

血行再建治療の最適化に関する研究

研究分担者 飯原 弘二 国立循環器病研究センター 脳神経外科部長

研究要旨

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。過灌流現象を起こしている部位では、MR-FLAIR画像画像で吻合部近傍の皮質に高信号（血管原性浮腫）を呈し、またPET定量画像では脳血流量の増加と酸素摂取率の低下を認めた。選択的神経細胞死に関しては、不完全梗塞を呈した部位で、¹²³I-IMZ(iomazenil) SPECTにより、遅発性に選択的神経細胞死が進行する可能性が示唆された。SPECTやPET画像とMRI形態画像を重ね合わせることで、術後の過灌流現象および選択的神経細胞死についての評価が可能であり、今後、超高解像度SPECT技術の開発につながる可能性が示唆された。

A. 研究目的

Japan EC-IC bypass Trail (JET) studyによって中等度以上の血行力学的脳虚血における脳血行再建治療の有効性が証明され、より軽症の血行力学的脳虚血における脳梗塞再発率はJET-2 studyによって解明されつつある。しかし、これらの研究の基となる脳血流SPECTの定量評価については、これまで測定法や定量法に施設間差があった。現在、国立循環器病研究センターが開発した定量的SPECT画像再構成・解析パッケージ（QSPECT）を用いて、脳血流SPECT定量評価法の標準化を行い、より正確な評価のもとに、脳血行再建術の適応を評価した上で治療方針を決定することが可能となりつつある。現在、脳血行再建治療は技術的にはすでに確立されたものであると考えられるが、脳血行再建治療において様々な合併症がある。その中でも、血行再建術後過灌流現象、および不完全梗塞に伴う選択的神経細胞死は病態が解明されておらず、現在のところ未だ克服できていない問題である。この問題を克服することが脳血行再建治療の最適化につながると考えられる。

本研究では、成人もやもや病を対象として、QSPECTを中心として、その他¹²³I-IMZ(iomazenil) SPECT、¹⁵O-Gas PETによる脳循環代謝評価、およびMRIでの形態画像を組み合わせることによる血行再建術後過灌流、血行再建術後選択的神経細胞死の病態の解明が可能かの評価を行い、今後の超高解像度SPECT技術の開発につなげることを目的とする。

B. 研究方法

成人もやもや病の症例を対象に、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と¹⁵O-Gas PETを用いた脳循環代謝の定量を施行した。同時期にMRI画像も撮像した。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。

また、脳血行再建治療後に不完全梗塞をきたした症例において、同部位（画像上脳梗塞をきたした部位の周囲、もしくは画像上脳梗塞はきたしていないが、臨床所見で脳虚血が疑われた場合の虚血推定部位：QSPECTでは）に関心領域を設定し、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。

C. 研究結果

平成24年3月31日現在、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例あり、現在経過観察中である。

QSPECTおよびPET画像をMRIと重ね合わせることで関心領域の脳循環代謝の評価が可能であった。大脳皮質のみならず大脳基底核の循環代謝に

ついでの評価も可能であった。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。

また、術後不完全梗塞を呈した7症例において、急性期にIMZ-SPECTを行った6症例全例において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。

D. 考察

脳血行再建術後過灌流は、MR-FLAIR画像画像で吻合部近傍の皮質に高信号（血管原性浮腫）を呈し、またPET定量画像では脳血流量の増加と酸素摂取率の低下を認める可能性が示唆された。また、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。我々は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。

これらの結果は、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の目的とする定量部位の正確な同定により可能であった。今後、これらの方法を用いることで、脳保護薬のDDS評価が可能となるような画像診断技術につながることを示唆された。

E. 結論

脳血流SPECTやPETの脳循環代謝の生理機能の定量画像とMRIによる形態画像を重ね合わせることで、術後の過灌流および選択的神経細胞死についての詳細な評価が可能であり、ひいては超高解像度SPECT技術の開発につながる。

F. 研究発表

1.論文発表

- Egashira Y, Takahashi JC, Ohnishi H, Kawasaki Y, Higashigawa M, Iihara K, Miyamoto S. Surgical treatment and perioperative management of moyamoya disease associated with glycogen storage disease Type 1a. J Neurosurg Pediatr7(1):11-4,2011
- Funaki T, Iihara K, Miyamoto S, Nagatsuka K, Hishikawa T, Ishibashi-Ueda H. Histologic characterization of mobile and nonmobile carotid plaques detected with ultrasound imaging. J Vasc Surg. 53(4): 977-83,2011

2.学会発表

- 中江卓郎、福田健治、賀来泰之、福島和人、飯田秀博、飯原弘二：脳血管外科手術の術後評価における¹²³I-IMZ SPECTの有用性についての検討、STROKE2011、2011年3月24日～26日、東京
- 中江卓郎、福田健治、賀来泰之、森田奈緒美、福島和人、飯田秀博、飯原弘二：¹²³I-iomazenil SPECTを用いた脳血管外科手術後の神経細胞密度評価の有用性についての検討、社団法人日本脳神経外科学会第70回学術総会、2011年10月12日～14日、横浜
- 中江卓郎、福田健治、賀来泰之、森田奈緒美、福島和人、飯田秀博、飯原弘二：脳神経外科手術後の不完全な虚血性変化における神経細胞viability評価の有用性、第23回日本脳循環代謝学会総会、2011年11月4日～5日、東京

G. 知的財産権の出願・登録状況

- 1.特許取得
なし
- 2.実用新案登録
なし
- 3.その他
なし

SPECTのための高機能逐次近似画像再構成法の研究

研究分担者 工藤 博幸 筑波大学システム情報系情報工学域 教授

研究要旨

本研究プロジェクトで開発した小視野を拡大して超高分解能で撮影する新しい方式の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逐次近似画像再構成法の開発を実施した。

A. 研究目的

本研究プロジェクトで開発した小視野を拡大して超高分解能で撮影する新しい方式の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

以降では、各画像再構成法の概要と性能評価のために行ったシミュレーション実験の結果を示す。

B. 研究方法

C. 研究結果

- 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

SPECT/PET装置の測定データ格納方式としては、ヒストグラムモードとリストモードが存在する。リストグラムモードは、1) ダ

イナミック画像の再構成や体動補正が行いやすいこと、2) 測定と画像再構成の計算を並行して同時に行うワンパス再構成が行いやすいこと、などの利点があり近年注目されている。一方、近年のSPECT/PET装置では、OSEM（Ordered Subsets Expectation Maximization）法などの高速に収束するブロック反復型画像再構成法が採用されているが、リミットサイクルと呼ばれる雑音特性が悪い画像に収束する問題点とリストモードデータへの拡張が容易でない問題点が存在する。

そこで、2002年に筆者らがヒストグラムモードデータに対して提案した非線形計画問題の双対性と呼ばれる概念に注目したブロック反復型画像再構成法をリストモードデータに拡張して、実装と性能評価を行った。図1, 2に、シミュレーション実験の結果を示す。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）法と提案手法の比較を行った。一反復終了時の再構成画像と対数尤度値を図に示してあるが、提案手法（赤線）はDRAMA法（緑線）と同等の高い性能を実現していることが確認できる。

- 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

SPECT/PETにおける大きな画質劣化要因として、部分容積効果による定量性・分解能の低下が存在する。特に、本研究プロジェクトで開発を行ったような脳イメージング装置では部分容積効果の影響は大きく診断に影響を及ぼすことが知られており、投影データから画像を生成する画像再構成の過程で補正することが求められる。部分容積効果の補正法としては、1) 画像再構成の過程に部分容積効果によるぼけの逆演算を組み込むダブルアリング（Deblurring）法、2) 同一患者のCT/MRI形態画像を利用して補正を行う

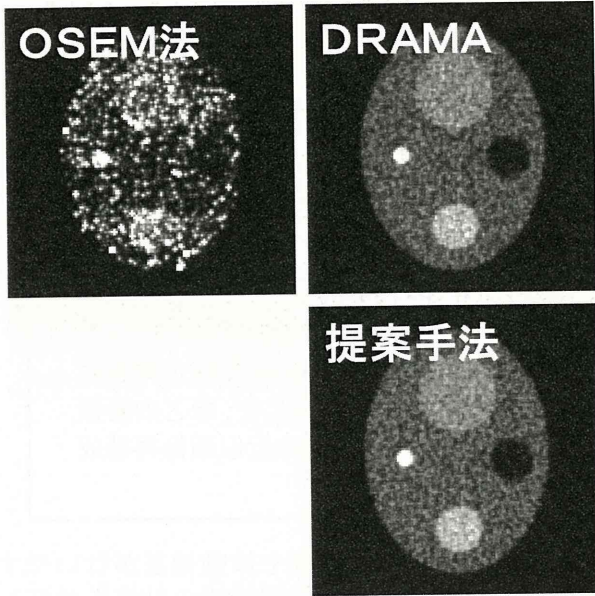


図1 一反復終了時の各再構成法の再構成画像

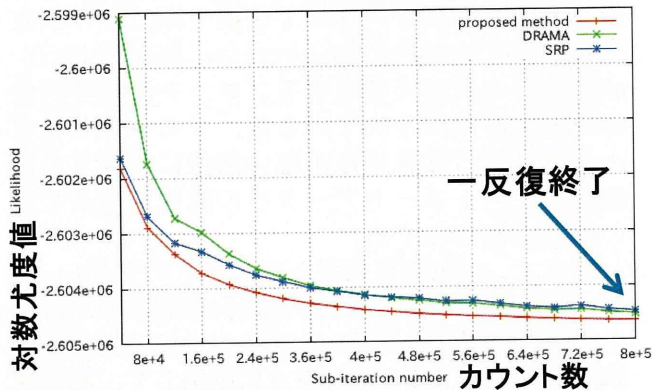


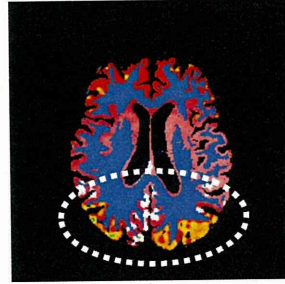
図2 一反復終了時の対数尤度関数の値

Muller-Gartnerの手法、の2つが存在する。1)の手法は、補正により統計雑音の増大が起こり実用が困難な問題点がある。一方、2)の手法は、統計雑音は抑制されるが形態画像に写らない病変に対して効果が小さい問題点がある。

