

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）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：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011 ～ 2012

課題番号：23659592

研究課題名（和文） 電子常磁性共鳴法を用いる複数分子同時イメージング法の開発

研究課題名（英文） Multiple molecular imaging by EPR spectroscopy

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）：生物をそのままの状態画像化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、生体機能・生命機能と関連する生体内複数分子を非侵襲的に画像化をめざしており、近年開発した電子常磁性共鳴イメージング (Electron Paramagnetic Resonance Imaging (EPRI)) 法を利用して、生命現象の解明を試みる。

研究成果の概要（英文）：Electron paramagnetic resonance (EPR) imaging combined with 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. Using this improved EPR imager, multiple molecular imaging studies were carried out in vivo.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,700,000	810,000	3,510,000

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、イメージング、複数分子

## 1. 研究開始当初の背景

電子常磁性共鳴 (EPR) イメージング法は、フリーラジカル等により起こる生体機能情報を非侵襲的に 3次元で視覚化できる分子イメージング法の一手法である。本申請では、複数の常磁性プローブ分子を個別に識別し、複数分子の存在状態や体内動態をそれぞれ同時に非侵襲的に視覚化する、全く新しい“複数分子同時イメージング法の開発”に挑戦する。この分子イメージング手法を病態モデル動物に適応すると、複数の生体機能情報（例えば、酸素分圧や pH、薬物効果など）を一個の動物個体から同時に画像情報として

取得することが可能となる。このような複数分子同時イメージング手法を開発することによって非侵襲的に得られる生体機能情報は、病因の解明や治療薬の開発など幅広い分野での活用が期待されるものである。

## 2. 研究の目的

EPR イメージング法は、フリーラジカルの発生によって起こる様々な体内機能の変化を非侵襲的に視覚化する分子イメージング法の一手法である。本研究では、複数の常磁性プローブ分子を個別に識別し、複数分子から得られる生体機能情報を同一個体で非侵襲

的に同時に画像化する、新しい“複数機能同時イメージング法の開発研究”に挑戦する。この分子イメージング手法を病態モデル動物に適応すると、複数の生体機能情報（本研究では、酸素分圧や pH、薬理効果など）を、同一の動物で同時に取得することが可能となる。本手法を用いて非侵襲的に得られる生体機能情報は、病因の解明や治療薬の開発などの幅広い分野での活用が期待されている。

### 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

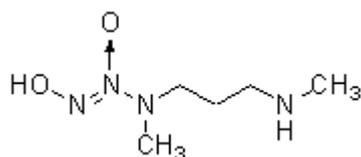
(3-carboxy-2, 2, 5, 5-tetramethylpyrrolidine-1-oxyl)、MCP (methoxycarbonyl-2, 2, 5, 5-tetramethylpyrrolidine-1-oxyl)、HMP (3-hydroxymethyl-2, 2, 5, 5-tetramethylpyrrolidine-1-oxyl)、TEEPONE

(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、これらのナイトロオ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で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 μmol/g 体重の割合で投与した。

(3) 一酸化窒素 (NO) ラジカルの発生とトラッピング法について

NO 発生は、in vitro 系では NO ドナー薬剤を使用した。以下に示した NOC 7 (DOJINDO) 1-Hydroxy-2-oxo-3-(N-methyl-3-aminopropyl)-3-methyl-1-triazene を使用して NO を発生させた。



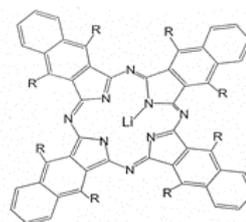
In vivo においてマウス体内での NO 発生は、リポポリサッカリドをマウス腹腔内へ投与して行った。

NO のトラッピングは、Dithiocarbamate-Fe(II) 錯体により行った。NO トラップ剤の調整等は Fujii H. の論文に記載されている方法で行った (参考論文： Fujii H. et al. Mag Reson Med. 1999: 42;

599-602.)。

(4) 酸素感受性プローブ

酸素感受性プローブとして、Lithium 5, 9, 14, 18, 23, 27, 32, 36-octa-n-butoxy-2, 3-naphthlocyanine (LiNc-Bu0) を用いた。



