

電子スピン共鳴画像法によるマウス大腿部に投与した ニトロキシドラジカルの分布描画

石田 信一¹, 松本 清治¹, 横山 秀克¹
森 則夫¹, 熊代 永¹, 土橋 宣昭²
尾形 健明³, 北嶋 龍雄³, 小野 光弘³
鎌田 仁³, 吉田 栄久夫⁴

¹ 福島県立医科大学神経精神科

² 福島県立医科大学 RI 研究室

³ 山形大学工学部

⁴ 日本電子㈱

1. はじめに

磁気共鳴は、核磁気共鳴 (NMR) と電子スピン共鳴 (ESR) とに大別される。前者は、核スピンによって生ずる磁気モーメントと磁場との相互作用を、また後者は、電子スピンによって生ずる磁気モーメントと磁場との相互作用を観測するものである。

ところで磁気モーメントの大きさは、水素原子核では 2.79 であり、一方、電子では -1836 と大きく異なっている。この違いから、従来 NMR では、プロトンの場合、0.94~14.1 T の磁場と

40 MHz-600 MHz の電磁波との組合せで、一方、ESR では、約 0.3 T の磁場と 9 GHz の電磁波との組合せで、一定の感度と分解能を得てきた。

現在、分光器として普及している ESR 装置においても、X-バンド (約 9 GHz) のマイクロ波を、空洞共振器内に照射して信号を検出している。ところが、空洞共振器は、試料挿入空間が狭く、また、X-バンドマイクロ波は、水による誘電損失が大きく、生体試料では、Q 値が極端に低下して測定不可能となる。このように、生体計測を行うには不都合な条件があるため、X-バンドマイクロ波を用いた非観血的な *in vivo* 計測は、事実上不可能であった。

キーワード Electron spin resonance, Imaging system, Loop-gap resonator, Nitroxide radical, Mouse

そこで、誘電損失の少ない L-バンドマイクロ波を使用したシステムが開発された¹⁾²⁾³⁾⁴⁾。著者らは、試料挿入空間が大きくとれる内部シールドを施したループギャップ型の共振器を用いたシステムを開発使用し、一定の成果を得ている⁵⁾⁶⁾。

ESR 法は、フリーラジカルを直接検出する唯一の方法である。近年、活性酸素をはじめとするフリーラジカル反応が、種々の疾患と重要な関連を持つことが明らかにされて、その反応の解明の重要性が高まってきた⁷⁾⁸⁾。生体内で発生するフリーラジカルを *in vivo* で検出し、さらに、

その分布状態を画像化する技術が開発されれば、生体内フリーラジカルの発生状況や、その分布、消長などの解析が可能となり、フリーラジカルの関与する生理機能や病態の研究が、大きく進展するであろう。しかし、現状の生体計測用 ESR 装置の装置感度は、生体内に生理的に発生するフリーラジカルを直接検出するまでには至っていない。そのため、体外投与のフリーラジカルを検出追跡することが中心になっている。今回、著者らは、ニトロキシドラジカルを投与したマウスの大腿部におけるラジカルの検出とその分布状態の画像化に成功したので報告する。

2. 実 験

2-1 実験装置

装置は、既報の L-バンド ESR 装置⁹⁾を基本とした。これに、磁場勾配用コイル 1 対を対向するように電磁石用ポールピース面に装着した。その外観の写真を図 1-A に示す。X, Y, Z の 3 軸方向に、最大 4 mT/cm までの勾配磁場を発生させることができる。本研究においては 1 mT/cm の磁場勾配下で観測を行った。なお、電磁石の両極間において磁極方向を Z 軸、上下方向を X 軸、前後方向を Y 軸としている。

さらに、ミニコンピューター (CPU: 米国 DEC 社製 LSI-11) を接続してイメージングシステムとした。ミニコンピューターにより磁場掃引、勾配磁場の強度と勾配角度の設定、ESR 信号の取得が全自動に行える。

使用したループギャップ共振器は、内径 41 mm、軸長 10 mm のダブルギャップ型で、ギャップ部には電気シールドが施されている。(図 1-B) この電気シールドによって、ループ内の残留電界を減少させ、生体のような高損失誘電体



