

201114009A

厚生労働科学研究費補助金
医療技術実用化総合研究事業

脳保護薬のDDS評価を可能にする
超高解像度SPECT技術の開発に関する研究

平成23年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 飯田 秀博

平成24（2012）年 5月

厚生労働科学研究費補助金
医療技術実用化総合研究事業

脳保護薬のDDS評価を可能にする
超高解像度SPECT技術の開発に関する研究

平成23年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 飯田 秀博

平成24 (2012) 年 5 月

目 次

I. 総括研究報告

脳保護薬のDDS評価を可能にする超高解像度SPECT技術の開発に関する研究 飯田 秀博	1
--	---

II. 分担研究報告

1. 画像の高解像度化と機器の設計・性能評価に関する研究 —高解像度SPECT装置の開発と超音波照射BBB透過性の評価— 銭谷 勉	13
2. 治療薬の選択と評価実験の設計 ～神経保護薬エダラボンは超音波血液脳関門薬物透過特性に影響を与えるか?～ 古幡 博	18
3. MRI画像評価に関する研究 横山 昌幸	31
4. 血行再建治療の最適化に関する研究 飯原 弘二	36
5. SPECTのための高機能逐次近似画像再構成法の研究 工藤 博幸	38
6. PETを用いたDDS評価との比較および調査に関する研究 菅野 巖	42
7. I-123標識酸化LDL (^{123}I -oxLDL) の新規標識合成法に関する研究 河嶋 秀和	45
8. 高解像度SPECT検出器の設計のためのシンチレーション光伝搬シミュレーションの開発 平野 祥之	47
9. レポーター遺伝子を利用した幹細胞移植療法における新たな分子イメージング法の 開発に関する研究 大谷 健太郎 (研究協力者)	49
10. [^{123}I]oxLDLの初期動態に関する研究 中野 厚史 (研究協力者)	52
11. ^{123}I 標識された活性エステルを用いる[^{123}I]oxLDLの合成 三宅 義徳 (研究協力者)	58
12. 息止めCT撮像によって得られる減弱係数分布画像を減弱・散乱補正に用いての 定量的SPECT画像再構成に関する研究 越野 一博 (研究協力者)	60

13. 脳ファントムを用いた定量SPECT再構成画像の施設間再現性評価に関する研究 堀 祐樹 (研究協力者)	-----	65
14. 脳血流SPECT画像の施設間差に関する研究 山内 美穂 (研究協力者)	-----	68
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----	72
IV. 研究成果の刊行物・別刷	-----	78

I . 総括研究報告

脳保護薬のDDS評価を可能にする超高解像度SPECT技術の開発に関する研究

研究代表者 飯田 秀博 独立行政法人国立循環器病研究センター研究所 画像診断医学部長

研究要旨

本研究事業では、急性期脳梗塞疾患の薬物治療におけるDDS評価法として放射線同位元素を使ったSPECTイメージング技術の確立を試みる。研究の最終年度である本年度は、DDS評価を目指したSPECT製剤の開発として、安定性の高い高分子化合物標識技術の確立に成功した。また、高分子ミセルが急性期脳梗塞標的・治療にとって有用性が高いことを明らかとした。超音波照射によるBBB透過性向上に関しては、安全性の高いBBB開放照射条件を明らかとし、神経保護薬投与の超音波併用の可能性も示唆された。また、高解像度SPECT装置は、高解像度化、高感度化、画像処理の高速化、操作性向上がなされ、実用性の高いシステムが構築された。さらに、高解像度SPECT装置を用いて、ラットを対象に超音波照射によるBBB透過性向上の画像化に成功した。本研究によって、脳保護薬のDDS評価を可能にする超高解像度SPECT技術を確立することができた。

分担研究者

銭谷 勉 国立循環器病研究センター研究所 室長
古幡 博 東京慈恵会医科大学 教授
横山 昌幸 東京慈恵会医科大学 准教授
飯原 弘二 国立循環器病研究センター病院 部長
吉田 洋一 ㈱モレキュラーイメージングラボ 代表取締役

鷺野 弘明 日本メジフィジックス㈱ 理事
工藤 博幸 筑波大学大学院システム情報工学研究科 教授
菅野 巖 放射線医学総合研究所 主任研究員
河嶋 秀和 国立循環器病研究センター研究所 室長
平野 祥之 国立循環器病研究センター研究所 研究員

A. 研究目的

急性脳梗塞治療特区では、超音波を併用する脳梗塞急性期の血栓溶解治療の臨床研究と同時に、発症の3時間以降に難溶性の脳保護治療薬の疾患領域へのDDSの確立が目標である。特に、脳保護治療薬を積極的に脆弱化組織に移送すべく超音波の局所血液脳関門(BBB)透過性に与える効果の評価は重要課題である。その評価には、高感度かつ高精度で定量評価可能な画像診断指標の確立が不可欠である。本研究事業では、急性期脳梗塞疾患の薬物治療におけるDDS評価法として放射性同位元素を使ったSPECTイメージング技術の確立を試みる。

DDS評価を目指したSPECT製剤の開発に関しては、昨年度、血管脆弱性の関するイメージングのプロープとして、酸化LDLのI-123による標識に成功したが、本年度は標識化合物のより安定性の高い生成を目指して間接標識法を検討する。

薬物キャリアーとしての高分子ミセルの開発では、ABC現象に関して調査し、長期にわたって繰り返し投与の可能性を検討する。

超音波照射によるBBB透過性向上に関しては、マイクロバブル併用では出血の可能性が高いため、マイクロバブルを併用せず超音波照射のみで安全性の高いBBB開放照射条件を明らかにする。急性期脳梗塞患者に対して臨床で使用されている神経保護薬投与の超音波併用の可能性も検討する。

高解像度SPECT装置の開発では、実用化に向けて、検出器の高解像度化、装置の高感度化、操作性向上を行う。画像再構成法の開発においても、高解像度化、高感度化、高速化、定量精度を向上させるための手法を検討した。また、高解像度SPECTを用いた超音波照射BBB透過性を評価の可能性についてラットを対象に検討する。

飯原は成人もやもや病を対象に、脳血行再建治療の前後で再構成・解析パッケージ(QSPECT)をもとにした脳血流量を主軸に、¹²³I-IMZ(iomazenil) SPECT、¹⁵O-Gas PETを用いた脳循環代謝の定量を施行し、MRI形態画像と重ね合わせ、成人もやもや病に対する血行再建術後の合併症である過灌流現象および不完全梗

塞に伴う選択的神経細胞死を評価した。菅野はPETによる脳へのDDS評価の基礎となる低酸素環境に順応したマウス的大脑皮質で神経血管反応性を検討した。

B. 研究方法

1. I-123標識酸化LDLの新規標識合成

間接標識法として、まず、I-123標識活性エステル¹²³I-SIPPを合成した。¹²³I-SIPPを用いて酸化LDLを標識した。¹²³I-oxLDLの放射化学純度を分析した。また、細胞取り込みをLOX-1発現細胞とWild Typeで比較した。さらに、アテローム性動脈硬化症モデルApoEノックアウトC57/BL/6マウスに¹²³I-oxLDLを投与し、Autoradiographyおよび蛍光染色によって体内分布を調べた。

(倫理面への配慮)

動物実験は、実験計画に対する研究実施機関の承認を受けた上で、国立循環器病研究センター動物実験実施規程に基づき、動物に苦痛を与えないよう配慮して行った。

2. 高分子ミセルのABC現象の調査

薬物キャリアー用の内核が疎水性の高分子ミセルについてABC現象誘起・認識挙動、高分子ミセルMRI造影剤との直接比較、およびABC現象誘起の際の産生抗体の分析を行った。具体的には、ABC現象の測定は、ABC現象を引き起こすことがわかっている、PEG-修飾リポソームをポジティブコントロールとして用い、図1に示すように1週間の投与間隔を置いて、2回投与し、2回目投与後6時間後の血中・肝臓・脾臓濃度を測定した。血中濃度が下がり、肝臓・脾臓濃度が上がればABC現象が起きたことになる。濃度の測定は投与サンプルに含まれるGdイオンをICPで定量することによった。

(倫理面への配慮)

本研究では動物実験に関するものに限られる。具体的には、マウスを用いた動物実験である。この実験は、大学の動物実験倫理規定に基づき実施された。すなわち、実験動物の苦痛を伴う可能性のある作業(犠牲死など)は麻酔下で行い、倫理基準を厳守された。以上より、動物実験に対する倫理は十分に遵守された。

