えた液体採取測定システム”, 発明者: 木村 裕一, 橋爪 宣弥, 北村 圭司, 西本 尚弘, 関 千江, 菅野 巖, 権利者: 同上, 特許, 国内, PCT/JP2008/050803, 2008/1/22 出願, 2009/7/30 公開.

⑤ “遠心分離装置”, 発明者: 木村 裕一, 橋爪 宣弥,

北村 圭司, 西本 尚弘, 関 千江, 菅野 巖, 権利者: 同上, 特許, 国内, 特願 2009-227513, 2009/9/30 出願.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

木村 裕一, Kimura Yuichi, 独立行政法人 放射線医学総合研究所・分子イメージング研究センター・チームリーダー, 研究者番号: 60205002.

(2) 研究分担者

外山 宏, Toyama Hiroshi, 藤田保健衛生大学・医学部・放射線医学教室・准教授, 研究者番号: 90247643.

北村 圭司, Kitamura Keishi, (株) 島津製作所・基盤技術研究所・課長, 研究者番号: 30395941.

(3) 連携研究者

樋口 真人, Higuchi Makoto, 独立行政法人 放射線医学総合研究所・分子イメージング研究センター・チームリーダー, 研究者番号: 10373359.

志田原 美保, Shidahara Miho, 独立行政法人 放射線医学総合研究所・分子イメージング研究センター・研究員, 研究者番号: 20443070.

本谷 秀堅, Hontani Hidekata, 名古屋工業大学・工学系研究科・教授, 研究者番号: 60282688.

関 千江, Seki Chie, 独立行政法人 放射線医学総合研究所・分子イメージング研究センター・研究員, 研究者番号: 40443080.

西本 尚弘, Nishimoto Takahiro, (株) 島津製作所・基盤技術研究所・部長.

和田 康弘, Wada Yasuhiro, 独立行政法人 理化学研究所・分子イメージング科学研究センター・副チームリーダー.

(4) 研究協力者

長縄 美香, Naganawa Mika, 独立行政法人 放射線医学総合研究所・分子イメージング研究センター・研究員, (H19~H20).

坂口 和也, Sakaguchi Kazuya, 独立行政法人 放射線医学総合研究所・分子イメージング研究センター・研究員, (H19~H20)

以上