(5) EPR イメージング装置について： 本研究で使用した3次元 EPR イメージング装置は自作した物で、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 (128×128pixels)

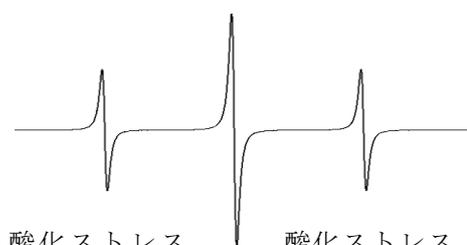
### 4. 研究成果

(1) 複数ラジカルの視覚化

酸素プローブラジカルとニトロキシドラジカルの検出について：

酸素プローブ LiNc-Bu0 および 15N ニトロキシドプローブをマウスに投与して in vivo EPR スペクトルを観測した。得られたスペクトルを以下に示した。

酸素感受性プローブ  
(一本線)LiNc-Buo



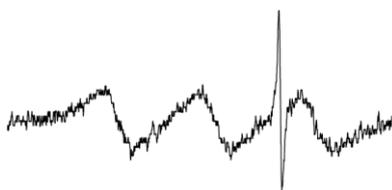
酸化ストレス  
評価プローブ  
(二本線)15N  
ニトロキシド  
(低磁場側)

酸化ストレス  
評価プローブ  
(二本線)15N  
ニトロキシド  
(高磁場側)

LiNc-Bu0 は、一本線のスペクトルを示し、15N 化したニトロキシドプローブは 2 本線を示す。これらの同時画像化において、15N 化ニトロキシドスペクトルでは高磁場側あるいは低磁場側の信号を、酸素プローブスペクトルでは、中心の 1 本線信号を利用してそれぞれ画像化することが可能である。今回の研究期間では、試験管レベルでのファントムを用いた

同時画像化まで行うことが出来、動物での同時画像化を現在進めているところである。NO ラジカルと酸素プローブラジカルの検出：NO は NOC 7 により発生させ、DETC-Fe(II) 錯体でトラップさせた。既報の通り 3 本線の EPR スペクトルが観測できた。マウスにリポポリサッカリドを投与して NO を生成させ、マウスに DETC-Fe(II) 錯体を個別に投与して、*in vivo* において NO をトラップさせた。また、それと同時に酸素感受性プローブ LiNc-BuO を投与して両スペクトルの観測を試みた。得られた *in vivo* EPR スペクトルを以下に示した。

DETC-Fe(II) 錯体でトラップした NO と酸素プローブ LiNc-BuO の EPR スペクトル



ブロードな 3 本線ラジカルが DETC-Fe(II) 錯体でトラップした NO のスペクトルで、その上に、LiNc-BuO ラジカルの 1 本線が重なっていることがわかる。この系においても同時画像化は *in vitro* でのファントムまで成功しており、現在、マウスでの画像化を進めているところである。

(2) 複数ニトロキシド分子の同時画像化：ニトロキシドの窒素原子を 14N 化および 15N 化する事で 2 種類のニトロキシドが識別可能であることが報告されている。この手法では 14N と 15N 化という、三本線と二本線の識別だけを利用するので基本的には 2 種類を同時に識別するのみである。そこで我々は、ニトロキシドの 1 本の信号だけに着目して画像化を試みている。14N 化ニトロキシドであっても生体内での環境の違いでスペクトルが分離できればそれぞれを個別に画像化することが可能なる。現在、1 本線の信号から画像化するプログラムの製作を終えたところで、ファントムでの画像化を進めている。

## 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 9 件)

① Emoto 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.

② Kohri, 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.

③ Fujii HG, Sato-Akaba H, Emoto MC, Itoh 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.

④ Koda 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.

⑤ Sueishi 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.

⑥ Emoto 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.

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

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

⑨ Fujii 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

② Miho 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

③ Miho Emoto, Hideo Sato-Akaba, Hiroshi Hirata, Hirota Fujii, Differences in distribution and reduction rate of BBB permeable nitroxides by in vivo EPR imaging method, SFRBM2012, Nov. 20 '2012, San Antonio

④ Hirota Fujii, 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 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

江本 美穂 (EMOTO MIHO)

札幌医科大学・医療人育成センター・研究員

研究者番号：10578735

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：