

## ラット脳の放射線壊死作成および MRI による評価

橋本隆裕<sup>1</sup>, 池平博夫<sup>1</sup>, 安藤興一<sup>1</sup>, 吉井与志彦<sup>4</sup>,  
平岡 武<sup>2</sup>, 柴山晃一<sup>3</sup>, 福田 寛<sup>1</sup>, 館野之男<sup>1</sup>

<sup>1</sup>放射線医学総合研究所臨床研究部  
<sup>3</sup>同 病院部

<sup>2</sup>同 物理研究部  
<sup>4</sup>筑波大学脳神経外科

## はじめに

放射線照射に伴う正常脳への影響は病巣の反応とともに重要な問題である。すなわち、照射野内の正常脳の放射線障害による合併症が結局は照射線量を規定しているのが現状で、残念ながら現在の照射線量による治療のみで治癒の得られる脳腫瘍は極めて少ない<sup>1)</sup>。臨床的に照射の効果および影響を評価するには X 線 CT (computed tomography), MRI (magnetic resonance imaging), PET (positron emission tomography) などの画像診断が有力な手懸かりとなるが、臨床の場では純粹に放射線照射の影響のみを評価するには困難な場合が多い<sup>2),3)</sup>。実験的にも放射線照射に対する正常脳の反応を検討した報告は多く見られるが<sup>4)</sup>, 従来の方法では小動物の脳局所照射を行うには線量分布の点で問題があり、また小動物の脳の *in vivo* での画像も満足できるものではなかった<sup>4),5)</sup>。

本研究の目的は照射野内の良好な線量分布の得られる陽子線 (プロトン) を用いてラットの実験的局所脳障害を作成し、その障害の描出を高分解能 MRI にて試み、脳照射に伴う正常脳障害の病態解明の第一歩とすることである。

## 対象および方法

10 週齢の雄性 Fischer ラット 20 匹の頭部局所照射を以下の方法で行い、そのうち無作為に抽出した 4 匹を今回の MRI による検討の対象とした。残りの動物は別の実験に供した。

照射方法：ラットを抱水クロラルの腹腔内投与 (0.35 mg/kg) にて麻酔を得た後、脳の長軸が水平となるように下顎を約 1 cm のアクリル板に乗せ、腹臥位にて固定した。照射は放射線医学総合研究所のサイクロトロンより得られる陽子線 (プロトン, 70 MeV, 垂直ビーム) を用い、Bragg-peak を重ね合わせることで (spread out Bragg-peak), 照射容積内の線量を均一とした。照射野は bregma を中心とした前後 10 mm, 左右 20 mm の矩形で、照射深度は頭皮より 5 mm とし、60 Gy の一回照射 (照射時間 100 秒前後) を行った。照射後動物は麻酔より覚醒させ、その後自由に餌、水を摂らせて飼育し、照射後 5 ヶ月目に以下のごとく MRI 撮影を行った。

MRI 測定：口径 31 cm の水平型、超伝導 2T 磁石よりなる動物用 MR 装置 (RS-200, Siemens-Asahi Medical Systems Ltd., Tokyo) を用いた。撮影には動物を抱水クロ

キーワード magnetic resonance imaging <MRI>, radiation brain damage, radiation necrosis

ラールの腹腔内投与にて不動化し、H-1 用 Alderman-Grant 型コイル (内径 8 cm, 共鳴周波数 85.26 MHz) の中に固定した。観測周波数および 90°, 180°パルスは動物をコイルに入れた状態で決定した。

パルス系列はスピネコー (SE) 法で、繰り返し時間/エコー時間=500/30 ms の T<sub>1</sub>強調 (T<sub>1</sub>W) 画像を撮影した。画像再構成は 2D FT (dimensional Fourier transformation) によった。スライス幅は 2 mm のシングルスライスで断層面は冠状断とし、積算回数は 2 ないし 4 回である。In vivo での血液脳関門 (BBB) 障害の指標として、Gd-DTPA (0.1 mmol/kg) を腹腔内投与後前記と同条件の T<sub>1</sub>W SE を撮影した。

