

内 容 目 次

主 論 文

Development of a novel method for visualizing restricted diffusion using subtraction of
apparent diffusion coefficient values

(制限拡散を描出するための新たな ADC サブトラクション法の開発)

Yuuki Yoshimura, Masahiro Kuroda, Irfan Sugianto, Abdullah Khasawneh, Babatunde
O. Bamgbose, Kentaro Hamada, Majd Barham, Nouha Tekiki, Akira Kurozumi, Toshi
Matsushita, Seiichiro Ohno, Susumu Kanazawa, Junichi Asaumi

Molecular Medicine Reports 20(3) 2963-2969 2019

主 論 文

Development of a novel method for visualizing restricted diffusion using subtraction of apparent diffusion coefficient values

[緒言]

Magnetic resonance imaging (MRI) の拡散強調画像は、臨床において脳梗塞など脳血管障害や腫瘍の早期診断に役立っている。頭部や体幹部の拡散強調画像の撮像は日常的に行われ、その有用性も多く報告されている。拡散強調画像より計算された apparent diffusion coefficient (ADC) マップも臨床では使用され、物理的な障壁がない状態での拡散（自由拡散）と障壁がある状態での拡散（制限拡散）の両者が反映されている。そもそも、拡散強調画像は自由拡散を想定した撮像法であり、ある場所にあった水分子が一定時間後には正規分布に従って広がる様子を表している。しかし、実際の生体内では細胞膜や複数のコンパートメントにより、水分子の拡散は制限され、正規分布での拡散解析には限界がある。

近年、制限拡散における水分子の動きを解析する diffusion kurtosis imaging (DKI) が注目されている。DKI は制限拡散を、正規分布からの逸脱の度合いを示す尖度 (kurtosis) という指標で示している。臨床において、急性期脳梗塞やグリオーマ、アルツハイマー病、パーキンソン病、注意欠陥多動性障害、多発性硬化症、側頭葉てんかん、traumatic brain injury、脊髄病変など DKI の有用性は多く報告されている。DKI は制限拡散の感度が高いことや b 値の数が少なく比較的撮像時間が短いこと、定量が可能などの利点がある。一方で、 b 値の使用範囲に依存して尖度の値が変化しうることや生物物理学的モデルの想定がないため得られた尖度の値を直感的に把握しがたいこと、専用の画像解析ソフトが必要なことなどの欠点があるため、有用性の報告はあるものの臨床での普及には至っていない。

今回我々は、DKI とは異なった方法で制限拡散を描出する新たな手法を考案した。条件の異なる 2 種類の拡散強調画像の撮像を行い、そこから計算された ADC 値のサブトラクションを行うという方法である。以下、この方法を「ADC サブトラクション法 (ASM: ADC subtraction method)」と呼ぶ。

本研究の目的は、バイオフィントムの撮像を行い、ASM と DKI を比較することで、ASM が制限拡散を描出することが可能であるか検討する。

[方法]

ファントム容器 外径が縦 9.5cm、横 14cm、高さ 7cm のファントム容器コンテナの中にマイクロキュベット halbmikro 1.5ml (Labotechnik, Greiner Germany) のファン

トム容器を設置した。ファントム容器コンテナ内は、生理食塩水(0.9% NaCl)で充填した。

バイオフィantom 細胞には、RIKEN Cell Bank (Ibaraki, Japan)から購入した Jurkat 細胞を用いた。培養には、RPMI 1640 medium (pH7.4; Gibco, Grand Island, NY, USA) に 10% fetal bovine serum (Filtron PTY Ltd., Brooklyn, AU, USA) と 1% penicillin-streptomycin-neomycin (Gibco) を加えたものを用いた。インキュベーターを用い、5% CO₂, 37°Cで行った。

