磁気共鳴を用いた生体レドックスイメージング (ReMI)

内海 英雄

Novel Redox Molecular Imaging “ReMI” with Dual Magnetic Resonance

Hideo Utsumi

*Innovation Center for Medical Redox Navigation, Kyushu University;
3-1-1 Maidashi, Higashi-ku, Fukuoka 812-8582, Japan.*

(Received April 3, 2013)

Free radicals, reactive oxygen species (ROS), and redox status are known to be involved in cell signaling, proteomics, *etc.* in homeostasis and oxidative disease. Electron spin resonance (ESR) spectroscopy is a very sensitive and selective technique for detecting free radicals, and we have developed an *in vivo* ESR spectroscopy/imaging system combined with a nitroxyl probe for noninvasive assessment of free radical reactions in various disease models such as diabetes, cancer, liver/lung damage, gastric lesions, brain injury, *etc.* The systematic measurement with probes having different degrees of membrane permeability make it possible to clarify the location of free radical generation in blood vessels, cell membranes, and the cytoplasm. Our findings strongly indicate the great advantage of the *in vivo* ESR spectroscopy/imaging/nitroxyl probe technique in biomedical sciences. However, the spatial resolution of the ESR spectroscopy imaging system is insufficient due to the short T_2 of probes. Proton magnetic resonance imaging (MRI) has significant clinical utility in the diagnosis of disease. Dynamic nuclear polarization (DNP)-MRI yields highly resolved images of free radical distribution in small animals by enhancing the water proton signal intensity *via* the Overhauser effect. We developed a new sequence for DNP-MRI and succeeded in obtaining simultaneous dual images using radicals labeled with ^{14}N and ^{15}N nuclei. This technique can visualize individual redox processes and the individual redox status of inner and/or outer cells in a dose-dependent manner. More recently, we have developed a novel DNP-MRI scanner and enables the use of DNP-MRI in different disease models.

Key words—reactive oxygen species; redox; magnetic resonance imaging; electron spin resonance; free radicals; oxidative disease

1. はじめに

卒業研究（東京大学薬学部）で「薬品製造工学」を選んだことが電子スピン共鳴（electron spin resonance; ESR）との出会いである。管教授の指示で当時博士課程2年生の桐野 豊さん（現徳島文理大学学長）の指導を受けることとなった。桐野さんはアスコルビン酸（ビタミンC）の酸化中間体をESRフロー法で研究しており、私のテーマは「アスコルビン酸とヒドラジンの反応中間体ラジカルの構造解析」であった。種々のアスコルビン酸誘導体を合成し、ヒドラジン類との反応中間体の構造解析をして修士論文とした。

博士課程進学時に自分自身で研究テーマを探ることになり生物関係に興味を覚え「スピンラベル法による膜脂質の動的構造に関する研究」とした。一人で、スピンラベル脂肪酸の合成、卵黄レシチンの抽出・精製、スピンラベル化リポソームの作製とESR測定を行った。幸い、国立予防衛生研究所から野島庄七先生が薬学部教授に赴任することとなり、井上圭三先生からリポソームの指導を受け、博士論文「スピンラベル法による膜脂質の動的構造に関する研究」をまとめた。

学位取得後、野島研で膜脂質の流動性と抗原性について研究し、1978年から2年間、ドイツのケルン大学医学部 Stoffel 教授の下で ^{13}C -NMR を用いた膜タンパク質・脂質相互作用の研究を行い、NMRへの親近感ができるとともに生命現象への関心が一層深くなった。

1982年に昭和大学薬学部衛生化学教室の助教授

The author declares no conflict of interest.

九州大学先端融合医療レドックスナビ研究拠点（〒812-8582 福岡市東区馬出3-1-1）

e-mail: hideo.utsumi.278@m.kyushu-u.ac.jp

本総説は、平成24年度日本薬学会賞の受賞を記念して記述したものである。

として赴任した。ESR や NMR による膜流動性の研究を継続していたが、1986 年にたまたま、日本電子の藤本氏から生体計測 ESR の報告例を聞き、瞬間的に「面白い」と思い、直ちに大学院生と一緒に装置開発に着手した。また、濱田教授のご支援で、私学助成「大型設備導入」で生体 ESR 画像解析装置が採択され、翌 1987 年に日本電子に共同開発を依頼した。多くの困難な事柄があったが、幸い完成し、マウスで ESR 測定と画像化研究を始めた。また、ラット用装置が必要となり、300 MHz ESR 装置の開発に着手した。日本電子の会社近くのとんかつ屋に OHP を持ち込み、技術者諸氏と熱く打ち合わせをし、ヒトの腕も入るループギャップ型共振器と装置が完成した。

1994 年に九州大学へ赴任した際、マウス用、ラット用 ESR 装置などの研究設備を昭和大学の厚意で九州大学に寄贈して頂き、病態モデル動物への応用を中心に研究を進めた。新規プローブ剤を合成することで、多くの疾患モデルでレドックスと病態発現の関係が明らかとなった。また、解剖学情報を付加するため、ESRI/magnetic resonance imaging (MRI) 融像可視化装置を開発した。2003 年には Philips 社が試作したオーバーハウザー効果を利用した dynamic nuclear polarization (DNP)-MRI に新たな解析アルゴリズム法を提案・導入するとともに機能性ニトロキシルプローブの開発、病態モデルへの応用研究を行った。しかし、Philips 社の R&D 装

