

磁気共鳴顕微鏡法による実験小動物の観察

Application of magnetic resonance microscopy to examination of small experimental animals

杉本実紀

京都大学大学院農学研究科

M. Sugimoto

Graduate School of Agriculture, Kyoto University

1. はじめに

生命現象の解析においてはしばしば生体・生細胞の機能や形態の連続的な変化の観測が必要とされる。細胞やごく小型の生物（菌類等）ではこれは比較的容易で、形態観察は光学顕微鏡でも位相差法などにより可能であるため従来から広く利用されている。さらに微分干渉顕微鏡や冷却 CCD カメラ等の利用により、高解像度での観察や蛍光ラベルを用いた細胞機能の解析も可能になっている。これに対して、我々が研究対象としている哺乳動物の個体については、発生初期は観察対象が小さく培養等も比較的容易であるので細胞に用いられる方法で連続的な解析が可能となっているが、発生が進むとそれらの方法では不十分である。また哺乳動物の胎子の段階では生存・発育に母胎環境が必要であるという制限がある。現在、遺伝子工学の発達等により様々な形質を生じさせることはできるが、解析のために胎子を子宮外へ取り出すと発生は中断されるので連続的な観察は不可能となる。これらの点を解決するためには体内の器官や母体内の胎子にも適用できる生体内組織の解析法が必要である。器官・個体内部の観察法には、超音波画像、X線撮影法・computed tomography (CT)、磁気共鳴画像、電子スピン共鳴画像、positron emission tomography 等があるが、分解能の高さと分析的手法への応用の可能性から、我々は磁気共鳴画像法 (magnetic resonance imaging; MRI) について検討している。

MRI の信号は観察対象の物理化学的性質に依存する。プロトン画像には水素原子の密度と局所環境が影響するので、生体においては水分および脂質の分布、組織内の自由水と結合水の比率等を無染色で観察することができる。MRI は X 線 CT では発見が難しい軟組織の異常が検出でき、医療分野で広く使用されている生物試料の非侵襲的観察法として優れた方法であるが、従来の臨床機の空間分解能は小動物の観測に十分ではない。そこで我々は磁気共鳴顕微鏡法 (magnetic resonance microscopy; MRM) [1, 2] と呼ばれる高分解能 MRI を利用している。MRM は高静磁場および強い磁場勾配を使用することで通常の臨床用と比較して 10 倍以上高い空間分解能が得られる。この手法により組織の形態や小動物の胎子の観察に必要とされるレベルで非侵襲的の多次元観測が可能となり、摘出標本についても複数の手法で解析できるという利点がある。また、高磁場の使用により化学シフト分解能も高まると考えられる。我々が使用している磁気共鳴顕微鏡装置は、プロトン共鳴周波数が 400MHz のフーリエ変換型 NMR 分光計に勾配磁場発生装置および画像観測プローブ等を組み合わせたもので、中心磁場 9.4T、89mm のワイドポア型超伝導磁石を使用しており、超伝導を維持するための寒剤を低温物質科学研究センターから受けている。本稿では我々が行っている実験のうち、レチノイン酸投与を行ったマウス胎子の固定標本の観察と、マウス雄性生殖器系の生体内観察について紹介する。

2. レチノイン酸投与によるマウス胎仔の形成不全の観察

レチノイン酸はビタミン A の活性型代謝物である。ビタミン A は哺乳動物にとって必須の栄養素であるが、妊娠個体における過剰な摂取は発生中の胚・胎仔に様々な形成不全を生じさせる[3-10]。我々の研究室では以前に妊娠マウスへのレチノイン酸の単回投与によって、胎仔の骨格に投与量および投与時期に依存した異常が生じることを報告した[11]。交配後 8.5 日に経母体的にレチノイン酸を投与されたマウスの胎仔では頭部、体幹、尾部の形成不全が観察された。このような胎仔の内部構造について MRM により検討した[12]。ジメチルスルフォキシドに溶解した 50 mg/kg 体重の全トランスレチノイン酸を交配後 8.5 日に腹腔内投与した母体から、交配後 11.5 日から 18.5 日の間にマウス胎仔を採取した。対照群として妊娠マウスにジメチルスルフォキシドのみを投与し、同様に胎仔を採取した。採取した胎仔は 80%エタノールまたは 20%中性緩衝ホルマリンで固定し、二次元フーリエ変換スピネコー (2DFT-SE) 法または三次元フーリエ変換スピネコー (3DFT-SE) によりプロトン画像を観測した。胎仔のサイズにより、プローブの直径は 10 または 20 mm、観測視野は各軸方向 10, 20, または 30 mm から選択した。2DFT-SE 法ではマルチスライススピネコー法により中心間隔 1mm で 3 または 5 枚の矢状断面を 256×256 マトリックスで観測した。また、繰り返し時間 (TR) およびエコー時間 (TE) の組み合わせは 200/5, 500/5, 1000/5, 1000/10, 1000/20 (TR/TE, 単位は msec, 以下同様に表記) とした。3DFT-SE 法では TR/TE = 200/5 とし, 128×128×128 または 256×256×32 マトリックスのデータを取得した。得られたデータはフーリエ変換により画像化した。