MRI 撮影終了後、生理食塩水に溶解した 2% Evans blue 溶液 (1 ml/kg) を股静脈より投与した。1 時間後に脳を摘出してホルマリン中に固定し冠状断面を作成して Gd-DTPA 投与後の MRI と比較した。また Luxol Fast blue 染色による組織学的検討も行った。

## 結 果

照射後 5 ヶ月にわたる観察期間中に死亡した動物は見られず、摂食行動および運動機能にも異常は認めなかった (n=20)。照射部位の脱毛は著明で、その周囲は図 1 のように bregma を中心に前後 10 mm, 左右 20 mm と設定した照射野に良く一致していた。照射後 5 ヶ月目の頭部 MRI を図 2 に示す。冠状断単純 T<sub>1</sub>W SE 像にて両側側脳室の拡大および脳梁を中心に側脳室内側部に低信号域を認め (図 2-A), Gd-DTPA 投与後、T<sub>1</sub>W SE 像にて低信号を呈した部位にほぼ一致した造影効果を認めた (図 2-B) が、単純 MRI にて異常信号が明らかでなかった視床核の一部にも造影効果が見られた。照射野内の皮質および被殻には MRI 上異常信号は認めな

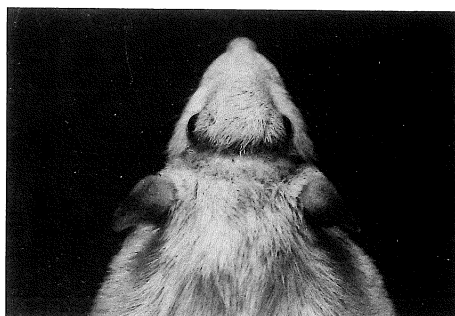


図 1. 陽子線 (プロトン) の 60 Gy 一回照射後 5 ヶ月経過したラットの頭部を示す。照射は頭頂部より垂直ビームを使用し、照射野は左右 20 mm, 前後 10 mm の矩形で照射深度は頭皮より 5 mm とした。脱毛の範囲が設定した照射野とよく一致している。

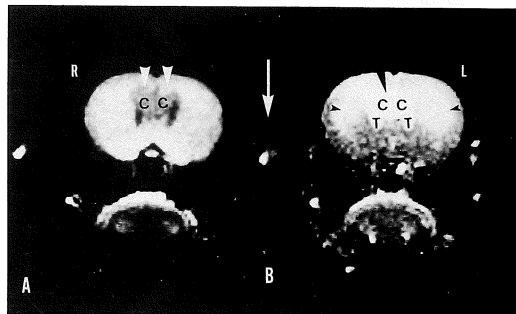


図 2. 照射後 5 ヶ月経過時のラット頭部 MRI 冠状断を示す。(spin echo 法, Tr/Te=500/30 ms, 2 mm 幅)。単純では側脳室の拡大 (小矢頭) と脳梁 (cc) を中心に低信号域 (大矢頭) を認め (A), Gd-DTPA による造影では単純 MRI にて低信号を呈した部分が造影効果を呈し、また視床核 (T) にも造影効果が見られる。外包にも淡い造影効果が見られる (黒矢頭)。皮質部には異常信号を認めない (B)。図中央の矢印は照射の方向と深度 (頭皮より 5 mm) を示す。

かった。今回検討した 4 匹の MRI 所見はいずれも上記の如くであった。

Evans blue 投与後に摘出した脳の冠状断面を図 3-A に示す。矢印のごとく脳梁を中心に側脳室の周囲に漏出が見られたが、側脳室よりの被殻にも漏出が見られた。ただ、脳梁には肉眼的