置は感度が低いことから、2004 年から 5 年かけて 科学技術振興機構 (Japan Science and Technology Agency; JST) の先端計測機器開発事業の支援の下、高感度の DNP-MRI を試作した。

これらの成果が出始めた 2008 年に、科学技術振興調整費の先端融合領域イノベーション推進事業に応募することとなり、薬学が中心となり医学、農学、工学が加わりプロジェクト提案した結果、「先端融合医療レドックスナビ研究拠点」が採択された。この拠点は 10 年間の大型プロジェクトで、産学連携して新たな研究領域をイノベーションし研究結果を製品として社会還元することが求められている。特許の関係で、本稿で記述できないが、全く新しい概念のレドックス画像化システム “ReMI” に向けたシーズが蓄積しつつある。

2. *In vivo* 用 ESR 画像化装置の開発研究

最も馴染みのある UV 吸収分析から明らかなように、ほとんどの分析法は電磁波を試料に照射し変化を検出する。Figure 1 に電磁波の波長と検出に適した試料の大きさの関係を示すように、電磁波の中で波長が短い光は生体への浸透性が低い。電子スピン共鳴で用いる電磁波も、水など誘電率の高い試料では電磁波の電界成分と双極子相互作用することで誘電損失が起こり、試料は発熱（電子レンジの原理）し生体浸透性（skin depth と呼ぶ）も低くなる。そこで、生体計測では、①浸透性の高い低周波電磁波（1 GHz で 2 cm, 100 MHz で 20 cm 程度）と、②

Fig. 1. Relation between Electromagnetic Wave Length and Skin Penetration

電磁波の電界成分と試料との接触を抑える検出法（ループギャップ型，リ・エントラント型共振器や電界分離サーフェイスコイルなど）を用いることで，1985–86年に数カ所の研究所で生体計測 ESR の開発に成功していた。

筆者らも 1987 年に日本電子とともに装置開発を開始し，小野らが開発したシールド型ループギャップ共振器をベースに動物用横型と摘出臓器用縦型（温度調節可能）共振器を作製した。動物の放尿などにも配慮し試料部は密閉型で，縦型共振器では温度可変できる。当時は，1 GHz 発信機などの部品が軍需規制品に該当し，購入に苦労したと聞く。画像化に関しては日本電子に技術がなかったため，磁場勾配コイルや画像化のアルゴリズムソフト開発から着手した。磁場勾配下では通常の ESR スペクトルに位置情報が重畳（畳み込み）されて観測される。したがって，位置情報を得るには重畳スペクトルから通常スペクトル情報を除く逆重畳が必要で，逆重畳はフーリエ面で除算する方法が一般的である。この磁場勾配の向きを回転させ，各方向での一次元情報を得た後，逆投影することで 2 次元あるいは 3 次元の画像を作成する。この逆投影法では投影方向に星型のノイズが生じるので，ノイズ消去用フィルターを一次元情報に畳み込む方法が有効で，この演算にもフーリエ級数が有用とされていた。早速，磁場勾配コイルの自作に取り掛かり，失敗の連続であったが，最終的に Fig. 2(a) に示す磁場勾配コイルが完成した。また，フーリエ変換ソフトが市販されていなかったため，バタフライ法を利用し，逆投影法を自作した。データ取得は 16 bit の AD コンバー

ターを介して，磁場勾配制御は定電流電源をコンピュータ制御し行った。

この間，何度も日本電子（昭島）で打ち合わせを行い，西川先生や尾形先生の研究室に伺いご教示頂いた。これらの先行研究を基にして，1989 年に L-band ESR 装置が完成し昭和大学に導入されたが，導入直後の装置は共振器の結合調整が難しく，水溶液中のラジカルは検出できるが生理食塩水や動物中のラジカルは全く検出できなかった。当時の大学院生による血の滲むような試行錯誤を経て，マウスに尾静脈内投与したニトロキシラジカルのシグナル消失を検出し，論文発表に至った。¹⁾ その後，種々の改良を加えることで，20–30 g のマウス腹部など生体計測が可能となり高酸素暴露や食餌とレドックス代謝の関係が明らかになった。^{2,3)} また，画像化ソフトを徳島在住の芝氏に外注し，生体計測 ESRI 装置が完成した。二次元画像の一例を Fig. 2(b) に示す。ニトロキシラジカルの生理食塩溶液をマウス気管内に強制投与し胸部を画像化したもので，肺の形と一致し心臓部が欠けた画像を得た。⁴⁾ ちなみに，Fig. 3 は昭和大学の装置をカタログ用に撮影したもので，本装置は，大学や研究機関などに 20–30 台程が導入されている。

医薬品の薬効評価には病態モデルラットが汎用されている。既に，日本電子とは多くの共同開発を手掛けていたことから，より大きいラット用 300 MHz ESR 装置 [Fig. 4(a)] とヒトの腕も入る内径 65 mm のループギャップ型共振器 [Fig. 4(b)] が完成した。本装置は糖尿病モデルラットの解析に威力を発揮し，九州大学赴任後初めての臨床医学者と

Fig. 2. Home-made Field Gradient Coils (a) and ESRI Image of Mouse Lung after Tracheal Injection of Nitroxyl Radical (b)

