

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 7 日現在

機関番号：20101

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2010 ～ 2012

課題番号：22390236

研究課題名（和文） 高速 EPR イメージング法を用いた生体機能の視覚化に関する研究

研究課題名（英文） Functional molecular imaging studies by rapid EPR imaging method

研究代表者

藤井 博匡（FUJII HIROTADA）

札幌医科大学・医療人育成センター・教授

研究者番号：70209013

研究成果の概要（和文）：生き物をそのままの状態ですべて計測する非侵襲分子イメージング法は、生命現象を分子の動きからダイナミックに観測することができ、生命活動の解明への貢献はもとより、病因の解明、早期診断、治療薬の開発への貢献など、期待が膨らんでいる。本課題では、実験動物の生体機能・生理機能を非侵襲的に画像として視覚化するため、近年開発した電子常磁性共鳴イメージング（Electron Paramagnetic Resonance Imaging (EPRI)）法を利用し、全く新しい“機能性イメージング化研究法”の構築をめざしている。

研究成果の概要（英文）：Electron paramagnetic resonance (EPR) imaging using nitroxides is a powerful, noninvasive method for visualizing the redox status modulated by oxidative stress in vivo. However, to date, it has not always been possible to obtain three-dimensional (3D) images with a continuous wave (CW)-EPR imager in small rodents while using nitroxides. Due to improvements in imagers that enable rapid data-acquisition, the feasibility of 3D EPR imaging with good quality in mice was tested with nitroxides of different lipophilicities. The improved CW-EPR imager may be a useful noninvasive tool for assessing changes in the redox status of living subjects under oxidative stress.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	5,000,000	1,500,000	6,500,000
2011年度	4,600,000	1,380,000	5,980,000
2012年度	4,600,000	1,380,000	5,980,000
年度			
年度			
総計	14,200,000	4,260,000	18,460,000

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：電子常磁性共鳴、イメージング、ESR、EPR、酸化ストレス、活性酸素

## 1. 研究開始当初の背景

生き物をそのままの状態ですべて計測する“非侵襲的手法”で進められている分子イメージング法は、生命現象を分子の動きからダイナミックに観測することが可能となり、生命活動の解明への貢献はもとより、病因の解明や早期診断、治療薬の開発への貢献など、期待がふくらんでいる。現在、日本社会では少子高齢

化傾向に拍車がかかり、医療費の高騰を抑える政策が急務となっている。新たな分子イメージング技術が発展し、脳機能の早期診断が可能となれば、高齢化社会での予防医学の発展に寄与するものと思われる。アルツハイマー病を始めとする疾病は酸化ストレスの亢進により起こっていることが明らかになっており、酸化ストレスをキーワードとする脳

機能診断が重要である。

## 2. 研究の目的

“非侵襲的画像化手法”である分子イメージング法は、生命現象を分子の動きからダイナミックに観測することが可能となり、生命活動の解明への貢献はもとより、病因の解明や早期診断、治療薬の開発への貢献など、期待がふくらんでいる。電子常磁性共鳴イメージング (Electron Paramagnetic Resonance Imaging (EPRI)) 法は、生きた動物体内で発生するフリーラジカルの情報を3次元的に画像化して視覚化することが可能な手法である。本研究課題では、実験動物の生体機能・生理機能を非侵襲的に画像として視覚化するため、近年開発した高速 EPRI 装置を利用し、全く新しい“機能性イメージング化研究法”の構築をめざすものである。我々が開発した研究手法を実験小動物に適用し、非侵襲的に生体機能を反映した機能情報(抗酸化能、神経活動、酸素分圧など)を高速・高解像度で視覚化することに挑戦し、病態の画像解析や治療薬の開発への貢献をめざすものである。具体的には、高速化した EPR イメージング (EPRI) 装置とニトロキシド分子などを造影剤・イメージングプローブとして利用し、生体機能を視覚化する新しいイメージング研究法を構築する。

## 3. 研究の方法

(1) スピンプローブについて： 代表的なニトロキシド化合物として、以下の5種類のプローブを用いた。CMP (3-carbamoyl-2, 2, 5, 5-tetramethylpyrrolidine-1-oxyl)、COP

(3-carboxy-2, 2, 5, 5-tetramethylpyrrolidine-1-oxyl)、MCP (methoxycarbonyl-2, 2, 5, 5-tetramethylpyrrolidine-1-oxyl)、HMP (3-hydroxymethyl-2, 2, 5, 5-tetramethylpyrrolidine-1-oxyl)、TEEPONE

(2, 2, 6, 6-tetraethylpiperidine-1-oxyl)。上記二つは水溶性であり、あとの三種類は疎水性である。化合物の lipophilicity の違いが疎水性・親水性組織への分配の違いに繋がると予測され、動物に投与された際、これらのニトロキシド分子の体内分布状況は大きく異なることが予想される。

(2) 動物実験について： 本研究で行った動物実験は、全て、札幌医科大学動物実験委員会が実験プロトコルが審査され承認されたものである。本研究では、5~7週齢の C57BL/6 および BALB/C マウスを使用した。ニトロキシド化合物を生理食塩水に溶解させ、マウス尾静脈より  $0.15 \mu\text{mol/g}$  体重の割合で投与した。

