

重水素磁気共鳴を用いた脳血流量測定法の開発に 関する基礎的検討—第1報

吉澤 卓¹, 恵良田知樹²
本間一弘³, 兵頭明夫¹, 能勢忠男¹

¹筑波大学臨床医学系
²筑波大学理工学系
³機械技術研究所

はじめに

核磁気共鳴法(以下 NMR)は、高エネルギーリン酸化合物などの組織代謝産物を生体内情報として測定し得るので、脳の虚血病態を *in vivo* で観測する方法として期待されている^{1)~3)}。中枢神経系疾患で最も多い虚血性脳血管障害では、脳の組織血流量が病態評価の基本的パラメーターである⁴⁾。脳血流量と NMR で観察できる脳組織代謝産物との比較が最近試みられているが、脳血流量は NMR 装置外で別個に測定せざるを得ないのが現状である³⁾。しかし、同一個体でほぼ

同時に測定することが望ましいので、重水を組織血流量測定の際の標識とする試み^{5),6)}を応用し、NMR 装置内での脳血流量測定に重水素 NMR を用い得るかについて検討した。

方 法

1) NMR による重水素量測定
NMR 用重水 (99.75 % 以上) (和光純薬株) を蒸留水で希釈した 1.0 % 体積濃度検体とこれを 3 段階に 1/2 希釈したもの及び生理食塩水との 5 検体を用意し、各 0.2 ml を径 5 mm NMR サンプル管 (日本精密科学株) に封入した。測定

キーワード brain blood flow, deuterium, heavy water, magnetic resonance, rat

機器は西独ブルッカー社（日本ブルッカー(株)）製分析用 NMR 装置 MSL 400 (外部磁場 9.4 テスラ, 重水素共鳴周波数 61.4 MHz) を用い, 90 度パルスから得られる重水素スペクトル (反復時間は 2.5 秒, 4 回加算平均) の積分値と検体重水含有量とを比較した。

2) 生体組織検体内の重水素測定

ネプタール麻酔 (0.25 mg/kg, i.p. 投与) ウィスター系ラット (300~400 g, n=5) に重水 (10 ml/kg) を腹腔内投与し, 2 分毎に 10 分まで, および 20 分後に, 各 0.2 ml ずつ動脈採血し, 動脈血中の重水素信号量を前述の方法で測定し, 血中重水素量を求めた。また, 同様のラットを, 同じ時間経過で断頭, 脳及び側頭筋組織を採取し, 計量, 径 10 mm NMR サンプル管*2 に入れ, 組織片中重水素量を求めた。

3) 生体内重水素量の非侵襲的測定

サーフェスコイルの作製は Gonnella らの方法^{7),8)} に従い, 銅線 (#24) を水素 100 MHz 用に 2 回, 重水素 15 MHz 用に 5 回巻き (内径 10 mm, 外径 14 mm), 可変コンデンサー (Voltronics Corp. V 2153) を組み, ¹H/²D 両用とした。測定機器は西独ブルッカー社製 BMT 24/40 と MSL 400 用のプログラム DIS-MSL とを用いた。方法 2) と同じ準備をしたラット頭皮上 (脳の直上) にコイルを固定した。このコイルで高周波パルスを送受信し, プロトンの画像を構成, 本機付属の内径 25 cm 画像用コイルで作製した画像と重複し, 脳が関心領域内にあることを確認した。

重水 (10 ml/kg) を腹腔内投与 (n=5) し, 重水素の 90 度パルスを用い, 全経過 2.5 秒の信号採取を 4 回加算, 30 秒の間隔で経時的に反復,

