

¹H-NMR スペクトロスコピーによる脳腫瘍診断の試み

吉田雄樹¹, 吉岡芳親¹, 安田直毅¹, 斉木 巖²,
金谷春之²

¹岩手医科大学第2生理 ²同 脳神経外科

序

³¹P-MRS, ¹H-MRS を用いて脳腫瘍の診断を非侵襲的に行う試みや基礎実験が為されて^{1)~6)}, 指標となり得る物質が検討されているが, まだ, 十分に定量化出来ていない. そこで我々は, 基礎データを得る目的で, より多くの情報を与えてくれると考えられる¹H-MRS を選び, また, 摘出脳組織を抽出処理し, MRS 測定 of 分解能及び感度を高めた *in vitro* の系で解析してきた. その結果, NMR スペクトル上に現われる物質の, 相互のピーク面積比, 即ち各物質の相対的含量比が, 各種脳腫瘍において特徴的な傾向を示す事が解り, NMR による脳腫瘍の診断の可能性を示すことができた. 更に我々は, 多変量解析法の, 一手法である判別分析法を用い, NMR の脳腫瘍の鑑別診断における実用性につき, より, 定量化して検討した.

方 法

標本は, 本学付属病院において頭蓋内腫瘍摘出術により摘出した脳腫瘍組織である. 対照には, glioma の症例において, 減圧をも目的とした広範切除により得られた正常大脳皮質を用い

た. いずれの例も放射線及び化学療法は行っていない. 症例の内訳は表1に示した. 摘出組織は, 直ちに抽出処理するか, もしくは, ドライアイス中 (-78°C) で凍結させ, そのまま保存し, 10 日以内に抽出処理した. 抽出には, 摘出組織より, 血腫や壊死組織を肉眼的に除いた, 湿重量 80-500 mg の組織片を用い, Folch 法⁷⁾を参考にして処理した. Folch 法は, 本来, 脂質を抽出するために考案された手法であるが, *in vivo* NMR において観測される低分子有機化合物を, 水溶性分画として, 加水分解や, 酸化をさせることなく抽出でき, 処理法として適切であるので用いた. 水溶性分画を 48 時間凍結乾

表1. 実験に用いた脳組織の組織型とその症例数. どの例も放射線療法や化学療法は行っていない.

組 織 型	症例数
正常 frontal cortex	6
腫瘍	
low grade astrocytoma	5
glioblastoma	7
ependymoma	3
meningioma	12
neurinoma	7
pituitary adenoma	3
metastatic tumor	3

キーワード magnetic resonance spectroscopy, brain tumor, differential diagnosis, discriminant analysis, *in vitro*

燥した後、重水 0.3 ml に再溶解させ、スペクトルの測定を行った。使用した装置は、Bruker 社 WP-80SY-WG, 1.9T であり、5 mm 試料管を用いて、 $30.0 \pm 0.5^\circ\text{C}$ で測定した。観測周波数 80 MHz, 90° パルスを用い、繰り返し時間は、我々

の注目する物質が、十分に緩和していると考えられる時間として、14.1 s とした。積算回数は 128 回であった。スペクトルの帰属は、文献^{9)~10)}を参照するとともに、純物質のスペクトルとの比較を行い、更に、純物質を、試料に添加する

