

時系列 ESR 画像の *in vivo* 応用

横山 秀克

山形県テクノポリス財団生物ラジカル研究所

はじめに

フリーラジカルが生体機能に深く関与していることが示唆^{1)~7)}されており、生体中のフリーラジカルを観測し分布状態を画像化する技術が切望されている。電子スピン共鳴 (ESR) 法は核磁気共鳴 (NMR) 法と同一の原理に基づく磁気共鳴分光法の一つであるが、フリーラジカルの有する不対電子を直接観測することのできる唯一の手法である。

生体の ESR 計測を行うためには、生体という大容積で高誘電損失の試料を常温で測定できなければならない。しかし、空洞共振器に試料を挿入し約 9.5 GHz のマイクロ波 (X-バンド) を照射して感度の向上を図る従来の ESR 装置では、水による誘電損失が大きいため生体計測は不可能であり、試料挿入空間も狭かった^{8),9)}。水による誘電損失には周波数依存性があるため、これを避けるためには、照射波の周波数を下げる必要がある¹⁰⁾。また、試料挿入空間を広げるためには、大きな共振器が必要となるが、そのような共振器を駆動させるためには十分に長い波長を用いる必要がある。

以上の理由により *in vivo* ESR 計測を行うための照射波として、誘電損失が小さく、波長も十分に長い低周波マイクロ波 (1 GHz 以下) が用いられている^{11)~21)}。しかしこのような電磁波エネルギーの低い、低周波マイクロ波を用い

るがゆえ、*in vivo* ESR 装置では高感度な計測は困難である。更に、ESR 画像を取得する際には、磁場勾配付加のため信号雑音比は低下し (一般的な測定条件ではおおよそ -10 dB)、また、複数の磁場勾配付加スペクトルが必要なため計測時間が延長 (一般的な測定条件ではおおよそ 80 倍) してしまうため、内在性フリーラジカルの画像化は、はなはだ困難なものとなる。そこで、ESR 法による *in vivo* 計測として、比較的安定なフリーラジカルであるスピンプローブ剤を小動物の体外より投与 (外在性のフリーラジカル) し、その分布や動態を観察し、この情報よりフリーラジカルと生体機能の関連を解明する研究がなされている^{14),17)~20)}。このような実験条件では、スピンプローブ剤の投与は、生体内でのフリーラジカル発生のモデルとなる。このような目的のためのスピンプローブ剤には主にニトロキシドラジカル (アミノキシルラジカル, ニトロキシルラジカルとも呼ばれる) が使われてきた。また、こうした外在性フリーラジカルの計測は、内在性フリーラジカル計測に向けての前段階としての重要な意味も持っている。

さて、ESR の緩和時間は NMR に比べはるかに短いため、測定法には連続波法が主に使われている。この際、磁場掃引を必要とするため、測定時間は磁場掃引速度に依存する。ESR 画像法では、画像データを取得するため

キーワード *in vivo* ESR, rapid scan, temporal imaging, free radical, nitroxide radical

には、多方向から磁場勾配かけた計測が複数回必要なため、磁場掃引速度が遅ければ、画像取得に長時間を要することになる。

著者らは、以前、市販の X-バンド ESR 装置を改造して *in vivo* ESR 装置を試作し、この装置を用いて、ラット頭部における腹腔内投与されたニトロキシドラジカルの ESR 画像化を行った¹⁸⁾。この装置の主電磁石は鉄心コイルの電磁石であった。鉄心コイルで高速の掃引を繰り返すと、鉄損と呼ばれる鉄特有のヒステシスにより、磁場発生に複雑な応答遅れを生ずる。このため、鉄心コイルで高速の掃引を繰り返すことは困難であった。

更にこの試作装置では市販のレコーダを使用した磁場掃引制御を用いていたため、最大掃引速度が 15 mT/30 s であった。結局、この装置では、ESR 画像データを取得するのに 40 min 以上を要した¹⁸⁾。このように市販機を改造した従来の装置では、測定に長時間を要するという問題点があった。

鉄心を有しない電磁石、すなわち空心コイルは、鉄心による磁気ヒステシスを生じないので、高速磁場掃引を繰り返すことができる。空心コイルは鉄心コイルに比べて、消費電力が大きいという問題点があるが、共振周波数を 700 MHz 帯域にすれば静磁場強度は通常約 25 mT となるので、空心コイルでも十分設計可能である²¹⁾。そこで、著者らは、*in vivo* ESR 画像法における測定時間の短縮、すなわち高速化を達成するために、空心コイルを主磁石として装備した、高速掃引 ESR 画像化装置の開発を行った²²⁾。本稿では、この新たに開発した装置とこれによる ESR 画像法について概説を行った後、この装置によって可能となった時系列 ESR 画像化とその *in vivo* 応用例について、著者らの経験を基に紹介する^{22),23)}。

高速掃引 ESR 画像化装置

ESR 画像化装置は、主電磁石、一对の磁場掃引コイル、一对の磁場勾配コイル、電源、パソコン、ループギャップ共振器、発振器、700 MHz マイクロ波分光部、磁場変調コイルから構成される^{22),23)} (Fig. 1)。

主電磁石は水冷式ヘルムホルツ型空心コイルであり、最大電流 10 A を流すことにより、最大静磁場 60 mT を発生させることができる。磁場掃引コイルはヘルムホルツ型である。このコイルを電流制御することにより、最高 15 mT/s の磁場掃引が可能である。これを高速磁場掃引と呼んでいる。

磁場勾配コイルは、中心から 20 mm の範囲で、x-, y-, z-軸に直線性の良好（設定値からのずれは ± 0.01 mT 以下）な磁場勾配を、最大 1 mT/cm の強度で発生させることができる。磁場勾配の直線性が良好な領域は共振器の占める空間と一致している。対向した磁場勾配コイルの間隔は 101 mm である。これらのコイルは z-軸用の反ヘルムホルツ型コイルと、x-, y-軸用の 8 の字形のシムコイルと呼ばれるコイルからなる。これらのコイルは Anderson²⁴⁾ の提唱により最適化された設計に基づき作成した。

