

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：17102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26560215

研究課題名(和文) 生体抗酸化動態の新規磁気共鳴計測手法の創成

研究課題名(英文) In vivo imaging method for ascorbic acid

研究代表者

市川 和洋 (ICHIKAWA, KAZUHIRO)

九州大学・先端融合医療創成センター・教授

研究者番号：10271115

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：アスコルビン酸は主要な抗酸化物質であるが、プロオキシダント・アンチオキシダントの両面を有するなど複雑な役割を果たしていると考えられており、その機序解析が酸化ストレス疾患研究に重要である。本研究では、マウス個体においてオーバーハウザー効果MRI(OMRI)を用いてアスコルビン酸ラジカルの計測技術基盤の確立を目的とした。アスコルビン酸ラジカルの分光特性決定、共振器改良に依る検出感度の最大化を実現した。また、アスコルビン酸ラジカル溶液のマウス投与後、OMRI撮像が可能であること、その検出限界について明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Ascorbic acid is one of the major antioxidants and has been regarded to play multiple roles in antioxidant defense system, having both roles of pro- and anti-oxidant. It is thus important to investigate its reaction mechanism in vivo, for oxidative stress disease research. In this study, an imaging approach with Overhauser enhanced MRI (OMRI) was developed for imaging ascorbic acid radical in mice. Magnetic resonance spectroscopic characterization of ascorbic acid radical was investigated and OMRI resonators were developed to maximize detection sensitivity for ascorbic acid radical. In results, ascorbic acid radical were imaged with OMRI after administration of the radical solution i.m., i.v., i.p. and s.c.

研究分野：医用工学

キーワード：抗酸化物質 イメージング

1. 研究開始当初の背景

抗酸化酵素・抗酸化物質動態は、生体の酸化ストレス防御において重要な役割を果たしている。試験管実験、培養細胞、実験動物モデルで、これら抗酸化物質の生体防御能に関するエビデンスが示される一方で、多くの努力にも関わらず抗酸化医薬品は上市されておらず、また学術的にも疫学調査でのベルベルジンの抗酸化作用が1件報告されているのみである。これはダイナミックに変動していると考えられる抗酸化物質動態を生体丸ごとで継続的に計測する手段がなかった事がその一因である。

我々は、酸化還元感受性の常磁性分子の酸化・還元反応を、電子スピン共鳴分光装置(ESR)、オーバーハウザー効果 MRI(OMRI)により計測し、疾患モデルにおける生体レドックス状態計測を行ってきた。その過程で、アスコルビン酸の1フォームであるアスコルビン酸ラジカルを OMRI 装置により可視化できる可能性を見だし、アスコルビン酸ラジカルを生体において直接計測することで、酸化ストレス疾患個体におけるアスコルビン酸の抗酸化防御の役割を解明できると考えた。

生体物質の動態を直接可視化することは、究極のバイオマーカーとして薬理学あるいは臨床診断上極めて有効な手法になりうる。アスコルビン酸の細胞内濃度は数 mM と生体分子としては高濃度であるとともに、生体抗酸化防御の基盤と考えられている。

生体での動態の動的変化を直接可視化可能となれば、新たなバイオマーカーとなりうること、また酸化疾患機序解析の進展、アスコルビン酸の抗酸化防御機構に関する新たな視点を提供すると考える。また、計測原理は臨床応用への展開が可能であり、将来的にアスコルビン酸状態計測に基づく酸化ストレス臨床診断法へと発展し得る有用性を秘めている。

2. 研究の目的

本研究は、酸化ストレス下で態様変化により生じることが推定されるアスコルビン酸ラジカル体を、動物個体において計測する基盤を樹立することを目的とした。これまで、摘出臓器・血液試料での態様変化の報告は有るが、生体では計測例が無い。

具体的な研究目的は以下のとおりである。これまでに、試験管レベルでアスコルビン酸ラジカル可視化に成功している。その検出下限から推定すると、現在は生体内の定常状態のラジカル量は検出下限と同程度かやや下回る。従って、酸化ストレス等が惹起され、アスコルビン酸ラジカルフォームが過剰産生したときのみ、画像化計測できると推定する。