の共同研究に発展した.⁵⁾

一方、生体内では複数のラジカルが存在していたり、異なる運動状態に由来し複数のスペクトルが観測されることが多い。複数種のスペクトルが混在する場合には逆重畳法での画像化は原理的に不可能で、スペクトル情報と空間情報を分離することが必要となる。このアルゴリズムは既に Eaton らから報告されていたが、肝心の部分は記載がなく、600 G/cm の磁場勾配コイルを自作しながら手探りで研

Fig. 3. *In Vivo* L-band ESRI System Commercialized from JEOL

Fig. 4. *In Vivo* 300 MHz ESR System (a) and Its Resonator (b)

Fig. 5. Fused Imaging System of *In Vivo* ESRI with MRI (a) and Home-made Dual Resonator for ESRI and MRI (b)

究を開始した。パソコン好きの大学院生と種々の議論を重ねながらソフトを作成した結果、ヒドロキシルラジカル ($\cdot\text{OH}$) と NO をそれぞれ DMPO ないし Fe-MGD 錯体で捕捉後、両ラジカル二次元空間分離画像を得た.⁶⁾ この方法は、動物体内あるいは組織切片での複数種のラジカル種や drug delivery system (DDS) (薬物輸送担体) の分別可視化を可能とし、病態解明や医薬品の解析に強力な手法となる.⁷⁾

ESRI はラジカルの可視化法として有効な手段であるが、臓器や組織との対応関係が同定できない。そこで、2000 年に科研費展開研究 A を申請し、日本電子と日立製作所の協力を得て、ESRI/MRI 融像可視化装置の試作を行った。診断用 0.2 T MRI の中古品を購入し、日本電子が試作した簡易型 ESRI 磁石との間に特注動物移動ベッドを設置した [Fig. 5(a)]. また、当時の大学院生が MRI・ESR コイルを試作し、融像画像を得ることに成功した [Fig. 5(b)].⁸⁾

マウス体内の油水分分配係数の異なる 2 種のプローブ、carbamoyl-PROXYL ないし carboxy-PROXYL を静脈内投与 (100 mM, 100 μL) し ESRI/MRI 画像を得ると、水溶性の carboxy-PROXYL では上腹部での残留性が高く心臓、肝臓、腎臓に分布するが、微膜浸透性の carbamoyl-PROXYL 投与では、直後に上腹部全体に分布するものの急速に減少することが観察された.⁹⁾

3. 生体計測 ESR を用いた病態モデルでのレドックス動態の解析

$\cdot\text{OH}$ やスーパーオキシドアニオンラジカル ($\cdot\text{O}_2^-$) など活性酸素の ESR 検出法としてスピントラップ法が汎用されている。しかし、*in vivo* ESR 装置は、感度が通常の ESR 装置の 1/10-1/100 と低いうえにスピニングダクトが生体内で非常に短寿命である

ため、*in vivo* ESR 装置で活性酸素を直接検出することは困難である。1950 年代の終わりから 1960 年代の始めにかけて、多種の環状ニトロキシラジカル（以前は「ニトロキシド」と呼んだが、Rozantsev 著“Free Nitroxyl Radicals”に依拠）が合成され、¹⁰⁾ 2,2,5,5-tetramethylpyrrolidine-1-oxyl (PROXYL) 誘導体や 2,2,6,6-tetramethylpiperidine-1-oxyl (TEMPO) 誘導体など種々のニトロキシラジカルが市販されている。筆者は大学院博士課程でスピンラベル法を研究していたが、ニトロキシラジカルが、生体内の種々の酸化還元酵素で容易に還元されることが欠点の 1 つであった。ニトロキシラジカルと生体内酸化還元酵素や遷移金属との反応について研究され、¹¹⁾ 活性酸素との反応でもシグナルが消失することも明らかになっていた。^{12,13)} そこで、ニトロキシラジカルと活性酸素との反応性に着目し「*in vivo* ESR/スピンプローブ法」を作業仮説として研究を進めた。この方法は、Fig. 6 に示すように、ニトロキシラジカルをスピンプローブ剤として疾患モデル動物の体内に投与し、その ESR シグナル強度の変動からレドックス状態を推測するもので、減衰速度に及ぼす各種抗酸化剤、阻害剤処置の影響を計測し生体内の活性酸素の生成とそのメカニ

ズムを解析する。筆者らは、鉄過剰負荷肝障害、¹⁴⁾ ディーゼルエンジン排気ガス惹起肺障害、¹⁵⁾ 脳虚血-再灌流障害、¹⁶⁾ 種々の胃潰瘍モデル（アンモニア惹起、¹⁷⁾ 水浸拘束、¹⁸⁾ あるいはインドメタシン誘発¹⁹⁾）、ストレプトゾトシン惹起糖尿病、²⁰⁾ ポルフィリン症皮膚障害、²¹⁾ アジュバンド関節炎、²²⁾ ジエチルニトロソアミン惹起肝がん、²³⁾ 移植がん、²⁴⁾ ドーパミン誘発脳機能障害^{25,26)} など種々の疾患モデル動物体内での活性酸素生成あるいはレドックス変動を *in vivo* ESR/スピンプローブ法を用いて無侵襲解析してきた。他の研究グループからは、X 線照射²⁷⁾ やがん、²⁸⁾ アスベスト肺、²⁹⁾ 糖尿病モデル、³⁰⁾ その他の疾患モデル³¹⁻³³⁾ などが報告されている。古い情報であるが、2008 年までの報告例を PubMed で検索し、その結果を Table 1 に示す。Table 1 中の # は上記のシグナル減衰の亢進を確認したものである。この手法は海外で腫瘍部位などでの酸素濃度計測にも応用されている。⁴⁰⁾