交配後 18.5 日の胎仔の 2DFT-SE 像では脊椎等の骨格、肝、腎、胃等の消化器系、心臓、肺等の腹腔および胸腔内の臓器および脳等の矢状面に現れる主要な構造が判別できた (図 1)。MRI における画像コントラストは観測対象核種 (本実験ではプロトン) の密度、スピン-格子緩和時間 (T1), スピン-スピン緩和時間 (T2) 等の違いによって生成する。ただし、MRM 画像においては拡散が主要なコントラスト形成機構であるという意見もある[2]。観察対象核種の密度の差異は TR が長く TE が短い画像での信号強度にもっとも良く現れ、T1 および T2 の差異はそれぞれ TR および TE による信号強度の変化に影響する。短い TR で観測した場合、T1 の短い部分が相対的に高信号である T1 強調画像になるが、本実験の胎仔標本では骨格が強調され、正中断面では鼻部、頭蓋底、脊椎に高信号の領域が観察された。長い TE で観測した場合、T2 の短い部分が低信号である T2 強調画像になるが、胎仔標本では骨組織を含む結合組織、心臓、肝臓が相対的に低信号となった。対照群の 18.5 日胎仔では明瞭な異常が観察されなかったのに対し、レチノイン酸投与群の胎仔では骨格異常が観察され、腰椎から

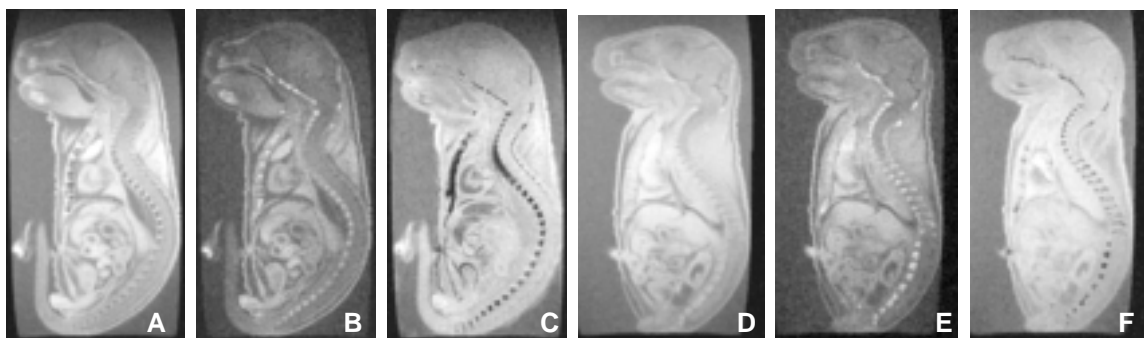


図 1. 交配後 18.5 日マウス胎仔の 2DFT-SE 像。A: 対照群プロトン密度強調, B: 対照群 T1 強調, C: 対照群 T2 強調, D: 投与群プロトン密度強調, E: 投与群 T1 強調, F: 投与群 T2 強調。

