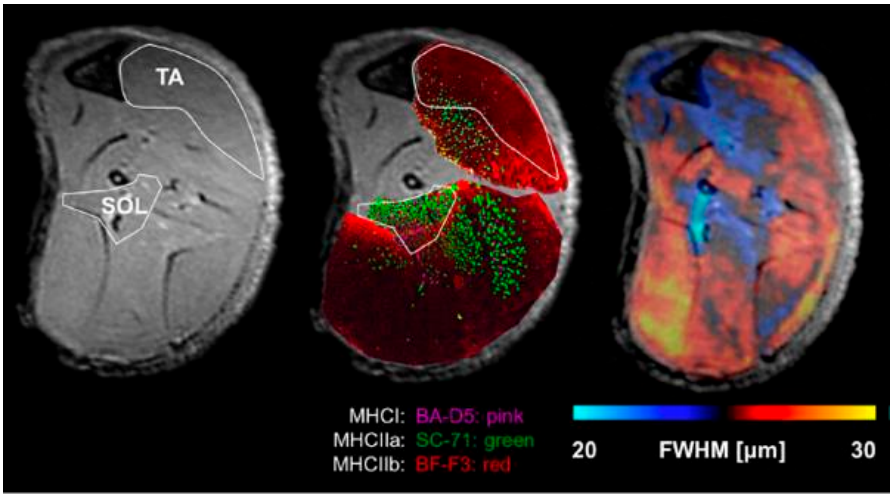
118　次世代MRIによる筋細胞構造・機能の定量計測法の開発	畑　純一

【目的】現在、骨格筋内の細胞構成比は、筋生検という筋肉の一部を切り取って行う検査により、測定するのが主流である。しかし、筋生検は身体への侵襲性に加え、手技の煩雑さが伴う。また現在の画像医学では、CT や MRI を用いた筋線維の可視化手法があるが、筋細胞の種類を識別できる解像度のものはなく、筋生検を用いた組織学と同等の情報を得ることは困難とされている。このため、高解像度かつ侵襲性の低い筋細胞検査技術の開発が望まれてきた。そこで我々は磁気共鳴画像法（Magnetic Resonance Imaging：MRI）による水分子の分子移動を計測し、生体マクロ構造自体のサイズを可視化する技術を開発することで、骨格筋の線維タイプを非侵襲的に識別することを目的とした。

【方法】水分子拡散現象を磁気共鳴信号へエンコードすることで筋細胞の種類鑑別を定量的に行う新規 MRI 技術の開発を目指す。このために本研究では大きく三つの実験を行った。一つは数値シミュレーション実験として、磁気共鳴数値シミュレーションとして、Bloch 方程式と物理方程式を考慮し、水分子のランダムシミュレーションを Matlab R2015a（The Math Works 社）を用いて開発し、シミュレーションした。二つ目は動物 MRI 計測実験ではシミュレーションにて得られた最適化数値を MRI 装置実機においてパルスシーケンンスプログラミングを行い、装置自体へ実装し生体下において実験動物の下腿部骨格筋の MRI 計測を行った。三つ目はヒト被験者 MRI 計測実験として、倫理委員会承認、そしてインフォームドコンセントによる同意後に MRI 計測を実施し、運動タイプの大きく異なる被験者を対象として、運動機能と開発手法による相関性を検討した。

【結果】骨格筋における数値シミュレーションによる水分子信号の挙動の結果、算出される骨格筋の構造径サイズは過小評価された。拡散計測法による構造評価にはΔ、δの特徴を十分に理解し、過大、過小評価をしないよう注意深く考察していく必要がある。また、骨格筋において正確に構造を評価する場合には 200 ms 以上の十分な拡散時間が必要であった。動物実験では従来法では判明できなかった筋細胞の種類を明確にコントラストつけて識別できるという結果が得られ、また免疫染色像と合わせることで開発手法を裏付けることができた。健常ボランティア実験では、筋肉の使い方が大きく異なる 2 タイプの健常ボランティアで開発手法による可視化を行うことで、筋肉の質が大きく異なるという結果が得られた。