本研究では、1.疾患状態あるいは大量投与

等の極端な条件下で、マウス等におけるアスコルビン酸ラジカルの直接画像化計測を実現する。また、2.検出感度の改善等により、正常マウスにおけるアスコルビン酸ラジカル計測を実現する。これらの結果を、疾患あるいは関心臓器におけるアスコルビン酸総量と比較定量することで、個体におけるアスコルビン酸の抗酸化防御の役割を解明する為の計測基盤を確立することを目的とした。

3. 研究の方法

研究代表者のグループメンバー(工・薬・理・農)により研究遂行した。

計測機器は、設置済みの 10mT, 15mT OMRI 装置、0.33T ESR 装置、1.5T MRI 装置を一般的な操作パラメータを中心に計測を行う。

アスコルビン酸ラジカルの生体での計測を目的として、外部生成アスコルビン酸ラジカルの大量投与モデル、担がんモデル等での計測を進める。担がんモデルでは臨床的に大量点滴投与が試みられていることも念頭に、生体内に存在するアスコルビン酸ラジカル計測、あるいは外部から大量投与後の動態についても計測を行う。

現在までに得た OMRI 計測感度と想定アスコルビン酸ラジカル濃度との関係性から、これらの計測には、アスコルビン酸ラジカルの分光特性値の決定に基づく測定パラメータの最適化、あるいは計測共振器や励起手法の改良などが必須である。そこで、計測感度向上が目指し、電子スピン励起改良、検出機器の改良等を進め、生理的な条件下でのアスコルビン酸ラジカル計測を目指す。

4. 研究成果

具体的な研究項目、成果は以下の通りである。

1) 実験動物でアスコルビン酸ラジカル計測を実現する。

正常状態でのアスコルビン酸ラジカルは計測下限付近にあると推定している。そこで、まず外部から投与したアスコルビン酸ラジカルを、マウス個体で計測実現することを端緒として研究を進めた。

試験管内で、アスコルビン酸ラジカル溶液(ラジカル量として約 10 μ M)を調製し ESR 装置を用いて比較定量した。本溶液のラジカル寿命は数分程度であり、計測時間に制限があったため、アスコルビン酸ラジカルの縦緩和時間、緩和度等の粗計測を OMRI により行い、緩和パラメータを決定した。

2) アスコルビン酸ラジカル計測感度の向上を図る。

OMRI 計測におけるラジカル検出力は、励起磁場強度、電子スピン励起飽和度等の要素で決定される。従って実験的計測感度向上の手段は、飽和度の向上、及び検出器の改良を行

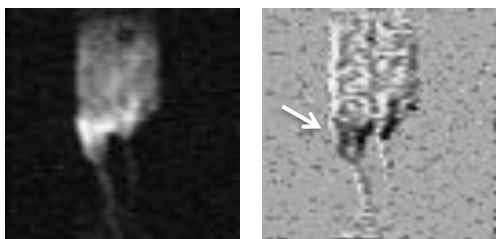
い、検出感度の向上を進めた。

1) の検討で決定した緩和パラメータに基づき計測条件を設定し、レイキ条件の最適化を図った。一方、電子スピン吸収は局在核により複数の吸収線を示し、アスコルビン酸ラジカルでは2本線を有している。通常 OMRI 計測における電子スピン励起は単一吸収線に対して行うため、アスコルビン酸は最大飽和度の 1/2 にとどまるため、通常 OMRI レイキで用いられる連続波励起から、ESR パルス励起による広帯域化を実現し2倍感度像を実現を試みた。パルス幅 1ns~100 μ s に対してパルス発生器ゲート改良を行うとともに、低 Q 共振器を製作した。その結果、励起周波数を 100ppm 以下まで制御すること、温度ドリフトを考慮した励起を行うことが有用であることがわかり、短パルス対応を実現した。その結果、ほぼ2倍の OMRI 感度像を実現した。

