

Diffusion MRI を用いた生体内水分子の制限拡散に関する研究

Study of Restricted Water Diffusion in Biological Tissue
by Diffusion Magnetic Resonance Imaging

佐野真人・関野正樹・荻上真理・上野照剛

東京大学大学院医学系研究科, 文京区本郷 7-3-1 (〒113-0033)

M. Sano, M. Sekino, M. Ogiue-Ikeda and S. Ueno

Department of Biomedical Engineering, Graduate School of Medicine, University of Tokyo

7-3-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-0033

The exact mechanisms underlying the relationship between water diffusion and tissue microstructure remain largely unknown. Theoretically, signal decay by a motion probing gradient (MPG) in diffusion magnetic resonance imaging (MRI) represents the monoexponential form. However, it has been reported that in diffusion MRI experiments using high b values, the diffusion signal decay in biological tissues is not monoexponential, but is more accurately biexponential. Although unverified, it is assumed that the slow and fast diffusion components are assigned to the intra- and extracellular space respectively. In this study, we measured the fractions of fast and slow diffusion components of leukemic cells (TCC-S cells) using diffusion MR spectroscopy, and we compared the two diffusion components with the volume fractions. The results show that the assignment of diffusion components to volume fractions is not correct. The difference between the volume fractions and the fractions of components is attributed to the exchange of water molecules between two compartments through the cell membrane. To clarify the exact effects of the exchange of water molecules to MRI signals, we used a finite difference diffusion simulation model and were able to estimate the water exchange rate through the cell membrane.

Key words: magnetic resonance imaging, restricted water diffusion, biexponential decay

1. はじめに

核磁気共鳴画像法 (MRI) を用いた拡散現象の画像化は古くは 80 年代から行われてきたが^{1),2)}, 臨床応用が急速に進んだのは EPI (Echo Planar Imaging) と組み合わせて超急性期脳梗塞の診断に使われるようになった 90 年代からである³⁾. 拡散強調像が臨床応用され気軽に撮像できるようになると, 拡散現象という今まで MRI であまり利用していなかったコントラストが, いろいろな病変で興味深い像を示すことがわかってきた.

生体内における水分子の拡散現象は, 組織内の膜や繊維といった微小構造により制限を受けるため, MRI の信号は細胞の大きさや方向といった形態上の特徴に非常に影響を受けやすいことが指摘されてきた^{4),5)}. しかし, 生体内

拡散現象を特徴づける様々な物理量, 例えば細胞内外の拡散係数, 細胞の形状や体積, 細胞膜の透過性などに対して, MRI の信号が具体的にどのような依存性を示すのかについては, ほとんど明らかにされていない.

本研究では, 生体内水分子の拡散に関する物理量のうち, 特に細胞膜の水の透過性と細胞内拡散係数に注目し, これらが MRI の信号に及ぼす影響について数値解析により検討する. さらに, 細胞膜の水の透過性と細胞内拡散係数が未知の試料について MRI の信号の測定結果と数値解析結果とを比較することで, これらを推定する方法を提案する.

2. 拡散強調磁気共鳴画像法 (Diffusion MRI)

MRI で拡散を検出するために用いるのは, 比較的強い 1 対の反転傾斜磁場であり, これを運動検出傾斜磁場 (motion probing gradient: MPG) と呼ぶ (Fig.1). MPG を 180° パルスの前後に印加すると, 各スピンの存在する座標により経験する磁場の大きさは異なる. 静磁場の大きさを B_0 , MPG の大きさを G , 印加時間を δ , 2 つの MPG の始まりから始まりまでの時間を Δ , 磁気回転比を γ , MPG 印加時において印加軸に沿った励起スピンの座標上の位置を z とすると, あるスピンの共鳴周波数は

$$\omega = \gamma B_0 + \gamma G z \quad (1)$$

によって決定される. 印加する MPG が印加時間内に理想的な矩形波を示し, 渦電流などによる残留磁場がないものとする, MPG 印加により生じるスピンの位相変化の合計 ϕ は次式のようになる.

$$\phi = \gamma \int_0^{\delta} G z dt = \gamma G \delta z \quad (2)$$

よって 2 つの MPG 印加による正味の位相変化は

$$\phi_1 + \phi_2 = \gamma G \delta (z_1 - z_2) \quad (3)$$

となる. 式(3)より拡散の速度が速いほど, 位相の変化はより大きくなることがわかる.