下腿部骨格筋の免疫染色像と非侵襲細胞識別 MRI 法



118. 次世代 MRI による筋細胞構造・機能の定量計測法の開発

畑　純一

東京慈恵会医科大学 再生医学研究部

Key words：体力医学，骨格筋，MRI，筋細胞，生体可視化

緒　言

骨格筋の筋線維はその形や機能からいくつかの種類に分類される。主に遅筋線維（slow twitch：SW、type1 線維）と呼ばれる持久性の高い筋肉と、速筋線維（fast twitch：FT、type2 線維）と呼ばれる瞬発力の高い筋肉に大別される［1］。二者は、収縮特性、エネルギー系、疲労耐性などの特性が大きく異なる。生体における骨格筋はこれらの遅筋と速筋が混在し組織されている［2］。筋線維構成は各筋群において異なり、type1 が多いもの、またその逆とさまざまである。さらに、筋疾患、トレーニングにより筋線維の構成や太さは変化する［3～5］。このため、筋線維の構成や太さを理解することは臨床医学、スポーツ医科学など多岐にわたる分野で重要であると言われている。

現在、骨格筋内の細胞構成比は、筋生検という筋肉の一部を切って行う検査により、測定するのが主流である。しかし、筋生検は身体への侵襲性に加え、手技の煩雑さを伴う。また現在の画像医学では、CT や MRI を用いた筋線維の可視化手法があるが、筋細胞の種類を識別できる解像度のものはなく、筋生検を用いた組織学と同等の情報を得ることは困難とされている。このため、高解像度かつ侵襲性の低い筋細胞検査技術の開発が望まれてきた。そこで我々は磁気共鳴画像法（Magnetic Resonance Imaging：MRI）による水分子の分子移動を計測し［6，7］、生体マクロ構造自体のサイズを可視化する技術を開発することで、骨格筋の線維タイプを非侵襲的に識別することを目的とした。

方　法

水分子拡散現象を磁気共鳴信号へエンコードすることで筋細胞の種類鑑別を定量的に行う新規 MRI 技術の開発を目指す。このために本研究では大きく三つの実験を行った。

1. 数値シミュレーション実験

磁気共鳴数値シミュレーションとして、Bloch 方程式と物理方程式を考慮し、水分子のランダムシミュレーションを Matlab R2015a（The Math Works 社）を用いて開発し、シミュレートした。シミュレーションにおける MRI パルスシーケンスは Pulsed Gradient Spin Echo 法［8］とし、細胞構造や温度などの生体情報を設定しシミュレートすることで最適値の算出を行った。

拡散係数は自由拡散条件において、$D=2.0\times10^{-3}$ mm²/s になるように設定した。MRI ハードウェアの設定として傾斜磁場強度制限のない理想条件、動物用 MRI 実験機条件（＜600 mT/m）、臨床用 MRI 装置条件（≦40 mT/m）を設定した。実機実験環境に近づけるため拡散検出傾斜磁場の印加時間を 5、10、20、30 ms、印加間隔を 20、100、200 ms として拡散時間の調整を行った。骨格筋細胞を模擬した円柱構造の短軸面において、拡散シミュレーションを行い、最適な拡散時間の推定を行った。制限構造を反映した信号減衰が分かりやすいよう、平均細胞径 49.6 μm を設定した単一の円形制限構造を用いて［9］、構造内に拡散粒子数を分布させることで下記数式（1）、（2）を用いて拡散シミュレーションした［10］。また、得られた分布信号をフーリエ変換することで組織構造情報へと変換した。

$$\phi_i = \gamma g\left[\int_{\tau}^{\tau+\delta} x_k(t)dt - \int_{\tau+\Delta}^{\tau+\Delta+\delta} x_k(t)dt\right] \approx \gamma g\left[\sum_{t=\tau}^{\tau+\delta} x_{k,t} - \sum_{t=\tau+\Delta}^{\tau+\Delta+\delta} x_{k,t}\right](\Delta t) \quad \cdots (1)$$

$$E = \int_{-\infty}^{\infty} P(\phi)\cos(\phi)d\phi \approx \frac{1}{N}\sum_{i=1}^{N}\cos\phi_i \quad \cdots (2)$$

γ : Gyromagnetic ratio [Hz/T]、g : Amplitude [mT/m]、P(Φ)： Distribution of the phase shift、N : Particle number