50 分間経時的に信号採取した。採取したデータは DISML の S IMFI プログラムで下記の (4), (5) に近似計算させ, 時定数を求めた。

組織血流量の算定は, Kety ら⁹⁾ が笑気を標識物質として脳組織血流量を測定 (Height over area 法) し得た方法に従う。これは, 動脈血から血管外腔への標識拡散を一様とし, 両者の標識濃度の時間的変化の差異から動脈血の組織灌流量を求めるものである。組織血流量 F , 時間 t での動脈血中の標識物質濃度 $f_a(t)$, 対象組織での標識物質濃度 $f_b(t)$, 血液組織分配係数 λ とし, 時間: T 後に平衡に達したとすると,

$$1/F = \int_0^T \lambda f_a(t) dt - \int_0^T f_b(t) dt / f_b(T) \quad (1)$$

$$\lambda f_a(T) = f_b(T) \quad (2)$$

$$\text{ここで, } I_a = f_a(T), I_b = f_b(T) \quad (3)$$

とすると,

$$f_a(t) = I_a (1 - \text{Exp}(-t/Tc_a)) \quad (4)$$

$$f_b(t) = I_b (1 - \text{Exp}(-t/Tc_b)) \quad (5)$$

と近似⁹⁾ できる。 $\lambda = 1$ のときには,

$$1/F = Tc_b - Tc_a \quad (6)$$

したがって, 時定数 (Tc) の差の逆数で血流量が与えられる。

結 果

1) NMR による重水素量測定結果

希釈重水 (1.0%) の重水素信号の積分値を 100 としたとき % 濃度 C と信号量 I とは正の相関 ($I = 0.72 C + 101.4$, 相関係数 0.999) を示した。同一検体 (n=5) の測定誤差は, 標準偏差で 6.2, 同一濃度検体 (n=5) では 4.8 であった。

2) 組織検体内の重水素測定結果

重水を腹腔内投与したとき, 血中濃度は経時

Fig. 1

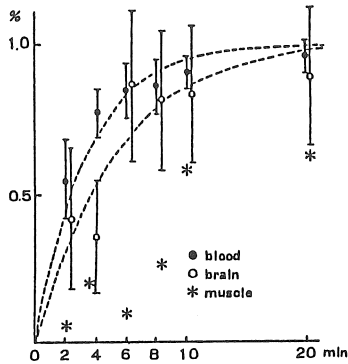


Fig. 1 10 ml/kg の重水を腹腔内投与したときの血中濃度(容積%; closed circle, これに付属する直線はその標準偏差)の経時的变化を指数回帰近似計算して得られた時定数 3.4 分. 脳 (open circle) と筋 (asterisk) の組織濃度(重量%) の経時的变化は, 各時点で採取した組織片の重水素含量(脳のみ, その標準偏差を図示)で血管内遺残血中の重水も含む.

Fig. 2

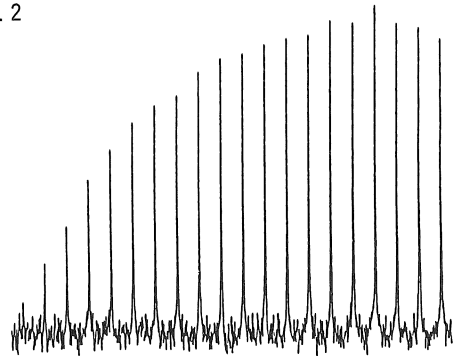


Fig. 3

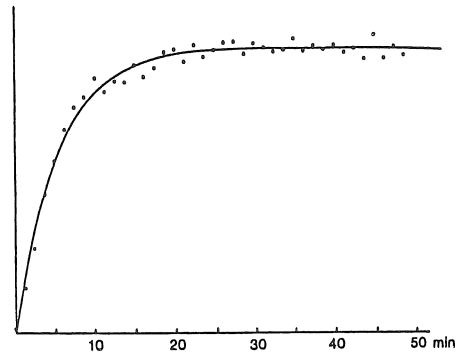


Fig. 2 重水腹腔内投与後のラット頭部での重水素 NMR スペクトルを経時的に示す. 1 回の採取は, 10 秒, 間隔 30 秒である.

