

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 10 日現在

機関番号：17501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25350534

研究課題名(和文)冷却装置付3D・MRIコイルを備えた電磁ホーン型ESR装置による腫瘍イメージング

研究課題名(英文)Imaging of oxidant stress in brain tumor using an electromagnetic horn type ESR spectrometer including 3D MRI coil with cooling device

研究代表者

上田 徹 (Kamida, Tohru)

大分大学・医学部・准教授

研究者番号：90315333

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

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、吸収スペクトル/分散スペクトル同時検出仕様、冷却装置付き3次元MRIコイル組込み式X-band電磁ホーン型ESRイメージング装置を開発した。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、メチオニンラジカルを造影剤としてESR計測が可能だったが、前者では、磁場勾配が不均一になりイメージングが困難だった。上記装置を応用させ、吸収スペクトル/分散スペクトル同時検出仕様、冷却装置付き3次元MRIコイル組込み式X-band TMモードESRイメージング装置を考案した。

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, X-band electromagnetic horn type ESR spectrometer including 3D MRI coil with cooling device capable of measuring both absorption spectrum and dispersion spectrum was developed, and compared with the conventional loop gap resonator in brain tumor model. Although ESR measurement from brain tumor was possible using a nitroxyl radical-labeled methionine for a tracer at the latter, non uniform magnetic field prevented ESR imaging in the former. X-band electromagnetic TM mode ESR spectrometer including 3D MRI coil with cooling device capable of measuring both absorption spectrum and dispersion spectrum was newly designed by application of the above-mentioned equipment.

研究分野：総合領域

キーワード：医用 生体画像 ESR 電磁ホーン 脳腫瘍 イメージング

## 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、癌、脳卒中、高血圧症や糖尿病などの生活習慣病、認知症などの疾患に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、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有用である。

(2) 近年、生体試料への透過性が比較的高い低周波のマイクロ波を使ったループギャップ共振器型電子スピン (ESR: Electron Spin Resonance) イメージング装置が開発され、各種疾患の小動物モデルにおけるフリーラジカルのイメージングが多く施設で開発、研究されている。これら従来の共振器では、測定時不対電子のトラップ量に限界があること、測定感度を上げるために高周波のマイクロ波を用いると、試料への透過度が低下するだけでなく試料空間も小さくなることから、ヒトなどより大きな生体試料におけるフリーラジカルのイメージングには未だ限界があり、将来的に臨床機器として応用される可能性は現状では少ない。

(3) 我々の研究グループではより高周波のマイクロ波を使う一方で、試料セルを電磁ホーン型にし、より多くの不対電子数の計測を可能とした世界で唯一稼働の先端的電磁ホーン型 ESR イメージング装置を開発してきた。電磁ホーン型 ESR イメージング装置を使って生体試料におけるフリーラジカルのイメージングを臨床応用させるためには、ESR 測定感度とイメージング解像度の向上、3次元画像技術の構築、機器の巨大化などが必要である。

## 2. 研究の目的

(1) 本研究では、電磁ホーン型 ESR 装置の測定感度とイメージング解像度の向上を目的として、既存の電磁ホーン型 ESR 装置を、位相が 90 度異なる吸収スペクトルと分散スペクトルを同時に検出可能な仕様にし、ESR 計測の精度を高める。さらに、加熱することなく高い電流を流すことが可能な冷却装置付き 3次元 MRI コイルを組み込み、ラジカル試料や小動物の脳腫瘍モデルを使って ESR イメージングを行う。

## 3. 研究の方法

(1) 既存の X-band 電磁ホーン型 ESR 装置を、特

殊ミキサーを使い、吸収スペクトルと 90 度位相の異なる分散スペクトルを同時に検出可能な仕様にし、方解石単結晶中の Mn(II) イオンの ESR 計測を行う。

(2) 2 電流電源 Zupancic 型コイルとアンチヘルムホルツコイルを組み合わせた 3次元 MRI コイルに冷却用パイプを巻き込んだものを試作する。MRI コイルを既存の K-band 電磁ホーン型 ESR 装置に組み込み、人工試料 (ファントム試料) の 3次元イメージングを行う。

(3) 既に *in vitro* で悪性脳腫瘍 (U251 human glioglastoma cells) への取り込みを確認しているスピンラベル剤 (特許 5836135 号) を使用する。予定している ESR イメージング装置で、脳内に植え込まれた腫瘍がイメージング出来ない可能性も考えて、エネルギー代謝関連物質のスピンラベル化も行う。前回行った本研究費報告書 (*in vitro*) の実験と同様の手法で、新たなスピンラベル剤の腫瘍への取り込みと L-アスコルビン酸などによってラジカルが消去されるのを確認する。