図 1-A. ESR 用電磁石に磁場勾配用コイルを装着した概観。

受付年月日 1989年12月7日

別刷請求先 (〒960) 福島市光ヶ丘1 福島県立医科大学 RI 研究室 土橋宣昭

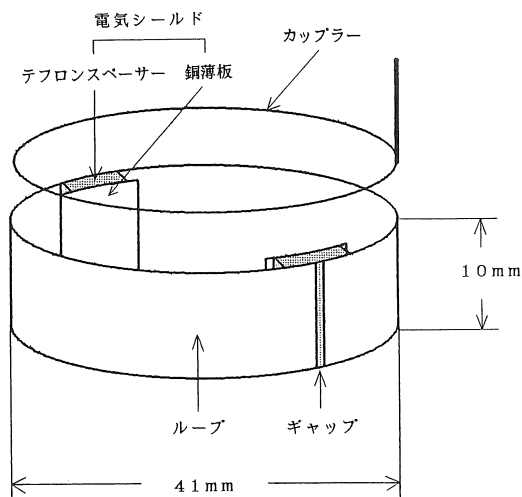


図1-B. 電気シールド付きループギャップ共振器。

をループ内に満たした際の Q 値の低下を防いでいる⁹⁾。この共振器により、約 30 mT の磁場と 700-800 MHz のマイクロ波¹⁰⁾との組み合わせで観測を行った。

2-2 実験動物および試薬

実験動物は、体重約 30g の C57 BL マウスをネブタール麻酔下で使用した。

試薬は、米国 Aldrich 社製 3-carbamoyl-2, 2,5,5-tetramethylpyrrolidine-1-yloxy (CPROXYL) を生理食塩水に溶解し 0.2M に調整して使用した。0.2 M CPROXYL 溶液 0.05 ml をマウス右大腿部に、0.1 ml を左大腿部に皮下注射した。そして、皮下注射した部位が、10 mm 長のループギャップ共振器内に位置するようにセットして計測を行った。

2-3 ESR イメージング法

イメージングは、Lauterbur の Zeugmatography の手法¹¹⁾¹²⁾によった。一定の面内で、勾配強度を一定にして、磁場勾配角度を系統的に変化させて、投影スペクトル (磁場勾配下で測定した ESR スペクトル) を得る。本研究では、例えば XY 平面への二次元イメージを得る場合は、

1 mT/cm の勾配下で、X 軸からの勾配角度を 20°刻みで 0°~160°まで回転させて合計 9 本の投影スペクトルを測定した。

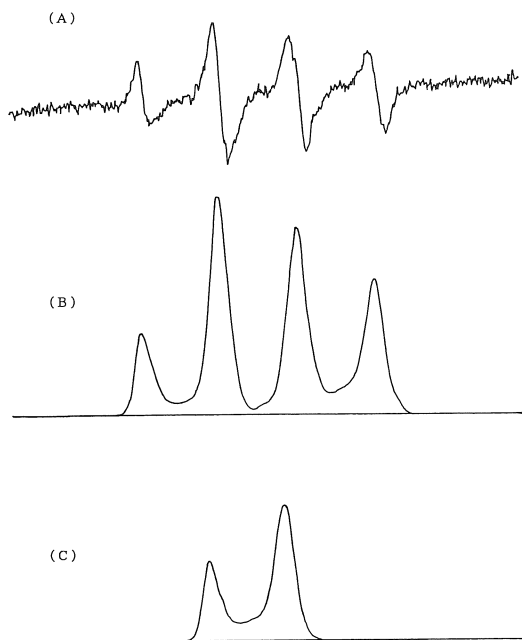
ESR 信号は、一次微分形で得られるので、一度、積分処理を施す。さらに、ニトロキシドラジカルは、核スピン量子数 1 の ¹⁴N 核による超微細構造 (hfs) を示すので、磁場勾配下で測定した投影スペクトルも、これら 3 本の hfs 成分が重畳した形で得られる。画像化には、どれか 1 本の hfs 成分でよく、投影スペクトルから残り成分を除去することが望ましい。著者らは、3 本の hfs 成分のうち m = +1 の低磁場の hfs 成分を抽出し、画像化のために原データとした。この原データを基にスーパーミニコンピュータシステム (日本、データゼネラル社製 MV 10000 SX) を用い、フィルター逆投影法¹³⁾によって画像構築を行った。

