

Fig.42 メダカ腹部 (wild)、axial、約 35 スライス毎に表示

5. 考察

(1) 脂肪のケミカルシフトと解像度

メダカ(wild)の撮像実験で得られた試料全体からのNMRスペクトラムをFig.43に示す。ケミカルシフトにより、脂肪のピークが中央の水のピークからおよそ4ppm離れた場所に存在することが分かる。

現行の撮像実験において、サンプリング周波数として4MHzを用い、4096点信号を取り込んでいるリード方向における周波数分解能は、 $1/4\text{MHz} \cdot 4096 \sim 1.017\text{KHz}$ となる。脂肪のケミカルシフトは4ppmなので、 $600\text{MHz} \cdot 4\text{ppm} = 2.4\text{KHz}$ となり、2点分リード方向に脂肪成分がずれることになる。

ワイルドタイプの画像から脂肪と考えられる浮き出たように見える部分を拡大した画像をFig.44に示す。このFig.45のリード方向と平行な黒い直線上の強度分布をプロットしたも

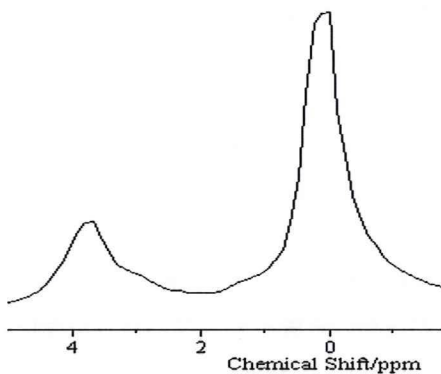


Fig.43 NMR スペクトラム

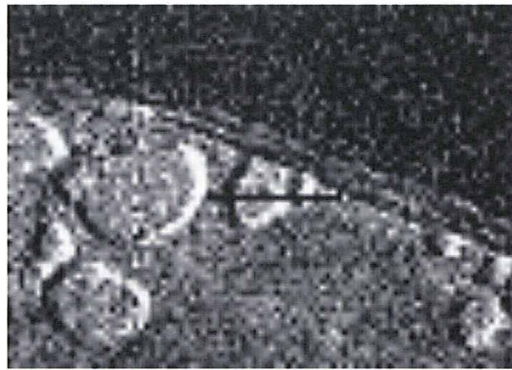


Fig.44 脂肪付近のMRI拡大画像

のをFig.45に示す。Fig.45において、横軸3pixelから4pixel付近にて信号強度が低くなり、画像上では黒く見えている。また13pixelから14pixel付近で強度が突出している。このことは3pixelから12pixelまで分布していた脂肪成分がケミカルシフトにより、2pixelリード方向にシフトしたためと説明できる。低い信号は脂肪成分が移動したためであり、突出部は移動してきた脂肪の信号と元の信号が足し合わされたためである。この効果が、あたかも脂肪成分にエンボス効果を与えたようになり、脂肪のみが立体的に認識されることになったと考えられる。

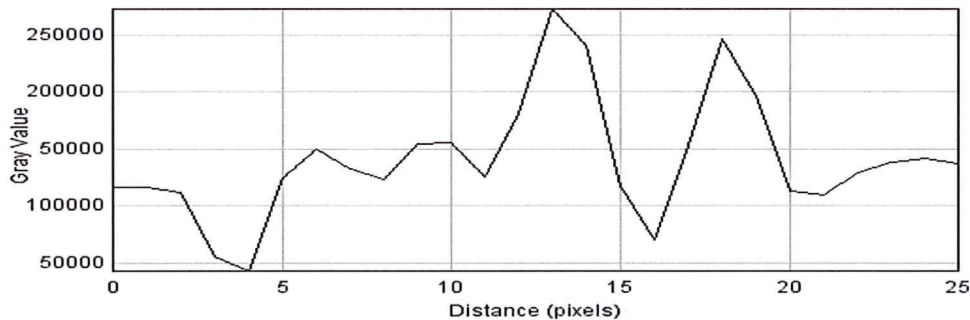


Fig.45 直線上の強度分布図

また、Fig.45 において、脂肪のケミカルシフトによる信号の突出も欠損も明瞭に 2pixels で起きていることが分かる。これは、シフトした脂肪成分が 1pixel でその位置を特定できたと考えることができる。もし、2pixels 以上の解像度であれば、境界が 2pixels 以上でぼやけた画像上の部位がシフトするため、Fig.45 における信号の突出も欠損も 3pixels 以上有することになり、事実と異なる。このことより、解像度として Voxel サイズである(20 μ m)³ が得られたと考えられる。

しかし、生体を用いた解像度の評価には、生体が本質的に 3 次元構造を持つために、正確な評価が難しい。明確な評価を生体画像において行うためには、病理切片と比較して小さな組織が見えたかどうかによって解像度の評価を行う必要がある。

(2) アーチファクト

撮像された画像には、白い筋状のアーチファクトが見られる。これは、RF コイルの感度分布域が傾斜磁場のかかる領域よりも広いため、傾斜磁場の影響を受けない信号が受信されてしまうことによって現れていると考えられる。そのため、傾斜磁場コイルの線形性のよい領域にすべて受信コイルが入るよう設計することが必要だと考える。方策として、RF コイルの小型化が考えられる。もしくは、送信コイルと受信コイルを分離し、受信コイルをサーフェイスコイルにするなど、受信コイルだけを小型化することでも対応が可能だと考える。

(3) 基礎医学への応用；メダカ (knock out) の撮像

ガンの発症は、ガン抑制遺伝子による腫瘍抑制のメカニズムの崩壊によって起こると考えることができる。現在までに様々なガン抑制遺伝子が発見されているが、その中でも P53 は、臓器特異性がなく、多くのヒトの腫瘍内に変異した P53 が発見されている。腫瘍の内部で P53 を再活性化させることによってガンを治療できる可能性も考えられ、その注目度が高い[7]。変異した P53 を持つマウスと P53 のノックアウトマウスとでは、がんの発症パターンに違いがあるなど、ガン治療に向けて、理解すべき問題も多い。

京都大学放射線遺伝学教室において、P53 の遺伝子をノックアウトしたメダカが作られている[8]。P53 のみをノックアウトをするように、交配を重ねて行くと、外見からは明らかな腫瘍がないにも関わらず、メダカの寿命の 3~5 年に遥かに満たない生後 1 年以下で、

ほとんどのメダカが白くやせて死んでしまう。

メダカでは、生後 1 年では殆どガンが発症せず、生後 3 年程度で肝臓ガンを発症する個体が増える[9]。このため、1 年以内での死亡率の高さは P53 に関連していると考えられていたが、いつどのような形でどこにガンが発症するのかなど、その影響についてはよく分かっていなかった。

本研究の過程で、P53 knock out メダカを入手する機会があったため、開発したプローブの応用実験として撮像を行った。P53 ガン発現抑制遺伝子を knock out した生後 10 カ月のメダカ (P53^{Y186X/Y186X} ホモ型) の写真を Fig.46 に示す。