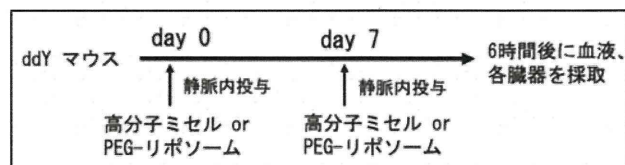


図1 ABC現象測定スキーム

3. 超音波照射BBB開放条件の最適化

マイクロバブル(Micro Bubble: MB)を用いずに、

経頭蓋的な超音波を加えながら出血率増高を招来しない形での薬物透過率の可能性についてラットを対象に実験的に検証した。図2は超音波照射システムの全体図である。表1に実験条件を示した。まず in vivo実験によって、超音波強度、あるいは超音波曝露時間を変えた場合の、Evans blueのBBB透過率の変化を検証し、超音波単独での透過率閾値を確認した。次いで、急性脳梗塞患者等の治療に用いられる血栓溶解剤rt-PAの毒性の効果を考慮した場合のBBB透過率の変化を同様にEvans blueを用いて検証した。さらに、急性脳梗塞患者で臨床的に使用されている神経保護薬エダラボン(Free Radical Scavenger: FRS)を超音波と併用した場合には、その薬物透過率が抑制されるか否かを、in vivo実験で評価した。

(倫理面への配慮)

本動物実験は、東京慈恵会医科大学実験動物施設内において全て行われた。この実験は、同大学実験動物委員会の承認を得て行われた。また、実験動物委員会の倫理規定を遵守して実験は行われた。

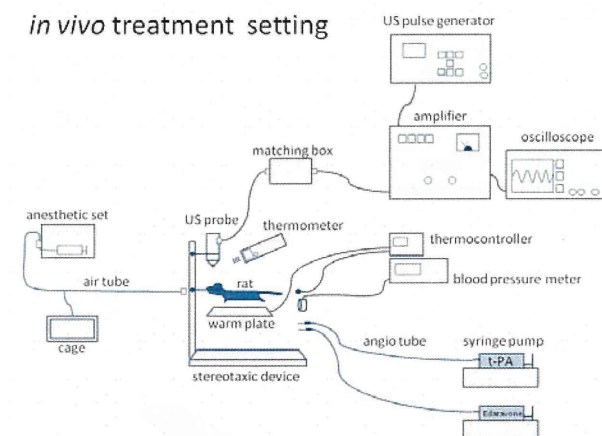


図2 超音波照射システム全体図

表1 超音波照射実験条件

2-i) 超音波単独照射によるBBB透過性

比較群	例数	週齢	平均体重とその標準偏差(g)
2W/cm ²	7	8~10	337.5±28.8
4W/cm ²	28	8~11	292.8±43.3
2W/cm ² ・rt-PA投与	10	8~11	337.5±23.4
連続波(CW)	35	8~11	301.7±44.4
パースト波(BW)	10	9~10	329.4±16.3

2-ii) rt-PA併用によるBBB透過性評価

比較群	例数	週齢	平均体重とその標準偏差(g)
rt-PA投与	30	9~12	331.0±26.7
rt-PA非投与	25	8~11	304.3±41.5

比較群	例数	週齢	平均体重とその標準偏差(g)
rt-PA 投与	30	9~12	331.0±26.7
エダラボン + rt-PA 投与	29	9~10	321.4±15.2

4. 画像の高解像度化と機器の設計・性能評価

頭部SPECT用に開発された検出器は、250 mm×150 mm×6.4 mmのNaIシンチレータ（サンゴバン製）と52 mm×52 mmで8×8アノードを持つ位置感応型光電子増倍管（PSPMT: H8500浜松ホトニクス製）5×3で配列されたものと光学結合されている。今回、高解像度化のために全てのアノード信号をデジタル化するフルデジタル回路を開発した。図3はデジタル回路を搭載した高解像度SPECT装置である。デジタル検出器回路を搭載した検出器の固有空間分解能が評価された。

同時に高感度化も行い、検出器2台搭載システムとした。さらに、画像再構成アルゴリズムにコリメータ応答関数を組み込んだ。これによって、画像ノイズを抑制することができ、感度の改善が期待される。

また、DDS評価での装置の実用性を考慮して、データ収集、画像処理、画像再構成のすべてソフトウェアをグラフィカルユーザーインターフェイス(GUI)化し、装置に搭載した。

さらに、検出器の高解像度化にLaBr3の利用が可能かどうかを検証するために、モンテカルロシミュレーションを用いて空間分解能と検出効率で評価した。



図3 デジタル回路が搭載された高解像度SPECT装置。左図：装置内部、右図：全体外観

5. 高機能逐次近似画像再構成法の開発

本研究で開発したSPECT装置は、1) 測定されるγ線光子のヒストグラム化を行わないリストモードデータ収集も視野に入れていること、2) 小視野を拡大撮影するためSPECTイメージングで問題になる部分容積効果の影響が大きいこと、3) 投影データ測定方向数や測定角度範囲を制限したりトランケーションがあるデータ収集も視野に入れていること、などの特徴がある。本年度の研究では、1)～3)の装置特徴を考慮した高機能な逐次近似画像再構成法の開発を実施

した。具体的には、以下の4つの画像再構成法の開発を行い、実装とシミュレーション実験による評価を行った。

- ① 非線形計画問題の双対性を用いたリストモードデータからのブロック反復型画像再構成法
- ② CT/MRI画像を先見情報に利用した部分容積効果補正を組み込んだMAP（事後確率最大）画像再構成法
- ③ トータルバリエーション（TV）を用いた少数方向投影データからの画像再構成法
- ④ トランケーション投影データからの濃度事前情報を用いた画像再構成法

6. 高解像度SPECTによる超音波照射BBB透過性の画像評価

SDラット(male, 420g)を使用した。3%イソフルラン吸入麻酔下にて、図4のようにStereotaxic deviceに固定、頭部除毛後、超音波プローブが頭皮に押し当てられ、右脳に照射された。エバンスブルー0.84 ml（体重の5%）を1分間投与、生食0.1 mlでフラッシュした5分後、超音波照射開始した。超音波照射は出力5.25 W/cm²で、10分間照射、5分休止、10分間照射、5分休止、10分間照射した。BBB透過性を評価するために、放射性薬剤(radioisotope: RI)は、通常はBBBを透過しない^{99m}Tc-DTPAを使用し、2回に分けて投与した。1回目は超音波照射開始から25分後に、2回目は55分後に投与した。^{99m}Tc-DTPAの投与量は、1回目319 MBq/1.0 ml、2回目335 MBq/1.0 mlで、総投与量654 MBq、それぞれ生食0.2 mlフラッシュを含めて尾静脈から1分間投与した。超音波照射終了と同時に、^{99m}Tc-DTPAの2回目が投与され、照射終了から10分後、2時間SPECT撮像が行われた。15分間のスキューンを8回繰り返した。SPECT撮像終了後、X線CT撮像が行われた。

ネンプタール麻酔0.3 ml静注によってSacrificeされ、開胸後、PBS 50 mlおよび10%ホルマリン50 mlにて灌流固定後、頭皮を剥いで、X線CT撮像および30分間のSPECT撮像を行った。その後、脳が摘出され、2 mm厚の切片が作成され、エバンスブルーの集積が確認された。さらに包埋、染色後、薄くスライスされ、Autoradiography (10~20 μm厚)およびHE染色 (10 μm厚)が行われた。Autoradiographyの露光時間は24時間とした。

（倫理面への配慮）

動物実験は、実験計画に対する研究実施機関の承認を受けた上で、国立循環器病研究センター動物実験実施規程に基づき、動物に苦痛を与えないよう配慮して行った。



図4 ラット頭部への超音波照射セットアップ

7. 血行再建治療の最適化

脳血流SPECTとPETを用いた脳循環代謝の定量画像と、MRIによる形態画像を重ね合わせ、脳血行再建治療前後の脳循環代謝を評価した。また、過灌流を呈した部位では経時的な変化を追跡した。さらに、¹²³I-IMZ(iomazenil) SPECTを用いて選択的神経細胞死の有無およびその経時的変化を追跡した。

(倫理面への配慮)

本研究への参加は任意であり、研究の参加の可否により治療法は変わらず、患者は不利益を被らない。個人情報保護には万全を期している。

8. PETを用いたDDS評価との比較および調査

頭蓋骨に穴を開け硬膜を維持した開窓法を施した雄性C57BL/6Jマウス(N = 4, 4-7週齢)を、酸素分圧8%で飼育し、蛍光色素Sulforhodamine 101を腹腔投与後に、二光子顕微鏡法(励起波長: 900 nm、蛍光波長610 nm)を用いて一次体性感覚野の微小血管構造を低酸素環境下飼育1カ月まで経時的に観察した。

(倫理面への配慮)