2. 動物 MRI 計測実験

生体計測による、定量的な筋細胞情報の可視化技術開発と体力医学への展開として、得られた最適化数値を MRI 装置実機においてパルスシーケンンスプログラミングを行い、装置自体へ実装した。動物実験では動物実験委員会の承認後に生体下において骨格筋の MRI 計測を行った。また妥当性評価として、免疫染色による病理学的情報との比較を行った。免疫染色は、BA-D5、SC-71、BF-F3 の 3 試薬を用いた。MRI 計測は、動物実験用の超高磁場 9.4T MRI scanner（Bruker BioSpin、Max Gradient Strength : 700mT/m）装置及び Cryogenic probe（Bruker BioSpin AG、Fallanden, Switzlan）を使用した。計測条件はシミュレーションをもとにした拡散時間設定、TR : 4,000 ms、TE : 15.8 ms、FOV : 20 mm×12 mm、image matrix：67×40、pixel resolution：300 μ m×300 μ m、slice thickness：1.2 mm、b-value: 0 から 4,000 s/mm^2 と設定した。得られた画像はシミュレーションと同様にフーリエ変換することで組織構造画像へと変換した。

3. ヒト被験者 MRI 計測実験

ヒト対象計測として、倫理委員会承認、そしてインフォームドコンセントによる同意後に MRI 計測を実施し、運動タイプの大きく異なる被験者を対象として、運動機能と開発手法による相関性を検討した。MRI 計測は、ヒト臨床用の高磁場 3.0T MRI scanner（Siemens Healthcare、Erlangen、Germany、Max Gradient Strength：60 mT/m）装置及び 60-channel Body Coil（Siemens Health care）を使用した。計測条件は TR：4000 ms、TE：93 ms、FOV：40 mm×27.5 mm、image matrix : 128×88、pixel resolution : 3.12 mm×3.12 mm、slice thickness : 8 mm、b-value : 0 から 4,000 s/mm^2 と設定した。ヒト被験者計測では、実装テスト計測段階のため拡散時間設定はシミュレーション結果とは異なる値であり、拡散検出傾斜磁場の印加時間を 17.9 ms、印加間隔を 45.6 ms と設定した。得られた画像はシミュレーションと同様にフーリエ変換することで組織構造画像へと変換した。

結果および考察

1. 数値シミュレーション実験結果

骨格筋における数値シミュレーションによる水分子信号の挙動を示す図 1 の結果が得られた。実験機条件では、拡散時間に応じて理論的な信号挙動から MPG の印加間隔（Δ）に応じて diffraction peak が q-value の高い方へずれていく結果となった。これより算出される骨格筋の構造径サイズは過小評価された。また、臨床機条件では、実際の装置と同様に δ を固定し Δ を延長できない仮定、また十分な信号強度が確保できる条件でシミュレーションしたところ、理想条件とは大きく離れた結果が得られた（図 1）。結果より臨床機条件では実験機よりさらに過小評価される傾向が確認できた。このため拡散計測法による構造評価には Δ、δ の特徴を十分に理解し、過大、過小評価をしないよう注意深く考察していく必要がある。また、骨格筋において正確に構造を評価する場合には 200 ms 以上の十分な拡散時間が必要と考察される。

2. 動物 MRI 計測実験結果

実験動物を対象とし、開発技術にて可視化した画像結果が図 2 に示すように得られた。免疫染色の結果、マウス下腿部骨格筋の前脛骨筋は Type Ⅱb 細胞が豊富に存在した。また、前脛骨筋の内側には Type Ⅱa 細胞が豊富に存在してい

た。これを開発技術にて可視化した結果、従来法ではコントラストがつかなかったにもかかわらず、その細胞種の違いをくっきりと識別できるという結果が得られた。またマウス下腿部骨格筋では領域が狭く見づらいが中央部に Type I が豊富に存在する領域がヒラメ筋内にあった。こちらも同様に開発技術で明瞭にコントラストをつけることができた。免疫染色像と開発手法を合わせることで、骨格筋線維の種類を反映していることが証明された。