ワイルドタイプと比較し、動きが鈍くなっており、腹部がやせ細り、体全体が白くなっていた。急激に動きがおかしくなっていたために、MRI 顕微鏡による撮像を行なった。得られた頭部の MRI 画像を Fig.47~Fig.49 に、腹部の MRI 画像を Fig.50~Fig.52 に示す。画像の軸合わせや 2D 画像の切り出しはアブラハヤの時と同様である。

Fig.37~Fig.42 と Fig.47~Fig.52 から明らかなように、P53 ノックアウトメダカとワイルドタイプでは、組織構造に明確な違いがある。TR1.2sec であるため、T1 加重に近い形の画像が得られているはずである。肝臓ガンの例では、分化度の違いにより腫瘍の明度に変化する。P53 の欠損によって、どのようなガンが発症するかはよく分かっていないが、組織コントラストが P53 ノックアウトメダカとワイルドタイプが異なっている。しかし、この違いが P53 の欠損によるものだけかは明らかでない。

まず、今回の撮像では、生後 4 ヶ月のワイルドタイプと生後 10 ヶ月のノックアウトメダカを用いているため、成長度合いの違いによる可能性が挙げられる。また、ノックアウトメダカは、非常に痩せていたために、体内脂肪を使い切り、その脂肪部分が空洞になったというような飢餓が引き起こした違いであるという可能性もある。これらの可能性を検証するためには、同一個体における病理切片を作成し、MRI 画像と比較する必要があると考えられる。



Fig.46 メダカ (knock out)