実験は放医研における実験動物使用規定に則った。

C. 研究結果

1. I-123標識酸化LDLの新規標識合成

[¹²³I]SIPPを放射化学的収率45%、放射化学的純度93%で得た。また、¹²³I-oxLDLを放射化学的収率46%、放射化学的純度93%で得た。取り込み実験において、¹²³I-oxLDLは、LOX-1発現細胞において対照群と比較し、何れの濃度においても3倍以上高い放射能集積を示した(図5)。大動脈の展開標本を用いたARGでは、蛍光染色との比較から、アテローム性血管病変部位への放射能集積を認めた。放射能は肝臓に30% injected dose、また、臓器を摘出後の体部に47% injected doseとそれぞれ高く分布した。単位臓器重量では、肝胆系に35% injected dose/g、心臓に22%

injected dose/gと高い分布を示した。

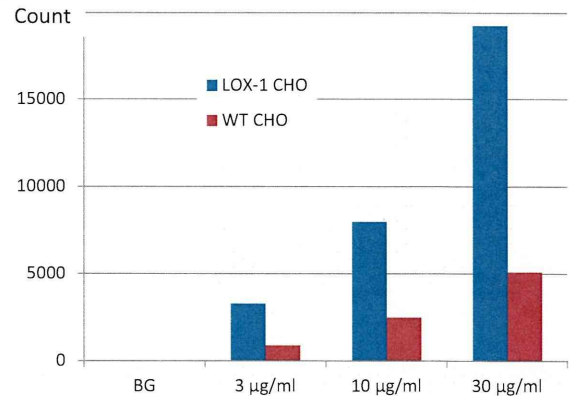


図5 ¹²³I-oxLOX-1の細胞取り込み

2. 高分子ミセルのABC現象の調査

図6はGdでミセルを検出器した結果である。図7はPEG-リポソームを蛍光物質でラベルした結果である。これらの結果から、次のように言える。1) 高分子ミセルMRI造影剤はABC現象を誘起せず、また、ABC現象が誘起された場合にも認識されない。2) PEG-リポソームはABC現象を誘起する。また、ABC現象が誘起された場合に生体に認識されて血中濃度が下がる。この認識は、同時に投与された高分子ミセルが認識されていないときも、同様に認識されて血中濃度が減少する。

次にEG-リポソームと薬物ターゲティング用PEG-PBLAミセルの組合せで同時投与実験を行った結果を示す。図8はGdで測定したPEG-リポソームの結果である。1回目にPEG-リポソームを投与した群は、血中濃度が下がり、肝臓の分布が増加してABC現象が観察された。1回目にPEG-PBLAミセルを投与した群では、ABC現象が観察されるがその程度はPEG-リポソームに比べて弱い。図9は蛍光ラベルで測定したPEG-PBLAミセルの結果である。どの場合にもPEG-PBLAミセルの血中濃度は減少していない。PEG-PBLAミセルはABC現象を引き起こすが、2回目の投与では認識されないことが明確に証明できた。

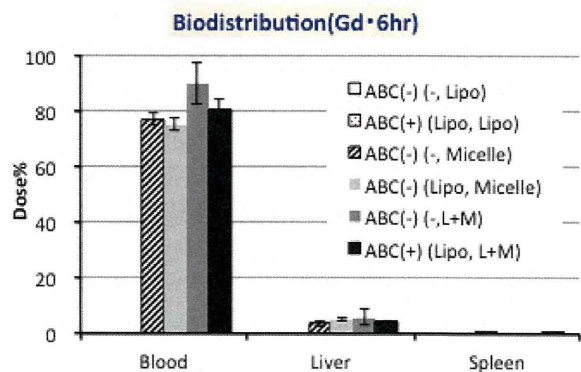


図6 Gdでミセルを検出した結果

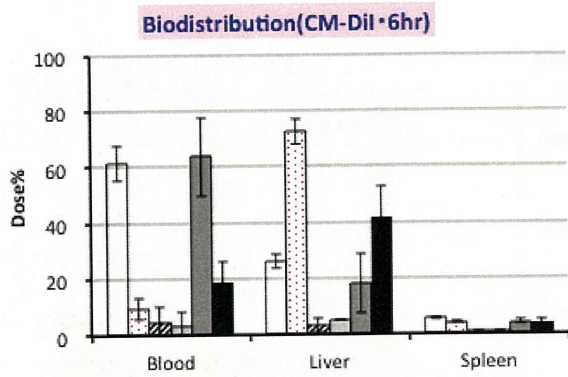


図7 蛍光ラベルで検出したPEG-リポソーム

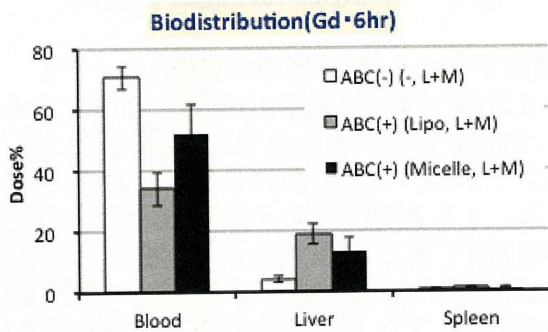


図8 Gdで検出したPEG-リポソーム

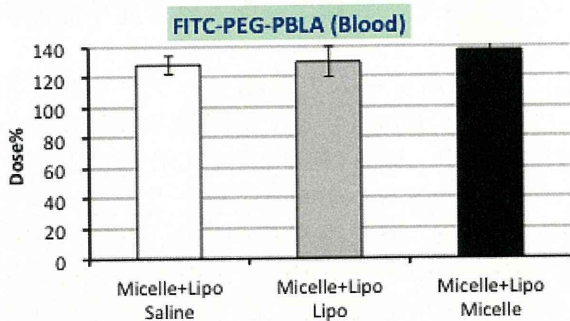


図9 蛍光ラベルしたPEG-PBLAミセルの血中濃度

3. 超音波照射BBB開放条件の最適化

図10から、(条件1) 超音波周波数500kHz、4W/cm²、連続波照射条件下では、数分でBBBの開放が認められたが、その後、4分から32分へ照射時間を変えてもBBB透過率に変化を認めなかった。また、(条件2) 音響強度2W/cm²では、ほとんどBBB透過率の増高は32分の間認められなかった。rt-PAを投与したときには、(条件1)の条件下では、BBB開放に大きな差は認められなかった(図11)ものの、(条件2)の条件下では、32分間の照射でBBB透過率の増高を示した(図12)。また、エダラボン投与下では、rt-PAによる透過率増高を抑制する傾向が見られたが、優位な差は認められなかった(図13)。

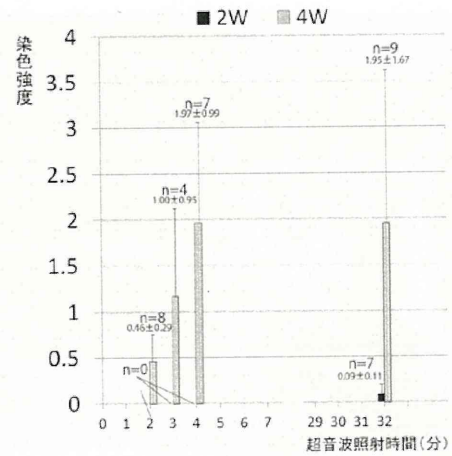


図10 超音波照射によるBBB透過率の変化

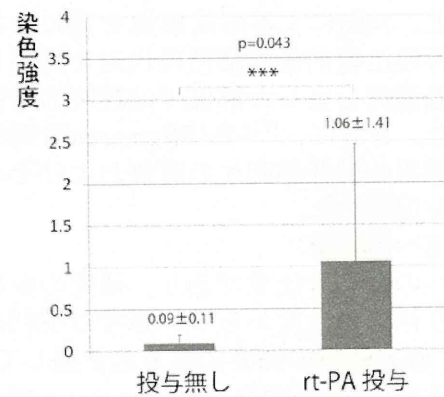


図11 2W, 32分照射時におけるrt-PA投与群と非投与群の比較

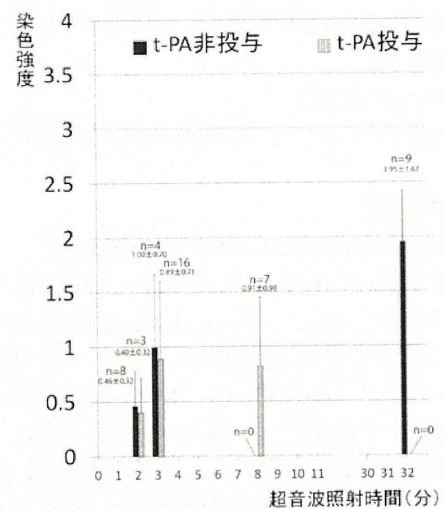


図12 4W, 32分照射時におけるrt-PA投与群と非投与群の比較

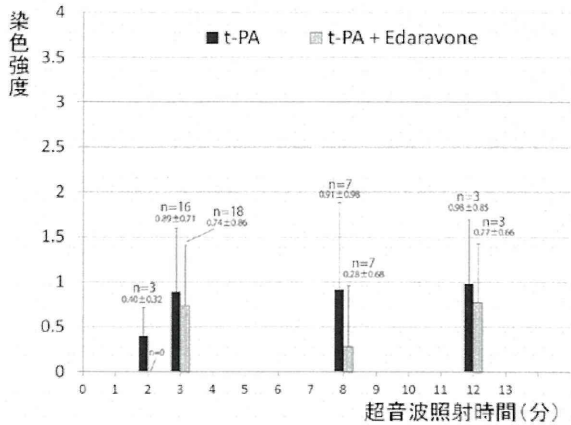


図 1 3 エダラボン併用時でのBBB透過性の結果

4. 画像の高解像度化と機器の設計・性能評価

図 1 4 はデジタル検出器回路搭載によって得られた点広がり関数である。この結果から、2 mm 程度の検出器固有空間分解能が得られることが示唆された。また、検出器を 2 台搭載することによって感度が 2 倍に、さらに、画像再構成アルゴリズムにコリメータ応答関数を組み込むことによって統計ノイズ抑制効果が確認され、感度改善効果があることが確認された。