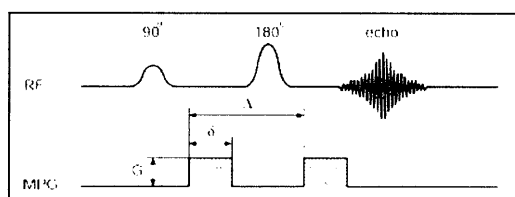


Fig. 1 Motion probing gradient.

一般に自由に拡散する物質に対して、1 対のパルス状 MPG により生じる信号減衰は次式により与えられる⁶⁾。

$$\ln(S/S_0) = -\gamma^2 \int_0^t \left(\int_0^{t'} G(t'') dt'' \right) \cdot \bar{D} \cdot \left(\int_0^{t'} G(t'') dt'' \right) dt' \quad (4)$$

ここで S および S_0 は、それぞれ MPG を印加した時としない時の信号強度であり、 $G(t')$ は一般的な傾斜磁場関数である。また D は拡散テンソルである。ここで $G(t')$ が理想的な矩形波を示し、渦電流などに起因する残留磁場がなく、画像化に用いる傾斜磁場は無視できるほど小さいとする。 x 軸のみに大きさ G_x の傾斜磁場を印加すると式(4)は

$$\ln(S/S_0) = -bD_{xx} \quad (5)$$

もしくは

$$S/S_0 = \exp(-b \cdot D_{xx}) \quad (6)$$

という関係式に書き換えられ、これは拡散 MRI における解析において基本的な等式である。式(6)からわかるように、信号減衰を表す関数として、 $\exp$ の項が一つなので monoexponential 減衰と呼ばれている。

$$b = \gamma^2 G_x^2 \delta^2 (\Delta - \delta/3) \quad (7)$$

は b 値 (b-factor) と呼ばれ、磁気回転比 γ と MPG の印加条件から求められる (Fig.1)。

3. 生体内水分子の拡散

生体内での水分子の拡散は、膜や繊維といった組織内の微小構造により制限を受け (制限拡散)、形態上の特徴に非常に影響を受けやすく、そのことを用いて临床上では様々な病変部の診断が可能となっている。しかし拡散現象と生体内組織の微細構造との関係の正確なメカニズムは今なお不明な点が多く存在する。

その一つとして、b-factor が大きい時に生体内組織では式(5),(6)が成立せず、multi-exponential な減衰 ($\exp$ の多項式) を示すということが報告されている^{5),7)}。b-factor が高くなるに従い、線形減衰から非線形減衰に、monoexponential 減衰から式(8)で表される biexponential 減衰へと変化する。つまり、生体内での水の拡散は遅い拡散の component と速い拡散の component、二つの component から成ると考えることができる。

$$S/S_0 = f_{slow} \exp(-b \cdot D_{slow}) + f_{fast} \exp(-b \cdot D_{fast}) \quad (8)$$

f_{fast} , f_{slow} , D_{fast} , D_{slow} はそれぞれの component の係数で

あり、拡散速度の速い方を fast diffusion component、遅い方を slow diffusion component という。二つの component に分けられるという解釈の一つとして、細胞外空間は細胞内空間より速く拡散していると考えられるため、fast diffusion component は細胞外空間に、slow diffusion component は細胞内空間に由来すると推定することができる。しかし実際に component と細胞内外の空間比を比較すると大きな差が生じている。その原因として細胞膜の水の透過の影響が考えられているが、今なお不明な点が多く存在する。

4. 実験

MRI 装置を用いて白血病細胞 TCC-S の b-factor と信号強度の関係を測定し、diffusion component と細胞内外空間の割合との比較を行った。

