

小動物用 MRI の創薬への応用

いとうこういち 徳島文理大学香川薬学部 (〒769-2193 香川県さぬき市志度 1314-1)
伊藤康一 E-mail: itoh@kph.bunri-u.ac.jp
ふじいひろただ 札幌医科大学保健医療学部 (〒060-8556 札幌市中央区南1条西17)
藤井博匡 E-mail: hfujii@sapmed.ac.jp

実験のコツと注意点

測定対象となる動物種や測定部位に適した MRI 装置および測定コイル (RF コイル) を選ぶ。MR 画像測定時には、磁場の均一度や共鳴周波数、使用コイルのカップリング状態を調整最適化し、信号対雑音比 (Signal to Noise Ratio: SNR) の良い画像がとれるよう準備する。

麻酔下での測定においては体温低下 (体温をモニター、コントロールする必要がある) に注意し、またそれぞれ実験目的によりの確かな麻酔薬の選定を行うとよい。

置場所の確保、ランニングコストの捻出など基礎医学・薬学分野一般の研究者にとっては容易には手の出せないものである。そこで、もっと広く MRI の技術を基礎医学・薬学分野の研究者に利用してもらいたいとともに、将来の新しい MRI の応用・開発のために、永久磁石を有した小動物用 MRI 装置について紹介したい。

||| MRI 装置

ここで紹介する MRI 装置は MR テクノロジー社 (つくば市) が開発した日立金属 NEOMAX カンパニー 03 ~ 2T 永久磁石を有するものである。我々の研究室に

||| はじめに

1970 年代、NMR (Nuclear Magnetic Resonance: 核磁気共鳴) 画像撮像法の試みから始まり、1980 年代に MRI (Magnetic Resonance Imaging: 磁気共鳴画像) 装置の臨床診断用が世に登場し始めた。現在では病院などで画像診断の有力な機器として日常的に広く利用されている。主に 1 ~ 1.5T (Tesla: テスラ) の超伝導磁石を有する MRI 装置が主流である。一方、最近基礎医学・薬学の分野でも超伝導磁石を有する高磁場 (4.7 ~ 11.7T) MRI 装置で猿から小動物 (齧歯類) を用いて多くの研究がなされるようになってきた。しかし、このような装置は大変高価であるのと同時に、その設

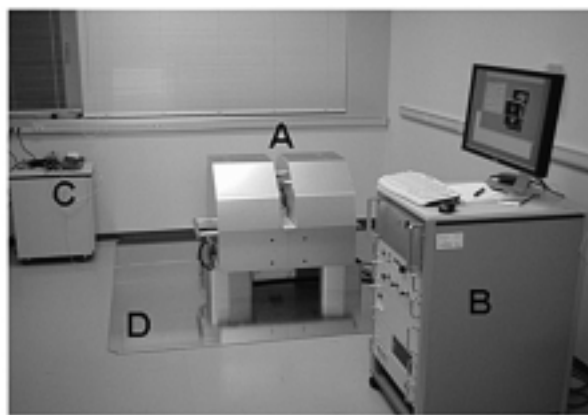


図1 MRmini 1.5T の全容

A: MRI 本体, B: コンソールユニット, C: 吸入麻酔装置, D: 荷重分散板

設置されている装置は DS ファーマバイオメディカル (株) から MRmini として発売されている, 主にマウス, ラット用に設計された 1.5T の MRI である (図 1). この装置の原理等はここでは省略するが, 詳細は「コンパクト MRI」(巨瀬勝美 編著, 共立出版) を参考にさせていただきたい. しかし, 原理などには全くの門外漢の素人でも容易に MR 画像を得ることができる.