尾側の椎骨で顕著であった。また、これらの一部で脊髄の逸脱・屈曲や消化管の形成不全が認められた。3DFT-SE 法像では高信号の領域は主に骨格に認められた。レチノイン酸投与群の胎仔における骨格の異常としては 2DFT-SE 法で観察された椎骨の形成不全に加えて骨盤の形成不全が観察され、立体的な構造の形態が 2DFT-SE 法より明瞭に描出された。交配後 15.5 日の胎仔では TR と TE の組織コントラストに対する効果は交配後 18.5 日胎仔と同様であったが、短い TR で観測した画像で高信号を示す骨格内の領域は少なかった。正中断面で高信号が観察された領域は頭蓋底で、この高信号の領域は MRM 観察後に作製した組織標本において骨化の開始と赤血球の侵入が観察された領域と一致した。15.5 日胎仔の 2DFT-SE 像においてもレチノイン酸投与群では脊椎および脊髄の形成不全が観察され、観測後の標本から作製した組織切片において確認された。レチノイン酸投与群胎仔では消化管の下部が低形成で粗な配置となる傾向があったが、典型的な形態は特定できていない。交配後 13.5 および 11.5 日胎仔では発生の進んだ胎仔に比べて組織コントラストは低かった。これらのステージのレチノイン酸投与群胎仔では尾および尾方の椎骨原基の形成不全が観察された。

短い TR で観測した画像における高信号領域はスミスらによる報告[13]と同様に骨格の骨形成中の部位に対応していた。成熟個体の骨組織は通常、T1 および T2 強調像の両方で低信号である。しかしカルシウム粒子は表面緩和メカニズム (surface relaxation mechanism) により T1 および T2 を短縮する可能性があり、脳のカルシウム沈着において T1 強調像で信号強度の上昇が認められる場合があると報告されている[14, 15]。短い TR で観測された画像での骨化中の骨組織における信号増強は同様な機構により生じたと考えられる。ただし、実験モデルでは T1 強調像における信号強度はカルシウム粒子が重量比 30%までの濃度では上昇するが、それ以上の濃度ではプロトン密度の低下と T2 短縮により低下する[15]。長い TE で観測した画像における肝臓および心臓の信号低下はヘモグロビンに由来する鉄の常磁性効果によると考えられる。常磁性の鉄粒子は T1 および T2 の両方を短縮する効果があり、胎仔の肝が T1 強調像において高信号となる場合もある[13]。しかしながらこの実験での 2DFT-SE 観測の条件下では T2 短縮による信号の減衰が T1 短縮による信号増強をうち消したと推測される。

三次元法は二次元法に比べて測定に長時間を要しデータが大きいので処理ににくいという欠点はあるが、二次元法では解析しにくい立体的な構造の観察と記録、解析には適していると考えられる。レチノイン酸投与胎仔では腰椎、骨盤、尾椎および消化管の形成不全が代表的であったが、椎骨の異常は二次元像でも観察しやすいのに対し、脊椎に対して斜めに位置した骨盤の形態は観察が難しかった。また、マルチスライス像は隣り合うスライス間の干渉を避けるためにスライス間に隙間ができるので、細部の構造は検出できないことがある。そのため、三次元観測は立体構造の観察を容易にするだけでなく微小な観察対象の検出にも有用であると考えられる。

3. 観測法の改良と生体内観測への適用

MRI は化学固定後の標本の非破壊観察にも有用であるが、生体内構造の観測が可能である点が、さらに大きな特長である。そこで麻酔下でのマウスの断層画像の観察法について検討した。MRI は CT や超音波画像と比較して測定に長時間を要するが、生体の観察においてはこの点の改善が必要である。臨床機ではエコープラナー法等の高速撮像法が普及しているが、我々が使用している高磁場装置では T2 短縮による信号減衰、観測対象による磁場の不均一性、装置への負荷等から適用が難しいと考えられた。スピンエコー法での測定時間は概ね $TR \times \text{測定ステップ数} \times \text{積算回数}$ となる。測定ステップ数は位相エンコード数 \div 1 励起あたりエコー数で、位相エンコード数は観測データの各軸方向マトリッ