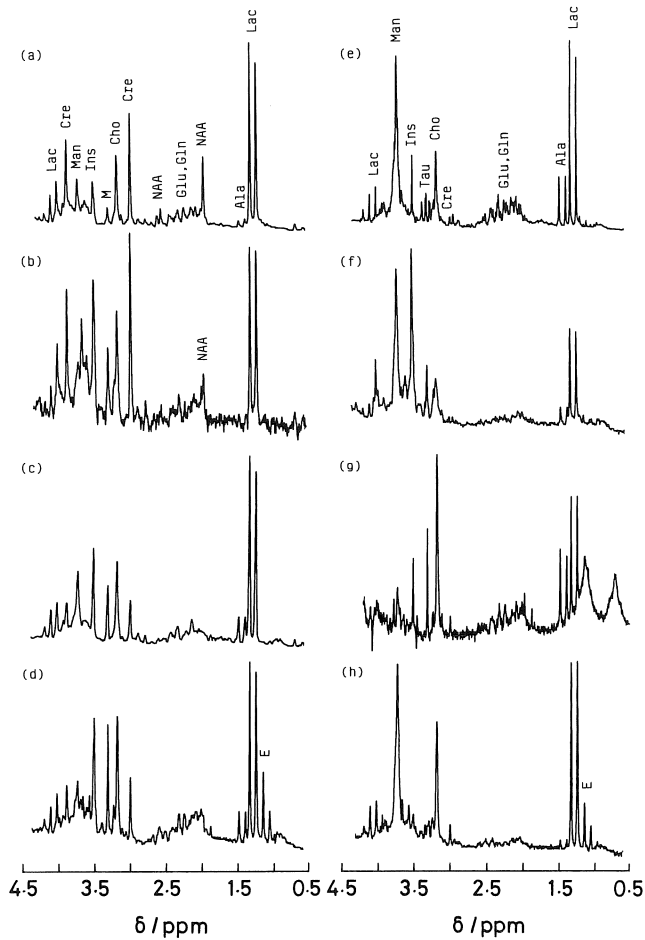


図 1. 正常脳組織および各種腫瘍組織の ^1H -NMR スペクトル. (a) : normal frontal cortex, (b) : low grade astrocytoma, (c) : glioblastoma, (d) : ependymoma, (e) : meningioma, (f) : neurinoma, (g) : pituitary adenoma, (h) : metastatic tumor. 化学シフト値は DSS を基準とした。図中の略号は、以下の物質を示している。E : エタノール, Lac : 乳酸, Ala : アラニン, NAA : N-アセチルアスパラギン酸, Glu : グルタミン酸, Gln : グルタミン, Cre : クレアチン, Cho : コリン, M : メタノール, Tau : タウリン, Ins : イノシトール, Man : マニトール。エタノールとメタノールは、抽出溶媒由来であり、マニトールは、手術時に患者の脳圧降下の為に投与された。

1991年3月13日受理 1991年5月7日改訂
別刷請求先 〒020 盛岡市内丸19番1号 岩手医科大学医学部第2生理 吉岡芳親

ことによって、行った。スペクトルより得られる情報としての各代謝物質の濃度に対応するピーク面積を、変数として、解析を行った。データの統計処理として、有意差検定には二標本t検定を、また、鑑別診断の的中率を求めるのには判別分析を用いた。

結 果

図1に正常脳組織及び各種腫瘍組織よりえられたスペクトルを示した。今回使用した装置では、スペクトル上、クレアチン、ホスホクレアチン、クレアチニンを識別できないので、便宜上、まとめてクレアチンとした。また、コリン、

