



Title	電子常磁性共鳴分光装置の高感度化と固形腫瘍pHイメージングへの応用
Author(s)	中岡, 梨々子
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(工学)
Dissertation Number	甲第15075号
Issue Date	2022-03-24
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k15075
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/88706
Type	doctoral thesis
File Information	Ririko_Nakaoka.pdf



電子常磁性共鳴分光装置の高感度化 と固形腫瘍 pH イメージングへの応用

Sensitivity enhancement of an electron paramagnetic resonance
spectrometer and its application to pH mapping of solid tumors

中岡 梨々子

北海道大学大学院 情報科学院

情報科学専攻 生体情報工学コース

磁気共鳴工学研究室

2022 年 1 月 18 日

目次

第1章 序論.....	4
1.1 研究背景.....	4
1.1.1 固形腫瘍の治療効果判定の課題	
1.1.2 腫瘍細胞のエネルギー代謝と pH	
1.1.3 pH 測定による Carbonic anhydrase IX 阻害の治療効果の早期予測	
1.1.4 治療効果早期判定のための EPR pH イメージングの課題	
1.2 電子常磁性共鳴分光.....	8
1.2.1 電子常磁性共鳴法の原理	
1.2.2 750 MHz CW-EPR イメージング装置の構成	
1.3 研究目的.....	11
1.4 各章の概要.....	11
第2章 高周波磁場発生効率改善の実験.....	19
2.1 EPR 共振器の高感度化の背景.....	19
2.2 実験方法.....	20
2.2.1 共振器の構造	
2.2.2 数値シミュレーション	
2.2.3 共振器の特性測定	
2.2.4 EPR 分光測定	
2.2.5 EPR イメージング	
2.3 実験結果と考察.....	27
2.3.1 数値シミュレーションによる最適化	
2.3.2 共振器の特性評価	
2.3.3 信号強度と SNR	
2.3.4 水溶液サンプルの EPR イメージング	
2.3.5 <i>In Vivo</i> EPR イメージング	
2.4 まとめ.....	38

第3章 チューナブル共振器における雑音の分析.....	42
3.1 EPR 共振器における雑音についての背景.....	42
3.2 実験方法.....	43
3.2.1 雑音の算出方法	
3.2.2 ベースラインの雑音計測	
3.3 実験結果と考察.....	58
3.3.1 雑音の算出結果	
3.3.2 バラクタダイオードの影響	
3.3.3 各雑音源によるベースラインへの影響	
3.4 まとめ.....	67
第4章 マルチハーモニック検波による受信システムの高感度化....	71
4.1 EPR 受信システムの背景.....	71
4.2 実験方法.....	72
4.2.1 マルチハーモニック検波方式	
4.2.2 マルチハーモニック検波システムの構築	
4.2.3 pH 感受性プローブと水溶液サンプル	
4.2.4 pH マップの再構成法	
4.2.5 EPR 分光測定	
4.2.6 水溶液サンプルの pH マッピング	
4.3 実験結果と考察.....	79
4.3.1 マルチハーモニック検波方式による EPR 分光	
4.3.2 マルチハーモニック検波方式による pH マッピング	
4.4 まとめ.....	87
第5章 CAIX 阻害による治療効果の早期予測への応用.....	91
5.1 pH イメージング用いた治療効果判定の背景.....	91
5.2 実験方法.....	92
5.2.1 試薬	

5.2.2 腫瘍モデルマウス	
5.2.3 CAIX 阻害腫瘍モデルマウスの pH マッピング	
5.3 実験結果と考察.....	94
5.3.1 固形腫瘍への CAIX 阻害剤投与	
5.3.2 固形腫瘍の CAIX 阻害への pH 応答の検出	
5.3.3 固形腫瘍の CAIX 阻害による細胞外 pH 変化	
5.4 まとめ.....	103
第6章 結論と今後の展望.....	107
謝辞.....	111
研究業績.....	113

第1章 序論

1.1 研究背景

1.1.1 固形腫瘍の治療効果判定の課題

近年、がんの罹患率、がんによる死亡率は世界的に増加しており、その治療法として、放射線療法、手術療法や化学療法が開発されている。中でも化学療法では、がん細胞の増殖や生存に必須の分子を阻害し抗腫瘍効果を発揮する分子標的薬が現在注目されており、盛んに開発されている[1.1]。主に固形腫瘍への化学療法に対して、臨床で用いられている治療効果判定法は、画像診断による腫瘍体積変化の計測である[1.2]。この手法では、治療後に数週間～1 ヶ月経過してから再度腫瘍の画像診断を行い、腫瘍の大きさの変化を確認するため、効果を認めるまでに時間が必要である。腫瘍のサイズが小さくなっていれば治療効果を認められるが、治療効果が認められなければ、がん治療において大きなロスタイムになる。治療効果が低い場合でも効果を認めるまでに時間がかかるため、より効果のある治療へ早期に切り替えることができず、最適な治療法の選択が困難になっている。従って、効果を早期に見極めるための治療効果測定法の開発は重要な課題である。

1.1.2 腫瘍細胞のエネルギー代謝と pH

悪性腫瘍では過剰な細胞増殖が起こり、血管の新生が無秩序となるため、低酸素状態に陥る。低酸素環境下で、低酸素誘導因子(HIF-1 α)が活性化し、HIF-1 α は、上皮間葉転換、解糖、転移、pH 調節、および血管新生の調節に深く関与している[1.3-1.5]。また、がん細胞は代謝活性が高いため、好氣的条件下でもグルコースの代謝において、酸化的リン酸化と嫌気性糖分解の両方を利用してエネ

ルギーを生成し、乳酸を多く産生する[1.6]。そして、細胞中の pH を一定に保つために乳酸を細胞外へ排出する。細胞内の pH はややアルカリ性に保たれる一方、乳酸の排出や水素イオンの産生により、細胞外の pH は低下する[1.7]。

1.1.3 pH 測定による Carbonic anhydrase IX 阻害の治療効果の早期予測

低酸素誘導因子(HIF-1 α)によって発現する炭酸脱水酵素 Carbonic anhydrase IX (CA IX)は細胞の pH を調節する膜貫通型 CA アイソザイムであり、炭酸脱水酵素の中で最も高い水素イオン変換速度を示す[1.8]。CO₂の重炭酸イオンおよびプロトンへの可逆的水和を触媒することで、細胞外の酸性化を引き起こし腫瘍の増大や転移を促進するため、CA IX の過剰発現は低酸素状態でのがん細胞の生存を促進する[1.9, 1.10]。

CA IX の阻害剤はがん細胞の pH 調節や細胞外酸性化の機能を喪失させるため、分子標的薬としての効果が期待されている[1.11, 1.12]。現在、数種類の CA IX 阻害剤の臨床試験が行われており、その1つである U-104 (SLC-0111) は第二相試験まで達している[1.13]。CA IX が阻害されると腫瘍は細胞内の pH 調節機能が低下し、細胞外 pH が変化すると予想される。従って、CA IX 阻害の前後で細胞外 pH の変化を観測することができれば、CA IX 阻害の治療効果を早期に判定できると予想される。腫瘍サイズの変化ではなく、代謝変化による細胞外 pH の変化を用いることで、腫瘍サイズの減少や増加を待たずに短期間で治療効果の判断を行えると期待できる。また、固形腫瘍の治療効果の早期評価に細胞外 pH イメージングを応用した例はなく、細胞外 pH の検出による治療効果早期評価方法の確立はがん研究に大きな技術的進展をもたらすと考えられる。

1.1.4 治療効果早期判定のための EPR pH イメージングの課題

現在、悪性腫瘍の診断や治療効果を正確に評価するために、様々な画像診断法が研究されている。その中でも、特定の分子の分布を可視化する分子イメージングは、生体内の代謝変化を観察できるため、腫瘍組織の詳細な理解や治療効果の早期評価に有用である。現在、臨床現場や研究機関で主に使用されている分子イメージング法には、形態学的情報を画像化する¹H-MRI (Magnetic Resonance Imaging) や、機能的情報を画像化するPET (Positron Emission Tomography) 、fMRI (Functional MRI)、CEST (Chemical Exchange Saturation Transfer) MRIなどがある[1.14, 1.15]。その中でも、PETや蛍光イメージングは、pHを可視化することができる技術であるが、それぞれ被曝の可能性、生体深部の計測の困難性、低解像度といった問題がある[1.16-1.17]。CEST MRIでは、*in vivo*でのpHイメージング法が開発されており、2次元スライス画像を複数取得することで、3次元の情報取得を可能にしている。測定時間が長時間であるという問題に対して、近年、高速化の研究が進んでおり、Villanoらによる報告では、FOV $25 \times 25 \times 10 \text{ mm}^3$ (空間分解能 $0.37 \times 0.37 \times 2 \text{ mm}^3$)の撮像時間 9分半を達成している[1.18]。がん研究においては、ピルビン酸代謝経路の阻害による細胞外pHの変化を検出した報告があり、今後のがん治療への応用が期待されている[1.19]。

臨床現場での使用はまだ行われていないが、不対電子の分布を可視化する電子常磁性共鳴イメージング法 (Electron Paramagnetic Resonance Imaging: EPRI) による pH 測定が可能である。EPR 法では、2012 年に Bobko らにより新たな pH 感受性の常磁性プローブ分子が開発され、がん腫瘍の pH 測定の可能性が拓けた[1.20]。Komarov らは、この pH 感受性プローブを用いて、世界で初めて EPR 法による腫瘍モデルマウスの 3 次元 pH マッピングに成功した[1.21]。

高感度 EPR 分光装置による固形腫瘍の細胞外 pH イメージングを用いて、細

胞外 pH の変化率と腫瘍サイズの成長率に相関を認めることができれば、pH イメージングを用いた CA IX 阻害の治療効果の早期評価が可能になる。治療効果の早期検出が可能になれば、CA IX 阻害剤が無効な細胞に対して早期に他の治療法に切り替えることができ、有効な細胞に対しては将来的な効果の予測が可能になるため、治療法の最適化に大いに貢献できる。

図 1-1 に、先行研究[1.21]で報告されたヒト由来膵管がんモデルマウスの細胞外 pH イメージングの例を示す。図 1-1 の左から、マウスの右後肢に作製した固形腫瘍の MRI 画像、EPR 信号強度のマップ、EPR による pH マップである。MRI 画像に示す白点線内が腫瘍であり、EPR pH マッピングでは該当部分が低い pH を示している。この pH イメージングの分解能は 0.078 であり、これを実現するために高濃度のプローブ (0.6 mmol/kg body weight) をマウスに投与している。しかし、高濃度のプローブはマウスの致死率を高めるため、少量のプローブで信号を検出できることが望まれる。そのためには、EPR 分光装置における信号検出の高感度化が求められる。EPR 分光装置の信号検出部である共振器や受信システムの高感度化が必要である。

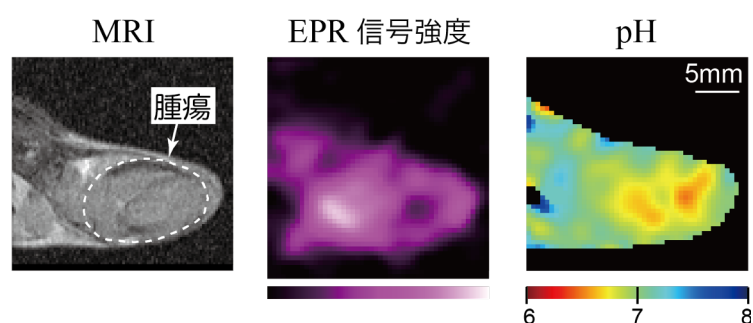


図 1-1 モデルマウス腫瘍 (Hs766t) の EPR pH イメージングの例
Adapted with permission from Analytical Chemistry, In Vivo Extracellular pH Mapping of Tumors Using Electron Paramagnetic Resonance, D. A. Komarov, Y. Ichikawa, K. Yamamoto, N. J. Stewart, S. Matsumoto, H. Yasui, I. A. Kirilyuk, V. V. Khrantsov, O. Inanami & H. Hirata. Copyright 2018 American Chemical Society.

1.2 電子常磁性共鳴分光

1.2.1 電子常磁性共鳴法の原理

電子常磁性共鳴 (EPR) 法は、試料内部のフリーラジカルの分布を可視化する技術であり、生体内の酸素分圧[1.22, 1.23]やpH [1.23, 1.24]、酸素還元状態[1.25]などを可視化することも可能である。その特徴は、不対電子を持つ分子・原子を観測の対象とする点、および外部静磁場を使用する点にある。電子は、古典的な描像では負の電荷を持つ素粒子であり、原子核と同様に磁気モーメントを持つ。図1-2に示すように、電子に静磁場 B_0 を印加すると、ゼーマン相互作用により電子のエネルギー準位は、磁界に対して平行で安定な準位と、反平行で準安定な準位の2つの準位に分かれる。外部より照射された電磁波の周波数が共鳴条件を満たすとき、低いエネルギー準位（安定準位）にある電子がマイクロ波のエネルギーを吸収し、高い準位（準安定準位）へ遷移する。図1-3に電子常磁性共鳴の共鳴条件式を示す。共鳴条件は、電磁波のエネルギーと静磁場によって分裂した電子スピン状態間のエネルギー準位が等しいことである。この条件が満たされた時、低エネルギー状態の電子スピンのエネルギーを受け取り、高いエネルギー準位へ遷移する。

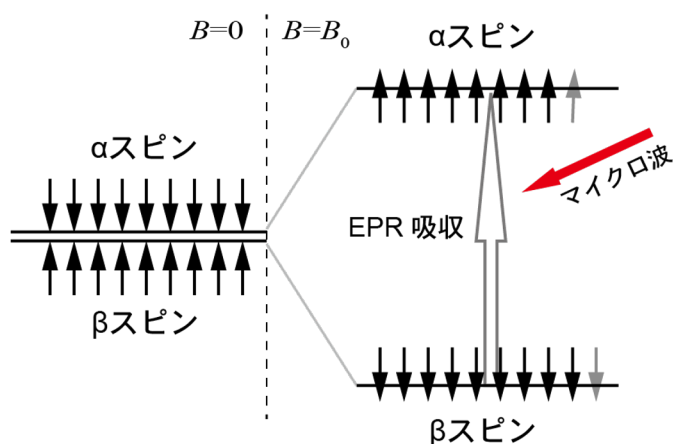


図 1-2 電子常磁性共鳴の原理

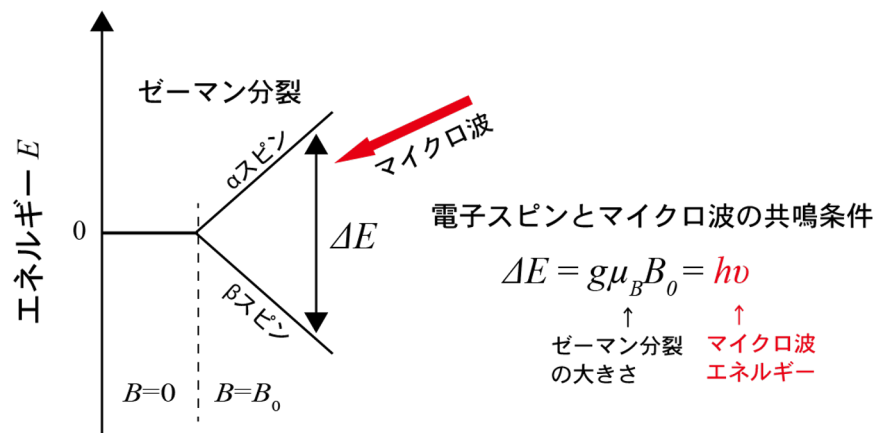


図 1-3 電子常磁性共鳴の共鳴条件

EPR法には、マイクロ波パルスを照射して計測するパルスEPR法と、磁場掃引により計測する連続波 (CW) EPR法がある。本研究では、連続波EPR法を使用している。連続波EPR法では、試料に照射されるマイクロ波の反射波を検出器で観測しながら磁場強度を変え、磁場と電磁波が直交し共鳴条件が満たされた磁場の位置でマイクロ波吸収が生じる。マイクロ波が吸収されることにより、マイクロ波共振器においてインピーダンスが変化する。共鳴していない状況では、インピーダンス整合が取れているため反射波はゼロであるが、電子スピンによるエネルギー吸収が生じるとき整合は崩れ、入射したマイクロ波の反射波が観測される。この反射したマイクロ波の変化を外部磁場強度に対して観測したものがEPRスペクトルである。

1.2.2 750 MHz CW-EPR イメージング装置の構成

一般的な EPR イメージング装置の構成と、EPR スペクトルを取得するまでの流れを説明する。図 1-4 に反射型の EPR ブリッジのブロック図、図 1-5 に EPR イメージング装置のダイアグラムを示す[1.26]。マイクロ波発振器から出力され

たマイクロ波は、方向性結合器によってメインライン（180°ハイブリッド側）とリファレンスライン（位相器側）に分岐される。メインラインに分岐されたマイクロ波は、減衰器を通り、目的とするマイクロ波電力に調整され、180°ハイブリッドを通過して共振器に入力される。180°ハイブリッドは4つの端子を持ち、各端子に入力した信号を分割する素子である。磁場掃引していない状態では、共振器と180°ハイブリッドはインピーダンス整合がとれた状態であり、マイクロ波の反射はほとんどない。磁場掃引コイルによる磁場掃引を行うと、ある磁場強度に達した所で共鳴現象が生じ、マイクロ波が試料に吸収される。そして、インピーダンス整合が崩れ、マイクロ波の一部が反射する。この際、反射波は磁場変調周波数（約100 kHz）により振幅変調される。反射波は再び180°ハイブリッドを通過し、低雑音増幅器で増幅された後、リファレンスラインに分岐されて位相等が調整されたマイクロ波によりホモダイン検波される。その後、反射波は位相検波器で検波されEPR信号として出力される。なお、ATCとは共振器の共振周波数をマイクロ波周波数にロックする負帰還制御システム（自動チューニング制御）のことである。また、通常のEPRスペクトルは空間情報を持たないため、2次元または3次元のEPRイメージングでは、マグネットの内側に3軸方向に磁場勾配を発生できる勾配コイルを設置し、磁場が直線的に変化する磁場勾配を印加することで、多次元の位置情報を持つEPRスペクトルを取得している。

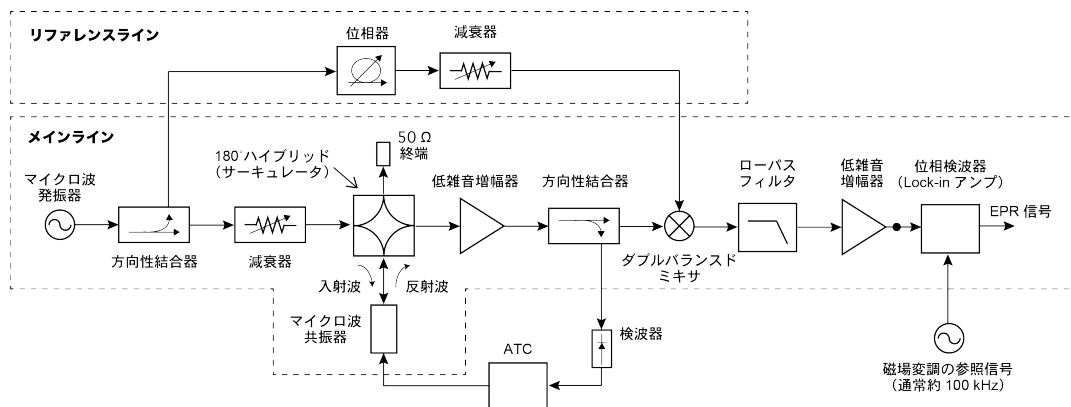


図 1-4 EPR 分光装置のブロック図

1.3 研究目的

高効率で低雑音な 750 MHz チューナブル共振器の開発と EPR 受信システムの高感度化により、腫瘍モデルマウスの高感度 EPR イメージングの実現を目指す。そして、EPR 法による高精度な細胞外 pH イメージングを用いて、固形腫瘍の CA IX 阻害による治療効果の早期評価法の実現可能性を示す。

この研究目的を達成するために、EPR スペクトルの信号対雑音比 (SNR) の最大化が課題となる。EPR 分光装置の高感度化のために、750 MHz チューナブル共振器を高感度し、さらに EPR 受信システムへマルチハーモニック検波システムを導入した。また、細胞外 pH イメージングを用いた CA IX 阻害治療効果の早期評価の実現には、CA IX 阻害による細胞外 pH を検出できることを示す必要がある。そのために、腫瘍モデルマウスに CA IX 阻害剤を投与した前後で高精度な細胞外 pH イメージングを行い、CA IX 阻害による細胞外 pH の変化を明らかにした。各章では、これらの課題について詳しく述べる。

1.4 各章の概要

第2章では、EPR スペクトルの信号強度を最大化する 750 MHz チューナブル共振器の設計法について述べる。具体的には、750 MHz チューナブル共振器のマイクロ波駆動効率の最大化を目指した。750 MHz チューナブル共振器内のインピーダンス整合のために、共振回路と結合回路を繋ぐ平衡伝送線路の特性インピーダンスと結合キャパシタの最適化を課題とした。これまで明らかにされていない平衡伝送線路の特性インピーダンスのマイクロ波駆動効率への影響を明らかにし、マイクロ波シミュレーションを用いた高効率 750 MHz チューナブル共振器の最適設計を行った。これにより先行研究[1.27]と比較して、高周波磁場発生効率を 2.4~2.9 倍増加させることに成功した。

第3章では、750 MHz チューナブル共振器で発生する雑音の検証について述べる。EPR スペクトルの雑音を低減させるために、支配的な雑音源を分析することを課題とした。これにより、小動物計測用のチューナブル共振器における高周波雑音の特性と EPR スペクトルのベースラインへの影響について明らかにした。ベースライン雑音の主な原因はマッチング回路のバラクタダイオードであることを明らかにし、これをトリマコンデンサに置き換えることで、SNR を 6.1 倍向上させた。

第4章では、EPR 受信システムの高感度化について述べる。EPR 受信システムのデジタル化を行い、これまで取得していなかった磁場変調信号の高調波を含めたマルチハーモニック検波システムを導入した。約 100 kHz と比較的高い磁場変調周波数でのマルチハーモニック検波システムにおいて、高周波ノイズや多大なメモリ使用が課題であった。マルチハーモニック検波システムを導入した EPR 分光装置を用いて、従来の位相検波方法より 2 倍高い SNR の EPR スペクトルが得られ、pH 分解能 0.07 の水溶液 pH イメージングを実現した。

第5章では、pH 分布を用いた治療効果の可視化について述べる。高感度化し

た EPR 分光装置による固形腫瘍の細胞外 pH イメージングを CA IX 阻害によるがん治療効果の早期評価モデル実験へ適用した。CA IX 阻害の有無による細胞外 pH の差を明らかにし、CA IX を阻害する前と後で細胞外 pH にどの程度変化が起こるかを検証した。

第 6 章では、本研究を総括し、残されている課題と今後の展望について述べる。

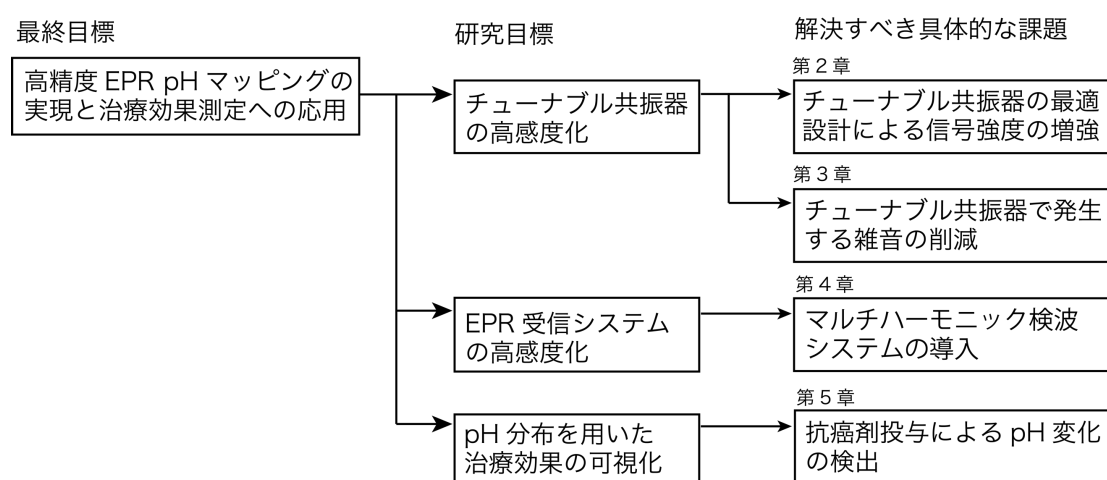


図 1-6 本研究の目標と各章での課題

1.5 参考文献

- [1.1] 日本臨床腫瘍学会（編），入門腫瘍内科学，南江堂，114–117, 2020.
- [1.2] 佐々木常雄，岡元るみ子（編），新がん化学療法ベスト・プラクティス，照林社，35–37, 2019.
- [1.3] C. Potter & A. L. Harris, Hypoxia Inducible Carbonic Anhydrase IX, Marker of Tumour: Hypoxia, Survival Pathway and Therapy Target, *Cell Cycle*, **3**, 159–162 (2004).
- [1.4] M. S. Ullah, A. J. Davies & A. P. Halestrap, The plasma membrane lactate transporter MCT4, but not MCT1, is up-regulated by hypoxia through a HIF-1-dependent mechanism, *Journal of Biological Chemistry*, **281**, 9030–9037 (2006).
- [1.5] C. C. Wykoff, N. J. Beasley, P. H. Watson, K. J. Turner, J. Pastorek, A. Sibtain, G. D. Wilson, H. Turley, K. L. Talks & P. H. Maxwell, Hypoxia-inducible expression of tumor-associated carbonic anhydrases, *Cancer Research*, **60**, 7075–7083 (2000).
- [1.6] Corbet & O. Feron, Tumour acidosis: From the passenger to the driver's seat, *Nature Reviews Cancer*, **17**, 577–593 (2017).
- [1.7] M. Debreova, L. Csaderova, M. Burikova, L. Lukacikova, I. Kajanova, O. Sedlakova, M. Kery, J. Kopacek, M. Zatovicova, J. Bizik, S. Pastorekova & E. Svastova, CAIX Regulates Invadopodia Formation through Both a pH-Dependent Mechanism and Interplay with Actin Regulatory Proteins, *International Journal of Molecular Sciences*, **20**, 2745–2764 (2019).
- [1.8] A. P. Aldera & D. Govender, Carbonic anhydrase IX: A regulator of pH and participant in carcinogenesis, *Journal of Clinical Pathology*,

doi:10.1136/jclinpath-2020-207073 (2021).

- [1.9] I. Koyuncu, A. Gonel, M. Durgun, A. Kocyigit, O. Yuksekdog, C. T. Supuran, Assessment of the antiproliferative and apoptotic roles of sulfonamide carbonic anhydrase IX inhibitors in HeLa cancer cell line, *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, **34**, 75–86 (2019).
- [1.10] A. Güttler, K. Theuerkorn, A. Riemann, H. Wichmann, J. Kessler, O. Thews, M. Bache & D. Vordermark, Cellular and radiobiological effects of carbonic anhydrase IX in human breast cancer cells, *Oncology reports*, **41**, 2585–2594 (2019).
- [1.11] P. C. McDonald, S. Chia, P. L. Bedard, Q. Chu, M. Lyle, L. Tang, M. Singh, Z. Zhang, C. T. Supuran, D. J. Renouf & S. Dedhar, A Phase 1 Study of SLC-0111, a Novel Inhibitor of Carbonic Anhydrase IX, in Patients With Advanced Solid Tumors, *American Journal of Clinical Oncology*, **43**, 484–490 (2020).
- [1.12] C. T. Supuran, V. Alterio, A. Di Fiore, K. D’Ambrosio, F. Carta, S. M. Monti, G. De Simone, Inhibition of carbonic anhydrase IX targets primary tumors, metastases, and cancer stem cells: Three for the price of one, *Medcinal Research Reviews*, **38**, 1799–1836 (2018).
- [1.13] E. Temiz, I. Koyuncu, M. Durgun, M. Caglayan, A. Gonel, E. M. Güler, A. Kocyigit & C. T. Supuran, Inhibition of Carbonic Anhydrase IX Promotes Apoptosis through Intracellular pH Level Alterations in Cervical Cancer Cells, *International Journal of Molecular Sciences*, **22**, 6098 (2021).
- [1.14] D. N. Levin, C. A. Pelizzari, G. T. Chen, C. T. Chen & M. D. Cooper, Retrospective geometric correlation of MR, CT and PET images, *Radiology*, **169**, 817–823 (1988).

