

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/10mmdsv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10 MHz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Kepco製のものをを用いた(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))。

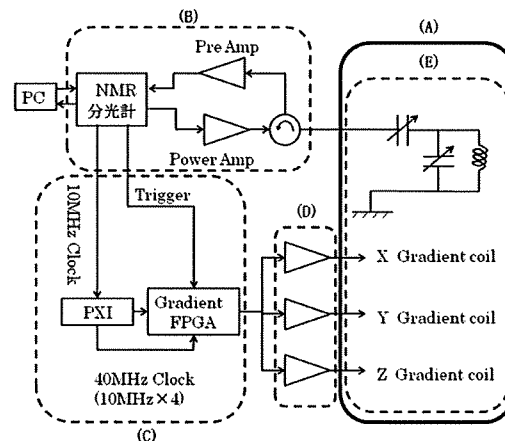


Fig.1 システムのブロックダイアグラム

(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)。ボビ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。

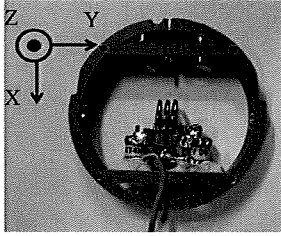


Fig.2 RF コイル

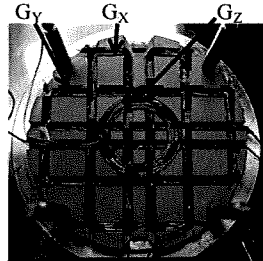


Fig.3 傾斜磁場コイル

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、信号のロスが減らし、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

解像度を決定する要因は、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ると、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 (スピー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、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[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 のスピンエコー法を用いた。画像サイズは 4096×256×256 で、1voxel = 20μm×20μm×20μm 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。

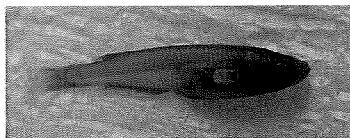


Fig.6 メダカ (wild)

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。

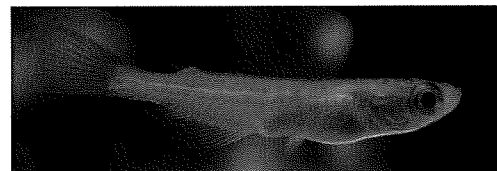


Fig.8 メダカ (knock out)