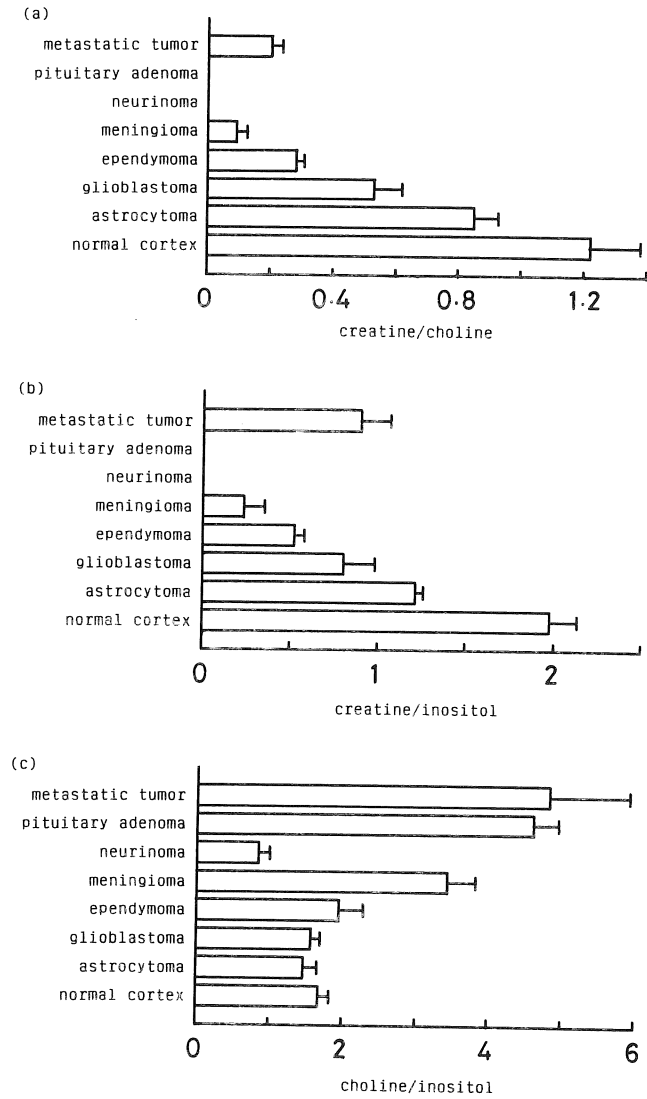


図2. 各組織における、クレアチン/コリン、クレアチン/イノシトール、コリン/イノシトールのピーク面積比。値は、mean+SEで示した。

ホスホリールコリンについても、同様の理由から、まとめてコリンとした。3.7 ppmに認められるピークは、術中に用いたモニターに由来すると思われる。また、3.3 ppmと1.1 ppmに現れるピークは、抽出溶媒中のメタノールとエタノールに由来すると考えられる。正常脳や脳腫瘍の *in vivo* NMR スペクトロスコピーに於いて、定量化の為のピークの面積計算などが比較的容易で注目されてきた物質は、乳酸、NAA (N-acetylaspartate), クレアチン, コリン, イノシトールである^{1),3)-6),11),12)}。これらの物質について、診断に有用かどうか、まず検討してみた。乳酸は、我々の標本が、摘出組織であるため、解糖の影響を受け易く、*in vivo* の状態を反映させる事が難しいので除いた。NAA は、図1 (a) の正常組織では、大きく認められたが、腫瘍組織では、図1 (b) のように、glioma のうちの数例に、少量認められたのみであり、ほかの腫瘍には認められなかった。そのピークに注目するだけで、正常と腫瘍はある程度識別できるが、各種腫瘍間の識別には使えない。残りの、イノシトール, コリン, クレアチンは、脳腫瘍全般に存在し、鑑別診断のパラメーターとして適当であると考えた。また、*in vitro* NMR スペクトロスコピーにおいては、絶対量を求めるのは比較的容易であるが、*in vivo* では難しく、単一

スペクトル上での相対量の比較が最も実用的である。そこで、我々は、今までも³¹P-MRS で良く用いられてきたように、ピーク面積比を用いることにした。すなわち、コリン/イノシトール, クレアチン/イノシトール, クレアチン/コリンのピーク面積比である。今回は、これらの3つの面積比を変数として、識別や診断が出来るかどうかを検討した。まず、ピーク面積比の平均値を図2に示した。次に、各組織間で、有意差検定を行った。表2に示したように、ほとんどの組合せにおいて有意差があり、各種腫瘍の特徴を表す事が出来た。更に、1変数で有意差がなくても、ほかの変数で有意差を認める場合があり、考慮する変数を多くすることにより識別力が増す事が解る。3つの変数の何れでも有意差がなかったのは、ependy-moma と metastatic tumor の組合せのみであった。次に、まだ例数は少ないが、これらの指標が脳腫瘍の実際の診断上どの程度有用かについて、とりわけ、臨床上で鑑別診断が問題となり易い場合を想定し、判別分析法を用いて検討した。その結果を表3に示した。まず、glioma系腫瘍の low grade astrocytoma, glioblastoma, ependymoma に関しては、1変数を使ったときには、クレアチン/イノシトール比を用いたときの的中率が良く、73%であった。変数を2つにすると、クレアチ

表2. 各組織間における有意差検定の結果。検定には、クレアチン/コリン, クレアチン/イノシトール, コリン/イノシトールのピーク面積比を変数とした、2標本t検定を用いた。

	r/h r/n h/n	r/h r/n h/n	r/h r/n h/n	r/h r/n h/n	r/h r/n h/n	r/h r/n h/n	r/h r/n h/n
normal cortex	ns ** ns	** *** ns	** *** ns	*** *** **	*** *** **	** *** *	** ** **
astrocytoma	* ** ns	** *** ns	*** *** **	*** *** *	*** *** **	*** *** **	*** ns **
		* * ns	** ** **	*** *** **	** ** **	** ns **	** ns **
glioblastoma			** * *	*** *** ns	*** *** **	ns ns ns	ns ns ns
				ns ns ***	ns ns *	ns * ns	ns * ns
ependymoma					ns ns **	*** *** **	*** *** **
meningioma						pituitary	** ** ns
neurinoma						adenoma	
							metastatic tumor

r/h: creatine/choline ratio
 r/n: creatine/inositol ratio
 h/n: choline/inositol ratio
 ***: P<0.001
 **: P<0.01
 *: P<0.05
 ns: not significant