磁場掃引コイルおよび磁場勾配コイルの電流電源（米沢スタビライザー製）は、D/A コンバータ（DAJ98, カノープス）を介して、パソコン（PC9801BA, NEC）で制御する。このパソコンは A/D コンバータ（DAJ98, カノープス）を介するデータ収集にも使われる。磁場掃引コイルと磁場勾配コイルの制御およびデータ収集を行うオンラインプログラムは自作した。プログラムは BASIC で記述し、MS-DOS 上で QuickBASIC (Ver4.5, マイクロソフト) を用いてコンパイルした。

共振器にはループギャップ共振器¹⁵⁾を用い

1999 年 1 月 20 日受理 1999 年 2 月 9 日改訂

別刷請求先 〒990-2473 山形市松栄 2-2-1 高度技術研究開発センター内 山形県テクノポリス財団生物ラジカル研究所 横山秀克

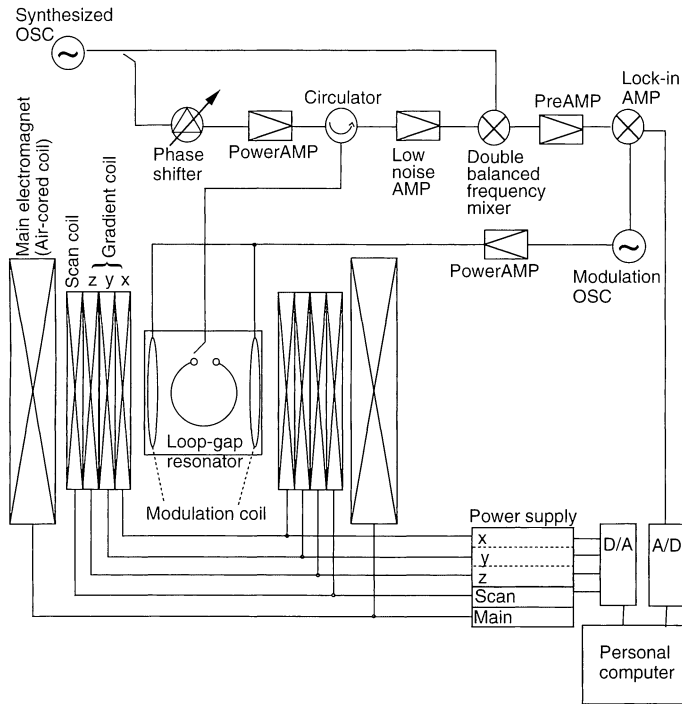


Fig. 1. Block diagram of our rapid scan ESR imaging system.

た. これは円筒状ループがインダクタンスをギャップ部がキャパシタンスを与える等価回路の共振器であり, 電界はギャップ部に主に集中するので, ループ内に試料を挿入することにより, ループ内に広く分布した磁界のみを有効に利用できる. 著者らが用いたループギャップ共振器は, 小野らの報告¹⁶⁾に基づいて自作したもので, 内径 41 mm, 軸長 10 mm の 2-ギャップ型であり, 材質は無酸素銅で表面は金メッキ加工してある. そして, ギャップの内側にはループ内に電界が漏れるのを防ぐブリッジシールド (テフロンと銅板の二層構造) を有する. この共振器内部にはラットなら頭部, マウスなら全身の挿入が可能である. 共振点は約 700 MHz で, この周波数帯域の波長は共振器の大きさに十分対応する長さである.

共振器はシールドケース (日本電子製) に装着した. このシールドケースには外部回路と共

振器を磁氣的に結合させる結合コイル, 磁場変調を引加するための一対の磁場変調コイルが実装済みである. このシールドケースに装着した状態での無負荷 Q 値は約 600 である. シールドケースは, 内部の共振器の中心が, 対向した磁場勾配コイルの中心に位置するように固定した. これにより, 共振器内部の空間 (内径 41 mm, 軸長 10 mm) が, 磁場勾配の直線性が保証されている空間 (直径 40 mm の球) にほぼ含まれる. 共振器の磁界は共振器の軸長より軸長方向に約 5 mm 遠方まで有効である¹⁸⁾. また, 共振器内部における変調磁界強度の平坦性が保証されているのは中心から 15 mm の範囲なので, 共振器を中心として直径 30 mm, 軸長 20 mm の円筒内の空間が, 有効な画像範囲となる.

共振器は発振器 (R4262, アドバンテスト) で駆動される. ESR 測定時には共振器からの

反射波が最小になるように、結合コイルの位置を合わせ、そのときの共振周波数に発振器をチューニングする。700 MHz マイクロ波分光部はホモダイン検波のための、分波器 (HDH, ヒロセ), サーキュレータ (60N50, ウィルトロン), 位相器 (PS3, R & K), 低雑音増幅器 (AFS-2, MITEQ), ダブルバランスドミキサ (M-19CA, R & K) から構成される。検波増幅された信号は磁場変調周波数でロックイン増幅される。一對の磁場変調コイル (日本電子) はロックイン増幅器 (5210, PARC) の内部発振器とパワーアンプ (日本電子) で駆動される。

ESR 画像法

通常、ESR スペクトルは試料全体の平均の信号であるので、空間情報は含まない。試料内のフリーラジカルの分布情報を得るための方法として、ゼーマン分裂を起こさせる主磁場のほかに、既知の空間依存性を持つ磁場を付加する方法がある。例えば、静磁場に並行に線形磁場勾配を付加すれば、得られた ESR スペクトルの横軸は磁場から位置に変換され、共鳴条件が成立する磁場に位置するフリーラジカルの ESR 信号が観測される²⁵⁾。