実用化装置として操作性向上のためにソフトウェアを GUI 化し、装置に搭載できた。図 1 5 はソフトウェア画面一例で、データ収集のソフトウェア画面である。

図 1 6 はモンテカルロシミュレーションによって得られた LaBr₃(Ce) を用いた SPECT 検出器における厚さと空間分解能の関係および検出効率である。NaI より高い空間分解能が示唆された。

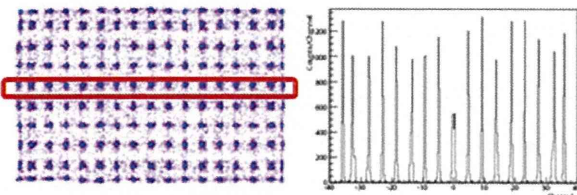
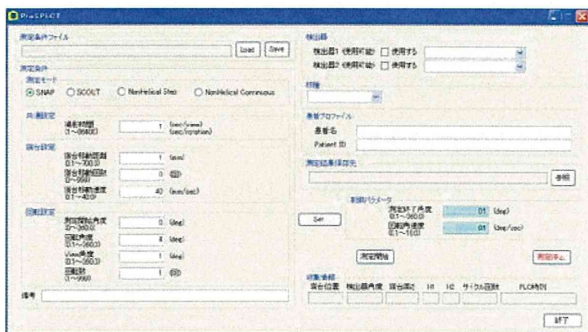


図 1 4 検出器固有空間分解能の評価。左図：点広がり画像、右図：赤い領域の点広がり画像のプロファイル



データ収集ソフトウェア

図 1 5 GUI 化されたソフトウェア

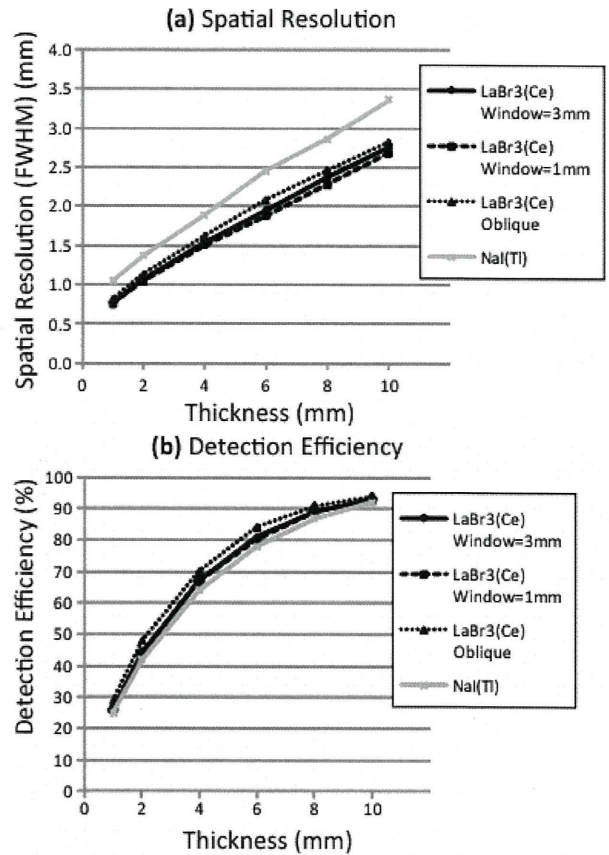


図 1 6 LaBr₃(Ce) を用いた SPECT 検出器における厚さと空間分解能の関係 (上図) および検出効率 (下図)

5. 高機能逐次近似画像再構成法の開発

図 1 7 は非線形計画問題の双対性を用いたリストモードデータからのブロック反復型画像再構成法のシミュレーションによる評価結果である。従来の OSEM 法及び (既存のブロック反復型画像再構成法の中で最高の性能を持つとされている) DRAMA (Dynamic Row-Action Maximum Likelihood) 法と提案手法の一反復時での比較を行った。DRAMA 法と同等の高い性能を実現していることが確認できる。

図 1 8 は CT/MRI の形態画像を先見情報として PET の画像再構成に利用する解剖学的 MAP (Anatomical MAP) 画像再構成法に部分容積効果補正を組み込み、脳イメージングを想定したシミュレーション実験の結果である。従来の代表的な画像再構成法である MLEM (Maximum Likelihood Expectation Maximization) 法及び (形態画像を利用しない) MAP 法と提案手法の比較を行った。提案手法では雑音を増大させずに部分容積効果を補正することに成功している。

図 1 9 は代表的な反復型画像再構成法である ART (Algebraic Reconstruction Technique) 法と TV 最小化を組み合わせた新規性が高い画像再構成法を構築して、(SPECT/PET に適用する前段階として) X

線CTを対象とした、投影データの測定方向数が16と少数の場合を想定したシミュレーション実験の結果を示す。従来の代表的画像再構成法であるFBP (Filtered Backprojection) 法及びART法と提案手法の再構成画像を比較すると、提案手法により高画質の再構成画像が得られていることが確認できる。

