

平成 22 年 6 月 2 日現在

研究種目：若手研究 (B)
研究期間：2008～2009
課題番号：20700371
研究課題名 (和文) 磁気共鳴拡散イメージング法による実験動物の非侵襲的神経画像解析法の確立
研究課題名 (英文) Establishment of noninvasive neuroimaging analysis in experimental animals by using diffusion weighted magnetic resonance imaging.
研究代表者
山田 雅之 (MASAYUKI YAMADA)
藤田保健衛生大学・医療科学部・准教授
研究者番号：40383773

研究成果の概要 (和文)：

拡散 MRI を用いた実験小動物の非侵襲的神経画像解析法の確立を目的とした。本課題では、まず正常神経路の描出法としてマンガン造影 MRI を最適化し、次いで拡散テンソル MRI による神経変性の検出について研究した。結果、マンガン造影 MRI では小型霊長類実験動物の正常な網膜神経投射を生体のまま視覚化することに成功し、拡散テンソル MRI では得られた各種拡散異方性インデックスに神経変性に対する高い検出能を認めた。本研究成果から拡散 MRI の非侵襲的神経画像解析法としての有用性が強く示唆された。

研究成果の概要 (英文)：

The purpose of this study was to establish a noninvasive imaging analysis for detecting neural degeneration in the experimental animals by using magnetic resonance (MR) imaging. In this study, manganese enhanced MR imaging was optimized as a tool to depict the normal neural pathways in non-human primates *in vivo*. Furthermore, diffusion tensor MR imaging was performed to detect the degeneration on the retinal projection pathways of the animals. Results of this study suggest that diffusion weighted MR imaging is a useful tool for noninvasive neuroimaging analysis in the experimental animals.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	2,500,000	750,000	3,250,000
2009 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：統合領域

科研費の分科・細目：実験動物学・実験動物学

キーワード：動物実験技術

1. 研究開始当初の背景

実験小動物を対象とした神経病態画像解析研究では、各種病理組織染色像の光学顕微鏡観察、さらには電子顕微鏡を駆使した神経微細構造変性の解析など、*ex vivo* レベルでの解析手法が主要な動物実験技術であった。これら組織病理学的神経病態解析手法では、極めて微細な神経構造の観察が可能であり、特に電子顕微鏡については単一の細胞や神経軸索に着目した病態解析が可能であった。

このような高い有用性をもつ組織病理学的神経病態解析手法の欠点は、対象動物を生体のまま観察することが極めて困難な点であった。また、それに伴い同一動物の経時的な観察が不可能であり、このために多くの対象動物が必要であった。

対象動物を *ex vivo* で扱わざるを得ない、すなわち生体での観察が困難な従来型の組織病理学的神経解析手法では、近年強く求められる動物実験の 3R のうち、実験動物の削減 (reduction) と実験内容の改善 (refinement) への対応には限界があった。

2. 研究の目的

実験小動物を対象とした超高磁場の磁気共鳴画像法 (以下、MRI) が国内でも利用可能となり、その原理的特性から実験小動物の非侵襲神経画像解析における有用性が期待される。本研究では、拡散 MRI や MEMRI など近年考案された種々の MRI 撮像法を実験小動物の神経画像解析に適用することにより、従来の組織病理学的解析手法に迫る感度を有し、かつ非侵襲的に神経病態の経時的観察と定量解析が可能な動物実験技術を確立することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) MEMRI による正常神経路の機能的描出

実験小動物を対象とした神経病態の画像解析法を確立するためには、正常な神経路の形態的所見のみならず、その機能性についても視覚化する必要がある。そこで本研究課題においては、Mn²⁺の優れたプロパティ、すなわち①Ca²⁺電位チャネルから細胞内に取り込まれる、②軸索輸送性を有する、③MRIにおいて容易に検出可能、などを利用した MEMRI による正常神経路の描出について、小型霊長類コモンマーモセットの視神経を対象にした最適化を試みた。

使用装置は実験小動物専用超高磁場 MRI (PharmaScan70/16, 7.0T, BrukerBiospin) に内径 60mm の RF 送受信コイルを組み合わせ、イソフルレン麻酔下で塩化マンガン水溶液の眼球内投与と経時的撮像を実施した。方法の詳細は、主な発表論文等欄に記載の[1]および[2]に示す。

