

脳内微小透析法によりラット線条体に投与された ニトロキシドラジカルの ESR 画像

植田 勇人*²⁾, 横山 秀克*^{1,3)}, 大矢 博昭・鎌田 仁*¹⁾

*¹⁾山形県テクノポリス財団生物ラジカル研究所

*²⁾宮崎医科大学精神医学講座, *³⁾福島県立医科大学精神医学講座

ESR imaging of the rat brain with a nitroxide radical perfused by
in vivo microdialysis

*Ueda, Y.^{1),2)}, Yokoyama, H.^{1),3)}, Ohya-Nishiguchi, H.¹⁾ and
Kamada, H.¹⁾.*

1) Institute for Life Support Technology, Yamagata Technopolis
Foundation, 2-2-1 Matsuei, Yamagata 990, Japan 2) Department
of Psychiatry, Miyazaki Medical College, Kihara 5200, Kiyotake-
cho, Miyazaki 889-16, Japan 3) Department of Psychiatry,
Fukushima Medical College, 1-Hikarigaoka, Fukushima 960-12,
JAPAN

We report here our investigation of the spatial distribution
of free radicals using an electron spin resonance (ESR)-imaging
system combined with an in vivo brain microdialysis method,
which was performed in the resonator of the ESR-imaging
system. A non-magnetic cannula, newly developed in this study,
was used for the perfusion of the exogenous free radicals agent. A
nitroxide, 3-carbamoyl-2,2,5,5-tetramethylpyrrolidine-1-oxyl
(carbamoyl PROXYL), was used as the imaging agent in saline
solution at a concentration of 0.3 M, which was perfused into the
right caudate putamen of the rat at 2 ml/min by a microinfusion
pump. Two-dimensional ESR projection of the Z-X plane, which
was clearly distinguished (about 10 mm diameter) from the non-
perfused brain area, was obtained 6 hours after the beginning of
perfusion of carbamoyl PROXYL. The present method is
considered to be a useful tool to introduce stable free radicals into
a specific area of the brain.

KEY WORDS

ESR-imaging system; in vivo ESR; Rat brain; Nitroxide
radicals; Microdialysis

【目的】我々は、誘電損失が少ない低周波マイクロ波(約700MHz)を用いるin vivo ESR装置を開発してきた(6)。しかし、低周波ESRは装置感度が低いため、現段階では生体内で発生するフリーラジカルを検出するのは困難である(1-7)。そのため、スピンラベル剤であるニトロキシドラジカルのような安定ラジカルを小動物の体外より投与し、その分布状態を画像化するという研究が行われている。しかし、汎用されるほとんどのニトロキシドラジカルは脳内移行を示さないため、脳内特定部位におけるニトロキシドラジカルの画像解析は困難である(6)。この問題を解決する一手段として我々は脳内微小透析法(8-10)を応用し脳内特定部位に投与したニトロキシドラジカルのin vivo ESR画像を得る方法を開発したので、その方法と有用性について報告する。

【方法】まずin vivo ESR装置の共振器内で使用可能なラジカル供給子についてであるが、ラジカル供給子は脳内微小透析法において汎用されるI字型プローブを基にして、その部品をすべて非磁性体の材料を用いて独自に作成した。

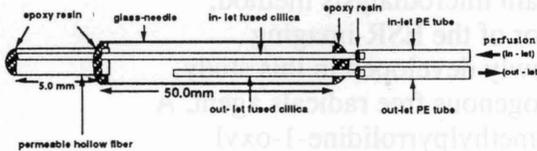


図1 ラジカル供給子の構成図

ラジカル供給子の作成について以下に記す(図1参照)。流入用内筒及び排出用内筒にはいずれも内径 $75\mu\text{m}$ 、外径 $150\mu\text{m}$ のポリイミド表面加工された石英製チューブを用い、外筒には外径1mm、長さ5cmのガラス管を用いた。流入用内筒は長さ6.5cmに、排出用内筒は長さ3.5cmにて使用する。それらの一端長さ1cmにわたる部分は、内径 $280\mu\text{m}$ 、外径 $610\mu\text{m}$ のポリエチレンチューブへの接続に使用され、流入用内筒は流入用ポリエチレンチューブに、