クス数で決まる（1方向については周波数エンコードを行うのでステップ数に影響しない）。1励起あたりで観測するエコーは信号の減衰があるので1エコーとした。これらから観測時間の短縮のために、TRの短縮、観測データマトリックス数の低減、および積算回数の低減の3点で改良が可能と考えられた。TRは信号強度に影響し、先に胎仔標本の観測で示したように通常のスピニングエコー法でTRを短くすると、大部分の領域で信号が低下して画質が低下すると共に、T1の短い組織のみが高信号である画像となり他の特徴についての観察ができない。そこで我々はスピニングエコー法の励起パルス幅を調節し90°より大きい角度のパルスとするFlip-back法について検討した。スピニングエコー法では1回目のパルスによる励起の後、180°パルスを照射してエコーを発生させるが、90°より大きい角度のパルスの後に180°パルスにより反転させると、エコー発生後の緩和に必要な時間は90°パルスを用いた場合より短くなるので、連続して短いTRでパルスを照射している状態では90°パルスで励起した場合より信号が強くなり、組織間のT1の違いによるコントラストは低下する（図2）。これによって、TRを長くしてTEを変化させた場合のT2の差異による組織間コントラストやプロトン密度の違いによるコントラストを観察することができる。現時点で三次元観測ではこの方法が使用できるようになったが、二次元法ではまだ適当な観測条件が得られていない。また空間分解能を維持して観測データのマトリックス数を減少させるために視野を制限し、積算回数を低減するために励起パルスの位相を交互に反転させて自由減衰信号によるノイズを視野の端に移動させる処理を行った。このような方法により、固定標本においても従来使用していた3DFT-SE法より観測時間を短縮してプロトン密度強調像を観察できた（図3）。

生体内観測ではマウスに麻酔を施し、幼若個体では直径20mm、成熟期以降の個体では直径40mmのプロープ内に保定した。MRIでは観察対象の動きが信号に大きく影響し、腹腔や胸腔内の器官では呼吸や心拍により画質の低下が生じることから、頭部と雄性生殖器系（精巣およびその近傍の領域）で二次元および三次元画像の観測条件を検討した。本稿では雄性生殖器系での結果を示す。二次元画像はマルチスライス法を用い、幼若個体は20×20mmの視野を128×128、成熟個体は40×20mmの視野を256×128マトリックスで、TRとTEを変化させて観測した。三次元画像は成熟個体において40×20×20mmの視野を256×128×32マトリックス（体軸方向の分解能が他より低い）で、Flip-backスピニングエコー法を用いてTRは一定（300msec）で励起パルス幅およびTEを変化させて観測した（図4）。

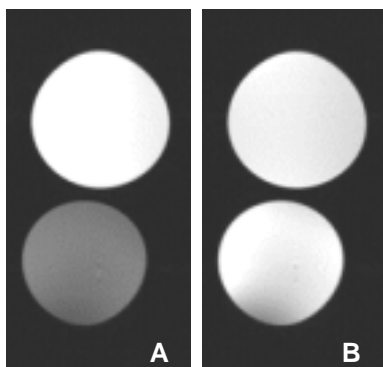


図2．励起パルスによる画像の変化（A: 90°, B: 154°）。上の円は植物油で下の水よりT1が短い。

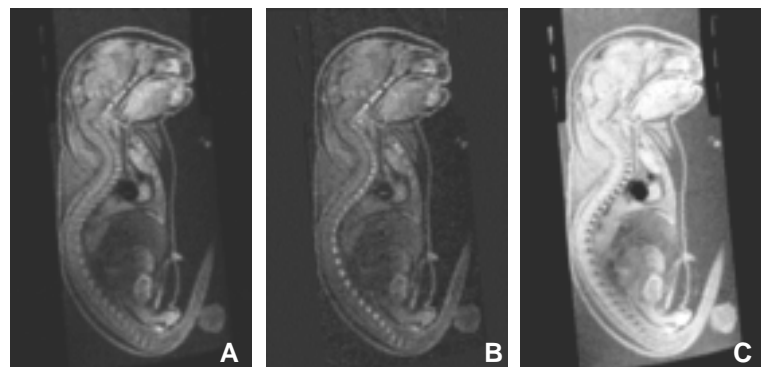


図3．通常のスピニングエコー法（A, TR = 300 msec）およびFlip-back法（B, TR = 500 msec）で観測したマウス胎仔標本の三次元画像中の矢状断面ならびに両画像から計算したT1が短い領域（C）。