ESR 画像法における磁場勾配の付加には、NMR 画像法でも一部使われていたズームトグラフ法^{26),27)}が主に用いられている。これは、Lauterbur らによって提案されたもので、一定

の面内で磁場勾配強度を一定に保ち、磁場勾配角度を系統的に変化させて、投影スペクトルを得る手法である。x を磁場勾配方向にとった空間座標、g(x) を静磁場と勾配磁場の和の磁場のもとで観測された信号、h(x) を静磁場のもとで観測された信号、f(u) を磁場勾配に垂直な平面 x=u 内におけるフリーラジカルの濃度とすると、以上の関係は次式で表せる。

$$g(x) = \int h(x-u)f(u)du + n(x) \dots\dots\dots(1)$$

ここで、n(x) は加法的測定雑音とする。g(x) と h(x) は測定で得られる関数であり、f(u) は推定したい未知の関数である。ある平面内で磁場勾配の方向を変えながら式(1)を解いていくと、対応した投影 f(x) を得ることができる。例えば、y-z 平面上に磁場勾配を 20 度刻みで回転させながら 9 回測定を行うことにより、y-z 平面に平行な二次元投影像 (三次元的に分布しているフリーラジカルを平面に正投影したもの) を得る。この二次元投影像を同じく 20 度刻みで 9 枚取得することにより、このデータから試料の三次元空間分布データを得ることができる。この三次元空間分布データから、任意の面のスライス (すなわち CT 画像) を切り出す。すなわち、この条件下では CT 画像の取得には 9×9 回、つまり 81 回の磁場勾配下の測定が必要となる^{18),28)} (Fig. 2)。したがって、この画像法では三次元空間分布データが必

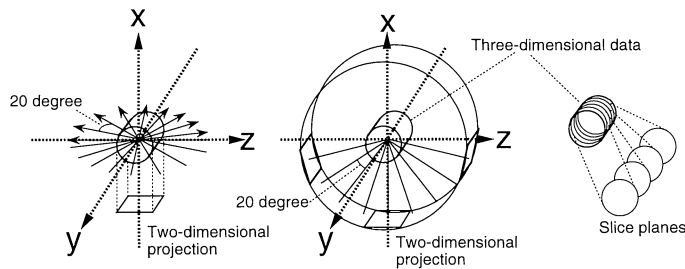


Fig. 2. Schematic diagram of three-dimensional zeugmatography. (from ref. 28 with slight modification).

用なので、ESR-CT 画像化は三次元 ESR 画像化と同義である¹⁸⁾。いずれにしろ、ESR 画像法においては、磁場勾配下の複数個のスペクトルが必要となり、単に ESR 信号を取得する場合に比べて長時間の測定時間が必要となる。

磁場勾配下のスペクトルは、その本来の線幅や超微細構造等の情報にフリーラジカルの空間分布情報が重畳したものになる (式(1))。すなわち、空間分布を示す信号 $f(x)$ に磁場勾配なしの ESR 信号 $h(x)$ が畳み込み演算 (コンボリューション) されたものが、実測される磁場勾配下のスペクトル $g(x)$ である。このスペクトルから、空間情報のみを抽出し、画像を再構成することにより ESR 画像が得られる。この空間情報の直接的な抽出処理がデコンボリューションと呼ばれるものである。すなわち、デコンボリューションとは実測データである磁場勾配下スペクトル $g(x)$ および磁場勾配なしスペクトル $h(x)$ を用いて未知の空間分布データ $f(x)$ を推定する問題である。

デコンボリューション処理には高速フーリエ変換が用いられる。実測データには雑音が混じているため、ソフトウェア・フィルタが必要である。このためのフィルタとして、低域通過フィルタ、パラメトリックウィナーフィルタ、一般化フィルタ、制約条件付き最小 2 乗フィルタ、射影フィルタがある。これらのフィルタは、湯浅らによれば、すべて低雑音状態では良好な結果を示すと報告されている^{29),30)}。著者は低域通過フィルタを用いている。

一般に共鳴信号から、その共鳴の存在場所を推定する場合の精度は、共鳴信号の検出能で左右される。したがって、ESR 画像法においても、その空間分解能は共鳴波形 (スペクトルの線幅等) で制限される²⁵⁾。あるピンポイント試料のスペクトルが半値幅 $\Delta H_{1/2}$ の線幅を持つとする。 α_{\max} の磁場勾配下で、このピンポイント試料が少なくとも Δz 空間移動したとき、この移動量が ESR 画像として識別できるとすれば、以下の式が成り立つ²⁵⁾。

$$\Delta H_{1/2} = \alpha_{\max} \Delta z \quad \dots\dots\dots (2)$$

このときの空間における距離 Δz で、大野らは空間分解能を δz と見積もっている²⁵⁾。

$$\delta z = \Delta H_{1/2} / \alpha_{\max} \quad \dots\dots\dots (3)$$

デコンボリューションによって、スペクトルの広がり (すなわち線幅) に関係なく空間分布が推定できれば、 δz はゼロとなってしまう。しかし、実際にはデータは雑音を含んでおり、 δz がゼロになることはありえない。デコンボリューションは、磁場勾配下スペクトルから無勾配スペクトルを用いて、空間分布を推定する作業である。同じ作業を、無勾配スペクトルを用いて、無勾配スペクトル自身に行えば、空間分布を仮定してデコンボリューションしたことになり、デコンボリューションに用いられた本来のスペクトル形状が得られる。こうして得られたスペクトルの半値幅を $\Delta H_{1/2}'$ とする。この $\Delta H_{1/2}'$ は実測スペクトルの信号雑音比に左右され、信号雑音比がよければ、 $\Delta H_{1/2}'$ は小さくなる。そこで、著者らは、 $\Delta H_{1/2}'$ を磁場勾配 α_{\max} で割った値、すなわち、

$$\delta z' = \Delta H_{1/2}' / \alpha_{\max} \quad \dots\dots\dots (4)$$

を空間分解能の指標として評価している (単位は mmFWHM. FWHM=full width at half maximum)^{22),23),31)}。なお、この半値幅を目安にすることが妥当であることはファントムを用いて実験的に確認している。