4.1 方法

サンプルとする細胞は、慢性骨髄性白血病から樹立された TCC-S 細胞株を用いた⁸⁾。TCC-S 細胞を用いた理由は、取扱いが簡単であり、細胞がほぼ球形であるので細胞内外の空間の割合を細胞の半径と密度から求めることができるからである。白血病細胞の電子顕微鏡図を Fig.2 に示す。細胞をインキュベータ (37 °C, 5 %CO₂) 内で培養し、測定直前に培養液を遠心分離することにより沈殿した細胞を抽出しサンプルとした。容器はプラスチックチューブを用い、MRI 装置 (4.7 T, Varian) を用いて b-factor と信号強度の関係を求めた。使用するパルスシーケンスの動作を確認するために、まず非生体内物質のサンプルとして、イソプロパノール ((CH₃)₂CHOH) で予備実験を行った。次に TCC-S 細胞での b-factor と信号強度の関係を測定し、減衰曲線を biexponential 関数で近似し fast diffusion component : f_{fast} , slow diffusion component : f_{slow} を求めた。撮像条件は TR (Repetition Time) = 1000 msec, TE (Echo Time) = 13 msec, Δ = 50 msec, δ = 25 msec, b-factor = 0 ~ 6000 sec/mm² とし、測定点を増やすため、画像化せずにスペクトルで信号強度を測定した。

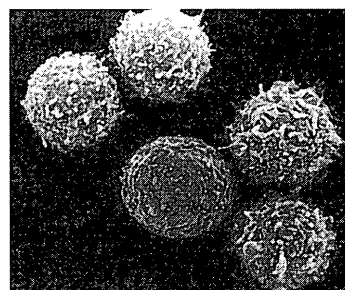


Fig. 2 Leukemic cells

4.2 結果と考察

イソプロパノールでの b-factor - 信号強度の関係を

Fig.3 に示す. Fig.3 よりイソプロパノールでは線形減衰を示し、式(5),(6)で表される monoexponential 減衰を示すことがわかる. また減衰直線の傾きから求まる拡散係数は $0.428 \times 10^{-3} \text{ mm}^2/\text{sec}$ (18.7°C)となり、他の測定例 ($0.44 \times 10^{-3} \text{ mm}^2/\text{sec}$, 22°C)と非常に近い値が得られた. よってここで使用するパルスシーケンスは正常に動作しているということが確認できた.

次に TCC-S 細胞を含んだサンプル溶液での b-factor—信号強度との関係を Fig.4 に示す. Fig.4 より、b-factorが増えるにしたがって、信号強度の対数は非線形に減少した. 生体に特有の制限拡散現象、multi-exponential 減衰が *in vitro* のサンプルでも現れることがわかった. ここでは減衰曲線を biexponential 関数 (式(8)) で近似することで、fast diffusion component: 0.708 ± 0.021 , slow diffusion component: 0.288 ± 0.018 を求めた.

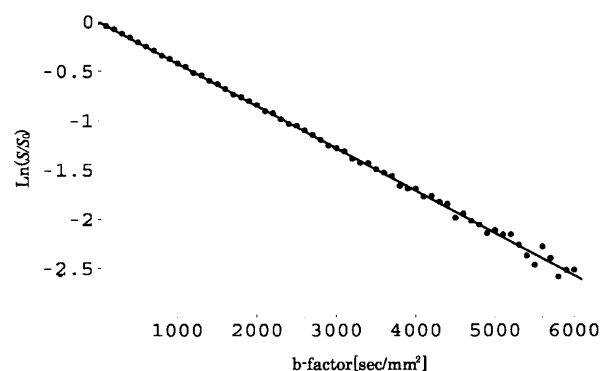


Fig. 3 Signal decay in isopropanol.

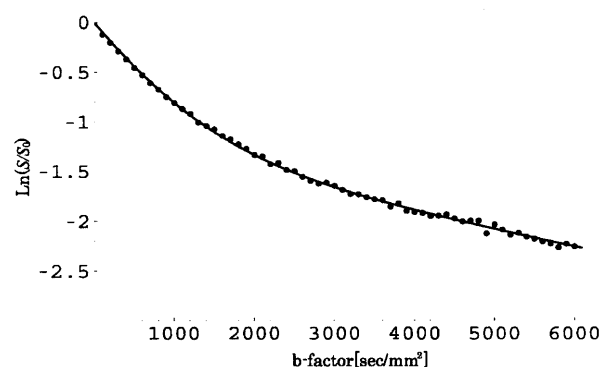


Fig. 4 Signal decay in TCC-S cells.