RF (Radio Frequency: ラジオ波) コイル

MR 信号は RF パルスに共鳴した組織の中で発生する. 小動物の MR 信号は目的部位に応じて比較的小さい送信コイルによって生じ受信コイルによって検出される. 現在 3 種類のサイズ (内径 38.5 mm, 30 mm, 20 mm) のソレノイドコイルを使用した RF コイルを使用している. ラット頭部用 (内径 38.5 mm と 30 mm, 38.5 mm はマウス腹部用としても可能) とマウス頭部用 (内径 30 mm と 20 mm, マウスの大きさによって使い分け, 30 mm はラット頭部用と同じ) として使用している. MRmini の RF コイルには, 動物を保持するためのインナーベッドとコイルに直結されたアウターベッドにより構成されている (図 2B). このインナーベッドには, 上切歯 (上顎) 固定用と吸入麻酔用を一体化したホルダーにより動物頭部の固定を確実なも

のとしている (図 2C).

小動物用永久磁石低磁場 MRI の利点と問題点

永久磁石低磁場 MRI は超伝導磁石 MRI 装置に比べて特別な静磁場空間を必要としないため設置場所の制限がほとんどない. 唯一, 装置自体は小型であるが永久磁石の重量 (磁場強度とギャップ幅により違うが, 1T のギャップ幅 60 mm で約 750 kg や 1.5T のギャップ幅 80 mm で約 1600 kg) があるため, ある程度の耐荷重を有した床が必要である. しかし, それも加重分散板上に設置することにより多くの場合解決される. 我々の MRmini (1.5T のギャップ幅 80 mm で約 1600 kg) は普通の実験室 (5 階) に設置されている (図 1). 超伝導磁石 MRI は超低温冷却剤として液体ヘリウムを常時一定量保たなければならない. さらに電源を切ることができないことなどランニングコストが非常にかかるが, 永久磁石低磁場 MRI はそのような必要がほとんどないので経済的である. その他, 可動性があるなど利点ばかりのように見える. しかし, 第 1 点の問題点は解像度である. 現在, 小動物用永久磁石低磁場 MRI は 2T 程度までしか高磁場化ができていないので, 超伝導磁石 MRI の 4.7T ~ 11.7T の装置に比べてどうしても解像度では太刀打ちできない. 第 2 点は現時点で磁場の均一度が超伝導磁石 MRI より劣るため, BOLD (Blood Oxygen Level Dependent) MRI 法などを利用しファンクショナル MRI (functional MRI: fMRI) を行うことはできない. そこで高磁場 MRI とは目的により住み分けることが必要となる. ここから我々の出番で, まだ未開拓分野の分子イメージング MRI (molecular MRI) や薬理・薬物動態イメージング MRI (pharmacological and pharmacodynamic MRI: phMRI) 法を開拓していくことである. その前に, 現在どのようなパルス系列で撮像できるかを実際の画像とともに紹介する.

パルス系列: (現在我々のシステムで可能なもの)

1) 3D スピンエコー (Spin Echo: SE)

3D で撮像することにより比較的高い SNR で多数の断面数を撮像することができる. しかし, FOV (Field of View: 撮影視野) 内での断面数設定になるため不必

