

研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2008 ～ 2009
 課題番号：20790884
 研究課題名（和文） 生体内水分子の拡散に基づいた生体組織微小構造および細胞膜機能の可視化に関する研究
 研究課題名（英文） Visualization of microscopic structure and cell membrane function based on diffusion of water molecule in biological tissue
 研究代表者
 今江 禄一（IMAE TOSHIKAZU）
 東京大学・医学部附属病院・診療放射線技師
 研究者番号：80420222

研究成果の概要（和文）：本研究では磁気共鳴画像装置より非侵襲的に得られる生体内水分子の拡散情報を用いて、生体内水分子の細胞膜透過率ならびに細胞内拡散係数を推定する方法を提案し、健常ヒトおよび脳梗塞ラットの脳皮質の細胞膜透過率を推定した。推定された細胞膜透過率は健常ヒトでは $76 \pm 9 \mu\text{m}/\text{sec}$ 、脳梗塞ラットの梗塞部では $58 \mu\text{m}/\text{sec}$ であり、細胞膜透過率は梗塞部で低下する傾向があった。これは脳梗塞による損傷が細胞膜機能の低下を引き起こす要因であると考えた。

研究成果の概要（英文）：The signal intensity of diffusion-weighted imaging is sensitive to the intra- and extracellular diffusion coefficient of water and cell membrane permeability. We proposed a method to estimate noninvasively the membrane permeability and intracellular diffusion coefficient. The estimated membrane permeability of normal human brain and infarcted rat brain were $76 \pm 9 \mu\text{m}/\text{sec}$ and $58 \mu\text{m}/\text{sec}$, respectively. The result indicates that injury due to the cerebral infarction causes the decline of the cell membrane function.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2009年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
年度			
総計	1,900,000	570,000	2,470,000

研究分野：医歯薬学

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：MRI, 拡散, 生体内水分子, 細胞膜機能, 可視化

1. 研究開始当初の背景

拡散現象は粒子、熱、運動量、エネルギーなどが分子のランダムな熱運動（ブラウン運動）によって高い部分から低い部分へと自発的に散らばり、均一な定常状態へと向かう物理現象である。磁気共鳴画像（magnetic

resonance imaging : MRI) 装置を用いた拡散強調画像 (diffusion weighted imaging) は生体内水分子の拡散を反映した画像を得ることが可能であり、臨床現場では超急性期脳梗塞の診断等でその有用性が確立している。図 1(a), (b) に健常ラットの T1 強調画像および脳梗

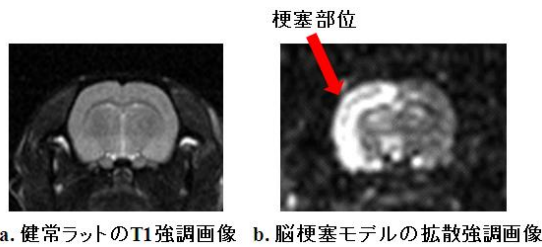


図 1 健康・脳梗塞を生じたラットの拡散強調画像

塞を生じたラットの拡散強調画像を示す。図 1 (b) に示すように、梗塞が生じた脳組織では見かけの拡散係数 (apparent diffusion coefficient: ADC) が上昇し、梗塞領域は高信号を示していることがわかる。拡散 MRI 信号は磁気共鳴信号の収集に同期させて空間的に磁場強度が変化する一対の拡散傾斜磁場 (motion probing gradient: MPG) を印加することによって、測定試料に含まれる水の拡散係数 D (diffusion coefficient) に依存する信号強度を得ることができる。MPG の条件と信号強度との関係は以下の式によって示される。

$$\ln(S(b)/S(0)) = -b \cdot D \quad (1)$$

ここで、 $S(b)$ は MPG 印加時の信号強度、 $S(0)$ は MPG 印加なし時の信号強度で、 b は MPG 強度を示す係数で以下の式によって示される。