ニトロキシラジカルをプローブとする *in vivo* ESR/スピンプローブ法の科学的妥当性を実証するには、シグナル減衰速度と活性酸素生成量との関係を明確にすることが不可欠である。そこで、われわれは・OH 発生系のフェントン試薬を添加し *in vitro* ESR シグナル減衰速度を算出・解析した。次に、carbamoyl-PROXYL の代わりにスピントラップ剤 DMPO を添加し、生成するスピンアダクト DMPO-OH 生成量への阻害作用を解析したところ、シグナル減衰速度と DMPO-OH 生成量との関係は非常によく相関を示し ($R=0.92$, $p<0.0001$)、阻害も認められた (Fig. 7)。これらから、ニトロキシラジカルの ESR シグナル減衰速度から・OH 生成量を半定量的に評価できることが明らかとなった。¹⁹⁾

Figure 8 に示すように、ニトロキシラジカルに化学修飾を施すことで細胞内外のレドックス動態を分離解析できる。^{41,42)} 例えば、carboxy-PROXYL (*n*-オクタノール/水分配係数 $P_o/w=0.0047$) は主に水系に、MC-PROXYL ($P_o/w=8.7$) は膜内に存在し、carbamoyl-PROXYL ($P_o/w=0.68$) はわずかに膜と相互作用する。特に、AMC-PROXYL は細胞内のカルボキシルエステラーゼにより加水分解され carboxy-PROXYL に変換することで細胞内に蓄積する性質を有する。⁴²⁾ 尾静脈内投与後のマウス頭部における分布画像から AMC-PROXYL は脳質

Fig. 6. *In Vivo* ESR Spectra of Nitroxyl Radical in Mouse after Intra-Venous Injection (a) and Semilogarithmic Plot of *In Vivo* ESR Signal Intensities with the Period after Injection (b)

Table 1. Reports of Application of *In Vivo* ESR/Nitroxyl Probe Technique to Animal Models in Diseases

Experimental models	Authors	Journal (Year)	Reference
Hypoxia	Miura Y. <i>et al.</i>	Biochem Biophys Res Commun (1992)	(2) *, #
IR Injury	Utsumi H. <i>et al.</i>	Free Radic Res Commun (1993)	(34) *, #
X-ray Irradiation	Miura Y. <i>et al.</i>	Free Radic Biol Med (1997)	(27) #
STZ-induced diabetes	Sano T. <i>et al.</i>	Diabetologia (1998)	(5) *, #
RIF-1 Implantation	Kuppusamy P. <i>et al.</i>	Cancer Res (1998)	(28) #
Iron Overload	Phumala N. <i>et al.</i>	Free Radic Biol Med (1999)	(14) *, #
Seizures	Yokoyama H. <i>et al.</i>	Magn Reson Imaging (2000)	(35)
Lung Injury (DEP)	Han J. Y. <i>et al.</i>	Free Radic Biol Med (2001)	(15) *, #
Myocardial Infarction	Tsutsui H. <i>et al.</i>	Circulation (2001)	(31) #
Acute Asbestosis	Leonard S. S. <i>et al.</i>	Mol Cell Biochem (2002)	(32)
Gastric Ulcer (ammonia)	Kasazaki K. <i>et al.</i>	Free Radic Res (2003)	(17) *, #
MCAO	Yamato M. <i>et al.</i>	Free Radic Biol Med (2003)	(16) *, #
Diabetes (STZ)	Matsumoto S. <i>et al.</i>	Free Radic Res (2003)	(20) *, #
TNBS-induced Colitis	Togashi H. <i>et al.</i>	Gut (2003)	(33)
Gastric Ulcer (Stress)	Yasukawa K. <i>et al.</i>	Free Radic Res (2004)	(18) *, #
Protoporphyrria	Takeshita K. <i>et al.</i>	J Invest Dermatol (2004)	(21) *, #
Obesity	Sonta T. <i>et al.</i>	Free Radic Biol Med (2004)	(30) #
STZ-induced Diabetes	Tsubouchi H. <i>et al.</i>	Free Radic Biol Med (2005)	(36) #
Lung Injury	Kaimul Ahsan M. <i>et al.</i>	Free Radic Biol Med (2005)	(37) #
Gastric Ulcer (NSAIDs)	Utsumi H. <i>et al.</i>	J Pharmacol Ther Exp (2006)	(19) *, #
Adjuvant Arthritis	Yamada K. <i>et al.</i>	Free Radic Res (2006)	(22) *, #
Liver Injury (DEN)	Yamada K. <i>et al.</i>	Free Radic Biol Med (2006)	(23) *, #
UV-induced Skin Injury	Takeshita K. <i>et al.</i>	Free Radic Biol Med (2006)	(38) #
Diabetic Eye	Yamato M. <i>et al.</i>	Antioxid Redox Signal (2007)	(26) #
Tumor in Foodpat	Ichikawa K. <i>et al.</i>	Antioxid Redox Signal (2007)	(24) *, #
Myocardial Infarction	Tsutsumi T. <i>et al.</i>	Cardiovasc Res (2008)	(39) #

* Represents the reference reported by our group, and # shows the case in which the enhanced signal decay was observed.