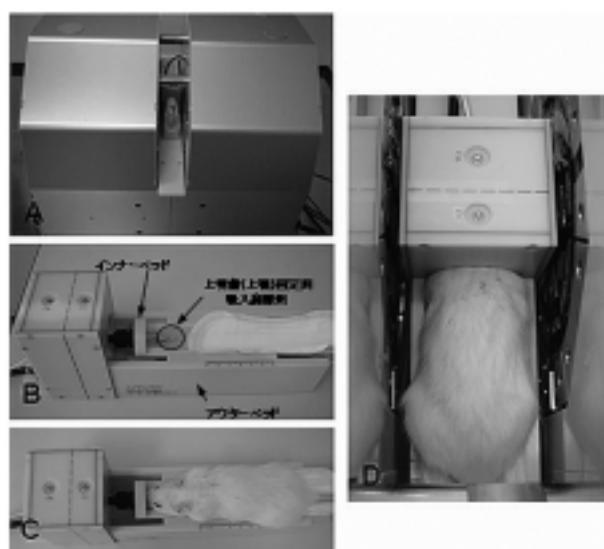


図 2 MRmini 1.5T 用 RF コイルと麻酔ラットの保持

A: MRI 本体, B: RF コイルと動物保持ホルダー, C: 麻酔ラットの保持, D: 撮像時の RF コイルと麻酔ラット

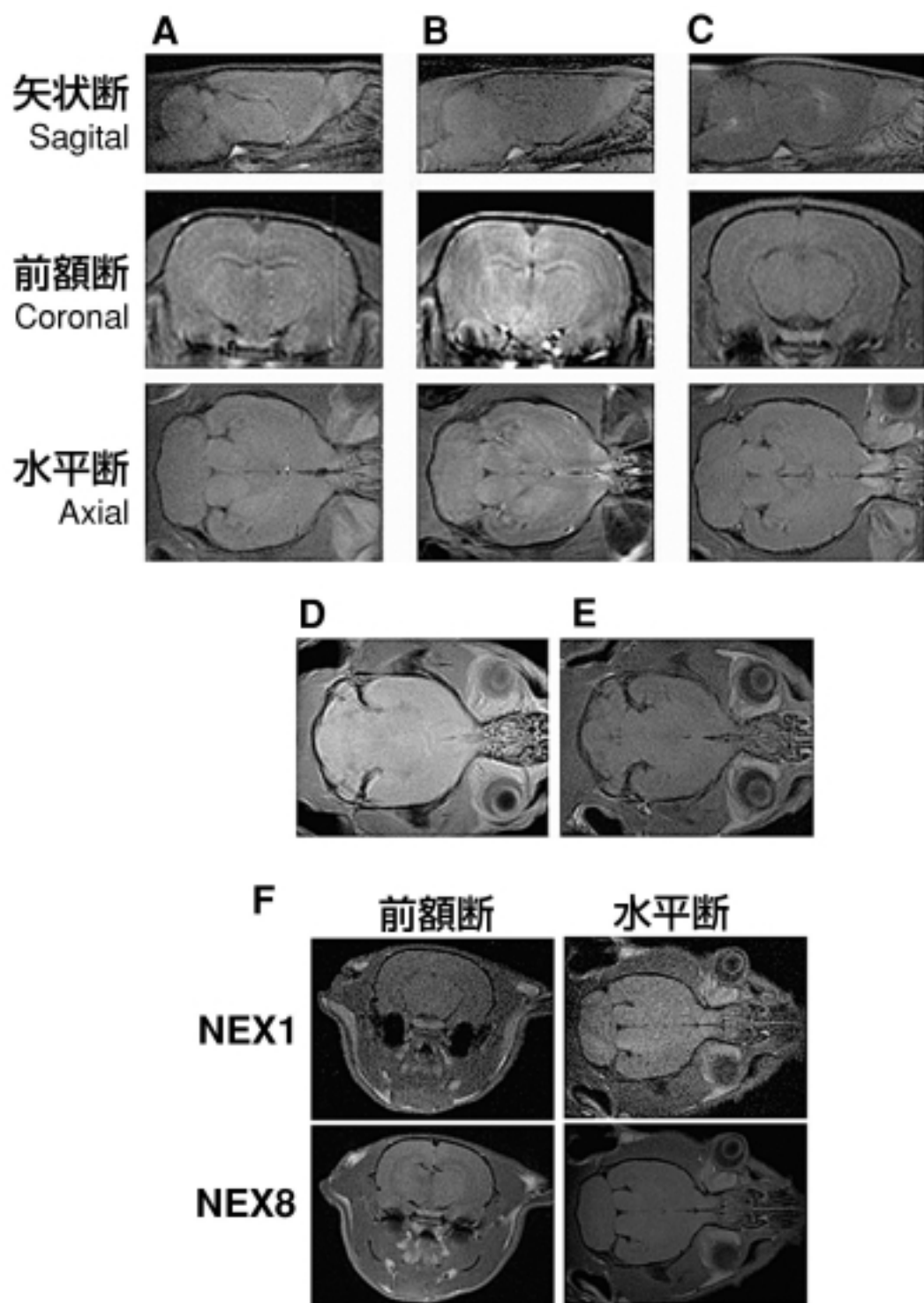


図3 各種パルス配列によるラット脳MR画像

A: 3D-SE, B: 3D-FLASH, C: 2D-MS, D: プロトン強調画像(水平断), E: T1強調画像(水平断), F: NEX1とNEX8(2D-MS)での前額断と水平断画像解像度差