デコンボリューションされたデータは画像再構成に供される。画像再構成とは複数個の分布信号 $f_{\theta}(r)$ ($\theta=1, 2, \dots, m$) から分布画像 $F(x, y)$ を得る手法である。画像再構成のアルゴリズムには、解析的画像再構成法の一つであるフィルタ補正逆投影法が、ESR 画像法においては一般的な手法であり^{12)~14),20)}、著者もこれを用いている^{18),22),23),31)}。他の画像再構成法としては、加法的再構築法や最大エントロピー法などがある^{29),30)}。

実際の計測に当たっては、磁場勾配は 1 mT/cm, その回転角は 20 度刻に設定した。この条件下では、9 本のスペクトルから 1 面の二次元投影像が得られ、9 面の投影像から ESR-CT が得られるので、ESR-CT を得るためには合計 81 本の磁場勾配下のスペクトルが必要となる。磁場勾配付加の測定に先立ち、磁場勾配なしの掃引を行い、得られた無勾配スペクトルの線形は、勾配スペクトルのデコンボリューションに用いた。

計測で得られた ESR 信号は微小型なので、数値積分によって積分信号を求める。次に、磁場勾配下の ESR スペクトルデータを低域通過フィルタ処理後、高速フーリエ変換法でデコンボリューションした。そしてデコンボリューションされたデータを用いて、ESR-CT 画像をフィルタ補正逆投影法で再構築した。1 mT/cm の磁場勾配下で、x-, y-, z-軸方向に 150 mm (=15 mT) のデータは 300 点のデータ点に量子化した (1 点=0.5 mm)。画像の有効範囲は中心から直径 30 mm の範囲なので、150×150 mm のデータから、中央の 50×50 mm だけを画像用に使用している。再構築された三次元立体情報から任意の CT スライスを取り出すことができる。3 層の平均値を一枚の CT スライスとして再構成すれば、データ 3 点分の占める距離がスライス厚に相当するので、すなわちスライス厚は 1.5 mm となる。すべての CT スライスの最大信号強度の 25% 以下の信号は雑音とみなした。画像は 256 色で表現されている。画像処理プログラムは自作した。記述言語およびコンパイラはオンラインプログラムと同様である。

ニトロキシドラジカル腹腔内投与後のラット頭部における時系列 ESR 画像化

前述したように、著者らは以前、鉄心コイルを主磁石として用いた ESR 画像化装置で、ラット頭部における腹腔内投与されたニトロキシ

ドラジカルの ESR 画像化を行った。この装置では ESR-CT 画像を得るのに 40 数 min を要した¹⁸⁾ため、この 40 数 min の間のフリーラジカル分布の動態については、知るすべがなかった。本項では、今回新たに開発した高速掃引 ESR 画像化装置の応用として、従来装置で行った実験と同じニトロキシドラジカル (3-carbamoyl-2,2,5,5-tetramethylpyrrolidine-1-oxyl ; carbamoyl-PROXYL) を同じ方法でラットに投与 (腹腔内投与) し、従来の装置で要した 40 数 min の間に複数のラット頭部の時系列 ESR 画像を取得して、これまで知り得なかったこの時間内のフリーラジカルの分布動態について検討した²²⁾。

実験動物にはウイスター系雌性ラット (200 g, 9 週齢) を用いた。ペントバルビタール麻酔下のラットに、生理食塩水に 0.2 M の濃度で溶解した carbamoyl-PROXYL (アルドリッチ) を 5 ml 腹腔内投与した。ラット頭部を外耳道孔より 10 mm 前方が共振器の中心になるように固定し、ESR 計測を行った。この状態における共振器の Q 値は約 50 である。

本項の実験では、1 回の掃引のデータを取得するのに 1.4 s を要した (15 mT の磁場掃引に 1.2 s, データ保存に 0.1 s, 次の磁場勾配印加に 0.1 s)。そして、ESR-CT に必要なデータの取得には 2.5 min を要した [1.4 s×82 (1 無勾配掃引+81 勾配掃引)+30 s 手動操作]。これは従来の鉄心コイルの ESR 装置の所要時間の約 20 分の 1 という大幅な時間短縮である。また、次の測定開始の前に、結合コイルおよびマイクロ波分光部の再チューニングのために約 30 s 必要であり、CT 取得は 3 min ごととなる。これが本実験における時間分解能となる。本実験では、この CT 取得のための ESR 測定を carbamoyl-PROXYL の投与より 5 min 後から 47 min 後まで 3 min ごとに繰り返した。

z-x 面における外耳道孔より 10 mm 前方の ESR-CT 画像 ($\delta z'$, 2.3 mmFWHM) の時間変化を Fig. 3 に示す。低信号領域は脳に、高信

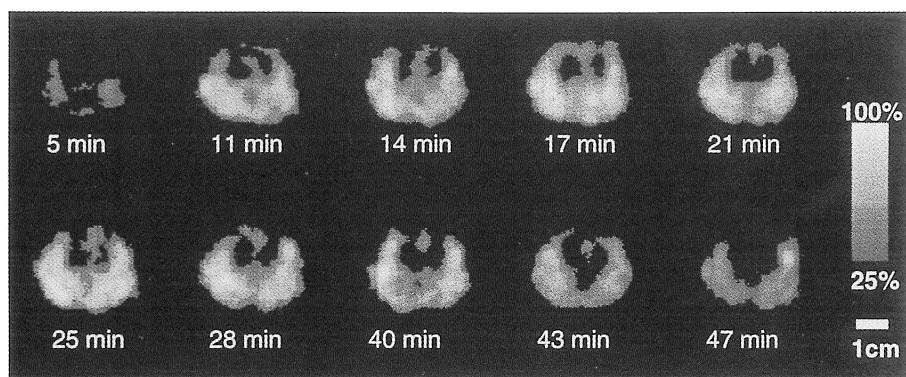


Fig. 3. Temporal ESR-CT images in z-x plane (10 mm anterior to interaural line) of the rat head after injection of carbamoyl-PROXYL. The number at the bottom of each slice image indicates the time after injection. Spatial resolution is 2.3 mm FWHM. (from ref. 22 with slight modification).