(3) EPR イメージング装置について： 本研究では自作した3次元 EPR イメージング装置を使用した。稼働条件は 750MHz、27mT である。

本研究を通じた撮像の条件は、以下の通りである。

磁場スキャン幅：6mT、磁場勾配：0.6mT/cm、スキャン速度：80ms、プロジェクション数：181、modulation amplitude：0.2mT、Field of View (FOV)：50mm (128×128 pixels)

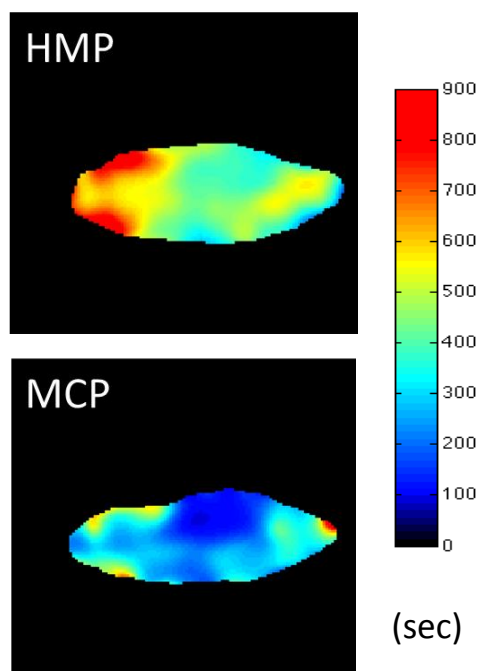
## 4. 研究成果

(1) ニトロキシドプローブを用いた3次元 EPR イメージングについて

血液脳関門 (BBB) 透過性を持たない CMP と、BBB 透過性を有する HMP をそれぞれマウス尾静脈より投与し、EPRI 画像を撮像した。181 プロジェクションの投影データを filtered back-projection 法を用いて画像化した。画像データは  $128 \times 128 \times 128$  点の3次元 (3D) データで、取得時間は約30秒程度であった。得られた画像は3次元 (3D) でのデータとして取得しているため、任意のスライス面での2次元 (2D) 画像を表示することが可能である。両イメージングプローブから得られた画像を比較すると CMP ではマウス頭部の一部が欠けており、この欠けた部分がマウスの脳組織であることが分かる。次に、BBB 透過性プローブである HMP と MCP を用いた、2D・3DEPRI 画像を撮像した。2D 画像は、矢状断面での画像で比較したが、BBB 透過性を持っていても両化合物の頭部における分布がかなり異なっていることがわかる。また、surface-rendered 手法を用いて3次元化したマウス頭部画像では、ニトロキシド分子の脳内分布だけではなく、頭部表面の分布も含めた頭部全体における分布状況の差異が観測されているのが分かる。

(2) 酸化ストレス状態の定量的評価法の確立  
ニトロキシド分子を動物に投与すると、速やかに還元反応を受けてラジカルを失い、常磁性体から反磁性体のヒドロキシルアミン誘導体へと変化する。HMP をマウス尾静脈より投与し、マウス頭部全体からの EPR 信号変化を測定した。頭部全体の信号強度の経時変化を観測することが出来、得られたデータを片対数プロットで処理すると直線性を示すことから、観測された還元反応は擬一次反応速度に従っており、直線の傾きから速度定数・半減時間を求めることができる。HMP の結果では、マウス頭部の半減時間は10分程度と算出される。マウス頭部における2次元 EPRI 画像 (矢状断面) を経時的に撮像し、各ピクセルにおける画像強度の時間変化を解析し各ピクセルにおける HMP の半減時間を求めそのマッピングを行った。以下に HMP と MCP の半減時間のマッピングを示したが、別名、レッドスマップとも呼ばれているマップである。脳組織内での MCP の半減時間は HMP に比し著しく短いことがわかる。

マウス頭部におけるレドックスマップ  
 上図：HMP 投与、下図：MCP 投与



(3)病態モデル動物の作成について： 脳梗塞モデル動物（中大動脈閉塞によるモデル）と、脳炎症モデル動物（リポポリサッカリドを腹腔内や、脳実質内に投与して炎症を起こさせるモデル）を作成することが出来た。次に、これらの病態モデル動物を用いた酸化ストレスの評価を実施した。脳内の酸化ストレス状態を画像化するために脳内・脳外全域に分布するニトロキンドであるHMPを用いて、EPRイメージング画像を経時的に記録した。0.15秒スキャン、181プロジェクションでの条件で、約30秒ごとに三次元画像を取得することが出来た。これらの経時的データから二次元画像をとりだし、HMPの半減期マップであるレドックスマップを作成した。これらのレドックスマップから、炎症状態の持続性やその状態変化、更には、抗炎症薬による炎症効果画像として評価することが出来た。

#### 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9件）

①Emoto CM, Yamada K, Yamato M, Fujii GH. Novel ascorbic acid-resistant nitroxide in a lipid emulsion: An efficient brain imaging contrast agent for MRI of small rodents. 査読有 Neuroscience Letters. 2013 In press.