要な画像が多くはいることがある (図 3A, TR: 100 msec, TE: 12 msec, NEX8)。

2) 3D グラジエントエコー法

フラッシュ (Fast Low Angle Shot: FLASH) 法とも呼ばれ、高速に T1 強調画像を撮像できるパルス配列である。この高速撮像により呼吸などの規則的な動きや、不規則な動きなどによるアーチファクトを抑制することができる利点がある。図 3B はラット脳の前額断、水平断、矢状断を TR: 50 msec, TE: 5 msec, NEX4, スライス 16 枚で連続撮像した画像である。

3) 2D-SE マルチスライス (2D-MS: Multi Slice)

スピンエコー法で撮像断面数をスライス幅で設定できる。現在は 2.5 mm と 1 mm のスライス幅で脳の連続撮像を行っている (図 3C, TR: 500 msec, TE: 9 msec, NEX8, 2.5 mm 幅)。

4) 拡散強調画像 (Diffusion Weighted Imaging: DWI)

組織内の水分子の微細な動き (拡散) をその動きの早さと方向をパラメーターとして画像化する方法で最近では、ミエリンや神経経路の抽出などに応用 (拡散テンソル画像: DTI) されている。(例: TR: 500 msec, TE: 69 msec)

5) 短反復時間反復回転法

(Short TI Inversion Recovery: STIR)

TI (反転時間) を短く設定することで脂肪の信号強度を抑制する撮像法でコントラストを調節することができる。(例: TR: 2000 msec, TE: 12 msec)

NEX (Number of Excitations) とは、信号積算回数を示し NAQ (Number of Acquisition) または NAV (Number of Average) と言う場合もある。単純に NEX を 2 倍にすると SNR は 2 倍になり、スキャン時間は約 2 倍になる。例えば、撮像時間は 2D-MS, 2.5 mm スライス幅 10 枚を TR: 500 msec, TE: 9 msec の条件で NEX1 では約 1 分、NEX8 だと約 8 分である (図 3F)。これは、実験者がどのような目的の実験 (どれくらいの間隔で経時変化を観察するかなど) で、どの程度の画像解像度を要求するかにより随時決定する必要がある。

分子イメージング MRI と薬理・薬物動態イメージング MRI の可能性

高分解能・高磁場の MRI 装置による、解剖学的検討、MRS (MR スペクトロスコピー) さらに BOLD などの fMRI の解析などは、この永久磁石低磁場 MRI 装置に現段階では望んではいけない。そこで、この MRI 装置に適したアプリケーションを開発することにより、手軽に多くの人々が利用できる優れたものになる。

分子イメージング MRI

最近、放射性物質 (核イメージング) や蛍光物質 (光学的イメージング) を使用した特異分子のイメージング手法が *in vivo*, *in vitro* の実験系で急速な発達を遂げている。分子イメージングの発展は、ヒトの各種疾患やその動物モデルから多くの情報を得ることができると大変重要な手法である。その中で、特に最近注目を集めているのが MRI を用いた分子イメージング法の開発である^{2,3)}。MRI の最大の利点は、非侵襲的に比較的短時間に体内の情報をマクロ的視点から正確に得ることであるが、分子イメージングは時・空間分解能や MRI 装置そのものの性格上あまり得意な領域ではなかった。しかし、MRI のマクロ的視点とミクロ的視点の関連付けによる分子イメージングはとても魅力的であり、その手法の開発に注目が集まりつつある。特に、脳機能を fMRI とその活動部位での MRS で生化学的パラメーターを関連づける試みなども行われている。さらに、MRI 用造影剤は分子イメージングするための重要な一手段である。この MRI 用標識化合物・造影剤を用い、細胞移動、遺伝子・タンパク質発現、特別な生物学的現象をモニターできることが期待される。ここでは小動物脳内の分子イメージング法の 1 つであるマンガン造影 MRI 法を紹介する。また薬理的イメージング MRI の例も併せて紹介する。