Fig. 7. Relation of $\cdot\text{OH}$ Generation, Spin-Adduct of DMPO-OH and the Signal Decay Rate of Nitroxyl Probe (a) and Inhibition Assay of Its Signal Decay Rate with Spin-Trapping Reagent DMPO (b)

部分に高濃度で滞留し、種々の脳疾患における活性酸素動態の解析に有効であることが示され、種々のプローブ剤を組み合わせることで活性酸素動態を細胞膜内外で解析できる。

さらに、ニトロキシルラジカルの置換基を修飾することで活性酸素や抗酸化剤への感受性が異なるプローブも得られており、^{43,44)} 今後多くの酸化ストレス疾患での局所活性酸素動態・レドックス状態が解

Fig. 8. Development of Site-targeted Nitroxyl Probes and Their Pharmacokinetic Properties in Blood Vessel

明できるものと期待している。

4. 新たなレドックス画像化システム ReMI (Redox Molecular Imaging)

「オーバーハウザー効果」とは、Fig. 9 に示すように、フリーラジカルの電子スピンを ESR 遷移させ、電子スピンの双極子相互作用により核スピンの偏極 (dynamic nuclear polarization; DNP) する現象である。⁴⁵⁾ 熱平衡状態では、基底状態と励起状態にある核スピンの比はボルツマン分布に従い、例えば磁場が 0.4 T でのゼーマン分裂では、全部の核スピンの 1 000 000 個あるとすると、励起状態の核スピンの基底状態の核スピンの差はわずか 1.3 個にすぎない。一方、電子スピンの磁気回転比はプロトンに比べ 654 ほど大きく両状態間のスピンの差は 1.3×654 となり、DNP により核スピンのボルツマン分布が最大 (理論値) で 330 倍に増強される。したがって、DNP を MRI に応用すると通常の MRI 測定に比べ 330 倍 (理論値) の高感度化を図ることができる。Lurie らはこのオーバーハウザー効果に着目しフリーラジカルの画像化装置、DNP-MRI を開発した。⁴⁶⁾ ESRI は ESR シグナルの緩和時間が非常に短いため MRI に比べると空間分解能・時間分解能が著しく低い。DNP-MRI はラジカルの ESR 励起により偏極した水プロトンを MRI で可視化することで、高い空間分解能を持ち、短時間測定が可能である。オランダの Philips 社はこの有用性に着目し、造影剤メーカーである Nycomed 社 (Sweden) と協力して DNP-MRI 開発に着手し、

Fig. 9. Boltzman Distribution of Electron Spin and Proton (a), and Dynamic Nuclear Polarization (DNP; Overhauser Effect) (b)

1998 年にプロトタイプ 1 号機を完成した。しかし、MRI 磁場強度が 0.015 T と低いために十分な感度が得られず、現在、開発は中断している。GE 社は DNPI に高い関心を示し Nycomed を買収することで基本特許を取得し、生体外で DNP したプローブを担がんマウスに投与し代謝画像を得る方法を開発し新たな画像化法として世界戦略しつつある。

筆者は 1999 年に Philips の MRI 研究所を訪ねる機会を得、2001 年から DNP-MRI 装置の試作を検討した。Philips と Nycomed は DNP-MRI をがん組織の酸素濃度組織の可視化診断装置としての展開を考え、いくつかの研究室でも動物実験に成功していた。^{47,48)} 九州大学で大型装置の予算がつき、結果と

して試作を待つことなく Philips 社の R&D を導入することとした。導入に当たり、Philips の MRI 研究所を再度訪ね、新たな分離画像化アルゴリズムを提案した。 ^{14}N , ^{15}N 標識ニトロキシラジカルは、ESR スペクトルの共鳴磁場が異なる。そこで、Fig. 10 に示すように、ESR 励起を ^{14}N , ^{15}N の核種で交互に行えば、複数のプローブが同時に画像化できると考えた。⁴⁹⁾ このシーケンスでは、MRI 撮像する際に各位相エンコード毎に ^{14}N , ^{15}N を交互に ESR 励起することから、 ^{14}N , ^{15}N を同時分離した可視化が可能である。このパルスシーケンスを用いて、酸化反応と還元反応を同時に画像化できるかど

Fig. 10. Novel Sequence for Serapative DNP-MRI System

うかを検討した。Figure 11 に示すように、3 本の試験管には左から順に 20, 10, 5 mM のアスコルビン酸 (ascorbic acid; ASA) と ^{15}N で標識した carbamoyl-PROXYL を封入し、他の 3 本の試験管には、左から順に 1.2, 0.8, 0.4 U/mL のヒドロペルオキシダーゼ (hydropoxidase; HRP) と H_2O_2 , ^{14}N で標識したヒドロキシラミン体を封入し、DNP-MRI 同時分離画像を経時的に取得した。ニトロキシラジカルは、ASA の濃度依存的に画像強度が減少し、ヒドロキシラミン体は HRP の濃度依存的に画像強度が増加する様子を明瞭に示された。また、Fig. 12 に示すように、非膜透過性の ^{15}N -carboxy-PROXYL と膜透過性の ^{14}N -MC-PROXYL をアスコルビン酸封入リポソームと混合し同時分離画像すると、膜透過性 MC-PROXYL ではリポソーム内のアスコルビン酸との反応で顕著に輝度が減少するのに対し、非膜透過性 carboxy-PROXYL では輝度が全く変化しない画像が得られ、厚さ 8 nm のリポソーム膜を隔てた内側と外側でのレドックス動態を分離して同時に視覚化できることが示された。また、感度を向上させる表面コイルを作製し、⁵⁰⁾ 膜透過性のプローブを用いて脳梗塞モデルで可視化すると、梗塞巣で明らかなレドックス代謝機能障害が認