細胞計測には、細胞測定器(Coulter Electronics Ltd., Luton, UK)を用い、8 μm 以上の粒子を細胞として計測した。細胞のバイオフィantomへの封入には、過去に報告した方法に従った。簡単には、細胞数を測定後、細胞液を 0.89ml 程度までに濃縮し、ファントム容器に入れ、161g, 5 分間遠心分離し、上清を除去して細胞密度を 1~8×10⁸ cell/ml に調整した。処理後の細胞は、ゲランジェム(P-8169; Sigma Chemical Corporation, St. Louis, MO, USA)にて封入した。バイオフィantomは 2 種類作成し、ペレット状の最高細胞密度ファントムとゲランジェムで固定した低細胞密度ファントムである。それぞれのバイオフィantomをファントム容器に封入した。

MR 装置および画像解析ソフト・統計解析ソフト MR 装置は SIEMENS 社製 MAGNETOM Prisma VE11C 3.0T (Erlangen, Germany) を使用した。コイルは Head/Neck Coil 20ch (Erlangen, Germany) を使用した。画像解析ソフトは Image J (National Institutes of Health: NIH, USA), DKI の画像解析ソフトは diffusional kurtosis estimator (DKE) ver. 2.6 を用いた。統計解析ソフトは Excel (Microsoft) のアドインである Statcel4 を用いた。

バイオフィantom加温装置 ファントム容器コンテナを自作のバイオフィantom加温装置の中に設置した。バイオフィantom加温装置は ethylene-vinyl acetate copolymer 製の装置で、循環恒温槽(Thermo-Mate BF-41 (Yamato Scientific Co., Ltd., Japan))と接続されている。加温は人の体温と同じとするため、ファントム容器内が約 37°Cになるよう調整した。

MR 撮像中の温度測定 撮像時の温度は、光学式ファイバー温度計 (FluoropticTM thermometer m600 (Luxtron Co., USA))を用いて、ファントム容器内部に温度計を設置し、MR 撮像中、経時的にファントム容器内の温度測定を行った。

撮像条件 DKI および ASM の撮像条件を Table 1 に示す。DKI では DKI-1, DKI-2, DKI-3 の 3 つのシーケンスで single shot-echo planar imaging (SS-EPI) を使用した。

ASM では基本シーケンス，修飾シーケンスの 2 つのシーケンスで readout segmentation of long variable echo-trains (RESOLVE) を使用した．b 値の数を変化させて，2 種類の拡散強調画像の撮像を行う．基本シーケンスは b 値を 0, 500, 1000 sec/mm² と 3 点設定し，修飾シーケンスは b 値を 0, 500, 1000, 10000 sec/mm² と 4 点設定した．b 値の数が異なることで，両シーケンスの δ (motion probing gradient (MPG) 印加時間)， Δ (MPG 間隔) が変化してくる．b 値の式 (式 (1)) において， $(\Delta - \delta/3)$ は有効拡散時間と言い，拡散現象を観察している時間を表している．

$$b = \gamma^2 G^2 \delta^2 (\Delta - \delta/3) \dots\dots\dots (1)$$

ここで， γ はプロトンの磁気回転比，G は傾斜磁場強度を表す．基本シーケンスと修飾シーケンスの有効拡散時間はそれぞれ 39.3msec と 46.0msec となる．有効拡散時間の延長には限界があり，この修飾シーケンスの有効拡散時間は上限に近い．DKI, ASM 共に最高細胞密度ファントムは 5 回，低細胞密度ファントムは 9 回撮像した．

Parameters	ASM		DKI		
	RESOLVE-basic	RESOLVE-modify	DKI-1	DKI-2	DKI-3
TR (msec)	8,000	8,000	6,000	6,000	6,000
TE (msec)	86	106	75	75	75
ES (msec)	0.56	0.56	0.93	0.93	0.93
FOV (mm)	120	120	120	120	120
Matrix	224x224	224x224	82x82	82x82	82x82
BW (Hz/pixel)	399	399	1,220	1,220	1,220
Averages	2	2	1	1	9
Segments	7	7	1	1	1
Slice thickness (mm)	5	5	5	5	5
Slice number	1	1	5	5	5
Phase direction	AP	AP	AP	AP	AP
δ (msec)	5.6	15.6	13.8	13.8	-
Δ (msec)	41.2	51.2	33.5	33.5	-
Diffusion time (msec)	39.3	46.0	28.9	28.9	-
b-value (sec/mm ²)	0,500,1,000	0,500,1,000,10,000	0,500,1,000	0,500,1,000	0
Diffusion direction	3	3	30	30	-
Imaging time (min:sec)	13:28	19:06	6:24	6:24	1:12