マンガン造影 MRI (Manganese-Enhanced MRI: MEMRI)

マンガン (Mn) は体にとって必須微量元素の一つである。Mn はその約 80 % が脳で必要とされている。例えばてんかん発症と Mn 欠乏との関係や、微量な Mn の長期吸入によりパーキンソン病様症状を呈するなどの報告があり、神経毒性作用も広く認められてい

る。Mn イオンはカルシウム (Ca) イオンとその大きさが近いなどのことにより、Ca チャネルを介し細胞内に流入すると考えられている。さらに、金属イオントランスポーターを介する細胞内流入系も報告されている。この Mn の脳内や細胞内に流入しやすい性質と、常磁性体として Mn イオンが水分子のプロトン緩和時間 (T1) を減少させる特性を利用して、T1 強調 MR 画像が得られ、Mn を造影剤として小動物の脳を造影する方法が考案された⁴⁾。この造影方法をマンガン造影 MRI (MEMRI) 法という。また、神経科学者にとっての興味は、Mn イオンが電位依存型 Ca チャネルを介して神経細胞内に流入することから、神経活動依存的な変化を MRI で観察することができる fMRI の一つの手法となる可能性である⁵⁾。図 4 にラットの脳前額断と水平断の典型的な MEMRI 画像を示した。塩化マンガン (MnCl₂) を腹内投与後、麻酔下で 2D-MS で撮像した。MnCl₂ 投与 5 分後においてすでに側脳室周辺に Mn で増強された水の信号が観察される。さらにこの信号は時間経過とともに強くなり脳実質内にも広がり示すとともに、Mn 投与前の画像と比較して

脳全体のコントラストがはっきりと造影されている。特に Mn 投与後短時間においては第 3, 4 脳室周辺部、嗅球の造影が顕著である (図 4)。しかし、24 時間後ではこれらの信号は完全に消失する。しかし、嗅球、小脳、下垂体においてはそれぞれの層構造がより明確に観察され、また嗅神経線維をトレースすることができる (図 5)。このことは、末梢投与された MnCl₂ が血液脳関門、血液脳脊髄液関門を通過し主に側脳室から脳実質に移行していることを示す。また、Mn には各脳部位間でその移行程度に差があることが認められる。24 時間以降では神経細胞内に取り込まれた Mn が軸索内移動し神経線維を造影し、または細胞内に留まり組織構造を造影する。この場合も、Mn の取り込みに対する組織 (細胞) 特異性が認められる。このように、造影剤を使用することにより MRmini においても高磁場 MRI に近いマクロ的視点からの観察が可能であると同時に、生体の必須微量元素 Mn の動態を分子イメージングとしてミクロ的視点の観察を可能にした。このことは、この分子イメージング MRI 法を用いることにより Mn 神経毒性により発症するパーキン