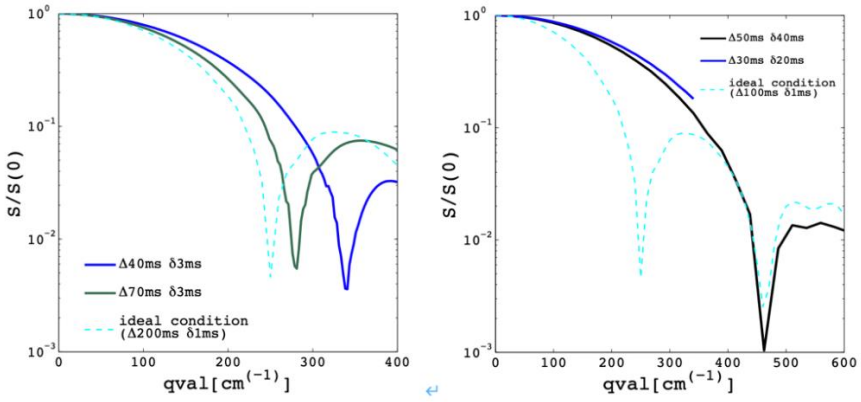


図 1. シミュレーション実験による骨格筋制限構造内の水分子信号の挙動

左図）実験機条件による結果。

右図）臨床機条件による結果。

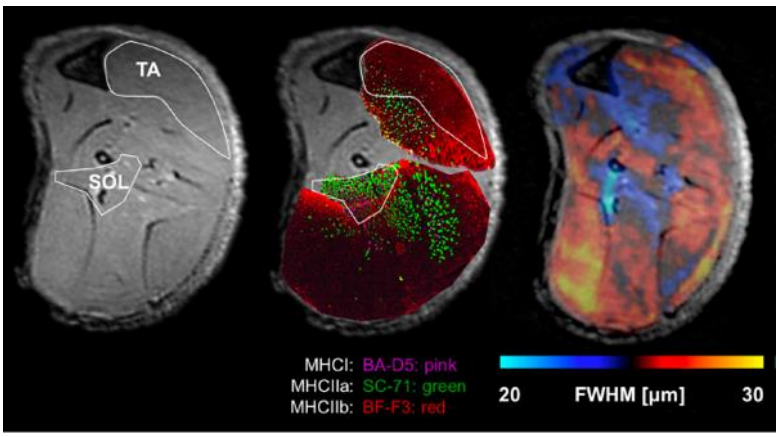


図 2. マウス下腿部における骨格筋細胞識別技術を適応させ可視化した断面画像

左図）通常の MRI 技術による画像。

中図）左図に免疫染色像を重ね合わせた画像。

右図）開発技術による画像。

3. ヒト被験者 MRI 計測実験結果

ヒト健常ボランティアを対象とし、開発技術にて可視化した画像結果が図 3 に示すように得られた。まず、通常の MRI では確認できなかった筋肉の質をコントラストとした結果が開発手法では確認できた。また、筋肉の使い方が大きく異なる 2 タイプの健常ボランティアで異なる結果が得られた。特にヒラメ筋内において筋細胞組成が異なっている結果が得られた。本ヒト健常ボランティアにおける実験は、本格的な研究をスタートしていくうえでの準備段階にあたる研究内容である。しかし、十分にそのポテンシャルは示されたといえる。

今後、ヒト臨床試験を経て本手法が確立されることにより、運動器の機能、疲労、トレーニングの定量評価が可能となることが期待される。また、骨格筋疾患の画像診断やそのメカニズム解明において新しい基準をもたらす可能性や、簡易な検査で筋種類分布や筋細胞径に基づくスポーツ適正判定が行える可能性、疲労度合い判定によるリハビリやトレーニングのスケジュール管理、高齢者サルコペニアなどの ADL 低下の原因解明など、本技術は医学、医療、スポーツ、健康へ大きく貢献することが期待される。