(4) 悪性脳腫瘍 (U251 human glioglastoma cells) および生食水 (対照) をマウス脳に定位的に植え込み、4 週後麻酔をかけ試料用円筒に固定。メチオニンラジカルを腹腔内投与し、L-band ループギャップ共振器でマウス頭部より経時的に ESR 計測する。実験終了後、動物の脳を取り出し、脳内で増大した腫瘍の大きさと ESR 計測の結果を比較する。

(5) 実験 (4) の動物モデルを使って、吸収スペクトル/分散スペクトル同時検出仕様、冷却装置付き 3次元 MRI コイル組込み式 X-band 電磁ホーン型 ESR イメージング装置で脳腫瘍のイメージングを試みる。実験終了後、組織学的にみられる腫瘍の広がり、酸化ストレスマーカーで定量されるラジカル量を比較検討する。

## 4. 研究成果

(1) X-band 電磁ホーン型 ESR 装置に特殊ミキサーを採用し、方解石単結晶中の Mn(II) イオンの ESR 計測を行ったところ、互いに 90 度位相が異なる実部 ESR スペクトルと虚部 ESR スペクトルが同時計測され (図 1)、ESR スペクトルの位相整合と制御が可能になった。これにより ESR 計測の精度の向上が期待される。

(2) 2 電流電源 Zupancic 型コイルとアンチヘ

ルムホルツコイルを組み合わせた3次元MRIコイルに冷却用パイプを巻き込んだものを試作した(図2)。MRIコイルを既存のK-band電磁ホーン型ESR装置に組み込み、人工試料(ファントム試料)の3次元イメージングを行った(図3)。ファントム試料のESR信号は計測できたが、コイル内で安定した磁場勾配が得られなかったためか、余分な信号も同時に計測され、イメージングが困難であった。

(3) ブドウ糖ラジカルの合成に成功した(図4)。

(4) メチオンラジカルを腹腔内投与し、その直後よりL-bandループギャップ共振器でマウス頭部より経時的にESR計測したところ、コントロールでは徐々にESR信号が大きくなり、25分で最大信号となった後、減衰していった(図5)。一方、脳腫瘍モデルでは、25分で最大ESR信号となった後、1時間近く経ても信号の減衰はみられなかった(図6)。また、組織学的に定着した腫瘍の大きさに比例してESR信号が大きかった。脳腫瘍モデルでは、メチオンラジカルが腫瘍の細胞膜に取り込まれた結果、時間を経てもESR信号が減衰しなかったと考えられた。メチオンラジカルはESRイメージング装置において、脳腫瘍の造影剤として有用と思われた。吸収スペクトル/分散スペクトル同時検出仕様、冷却装置付き3次元MRIコイル組込み式X-band電磁ホーン型ESRイメージング装置は試作され、脳腫瘍モデルも完成されたが、現時点では、人工試料のESRイメージングですら不完全であった。冷却装置付き3次元MRIコイルにおいて、安定した磁場が得られるよう、デルリン製ボビンに熱伝導性が高い薄膜のグラファイトシートをコイルの内外に巻き込み込むなどの工夫が必要と思われた。

(5) ピロカルピン誘発けいれん重積モデルを使って、新規抗てんかん薬の一つであるラモトリギン(LTG)の抗酸化作用について、酸化ストレスマーカーの定量により検討した。けいれん重積前LTGの投与により、NO代謝が抑制され、NMDA受容体拮抗薬の影響を受けなかったことから、けいれん重積におけるLTGの抗酸化作用が示され、NMDA受容体を介さない経路の関連が示唆された(図7)。

(6) 以前試作したTMモード共振器(図8)に

冷却用パイプを取り付け、吸収スペクトル/分散スペクトル同時検出仕様、冷却装置付き3次元MRIコイル組込み式X-band TMモードESRイメージング装置を試作した。現在、人工試料のイメージングを行なっている。