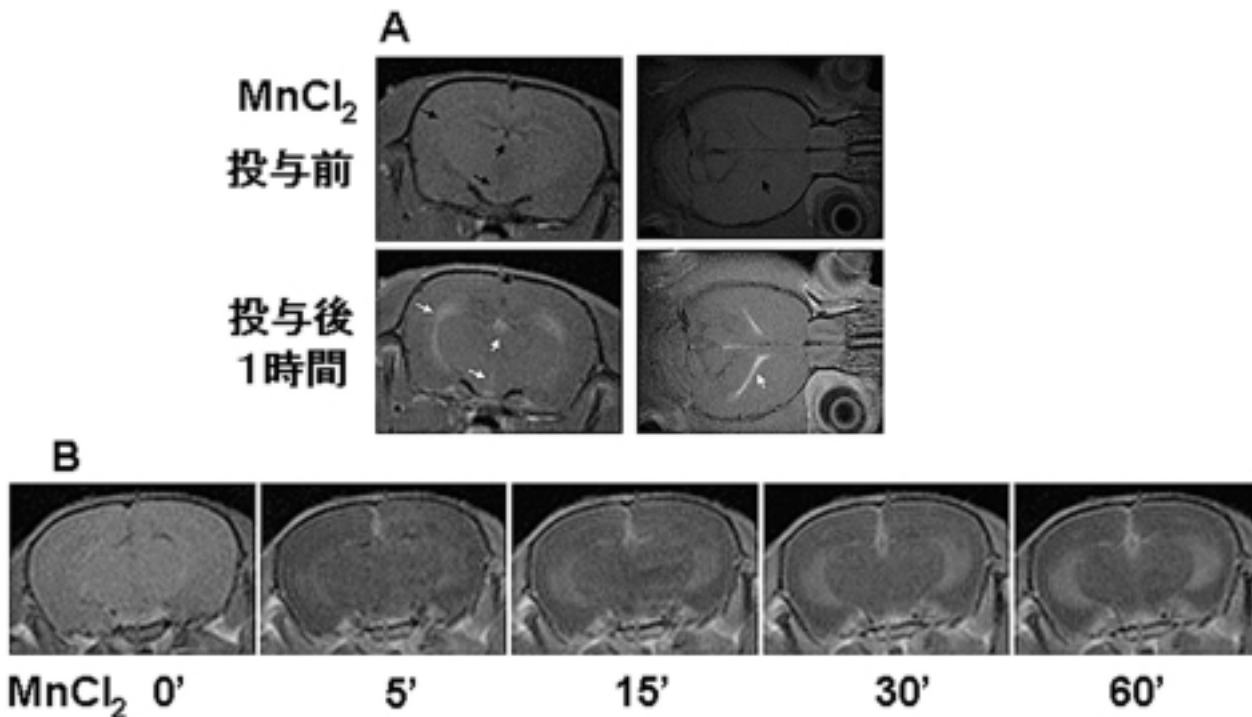


図 4 塩化マンガン投与前と 1 時間後のラット脳の典型的な MEMRI T1 強調画像 (2D-MS)

A: 前額断 (左図) と水平断 (右図), NEX8 (白矢印が ME 陽性信号, 白・黒矢印は脳室およびその周辺), B: 塩化マンガン投与後の経時変化 (前額断) NEX4