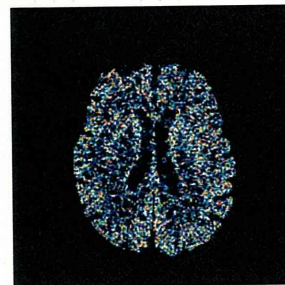
そこで、本研究では、ダブルリング法とMuller-Gartnerの手法の長所を両立させ、形態画像に写らない病変にも有効かつ統計雑音も抑制可能な新手法を開発した。具体的には、2007年に筆者らが開発したCT/MRIの形態画像を先見情報としてPETの画像再構成に利用する解剖学的MAP (Anatomical MAP) 画像再構成法に部分容積効果補正を組み込み、実装と性能評価を行った。図3に、脳イメージングを想定したシミュレーション実験の結果を示す。従来の代表的な画像再構成法であるMLEM (Maximum Likelihood Expectation Maximization) 法及び(形態画像を利用しない) MAP法と提案手法の比較を行った。実験は、白点線で示した後頭葉から頭頂葉にかけての部位に病変が存在する状況を想定している。MLEM

M法では部分容積効果は補正されているが統計雑音が増大しており、従来のMAP法では部分容積効果の影響は上手く補正されておらず病変の部位が識別し難くなっている。これに対して、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。

提案手法



形態画像を利用しない従来のMAP法



MLEM法

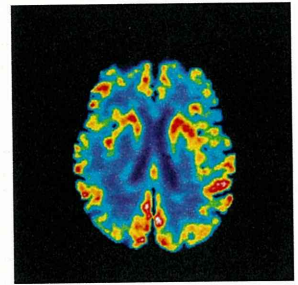


図3 各手法の再構成画像

③ 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

近年のSPECT/PET装置では、装置の物理的制約や測定時間削減などの理由から、180度角度範囲の完全な投影データが測定できない構成のものが存在する。また、本研究プロジェクトで開発を行ったSPECT装置では、小視野を拡大撮影するため投影データにトランケーションが生じる。このような場合には、一部が欠損した不完全投影データからの画像再構成法が必要となる。

近年、X線CTの分野では、対象画像が同一領域内でほぼ様な濃度値を持つことを表すTV (Total Variation) と呼ばれる先見情報を用いて不完全投影データから高画質の画像を再構成する研究が行われているが、TVは微分不可能で強意の凸関数でないなどの理由からTVを用いた反復型画像再構成法の構築は困難な問題点がある。そこで、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を対象とした実装と性能評価を行った。図4に、投影データの測定方向数が16の場合を想定したシミュレーション実験の結果を示す。従来の代表的な画像再構成法であるFBP (Filtered B

ackprojection)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。

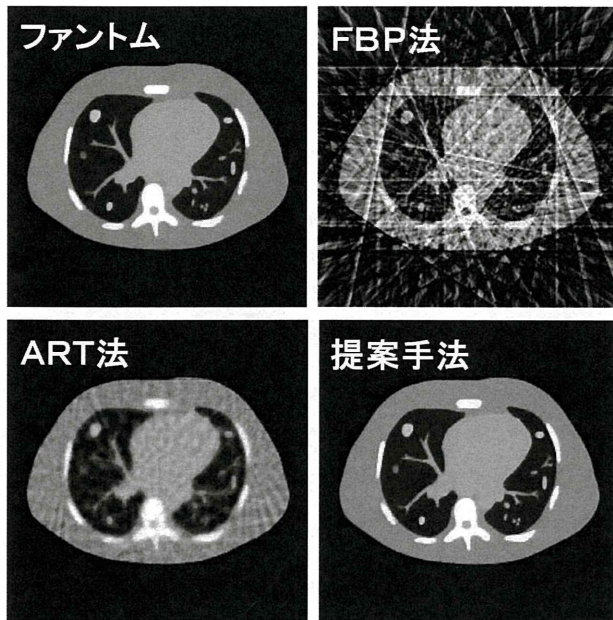


図4 各手法による16方向投影データからの再構成画像

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

本研究プロジェクトでは、脳保護薬のDDS評価を可能にする小視野を拡大して超高分解能で撮影する新しい方式のSPECT装置の開発を行った。図5に示すように、この方式では、ガンマカメラにピンホールコリメータを装着して小視野を細かくサンプリングしたトランケーション投影データを測定して、これに画像再構成を行い高分解能のSPECT画像を得る。本方式のキーはトランケーション投影データからの画像再構成法の開発であり、本年度の研究では、『対象画像に含まれる濃度値の一部が既知』であるという濃度事前情報を用いて定量性のある画像を生成する画像再構成法を開発した。本手法は、SPECTやCT検査においては、例えば『空気に集積するRI密度(吸収係数)はゼロである』ことなど、対象画像に含まれる濃度値の一部が既知の場合が多いことに着目して、これを事前情報を利用してトランケーションによる定量性の低下を抑制するものである。具体的には、MLEM法などの逐次近似画像再構成法の反復計算の過程において、事前情報として与えられた濃度値を持つ画素を自動的に同定して、これを制約条件に課して画像再構成を行う。

図6に、提案手法のシミュレーション実験結果を示す。本実験では、図6のファントム画像中の2つの濃度値0.0と1.0を事前情報として用いてい

る(もちろん、どの画素が0.0や1.0の濃度値を持つかは未知としている)。投影データを測定する関心領域(ROI)の大きさが異なる2つの場合(ROI-1, ROI-2)についてトランケーション投影データから画像再構成を行ったが、いずれの場合も濃度値0.0と1.0の画素は上手く推定され、高画質の再構成画像が得られている。

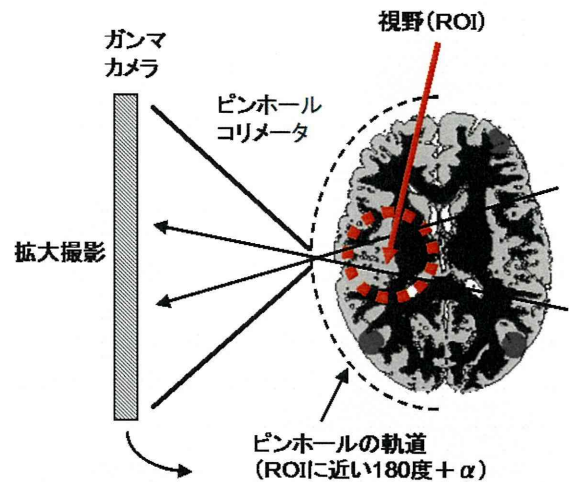
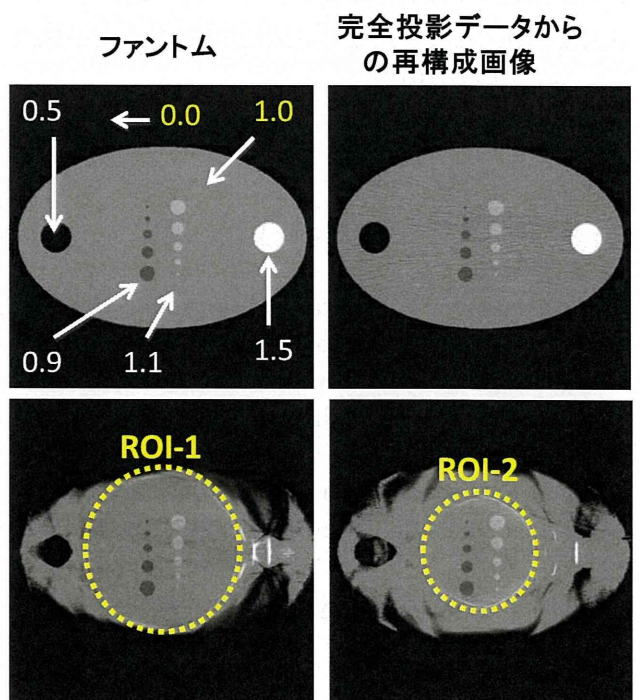


図5 本研究プロジェクトで開発した小視野拡大型ピンホールSPECT装置の原理



トランケーション投影データからの画像(ROI-1) トランケーション投影データからの画像(ROI-2)

図6 提案手法によるトランケーション投影データからの再構成画像

D. 考察

E. 結論

本年度の研究では、本研究プロジェクトで開発した小視野を拡大して超高分解能で撮影する新しい方式のSPECT装置の特徴を考慮して、様々なプロトタイプの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、シミュレーション実験により有効性を実証した。

- 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

これらの画像再構成法は、単に本研究プロジェクトで開発したSPECT装置に適したものであるばかりでなく、一般性が大きく世界最先端のSPECT/PET/CTを目的とした画像再構成研究と比較しても、見劣りしない学術的に価値が高いものと考えている。例えば、④の濃度事前情報を用いた再構成法は、国際雑誌Physics in Medicine and Biology誌（Institute of Physics出版、ISIインパクトファクター3.056）に短時間で採録になった。

F. 研究発表

1.論文発表

- [1] Q.Huang, T.Zeniya, Y.Hirano, H.Kudo, H.Iida, and G.T.Gullberg: Evaluation of a brain imaging system with combined parallel hole and pinhole collimation, Proceedings of 11th International Meeting on Fully Three-Dimensional Image Reconstruction in Radiology and Nuclear Medicine, pp.246-249 (2011)
- [2] E.A.Rashed and H.Kudo: Row-action image reconstruction algorithm using lp-norm distance to a reference image, Conference Record of 2011 IEEE Nuclear Science Symposium and Medical Imaging Conference, pp.3966-3970 (2011)
- [3] E.A.Rashed, Z.Wang, and H.Kudo: Adaptive thresholding for robust iterative image reconstruction from limited views projection data, Conference Record of 2011 IEEE Nuclear Science Symposium and Medical Imaging

Conference, pp.4249-4252 (2011)

- [4] E.A.Rashed, H.Toda, T.Sera, A.Tsuchiyama, T.Nakano, K.Uesugi, and H.Kudo: Towards a high-resolution local tomography using statistical iterative reconstruction, Conference Record of 2011 IEEE Nuclear Science Symposium and Medical Imaging Conference, pp.4253-4256 (2011)
- [5] E.A.Rashed and H.Kudo: Iterative thresholding framework for row-action reconstruction from sparse projection data, Conference Record of 2011 IEEE Nuclear Science Symposium and Medical Imaging Conference, pp.4257-4259 (2011)
- [6] 工藤博幸, イサムラシド: 圧縮センシングを用いた少数方向投影データからのCT画像再構成, 映像情報メディカル, Vol.43, No.13, pp.1093-1099 (2011)
- [7] 工藤博幸: 脳イメージングにおける機能画像と形態画像融合の在り方—MRI情報を利用したSPECT/PET画像再構成法—, 日本医用画像工学会JAMIT e-ニューズレター, No.64, pp.22-24 (2011)
- [8] E.A.Rashed and H.Kudo: Statistical image reconstruction from limited projection data with intensity priors, Physics in Medicine and Biology, Vol.57, No.7, pp.2039-2061 (2012)

2.学会発表

- [1] 工藤博幸: 統計的推定による画像再構成の基礎と新しい展開, 日本医用画像工学会第30回大会 (2011) (日本医用画像工学会からDVDにて発売)
- [2] E.A.Rashed and H.Kudo: Row-action reconstruction algorithms for the minimization of the L1/L0 distance from a reference image in CT, 日本医用画像工学会第30回大会 (2011)
- [3] 高橋和晃, 工藤博幸: ブロック反復型画像再構成における緩和パラメータを用いないリミットサイクル回避法—リストモード再構成への拡張, 日本医用画像工学会第30回大会 (2011)
- [4] 大森広崇, 野村勇人, 工藤博幸: 脳血流PET/SPECTイメージングにおける画像再構成と病変検出の統合, 日本医用画像工学会第30回大会 (2011)
- [5] 大森広崇, 野村勇人, 工藤博幸: MRI情報を利用した脳PET/SPECTイメージングにおける画像再構成法, 電子情報通信学会医用画像研究会 (2011)

G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む.)