$$b = \gamma^2 G^2 \delta^2 (\Delta - \delta/3) \quad (2)$$

ここで、 γ は磁気回転比、 G は MPG 強度、 δ は MPG のパルス幅、 Δ は二つの MPG パルスの時間間隔である。式 (1) は、信号強度の対数が MPG の強度因子 b に対して直線的に減少することを示すが、これは溶液のように一様で拡散障壁を持たない系でのみ成立する。一方、生体内水分子の拡散は細胞膜や微小構造に影響を受けた制限拡散であり、強度因子 b に対する信号減衰は式 (1) のような線形性を示さない。過去の拡散 MRI の研究では、主に生体内水分子の実効的な拡散係数の計測に焦点が向けられ、微小構造や細胞膜透過率がどのように拡散 MRI 信号へ影響を及ぼすかについては十分に明らかにされていない。微小構造および細胞膜透過率による拡散 MRI 信号への寄与を、定式化もしくは数値解析により予測することが可能となれば、細胞膜透過率や細胞の形状などの未知のパラメータが評価可能となると期待できる。現在、生体内水分子から得られる拡散 MRI 信号と生体組織内の拡散パラメータの関係を特徴付ける様々な物理モデルが提案されており、拡散 MRI 信号と細胞内の拡散パラメータの関係を示すには数値解析が有用であることが知られている。これまで我々は、有限差分法を用いた数値解析 (シミュレーション) を用いて、細胞膜透過率や細胞内拡散係数が拡

散 MRI の信号にどのように影響するのかを明らかにするとともに、高い解析精度を得るための条件を明らかにした。

一方、過去の細胞膜透過率評価では、ラットの肝細胞膜透過率: $18 \mu\text{m}/\text{sec}$ (単シリコン層フィルタリング遠心分離システム, 4°C)、カエルの卵母細胞膜透過率評価: $2.7 \mu\text{m}/\text{sec}$ (拡散 MRI)、ラットの上皮および内皮を混合した試料の細胞膜透過率: $75.7 \mu\text{m}/\text{sec}$ (放射性同位元素: トリチウム, 37°C) と評価されており、生体組織内の細胞膜透過率はおおよそ $1 \mu\text{m}/\text{sec}$ から $100 \mu\text{m}/\text{sec}$ であると考えられている。しかしながら、いずれの手法も *in vitro* であり、測定手法や対象とする細胞、温度などの測定環境に依存して変動すると考えられる。また、*in vitro* による細胞膜透過率評価では、生命を維持した状態で生体組織に含まれる細胞とは異なる膜透過率を有している可能性があることから、生体内組織中の細胞膜透過率を非侵襲的に評価する手法の確立が期待されている。

2. 研究の目的

これまで我々は細胞膜透過率が未知の試料について、拡散 MRI 測定の結果と数値解析の比較をもとに細胞膜透過率を推定する手法を提案し、培養した白血球を用いてその手法の有効性を示した。また、健康ラットに対して同手法を適用し、*in vivo* にラットの脳細胞膜透過率が推定可能であることを確認した。本研究では開発した方法を健康ヒトの脳組織に応用させること、また、ラットを用いて疾患時の構造変化と細胞膜透過率の関係を明らかにすることを研究期間内の目標とした。

3. 研究の方法

(1) 申請者はこれまでにテスト試料および健康ラットの脳細胞 (皮質) における細胞膜透過率評価を以下の手順で行った。

- ① MRI 装置を用いてテスト試料および健康ラットの脳の拡散 MRI 信号を収集した。
- ② 細胞内拡散係数 D_{int} と細胞膜透過率 P が未知のパラメータとなることから、これらの値を変数として有限差分拡散シミュレーションを行った。
- ③ シミュレーションから求められた拡散 MRI 信号値と MRI 装置を用いた実測値との差を評価する評価関数を以下のよう

$$F = \sum_i (S_{\text{sim}}(b_i, P, D_{\text{int}}) - S_{\text{exp}}(b_i))^2 \quad (3)$$