次に TCC-S 細胞を完全な球体と仮定して細胞の直径 ($17 \pm 0.62 \mu\text{m}$) と細胞密度 ($2.65 \times 10^8 \text{ cells/ml}$) からサンプル溶液中の細胞内外空間の割合を求めた. 細胞外空間は 0.318 ± 0.042 , 細胞内空間は 0.682 ± 0.053 となった. Fig.4 から求まる diffusion component と細胞内外空間の割合との比較に大きな差が生じていることがわかる. その差を生じさせる最も大きな原因として、細胞膜を通して細胞内外空間の水分子の透過・交換の影響が考えられ、slow

diffusion component が過小評価されているのではないかと推定できる. そこで細胞膜を通じた水分子の透過・交換が MRI の信号へ与える影響について数値解析 (シミュレーション) により検討した.

5. 数値解析

5.1 基本的なアルゴリズム

まず、Pick の拡散第二方程式 (拡散方程式) は次式で表される.

$$\frac{\partial c}{\partial t} = D \frac{\partial^2 c}{\partial x^2} \quad (9)$$

c は濃度, D は拡散係数である. ここでは一次元で考えて、有限差分法を用いて展開すると

$$\frac{c_i^{n+1} - c_i^n}{\Delta t} = D \frac{c_{i-1}^n - 2c_i^n + c_{i+1}^n}{\Delta x^2} \quad (10)$$

となる. Δt は時間ステップ, Δx はグリッド間隔, i はノード, n は時間ステップである. 時間ステップ $n+1$ について式(10)を解くと

$$c_i^{n+1} = s_{1 \rightarrow 0} c_0^n + s_{2 \rightarrow 1} c_2^n + (1 - s_{1 \rightarrow 0} - s_{1 \rightarrow 2}) c_i^n \quad (11)$$

と表すことができる. ただし

$$s_{i-1 \rightarrow i} = s_{i \rightarrow i-1} = D \frac{\Delta t}{\Delta x^2} \quad (12)$$

である. $s_{a \rightarrow b}$ は単位時間ステップあたりノード a からノード b へと移った粒子の割合であり、jump probability と呼ばれている. 拡散による磁化の変化をシミュレーションするには、式(11)の濃度 c を磁化ベクトル M に置き換えればよい.

拡散を検出するには MPG を印加する必要がある. MPG を x 方向に印加した時に、1 ステップあたりで変化する磁化の位相は

$$\Delta\phi = \gamma G (i - I/2) \Delta x \Delta t \quad (13)$$

で表される⁹⁾. よって MPG を印加することによる磁化の変化は

$$\begin{aligned} M_x^{n+1}[r] &= M_x^n[r] \cos(\Delta\phi) - M_y^n[r] \sin(\Delta\phi) \\ M_y^{n+1}[r] &= M_y^n[r] \cos(\Delta\phi) + M_x^n[r] \sin(\Delta\phi) \end{aligned} \quad (14)$$

で表される. M_x, M_y は磁化 M の x, y 成分であり、 r は位置を表すベクトルである. またすべての時間ステップにおいて磁化 M は

$$M^{n+1}[r] = M^n[r] \exp\left(-\frac{\Delta t}{T_2}\right) \quad (15)$$

で表される T_2 緩和により減衰し続ける¹⁰⁾. 式(11),(14),(15)で表されるすべての磁化の変化を組み合わせ、最終的な磁化はエコー時間 TE でのすべてのノードの磁化ベクトルを合計することで求めることができる.