なし

PETを用いたDDS評価との比較および調査に関する研究

研究分担者 菅野 巖（独）放射線医学総合研究所分子イメージング研究センター 主任研究員

研究要旨

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。1か月にわたり8%低酸素環境下で飼育したマウス的大脑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確認され、神経血管カプリングの消失は神経細胞から血管への信号伝達路の機能不全であると推定できた。

A. 研究目的

PETによる脳へのDDS評価の基礎となる脳微小循環の低酸素環境に対する血管形態の適応と脳血管機能の適応を検討する目的で、低酸素環境下で飼育したマウス的大脑皮質の微小血管の形態と機能の経時変化を検討した。

B. 研究方法

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か月まで経時的に観察した。計測は0.445 μm/pixelサイズで1024x1024を深さ方向に5 μm間隔で800μmまでの容積画像として連続した4~6区画で取得した。個体毎に穿通枝血管以降の毛細血管径を1か月まで毎週計測し、低酸素環境飼育前日を基準にした毛細管の拡張率を求めた。また、低酸素環境下における脳血管反応性は、覚醒下で空気振動ヒゲ刺激に対するバレル領域応答をレーザードプラー血流計(LDF)で測定した。また、別個体を用いて同様の8%低酸素環境下のCO₂反応性を2週間毎に測定した。さらに、電圧感受性蛍光色素(VSD)により、血管構造計測日と異なる日に測定し、1か月までの経時変化を求めた。

(倫理面の配慮)

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

8%低酸素下での微小血管構造の典型的な経時変化を測定した結果、動脈系および静脈系のいずれも1週目ころから血管径は拡張をはじめ、1か月では毛細血管は元の血管径に対して15~20%の拡張を示した(図1上)。この期間のひげ刺激に対する大脑皮質バレル領域の脳血管反応性をLDFで測定した結果、約

20%から徐々に低下し、1か月後には5%以下まで脳血管反応性が消失した(図1)。

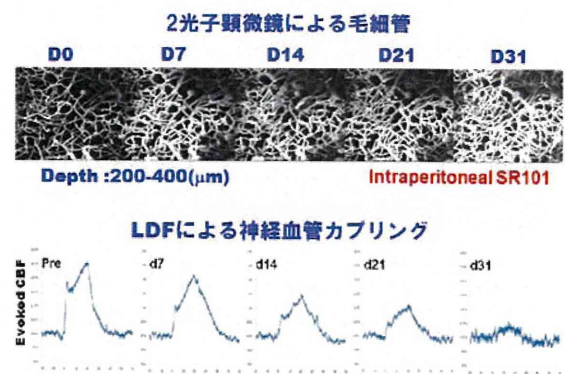


図 1

別個体で、2週目と4週目のCO₂反応性は低酸素飼育前と比べ保存され、血管の拡張性は保持されていた。また、同じく2週目と4週目で電位感受性蛍光色素(VSD)を用いてバレル皮質領域の神経活動を計測では神経活動が全く変動していないことが確認された(図2)。

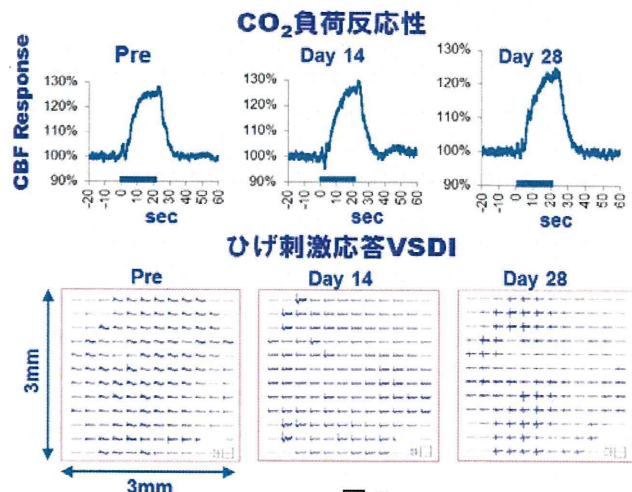


図 2

D. 考察

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

低酸素下飼育で脳実質毛細血管ではひげ刺激に対する神経血管カプリング反応が消失した。しかし、神経活性と脳血管の拡張性は維持されていた。神経血管カプリングの機序を解明する重要な実験モデルができたことになる。

F. 研究発表

1. 論文発表

- Masamoto K, Kanno I. Anesthesia and the quantitative evaluation of neurovascular coupling. *J Cereb Blood Flow Metab.* (in press) 2012 Review
- Masamoto K, Tomita Y, Toriumi H, Aoki I, Unekawa M, Takuwa H, Itoh Y, Suzuki N, Kanno I. Repeated Longitudinal in vivo Imaging of Neuro-glio-vascular Unit at the Peripheral Boundary of Ischemia in Mouse Cerebral Cortex. *Neurosciences* (in press) 2012
- Yoshihara K, Takuwa H, Kanno I, Okawa S, Yamada Y and Masamoto K, 3D Analysis of Intracortical Microvasculature during Chronic Hypoxia in Mouse Brains. *Adv Exp Med Biol* (in press) 2012
- Paulson OB, Kanno I, Reivich M, Sokoloff L. History of International Society for Cerebral Blood Flow and Metabolism. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2011 Dec 21. Review
- Miyazaki K, Masamoto K, Morimoto N, Kurata T, Mimoto T, Obata T, Kanno I, Abe K. Early and progressive impairment of spinal blood flow-glucose metabolism coupling in motor neuron degeneration of ALS model mice. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2012 Mar;32(3):456-67.
- Autio J, Kawaguchi H, Saito S, Aoki I, Obata T, Masamoto K, Kanno I. Spatial frequency-based analysis of mean red blood cell speed in single microvessels: investigation of microvascular perfusion in rat cerebral cortex. *PLoS One.* 2011;6(8):e24056. Epub 2011 Aug 24.
- Autio JA, Kershaw J, Shibata S, Obata T, Kanno I, Aoki I. High b-value diffusion-weighted fMRI in a

rat forepaw electrostimulation model at 7 T. *Neuroimage.* 2011 Jul 1;57(1):140-8.

- Saito S, Aoki I, Sawada K, Sun XZ, Chuang KH, Kershaw J, Kanno I, Suhara T. Quantitative and noninvasive assessment of prenatal X-ray-induced CNS abnormalities using magnetic resonance imaging. *Radiat Res.* 2011 Jan;175(1):1-9.
- Takuwa H, Autio J, Nakayama H, Matsuura T, Obata T, Okada E, Masamoto K, Kanno I. Reproducibility and variance of a stimulation-induced hemodynamic response in barrel cortex of awake behaving mice. *Brain Res.* 2011 Jan 19;1369:103-11.
- Saito S, Aoki I, Sawada K, Sun XZ, Chuang KH, Kershaw J, Kanno I, Suhara T. Quantitative and Noninvasive Assessment of Prenatal X-Ray-Induced CNS Abnormalities Using Magnetic Resonance Imaging. *Radiat Res.* 2010 Nov 10.
- Zhelev Z, Bakalova R, Aoki I, Gadjeva V, Kanno I. Imaging of cancer by redox-mediated mechanism: a radical diagnostic approach. *Mol Biosyst.* 2010 Dec;6(12):2386-8.
- Takuwa H, Matsuura T, Bakalova R, Obata T, Kanno I. Contribution of nitric oxide to cerebral blood flow regulation under hypoxia in rats. *J Physiol Sci.* 2010 Nov;60(6):399-406.
- Kawaguchi H, Obata T, Ota M, Akine Y, Ito H, Ikehira H, Kanno I, Suhara T. Regional heterogeneity and age-related change in sub-regions of internal capsule evaluated by diffusion tensor imaging. *Brain Res.* 2010 Oct 1;1354:30-9.
- Kokuryo D, Kimura Y, Obata T, Yamaya T, Kawamura K, Zhang MR, Kanno I, Aoki I. A small animal holding fixture system with positional reproducibility for longitudinal multimodal imaging. *Phys Med Biol.* 2010 Jul 21;55(14):4119-30.
- Seki C, Ito H, Ichimiya T, Arakawa R, Ikoma Y, Shidahara M, Maeda J, Takano A, Takahashi H, Kimura Y, Suzuki K, Kanno I, Suhara T. Quantitative analysis of dopamine transporters in human brain using [¹¹C]PE2I and positron emission tomography: evaluation of reference tissue models. *Ann Nucl Med.* 2010 May;24(4):249-60.
- Masamoto K, Obata T, Kanno I. Intracortical microcirculatory change induced by anesthesia in rat somatosensory cortex. *Adv Exp Med Biol.* 2010; 662:57-61.