P53 Y186X/Y186X、ホモ型、生後約 10 カ月

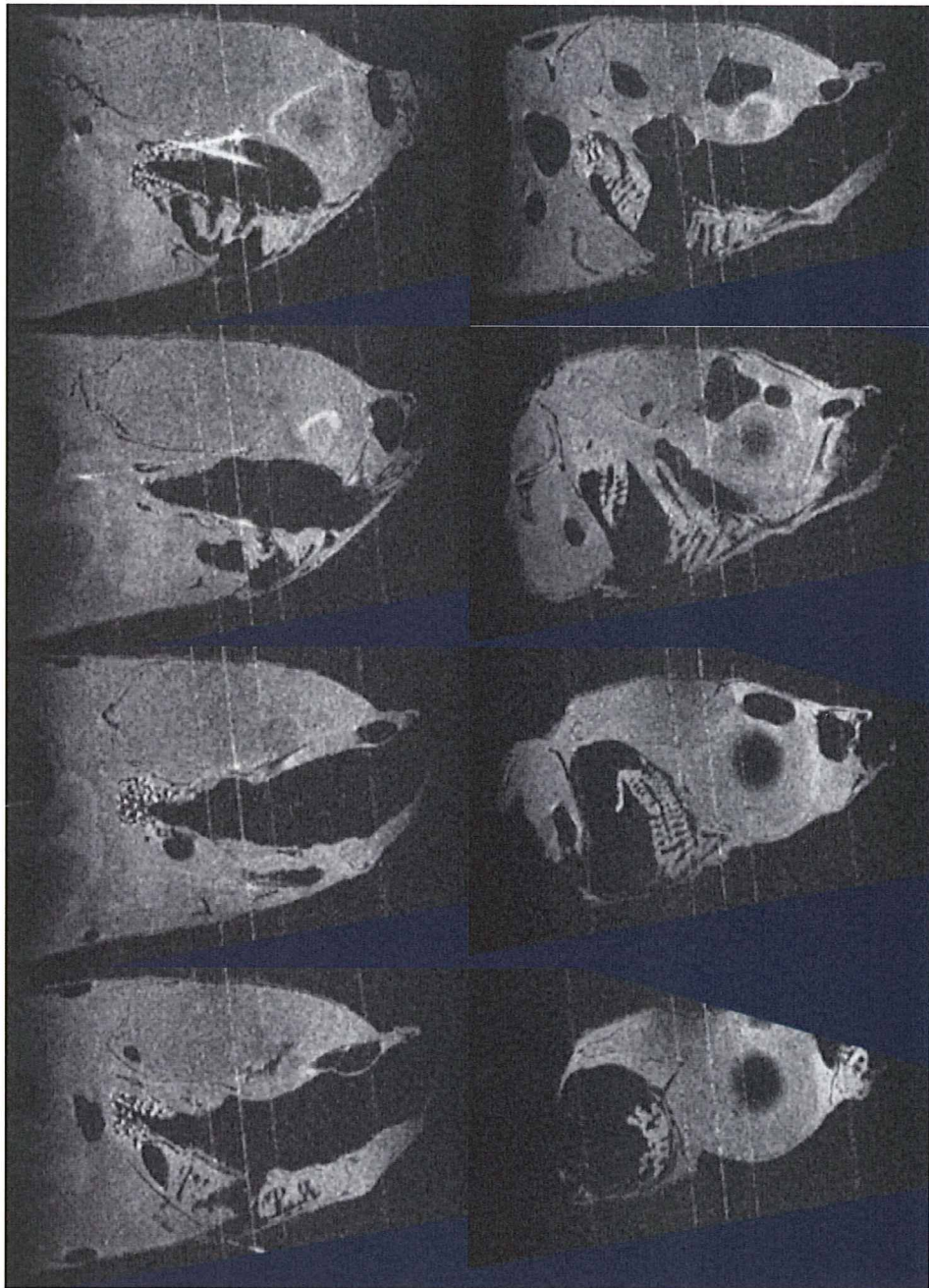


Fig.47 メダカ頭部 (knock out)、saggital、約 20 スライス毎に表示

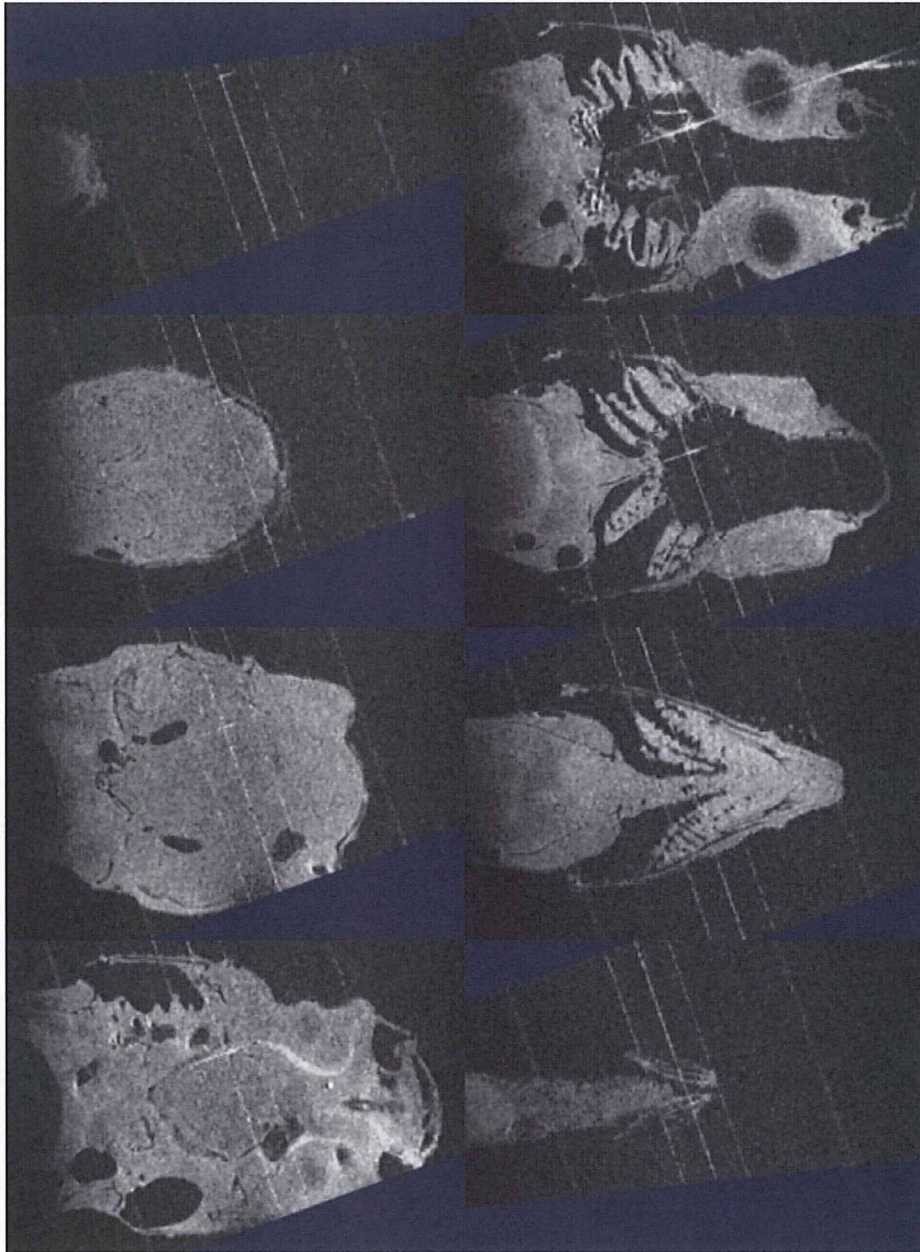


Fig.48 メダカ頭部 (knock out)、coronal、約 30 スライス毎に表示

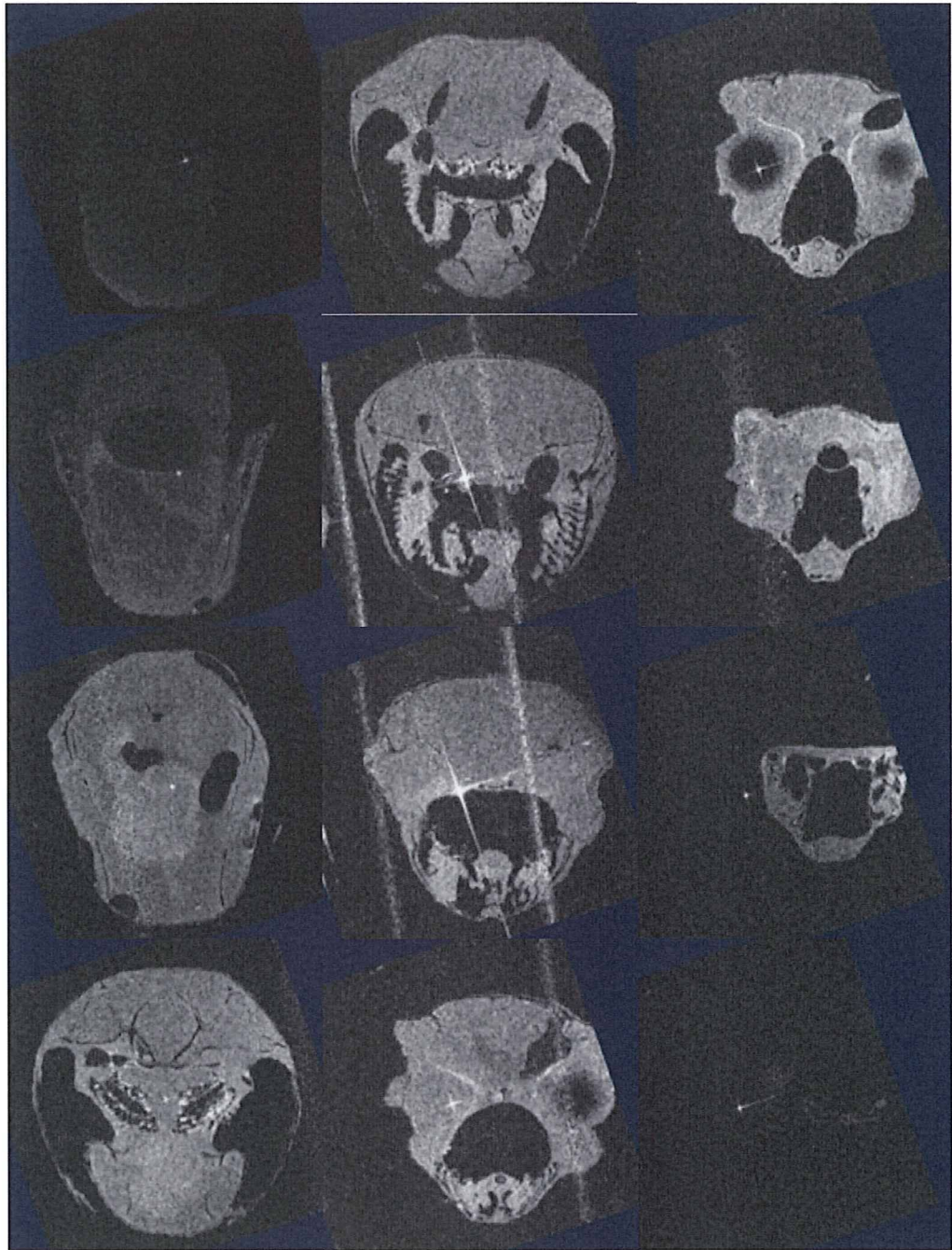


Fig.49 メダカ頭部 (knock out)、axial、約 35 スライス毎に表示



Fig.50 メダカ腹部 (knock out)、saggital、約 20 スライス毎に表示