ン/イノシトールとコリン/イノシトールの比を用いた時の的中率が良く、80%であった。この腫瘍群の場合、もう1つの比を加えても的中率は上がらなかった。上記2つの比を使った時の判別分析の結果を図3に示した。low grade astrocytoma と ependymoma は十分に識別できるが、7例の glioblastoma のうち、2例は low grade astrocytoma との識別が困難であり、1例は ependymoma との識別が困難であった。次に、小脳橋角部に発生したときに鑑別が問題となる事のある、meningioma と neurinoma では、1変数では、コリン/イノシトール比が有効で、的中率は95%であった。2変数では、クレアチン/イノシトールとコリン/イノシトールの比を用いると、100%的中率が得られた。図4に示した如く、この両者は良く分離しており、十分に識別できると考えられた。

考 察

表3. 判別分析による鑑別診断的中率. 変数として、クレアチン/コリン, クレアチン/イノシトール, コリン/イノシトールのピーク面積比を用いた. 変数が1つのときおよび2つのときの的中率を示した。

面積比	腫瘍群	
	astrocytoma glioblastoma ependymoma	meningioma neurinoma
creatine/choline	53%	54%
creatine/inositol	73%	54%
choline/inositol	40%	95%
creatine/choline creatine/inositol	73%	58%
creatine/choline choline/inositol	67%	95%
creatine/inositol choline/inositol	80%	100%

現在, *in vivo* ¹H-MRS により、ヒトの正常脳組織や脳腫瘍組織から、ピークの分離やS/Nの良いスペクトルが得られつつあり^{3)-6),11),12)}、病

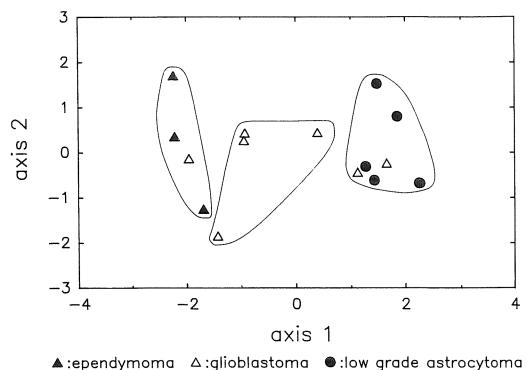


図3. glioma系腫瘍の判別得点の分布. 判別分析には、クレアチン/イノシトール, コリン/イノシトールの2つのピーク面積比を用いた. 横軸および縦軸は、判別分析によって得られる、D1軸とD2軸である. 的中率は、80%であった. 判別分析によって同一グループに属すと見なされた症例群を、見易くするために、線で囲んだ。

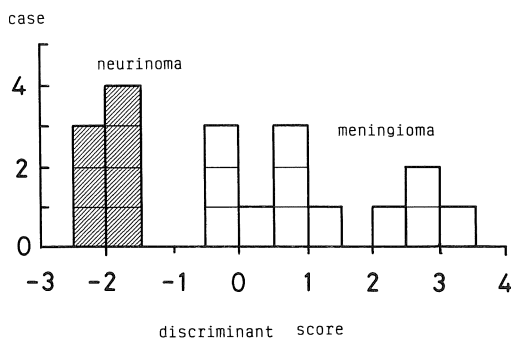


図4. neurinoma と meningioma の判別得点の分布. クレアチン/イノシトール, コリン/イノシトールの2つのピーク面積比を使った判別分析の結果であり、横軸に判別得点、縦軸に症例数を示した. 判別分析による的中率は、100%であった。