排出用内筒は排出用ポリエチレンチューブに接続された。各接続にはエポキシレジンを用いた。ポリエチレンチューブに接続された2本の内筒は外筒に挿入されエポキシレジンで固定された。長さ5mmにわたり外筒から突出する流入用内筒は、一端がエポキシレジンで閉じられた半透膜で覆われ、その半透膜はエポキシレジンで外筒のガラス管と接着固定された。今回半透膜には分子量7,000-8,000以下の物質を浸透圧差によってラジカル供給子外の標的領域に供給できるキュプロファン膜を使用し、I型ラジカル供給子が作成された。次にペントバルビタール麻酔下のウイスター系雄性ラットの右線条体にPellegrio and Cushman(11)らの脳図譜に従いラジカル供給子先端が位置するように脳定位術を行ない留置した(図2参照)。

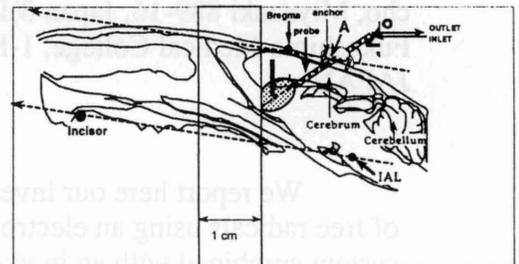


図2 ラジカル供給子の脳定位固定図とループギャップ共振器の位置関係(A: bregma, B: 灌流領域, C: IAL; intraaural line)

その後、ラットをループギャップ共振器(直径4cm、幅1cm)内に挿入し、ラジカル供給子の半透膜先端が共振器の尾側の後端に位置するように固定した。引き続き、注入ポンプを用いて0.3Mのニトロキシドラジカル、3-carbamoyl-2,2,5,5-tetramethylpyrrolidine-1-oxyl (carbamoyl-PROXYL)生食溶液をラジカル供給子を通じラット右線条体に灌流(2ul/min)した。灌流開始直後より、約26mTの静磁場内で約740MHzのマイクロ波40mWを共振器に照射してESR計測を行った。

【結果】

- 1 灌流開始直後にはESR信号は観測されなかった。
- 2 灌流操作2時間後には、carbamoyl-PROXYLのESR信号が観測され、灌流開始6時間後には信号のS/Nは向上した（図3参照）。

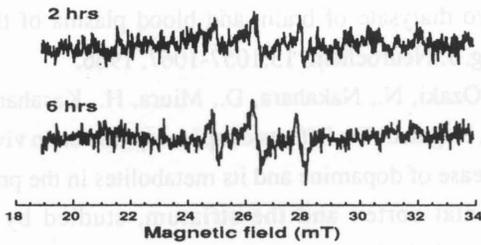


図3 carbamoyl-PROXYLのESRシグナルの経時的変化

3 この時点で、1mT/cmの磁場勾配を印加しながらESR測定を行い、ZX面での画像再構築(2次元投影)を行なったところ、ラジカル供給子を中心に右線条体に拡散したcarbamoyl-PROXYLが明確に描画された(図4 A参照)。

4 3にて描出されたpositionを確認するために、ラジカル供給子への carbamoyl-PROXYLの注入を停止した後、0.2M carbamoyl-PROXYLを5ml腹腔内投与してCT画像化(6)を行なった(図4 B参照)。この画像は、ラジカル供給子の半透膜先端に相当するZX面のCT像である。carbamoyl-PROXYLは血液脳関門を通過しないために脳実質は陰性描画されている。図4 Aと図4 Bの空間分解能はそれぞれ2.06mmと2.64mmである。図4 Aと図4 Bを合成したものが図4 Cである。さらに図4 Cにラット脳図譜を投影したものが図5である。この画像より脳内の被測定部位である右線条体に存在するcarbamoyl-PROXYLの拡散状態が確認された。

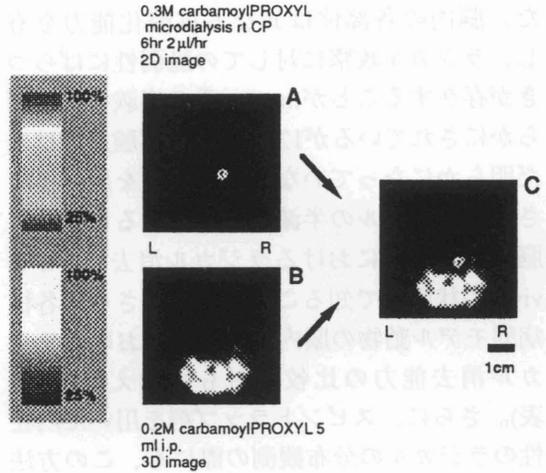


図4 ラット線条体に灌流投与された carbamoyl-PROXYLの分布(A)と全身投与による頭部ESR-CT画像(B)

