

機関番号： 11501

研究種目：若手研究(B)

研究期間： 2009 ~ 2010

課題番号： 21760307

研究課題名(和文) 小動物内酸化還元機能計測のためのピンポイント電子スピン共鳴装置の開発

研究課題名(英文) Development of ESR spectrometer using magnetic field gradient modulation for redox function measurement among small animals

研究代表者

伊藤 智博 (TOMOHIRO ITO)

山形大学・大学院理工学研究科(助教)

研究者番号： 60361276

研究成果の概要(和文): 生体内フリーラジカルの in vivo 計測を行うために, 1GHz 程度の電磁波を使用した低周波 ESR 法があり ESR 画像装置を始めとする様々な装置が開発されている。本研究は, in vivo で生体内の局所領域におけるフリーラジカル検出装置の開発の一環として行われたものである。試料空間内に交流磁場勾配を高効率で印加するために, シールドケース内に磁場勾配コイルを内蔵することにより, 渦電流損失が 2/3 に減少し, 局所領域における ESR スペクトルの検出を可能にした。さらに, 空間分解や動物をモデルとした擬似試料を測定し, 装置の基礎的な性能を評価した。

研究成果の概要(英文): As a present method to analyze the redox state in a living thing, an ESR spatiotemporal imaging technique is applied to a small animal receiving a nitroxyl radical as a spin probe. In this method, however, the accurate images are not obtained when various radicals co-exist or the ESR line shape changes. In this paper, the development of the shield case with low eddy current and the field gradient coils with high speed response is reported in order to realize the modulated gradient method using the loop-gap resonator for a small animal. The spatial resolution was determined to be about 6.8 mm at the field gradient of 0.12 mT/mm. The separation of the EPR spectra of two types of radicals was also made.

交付決定額

(金額単位: 円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野: 工学

科研費の分科・細目: 電気電子工学・計測工学

キーワード: 電子スピン共鳴, 磁場勾配変調, センシティブポイント法, L-バンド, 生物ラジカル, 磁場焦点法, 生体計測, EPR

1. 研究開始当初の背景

生きたままの状態でラットやマウス, 魚卵などの生体内の活性酸素消去能や生体内酸化還元機能を解明することができる 0.3~

1.2GHz のマイクロ波も使用した低周波用域の ESR 装置が開発されてきた。均一な磁場勾配を使用する ESR 画像装置では生体内のフリーラジカルの分布と動態を解析できる。ESR

画像法では、複数のラジカル種が存在する場合、正しい ESR 画像を得ることができない問題があり、この問題を解決するために、spectral-spatial ESR 画像法が開発された。しかし、この方法には、長時間の測定が必要なため、生体内の酸化還元を追跡することが不可能である問題があった。

もう一方の方法として、磁場勾配変調を用いて選択領域の ESR 信号を測定する手法があり、この手法の場合、測定時間は、通常の ESR スペクトルを得る時間と同じ時間で測定が可能であり、生体内の酸化還元を追跡できる時間分解能を有している。1984年に Herrling らによって磁場勾配変調による局所領域の測定が行われているが ESR 信号が 2 つに分裂するなどの問題点があり、伊藤らは印加波形を三角波することによって、この問題点を解決した (T. Ito and et.al., Appl. Magn. Reson., in press., 特開 2007-127582, 伊藤智博, 尾形健明)。この研究の過程で、小動物などを測定するために使用されているループギャップ共振器のシールドケースの渦電流が影響して、三角波による交流磁場勾配を印加することが困難である問題点が明らかになった。もし、このシールドケースの渦電流を軽減し、数 100Hz 程度の交流磁場勾配を印加することが可能になれば、小動物を生きのまま測定できる「in vivo ピンポイント電子スピン共鳴法」が確立でき、より詳細な生体反応機構の解明が期待される。また、シールドケースの渦電流問題を解決することは将来的な大型動物や人体対応のピンポイント ESR 装置の開発を容易にすることにつながると考え、本研究に着目した。

2. 研究の目的

本研究では、小動物(ラット頭部やマウスのホールボディ)を対象を絞って、ラットやマウスの部位別(脳, 肝臓, 腎臓)の ESR スペクトルを同時に観測し、部位別の ESR 信号強度の時間変化や ESR スペクトルの違いを調べることのできる小動物に対応したピンポイントスピンプローブ ESR 計測システムの実現を目的とする。