1991年 2月 8日受理 1991年 4月 22日改訂

別刷請求先 〒260 千葉市穴川 4-9-1 放射線医学総合研究所臨床研究部 橋本隆裕

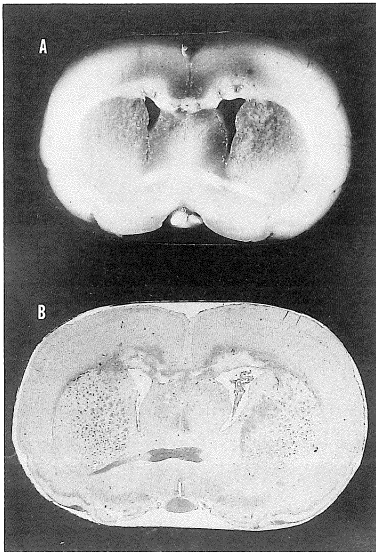


図3. 摘出脳の冠状断面を示す。A) Evans blue の漏出は脳梁を中心とした側脳室周囲に見られる。MRI にて造影効果の見られなかった被殻も漏出が及んでいる。脳梁には肉眼的にも壊死により多数の孔が見られるが Evans blue の漏出は見られない。B) 脳梁は組織の脱落が明らかで、脱髄が著しい (Luxol Fast blue 染色)。

に多数の孔 (vacuolation) が見られたものの脳梁自体には漏出は認めなかった。

図3-Bに示すように最も変化の大きかった脳梁は組織の脱落が著しく、組織学的に凝固壊死を呈する特徴的な放射線壊死で、著明な脱髄が見られ、脳梁周囲組織では血管壁の肥厚を認めた。Evans blue でのみ異常を呈した被殻にも局所的ではあるが血管壁の変化を認め、特に脳室に接する部分で顕著であった。

### 考 察

今回は正常脳の放射線壊死の作成および評価法を開発するため、陽子線 (プロトン) を用いてラット脳局所照射を行ない、その変化を高分解能 MR 装置にて捉えることを試みた。実験動物、特にラットなどの小動物の脳に外照射を行なう場合に最も問題となるのはやはり線量分布

の精度である。従来使用されている外照射装置は $^{60}\text{Co}$  およびリニアックで、一般に鉛を用いた遮蔽により照射野を設定するが<sup>4)</sup>、口腔、咽頭、気管、食道などの近傍組織障害を引き起こす可能性が高く、ましてラット脳への精度の高い局所照射は不可能であった<sup>6)</sup>。加えて、ラット脳の照射後の変化を *in vivo* の画像として検討することも高分解能 MR 装置なくしては困難であった。

陽子線 (プロトン) は照射野内での線量分布が良好で、Bragg-peak を有する物理的特性がある<sup>7)</sup>。この単一の Bragg-peak を用いてラット脳の照射を行ない、Evans blue により血液脳関門の障害を *in vitro* で検討した報告<sup>5)</sup>があるが、この方法では脳深部のある限られた領域の照射には優れるものの均一な線量に対する脳の各構造の反応の違いを検討するには適していない。そこで今回は spread-out Bragg peak を用いて頭頂から脳内の 5 mm までの範囲の線量分布が均一に 60 Gy となるように照射を行い、部位による反応の違いにも注目した。

図1に示したように、脱毛の範囲は設定した照射野に一致し、照射範囲外の組織、例えば眼球への影響は見られなかった。また図2、3のように MRI 所見および摘出脳でも異常所見は照射野にほぼ局限し陽子線の線量分布の精度の高さを良く反映していた。このように従来の照射法で見られた咽頭、口腔など脳以外の組織障害に起因する死亡を除外でき、今回のようにラット脳に局限した高線量一回照射後の長期間の観察が可能となる。脳への放射線照射には種々の程度の副作用を伴うが、臨床的に最も問題となるのはいわゆる late delayed radiation damage である<sup>1)</sup>。とりわけ、放射線壊死は最も重大な合併症で照射後数カ月から数年の期間をおいて発生する。この期間 (latent period) の意味は未だ十分には解明されていないが、放射線壊死の発生機序は血管内皮障害説が最も有力で、内皮細胞の障害が再生能を上回って顕性化するまでの時間を表すと考えられる。実際に線量や照射野容積が増えると障害発現までの期間は短くな