ASM, apparent diffusion coefficient subtraction method; DKI, diffusion kurtosis imaging; RESOLVE, readout segmentation of long variable echo-trains; TR, repetition time; TE, echo time; ES, echo space; FOV, field of view; BW, band width; AP, antero-posterior; δ , motion probing gradient (MPG) pulse duration; Δ , MPG pulse spacing.

Table 1. DKI および ASM の撮像条件.

DKI の画像処理 DKI の画像解析ソフト DKE ver. 2.6 は Medical University of South Carolina のホームページ (<http://academicdepartments.musc.edu/cbi//dki>) で公開されている．DKI-1, DKI-2, DKI-3 の撮像により得られた拡散強調画像を DKE にて式 (2) を用いて計算し，空間方向の平均値である mean kurtosis (MK) 画像を作成した．

MK 画像は interpolate 処理により, voxel size が 1.0x1.0x1.0 mm となる.

$$S=S_0*\exp(-b*ADC+b^2*ADC^2*MK/6) \dots\dots\dots (2)$$

ここで, S は信号強度, S₀ は b 値 0 sec/mm² のときの信号強度, b は Table 1 に示した b 値とする.

ASM の画像処理 基本シーケンスは b 値を 0, 500, 1000 sec/mm² と 3 点設定し, ADC 値 (ADC_b) を計算する. 修飾シーケンスは b 値 10000 sec/mm² を使用せず, b 値 0, 500, 1000 sec/mm² の 3 点で ADC 値 (ADC_m) を計算する. ASM の式を以下に示す (式 (3)). ASM では, ADC 値が高いほど ADC 値のばらつきが大きい現象を補正するため, ADC 値の絶対値差を ADC 値の 3 乗で除して計算する.

$$ASM= | ADC_b-ADC_m | / (ADC_b)^3 \dots\dots\dots (3)$$

画像評価 MK 画像に関しては, ファントム容器内の細胞部分に, 縦 1×横 4 ピクセルの region of interest (ROI) を 3 か所設定した. ファントム容器コンテナ内の生理食塩水部分に 6 か所の同サイズの ROI を設定し, MK 値を測定した. ASM に関しては, 基本シーケンス, 修飾シーケンスの撮像より得られた各 b 値の拡散強調画像に対して, ファントム容器内の細胞部分に, 3×3 ピクセルの ROI を 4 か所設定した. ファントム容器コンテナ内の生理食塩水部分に 8 か所の同サイズの ROI を設定し, 信号強度を測定した. 各信号強度を対数変換し, その傾きの逆数から各 ROI の ADC 値を算出し, 式 (2) より ASM 値を算出した. 基本シーケンスの ADC 値および MK 値, ASM 値に関して, 生理食塩水, 低細胞密度ファントム, 最高細胞密度ファントムの 3 群間で Steel-Dwass 法による多重比較検定を有意水準 5%で行った. ROI の総数は, ADC 値および ASM 値のとき生理食塩水で 112 個, 低細胞密度ファントムで 36 個, 最高細胞密度ファントムで 20 個となる. また, MK 値のとき生理食塩水で 84 個, 低細胞密度ファントムで 27 個, 最高細胞密度ファントムで 15 個となる.