5.2 シミュレーションモデル

2 次元モデルで計算を行った. 設定したモデルを Fig.5 に示す. TCC-S 細胞との比較のために細胞を一辺 $15 \mu\text{m}$

の正方形とし、細胞内、細胞外は一様な液体で満たされているとした。4章での実験結果と比較させるために細胞内空間の占める割合が70%になるように細胞外空間を設定した。細胞外空間はTCC-S細胞の培地で満たされているとし、細胞外拡散係数を培地の拡散係数 $0.00280 \text{ mm}^2/\text{sec}$ に設定した。細胞数は1個とし、異方性はないと考え、MPGをx軸方向に印加した。

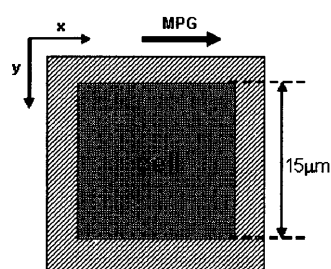


Fig. 5 Two-dimension simulation model.

5.3 結果と考察

まず細胞外拡散係数を D_{extra} ($0.00280 \text{ mm}^2/\text{sec}$)、細胞内拡散係数を D_{intra} とし、 $D_{intra} = d \times D_{extra}$ ($d=0.0 \sim 1.0$) と変化させ、細胞膜を通した水分子の透過はないと設定した ($S_{exchange}=0$)。結果を Fig. 6 に示す。次に細胞内拡散係数 D_{intra} を一定にし ($D_{intra}=D_{extra}$)、細胞膜の水透過性を示す jump probability: $S_{exchange}$ を細胞外空間の jump probability: S_{extra} に対して、 $S_{exchange} = j \times S_{extra}$ ($j=0.0 \sim 1.0$) と変化させた。結果を Fig. 7 に示す。Fig. 6, 7 より細胞内拡散係数が小さくなればなるほど、また細胞膜の水の透過性が小さくなればなるほど MRI の信号は減衰しにくくなっている様子がわかる。

細胞内拡散係数と細胞膜の水透過性がともに MRI の信号に大きく影響を及ぼし、diffusion component と細胞内外空間との割合の違いに大きく関係していると考えられることができる。

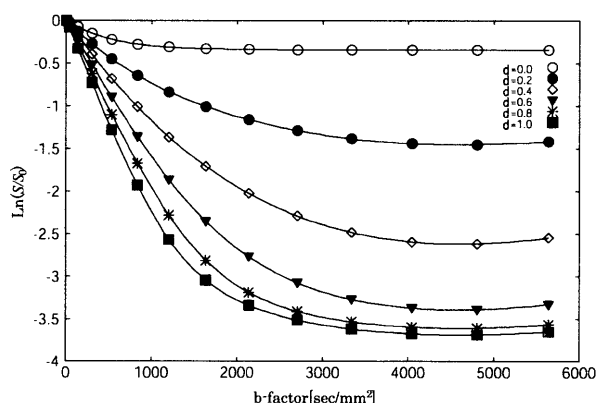


Fig. 6 Simulation results for different diffusion coefficients of intracellular space.

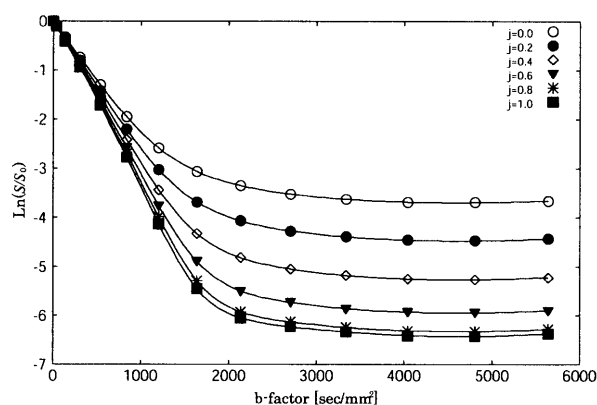


Fig. 7 Simulation results for different exchange rates of water molecules between the cell membrane.