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。

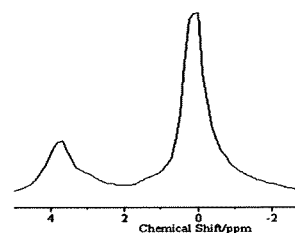


Fig.10
NMR スペクトラム

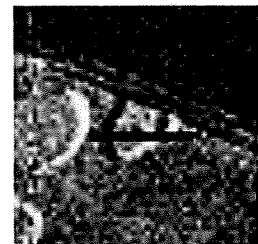


Fig.11
メダカ(wild)拡大画像、
リード方向と平行に
黒いラインを引いた

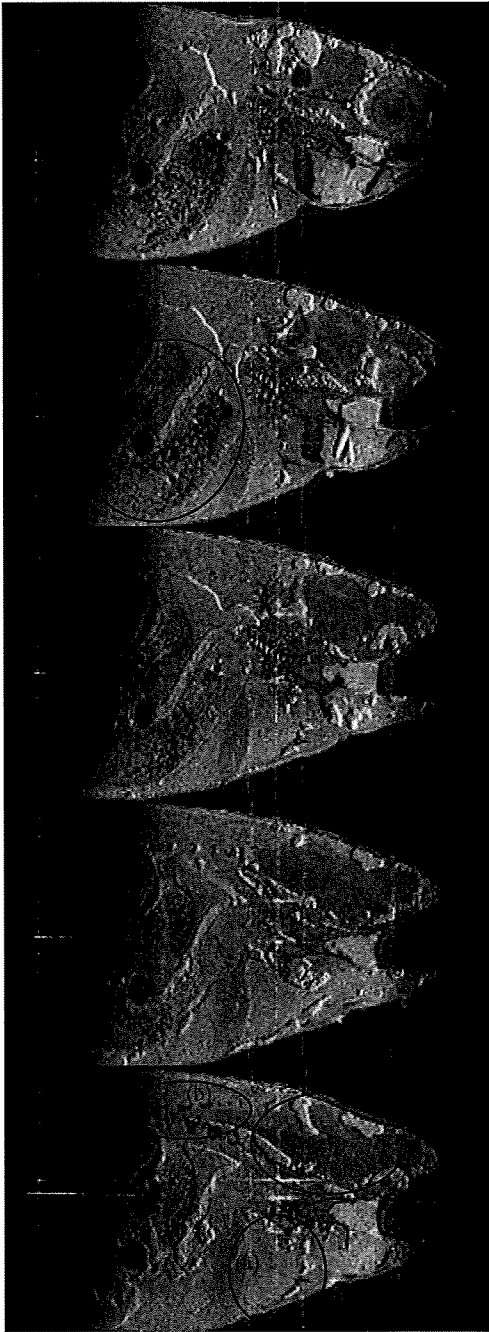


Fig.7 メダカ (wild) saggital

(a) 心臓 (b) 脊髄 (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

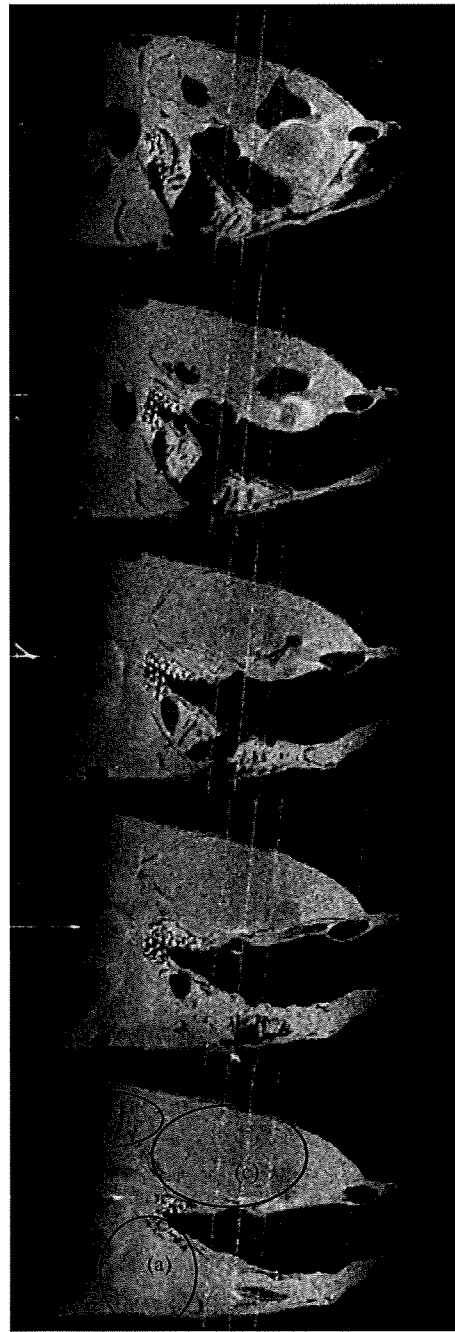


Fig.9 メダカ (knockout) saggital

(a) 心臓 (b) 脊髄 (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。

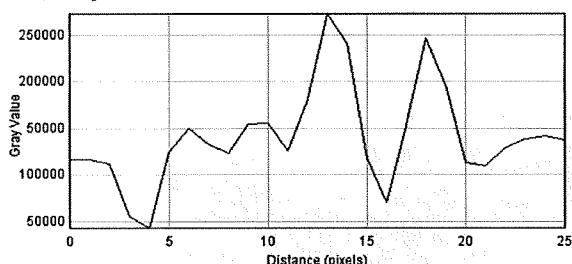


Fig.12 直線上の強度分布図

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。

「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」

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
再生医療, Vol.9 (suppl.), 245, (2010)

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

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

MRI は非侵襲的に生体を 3 次元 (3D) で可視化でき、軟組織のコントラストの高い画像が得られる特徴がある。本研究では数分の撮像時間により、細胞の配列が分かる (10 μm)³ 程度 (臨床機では 1mm)³ 程度) の空間分解能で生体組織構造の 3D 可視化をすることを目標に MRI 顕微鏡の開発を行っている。これにより、モデル生物における幹細胞の導入時の器官形成を 3D かつ経時的に追える可能性がある。高分解能を得るには高い信号雑音比が必要であるため、14.1T (臨床機の約 10 倍) の静磁場マグネットを用い信号強度を高めている。送受信コイルと傾斜磁場コイル一体型のプローブを開発し、送受信コイル内にある内径 4.2mm の試験管に挿入可能な検体が撮像可能となった。この現行機では、約 3.5T/m (臨床機の約 100 倍) の傾斜磁場強度を用い、空間解像度(20 μm)³、視野 (4096 \times 256 \times 256) の撮像を 20 時間で行える。現在、発生のモデル生物であるメダカを用いて、生きたまま器官発生の各段階 (特に脳神経系) の可視化を目指し開発を行っている。第一段階として、死後すぐのメダカをパラフィンにて試験管内に保持したものを撮像している。得られた高解像度 (20 μm \times 20 μm \times 16 μm) の MRI 画像上で各器官の形態学的特徴を識別できた。さらに撮影パラメータ等の調整を行い、画像における組織間のコントラストの明確化について報告する。また、固定した鶏の胎児の撮像を行い撮像時間内の形質変性の画像への影響、固定法の違いによるコントラスト変化について検証する。