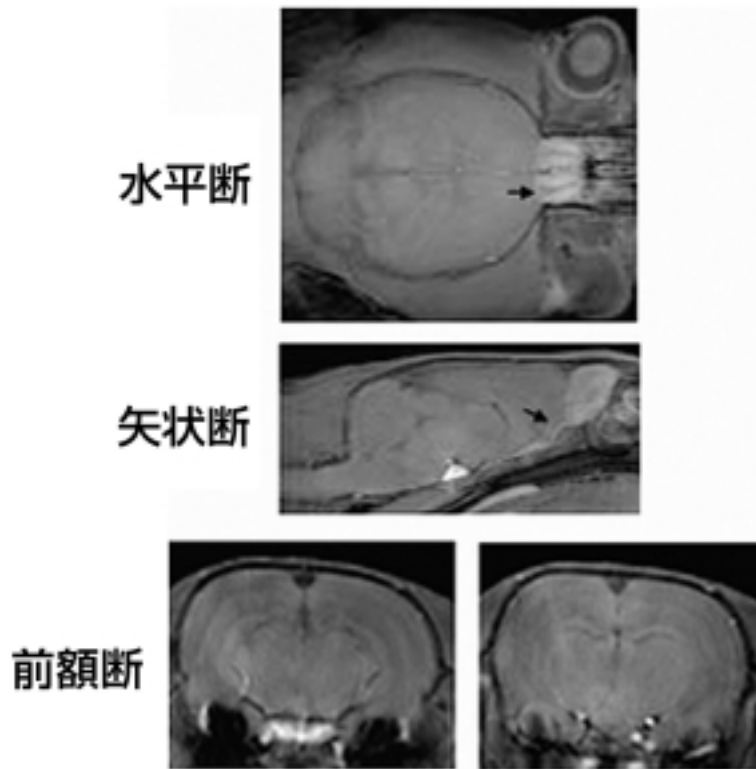


図5 塩化マンガン投与 24 時間後のラット脳の典型的な 3D-FLASH MEMRI 画像
(黒矢印：水平断画像では嗅球, 矢状断画像では嗅覚からの神経線維の ME 陽性信号) NEX8

ソン様症状の解明の一助となる。

薬理的イメージング MRI

最近，脳の薬理学的研究に BOLD コントラストを用いた fMRI が広く使われるようになってきた。しかし，BOLD 信号は脳局所または全身循環血流などにより影響を受けることから，薬物の脳への作用が BOLD 信号変化にどの程度直接反映しているか，まだ多くの検証が必要とされている。しかし，脳活動の興奮と抑制に対する薬理的イメージング MRI が今後重要な役割を担うことは間違いない。そのため，その基礎的検討を早急に始めなければならない。

そこで薬理的イメージング MRI として MEMRI の麻酔薬の影響についての検討例を紹介する。現在，MEMRI の撮像は麻酔下で行っているため，Mn 脳内動態の各種麻酔薬の影響を検討した。麻酔薬は動物実験に汎用されているウレタン， α -クロラロゼ，ペントバルビタール，ケタミン，イソフルランを用いた。そ

れぞれの麻酔薬が投与されたラットに $MnCl_2$ を腹腔内投与しその後の Mn 脳内移行を検討した。この結果，ケタミン麻酔下における Mn 脳内移行が他の 4 種類の麻酔薬に比べ約 90 % 抑制されている (図 6)。ケタミンは NMDA 受容体の非競合的拮抗薬である。そこで，同種の拮抗薬である MK801 の効果を検討したところ，ケタミンと同様な効果が認められる。さらに NMDA，グルタミン酸，AP-5 (NMDA 受容体競合的拮抗薬)，NBQX (AMPA 受容体拮抗薬) を投与し薬理的検討を行った結果，Mn 脳内移行初期に NMDA 受容体を介した細胞内情報系が関与していることが示唆される (投稿中)。

また，我々は全般てんかんと側頭葉てんかんモデルを用いてラジカル，酸素イオンをターゲットとして分子イメージング MRI と薬理的イメージング MRI を組み合わせることにより，全般と部分てんかん発症機構の相違点を *in vivo* で解明することを試みている⁶⁾。実験小動物，病態モデル動物を用い，分子・薬理的