ここで、 b_i は評価点、 S_{sim} はシミュレーションにより求められた信号値、 S_{exp} は実験により得られた信号値である。

- ④ 評価関数が最小値となるような細胞内

拡散係数と細胞膜透過率を検索し、対象試料の細胞内拡散係数と細胞膜透過率を非侵襲的に推定した。

引き続き本研究では、提案した方法で健常ヒトの脳皮質の細胞膜透過率評価を行った。

対象部位は呼吸による動きがなく比較的固定しやすい頭部とし、測定対象の組織は脳細胞（皮質）とした。対象は20代の健常な成人3名、右利き左利きは問わず、男女も問わなかった。人体に対し拡散MRI検査を施行するため、倫理審査委員会の承認を得た上、被検者には説明と同意（インフォームド・コンセント）を行い、撮像条件は安全を考慮した条件の下で実験を行った。被検者にはインフォームド・コンセントの後、耳栓をしてもらい、MRI装置の診断に横たわってもらった。頭部を固定し、ナースコールを渡し、初期位置の設定を行った。続いて、位置決め撮像、拡散強調画像の収集を行った。収集シーケンスは、スピネコー系のエコープラナーイメージング（echo planar imaging : EPI）を用い、TR = 5500 ms, TE = 61.9-111.4 ms, FOV は 21 cm, マトリクスは 256×256, スライス厚は 5 mm, バンド幅は 250 kHz, 加算回数は 16回, b 値は 0-4500 sec/mm²の間で 500 sec/mm² ステップになるように設定した。MPG は 3 軸に適應した。各 b 値において、撮像時間は約 5 分であった。15 枚の拡散強調画像が再構成され、MPG あり画像 $S(b)$ と MPG なし画像 $S(0)$ より、信号値 $\ln(S(b)/S(0))$ と ADC を求めた。得られた信号値の画像から、C 言語を用いた解析プログラムより中心前回の灰白質に関心領域 (4.8×4.8×5 mm³) を設定し、 b 値に対する信号値のスペクトルを得た。

シミュレーションは有限差分法による拡散 MRI シミュレーションを用いた。2次元の細胞モデルとし、細胞1つの大きさは 18×18 μm², 信号を収集する細胞配列は 8×8 配列、細胞内:細胞外体積比は 78:22, 細胞外拡散係数 D_{ext} は 1.4×10⁻³ mm²/sec とした。MPG は x 方向に印加したものとし、最大 MPG 強度は $G = 46.3$ mT/m, MPG パルス幅 δ および MPG パルス時間間隔 Δ はそれぞれ $\delta = 25$ ms, $\Delta = 50$ ms とした。シミュレーションの空間間隔は $\Delta x = 0.5$ μm, 時間間隔は $\Delta t = 40$ μs とし、数値計算による拡散 MRI 信号を予測した。評価関数は式 (3) を用い、評価関数が最小値となる細胞内拡散係数 D_{int} と細胞膜透過率 P を推定した。

(2) 病態による細胞膜機能の変化の計測を行うため、本研究では疾患の一例として動物実験において脳梗塞モデルを作成し、拡散の計測およびパラメータの解析を行った。対象はオスの Wistar ラット (12~15 週齢, 体重 250~330 g) を用いた。飼料ならびに水は自由に得られ、健康を保った状態であるべくストレ

スのない環境下で飼育した。また、ラットの内頸動脈より塞栓子を挿入して血流を遮断することにより、脳梗塞を作成した。拡散 MRI 信号の収集時には呼吸による動きのアーチファクトを軽減するため、筋弛緩剤投与に加え人工呼吸機による呼吸制御を行った。MRI 装置は 4.7T UNITY INOVA imaging spectrometer を、パルスシーケンスは STEAM (stimulated echo acquisition mode), MPG は 6 方向に印加し、各 b 値と MPG において 4 回測定を行った。撮像条件は TR = 1000 ms, TE = 70 ms, TM (mixing time) = 15 ms, $\delta = 25$ ms, $\Delta = 50$ ms とし、 $b = 0-4000$ sec/mm² となるように MPG 強度は $G = 0-43.4$ mT/m とした。TM は 3 つの 90° パルスで構成される STEAM 法に特有のパラメータである。収集範囲は 2×2×2 mm³ として、健常部、梗塞部の拡散 MRI 信号スペクトルを得た。収集されたデータを健常ヒトと同様に解析し、脳梗塞組織の細胞膜透過率評価を行った。

シミュレーションは有限差分法による拡散 MRI シミュレーションを用い、条件は健常ヒトの細胞膜透過率を評価した時と同様とした。ただし、組織の構造は脳梗塞により変化すると考えられ、梗塞を生じた脳細胞の細胞膜透過率を推定するために、数値計算に構造変化のパラメータを組み込む必要があった。これは、文献より健常部の細胞内:細胞外体積比を 78:22, 梗塞部の細胞内:細胞外体積比を 93:7 とした。