これまでの磁場勾配変調法では、対になっている磁場勾配コイルを流れる電流を同じにし、磁場焦点の位置を中心に固定している。本研究では、異なる電流値の交流磁場勾配を印加することによって磁場焦点の位置を変えること、すなわち、磁場焦点の位置を移動可能にすることを第二の目的とする。

3. 研究の方法

(1) ESR 装置

ESR 装置は、我々の研究室で組み立てられ、ESR 共振器、静磁場コイル、磁場勾配コイル、磁場変調コイル、磁場掃引コイル、電源、測

定用パーソナルコンピュータ、ホモダイナ検波用 700MHz マイクロ波回路、ロックインアンプによって構成される。

ESR 共振器として、ループ・ギャップ共振器(LGR, 内径 41mm, 軸長 10mm)を使用した。ESR 共振器は、図 1 に示すようなシールドケースに取り付けられた。LGR によって発生されるマイクロ波磁界(B_1)と静磁場コイルによって発生される静磁場(B_0)は、垂直になるように並べられている。さらに、1組の磁場変調コイル(内径 76mm, 外径 102mm, 33 ターン, コイル間隔 66mm)がシールドケース内に取り付けられた。

z-軸用磁場勾配コイル(内径 80mm, 外径 120mm, 13 ターン, コイル間隔 80mm)は、厚さ 3mm の銅板を切断幅 0.3mm で切り出して製作され、シールドケースの内側または外側に固定された。z-軸用磁場勾配コイルの磁場の均一性は、中心より 20mm の球状空間内で、約 5%以下であった。

x-軸用磁場勾配コイルは、アンダーソン型コイルによって設計された。導体断面積が、 3.45mm^2 になるように設計され、コイルの形状は、内短径 30mm, 内長径 80mm, 外短径 60mm, 外長径 109mm, 12 ターン四角形のコイルで、板厚 3mm の銅板を、切断幅 0.3mm で切り出して製作された。

主磁場コイルは、ヘルムホルツ型の水冷式の空芯コイルを使用した。磁場掃引は、電流制御によって行われ、 15mT/s の高速磁場掃引が可能である。

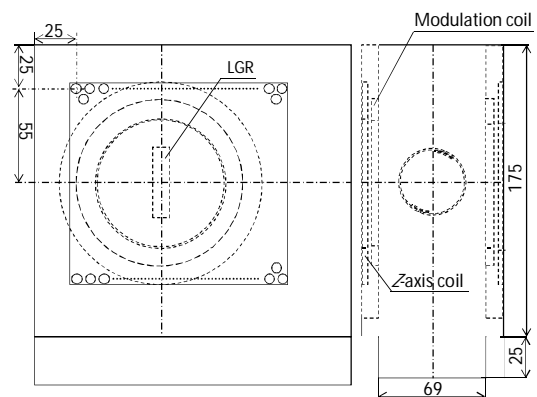


図 1. 700MHz 用シールドケースの概略図

(2) ESR 測定領域制御原理

通常の ESR 画像法では、静止した直流の磁場勾配を使用する。一方、磁場勾配変調法では、図 2 に示すように、三角波による交流磁場勾配で変調し、焦点を結ぶ空間の ESR 信号を選択的に測定することができる。これまでの研究では、左右の磁場勾配コイルの振幅強度が同じであったため、中央に位置する試料のみを観測していたが、本研究では、左右のコイルの振幅を変えることによって、焦点を結