- [1.15] N. K. Logothetis, J. Pauls, M. Augath, T. Trinath & A. Oeltermann, Neurophysiological investigation of the basis of the fMRI signal, *Nature*, **412**, 150–157 (2001).
- [1.16] A. Sun, X. Tang, D. Nie, Y. Fan & G. Tang, Positron emission tomography imaging of lesions pH using ¹¹C-labeled bicarbonate, *Cancer Biother Radiopharm*, **33**, 285–294 (2018).
- [1.17] A. Schädlich, S. Kempe & K. Mäder, Non-invasive in vivo characterization of microclimate pH inside in situ forming PLGA implants using multispectral fluorescence imaging. *Journal of controlled release, Journal of the Controlled Release Society*, **179**, 52–62 (2014).
- [1.18] D. Villano, F. Romdhane, P. Irrera, L. Consolino, A. Anemone, M. Zaiss, W. Dastrù & D. L. Longo, A fast multislice sequence for 3D MRI-CEST pH imaging, *Magnetic resonance in medicine*, **85**, 1335–1349 (2021).
- [1.19] C. Buyse, N. Joudiou, C. Corbet, O. Feron, L. Mignon, F. J. Iament & B. Gallez, Impact of Inhibition of the Mitochondrial Pyruvate Carrier on the Tumor Extracellular pH as Measured by CEST-MRI, *Cancers*, **13**, 4278 (2021). doi: 10.3390/cancers13174278
- [1.20] A. Bobko, T. D. Eubank, J. L. Voorhees, O. V. Efimova, I. A. Kirilyuk, S. Petryakov, D. G. Trofimov, C. B. Marsh, J. L. Zweier, I. A. Grigor'ev, A. Samouilov & V. V. Khramtsov, In vivo monitoring of pH, redox status, and glutathione using L-band EPR for assessment of therapeutic effectiveness in solid tumors, *Magnetic Resonance in Medicine*, **67**, 1827–1836 (2012).
- [1.21] D. A. Komarov, Y. Ichikawa, K. Yamamoto, N. J. Stewart, S. Matsumoto, H. Yasui, I. A. Kirilyuk, V. V. Khramtsov, O. Inanami & H. Hirata, In vivo

- extracellular pH mapping of tumors using electron paramagnetic resonance, *Analytical Chemistry*, **90**, 13938–13945 (2018).
- [1.22] M. Elas, R. Bell, D. Hleihel, E. D. Barth, C. McFaul, C. R. Haney, J. Bielanska, K. Pustelny, K. Ahn, C. A. Pelizzari, M. Kocherginsky & H. J. Halpern, Electron paramagnetic resonance oxygen image hypoxic fraction plus radiation dose strongly correlates with tumor cure in FSa fibrosarcomas, *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics*, **71**, 542–549 (2008).
- [1.23] A. A. Gorodetsky, I. A. Kirilyuk, V. V. Khramtsov & D. A. Komarov, Functional electron paramagnetic resonance imaging of ischemic rat heart: Monitoring of tissue oxygenation and pH, *Magnetic Resonance in Medicine*, **76**, 350–358 (2016).
- [1.24] S. Koda, J. Goodwin, V. V. Khramtsov, H. Fujii & H. Hirata, Electron paramagnetic resonance-based pH mapping using spectral-spatial imaging of sequentially scanned spectra, *Analytical Chemistry*, **84**, 3833–3837 (2012).
- [1.25] H. G. Fujii, H. Sato-Akaba, M. C. Emoto, K. Itoh, Y. Ishihara & H. Hirata, Noninvasive mapping of the redox status in septic mouse by in vivo electron paramagnetic resonance imaging, *Magnetic Resonance Imaging*, **31**, 130–138 (2013).
- [1.26] H. Sato-Akaba, H. Fujii & H. Hirata, Improvement of temporal resolution for three-dimensional continuous-wave electron paramagnetic resonance imaging, *Review of Scientific Instruments*, **79**, 123701 (2008).
- [1.27] T. Amida, R. Nakaoka, D. A. Komarov, K. Yamamoto, O. Inanami, S. Matsumoto & H. Hirata, A 750-MHz Electronically Tunable Resonator Using Microstrip Line Couplers for Electron Paramagnetic Resonance Imaging of a Mouse Tumor-Bearing Leg, *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, **65**,

1124–1132 (2018).

第2章 高周波磁場発生効率改善の実験

2.1 EPR 共振器の高感度化の背景

高感度な連続波 (CW) EPR 分光やイメージングを行うためには、高い Q 値と高い充填率 η が必要である。これは、EPR 信号強度が Q 値と充填率 η に比例するためである[2.1]。EPR 信号検出では、一般的に共振器の信号電圧 V_S を

$$V_S = \chi'' \eta Q \sqrt{P Z_0} \quad (1)$$

と表せる。この時、 χ'' は高周波磁化率の虚数成分、 P は共振器の入力マイクロ波電力、 Z_0 は伝送線路の特性インピーダンスである[2.2]。ここで、信号電圧 V_S は、伝送線路の特性インピーダンスと入力マイクロ波電力にも依存する。

線形応答領域では、EPR 信号強度は高周波磁場発生効率の2乗に比例する[2.3]。従って、高周波磁場発生効率は EPR 検出の感度を反映するパラメーターとして重要である。近年、腫瘍モデルマウスのイメージングのために、750 MHz チューナブル共振器が開発された[2.4]。この先行研究では、マルチコイルパラレルギャップ (MCPG) 共振器[2.5]が、2つの同軸線路からなる平衡伝送線路を通してマッチング、チューニング回路に結合されている。一般的な EPR 分光装置では、市販の $50\ \Omega$ 同軸線路が使用されている。しかし、より高いインピーダンスの同軸線路を用いることで、潜在的に EPR 信号電圧を増加させることができる。特性インピーダンスが $70\ \Omega$ の2芯同軸ケーブルを用いたサーフェイスクoil共振器[2.6, 2.7]については報告があるが、近年開発されたチューナブル共振器における同軸ケーブルの特性インピーダンスによる影響については未解明である。

本研究の目的は、750-MHz チューナブル共振器における EPR 検出感度への同軸ケーブルの特性インピーダンスが及ぼす影響について明らかにし、チューナブル共振器の信号強度最大化のための最適設計を行うことである

2.2 実験方法

2.2.1 共振器の構造

マイクロストリップライン結合とバラクタダイオードを用いた 750 MHz チューナブル共振器の詳細は既に報告されている。図 2-1 はマイクロストリップラインを用いたチューナブル共振器の回路図である。腫瘍モデルマウスの後肢をイメージングするため、MCPG 共振器のサンプルスペースは直径 16 mm、長さ 20 mm に設定された。MCPG 共振器は架橋ポリスチレン (REXOLITE 1422, C-Lec Plastics Inc, Philadelphia, PA, USA) で作られたボビンに沿った 3 本のコイルループによって構成されている。図 2-1 にあるコンデンサ C_p と C_s は銅被覆されたポリテトラフルオロエチレン (PTFE) 誘電体基板 (0.38 mm 厚, CuFlon, 15-7-7, Polyflon Company, Norwalk, CT, USA) で作製された。MCPG 共振器の外側には、REXOLITE のボビンに銅箔 (50 μm 厚, 10 mm 幅) を短冊状に貼られた RF シールドが設置された。図 2-2 に MCPG 共振器、RF シールドと REXOLITE ボビンの断面図を示す。

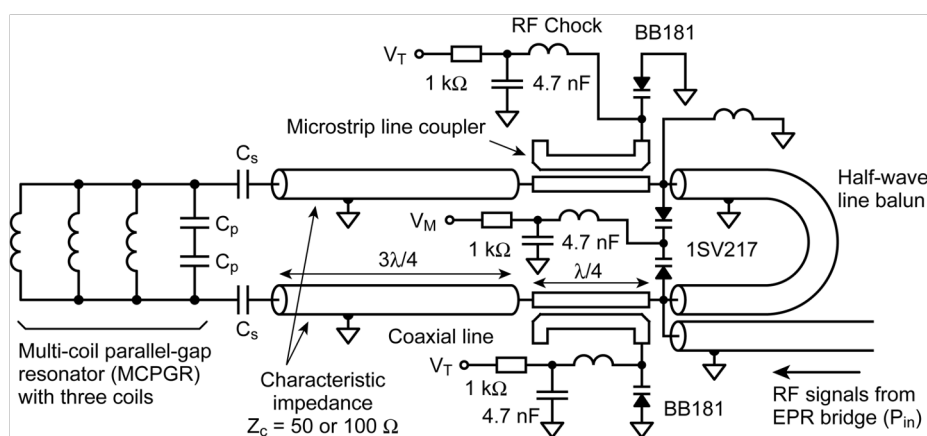


図 2-1 750 MHz チューナブル共振器の回路図

Reprinted by permission from Springer Nature Customer Service Centre GmbH: Springer, Applied Magnetic Resonance, Impact of the characteristic impedance of coaxial lines on the sensitivity of a 750-MHz electronically tunable EPR resonator, R. Nakaoka, H. Hirata, Copyright (2018)

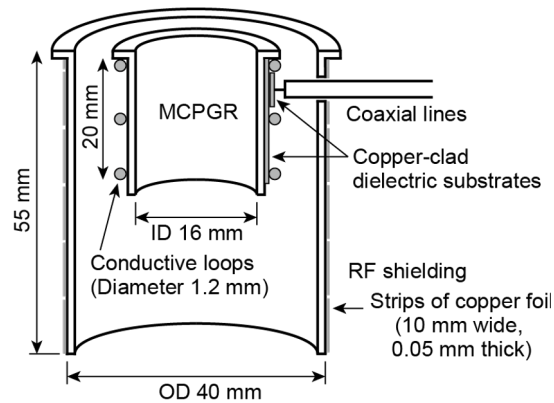


図 2-2 MCPG 共振器の断面図

Reprinted by permission from Springer Nature Customer Service Centre GmbH: Springer, Applied Magnetic Resonance, Impact of the characteristic impedance of coaxial lines on the sensitivity of a 750-MHz electronically tunable EPR resonator, R. Nakaoka, H. Hirata, Copyright (2018)

MCPG 共振器回路は非磁性セミリジット同軸ケーブルで作られた $3/4$ 波長の平衡伝送線路（直径 5.0 mm, 長さ 207 mm, $50\ \Omega$: SC-500/50, $100\ \Omega$: SC-500/100, コアックス株式会社, 横浜市）を通してチューニング、マッチング回路と結合された。同軸ケーブルの中の誘電体（PTFE）の直径は 4.18 mm であり、芯線の直径は $50\ \Omega$ の同軸ケーブルでは 1.27 mm、 $100\ \Omega$ の同軸ケーブルでは 0.37 mm であった。同軸ケーブルの減衰損失は、1 GHz において、 $50\ \Omega$ のケーブルでは 0.28 dB/m、 $100\ \Omega$ のケーブルでは 0.35 dB/m だった（コアックス株式会社のデータシートにより）。平衡伝送線路のもう一方の終端には、チューニングシステムに繋がるマイクロストリップラインを結合した。マイクロストリップラインについては、先行研究において報告されている[2.4]。マイクロストリップラインの特性インピーダンスは $50\ \Omega$ であり、750 MHz での挿入損失と結合率はそれぞれ 0.36 dB と 12.2 dB であった。半波長バランは非磁性セミリジット同軸ケーブル（直径 2.2 mm, 長さ 138 mm, SC-219/50-SC, コアックス株式会社, 横浜市）で作製さ

れた。その減衰損失は 1 GHz において 0.64 dB/m であった。周波数チューニングとインピーダンスマッチングの制御にはバラクタダイオード（可変キャパシタ）を用いた（チューニング：BB181, NXP Semiconductor, Netherland, マッチング：1SV217, 東芝デバイス&ストレージ, 川崎市）。

RF シールドに覆われた MCPG 共振器は 1.6-mm 厚のガラスエポキシ板で作製されたヘルムホルツコイル対（変調コイル）の中心に設置された。機械的な堅牢性の増加のために、ヘルムホルツコイル対の板をそれぞれ 2 mm 厚のガラスエポキシ板と接着した。50 Ω 同軸ケーブルを用いた MCPG 共振器では、コンデンサ C_p は 10 mm $\times$ 22 mm $\times$ 0.38 mm の銅被覆誘電体基板の片側の銅被覆を部分的に取り除くことで 4.3 pF に設定された。結合コンデンサ C_s は 1.5 pF に設定された。100 Ω 同軸ケーブルを用いた MCPG 共振器では、10 mm $\times$ 28 mm $\times$ 0.38 mm の銅被覆誘電体基板で 5.5 pF、結合コンデンサ C_s は 1.0 pF に設定された。これらの値は 2.2.2 節に述べるシミュレーション結果から決定した。MCPG 共振器と RF シールドのボビン、変調コイルを接着している 1 mm 厚のベークライト板に接着された。

チューナブル共振器では、共振器の共鳴周波数を CW EPR 分光装置のキャリア周波数に調整するために、自動チューニング制御を行っており、そのためには適切なチューニング幅を保持している必要がある[2.8]。先行研究では、設定されたチューニング幅は 4 MHz であった[2.4]。しかし、測定中の被検体の動きによる摂動を補償するには 2 MHz で十分であった。また、チューニング幅を狭めることにより高周波磁場発生効率を増加させ、EPR 検出の感度を向上させることができることが分かった。

2.2.2 数値シミュレーション

チューナブル共振器の特性について、ANSYS 社 (Canonsburg, PA, USA) による HFSS 3D マイクロ波シミュレータと Electronics Desktop 2017.2 を用いて数値シミュレーションを行った。図 2-3 に、HFSS 3D マイクロ波シミュレータを用いて作製した導電コイル、並列コンデンサ C_p と結合コンデンサ C_s を含んだ MCPG 共振器を 3D 有限要素モデルを示す。図 2-3 では単純化するために RF シールドは非視覚化されている。放射境界条件による計算領域は $120\text{ mm} \times 120\text{ mm} \times 120\text{ mm}$ に設定された。MCPG 共振器は計算領域の中心に設置された。平衡伝送線路と半波長バランのシミュレーションには Electronics Desktop におけるモデルを使用した。マイクロストリップラインは先行研究にある通りに設定した。バラクタダイオードには、Electronics Desktop における無損失のコンデンサモデルを使用した。回路シミュレーションの中で、コンデンサのキャパシタンスはバラクタダイオードの静電容量の範囲で適時調整された。図 2-4 に、Electronics Desktop におけるチューナブル共振器回路のシミュレーションモデルを示す。

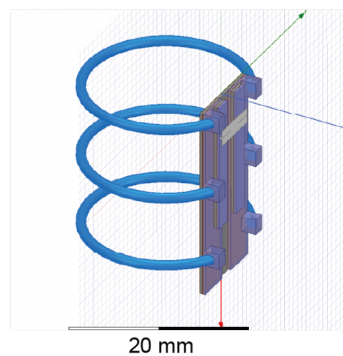


図 2-3 MCPG 共振器の 3D モデル

Reprinted by permission from Springer Nature Customer Service Centre GmbH:
Springer, Applied Magnetic Resonance, Impact of the characteristic impedance of
coaxial lines on the sensitivity of a 750-MHz electronically tunable EPR resonator,
R. Nakaoka, H. Hirata, Copyright (2018)

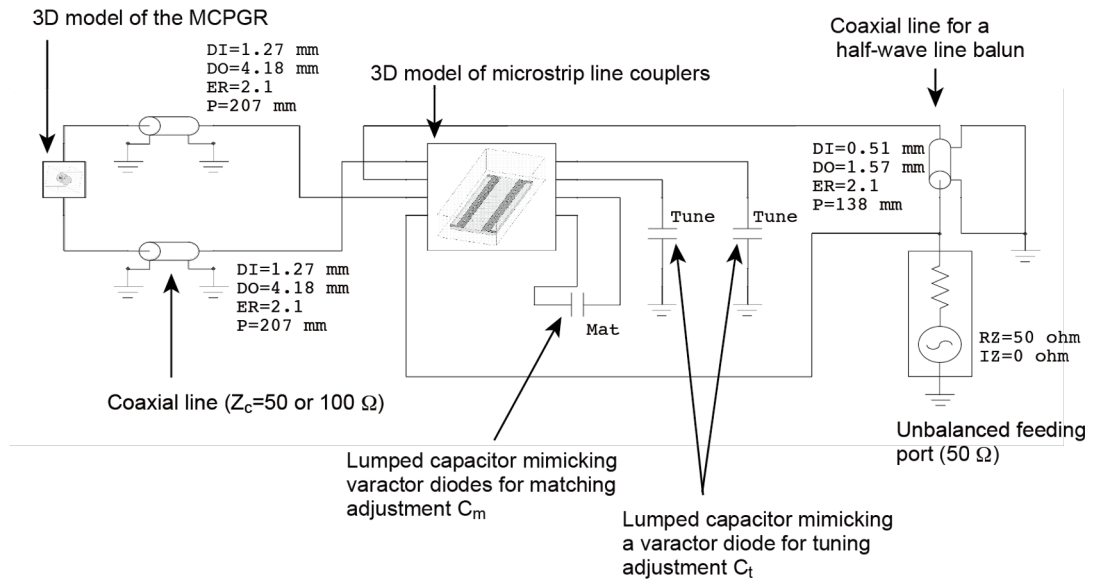


図 2-4 チューナブル共振器の回路モデル

Reprinted by permission from Springer Nature Customer Service Centre GmbH:
Springer, Applied Magnetic Resonance, Impact of the characteristic impedance of
coaxial lines on the sensitivity of a 750-MHz electronically tunable EPR resonator,
R. Nakaoka, H. Hirata, Copyright (2018)

回路内パラメータの最適値を探すため、結合キャパシタ C_s を 0.5-4.0 pF における高周波磁場発生効率を計算した。それぞれの結合キャパシタ C_s において、マッチングキャパシタ C_m を手動で調整することで、共振器回路のインピーダンス整合を図った。チューニングキャパシタ C_t は 12 pF に固定した。共振周波数は、結合キャパシタ C_s の値により変化するため、MCPG 共振器の誘電基板の面積を変化させることでコンデンサ C_p の値を調整し、共振周波数を 749-751 MHz の範囲内に調整した。チューナブル共振器のチューニング幅は、チューニングキャパシタ C_t が 2-12 pF の時の共振周波数のシフトから計算された。高周波磁場発生効率は MCPG 共振器の中心に発生した RF 磁場の値を入力電力 P の平方根で割ることで計算された。

2.2.3 共振器の特性測定

ネットワークアナライザ (E5062A, Keysight Technologies, Santa Rosa, CA, USA) を用いて、チューナブル共振器の反射係数 S_{11} を測定した。MCPG 共振器の中心磁場は金属球摂動法を用いて計算された[2.9]。チューニングシステムに用いているバラクタダイオードの印加電圧 V_T 2 V~14 V における共振周波数のシフトにより、チューニング幅を算出した。

2.2.4 EPR 分光測定

EPR 信号検出の感度を調べるために、研究室で作製された 750 MHz CW-EPR 分光装置のマグネットの間に、開発したチューナブル共振器を設置した。CW-EPR 分光装置の詳細は、先行研究で報告されている[2.10, 2.11]。分光測定は、水溶液サンプルとしてリン酸緩衝液で溶解された 2 mM のニトロキシラジカル 4-oxo-2,2,6,6-tetramethylpiperidine- d_{16} , 1- ^{15}N -1-oxy (^{15}N -PDT, CDN Isotopes Inc, Quebec, Canada) が 2.0 mL 入ったマイクロチューブ (内径 9 mm, 長さ 37 mm) を用いて行われた。図 2-5 に、 ^{15}N -PDT の化学構造式を示す。EPR 分光は表 2-1 に示すパラメータで行なわれた。EPR 信号が飽和しない値に入射マイクロ波電力を設定し、より高い信号対雑音比を得るために、磁場変調振幅をわずかに過変調である値に設定した。SNR は、1 次微分形 EPR スペクトルのピーク間信号強度をスペクトルのベースラインの信号の二乗平均平方根 (RMS) の 2 倍の値で割ることで求められた。

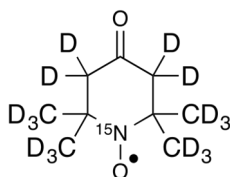


図 2-5 ^{15}N -PDT の化学構造式

表 2-1 EPR 分光測定パラメータ

掃引時間	100 ms	磁場変調周波数	90 kHz
掃引幅	5.0 mT	磁場変調振幅	70 μT
時定数	30 μs	データポイント数	2048
積算回数	100 回	入射マイクロ波電力	5.5 mW

2.2.5 EPR イメージング

水溶液サンプルの 3 次元 EPR イメージングは、シングルポイントイメージング法を用いて行われた[2.12-2.14]。X, Y, Z 方向に $15 \times 15 \times 15$ の磁場勾配が印加され、合計で 3375 のスペクトルを取得した。各方向の最大磁場勾配は 30 mT/m とした。EPR イメージの SNR を増加させるために EPR スペクトルを 2 セット取得して積算した。全ての画像取得時間は 15 分であった。中心磁場は ^{15}N -PDT ラジカルの吸収曲線の低磁場側に設定された。磁場掃引幅は 1.5 mT, Lock-in アンプの時定数は 100 μs , 1 スキャンあたりのデータ点数は 512 とした。その他の測定パラメータは 2.2.4 節の分光測定パラメータと同様である。

表 2-2 EPR イメージングパラメータ

掃引時間	100 ms	磁場変調周波数	90 kHz
掃引幅	1.5 mT	磁場変調振幅	40 μT
時定数	100 μs	データポイント数	512
積算回数	1 回	入射マイクロ波電力	2.8 mW

腫瘍モデルマウスの後肢の *in vivo* EPR イメージングのプロープとして、ニト

ロキシラジカル, trans-3,4-dicarboxy-2,2,5,5-tetra($^2\text{H}_3$)methylpyrrolidin-(3,4- $^2\text{H}_2$)-(1- ^{15}N)-1-oxy (^2H , ^{15}N -DCP) [2.15]を用いた。 ^2H , ^{15}N -DCP ラジカルは、ノヴォシビルスク州立有機化学研究所の Dr. Igor A. Kirilyuk により提供された。動物実験は先行研究と同様に施行された[2.16]。C3H HeJ マウス (7 週齢, オス) の右後肢にマウス扁平上皮がん (SCC VII) 細胞を皮下移植した[2.17]。腫瘍体積が 0.5 cm^3 を超えた時に、イメージング測定を行った。麻酔をかけられたマウスにプローブ ^2H , ^{15}N -DCP ($150\text{ }\mu\text{L}$, 100 mM , 0.75 mmol/kg body weight for a 20-g mouse) を尾静脈注射した。この投与量は、ニトロキシラジカルプローブを用いた生体イメージングの先行研究に基づいている[2-18, 2-19]。プローブ投与の 10 分後に EPR イメージング測定を開始した。EPR 生体イメージングのパラメータを表 2-2 に示す。中心磁場は ^2H , ^{15}N -DCP ラジカルの吸収曲線の低磁場側に設定された。EPR スペクトルは、上記の水溶液サンプルイメージングと同様に取得された。画像取得時間は、7.5 分であった。

2.3 実験結果

2.3.1 数値シミュレーションによる最適化

チューナブル共振器の数値モデルを用いて、共振周波数における MCPG 共振器内の高周波磁場を可視化した。図 2-6 に、MCPG 共振器の断面の高周波磁場ベクトルの絶対値を示す。 $50\text{ }\Omega$ 同軸線路、結合キャパシタ $C_s=1.5\text{ pF}$ 、入力 RF パワー 1 W を用いて、高周波磁場を計算した。MCPG 共振器の中心における高周波磁場は 48 A/m であった。RF シールドの開いている MCPG 共振器の上部と下部では、漏れ磁場が確認された。コイルループの付近において高い磁場が確認されたが、MCPG 共振器の中心領域 (円柱状に X 方向 12 mm , Z 方向 11 mm , Y 方向 17 mm) では、 $\pm 10\%$ の偏差で均一な磁場であった。高周波磁場発生効率 は 61

$\mu\text{T}/\text{W}^{1/2}$ であった。100- Ω 同軸線路、結合キャパシタ $C_s=1.0\text{ pF}$ を用いたチューナブル共振器の高周波磁場発生効率、 $75\text{ }\mu\text{T}/\text{W}^{1/2}$ であった。

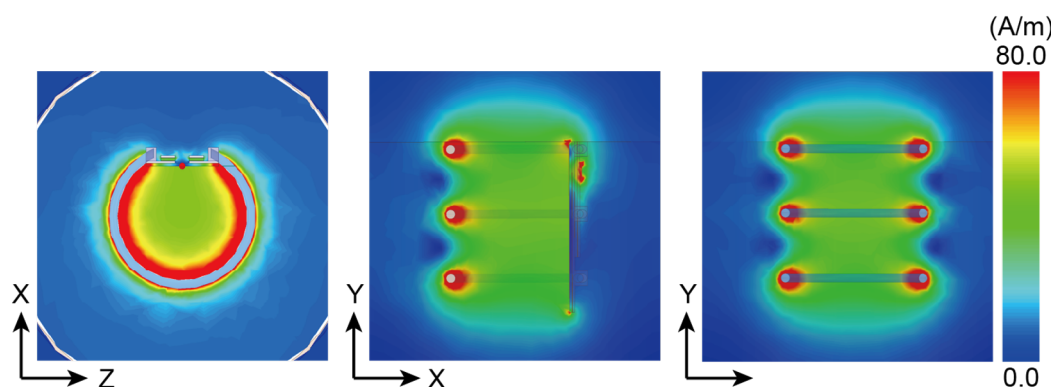


図 2-6 MCPG 共振器内の磁界分布

Reprinted by permission from Springer Nature Customer Service Centre GmbH: Springer, Applied Magnetic Resonance, Impact of the characteristic impedance of coaxial lines on the sensitivity of a 750-MHz electronically tunable EPR resonator, R. Nakaoka, H. Hirata, Copyright (2018)

図 2-7(a)は、結合キャパシタ C_s に対する、MCPG 共振器の中心の高周波磁場発生効率とマッチングキャパシタ C_m 、図 2-7(b)は、チューニング幅を示している。 $C_s=1.0\text{ pF}$ において、高周波磁場発生効率は最大であるが、チューニング幅は 2 MHz よりも小さい。 $C_s=1.0\text{ pF}$ 周辺以外では、同軸線路 50 Ω のチューナブル共振器よりも 100 Ω のチューナブル共振器の方が高周波磁場発生効率は大きい。これらの結果から、EPR 信号強度は高周波磁場発生効率に依存するため、100 Ω のチューナブル共振器の方が高い EPR 信号検出の感度を示すと考えられる。さらに、50 Ω のチューナブル共振器よりも 100 Ω 同軸線路の方が広いチューニング幅を持っていた。2 MHz 以上のチューニング幅を得るために、50 Ω 、100 Ω のチューナブル共振器で、結合キャパシタ C_s はそれぞれ 1.5 pF、1.0 pF 以上であることが望まれる。

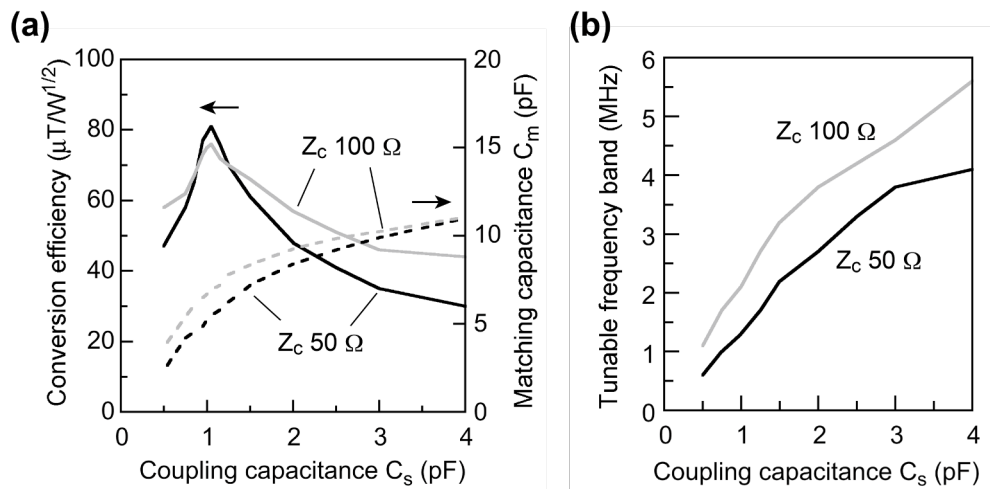


図 2-7 結合キャパシタ C_s に対する (a) MCPG 共振器の中心の高周波磁場発生効率とマッチングキャパシタ C_m 、(b) チューニング幅

Reprinted by permission from Springer Nature Customer Service Centre GmbH: Springer, Applied Magnetic Resonance, Impact of the characteristic impedance of coaxial lines on the sensitivity of a 750-MHz electronically tunable EPR resonator, R. Nakaoka, H. Hirata, Copyright (2018)

共振器の中の同軸線路とマイクロストリップラインの間のインピーダンス整合に、2つの状態がある。マイクロストリップラインのインピーダンスは 50Ω であるため、 50Ω 同軸線路はマイクロストリップラインとインピーダンス整合を取る。しかし、 100Ω 同軸線路はマイクロストリップラインとインピーダンス整合を取らない。平衡伝送線路は2つの同軸線路で成っており、マイクロストリップラインは共振器システムの一部である。したがって、同軸線路とマイクロストリップラインの間のインピーダンス整合は、共振器システムのこれらの伝送線路内の蓄えられた磁場エネルギーの分布に影響する。共振器の感度向上には、このエネルギー分布が重要となる[2.20]。共振器の最適設計のためには、同軸線路とマイクロストリップラインの中に蓄えられたエネルギーについて、より深く検討する必要がある。

