

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28日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2012

課題番号：22700470

研究課題名（和文）臓器発生機構解明に向けた MR 顕微鏡の開発

研究課題名（英文）Development of MR microscope for organogenesis research

研究代表者

上野 智弘 (UENO TOMOHIRO)

京都大学・医学（系）研究科（研究院）・助教

研究者番号：10379034

研究成果の概要（和文）：14.1 T の高磁場を用いた MR 顕微鏡の開発を行なった。最大 4.0 T/m の傾斜磁場により、20 μm の等方ボクセルでの化学固定したメダカの 3 次元画像の取得を行なった。ガン抑制遺伝子である p53 を変異させたメダカと野生型のメダカの 3 次元画像を比較し、その臓器の状態の違いを明らかにした。さらに、パーキンソン病などで観測される組織の鉄沈着をおおよそ示す透磁率を MR 顕微鏡で定量的にマッピングする手法を検討し、デジタル化の及ぼす影響を明らかにした。

研究成果の概要（英文）：We developed a magnetic resonance microscope by using high magnetic field of 14.1 T. We visualized chemically-fixed medaka in 20 μm isovoxel three dimensionally, where field gradients of 4.0 T/m at maximum were applied. Comparing 3D MR images of p53 cancer suppressor gene mutant medaka with those of wild type medaka, differences in internal organs were obtained. In addition to that, we analyzed digitized effects in quantitative susceptibility mapping, which gave us a tissue iron content map and could be used for detecting local iron accumulation in a brain of a Parkinson's disease patient.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011 年度	900,000	270,000	1,170,000
2012 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

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：MRI（磁気共鳴映像法）、顕微鏡

1. 研究開始当初の背景

(1) 京都大学において、14.1 T の静磁場マグネットを用いて、細胞レベルの高い空間分解能でメダカなどの小型魚類や生体組織を可視化できる MR 顕微鏡の開発を行なってきた。

信号強度は静磁場強度の 2 乗に比例するので、一般臨床機の 10 倍程度の高い静磁場強度を用いて信号強度を向上させ、高分解能の達成を目指している。この際、極限まで高い空間分解能を目指さず、(10 μm)³ 程度に空間分解能を抑えながら、高い時間分解能を得る

ことを目指している。

現在までに、傾斜磁場強度が3軸方向に対しそれぞれ4.2 T/m、3.5 T/m、3.4 T/mである平面型傾斜磁場コイルと直径5 mmの送受信用小型ソレノイドコイルが組み合わされたプローブを開発した。

NMR制御と傾斜磁場制御のシステムを統合し、送受信コイルと傾斜磁場コイル一体型プローブを駆動させていた。さらに、シーケンス制御と画像再構成のソフトウェア開発を行ない、統合システムとしてのMR顕微鏡のプロトタイプを完成させた(図1)。

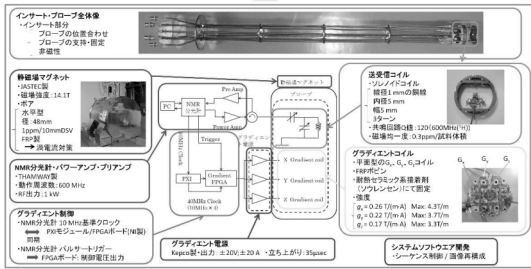


図1 プロトタイプ機のご概念図

(2) プロトタイプ機を用い、小型の川魚であるアブラハヤの幼魚の頭部を20 μm の解像度で3次元撮像した。画像サイズは4096 \times 256 \times 256で、撮像時間は22時間であった(図2)。

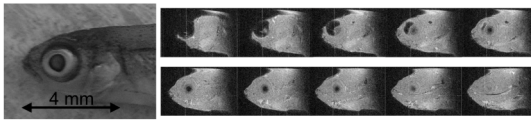


図2 ハヤの頭部の写真とMR画像

画像は3次元画像から頭頂部からあごへ向けたスライス面(サグittal面)を抽出したものであり、原画像の4096点の内、中心の256点分を切り出し、1部のスライスのみ示している。画像から分かるようにアブラハヤの形態学的構造が見て取れる。