号領域は頭蓋外に相当する。Carbamoyl-PROXYL 投与 5 min 後では信号強度が低いため、かすかに頭蓋外が描画されるにとどまった。しかし、画像は 11 min 後からは鮮明となった。11～43 min 後の画像において、低信号領域の中心部に carbamoyl-PROXYL の集積が観察された。47 min 後には、この carbamoyl-PROXYL の集積像は消失した。この時点における画像は、従来の装置で得られた画像¹⁸⁾に一致する。描出されたフリーラジカルの濃度は信号雑音比や測定条件等から、およそ 10^{-3} M 相当と推定される。

このように、高速掃引 ESR 画像化装置を用いることにより、従来装置で画像データ取得に要した時間 (40 数 min) 内に、複数の時系列 ESR 画像を取得することに成功した。そして、従来知り得なかった、この時間内のフリーラジカルの分布動態を明らかにできたことから、高速掃引 ESR 画像化装置による時系列 ESR 画像化が外在性のフリーラジカルの分布動態をみる上で有用であることが示された。

脳は低信号領域、頭蓋外は高信号領域として描画された。このことは、carbamoyl-PROXYL が血液脳関門を通過しがたい水溶性の高い物質であるという事実と合致し、また従来の

装置で得られた画像とも一致する¹⁸⁾。Fig. 4 は、carbamoyl-PROXYL 投与 11～43 min 後の ESR 画像において、脳にあたる領域の中心部にみられた集積像の解剖学的位置を同定するために、ESR-CT 画像の 1 例 (Fig. 3, 21 min)

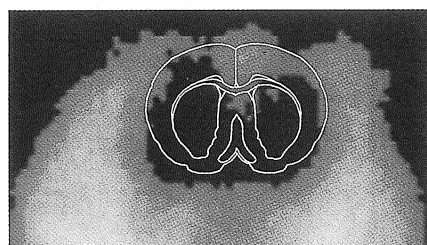
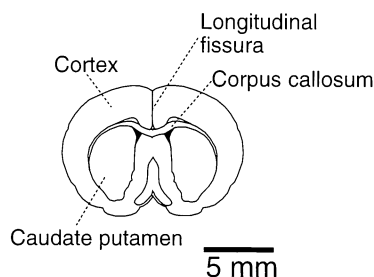


Fig. 4. A picture obtained by superimposing the brain-atlas of rat, corresponding to the brain-area for the example of the ESR-CT image (Fig. 3, 21 min), to assign the anatomical position. (from ref. 22 with slight modification).

に同一スライスに相当するラット脳地図³²⁾を投影したものである。Carbamoyl-PROXYL は血液脳関門を透過しないので、この集積像は脳実質ではありえず、中程度の太さの血管（アルテリオールやヴェニューレ）およびその分岐内の血液中に溶けているニトロキシドラジカルが描出されたものと考えられる。この像は、前大脳動脈とその分枝の存在する大脳縦列に一致して現れている (Fig. 4)。このことは、脳の血管が描画されなかった、従来装置で得られた画像¹⁸⁾と大きく異なる点であり、高速掃引 ESR 画像化装置によって初めて得られた知見である。従来の装置では、ESR-CT のためのデータの取得に 40 min 以上を要した。そのため、長時間にわたる測定中に共振周波数を一定に維持するのが困難で、手動で周波数の補正を行っていた。これらの要因が画像を損ねていたと考えられる。高速掃引 ESR 装置による計測時間の短縮が、これらの問題点を解決した。

血液脳関門透過性ニトロキシドラジカルを用いたラット脳の時系列 ESR 画像化

画像試薬には検出したい部位に集積する性質が望まれる。はん用されている多くのニトロキシドラジカルは、前項で用いた carbamoyl-PROXYL も含めて、血液脳関門を透過しがたいため、脳内に移行しにくい。したがって、脳の ESR 画像化を行うためには、血液脳関門を通過する画像試薬が必要である。最近、三浦らによって、エステル体のニトロキシドラジカルである 3-methoxycarbonyl-2,2,5,5-tetramethylpyrrolidine-1-oxyl(PCAM) が血液脳関門を通過し脳内に移行することが報告された^{33),34)}。彼らは放射性同位元素を用いてラット脳組織における、PCAM の脳取り込み率を求めている。それによれば、PCAM が典型的な脳内移行薬物であるジアゼパムと同程度に良好に脳に移行することが示されている。

著者らが開発した高速掃引 ESR 画像化装置

による時系列画像化の手法に、この PCAM を組み合わせれば、脳の時系列 ESR 画像が得られ、脳内のフリーラジカル分布動態を知ることができる。そこで、本項では、本装置の更なる応用として、PCAM を腹腔内投与したラットの頭部および脳の時系列 ESR 画像化を行った²³⁾。

PCAM は 3-carboxy-2,2,5,5-tetramethylpyrrolidine-1-oxyl(PCA) をメチルエステル化することにより合成した。メチルエステル化は以下の手法で行った。5 g の PCA (アルドリッチ) と 200 ml のメタノール (関東化学) と 2.0 ml の濃硫酸 (関東化学) の混合液を室温で 2 日間攪拌した。溶媒を減圧下濃縮した後、残渣をクロロホルム (関東化学) で抽出した。この溶液を蒸留水、炭酸水素ナトリウム水溶液 (関東化学)、そして蒸留水で洗浄した。洗浄した後、無水硫酸ナトリウム (関東化学) で乾燥させ、減圧下濃縮することにより PCAM を橙色油状物として得た (2.9 g, 収率 55%)。その分子構造は核磁気共鳴分光計および質量分析器で確認した。得られた PCAM はメタノールに溶解した後、最終濃度が 0.2 M になるように生理食塩水に溶解した。このときの生理食塩水中のメタノールの濃度は 10% (w/w) である。