Fig. 11. Separative Imaging of Redox Reaction with DNP-MRI

(a) Phantom of reduction of ^{15}N -nitroxyl radical and oxidation of its ^{14}N -hydroxylamine. (b) Time-dependent DNP-MRI images of ^{15}N -nitroxyl radical and ^{14}N -hydroxylamine. (c) Simultaneous redox rate imaging.

Fig. 12. Separative Imaging of Site-Specific Reaction with DNP-MRI

Phantom consisted of ascorbic acid encapsulating liposomes and membrane-impermeable ^{15}N -carboxyl-PROXYL (3 tubes, black) or membrane-permeable ^{14}N -MC-PROXYL (4 tubes, light dark), and their simultaneous redox rate imaging.

められた。⁵¹⁾ この DNP-MRI は、上記のほかに、がん組織の酸素動態、血管壁透過性の画像解析⁵²⁾や脂質膜内でのレドックス動態、⁵³⁾ 個体全体でのレドックス応答分子の動態画像解析 (PK/PD 可視化)⁵⁴⁾ などでも極めて有効であることが示されている。また、質量分析画像化と組み合わせることで分子の変化量とも関連づけることができる。⁵⁵⁾ 特許の関係で詳細を記述できないが、既に合成物質を用いない可視化法も見い出しておりヒトへの応用が近未来で可能である。次項に述べる高感度装置の開発を含め、新規の画像化法としての Redox Molecular Imaging, ReMI を提案し、ヒトへの応用を進めている。

5. 高磁場 ReMI の開発

MRI の感度は外部磁場強度に大きく依存し、2-3 乗で感度が増大することから、世界的には 5-10 T の高磁場装置が開発途上で、3 T の臨床装置が市販されている状況であり、わが国の MRI 装置は最近では欧米の後塵を配している。生体計測において ESR の電磁波は生体浸透性がよい 600 MHz 以下に限定され、結果として ESR 共鳴磁場は 20 mT 以下となり MRI の外部磁場も同程度となる。事実、Phillips 社の MRI 磁場は 15 mT で診断機器として十分な感度が得られず、開発中断に至った。そこで、われわれは 2004 年から 5 年間、科学技術振興機構の先端計測分析技術・機器開発事業の支援を受け、高磁場 ReMI の開発を進めた。日本電子、富士電機、日立メディコ、ネオマックスと共同で MRI 磁場を 1 T 以上、ESR 磁場を 20 mT とし両磁

場間で実験動物を移動することで高感度化を図った。当初は試料を ESR・MRI 磁石間で往復移動させ、ReMI 撮像に成功した。さらにこの方法では加速度が大きく動物への負荷が大きいことから、新たに円移動用に両磁石を開発するとともに新たなアルゴリズムを検討した結果、磁気共鳴の常識では全く想像外の「等速円移動 MRI」法を発見した。⁵⁶⁻⁵⁸⁾ この装置は Fig. 13 に示すように、実験動物を等速回転させ、20 mT・ESR 磁場で 500 ms の DNP を行い 100 ms 後に 1.5 T・MRI で撮像する方法で、外径 1 mm のキャピラリー (厚さ 0.1 mm) に封入した 0.2-2 mM のラジカルが明確に可視化できている。また、マウス小腸に投与したラジカルも小腸が輪切りとなって可視化され、MRI 画像も非常に明瞭で、レドックス・臓器像の融像化が可能となった。今後は、新規ヒト診断装置に向け、要素開発の基礎研究を進めることでわが国初の革新的医療機器を目指したい。

6. おわりに

以上、*in vivo* ESR 画像化装置の開発、ニトロキシルプローブ法の確立、病態モデルでのフリーラジカル動態の無侵襲解析、機能性プローブの合成・応用、ESR/MRI 融像システムの開発及び、DNP-MRI を用いた分子イメージング研究について概説するとともに新たに新規レドックス分子画像化装置・解析法 ReMI を提案した。今後、生体磁気共鳴画像システムの高感度化、高解像度化がさらに進むにつれ、疾患モデルにおける生体レドックス動態の

Fig. 13. (a) Development of 1.5 T High Sensitive DNP-MRI, (b) Phantom Consisted of 6 Cappelaries and 5 Tubes in Micro-UV Cell, and Images of MRI and DNP-MRI

詳細が明らかになり、画期的な画像診断法へ発展するものと期待される。

謝辞 本研究は昭和大学薬学部衛生化学教室並びに九州大学大学院薬学研究院機能分子解析学教室(旧薬品物理化学教室)、九州大学先端融合医療レドックスナビ研究拠点で行われたものである。一緒に研究に尽力して頂いた職員・学生の諸氏に心から感謝申し上げます。