2. 学会発表

[口頭発表]

- 木村泰之、伊藤浩、白石貴博、山田真希子、小高文聰、生駒洋子、関千江、川口拓之、高野晴成、藤原広臨、島田斉、菅野巖、須原哲也：PETによるドーパミンレセプターイメージングの機種間差、第50回千葉核医学研究会、千葉、2011.06

2. 木村泰之、伊藤浩、白石貴博、山田真希子、小高文聰、生駒洋子、関千江、川口拓之、高野晴成、藤原広臨、島田斉、菅野巖、須原哲也: PETによるドーパミンレセプターイメージングの機種間差、第1回核医学画像解析研究会、千葉、2011.11
 3. 伊藤浩、茨木正信*、正本和人、川口拓之、田桑弘之、谷口順子、菅野巖: 脳機能抑制による局所脳有効酸素拡散能の変化、第23回日本脳循環代謝学会総会、東京、2011.11
 4. 田桑弘之、正本和人、菅野巖、川口拓之、谷口順子、伊藤浩、その他: 低酸素環境飼育マウスにおける脳賦活及びCO₂負荷時の脳血管反応性の検討、第23回日本脳循環代謝学会、東京、2011.11
 5. 田桑弘之、松浦哲也、小島隆行、川口拓之、菅野巖、伊藤浩: 麻酔下および覚醒下マウスにおけるヒゲ刺激時の賦活脳血流変化での赤血球速度と濃度の計測、第37回日本微小循環学会、盛岡、2012.03
 6. 菅野巖: 長期間持続低酸素マウスのひげ刺激神経血管反応性低下時におけるバレル皮質活性とCO₂血管反応性、第37回日本微小循環学会総会、盛岡市、2012.03
2. Jeffrey Kershaw, Takayuki Obata, Sayaka Shibata, Hiroshi Ito, Iwao Kanno, Ichio Aoki: Biexponential modeling of diffusion-weighted MRI of rat brain before and after global ischaemia, 第39回日本磁気共鳴医学会大会, 北九州市, 2011.09
 3. Chie Seki, Hiroshi Ito, Youko Ikoma, Miho Shidahara, Yuichi Kimura, Iwao Kanno, Tetsuya Suhara, et.al: Quantitative analysis of dopamine transporters in human brain using [11C]PE2I and positron emission tomography: evaluation of reference tissue models, 第51回日本核医学会学術集会, つくば市, 2011.10
 4. Iwao Kanno, Kazuto Masamoto, Hiroyuki Takuwa, Hiroshi Kawaguchi, Jyunko Taniguchi, Yutaka Tomita, Norihiro Suzuki*, Hiroshi Ito: Persistent failure of neurovascular coupling induced by prolonged moderate hypoxia in the somatosensory cortex in mice, Neuroscience 2011, Washington, DC, 2011.11

[招待発表]

1. Iwao Kanno: Molecular Imaging at NIRS: From PET to Microscopy, NRI-UPENN joint symposium, Incheon, 2011.09
2. 菅野巖: 急性的および慢性的病態生理揺動におけるマウス体性感覚野大脳皮質のインビボ形態と微小循環の経時的計測、第89回日本生理学会大会、松本市、2012.03

[ポスター発表]

1. 小高謙一、青木伊知男、森谷純治、中原鉄平、田所裕之、館野馨、菊池達矢、福村利光、菅野巖、南野徹*、小室一成*: Tracking of Manganese Labeled Mononuclear Cells and Evaluation of Cardiac Function in Rat Model Using Self-Gating Cine Magnetic Resonance Imaging、第75回日本循環器学会、横浜市、2011.08

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

I-123標識酸化LDL (^{123}I -oxLDL) の新規標識合成法に関する研究

研究分担者 河嶋 秀和 国立循環器病研究センター研究所 室長

研究要旨

脳梗塞や脳内出血等の疾患に対し、脳保護薬の動態あるいはその治療効果判定にインビボ画像撮像技術を活用するためには、放射性同位元素で標識した分子プローブが必須である。本研究では、生体内で血管の脆弱化に関与する酸化LDL (oxLDL) に着目し、そのイメージングプローブとしての可能性を評価した。これまで、我々は、oxLDL構成成分の芳香族アミノ酸残基にSPECT核種のI-123を直接標識してきたが、今年度は、より緩やかな条件でI-123を導入可能な間接標識法にてI-123標識oxLDL (^{123}I -oxLDL) を作製し、その基礎評価を試みた。

A. 研究目的

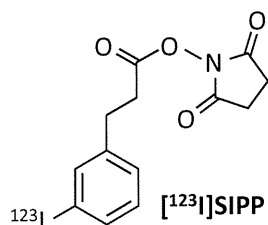
oxLDLは、lectin-like oxLDL receptor-1 (LOX-1)等の受容体を介して血管内皮機能を障害するとともに、種々のスカベンジャー受容体によるマクロファージ泡沫化への関与が報告されている。したがって、oxLDLの挙動を追跡することで、脳梗塞や脳内出血の原因となる血管病変に関して有益な情報を得られると期待される。

昨年度は、ペプチドあるいはタンパク中の芳香族アミノ酸にI-123を直接導入する方法（直接標識法）を用い、 ^{123}I -oxLDLを合成した。しかし、直接標識法では使用する酸化剤のため、反応条件によってはoxLDLを変性させる危険性がある。また、I-123の芳香環の標識位置を選択できないことから、安定性が低い標識プローブが生成する可能性も考えられる。そこで本研究では、上記の直接標識法の問題点を解決する間接法により ^{123}I -oxLDLを標識合成し、血管病変イメージングSPECTプローブとしての有用性を基礎的に検討した。

B. 研究方法

Succinimidyl 3-(3- ^{123}I iodophenyl)propionate (^{123}I -SIPP) の合成

3-ブロモプロピオン酸を出発物質としてブチルリチウムと反応させた。得られたジブチル体を塩化トリブチルスズと反応させ、標識前駆体である活性エステル体、succinimidyl 3-(3-tributylstannanylphenyl)propionateを合成した。酢酸溶液中、*tert*-butylhydroperoxide存在下で ^{123}I NaIを50°C、20分間加熱し、順相HPLC



にて精製することによりI-123標識活性エステル体の ^{123}I SIPPを得た。

^{123}I SIPPを用いたoxLDLの標識

^{123}I SIPPはoxLDLに存在する塩基性アミノ酸残基、あるいはN末端のアミノ基とアミド結合を形成する。本反応は系に存在する水素イオン濃度の影響を受けることから、pHと反応率との関連性を検討した。すなわち、 ^{123}I SIPP/DMF溶液に、oxLDL含有リン酸緩衝液 (pH 7.4~11) を加え室温にて30分間震盪し、Silica gel TLC (展開溶媒: MeOH/水 = 3/1) により、標識体である ^{123}I -oxLDLの放射化学的純度を分析した。

細胞取込み実験

培養ヒトLOX-1発現CHO細胞の培地をHEPES緩衝液に置換し、ここに3~30 μg oxLDL/ml相当の ^{123}I -oxLDLを添加した。37°Cで1時間インキュベートし、PBS洗浄後、0.1% SDSで細胞を溶解、溶液中の放射能をガンマカウンタで測定した。対照群には、Wild type CHO細胞を用い、1 wellあたりの放射能を取込み量として比較した。

体内分布実験

アテローム性動脈硬化症モデルであるApoEノックアウトC57BL/6マウス (雄性, 30週齢) に ^{123}I -oxLDLおよび蛍光色素標識したDiI-oxLDLを尾静脈より同時に投与した。投与100分後に脱血、大動脈を摘出・展開し、露出した内壁をイメージングプレートに付した。一方、蛍光染色にてLOX-1が発現している血管内のアテローム部位を同定し、ARGの結果と比較した。また、各臓器の放射能と重量を測定し、放射能分布を% injected doseおよび%

injected dose/gにて算出した。

なお、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。

C. 研究結果

Succinimidyl 3-(3-[¹²³I]iodophenyl)propionate ([¹²³I]-SIPP) の合成

トリブチルスズ前駆体は、出発物質3-ブロモプロピオン酸からの2段階反応により、総収率22%で得られた。

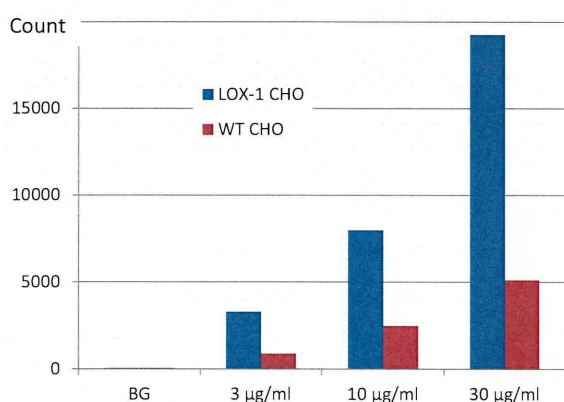
まず、I-123標識に先行して非放射性的のヨウ化ナトリウムを用いてヨウ素化反応を行い、目的物の生成をNMR解析により確認した。また、I-123の求電子置換反応を進めるにあたり、¹²³Iをヨウ素カチオンに変換する目的で*t*-butyl-hydroperoxideを酸化剤に使用した。トリブチルスズ前駆体からの1段階反応により、[¹²³I]SIPPを放射化学的収率45%、放射化学的純度93%で得た。

[¹²³I]SIPPを用いたoxLDLの標識

[¹²³I]SIPPとoxLDLとの反応において、系のpHと反応率との関係を調べたところ、TLC分析の結果、pH 10の時に77%と最大になった。そこで、pH 10のリン酸緩衝液を使用して得た反応液をSephadexカラムクロマトグラフィにて精製し、¹²³I-oxLDLを放射化学的収率46%、放射化学的純度93%で得た。

細胞取込み実験

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。



体内分布実験

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。

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。さらに、[¹²³I]SIPPとoxLDLとの反応ではoxLDL中のアミノ基がNH₂の非カチオン状態を保つ必要があり、また、oxLDL自身の安定性を考慮して、系のpHが反応率に及ぼす影響を検討したところ、pH 10の緩衝液を用いた際に最大の収率が得られることを見出した。[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。

一方、細胞取込み実験において、合成した¹²³I-oxLDLはLOX-1に認識されていることが示唆された。また、体内挙動に関する知見から、静脈内投与された¹²³I-oxLDLは主に肝臓に集積し、さらに血管内皮に存在するoxLDL受容体を介して全身性に分布していると考えられた。

E. 結論

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。

F. 研究発表

1.論文発表

なし

2.学会発表

- 1) Kawashima H. Assessment of sympathetic nerve function in miniature swine models of myocardial infarction: a PET study. XII Turku PET Symposium. Turku, Finland. 2011
- 2) Kawashima H. Pretargeted radioimmunotherapy of tumor using a novel rhenium-labeled biotin derivative and streptavidin conjugated anti-cytokeratin 19 monoclonal antibody. Society of Nuclear Medicine's 58th Annual Meeting. San Antonio, USA. 2011
- 3) Kawashima H. Evaluation of a miniature swine model of myocardial infarction: measurement of myocardial blood flow and sympathetic nerve function by PET. 2011 World Molecular Imaging Conference. San Diego, California. 2011