2. 研究の目的

(1) MR顕微鏡の安定性と機器制御精度の向上

研究背景で述べたMR顕微鏡のプロトタイプ機を発展させて、臓器発生機構の研究に用いられるようなMR顕微鏡を開発する。特に、プロトタイプ機の結果を踏まえて、新しくプローブを製作し、MR顕微鏡の安定性の向上と機器制御精度の向上を行なう。

(2) 化学固定法の検討

MR顕微鏡での高分解能3次元撮像には長時間要している。そこで、撮像された3次元

画像を最適化するために、撮像中の組織の融解の影響を排除する必要がある。組織の融解を防ぎ、MR顕微鏡にとって最適なコントラストを生む化学固定法の検討を行なう。

(3) 連続病理切片からの3次元デジタル画像作成

撮影されたMR顕微鏡画像の確からしさを検討し、画質を最適化するために、小型魚類であるメダカの連続病理切片から3次元デジタル画像を作成し、リファレンスとして用いる。

(4) 定量的透磁率マッピングの検討

組織中の鉄の含有量と強い相関がある生体組織の透磁率の分布を定量的にマッピングする定量的透磁率マッピングの手法を検討し、MR顕微鏡への導入を図る。特に、アルツハイマー病やパーキンソン病の神経変性疾患において、脳内の限局的な鉄の沈着が観測され、定量的透磁率マッピングの診断への応用が期待されている。

(5) in vivo イメージング環境の構築

小型魚類を生きたまま、MR顕微鏡で高分解能に撮像し、その個体ごとに経時観察を行なうために、撮像中には動きを止めた状態であるような小型魚類のMR顕微鏡内での生存環境の構築を行なう。

3. 研究の方法

(1) MR顕微鏡の安定性と機器制御精度の向上

傾斜磁場の印可時に近くの金属体に発生する渦電流を抑制するために、傾斜磁場コイルと信号用コイル(RFコイル)の一体化したプローブを、強化プラスチックを用いて開発する。同時に、傾斜磁場コイルの機械的振動を軽減させるように設計する。また、傾斜磁場コイルに流す電流値を20Aから40Aに高速電流電源を2台並列に接続することで行なう。

傾斜磁場コイルの印可電流の時間制御をプログラムのタイムスタンプを取ることでより精密化させる。また、傾斜磁場コイル自体の時定数を計測し、その効果も組み込んだ制御プログラムとする。さらに、傾斜磁場勾配の印可順序を傾斜磁場強度の小さいものから大きいものへと変更する。

RFコイルの共鳴回路のQ値の向上を図り、RF印可時の疑似振動の抑制を目指す。

得られた画像を合成することで、MR画像の視野拡大を行ない、ガン抑制遺伝子p53の変異した個体と野生型の個体を比較する。

(2) 化学固定法の検討

ヒトの病理切片を作成する際の病理組織の化学固定法（4%PFA、10%ホルマリン、ブアン液、ダビデソン液、70%エタノール、デント液）を応用する。その際に、固定法の確立している鶏の胚子をモデルに、メダカの固定法を検討する。

MR 画像との比較とともに NMR スペクトロスコピーを行なうことで、化学的組成についても比較を行なう。

(3) 連続病理切片からの 3 次元デジタル画像作成

ダビデソン液によって、化学的に固定されたメダカの全身の連続病理切片を 1 体あたり 100 枚程度作成する。

作成された病理切片を光学顕微鏡下でデジタル写真として取り込み、同一スライド内でのデジタル画像の合成をテンプレートマッチングにより行なう。さらに、スライド間の位置合わせを、病理切片作成時に挿入していたマウスの肝臓の三角中のマーカーを合わせることで行なう。これらにより、3次元のデジタル画像を作成する。

(4) 定量的透磁率マッピングの検討

脳の数値ファントムであるシェップローガンファントムの各領域に透磁率を割り当て、3次元の透磁率ファントムを作成する。透磁率ファントムから双極子磁場と透磁率の畳み込み演算により摂動磁場を計算し、それを入力画像として、定量的透磁率マッピングの検討を行った。入力画像を作成する際に、より現実のものと近づけるために、部分容積効果を組み込む。