②Kohri, S, Fujii H. Modified oxygen radical absorbance capacity assay that can be implemented at low temperatures: A pilot study. 査読有 Food Sci. Technol Res. 2013: 19; 269-276.

③Fujii HG, Sato-Akaba H, Emoto MC, Ito K, Ishihara Y, Hirata H. Noninvasive mapping of the redox status in septic mouse by *in vivo* electron paramagnetic resonance imaging. 査読有 Magn Reson Imag. 2013: 31; 130-138.

④Koda S, Goodwin J, Khrantsov VV, Fujii H, Hirata H. Electron Paramagnetic Resonance-Based pH Mapping Using Spectral-Spatial Imaging of Sequentially Scanned Spectra. 査読有 Anal Chem. 2012: 84; 3833-3837.

⑤Sueishi Y, Ishikawa M, Yoshioka D, Endoh N, Oowada S, Shimmei M, Fujii H, Kotake Y. Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) of cyclodextrin-solubilized flavonoids, resveratrol and astaxanthin as measured with the ORAC-EPR method. 査読有 J Clin Biochem Natr 2012: 50; 127-132.

⑥Emoto M, Mito F, Yamasaki T, Yamada K, Sato-Akaba H, Hirata H, Fujii H. A novel ascorbic acid-resistant nitroxide in fat emulsion is an efficient brain imaging probe for *in vivo* EPR imaging of mouse. 査読有 Free Radic Res. 2011: 45; 1325-1332.

⑦Moriyama N, Hayama M, Fujii H. Aged garlic extract scavenges superoxide radicals. 査読有 Plant Foods Hum Nutr. 2011: 66; 17-21.

⑧Pawlak A, Ito R, Fujii H, Hirata H. Simultaneous molecular imaging based on electron paramagnetic resonance of <sup>14</sup>N- and <sup>15</sup>N-labelled nitroxyl radicals. 査読有 Chem Comm. 2011: 47; 3245-3247.

⑨Fujii H, Sato-Akaba H, Kawanishi K, Hirata H. Mapping of Redox Status in a Brain-Disease Mouse Model by Three-Dimensional EPR Imaging. 査読有 Mag Reson Med. 2011: 65; 295-303.

〔学会発表〕（計8件）

① Hirotsada Fujii, Miho Emoto, Mayumi Yamato, Ken-ichi Yamada, Brain redox mapping in methamphetamine-treated mice using three-dimensional EPR imaging, ISMRM2013, April 25 '2013, Salt-lake city

②Miho Emoto, Hideo Sato-Akaba, Hiroshi Hirata, Hirotsada Fujii, Redox map of mouse brain by three-dimensional EPR imaging with six-membered nitroxyl radicals, ISMRM2013, April 25 '2013, Salt-lake city

③Miho Emoto, Hideo Sato-Akaba, Hiroshi

Hirata, Hirofumi, Hirofumi, Differences in distribution and reduction rate of BBB permeable nitroxides by in vivo EPR imaging method, SFRBM2012, Nov. 20 '2012, San Antonio

④ Hirofumi, Hirofumi, Miho Emoto, Mayumi Yamato, Ken-ichi Yamada, Novel ascorbic acid-resistant nitroxides in fat emulsion: An efficient brain imaging probe for MRI of small rodents, SFRBM2012, Nov. 20 '2012, San Antonio

⑤江本美穂、赤羽英夫、平田拓、藤井博匡、EPR イメージングによる六員環ニトロキシドのマウス頭部における酸化還元状態の評価、SEST2012、2012年11月1日、札幌市

⑥藤井博匡、佐藤慎吾、江本美穂、平田拓、グルコース Tempo スピンプローブを用いたEPR イメージング、SEST2012、2012年11月1日、札幌市

⑦藤井博匡、江本美穂、赤羽英夫、平田拓、高速EPR イメージングシステムによるマウス脳内レドックス状態の評価について、SEST2011、2011年11月17日、仙台市

⑧江本美穂、水戸文弥、山崎俊栄、山田健一、赤羽英夫、平田拓、藤井博匡、新規アスコルビン酸耐性ニトロキシドによるマウス頭部の in vivo EPR イメージング、SEST2011、2011年11月17日、仙台市

〔図書〕(計0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

○取得状況(計0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

藤井 博匡 (FUJII HIROTADA)

札幌医科大学・医療人育成センター・教授  
研究者番号: 70209013

(2)研究分担者

( )

研究者番号:

(3)連携研究者

平田 拓 (HIRATA HIROSHI)

北海道大学・大学院情報科学研究科・教授  
研究者番号: 60250958

伊藤 康一 (ITO KOUICHI)

徳島文理大学・薬学部・教授

研究者番号: 30291149

長崎 幸夫 (NAGASAKI YUKIO)

筑波大学・数理物質科学研究所・教授

研究者番号: 90198309