G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

なし

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

研究分担者 平野 祥之 国立循環器病研究センター研究所 画像診断医学部 流動研究員

研究要旨

本研究では、SPECT検出器におけるシンチレーション光の伝搬をシミュレーションすることで、新たに開発する高解像度検出器の性能を見積もった。はじめにNaI(Tl)を用いたSPECT検出器の実験値と比較し、シミュレーションの有用性を確認した。またLaBr₃(Ce)を用いた検出器において、約2倍率のピンホールコリメータを用いることで、80%の高い検出効率をもち1mm程度の高分解能が期待できることをシミュレーションによって示した。

A. 研究目的

SPECT検出器の位置分解能は、シンチレーション光の受光素子への分布に強く依存する。よって検出器開発においてシンチレーション光の伝搬を把握することは重要である。本研究の目的は、LaBr₃(Ce)(10cm x 10cm)と2 x 2のマルチアノードタイプの光電子増倍管PMT(H8500)を基にした高解像度SPECT検出器の性能をシンチレーション光の伝搬をシミュレーションすることで見積もることである。またこの結果は、検出器開発にフィードバックすることができる。

B. 研究方法

はじめに、すでに製作済みのNaI(Tl)シンチレータと3 x 5 PMT(H8500)を基にした大視野検出器の実験結果と比較することで、シミュレーションの有用性を確認した。シミュレーションコードとしてはGeant4を用い、検出器の幾何形状を詳細に再現した。また各物質の光学的特性をできるだけシミュレーションに取り入れ、シンチレーション光の発生から、PMTの光電面までを詳細にシミュレーションした（図1）

シミュレーションの妥当性を確認した後、新しく開発する発光量の高いLaBr₃(Ce)と2 x 2 PMT (H8500)を用いた高解像度SPECTの性能をシミュレーションによって評価した。ガンマ線の入射は、15mm間隔で7 x 7ポイントから検出器に対して垂直に、ピンホールコリメータを導入した場合の斜め入射を行った。またシンチレータの厚さを10mmから1mmに、またPMTとの接合部（ウィンドウ）の厚さも変えて評価した。（倫理面への配慮） 該当しない

C. 研究結果

NaI(Tl)を基にした大視野検出器との実験結果において、シミュレーションは実験値をよく再現した。実験値およびシミュレーションのエネルギー分解能は、それぞれ10%、9.0%であった。

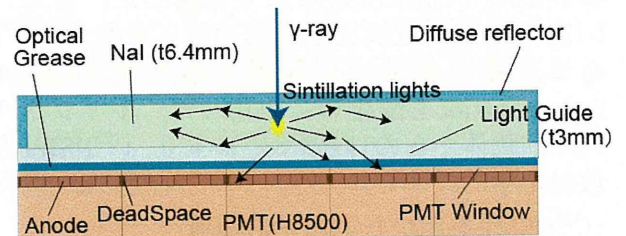


図1 シミュレーションの様子。検出器を詳細に再現し、各物質の光学特性を考慮した。

また位置分解能も検出器の中心で、それぞれ3.0mm、2.8mmであった。

次にLaBr₃(Ce)を用いた高解像度SPECTのシミュレーション結果を図2に示す。また位置分解能と検出効率を図3に示す。シンチレータの厚さが1mmの場合は、分解能(FWHM)は1mm以下が達成できるが検出効率が30%程度になってしまう。

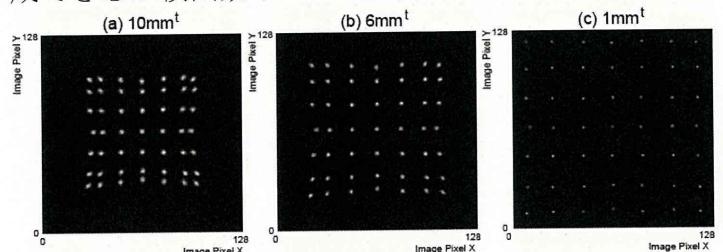
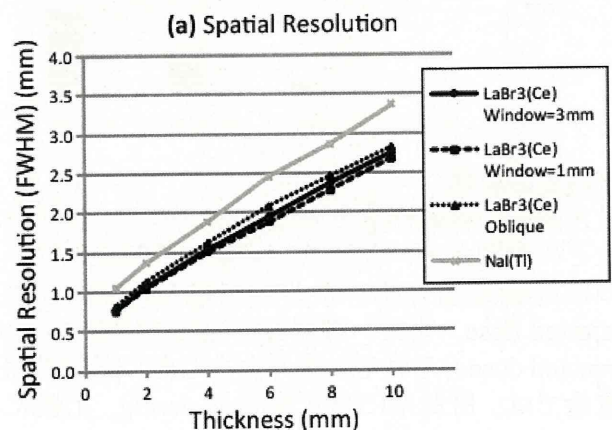


図2 LaBr₃(Ce)を用いたSPECT検出器における厚さが10, 6, 1 mmの場合のポジションマップ。



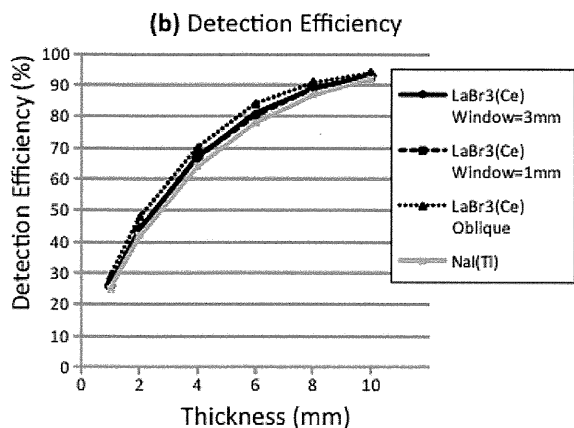


図3 LaBr₃(Ce)を用いたSPECT検出器における厚さと位置分解能の関係(a)および検出効率(b)

D. 考察

シミュレーションは非常によく実験を再現し、新たに開発する検出器の性能を予測するための有用なツールになるといえる。

LaBr₃(Ce)を用いた高解像度SPECT検出器はシンチレータの厚さを1mmにすれば、1mm以下の高解像度が期待できる。しかしこの場合検出効率が30%以下になり検査時間の短縮の観点から実用的ではない。当該検出器はピンホールコリメータを用いて局所領域を高解像度(1mm以下)で撮像することを目的としたものであり、約2倍の拡大率を持つピンホールコリメータを使用する予定である。よって厚さは6mm程度あれば1mm程度の分解能が期待でき、この場合検出効率も80%あり、臨床機に比べて遜色ないと考えられる。

E. 結論

本研究で行ったシミュレーションは実験値をよく再現し検出器の設計等に有用であると言える。また新しく開発するLaBr₃(Ce)を用いた高解像度SPECTは約2倍率のピンホールコリメータを用いることで、1mm程度の高解像度で80%以上の高い検出効率をもつSPECT検出器が期待できる。

F. 研究発表

1.論文発表

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

2.学会発表

該当なし

G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

該当なし

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

研究協力者 大谷 健太郎 国立循環器病研究センター研究所 再生医療部 研究員

研究要旨

レポーター遺伝子の一つであるヒトNa⁺/I⁻共輸送蛋白(hNIS)遺伝子過剰発現マウス(hNIS-Tgマウス)の脂肪由来間葉系幹細胞(ASC)を利用し、レシピエント動物内での移植細胞の時間・空間的分布の評価を行った。本年度は心筋梗塞モデルラットにおいて、移植したhNIS-TgマウスASCをSPECT法で捕捉できるまでには到らなかったが、今後移植細胞数や移植部位の検討、撮像タイミングなどの実験プロトコルの最適化を行い、移植細胞の追跡と組織再生効果の同時評価を可能とする新たな組織再生評価法の開発を目指したい。

A. 研究目的

細胞移植をはじめとした血管新生療法は虚血性疾患に対する有効な治療法の一つである。間葉系幹細胞は骨髄、脂肪組織、卵膜などから分離可能な体性幹細胞であり、これまでにin vitroの実験系で脂肪や軟骨、骨細胞に分化することが報告されている。また、下肢虚血や心筋梗塞、心筋炎モデル動物へ間葉系幹細胞を局所移植あるいは全身投与することにより、血管新生及び組織再生効果があることが多数報告されている。そのメカニズムに関しては、①間葉系幹細胞の血管内皮細胞や心筋細胞への分化、②間葉系幹細胞からのサイトカイン分泌によるパラクライン効果、③間葉系幹細胞による免疫調整作用など様々な報告があるが、未だに不明な点が多い。特に、局所に移植あるいは全身に投与された間葉系幹細胞の移植後の時間・空間的分布や、移植された幹細胞がどれくらいの期間に亘って局所に生着、もしくは局所で生存しているかについてはほとんど分かっていない。本研究の目的は、レポーター遺伝子を利用した分子イメージング法を利用して、レシピエント動物に移植された間葉系幹細胞の時間・空間的分布及びその組織再生効果の同時観察を可能とする新たな組織再生評価法の開発を行うことである。

B. 研究方法

1. レポーター遺伝子過剰発現マウス

レポーター遺伝子として広く用いられているヒトNa⁺/I⁻共輸送蛋白(hNIS)遺伝子を過剰発現させたマウス(hNIS-Tgマウス)は放射線医学総合研究所の犬伏正幸博士から分与いただいた。細

胞膜上にhNISを発現させることにより、細胞内に^{99m}Tc-pertechnetateや¹²⁴Iを取り込むようになり、SPECTやPETで細胞の画像化が可能となる。

2. マウス皮下脂肪由来間葉系幹細胞の培養法の確立

これまでに、ラット皮下脂肪から分離・培養した間葉系幹細胞(ASC)を心筋梗塞などの虚血性疾患モデル動物に移植し、組織再生が認められたという報告は多数なされている。しかし、マウス皮下脂肪からASCを分離したという報告は少ない。そのため、まず始めにマウス皮下脂肪ASCを分離・培養する方法の確立を試みた。雄性C57B/6マウスの皮下脂肪を外科的に摘出し、コラゲナーゼ処理により組織を分解した。細胞懸濁液を培養ディッシュに播種し、ASCが分離・培養可能か否かについて検討を行った。