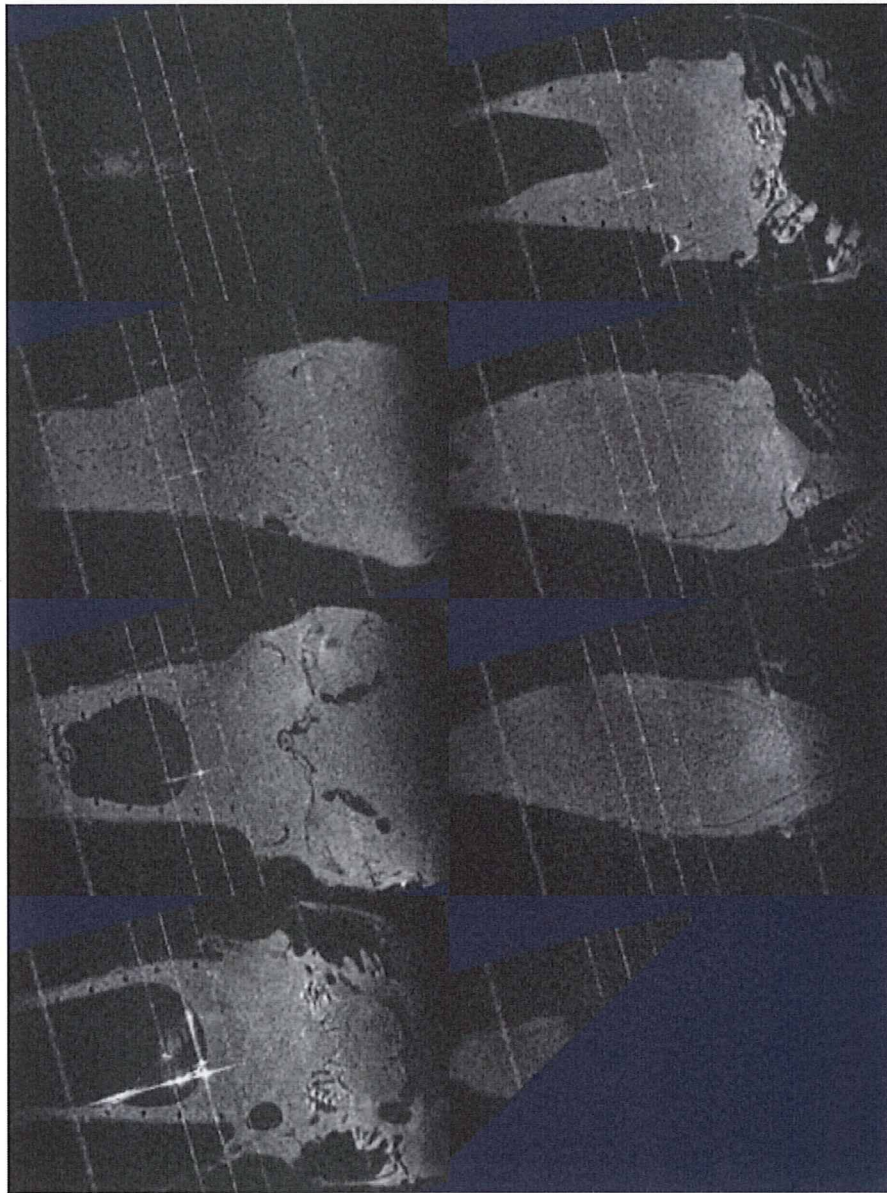


Fig.51 メダカ腹部 (knock out)、coronal、約 30 スライス毎に表示

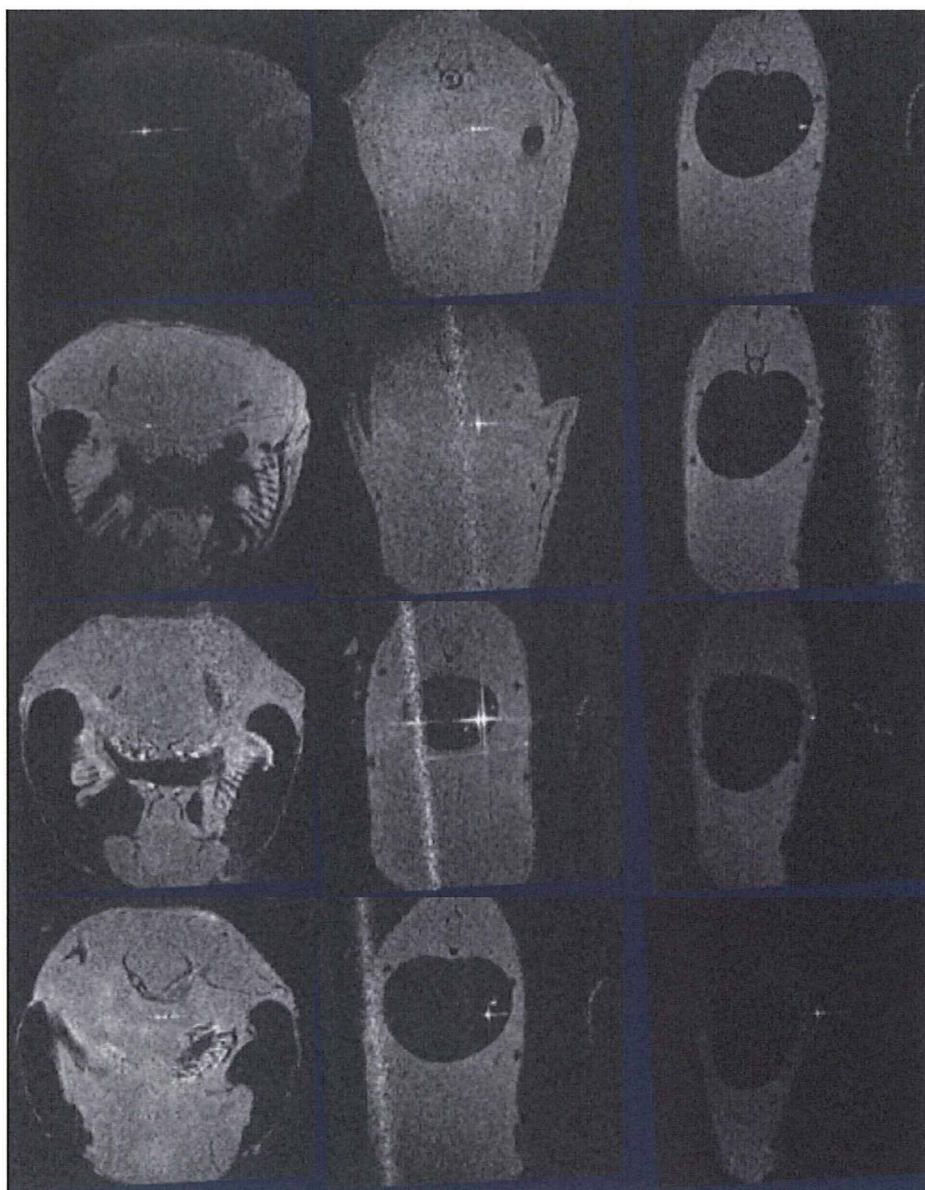


Fig.52 メダカ腹部 (knock out)、axial、約35スライス毎に表示

(4) 化学固定による画像への影響

病理切片の作成時に一般的によく用いられる PFA による固定をメダカ (wild) に対して施し、化学固定による画像への影響を検証した。Fig.53 に PFA 固定したメダカ (wild) を示す。PFA 固定液が臓器によく浸透するように開腹してある。