次に細胞内拡散係数 D_{intra} と膜の透過性を示す $S_{exchange}$ を同時に変化させ、数値解析結果と4章で行ったTCC-S細胞での実験結果の比較を行い、未知数である D_{intra} と $S_{exchange}$ の推定を試みた。評価関数として

$$F = \sum_i (S_{the,i} - S_{exp,i})^2 \quad (16)$$

を定め、 F が最小となる時の値を求めた。 S_{the} は計算値、 S_{exp} は実験値である。 d, j ともに 0.001 間隔で変化させた。 $d=0.259, j=0.001$ の時、評価関数 F が最小となり、その時の解析値と実験値との比較を Fig. 8 に示す。この時、細胞内拡散係数: $D_{intra}=0.000725 \text{ mm}^2/\text{sec}$ 、細胞膜の jump probability: $S_{exchange}=0.000249$ が求まった。

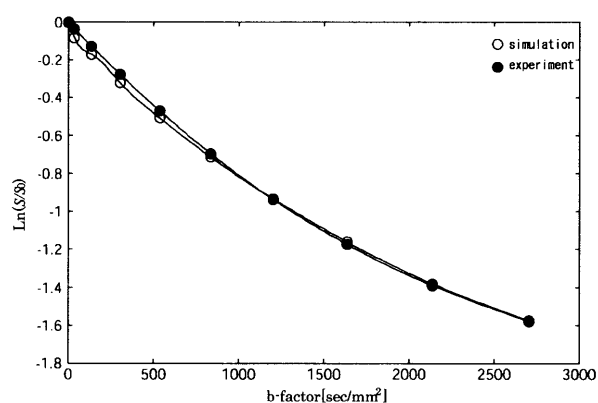


Fig. 8 Comparison between simulation results and experimental results.

6. 結論

Diffusion MRI を用いて測定した b-factor—信号強度の関係が、白血病細胞 TCC-S を含んだサンプルでは生体内組織に特有の biexponential 減衰を示すことがわかった。信号減衰曲線からそれぞれの diffusion component を求め、

fast diffusion component が細胞外空間に, slow diffusion component が細胞内空間に由来するという仮定のもとで解析を行うと, diffusion component と細胞内外空間との割合には大きな差が生じた. この差が生じる原因として細胞膜を通しての水分子の透過が考えられるが, その影響を数値解析により検討してみると, 膜の透過性の大小が MRI の信号に大きな影響を及ぼし, また実験結果との比較から未知数だった膜の水透過率と細胞内空間の拡散係数の推定が可能であることがわかった. 本手法を実際の生体組織に適用可能とするため, 今後は細胞外空間の拡散係数や細胞内外空間の割合が未知の場合, さらに細胞が形状異方性を持つ場合に対して, 本手法の拡張や正当性, 妥当性の評価を行う必要がある.

謝辞 本研究は文部科学省科学研究費補助金特別推進研究 (No.12002002) の援助によった.

文 献

- 1) D. Le Bihan, E. Breton, D. Lallemand, P. Grenier, E. Cabanis, M. Laval-Jeantet: *Radiology*, **161**, 401-407, 1986
- 2) K. D. Merboldt, W. Haricke, J. Frahm: *J Magn Reson*: **64**, 479-486, 1986
- 3) M. E. Moseley, J. Mintoravitch, Y. Cohen, H. S. Asagari, N. Derugin, D. Norman, J. Kucharczyk: *Magn Reson med*: **14**, 330-346, 1990
- 4) T. Niendorf, R. M. Dijkhuizen, D. G. Norris, M. van Lookeren Compagne, K. Nicolay: *Magn Reson Med*: **36**, 847-857, 1996
- 5) C. A. Clark, D. Le Bihan: *Magn Reson Med*: **44**, 852-859, 2000
- 6) Stejskal EO, Tanner JE: *J Chem Phys*: **42**, 288-292, 1969
- 7) Chris A. Clark, Le Bihan: *Magn Reson Med*, **44**, 852-859, 2000
- 8) Y. Kano, M. Akutsu, H. Mano, Y. Sato, S. Tsunoda, Y. Homma, Y. Fukukawa: *Blood*, vol **97**, pp. 1997-2007, 2001.
- 9) C-L. Chin, F. Wehrli, S. Hwang, M. Takahashi, D. Hackney: *Magn Reson Med*, **47**, 455-460, 2002
- 10) F. Bloch: *Phys Rev*, **70**, 460-474, 19

2003 年 10 月 28 日受理, 2004 年 1 月 15 日採録