SHARP と呼ばれる背景磁場の除去を行ない、双極子磁場のサイズを変えて透磁率のマップを求めた。このとき、双極子磁場に存在する零点の効果をなくすために、磁場の方向を3方向設定して、透磁率を求める COSMOS という方法を採用した。

(5) in vivo イメージング環境の構築

メダカを生きたまま、MR 顕微鏡で観測し、さらにその経時変化を追いかけるために、様々なメダカを飼育できる環境を整備する。

生きたまま撮像する際には、メダカの体動が MR 顕微鏡画像の解像度を劣化させてしまう。そのため、水温を下げてメダカの動きを止める低温麻酔の条件について、検討を行う。

4. 研究成果

(1) MR 顕微鏡の安定性と機器制御精度の向上

傾斜磁場コイルと RF コイルが一体となった強化プラスチック製のプローブを作製した (図 3)。

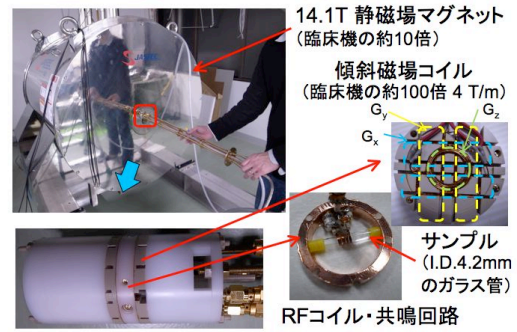


図 3 プラスチック製プローブと MR 顕微鏡の全体写真

新しいプローブでは傾斜磁場コイルに流す電流を 20A から 40A に増加することができ、これにより傾斜磁場の線形領域の増加が図られた。新しいプローブを用いて、傾斜磁場コイルを用いた磁場不均一性の補正について検討し、その有用性を確認した。また、長時間撮像の影響を低減させるために、撮像時の磁場勾配印加順序を傾斜磁場の強度の小さいものから大きいものへとなるように設定し、撮像対象の時間変化に影響を受けにくく出来た。さらに、MR 顕微鏡における視野の制限を緩和するために、別々に撮像されたメダカの頭部と腹部を画像処理によって合成した。化学固定したガン抑制遺伝子 p53 の変異型メダカと野生型メダカについて合成した画像を比較することで、変異型メダカでは肝臓や腸管が縮退し、腹腔内に液体が大きな割合を占めていることが分かった (図 4)。

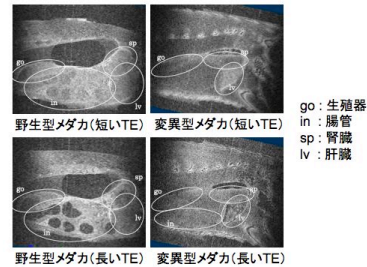


図 4 野生型メダカとガン抑制遺伝子変異型メダカの腹部 MR 画像

出力傾斜磁場をクロック周波数における最小単位で制御できる時間制御プログラムの精密化を行なった。これは、出力傾斜磁場の時間制御プログラムをステートマシンにより構成し、時間確定度の低いアナログ出力時以外の制御時間のタイムスタンプを計測して行なった。その際に、状態維持に必要な時間の長さに応じてクロック周波数を変更した。さらに新型プローブの傾斜磁場コイルの時間変動パラメーターの計測を行ない、その計測結果を用いて、任意の傾斜磁場パルスシーケンスの開発が行なえるようにした。

RF コイルの共鳴回路での Q 値を向上させ、

さらに、RF パルス送受信時の RF コイルや周りの金属体の振動による疑似信号を、RF シールドの効率向上や振動防御装置の導入により軽減した。結果として得られた化学固定した野生型メダカの 3 次元画像の断面図を図 5 に示す。

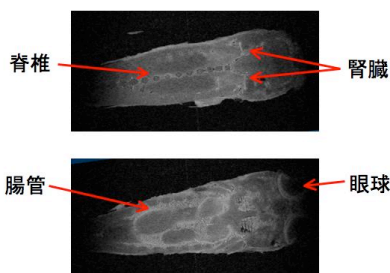


図 5 野生型メダカの MR 顕微鏡画像 (サグittal断面)