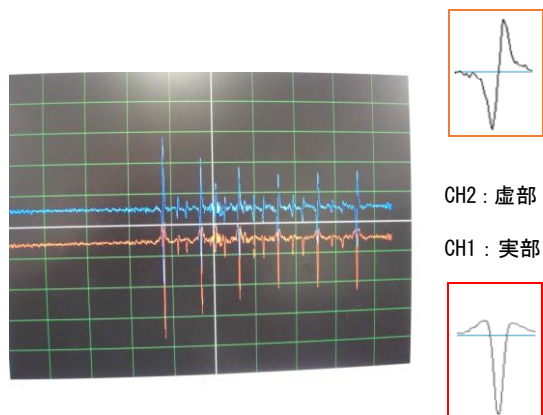


図1. 実部 ESR スペクトルと虚部 ESR スペクトルの同時計測—これらスペクトルは分散・吸収スペクトルから位相が90°ずれている

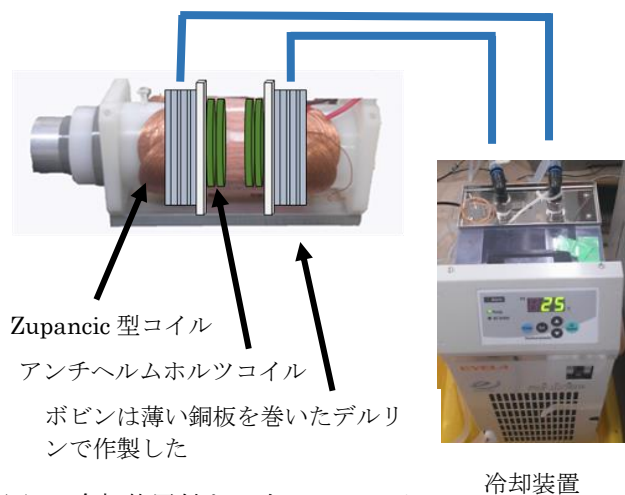


図2. 冷却装置付き3次元MRIコイル



実際の冷却装置付き3次元MRIコイル

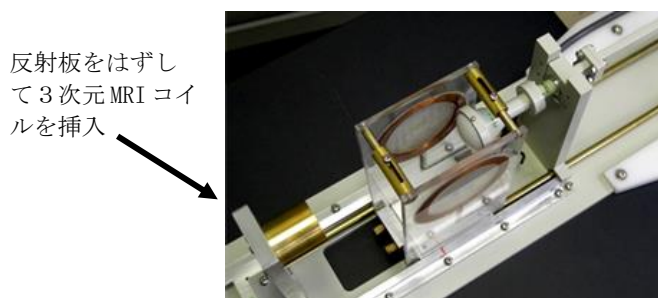


図3. K-band電磁ホーン型ESR装置



実際の ESR イメージング風景

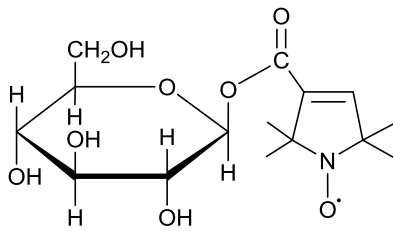


図 4. glucose + 2,2,5,5-tetramethylpyrroline-1-oxyl

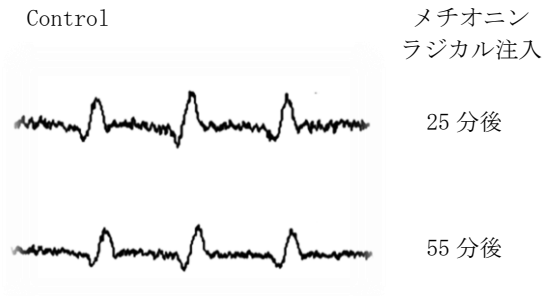


図 5. L-band ループギャップ共振器での正常マウス頭部からの ESR 計測

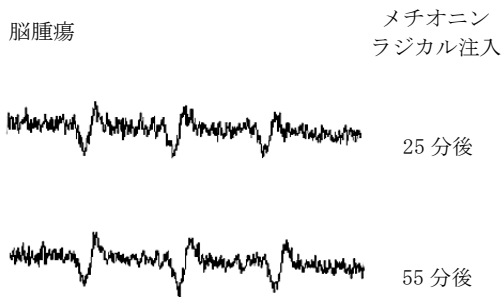


図 6. L-band ループギャップ共振器での脳腫瘍マウス頭部からの ESR 計測

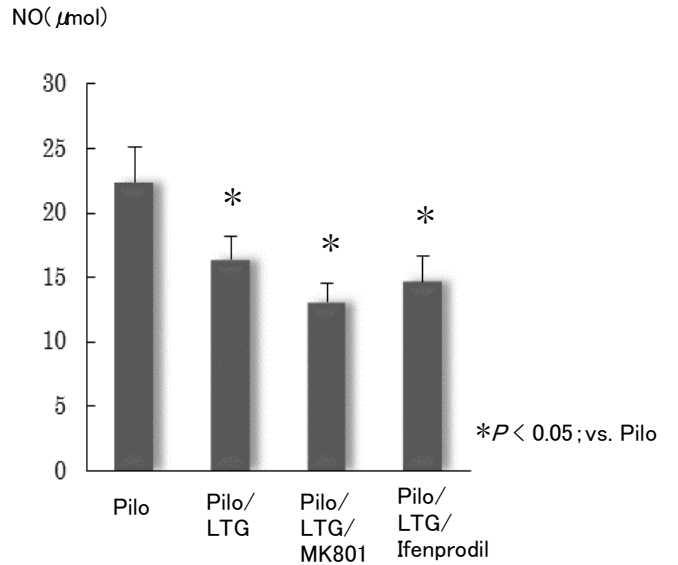
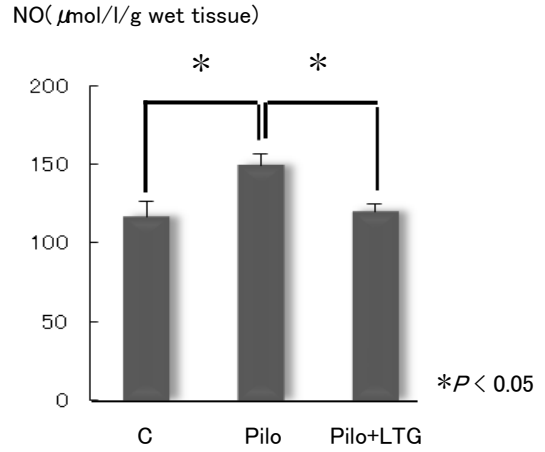


図 7. ピロカルピン誘発痙攣重責マウスにおける LTG の抗酸化効果と NMDA 受容体拮抗薬の影響



図 8. TM110 モード共振器

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 5 件)

- ① Onishi K, Kamida T, Momii Y, et.al (以下 2 人), The clinical and pathological significance of nitric oxide synthase in human pituitary adenomas: a

comparison with MIB-1、Endocrine、査読有 46、2014、154-159

② Fudaba H、Shimomura T、Abe T、Kamida T(8番目)、et.al(2人)、Comparison of multiple parameters obtained on 3T pulsed arterial spin-labeling, diffusion tensor imaging, and MRS and the Ki-67 labeling index in evaluating glioma grading、Am J Neuroradiol、査読有、35、2014、2091-2098