[結果]

撮像中のファントム容器内の温度の平均値と標準偏差は 37.2±0.7°Cであった. また, 低細胞密度ファントムおよび最高細胞密度ファントムの細胞密度はそれぞれ 1.21×10⁸ cell/ml, 7.41×10⁸ cell/ml であった. この時の生理食塩水, 低細胞密度ファントム, 最高細胞密度ファントムの ADC 値の平均値と標準偏差はそれぞれ 2.95±0.08 [×10⁻³ mm²/sec], 1.90±0.35 [×10⁻³ mm²/sec], 0.79±0.05 [×10⁻³ mm²/sec]であった (Fig. 1). 細胞密度が増加すると ADC 値は低下した. Steel-Dwass 法より, 3 群間で有意差が認

められた。生理食塩水，低細胞密度ファントム，最高細胞密度ファントムの MK 値の平均値と標準偏差はそれぞれ 0.04 ± 0.01 , 0.44 ± 0.13 , 1.27 ± 0.03 であった (Fig. 2)。生理食塩水，低細胞密度ファントム，最高細胞密度ファントムの ASM 値の平均値と標準偏差はそれぞれ $0.25 \pm 0.20 [\times 10^4 (\text{sec}/\text{mm}^2)^2]$, $0.51 \pm 0.41 [\times 10^4 (\text{sec}/\text{mm}^2)^2]$, $4.80 \pm 4.51 [\times 10^4 (\text{sec}/\text{mm}^2)^2]$ であった (Fig. 3)。ADC 値とは反対に，細胞密度が増加すると MK 値と ASM 値は増加した。MK 値，ASM 値共に 3 群間で有意差が認められた。

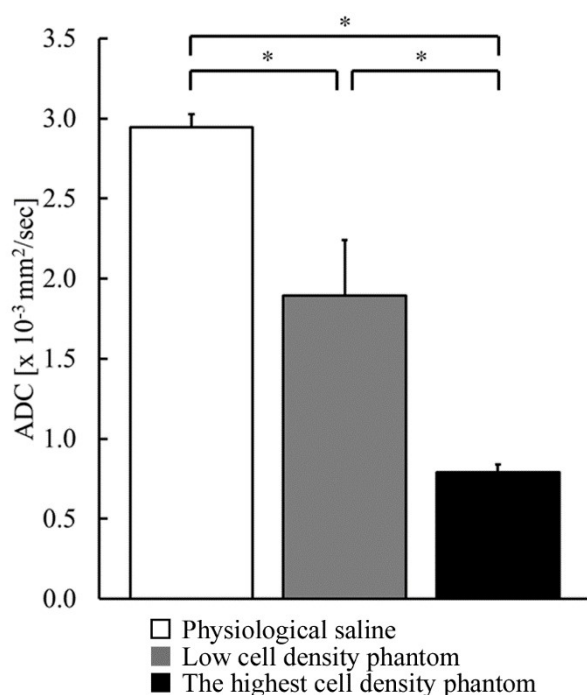


Figure 1. ADC 値のグラフ。白は生理食塩水，グレーは低細胞密度ファントム，黒は最高細胞密度ファントムを示す。*P<0.05.

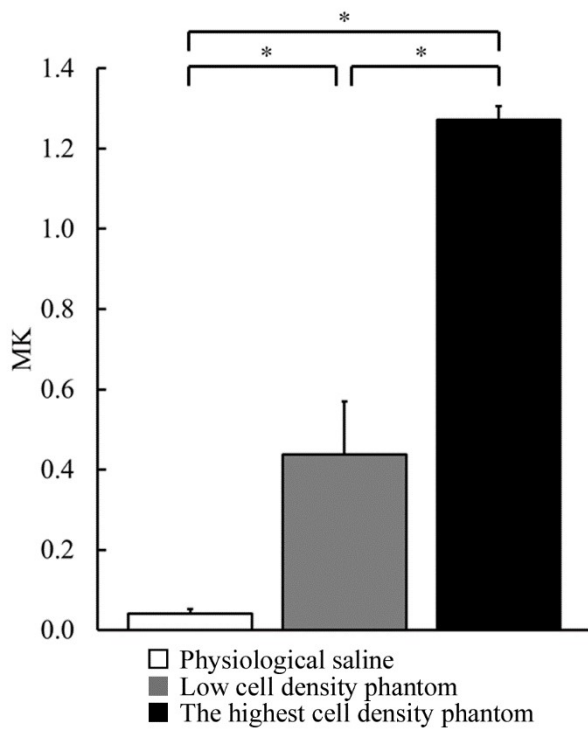


Figure 2. MK 値のグラフ。白は生理食塩水，グレーは低細胞密度ファントム，黒は最高細胞密度ファントムを示す。*P<0.05.