態の把握や診断と結び付けるため、NAAと乳酸の相対比に注目したり、また、絶対量を求めて指標とする試みも成されているが、我々は、現段階では、先ず、基礎データが必要であると考え、分解能及び感度の高い *in vitro* の系を採用し検討した。また、*in vitro* ではあるが、*in vivo* での測定を考慮して、NMR スペクトルの処理法や指標となる変数の決定を行った。その結果、*in vivo* でも観測しやすいピークである、クレアチン、コリン、イノシトールの3物質のピーク面積に注目すれば、鑑別診断も可能であること、また、*in vivo* での計測に都合よく、絶対量は必要なく、相対比を用いれば良いことが解った。鑑別診断や組織の識別を行うための統計処理としては、多変量解析の中の、判別分析を用いることができ、使用する変数をよりふやしたほうが良いことが解った。実際の診断に応用する場合には、判別分析によって既知のデータを解析し、マップを作っておく。そして、未知の組織がそのマップ上のどこに来るかで識別すれば良く、非常に簡単なパターン認識法である。判別分析は、個々の変数では識別が難しいときに、同時に多変数を用いて、すなわち、多くの情報を一度に用いて識別を行うことができる手法であり、識別力、もしくは、精度を上げることができる。また、同時に、識別的中率や、誤識別の確率も算出できる。多変数を用いた解析は、近年医学方面でも診断や予測に使われて来ており¹³⁾、NMR 医学の分野でも1990年になり、Morvanら¹⁴⁾やSlettenら¹⁵⁾により多変量解析法が導入され、病態と結び付ける試みが為されており、今後の、NMRを用いた識別や診断にはたず役割は大きいと考えられる。我々は、上記3物質の面積比しか使わなかったが、このほかに、*in vivo* で測定できる、他のピークを加えたり、緩和時間やpHなども、変数として加えることができるので、識別力を更に高めることができると考えられる。また、*in vivo* では、エコーを用いたり、さまざまなパルスシーケンスを用いて、スペクトルを得ており、このスペクトル

上には、既に、各種物質の緩和時間の情報が盛り込まれている。よって、このスペクトルより得られる面積比は、我々が *in vitro* で得た面積比よりも更に良い識別力を持った変数となる可能性があり、この方面でのデータの蓄積が待たれる。ただし、磁場強度や、パルスシーケンス等の測定条件は、規格化、もしくは、同一にする必要がある。大まかには、現在イメージングで使われている、 T_1 もしくは T_2 強調画像に対して、 T_1 もしくは T_2 強調スペクトルとして、解析すれば良いと考えている。

物質に注目するという意味では、現在は、腫瘍に特有の酵素やホルモンなどの微量物質を探し腫瘍マーカーとしているが、我々が指標としたのは、どの組織にもかなりの量で存在しているクレアチン、コリン、イノシトールであり、特異性を欠いているようにも見える。しかしながら、我々の手法に於いて、各種脳腫瘍に有意差が認められ、鑑別診断においても有用であった。

我々は、病理組織診断の結果とNMRスペクトロスコーピーによるデータを結び付ける事に主眼を置いたが、病理組織診断とNMRによる診断は、指標が、それぞれ、形態と代謝物質の量というように、異なっている。しかし、我々が注目した物質により識別がある程度可能であったという事からすると、腫瘍の特異性が、代謝物質から、ある程度推測できると考えられる。

また、NMRでは、緩和時間や線幅により、存在状態を反映した情報も得られるので、我々が行ったような判別分析に、それらを変数として導入すれば、更に微妙な生体組織の状態もしくは病態をNMRの方から知る事が出来ると考えている。

