

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31日現在

機関番号：17501
 研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2009～2012
 課題番号：22500412
 研究課題名（和文） 電磁ホーン型 ESR イメージング装置による脳虚血モデルでの酸化ストレスの画像化
 研究課題名（英文） Imaging of oxidant stress in brain ischemia using an electromagnetic horn type ESR spectrometer
 研究代表者 上田 徹 (KAMIDA TOHRU)
 大分大学・医学部脳神経外科・講師
 研究者番号：90315333

研究成果の概要（和文）：生体内でのフリーラジカルの画像化は、酸化ストレス由来の疾患の診断などで有用である。生体試料の ESR 測定を行うため、L-band 電磁ホーン型 ESR 装置を開発し、痙攣重積や脳腫瘍モデルで、従来のループギャップ共振器と比較した。後者では各々のモデルで ESR 計測ができたが、前者では感度の問題で困難だったため、3次元局所 ESR 信号検出方式 ESR イメージング装置と Q-band 電磁ホーン型 ESR 装置を開発し、各々を組み合わせる手法を考案した。

研究成果の概要（英文）：Imaging of a free radical in the living body is useful at diagnosis of the disease of oxidant stress origin, etc. In order to perform ESR measurement of a living specimen in a status epilepticus and a brain tumor models, L-band electromagnetic horn type ESR spectrometer was developed, and compared with the conventional loop gap resonator. Although ESR measurement was completed in each model at the latter, it was difficult for a low sensitivity in the former. Combining Q-band electromagnetic horn type ESR spectrometer with a three-dimensional local ESR signal detecting ESR imaging spectrometer was devised as a remedy.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,600,000	780,000	3,380,000
2010年度	500,000	150,000	650,000
2011年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：人間医工学・医用生体工学・生体材料学

キーワード：医用・生体画像

1. 研究開始当初の背景

(1) 活性酸素種 NOS (Reactive Oxygen Species) や活性窒素種 RNS (Reactive Nitrogen Species) などのフリーラジカルは、加齢、脳卒中、癌、高血圧症および糖尿病などの生活習慣病、てんかん、アルツハイマー

などの疾患に深く関与していることが分かってきている。生体内のフリーラジカルの分布を画像化することは、加齢や酸化ストレス由来疾患の病態解明や診断および創薬における抗酸化能評価において非常に有用と思われる、その技術開発が進められてきた。

(2) 近年、L-band loop gap 共振器型 ESR (Electron Spin Resonance)-CT (日本電子製) が開発され、市販されるまでになったが、マイクロ波周波数が 1 GHz と低周波であり、特に誘電ロスの大きな生体試料(含水試料)では、その解像度に限界があり実用的でなかった。従来の共振器では、マイクロ波周波数が大きくなると、試料共振器が小型になり、不對電子数計測に限界があった。共同研究者小林は、高周波のマイクロ波 (24GHz ; K-band) を使う一方で、試料セルを電磁ホーン型にし、より多くの不對電子数の計測を可能とした電磁ホーン型 ESR 装置を開発してきた。さらにこの数年で、感度や操作性、コンピュータ自動化などの改良で、ほぼ実用化の域に達した世界で唯一稼働の先端的電磁ホーン型 ESR 装置を立ち上げた。しかしながら、電磁ホーン型 ESR 装置を使った基礎および臨床医学への応用研究は、現在のところほとんど始動していない。

(3) 研究代表者上田は、これまで主にてんかんにおけるフリーラジカルの関与を、基礎および臨床の両側面から研究を進め、少しずつその成果を上げてきた。しかしながら、フリーラジカル発生の証明は、RNS の合成酵素の存在を免疫組織学的手法により間接的にみただけで、評価法としては十分でなかった。ESR 装置によるフリーラジカル発生の評価のみならず、その画像化の必要性を感じていた。そこで学内に電磁ホーン型 ESR 装置が稼働していることを知り、その開発者の小林と研究構想が一致したことから、電磁ホーン型 ESR 装置の画像化システムの構築および基礎および臨床医学への応用を着想するに至った。

2. 研究の目的

本研究期間内における到達目標は、生きた状態で小動物の脳内に発生したフリーラジカルを、可能な限り分解能が高い 3D 画像で捉えることである。その病態モデルとして、小動物中大脳動脈部分虚血モデルをはじめとして、痙攣重積や悪性脳腫瘍モデルを使う。

3. 研究の方法

(1) 脳虚血、痙攣重積や悪性脳腫瘍モデルを作成する。

(2) L-band 電磁ホーン型 ESR 装置を作製し、上記 (1) のモデルを使って、ESR を計測する。また、従来のループギャップ共振器を使った結果と比較する。