(2) 化学固定法の検討

鶏の胚子において、6 種類の固定液 (4%PFA、10%ホルマリン、ブアン液、ダビデソン液、70%エタノール、デント液) の違いを NMR スペクトロスコピーにより調べ、水分量の大きさに対する依存性が 4%PFA で固定した胚子で高く、70%エタノールで固定した胚子で低いという結果が得られた (図 7)。

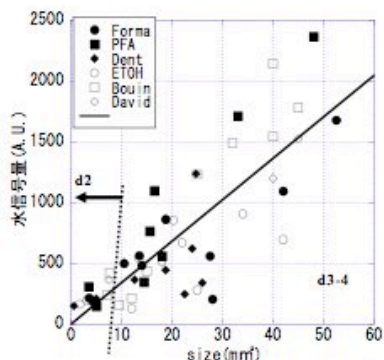


図 7 水信号量の鶏の胚子の大きさ依存性の固定液による違い

異なった固定液を用いて固定された胚子の MRI 画像を比較すると、NMR スペクトロスコピーで得られた結果は、胚子中の神経束などの微小構造との関連があることが示唆された。また、メダカにおいて固定液の影響を同様に検討したが、魚類特有の自己消化の早さにより、状態保存の観点から用いることの出来る固定液がダビデソン液のみであることが分かった。

(3) 連続病理切片からの 3 次元デジタル画像作成

化学固定したメダカの病理連続切片 (サグittal断面) からのリファレンスとしての 3D 画像の製作を行なった。病理連続切片においても、切片間のお互いの位置情報が失われているため、均質なマーカーを加えることで、切片間の位置合わせが可能となった。位置合わせして構成した 3D 画像のボリュームレンダリングと 3D 画像から作成したコロナル断面像を図 8 に示す。

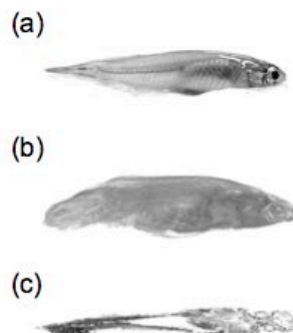


図 8 メダカの連続切片より作成した 3D 画像
(a) メダカの写真、
(b) 3D 画像のボリュームレンダリング、
(c) 3D 画像から作成したコロナル断面像

病理切片画像と MR 顕微鏡画像の比較検討を行い、本研究で行なった 3D 画像の作成が十分確からしく、リファレンスとして使えることが分かった。

(4) 定量的透磁率マッピングの検討

MR 顕微鏡への定量的透磁率マッピングの導入を図った。定量的透磁率マッピングは MR 信号における位相情報から組織の透磁率を求めるものである。関心領域の外からの磁場の影響を数学的に取り除くことができる SHARP という方法を採用して、計算シミュレーション実験、ファントム実験を行なった。

ここで、定量的透磁率マッピング (QSM) での、画像処理のために離散化した空間双極子場の効果が及ぶ範囲を制限した影響を特に検討した。さらに、QSM での部分容積効果を小さくする手法を検討した。本研究により、QSM において、離散化された空間双極子場は直径 15 ピクセルの範囲に限定できることが分かった (図 9)。また、この距離は、空間双極子場の離散化による影響から決まっていることが示唆された。これは、実際の有効な双極子場の大きさは画像の解像度に比例していることを意味する。部分容積効果に関しては、その軽減を示唆する結果が得ら

れた。これらにより、MR 顕微鏡への導入の準備を整えることができた。

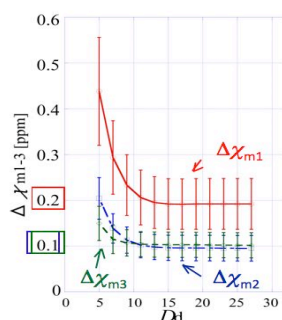


図9 計算された透磁率の空間双極子場の大きさ依存性 (赤、青、緑で囲まれた値が設定値/色の違いが設定領域の違いに対応)