4. 研究成果

(1) 図 2 に拡散物質が細胞膜を透過しない条件 ($P = 0$ μm/sec) で、細胞内拡散係数 D_{int} を 0 から 1.4×10⁻³ mm²/sec まで変化させたときの b 値と対数表示の信号値との関係を示す。いずれの曲線も b 値の上昇につれ、信号強度が減少した。細胞内拡散係数 D_{int} が 0.0, 0.27×10⁻³, 0.58×10⁻³ mm²/sec のときに信号減衰は明確な曲線を描き、細胞内拡散係数が大きくなるにつれて直線に近づいた。また、細胞内拡散係数 D_{int} が 1.4×10⁻³ mm²/sec のとき、細胞内拡散係数と細胞外拡散係数が一致しており、信号減衰曲線は式(1)に示されるように直線を描くはずである。この信号減衰が曲線を描いた理由として、細胞膜による拡散の制限が考えられた。

図 3 に細胞内外拡散係数が等しい条件 ($D_{int}=D_{ext}=1.4\times 10^{-3}$ mm²/sec) で、細胞膜透過率 P を 0 から 1.0×10⁵ m/sec まで変化させたときの b 値と対数表示した信号値の関係を示す。細胞膜透過率が小さい場合、細胞膜による制限拡散の影響が大きい、細胞膜透過率が非常に大きくなると細胞膜の拡散の制限の効果は小さくなり、このときの b 値と対数表示した信号値の関係は自由拡散のように直線的になると考えられた。

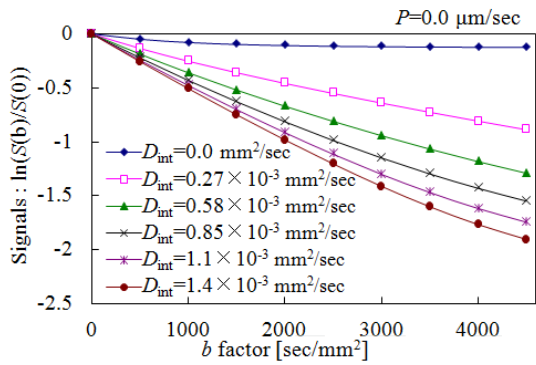


図 2 拡散物質が細胞膜を透過しない条件 ($P = 0 \mu\text{m}/\text{sec}$) で細胞内拡散係数 D_{int} を変化させたときのシミュレーション結果

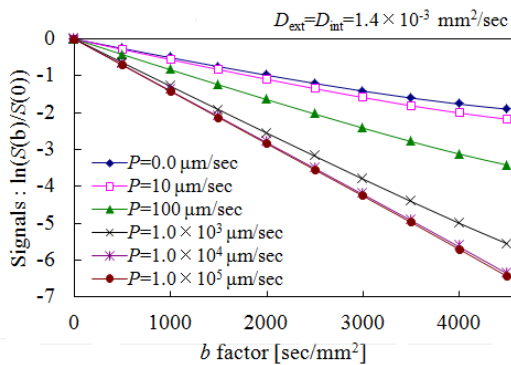


図 3 細胞内外拡散係数が等しい条件で細胞膜透過率変化させたときのシミュレーション結果

(2) 図 4 に拡散強調画像 b 値を 0 から $4000 \text{ sec}/\text{mm}^2$ まで変化させた時の健常ヒトの脳の拡散強調画像を示す。 b 値が大きくなると白質、特に内包後脚での高信号が顕著になっている。これは、白質は線維による制限拡散の割合が大きいため、 b 値が高くなるにつれて信号減衰の割合が少なくなるのに対し、灰白質は白質に比べて神経細胞が多く、制限拡散の割合が比較的小さいためであると考えられた。図 5 に健常ヒト 3 名の灰白質 (中心前回) における信号減衰曲線を示す。グラフ内の図は $b = 4000 \text{ sec}/\text{mm}^2$ のときの信号値の画像であり、脳内の関心領域から信号値を取り出した。信号値は b 値が増加するにつれ、減少していることがわかる。得られた信号値は関心領域内の平均値である。

健常ヒト 3 名の信号値より提案した方法で細胞膜透過率評価を行った。健常ヒト 3 名の信号減衰曲線はすべて式(3)の評価関数 F が最小となる細胞膜透過率 P と細胞内拡散係数 D_{int} が存在した。図 6 に健常ヒト 1 名の信号減衰曲線と評価関数 F が最小となったシミュレーションの曲線を示す。推定された健常ヒト 3 名の脳神経細胞内拡散係数 D_{int} は $(1.0 \pm 0.1) \times 10^{-3} \text{ mm}^2/\text{sec}$ 、細胞膜透過率 P は 76 ± 9

