

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 10 月 22 日現在

機関番号：14202

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21591557

研究課題名（和文）極小超常磁性体酸化鉄造影ラット脳腫瘍MR像の造影効果に寄与する免疫学的要因の検討

研究課題名（英文）assessment of central nervous system immunity in a rat glioma model by USPIO-enhanced magnetic resonance imaging

研究代表者

井藤 隆太 (ITO RYUTA)

滋賀医科大学・医学部・講師

研究者番号：80263052

研究成果の概要（和文）：脳腫瘍部では中枢神経内で免疫反応に関与しているとされる樹状細胞（microglia）が活性化されていることが知られ、これが新しい免疫治療法にも取り入れられている。この免疫細胞の振る舞いを極小超常磁性体酸化鉄造影 MR 画像で描出できるかどうかの検討をしたところ、造影剤が免疫細胞中に取り込まれることが確かめられ画像化可能であると考えられたが、その実用化には免疫細胞外にある造影剤の効果を取り除き免疫細胞内造影剤による信号低下を分離する工夫が必要である。

研究成果の概要（英文）：Microglia has an important role in central nervous system immunity. Histopathologic studies of glioma tissue have revealed high levels of infiltrating microglia. Because microglia is an attractive candidate in immunotherapy for glioma, development of the method to monitor microglial function by magnetic resonance imaging is essential. We showed that ultra-small particles of iron oxide (USPIO) contrast agent could potentially enhance visualization of microglial function although the technique to suppress background signal intensity originating from USPIO outside of microglia should be needed.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合 計
2009 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010 年度	900,000	270,000	1,170,000
2011 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総 計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医師薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・放射線科学

キーワード：核磁気共鳴画像(MRI)、脳腫瘍モデル動物、USPIO 造影剤

1. 研究開始当初の背景

磁気共鳴(MR)画像法は多様な生体指標の測定が可能で高い空間分解能に加え組織コントラスト分解能の良好な画像が得られることから脳腫瘍性病変の診断、治療方法の決定、治療効果判定の手段として日常診療に広く浸透している。脳腫瘍性病変の形態的な情報は主に T₁ 強調像や T₂ 強調像から得られ、造

影剤を使用した際の信号増強の有無は腫瘍性病変の組織学的性質やその広がりを予想するために有用な情報を提供する。従来、中枢神経系造影 MR 検査では主にガドリニウム(Gd)造影剤が広く使用されてきたが、最近、新しい造影剤として径 15-30nm のデキストラン被膜で完全に覆われたオプソニン化しにくい鉄剤(Fe₂O₃ Fe₃O₄)である

極小超常磁性体酸化鉄 (ultrasmall superparamagnetic iron oxide, USPIO)造影剤の実用化が進められ、その長い血漿内半減期を利用したMR angiography用造影剤及び脳血流計測用(perfusion画像)造影剤としての、また、macrophageに取り込まれることから頸動脈壁動脈硬化性プラーク画像の描出、体幹部においてはリンパ節転移評価における有用性が認められている。脳腫瘍に対するUSPIO造影画像では、造影領域や造影されるタイミングがGd造影剤使用時に観察される造影効果とは必ずしも一致しない例が経験され、その造影機序は血液脳関門(BBB)の破綻の有無や造影剤のもれ出る間質の多寡を反映するGd造影剤とは異なると考えられているが、その詳細は明らかではない。脳腫瘍部分では中枢神経内で免疫反応に関与しているとされるmicroglia / macrophageを中心とした樹状細胞(dendritic cell)が活性化されていることが知られ、投与されたUSPIO造影剤由来の鉄の一部がこれらの免疫関与細胞に取り込まれる現象が報告されており、その造影効果は腫瘍及び周囲の免疫学的環境を反映している可能性も考えられている。脳腫瘍病変に対するUSPIOの造影作用及び機序の詳細を明らかにすることで、この免疫に関与している細胞を標識しMRで画像化することができれば、昨今の免疫学的治療をはじめとした新しい脳腫瘍治療法の適応の決定や治療評価判定において有用な情報を加えると考えられる。

2. 研究の目的

USPIO造影剤による脳腫瘍及び腫瘍周囲に認められる造影効果に関して免疫系、特に樹状細胞(dendritic cell)の関与について明らかにするために神経膠腫モデルラット

(N-ethyl-N-nitrosourea 誘発 glioma)の脳腫瘍造影MR画像を得るとともに組織学的評価を行うことで以下の点について検討する。

(1) 撮像シーケンス(Spin Echo(SE)-T₁強調画像(T₁WI)、SE-T₂強調画像(T₂WI)、Gradient Echo(GRE)-T₁WI、GRE-T₂WI)ごとの造影剤投与後撮像までの時間と造影効果(強さ及び造影範囲)との関係を明らかにしUSPIOの至適撮像法を検討する。