REFERENCES

- 1) Utsumi H., Muto E., Masuda S., Hamada A., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **172**, 1342–1348 (1990).
- 2) Miura Y., Utsumi H., Hamada A., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **182**, 1108–1114 (1992).
- 3) Gomi F., Utsumi H., Hamada A., *Life Sci.*, **52**, 2027–2033 (1993).
- 4) Takeshita K., Utsumi H., Hamada A., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **177**, 874–880 (1991).
- 5) Sano T., Umeda F., Hashimoto T., Nawata H., Utsumi H., *Diabetologia*, **41**, 1355–1360 (1998).
- 6) Matsumoto K., Utsumi H., *Biophys. J.*, **79**, 3341–3349 (2000).
- 7) Matsumoto K., Yahiro T., Yamada K., Utsumi H., *Magn. Reson. Med.*, **53**, 1158–1165 (2005).
- 8) Matsumoto S., Nagai M., Yamada K., Hyodo F., Yasukawa K., Muraoka M., Hirata H., Ono M., Utsumi H., *Concepts Magn. Reson. Part B*, **25B**, 1–11 (2005).
- 9) Hyodo F., Yasukawa K., Yamada K., Utsumi H., *Magn. Reson. Med.*, **56**, 938–943 (2006).
- 10) Rozantsev E. G., “Free Nitroxyl Radicals, Synthesis of some stable radicals and the most important intermediates,” ed. by Ulrich H., Plenum Press, New York, 1970, pp. 203–246.
- 11) Kocherginsky N., Swartz H. M., “Nitroxide Spin Labels: Reactions in Biology and Chemistry, Chemical reactivity of nitroxides,” CRC Press, New York, 1995, pp. 27–66.
- 12) Asmus K. D., Nigam S., Willson R. L., *Int. J. Radiat. Biol.*, **29**, 211–219 (1976).
- 13) Finkelstein E. M., Rosen G. M., Rauckman E. J., *Biochim. Biophys. Acta*, **802**, 90–98 (1984).
- 14) Phumala N., Ide T., Utsumi H., *Free Radic. Biol. Med.*, **26**, 1209–1217 (1999).
- 15) Han J. Y., Takeshita K., Utsumi H., *Free Radic. Biol. Med.*, **30**, 516–525 (2001).
- 16) Yamato M., Egashira T., Utsumi H., *Free Radic. Biol. Med.*, **35**, 1619–1631 (2003).
- 17) Kasazaki K., Yasukawa K., Sano H., Utsumi H., *Free Radic. Res.*, **37**, 757–766 (2003).
- 18) Yasukawa K., Kasazaki K., Hyodo F., Utsumi H., *Free Radic. Res.*, **38**, 147–155 (2004).
- 19) Utsumi H., Yasukawa K., Soeda T., Yamada K., Shigemi R., Yao T., Tsuneyoshi M., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **317**, 228–235 (2006).
- 20) Matsumoto S., Koshiishi I., Inoguchi T., Nawata H., Utsumi H., *Free Radic. Res.*, **37**,