3. 結果と考察

図 2 は、Z 方向へ 1 mT/cm の磁場勾配をかけながら観測したマウス両大腿部の、ニトロキシドラジカルの ESR 信号の 1 例である。図 2-A は、一次微分形であり、図 2-B はそれに積分処理を施したものである。さらに、図 2-C は、hfs の 1 成分を抽出したものである。マウスの左右大腿部における Z 軸方向のニトロキシドラジカルの分布状態を表している。

図 3 に、マウス大腿部をループギャップ共振器内に挿入し、マウスの後面、上面、側面から見たニトロキシドラジカルの二次元分布画像を示す。座標軸のとり方は図に示したとおりである。

図 3-A は、XZ 平面への二次元投影画像つまり、マウスの体軸方法に投影した画像である。ニトロキシドラジカル溶液の投与量の多いマウス左大腿部では、信号強度が強く、かつ広範囲に分布しており投与量の少ない右大腿部では、シグナル強度が弱くかつ、その広がりも小さく



描出されている。

図3-Bは、XY平面への二次元投影画像である。この場合には、左右大腿部に皮下注射したニトロキシドラジカルが重なって見えるために、信号強度がより強くかつ分布範囲の広いひとつの画像として描出されている。

図3-Cは、YZ平面への二次元投影画像である。図3-Aの場合と同様に、ニトロキシドラジ

図2-A. ESR 投影スペクトル (一次微分形) ESR 測定条件：共振周波数 703.3 MHz, 中心磁場 25 mT, マイクロ波出力 10 mW, 掃引幅 ±5 mT, 掃引速度 2 min, 磁場変調幅 0.1 mT, 時定数 0.03 sec.

図2-B. ESR 投影スペクトル (積分処理後).

図2-C. ESR 投影スペクトル (積分処理後 $m = +1$ の hfs 成分を抽出).

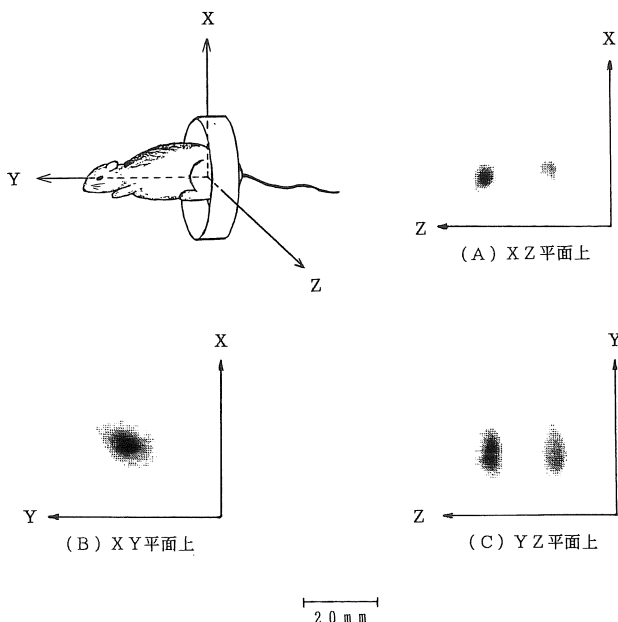


図3-A. マウス大腿部におけるニトロキシドラジカルの分布画像 (XZ平面へ投影).

図3-B. マウス大腿部におけるニトロキシドラジ

カルの分布画像 (XY平面へ投影).

図3-C. マウス大腿部におけるニトロキシドラジカルの分布画像 (YZ平面へ投影).