また、濃度事前情報を利用することで、トランケーションがあっても視野内は正確に画像再構成できることが示された。

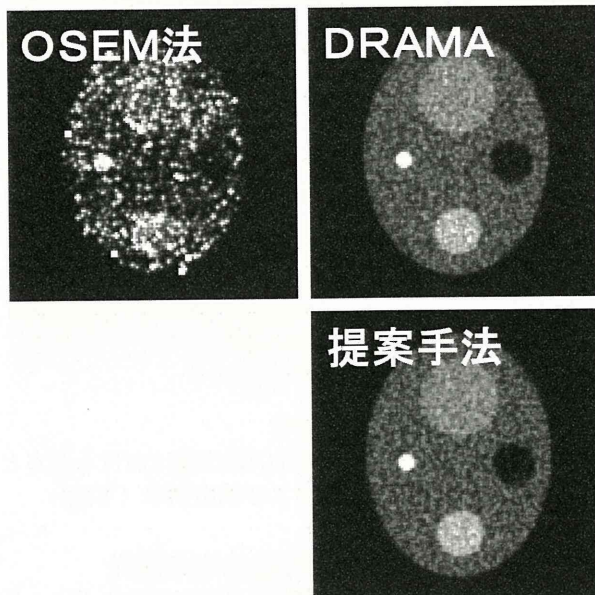


図17 非線形計画問題の双対性を用いたリストモードデータからのブロック反復型画像再構成法で得られた画像。OSEM法、DRAMA法との比較

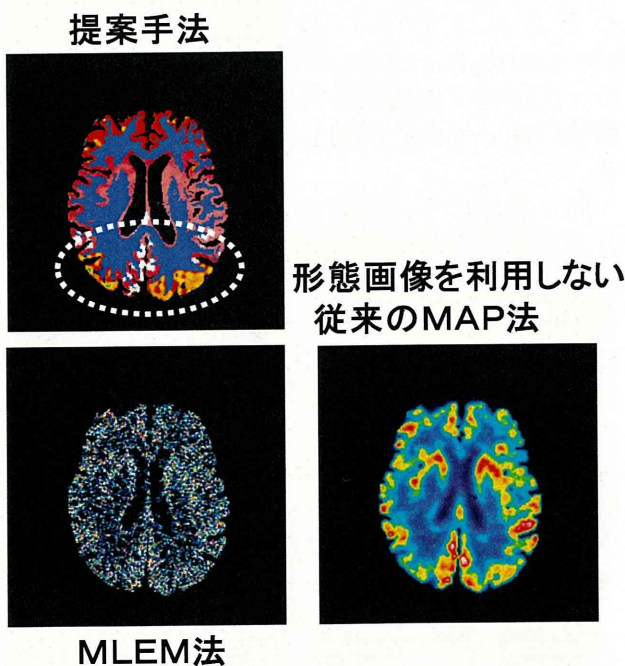


図18 CT/MRI画像を先見情報に利用した部分容積効果補正を組み込んだMAP画像再構成法で得られた画像。MLEM法、従来MAP法との比較

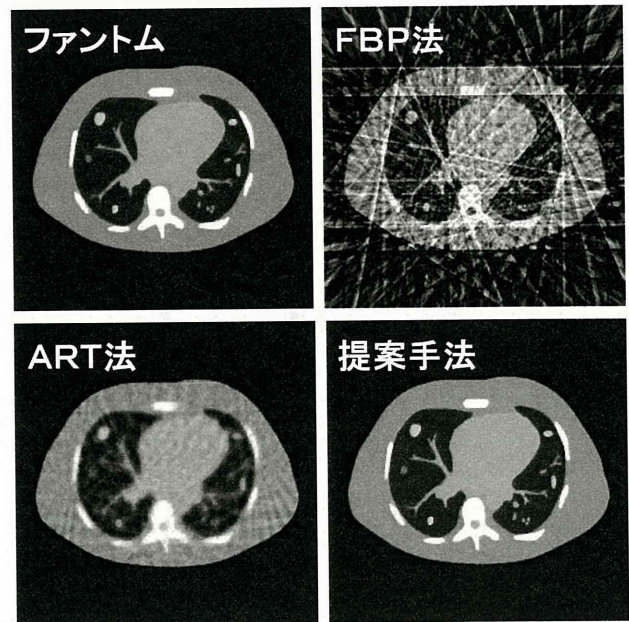


図19 トータルバリエーション (TV) を用いた不完全投影データからの画像再構成法で得られた画像。FBP法、ART法との比較

6. 高解像度SPECTによる超音波照射BBB透過性の画像評価

図20は灌流固定後、頭皮を剥いで得られたex vivo SPECT画像とX線CT画像とのフュージョンである。通常はBBBを透過しない^{99m}Tc-DTPAが脳に集積しているのがはっきりと確認できた。摘出したラット脳の2mm厚のスライスの写真である。SPECT画像と同じ位置に、投与したエバンスブルーが集積しているのが確認できた。これは、^{99m}Tc-DTPAが超音波照射によって開放されたBBBを透過したことを示唆する。

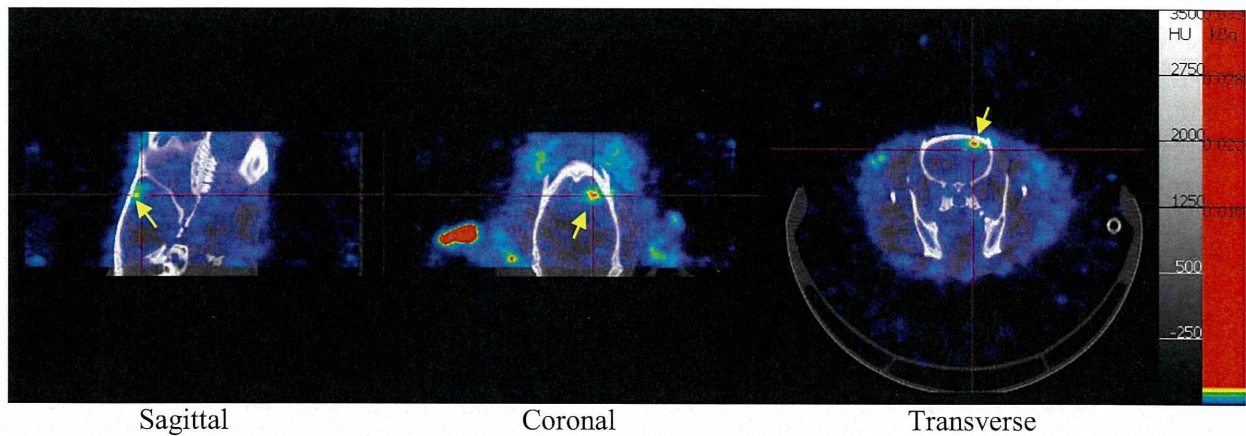


図20 灌流固定後、頭皮を剥いで得られたラット脳ex vivo SPECT画像。^{99m}Tc-DTPAの脳内への集積が確認できた

7. 血行再建治療の最適化

術後過灌流を示した症例は19例、術後不完全梗塞が疑われた症例は7例において、治療後の脳血流SPECTで過灌流を呈した部位は、MRI-FLAIR画像で高信号、拡散強調画像では低信号、ADC mapでは高信号を呈する血管原性浮腫の所見を認めた。同部位にPETの定量画像を重ね合わせると、脳酸素摂取率が低下している例が多かった。急性期にIMZ-SPECTを行った全症例においてIMZの集積低下を示し、さらに亜急性期に集積低下の進行を認め、遅発性に神経細胞死が起きている可能性が示唆された。

8. PETを用いたDDS評価との比較および調査

1か月にわたり8%低酸素環境下で飼育したマウスの大脳皮質では脳実質内毛細血管が拡張すると同時にひげ刺激に対する脳血管反応性が低下した。しかし、同部位ではCO₂に対する脳血管反応性は維持され血管の拡張能力が保持されていること、また、刺激時の神経活動も保持されていることが確認された。

D. 考察

oxLDLを間接標識する目的で、新たに合成したトリブチルスズ前駆体と放射性ヨウ素との交換反応により、¹²³I]SIPPを合成できた。¹²³I]SIPPの合成法を確立したことにより、酸化剤に対して脆弱な生理活性ペプチドあるいはタンパクにおいてもI-123標識が可能となった。今年度の検討により、oxLDLの性質に影響を与えることなく、I-123標識することに成功した。この成果は、新規ペプチドやタンパクの生理機能探索に有用なSPECTプローブの提供に資すると同時に、脳保護薬の標識合成と評価にも適用されることから、DDS評価を目的とした当初の技術目標を達成できた。

造影成分であるGdイオンを内核に結合した高分子ミセルMRI造影剤については、ABC現象を誘

起することもせず、ABC現象を起こしたマウスでも認識されないことが明らかとなった。よって、この造影剤による急性脳梗塞の診断にはABC現象の懸念は全くないことが判明した。次に、脳保護薬やメタロプロテアーゼ阻害剤などの封入した治療用的高分子ミセル（これらの薬物を物理的に封入するために疎水性の内核を有する）については、PEG-PBLAブロックコポリマーを用いて検討したところ、極めて興味深いことが判明した。PEG-PBLAはPEG-リポソームよりは程度が弱いながら、ABC現象を誘起する。しかし、ABC現象起こしたマウスにおいて、2回目の投与でその血中濃度が減少することはない。この結果は、高分子ミセルを脳梗塞の診断と治療の両側面において使うことに問題がないことを示す。以上の結果を総合すると、高分子ミセルは急性脳梗塞標的診断・治療のキャリアーとしてABC現象の懸念なく使用できることが本研究で明らかとなった。

超音波照射条件の最適化に関する研究結果では、出血傾向を伴わない経頭蓋的超音波照射によってもBBBの薬物透過性を増高させ得る可能性を示せただけでなく、そのBBB透過性増高は超音波照射開始から極めて短時間で起こりうることも示すことが出来た。Evans Blueの粒子サイズは数ナノ立方メートルであり、現行のMRI造影剤とほぼ同様である。それゆえ、MRI造影剤等のサイズの薬物のBBB透過性を経頭蓋的超音波照射で制御し得る可能性が示唆された。しかしながら、照射超音波4 W/cm²はやや強力で、脳組織の損傷は少なからず認めるとともに頭皮近傍では大きな損傷を惹起しており、その条件をそのまま臨床に適用するには超音波暴露照射法についての適切な制御法を空間的制御も含め採用する必要があることも安全性の面から明らかとなっている。

高解像度SPECT装置の開発では、デジタル検出器回路を開発し、検出器が高解像度化された。

同時に、検出器2台搭載およびコリメータ応答関数組み込み画像再構成アルゴリズムによって高感度化も実現した。ソフトウェアもGUI化され、操作性も向上した。脳保護薬のDDS評価などに十分に応用可能な実用的な高解像度、高感度SPECT装置を構築できた。

画像再構成法の研究では、本事業で開発したSPECT装置を実用化する上で、有効な4つの逐次近似画像再構成法を開発できた。非線形計画問題の双対性を用いたリストモードデータからのブロック反復型画像再構成法は、高速な画像再構成を可能とするために、当初、クラスタコンピュータを利用して画像再構成の高速化を考えていたが、本画像再構成法の方が安価で実用的である。次に、CT/MRI画像を先見情報に利用した部分容積効果補正を組み込んだMAP（事後確率最大）画像再構成法は高解像度画像を提供するが、検出器の高解像度化と合わせて利用することにより、さらに効果的であると考えられる。また、トータルバリエーション(TV)を用いた少数方向投影データからの画像再構成法は、高感度化に大きく貢献するため、解像度と感度のトレードオフを改善する効果的な技術である。最後に、トランケーション投影データからの濃度事前情報を用いた画像再構成法は、局所領域を高解像度して定量画像を得るには必要不可欠な技術である。以上、本高解像度SPECT装置の実用化にとって、重要な画像再構成法を開発することができた。