Fig. 3 重水素 NMR スペクトルの積分値の経時的变化を示す. Fig. 1-a で見た脳組織片の重水素濃度の変化と比較して, 明らかに安定した変化を示す. この変化の時定数は 4.6 分であった. 腹腔内投与された重水が脳に入る様子を in vivo NMR で観測し得た.

係数 $\lambda = 1.0$ を得た. なお側頭筋では時定数が 20 分となった.

3) 体内重水素量の経時的变化

重水投与後, 重水素の信号は数分間漸次増加 (Fig. 2, Fig. 3) の後, 一定となる. 時定数 (T_{c_b}) は 4.6 分 (SD=0.7 分, n=5) であった. 一般に脳組織血流量は白質と灰白質とに分けられる⁴⁾ ことから, 2 成分への分離を試みたが, 早期成分は平均 4.6 分 (SD=0.7 分, n=5) で増加, 第 2 成分は, 平均 3.4 日 (SD=3.8 日, n=5) での減少となり, 分けることはできなかった.

的に上昇し, その後一定となった (Fig. 1). その時定数 (T_{c_a}) は 3.4 分であった. 脳の組織片中の濃度も漸次増加, 各点の誤差は血液標本に比して大きかったが, 時定数 (T_{c_b}) 5.2 分を得た. 各近似計算上の $f_a(T)$, $f_b(T)$ の比から分配

考 察

重水を標識物質とした生体内水代謝の研究報

報告がある^{10)~14)}、これは質量分析機を用いた解析であり、重水を含む生体からのサンプルを *in vitro* NMR で計測する試みは初めてであろう。今回の結果から、生体系に入った重水が NMR でも容易に測定できることが明らかになった。同一検体での測定誤差が 6.2% であったが、加算回数 4 回であり、さらに精度を高めることも可能であると考えられる。しかし、生体内での重水の動態把握には十分であると思われる。

一般に、指数関数的変化を捉える場合、測定系の時間分解能は、その時定数の少なくとも数分の一であることが必要である。腹腔内投与された重水が動脈血を介し、脳へ拡散する過程は、実験 2) から時定数 3.4 分と速やかな変化であったので、NMR で脳血流量を測定する場合、その時間分解能は 2 分以下がよいと考え、実験 3) を行った。重水素信号量の時間変化は指数関数 (6) によく近似できた。二成分に分ける試みでは第 2 成分の時定数が実験系に比して長く、第一成分のみを扱うのが適当である。また、これは脳からの信号量が一律の増加後、ほぼ一定していることを示している。重水は体液中に DHO の形で吸収され、排泄は体液の水代謝の一部となるため、飽和後の血中濃度は比較的安定 (排泄の半減期は成人で 4.5~9.5 日) している^{12)~14)} ためである。

なお、実験 2) で組織検体の結果は血液検体に比して誤差が大きい、この差は血液が同一個体からの連続採取であるのに対し、組織片は 1 個体 1 検体の不連続採取であることに起因すると思われる。しかし、動態の違いを評価するには十分利用できた。側頭筋の時定数は脳よりも長く、血流量は脳の約 1/10 と推定され、これも妥当な値⁶⁾ であった。

実験 2) の結果の動脈血中濃度変化と実験 3) の結果とから与えられる脳血流量は 81 ml/100 g brain min であった。これは脳血流量として了解できる値¹⁵⁾ であり、実験 3) の結果に測定法と

しての可能性を認めた。従って今後は各個体での動脈血中濃度の変化をも同時に求め、測定法として確立する必要がある。

NMR での脳血流量測定には、猫を対象とした trifluoromethane 吸入法の報告¹⁶⁾ があるが、吸入ガスの麻酔効果が高濃度であることなどの問題があり、むしろ重水のほうが有利と考える。Ackerman ら^{5),6)} は、動物の筋などに重水を局所注入し、その上のサーフェスコイルで重水素の NMR 信号の減衰から組織血流量を求めた。これは脳にそのまま応用できない。Muller ら¹⁷⁾ はラット脳で重水素画像を作製、その利用法として、重水を腹腔内投与した後の連続的重水素画像から脳の信号量の増加の時定数を示した。しかし、重水の動態がこれよりも早いことを我々の結果は示す。組織血流量を見るには、実験 2) のような標識物質動態の予備解析を踏まえて計画することが必要であった。なお、重水の組織分配係数は実験 2) から 1.0 とした。重水の組織分配係数に関する検討はまだなく、参考までに水では 0.85~0.95^{18),19)} とされる。