3. hNIS-Tg成獣マウスにおける^{99m}Tcの体内分布の検討

hNIS-TgマウスASCの移植実験に先立ち、hNIS-Tgマウスに^{99m}Tc-pertechnetateを静脈内投与した際に、どのような体内分布を呈するかについて、野生型マウス(WTマウス)との比較検討を行った。^{99m}Tc-pertechnetateを静脈内投与後、小動物用SPECT/CT装置(NanoSPECT/CT、BioScan社)にて撮像を行った。撮像後、マウスから採血を行い、血液中の放射線量の計測も併せて行った。

4. hNIS-TgマウスASCを用いた移植細胞追跡法の検討

心筋梗塞モデルラットにhNIS-TgマウスASCを

移植し、移植細胞の時間・空間的追跡が可能か否かについて検討した。ヌードラットの左前下行枝を結紮し、心筋梗塞モデルを作成した。梗塞の境界領域にhNIS-TgマウスASCを筋肉内注射により移植した。細胞移植2日後に²⁰¹TlClによる心筋組織灌流評価及び、^{99m}Tc-pertechnetateによる移植細胞の画像化を行った。

(倫理面への配慮)

実験動物に対する倫理的配慮として、動物実験は国立循環器病研究センターの動物実験指針を遵守して試行した。

C. 研究結果

1. マウス皮下脂肪由来ASCの分離・培養

ラット皮下脂肪と同様に、マウス皮下脂肪からASCを分離・培養する方法を確立することができた(図1)。マウスの細胞はラットの細胞に比べて増殖が止まりやすい印象があるため、より効率良く培養する条件を今後引き続き検討していく予定である。

マウス皮下脂肪由来間葉系幹細胞

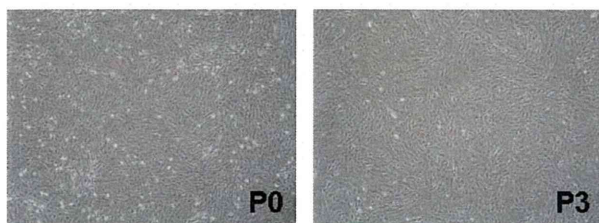


図1. マウス皮下脂肪由来ASC

2. hNIS-Tgマウスにおける^{99m}Tcの体内分布

WTマウスに^{99m}Tc-pertechnetateを静脈内投与すると、甲状腺、胃(底部)及び膀胱への^{99m}Tcの集積が認められた(図2左図)。一方、hNIS-Tgマウスに^{99m}Tc-pertechnetateを投与すると、胃(底部)及び膀胱への集積はWTマウスと同様に認められたが、^{99m}Tcの甲状腺への取り込みの有意な低下及び骨格筋への取り込みの有意な上昇が認められた(図2右図)。

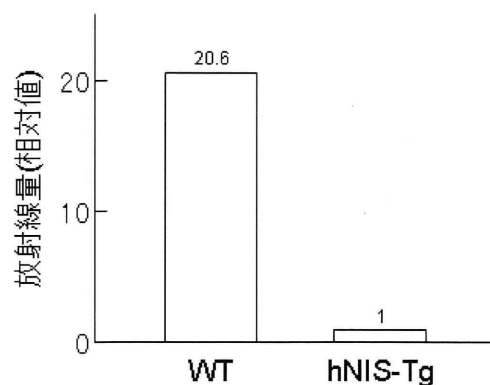


図3. 血中放射線量の比較

WT

hNIS-Tg

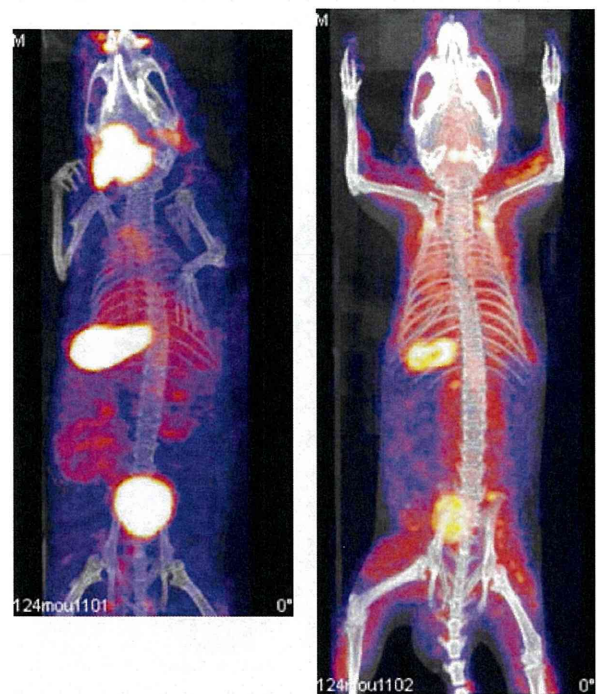


図2. WTとhNIS-Tgにおける^{99m}Tcの体内分布の差異

WT及びhNIS-Tgマウスの血液中の放射線量を測定したところ、hNIS-Tgマウスに比しWTマウスで20.6倍高い放射線量が検出された(図3)。このことから、hNIS-Tgマウスでは血液中から細胞・組織中へ^{99m}Tcが速やかに移行したことが推察された。

3. hNIS-TgマウスASCを用いた移植細胞追跡

心筋梗塞モデルラットにhNIS-TgマウスASCを移植し、その時間・空間的追跡が可能か否かについて検討を行った。心エコー図法及び²⁰¹TlClシンチのいずれにおいても明瞭に梗塞領域を可視化することが可能であった(図4左図、右上図)。しかし、hNIS-TgマウスASCへの^{99m}Tcの取り込みはSPECT画像では確認することはできなかった(図4右下図)。

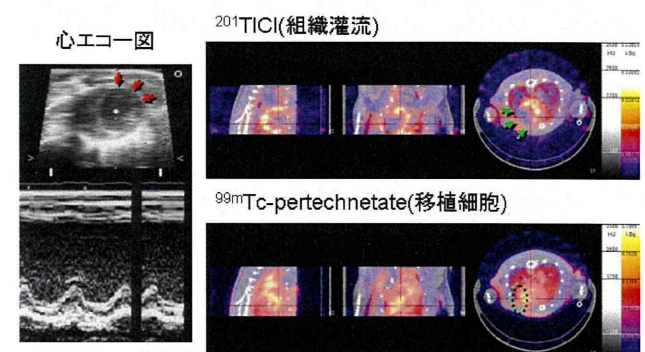


図4. 心筋梗塞モデルラットにおける心筋灌流評価及び移植細胞の検出

SPECT撮像終了後、心臓を摘出し、高感度SPECT装置を用いて摘出した心臓だけで再度撮像を行ったが、移植したhNIS-TgマウスASCを検出することはできなかった(図5)。

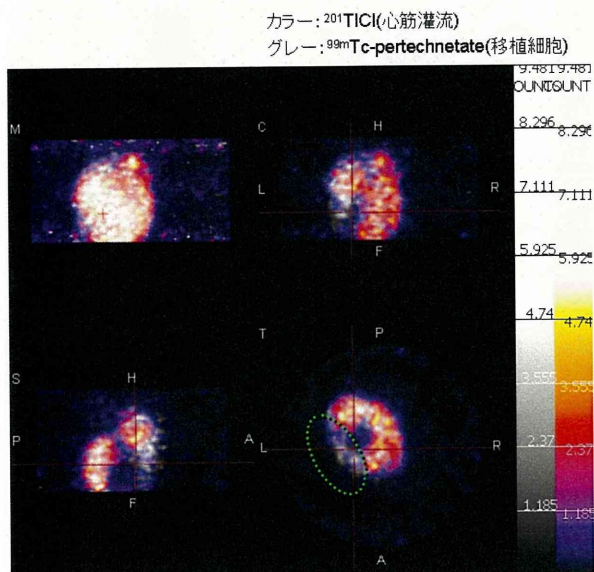


図5. 摘出心でのhNIS-TgマウスASCの検出

最後に、心臓を短軸方向に切断し、オートラジオグラフィーにて移植細胞の検出を試みたが、オートラジオグラフィーでもhNIS-TgマウスASCを検出することはできなかった。

D. 考察

本年度の検討では、心筋梗塞モデルラットに移植したhNIS-TgマウスASCを^{99m}Tc-pertechnetateを用いて検出することは残念ながらできなかった。その理由としては、①移植したhNIS-TgマウスASC細胞数の不足、②梗塞心筋に取り込まれた^{99m}Tc-pertechnetateによる、移植細胞からの信号のマスク、③細胞移植後の撮像タイミング(移植細胞の生着率・生存率の影響)など、いくつかの原因が考えられる。

今回用いたASCの細胞数は、細胞増殖が芳しくなかったこともあり、従来から報告されている細胞数よりも少なかった。

マウスから採取できる皮下脂肪の量はラットに比べて少ないため、そこに含まれるASCの初期量も少ないことが予想される。そのため、かなり大量の脂肪組織を用いてASCを分離・培養するなど、細胞培養法に若干の修正を加える必要があると考えられる。梗塞心筋への^{99m}Tcの取り込みは、移植細胞検出において大きな障害となり得るため、投与するアイソトープの量や、投与してから撮像までのタイミング等、撮像条件を最適化する必要があると考えられる。

局所に移植された幹細胞がどのくらいの期間に亘って生存しているかを生体内において検討した報告はほとんどない。虚血領域に移植された幹細胞にアイソトープが取り込まれるようになるためには、移植細胞が生存していることはもちろんのこと、血流が確保されることが必須であり、今回評価を行った細胞移植2日後では血管再生が起きていなかった可能性も否定できない。そのため、移植細胞評価の時期に関しても最適化を行う必要があると考えられる。

E. 結論

心筋梗塞モデルラットの梗塞境界領域にhNIS-TgマウスASCを移植し、小動物用SPECT装置を用いて移植細胞の時間・空間的分布の評価を行った。今後、移植細胞数の検討や、撮像タイミングなどの条件設定を最適化し、移植細胞の追跡と組織再生効果の同時評価を可能とする新たな組織再生評価法の開発を目指す予定である。

F. 研究発表

- 1.論文発表
該当なし
- 2.学会発表
該当なし

G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

該当なし

[¹²³I]oxLDLの初期動態に関する研究

研究協力者 中野 厚史 国立循環器病研究センター研究所 血管生理学部 研究員

研究要旨

マウスは心拍数、全身循環時間共にヒトの10倍と速く、代謝速度の速い薬剤の動態を解析するには、新たな解析法が必要となる。血栓形成や動脈硬化の原因物質と考えられる酸化LDLを¹²³Iで標識し、マウスでの初期代謝動態を解析する方法を開発した。