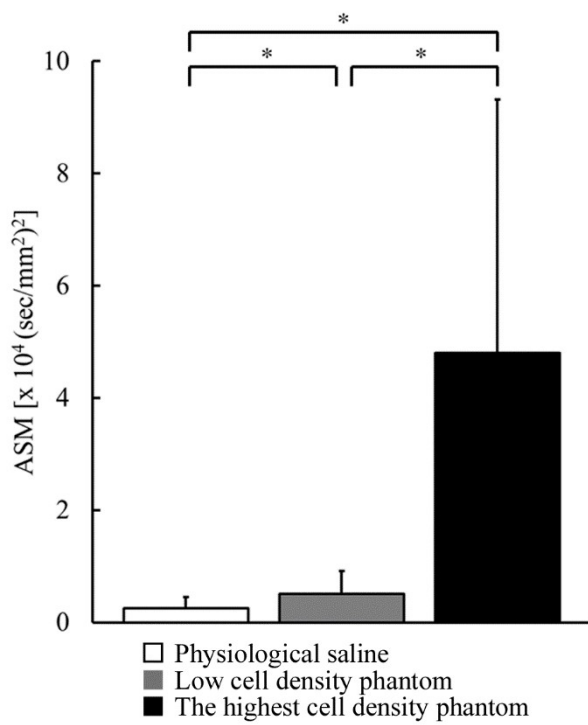


Figure 3. ASM 値のグラフ。白は生理食塩水，グレーは低細胞密度ファントム，黒は

最高細胞密度ファントムを示す。*P<0.05.

[考察]

本研究では, ASM と呼ばれる新しい方法を開発し, その有用性を実験的に実証した. 拡散強調画像は広く臨床で用いられている. 拡散には自由拡散と制限拡散があるが, 現在主に使われている ADC 値は両者を反映している. 近年, 制限拡散を表現する DKI などの画像が出現し, 臨床的有用性が報告されはじめた. しかし, 制限拡散を画像化する手法は限られており, 今回新しい方法として ASM を考案し, 実験的にその有用性を確認した. DKI とは, 水分子が自由拡散からどの程度逸脱しているかを定量的に表した画像で, 拡散強調画像よりも, 実際の生体内の微細構造を評価することができると言われている. 制限拡散イメージング技術の中でも, DKI には制限拡散に対する高い特異性などの利点がある. 少数の b 値, これは比較的短い撮像時間をもたらす. 定量的な能力. b 値が大きいくほど, 拡散強調が強いほど, 病原性組織におけるコントラストが高い. 今回, 非正規分布の拡散解析法である DKI を制限拡散描出のゴールドスタンダードとして位置づけ, ASM との比較対象とした. DKI の臨床応用は多数報告されており, Hempel らはグリオーマのグレードと MK 値は強く相関しており, グレードが高いと MK 値は高くなると述べている. また, Qi らもグリオーマのグレードが高く, 細胞密度が高いと MK 値は高くなると述べている. Wu らは頸部の non-Hodgkin lymphoma において化学療法後, ADC 値は増加し, MK 値は低下すると述べている. Wang らは膀胱腫瘍と炎症を比較し, 腫瘍では ADC 値が低く, MK 値が高くなると述べている. また, Barrett らは前立腺癌と正常前立腺組織を比較し, 癌では ADC 値が低く, MK 値が高くなると述べている. いずれも, 今回の我々のバイオフィントムを用いた検討と同様の結果であった.