(2) 拡散異方性インデックスによる神経変性病態の検出と定量評価

コモンマーモセットの片側視神経に作出したびまん性の神経変性病態を、拡散テンソル MRI 法にて撮像し、その画像データから各種拡散異方性インデックスを算出した。また、組織病理学的解析手法と比較検証を行うため、髄鞘染色法およびニューロフィラメント染色法を施した対象視神経のパラフィン薄切標本の光学顕微鏡所見、および両側視神経の電子顕微鏡所見と対比した。

拡散異方性インデックスの算出には、拡散 MRI データのテンソル解析によって得られる空間座標軸 (X, Y, Z) に関連する水分子拡散の固有値 λ を使用し、その値が $\lambda_1 > \lambda_2 > \lambda_3$ となるものについて、以下の式を用いた。

Fractional anisotropy (FA)

$$FA = \frac{1}{2} \sqrt{2} \sqrt{\frac{(\lambda_1 - \lambda_2)^2 + (\lambda_2 - \lambda_3)^2 + (\lambda_3 - \lambda_1)^2}{\lambda_1^2 + \lambda_2^2 + \lambda_3^2}}$$

Relative anisotropy (RA)

$$RA = \frac{1}{2} \sqrt{2} \sqrt{\frac{(\lambda_1 - \lambda_2)^2 + (\lambda_2 - \lambda_3)^2 + (\lambda_3 - \lambda_1)^2}{(\lambda_1 + \lambda_2 + \lambda_3)^2}}$$

Volume Ratio (VR)

$$VR = 1 - 27 \frac{\lambda_1 \cdot \lambda_2 \cdot \lambda_3}{(\lambda_1 + \lambda_2 + \lambda_3)^3}$$

Linear diffusion case (CI)

$$CI = \frac{\lambda_1 - \lambda_2}{\lambda_1 + \lambda_2 + \lambda_3}$$

Planar diffusion case (Cp)

$$Cp = \frac{2(\lambda_2 - \lambda_3)}{\lambda_1 + \lambda_2 + \lambda_3}$$

Axial anisotropy (Am)

$$Am = \frac{\lambda_1 - (\lambda_2 + \lambda_3)/2}{\lambda_1 + \lambda_2 + \lambda_3}$$

また、見かけ上の拡散係数である apparent diffusion coefficient (ADC)については、次式から算出した。

$$ADC = \frac{\lambda_1 + \lambda_2 + \lambda_3}{3}$$

これら各種拡散異方性インデックスの値について、左右視神経における比較および経時的評価を行い、健常側および変性側の組織病理学的解析所見との検証により、視神経軸索レベルのびまん性神経変性に対する拡散MRIの感度や有用性、さらに臨床的有用性についても考察した。

4. 研究成果

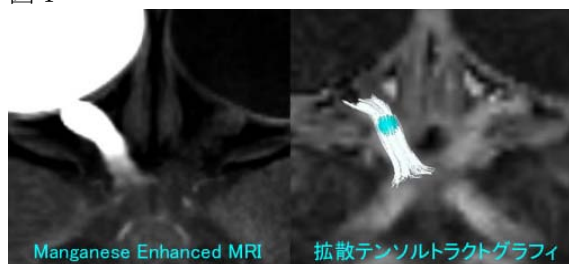
(1) MEMRIによる正常神経路の機能的描出
脳神経科学研究やトランスレーショナルリサーチにおいて重要な役割が期待される小型霊長類コモンマーモセットの視神経路にMEMRI法を適用し、ヒトに類似の視覚伝導路を描出する事に成功した。

従来マウスやラットといった齧歯類実験小動物に利用されてきた本法を霊長類実験動物についても適応できたことにより、本法の有用性や用途が高まった。本研究成果の詳細と本法の応用成果を主な発表論文等欄に記載の[1]および[2]に示す。

MEMRI法の応用によりヒトに類似したコモンマーモセットの視覚伝導路について、その形態情報のみならず、網膜神経細胞の活動やその軸索輸送性といった神経機能に関する情報の視覚化にも成功した。