Fig.54～Fig.56 に撮像した画像を示す。得られた画像から、PFA 固定されたメダカはされていない個体と比べて臓器の境界が明瞭であるように思われた。しかし、信号強度はやや低下しているように思える。PFA による化学固定を行っての撮像は、生きた状態での撮像にはもちろん用いることはできないが、形態をより臓器間のコントラストを高いものとして観察したい場合には有用であると考ええる。



Fig.53 PFA 固定されたメダカ (wild)、生後約4カ月

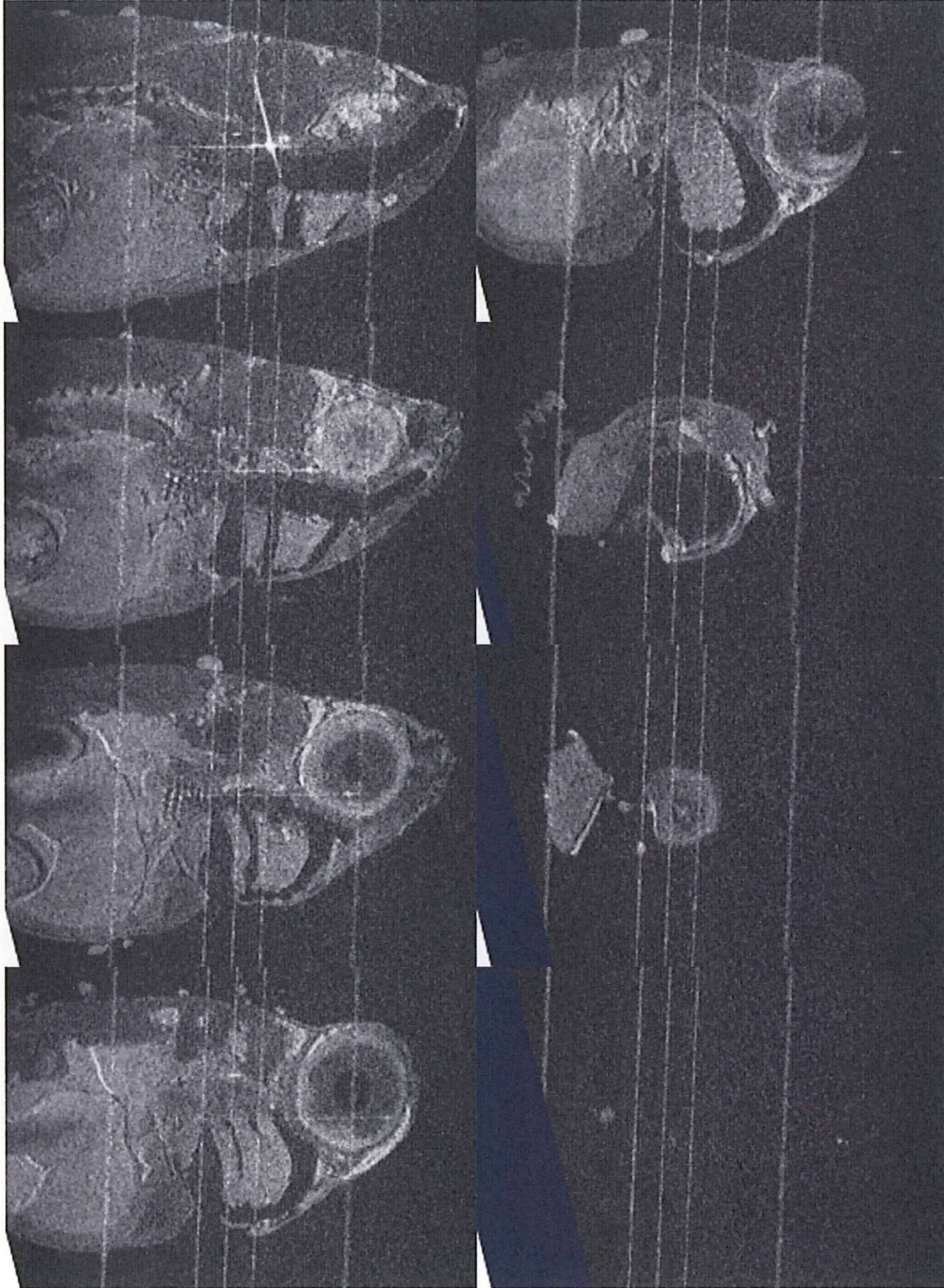


Fig.54 メダカ頭部 (wild)、PFA 固定、saggital、約 20 スライス毎に表示

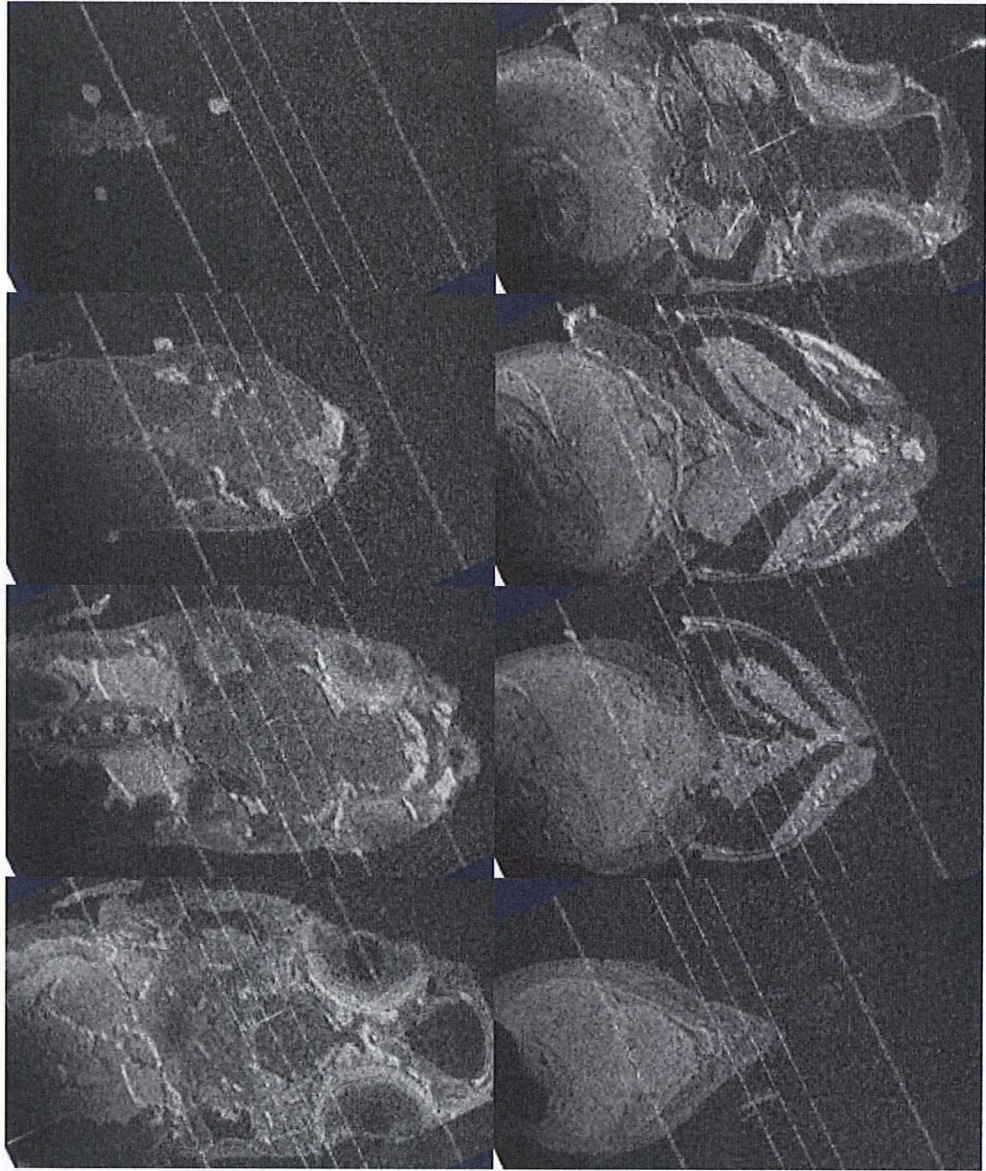


Fig.55 メダカ頭部 (wild)、PFA 固定、coronal、約 30 スライス毎に表示

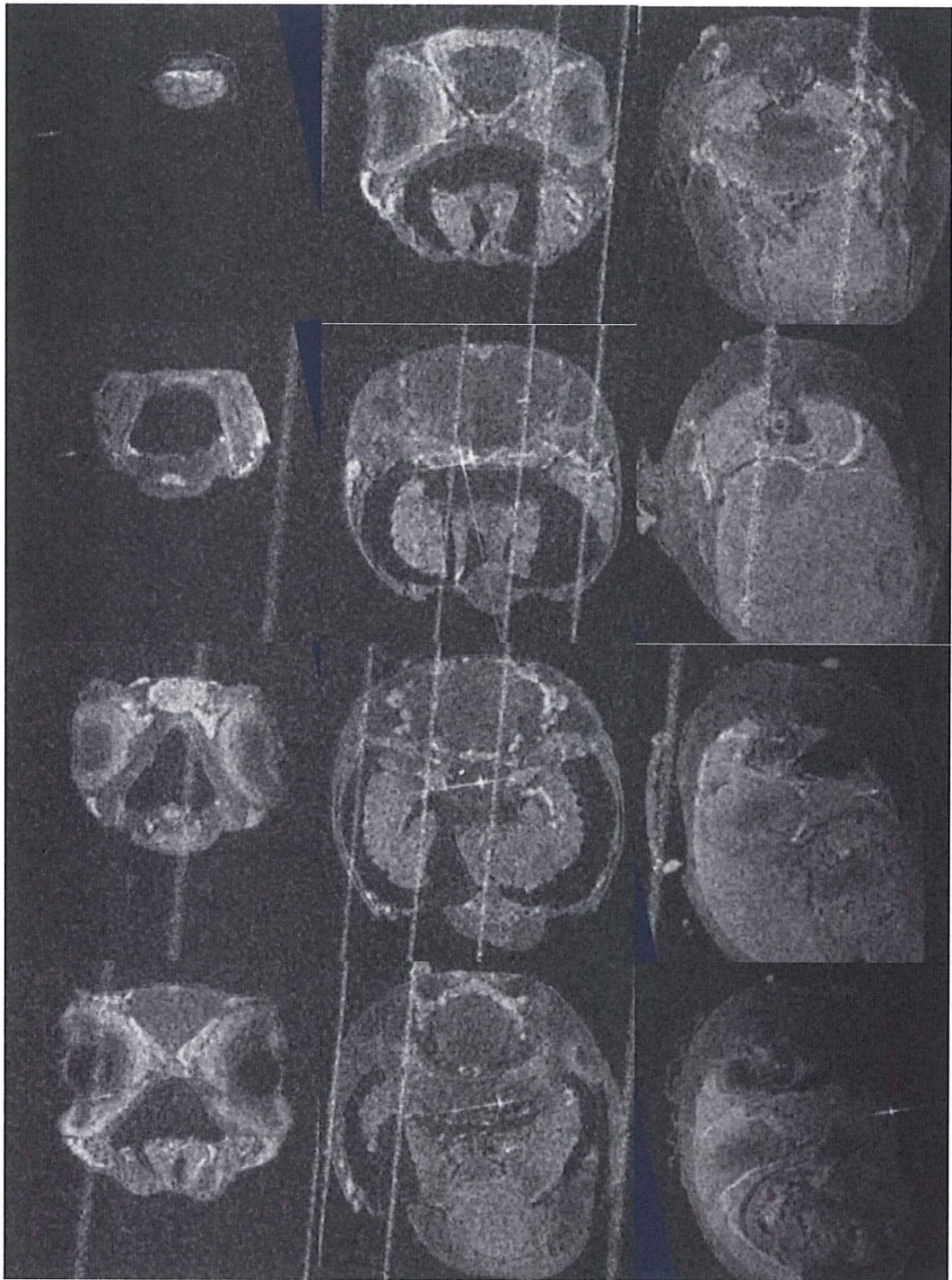


Fig.56 メダカ頭部 (wild)、PFA 固定、axial、約35スライス毎に表示

第4章 結論

RF コイル・傾斜磁場コイル一体型プローブの開発とそれを用いたメダカの撮像を行った。RF コイル部の Q 値は 150 を達成した。また、傾斜磁場強度はおおむね目標値の 3T/m を達成した。さらに空間解像度はプロトタイプ機の持つ $(50\mu\text{m})^3$ から $(20\mu\text{m})^3$ まで向上した。そして、安定性に関しては 2 回の撮像にて故障していたものが 25 回の撮像を現在まで行っても故障していない。また、得られたメダカの 3D 画像からは体内の形態的な特徴がよく観察できた。

さらなる空間解像度の向上には、傾斜磁場用電流アンプの出力の強化や磁場解析ソフトを用いた磁場のシュミレーションによる傾斜磁場コイルのデザインのさらなる洗練が必要であると考えられる。

アーチファクトの問題には、受信コイルのさらなる小型化により受信コイルの感度分布域を最適化することで改善されると考える。

今後、撮像時間を短縮するためには、撮像時間全体の短縮にともなう繰り返し時間の短縮による信号の減少を補うために、1 ラインの信号読み込みの間に数回信号を積算するシーケンスの開発とその処理を行うプログラムの開発などの対策が必要であると考えられる。