(3) 電磁ホーン型 ESR 装置だけでイメージングが困難場合を考えて、新たに局所 ESR 信号検出方式 ESR イメージング装置 を開発する。

4. 研究成果

本来の課題である脳虚血モデルの作成が、マウスでは困難であったため、ESR 計測は行えなかった。



図 1 L-band 磁場/周波数掃引方式電磁ホーン型 ESR 回路
左下にアジレント製 YIG 周波数掃引/固定発振器を設置

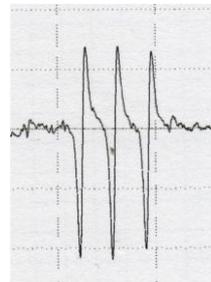


図 2 L-band 磁場掃引電磁ホーン型 ESR スペクトル
試料濃度 0.01M の TEMPOL 水溶液
試料容量 : 10ml
測定条件 : 磁場掃引 25~75mT,
周波数 1.2000GHz, 照射電力
50mW, 室温、積算回数 1 回

痙攣重積モデルを使って、スピンプローブ (carboxyl-PROXYL) 法により、各々共振器で ESR 計測を行ったところ、ループギャップ共振器で確認出来たマウス脳内でのラジカル反応 (図 3) は、L-band 電磁ホーン型 ESR 装置 (図 1) では感度不良のため、計測困難であった。

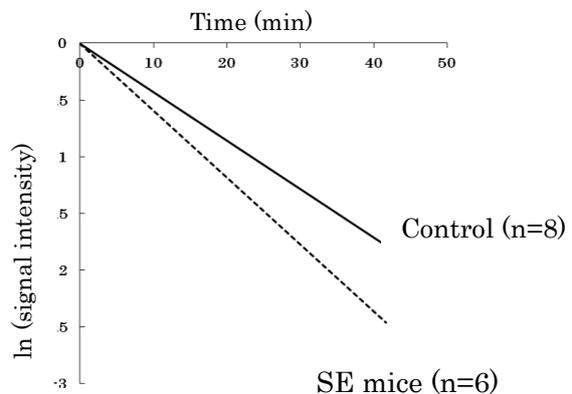


図 3 Control と比較して、痙攣重積 (SE) mice では ESR シグナルの減衰が亢進しており、頭部でフリーラジカルが発生していることがわかる。

同様に、脳腫瘍モデルを作製し、各々共振器で ESR 計測を行った。In vitro の研究として、腫瘍増殖時細胞膜形成に必要な代謝物質（メチオニン）にラジカル分子を付加し、悪性腫瘍細胞に取り込ませ、X-band の共振器で ESR 計測を行った（図 4；特願 2012-3882 号）。さらに、マウス脳内に植え込まれた悪性脳腫瘍にスピンラベル剤を取り込ませ、ループギャップ共振器により ESR 計測を行っている（特許申請予定）。このモデルでも、L-band 電磁ホーン型 ESR 装置では感度不良のため、計測困難であった。

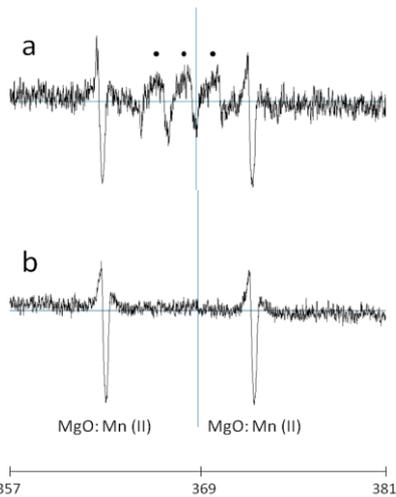


図 4 15mM メチオニンラジカルを取り込ませた脳腫瘍細胞からの ESR 信号 (a)、さらに 15mM L-アスコルビン酸を取り込ませた腫瘍細胞からは ESR 信号は得られなかった (b)。

そこで、感度向上を目的として、試料空間内に生体試料上下移動装置を取り付けると共に、任意幅に可変可能なスリットがついたマイクロ波照射口から、マイクロ波ビームを試料の微細部位に照射できるようにした。さらに、この装置を 360 度回転できるようにした（図 5；特願 2013-107124 号）。この装置を使えば、誘電率の問題で生体試料に透過困難な強力なマイクロ波（Q-band）を使った電磁ホーン型 ESR 装置（図 6；本研究費および他研究で作製）による 3D イメージングも可能となり得る。



図 5 3次元局所 ESR 信号検出方式 ESR イメージング装置の試料台 (for 電磁ホーン)：ホルダー（黒枠円柱）に小動物を入れ、電磁ホーン型 ESR の試料空間へ上から設置する。