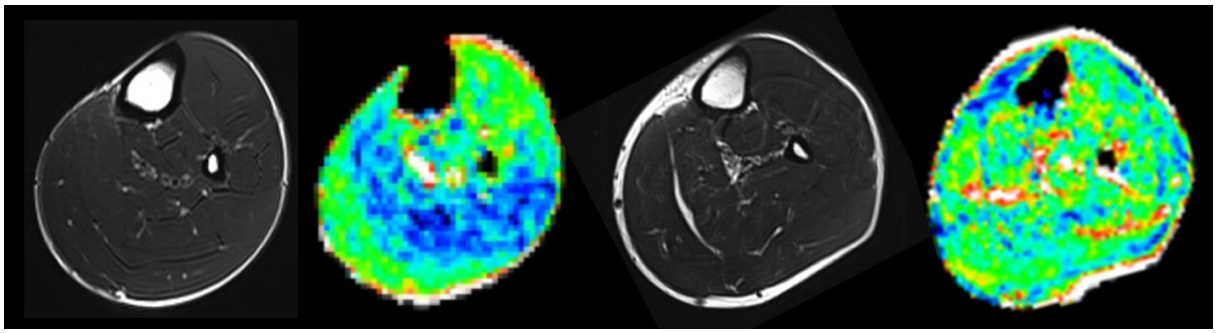


図 3. 健常ボランティア下腿部における骨格筋細胞識別技術を適応させ可視化した断面画像
左より順に、持久スポーツ選手の通常 MRI、開発技術、短時間スポーツ選手の通常 MRI、開発技術の画像。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、東京慈恵会医科大学再生医学研究部の岡野ジェイムス洋尚教授と長谷川実奈美助教である。また研究協力者である慶應義塾大学整形外科教室の中村雅也教授と中島大輔助教に多大な研究助言をいただき感謝申し上げます。そして、本研究は、2019 年度上原記念生命科学財団の助成金交付により遂行されたものです。この場を借りて深く御礼申し上げます。

文　献

1) Pette D, Staron RS. Myosin isoforms, muscle fiber types, and transitions. Microscopy research and technique 2000 Sep; 50 (6): 500-509. PMID: 10998639 DOI: 10.1002/1097-0029(20000915)50:6<500::AID-JEMT7>3.0.CO;2-7
2) Punkt K, Psinia I, Welt K, Barth W, Asmussen G. Effects on skeletal muscle fibres of diabetes and Ginkgo biloba extract treatment. Acta histochemica 1999 Feb; 101 (1): 53-69. PMID: 10093642 DOI: 10.1016/S0065-1281(99)80008-7
3) Punkt K, Mehlhorn H, Hilbig H. Region- and age-dependent variations of muscle fibre properties. Acta histochemica 1998 Feb; 100 (1): 37-58. PMID: 9542580 DOI: 10.1016/S0065-1281(98)80005-6
4) Yan Z, Okutsu M, Akhtar YN, Lira VA. Regulation of exercise-induced fiber type transformation, mitochondrial biogenesis, and angiogenesis in skeletal muscle. Journal of applied physiology. 2011 Jan; 110 (1): 264-274. PMID: 21030673 DOI: 10.1152/japplphysiol.00993.2010
5) Carroll S, Nicotera P, Pette D. Calcium transients in single fibers of low-frequency stimulated fast-twitch muscle of rat. The American journal of physiology 1999 Dec; 277(6): C1122-9. PMID: 10600763 DOI: 10.1152/ajpcell.1999.277.6.C1122
6) Callaghan PT, Coy A, MacGowan D, Packer KJ, Zelaya FO. Diffraction-like effects in NMR diffusion studies of fluids in porous solids. Nature 1991 Jun; 351(6326): 467-469. DOI:10.1038/351467A0

7) Cory DG, Garroway AN. Measurement of translational displacement probabilities by NMR: an indicator of compartmentation. Magnetic resonance in medicine 1990 Jun; 14 (3): 435-444. PMID: 2355827 DOI: 10.1002/mrm.1910140303
8) Stejskal EO, Tanner JE. Spin Diffusion Measurement : Spin Echoes in the Presence if a Time-Dependent Field Gradient. The Journal of Chemical Physics 1965 Jul,42 (1): 228-292 DOI:10.1063/1.1695690
9) Kern H, Barberi L, Löfler S: Electrical stimulation counteracts muscle decline in seniors. ront Aging Neurosci 2014 Jul; 189 (6): 1-11 PMID: 25104935 doi: 10.3389/fnagi.2014.00189
10) P. Linse, O. Soderman. The Validity of the Short-Gradient-Pulse Approximation in NMR Studies of Restricted Diffusion. Simulations of Molecules Diffusing between Planes, in Cylinders and Spheres. Journal of Magnetic Resonance 1995 Sep, 116 (1): 77-86 DOI:10.1006/JMRA.1995.1192