2.3.2 共振器の特性評価

50 Ω 、100 Ω の同軸線路を用いたチューナブル共振器をシミュレーション結果に基づき作製した。図 2-8 に、実際に作製した 50 Ω のチューナブル共振器の写真を示す。図 2-9(a)に、インピーダンスマッチング特性（反射係数 S_{11} ）を示す。空の共振器において、チューニング回路への印加電圧 $V_T=8$ V の時、マッチング回路への印加電圧 $V_M=7.7$ V で、インピーダンス整合となった。図 2-9(b)は、チューニング回路への印加電圧と、50 Ω 、100 Ω のチューナブル共振器の共振周波数の依存性を示す。各チューニング電圧において、チューナブル共振器のインピーダンス整合を取るように、マッチング電圧は調整された。50 Ω のチューナブル共振器では、チューニング電圧 $V_T=2-14$ V において、共振周波数は 746.9 MHz から 750.0 MHz（チューニング幅 3.1 MHz）にシフトした。100 Ω のチューナブル共振器では、746.6 MHz から 748.7 MHz（チューニング幅 2.1 MHz）であった。この測定結果は、シミュレーションから想定した結果とは異なるものであった。これは、バラクタダイオードの容量、マイクロストリップラインの結合と結合容量の、数値モデルと構築されたチューナブル共振器の違い、および構築されたチューナブル共振器の浮遊容量によるものであると説明できる。

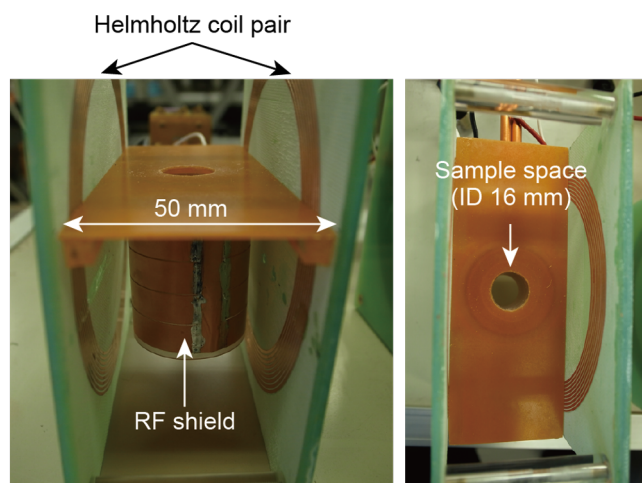


図 2-8 作製した 50- Ω のチューナブル共振器

Reprinted by permission from Springer Nature Customer Service Centre GmbH:
Springer, Applied Magnetic Resonance, Impact of the characteristic impedance of
coaxial lines on the sensitivity of a 750-MHz electronically tunable EPR resonator,
R. Nakaoka, H. Hirata, Copyright (2018)

50- Ω のチューナブル共振器では、高周波磁場発生効率は $80 \mu\text{T}/\text{W}^{1/2}$ であり、無負荷の Q 値は 130 であった。一方、100 Ω のチューナブル共振器では、高周波磁場発生効率は $97 \mu\text{T}/\text{W}^{1/2}$ であり、無負荷の Q 値は 150 であった。測定された高周波磁場発生効率は、シミュレーション結果から想定した値よりも 30% 高かったが、50 Ω と 100 Ω のチューナブル共振器のそれぞれの高周波磁場発生効率の差は、想定した通りの結果となった。同軸線路の特性インピーダンスの増加に伴い、シミュレーションと実測で共に磁場発生効率が増加している傾向を表しているため、シミュレーションにより正しく最適化できていると考えられる。この研究において構築されたチューナブル共振器は、先行研究において同じ直径で作成されたチューナブル共振器 ($34 \mu\text{T}/\text{W}^{1/2}$) よりも、高周波磁場発生効率が 2.4~2.9 倍向上した。この結果は、チューニング幅の最適化により達成したと考えられる。従って、伝送線路と結合キャパシタにおけるシミュレーションにより、チューナブル共振器のマイクロ波伝送の最適化を実現できることを示した。

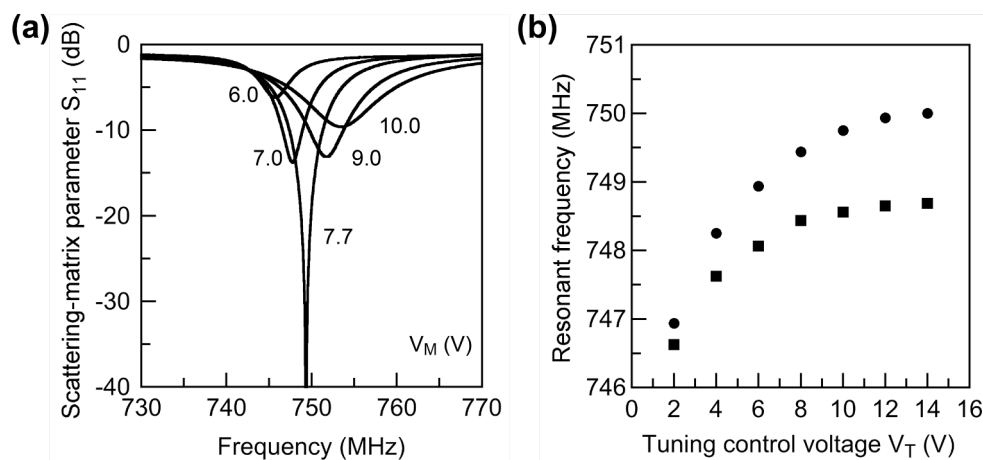


図 2-9 (a)インピーダンス マッチング特性、(b) チューニング回路への印加電圧と共振周波数の関係

Reprinted by permission from Springer Nature Customer Service Centre GmbH: Springer, Applied Magnetic Resonance, Impact of the characteristic impedance of coaxial lines on the sensitivity of a 750-MHz electronically tunable EPR resonator, R. Nakaoka, H. Hirata, Copyright (2018)

2.3.3 信号強度と SNR

作製した $50\text{-}\Omega$ と $100\text{-}\Omega$ の同軸線路を用いたチューナブル共振器により、EPR スペクトルを取得した。図 2-10 は、 $100\text{ }\Omega$ (上) と $50\text{ }\Omega$ (下) のチューナブル共振器による、2 mL マイクロチューブに詰めた 2 mM の ^{15}N -PDT ラジカル水溶液の EPR スペクトルを示す。 $100\text{-}\Omega$ のチューナブル共振器では、EPR 信号の信号強度が 14% 高く、これは高周波磁場のシミュレーション結果に即している。しかし、 $100\text{ }\Omega$ のチューナブル共振器では、ベースラインノイズの強度も $50\text{ }\Omega$ のチューナブル共振器よりも高くなった。 $50\text{ }\Omega$ と $100\text{ }\Omega$ のケーブルを用いたチューナブル共振器それぞれにおいて、EPR スペクトルの SNR は 149 と 134 であった。

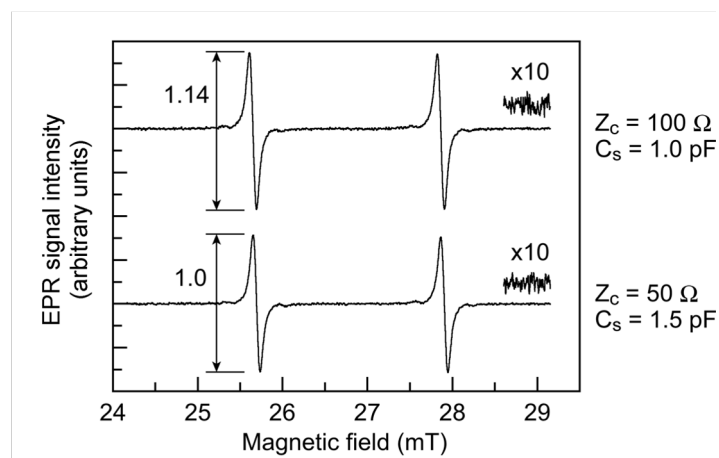


図 2-10 100- Ω (上) と 50- Ω (下) のチューナブル共振器による 2 mM ^{15}N -PDT ラジカル水溶液の EPR スペクトル

Reprinted by permission from Springer Nature Customer Service Centre GmbH: Springer, Applied Magnetic Resonance, Impact of the characteristic impedance of coaxial lines on the sensitivity of a 750-MHz electronically tunable EPR resonator, R. Nakaoka, H. Hirata, Copyright (2018)

連続した 3 回の測定から、100 Ω のチューナブル共振器では高い EPR 信号強度が得られる一方、50 Ω のチューナブル共振器の方がわずかに SNR が高いことがわかった。これは、50 Ω の同軸線路に比べて 100 Ω の同軸線路の方が高い熱雑音を持っていることに起因すると考えられる。また、伝送線路に使用している 100 Ω 同軸ケーブルの芯線は直径 0.37 mm であり、50 Ω 同軸ケーブルの 1.27 mm に比べて約 1/3 の細さとなっている。それにより、接続の安定性の低下や振動による雑音が生じたと考えられる。100 Ω の同軸線路においてこれらの雑音が増加したことで、EPR 信号強度の高さに関わらず、SNR が低下してしまった。

100 Ω の同軸線路を用いたことで、伝送線路と MCPG 共振器の間の電圧反射係数が減少した。これは、MCPG 共振器が共振により高インピーダンスになることに起因する。電圧反射係数が減少したことで、MCPG 共振器に伝送されるマイクロ波が増え、高周波磁場発生効率が増加した。更に、式 (1) により、高

いインピーダンスの伝送線路に結合された共振器では、信号電圧が高い。結合キャパシタを通して MCPG 共振器に結合している $100\ \Omega$ 同軸線路は、共振器システムの一部であるため、同軸線路のインピーダンスは直接的な式 (1) の伝送線路のインピーダンスではない。しかし、図 2-10 に示すように、信号電圧の増加に起因していると考えられる。

EPR 検出の感度は、EPR スペクトルの信号強度とベースラインノイズに関係する。共振器における高周波磁場、すなわち高周波磁場発生効率、は、信号強度に直接的に関係する。しかし、本研究で作製した共振器のシミュレーションモデルでは、雑音について考慮されていなかった。2 つの作製した共振器の大きな違いは $3/4$ 波長の同軸線路のインピーダンスであるため、ベースラインノイズの増加は同軸線路の雑音に起因すると考えられる。従って、マイクロ波伝送の向上に対して雑音の増加が十分に小さい特性インピーダンスの伝送線路が求められる。先行研究[2.6, 2.7]において用いられている特性インピーダンス $70\ \Omega$ の伝送線路は 2 芯同軸ケーブルであり、比較的柔軟に調整することができるが、本研究に用いている同軸線路の特性インピーダンスには規格の制限があるため、特性インピーダンスを柔軟に変えることは難しい。従って、開発可能である特性インピーダンスの伝送線路の中で SNR が最大となった $50\ \Omega$ の同軸線路のチューナブル共振器を用いる。更に、2 つの共振器の違いは、インピーダンスマッチングに用いているバラクタダイオードへ印加している逆バイアス電圧にある。これはバラクタダイオードで発生する雑音に影響している。共振器における感度と、取得される EPR 信号の SNR について深く理解するためには、共振器で発生する雑音についての深い分析が必要がある。

2.3.4 水溶液サンプルの EPR イメージング

構築したチューナブル共振器の撮像可能領域を調べるために、 ^{15}N -PDT ラジカル水溶液の撮像を行った。図 2-11(a)は、撮像に用いた 2 mM の ^{15}N -PDT ラジカル水溶液 2 mL のマイクロチューブの写真である。マイクロセントリフュージチューブの長さは 37 mm であるため、長さが 20 mm である MCPG 共振器の外にチューブの下側は出ていた。図 2-10(b)に、信号強度の最大値の 25% 閾値で計算された EPR 信号強度の 3D 画像、図 2-10(c)に 3D 画像から選択されたスライスの 2D 画像を示す。 ^{15}N -PDT ラジカル水溶液のチューブの画像化された長さは、MCPG 共振器よりも長く、およそ 24 mm であった。これは、MCPG 共振器の漏れ磁場によるものだと考えられる。シミュレーション結果による MCPG 共振器の高周波磁場分布（図 2-6）により、この撮像可能領域の拡大が説明できる。

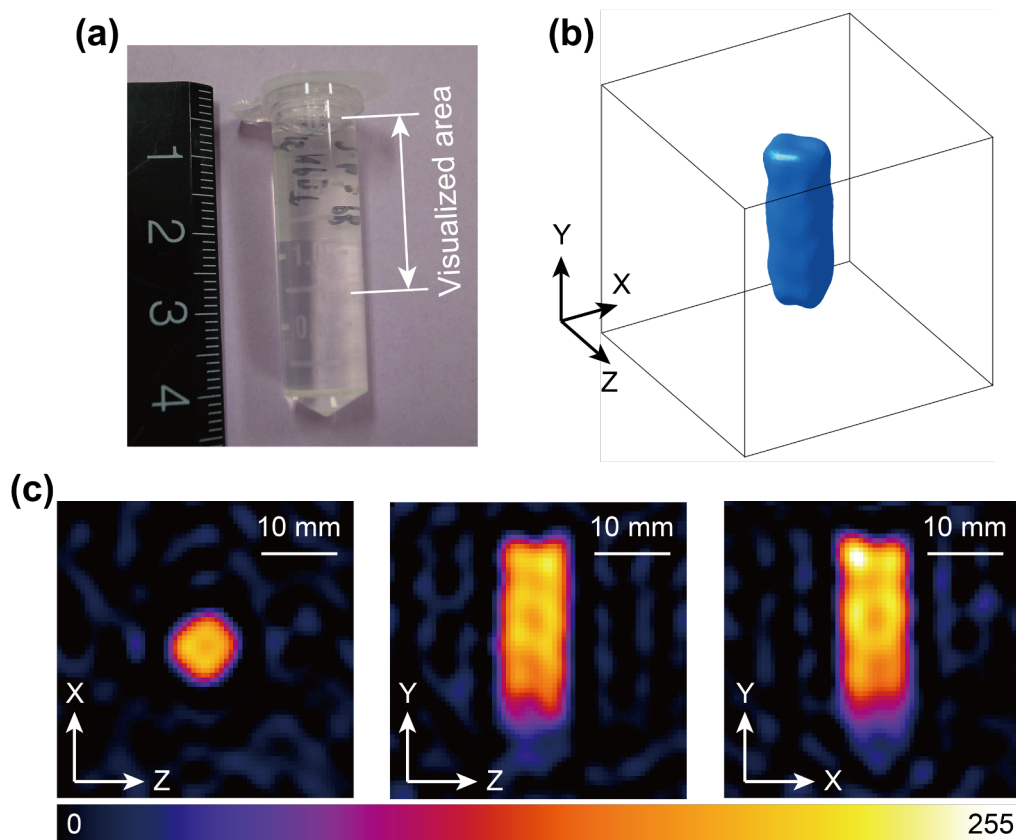


図 2-11 (a) 2 mM¹⁵N-PDT ラジカル水溶液チューブ、(b) EPR 信号強度の 3D 画像、(c) 2D 画像

Reprinted by permission from Springer Nature Customer Service Centre GmbH: Springer, Applied Magnetic Resonance, Impact of the characteristic impedance of coaxial lines on the sensitivity of a 750-MHz electronically tunable EPR resonator, R. Nakaoka, H. Hirata, Copyright (2018)

2.3.5 *In Vivo* EPR イメージング

作成したチューナブル共振器の安定性と感度を調べるために、腫瘍モデルマウスの後肢の撮像を行った。*in vivo* 実験では、EPR 吸収ピークが狭く、生体内で 25 分の半減期を持つ ²H, ¹⁵N-DCP ラジカルをイメージングプローブとして用いた。図 2-12(a)に、MCPG 共振器内の腫瘍モデルマウスの後肢の配置の模式図を示す。マウスの後肢を入れた状態のチューナブル共振器の Q 値は 100、磁場発生効率は $62 \mu\text{T}/\text{W}^{1/2}$ であった。チューナブル共振器の共振周波数は、750.8 MHz

から 747.2 MHz (-3.6 MHz) にシフトした。図 2-12(b)に、信号強度の最大値 25% の閾値で計算された腫瘍モデルマウスの EPR 信号強度の 3D 画像、(c)に 3D 画像から選択されたスライスの 2D 画像を示す。EPR データ収集中、チューナブル共振器のチューニング制御回路により、マウスの生理学的動きによる共振周波数のずれを均等に補正した。

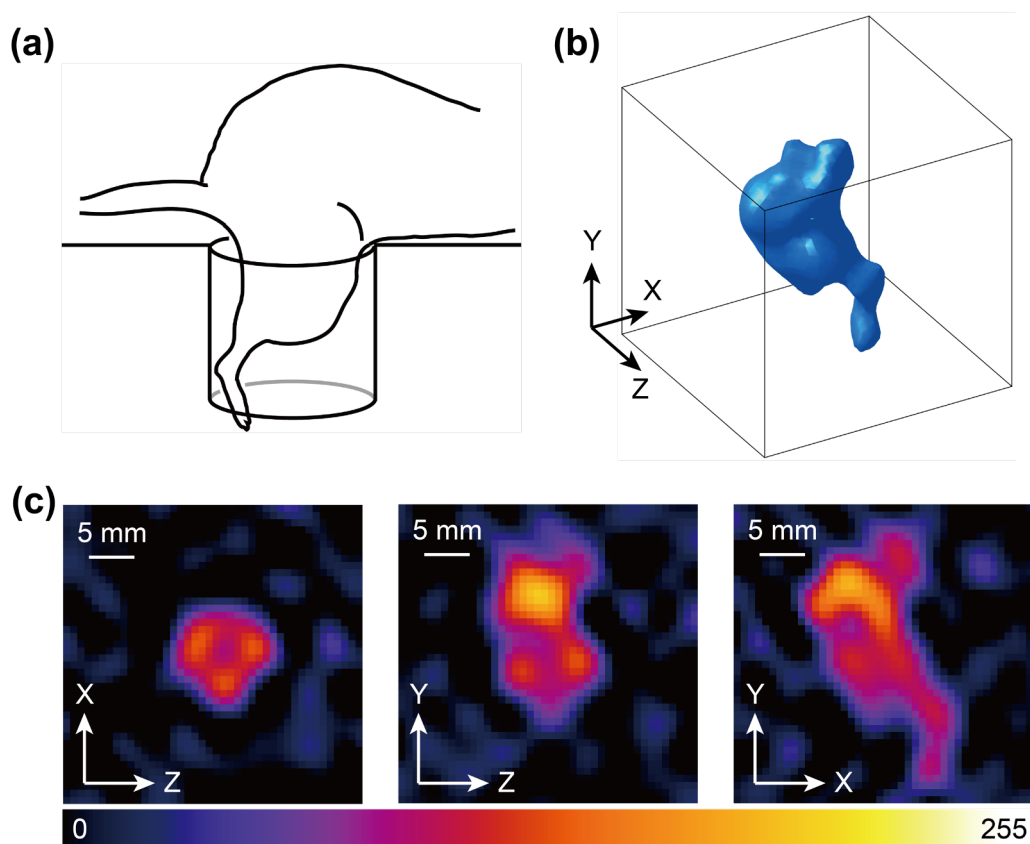


図 2-12 (a) MCPG 共振器内の腫瘍モデルマウスの後肢の配置、(b) EPR 信号強度の 3D 画像、(c)2D 画像

Reprinted by permission from Springer Nature Customer Service Centre GmbH: Springer, Applied Magnetic Resonance, Impact of the characteristic impedance of coaxial lines on the sensitivity of a 750-MHz electronically tunable EPR resonator, R. Nakaoka, H. Hirata, Copyright (2018)

2.4 まとめ

第2章の研究では、先行研究[2.4]と比較して、高周波磁場発生効率を2.4~2.9倍増加させることに成功した。チューナブル共振器における同軸線路の特性インピーダンスがEPR信号検出の感度だけでなく、スペクトルのベースラインノイズにも影響することがわかった。50 Ω 同軸線路を用いたチューナブル共振器では、100 Ω のチューナブル共振器より10% SNRが高い結果となり、低いインピーダンスの同軸線路を用いた方が、EPRスペクトルのSNRが高いことがわかった。*in vivo* EPRイメージングのためには、チューナブル共振器で発生する雑音についての分析とそれを踏まえた最適設計を目指す必要がある。

2.5 参考文献

- [2.1] G. R. Eaton, S. S. Eaton, D. P. Barr & R. T. Weber, Quantitative EPR, 79–90 (Springer, Wien, 2010).
- [2.2] G. A. Rinard, S. S. Eaton, G. R. Eaton, C. P. Poole Jr. & H. A. Farach, Handbook of Electron Spin Resonance, vol. 2, ed. by C. P. Poole Jr, H. A. Farach, 1–23 (Springer, New York, 1999).
- [2.3] G. R. Eaton, S. S. Eaton, D. P. Barr & R. T. Weber, Quantitative EPR, 37–61 (Springer, Wien, 2010).
- [2.4] T. Amida, R. Nakaoka, D. A. Komarov, K. Yamamoto, O. Inanami, S. Matsumoto & H. Hirata, A 750-MHz Electronically Tunable Resonator Using Microstrip Line Couplers for Electron Paramagnetic Resonance Imaging of a Mouse Tumor-Bearing Leg, *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, **65**, 1124–1132 (2018).
- [2.5] Y. Kawada, H. Hirata & H. Fujii, Use of multi-coil parallel-gap resonators for co-registration EPR/NMR imaging, *Journal of Magnetic Resonance*, **184**, 29–38 (2007).
- [2.6] T. Haga, H. Hirata, P. Lesniowski, K. M. Rychert, B. B. Williams, A. B. Flood & H. M. Swartz, L-band surface-coil resonator with voltage-control impedance-matching for EPR tooth dosimetry, *Concepts in Magnetic Resonance Part B Magnetic Resonance Engineering*, **43B**, 32–40 (2013).
- [2.7] H. Sugawara, H. Hirata, S. Petryakov, P. Lesniewski, B. B. Williams, A. B. Flood, & H. M. Swartz, Design and evaluation of a 1.1-GHz surface coil resonator for electron paramagnetic resonance-based tooth dosimetry, *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, **61**, 1894–1901 (2014).
- [2.8] H. Hirata, H. Watanabe, M. Kumada, K. Itoh & H. Fujii, Decoupling of automatic control systems in a continuous-wave electron paramagnetic resonance spectrometer for biomedical applications, *NMR in Biomedicine*, **17**, 295–302 (2004).
- [2.9] J. H. Freed, D. S. Leniart & J. S. Hyde, Theory of saturation and double resonance effects in ESR spectra. III. rf coherence and line shapes, *The Journal of Chemical Physics*, **47**, 2762–2773 (1967).

- [2.10] H. Sato-Akaba, H. Fujii & H. Hirata, Improvement of temporal resolution for three-dimensional continuous-wave electron paramagnetic resonance imaging, *Review of Scientific Instruments*, **79**, 123701 (2008).
- [2.11] H. Sato-Akaba, Y. Kuwahara, H. Fujii & H. Hirata, Half-life mapping of nitroxyl radicals with three-dimensional electron paramagnetic resonance imaging at an interval of 3.6 seconds, *Analytical Chemistry*, **81**, 7501–7506 (2009).
- [2.12] S. Subramanian, N. Devasahayam, R. Murugesan, K. Yamada, J. Cook, A. Taube, J. B. Mitchell, J. A. B. Lohman & M. C. Krishna, Single-point (constant-time) imaging in radiofrequency Fourier transform electron paramagnetic resonance, *Magnetic Resonance in Medicine*, **48**, 370–379 (2002).
- [2.13] K. Matsumoto, B. Chandrika, J. A. B. Lohman, J. B. Mitchell, M. C. Krishna & S. Subramanian, Application of continuous-wave EPR spectral-spatial image reconstruction techniques for in vivo oxymetry: Comparison of projection reconstruction and constant-time modalities, *Magnetic Resonance in Medicine*, **50**, 865–874 (2003).
- [2.14] H. Jang, S. Subramanian, N. Devasahayam, K. Saito, S. Matsumoto, M.C. Krishna & A.B. McMillan, Single acquisition quantitative single-point electron paramagnetic resonance imaging, *Magnetic Resonance in Medicine*, **70**, 1173–1181 (2013).
- [2.15] A. A. Gorodetsky, I. A. Kirilyuk, V. Khramtsov & D. A. Komarov, Functional electron paramagnetic resonance imaging of ischemic rat heart: Monitoring of tissue oxygenation and pH, *Magnetic Resonance in Medicine*, **76**, 350–358 (2016).
- [2.16] H. Kubota, D. A. Komarov, H. Yasui, S. Matsumoto, O. Inanami, I. A. Kirilyuk, V. V. Khramtsov & H. Hirata, Feasibility of in vivo three-dimensional T_2^* mapping using dicarboxy-PROXYL and CW-EPR-based single-point imaging, *Magnetic Resonance Materials in Physics, Biology and Medicine*, **30**, 291–298 (2017).
- [2.17] H. D. Suit & C. Suchato, Hyperbaric oxygen and radiotherapy of a fibrosarcoma and of a squamous-cell carcinoma of C3H mice, *Radiology*, **89**, 713–719 (1967).
- [2.18] F. Hyodo, S. Matsumoto, N. Devasahayam, C. Dharmaraj, S. Subramanian, J. B. Mitchell & M. C. Krishna, Pulsed EPR imaging of nitroxides in mice, *Journal of*

Magnetic Resonance, **197**, 181–185 (2009).

- [2.19] M. C. Emoto, H. Sato-Akaba, H. Hirata & H. G. Fujii, Dynamic changes in the distribution and time-course of blood-brain barrier-permeable nitroxides in the mouse head with EPR imaging: Visualization of blood flow in a mouse model, *Free Radical Biology and Medicine*, **74**, 222–228 (2014).
- [2.20] H. Hirata, T. Walczak & H. M. Swartz, Characteristics of an electronically tunable surface-coil-type resonator for L-band electron paramagnetic resonance spectroscopy, *Review of Scientific Instruments*, **72**, 2839–2841(2001).