A. 研究目的

マウス、ラットなどの小型動物を用いたin vivo molecular imagingは、全身の代謝動態を非侵襲かつ経時的に行うことが可能であるため、各種タンパクの代謝動態や新規薬剤の開発研究において必須の研究手法となっている。とりわけ近年では小動物専用のPET/SPECT装置が開発され、比較的高い空間分解能での評価が可能となってきた。クリアランスの速い、もしくは未知の薬物動態を調べるには、定常状態だけでなく投与直後からの全身臓器分布の変化を評価していく必要がある。マウスの場合、心拍数、全身循環時間共にヒトの約10倍と速く、代謝の速い薬剤の動態解析を行うには、空間分解能よりも高い時間分解能での解析が要求される。

本研究では、現有の装置より得られたイメージ画像を用い、初期動態を可能な限り高い時間分解能でデータを抽出・解析する手法を開発することを目的とする。

B. 研究方法

酸化LDL(以下 oxLDL)は、血管内皮細胞に対し傷害作用を有しており、血栓形成を促進し脳梗塞や心筋梗塞、動脈硬化等の原因物質として注目されている。我々は血管病変の非侵襲評価を目的として、oxLDLをプローブとし、SPECT核種である¹²³Iで標識した[¹²³I]oxLDLを開発し、その全身代謝動態の研究を行ってきた。oxLDLの血中からのクリアランスは非常に速く、5分以内に95%以上が消失することがこれまでの研究で明らかになってきた。そのため、投与直後からの高い時間分解能での経時的な解析が必要となる。また、マウスの全身循環時間は約5秒であり、複数匹のマウスより薬剤の初期動態を抽出するには、投与時刻を1秒以下の精度で一致させる必要がある。

個体差を含むデータより、マウス群としての本質的な情報を取り出すためには、個々のマウ

スの各臓器のタイムアクティビティカーブ(TAC)を単純に平均して評価するのではなく、TACそのものの算出方法を可能な限り同一条件で算出した上に、時間軸情報を揃えた上での評価が必要となる。

1. 動物実験

10週齢Wild Typeマウス (CL57BL/6) 10匹を使用した。[¹²³I]oxLDLの作成は昨年度河嶋らにより報告された手法に従った。[¹²³I]oxLDLのマウスへのインジェクションは、尾静脈より用手的に約1秒間かけて行った。

マウスに投与した[¹²³I]oxLDLの投与直後からの全身動態を記録するために、臨床用SPECT装置(GCA-7200A; TOSHIBA, Tokyo, Japan)を用いてDynamic Planar像を1秒間隔で撮影した。また、Dynamic Planar像を取得後にマウスを解剖し、各臓器の重さ及び放射能の測定を行った。(倫理面への配慮)

動物実験は、国立循環器病研究センター実験動物委員会の承認の基、同センター動物実験実施規程に則り、動物に苦痛を与えないよう配慮し実施した。

2. データ処理法

通常、複数匹のRIイメージの時間情報の一致のために、投与時刻を基準とする方法が一般的である。こうした手法でも、解析に必要な時間分解能が分単位以上の場合にはあまり問題とならない。しかし、マウスにおける初期動態の評価には秒単位の分解能が要求される。我々是用手的にマウスに投与したoxLDLの動態を複数匹のマウスで一致させるために、RV (Right Ventricle)を投与薬剤のBolusが最初に通過する時刻を基準とすることを提案する。そのためには、RVに薬剤が到達した時刻を正確に定義する必要がある。それを実現するために、複数匹のマウス間で一定基準でのRV ROIの定義手法と時系列データの信号処理を開発した。

2-1. RV ROIの定義

ROI定義は通常、位置合わせを行ったMRI

像を用いて定義する。本研究においても実験当初はMRI像を基準としたROI定義を行うため、マウス体側部両側に等間隔にRI用及びMRI用マーカを複数配置したマウス保定ベッドを新たに作成した。2つのモダリティにおけるマーカ像の重心を基準として2つのモダリティの位置を1mm以下の精度で一致させた後に、従来通りの手法でMRI上の心臓の位置より用手的にRVのROI定義を行った。

しかしこのROI定義法は、マウス心臓の位置がMRIでは明確に見えずROIの決定が困難な場合や、心臓の位置がRIイメージと一致しない場合が発生し正確なROI定義が困難であった。さらに、実験に用いたマウスは同一週齢のCL57BL/6マウスで、臓器サイズには大きな個体差はないと考えられるにも関わらず、この手法で定義したROI面積が他と異なる場合などの、MRI像ベースでDynamic Planar像上にROI定義を高精度に行う上での問題点が浮かび上がってきた。つまり、マウスのRVのように小さく、正確な形状がMRIに写りにくい場合には、MRI上の用手的なROI定義では一定基準での評価は困難である。

我々は、RIイメージを基に一定基準での

RV ROIを決定するために、投与直後にRVを通過する1秒間隔の2枚の画像を基に平均画像を作成し、RV領域を決定するRIイメージ上の等高線となる閾値を決定した。閾値の決定は、投与量補正を行った複数のマウスのイメージにおいて、領域のRI強度の変極点を通る等高線領域で、且つ複数匹のRVの面積が同一になるように決定した。RVの面積が同一となるようにしたのは、対象となる動物が同一週齢のWTマウスで個体間の臓器サイズに殆ど差がないと推定されるからである。従って、本手法ではMRIで心臓位置が明確でないケースにおいてもRV ROIの決定が可能である。また、MRI像はRIイメージより決定されたRV領域が、面積や位置などに大きな矛盾がないかの確認にのみ使用した。

2-2. 信号処理

このようにして定義を行ったRV ROIにおいて、1秒間隔のタイムアクティビティカーブ(TAC)を算出した。 $[^{123}\text{I}]\text{oxLDL}$ の血中からのクリアランスと共にRV TACのS/Nが劣化するために移動平均を行った。移動平均の窓サイズは、0-10秒は移動平均なし、11-19秒は3点での、20-50秒は5点での、51-99秒は7点での

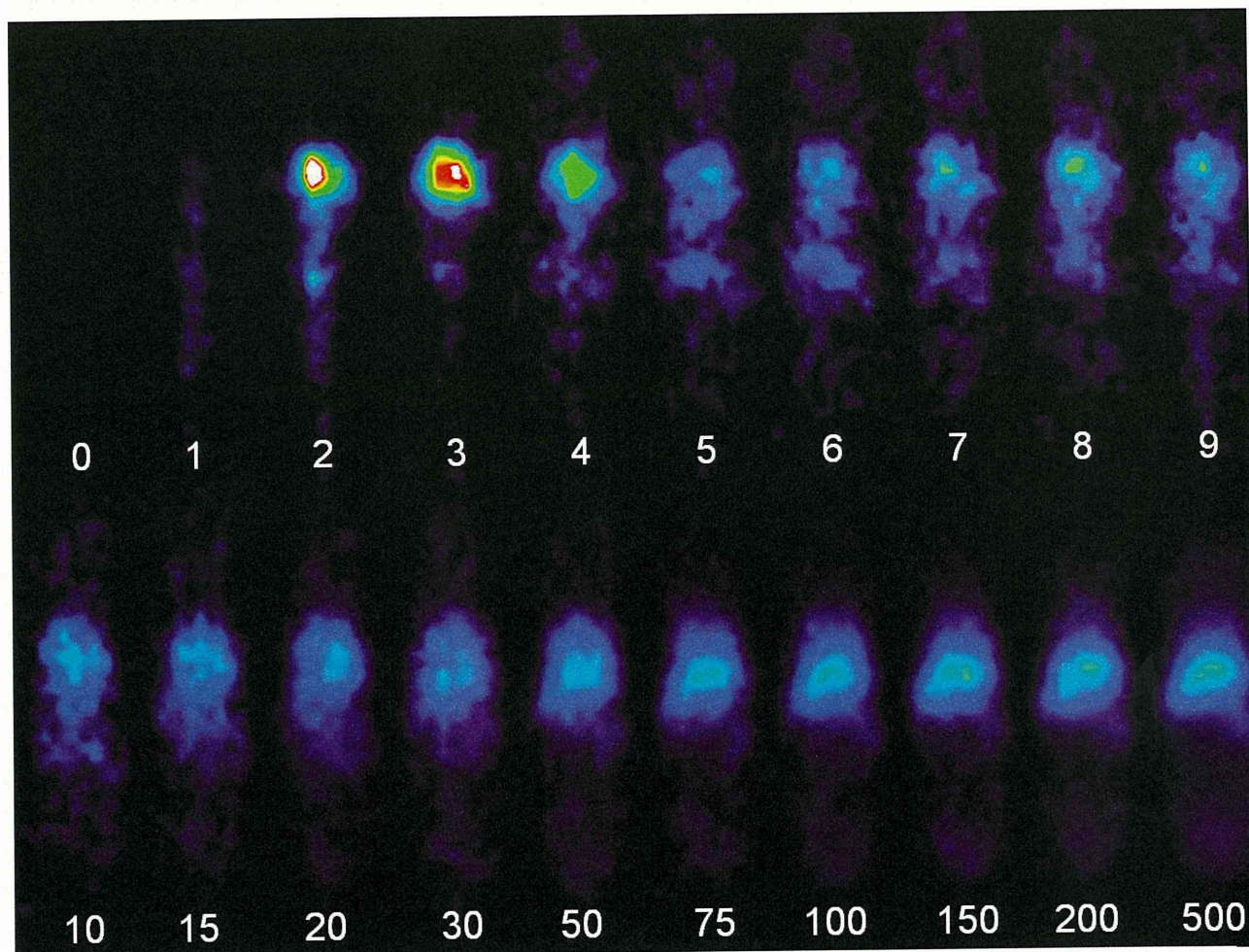


図1 マウスに $[^{123}\text{I}]\text{oxLDL}$ を尾静注したときのDynamic Planarイメージ

の、100秒以降は9点と可変長で行った。

$$TAC_{mov}(i, j, t) = \frac{1}{2n+1} \sum_{i=-n}^n TAC_{mov}(i, j, t+i\Delta t)$$

where TAC_{mov} : moving average of TAC, i : mouse number, j : organ

RVを最初に通過する時点でのデータには移動平均を行っていない。このとき実際の通過時のピークは1秒間隔の2点間の間に存在することが想定される。そのためデータを0.1秒単位とするために、B-Spline補間を行った。こうして決定した $[^{123}\text{I}]\text{oxLDL}$ のRV通過時のピーク位相を基に、複数のマウスにおける動態の時間軸を一致させた。