(2) USPIO造影剤はそのままのサイズではBBBを超えないことから、造影効果とBBB破綻の有無との関係を、BBBの破綻を反映していると考えられるGd造影画像の造影効果と比較、検討する。

(3) MR信号変化をもたらす造影剤由来の鉄の腫瘍及び腫瘍周囲の局在(間質か細胞内か、細胞内とすれば細胞の種類(腫瘍細胞、astrocyte、microglia / macrophage))を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 使用動物

脳神経膠腫モデル病変は、妊娠14-17日目のFisher-334ラットに50mg/kgのENUを腹腔内注射し経胎盤性に胎児に曝露することで、生後8匹(オス3匹、メス5匹、体重160g-380g)のラットに発生した11腫瘍。MR撮像はすべてイソフルレン吸入麻酔下(イソフルレン 2.0-4.0%, Air 1.5L/min, O₂ 0.5L/min)にて行い、温風にて保温を施行した。造影剤は尾静脈に留置した24G catheterより注入した。MR画像撮像後、paraformaldehyde in 0.1 M phosphate buffer (pH 7.2)で経心性に灌流固定し(造影剤投与後3時間後n=1、5-7時間後n=4、17時間以降n=3)取り出した脳から腫瘍が含まれた部分をMR画像撮像面に平行に合わせて切り出した。これを4℃に保った固定液中で3日間固定した後、パラフィン包埋し薄切組織標本を作製した。当実験に実験動物を使用すること及び実験操作に伴う動物の取り扱いに関しては滋賀医科大学動物実験委員会承認(09-137)を受けた。

(2) MR画像撮像

MR画像は、UNITYINOVA NMR system (VARIAN Inc, Palo Alto, CA, USA)を備えた12cm gradient set up to 400mT/m (Magnex Scientific Ltd., Abbingdon, UK)を装着したHorizontal 7T/40 cm magnet (Japan Superconductor Technology Inc., Kobe, JAPAN)で、ラットの頭部を内径5cmの自作受信コイル中に固定して以下の画像を撮像した。

撮像スライス数14、スライス厚1.2mm、スライス間隔0.2mm、matrix数256×128、Field of View (FOV) 30×30mm²はすべての撮像シーケンスで同一とした。

① Gd(Gd-)造影画像

SE-T₂WI (繰り返し時間(TR)/エコー時間(TE) 2500/18 msec, 加算回数(AVE)=2)を撮像後、造影前SE-T₁WI (TR/TE 850/12 msec, AVE=2)とガドジアミド(オムニスキャン 第一三共株式会社) 0.4mmol/kgを尾静脈に留置したcatheterから注入後のGd-SE-T₁WIを撮像。

② USPIO造影剤(USPIO-)造影画像

①と同じ条件のSE-T₂WI、SE-T₁WIに加えGRE-T₁WI (TR/TE 200/3.58 msec, Flip Angle (FA) 55度, AVE=6)、GRE-T₂WI (T₂starWI) (TR/TE 600/8 msec, FA 30度, AVE=2)の4撮像シーケンスを造影前、USPIO(名糖産業、愛知県清須市)10mgFe/Kgを尾静脈より留置したcatheterから注入後(8匹、11腫瘍)、投与2-3時間後(8匹、11腫瘍)、4-6時間後(7匹、10腫瘍)、16-21時間後(3匹、4腫瘍)、37-45時間後(3匹、4腫瘍)、62-69時間後(3匹、4腫瘍)に撮像した。

(3) 組織標本

パラフィン包埋した組織を3μmに薄切し、MR 画像面に一致する薄切切片に対して Hematoxylin-eosin(HE)染色、鉄染色(ベルリン青染色)に加え、中枢神経由来と考えられている免疫系樹状細胞 microglia に対する抗 Iba1 (ionized calcium binding adaptor molecule 1)抗体、macrophage 一般に対する抗 CD68 (ED1, rat macrophage lysosomal membrane)抗体免疫組織染色を行った。

(4) 検討項目

① 画像評価

得られた画像をモニター上に表示し二人の観察者により信号変化の程度及び範囲を決定、記録した。SE-T₂WI、SE-T₁WI 及び Gd-SE-T₁WI で腫瘍の存在する範囲を決定し、これと Gd 造影剤により造影された領域を基準に USPIO 造影後の信号変化領域(高信号化、低信号化)を二人の観察者の合議により決定した。

② 組織標本評価

鉄染色標本により鉄沈着部分を確認し、HE 染色、抗 Iba1 染色及び抗 CD68 染色標本を参照し鉄沈着の局在を決定した後、この鉄沈着の MR 画像の信号変化への寄与を確認した。

4. 研究成果

(1) 実験結果

① USPIO-SE-T₁WI にて信号上昇が認められた腫瘍

投与後 時間	投与 直後	2-3 時間	4-6 時間	16-21 時間 以降
SE-T ₁ WI	5/11	6/11	7/10	等信号(4)