③ Sugita K、Kamida T、Matsuta H、et.al(2人)、Usefulness of pulsed arterial spin-labeling MRI for localizing a seizure focus: a surgical case、Seizure、査読有、23、2014、318-320

④ Fudaba H、Ooba H、Abe T、Kamida T、et.al(3人)、An adult case of cerebral malakoplakia successfully cured by treatment with antibiotics, bethanechol and ascorbic acid、J Neurol Sci、査読有、342、2014、192-196

⑤ Kamida T、Kong S、Eshima N、Fujiki M、Cathodal transcranial direct current stimulation affects seizures and cognition in fully amygdala-kindled rats、Neurol Res、査読有、35、2013、602-607

[学会発表] (計8件)

① 上田 徹、新規抗てんかん薬ラモトリギンの抗酸化作用について—マウスの痙攣重責モデルにおける検討—、日本脳神経外科学会 第74回学術総会、2015年10月14日、ロイトン札幌(北海道札幌市)

② 上田 徹、非けいれん性てんかん重責状態における1HMRSの意義、第48回日本てんかん学会学術総会、2014年10月2日、京王プラザホテル(東京都新宿区)

③ 上田 徹、フリーラジカルとてんかん—ラジカルイメージング装置開発への挑戦—、第47回日本てんかん学会学術総会、2013年10月11日、リーガロイヤルホテル小倉(福岡県北九州市)

④ 小林 正、電磁ホーン型ESR装置によるESR吸収・分散スペクトルの同時計測、第18回ESRフォーラム研究会、2014年7月26日、名古屋大学シンポジオン会議室(愛知県名古屋市)

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況(計1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: 平成 25 年 5 月 21 日

国内外の別: 国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

上田 徹 (KAMIDA Tohru)

大分大学・医学部医学科・准教授

研究者番号: 90315333

(2) 研究分担者

小林 正 (KOBAYASHI Tadashi)

大分大学・工学部電気電子工学科・名誉教授

研究者番号: 30100936

(3) 研究分担者

大賀 恭 (Ohga Yasushi)

大分大学・工学部応用化学科・教授

研究者番号: 60252508