ぶ空間を移動できるようにした。すなわち、電気的な制御によって、選択領域を変更できるようにする。

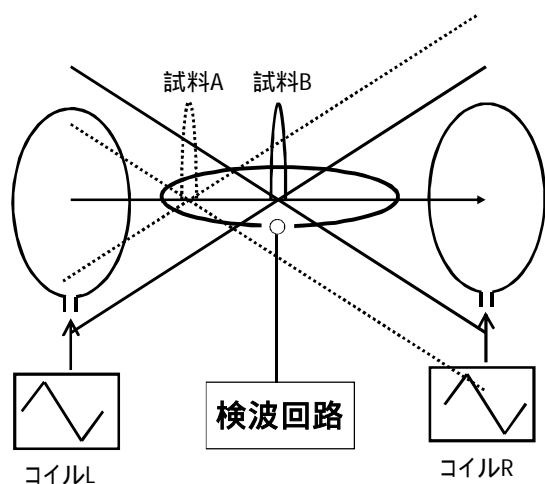


図 2. ESR 観測領域を制御するダイアグラム

(3)測定試料

ピンポイント試料として、内径 1mm のキャピラリーガラス管に、1 mg の 2,2-ジフェニル 1-ピクリルヒドラジル(DPPH)を入れたものを使用した。2つの内径 10mm のガラス試験管に、それぞれ、トリプレットな ESR 信号を有する 5mM の 4-ヒドロキシ-2,2,6,6-テトラメチルピペリジン-1-オキシド(TEMPOL)水溶液とシングレットな ESR 信号を有する 25wt% の DPPH / 塩化ナトリウム粉末試料を入れ、2種類のラジカル種が存在するモデル試料とした。

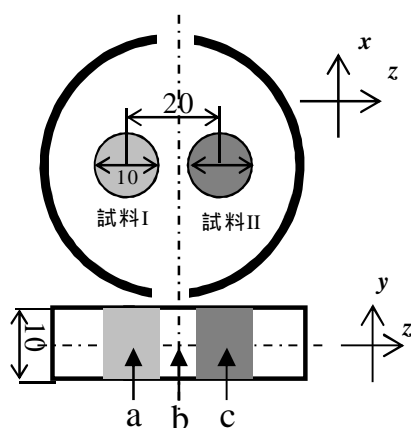


図 3. 2 種類のラジカル種モデル試料の概略図

4. 研究成果

(1)磁場勾配コイルの設置位置の違いによる渦電流損失の影響

磁場勾配コイルをシールドケースの内部または外部に設置した場合の渦電流損失の影響を測定した。ピンポイント試料を LGR の

中心から 10mm の距離 D の位置に置き、コイル L およびコイル R に、それぞれ $20A_{p-p}$ の交流電流を印加し、ESR スペクトルを測定した。得られた ESR スペクトルより、ESR 信号の線幅 H を算出した。直流磁場勾配強度が、 $0.12mT/mm$ であることから、渦電流損失 L が 0% の場合、磁場勾配強度は $0.12m Tp-p/mm$ となる。信号の線幅を H 、中心からの距離を D とおくと H と D と L の間には

$$L = \left(1 - \frac{\Delta H}{0.12 \times D}\right) * 100 \quad \dots (式 1)$$

の関係式が成り立つ。測定より得られた線幅 H と式 1 より算出した渦電流損失 L を表 1 に示す。周波数 f が増加するに従って、渦電流損失 L は増大する。また、すべての周波数において、磁場勾配コイルをシールドケースの内側に設置したほうが、渦電流損失 L を 15 ~ 20% 程度、軽減できることから、シールドケースの内側に磁場勾配コイルを設置することによって渦電流の発生を抑えられる。

表 1 磁場勾配コイルの設置位置の違いによる線幅 H と渦電流損失 L

周波数 f (Hz)	線幅 H (mT)		渦電流損失 L (%)	
	外部	内部	外部	内部
50	0.54	0.69	55	43
100	0.45	0.64	63	47
250	0.33	0.54	73	55
500	0.27	0.44	78	63

(2)シールドケースの側面板の穴の有無による渦電流の影響

シールドケースの側面の板に穴を開けることによって渦電流の軽減に効果があるかを確かめる実験を行った。具体的には、シールドケースの側面に、218 個の穴 (内径 7mm) を開けたものと開けないものを製作し、その時の磁場焦点の中心からの距離 d を x, y, z -ステージとガウスメータを用いて、測定した。磁場勾配コイルには、 z -軸用磁場勾配コイルを使用した。磁場焦点の確認には、ガウスメータの交流振幅が最少になる点を焦点として位置決めを行った。この時、コイル L とコイル R の交流電流振幅の和は、 $110A_{p-p}$ として、コイル L の電流値 I が $27.5A_{p-p} \sim 87.5A_{p-p}$ まで変化させて、焦点位置を測定した (図 4)。