実験動物にはウイスター系雄性ラット (200 g, 9 週齢) を用いた。ペントバルビタール麻酔下のラットに、PCAM を 2 ml 腹腔内投与した。ラット頭部を外耳道孔より 9 mm 前方が共振器の中心になるように固定し、ESR 計測を行った。

Fig. 5 に z-x 面における典型的な ESR-CT 画像 ($\delta z'$, 2.6 mm FWHM) の時間変化を示す。各々のスライス画像の下の数字は共振器中心からラット鼻側方向への距離を示す。画像の一番上の数字は PCAM 投与後の時間を示す。投与 10 min 後、脳および頭蓋外はすべてのスライスレベルで高信号領域として描画されている。このことは、腹腔内投与された PCAM が

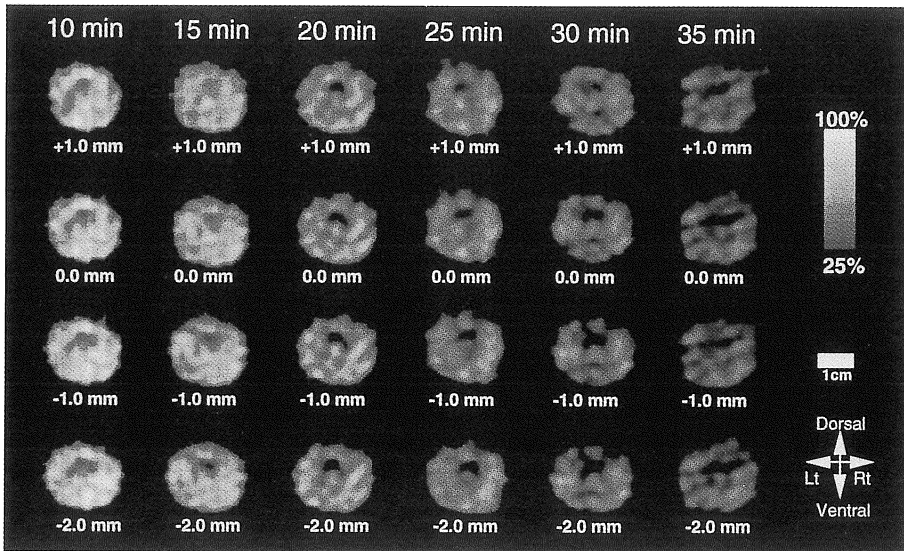


Fig. 5. Temporal ESR-CT images in the z-x plane for a rat's head after injection of PCAM. The number at the bottom of each slice image indicates the distance from the center of the loop-gap resonator (=9 mm anterior to interaural line) in the direction of the nasal side. The number at the top of the images is the time after injection. Spatial resolution was 2.6 mm FWHM. (from ref. 23 with slight modification).

急速に脳を含む頭部に移行していることを示す。これらの画像は、前項で示した、血液脳関門非透過性ニトロキシドラジカルである carbamoyl-PROXYL を用いて得られた画像（脳は低信号領域、頭蓋外は高信号領域として描画）と大きく異なる点である。時間の経過とともに画像は徐々に不鮮明になった。描出されたフリーラジカルの濃度は信号雑音比や測定条件等から、およそ 10^{-3} M 相当と推定される。

Fig. 6a は解剖学的位置を同定するために、共振器中心部の ESR-CT 画像の 1 例 (Fig. 5, 0.0 mm, 10 min) に同一スライスに相当するラット脳地図³²⁾を投影したものである。そして、Fig. 6a に示したように、画像領域を皮質、線条体、頭蓋外の 3 部分に分けた。

Fig. 6b にそれぞれの画像領域の信号強度の平均値の時間変化の例を示す。再現性よく、片対数プロットにより良好な直線性が観察された（皮質での相関係数 = -0.978 ± 0.006 ；線条体

での相関係数 = -0.948 ± 0.026 ；頭蓋外での相関係数 = -0.982 ± 0.001 , $n=4$)。これは信号強度が指数関数的に減衰していることを示す。ゆえに、減衰の半減期をニトロキシドラジカルの除去能を評価するパラメータとして使った。Fig. 6c に示すように皮質、線条体、頭蓋外での PCAM の半減期は、それぞれ 15.291 ± 1.510 , 11.254 ± 0.864 , 19.088 ± 2.860 min であった。頭蓋外での半減期は脳内（皮質および線条体）に比べて統計的に有意に長く、また、線条体での半減期は皮質に比べて統計的に有意に短かった（スチューデントの t 検定, $p < 0.05$)。ニトロキシドラジカルは脳内に存在する還元剤（アスコルビン酸等）で還元され、その常磁性を失う^{33),35),36)}。皮質と線条体で PCAM の半減期が異なるということは、脳内において、フリーラジカルの常磁性を剥奪する機能が脳の部位によって異なることを示唆している。