3) 健常動物でのアスコルビン酸ラジカル動態を計測する。

1) で決定したアスコルビン酸ラジカルの緩和パラメータに基づき決定した計測条件と、2) で改良を行った OMRI 共振器を用いて、同溶液をマウス皮下、筋肉内、或いは腹腔内に投与し、OMRI 装置で生体計測の可否について検討を行った。

一例としてマウス皮下にアスコルビン酸ラジカル溶液を投与し、OMRI 計測を行った例を下図に示す(左:T1 強調画像、右:アスコルビン酸ラジカル画像、矢印位置にラジカル溶液を投与した)。



マウス皮下、筋肉内、腹腔内投与したアスコルビン酸溶液は、OMRI 計測により計測可能であることを初めて示した。

4) 健常動物でのアスコルビン酸ラジカル動態を計測する。

3) までの検討に基づいて、健常マウスにおけるアスコルビン酸ラジカル計測を予備検討を行った。アスコルビン酸を摂取させた Balb/c マウスにおいて OMRI 計測を行ったが、ラジカル画像としては、変化の傾向が見られるものの有意な画像変化を生じなかった。

マウス種間で体内アスコルビン酸量が異なることが知られており、アスコルビン酸ラジカル量が低い可能性が考えられる。そこで Balb/c, ddY, CD-1 マウス等において比較を試みるとともに、高濃度ラジカル溶液の静脈内点滴投与を行い陽性画像を作成し、徐々に

低濃度溶液へと変更することで、極低濃度のアスコルビン酸ラジカルの画像判別を実現し、検出閾値を明らかにすることを目的として検討を行った。

その結果、高濃度投与では OMRI 撮像後優位な画像強度変化が認められ、アスコルビン酸ラジカルを検出していることが示唆された。同濃度投与では、マウス種により画像強度変化が異なっていた。従って、マウス種間でアスコルビン酸の存在フォーム比が異なり、ラジカル検出性が違う可能性が示唆された。低濃度化する際のラジカル検出閾値が異なるため、またマウス個体間で検出性にばらつきがあった。従って、今後はマウス種の選択検討により、健常動物から疾患動物においてアスコルビン酸ラジカルの画像検出が可能となる可能性が示された。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 4 件)

1. Kumagai K, Akakabe M, Tsuda M, Konishi Y, Tsuda M, Fukushi E, Kawabata J, Abe T, Ichikawa K: Observation of Glycolytic Metabolites in Tumor Cell Lysate by Using Hyperpolarization of Deuterated Glucose. *Biol. Pharm. Bull.* 37(8):1416-21. (2014)
2. 長沼辰弥、中尾素直、市川和洋、内海英雄: レドックス分子イメージング技術と明日をささえる装置開発、*薬学雑誌*, 135(5), 733-8, 2015
3. R. Hata, H. Nonaka, Y. Takakusagi, K. Ichikawa and S. Sando: Design of a hyperpolarized ^{15}N NMR probe that induces a large chemical-shift change upon binding of calcium ion. *Chem Comm.* 51, 12290-12292 (2015)
4. R. Hata, H. Nonaka, Y. Takakusagi, K. Ichikawa and S. Sando: Design of a Hyperpolarized Molecular Probe for Detection of Aminopeptidase N Activity. *Angewandte Chemie.* 55, 1765-1768 (2016)

[学会発表] (計 1 件)

1. Yoichi Takakusagi, Kaori Inoue, Tatsuya Naganuma, Fuminori Hyodo Kazuhiro Ichikawa. Effect of the ionic charge of gadolinium complex for polarization and spin-lattice relaxation of $[^{13}\text{C}]$ hyperpolarized chemical probes after dissolution. 5th DNP symposium. Egmond Aan Zee, Netherlands, 31st Aug- 4th Sep. 2015

[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
<http://redoxnavi.kyushu-u.ac.jp/group1/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

市川和洋 (ICHIKAWA KAZUHIRO)
九州大学・先端融合医療創成センター・教授
研究者番号：10271115

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし

(4) 研究協力者

田村 千尋 (TAMURA CHIHIRO)
加藤 奈緒 (KATO NAO)
小林 竜馬 (KOBAYASHI RYOMA)
酒井 浄 (SAKAI KIYOSHI)