文 献

- [1] J. B. Aguayo, S. J. Blackband, and J. Schoeniger, *et al.*, Nuclear magnetic resonance imaging of a single cell, *Nature*, vol.322, pp.190-191, July 1986.
- [2] S. C. Lee, K. Kim, and J. Kim, *et al.*, One micrometer resolution NMR microscopy, *J.Magn.Reson*, vol.150, Issue.2, pp.207-213, June 2001.
- [3] L. Ciobanu, D. A. Seeber, and C. H. Pennington, 3D MR microscopy with resolution $3.7\ \mu\text{m}$ by $3.3\ \mu\text{m}$ by $3.3\ \mu\text{m}$, *J.Magn.Reson*, vol.158, Issue.1-2, pp.178-182, September 2002.
- [4] J. J. Flint, C. H. Lee, and B. Hansen, *et al.*, Magnetic resonance microscopy of mammalian neurons, *NeuroImage*, vol.46, Issue.4, pp.1037-1040, July 2009.
- [5] D. I. Hoult, and R. E. Richards, The Signal-to-Noise Ratio of the Nuclear Magnetic Resonance Experiment, *J.Magn.Reson*, vol.24, pp.71-85, March 1976.
- [6] D. A. Seeber, J. H. Hoftiezer, and W. B. Daniel, *et al.*, Review of scientific Instruments, vol.71, number.11, November 2000.
- [7] K. H. Vousden, and C. Prives, P53 and Prognosis: New Insights and Further Complexity, *Cell*, vol.120, pp.7-10, January 2005.
- [8] Y. Taniguchi, S. Takeda, and M. Furutani-seiki, *et al.*, Generation of medaka gene knockout models by target-selected mutagenesis, *Genome Biology* 2006, vol.7, Issue.12, Article.R116, pp.1-14.
- [9] P. Masahito, K. Aoki, and N. Egami, *et al.*, Life-span Studies on Spontaneous Tumor Development in the Medaka (*Oryzias latipes*), *Jpn.J.Cancer Res.* 80, 1058-1065, November 1989

謝辞

本論文を作成するにあたり、指導教官の杉本直三教授、上野智弘助教から、丁寧かつ熱心なご指導を賜りました。ここに感謝の意を表します。MRI 顕微鏡開発プロジェクトにて大変お世話になりました高次脳イメージング総合研究センターの福山秀直教授そして浦山慎一助教に感謝の意を表します。メダカ (wild) を提供下さった岡昌吾教授に感謝の意を表し

ます。遺伝子改変メダカを提供していただき、それに関する専門的な知識をご教授下さった谷口善仁准教授に感謝の意を表します。プローブの部品の製作にあたって協力くださった波多野直也先生に感謝の意を表します。

付録

(1) 画像視野 (FOV) を横 L_x 、縦 L_y 、画像マトリックス数を横 N_x 、縦 N_y 、画素サイズを横 d_x 、 d_y 、位相エンコード時間を T_y 、位相エンコードステップを ΔG_y 、位相エンコード数を N_e 、傾斜磁場強度を G_x 、データ収集時間を T_x 、サンプリング時間間隔を t_x 、サンプリング点数を N_r とする。まず、画像視野、画像マトリックス数、画素サイズには、

$$d_x = L_x / N_x, \quad d_y = L_y / N_y \quad (1)$$

という関係がある。そして画像マトリックス数 N_x 、 N_y は、撮像時の位相エンコード数 N_e とサンプリング点数 N_r によって決定され、

$$N_x = N_r, \quad N_y = N_e \quad (2)$$

という関係がある。また、 T_x の時間において実現される周波数分解能が $1/T_x$ であり、これが x 方向の 1 画素あたりの周波数帯域 $\gamma G_x d_x / 2\pi$ と等しくなるため、 x 方向の画素サイズ d_x は、

$$(\gamma G_x d_x) / 2\pi = 1/T_x \quad (3)$$

より、

$$d_x = 2\pi / (\gamma G_x d_x) \quad (4)$$

となる。よって、(1) と $T_x = N_x t_x$ より、

$$L_x = (2\pi N_x) / (\gamma G_x d_x) = 2\pi / (\gamma G_x t_x) \quad (5)$$

となる。また、 d_y については最小ステップの位相エンコードと最大ステップの位相エンコードを、各々 T_y の位相エンコード時間だけ加えた場合、位相エンコード方向に隣り合う画素間で、位相が 2π 異なるため、

$$\gamma N_y \Delta G_y d_y T_y = 2\pi \quad (6)$$

すなわち、

$$d_y = 2\pi / (\gamma N_y \Delta G_y T_y) \quad (7)$$

となり、 $G_y = N_y \Delta G_y$ と対応させると、(4) と同様の式が成り立つことがわかる。ここで、 G_y は、位相エンコードにおける磁場勾配の全変化量であるため、

$$L_y = (2\pi N_y) / (\gamma N_y \Delta G_y T_y) = 2\pi / (\gamma \Delta G_y T_y) \quad (8)$$

となる。ゆえに、画像視野と画像サイズは、傾斜磁場強度に反比例することとなる。すなわち、高解像度化のためには強い傾斜磁場を作り出すことが可能な傾斜磁場コイルが必要であることとなる。

研究成果の刊行に関する一覧表レイアウト (参考)

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
該当無し							

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
上野智弘、福山秀直	超高感度MRI 顕微鏡	炎症と免疫	16	4-8	2008
金山翔一郎、上野智弘、犬飼宗弘、浦山慎一、武田和行、杉本直三、福山秀直	14 T MRI 顕微鏡の開発	第13回NMR マイクロイメージング研究会要旨集	13	37-38	2009
T, Ueno, S. Kanayama, M. Inukai, S. Urayama, K. Takeda, N. Sugimoto, and H. Fukuyama	Development of 14.1 T MR Microscope	Molecular Imaging and Biology	12 (suppl.)	S255-S256	2010
金山翔一郎、上野智弘、犬飼宗弘、浦山慎一、武田和行、杉本直三、福山秀直	14 T MRI 顕微鏡の開発	第37回日本共鳴磁気医学会大会講演要旨集	29	195	2009
金山翔一郎、桑原航、上野智弘、浦山慎一、波多野直也、杉本直三、福山秀直	14.1 T MRI 顕微鏡を用いたメダカの3D 可視化	信学技報	109	361-366	2010
金山翔一郎、桑原航、上野智弘、浦山慎一、波多野直也、杉本直三、福山秀直	14.1 T MRI 顕微鏡を用いたメダカの3D 可視化	低温物質科学研究センター誌	16	未定	2010
金山翔一郎、桑原航、上野智弘、浦山慎一、波多野直也、杉本直三、福山秀直	生体組織構造の3D 可視化のための高分解能MRI 顕微鏡の開発	再生医療	9 (suppl.)	245	2010

「超高感度MRI 顕微鏡」

上野智弘、福山秀直

炎症と免疫, Vol. 16, 4-8, (2008)

超高感度 MRI 顕微鏡

上野智弘* 福山秀直**

MRI 顕微鏡は生体細胞の組成や機能を可視化するために、ミクロンオーダーの解像度を目指して開発が進められてきた。この解像度を達成するためには、機器の超高感度化による信号雑音比の向上と 10 T/m 程度の強力な磁場勾配の開発が必要不可欠であった。このため、高磁場化が進み、マイクロコイルとよばれる小さなコイルを用いた小さな共鳴回路と、小さいが強力な磁場勾配コイルで構成されるような形態をとるようになってきている。現状ではまだ実験機に近いが、開発が進み、光学顕微鏡のような形で MRI 顕微鏡が導入されることが期待される。