第3章 チューナブル共振器における雑音の分析

3.1 EPR 共振器における雑音についての背景

EPR 分光およびイメージングにおいて、高い感度を実現するためには、EPR スペクトルの信号対雑音比を最大化する必要がある。そのためには、EPR スペクトルにおける信号強度を増加させ、ベースラインの雑音を減少させる必要がある。特に EPR 吸収ピークの近くまたは同じ周波数の雑音は EPR スペクトルの検出にエラーを引き起こし、EPR 測定の感度が制約される。従って、EPR 測定感度を改善するためには、EPR 分光装置における雑音源について理解を深めることは必要不可欠である。共振器の高周波磁場発生効率¹⁾は EPR スペクトルの信号強度に比例することは分かっている一方[3.1-3.3]、EPR 分光装置の雑音源と共振器に関連する雑音レベルについてはより深い調査が必要である。

X-band EPR 分光装置では、Pfenninger らによる EPR 分光装置の雑音分析の報告がある[3.4]。しかし、小動物計測用の共振器についての雑音電圧を算出する一般的な式は提示されていない。核磁気共鳴測定では、Suits らにより RF シールドを用いることなく外部環境による雑音電圧を削減する雑音耐性コイルが設計された[3.5]。更に、Kumar らにより、周波数の関数による円形ループ共振器における雑音指数が報告された[3.6]。これらの研究から、共振器の構成、幾何学的および電氣的パラメータが、磁気共鳴分光法における雑音指数、したがって小動物実験の EPR 測定感度に大きな影響を与えることは明らかである。生体の EPR 分光測定実験において、一般的に 3 種類の雑音源、(1)実験動物からの雑音（サンプルノイズ）、(2)共振器を含めた EPR 分光装置からの雑音（システムノイズ）、(3)外部環境からの雑音（環境ノイズ）がある。第 3 章の研究では、腫瘍モデルマウスを測定するために開発された 750 MHz チューナブル共振器[3.7, 3.8]を用

いて取得された EPR スペクトルのベースライン雑音の評価と削減を行った。チューナブル共振器は、共振周波数の調整（チューニング）とインピーダンス整合の調整（マッチング）を自動制御可能な共振器であり、本研究で用いている 750 MHz チューナブル共振器では、印加電圧により静電容量が可変であるバラクタダイオードを用いてマッチング、チューニングを自動制御している。チューナブル共振器で発生する雑音は、熱雑音とバラクタダイオードで発生する雑音で構成される。しかし、チューナブル共振器の高周波雑音の特性と EPR スペクトルのベースラインへの影響については未だ明らかになっていない。本研究に用いるチューナブル共振器は、マウスの後肢に対応するために半開 RF シールド構造を採用しているため、標準の X-band キャビティ共振器とはシールドとコイルの形状が異なり、既存の研究結果を直接変換して、750 MHz EPR 分光装置の雑音指数をモデル化することはできない。

本研究の目的は、EPR スペクトルに対する複数の雑音源による影響を実験的に調査し、チューナブル共振器における支配的な雑音源を明らかにすることである。この研究では、EPR スペクトルのベースラインの雑音レベルと外部環境による高周波雑音の影響を定量的に調査した。この調査により、チューナブル共振器の支配的な雑音源を削除することで、高感度な *in vivo* EPR 分光およびイメージングに繋がる。

3.2 実験方法

3.2.1 雑音の算出方法

図 3-1 に示すチューナブル共振器の回路で発生する雑音について算出した。雑音の評価方法は、雑音電力スペクトル密度や雑音温度など様々あるが、計測結果として得られやすいなどの理由から、本研究では雑音電圧を用いた。チューナ

ブル共振器で発生するノイズは、(1)熱雑音と(2)ショット雑音について算出を行った。それぞれの算出方法について以下に説明する。

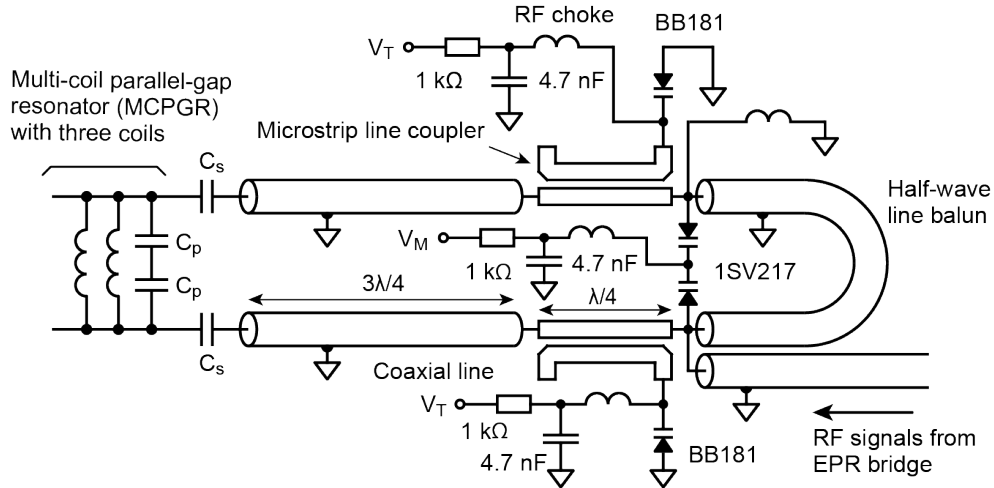


図 3-1 チューナブル共振器回路図

Reprinted from AIP Adv. 9, 075312 (2019); licensed under a Creative Commons Attribution (CC BY) license.

(1) 熱雑音

熱雑音の雑音電圧 V_{thermal} は下式によって求められる[3.9]。

$$V_{\text{thermal}} = \sqrt{4kTR\Delta f} \quad (1)$$

k はボルツマン定数 $1.38064852 \times 10^{-23}$ [J/K]、 T は絶対温度 [K]、 Δf は周波数帯域 [Hz]、 R は素子の抵抗値 [Ω]である。以下の計算では、絶対温度 $T=300$ K、EPR 装置に用いているローパスフィルタの周波数帯域 $\Delta f = 998$ kHz を用いる。チューナブル共振器の各素子を直流抵抗、熱雑音源で表した回路図を図 3-2 に示す。それぞれ、 R_{coil} は図 3-1 における結合コンデンサ C_s を含む MCPG 共振器、 R_{coax} は同軸線路、 $R_{\text{MSL}}(+\text{BB181})$ はチューニング制御のためのバラクタダイオード BB181 を含むマイクロストリップライン、 R_v はマッチング制御をしているバラクタダイオード 1SV217、 R_u は半波長 U バランの抵抗値を表している。熱雑

音の雑音源である(A) MCPG 共振器、(B) 同軸ケーブル、(C) バラクタダイオード、(D) マイクロストリップライン、(E) MCPG 共振器内で発生する損失について、以下の方法で求めた。

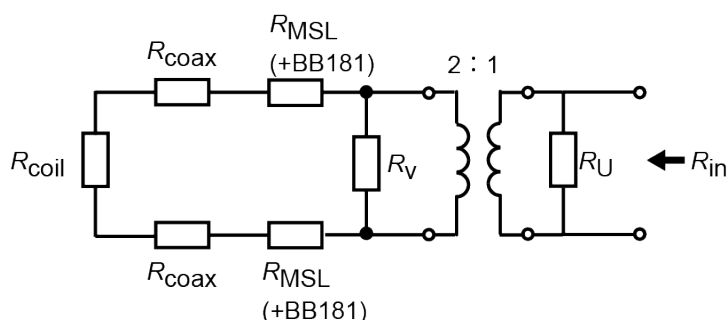


図 3-2 各素子を抵抗で表した回路図

(A) MCPG 共振器

MCPG 共振器は図 3-3 に示す通り、コイル L とコンデンサ C_p, C_s で構成されているため、それぞれの抵抗値から MCPG 共振器の抵抗値 R_{coil} を算出する。まず、コイルにおける抵抗値 R_L は下式で求められる。

$$R_L = \frac{l}{S} \cdot \frac{1}{\sigma} \quad (2)$$

l は銅線の長さ、 σ は銅の導電率 5.8×10^7 [S/m] を代入し、 S はコイルの電流が流れている表皮深さ $\delta_s = \sqrt{\frac{1}{\pi f \mu \sigma}}$ [m] (f : 共振周波数 [Hz]、 μ : 銅の透磁率

1.26×10^{-6} [H/m]) を用いて算出される断面積[m²]であり、 $S = 2\pi r \delta_s$ で求められる。このとき、銅線の半径 r は 0.5 mm で、直径 18 mm、 n 個の一巻きのコイルが並列接続されている。次にコンデンサ C_p, C_s における抵抗値 R_p, R_s を求める。理想状態のコンデンサでは抵抗値が 0 であるが、市販のコンデンサにおける損失を表すパラメータとして、損失係数 $\tan \delta$ は公表されている。 $\tan \delta = \frac{R}{\frac{1}{\omega C}}$

で表されるため、コンデンサ (0.38 mm 厚, CuFlon, 15-7-7, Polyflon Company,

Norwalk, CT, USA)のデータシートにある $\tan \delta = 4.5 \times 10^{-4}$ とキャパシタンス C_p, C_s より、下式で抵抗値 R_p, R_s を算出できる。

$$\begin{aligned} R_p &= \frac{\tan \delta}{\omega C_p} \\ R_s &= \frac{\tan \delta}{\omega C_s} \end{aligned} \quad (3)$$

以上で求めた抵抗値を用いて、MCPG 共振器の抵抗値 R_{coil} は下式で求められる。

$$R_{\text{coil}} = \frac{1}{\frac{n}{R_L} + \frac{1}{2R_p}} + 2R_s \quad (4)$$

このとき、 $n=3$ である。

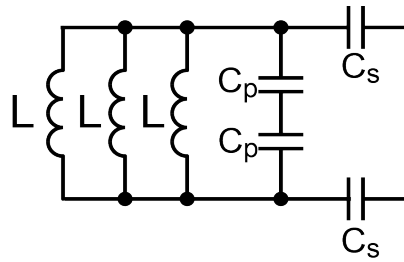


図 3-3 MCPG 共振器部分の回路図

(B) 同軸ケーブル

図 3-4 のように伝送線路に用いるセミリジットケーブルの中心導体, 絶縁体の半径をそれぞれ a, b とおき、長さを l とすると、同軸ケーブルの直流抵抗値 R_{coax} は下式で求められる[3.10]。

$$R_{\text{coax}} = \frac{l}{2\pi\sigma\delta_s} \left(\frac{1}{a} + \frac{1}{b} \right) \quad (5)$$

同軸ケーブルの長さ l は伝送線路では $3\lambda/4$ である 207 mm であり、U バランでは $\lambda/2$ である 138 mm である。 λ は波長[m]であり、周波数 750 MHz に対して 399.7 mm である。同軸ケーブルの絶縁体 PTFE の比誘電率 ϵ_r は 2.1 であるため、波長短縮率は 0.69 である。

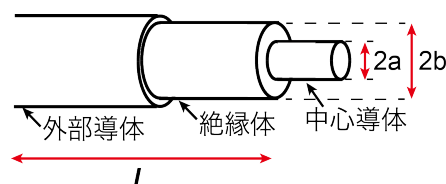


図 3-4 MCPG 共振器部分の回路図

(C) バラクタダイオード

図 3-5 に示すように、マッチングキャパシタ C_M 、チューニングキャパシタ C_T として、それぞれバラクタダイオード 1SV217 (東芝デバイス&ストレージ)、BB181 (NXP Semiconductors, Netherland)を用いる。

C_M として用いる 1SV217 はデータシートにてその抵抗値を知ることができるが、 C_T に用いる BB181 の抵抗値は、データシートに記載されていないため、その値を実測した。バラクタダイオードの抵抗値の測定のために、図 3-6 に示す回路を作製し、ネットワークアナライザで計測した。太線部分は同軸ケーブルであり、高周波と直流電圧が混在しないように Bias-T 回路を用いて、チョークコイルとコンデンサのフィルター回路を作製した。バラクタダイオード以外の素子が接続されている状態でネットワークアナライザのキャリブレーションを行うことで、バラクタダイオードの抵抗値測定の正確性を高めた。

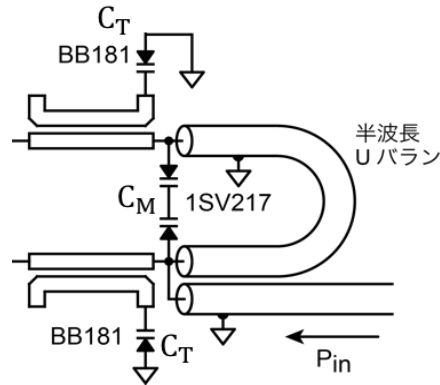


図 3-5 バラクタダイオード部分の回路図

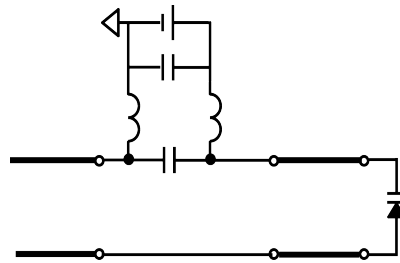


図 3-6 バラクタダイオード測定回路

(D) マイクロストリップライン

MCPG 共振器回路で用いられるマイクロストリップラインを図 3-7 に示す。ラインの長さを l 、幅を w 、銅箔の厚さを t とする。直線状のラインの抵抗値を R_{line} 、コの字のラインを R'_{line} とし、マイクロストリップラインの抵抗値は、

$$R_{\text{line}} = \frac{l}{\sigma(2\delta_s t + 2\delta_s w)}$$

$$R'_{\text{line}} = \frac{l'}{\sigma(2\delta_s t + 2\delta_s w)} \quad (6)$$

と計算できる[3.11]。直線状のラインの長さ l は 38 mm であり、コの字のラインの長さ l' は直線状に換算し 41.6 mm として、計算に用いた。また、MCPG 共振器回路に直列に接続している直線状のラインからコの字のラインに電圧が伝導する割合は、図 3-8 に示す(a)から(b)でも、(b)から(a)でも、25%である。マイ

クロストリップラインの全体の抵抗値 R_{MSL} は、直線状のラインに発生する雑音電圧 V_{line} とコの字のラインに発生する雑音電圧 V'_{line} の25%の総合した雑音電圧 V_{total} から逆算できる。

$$V_{total} = V_{line} + 0.25V'_{line} = \sqrt{4kTR_{MSL}\Delta f} \quad (7)$$

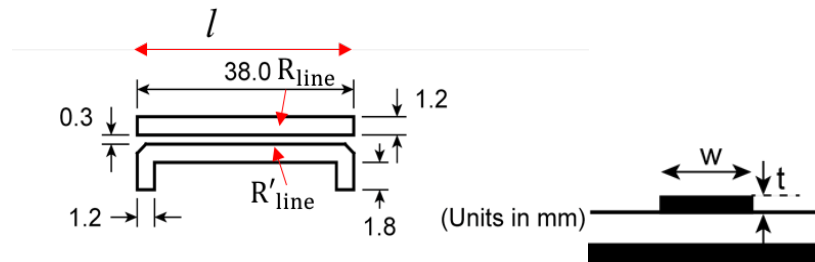


図 3-7 マイクロストリップラインの構造図

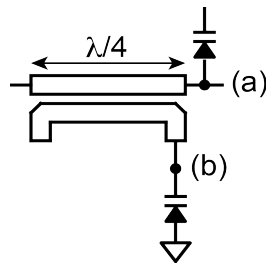


図 3-8 マイクロストリップラインとダイオード

(E) MCPG 共振器内で発生する損失

MCPG 共振器における雑音は抵抗による熱雑音の他に、(i)放射損失、(ii)シールドにおける損失、(iii)表面消費損失による雑音が挙げられる。マイクロ波シミュレータ ANSYS HFSS により作成した MCPG 共振器の 3D モデルを用いて、これらの電力損失を熱雑音として計算した。それぞれの電力損失について以下に説明する。

(i) 放射損失

MCPG 共振器は上部から測定試料であるマウス後肢を挿入するため、図に示すように MCPG 共振器の上側は電磁波シールドが十分に覆われていない。従って、MCPG 共振器からマイクロ波が放射し、電力の損失が生じていると考えられる。放射損失を求めるために、放射電力 W_{rad} を算出した。図 3-9 に示すように、MCPG 共振器の 3D モデルの上部、下部にそれぞれシールドを塞ぐように四角を作製した。これによって、シミュレーションで四角を通過する電力量を調べることができる。以下に算出式を示す。

$$W_{\text{rad}} = \int \text{Re}(\mathbf{E} \times \mathbf{H}^*) \cdot d\mathbf{S} \quad (8)$$

このとき、 $\mathbf{E} \times \mathbf{H}^*$ は作製した四角内の複素ポインティングベクトルである。

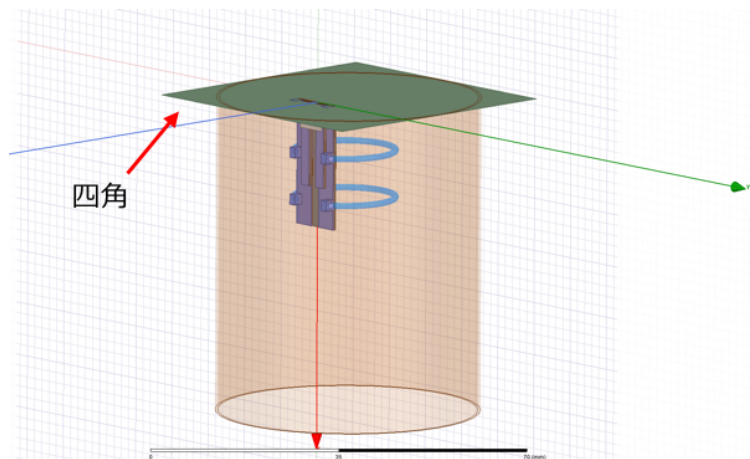


図 3-9 放射損失電力算出方法

(ii) シールドの損失

MCPG 共振器は電磁波シールドに囲われている。電磁波シールド内は磁場が $\mathbf{B}_I$ であり、電磁波シールド外では磁場が 0 である。そのため、図 3-10 に示すように、電磁波シールド内外の間の磁場の境界条件により、磁場 $\mathbf{B}_I$ を打ち消すために渦電流が発生している。この渦電流によってジュール熱が発生し、電力の

損失が生じる。シールド損失電力 W_{shield} は以下のように求められる。

まず、MCPG 共振器 3D モデルにおいて、シールド上に縦方向に 3 mm 間隔で点を作った。シミュレーションで得られる、その点の磁界 H を用いて、

$I = \oint_l H \cdot dl$ より、電流を計算した。抵抗率、長さ、断面積を用いて抵抗値 R を計算した。そして、求めた電流と抵抗値を用いて、 $W_{\text{shield}} = RI^2$ より損失電力を算出した。

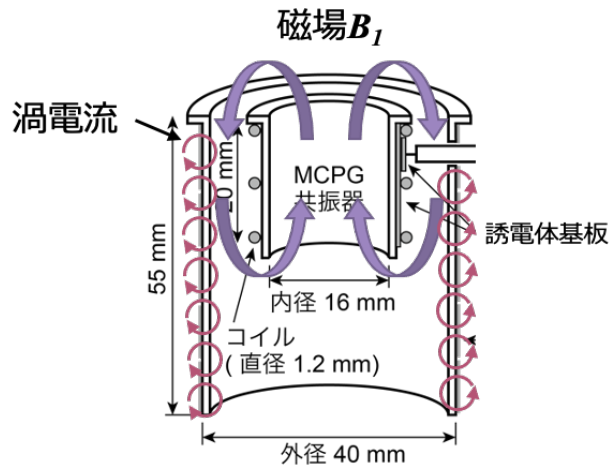


図 3-10 シールド損失の原理

(iii) 表面消費損失

MCPG 共振器は、コイルと、銅板とテフロンを合わせたコンデンサをハンダで接合している構造であるため、全ての部品の表面で消費している電力 W_{surface} を求めた。シミュレーションで得られる、それぞれの部品のモデルにおける表面消費電力を積分して算出した。そして、それぞれ得られた損失電力を雑音抵抗に換算し、MCPG 共振器における熱雑音源として計算した。損失電力の雑音抵抗への換算方法を以下に示す。まず、それぞれの損失電力を以下のように表す。

$$W_{\text{total}} = W_{\text{rad}} + W_{\text{shield}} + W_{\text{surface}} \quad (9)$$

図 3-11 に示すように、MCPG 共振器の 3 つのコイルに流れる電流をそれぞれ上から I_1 、 I_2 、 I_3 とし、コイルの中心磁場を B_1 、 B_2 、 B_3 とする。また、コイルの半径 a は 9 mm で、コイル間距離 d は 6 mm である。ビオ・サバールの法則より、真ん中のコイルの中心磁場 B_2 は、式(10)のように表せ、それ以外のコイルの中心磁場 B_1 、 B_3 は式(17)のように表せる。

$$B_2 = \frac{\mu_0 I_2}{2a} \quad (10)$$

$$B_1 = B_3 = \frac{\mu_0 I_2 a^2}{2(a^2 + d^2)^{\frac{3}{2}}} \quad (11)$$

また、磁場発生効率 Λ と中心磁場 B_2 は式(12)の関係にある。

$$\Lambda = B_2 / \sqrt{P} \quad (12)$$

入力電力 P は 5.5 mW であり、磁場発生効率 Λ は実測で得られているため、式(10)から中心磁場 B_2 を求めることができる。求めた中心磁場 B_2 と式(10)、式(11)を用いて、電流 I_2 を求められるため、電流の合計 $I_{\text{total}} = I_1 + I_2 + I_3$ と W_{total} を用いて、式(13)より損失抵抗 R_{loss} が求められる。

$$R_{\text{loss}} = \frac{W_{\text{total}}}{I_{\text{total}}^2} \quad (13)$$

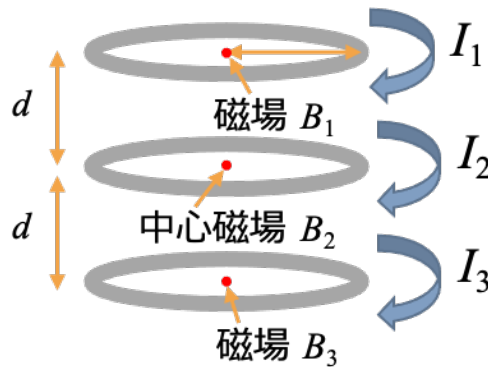


図 3-11 MCPG 共振器における電流と磁場

(2) ショット雑音

ショット雑音の雑音電圧 V_{shot} は下式によって求められる[3.9]。

$$V_{\text{shot}} = \sqrt{2qIR\Delta f} \quad (14)$$

q は電化素量 1.6×10^{-19} [C]、 I はダイオードに流れる電流の平均値 [A]である。電流の平均値 I は以下のように求められる。入力電圧の振幅を E_m 、電流の振幅を I_m と与えられているとき、電流 $i_{(t)}$ と電圧 $e_{(t)}$ を

$$i_{(t)} = I_m \sin \omega t \quad (15)$$

$$e_{(t)} = E_m \sin(\omega t + \varphi) \quad (16)$$

と表せ、図 3-12 に示すようにバラクタダイオードは抵抗 R_V とキャパシタ C の直列回路と等価とみなせるため、

$$\begin{aligned} e_{(t)} &= R_V I_m \sin \omega t - \frac{1}{\omega C} I_m \cos \omega t \\ &= \sqrt{R_V^2 + \frac{1}{(\omega C)^2}} I_m \sin(\omega t - \tan^{-1} \frac{1}{\omega C R_V}) \end{aligned} \quad (17)$$

と表せる。

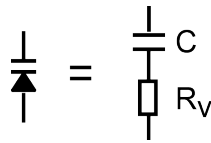


図 3-12 バラクタダイオードの等価回路

以下に示す電圧の振幅 E_m と電流の振幅 I_m の関係式より、電流の振幅 I_m を求められ、

$$E_m = I_m \sqrt{R_V^2 + \frac{1}{(\omega C)^2}} \quad (18)$$

電流の平均値 I は下式で得られる。

$$I = \frac{1}{T} \int_0^T |I_m \sin \omega t| dt \quad (19)$$

回路内の各素子の抵抗値を調べた後に、マイクロストリップラインにより伝達する電圧の割合を考慮した。チューニングキャパシタ C_T である BB181 は、図 3-5 に示す通り、マイクロストリップラインを介して回路に接続しているため、マイクロストリップラインと BB181 の抵抗値を合わせて算出する必要がある。そこで、式(19)と同様に総合した雑音電圧から逆に計算し、抵抗値を求める。

回路全体の熱雑音電圧を求めるために、MCPG 共振器回路全体の抵抗値 R_{in} を考えると、まず共振器、伝送線路、マイクロストリップラインとダイオードをまとめた抵抗値 Z_L を下式のように表せると、U バランの並列回路とみなせる。U バランは半波長であるため、1:2 変圧器の機能を持つ。よって、MCPG 共振器回路全体の抵抗値 R_{in} は、図 3-2 に示す各素子の雑音源の回路から図 3-13(a)のように、

$$R_{in} = \frac{1}{4} Z_L + R_U \quad (20)$$

と表せ、回路全体の熱雑音電圧を求められる。

このとき、

$$Z_L = \frac{1}{\frac{1}{R_{coil} + 2R_{coax} + 2R_{MSL}} + \frac{1}{2R_V}} \quad (21)$$

次に、ショット雑音について考える。ショット雑音はダイオードで発生するため、 C_M である 1SV217、 C_T である BB181 において考える必要がある。 C_M では図 3-13(b)のように抵抗値 r_m の 1SV217 が 2 つ直列に連なっており、 $R_m = r_m + r_m$ と表せるため、ランダムな信号である雑音電圧の 2 乗平均 v_m の電圧源の

直列接続とみなせ、 $V_m = \sqrt{v_m^2 + v_m^2}$ と計算できる[3.12]。 C_T では、マイクロストリップラインに BB181 が接続されており、電圧の伝達率が 25%であるため、 V_m と同様に雑音電圧 v_t を用いて、 $V_t = 0.25\sqrt{v_t^2 + v_t^2}$ と得られる。よって、ショット雑音の雑音電圧 V_{shot} は、

$$V_{shot} = \sqrt{V_m^2 + V_t^2} \quad (22)$$

と求められる。

そして、MCPG 共振器回路全体に発生する熱雑音とショット雑音の雑音電圧は以下のように求められる。

$$V_{total} = \sqrt{V_{thermal}^2 + V_{shot}^2} \quad (23)$$

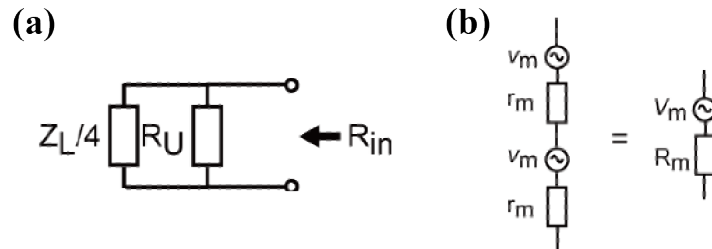


図 3-13 (a)雑音源の等価回路、(b) マッチングキャパシタのショット雑音源の等価回路

3.2.2 ベースラインの雑音計測

本研究で用いた 750 MHz CW EPR 分光装置を図に示す。以前に報告された分光装置[3.13, 3.14]から、RF 検出にダブルバランスミキサー (DBM) を使用している点が変更されている。EPR スペクトルのベースラインの雑音を計測するために、 ^{15}N -PDT の EPR 分光測定を行った。 ^{15}N -PDT 水溶液サンプルは、 ^{15}N -PDT

を 2 mL のリン酸緩衝食塩水 (PBS) で溶解し、マイクロセントフリッジチューブ (直径 9 mm、長さ 37 mm) に詰めて作製された。図 3-14 に、 ^{15}N -PDT の EPR スペクトルを示す。EPR スペクトルにおいて、図 3-14 に示す通りに信号強度と雑音を定義する。EPR スペクトルのベースラインの雑音の値は、 ^{15}N -PDT の吸収ピークのスペクトル情報を持たない領域の 100 データ点の標準偏差を 2 倍して算出した。それぞれの信号強度と雑音レベルは EPR 分光測定を 5 回繰り返し、その測定結果の平均を用いた。EPR 信号強度と雑音レベルは、以下の 3 つの状態で測定された。

- (i) マッチング回路にバラクタダイオードを用いているチューナブル共振器 (図 3-1 の回路) を用いた。この状態で測定されたベースラインの雑音レベルが、この研究において比較対象とされる従来の雑音レベルである。ベースラインの雑音レベルは、入力マイクロ波電力 P_{in} の関数として測定された。無負荷のチューナブル共振器の中心の高周波磁場発生効率 η は $102 \mu\text{T}/\text{W}^{1/2}$ であった。
- (ii) マッチング回路にトリマキャパシタを用いているチューナブル共振器を用いた。(i) のチューナブル共振器におけるバラクタダイオード (1SV217) を非磁性であるトリマキャパシタ (NMAM15HV) に置き換えた。チューニング回路ではバラクタダイオード (BB181) は置き換えられず、そのまま用いられた。この状態により、マッチングシステムにおけるバラクタダイオードのベースラインの雑音レベルへの影響について調査した。(i) と同様に、ベースラインの雑音レベルは、入力マイクロ波電力 P_{in} の関数として測定され、無負荷のチューナブル共振器の中心の高周波磁場発生効率 η は $132 \mu\text{T}/\text{W}^{1/2}$ であった。
- (iii) RF シールドされたマッチング回路にトリマキャパシタを用いているチューナブル共振器 (図 3-15(b) 参照) を用いた。MCPG 共振器に用いている半開

の RF シールドに加えて、2 層のアルミニウムホイル（厚さ 11 μm ）を用いてチューナブル共振器を完全に覆うことで、EPR スペクトルへの外部環境からの RF 雑音の影響を遮断した。2 層のアルミニウムホイルの伝達係数は、RF 電流において 0.8×10^{-3} （750 MHz における表皮深さ 3.1 μm ，アルミニウムの導電率 36 MS/m）であった。この状態のチューナブル共振器を用いて測定したベースラインの雑音レベルを(i)、(ii)の状態と比較することで、EPR スペクトルへの外部環境からの RF 雑音を測定した。

以上の 3 つの状態に加え、チューナブル共振器の代わりに 50- Ω ダミーロード（Mini-Circuits Laboratory Inc, Brooklyn, NY, ANNE-50）を接続し、共振器を除いた EPR 分光装置の雑音定数を測定した。実際の実験状態ではないが、この状態で EPR 分光装置の受信システムの雑音レベルを評価する。測定パラメータを表に示す。入力マイクロ波電力は 5.5 mW（EPR 信号の飽和レベルに達しない値）であった。状態(i)において様々な磁場変調振幅（0~80 μT ）での雑音レベルを比較することで、磁場変調のベースライン雑音への影響を調べた。各状態のベースラインの雑音レベルの 5 回測定の平均を両側 t 検定することで比較した。

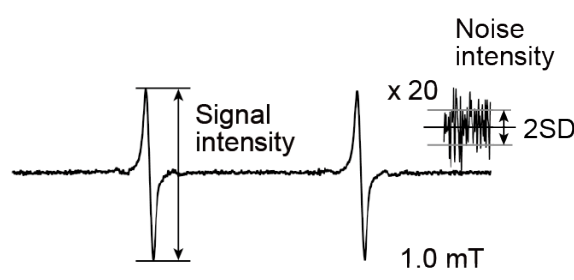


図 3-14 ^{15}N -PDT の EPR スペクトルにおける信号強度と雑音電圧の定義
Reprinted from AIP Adv. 9, 075312 (2019); licensed under a Creative Commons Attribution (CC BY) license.