$\mu\text{m}/\text{sec}$ であった。今回の実験では健常ヒトの脳から得られる信号は $4.8 \times 4.8 \times 5 \text{ mm}^3$ の平均値であり、拡散 MRI で収集された信号はその取得領域に含まれる多数の細胞内外の拡散係数や細胞の平均的な形状、膜透過率を反映している。数値計算では実際の細胞に近い矩形の細胞を想定してシミュレーションを行い、細胞内拡散係数と細胞膜透過率を評価した。得られた細胞内拡散係数と細胞膜透過率は収集領域における平均的な評価値であるといえた。

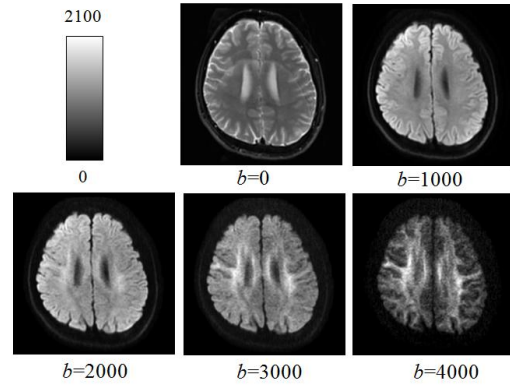


図 4 拡散強調画像

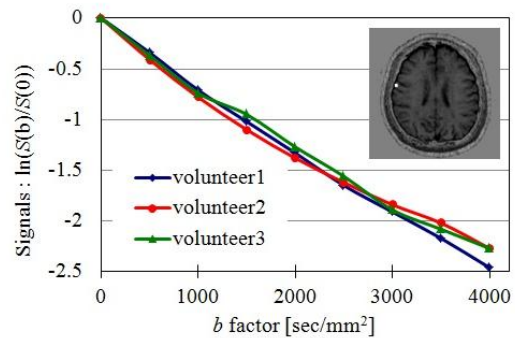


図 5 健常ヒト 3 名の灰白質における信号減衰曲線

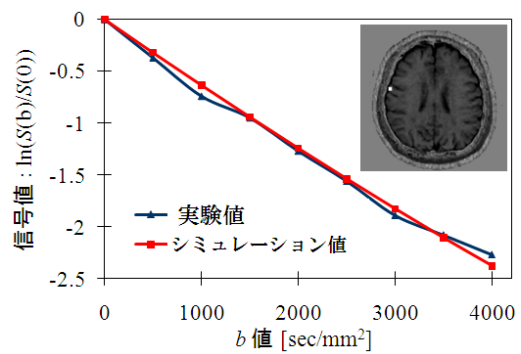


図 6 健常ヒトの細胞膜透過率評価

(3) 図7に拡散強調画像 b 値を 0 から 4000 sec/mm^2 まで変化させた時の脳梗塞ラットの健常部と梗塞部の信号値を示す。図内の画像は脳梗塞ラットの T2 強調画像であり、白く高信号を呈している部分が梗塞巣である。図7より梗塞部が健常よりも高信号となることがわかる。これは、本研究ではプロトン (^1H) を測定対象とし、その多くは生体内の水分子内に存在しており、脳梗塞が起こると細胞が拡大し、それに伴って拡散しやすい細胞外から拡散しにくい細胞内への水分子の移動が生じ、梗塞領域での実効的な拡散係数が低下するため高信号になると考えられた。

脳梗塞ラットモデルにおいて、健常部と梗塞部の細胞膜透過率評価を行った。推定された健常（非梗塞）部の細胞膜透過率は 69 $\mu\text{m}/\text{sec}$ (図8)、梗塞部の細胞膜透過率は 58 $\mu\text{m}/\text{sec}$ (図9)であった。脳梗塞による酸素供給低下が脳神経細胞に浮腫を生じさせ、その結果、水分子の細胞膜透過率が低下したと考えられた。拡散 MRI 信号を用いて非侵襲的に細胞膜透過率を評価し、梗塞部が正常組織より細胞膜透過率が低下すると示唆された。