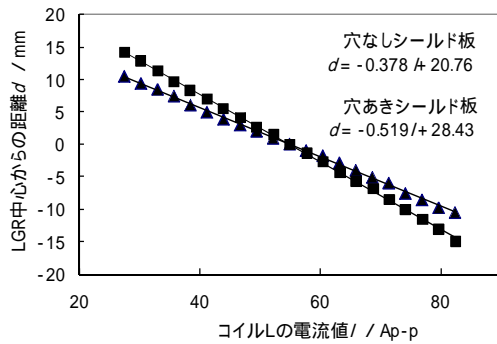


図 4. コイルの電流値と磁場焦点位置の関係

焦点位置は、穴の開いていないシールドケースでは移動距離が 20mm であったのに対し、穴の開いているシールドケースでは移動距離が 30mm まで移動できることが分かった。シールドケースの側面に穴を開けることによって、磁場勾配変調の渦電流損失が軽減されることが示唆された。ループ・ギャップ共振器の有効試料サイズは内径 35mm 程度であり、磁場焦点の位置を 30mm 移動できることから、生体試料を測定するための移動距離として十分な性能を有していると考えられる。すなわち、電氣的に磁場焦点の位置を移動できる。また、穴を開けたことによるマイクロ波の漏えいによる感度低下は、観測されなかった。

(3)空間分解能の測定

空間分解能を測定するために、ピンポイント試料をループ・ギャップ共振器の中心に置いた。コイル R に $82.5A_{p-p}$ 、コイル L に $27.5A_{p-p}$ の電流値を印加し、ESR スペクトルを測定した。さらに、コイル R の電流値を $5.5A_{p-p}$ 減少させ、コイル L の電流値を $5.5A_{p-p}$ 増加して、ESR スペクトルを得た。同様の測定をコイル L の電流値が $82.5A_{p-p}$ になるまで繰り返した。得られた ESR 信号強度を算出した。実験(2)で得られた電流値 I と中心からの距離 D の関係を用いて、ESR 相対信号強度と中心からの距離 D を図 5 にプロットした。

図 5 より、半値幅を用いて空間分解能を算出した結果、空間分解能は 6.8mm であった。小動物に対応した LGR の構造は、ラットの頭部程度の試料サイズに対応しており、ラットの脳の大きさは 10mm 前後であるため、7mm 程度の空間分解能であれば、脳部位に対して選択的な ESR 計測が十分可能であると考えられる。

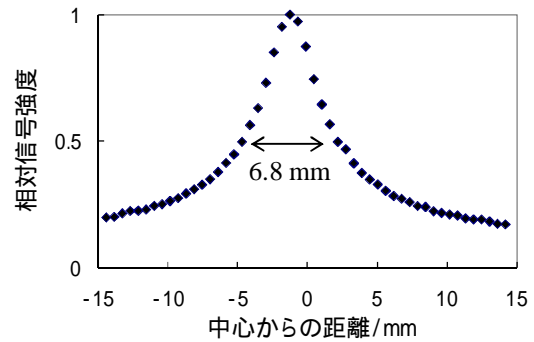


図 5. 共振器の中心からの距離と相対信号強度の関係

(4)モデル試料による 2 種類のラジカル種の ESR スペクトルの分離

図 3 に示すモデル試料の試料 I に DPPH / 塩化ナトリウム粉末を、試料 II に TEMPOL 水溶液を入れ、図 3a, 3b, 3c の位置に磁場焦点を合わせたときの ESR スペクトルを図 6a, 6b, 6c に示す。DPPH 領域である a 地点では DPPH のシングレットな ESR 信号のみが確認できた。一方、TEMPOL 領域である c 地点では TEMPOL 水溶液のトリプレットな ESR 信号のみが観測できた。これらの結果より、z-軸方向では交流磁場勾配を用いて信号の分離が出来た。