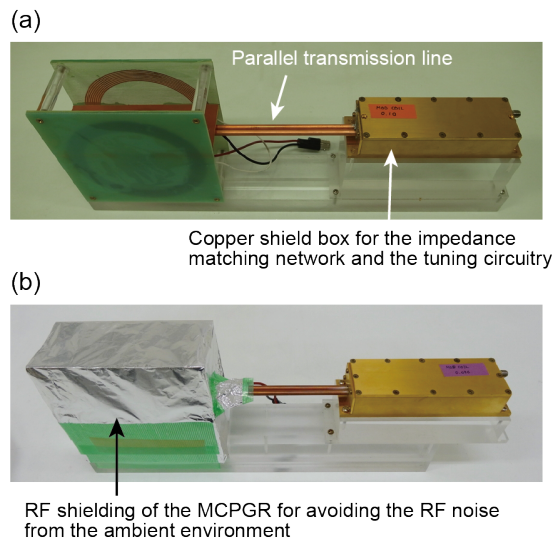


図 3-15 (a)チューナブル共振器、(b)アルミニウムホイルで RF シールドされたチューナブル共振器

Reprinted and adapted from AIP Adv. 9, 075312 (2019); licensed under a Creative Commons Attribution (CC BY) license.

3.3 実験結果と考察

3.3.1 雑音の算出結果

チューナブル共振器回路における各素子の抵抗値とチューナブル共振器内で発生している熱雑音とショット雑音、その合計値を算出した。図 3-16 は計算した雑音電圧の割合を表したグラフである。伝送線路の特性インピーダンス Z_C が $50\ \Omega$ と $100\ \Omega$ のチューナブル共振器の全体の雑音と熱雑音の内訳を示している。 $Z_C=50\ \Omega$ のチューナブル共振器の全体の雑音のうち、熱雑音は 22%、ショット雑音は 78%であり、 $Z_C=100\ \Omega$ のチューナブル共振器のそれぞれの雑音は 27%、73%であった。また、 $Z_C=50\ \Omega$ のチューナブル共振器での雑音を 100%としたとき、 $Z_C=100\ \Omega$ のチューナブル共振器では、全体の雑音は 17%減少するが、熱雑音は 4%増加した。 $Z_C=50\ \Omega$ 、 $100\ \Omega$ のどちらの共振器でも、バラクタ

ダイオードから発生しているショット雑音が支配的であることが分かった。

同軸線路

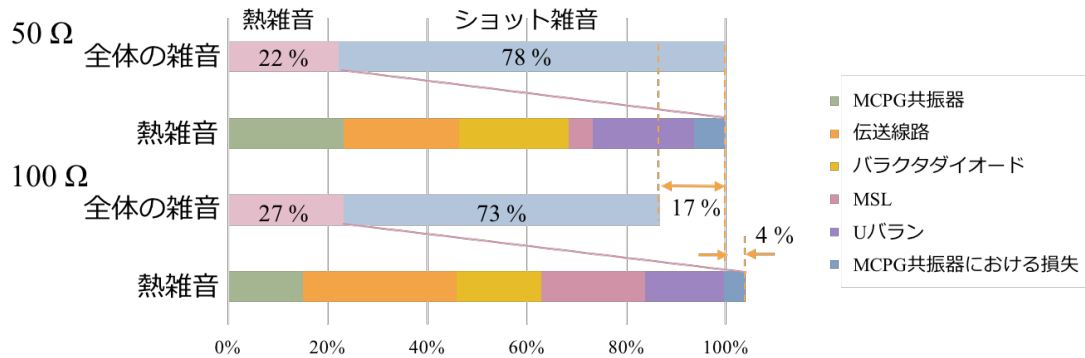


図 3-16 回路内全体の雑音割合

3.3.2 バラクタダイオードの影響

図 3-17 は、マッチング回路にバラクタダイオード用いた共振器：状態(i)と用いていない共振器：状態(ii)で測定した ^{15}N -PDT の EPR スペクトルである。トリマキャパシタのマッチング回路を用いた EPR スペクトルでは、バラクタダイオードのマッチング回路より、ベースラインの雑音強度が小さかった。

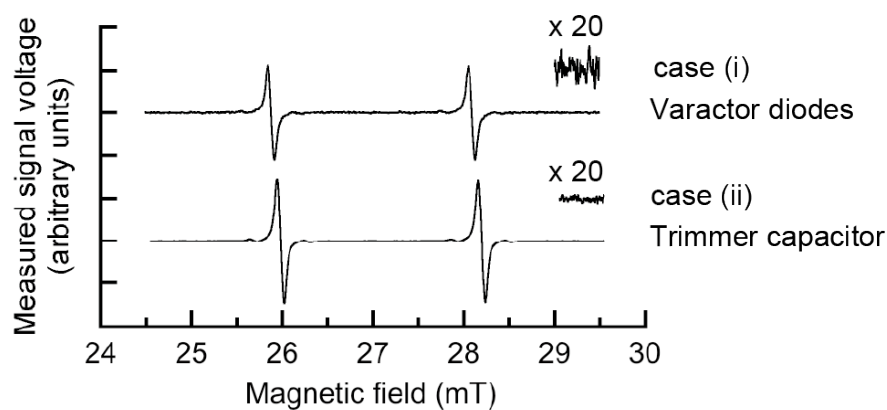


図 3-17 状態(i)と状態(ii)で測定した ^{15}N -PDT の EPR スペクトル

Reprinted from AIP Adv. 9, 075312 (2019); licensed under a Creative Commons Attribution (CC BY) license.

図 3-18 は、状態(i)と(ii)に関してスペクトルのベースライン雑音の入力マイクロ波電力 P_{in} の依存性を示している。赤丸は状態(i)、黒丸は状態(ii)のベースライン雑音を示す。サンプルサイズ $n=5$ で、平均値 $\pm$ SD を示す。トリマキャパシタを用いた共振器のベースラインの雑音レベルは、全ての入力マイクロ波電力で低レベルを維持していたのに対し、バラクタダイオード用いた共振器のベースラインの雑音レベルは入力マイクロ波電力-10 dBm (0.1 mW) から急速に増加していた。図 3-18 に示されるベースラインの雑音レベルを比較することで、状態(i)の雑音レベルの増加は、入射マイクロ波電力-10 dBm を超えて、マッチング回路におけるバラクタダイオードにより生成されたノイズによって支配されていると結論付けることができる。従って、5.5 mW の入力マイクロ波電力での測定におけるバラクタダイオードからの雑音は、ベースラインの雑音レベルの主要な雑音源であることを推測できる (図 3-18 参照)。また、図 3-18 により、トリマキャパシタの共振器では、ベースラインの雑音レベルの入力マイクロ波電力の依存性が少ないことが示された。入力マイクロ波電力 7.4 dBm (5.5 mW)では、トリマキャパシタを用いた共振器でのベースライン雑音は 0.76 で、バラクタダイオードを用いた共振器でのベースライン雑音レベル 3.55 に比べ、4.7 倍の改善となった。

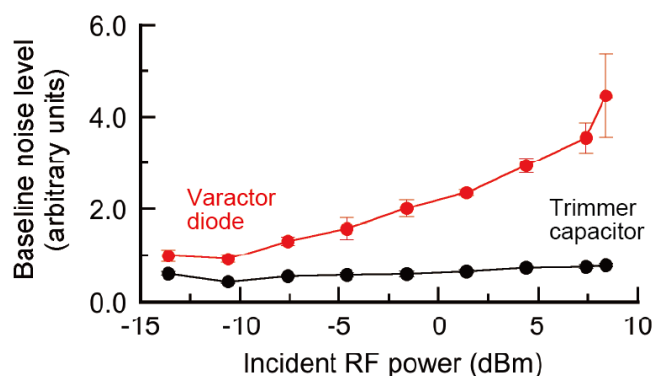


図 3-18 入力マイクロ波電力 P_{in} のスペクトルのベースライン雑音への依存性 (エラーバーは SD)

Reprinted and adapted from AIP Adv. 9, 075312 (2019); licensed under a Creative Commons Attribution (CC BY) license.

図 3-19 に、バラクタダイオードを用いた共振器と用いていない共振器で得られた EPR 信号強度の平均値 $\pm$ SD ($n=5$) を示す。本実験で ^{15}N -PDT の EPR 信号は入力マイクロ波電力の飽和レベルには達しなかった。入力マイクロ波電力 6.9 mW (8.4 dBm)までの間で、両方の共振器での信号強度は入力マイクロ波電力の平方根に比例していた。信号強度の SD はとても小さいため、図 3-19 においてエラーバーが見えなていなかった。5.5 mW (7.4 dBm) の入力マイクロ波電力で、バラクタダイオードの共振器：状態(i)での信号強度は 446(任意単位)であった。それに対して、トリマキャパシタの共振器：状態(ii)での信号強度は 579 (任意単位)であった。この信号強度の増加は共振器の Q 値の違いによると考えられる。バラクタダイオードの共振器での負荷あり Q 値は 150 で、トリマキャパシタを用いた共振器の Q 値は 214 であった。

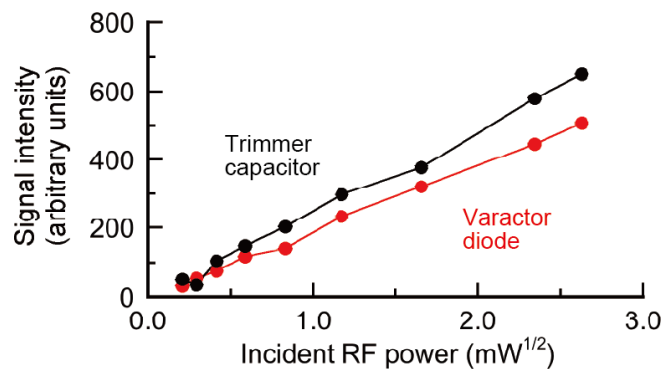


図 3-19 入力マイクロ波電力 P_{in} のスペクトルの信号強度への依存性（エラーバーは SD）

Reprinted and adapted from AIP Adv. 9, 075312 (2019); licensed under a Creative Commons Attribution (CC BY) license.

図 3-20 に、入力マイクロ波電力への図 3-18 と図 3-19 のデータから得られる SNR（信号対雑音比）の依存性を示す。サンプルサイズ $n=5$ で、平均値 $\pm$ SD を示す。バラクタダイオードの共振器：状態(i)ではベースライン雑音レベルが上がっていたため、信号強度と同様な向上は SNR には見られなかった。状態(i)とは対照的に、トリマキャパシタの共振器：状態(ii)では入力マイクロ波電力の増加に伴い、SNR は大幅に増加した。5.5 mW (7.4 dBm) の入力マイクロ波電力で、バラクタダイオードの共振器：状態(i)での SNR は 127 であり、トリマキャパシタの共振器：状態(ii)での SNR は 771 であった。最終的に状態(i)と状態(ii)を比較すると、ベースライン雑音レベルが 4.7 倍減少、信号強度が 1.3 倍向上し、SNR は 6.1 倍向上した。

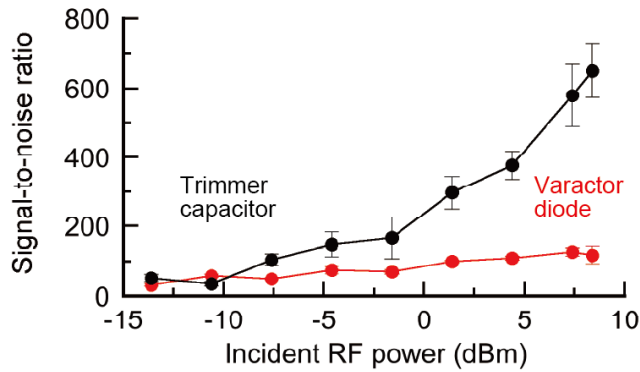


図 3-20 入力マイクロ波電力 P_{in} 毎の SNR の比較 (エラーバーは SD)
 Reprinted and adapted from AIP Adv. 9, 075312 (2019); licensed under a Creative Commons Attribution (CC BY) license.

ベースライン雑音測定では、マイクロ波発振器の単側波帯 (SSB) 位相ノイズの影響は観察されなかったが、SSB 位相ノイズが高出力で明らかになる可能性があることに注意すべきである[3.15-3.17]。実際、マッチング回路のバラクタダイオードからの雑音を取り除いた後には、マイクロ波発振器の位相ノイズの影響が高出力領域での EPR 分光法の主要な雑音源になり得る。通常、CW-EPR 分光装置では使用するマイクロ波発振器とその周波数は固定されているため、共振器は分光装置の改善のためにさらに最適化できる主要な要素であり、マウス腫瘍などの高感度 *in vivo* EPR 分光とイメージング実験を実現する。本研究で報告しているチューナブル共振器の雑音特性への洞察は、*in vivo* 腫瘍実験のための EPR 分光装置の共振器の将来の改善に役立つはずである。

3.3.3 各雑音源によるベースラインへの影響

図 3-21 に、磁場変調振幅を 0 から 80 μT の間で増加させた時の、スペクトルのベースライン雑音のサンプルサイズ $n=5$ の平均値 $\pm$ SD を示す。磁場変調振幅 0 μT の時と比べて、80 μT での平均雑音レベルは 52%高かった。このノイズレベルの増加は、磁場変調振幅の増加に伴い、印加された静磁場 (27 mT) と磁場変調用のヘルムホルツコイルペアで流れる電流に関連するローレンツ力が増加することで、チューナブル共振器が強制的に振動することを考慮することで説明できる。ヘルムホルツコイルペアはチューナブル共振器の支持構造に機械的に接続されている (図 3-16 参照) ため、ヘルムホルツコイルペアに関連するローレンツ力は機械的振動と共振器の不安定性に寄与し、したがってスペクトルのベースラインノイズに寄与する可能性がある。

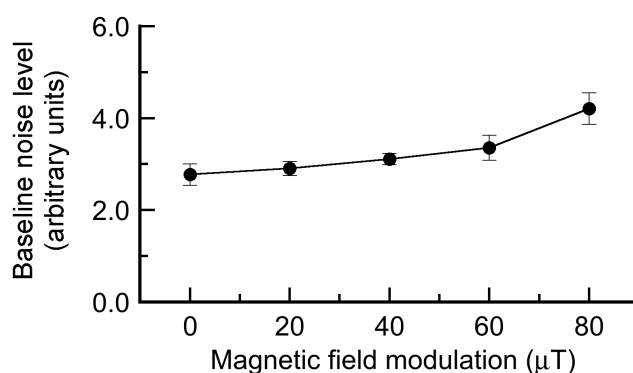


図 3-21 磁場変調のベースライン雑音への影響 (エラーバーは SD)
Reprinted and adapted from AIP Adv. 9, 075312 (2019); licensed under a Creative Commons Attribution (CC BY) license.

ベースライン雑音レベルに対する外部環境からの高周波雑音の影響を調査した。完全に閉じた RF シールドを使用したトリマキャパシタの共振器：状態(3)を、半開放の RF シールドを使用したトリマキャパシタの共振器：状態(ii)と比較した。図 3-22 は、一般的な EPR 分光測定条件下 (入力マイクロ波電力 5.5 mW) で得られたベースライン雑音レベルを示す。その他の測定パラメータは、3.2 節

で与えられたものと同じである。バラクタダイオードを用いた共振器：状態(i)とトリマキャパシタを用いた共振器：状態(ii)を使用して共振器で測定されたベースライン雑音レベルのデータは、それぞれ V、T として与えられており、図 3-19 に示されているデータと同じである。50 Ω のダミーロードが共振器の代わりに 180°ハイブリッドに接続されたときのベースライン雑音レベルは、図 3-23 に DL として示されている。完全に閉じた RF シールドを使用したトリマキャパシタの共振器：状態(3)のベースライン雑音レベルは、T+S として与えられている。磁場変調なしのバラクタダイオードの共振器を用いたベースライン雑音レベルは、V (Mod-) として示されている。状態(3)のベースライン雑音レベルの平均値 (0.74) は、状態(ii)の雑音レベル (0.76) よりもわずかに低かったが、この差は統計的に有意ではなかった ($P=0.665$ 、両側 t 検定、 $n=5$)。従って、半開放 RF シールドの場合でも、外部環境からの高周波雑音はベースラインスペクトル雑音の大きな原因ではないことが分かった。

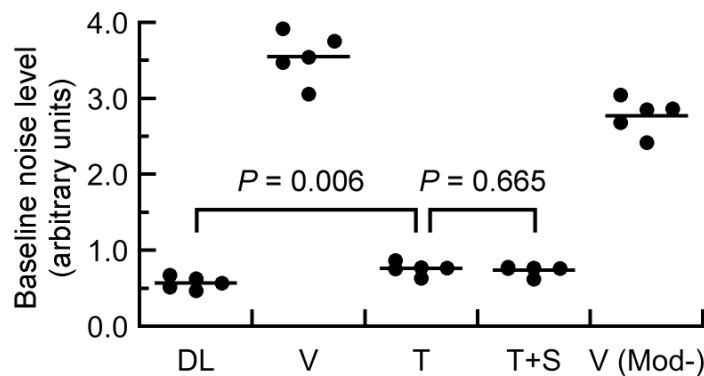


図 3-22 チューナブル共振器のベースライン雑音の比較

Reprinted and adapted from AIP Adv. 9, 075312 (2019); licensed under a Creative Commons Attribution (CC BY) license.

50 Ω のダミーロード (DL) で記録されたベースライン雑音レベルは、0.570

(任意単位)であった(図 3-22 参照)。分光装置の受信システムを表すこの雑音レベルは、測定された最小の雑音レベルである。トリマキャパシタの共振器では、ベースライン雑音レベルは 0.76 であった。DL と T のベースライン雑音レベルの平均値の差は統計的に有意であった ($P = 0.006$ 、両側 t 検定、 $n = 5$)。従って、トリマキャパシタを用いたマッチング回路の共振器はスペクトルベースラインに雑音を付加していると言える。

マッチング回路のバラクタダイオード (1SV217) は、共振器の給電ポートに直接接続されていた。従って、バラクタダイオードにより生成される雑音電圧は、スペクトルのベースライン雑音レベルに著しく影響した(図 3-21 参照)。マッチング回路用のバラクターダイオードとは対照的に、チューニング回路用のバラクターダイオード (BB181) は、マイクロストリップラインを介して平衡伝送線路に接続されているため、ベースライン雑音レベルへの影響が少ない。マイクロストリップラインの結合は、750MHz で 12.2dB であった。チューニングのためにバラクタダイオードにより生成された高周波雑音電力のわずか 6% が共振器の平衡伝送線路に転送された。従って、チューニング回路のバラクタダイオードで発生する雑音がスペクトルベースライン雑音に与える影響は、マッチング回路のバラクタダイオードより大幅に小さくなる(図 3-22 の V, T 参照)。ただし、チューニング回路のバラクタダイオードは、依然として共振器の雑音源である。

磁場変調なし条件の平均値 (V (Mod-)) は 2.77 (任意単位) であり、磁場変調振幅 70 μ T でのバラクタダイオードの共振器でのベースライン雑音レベルの平均値 (V) より 22% 低くなっている。70 μ T の磁場変調振幅下でのバラクタダイオードの共振器 (V) の特性は、磁場変調振幅がベースライン雑音レベルに大きく寄与することを明確に示している。共振器と磁場変調に関する雑音源をさら

に調査することで、今後の研究のベースライン雑音レベルのさらなる低減につながる可能性がある。

3.4 まとめ

この研究では、(i)共振器自体の内部で生成された雑音が EPR スペクトルのベースライン雑音に大きな影響を与えること、(ii)マッチング回路のバラクタダイオードがベースライン雑音の主な原因であること、(iii)外部環境からの雑音はスペクトルベースライン雑音にほとんど寄与していないことが分かった。マッチング回路のバラクタダイオードをトリマコンデンサに置き換えることで、EPR スペクトルの SNR が 6.1 倍向上した。従って、チューナブル共振器において、バラクタダイオードを使用する際はショット雑音について注意が必要であり、チューニング、マッチングの電氣的制御には BST コンデンサなどのショット雑音を持たない可変容量コンデンサを使用することで低雑音化を望める。

これらの結果は、今後の最適な *in vivo* 分光およびイメージングのための EPR 共振器の設計に役立つと考えられる。磁場変調に使用されるヘルムホルツコイルペアの機械的構造を最適化することで、さらなる SNR の改善が期待できる。

3.5 参考文献

- [3.1] G. Feher, Sensitivity considerations in microwave paramagnetic resonance absorption techniques, *Bell System Technical Journal*, **36**, 449–484 (1957).
- [3.2] W. Froncisz & J. S. Hyde, The loop-gap resonator: a new microwave lumped circuit ESR sample structure, *Journal of Magnetic Resonance*, **47**, 515–521 (1982).
- [3.3] W. L. Hubbell, W. Froncisz & J. S. Hyde, Continuous and stopped flow EPR spectrometer based on a loop gap resonator, *Review of Scientific Instruments*, **58**, 1879–1886 (1987).
- [3.4] S. Pfenninger, W. Froncisz, & J. S. Hyde, Noise analysis of EPR spectrometers with cryogenic microwave preamplifiers, *Journal of Magnetic Resonance, Series A*, **113**, 32–39 (1995).
- [3.5] H. Suits, A. N. Garroway & J. B. Miller, Noise-immune coil for unshielded magnetic resonance measurements, *Journal of Magnetic Resonance*, **131**, 154–158 (1998).
- [3.6] A. Kumar, W. A. Edelstein & P. A. Bottomley, Noise figure limits for circular loop MR coils, *Magnetic Resonance of Medicine*, **61**, 1201–1209 (2009).
- [3.7] T. Amida, R. Nakaoka, D. A. Komarov, K. Yamamoto, O. Inanami, S. Matsumoto, & H. Hirata, A 750-MHz Electronically Tunable Resonator Using Microstrip Line Couplers for Electron Paramagnetic Resonance Imaging of a Mouse Tumor-Bearing Leg, *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, **65**, 1124–1132 (2018).
- [3.8] R. Nakaoka, D. A. Komarov, S. Matsumoto & H. Hirata, Impact of the Characteristic Impedance of Coaxial Lines on the Sensitivity of a 750-MHz

- Electronically Tunable EPR Resonator, *Applied Magnetic Resonance*, **49**, 853–867 (2018).
- [3.9] A. Ambrozy, Electronic noise, McGraw-Hill International Book Co, Budapest, Hungary, Chapter 1 (1982).
- [3.10] R. E. Collin, Foundations for Microwave Engineering Second edition, The IEEE Press Series on Electromagnetic Wave Theory, 117 (1992).
- [3.11] H. Asai, Design Wave Magazine, CQ Publishing Co, Ltd, Tokyo, Japan, October, 142–148, (2003).
- [3.12] F. R. Connor, Noise/Second Edition, Edward Arnold, London, England, Chapter 4 (1982).
- [3.13] H. Sato-Akaba, H. Fujii & H. Hirata, Improvement of temporal resolution for three-dimensional continuous-wave electron paramagnetic resonance imaging, *Review of Scientific Instruments*, **79**, 123701 (2008).
- [3.14] H. Sato-Akaba, Y. Kuwahara, H. Fujii & H. Hirata, Half-life mapping of nitroxyl radicals with three-dimensional electron paramagnetic resonance imaging at an interval of 3.6 seconds, *Analytical Chemistry*, **81**, 7501–7506 (2009).
- [3.15] W. Froncisz, T. Oles & J. S. Hyde, Q-band loop-gap resonator, *Review of Scientific Instruments*, **57**, 1095–1099 (1986).
- [3.16] P. Lesniewski & J. S. Hyde, Phase noise reduction of a 19 GHz varactor-tuned Gunn oscillator for electron paramagnetic resonance spectroscopy, *Review of Scientific Instruments*, **61**, 2248–2250 (1990).
- [3.17] J. S. Hyde, M. E. Newton, R. A. Strangeway, T. G. Camenisch & W. Froncisz, Electron paramagnetic resonance Q-band bridge with GaAs field-effect

transistor signal amplifier and low-noise Gunn diode oscillator, *Review of Scientific Instruments*, **62**, 2969–2975 (1991).

第4章 マルチハーモニック検波による受信システムの高感度化

4.1 EPR 受信システムの背景

連続波 (CW) EPR 法を用いた *in vivo* イメージングは、生体内の酸素分圧や pH の可視化を可能にしている[4.1-4.3]が、より高精度なイメージングのためには、高感度な EPR スペクトルの取得が必要である。そのために、EPR 分光装置自体の高感度化が求められている。EPR 分光装置において、EPR 信号の受信システムは測定感度に大きく影響する。一般的な CW EPR 分光法では、EPR 信号をより高感度に検出するために、磁場変調を用いている。変調された EPR 信号は位相検波により、復調され受信される。磁場変調に用いる変調信号の振幅と EPR スペクトルの本来の線幅の比（磁場変調率）が 0.25 より大きいと徐々に過変調の状態となる。過変調では、得られる EPR 信号が高感度化される一方、正しく復調されず歪んでしまう。*in vivo* イメージングでは、多少の EPR スペクトルの歪みを受け入れることで、過変調による高感度化を享受している。また、一般的には変調信号の基本波成分のみを用いて位相検波しているが、過変調が進むにつれ、 n 次の高調波成分が増加する。

1995 年に Bikineev らにより、変調周波数の高調波を含めてスペクトルを再構成することで、過変調による EPR スペクトルの歪みを補正する手法が発表された[4.4]。2011 年に Tseitlin らは X-band EPR 分光装置にこの方法を実装し、変調周波数 10 kHz において EPR スペクトルの線幅を回復させることに成功した[4.5]。2015 年に同グループは、このマルチハーモニック再構成法により、広い線幅と狭い線幅のスペクトルにおいてもそれぞれ線幅を十分に回復できることを実証した[4.6]。これを受けて、2020 年に Gonet らは、変調周波数 1 kHz においてこ

のマルチハーモニック検波法を *in vivo* イメージングに応用した[4.7]。600 MHz EPR 分光装置にて、磁場変調率 26 倍において変調信号の高調波を 100 次まで含めた再構成が行われた。高い磁場変調率を使用する（より過変調にする）ためには、より高い次数の高調波まで取得することが必要になるが、再構成処理のための PC においてより多くのメモリを必要とする。また、高い変調周波数を使用する場合、変調信号の高調波は高周波信号となり多くの雑音を伴うリスクがある。従って、必要な感度に対して、磁場変調率と再構成に含めるべき変調信号の高調波次数をより小さくする検討が必要である。

第 4 章の研究の目的は、高精度 *in vivo* pH イメージングのために 750 MHz EPR 分光装置にマルチハーモニック検波法を実装し、高い変調周波数（従来から使用している 90 kHz）において EPR スペクトルの高感度化を実現することである。

4.2 実験方法

4.2.1 マルチハーモニック検波方式

デジタルマルチハーモニック検波 (MHD) システムは、LabVIEW2020 開発環境 (National Instruments, Austin, TX) を用いて構築された。Tseytlin らによる先行研究[4.5, 4.6]で報告されている方法を用いて、フーリエ領域においてマルチハーモニック再構成を行った。周波数 u 領域における n 次高調波 $S_n(u)$ のフーリエ変換は式(1)のように定義できる。

$$S_n(u) = D_n(u) * F(u) \quad (1)$$

$F(u)$ は 1 次微分 EPR 吸収スペクトルのフーリエ変換である。フィルタ関数である $D_n(u)$ は以下のように定義される。

$$D_n(u) = \left(\frac{h_m}{4n}\right) j^{(n-1)} \left[J_{n-1}\left(\frac{h_m u}{2}\right) + J_{n+1}\left(\frac{h_m u}{2}\right) \right], n > 0 \quad (2)$$

h_m は磁場変調振幅、 J_{n+1} と J_{n-1} は第 1 種ベッセル関数であり、 $u = 2\pi i/H_s$ は磁場掃引幅 H_s とフーリエ領域の離散化インデックス i を用いて計算された。1 次微分吸収スペクトルを求めるために、逆畳み込み積分を行った。

$$F(u) = \frac{S_n(u)}{D_n(u)} \quad (3)$$

分母の $D_n(u)$ は 0 になり、その時の $S_n(u)$ の情報は失われてしまう。その状態を避けるため、式(3)は次式を用いて高調波と足し合わされた。

$$F(u) = \frac{\sum_1^n D_n^*(u) S_n(u)}{\sum_1^n D_n^*(u) D_n(u)} \quad (4)$$

$D_n^*(u)$ はフィルタ関数である $D_n(u)$ の複素共役であり、 n はマルチハーモニック再構成に使われた最大次数である。 $F(u)$ はガウシアン関数と畳み込み積分された方形窓を用いてフィルタリングされた。EPR スペクトルの信号対雑音比 (SNR) と線幅はトレードオフの関係にあるため、線幅が回復する十分なフィルタのカットオフ周波数を最適化する必要がある。