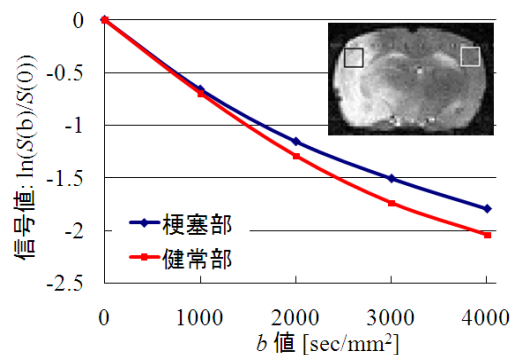


図7 脳梗塞ラットの梗塞部と健常部の拡散 MRI 信号値

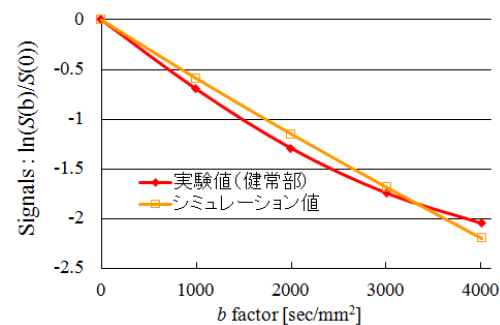


図8 健常部の細胞膜透過率推定

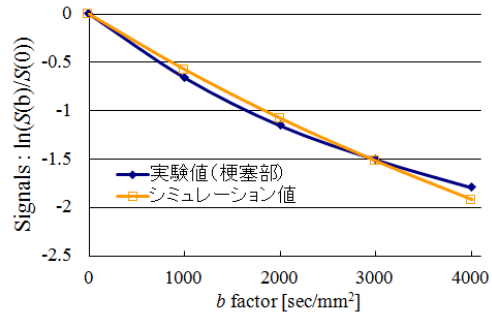


図9 梗塞部の細胞膜透過率推定

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 T. Imae, H. Shinohara, M. Sekino, S. Ueno, H. Ohsaki, K. Mima, K. Ohtomo. Estimation of Cell Membrane Permeability and Intracellular Diffusion Coefficient of Human Gray Matter. *Magn Reson Med Sci*, vol. 8, No.1, pp. 1-7, 2009. 査読あり.
- ② T. Imae, H. Shinohara, M. Sekino, S. Ueno, H. Ohsaki, K. Mima, K. Ohtomo. Minimization of computational errors in 1D diffusion simulation of nuclear magnetization. *IEEE Trans Magn (IEEE Transactions on Magnetics)*, vol. 44, No.11-2, pp. 4496-4499, 2008. 査読あり.

[学会発表] (計4件)

- ① T. Imae, H. Shinohara, M. Sekino, H. Ohsaki, S. Ueno, K. Mima, and K. Ohtomo, "Estimation of cell membrane permeability and intracellular diffusion coefficient of the gray matter in the normal human brain," ISMRM 17th Scientific Meeting and Exhibition, Honolulu, USA, 21 April 2009.
- ② 今江禄一, 篠原広行, 関野正樹, 上野照剛, 大崎博之, 美馬和男. 拡散 MRI を用いた脳梗塞ラットの細胞膜透過率評価. 第 65 回日本放射線技術学会総会学術大会, 横浜, 2009 年 4 月 18 日.
- ③ 今江禄一, 篠原広行, 関野正樹, 上野照剛, 大崎博之, 美馬和男, 大友邦. 拡散 MRI を用いた生体内水分子の脳細胞膜透過率評価. 第 36 回日本磁気共鳴医学会大会, 旭川, 2008 年 9 月 12 日.
- ④ T. Imae, H. Shinohara, M. Sekino, S. Ueno, H. Ohsaki, K. Mima, K. Ootomo, "Minimization of Computational Errors in Diffusion Simulation of Nuclear Magnetization", IEEE International Magnetism Conference, Madrid, Spain, 4 May 2008.

6. 研究組織

(1)研究代表者

今江 禄一 (IMAE TOSHIKAZU)

東京大学・医学部附属病院・診療放射線技師

研究者番号：80420222

(2)連携研究者

篠原 広行 (SHINOHARA HIROYUKI)

首都大学東京・人間健康科学研究科・教授

研究者番号：90138488

関野 正樹 (SEKINO MASAKI)

東京大学・新領域創成科学研究科・助教

研究者番号：20401036