カル溶液の投与量の多い左大腿部でシグナル強度が強く、分布範囲も広く描出されている。また、図3-Aにおける左右の画像の中心間の距離は約20mmであり、図3-Cにおける左右の画像の中心間の距離にほぼ等しい。さらに、これは、実際に左右大腿部に皮下注射した部位間の距離にほぼ等しかった。以上のように、ニトロキシドラジカル溶液の投与量と良く相関したシグナル強度と分布状態を示す画像が得られており、その位置関係も正確に再現されているといえる。

ところで、図3-B、Cを見ると共振器の軸長(10mm)より大きな範囲にもニトロキシドラジカルの分布像が得られている。共振器の外に位置するニトロキシドラジカルのESR信号が観測されるのは、ループギャップ共振器においては、軸長方向にマイクロ波磁界が分布するが、それは共振器内部だけでなく外部にも存在しているからである。このことはDPPH粉末をつめたキャピラリーを用いて信号強度を比較することにより確認された。DPPHの信号強度は、開口部から5mm以上離れると急激に減少したが、開口部から5mm以内では距離と共に極めて緩徐に減少した。従ってこの共振器の軸長方向(この場合Y軸方向)に20mm近くの有効な試料空間があると考えてよい。図3の画像は濃度の高い点を中心に、この有効空間内に収まっているので、既に述べたようにニトロキシドラジカルの存在する位置及び量と画像との対応を確認することはできた。今回、共振器外部からの信号の強度の補正は行わなかったが、図3に見られる分布状態はほぼ実態に近いものと考え、今後、分布画像に定量性を持たせるためには、共振器外からの信号の強度補正が必要となろう。

これらの三方向から見た画像構築のための原データの取得は、各面ごとに10分、計30分間で終了した。ニトロキシドラジカルは、一般的に、生体に投与されると消去、排泄される³⁾⁶⁾¹⁴⁾が、皮下に投与した場合は、30分程度の時間経

過では減少はみられなかった。

磁気共鳴画像法として、プロトンのNMR画像法が、近年めざましく発展し、臨床応用されている。磁気共鳴法のもうひとつの大きな柱であるESR法は、これまでX-バンドマイクロ波を使用していたために、in vivoの生体計測という観点からすれば、NMR法に比べ遅れていることは事実である。しかしながら、医学、生物学の分野において生体内フリーラジカル反応が注目されている現在、ESR法による生体計測の重要性が増している。そこで、著者らは、マイクロ波としてL-バンド波を用いることによって誘電損失を軽減し、さらに、内部に電気シールドを施したループギャップ共振器を開発し、ループ内での均一な磁場を得た。その結果、大容量の生体試料の計測が可能となった。

従来のX-バンドESR装置では、室温で計測できる水溶液試料の量は、せいぜい数100 μ lであり、それも特殊な偏平セルに入れて計測する必要があった。著者らの開発したL-バンドESRシステムによれば、現在、20mlまでの水溶液試料を、特殊なセルを必要とせずに測定することが可能である。装置感度は10mlの 10^{-6} Mニトロキシドラジカル水溶液を対象とした場合、磁場変調0.1mT、マイクロ波電力10mWで、S/N比として約10である。さらに動物では、ラットの頭部やマウスのwhole bodyまで対象と心得る。

すでに、ラット尾部を対象にして、血中ニトロキシドラジカルの分布を画像化する試みが報告されている¹⁵⁾。今回著者らは、マウスの両大腿部を共振器内に挿入して、体位を固定したまま三方向からの二次元投影像の描画に成功した。動物を対象とする計測の場合、呼吸、心拍に伴うノイズの消去が重要な課題である。著者らは胸部、腹部は別としても頭部、大腿部は、特別なトリガー回路なしでデータの取得を行うことを目的としてきた。共振器の長さが10mmであ

ればマウス大腿部の体外計測において、腹部、胸部の動きの影響を受けることは少ない。また、共振器の内部シールドによって内部の磁界の均一度はより高められ、共振器内の位置に依存する共振点のずれが減少するため、体動によるノイズも減少させる結果となった。このようにして30分程度の間、安定な体外計測が可能となり、二次元投影画像を描出することに成功した。

今後は、XバンドからLバンド化したことに伴う必然的な感度低下をいかにして最小限にとどめるか、さらに、積極的な感度向上の技術開発（例えば、ESRのパルス化など）が重要な課題である。また、生体内で発生する活性酸素の検出法としてスピントラップ法¹⁶⁾が考えられる。種々の活性酸素やフリーラジカルに特異的に反応するスピントラップ剤の開発なども望まれるところである。