4.2.2 マルチハーモニック検波システムの構築

図 4-1 に、第 4 章の実験で用いた 750 MHz EPR 分光装置の簡略化したダイアグラムを示す。EPR 分光装置の詳細は先行研究[4.8, 4.9]にて報告されている。一般的な CW EPR 法では、磁場変調と組み合わせて Lock-in アンプを用いて位相検波 (PSD) を行う。マルチハーモニック検波では、ホモダイン検波の直後に、16 bit DAQ ボード PXIe-6386 (チャンネル毎最大サンプリングレート 14 MS/s、National Instruments, Austin, TX) を用いて電圧信号を受信した。デジタル化された信号は、信号処理のために Thunderbolt 3 を通してコンピュータに送られた。図 4-2 に示すように、8,192 点の EPR スペクトルを構成するために、8192 点×128

点 (1,048,576 点) の EPR 信号がコンピュータに送られ、128 点ずつ順にフーリエ領域で変調周波数成分を取り出すことで位相検波された。高調波スペクトルについては、変調周波数の高調波成分をそれぞれ取り出すことで位相検波を行った。1 スキャンあたりのデータ取得時間 (100 ms) とサンプル点数 (8,192) により、磁場変調に用いる変調周波数を 81.92 kHz と設定した。それぞれのサンプル点は磁場変調の信号と同期している。データサンプリング信号を磁場変調信号と同期させるために、サンプリング周波数を変調周波数の 128 倍である 10.48576 MHz に設定した。これらの 2 つの信号は 2 チャンネル波形発生器 (Keysight Technologies 33522A, Santa Rosa, CA) で発生され、外部磁場掃引及び磁場勾配を制御している外部トリガを用いて同期された。EPR スペクトルは 750 MHz マルチコイルパラレルギャップ共振器 (サンプル領域 内径 22 mm, 長さ 30 mm) [4.8]を用いて測定を行った。無負荷の共振器の高周波磁場発生効率は $126 \mu\text{T/W}^{1/2}$ であった。

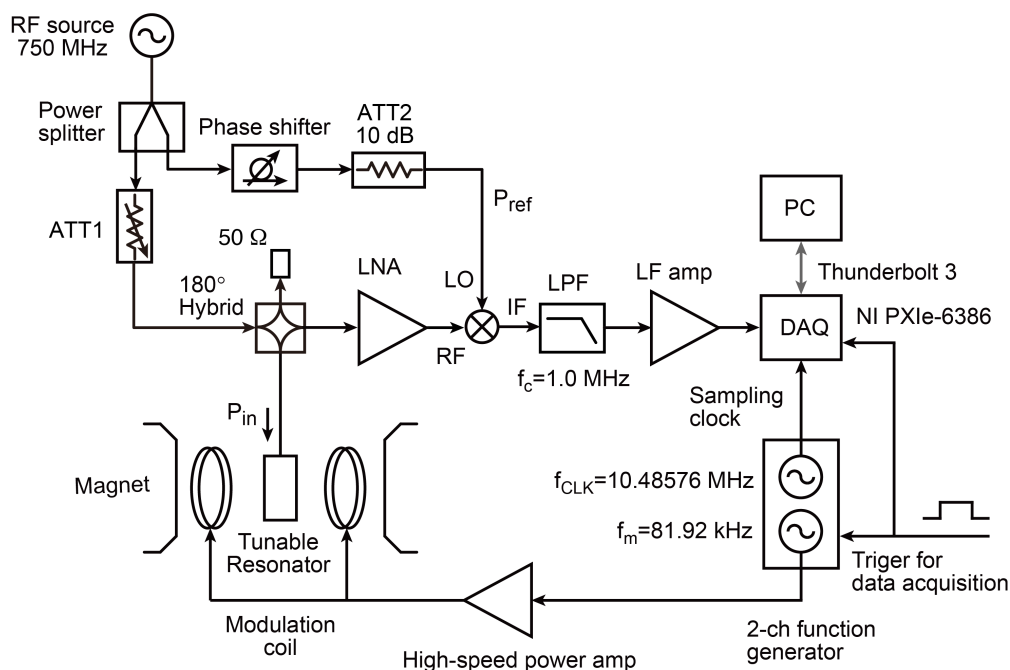


図 4-1 MHD システムを含む 750 MHz EPR 分光装置のブロックダイアグラム

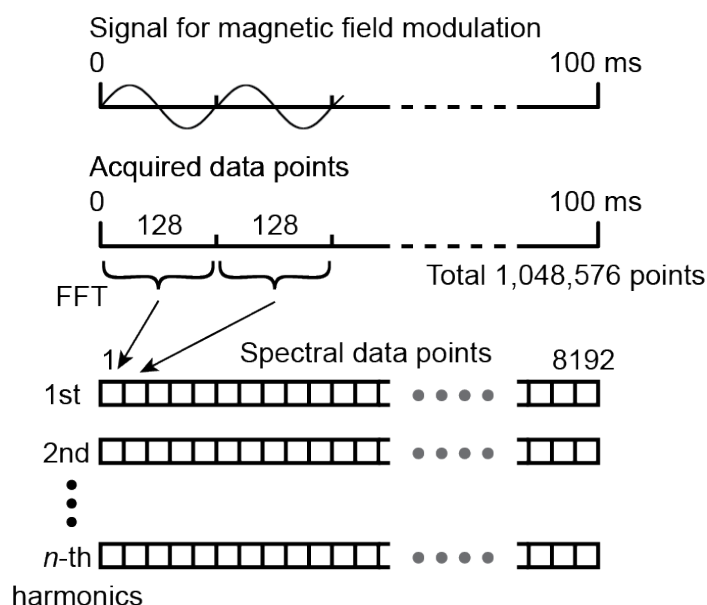


図 4-2 MHD システムにおけるデジタル位相検波の流れ

4.2.3 pH 感受性プローブと水溶液サンプル

pH感受性ニトロキシラジカル、2-(4-((2-(4-amino-4-carboxybutanamido)-3-(carboxymethylamino)-3-oxopropylthio)methyl)phenyl)-4-pyrrolidino-2,5,5-triethyl-2,5-dihydro-¹H-imidazol-1-oxyl, R-SGが重水素化されたdR-SGは先行研究において合成が報告されている[4.10]。得られるスペクトルの線幅がよりシャープになり、信号強度が大きいため、dR-SGプローブを用いた[4.11]。図4-3にdR-SGの化学構造式を示す。プロトンが結合していない状態（図4-3(a)）とプロトンが結合している状態（図4-3(b)）があり、この比率がpHによって変動する。この時、図4-4に示すようにEPR吸収スペクトルの両端の2つのピーク間距離が変動し（超微細構造定数hyperfine coupling constant (hfc) の変化）、pHが高くなるにつれてhfcが大きくなる。予め決められたpHで取得した構成データを用いて、得られたEPRスペクトルのpHを計算することができる。pH=3.07とpH=11.77において、スピンプローブは図4-3(a)または図4-3 (b)の一方の状態になる。24°Cに

においてpH=6.815で1:1の割合となる[4.12]。

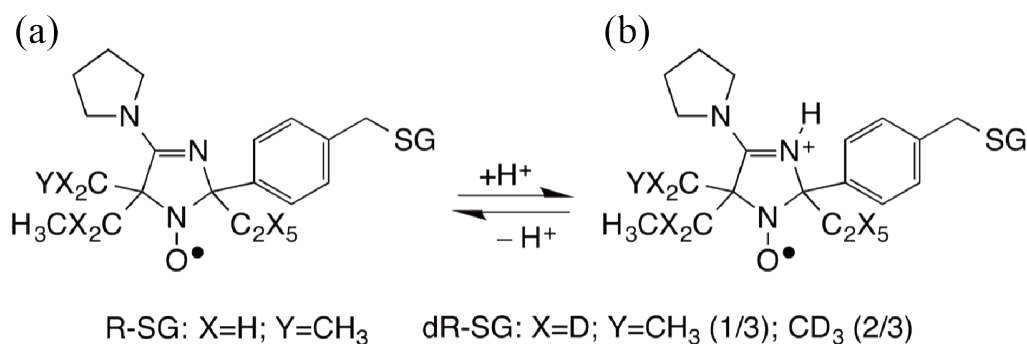


図 4-3 pH 感受性プローブ dR-SG の(a)プロトンが結合していない状態と (b)プロトンが結合している状態 (SG：グルタチオン残基)

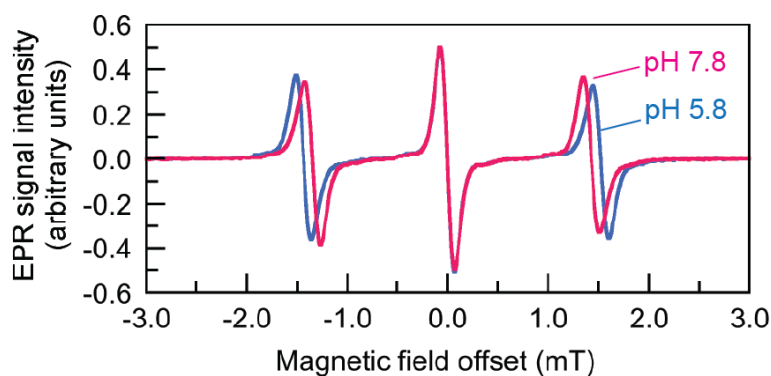


図 4-4 pH 感受性プローブ dR-SG の EPR スペクトル

リン酸緩衝液 (PBS) を用いて、2 mMのdR-SGを溶解した。HClとNaOHを用いて、pH 6.20から7.40までの7つのラジカル水溶液を調整した。水溶液のpHは、ガラス電極 (InLab Semi-Micro, Mettler Toledo, Columbus, OH) を備えたpHメーター (SevenCompact pH meter S220, Mettler Toledo, Columbus, OH) を用いて測定された。2 mLのバイアル (内径 9.8 mm, 長さ 32 mm, product number 5182-0715, Agilent Technologies, Santa Clara, CA) を用いて水溶液サンプルを用意し

た。バイアルは、架橋ポリスチレン（Rexolite® 1422）で作られたサンプルホルダーにより750 MHz EPR分光装置の共振器の中心に設置された。

4.2.4 pH マップの再構成法

4次元スペクトル空間画像は、逐次近似を用いる代数的再構成法（Algebraic Reconstruction Technique, 以下、ART 法）により再構成された。ART 法の各繰り返しにおいて、スペクトルデータのフィッティングを行った。計算は Apple Mac mini（M1, 2020, memory 8 GB）を用いて行った。再構成プログラムは、開発環境 MATLAB 2021a（MathWorks, Natick, MA）において実装された。高速計算のために、ART 法プログラムは C 言語で書かれ、MATLAB-executable (MEX) 関数としてコンパイルされた。pH 再構成アルゴリズムの詳細については、先行研究[4.13, 4.14]にて報告されている。腫瘍モデルマウスの後肢の pH マッピングでは、スペクトル窓 6.75 mT と FOV 25.0 mm × 25.0 mm × 37.5 mm から決定したマトリックスサイズ 768 × 48 × 48 × 72 を用いた。ART 法の繰り返し回数は、式(5)を用いて得られた各繰り返しにおける誤差を最小化することで最適化された値である、7 回を用いた。

$$\text{error} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n |\text{pH}_{\text{median}}(i) - \text{pH}_{\text{meas}}(i)|, \quad (5)$$

n は測定サンプル数、 $\text{pH}_{\text{median}}$ は再構成された pH 値の中央値、 pH_{meas} は pH 電極メーターを用いて測定された pH 値である。計算閾値は信号強度の計算結果の平均値の 40%とした。

4.2.5 EPR 分光測定

従来の PSD システムとデジタル MHD システムを用いた EPR 分光測定におい

て共通して用いたパラメータは、磁場掃引幅 9.0 mT, 変調周波数 81.92 kHz, 入力マイクロ波電力 4.37 mW, EPR スペクトルのサンプル点数 8,192 であった。デジタル MHD システムにおけるパラメータの最適化のために、磁場変調振幅が dR-SG プローブのスペクトルの本来の線幅の 1 倍である 0.13 mT (磁場変調率 1 倍) と 2 倍である 0.26 mT (磁場変調率 2 倍) で比較を行った。高調波スペクトル $S_n(u)$ が取得された直後にかけられるローパスフィルタ (LPF) におけるカットオフ周波数は 2,604 Hz (Lock-in アンプの時定数 30 μ s に対応) であり、MHD 再構成においてフーリエ領域でかけられるフィルタリングのカットオフ周波数は、それぞれ磁場変調率 1 倍の時は基本波の 50 次、磁場変調率 2 倍の時は基本波の 52 次であった。

4.2.6 水溶液サンプルの pH マッピング

従来の PSD システムとデジタル MHD システムを用いた EPR 測定において共通して用いたパラメータは、磁場掃引幅 9.0 mT, 磁場変調振幅 0.13 mT, 変調周波数 81.92 kHz, 最大磁場勾配 70 mT/m, 入力マイクロ波電力 4.37 mW であった。各 X-, Y-, Z-方向に 15 段階の磁場勾配を印加しスペクトルを取得した (合計 3,375 スペクトル)。従来の PSD システムでは、Lock-in アンプの時定数 30 μ s, 1 スキャンにおけるスペクトルサンプル数 2,048 であった。デジタル MHD システムでは、高調波スペクトル $S_n(u)$ の LPF におけるカットオフ周波数は 2,604 Hz (Lock-in アンプの時定数 30 μ s に対応) であり、フーリエ領域のフィルタのカットオフデータポイントは 50 であった。1 スキャンにおけるスペクトルサンプル数 8,192 であり、MHD 再構成に含めた高調波の次数は 4 であった。総合したデータ取得時間は 7.5 分であった。水溶液サンプルの EPR pH 測定はマウス体温と同じ温度である 37°C で行われた。水溶液サンプルの温度調節は、Small animal

monitoring & gating system (Model 1030、SA Instruments, Inc.、Stony Brook、NY、USA)を用いて、バイアルに光ファイバの温度センサ(25SFOC-23、SA Instruments, Inc.、Stony Brook、NY、USA)を挿入し、読み取られた温度によりフィードバック制御されたファン(77n100、SA Instruments, Inc.、Stony Brook、NY、USA)から送られる温風を当てることで行われた。

4.3 実験結果と考察

4.3.1 マルチハーモニック検波方式による EPR 分光

磁場変調に用いる変調信号の振幅と EPR スペクトルの本来の線幅の比を磁場変調率とし、以下、磁場変調 a と表す。図 4-5 に従来位相検波 (PSD) システムによる EPR スペクトルと、開発したマルチハーモニック (MHD) 位相検波システムによる EPR スペクトルを示す。MHD 位相検波システムによる EPR スペクトルは磁場変調率 $a=1.0$ 倍で取得された。それぞれの EPR スペクトルは 300 回積算されており、中心磁場が 0 に調整されている。図 4-5 の右上には 50 倍した EPR スペクトルのベースライン雑音を示す。図 4-6 は、マルチハーモニック検波において、磁場変調率 $a=2.0$ 倍で得られた 1 次～5 次までの高調波スペクトル $S_n(u)$ である。図 4-6 に示す $S_n(u)$ は、ローパスフィルタを掛けられている。高次になるにつれて振幅が小さくなっていることが分かる。

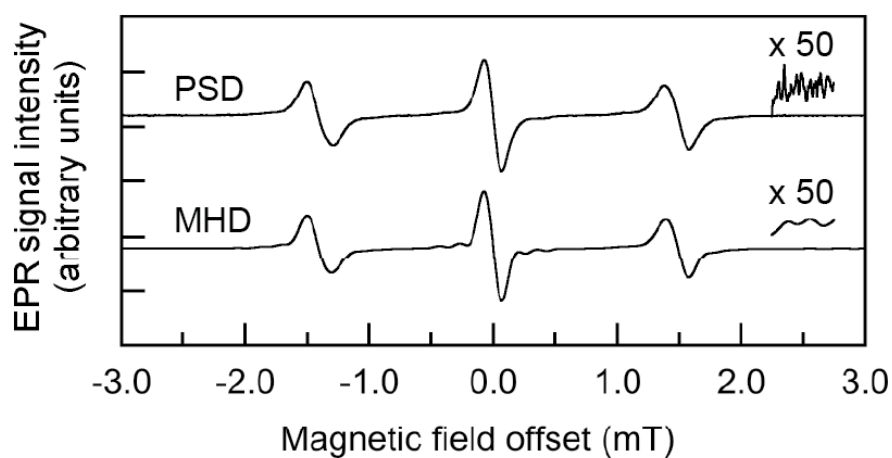


図 4-5 pH 感受性プローブ dR-SG の（上）従来 PSD システムと（下）MHD システムを用いた EPR スペクトル

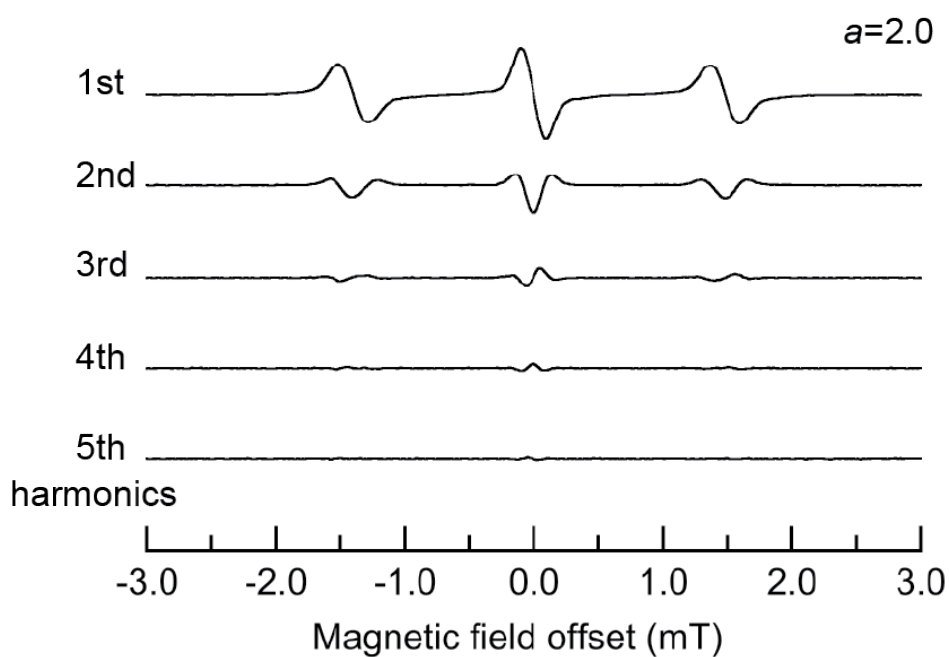


図 4-6 pH 感受性プローブ dR-SG の高調波スペクトル $S_n(u)$

マルチハーモニクス検波において必要な磁場変調率 a 、ハーモニクス数を求めた。磁場変調率 $a=1.0$ 倍、 2.0 倍の時の、MHD 再構成に含めたハーモニクス

数と信号対雑音比 (SNR) の関係を図 4-7(a) に、MHD 再構成に含めたハーモニクス数と線幅 (μT) の関係を図 4-7(b) に示す。それぞれ 300 回測定の実験値であり、エラーバーは SEM を示す。磁場変調率 $a=1.0$ 倍、 2.0 倍のどちらにおいても、MHD 再構成に含めるハーモニクス数が増える毎に、SNR と線幅は増加した。磁場変調率 $a=1.0$ 倍の時、ハーモニクス数 3 以降で SNR、線幅は一定になった。これは、磁場変調率 $a=1.0$ 倍におけるマルチハーモニック検波で受信された高調波スペクトルの上限がハーモニクス数 3 であることによる。MHD 再構成に含めるハーモニクス数が増えるに伴い線幅が広がったことは、含まれる信号が増えるに従い含まれる雑音も増えたためであると考えられる。磁場変調率 $a=2.0$ 倍の時、ハーモニクス数 6 以降で SNR、線幅は一定になった。磁場変調率 $a=1.0$ 倍の時と比べ、MHD 再構成に含まれるハーモニクス数が 1、2 の時の SNR、線幅がとて小さい値となった。

高調波スペクトル $S_n(u)$ の LPF におけるカットオフ周波数 $2,604 \text{ kHz}$ は、Lock-in アンプ (LI 5640、NF ELECTRONIC INSTRUMENTS、横浜市) の時定数 $30 \mu\text{s}$ に対応している等価雑音帯域幅から決定した。Lock-in アンプの時定数 τ に対する減衰傾度 24 dB における等価雑音帯域幅 B_{N24} の算出式を以下に示す (LI 5640 取扱説明書より)。

$$B_{N24} = \frac{5}{32 \times \tau}, \quad (6)$$

フーリエ領域のフィルタのカットオフ周波数は、 $a=1.0$ 倍で 50 次、 $a=2.0$ 倍で 52 次に調整された。このフィルタ値は、得られるスペクトルの線幅が、従来 PSD システムを用いて磁場変調率 $a=1.0$ 倍で得られる EPR スペクトルの線幅を超えないように最適化された。図 4-5 に示す通り、dR-SG は 3 本の吸収ピークの数を持つため、フーリエ領域のフィルタを広く取る必要があるが、吸収ピークが少ない EPR 信号では、フィルタを狭め、より高い SNR を得ることがで

きる。磁場変調率 $a=2.0$ 倍において MHD 再構成に必要な信号は 6 次の高調波にまであることから、ハーモニクス数が 1、2 の時は必要な信号が含まれていないため、EPR スペクトルを再構成できていないと考えられる。磁場変調率 $a=1.0$ 倍の時、磁場変調率 $a=2.0$ 倍に比べて SNR が高く、線幅が小さい結果となった。磁場変調率 $a=2.0$ 倍の時の方がフーリエ領域のフィルタを広くかけているのにも関わらず、磁場変調率 $a=1.0$ 倍の方が高感度な EPR スペクトルを得られた。これは、磁場変調周波数が 81.92 kHz と比較的高い周波数であることから、含めるスペクトルが高次になるにつれて高周波となり、雑音を広く受信してしまうことによるのではないかと考えられる。本研究では、用いている EPR 装置の自動周波数制御のための FM 変調の変調周波数との干渉を避けるために、磁場変調周波数を下げることはしなかった。また変調信号を低周波にすると、マイクロ波発振器の位相ノイズ (SSB 位相ノイズ) による影響も増えてくる。今後の MHD システムを用いた高感度化において、低い磁場変調周波数を用いることは有用であるが、高周波ノイズと SSB 位相ノイズの影響のバランスを考慮する必要がある。

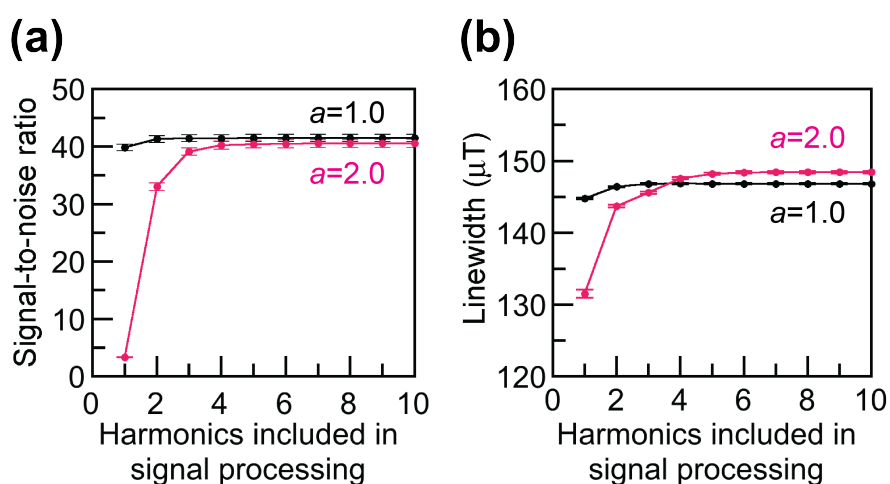


図 4-7 各磁場変調率 a における MHD 再構成に含めたハーモニクス数と、(a)信号対雑音比 (SNR)の関係、(b) 線幅 (μT)の関係 (サンプルサイズ $n=300$ の平均値 $\pm$ SEM)

従来の PSD システムと開発した MHD システムを用いて得られたそれぞれの ESR スペクトルの SNR を比較した。図 4-8 に、従来の PSD システムを用いた磁場変調率 $a=0.25$ 倍、 1.0 倍の時の SNR、MHD システムを用いた磁場変調率 $a=1.0$ 倍、 2.0 倍の時の SNR を示す。それぞれ 300 回測定の実験値の平均値でエラーバーは SEM を示す。MHD システムを用いた結果は、図 4-7 と同じデータを用いている。磁場変調率 $a=0.25$ 倍では、磁場変調の影響が十分に小さいため、得られた EPR スペクトルは磁場変調による歪みがない本来の線幅を示している。従来の PSD システムにおける磁場変調率 $a=0.25$ 倍で SNR は 6、 $a=1.0$ 倍での SNR は 19 であった。MHD システムにおける磁場変調率 $a=1.0$ 倍での SNR は 41、 $a=2.0$ 倍での SNR は 40 であった。従って、MHD システムによる ESR スペクトルの SNR と比較すると、PSD システムにおける磁場変調率 $a=0.25$ 倍での SNR から約 7 倍、 $a=1.0$ 倍での SNR から約 2 倍向上した。先行研究では、磁場変調率 $a=26$ 倍にてハーモニクス数 100 まで含めた MHD 再構成を行ったことで、 $a=0.25$ 倍における SNR から約 7 倍向上していた[4.6]。本研究では磁場変調率 $a=1.0$ 倍、ハーモニクス数 4 までという、先行研究より少ない磁場変調率、ハーモニクス数での MHD 再構成で、同様の SNR の 7 倍向上を達成した。

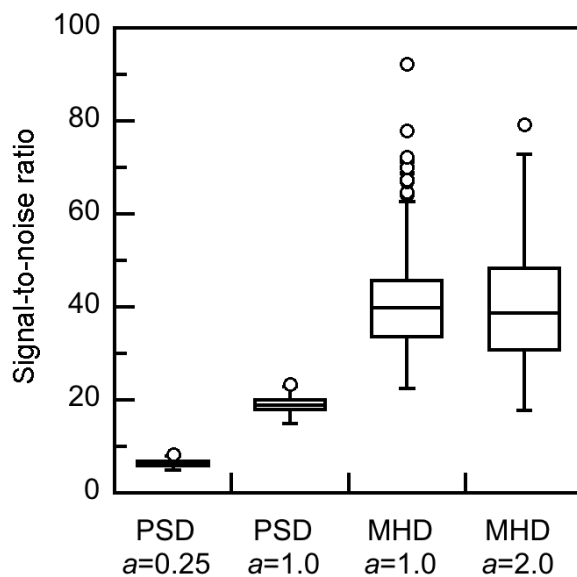


図 4-8 各磁場変調率における従来 PSD システムと MHD システムを用いた EPR スペクトルの SNR 比較 (サンプルサイズ $n=300$)

4.3.2 マルチハーモニック検波方式による pH マッピング

開発した MHD システムを用いて、水溶液サンプルの pH イメージングを行った。前節で決定した MHD 再構成パラメータを用いて EPR 信号は再構成された。図 4-9(a)に、水溶液サンプルとして使用した 2 mL バイアル (内径 9.8 mm) を示す。図 4-9(b)は、EPR 信号強度のサーフェイスレンダリング画像であり、グレーで示された位置のスライス画像を、図 4-9(c)に示す。pH 6.2~7.4 の間で 0.2 刻みの 7 つの水溶液サンプルを用いて、pH イメージングを行った。図 4-10 に、その 2 次元画像を示す。この時、7 つのサンプルで求めた pH 分解能の平均は 0.07 であり、PSD システムと同様に pH イメージングを行うことができた。pH 6.2、6.4、7.4 においてイメージング結果にむらが見られるが、全てのファントムで一様に見られるものではないことから、磁場の不均一性によるものではなく、ART 再構成における最適な繰り返し計算回数の違いによるものであると考えられる。