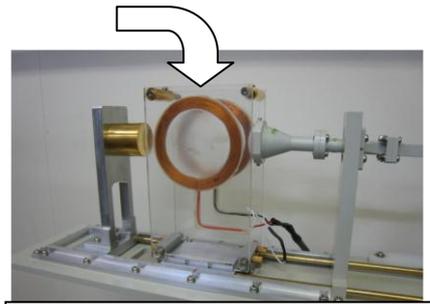


図 6 Q-band 電磁ホーン型 ESR 装置

ESR イメージング装置においては、人工試料（図 7）の ESR イメージングが、K-band 電磁ホーン型 ESR 装置（図 8）により成功している（図 9、10）（特願 2010-14655 号）。



図 7 2、3本の DPPH 試料で構成されるファントム試料

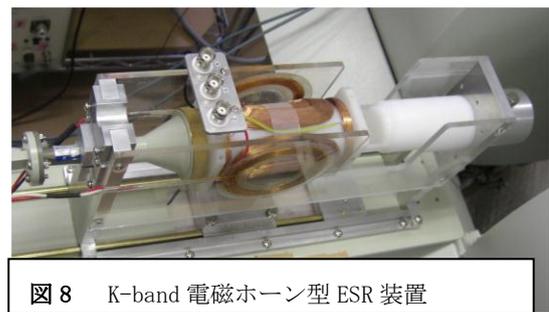


図 8 K-band 電磁ホーン型 ESR 装置

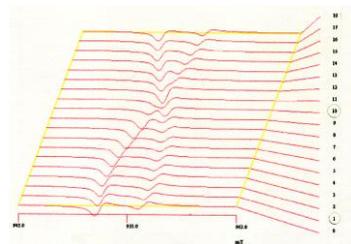


図 9 2本の DPPH 試料からなるファントム試料の磁場勾配方位 $0^\circ \sim 180^\circ$ まで 10° 間隔で計測した磁場勾配 1 次積分 ESR イメージングスペクトルのスタック表示

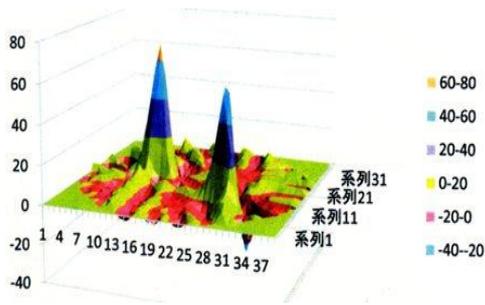


図 10 磁場勾配 ESR スペクトルの角度依存データ(図 9)から、画像再構築ソフトのバックプロジェクション法を用い再構成された元画像(2次元画像；縦軸は信号強度)

今後、電磁ホーン型 ESR 装置の感度を向上させる努力をすると共に、実際に、3次元局所 ESR 信号検出方式 ESR イメージング装置を使った脳腫瘍イメージングを行う予定である。これらの手法が確立されれば、生体試料のフリーラジカルが高感度に測定可能となるだけでなく、少なくとも生きた動物で解像度の高い 3D のフリーラジカルのイメージングが期待される。

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)

〔雑誌論文〕(計 2 件)

小林 正、大賀 恭、戸高 孝、上田 徹、電磁ホーン型 / 共振器型 総合 ESR 装置開発と応用計測、電子スピンスイエンズ学会誌、査読無、10、2012、pp88～93・

上田 徹、梶井泰朋、阿部竜也、小林 正、大賀 恭、糖およびメチオニン代謝の ESR イメージング—ヒト脳腫瘍細胞を用いて—、大分大学 VBL 年報、査読無、2010、pp92-97

〔学会発表〕(計 1 件)

磁場／周波数掃引仕様 電磁ホーン／共振器型 ESR 装置の開発と応用、小林正、大賀 恭、戸高 孝、小野沢晃、上田 徹、第 50 回電子スピンスイエンズ学会年会、2011 年 11 月 17 日、仙台

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 3 件)

名称：マイクロ波反射方式電磁ホーン型 ESR 装置

発明者：小林 正、大賀 恭、上田 徹、原孝文

権利者：国立大学法人 大分大学、原正和

種類：特許

番号：特願 2013-107124 号

出願年月日：25 年 5 月 21 日

国内外の別：国内

名称：ESRI 用造影剤

発明者：小林 正、上田 徹、大賀 恭、梶井泰朋

権利者：国立大学法人 大分大学

種類：特許

番号：特願 2012-3882 号

出願年月日：24 年 1 月 12 日

国内外の別：国内

名称：2 電流電源方式 Zupancic 型コイルとアンチヘルムホルツ型コイル構成の MRI イメージングコイルを用いた 3 次元電磁ホーン型 ESR イメージング装置の開発

発明者：小林 正、上田 徹、原孝文

権利者：国立大学法人 大分大学、原正和

種類：特許

番号：特願 2010-146559 号

出願年月日：22 年 6 月 28 日

国内外の別：国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

上田 徹 (KAMIDA TOHRU)

研究者番号：90315333

(2) 研究分担者

小林 正 (KOBAYASHI TADASHI)

研究者番号：30100936