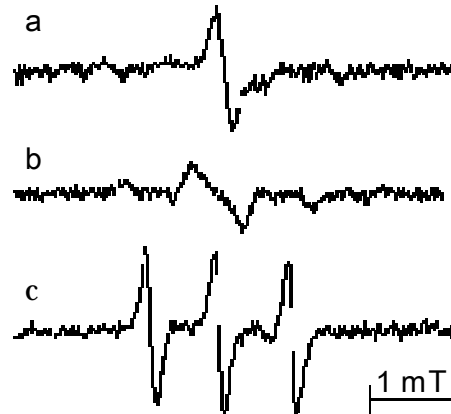
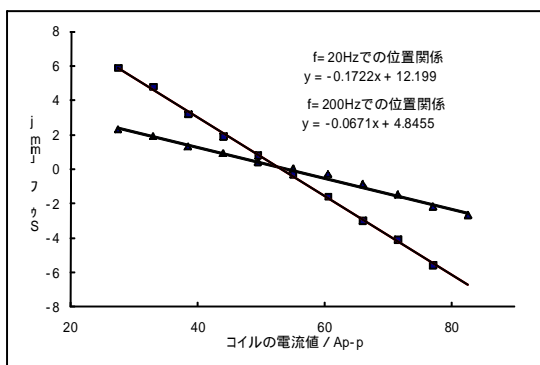


図 6. 共振器の中心からの距離と相対信号強度の関係

(5)x-軸用磁場勾配コイルの評価

z-軸方向における交流磁場勾配を用いて、十分な空間分解能および複数種類のラジカル種の ESR 信号の分離が可能であったので、次に x-軸方向の磁場勾配コイルの評価を行った。具体的には、実験(2)と同様に、x, y, z-ステージとガウスメータを用いて、磁場焦点位置の移動距離を測定した。2 つのコイルの交流電流振幅の和を $110A_{p-p}$ なるようにして、片方のコイルの電流値 I が $27.5A_{p-p} \sim 87.5A_{p-p}$ まで変化させて、焦点位置を測定した。



焦点位置は、周波数が200Hzでは移動距離が6mmであったのに対し、周波数が20Hzでは移動距離が12mmまで移動できることが分かった。周波数を下げることによって、移動距離を増加できるが、試料空間が30mmを十分に移動することができないことが分かった。x-軸方向の移動については、現在、磁場勾配コイルの再設計・製作を行っており、今後の改良が必要である。

(6)まとめ

本研究では、小動物に対応したピンポイントスピンプローブ ESR 計測システムの実現を目的に研究を行ってきた。従来型のシールドケースでは、磁場勾配コイルが外部に設置されており、渦電流損失による影響が大きく、本法を実現するために必要不可欠な交流磁場勾配を印加することが困難であったが、磁場勾配コイルをシールドケースに内側に設置することによって問題解決を図った。さらに、より渦電流を軽減するために、シールドケースに穴を開けることによって、目的であるマイクロ波を遮断するシールドケースの機能を有しつつ、渦電流を軽減することができた。また、第二の目的である電気的に選択領域を変化させることが可能になった。z-軸方向の空間分解能は、6.8mm であることがわかり、ラット頭部を対象した場合、脳部位と脳部位以外の部分を選択できるため、十分な性能を有している。モデル試料の実験では、2種類の特異的な ESR 信号を有する試料を分離することができたため、空間分解能の結果も踏まえ、十分な分解能を有していると考えられる。今後、本装置を活用して、小動物の活性酸素種の動態を追跡することによって、医学・生命科学の分野に貢献できることが期待される。また、x-軸方向については、不十分な結果となったが、今後、改良を重ね x-軸方向の移動距離、分解能の向上を目指し、より完成度高い装置に仕上げる。

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)

〔学会発表〕(計3件)

城石知紀, 伊藤智博, 須崎均, 尾形健明, 生体 ESR 計測用磁場勾配コイル内蔵型シールドケースの開発, 第49回電子スピンスイエンズ学会, 名古屋大学, 2010年11月11日.

城石知紀, 伊藤智博, 尾形健明, 生体用磁場勾配変調 ESR 法に対応したループギャップ共振器のシールドケースの開発, 平成22年度化学系学協会東北大会, 岩手大学, 2010年9月25日.

城石知紀, 伊藤智博, 尾形健明, 小動物対応磁場焦点 ESR 法のためのループギャップ共振器用低渦電流シールドケースの開発, 第48回電子スピンスイエンズ学会年会, 神戸大学, 2009年11月10日.

〔その他〕

ホームページ等

<http://mri.yz.yamagata-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

伊藤 智博 (TOMOHIRO ITO)

山形大学・大学院理工学研究科・助教

研究者番号: 60361276