高信号域は主に腫瘍深部領域に認められ、Gd で増強される範囲と比べ範囲は狭い。投与直後から高信号を示す腫瘍と投与2時間後以降に徐々に高信号を示す腫瘍がある。

② USPIO 投与後、信号低下が認められた腫瘍

投与後時 間	投与 直後	2-3 時間	4-6 時間	16-21 時間	37-45 時間	62-69 時間
SE-T ₁ WI	6/11	9/11	9/10	1/4	1/4	等(4)
SE-T ₂ WI	9/11	10/11	9/10	1/4	1/4	1/4
GRE-T ₂ WI	10/11	10/11	9/10	2/4	2/4	2/4
GRE-T ₁ WI	10/11	9/11	6/10	1/4	1/4	1/4

腫瘍辺縁優位に信号低下を認める腫瘍(n=5)と内部に信号低下を認める腫瘍(n=5)があった。また、USPIO-GRE-T₂WI(T₂starWI)でGdで増強される範囲よりも広い範囲で信号低下が見られる腫瘍(n=7)があった。

③組織標本による鉄の局在評価

腫瘍細胞間に Iba1 陽性細胞が認められ、これらの細胞内に造影剤投与3時間後以降鉄染色陽性物質を認めた。CD68 陽性細胞はごくわ

ずかに認めるが腫瘍部分のみならず脳組織内への遊走自体が乏しい。

(2) 考察

USPIO 造影剤を使用し活性化

microglia(=Iba1 陽性細胞)を MR 画像で描出することで、脳腫瘍性病変に対する免疫反応の視覚化を試みた。腫瘍部分に存在する活性化 microglia 内に USPIO 造影剤投与3時間後以降に鉄染色陽性物質を認めたが、この時間帯の MR 画像は血管内に残存していると考えられる比較的多量の USPIO 造影剤に起因する信号低下に microglia 内に分布する鉄に起因すると考える信号変化が埋もれてしまい、これらを分離することは困難であった。投与17時間後以降の MR 画像では腫瘍部分の信号低下は乏しく、この時期に microglia 内の鉄染色陽性物質に起因する信号低下を画像化するのは困難であった。CD68 陽性細胞は脳腫瘍部分への遊走自体が乏しく、この細胞を USPIO で標識した MR 画像で脳腫瘍性病変に対する免疫反応を評価するのは困難と考えられた。

USPIO 造影剤は血管内に比較的最長時間留まるとされ、より正確な血管床の評価が可能と考えられている。今回の実験で見られた造影直後から信号低下をきたす領域は血管内にとどまる USPIO 造影剤に起因すると考えられる。USPIO-GRE-T₂WI(T₂starWI)では、血管内 USPIO 造影剤の磁化率効果により実際の血管床より広い範囲で信号強度低下が生じる結果、この画像を用いた血管床面積の定量評価は過大評価につながる可能性があると考えられるが、増生したわずかな異常血管を鋭敏に描出可能と考えられ定性的評価方法としての有用性は期待できる。

一部の腫瘍において USPIO-SE-T₁WI で腫瘍内部に投与直後から増強効果と考える高信号変化を認めることから、USPIO 造影剤は血管内に比較的最長時間留まるとされているものの、BBB の破綻の程度が大きければ早期に間質への造影剤漏出が生じている可能性が考えられる。同時に、腫瘍の辺縁、および内部にも信号低下領域を認めることを合わせ、Gd 造影剤では一様に高信号に造影される領域を、間質と腫瘍血管床とに分離できる可能性が示唆される。USPIO-SE-T₁WI で、USPIO 造影剤投与後2時間以降で徐々に高信号となる結節を認めることから、BBB の破綻の程度が小さい場合には、USPIO 造影剤は造影後早期では血管内にとどまり、その後、緩徐に間質へ漏出していくことが推測された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔学会発表〕(計2件)

①山本敦子 井藤隆太、脳腫瘍モデルラット

を用いた極小超常磁性体酸化鉄MR造影剤による脳腫瘍造影効果の評価、第39回日本磁気共鳴医学会大会、平成23年9月30日、福岡県北九州市小倉

②井藤隆太、Gadolinium-enhanced 3D T₁-contrast inversion recovery fast spin-echo imaging、European Congress of Radiology 2012、平成24年3月1-5日、オーストリア国ウィーン

6. 研究組織

(1) 研究代表者

井藤 隆太 (ITO RYUTA)
滋賀医科大学・医学部・講師
研究者番号：80263052

(2) 研究分担者

北原 均 (KITAHARA HITOSHI)
滋賀医科大学・医学部・助教
研究者番号：40402721

(3) 研究分担者

地藤 純哉 (JITO JYUNYA)
滋賀医科大学・医学部・助教
研究者番号：50534161