2-3. 他の臓器のROI定義に関して

定常状態において $[^{123}\text{I}]\text{oxLDL}$ が集積する肝臓は120秒以降の平均画像よりRVと同様に複数のマウスでの面積が一定となるように閾値を決定した。特定の臓器のない腹部については他の臓器ROIと重複がなく、ROI面積が一定となるように定義した。

各臓器のTACは、RVと同様の移動平均及びB-Spline補間を行った後に、RV TACを基に決定した位相情報を用いて時間軸を移動させた。こうして求めた位相の一致した各臓器のTACを用いてアンサンブル平均を行い初期動態の評価を行った。

C. 研究結果

1. DynamicPlanar イメージ

図1にDynamicPlanarイメージを示す。投与後2-3秒でRVから肺循環をし、4秒以降肺循環から全身循環に移っている様子が観察される。全身循環時に腹部や腎臓への循環もみられるが、集積などは見られない。7-8秒において全身循環した $[^{123}\text{I}]\text{oxLDL}$ が再度心臓に戻ってきている様子が観察される。その後、 $[^{123}\text{I}]\text{oxLDL}$ は主に肝臓に集積し、100秒の時点でほぼ肝臓への集積が完了し定常状態となる。肝臓からのスピルオーバーが大きいために判然としないが75秒以降の像においては脾臓への集積もみられる。ただし、Planar像においては脾臓の半分以上の領域は肝臓と重なる領域となるためここではROI解析の対象とはしなかった。

2. 臓器重量

今回の10匹のCL57BL/6マウスの体重及び臓器重量を表1に示す。

	MEAN	SD	CV(%)
体重 (g)	23.31	0.98	4.19
心臓 (g)	0.15	0.01	5.09
肝臓 (g)	1.28	0.05	3.80

表1 マウスの体重及び臓器重量

各臓器共体重程度のばらつきであり、今回の想定である、投影面積がほぼ一定となることを示唆する結果である。

3. ROI

図2に図1で用いたマウスにおけるRV ROIの定義を示す。本実験に使用した、10匹のうち3匹がMRI像での心臓の画像が明確には認識できなかったが、RIイメージ上からの閾値指定によりRV ROIを決定することができた。但し、投与放射線量が平均の1/3とうまく $[^{123}\text{I}]\text{oxLDL}$ の合成ができなかった個体では、投与量補正してもデータが離散的であるために上手く領域を決定できず、ROI修正が必要であった。

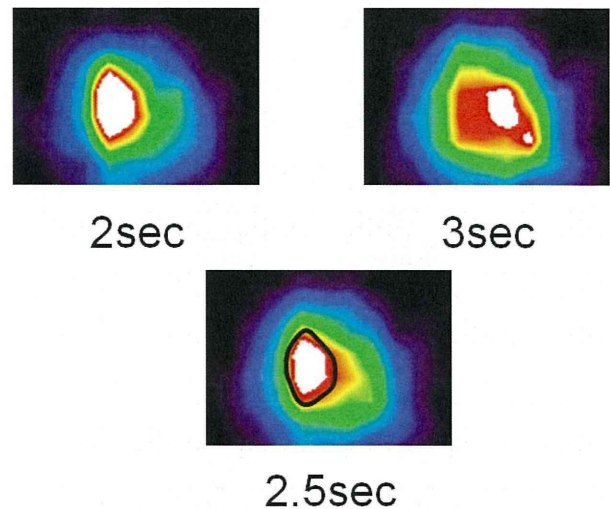


図2 RV通過時の2枚の1秒間隔の像より平均画像を作成し、閾値は、ROI面積が複数のマウスで一定となるように定義。

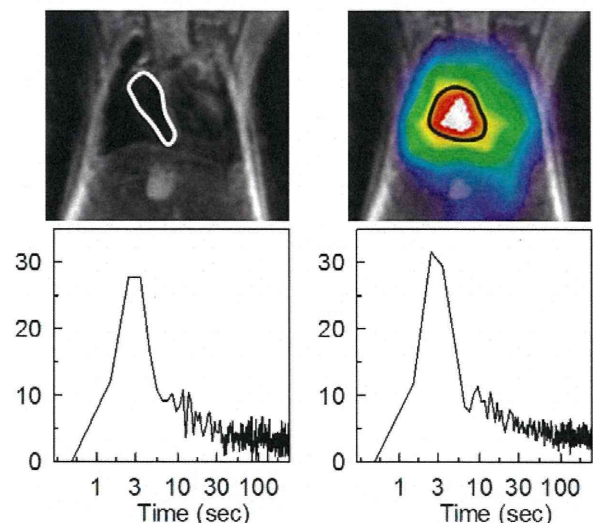


図3 MRI像によるRV ROI決定と、平均画像からのRV ROI およびTACの比較 (尚、図1, 2とは別のマウスでの例)

図3に、MRIによるRV ROI定義と、本手法により定義したRV ROIを示す。また、各ROIの下にはそれぞれのROIで作成したTACを示す。

4. TAC

図3下に示すTACは信号処理前の1秒間隔のデータである。RVを通過する時点の2点を見ると、RVを薬剤を通過することに対応するピークは、この例の場合2秒と3秒の間に存在することが推定される。また、2つのROIから求めたTACを観察すると、推定されるピークの位相や強度が変化するだけでなく、7-8秒における1回目の全身循環後のピークがより明確であること、30秒以降のノイズ成分が少ない。これらのTACの特徴より、本手法によるROI領域がRV（正確にはRVを含むPlanar断面）を適切に捉えていることが判る。

5. 信号処理

実験方法で述べたような信号処理を6匹のマウスのRV TACに実施した例を図4に示す。

図4 a)は、投与量補正したDynamic Planarイメージより、6匹のマウスで同一基準、同一面積のRV ROIより算出したものである。投与量の低いマウス#6のケースは30秒以降のノイズ成分が相対的に大きくなってしまっている。

図4 b)は、a)に示したRV TACを実験方法で述べた、可変窓サイズの移動平均を行った結果。30秒以降のノイズ成分は大きく抑制されている。ただし、12秒前後の3つ目のピークは全身循環の2回目に対応するピークとも考えられるが、今回の移動平均では消失してしまっている。

図4 c)は、b)をB-spline法を用いて、0.1秒間隔に補間した結果。それぞれのマウスにおいて薬剤がRVを通過する位相を算出した。

図4 d)は、c)で求めた位相のズレを一致させたもの、尚、ピーク位相は投与後2秒とした。他の臓器のTACも、同様の信号処理後RVで求めたマウス毎の位相のズレを用いて時間軸の補正を行い時間軸の一致した各臓器のTACを算出した。このようにして、各臓器において同一面積のROIで時間情報の一致したTACを算出し、10匹のマウスでの臓器毎にアンサンブル平均を算出した（図5）。

図5に示す2秒の位置にある点線が、位相を合わせた点である。図の赤線はRV TACを示す。下向きの矢印で示す約8秒の位置のRV TACにピークが観察される。この2つのピークの間隔はマウスの全身循環時間と対応しており、投与した薬剤が全身循環により大半が消失、拡散したことを示す。RVの時間変化において、30秒程度までは主に血中からの $[^{125}\text{I}]\text{oxLDL}$ のクリ

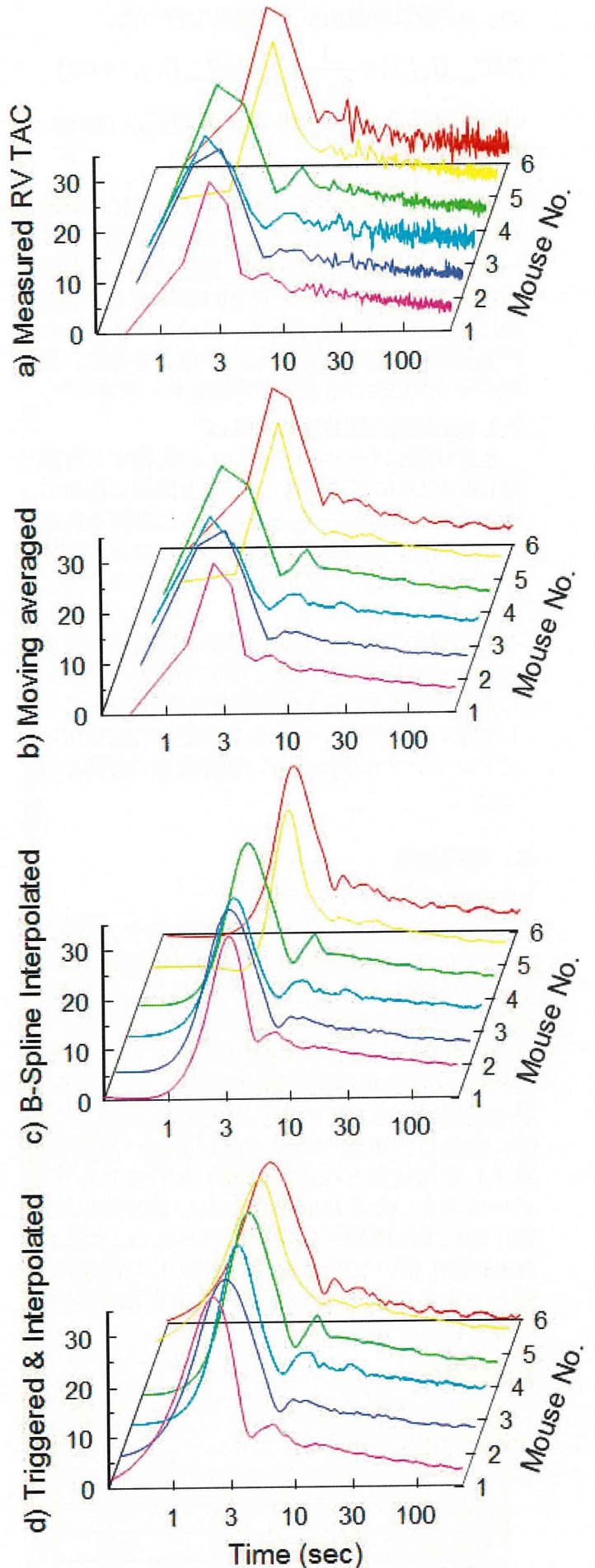


図4 RV TACの信号処理過程