標識物質として、重水の利点は^{6),17)}、生体内の水の動きを追跡できる点である。本報告は生体内でこれを観察できることを示した。ただ、欠点として留意すべきは、後述の毒性の他に、重水素の NMR 信号強度が水素の 0.965% と小さいことで、今回の検討では 10 ml/kg 投与とした。投与量が多いと、水の大量投与同様の右心負荷や利尿効果をといた問題が考えられたからである。重水の毒性は、慢性実験で体重の 30% まで水と置換可能であるが雄ラットに不妊をみる²⁰⁾。急性変化は内耳障害で、100 g 重水飲用の成人に眼振を認めることがある²¹⁾ が、50% 重水を 100 ml 内服させても何ら問題はない¹⁰⁾、という。この量の重水素は脳への移行をサーフェスコイルで捉え得ると推定している。また、滲出液への重水の移行を観察できることも認めており、眼球内水代謝や浮腫形成過程など、従来の方法で

は評価の難しかったところにも適応が考えられる。

ま と め

生体内重水素 NMR の利用した脳血流量測定に関する基礎的検討を行った。その結果、ラットで脳血流量を測定できると考えられた。投与方法や情報の採取法をさらに検討するとともに血中濃度変化を同時に捉える方法を開発する必要性を認めた。

謝辞：本研究の主旨をご評価下さいました、京都府立医科大学堀川義治先生、ならびに国立予防衛生研究所加藤賢三先生に感謝致します。本研究は、筑波大学特別プロジェクト「代謝」および昭和 63 年度筑波大学学内プロジェクトの援助による。本論文の要旨は第 14 回日本核磁気共鳴医学会大会、於東京、1989 年 9 月、で発表した。

文 献

- 1) Gadian DG, Frackowick RSJ, Crokard A et al.: Acute cerebral ischemia: Concurrent changes in cerebral blood flow, energy metabolites, pH, and ^{31}P and ^1H nuclear magnetic resonance spectroscopy. 1. Methodology, *J Cereb Blood Flow Metab* 7: 199-206, 1987
- 2) Germano BM, Pitts LH, Berry I et al.: Magnetic resonance imaging and ^{31}P magnetic resonance spectroscopy for evaluating focal cerebral ischemia. *J Neurosurg* 70: 612-618, 1989
- 3) Narutomi H, Sasaki M, Kanashiro M, Kitani M, Sawada T: Flow thresholds for cerebral energy disturbance and pump failure as studied by in vivo ^{31}P and ^{23}Na nuclear magnetic resonance spectroscopy. *J Cereb Blood Flow Metab* 8: 16-23, 1988
- 4) Fieschi C, Lanzi GL: Cerebral blood flow and metabolism in stroke patients. In: Ross Russel RW (eds) *The vascular disease of the central nervous system*. Churchill Livingstone London 1983
- 5) Ewy CS, Babcock EE, Ackerman JJH: Deuterium nuclear magnetic resonance spin-imaging of D_2O : A potential exogenous MRI label. *Magn Reson Imag* 4: 407-411, 1986
- 6) Ackerman JJH, Ewy CS, Kim SG: Deuterium magnetic resonance in vivo: The measurement of blood flow and tissue perfusion. *Ann NY Acad Sci* 508: 89-98, 1987
- 7) Rajan SS, Wehrle JP, Glickson JD: A novel double-tuned circuit for in vivo NMR. *J Magn Reson* 74: 147-154, 1987
- 8) Gonnella NC, Silverman RF: Design and Construction of a simple double-tuned, single-input surface-coil probe. *J Magn Reson* 85: 24-34, 1989
- 9) Kety SS, Schmidt CF: The nitrous oxide method for the quantitative determination of cerebral blood flow in man: Theory, procedure and normal values. *J Clin Invest* 27: 476-483, 1948
- 10) Moore FD: Determination of total body water and solids with isotopes. *Science* 104: 157-160, 1946
- 11) London IM, Ritterberg D: Deuterium studies in normal man. *J Biol Chem* 184: 687-691, 1950
- 12) Shloerb PR, Fitzpatrick GF, Edelmann IS et al.: The measurement of total body water in the human subject by deuterium oxide dilution with a consideration of the dynamics of the deuterium distribution. *J Clin Invest* 29: 1296-1310, 1950
- 13) 平野修助, 太田庸起子: 重水を用いた病態時の水分代謝に関する研究. 国立公害研究所研究報告 84: 243-252, 1985
- 14) 金子佳代子, 加藤有美子, 小池五郎: 重水による体水分量の測定. 日本栄養食糧学会誌 38: 97-100, 1985
- 15) Haining JL, Turner MD, Pantall RM: Local cerebral blood flow in young and old rats during hypoxia and hypercapnia. *Am J Physiol* 218: 1020-1024, 1970
- 16) Barranco D, Sutton LN, Florin S et al.: Use of