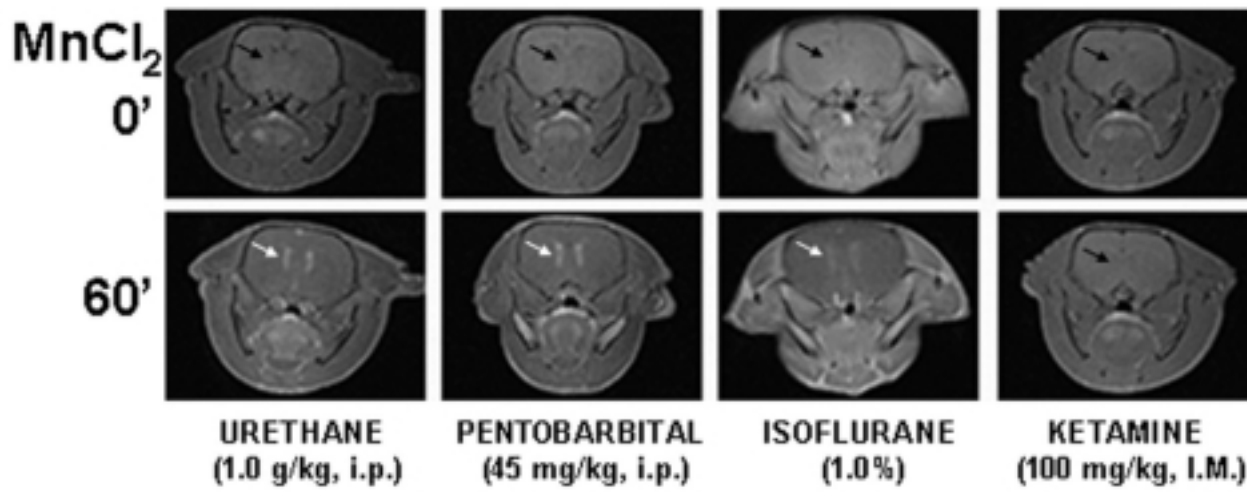


図6 各種麻酔下でのラット脳のMEMRI画像(2D-MS)

各種麻酔下で塩化マンガンを腹腔内投与前および60分後の前額断画像(白矢印がME陽性信号,白・黒矢印は脳室およびその周辺)NEX8

イメージングMRIによる特異性,時・空間的解像度を含めた高速撮像法の確立により,ヒトの疾患の診断や病因の解明に非常に有効な手段の一つになると期待される。今回はMEMRI法を用いたが,今後は研究者が求める分子をより選択的に造影することが可能となる新規MRI用造影剤の開発をする必要がある。

薬物動態イメージングMRI

もう一つ重要と考えている薬物動態イメージングMRIの可能を示したい。その一例として新薬開発における体内分布試験を想定している。現在,新規化合物の体内分布試験は化合物に放射性標識(^{14}C など)して動物に投与後,全身切片を作成しオートラジオグラフィによりその体内分布を観察する。この試験には大量の動物,放射性標識化合物,それと多くの手間が必要となる。そこで,分子イメージングMRI法を活用することによりこれらの問題を解決することができると考えている。つまり,放射性標識化合物の代わりにMRI用標識化合物を作成しそれを投与,その後生きてまま経時的(長期的)にその化合物自身または化合物で増強された水の信号を画像化し追跡することにより,体内分布とその移行を検討する。この手法が確立すると動物数を激減させることができるとともに,安定した結果を少ない人員で手軽に入手することが可

能となる。また,超電導磁石に比べ,永久磁石では磁氣的干渉が少ないので,MRminiのような小型装置を数台または数十台並列に設置し,同時に観察をすることが可能なのでこの点からもその有用性が期待される。

何れともあれ,小動物用永久磁石低磁場MRIの有用性を認識し,神経・精神疾患のターゲット組織(脳各部位など),分子を目標としたMRI用標識物質の開発を早急に行わなくてはならない。

参考文献

- 1)「コンパクトMRI」(巨瀬勝美 編著,共立出版)2004.
- 2) Fujii H, et al : Development of an ESR/MR dual-imaging system as a tool to detect bioradicals. Magn Reson Med Sci 5 : 17-23, 2006.
- 3) Fujii H, et al : Measurement of brain tissue oxygenation under oxidative stress by ESR/MRI dual system. Magn Reson Med Sci. in press 2007.
- 4) Lin YJ, Koretsky AP : Manganese ion enhances T1-weighted MRI during brain activation: an approach to direct imaging of brain function. Magn Reson Med 38 : 378-388, 1997.
- 5) Aoki I, et al : Dynamic activity-induced manganese-dependent contrast magnetic resonance imaging (DAIM MRI). Magn Reson Med 48 : 927-933, 2002.
- 6) Itoh K, et al : Magnetic Resonance and Biochemical Studies during Pentylentetrazole-kindling Development. - the relationship between NO, nNOS and seizures-. Neurosci 129 : 757-766, 2004.