高解像度SPECTによる超音波照射BBB透過性の評価の可能性検討実験では、ラット脳の超音波照射された領域において通常はBBBを透過しない^{99m}Tc-DTPAの集積が確認できた。エバンスブルーの集積とも良く一致していた。これは超音波照射によるBBBの透過性をSPECTで評価できることを示唆する。さらには、SPECTで薬物動態解析することで、透過速度定数を定量化できると考えられる。

脳血行再建術後の選択的神経細胞死においては、脳皮質神経細胞が虚血にさらされることで数か月の期間で遅発性に進行する可能性が示唆されたが、これは我々が以前に脳動脈瘤治療に伴う脳血行再建術中に虚血に曝された部位において、その後の緩徐な経過で神経細胞が脱落する例を報告したが、その所見と一致するものであった。この結果は、QSPECTおよび¹²³I-IMZ(iomazenil) SPECT、¹⁵O-Gas PETによる正確な脳循環代謝の評価と、MRIでの形態画像を組み合わせることで目的とする定量部位の正確な同定により可能であった。このような手法は、脳保護薬のDDS評価が可能となるような画

像診断技術に有効であるといえる。

低酸素環境に順応したマウスの大脳皮質で神経血管反応性を検討では、低酸素環境に対して脳微小血管は脳組織への酸素供給量を維持するためにその血管拡張により脳血流量を増加する補償機序が作動していることを確認した。これは血管径が拡張して組織への脳血流量を保持する機構が作動したためと考えられる。しかし、この間にひげ刺激による脳血流反応性は消失したが、この原因として脳血管の拡張による更なる拡張機能の消失と低酸素による神経機能活性の消失の可能性が考えられたが、今回の研究で両者とも保持されていることが判明した。神経血管カプリング機序のどのような機序が不全になったのか今後の検討が必要である。

E. 結論

DDS評価のためのSPECT製剤の開発では、安定性の高い高分子化合物標識技術が確立でき、高分子ミセルの急性期脳梗塞標的・治療に対する有用性も明らかにできた。超音波照射によるBBB透過性向上に関しては、安全性の高いBBB開放照射条件を明らかとし、神経保護薬投与の超音波併用の可能性も示唆できた。また、高解像度SPECT装置の開発においては、高解像度化、高感度化、画像処理の高速化、操作性向上がなされ、実用性の高いシステムが構築できた。さらに、高解像度SPECT装置を用いて、ラットを対象に超音波照射によるBBB透過性向上の画像化に成功した。本研究によって、脳保護薬のDDS評価を可能にする超高解像度SPECT技術を確立することができた。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Nezu T, Yokota C, Uehara T, Yamauchi M, Fukushima K, Toyoda K, Matsumoto M, Iida H, Minematsu K. Preserved acetazolamide reactivity in lacunar patients with severe white-matter lesions: ¹⁵O-labeled gas and H₂O positron emission tomography studies. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2012 Epub ahead of print
- 2) Koshino K, Watabe H, Enmi J, Hirano Y, Zeniya T, Hasegawa S, Hayashi T, Miyagawa S, Sawa Y, Hatazawa J, Iida H. Effects of patient movement on measurements of myocardial blood flow and viability in resting ¹⁵O-water PET studies. *J Nucl Cardiol.* 2012 Epub ahead of print
- 3) Ose T, Watabe H, Hayashi T, Kudomi N, Hikake M, Fukuda H, Teramoto N, Watanabe Y, Onoe H, Iida H. Quantification of regional cerebral blood flow in rats using an arteriovenous shunt and micro-PET. *Nucl Med Biol.* 2012 Epub ahead of

print

- 4) Agudelo CA, Tachibana Y, Hurtado AF, Ose T, Iida H, Yamaoka T. The use of magnetic resonance cell tracking to monitor endothelial progenitor cells in a rat hindlimb ischemic model. *Biomaterials*. 33(8);2439-2448,2012
 - 5) Hirano Y, Zeniya T, Iida H. Monte Carlo simulation of scintillation photons for the design of a high-resolution SPECT detector dedicated to human brain. *Ann Nucl Med*. 26(3);214-221,2012
 - 6) Wakai A, Tsuchida T, Iida H, Suzuki K. Determination of two-photon-excitation cross section for molecular isotope separation. *J Mol Spectrosc*. 274;14-21,2012
 - 7) Teramoto N, Koshino K, Yokoyama I, Miyagawa S, Zeniya T, Hirano Y, Fukuda H, Enmi J, Sawa Y, Knuuti J, Iida H. Experimental Pig Model of Old Myocardial Infarction with Long Survival Leading to Chronic Left Ventricular Dysfunction and Remodeling as Evaluated by PET. *J Nucl Med*. 52(5);761-768,2011
 - 8) Agudelo CA, Tachibana Y, Teramoto N, Iida H, Yamaoka T. Long-term in vivo magnetic resonance imaging tracking of endothelial progenitor cells transplanted in rat ischemic limbs and their angiogenic potential. *Tissue Eng Part A*. 17(15-16);2079-2089,2011
 - 9) Zeniya T, Watabe H, Hayashi T, Ose T, Myojin K, Taguchi A, Yamamoto A, Teramoto N, Kanagawa M, Yamamichi Y, Iida H. Three-dimensional quantitation of regional cerebral blood flow in mice using a high-resolution pinhole SPECT system and ¹²³I-iodoamphetamine. *Nucl Med Biol*. 38(8);1157-1164,2011
 - 10) Matsubara K, Watabe H, Kumakura Y, Hayashi T, Endres CJ, Minato K, Iida H. Sensitivity of kinetic macro parameters to changes in dopamine synthesis, storage, and metabolism: a simulation study for [(1)(8)F]FDOPA PET by a model with detailed dopamine pathway. *Synapse*. 65(8);751-762,2011
- 2.学会発表
- 1) Iida H. SPECT Quantification of myocardial blood flow. ICNC10 - Nuclear Cardiology and Cardiac CT. Amsterdam - Netherlands. 2011
 - 2) Iida H. Recent advances in quantifying myocardial blood flow: SPECT and PET. ICNC10 - Nuclear Cardiology and Cardiac CT. Amsterdam - Netherlands. 2011
 - 3) Iida H. Ultra rapid assessment of brain blood flow and oxygen consumption for acute stroke research. XII Turku PET Symposium. Turku, Finland. 2011
 - 4) Iida H. A semi-automatic approach for quantitative reconstruction of SPECT images from DATSCAN. ENCDAT Meeting Birmingham. Birmingham, England. 2011
 - 5) Iida H. The Clinical Impact of Myocardial Blood Flow Estimation. 1st Biograph World Summit. Munich, Germany. 2011
 - 6) Iida H. Quantitative assessment of biological functional parametric images using PET and SPECT. JAPANESE-FINNISH JOINT SYMPOSIUM "ICT and Technology in Medical and Health Research". Hilton Helsinki Strand / Academy of Finland, Helsinki, Finland. 2011
 - 7) Zeniya T, Hirano Y, Tominaga T, Hori Y, Watabe H, Sakimoto T, Sohlberg A, Minato K, Hatazawa J, Iida H. Conceptual design of high spatial-resolution SPECT system for human brain. 2011 IEEE Nuclear Science Symposium and Medical Imaging Conference (Valencia, Spain), October 23-29, 2011
 - 8) Zeniya T, Kawashima H, Fukuda H, Hashikawa Y, Koshino K, Hirano Y, Hori Y, Miyake Y, Iida H. Optimization of multi-pinhole SPECT imaging for measuring quantitative cerebral blood flow in rats. Society of Nuclear Medicine's 58th Annual Meeting (San Antonio, USA), June 4-8, 2011
 - 9) Huang Q, Zeniya T, Hirano Y, Kudo H, Iida H, Gullberg GT. Evaluation of a brain imaging system with combined parallel hole and pinhole collimation. 11th International Meeting on Fully Three-Dimensional Image Reconstruction in Radiology and Nuclear Medicine (Potsdam, Germany), July 11-15, 2011
 - 10) 飯田秀博. 迅速ガスPET診断—高医療虚血脳診断の開発. 先端医療開発特区 (スーパー特区) 公開シンポジウム「急性脳梗塞早期系統的治療のための分野横断的診断治療統合化低侵襲システムの開発」. 東京慈恵会医科大学 (東京). 2011
 - 11) 飯田秀博. O-ガス迅速PET法のシステム構築と正当性評価. 第23回日本脳循環代謝学会総会. 都市センターホテル (東京). 2011
 - 12) 銭谷 勉, 河嶋秀和, 福田 肇, 橋川美子, 越野一博, 平野祥之, 堀 祐樹, 山本明秀, 圓見純一郎, 三宅義徳, 飯田秀博. ラット脳血流定量のためのマルチピンホールSPECT撮像の最適化. 第51回日本核医学会学術総会 (つくば), 2011年10月27-29日
 - 13) 銭谷 勉, 平野祥之, 富永貴則, 堀 祐樹, 湊小太郎, 畑澤 順, 飯田秀博. 頭部用高解像度SPECT装置の概念設計. 第51回日本核医学会学術総会 (つくば), 2011年10月27-29日
 - 14) 富永貴則, 平野祥之, 堀 祐樹, 銭谷 勉, 湊小太郎, 畑澤 順, 飯田秀博. 頭部用高解像度SPECT装置の開発と評価. 第51回日本核医学会学術総会 (つくば), 2011年10月27-29日