- ¹⁹F NMR spectroscopy for measurement of cerebral blood flow: A comparative study using microspheres. *J Cereb Blood Flow Metab* 886-891, 1989
- 17) Müller S, Seelig J: In vivo NMR imaging of deuterium. *J Magn Reson* 72: 456-466, 1987
- 18) Eichling JO, Raichele ME, Grubb RLJ et al.: Evidence of the limitation of water as a freely diffusible tracer in brain of the rhesus monkey. *Circ Res* 35: 358-364, 1974
- 19) Herscovitch P, Raichle ME: What is the correct value for the brain-blood partition coefficient for water? *J Cereb Blood Flow Metab* 5: 65-69, 1985
- 20) Peng SK, Ho KJ, Taylor CB: Biologic effects prolonged exposure to deuterium oxide. *Arch Path* 94: 81-89, 1972
- 21) Money KE, Myles WS: Heavy Water nystagmus and effects of alcohol. *Nature* 247: 404-405, 1974

A Study on the Brain Blood Flow Measuring Method Employing the Deuterium NMR : The First Report

TAKASHI YOSHIKAWA,¹ TOMOKI ERATA²
KAZUHIRO HOMMA,³ AKIO HYODO¹
TADAONOSE¹

¹*The Institutes of Clinical Medicine, University of Tsukuba
Tsukuba-shi, Ibaraki-pref. 305*

²*The Institute of Applied Physics, University of Tsukuba*

³*The Mechanical Engineering Laboratory*

Deuterium magnetic resonance was applied to the measurement of brain blood flow in rats. The concentration of deuterium in the arterial blood following intra-peritoneally administered heavy water was estimated by the integrals of deuterium magnetic resonance spectra of arterially collected blood ; this study revealed a mono-exponential increase in time course, of which the time constant was 3.4 min. in cases where 10 ml/kg heavy water was given. The concentrations of deuterium in the brain and the temporal muscle tissue could also be estimated that made to determine the data sampling time in the following study. A 1 cm in diameter home-made deuterium/proton double-tuned surface coil was applied to the head of each rat ; results exhibited a similar exponential increase of deuterium spectra and the time constant was 4.6 min. that could be calculated to the cerebral blood flow of 83 ml/100 g brain per min.. In this paper the authors pointed out the value of deuterium magnetic resonance in a non-invasive method to evaluate the in-vivo physiology such as the measurement of cerebral blood flow in rats.