まず, 低細胞密度ファントムおよび最高細胞密度ファントムの細胞密度はそれぞれ 1.21×10^8 cell/ml, 7.41×10^8 cell/ml であったことから, ケプラー予想により細胞外空間の距離を計算した. ケプラー予想によると, 等しい大きさの球で空間を充填するときの配置の密度はおよそ 74.05% とされている. 1 ml の 74.05% である 0.7405 ml が球の全体積となる. 細胞が球だと仮定すると, 球の全体積を細胞密度で除すことでひとつの球の体積が求まる. 球の体積がわかれば球の半径が求まる. 実際は, 1 ml 中に細胞が最密充填されているわけではないため, 求めた球の半径は実際の細胞の半径よりも大きくなる. 求めた球の半径を 2 倍したものは, 細胞中心間距離となる. この細胞中心間距離から細胞直径を引いたものは, 細胞間の細胞外空間の広さを示す. 今回用いた細胞の直径は $9.6 \mu\text{m}$ であるので, 低細胞密度ファントムの細胞外空間の距離は $13.1 \mu\text{m}$, 最高細胞密度ファントムでは $2.8 \mu\text{m}$ となる (Fig. 4). 細胞内空間の大きさは細胞直径であり $9.6 \mu\text{m}$ となる.

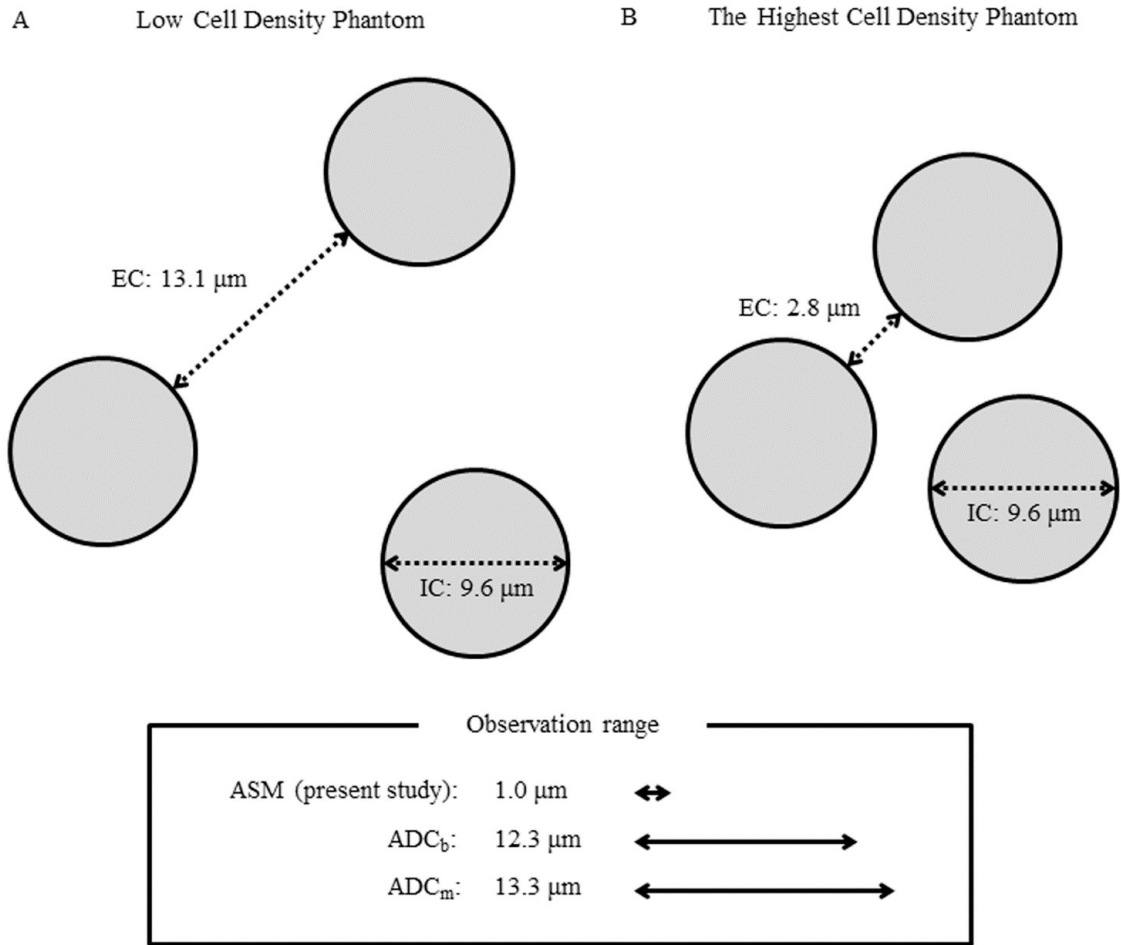


Figure 4. 細胞内外空間の距離と拡散観察範囲の概念図. (A) 低細胞密度ファントムの場合. (B) 最高細胞密度ファントムの場合. IC は細胞内空間距離, EC は細胞外空間距離を示す.

一方で、有効拡散時間から拡散現象の観察範囲を計算した。有効拡散時間が変化すれば拡散現象の観察範囲も変化してくる。観察範囲の異なる両シーケンスのサブトラクションを行うことで、非常に狭い空間の拡散現象を捉えることができる。そのため、自由拡散を想定した撮像法であるが、得られる情報は制限拡散となることが予想される。基本シーケンスと修飾シーケンスの有効拡散時間はそれぞれ 39.3msec, 46.0msec である。Stokes-Einstein の式より、37°Cにおける水の ADC 値は $3.0 \times 10^{-3} \text{ mm}^2/\text{sec}$ であり、有効拡散時間を乗ずることで水の拡散範囲の面積を求めることができ、そこから各撮像方法で観察できる直径を求めることができる。