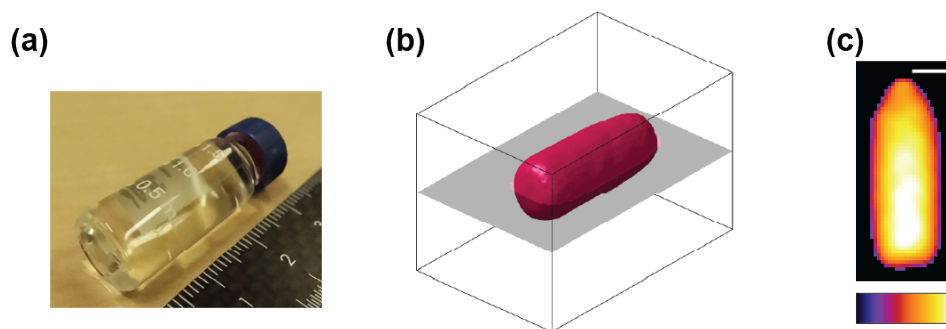


図 4-9 dR-SG 水溶液サンプルの(a)写真、(b)EPR 信号強度の 3D 画像と(c)2D 画像（スケールバーは 5 mm）

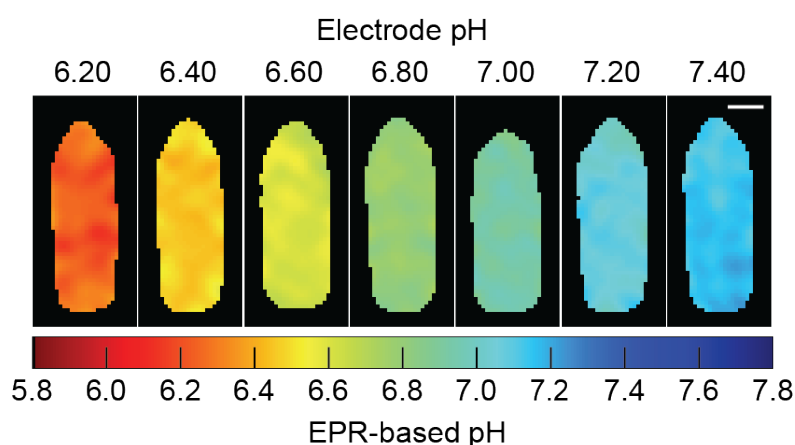


図 4-10 dR-SG 水溶液サンプルの pH6.2~7.4 の pH マップ（スケールバーは 5 mm）

ガラス電極 pH メーターで測定した pH に対する EPR 測定で得られた pH の関係を図 4-11 に示す。図 4-11 における黒丸が pH マッピングによるサンプル領域における平均値であり、エラーバーは $\pm$ SD である。EPR 測定値 $\text{pH}_{\text{measured}}$ を、ガラス電極 pH メーターの測定値 $\text{pH}_{\text{electrode}}$ の 3 次関数(7)で近似した。

$$\text{pH}_{\text{measured}} = m_0 + m_1x + m_2x^2 + m_3x^3 \quad (7)$$

$$x = \text{pH}_{\text{electrode}}$$

それぞれの係数は $m_0 = -8.2796$, $m_1 = 3.3363$, $m_2 = -0.11754$, $m_3 = -0.0069453$ であり、

この時の決定係数 R^2 は 0.99929 であった。図 4-11 より、pH 6.2~7.0 における EPR 測定 $\text{pH}_{\text{measured}}$ はガラス電極 pH メーターの測定 $\text{pH}_{\text{electrode}}$ との誤差 0.06 以下であるが、pH 7.2 を超えるとガラス電極 pH メーターの測定結果よりも大幅に低い値を算出していることが分かった。これは、従来の PSD システムを用いた EPR 測定においても同様であった。原因は、37°C では $\text{pK}_a=6.6$ から pH の値が大きく離れると、hfc (EPR 吸収スペクトルの両端の 2 つのピーク間距離) の変化が小さくなっていくことにあって考えられる。図 4-12 に、37°C で測定した pH 毎の dR-SG の EPR スペクトルの hfc を示す。 $\text{pK}_a=6.6$ から離れた pH 6.0 以下、pH 7.2 以上では、hfc の変化が小さいことが分かる。pH 7.2 以上では再構成に用いている構成データの hfc の変化が小さいため、高 pH での計算結果が本来の値より小さい値となったと考えられる。図 4-11 の青丸は、黒丸の測定 pH を赤線で示す 3 次多項式で補正した pH である。補正された pH はガラス電極 pH メーターで測定した pH に即している。ただし、pH 7.0 以上では、SD が増大している。

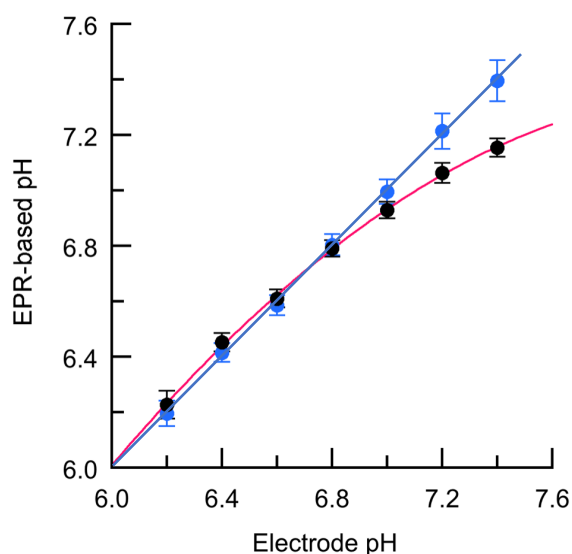


図 4-11 pH メーターで測定した pH に対する EPR 測定した pH の関係と補正曲線 (平均値 $\pm$ SD、黒丸：測定値、青丸：補正值、赤線：近似曲線)

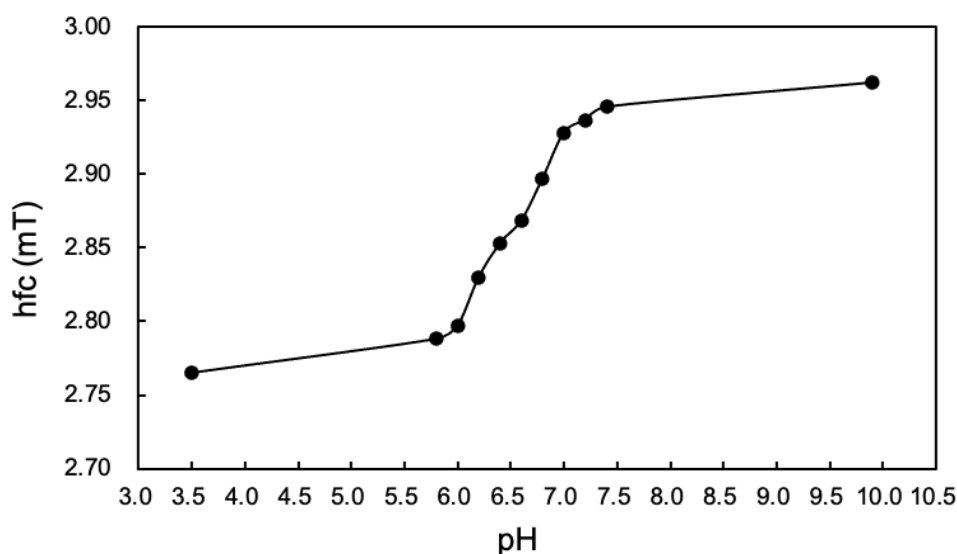


図 4-12 各 pH における dR-SG の hfc の遷移

4.4 まとめ

第 4 章の研究では、EPR 分光装置の受信システムにマルチハーモニック検波 (MHD) システムを導入した。pH イメージングを行うために、pH 感受性プローブ dR-SG の EPR 分光測定において MHD システムのパラメータを最適化した。磁場変調率 1 倍、ハーモニクス数 4 次まで含めた MHD 再構成により、従来のシステムと比べて、得られた EPR スペクトルの SNR (信号対雑音比) を 2 倍向上させた。従来システムと同様に、pH 分解能 0.07 で水溶液サンプルの pH イメージングを行うことができた。先行研究での報告に比べ、大幅に小さい磁場変調率で、先行研究[4.6]と同様の高感度化を達成したことから、必要な感度に対し、磁場変調周波数と磁場変調率を検討することができると考えられる。従って、高い変調周波数と低い変調周波数で影響する雑音 (高周波ノイズと位相ノイズ) を考慮し、最適な磁場変調周波数を使用することで更なるシステムの高感度化も期待できる。

4.5 参考文献

- [4.1] M. Elas, R. Bell, D. Hleihel, E. D. Barth, C. McFaul, C. R. Haney, J. Bielanska, K. Pustelny, K. Ahn, C. A. Pelizzari, M. Kocherginsky & H. J. Halpern, Electron paramagnetic resonance oxygen image hypoxic fraction plus radiation dose strongly correlates with tumor cure in FSa fibrosarcomas, *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics*, **71**, 542–549 (2008).
- [4.2] A. A. Gorodetsky, I. A. Kirilyuk, V. V. Khramtsov & D. A. Komarov, Functional electron paramagnetic resonance imaging of ischemic rat heart: Monitoring of tissue oxygenation and pH, *Magnetic Resonance in Medicine*, **76**, 350–358 (2016).
- [4.3] S. Koda, J. Goodwin, V. V. Khramtsov, H. Fujii & H. Hirata, Electron paramagnetic resonance-based pH mapping using spectral-spatial imaging of sequentially scanned spectra, *Analytical Chemistry*, **84**, 3833–3837 (2012).
- [4.4] V. A. Bikineev, E. A. Zavatskii, V. V. Isaev-Ivanov, V. V. Lavrov, A. V. Lomakin, V. N. Fomichev & K. A. Shabalin, Methods of correcting modulation-induced lineshape distortions in electron paramagnetic resonance spectroscopy, *Technical Physics*, **40**, 619–625 (1995).
- [4.5] M. Tseitlin, S. S. Eaton & G. R. Eaton, Reconstruction of the first-derivative EPR spectrum from multiple harmonics of the field-modulated continuous wave signal, *Journal of Magnetic Resonance*, **209**, 277–281 (2011).
- [4.6] Z. Yu, M. Tseytlin, S. S. Eaton & G. R. Eaton, Multiharmonic electron paramagnetic resonance for extended samples with both narrow and broad lines, *Journal of Magnetic Resonance*, **254**, 86–92 (2015).
- [4.7] M. Gonet, M. Baranowski, T. Czechowski, M. Kucinska, A. Plewinski, P.

- Szczepanik, S. Jurga & M. Murias, Multiharmonic electron paramagnetic resonance imaging as an innovative approach for in vivo studies, *Free Radical Biology and Medicine*, **152**, 271–279 (2020).
- [4.8] H. Sato-Akaba, H. Fujii & H. Hirata, Improvement of temporal resolution for three-dimensional continuous-wave electron paramagnetic resonance imaging, *Review of Scientific Instruments*, **79**, 123701 (2008).
- [4.9] H. Sato-Akaba, Y. Kuwahara, H. Fujii & H. Hirata, Half-life mapping of nitroxyl radicals with three-dimensional electron paramagnetic resonance imaging at an interval of 3.6 seconds, *Analytical Chemistry*, **81**, 7501–7506 (2009).
- [4.10] A. Bobko, T. D. Eubank, J. L. Voorhees, O. V. Efimova, I. A. Kirilyuk, S. Petryakov, D. G. Trofimov, C. B. Marsh, J. L. Zweier, I. A. Grigor'ev, A. Samouilov & V. V. Khramtsov, In vivo monitoring of pH, redox status, and glutathione using L-band EPR for assessment of therapeutic effectiveness in solid tumors, *Magnetic Resonance in Medicine*, **67**, 1827–1836 (2012).
- [4.11] A. Samouilov, O. V. Efimova, A. A. Bobko, Z. Sun, S. Petryakov, T. D. Eubank, D. G. Trofimov, I.A. Kirilyuk, I. A. Grigor'ev, W. Takahashi, J. L. Zweier & V. V. Khramtsov, In Vivo Proton–Electron Double-Resonance Imaging of Extracellular Tumor pH Using an Advanced Nitroxide Probe, *Analytical Chemistry*, **86**, 1045–1052 (2014).
- [4.12] J. Goodwin, K. Yachi, M. Nagane, H. Yasui, Y. Miyake, O. Inanami, A. A. Bobko, V. V. Khramtsov & H. Hirata, In vivo tumour extracellular pH monitoring using electron paramagnetic resonance: the effect of X-ray irradiation, *NMR in Biomedicine*, **27**, 453–458 (2014).
- [4.13] D. A. Komarov & H. Hirata, Fast backprojection-based reconstruction of spectral-

spatial EPR images from projections with the constant sweep of a magnetic field.

Journal of Magnetic Resonance, **281**, 44–50 (2017).

- [4.14] D. A. Komarov, Y. Ichikawa, K. Yamamoto, N. J. Stewart, S. Matsumoto, H. Yasui, I. A. Kirilyuk, V. V. Khramtsov, O. Inanami & H. Hirata, In vivo extracellular pH mapping of tumors using electron paramagnetic resonance, *Analytical Chemistry*, **90**, 13938–13945 (2018).

第5章 CA IX 阻害による固形腫瘍における治療効果の早期予測への応用

5.1 pH イメージングを用いた治療効果判定の背景

pH は、生物において生体恒常性の維持のための重要なパラメーターの 1 つである。人体において、がん[5.1-5.4]や、腎不全[5.5]、心臓虚血[5.6, 5.7]など多くの疾患で、pH が正常な生理学的値を外れていることが報告されている。第 1 章で述べた通り、がん細胞では通常の細胞とエネルギー代謝経路が異なり、乳酸を多く産生する[5.8]。これにより、がん細胞では pH 調節が活発に行われ、エネルギー代謝と細胞外 pH は密接に関係していることが知られている。生体内において重要なパラメータの一つである pH は、基本的な物理量であるが、生体内での計測が容易ではない[5.9]。分子イメージングのひとつである pH イメージングをがん研究へ応用する研究[5.10]は発展途上であり、生体内での細胞外 pH 計測を抗がん剤の治療効果と結びつけるモデル実験はこれまで行われていない。

低酸素条件下で過剰に発現する CA IX は、がん細胞において pH 調節機能を担っている[5.11]。CA IX を阻害することで、CA IX におけるがん細胞の pH 調節機能を低下させることができるため、CA IX 阻害剤は抗がん剤として期待されている[5.12, 5.13]。CA IX 阻害されたがん細胞では、CA IX 阻害されていないがん細胞と比較して、細胞内外でそれぞれ pH が変化すると考えられる。CA IX 阻害による化学療法の治療効果を細胞外 pH という効果予測バイオマーカーで早期予測できれば、がん治療における新たな治療法と治療効果予測法が確立できる。また、化学療法への応答と腫瘍成長の予測を数理モデル化できれば、他の種類の抗がん剤や放射線治療など、様々な治療法の早期効果予測に応用できる可能性がある。

第 5 章では、高精度 EPR 分光装置を用いて、腫瘍モデルマウスの細胞外 pH イメージングを行い、pH をバイオマーカーとして用いた CA IX 阻害による化学療法 of 早期予測方法の実現可能性を示す。

5.2 実験方法

5.2.1 試薬

先行研究[5.14]において合成された pH 感受性ニトロキシラジカル、2-(4-((2-(4-amino-4-carboxybutanamido)-3-(carboxymethylamino)-3-oxopropylthio)methyl)phenyl) -4-pyrrolidino-2,5,5-triethyl-2,5-dihydro-¹H-imidazol-1-oxyl, R-SG の重水素化体である dR-SG を動物実験のプローブとして用いた。dR-SG は、親水性トリペプチドであるグルタチオン残基を持ち、細胞膜を透過しないため、細胞外の環境に止まり、細胞外 pH のイメージングを可能にする。

CA IX 阻害剤として、U-104 (モデル番号 HY-13513) を MedChemExpress 社 (Monmouth Junction, NJ, USA) から購入した。U-104 の化学構造式を図 5-1 に示す。U-104 を溶解するために、ポリエチレングリコール 400 (PEG400) を Sigma-Aldrich Japan (東京) から購入した。先行研究[5.15, 5.16]を参考にして、PEG400 55.6%、エタノール 11.1%と純水 33.3%に U-104 (8.0 mg/mL) を溶解した。

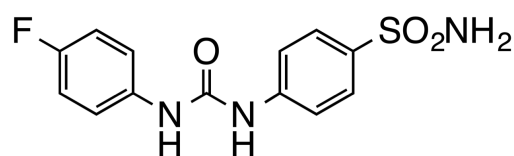


図 5-1 CA IX 阻害剤 U-104 の化学構造式

5.2.2 腫瘍モデルマウス

全ての動物実験は、北海道大学動物実験規則に従い、動物実験委員会の承認

を得て実施された（承認番号 20-0118）。先行研究[5.17]と同様に、ヒト由来膵管腺がん細胞である MIA-PaCa2（American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA）を用いた。BALB/c-*nu/nu* マウス（日本 SLC、浜松）の右後肢に約 1,000 万個の MIA-PaCa2 細胞を皮下注射し、固形腫瘍を作製した。U-104 による CA IX の阻害の様子を知るために、腫瘍サイズが 200 mm³ に達してから、U-104 の投与を開始し、21 日間腹腔投与した。投与濃度は、40 mg/kg、20 mg/kg（体重当たり）と Vehicle 群（いずれも 100 μ L／投与）の 3 群で行なった。

腫瘍モデルマウスの CA IX 阻害への pH 応答を測定するために、腫瘍サイズが 350~400 mm³ に達した日に 1 回目の測定を実施した。その 1 日後に U-104（40 mg/kg, 100 μ L）を腹腔投与し、約 1 時間後に 2 回目の測定を行った。

5.2.3 CA IX 阻害腫瘍モデルマウス pH マッピング

CAIX 阻害腫瘍モデルマウスの pH 応答を測定するため、細胞外 pH イメージングを行った。HCl か NaOH を用いて pH 7.4 に調整した dR-SG プローブ（7.6 mg, 0.6 mmol/kg 体重あたり）を、測定の直前にマウス体内に 40 秒かけて尾静脈注射した。dR-SG プローブ投与完了から 1 分後に測定を開始した。測定中は、マウスにイソフルランを吸入させ、麻酔をかけており（2.3%で導入しその後 1.0%~2.0%）、光ファイバ温度センサと圧力センサでマウスの体温と呼吸数をモニターした（A small animal monitoring and gating system; model 1025, SA instruments, Inc., Stony Brook, NY, US）。ヒーターシステム（Model 1025, SA Instruments, Inc., Stony Brook, NY, US）によるフィードバック制御を用いて、マウスの体温を 36.5 ~ 37.5 °C に維持した。

第 4 章で報告したマルチハーモニック検波（MHD）システムを用いて、EPR スペクトルを取得した。pH イメージングにおける測定パラメータは、磁場掃引

幅 9.0 mT, 磁場変調振幅 0.13 mT, 変調周波数 81.92 kHz, 最大磁場勾配 70 mT/m, 入力マイクロ波電力 11.48 mW であった。各 X-, Y-, Z-方向に 15 ずつの磁場勾配でスペクトルを取得した (合計 3,375 スペクトル)。MHD システムにおいて、高調波スペクトルの LPF のカットオフ周波数は 2,604 Hz であり、フーリエ領域のフィルタのカットオフデータポイントは 50 であった。1 スキャンにおけるスペクトルサンプル数は 8192 点であり、MHD 再構成に含めた高調波の次数は 4 であった。総合したデータ取得時間は 7.5 分であった。

第 4 章の実験と同様に、4 次元スペクトル空間画像は、逐次近似 (ART) 法により再構成された。ART 法の繰り返しにおいて、スペクトルデータのフィッティングを行った。pH 再構成アルゴリズムの詳細については、先行研究[5.18, 5.19]にて報告されている。腫瘍モデルマウスの後肢の細胞外 pH マッピングでは、スペクトル窓 6.75 mT と FOV 25.0 mm × 25.0 mm × 25.0 mm から決定したマトリックスサイズ 768 × 48 × 48 × 48 を用いた。ART 法の繰り返し回数は、7 回行なった。ART 法による pH の計算後、3 次多項式 (第 4 章参照) を用いて補正し、細胞外 pH マップを作成した。

5.3 実験結果と考察

5.3.1 固形腫瘍への CA IX 阻害剤投与

CA IX 阻害剤 U-104 の投与量による治療効果を確認するために、2 種類の投与量 40 mg/kg, 20 mg/kg (体重あたり) と Vehicle 群をそれぞれ 5 匹, 5 匹, 6 匹の腫瘍モデルマウスに投与した。CA IX 阻害剤 U-104 を投与した腫瘍モデルマウスの腫瘍サイズの変化を図 5-2 に示す。n=5~6 における平均値±SEM を表す。それぞれ、赤のプロットが 40 mg/kg、青のプロットが 20 mg/kg、黒のプロットが Vehicle で、各群の腫瘍成長曲線を示す。U-104 の投与量ごとの腫瘍成長への影

響の比較のため、図 5-3 に腫瘍サイズ 1000 mm^3 (投与開始から 5 倍) に達するまでの経過日数を示す。図 5-3 の作成には、図 5-2 のデータと同じデータを使用した。腫瘍サイズが投与開始から 5 倍になるまでの経過日数の平均値 $\pm$ SD はそれぞれ、投与量 40 mg/kg で 16.0 ± 1.4 日 ($n=5$)、投与量 20 mg/kg で 13.6 ± 3.9 日 ($n=5$)、Vehicle で 12.3 ± 2.5 日 ($n=6$) であった。Vehicle と投与量 40 mg/kg での経過日数を Student の t 検定を用いて検定した結果、有意差が認められた ($p=0.018 < 0.05$)。Vehicle と投与量 20 mg/kg 、投与量 20 mg/kg と投与量 40 mg/kg での経過日数の Student の t 検定では、有意差が認められなかった。投与量 40 mg/kg において U-104 の腫瘍成長抑制効果を確認できた。投与量 20 mg/kg の群ではばらつきが大きく、効果の個体差を表していることから、効果を確認するには投与量が少ないことが分かった。この結果から、本研究で U-104 投与群には投与量 40 mg/kg で投与した。

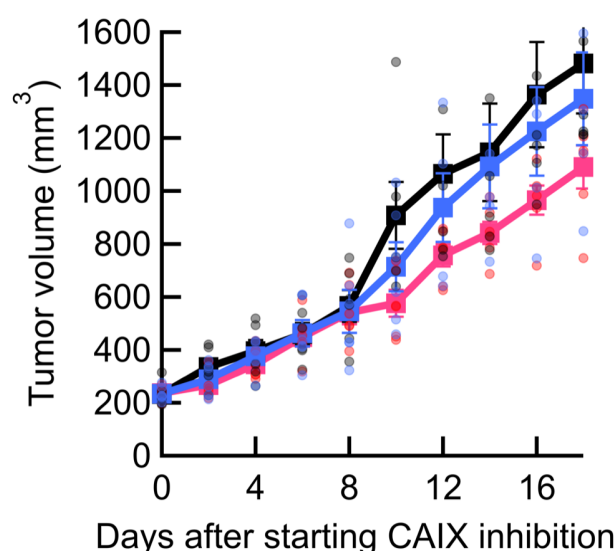


図 5-2 U-104 投与量に対する腫瘍成長曲線 (赤: 40 mg/kg , 青: 20 mg/kg , 黒: Vehicle)

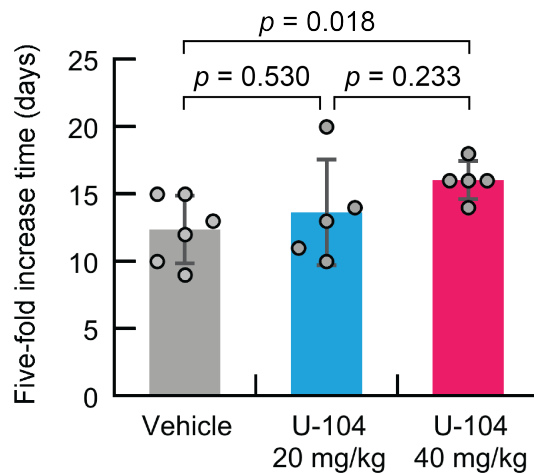


図 5-3 U-104 投与量による腫瘍サイズが 5 倍 (200~1000 mm³) になるまでの経過日数の比較

5.3.2 固形腫瘍の CA IX 阻害への細胞外 pH 応答の検出

腫瘍モデルマウスの CA IX 阻害への細胞外 pH 応答を測定するために、U-104 (40 mg/kg, 100 μL) を腹腔投与し、EPR 測定を行った。CA IX 投与前後の細胞外 pH を比較するために、腫瘍サイズが 400 mm³~550 mm³ で 1 回目の細胞外 pH 測定を行い、翌日に U-104 を投与し、その 1 時間後に 2 回目の細胞外 pH 測定を行った。測定では、細胞外 pH 測定のための EPR イメージングの他に、pH マップにおいて固形腫瘍の位置を特定するための MRI (核磁気共鳴) 画像を撮像した。一連の測定の模式図を図 5-4 に示す。測定の間、腫瘍モデルマウスは姿勢が変わらないようにマウス用ベッドに固定されている。EPR イメージングを行なった後に、EPR イメージング装置と同室にある MRI 装置にマウスが固定されているベッドを移動して、MRI 画像を撮像した。図 5-5 にマウス用ベッドに固定された測定時のマウスの右後肢の写真を示す。

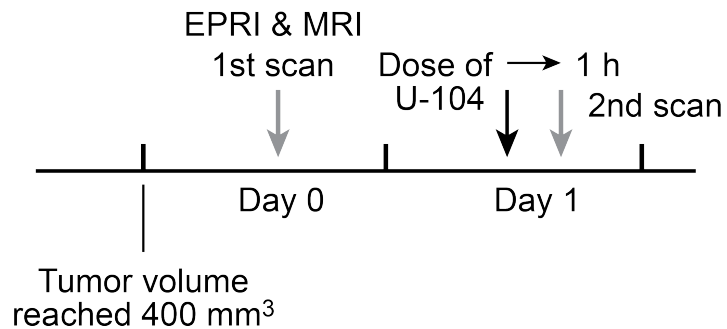


図 5-4 細胞外 pH 測定と U-104 投与の実験プロトコルの模式図



図 5-5 マウス用ベッドに固定された腫瘍モデルマウスの右後肢

腫瘍モデルマウスに対して U-104 投与前の 1 回目の測定と U-104 投与から 1 時間後の 2 回目のイメージング結果を図 5-6 に示す。それぞれの腫瘍モデルマウスの右後肢の MRI 画像と EPR イメージングにより取得した EPR 信号強度分布、細胞外 pH マップである。MRI 画像における赤線で囲われた部分が固形腫瘍であり、同じように赤線で、EPR 信号強度分布と細胞外 pH マップにおいて固形腫瘍に対応する部分を示している。スケールバーは 5 mm である。測定開始時間は、予備実験において U-104 を投与してから pH が最も低下する 1 時間後に設定した。U-104 投与前の 1 回目の測定、投与後の 2 回目の測定のどちらも、MRI 画像において固形腫瘍と共に正常組織が撮像されている。EPR 測定による pH 分布では正常組織の領域で高い pH を示しており、腫瘍部分では比較的低い pH を

示している。2 回目の pH イメージング結果では、1 回目に比べ、低い pH を示す黄色の領域が増えていることが分かる。図 5-7 は、3 次元の EPR 信号強度分布を示し、色を付けてある面が図 5-6 に示したスライス面である。細胞外 pH 変化の定量的な解析をするために、MRI の全ての 2D スライスから固形腫瘍領域を特定し、3D pH マップの関心領域 (ROI) を特定した。図 5-8 に、細胞外 pH マップから ROI を取り出し作成した U-104 投与前後の細胞外 pH 分布のヒストグラムを示す。3 次多項式 (第 4 章参照) による補正のため、U-104 投与前における、 pK_a 6.60 よりも大きく離れている高 pH において、ヒストグラムの分布が広がったと考えられる。U-104 投与後では、補正による影響は少なく広がりは見られず、 pK_a 6.60 付近の低 pH に偏っている。この時、U-104 投与前の細胞外 pH の中央値は 6.96、投与後の細胞外 pH の中央値は 6.76 であり、U-104 投与により細胞外 pH が 0.20 低下した。

5.1 節で述べた通り、がん細胞では、通常と異なるエネルギー代謝経路を辿るため、乳酸が多く産生され、pH 調節機能により乳酸は細胞外に排出される。CA IX による pH 調節機能が阻害されれば、乳酸が細胞内にとどまるため、細胞内 pH が低下し、細胞外 pH は上昇すると考えられる。Swietach らによる先行研究 [5-20] では、スフェロイドにおいて CA IX 阻害剤 AP105 を用い、CA IX 阻害による細胞内外の pH の変化を検出した結果、通常のがん細胞と比べ、細胞内 pH は低下し、細胞外 pH はやや上昇した。しかし、本研究では、*in vivo* において、CA IX 阻害による細胞外 pH は低下する傾向にあった。先行研究との CA IX 阻害に対する細胞外 pH の応答の違いは、細胞種が異なることに加えて、*in vitro* と *in vivo* での細胞外環境の違いにあるのではないかと考えられる。CA IX 阻害時の、他の pH 調節因子の活動状態を調べることで、細胞外 pH が低下したメカニズムを考察することができる。