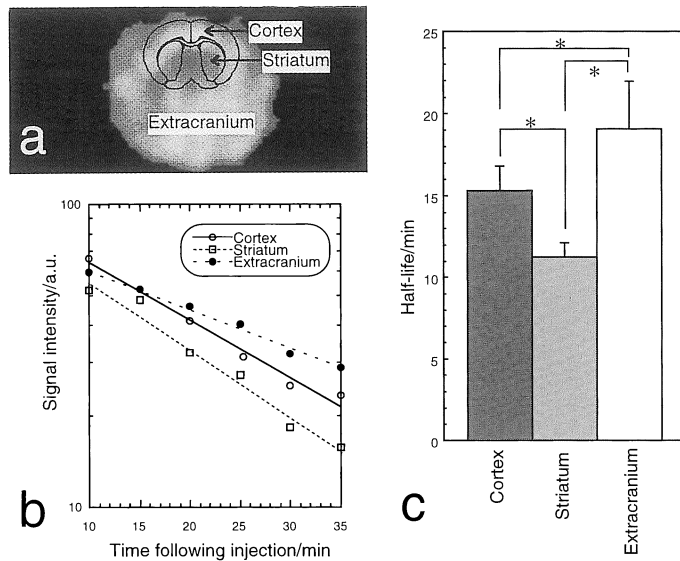


Fig. 6. (a) : A picture obtained by superimposing the brain-atlas of a rat, corresponding to the brain-area for the example of the ESR-CT image at the center of the loop-gap resonator (Fig. 5, 0.0 mm, 10 min), to assign the anatomical position. Image areas were divided into 3 parts : cortex, striatum, and extracranial region. (b) : An example of plots of averages of signal intensities in each area against time after injection of PCAM. (c) : The half-life of PCAM in the cortex, striatum, and extracranium of rats. Values are mean \pm standard error. * $p < 0.05$; Student's t-test ; $n = 4$. (from ref. 23 with slight modification).

ま と め

本稿では、空心コイルを装備した高速掃引 ESR 画像化装置による時系列 ESR 画像化について述べてきた。高速掃引 ESR 画像化装置を用いることにより、従来の鉄心コイル ESR 装置の 1/20 の計測時間で ESR-CT 画像が得られ、その結果、従来装置で画像データ取得に要した時間内に、複数の時系列 ESR 画像を取得することが可能となった。更に、この時系列 ESR 画像化の手法に血液脳関門透過性画像試薬を組み合わせるにより、脳の部位ごとによってフリーラジカル除去能が異なるという所見が得られた。

高速掃引 ESR 画像化装置による時系列 ESR 画像化は、外在性に投与されたフリーラ

ジカルの分布動態を知る上では有用な手法である。外在性のフリーラジカルはフリーラジカル発生のモデルである。各種疾患モデル動物における外在性フリーラジカルの時系列 ESR 画像化を通じて、フリーラジカルに関連した各種疾患の病態解明を図ることが将来展望され、ここに示された成果はそのための重要なステップとなる。

謝 辞

本稿で紹介した研究成果は次の方々との共同研究によるものです。記して謝意を表します(敬称略)。

山形県テクノポリス財団生物ラジカル研究所；伊東 治，小原平太郎，平松 緑，大矢博昭，

鎌田 仁

山形大学大学院工学研究科；尾形健明
山形県工業技術センター；及川和夫，佐藤敏幸
浜松医科大学精神科；森 則夫
福島県立医科大学 RI 研究室；土橋宣昭

文 献

- 1) Palmer RMJ, Ferrige AG, Moncada S : Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 1987 ; 327 : 524-526
- 2) Bread DS, Snyder SH : Nitric oxide mediates glutamate-linked enhancement of cGMP levels in the cerebellum. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989 ; 86 : 9030-9033
- 3) Dawson TM, Dawson VL, Snyder SH : A novel neuronal messenger molecule in brain : the free radical, nitric oxide. *Annal Neurology* 1992 ; 32 : 297-311
- 4) Kensler TW, Bush DW, Kozumbo WJ : Inhibition of tumor promotion by a biomimetic superoxide dismutase. *Science* 1983 ; 221 : 75-77
- 5) Oyanagui Y, Sato S, Okajima T : Suppressions of ischemic paw oedema in mice, rats and guinea pigs by superoxide dismutases from different sources. *Free Radic Res Comm* 1988 ; 4 : 385-396
- 6) Sasaki T, Murota S, Wakai S, Asano T, Sano K : Evaluation of prostaglandin biosynthetic activity in canine basilar artery following subarachnoid injection of blood. *J Neurosurg* 1981 ; 55 : 771-778
- 7) Yokoyama H, Mori N, Osonoe K, Ishida S, Kumashiro H : Anticonvulsant effect of liposome-entrapped superoxide dismutase in amygdaloid kindled rats. *Brain Res* 1992 ; 572 : 273-275
- 8) Schwan HP, Foster KR : Microwave dielectric properties of tissue. *Biophys J* 1977 ; 17 : 193-197
- 9) Schwan HP, Foster KR : RF-field interactions with biological systems : electrical properties and biophysical mechanisms. *Proc IEEE* 1984 ; 68 : 104-113
- 10) Ray RS : Broadband complex refractive indices of ice and water. *Appl Optics* 1972 ; 11 : 1836-1844
- 11) Berliner LJ, Fujii H : Magnetic resonance imaging of biological specimens by electron paramagnetic resonance of nitroxide spin labels. *Science* 1984 ; 227 : 517-519
- 12) Fujii H, Berliner LJ : One- and two-dimensional EPR imaging studies on phantoms and plant specimens. *Magn Reson Med* 1985 ; 2 : 275-282
- 13) Berliner LJ, Fujii H, Wan X, Lukiewicz SJ : Feasibility study of imaging a living murine tumor by electron paramagnetic resonance. *Magn Reson Med* 1987 ; 4 : 380-384
- 14) Alecci M, Colacicchi S, Indovina PL, Mono F, Pavone P, Sotgiu A : Three-dimensional *in vivo* ESR imaging in rats. *Magn Reson Imag* 1990 ; 8 : 59-63
- 15) Froncisz W, Hyde JS : The loop-gap resonator : a new microwave lumped circuit ESR sample structure. *J Magn Reson* 1982 ; 47 : 515-521
- 16) Ono M, Ogata T, Hsieh K, Suzuki M, Yoshida E, Kamada H : L-band ESR spectrometer using a loop-gap resonator for *in vivo* analysis. *Chem Lett* 1986 ; 491-494
- 17) Ishida S, Kumashiro H, Tsuchihashi N, Ogata T, Ono M, Kamada H, Yoshida E : *In vivo* analysis of nitroxide radicals injected into small animals by L-band ESR technique. *Phys Med Biol* 1989 ; 34 : 1317-1323
- 18) Ishida S, Matsumoto S, Yokoyama H, et al. : An ESR-CT imaging of the rat head of a living rat receiving an administration of a nitroxide radical. *Magn Reson Imag* 1992 ; 10 : 21-27
- 19) Berliner LJ, Wan X : *In vivo* pharmacokinetics by electron spin resonance spectroscopy. *Magn Reson Med* 1989 ; 9 : 430-434
- 20) Quaresima V, Alecci M, Ferrari M, Sotgiu A : Whole rat electron paramagnetic resonance imaging of a nitroxide free radical by a radio frequency (280 MHz) spectrometer. *Biochem Biophys Res Comm* 1992 ; 183 : 829-835
- 21) Oikawa K, Ogata T, Lin Y, Sato T, Kudo R, Kamada H : Rapid field scan L-band electron spin resonance computed tomography system us-