はじめに

平成 17 年医療施設調査によると、日本の一般病院 (9,026 施設) における MRI の保有台数は 3,878 台、一般診療所 (97,442 施設) において 1,250 台となっている。この保有台数の多さからも、医療における MRI の重要性は推察される。こうした診療用 MRI にくらべ、MRI 顕微鏡という機器は、まだ開発途上にあり、一般病院などで導入されるに至っていない。これは、MRI 顕微鏡が生体細胞中の組成や機能を非破壊・非侵襲的に可視化することをその最終目標としており、診療用 MRI と装置形態・必要技術が大きく異なるた

めである。MRI 顕微鏡に最終的に必要とされる解像度は、生体細胞の典型的な大きさ 10~100 μm を考慮すれば、 $(1\ \mu\text{m})^3$ 程度となる。診療用 MRI における典型的な解像度 $(1\ \text{mm})^3$ と比較すれば、voxel の体積として 9 桁の向上が MRI 顕微鏡に要求されていることになる。この超高感度を実現するために、MRI 顕微鏡では、高磁場、高磁場勾配、マイクロコイルなどが用いられ、診療用 MRI と別の装置として位置づけられている。

本稿において、診療用 MRI にくらべ 9 桁もの超高感度を達成しようとしている MRI 顕微鏡における原理的・技術的側面や開発の現状について概説する。

1. MRI の基本原理

均一磁場 H_0 中でプロトンの核磁気共鳴 (NMR) をおこなえば、周波数 $\omega_0 = \gamma \cdot H_0$ (ω_0 : 共鳴周波数, γ : 磁気回転比), 位相 ϕ_0 をもつプロトンの総量に比例する大きさの信号が得られる。磁場勾配 G を一定時間と一定時間加えた状態で NMR をおこなうことで、場所 r に存在するプロトン $\rho(r)$ の位置情報を、共鳴周波数 $\omega_0 + \omega(r) = \gamma H_0 + \gamma G \cdot r$

[キーワード]

MRI 顕微鏡
高磁場
高磁場勾配
マイクロコイル
高解像度

* UENO Tomohiro/京都大学大学院医学研究科人間健康科学系専攻

** FUKUYAMA Hidenao/京都大学大学院医学研究科附属高次脳機能総合研究センター

(frequency encoding), 位相 $\phi(r) = \phi_0 + t_{enc} \gamma G \cdot r$ (phase encoding) から得ることができる。磁場勾配 G を加えることで、周波数や位相を場所の関数とし、2次元、3次元的に位置情報を構成することにより、プロトンの密度分布 $\rho(r)$ をMRI画像として得ることができる。緩和時間、スピン拡散係数などの物理定数の場所における違いが大きく現れるようにNMRをおこなえば、単純なプロトンの密度分布 $\rho(r)$ だけでなく、物理定数の分布の重みを付けた画像 (T_1 強調画像, T_2 強調画像, 拡散強調画像など) を得ることもできる。

2. 信号検出上の解像度

MRIでは磁場勾配 G をかけることで、場所の違いが信号の周波数や位相の違いになって現れることを用いて画像化している。そのため、MRIの解像度は周波数や位相の違いをどれだけ正確に検出できるかと等価である。信号の取り込み時間 T_{acq} が有限であり、識別できる最小の位相差 $\Delta\phi$ が π であるので、信号検出過程で解像度の制限が加わる。信号取り込み時間 T_{acq} では、 $\Delta\omega = \pi/T_{acq}$ が区別できる最小の周波数差であるので、識別可能な2点間の距離 Δr (解像度) は $\gamma G \cdot \Delta r = \pi/T_{acq}$ となる。また、位相においても同様で、解像度 Δr は $\gamma G \cdot \Delta r t_{enc} = \pi$ となる。解像度と磁場勾配は、 $\Delta r \propto G^{-1}$ の関係があることがわかる。ここで、十分な信号雑音比があると仮定すれば、 $G = 0.1 \text{ T/m}$, $T_{acq} = 0.1 \text{ s}$ を用いることで、周波数差の測定より $\Delta r \approx 1 \mu\text{m}$ が得られる。

3. 超高感度化

実際の測定においては、雑音の問題から逃れることができない。解像度が向上するに従い、1 voxel 中に存在する核スピンの数 ($\rho(r) \Delta v$: $\Delta v = \Delta r^3$) が減少する。解像度にかかわらず雑音 (n) は存在し、高い解像度では1 voxel からの信号が雑音に埋もれてしまう。画像の見やすさ、きれいさの主要素である信号雑音比 $\rho(r) \Delta v/n$ が解像度

Δr^3 に比例しており、高解像度を得るためには高い信号雑音比が必要となる。

信号雑音比を向上させるためには、大別して3つのやり方がある。信号そのものを大きくするやり方、信号を効率よく取り出すやり方、雑音を小さくするやり方である。

1 voxel の信号は、向きの異なる核スピンの向きの統計平均である磁化 M の時間変化率を観測したものである。とくにプロトンの場合、アップスピンとダウンスピンの2つの向きであるので、1 voxel 中にアップが N_+ 個、ダウンが N_- 個あれば、磁化は $M \propto (N_+ - N_-)/(N_+ + N_-)$ となる。また磁化の時間変化率 \dot{M} は、磁化 M が磁場中で歳差運動をすることで生じ、共鳴周波数 ω_0 に比例している。磁化 M と共鳴周波数 ω_0 は磁場に比例しているため、1 voxel の信号の大きさは H_0^2 (H_0 : 磁場) に比例することになる。高磁場を用いることによって、信号強度を高めることができるのである。しかし、高磁場においては雑音も大きくなる。信号を検出する共鳴回路において、回路の雑音が大きいか場合は $n \propto H_0^{0.25}$ となり、試料自体の雑音が大きいか場合は $n \propto H_0^{0.5}$ となっている。結果として、高磁場にすることによって信号雑音比を $H_0^{1.75 \sim 1.5}$ で高めることができるのである。

NMR/MRIでは、磁化 M を磁場中で歳差運動させることで信号検出コイルに電圧を発生させ、その電圧を観測している。効率よく電圧を発生させるためには、コイルが磁化 M の近くに存在したほうがよい。1 voxel あたりのコイルの体積に占める割合を高めることで信号検出感度が向上する。つまり小さなコイル (マイクロコイル) を用いて、感度の向上を測ることができる。さまざまな形状のコイルが存在するが、ソレノイド型が最も高い感度をもつ。コイルの直径を d , 長さを h として、直径と長さの比 h/d を固定すれば、 d^{-1} で信号雑音比が改善される ($d \leq 100 \mu\text{m}$ では $d^{-1/2}$)。より小さいコイルで高い信号雑音比が実現されるのである。