透磁率は組織中の鉄含有量と相関が強く、パーキンソン病やアルツハイマー病などにおける脳組織中の鉄沈着過程を QSM により定量的に可視化できる可能性がある。そのため、MR 顕微鏡の QSM によって、パーキンソン病やアルツハイマー病の疾患モデルのメダカを可視化することで、発症のメカニズムや病態進行のメカニズムに迫れる可能性がある。

(5) in vivo イメージング環境の構築

小型実験動物であるメダカを生きのまま、経時的に MR 顕微鏡により観測するために、in vivo でのイメージングの準備を行なった。水温を下げることで、長時間メダカを麻痺させられることを見出し、in vivo のイメージングへの応用が可能となった。さらに、メダカの飼育スペースを大型化し、また循環集合水槽の試作を行ない、MR 顕微鏡における様々な病態モデルの経時的観測が可能となる環境整備を行なった。

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)

- ① Mai Murashima, Tomohiro Ueno, and Naozo Sugimoto, “Effective Digitized Spatial Size of Unit Dipole Field in Quantitative Susceptibility Mapping”, the proceedings of 35th Annual International Conference of the IEEE, 査読有, 2013, in press
- ② Mai Murashima, Tomohiro Ueno, and Naozo Sugimoto, “Comparisons of Quantitative Susceptibility Mapping (QSM) by using restricted oversampled spatial unit dipole field”, the proceedings of International Society of Magnetic Resonance in Medicine, 査読有, vol.21, 2013, pp.2418

ing (QSM) by using restricted oversampled spatial unit dipole field”, the proceedings of International Society of Magnetic Resonance in Medicine, 査読有, vol.21, 2013, pp.2418

- ③ M.Murashima, T. Ueno, K. Sakai, Y. Taniguchi, and N. Sugimoto, “Postmortem 3D Image Comparison of Wild Type and p53 Knockout Medaka by MR Microscope”, Molecular Imaging and Biology, 査読有, vol.14, supplement 1, 2012, s378
- ④ 庄司航, 上野智弘, 酒井晃二, 杉本直三, “メダカ連続標本切片からの高解像度 3D 画像構築及び MRM 画像との比較”, 信学技報, 査読無, 111 巻, 2012, pp.47-52
- ⑤ 桑原航, 上野智弘, 村島舞, 平石真寛, 山口佳美, 三浦岳, 波多野直也, 谷口善仁, 浦山慎一, 福山秀直, 酒井晃二, 杉本直三, “固定された脊椎動物モデルの NMR スペクトルと MRI 画像の検討”, 信学技報, 査読無, 110 巻, 2011, pp.173-178
- ⑥ T. Ueno, S. Kanayama, W. Kuwabara S. Urayama, N. Hatano, Y. Taniguchi, N. Sugimoto, and H. Fukuyama, “3D Visualization of the Medaka by MR Microscope”, the Proceedings of the 3rd Biomedical Engineering International Conference, 査読有, CD-ROM, 2010, 201052
- ⑦ 桑原航, 上野智弘, 浦山慎一, 谷口善仁, 山口佳美, 三浦岳, 福山秀直, 杉本直三, “MRI 顕微鏡によるメダカガン細胞の in situ 3次元可視化に向けた固定法の検討”, 生体医工学シンポジウム 2010 予稿集, 査読無, CD-ROM, 2010, p.p.1-10

[学会発表] (計 14 件)

- ① Mai Murashima, Tomohiro Ueno, and Naozo Sugimoto, “Effective Digitized Spatial Size of Unit Dipole Field in Quantitative Susceptibility Mapping”, 35th Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society, 2013 年 07 月 04 日, 大阪府大阪市
- ② Mai Murashima, Tomohiro Ueno, and Naozo Sugimoto, “Comparisons of Quantitative Susceptibility Mapping (QSM) by using restricted oversampled spatial unit dipole field”, 21st Annual Meeting & Exhibition of ISMRM, 2013 年 04 月 23 日, Salt Lake