本研究の一部は、平成元年度文部省科学研究費補助金による。

文 献

- 1) Ono M, Ogata T, Hsieh KC, et al.: L-band ESR spectrometer using a loop-gap resonator for in vivo analysis, Chem. Lett.: 491-494, 1986
- 2) Froncisz W, Hyde JS.: The loop-gap resonator: A new microwave lumped circuit ESR sample structure, J. Magn. Reson. 47: 515-521, 1982
- 3) Lukiewicz SJ, Lukiewicz SG.: In vivo spectroscopy of large biological objects, Magn. Reson. Med. 1: 297, 1984
- 4) Sotgiu A: Resonator design for in vivo ESR spectroscopy, J. Magn. Reson. 65: 206-214, 1985
- 5) Ogata T, Ono M, Fujisawa T, et al.: An example of in vivo analysis by L-band ESR technique using a loop-gap resonator, Chem. Lett.: 1681-1684, 1986
- 6) Ishida S, Kumashiro H, Tsuchihashi N, et al.: In vivo analysis of nitroxide radicals injected into small animals by L-band ESR technique, Phys. Med. Biol. 34: 1317-1323, 1989
- 7) 大柳善彦: スーパーオキシドと医学, 共立出版, 東京: 1981
- 8) Halliwell B, Gutteridge JMC 著, 松尾光芳, 嵯峨井勝, 吉川敏一訳: フリーラジカルと生体, 学会出版センター, 東京: 1988
- 9) 小野光弘, 謝国章, 鈴木道也, 他: 電気シールド付きループギャップ共振器, 信学技報: MW 86-90, 1986
- 10) 小笠原直幸, 鈴木道也, 布施正: ミリ波工学, ラテイス, 東京, 1976
- 11) Lauterbur PC: Image formation by induced local interactions: Examples employing nuclear magnetic resonance, Nature 242: 190-191, 1973
- 12) Lauterbur PC, Lai CM: Zeugmatography by reconstruction from projections, IEEE Transactions on nuclear science, NS-27: 1227-1231, 1980
- 13) Brooks RA, Chiro GD: Theory of image reconstruction in computed tomography, Radiology 117: 561-572, 1975
- 14) Couet WR, Eriksson UG, Tozer TN, et al.: Pharmacokinetics and metabolic fate of two nitroxides potentially useful as contrast agents for magnetic resonance imaging, Pharm. Res. 1: 203-209, 1984
- 15) 西川弘恭, 藤井博匡, 沖史也: in vivo ESR, ESRとフリーラジカル, 西川弘恭, 吉川敏一編, 日本医学館, 東京, 1989, p.41-48
- 16) 手老省三: 活性酸素のESRによる測定法, 蛋核酵 33: 2693-2698, 1988

Electron spin resonance imaging of the distribution of the nitroxide radical administered into mouse legs

SHIN-ICHI ISHIDA,* SEIJI MATSUMOTO*
HIDEKATSU YOKOYAMA,* NORIO MORI*
HISASHI KUMASHIRO,* NOBUAKI TSUCHIHASHI**
TATEAKI OGATA,*** TATSUO KITAJIMA***
MITSUHIRO ONO,*** HITOSHI KAMADA***
and EKUO YOSHIDA****

**Department of Neuropsychiatry, Fukushima Medical College, Fukushima 960-12, Japan*

***RI-Laboratory, Fukushima Medical College, Fukushima 960-12, Japan*

****Faculty of Engineering, Yamagata University, Yonezawa 992, Japan*

*****Technical and Engineering Division, JEOL Ltd., Akishima 196, Japan*

Electron spin resonance(ESR) imaging of a living mouse has been performed using a newly developed L-band ESR system. The system is composed of an L-band ESR spectrometer, a field gradient coil and a data processor. The imaging was carried out by Lauterbur's method. A nitroxide radical, 3-carbamoyl-2,2,5,5-tetramethylpyrrolidine-1-yloxy(CPROXYL), was used as an imaging agent in saline solution at a concentration of 0.2 M and administered subcutaneously 0.1 ml into the left leg and 0.05 ml into the right leg of the mouse. Two dimensional imagings were made by projection to XY, YZ and ZX planes. The images obtained here corresponded well the location and the distribution of the nitroxide radical in the mouse legs.