- ing an air-core electromagnet. Anal Sci 1995 ; 11 : 885-888
- 22) Yokoyama H, Ogata T, Tsuchihashi N, Hiramatsu M, Mori N : A spatiotemporal study on the distribution of intraperitoneally injected nitroxide radical in the rat head using an *in vivo* ESR imaging system. Magn Reson Imag 1996 ; 14 : 559-563
- 23) Yokoyama H, Itoh O, Ogata T, Obara H, Ohya-Nishiguchi H, Kamada H : Temporal brain imaging by a rapid scan ESR-CT system in rats receiving intraperitoneal injection of a methyl ester nitroxide radical. Magn Reson Imag 1997 ; 15 : 1079-1084
- 24) Anderson WA : Electrical current shims for correcting magnetic fields. Rev Sci Instr 1961 ; 32 : 241-250
- 25) 大野圭一. ESR イメージング. 東京, 日本 : アイピーシー, 1990
- 26) Lauterbur PC : Image formation by induced local interaction : example employing nuclear magnetic resonance. Nature 1973 ; 242 : 190-191
- 27) Lauterbur PC, Lai CM : Zeugmatography by reconstruction from projections. IEEE Trans Nucl Sci 1980 ; NS-27 : 1221-1231
- 28) Yoshimura T, Yokoyama H, Fujii S : Electron paramagnetic resonance detection and imaging of endogenous synthesized and exogenously supplied nitric oxide. J Magn Reson Anal 1997 ; 3 : 125-140
- 29) Yuasa T, Tamura A, Ogata T, Akatsuka T, Kamada H : Assessment and comparison of algorithms for *in vivo* ESR-CT imaging of bioradi- cal with L-band. Frontiers Med Biol Eng 1996 ; 7 : 311-330
- 30) Yuasa T, Watanabe Y, Tamura A, Ogata T, Kuronuma O, Akatsuka T, Kamada H : Development of interactive data processing system for *in vivo* ESR-CT imaging of bioradicals with L-band microwave. Med Imag Technol 1996 ; 14 : 281-291
- 31) Yokoyama H, Fujii S, Yoshimura T, Ohya-Nishiguchi H, Kamada H : *In vivo* ESR-CT imaging of the liver in mice receiving subcutaneous injection of nitric oxide-bound iron complex. Magn Reson Imag 1997 ; 15 : 249-253
- 32) Paxinos G. The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates. Sydney, Australia ; Academic Press, 1986
- 33) 三浦ゆり, 安西和紀, 小沢俊彦. 脳のレドックス反応に及ぼす酸化的ストレスの影響. 内海英雄, 吉川敏一編. 磁気共鳴と医学. vol 8. 東京, 日本 : 日本医学館, 1997 ; 25-28
- 34) Sano H, Matsumoto K, Utsumi H : Synthesis and imaging of blood-brain barrier permeable nitroxyl-probes for free radical reaction in brain of living mice. Biochem Mol Biol Int 1997 ; 42 : 641-647
- 35) Nakagawa K, Ishida S, Yokoyama H, Mori N, Niwa S, Tsuchihashi N : Rapid free radical reduction in the perfused rat liver. Free Rad Res 1994 ; 21 : 169-176
- 36) Halliwell B : Oxidants and the central nervous system : some fundamental questions. Acta Neurol Scand 1989 ; 126 : 23-33

***In vivo* Temporal ESR Imaging**

Hidekatsu YOKOYAMA

*Institute for Life Support Technology, Yamagata Technopolis Foundation
2-2-1 Matsuei, Yamagata 990-2473*

ESR imaging systems operating in lower frequency bands (less than 1 GHz), where the dielectric losses are lower, were developed to observe the distribution of exogenous free radicals. In general, the time required for the ESR imaging depends on the speed of the magnetic field scan because ESR measurements are performed by the continuous wave method. In this review, we presented an *in vivo* temporal ESR imaging technique by a rapid scan ESR system which equipped with air-cored coils as an electromagnet. The field scan speed of this system is more than twentyfold compared with that of a former ESR system which equipped with iron-cored coils as an electromagnet : so, temporal multiple sets of ESR-CT images of an exogenously given nitroxide radical in the rat's head could be obtained within the period in which one set of them had been obtained by the former system. Furthermore, a combination of this temporal ESR imaging technique and blood-brain barrier-permeable nitroxide radical made it possible to observe changes of the distribution of the radical in the brain. As a result, it was found that different regions of the brain showed differences in the rate of decay of the free radical. We believe that the temporal ESR imaging technique by a rapid scan ESR system is useful for investigating the dynamics of the distribution of exogenous free radicals, which functions as a model of free radical generation.