- City, Utah, USA
- ③ Mai Murashima, Tomohiro Ueno, Koji Sakai, and Naozo Sugimoto, “Quantitative Susceptibility Mapping of MR microscope”, 18th Japanese Medaka and Zebrafish Meeting, 2012年09月22日, 京都府京都市
- ④ Masahiro Hiraishi, Tomohiro Ueno, Koji Sakai, and Naozo Sugimoto, “In vivo imaging of small fish using magnetic resonance microscope”, 18th Japanese Medaka and Zebrafish Meeting, 2012年09月22日, 京都府京都市
- ⑤ 庄司航, 上野智弘, 酒井晃二, 杉本直三, “メダカ連続標本切片からの高解像度3D画像構築及びMRM画像との比較”, 電子情報通信学会医用画像研究会, 2012年1月19日, 沖縄県那覇市
- ⑥ M.Murashima, T. Ueno, K. Sakai, N. Hatano, Y. Taniguchi, and N. Sugimoto, “3D image analysis of p53 mutant medaka by the MR Microscope”, 日本生物物理学会第49回年会, 2011年9月17日, 兵庫県姫路市
- ⑦ M.Murashima, T. Ueno, K. Sakai, Y. Taniguchi, and N. Sugimoto, “Postmortem 3D Image Comparison of Wild Type and p53 Knockout Medaka by MR Microscope”, World Molecular Imaging Congress 2011, 2011年9月9日, San Diego CA, USA
- ⑧ T. Ueno, W. Kuwabara, M. Murashima, M. Hiraishi, Y. Yamaguchi, T. Miura, N. Hatano, Y. Taniguchi, S. Urayama, H. Fukuyama, K. Sakai, and N. Sugimoto, “High resolution 3D images and NMR spectra of chick embryo and medaka by 14.1 T MR microscopy”, ISMRM Scientific Workshop, Ultra-High Field Systems & Applications: 7t & Beyond: Progress, Pitfalls and Potential, 2011年2月22日, Lake Louise, Alberta, Canada
- ⑨ 桑原航, 上野智弘, 村島舞, 平石真寛, 山口佳美, 三浦岳, 波多野直也, 谷口善仁, 浦山慎一, 福山秀直, 酒井晃二, 杉本直三, “固定された脊椎動物モデルのNMRスペクトルとMRI画像の検討”, 医用画像研究会(メディカルイメージング連合フォーラム), 2011年1月20日, 沖縄県那覇市
- ⑩ T. Ueno, S. Kanayama, W. Kuwabara, S. Urayama, N. Hatano, Y. Taniguchi, N. Sugimoto, and H. Fukuyama,

- “Development of MR Microscope and three dimensional visualization of the medaka”, 日本生物物理学会第48回年会, 2010年9月20日, 宮城県仙台市
- ⑪ T. Ueno, S. Kanayama, W. Kuwabara, S. Urayama, N. Hatano, Y. Yamaguchi, T. Miura, Y. Taniguchi, N. Sugimoto, and H. Fukuyama, “MR顕微鏡の開発とメダカの3次元的可視化”, 第16回小型魚類研究会, 2010年9月18日, 埼玉県さいたま市
- ⑫ 桑原航, 上野智弘, 浦山慎一, 谷口善仁, 山口佳美, 三浦岳, 福山秀直, 杉本直三, “MRI顕微鏡によるメダカガン細胞のin situ3次元可視化に向けた固定法の検討”, 生体医工学シンポジウム 2010, 2010年9月10日, 北海道札幌市
- ⑬ T. Ueno, S. Kanayama, W. Kuwabara, S. Urayama, N. Hatano, Y. Taniguchi, N. Sugimoto, and H. Fukuyama, “3D Visualization of the Medaka by MR Microscope”, The 3rd Biomedical Engineering Internation Conference, 2010年8月27日, 京都府京都市

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

[その他]

ホームページ等

http://www.med.kyoto-u.ac.jp/organization-staff/research/human_health/mt0601/

6. 研究組織

(1) 研究代表者

上野 智弘 (UENO TOMOHIRO)

京都大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号: 10379034

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし