

信号検出コイルや増幅器を冷却することによって、熱雑音を減らすことができる。また、冷却により、信号検出コイルの抵抗を小さくし、回路のQ値を向上できる。簡単には信号が共鳴回路でQ値倍されるので、信号雑音比が改善される。冷却以外では、信号の加算平均が最も多く取られる手法である。信号雑音比をn倍するためには、 n^2 回の加算平均が必要となり、 n^2 倍撮影時間がかかる。そのため、MRIにおける雑音を大きく減らすことは困難である。

4. スピンの乱れ

これまでの議論においては、スピンの緩和や動きを無視している。実際は、信号測定中にvoxel内にあるスピンの運動に乱れが生じ、 $1\mu\text{m}$ という解像度は達成できていない。

スピンの運動の乱れは、核スピン同士が相互作用するスピン-スピン緩和（緩和時間： T_2 ）、スピンが動き回るスピン拡散や流れ、振動、磁場の不均一性によるものがある。スピン-スピン緩和により、信号の線幅が $1/\pi T_2$ に広がってしまう。これは、緩和によって信号採取中に信号が指数関数的に減衰してしまうために起こる。また、同様の減衰が磁場の不均一性によっても起こる。スピン-スピン緩和と磁場の不均一性による減衰をあわせて、その緩和時間を T_2^* とよぶ。このとき、信号の線幅は $1/\pi T_2^*$ に広がる。MRIではスピン-スピン緩和（ T_2 ）は、 $\Delta r = 1/\pi\gamma G T_2$ という解像度の制限を生む。さらに、MRI顕微鏡では、高磁場を用いることによって、試料中の透磁率の違い（とくに異なる組織の境界で局所的な磁場勾配が生じる）が大きくなり、また強力な磁場勾配Gのため、10~100msある T_2 が数ms程度の T_2^* に変化してしまう。つまり、解像度は $\Delta r = 1/\pi\gamma G T_2^*$ となるが、解像度と磁場勾配は $\Delta r \propto G^{-1}$ の関係を保っている。

高い解像度ではスピン拡散の影響が大きくなる。拡散係数Dをもつスピンは、磁場勾配のもと、時

間 t_{enc} のあいだに平均距離 $\sqrt{2Dt_{enc}}$ を移動する。生体細胞では典型的に $D = 1 \times 10^{-9} \text{m}^2/\text{s}$ であり、磁場勾配をかける時間を $t_{enc} = 10 \text{ms}$ とすれば、スピン拡散により、 $4.5\mu\text{m}$ の距離をスピンが移動する。つまり、解像度は $4.5\mu\text{m}$ 以上となってしまい、スピン拡散の影響を抑え、解像度 Δr を向上させるために、磁場勾配をかける時間 t_{enc} を短くし、強力な磁場勾配Gをかけなければならない。このとき、解像度と磁場勾配には $\Delta r \propto G^{-1/2}$ の関係が成り立つ。

このようにスピンの乱れ（ T_2 、 T_2^* 、D）による解像度の低下は、磁場勾配Gを強くかけることで抑制できる。このことから、MRI顕微鏡の実現には、超高感度化による信号雑音比の向上と、磁場勾配の強力化が必要不可欠であることがわかる。

5. KAISTでの取り組み

2001年に、Leeら¹⁾が内径 $275\mu\text{m}$ のチューブの中の外径 $110\mu\text{m}$ の2本の毛細管を撮影し、 $1 \times 1 (\mu\text{m})^2$ の2次元解像度（voxel体積： $75\mu\text{m}^3$ ）を得たとの報告をおこなった。彼らは、14.1Tの高磁場を用い、約11T/mのグレイド型の磁場勾配を作成している。直径12.8mmの共鳴回路の中心に直径 $500\mu\text{m}$ の信号検出コイルを巻いている。スピン拡散の影響を抑えるために、低い拡散係数をもつ油を内径 $275\mu\text{m}$ のチューブの中に満たしている。撮影時間は56分である。図1にその画像を示す。

Leeらは同じ実験環境のもとで、毛細管以外にもゲラニウムの葉幹の画像を $50\mu\text{m}$ スライス、 $2 \times 2 (\mu\text{m})^2$ の2次元解像度で得たと報告している。このときの撮影時間は56分である。図2にその画像を示す。Leeらによる $1 \times 1 (\mu\text{m})^2$ という解像度は、今なお2次元解像度の記録となっている。

6. オハイオ州立大学での取り組み

2000年に、Seeberら²⁾は3軸方向に15T/m以

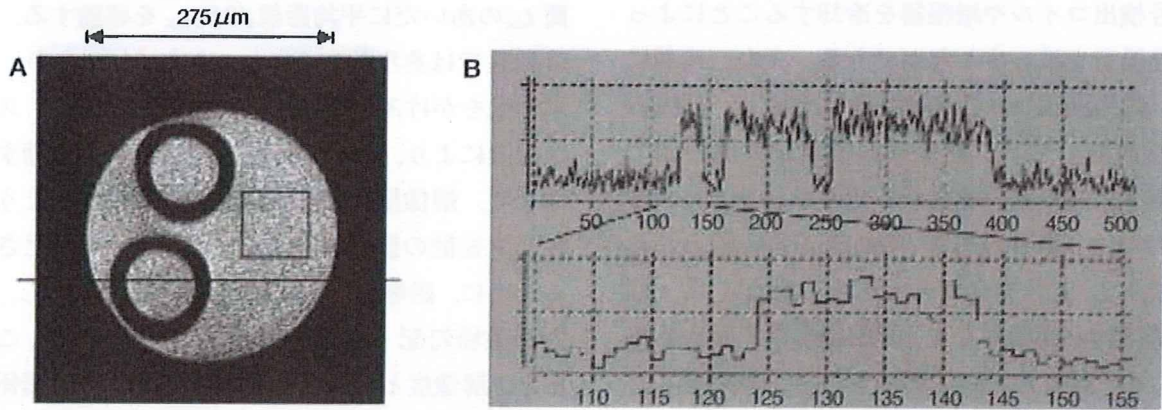


図 1. 2本の毛細管の画像と信号強度分布 (Lee SC *et al.*, 2001¹⁾より引用)
 A : 画像サイズは 512 pixels×512 pixels. 画像中の四角で囲まれた領域での信号雑音比は 4.6.
 B : A の横線上の信号強度分布の全体(上図, 512 点)とその拡大図(下図).

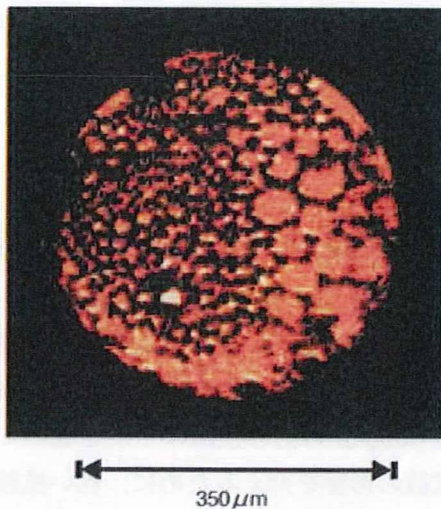


図 2. ゲラニウム(注)の葉幹の画像 (Lee SC *et al.*, 2001¹⁾より引用)

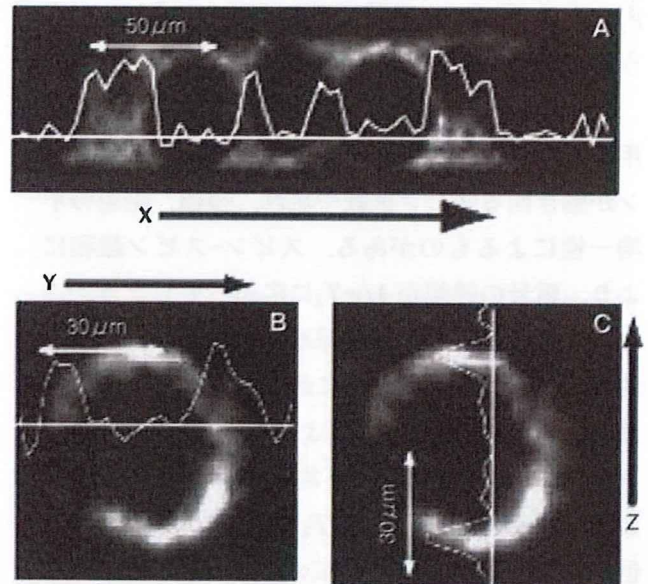


図 3. 毛細管中の蛍光ポリマービーズの MRI 画像 (Ciobanu L *et al.*, 2002³⁾より引用)
 毛細管の円筒軸方向を X 軸, 水平円筒断面方向を Y 軸, 磁場方向 (鉛直方向) を Z 軸としている. 画像中のグラフが画像横断面の信号強度を示している.

上の磁場勾配を $(0.6 \text{ mm})^3$ の領域で発生させ, 熱を 330 W に抑えることができる磁場勾配コイルを開発した. また, コイルのインダクタンスを非常に小さくし, 10~20 μs での高速スイッチングを可能としている. 2002 年, Ciobanu ら³⁾が, 内径 53 μm のマイクロ毛細管中の直径 39 μm の蛍光ポリマービーズを可視化し, 解像度は 1 voxel である $3.7 \mu\text{m} \times 3.3 \mu\text{m} \times 3.3 \mu\text{m} \approx 40 \times 10^{-15} \text{ l}$ であったと報告した. 彼らは 9 T の磁場, 5.8 T/m

の磁場勾配 (Seeber らのものと同型) を用いている. 直径 100 μm という非常に小さな信号検出コイルを作成した. また, T_1 を短く抑えるためにマイクロ毛細管中に硝酸銅を混ぜた水を入れている. 彼らの 3 次元解像度が最も高いものとなっている. 1 枚の撮影時間は 70 分程度である. 図 3 に得ら

れた画像を示す。2004年にはCiobanuら⁴⁾は同じ手法を用いて、生体単細胞（ゾウリムシ、アオミドロ）の可視化にも成功している。

おわりに

MRI顕微鏡は、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目標に、超高感度化を図り発展してきている。しかし、実験機としての色彩が強く、臨床への応用にまで至っていない。また、解像度の向上がこれまでと同様に進むとは考えにくい。だが、非侵襲的に組織の違いや機能を見分けるMRIの重要性が顕微鏡として失われた訳ではない。2007年度より、京都大学においても14.1Tの横置きの超伝導磁石を導入し、究極の解像度よりも臨床応用への道が開けるよう

なMRI顕微鏡の開発を開始している。さまざまなMRI顕微鏡の開発が進み、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。

文 献

- 1) Lee SC *et al* : One micrometer resolution NMR microscopy. *J Magn Reson* **150** : 207-213, 2001
- 2) Seeber DA *et al* : Triaxial magnetic field gradient system for microcoil magnetic resonance imaging. *Rev Sci Instrum* **71** : 4263-4272, 2000
- 3) Ciobanu L *et al* : 3D MR microscopy with resolution 3.7 μm by 3.3 μm by 3.3 μm . *J Magn Reson* **158** : 178-182, 2002
- 4) Ciobanu L *et al* : 3D micron-scale MRI of single biological cells. *Solid State NMR* **25** : 138-141, 2004

「14 T MRI 顕微鏡の開発」

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

第13 回NMR マイクロイメージング研究会要旨集, Vol. 13, 37-38, (2009)

14T MRI 顕微鏡の開発

¹金山翔一郎 ¹上野智弘 ²犬飼宗弘 ¹浦山慎一

²武田和行 ¹杉本直三 ¹福山秀直

¹京都大学大学院医学研究科 ²京都大学大学院理学研究科

背景 最初の MRI による生体細胞の観測は、1986 年に Aguayo らによって 9.5T の静磁場を用いて行われた[1]。その後、磁場勾配の強化や、1voxel の信号感度を向上させるためコイルを小型化することなどにより解像度の向上が図られ、2 次元の撮像では、2001 年に Lee らにより $1\ \mu\text{m} \times 1\ \mu\text{m} \times 75\ \mu\text{m}$ [2]、3 次元では 2002 年に Ciobanu らによって $3.7\ \mu\text{m} \times 3.3\ \mu\text{m} \times 3.3\ \mu\text{m}$ の空間解像度が達成された[3]。最近では、2009 年に Flint らによる解像度($4.7\ \mu\text{m}$)³での神経細胞の可視化が報告されているが[4]、これまでの MRI 顕微鏡では測定には数時間を要するため、その応用は形態学的な研究に限られている。

目的 本研究では空間分解能が($10\ \mu\text{m}$)³であり、時間分解能も高い MRI 顕微鏡の開発を行い、生体組織中の組成や機能を可視化することを目標としている。短時間の測定で高い分解能を達成するにあたっては、感度の低さが一番の障害となる。NMR の信号強度は、静磁場強度とともに増大するため、14.1 T の高い静磁場マグネットを用いて MRI のシステムを構築し、感度を向上させることを目指している。さらに高速撮像シーケンスの応用により、高い空間分解能を保ったまま臨床機と同程度の時間分解能を目指す。この MRI 顕微鏡を用いて、魚類などのモデル生物における発生や脳神経系の活動について研究を行う。また、非凍結病理検査への応用も考えている。

システムの構成 プロトタイプとして、Fig.1 に示すようなシステムを構築した。

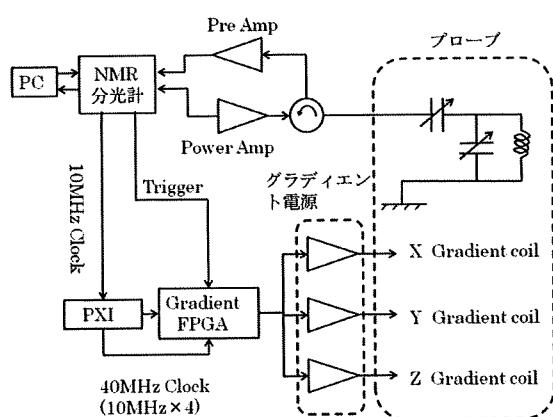


Fig.1 システムのブロックダイアグラム

1: 静磁場マグネット JASTEC 製で 14.1 T、ボア径が 48mm である。生体にストレスの少ない状態での撮像が可能となる水平ボアを採用した。またグラディエントの渦電流の抑制をするために、FRP のボアへと変更した。

2: プローブ プローブは本研究のためにすべて自作した。送受信コイルには、線径 1mm の銅線による内径 5 mm、幅 5 mm、3 ターンのソレノイドコイルを採用した。プロトンスピンの共鳴周波数である 600 MHz でマッチングを調整した共鳴回路における Q 値は 70 であった。また、

試料体積にわたる磁場均一度は 0.3ppm であった。

また、グラディエントコイルとして平面型の x、y、z 各コイルを FRP の同一ボビン上に巻いた。

得られたグラディエント強度はそれぞれ、 $G_x = 0.29 \text{ T/(m}\cdot\text{A)}$ 、 $G_y = 0.20 \text{ T/(m}\cdot\text{A)}$ 、 $G_z = 0.17 \text{ T/(m}\cdot\text{A)}$ 、最大のグラディエント強度は、グラディエント用電源の最大出力が $\pm 20\text{V}$ 、 $\pm 20\text{A}$ なので、それぞれ $G_x = 1.4 \text{ T/m}$ (4.76A)、 $G_y = 0.94 \text{ T/m}$ (4.76A)、 $G_z = 2.5 \text{ T/m}$ (14.3A)となった。

3: グラディエント制御 NMR 分光計の 10 MHz 基準クロックで、FPGA ボードと PXI モジュールを同期させた。NMR 分光計のパルサートリガーにより、FPGA ボードから制御電圧をグラディエント用電源に出力し、グラディエントシーケンスを実行した。

ファントム撮像 水で満たされた外径 5 mm、内径 4.2 mm の NMR 管の中に、外径 1.0 mm、内径 0.6 mm のガラス管 (pyrex 管) を 11 本入れたものをスピネコー法により (TR: 6 sec、TE: 2 m sec、スライスなし) 2D 投影像を撮影した。Fig.2 に得られた画像を示す。画像サイズは 4096×256 で、Fig.2 ではそのうちガラス管の部分を示している。撮像時間は 25 分で、 $1 \text{ pixel} = (26 \mu\text{m})^2$ であった。

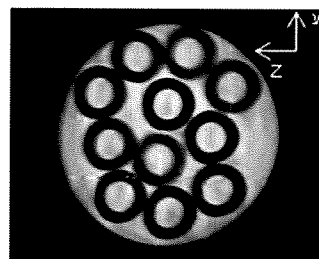


Fig.2 NMR管中のガラス管の画像

解像度 解像度に影響を与えるパラメータに、磁場の不均一性や信号取り込み時間、そして拡散の影響がある。磁場の不均一性による解像度の限界は、現状得られた不均一性を用いて、 $G_r = 1 \text{ T/m}$ として計算すると、 $\Delta r = 0.3 \text{ ppm} \cdot 600 \text{ MHz} / \{(\gamma / 2\pi) \cdot G_r\} \sim 4.2 \mu\text{m}$ となる。また、信号取り込み時間が長いほど分解能をあげられるが、その上限は T_2 で与えられ、生体では組織間の透磁率の違いにより、 $T_2^* \sim$ 数 ms となる。たとえば $T_2^* \sim 5 \text{ ms}$ とすると、 $\Delta r = 2 / \gamma G_r T_2^* \sim 1.5 \mu\text{m}$ となり、 T_2^* は本研究の目標分解能である $10 \mu\text{m}$ と比べるとおよそ一桁違うため大きな影響はない。さらに拡散により、スピニングランダムウォークするため、拡散係数 D_s を $2.5 \times 10^{-1} \text{ m}^2/\text{s}$ とすると、 $\Delta r = \sqrt{6 D_s T_2^*} = 8.6 \mu\text{m}$ となる。加えて、拡散による信号減衰が $\exp(-\alpha \gamma^2 G_r^2 D_s t^3)$ となる (α はシーケンスによる)。そのため、信号取得時間が制限され、信号減衰による解像度の限界は $\Delta r = (8 \alpha D_s / \gamma G_r)^{1/3} \sim 3.7 \mu\text{m}$ となる ($\alpha = 2/3$ とした)。これらの要因を加味しても、 $10 \mu\text{m}$ という目標の空間分解能は達成し得る領域にあるといえる。実際は雑音や受信系のダイナミックレンジの制限などを考慮して感度を最適化する必要がある。時間分解能を向上させると空間解像度は犠牲になるが、これも感度の最適化で解決していきたい。

結論 14.1 T の静磁場を用いた顕微鏡としての MRI のプロトタイプを作成した。プロトタイプを用いて、ファントムの撮像を行った。プロトタイプ機の調整を行い、解像度の議論を踏まえた上で、高解像度化、高速化を試みる。

参考文献

- [1] Aguayo JB, et al: Nuclear magnetic resonance imaging of a single cell. Nature 322 : 190-191, 1986.
- [2] Lee SC, et al : One micrometer resolution NMR microscopy. J Magn Reson 150 : 207-213, 2001.
- [3] Ciobanu L, et al : 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 158 : 178-182, 2002.
- [4] Flint J et al : Magnetic resonance microscopy of mammalian neurons. NeuroImage 46 : 1037-1040, 2009

「Development of 14.1 T MR Microscope」

T. Ueno, S. Kanayama, M. Inukai, S. Urayama,

K. Takeda, N. Sugimoto, and H. Fukuyama

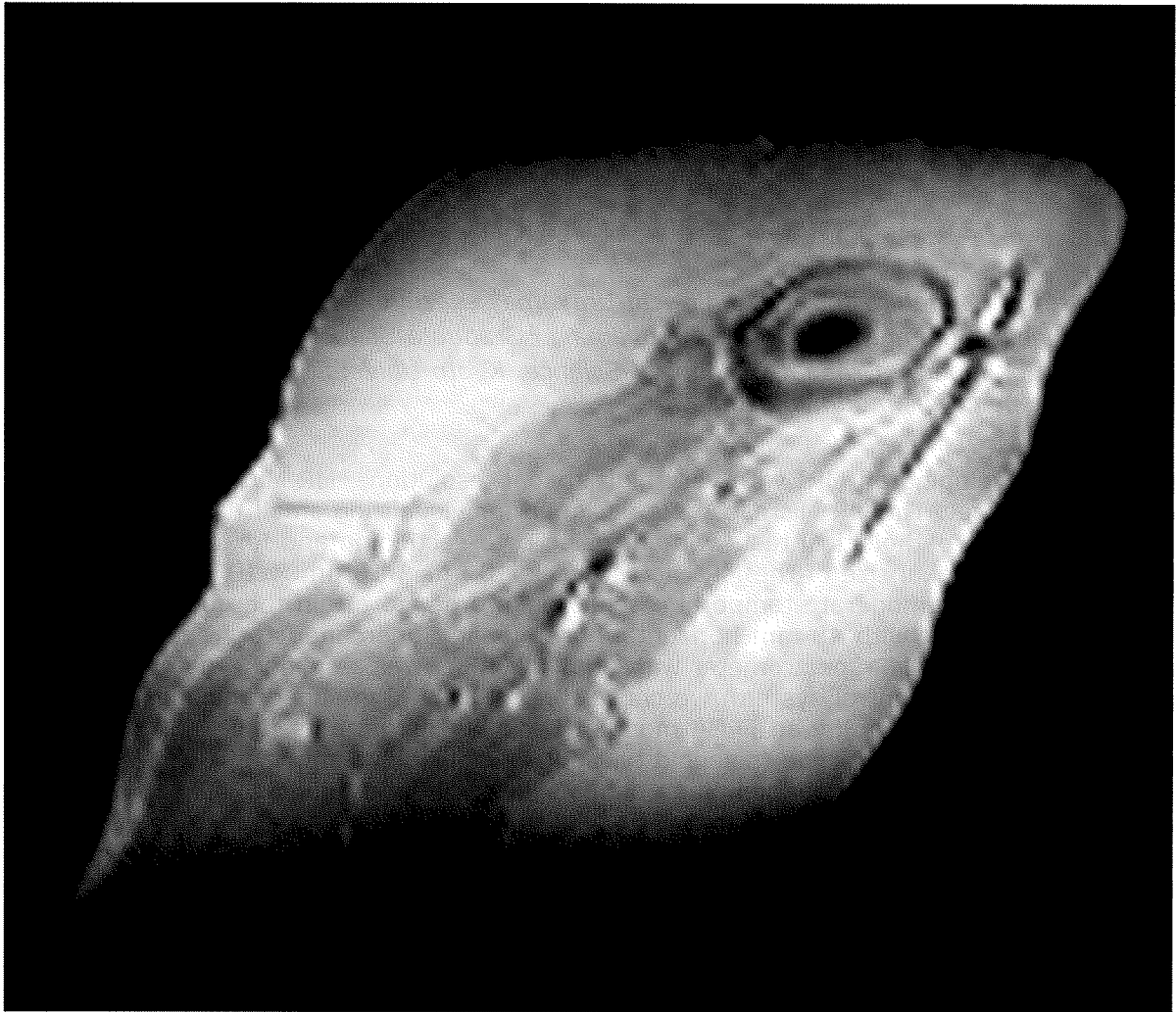
Molecular Imaging and Biology, Vol.12 (suppl.), S255-S256, (2010)

Presentation Number **1055**Poster Session 2b: Imaging Methodology and Instrumentation
September 25, 2009 / 16:00-17:30 / Room: 513

Development of 14.1 T MR Microscope

Tomohiro Ueno¹, **Munehiro Inukai**², **Shin-ichi Urayama**¹, **Kazuyuki Takeda**², **Shouichirou Kanayama**¹, **Naozo Sugimoto**¹, **Hidenao Fukuyama**¹, ¹Graduate School of Medicine, Kyoto University, Kyoto, Japan; ²Graduate School of Science, Kyoto University, Kyoto, Japan.
Contact e-mail: ueno@hs.med.kyoto-u.ac.jp

We have been developing an MRI with very high spatial resolution, "MR Microscope", by using a 14.1 T NMR magnet. The MR Microscope is designed for visualizing small tissue in vitro and will be applicable for pathological tests without using cryo-sectioning and for molecular imaging. The target voxel size of the MR Microscope is $10\ \mu\text{m} \times 10\ \mu\text{m} \times 10\ \mu\text{m}$ in a $128 \times 128 \times 128$ matrix with moderate temporal resolution. In order to attain the goal, we installed the 14.1 T NMR magnet with 48 mm horizontal bore (Japan Superconductor Technology, Inc., Japan) and a 600 MHz NMR spectrometer with an 1 kW RF power amplifier (Thamway, Inc., Japan). As for gradient control system, we chose three 400 W high speed amplifiers (KEPCO, Inc., USA) which were driven by an FPGA module (National Instruments, Inc., USA). All other components such as an MRI probe (solenoid type Rx/Tx coil of ID 5 mm and 5 mm long), gradient coils (triaxial coils on parallel plane bobbins), were built by ourselves. With the above system, we could get less than 1ppm magnetic field homogeneity in the sample space, and 0.62 T/m, 0.56 T/m, 1.3 T/m gradient field strength for 3 orthogonal axes. The difference in the gradient fields was caused by the output voltage limitation of the gradient amplifiers. Using the ordinary spin echo sequence, we accomplished 50 μm resolution with 3D image of a dried young sardine, which was soaked in water beforehand and fixed in agar gel. We are trying to obtain higher spatial resolution by improving the MRI probe and the gradient coils. We will present our current status of the development.



2D slice extracted from 3D image of a dried young sardine in agar gel. The structure of the head, such as the eyeball, is clearly seen.

Disclosure of author financial interest or relationships:

T. Ueno, None; **M. Inukai**, None; **S. Urayama**, None; **K. Takeda**, None; **S. Kanayama**, None; **N. Sugimoto**, None; **H. Fukuyama**, None.

「14 T MRI 顕微鏡の開発」

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

第37 回日本共鳴磁気医学会大会講演要旨集, Vol. 29, 195, (2009)

14 T MRI 顕微鏡の開発

筆頭演者： 金山翔一郎（京都大学大学院医学研究科）

共同演者： 上野智弘 犬飼宗弘 浦山慎一 武田和行 杉本直三 福山秀直

MRI のうち空間解像度が $(100\mu\text{m})^3$ 以下のものを一般に MRI 顕微鏡と呼ぶ。最近では空間解像度 $(4.7\mu\text{m})^3$ を達成したとの報告もあるが、撮像には数時間から丸1日を要するのが現状である。本研究では時間分解能が高い状態で $(10\mu\text{m})^3$ 程度の空間分解能の達成を目標にMRI顕微鏡の開発を行っている。空間解像度と時間分解能はトレードオフの関係にある。まず $(10\mu\text{m})^3$ を超える空間分解能の達成を図り、最終的に時間分解能を向上させても解像度を目標レベルに維持させる。高い空間解像度を達成するためには、高い信号雑音比 (S/N)を得ることが重要である。14.1 T (ボア径 48mm)の静磁場マグネットを用いNMR 信号強度を高めた状態でMRI顕微鏡のプロトタイプ機の開発を行った (Fig.1)。高い S/N が得られる内径 5mm のソレノイド型の送受信コイルと平面型の xyz 方向のグラディエントコイルを一体型プローブとし、グラディエントコイルの設置距離を縮め強い磁場勾配を印加できる設計とした。外径 5 mm、内径 4.2 mm の NMR 管中のファントムとメダカの 2D 投影像 (ピクセルサイズ= $(26\mu\text{m})^2$) の撮像を行った (Fig.2)。今後さらに撮像実験を重ねて撮像パラメータを最適化し、ファントムによる 3次元画像での解像度の評価を行い、生体撮像時の磁場の歪みの増大と撮像時間短縮への対応を行いたい。また、強い磁場勾配の実現と高速シーケンスの応用を試みる。そのために必要なコイルの冷却システム、堅固な構造のプローブ、時間応答の速いアンプを導入してプロトタイプ機の改良を行う。

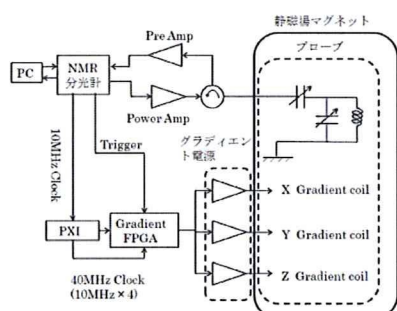


Fig.1 システムのブロックダイアグラム

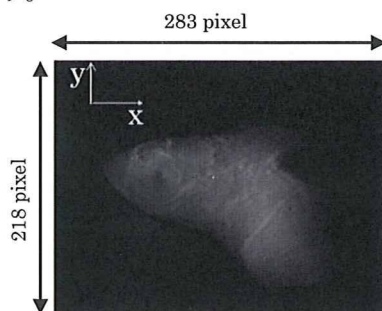


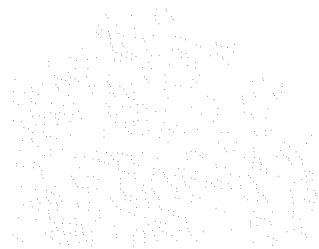
Fig.2 メダカの頭部
撮像条件 スピンエコー法
(TR:1.2sec、TE:2msec) ; 2D
投影像 ; 撮像時間 : 6分
取得画像 画像サイズ
=4096×256・1 pixel= $(26\mu\text{m})^2$

「14.1 T MRI 顕微鏡を用いたメダカの3D 可視化」

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

信学技報, Vol. 109, 361-366, (2010)



14.1T MRI 顕微鏡を用いたメダカの 3D 可視化

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[†]

[†] 京都大学大学院医学研究科 〒606-8507 京都市左京区聖護院川原町 53

[‡] 京都大学大学院工学研究科 〒606-8501 京都市左京区吉田本町

E-mail: †syouchirou@z04kensa.mbox.media.kyoto-u.ac.jp

あらまし 脊椎動物のモデル生物であるメダカ等の小型の生物の高解像度での撮像が可能な MRI 顕微鏡の開発を行っている。高い空間解像度を達成するためには、高い信号雑音比 (S/N) を得ることが重要である。14.1 T (ボア径 48mm) の静磁場マグネットを用い NMR 信号強度を高めた状態で MRI 顕微鏡のプロープの開発を行った。高い S/N が得られる内径 5mm のソレノイド型の送受信コイルと平面型の xyz 方向のグラディエントコイルを一体型プロープとし、グラディエントコイルの設置距離を縮め強い磁場勾配を印加できる設計とした。現段階ではメダカの撮像実験により、空間解像度(20 μm)³ という高解像度での撮像が可能となった。また、P53 ガン抑制遺伝子ノックアウトメダカとワイルドタイプとの形態比較によるガンの発現メカニズムの解析にも寄与すると考えられ、基礎医学にも有用であると考えられる。

キーワード MRI 顕微鏡, 高解像度, メダカ, P53 ガン抑制遺伝子

Visualization of the medaka by 14.1T MRI microscope

Shoichiro KANAYAMA[†] Wataru KUWABARA[†] Tomohiro UENO[†] Shin-ichi URAYAMA[†]

Naoya HATANO[‡] Naozo SUGIMOTO[†] and Hidenao FUKUYAMA[†]

[†] Graduate school of Medicine Kyoto University 53, Shogoin Kawahara-cho, Sakyo-ku, Kyoto, Kyoto, 606-8507 Japan

[‡] Graduate school of Engineering Kyoto University Yoshida Honmachi, Sakyo-ku, Kyoto, Kyoto, 606-8501 Japan

E-mail: †syouchirou@z04kensa.mbox.media.kyoto-u.ac.jp

Abstract We are developing MRI microscope that can take high spatial resolution images of small animals such as the medaka which is a model animal of vertebrata. It is important to acquire high signal to noise ratio for high spatial resolution. We developed probe for MRI microscope with 14.1T Superconductivity magnet to enhance NMR signal. We made plain X Y Z gradient coil and solenoid RF coil which has high signal to noise ratio in one component so that we can shorten distance of gradient coils and obtain strong gradient intensity. Now we can take image of the medaka with (20 μm)³ spatial resolution. Besides we can think that it can be useful to analyze mechanism of origin of cancer by morphological comparing knockout the medaka of P53 genes to wildtype the medaka. So we think it valuable for basic medicine.

Keyword MRI microscope, high spatial resolution, the medaka, P53 gene

1. 背景

最初の MRI による生体細胞の観測は、1986 年に Aguayo らによって 9.5 T の静磁場を用いて行われた[1]。その後、磁場勾配の強化や、1 voxel の信号感度を向上させるためコイルを小型化することなどにより解像度の向上が図られ、2 次元の撮像では、2001 年に Lee らにより 1 μm \times 1 μm \times 75 μm [2]、

3 次元では 2002 年に Ciobanu らによって 3.7 μm \times 3.3 μm \times 3.3 μm の空間解像度が達成された[3]。最近では、2009 年に Flint らによる解像度(4.7 μm)³での神経細胞の可視化が報告されている[4]。しかし、これまでの MRI 顕微鏡では測定には数時間を要するため、それらの応用は形態学的な研究に限られている。

2. 目的

生体細胞のサイズの($10\ \mu\text{m}$)³の空間解像度を持ちながら、時間分解能も高いMRI顕微鏡の開発を開始した。開発の第一段階として時間分解能に関係なく、高い空間分解能の達成を目指している。このMRI顕微鏡により、小型実験動物であるメダカの3D可視化を行う。死後すぐのメダカを撮像することによって、細胞が生きた状態に近い形で可視化できると考えられる。さらにガン抑制遺伝子であるP53を破壊したメダカとワイルドタイプのメダカを比較することにより、P53の発現における表現型の違いを3次元的に明らかにすることを目指す。

3. システムの概要

MRI顕微鏡のシステム構成のダイアグラムをFig.1に示す。ボア径48mmのJASTEC製静磁場マグネットを用い、スペックは磁場強度14.1 T、磁場均一度1ppm/10mT以下である(Fig.1(A))。生体にストレスの少ない状態での撮像が可能となる水平ボアを採用した。また傾斜磁場のスイッチングによる渦電流を抑制するために、強化プラスチックであるFRP製のボアへと変更した。THAMWAY製のNMR分光計・パワーアンプ・プリアンプを用いた(Fig.1(B))。動作周波数は600MHz、パワーアンプの出力は1kWである。National Instruments製のPXIモジュールとFPGAボードを用いて傾斜磁場制御を行った。PXIモジュールがNMR分光計の10MHz基準クロックを参照し、さらにFPGAボードに供給することで、NMR分光計に対しシステムを同期させた。FPGAボードからのアナログ電圧より、傾斜磁場の電流値を制御している。NMR分光計のパルサからパルスシーケンスのトリガーを供給し、FPGAボードからの制御電圧の出力のタイミングをとり、傾斜磁場シーケンスを実行した。傾斜磁場の電流アンプとしてKepeco製のものを用いた(Fig.1(D))。最大出力電圧は $\pm 20\text{V}$ 、最大出力電流は $\pm 20\text{A}$ 、立ち上がり速度は $35\ \mu\text{sec}$ である。RFコイルと傾斜磁場コイル

は一体型のものを自作した(Fig.1(E))。

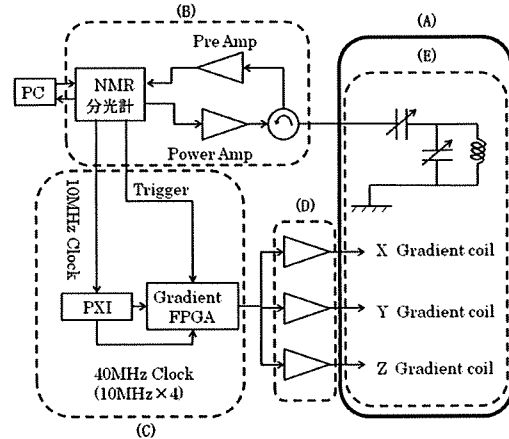


Fig.1 システムのブロックダイアグラム

- (A) 静磁場マグネット (B) NMR 分光システム
(C) 傾斜磁場制御システム (D) 傾斜磁場用電流アンプ
(E) RF コイル・傾斜磁場コイル一体型プローブ (自作)

4. プローブの開発

1. RF コイル部

送受信用コイルとして $\Phi 1$ の銅線を用いて3ターン、内径5mmのソレノイドコイルを製作した(Fig.2)。バランス回路にすることで、Q値の向上を図っている。試料体積にわたる磁場均一度はおおよそ0.5ppmであった。また、共鳴回路のQ値は120程度であった。ここで、コイルの中心軸方向をY、静磁場方向をZ、YとZと直交する方向をXとしている。

2. 傾斜磁場コイル部

平面型の傾斜磁場コイルを製作した(Fig.3)。ポピンには強化プラスチックであるPEEKを用いた。X、Y用コイルは平行4線型コイルを、Z用コイルにはマクスウェルペアのコイルを用いた。また、最大出力が得られるようにコイルの線形と巻き数を調整している。得られたグラディエント強度は、X、Y、Zそれぞれの方向に対し $g_x=0.180[\text{T}/(\text{m}\cdot\text{A})]$ 、 $g_y=0.135[\text{T}/(\text{m}\cdot\text{A})]$ 、 $g_z=0.152[\text{T}/(\text{m}\cdot\text{A})]$ であった。これにより最大傾斜磁場強度としてそれぞれ、 $G_x=3.60[\text{T}/\text{m}]$ 、 $G_y=2.70[\text{T}/\text{m}]$ 、 $G_z=3.04[\text{T}/\text{m}]$ が得ら

れた。

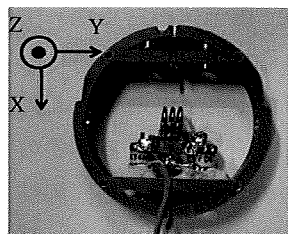


Fig.2 RF コイル

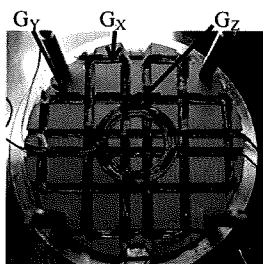


Fig.3 傾斜磁場コイル

3. インサート部

Rf コイル・傾斜磁場コイル部の静磁場への導入と位置合わせ、固定を行う。磁場に影響を与えないよう、すべて非磁性の材料を用いた。また、信号のロスを減らし、回路の安定性を高めるため、配線にはセミリジットの同軸ケーブルを用いた。また、傾斜磁場コイルの振動を避けるため、振れ止めを設置した。

5. 空間解像度

解像度を定める要因は、磁場の不均一性や信号取り込み時間、拡散が挙げられる。現状のシステムにおいては磁場均一度が 0.5ppm、傾斜磁場強度(G_r)が 3T/m であることより、磁場の不均一性によって定まる最小の空間解像度 (Δr)は、

$$\Delta r = 0.5 \text{ ppm} \cdot 600 \text{ MHz} / \{(\gamma/2\pi) \cdot G_r\} \sim 2.3 \mu\text{m} \quad (1)$$

となる。ここで γ は水素原子の磁気回転比である。また、信号取り込み時間が長ければ、周波数分解能が向上し、結果として空間分解能が向上するが、信号取り込み時間の上限は T_2 で与えられる。しかし、生体では組織間の透磁率の違いにより、 T_2^* ~ 数 ms となる。例えば現行の信号取り込み時間 ~ 1ms を T_2^* として採用すると T_2^* により決まる最小の解像度 Δr は、

$$\Delta r = 2/\gamma G_r T_2^* \sim 2.5 \mu\text{m} \quad (2)$$

と計算される。さらに拡散の効果を考えて、スピンのランダムウォークにより、室温での液体中の水分子の拡散係数 D_s を $2.5 \times 10^{-9} \text{ m}^2/\text{s}$ とすると、測定時間中の水分子の移動量 Δr は、

$$\Delta r = (6D_s T_2^*)^{1/2} = 1.9 \mu\text{m} \quad (3)$$

と計算される。ランダムウォークによる解像度の制限は Δr になる。加えて、拡散による位相の乱れにより信号減衰が生じ、 $\exp(-\alpha \gamma^2 G_r^2 D_s t^3)$ となる (α はシーケンスによる)。信号減衰により、信号取得時間が制限を受けることになる。信号減衰による解像度の限界 Δr は、

$$\Delta r = (8\alpha D_s / \gamma G_r)^{1/3} \sim 3.7 \mu\text{m} \quad (4)$$

となる (スピエコー法を仮定して、 $\alpha = 2/3$ とした)。

(1)~(4)の要因を加味しても、 $(10 \mu\text{m})^3$ の空間分解能は達成し得る。しかし雑音により実質的な信号取り込み時間が制約を受ける。また、1 ボクセルの空間解像度の向上には、(1)~(4)の要因に加え、1bit 以上の信号強度を必要とするため、ダイナミックレンジによる解像度の制限が生じる。これらにより、試料の大きさ、雑音を最適化する必要がある。

6. P53 ガン抑制遺伝子

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、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[5]。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[6]。P53 のみをノックアウトするように、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 年では殆どガンを発症せず、生後 3 年程度で肝臓ガンを発症する個体が増える[7]。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。

7. 撮像実験

1. 試料作成

今回、発生のモデル生物であるメダカを撮像対象とした。メダカは、エタノールにて殺された後、エタノールを蒸発させ、内径 4.2mm の NMR 管内にパラフィンにて固定する。パラフィンは NMR 信号を出さないため検体のバックグラウンドは黒くなる。またこの固定により、傾斜磁場コイルの振動によるモーションアーチファクトを抑えることができる。

2. 撮像条件

TR=1.2sec、TE=1msec のスピネコー法を用いた。画像サイズは 4096×256×256 で、1voxel = 20 μ m×20 μ m×20 μ m である。Y をリード方向として、X、Z 方向を Phase 方向として、3 次元撮像を行なった。撮像時間は 22 時間であった。

3. メダカ (wild) の撮像

Fig.6 に、生後約 4 カ月の wild タイプのメダカの写真を示す。これは、死後直後のメダカを撮影したものである。この後、NMR 管にパラフィンで固定して、MRI 顕微鏡により撮像した。Fig.7 に得られた MRI 画像の一部を示す。ImageJ の VolumeViewer において、画像を回転させ、解剖学的特徴を用いて目で身体の軸と画像の軸を合わせた。Fig.7 は得られた 3D 画像を Saggital にスライスした 10 スライスごとの画像である。Fig.7 の画像上で心臓(a)や脊髄(b)、脳(c)、腸管(d)といった臓器が見てとれた。また、脂肪と思われる部位が浮き出たような形で見られたが、これについては考察で詳しく述べる。

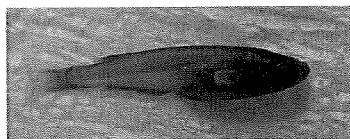


Fig.6 メダカ (wild)

4. メダカ (knock out) の撮像

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.8

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 MRI 画像を Fig.9 に示す。画像の軸合わせや 2D 画像の切り出しは wild タイプのものと同様である。脂肪と思われる部位が全く見受けられない。また、消化管がまったく見られなかった。その他心臓や脊髄、脳といった臓器は画像から見てとれた。

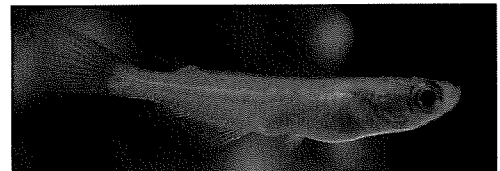


Fig.8 メダカ (knock out)

P53 Y186X/Y186X、ホモ型、生後 10 カ月

8. 考察

1. 脂肪のケミカルシフト

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.10 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 を使い、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、1/4Mhz・4096 ~ 1.017KHz となる。脂肪のケミカルシフトは 4ppm なので、600MHz・4ppm=2.4KHz 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.11 に示す。

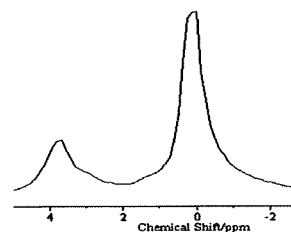


Fig.10
NMR スペクトラム

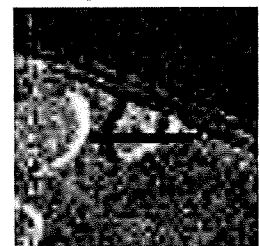


Fig.11
メダカ(wild)拡大画像、
リード方向と平行に
黒いラインを引いた

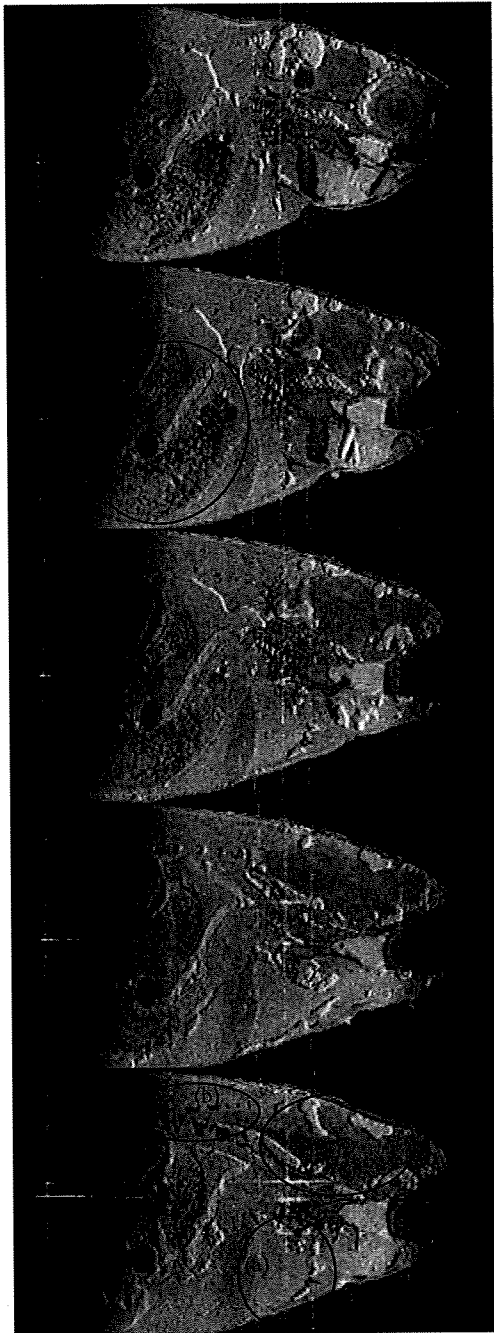


Fig.7 メダカ (wild) saggital

(a) 心臓 (b) 脊椎 (c) 脳 (d) 腸管

この Fig.11 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のを Fig.12 に示す。Fig.12 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

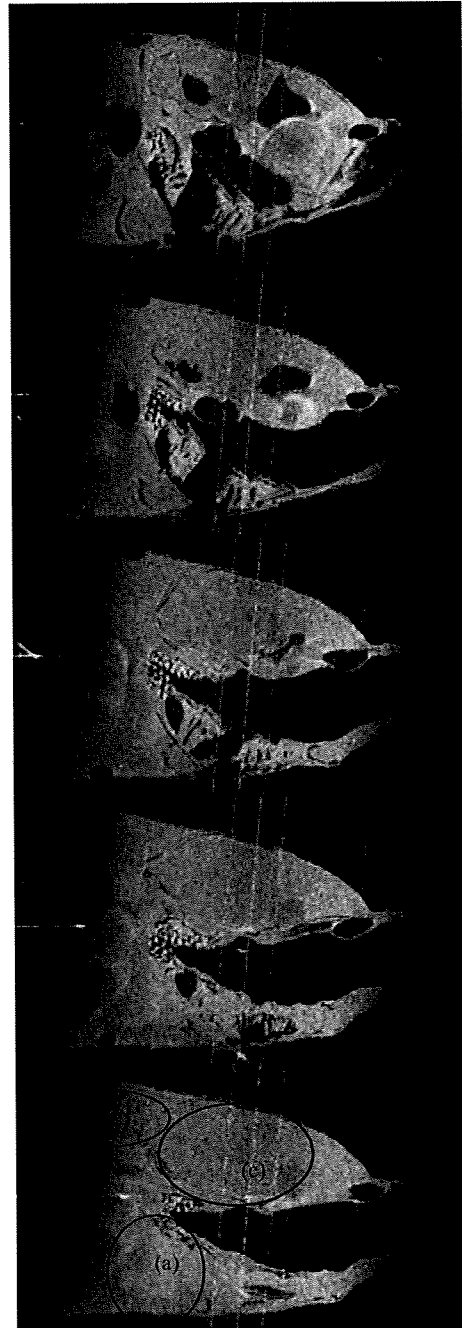


Fig.9 メダカ (knockout) saggital

(a) 心臓 (b) 脊椎 (c) 脳

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。

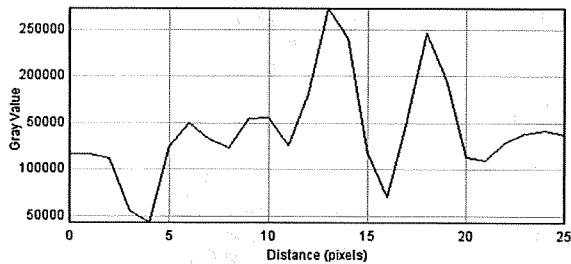


Fig.12 直線上の強度分布図

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。

3. 解像度の評価

Fig.12 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.12 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 $(20\mu\text{m})^3$ 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。

4. P53 遺伝子の影響

Fig.7 と Fig.9 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が変化する。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。

9. 結論

脊椎動物のモデル生物であるメダカの撮像が可能な MRI 顕微鏡のプロープを開発した。そして開発した MRI 顕微鏡によりメダカの撮像を行った。撮像によって、この装置がメダカの体内の構造を知りその表現型の違いを見るのに有用であることがわかった。またメダカは発生のモデル生物であるため、基礎医学の分野にも有用であると考えられる。さらに、生きたままの撮像が可能な装置の開発により、同一個体で経時的な変化を追うことも可能となる。

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] K. H. Vousden, and C. Prives, P53 and Prognosis: New Insights and Further Complexity, *Cell*, vol.120, pp.7-10, January 2005.
- [6] 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.
- [7] 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

「14.1 T MRI 顕微鏡を用いたメダカの3D 可視化」

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

低温物質科学研究センター誌, Vol. 16, 未定, (2010)

Pxx 14.1T MRI 顕微鏡を用いたメダカの 3D 可視化

金山 翔一郎^a, 桑原 航^a, 上野 智弘^a, 浦山 慎一^b,
波多野 直也^c, 杉本 直三^a, 福山 秀直^b,

^a京都大学 医学研究科 人間健康科学系専攻

^b京都大学 医学研究科 高次脳機能総合研究センター

^a京都大学 工学研究科 機械理工学専攻

E-mail : ueno@hs.med.kyoto-u.ac.jp

脊椎動物のモデル生物であるメダカ等の小型の生物の高解像度での撮像が可能な MRI 顕微鏡の開発を行っている。高い空間解像度を達成するためには、高い信号雑音比 (S/N) を得ることが重要である。そこで、14.1 T (ボア径 48mm) の静磁場マグネットを用い、NMR 信号強度を高めた状態で MRI 顕微鏡のプロープの開発を行っている。第一段階として、高い S/N が得られる内径 5mm のソレノイド型の送受信コイルと平面型の xyz 方向のグラディエントコイルを一体型プロープとし、グラディエントコイルの設置距離を縮め強い磁場勾配を印加できる設計とした。これにより、40 μ sec 程度で 3 軸方向に 3T/m 程度の磁場勾配を掛けることが可能となった。MRI 顕微鏡を用いたメダカの撮像実験において、画像視野が 4.2mm \times 4.2mm \times 5.5mm、1 ボクセルサイズが (20 μ m)³ である高解像度の画像が得られている。この場合の撮像時間は 22 時間である。この MRI 顕微鏡を用いて、P53 ガン抑制遺伝子ノックアウトメダカとワイルドタイプとの形態比較を行ない、ガンの発現メカニズムの解析に着手している。将来的には MRI 顕微鏡非凍結病理検査等への応用も考えている。