本論文の一部は第16回日本磁気共鳴医学会大会において発表した。

文 献

- 1) C. Tanaka, S. Naruse, Y. Horikawa, et al. : Proton nuclear magnetic resonance spectra of brain tumors. *Magn Reson Imaging* 4 : 503-508, 1986.
- 2) W. Heindel, J. Bunke, S. Glathe, et al. : Combined ¹H-MR imaging and localized ³¹P-spectroscopy of intracranial tumors in 43 patients. *J Comput Assist Tomogr* , 12 : 907-916, 1988.
- 3) H. Bruhn, J. Frahm, M. L. Gyngell, et al. : Noninvasive differentiation of tumors with use of localized H-1 MR spectroscopy *in vivo* : Initial experience in patients with cerebral tumors. *Radiology*, 172 : 541-548, 1989.
- 4) J. H. Langkowski, J. Wieland, H. Bomsdorf, et al. : Preoperative localized *in vivo* proton spectroscopy in cerebral tumors at 4.0 tesla-First results. *Magn Reson Imaging* 7 : 547-555, 1989.
- 5) C. M. Segebarth, D. F. Balériaux, P. R. Luyten, et al. : Detection of metabolic heterogeneity of human intracranial tumors *in vivo* by ¹H NMR spectroscopic imaging. *Magn Reson Med* , 13 : 62-76, 1990.
- 6) S. S. Gill, D. G. T. Thomas, N. Van Bruggen, et al. : Proton MR spectroscopy of intracranial tumours : *in vivo* and *in vitro* studies. *J Comput Assist Tomogr* , 14 : 497-504, 1990.
- 7) J. Folch, M. Lees. and G. H. S. Stanley : A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J. Biol. Chem*, 266 : 497-509, 1957.
- 8) K. L. Behar, J. A. Den Hollander, M. E. Stromski, et al. : High-resolution ¹H nuclear magnetic resonance study of cerebral hypoxia *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 80 : 4945-4948, 1983.
- 9) T. W. M. Fan, R. M. Higashi, A. N. Lane, et al.: Combined use of ¹H-NMR and GC-MS for metabolite monitoring and *in vivo* ¹H-NMR assignments. *Biochim Biophys Acta*, 882 : 154-167, 1986.
- 10) O. A. C. Petroff, D. D. Spencer, J. R. Alger, et al.: High-field proton magnetic resonance spectroscopy of human cerebrum obtained during surgery for epilepsy. *Neurology*, 39 : 1197-1202, 1989.
- 11) C. C. Hanstock, D. L. Rothman, J. W. Prichard, et al. : Spatially localized ¹H NMR spectra of metabolites in the human brain. *Proc Natl Acad Sci USA*, 85 : 1821-1825, 1988.
- 12) W. I. Jung, W. Grodd, O. Lutz, et al. : Localized ¹H *in vivo* NMR spectroscopy of small-volume elements in human brain at 1.5 T. *Magn Reson Med*, 15 : 320-326, 1990.
- 13) G. Rhodes, M. Miller, M. L. McConnell, et al. : Metabolic abnormalities associated with diabetes mellitus, as investigated by gas chromatography and pattern-recognition analysis of profiles of volatile metabolites. *Clin Chem*, 27 : 580-585, 1981.
- 14) D. Morvan, P. Jehenson, D. Duboc, et al. : Discriminant factor analysis of ³¹P NMR spectroscopic data in myopathies. *Magn Reson Med* , 13: 216-227, 1990.
- 15) E. Sletten, O. M. Kvalheim, S. Kruse, et al. : Detection of malignant tumours by multivariate analysis of proton magnetic resonance spectra of serum. *Eur J Cancer*, 26 : 615-618, 1990.

Diagnostic Trial for Human Brain Tumors Using ^1H -NMR Spectroscopy

Yuki YOSHIDA¹, Yoshichika YOSHIOKA¹, Naoki YASUDA¹,
Iwao SAIKI², Haruyuki KANAYA²

¹*2nd Department of Physiology and*
²*Department of Neurosurgery, Iwate Medical University*
19-1 Uchimaru, Morioka, Iwate 020

The utility of proton magnetic resonance (^1H -NMR) spectroscopy as an adjunct approach in the diagnosis of brain tumors was evaluated. NMR spectra were obtained with seven different types of human brain tumor as well as normal brain cortex. Tumors examined included low grade astrocytoma, glioblastoma, ependymoma, meningioma, neurinoma, pituitary adenoma, and brain metastasis from lung adenocarcinoma. Extracted samples from each tissue were used to achieve a good signal-to-noise ratio and enhance the resolution of the spectra. The spectra showed multiple resonances corresponding to lactate, alanine, N-acetylaspartate (NAA), glutamine, glutamate, creatine, choline, taurine, and inositol. While NAA appeared as a prominent peak with all of the normal brain cortices studied, it was markedly reduced or even undetectable with tumors. Thus brain tumors could be differentiated from normal brain cortex on the basis of the NAA content. The relative spectral patterns for creatine, choline, and inositol appeared to be different with different types of tumor. Therefore attempts were made to use the ratios of creatine to choline, creatine to inositol, and choline to inositol as parameters to characterize the tumor types. There were statistically significant differences ($P < 0.001 - P < 0.05$) in at least one of these ratios between the normal brain and each of the tumor groups and also between any two of the tumor groups with an exception of ependymoma/metastatic tumor combination. The discriminant power of these ratios was then evaluated. It was found that the three glioma types (low grade astrocytoma, glioblastoma, ependymoma) can be discriminated with 80% accuracy, and meningioma and neurinoma with 100% accuracy. These data suggested that NMR spectroscopy might yield clinically useful information and might be applicable to the differential diagnosis of brain tumors.