生体内で観測した画像は，化学固定を行った標本と比較して，同じ TR，TE で観測した場合に信号 / 雑音比が低い傾向があった．2DFT-SE 像において，TR/TE = 4000/5 としたプロトン密度強調像では骨組織および消化管内腔は低信号で，脂肪はやや高信号であるが，その他の組織はほぼ均質な中程度の信号を示した．T1 強調像 (TR/TE = 1000/5 または 500/5) では脂肪組織が高信号を示し，それ以外の部分は低信号になった．TR/TE = 4000/20 または 4000/40 の T2 強調像では大部分の組織の信号は低下し，精巣，脂肪組織および精巣上部の一部と推定される領域が相対的に高信号となった．一部の個体では精巣周囲の結合組織の領域も高信号となった．プロトン密度強調，T1 強調および T2 強調 2DFT-SE 像を比較すると，精巣・精巣上部の描出には T2 強調像が適していると考えられた．幼若個体で経時的に観測を行ったところ，生後 15 日以前では精巣は腹腔内に観察され，生後 18 日以降の個体で下降が見られた．3DFT-SE 法で観測した T1 強調像 (TR/TE = 300/5) では 2DFT-SE 法での T1 強調像と同様に，脂肪組織が高信号を示してそれ以外の部分は低信号になり，精巣等は明瞭に観察できなかった．これに対して flip-back 法で観測した画像では T1 強調像と同じ繰り返し時間でも脂肪以外の組織の信号が増強し，プロトン密度強調像に近づいた．さらに flip-back 法で TE を延長した場合，2DFT-SE 法の T2 強調と同様，精巣，精巣上部，脂肪が相対的に高信号になった．以上のように励起パルスと TE により，3DFT-SE 法と同様に組織間のコントラストを調節する事が可能であり，雄性生殖器官の観察には flip-back 法で TE を延長することが効果的であると考えられる．

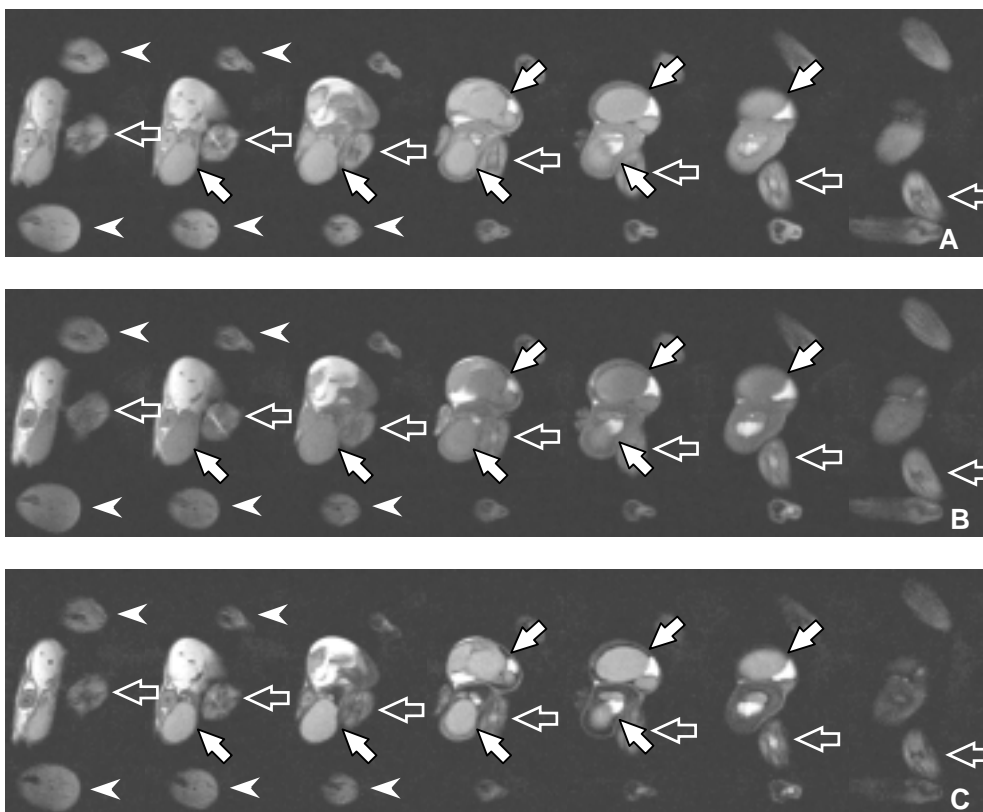


図 4．マウスの精巣近傍の横断像．麻酔下で観測した三次元画像 (Flip-back スピンエコー法) から抽出した．励起パルスとエコー時間の調節により，プロトン密度 (A)，T1 (B)，T2 (C) の効果を強調した．各列左が頭側，右が尾側で，白矢印は精巣，白抜き矢印は尾，矢尻は後肢大腿部断面を示す．