15) 堀 祐樹, 平野祥之, 錢谷 勉, 飯田秀博. 3D 脳ファントムを用いたQSPECT再構成画像の施設間再現性評価. 第51回日本核医学会学術総会 (つくば), 2011年10月27-29日

G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

1.特許取得

1. シンチレーション検出器
特許第4480865号
登録日：2010年3月26日
2. ¹⁵O-一酸化炭素の製造法
特許第3919513号
登録日：2007年2月23日
EP 1463065 (欧州)
登録日：2008年12月17日
CA 2468777 (カナダ)
登録日：2010年12月7日
3. 入力関数持続モニタ
特許第4375978号
登録日：2009年9月18日
4. 単一光子エミッションコンピュータ断層撮影のための装置と方法
特許第4424911号
登録日：平成21年12月18日
5. 磁気共鳴撮像法によるデータ収集方法及びプログラム
出願日：2003年12月2日
公開番号：2005-185296
6. 放射性薬剤のための放射線重量測定装置と濃度モニター統合装置
特許第4399588号
登録日：2009年11月6日
7. 粒子線加速器
特許第4714884号
登録日：2011年4月8日
US 7888891 (米国)
登録日：2011年2月15日

8. PET撮像による画像定量化装置、方法、プログラム及び該画像定量化プログラムを記録したコンピュータ読み出し可能な記録媒体
特許第4701406号
登録日：2011年3月18日

9. 動脈閉塞性疾病モデル動物の作製
特許第4779122号
登録日：2011年7月15日

10. 断層撮影画像の重ね合わせ方法及び断層撮影画像を重ね合わせて表示するためのコンピュータプログラム

出願日：2006年9月28日
出願番号：2007-537664

11. 心筋血流量の定量法、血流量定量プログラム及び血流量定量システム
特許第4895080号
登録日：2012年1月6日

12. 断層撮影装置
特許第4929448号
登録日：2012年2月24日

13. 実験動物固定装置
出願日：2007年4月24日
公開番号：2009-213373

14. 脳画像化装置用頭部模型及びその製造技術
出願日：2009年4月10日
出願番号：2009-96188
PCT：2010年4月6日出願/JP2010/056196

15. 標識化合物供給システム
出願日：2009年8月19日
公開番号：2011-43356

2. 実用新案登録
なし

3. その他
なし

II. 分担研究報告

画像の高解像度化と機器の設計・性能評価に関する研究 —高解像度SPECT装置の開発と超音波照射BBB透過性の評価—

研究分担者 銭谷 勉 国立循環器病研究センター研究所 画像診断医学部 室長

研究要旨

本年度は高解像度SPECT装置の実用化に向けた開発が行われた。フルデジタル化検出器回路を開発・搭載することによって検出器を高解像度化できた。同時に、検出器の2台搭載、および、コリメータ応答関数を組み込んだ画像再構成アルゴリズムによって、高感度化も可能となった。また、GUI化されたソフトウェアが搭載され、装置の操作性や画像処理環境が向上した。さらに、高解像度SPECT装置を用いて、ラットを対象に超音波照射によるBBB透過性向上の画像化に成功した。脳保護薬のBBB透過性の定量評価に、高解像度SPECT装置の利用が可能であることが示唆された。

A. 研究目的

超音波照射による血液脳関門(Blood-Brain Barrier: BBB)透過率の上昇効果が多数報告されている。マイクロバブルを併用する方法は局所的なショックウェーブ効果などにに基づきBBBの上昇効果は比較的長く継続する。超音波単独の低出力条件でも低分子化合物の透過が上昇することも古幡らのよって示唆されている。超音波照射による手法は、急性期脳梗塞における脳保護効果治療薬の脳組織実質への輸送を助け、r-tPAの毒性を相殺する治療薬の選択的な輸送効率を上昇させるだけでなく、さらに変性疾患をはじめとする脳疾患に対する治療薬のDrug Delivery System (DDS)における治療法につながる可能性が示唆される。本研究では、脳保護薬DDS評価に利用するための高解像度SPECT装置の実用化開発、およびラットを対象に超音波照射による低分子化合物のBBB透過性の向上を、高解像度SPECT装置を用いて画像化および評価の可能性を検討する。

B. 研究方法

1. 頭部用高解像度SPECT装置の実用化開発

頭部SPECT用に開発された検出器は、250 mm×150 mm×6.4 mmのNaIシンチレータ（サンゴバン製）と52 mm×52 mmで8×8アノードを持つ位置感応型光電子増倍管（PSPMT: H8500浜松ホトニクス製）5×3で配列されたものと光学結合されている。今回、高解像度化のために全てのアノード信号をデジタル化するフルデジタル回路を開発した。図1はデジタル検出器回路である。図2はデジタル回路を搭載した高解像度SPECT装置である。デジタル検出器回路を搭載

した検出器の固有空間分解能が評価された。

同時に高感度化も行い、検出器2台搭載システムとした。さらに、画像再構成アルゴリズムにコリメータ応答関数を組み込んだ。これによって、画像ノイズを抑制することができ、感度の改善が期待される。

また、DDS評価での装置の実用性を考慮して、データ収集、画像処理、画像再構成のすべてソフトウェアをグラフィカルユーザーインターフェイス(GUI)化し、装置に搭載した。

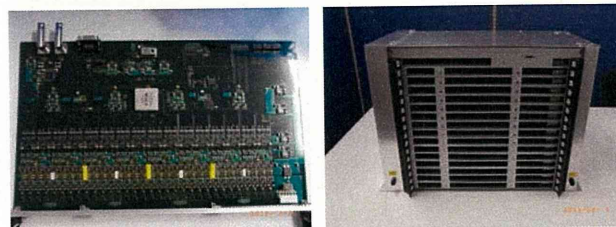


図1 高解像度化のためのデジタル検出器回路。左図：64アノードAD基板、右図：1検出器分回路の入ったラック。



図2 デジタル回路が搭載された高解像度SPECT装置。左図：装置内部、右図：全体外観

2. 高解像度SPECTによる超音波照射BBB透過性の画像評価

SDラット(male, 420g)を使用した。3%インフ

ルラン吸入麻酔下にて、図3のようにStereotaxic deviceに固定、頭部除毛後、超音波プローブが頭皮に押し当てられ、右脳に照射された。超音波は図4のような位置で照射された。エバンスブルー0.84 ml (体重の5%) を1分間投与、生食0.1 mlでフラッシュした5分後、超音波照射開始した。超音波照射は出力5.25 W/cm²で、10分間照射、5分休止、10分間照射、5分休止、10分間照射した。BBB透過性を評価するために、放射性薬剤(radioisotope: RI)は、通常はBBBを透過しない^{99m}Tc-DTPAを使用し、2回に分けて投与した。1回目は超音波照射開始から25分後に、2回目は55分後に投与した。^{99m}Tc-DTPAの投与量は、1回目319 MBq/1.0 ml、2回目335 MBq/1.0 mlで、総投与量654 MBq、それぞれ生食0.2 mlフラッシュを含めて尾静脈から1分間投与した。超音波照射終了と同時に、^{99m}Tc-DTPAの2回目が投与され、照射終了から10分後、2時間SPECT撮像が行われた。15分間のスキャンを8回繰り返した。SPECT撮像終了後、X線CT撮像が行われた。

ネブタール麻酔0.3 ml静注によってSacrificeされ、開胸後、PBS 50 mlおよび10%ホルマリン50 mlにて灌流固定後、頭皮を剥いで、X線CT撮像および30分間のSPECT撮像を行った。その後、脳が摘出され、2 mm厚の切片が作成され、エバンスブルーの集積が確認された。さらに包埋、染色後、薄くスライスされ、Autoradiography (10~20 μm厚)およびHE染色 (10 μm厚)が行われた。Autoradiographyの露光時間は24時間とした。

(倫理面への配慮)