ASM の拡散強調画像のシーケンスで観察できる拡散範囲は、基本シーケンスで直径 $12.3 \mu\text{m}$, 修飾シーケンスで直径 $13.3 \mu\text{m}$ であり、ASM ではその差分の $1.0 \mu\text{m}$ の範囲が画像化されていると考えられる (Fig. 4)。今回の結果では、細胞密度が高くなり、細胞外空間が狭くなるほど、ADC 値は低下し、

反対に MK 値と ASM 値は上昇した。従来から DKI は制限拡散を画像化できると考えられているが、今回のデータから、DKI は細胞外空間で作られる制限拡散を反映している可能性がある。さらに ASM は DKI と同様に、細胞外空間の制限拡散の程度を表現できることを示した。

今回の研究では、ASM の撮像時間は計 32.5 分であり、DKI の撮像時間の計 14 分よりも長い。一方、DKI は、ASM よりも画質が低い。ASM で用いられる RESOLVE は歪みなく画質を向上させ、ADC 値を正確にする。今回 ASM の撮像時間が長い理由は、ASM が高画質となるように解像度を高く、加算回数とセグメントを高値に設定したためである。ASM を DKI と同程度の画質にした場合、ASM の撮像時間はおよそ計 6 分となり、DKI より短時間となる。今後、画質を保ちながら撮像時間を短くした臨床研究用 ASM シーケンスを開発する必要がある。

リミテーションとして、基本シーケンスと修飾シーケンスを用いた ASM において、それぞれの有効拡散時間を変化させての検討は行っていない。その場合、ASM で表現される差分の範囲が変化し、制限拡散の程度も変化する可能性がある。しかし、現在臨床で普及している 3.0T 装置では差分の範囲を大幅に変化させるのも限界があるということも述べておく。

[結論]

今回のバイオフィantomを用いた検討により、DKI は主に細胞外空間における制限拡散を反映している可能性がある。さらに ASM は DKI と同様に、細胞外空間における制限拡散の程度を表現できる可能性がある。将来の臨床試験により、ASM は ADC マップと同様に有用な臨床画像診断法としての可能性が証明されると期待される。