化学固定を行った標本の観察と比較して、生体内 MRM 画像は同じ観測条件では信号 / 雑音比が低くなる傾向があった。脳組織においてホルマリン固定した標本は生体または未固定標本と比較して T1 および T2 が短縮すると報告されているが[16, 17]、他の組織でも同様な傾向があると考えられる。また、プロトンの拡散速度も固定標本の方が低いので[18]、生体では拡散による信号の低下の影響が大きいと推測される。さらに腹部の 2DFT-SE 像では脊髄、脊椎骨、大腿骨の一部等の輪郭が比較的明瞭に描出されるのに対して、腹腔内臓器は不明瞭な場合があり、特に消化管と推測される低信号領域の輪郭が不鮮明であった。一般に MRI は中空の臓器のイメージングには弱いと言われているが、今回の実験では測定中の蠕動等の影響が大きいようであった。この問題は高速イメージング法の導入により改善されると考えられる。

4. おわりに

MRI には非侵襲的観察の他に、化学シフト画像による組成分布の解析や、標識の併用により遺伝子発現[19, 20]や細胞死の生体内検出[21]も可能である。観測時間の短縮についても、MRM への高速撮像法の適用が進んでおり、実験小動物胎仔の子宮内観察も試みられている[22, 23]。詳細な観察には一層の改良が必要であるが、これらの手法は医学生物学分野において有用な解析法となり得る。

本研究は眞鍋昇助教授(現東京大学農学生命科学研究科教授)、宮本元教授(現京都大学名誉教授)、ならびに久米新一教授との共同研究である。また、本研究の一部は文部省科学研究費補助金および日本学術振興会未来開拓学術研究推進事業の補助をうけて行われた。

参考文献

- [1] Eccles, C.D. and P.T. Callaghan, *J Magn Reson*, 1986. **68**: 393-398.
- [2] Neeman, M. and L.O. Sillerud, *NMR microscopy*, in *NMR in physiology and biomedicine*, R.J. Gillies, Editor. 1994, Academic Press: San Diego. p. 101-118.
- [3] Frenz, D.A., et al., *Teratology*, 1996. **53**(5): 292-303.
- [4] Abbott, B.D., M.W. Harris, and L.S. Birnbaum, *Teratology*, 1989. **40**(6): 533-53.
- [5] Cusic, A.M. and C.P. Dagg, *Teratology*, 1985. **31**(1): 49-59.
- [6] Grant, J.H., et al., *J Craniofac Genet Dev Biol*, 1997. **17**(1): 1-8.
- [7] Newall, D.R. and J.R. Edwards, *Teratology*, 1981. **23**(1): 115-24.
- [8] Ozeki, H., et al., *Exp Eye Res*, 1999. **68**(2): 223-8.
- [9] Stull, D.L. and K.C. Wikler, *J Comp Neurol*, 2000. **417**(3): 289-98.
- [10] Padmanabhan, R., *Reprod Toxicol*, 1998. **12**(2): 139-51.
- [11] Okuda, T., et al., *J Reprod Dev*, 1997. **43**: 59-64.
- [12] Sugimoto, M., et al., *J Vet Med Sci*, 2002. **64**(5): 427-33.
- [13] Smith, B.R., et al., *Comput Med Imaging Graph*, 1996. **20**(6): 483-90.
- [14] Suzuki, S., et al., *Acta Neurochir (Wien)*, 2000. **142**(7): 801-4.
- [15] Henkelman, R.M., J.F. Watts, and W. Kucharczyk, *Radiology*, 1991. **179**(1): 199-206.
- [16] Tovi, M. and A. Ericsson, *Acta Radiol*, 1992. **33**(5): 400-4.
- [17] Nagara, H., et al., *J Neurol Sci*, 1987. **81**(1): 67-77.
- [18] Sun, S.W., J.J. Neil, and S.K. Song, *Magn Reson Med*, 2003. **50**(4): 743-8.

- [19] Weissleder, R., et al., Nat Med, 2000. **6**(3): 351-5.
- [20] Louie, A.Y., et al., Nat Biotechnol, 2000. **18**(3): 321-5.
- [21] Zhao, M., et al., Nat Med, 2001. **7**(11): 1241-4.
- [22] Smith, B.R., et al., Magn Reson Med, 1998. **39**(4): 673-7.
- [23] Hogers, B., et al., Anat Rec, 2000. **260**(4): 373-7.