動物実験は、実験計画に対する研究実施機関の承認を受けた上で、国立循環器病研究センター動物実験実施規程に基づき、動物に苦痛を与えないよう配慮して行った。

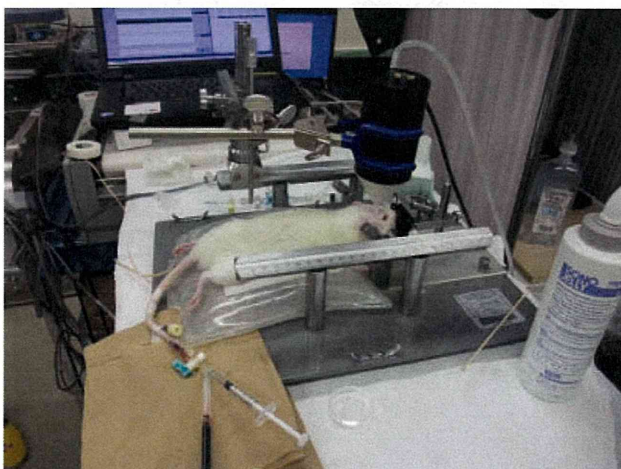


図3 ラット頭部への超音波照射セットアップ

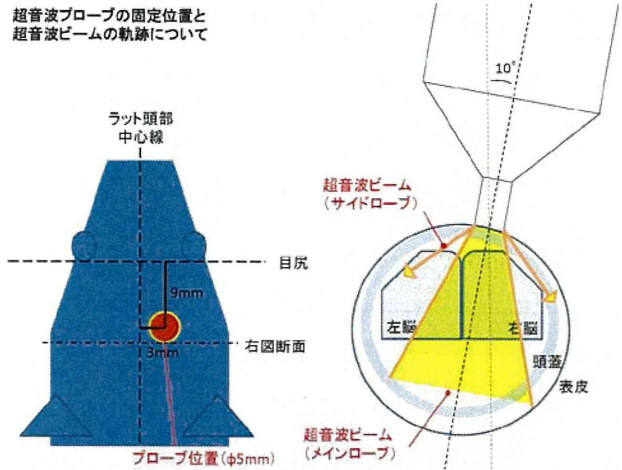


図4 ラット頭部における超音波照射位置

C. 研究結果

1. 頭部用高解像度SPECT装置の実用化開発

図5はデジタル検出器回路搭載によって得られた点広がり関数である。この結果から、2 mm程度の検出器固有空間分解能が得られることが示唆された。また、検出器を2台搭載することによって感度が2倍に、さらに画像再構成アルゴリズムにコリメータ応答関数を組み込むことによって統計ノイズ抑制効果が確認され、感度改善効果があることが確認された。

実用化装置として操作性向上のためにソフトウェアをGUI化し、装置に搭載できた。図6はソフトウェア画面一例で、データ収集、画像処理、画像再構成のソフトウェア画面である。

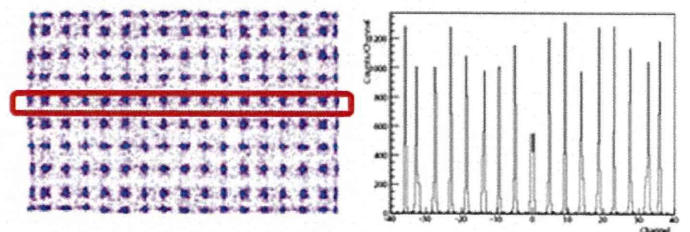
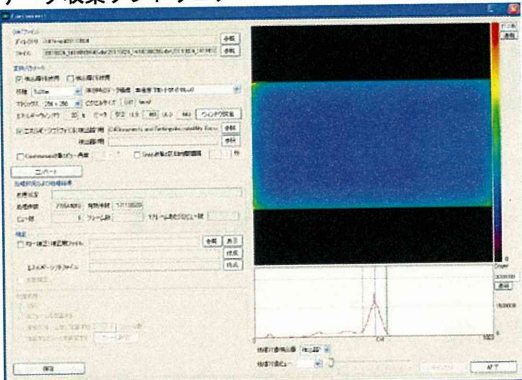


図5 検出器固有空間分解能の評価。

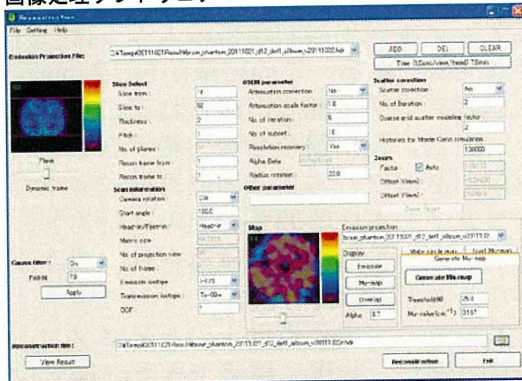
左図：点広がり画像、右図：赤い領域の点広がり画像のプロファイル。



データ収集ソフトウェア



画像処理ソフトウェア



画像再構成ソフトウェア

図6 GUI化されたソフトウェア。上図：データ収集ソフトウェア、中図：画像処理ソフトウェア、下図：画像再構成ソフトウェア。

2. 高解像度SPECTによる超音波照射BBB透過性の画像評価

図7はラット頭部をSPECT撮像して得られた2時間の投影データすべてを使用して画像再構成されたSPECT画像とX線CT画像のフュージョンである。照射した領域に^{99m}Tc-DTPAの高い集積が見られた。X線CT画像と重ね合わせることで脳への集積があることが確認できた。ただし、頭皮の集積もかなり高いことがわかる。

図8は15分毎のSPECT画像である。^{99m}Tc-DTPAの頭皮の集積が時間経過にしたがって減っていくのがわかる。ある程度時間経過した方が、全体の集積は少ないが、脳の集積が見え易くなる。

図9は灌流固定後、頭皮を剥いで得られたex vivo SPECT画像とX線CT画像とのフュージョンである。頭皮が無いため、^{99m}Tc-DTPAの脳への集積がはっきりと確認できた。

図10はSPECT撮像後に摘出したラット脳の2mm厚のスライスの写真である。SPECT画像と同じ位置に、投与したエバンスブルーが脳に集積しているのが確認できた。これはBBBを透過した結果といえる。

図11は摘出脳を10 μmに薄くスライスした切片の代表的なスライスのAutography画像とHE染色画像である。上図は集積が多いスライスで、SPECT画像とも良く一致していた。ただし、HE染色画像からダメージがあることが確認された。中図は少し集積があるスライスで、ダメージが少しあった。下図は集積が少ないスライスで、ダメージも観察されなかった。集積の程度にしたがって組織のダメージも観察された。

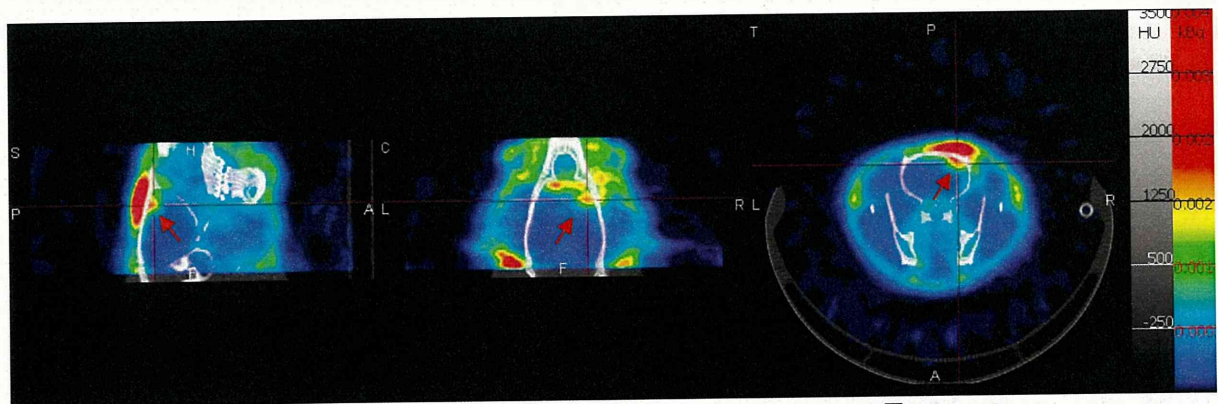


図7 2時間データを加算して得られたラット脳SPECT画像とX線CT画像とのフュージョン

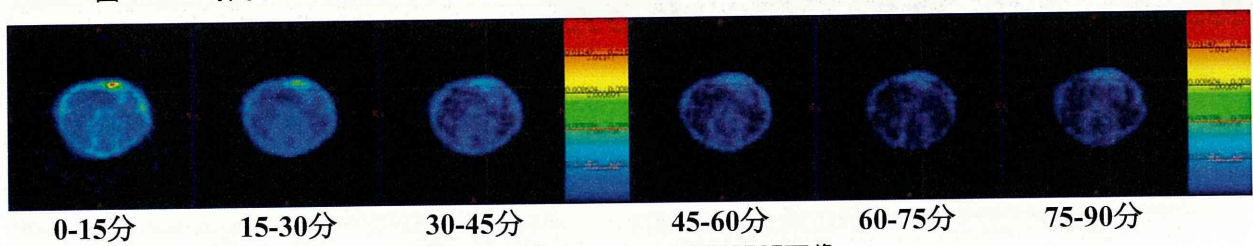


図8 15分毎のラット脳SPECT画像