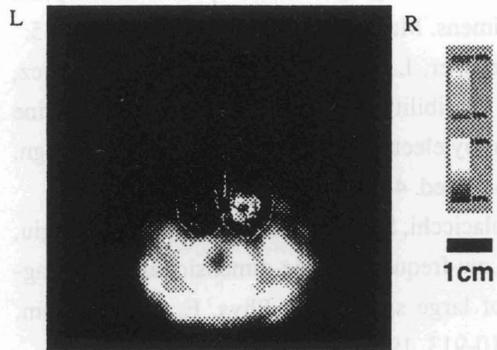


図5 右線条体に供給されたcarbamoyl-PROXYL

【考察】本研究で紹介した方法はラジカルの投与方法の一つであるが、1) 標的とする部位に定位的に投与することができる、

2) ラジカル分子のみを供給し比較的侵襲の少ない投与方法である、3) 灌流により投与したラジカルの分布状態をin vivo ESR装置で知ることができる、という特徴を有する。また、脳内の各部位は異なる抗酸化能力を有し、ラジカル攻撃に対しての脆弱性にばらつきが存在することがin vitro系の実験手法で明らかにされているが12)、in vivo実験系では未だ明らかになっていない。本方法を用い供給されるラジカルの半減期を測定することで、脳内特定部位におけるラジカル消去能力がin vivoの状態下で知ることが出来、さらに各種病態モデル動物の脳内特定部位におけるラジカル消去能力の比較検討も行なえる(未発表)。さらに、スピントラップ剤を用いた内在性のラジカルの分布観測の際にも、この方法が有効な手段となることが考えられる。

【参考文献】

- Berliner, L. J., Fujii, H.: Magnetic resonance imaging of biological specimens by electron paramagnetic resonance of nitroxide spin labels. *Science* 227:517-519, 1984.
- Fujii, H., Berliner, L.J. : One- and two-dimensional EPR imaging studies on phantoms and plant specimens. *Magn. Reson. Med.* 2:275-282, 1985.
- Berliner, L. J., Fujii, H., Wan, X., Lukiewicz, S.J.: Feasibility study of imaging a living murine tumor by electron paramagnetic resonance. *Magn. Reson. Med.* 4:380-384, 1987.
- Colacicchi, S., Indovina, P.L., Mono, F., Sotgiu, A.: Low-frequency three-dimensional ESR imaging of large samples. *J. Phys. E.: Sci. Instrum.* 21:910-913, 1988.
- Alecci, M., Colacicchi, S., Indovina, P.L., Mono, F., Pavone, P., Sotgiu, A.: Three-dimensional in vivo ESR imaging in rats. *Magn. Reson. Imag.* 8:59-63, 1990.
- Ishida, S., Matsumoto, S., Yokoyama, H., Mori, N., Kumashiro, H., Tsuchihashi, N., Ogata, T., Yamada, M., Ono, M., Kitajima, T., Kamada, H., Yoshida, H. : An ESR-CT imaging of the rat head of a living rat receiving an administration of a nitroxide radical. *Magn. Reson. Imag.* 10:109-114, 1992.
- 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.* 34:1317-1323, 1989.
- Bito, L., Davson, H., Levin, E., Murry, M., Snider, N.: The concentrations of free amino acids and other electrolytes in cerebrospinal fluid, in vivo dialysate of brain, and blood plasma of the dog. *J. Neurochem.* 13:1057-1067, 1966.
- Ozaki, N., Nakahara, D., Miura, H., Kasahara, Y., Nagatsu, T. : Effects of apomorphine on in vivo release of dopamine and its metabolites in the prefrontal cortex and the striatum, studied by a microdialysis method. *J. Neurochem.* 53: 1861-1864, 1989.
- Westerink, B.H.C., De Vries, J. B.: Characterization of in vivo dopamine release as determined by brain microdialysis after acute and subchronic implantations: methodological aspects. *J. Neurochem.* 51: 683-687, 1988.
- Pellegrino, L.J., Pellegrino, A.S., Cushman, A.J.: A stereotaxic atlas of the rat brain. New York and London: Plenum Press, 1986.
- Bruce, A. J. and Baudry, M.: Oxygen free radicals in rat limbic structures after kainate-induced seizures, *Free Rad. Biol. Med.*, 18 : 993-1002, 1995.