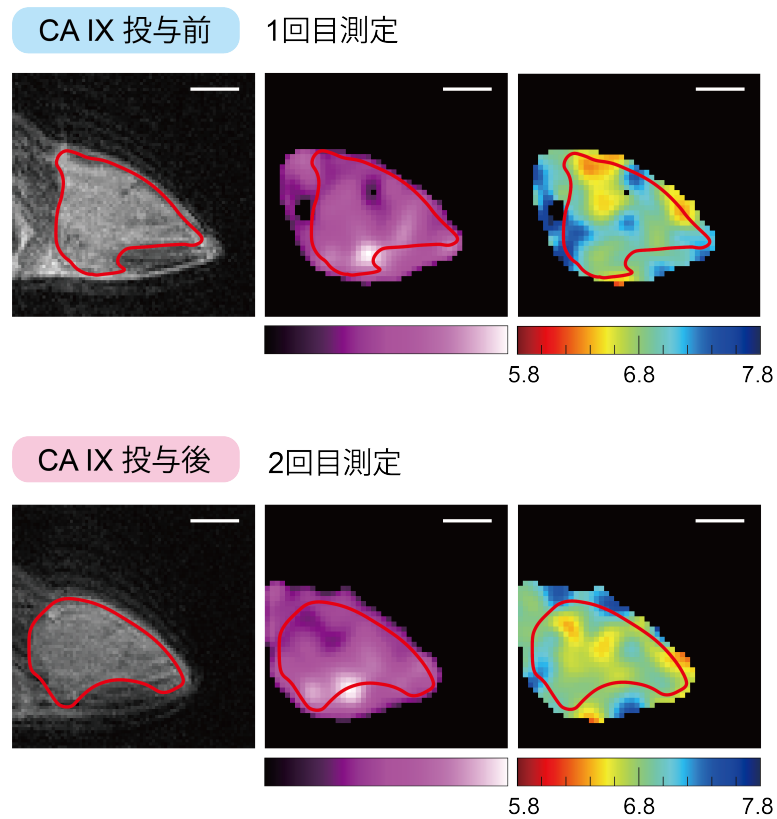


図 5-6 U-104 投与前後のイメージング結果（スケールバー：5 mm）

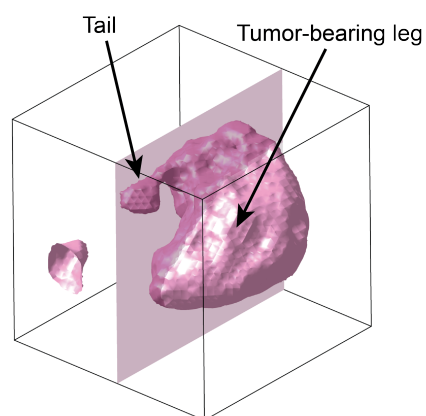


図 5-7 固形腫瘍が作製されたマウス後肢の EPR 信号強度の 3 次元分布

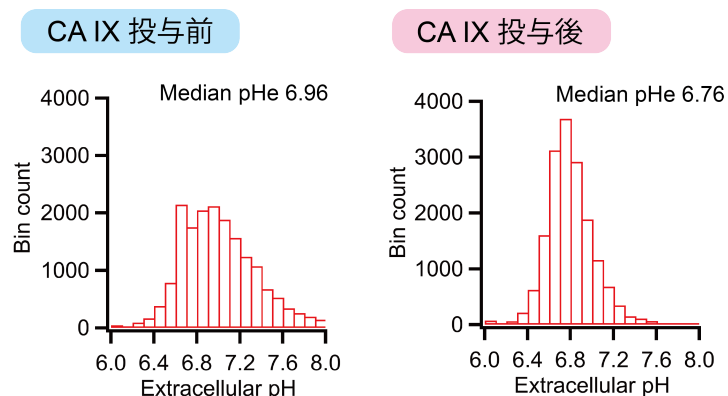


図 5-8 U-104 投与前後の pH ヒストグラム

5.3.3 固形腫瘍の CA IX 阻害による細胞外 pH 変化

CA IX 阻害のための U-104 投与による細胞外 pH 変化を解析するために、U-104 投与群 (n=5) と Vehicle 群 (n=5) を作成した。Vehicle 群では U-104 を含まない溶剤 (100 μ L) のみを腹腔内投与し、5.3.2 節と同様、投与の前後で 2 回の EPR 測定と MRI 測定を行った。図 5-9 に、U-104 投与群と Vehicle 群の細胞外 pH 変化を示す。U-104 投与群において、投与前後の細胞外 pH に差がないかを分析した。n=5 における 3D 細胞外 pH の平均値は、投与前で 7.04 (範囲 = 6.92~7.21, SD=0.11)、投与後で 6.94 (範囲 = 6.76~7.08, SD=0.14) であった。Vehicle 群において、同様の分析をしたところ、n=5 における平均値は、投与前で 7.00 (範囲 = 6.85~7.08, SD = 0.09)、投与後で 7.01 (範囲 = 6.94~7.18, SD = 0.09) であった。それぞれ対応のある t 検定を行った結果、どちらも優位な差はみられなかったが、U-104 投与群では $p=0.264$ 、Vehicle 群では $p=0.947$ であり、Vehicle 群に比べて U-104 投与群では p 値が大幅に減少していることがわかる。それぞれでばらつきが大きく、個体数が少ないため、有意差はみられなかったが、図 5-9 における U-104 投与群と Vehicle 群の細胞外 pH を比較すると、U-104 投与により細胞外 pH が低下する傾向があることが分かる。

図 5-10 に、固形腫瘍の中で細胞外 pH が 7.0 以下である割合を示す。Vehicle 群では、投与前後で変化は見られないが、U-104 投与群では、投与前から投与後で細胞外 pH が 7.0 以下である割合が増加していることがわかる。細胞外 pH 変化と同様に、対応のある t 検定を行ったところ、有意差は見られなかったが、Vehicle 群における $p=0.962$ に比べて U-104 投与群では $p=0.283$ と p 値が大幅に小さい値であった。

U-104 投与群における投与前後の細胞外 pH 変化の平均値は-0.105（範囲 = -0.29~0.16, SD = 0.180）であり、Vehicle 群では+0.004（範囲 = -0.13~0.15, SD = 0.119）であった。U-104 投与群と Vehicle 群のそれぞれの投与前後の細胞外 pH の差において対応のない t 検定を行ったところ、有意差はみられなかった。やはり pH 変化についてもばらつきが大きいため、有意差を認めるためには、個体数を増やす必要があると考えられる。しかし、それぞれの平均値からも、Vehicle 群では細胞外 pH の変化が小さく、U-104 投与群では細胞外 pH が下がる傾向があることが分かる。

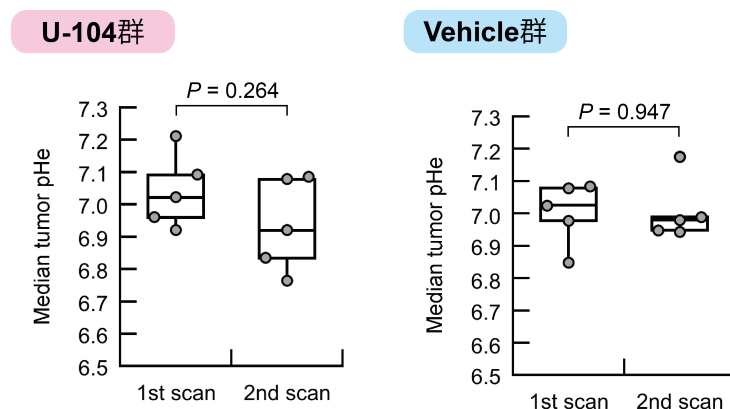


図 5-9 U-104 投与群と Vehicle 群の pH 変化比較

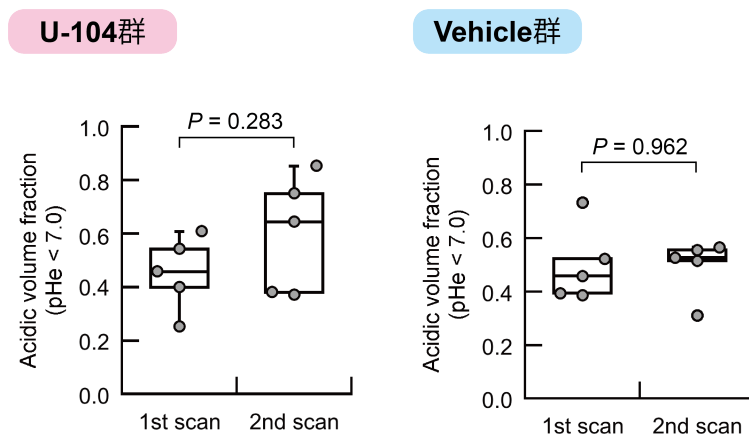


図 5-10 U-104 投与群と Vehicle 群の pH 7.0 以下の割合の比較

U-104 投与により有意に細胞外 pH が変化することは示すことができなかったが、細胞外 pH が低下する傾向があることを示した。これは、がん細胞において CA IX が阻害されることにより細胞外 pH が低下するがその変化が小さいことを示している。CAIX 阻害により、CAIX による pH 調節機能を止めることはできるが、乳酸や水素イオンを排出するモノカルボン酸輸送体 (MCT) や、 Na^+/H^+ 交換輸送体 (NHE) などのその他の pH 調節機能に関与する因子は働いており、がん細胞における pH 調節機能が完全には止まっていない。CAIX 阻害下でも他の因子により pH 調節が行われ、CA IX 阻害による細胞外 pH の変化が小さくなっていると考えられる。従って、より深い生物学的な考察には、MCT や NHE などの因子についても併せて調査する必要がある。MCT4 は乳酸を pH 依存的に輸送することが知られており、抗がん治療の可能性として MCT4 の阻害方法について研究が進んでいる[5.21]。EPR 法を用いた *in vivo* pH イメージングにより、MCT4 などの pH 調節因子を阻害することでより有意な細胞外 pH の変化を検出できる可能性があり、それによる pH 変化とその治療効果が認められ

ば、がん治療への応用が期待できる。

5.4 まとめ

第5章の研究では、高感度 EPR 分光装置を用いて、腫瘍モデルマウスの細胞外 pH イメージングを行い、CA IX 阻害による細胞外 pH の変化を検出した。U-104 を投与しない Vehicle 群における細胞外 pH の変化を検出し、U-104 投与モデルの細胞外 pH 変化との分析を行った。t 検定を行った結果、U-104 投与群と Vehicle 群どちらにおいても、投与前後の細胞外 pH に有意差があるとは結論づけることができなかった。しかし、Vehicle 群に対して U-104 投与群では p 値が大幅に小さく、U-104 投与により pH が下がる傾向にあることがわかった。従って、細胞外 pH の変化がより大きいと予想される pH 調節因子を阻害すれば、EPR 法を用いた細胞外 pH イメージングによる細胞外 pH 変化を検出することができると考えられる。このような治療薬の投与に対して、EPR pH イメージングを用いた細胞外 pH の変化の検出により、がん治療効果の早期評価に繋がれると期待できる。

5.5 参考文献

- [5.1] A. I. Hashim, X. Zhang, J. W. Wojtkowiak, G. V. Martinez & R. J. Gillies, Imaging pH and metastasis, *NMR in Biomedicine*, **24**, 582–591 (2011).
- [5.2] M. Stubbs, P. M. McSheehy, J. R. Griffiths & C. L. Bashford, Causes and consequences of tumour acidity and implications for treatment, *Molecular Medicine Today*, **6**, 15–19 (2000).
- [5.3] A. L. Vāvere, G. B. Biddlecombe, W. M. Spees, J. R. Garbow, D. Wijesinghe, O. A. Andreev, D. M. Engelman, Y. K. Reshetnyak & J. S. Lewis, A novel technology for the imaging of acidic prostate tumors by positron emission tomography, *Cancer Research*, **69**, 4510–4516 (2009).
- [5.4] R. A. Gatenby & R. J. Gillies, Why do cancers have high aerobic glycolysis?, *Nature Reviews Cancer*, **4**, 891–899 (2004).
- [5.5] J. Bott, M. P. Carroll, J. H. Conway, S. E. Keilty, E. M. Ward, A. M. Brown, E. A. Paul, M. W. Elliott, R. C. Godfrey, J. A. Wedzicha & J. Moxham, Randomised controlled trial of nasal ventilation in acute ventilatory failure due to chronic obstructive airways disease, *The Lancet*, **341**, 1555–1557 (1993).
- [5.6] J. A. Kraut & N. E. Madias, Consequences and therapy of the metabolic acidosis of chronic kidney disease, *Pediatric Nephrology*, **26**, 19–28 (2011).
- [5.7] J. D. Kopple, K. Kalantar-Zadeh & R. Mehrotra, Risks of chronic metabolic acidosis in patients with chronic kidney disease, *Kidney International Supplements*, **67**, S21–S27 (2005).
- [5.8] C. Corbet & O. Feron, Tumour acidosis: From the passenger to the driver’s seat, *Nature Reviews Cancer*, **17**, 577–593 (2017).
- [5.9] W. Blaszczyk and S. Pawel, What do cellular responses to acidity tell us about

- cancer?, *Cancer metastasis reviews*, doi:10.1007/s10555-021-10005-3 (2021).
- [5.10] A. A. Gorodetsky, I. A. Kirilyuk, V. V. Khramtsov & D. A. Komarov, Functional electron paramagnetic resonance imaging of ischemic rat heart: Monitoring of tissue oxygenation and pH, *Magnetic Resonance in Medicine*, **76**, 350–358 (2016).
- [5.11] I. Koyuncu, A. Gonel, M. Durgun, A. Kocyigit, O. Yuksekdog, C. T. Supuran, Assessment of the antiproliferative and apoptotic roles of sulfonamide carbonic anhydrase IX inhibitors in HeLa cancer cell line, *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, **34**, 75–86 (2019).
- [5.12] P. C. McDonald, S. Chia, P. L. Bedard, Q. Chu, M. Lyle, L. Tang, M. Singh, Z. Zhang, C. T. Supuran, D. J. Renouf & S. Dedhar, A Phase 1 Study of SLC-0111, a Novel Inhibitor of Carbonic Anhydrase IX, in Patients With Advanced Solid Tumors, *American Journal of Clinical Oncology*, **43**, 484–490 (2020).
- [5.13] C. T. Supuran, V. Alterio, A. Di Fiore, K. D'Ambrosio, F. Carta, S. M. Monti, G. De Simone, Inhibition of carbonic anhydrase IX targets primary tumors, metastases, and cancer stem cells: Three for the price of one, *Medcinal Research Reviews*, **38**, 1799–1836 (2018).
- [5.14] A. Bobko, T. D. Eubank, J. L. Voorhees, O. V. Efimova, I. A. Kirilyuk, S. Petryakov, D. G. Trofimiov, C. B. Marsh, J. L. Zweier, I. A. Grigor'ev, A. Samouilov & V. V. Khramtsov, In vivo monitoring of pH, redox status, and glutathione using L-band EPR for assessment of therapeutic effectiveness in solid tumors, *Magnetic Resonance in Medicine*, **67**, 1827–1836 (2012).
- [5.15] F. E. Lock, P. C. McDonald, Y. Lou, I. Serrano, S. C. Chafe, C. Ostlund, S. Aparicio, J. Y. Winum, C. T. Supuran & S. Dedhar, Targeting carbonic anhydrase IX depletes breast cancer stem cells within the hypoxic niche, *Oncogene*, **32**,

(2013).

- [5.16] D. Ramchandani, D. Unruh, C. S. Lewis, V. Y. Bogdanov & G. F. Weber, Activation of carbonic anhydrase IX by alternatively spliced tissue factor under late-stage tumor conditions, *Laboratory Investigation*, **96**, 1234–1245 (2016).
- [5.17] K. Kimura, N. Iguchi, H. Nakano, H. Yasui, S. Matsumoto, O. Inanami & H. Hirata, Redox-Sensitive Mapping of a Mouse Tumor Model Using Sparse Projection Sampling of Electron Paramagnetic Resonance. *Antioxidants & Redox Signaling*, (2021). doi 10.1089/ars.2021.0003
- [5.18] D. A. Komarov & H. Hirata, Fast backprojection-based reconstruction of spectral-spatial EPR images from projections with the constant sweep of a magnetic field. *Journal of Magnetic Resonance*, **281**, 44–50 (2017).
- [5.19] D. A. Komarov, Y. Ichikawa, K. Yamamoto, N. J. Stewart, S. Matsumoto, H. Yasui, I. A. Kirilyuk, V. V. Khramtsov, O. Inanami & H. Hirata, In vivo extracellular pH mapping of tumors using electron paramagnetic resonance, *Analytical Chemistry*, **90**, 13938–13945 (2018).
- [5.20] P. Swietach, S. Patiar, C. T. Supuran, A. L. Harris & R. D. Vaughan-Jones, The role of carbonic anhydrase 9 in regulating extracellular and intracellular pH in three-dimensional tumor cell growths, *Journal of Biological Chemistry*, **284**, 20299–20310 (2009).
- [5.21] Y. Futagi, M. Kobayashi, K. Narumi, A. Furugen & K. Iseki, Identification of a selective inhibitor of human monocarboxylate transporter 4, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **495**, 427–432 (2018).

第6章 結論と今後の展望

本研究では、チューナブル共振器と EPR 受信システムの高感度化により高精度 pH イメージングを実現し、細胞外 pH イメージングを用いて固形腫瘍における CA IX 阻害による治療効果の早期評価の実現可能性を示した。

高感度 pH イメージングの実現における課題は、EPR スペクトルの信号対雑音比 (SNR) の最大化であった。EPR スペクトルの SNR を最大化するために、チューナブル共振器と EPR 受信システムを高感度化した。細胞外 pH イメージングを用いた CA IX 阻害治療効果の早期評価の実現には、CA IX 阻害による細胞外 pH を検出することが課題であった。腫瘍モデルマウスに CA IX 阻害剤を投与する前後で高精度細胞外 pH イメージングを行い、CA IX 阻害による細胞外 pH の変化を明らかにした。

第 2 章では、EPR スペクトルの信号強度を最大するために、チューナブル共振器のマイクロ波駆動効率の向上を図った。チューナブル共振器におけるインピーダンス整合に着目し、これまで明らかにされていない平衡伝送線路の特性インピーダンスと共振回路の高周波磁場発生効率の関係を明らかにした。共振回路の磁場発生効率を最大にする平衡伝送線路の特性インピーダンスと結合キャパシタの最適化を行った結果、先行研究と比較して、高周波磁場発生効率を 2.4~2.9 倍増加させることに成功した。高い特性インピーダンスの平衡伝送線路を用いることで、得られた EPR スペクトルの信号強度は 14%増加したが、同時に雑音が 27%増加した。その結果から、チューナブル共振器において発生する雑音の分析と雑音を最小化する最適設計の必要性が明らかになった。

第 3 章では、EPR スペクトルの雑音を減少させるために、チューナブル共振器における雑音の分析を行った。これまで明らかにされていないチューナブル共振器における雑音の分析のために、(1)チューナブル共振器で発生する雑音、

(2)外部環境からの雑音、(3)磁場変調による雑音、(4)チューナブル共振器を除いた EPR 分光装置の雑音について検証した。その結果、チューナブル共振器における支配的な雑音はチューナブル共振器のマッチング回路に用いているバラクタダイオードで発生している雑音であることが分かった。マッチング回路のバラクタダイオードをトリマコンデンサに置き換えることで、EPR スペクトルのベースライン雑音は 1/4.7 に減少し、SNR が 6.1 倍向上した。今後、磁場変調コイルの構造を最適化することにより磁場変調による雑音を減少させ、さらに EPR スペクトルの SNR を向上させることが期待できる。

第 4 章では、EPR 受信システムの高感度化のために、EPR 分光装置の位相検波システムにマルチハーモニック検波 (MHD) システムを導入した。従来の Lock-in アンプを用いた位相検波ではなく、EPR 信号を直接 PC で位相検波するデジタル位相検波システムの構築を行った。これまで取得していなかった磁場変調信号の高調波を含めて EPR スペクトルを MHD 再構成することにより、EPR スペクトルの SNR 向上を図った。比較的高い磁場変調周波数を使用したマルチハーモニック検波システムにおける課題として、高調波の周波数が高くなることで生じる高周波ノイズや、高調波の数が増えることで必要になる多大なメモリ使用がある。約 100 kHz の磁場変調周波数において、必要な感度に対して磁場変調率と MHD 再構成に含めるべき変調信号の高調波次数の最適化を行った。先行研究では磁場変調率 26 倍において変調信号の高調波を 100 次まで含めた再構成を行っていた。本研究では、磁場変調率 1 倍において高調波を 4 次まで含めた再構成により先行研究と同程度の高感度化を達成した。従来のシステムと比べて、MHD システムにより EPR スペクトルの SNR を 2 倍向上させた。pH 感受性プローブを用いた EPR イメージングを行い、従来システムと同様の pH 分解能 0.07 での水溶液 pH イメージングを実現した。低い磁場変調周波数では、高

周波ノイズを避けることができるが、マイクロ波発振器の位相ノイズの影響があるため、両者の影響が少ない磁場変調周波数を検証することにより、さらなる受信システムの高感度化を期待できる。

第 5 章では、高感度 EPR 分光装置による細胞外 pH イメージングを固形腫瘍の抗がん剤治療早期評価モデル実験に適用した。腫瘍モデルマウスの右後肢に作製した固形腫瘍の細胞外 pH イメージングを行い、pH 調節機能を阻害する CAIX 阻害剤 U-104 の投与による細胞外 pH の変化を検出した。U-104 を投与した群における投与前後の細胞外 pH の変化に統計的有意差は認められなかったが、Vehicle 群と比較すると U-104 投与により細胞外 pH が下がる傾向にあることがわかった。このことから、CAIX を阻害しただけでは細胞の pH 調節機能は停止しないと考えられる。CAIX 阻害時の細胞における他の pH 調節因子の状態について調べ、pH 調節への寄与が大きい因子を明らかにすることにより、がん細胞の pH 調節機能の深い考察が可能になるだろう。また、その pH 調節への寄与が大きい因子の阻害による治療効果を細胞外 pH の変化として検出することで、EPR 法を用いた pH イメージングが、がん治療の早期評価に繋がると期待される。

本研究において、チューナブル共振器の最適設計と雑音の検証、受信システムの高感度化を行った。また、開発した高感度 EPR 分光装置を用いて、腫瘍モデルマウスの CAIX 阻害剤 U-104 投与による細胞外 pH の変化を検出した。本研究においてさらに明らかになった EPR 分光装置の高感度化の課題がある。共振器開発における更なる雑音源の削減や、最適な磁場変調周波数を用いた MHD 受信システムの開発により、今後さらなる高感度化が期待できる。

CAIX 阻害剤 U-104 投与では、細胞外 pH の有意な変化は認められなかったが、細胞外 pH をより変化させる治療において、EPR 法を用いた pH イメージン

グは有用である。治療前後の細胞外 pH の変化と腫瘍成長サイズの関係を用いてサポートベクターマシンを作製することで、治療効果の早期測定が可能になると予想される。細胞外 pH 検出による抗がん剤治療効果の早期測定方法を確立することができれば、最適な治療法の選択に大いに役立つ技術となる。本研究で用いた CA IX 阻害剤 U-104 だけでなく、他の抗がん剤や放射線治療など様々な治療法の早期予測に応用できれば、がん研究に大きな技術的進展をもたらすと考えられる。

謝辞

本研究を遂行するにあたり、御指導を戴いた北海道大学 情報科学研究院 生命人間情報科学部門 磁気共鳴工学研究室 平田 拓 教授に深謝の意を表する。本研究の実施の機会を与えて頂き、遂行が困難な時でも辛抱強く的確な御助言を戴けた事で本論文を執筆する事ができた。同部門 細胞生物工学研究室 岡嶋 孝治 教授には、副査としてご助言をいただくと共に、副指導教員として研究生生活等についての相談に対するご助言をいただき、迷いなく研究に邁進することができた。ここに深謝の意を表する。同部門 人間情報工学研究室 橋本 守 教授には、副査としてご助言をいただき、発表についてのご指導をいただいた。ここに深謝の意を表する。磁気共鳴工学研究室 松元 慎吾 准教授には、MRI 撮像方法についてのご指導や、生物学的な実験についてのご助言を頂いた。ここに深謝の意を表する。研究ゼミ等で研究内容から発表の仕様まで、様々な御指摘を頂いた同研究室 西村 生哉 助教に深謝する。本研究の第5章の実験では、北海道大学 獣医学研究院 応用獣医科学分野 放射線学教室 稲波 修 教授には CA IX 阻害に関する知見を頂いた。ここに深謝の意を表する。同教室 安井 博宣 准教授にはがん細胞を提供して頂き、実験マウスへのがん細胞移植を行っていただいた。動物実験についての様々なご助言を頂いた事で、動物実験を遂行することができた。ここに深謝の意を表する。磁気共鳴工学研究室内の諸氏には、様々な相談に応じて頂き、多大なる協力を戴いた。また、後輩達との雑談や交流のお陰で、前向きに研究に取り組むことができた。ここに感謝の意を表する。

博士課程進学へ背中を押してくれた家族に、感謝の意を表する。また、精神的な大きな支えとなってくれた大切な人に心からの感謝の意を表する。その存在無くては本研究を完遂することはできなかった。

湯川記念財団 望月基金の ISMAR-APNMR-NMRSJ-SEST 2021 への参加における支援に感謝する。クロサワ育成財団、中谷医工計測技術振興財団には、手厚い経済的ご支援を頂いた。両財団のご支援の元、研究に専念することができた。ここに深謝の意を表する。本研究の一部は日本学術振興会科学研究費助成事業 特別研究員奨励費 (21J10562) の助成を受けたものである。

研究業績

◆ 発表論文

1. **R. Nakaoka** and H. Hirata. Noise characteristics of a 750-MHz electronically tunable resonator for electron paramagnetic resonance spectroscopy, *AIP advances*, Vol. 9, No. 7, article no. 075312 (2019), (7 pages) doi:10.1063/1.5099381.
2. **R. Nakaoka**, D. A. Komarov, S. Matsumoto and H. Hirata. Impact of the characteristic impedance of coaxial lines on the sensitivity of a 750-MHz electronically tunable EPR resonator. *Applied Magnetic Resonance*, Vol. 49, No. 8, pp. 853–867 (2018), doi:10.1007/s00723-018-1001-6.
3. T. Amida, **R. Nakaoka**, D. A. Komarov, K. Yamamoto, O. Inanami, S. Matsumoto and H. Hirata, A 750-MHz electronically tunable resonator using microstrip line couplers for electron paramagnetic resonance imaging of a mouse tumor-bearing leg, *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, Vol. 65, No. 5, pp. 1124–1132 (2018), doi:10.1109/TBME.2017.2743232.

◆ 国際学会における発表

1. **R. Nakaoka** and H. Hirata. EPR based pH measurements using multiple harmonic detections, Joint conference of 22nd International Society of Magnetic Resonance Conference, the 9th Asia-Pacific NMR Symposium, the 60th Annual Meeting of the Nuclear Magnetic Resonance Society of Japan (2021), and the 60th Annual Meeting of the Society of Electron Spin Science and Technology, Poster number P1-6-17, Online (Aug. 2021). (Poster presentation)

◆ 国内学会における発表

1. 中岡梨々子, 平田拓, マルチハーモニックデジタル位相検波法による 750

MHz EPR 分光装置の高感度化, 第 59 回電子スピンサイエンス学会年会, 17, オンライン, 2020 年 11 月 (口頭発表)

2. 中岡梨々子, 平田拓, EPR 分光のための 750 MHz チューナブル共振器雑音特性の解明, 第 58 回電子スピンサイエンス学会年会, P252, 川崎市コンベンションホール, 2019 年 11 月. (ポスター発表)
3. 中岡梨々子, 松元慎吾, 平田拓, 750 MHz チューナブル共振器における信号対雑音比最大化に関する検討, 第 57 回電子スピンサイエンス学会年会, P-39, 北海道大学, 2018 年 11 月. (ポスター発表)
4. 中岡梨々子, 平田拓, 腫瘍モデルマウス用 750 MHz チューナブル共振器の最適設計, 第 56 回電子スピンサイエンス学会年会, PS64, 東京工業大学, 2017 年 11 月. (ポスター発表)

◆ シンポジウム発表

1. **R. Nakaoka** & H. Hirata, Noise characteristics of a 750-MHz electronically tunable resonator for electron paramagnetic resonance spectroscopy, Hokkaido University–Seoul National University Joint Symposium 2019 International Workshop on New Frontiers in Convergence Science and Technology, Poster No. 6, Seoul National University (Nov. 2019). (Poster presentation)
2. **R. Nakaoka** & H. Hirata, Sensitivity improvement of a 750-MHz Electronically Tunable EPR Resonator, Hokkaido University–Seoul National University Joint Symposium: 2018 International Workshop on New Frontiers in Convergence Science and Technology, Poster No. 17, Hokkaido University (Nov. 2018). (Poster presentation)

◆ 受賞歴

1. ISMAR-APNMR-NMRSJ-SEST 2021, The International EPR (ESR) Society,
Student Poster Award (2021/8/27)
2. 第 60 回電子スピンサイエンス学会年会 優秀発表賞 (2021/8/27)
3. 第 58 回電子スピンサイエンス学会年会 優秀ポスター賞 (2019/11/7)
4. 北海道大学大学院 情報科学研究科 生命人間情報科学専攻 修士課程 三上
奨学賞 (2018/3/25)

◆ スカラーシップ

1. 公益財団法人クロサワ育成財団奨学金 (2019/4 – 2020/10)
2. 公益財団法人中谷医工計測技術振興財団大学院生奨学金 (2020/10 –
2022/3)
3. 日本学術振興会 特別研究員 DC2 (2021/4 – 2022/3)
4. 湯川記念財団 望月基金 (2021/8)