本研究成果は、実験小動物の神経画像解析における有用な動物実験技術として、拡散テンソル tractography と共に今後の実験動物画像解析研究の発展に寄与するものと考えられる (図1)。

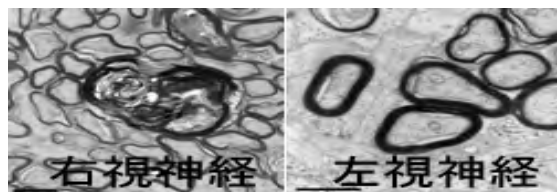
図1



(2) 拡散異方性インデックスによる神経変性病態の検出と定量評価

病理染色像の光学顕微鏡解析、および電子顕微鏡像の所見から、コモンマーモセットの右側視神経にびまん性の軸索変性を主体とする中等度のワーラー変性を認めた (図2)。

図2



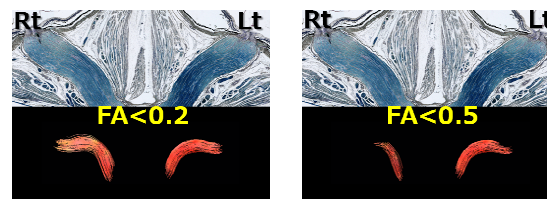
この片側視神経変性モデルについて、拡散テンソルMRI解析から得られたFA, RA, VR, CL, および Am では、健常側との明らかな差が認められ、特に VR の有用性が示された。結果の一例を表1に示す。

表1

	拡散異方性インデックス			
	変性前		変性モデル	
	Lt	Rt	Lt	Rt
$\lambda 1$	1.11	1.12	1.07	1.03
$\lambda 2$	0.35	0.35	0.31	0.50
$\lambda 3$	0.25	0.26	0.24	0.39
D(ADC)	0.57	0.58	0.54	0.64
FA	0.69	0.69	0.70	0.49
RA	0.48	0.48	0.49	0.31
VR	0.48	0.48	0.50	0.23
CL	0.44	0.45	0.47	0.28
Am	0.47	0.48	0.49	0.30
CP	0.12	0.10	0.10	0.11

本結果は、拡散MRIの応用である拡散テンソル法やその解析により得られる拡散異方性インデックスが神経病態検出において有用であることを明示した。また、この研究成果は拡散テンソルMRI法を用いた神経路描出法 (拡散テンソル tractography) の stop criterion (追跡描出の停止に関する閾値) を正確に決定する上で、特に重要であることを示した (図3)。拡散テンソル tractography はすでに臨床でも利用されており、この成果は実験動物のみならずヒトへも応用可能と考えられる。

図3



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 2 件)

①[1]M. Yamada, S. Momoshima, Y., Y. Masutani, et.al. , Diffusion-tensor neuronal fiber tractography and manganese-enhanced MR imaging of primate visual pathway in the common marmoset: preliminary results. Radiology. 2008 Dec;249(3):855-64.

(査読有)

②[2]山田雅之, 疋島啓吾, 藤吉兼浩, 他, マンガン神経トレーシング法 (MEMRI tract-tracing) による霊長類視覚伝導路の描出と網膜神経分布の解析, 日本磁気共鳴医学会雑誌 29 巻 1 号 Page23-29, 2009 年

(査読有)

[学会発表] (計 3 件)

①山田雅之, 他, 拡散テンソル MRI の解析から得られる各種異方性インデックスを用いた変性神経組織の病態検出に関する検討, 第 37 回日本磁気共鳴医学会大会, 2009 年 10 月 2 日, 横浜市

②山田雅之, 基礎医学研究における MRI の応用-神経路画像解析法の有用性, 第 9 回 東京臨床脳画像解析研究会, 2009 年 6 月 13 日, 東京都

③山田雅之, 他, マンガン神経トレーシング法 (MEMRI tract-tracing) による霊長類視覚伝導路の描出と網膜神経分布の解析, 第 36 回日本磁気共鳴医学会大会, 2008 年 9 月 12 日, 旭川市

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山田 雅之 (MASAYUKI YAMADA)

藤田保健衛生大学・医療科学部・准教授

研究者番号: 40383773