- 767–772 (2003).
- 21) Takeshita K., Takajo T., Hirata H., Ono M., Utsumi H., *J. Invest. Dermatol.*, **122**, 1463–1470 (2004).
 - 22) Yamada K. I., Nakamura T., Utsumi H., *Free Radic. Res.*, **40**, 455–460 (2006).
 - 23) Yamada K., Yamamiya I., Utsumi H., *Free Radic. Biol. Med.*, **40**, 2040–2046 (2006).
 - 24) Ichikawa K., Sakabe E., Kuninobu K., Yamori T., Tsuruo T., Yao T., Tsuneyoshi M., Utsumi H., *Antioxid. Redox Signal.*, **9**, 1699–1707 (2007).
 - 25) Yamato M., Kudo W., Shiba T., Yamada K. I., Watanabe T., Utsumi H., *Free Radic. Res.*, **44**, 249–257 (2010).
 - 26) Yamato M., Matsumoto S., Ura K., Yamada K. I., Naganuma T., Inoguchi T., Watanabe T., Utsumi H., *Antioxid. Redox Signal.*, **9**, 367–373 (2007).
 - 27) Miura Y., Anzai K., Urano S., Ozawa T., *Free Radic. Biol. Med.*, **23**, 533–540 (1997).
 - 28) Kuppusamy P., Afeworki M., Shankar R. A., Coffin D., Krishna M. C., Hahn S. M., Mitchell J. B., Zweier J. L., *Cancer Res.*, **58**, 1562–1568 (1998).
 - 29) Yokoyama H., Lin Y., Itoh O., Ueda Y., Nakajima A., Ogata T., Sato T., Ohya-Nishiguchi H., Kamada H., *Free Radic. Biol. Med.*, **27**, 442–448 (1999).
 - 30) Sonta T., Inoguchi T., Tsubouchi H., Sekiguchi N., Kobayashi K., Matsumoto S., Utsumi H., Nawata H., *Free Radic. Biol. Med.*, **37**, 115–123 (2004).
 - 31) Tsutsui H., Ide T., Hayashidani S., Suematsu N., Shiomi T., Wen J., Nakamura K., Ichikawa K., Utsumi H., Takeshita A., *Circulation*, **104**, 134–136 (2001).
 - 32) Leonard S. S., Mowrey K., Pack D., Shi X., Castranova V., Kuppusamy P., Vallyathan V., *Mol. Cell. Biochem.*, **234–235**, 369–377 (2002).
 - 33) Togashi H., Oikawa K., Adachi T., Sugahara K., Ito J., Takeda T., Watanabe H., Saito K., Saito T., Fukui T., Takeda H., Ohya H., Kawata S., *Gut*, **52**, 1291–1296 (2003).
 - 34) Utsumi H., Takeshita K., Miura Y., Masuda S., Hamada A., *Free Radic. Res. Commun.*, **19** (Suppl. 1), S219–S225 (1993).
 - 35) Yokoyama H., Itoh O., Aoyama M., Obara H., Ohya H., Kamada H., *Magn. Reson. Imaging*, **18**, 875–879 (2000).
 - 36) Tsubouchi H., Inoguchi T., Sonta T., Sato N., Sekiguchi N., Kobayashi K., Sumimoto H., Utsumi H., Nawata H., *Free Radic. Biol. Med.*, **39**, 444–452 (2005).
 - 37) Kaimul Ahsan M., Nakamura H., Tanito M., Yamada K., Utsumi H., Yodoi J., *Free Radic. Biol. Med.*, **39**, 1549–1559 (2005).
 - 38) Takeshita K., Chi C., Hirata H., Ono M., Ozawa T., *Free Radic. Biol. Med.*, **40**, 876–885 (2006).
 - 39) Tsutsumi T., Ide T., Yamato M., Kudou W., Andou M., Hirooka Y., Utsumi H., Tsutsui H., Sunagawa K., *Cardiovasc. Res.*, **77**, 713–721 (2008).
 - 40) Yasukawa K., Kasazaki K., Hyodo F., Utsumi H., “Methods in Redox Signaling,” ed. by Das D. K., Mary Ann Liebert, New Rochelle, 2009, pp. 90–99.
 - 41) Sano H., Matsumoto K., Utsumi H., *Biochem. Mol. Biol. Int.*, **42**, 641–647 (1997).
 - 42) Sano H., Naruse M., Matsumoto K., Oi T., Utsumi H., *Free Radic. Biol. Med.*, **28**, 959–969 (2000).
 - 43) Kinoshita Y., Yamada K., Yamasaki T., Sadasue H., Sakai K., Utsumi H., *Free Radic. Res.*, **43**, 565–571 (2009).
 - 44) Kinoshita Y., Yamada K., Yamasaki T., Mito F., Yamato M., Kosem N., Deguchi H., Shirahama C., Ito Y., Kitagawa K., Okukado N., Sakai K., Utsumi H., *Free Radic. Biol. Med.*, **49**, 1703–1709 (2010).
 - 45) Overhauser A. W., *Phys. Rev.*, **92**, 411–412 (1953).
 - 46) Lurie D. J., Bussell D. M., Bell L. H., Mallard J. R., *J. Magn. Reson.*, **76**, 366–370 (1988).
 - 47) Li H., Deng Y., He G., Kuppusamy P., Lurie D. J., Zweier J. L., *Magn. Reson. Med.*, **48**, 530–534 (2002).
 - 48) Krishna M. C., English S., Yamada K., Yoo J., Murugesan R., Devasahayam N., Cook J. A., Golman K., Ardenkjaer-Larsen J. H., Subramanian S., Mitchell J. B., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 2216–2221 (2002).
 - 49) Utsumi H., Yamada K., Ichikawa K., Sakai K., Kinoshita Y., Matsumoto S., Nagai M., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **103**, 1463–1468 (2006).

-
- 50) Matsumoto S., Yamada K., Hirata H., Yasukawa K., Hyodo F., Ichikawa K., Utsumi H., *Magn. Reson. Med.*, **57**, 806–811 (2007).
- 51) Yamato M., Shiba T., Yamada K., Watanabe T., Utsumi H., *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, **29**, 1655–1664 (2009).
- 52) Matsumoto S., Yasui H., Batra S., Kinoshita Y., Bernardo M., Munasinghe J. P., Utsumi H., Choudhuri R., Devasahayam N., Subramanian S., Mitchell J. B., Krishna M. C., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **106**, 17898–17903 (2009).
- 53) Benial A. M., Utsumi H., Ichikawa K., Murugesan R., Yamada K., Kinoshita Y., Naganuma T., Kato M., *J. Magn. Reson.*, **204**, 131–138 (2010).
- 54) Kosem N., Naganuma T., Ichikawa K., Phumala Morales N., Yasukawa K., Hyodo F., Yamada K., Utsumi H., *Free Radic. Biol. Med.*, **53**, 328–336 (2012).
- 55) Miura D., Fujimura Y., Yamato M., Hyodo F., Utsumi H., Tachibana H., Wariishi H., *Anal. Chem.*, **82**, 9789–9796 (2010).
- 56) Ichikawa K., Utsumi H., WO Patent 2010004427A3 (2010).
- 57) Ichikawa K., Takahashi T., Utsumi H., U.S. Patent 201200068705A1 (2012).
- 58) Ichikawa K., Takahashi T., Utsumi H., EP Patent 2412309A1 (2012).