る<sup>8)</sup>。従来の病理学的検討で、脳は部位により放射線感受性が異なり、ラットでは海馬采が最も障害を受けやすく、また照射線量により血管内皮細胞の障害とグリア細胞の障害では差があると指摘されている<sup>6)</sup>。すなわち低線量ではグリアの障害が内皮細胞障害より先に発生し、今回行った 60 Gy の照射では内皮細胞とグリアはほぼ同時期に障害を来すと考えられ、再現性の良い脳壊死モデル作成には高線量照射が必要である。今回の検討では脳梁の病変が最も著明で、組織像は細胞の脱落および血管の変化からなる明確な放射線壊死で、脳梁周囲の組織にも変化を認めたが、大脳皮質は保たれていた。脳梁での変化が顕著であったのは血管内皮とグリアの両方の障害のためと思われる。白質が放射線障害を来しやすいとする従来の見解を支持したが、rodent 脳では白質が少ないと言う欠点は否めない。

MRI 導入後、放射線照射を受けた患者脳で脳萎縮、脳室に接近する白質の浮腫、及び広範な白質の異常信号などの所見を認めるとする報告が増加しており、これらは脱髄、血液脳関門の障害および血管周囲の炎症と考えられている<sup>2),3)</sup>。しかし、臨床では MRI 所見を裏付ける組織学的検討を行なうには困難な場合が多く、手術や化学療法また血管障害など内因性の病変の影響も加わっており、MRI 所見も非特異的である。そのため正常脳の放射線障害の実験的研究には再現性の良い脳放射線障害を作成し、その MRI による検討を行なうことは意義がある。猫での正常照射 (35 Gy, 6 MeV, photons) 後の変化を MRI で観察した報告はあるが、異常所見を呈した頻度が低く (2/6)、またその所見は一様ではなかった<sup>9)</sup>。一方、今回の検討ではすべて MRI 上の異常所見 (4/4) が得られており、この相違は照射方法の精度ならびに先に述べたように照射線量の違いによると我々は考える。

正常脳では血液脳関門のために下垂体、脈絡叢などを除いて造影剤の血管外漏出は見られないため、造影剤の投与後に X 線 CT または MRI

の造影効果の有無により血液脳関門の機能評価が可能である。特に、濃度分解能が高い MRI での造影の有用性は臨床でも良く知られている。今回示した如くラット脳では空間分解能の精度の問題はあるものの、MRI は *in vivo* での血液脳関門の障害を知るには極めて都合が良い。臨床例で見られる放射線壊死の造影 CT および MRI では造影能が時間やステロイドによる治療により変化するが、今後、今回の手法を用いこの病態の解明も可能となるであろう。一方、Evans blue は静注後速やかに血中アルブミンと結合し、血管内に留まるが血液脳関門が破綻すると血管外に漏出するため摘出脳で容易に同定可能となる。今回の Evans blue の漏出と Gd-DTPA の造影所見をまとめると、① Evans blue の漏出の範囲は MRI 上の造影部分より広く、② 著明な Gd-DTPA の造影および組織変化の見られた脳梁では Evans blue の漏出は無く、③ また MRI 上造影効果を見なかった被殻に Evans blue の漏出を認めた。これらの解釈は十分ではないが、Gd-DTPA と Evans blue の所見の相違は *in vivo* と *in vitro* による違いが最も大きいと考える。また上記の①、③については MRI の分解能の問題および血管内の Evans blue が死後に漏出した可能性が考えられ、②については、脳梁は組織の脱落が著明で、脳梁自体の血管はヒアリン化が著しく、もはや血管内から外への移行は見られなくなっている。一方、周囲組織から漏れた物質は拡散するが、Gd-DTPA は Evans blue より分子量も小さく、拡散しやすいために脳梁に Gd-DTPA の造影効果が見られたと解釈した。Gd-DTPA と Evans blue の両者を検討した報告は見られないが、Hecht-Leavitt, et al.<sup>9)</sup> は Gd-DTPA の造影の有無について興味ある意見を述べている。すなわち、ネコ脳への照射後 T<sub>2</sub> 強調画像で高信号を呈した部位が Gd-DTPA により造影される場合とされない場合があり、造影されないのは非炎症性の脱髄および壊死を表わし、これにより組織学的な差違を分けられるというのである。我々は照射後に Gd-DTPA

にて造影される部分も時間が経つと造影がみられなくなることを確認しており (T. Hashimoto, unpublished data), 造影の有無は照射後の組織の反応すなわち血管の状態の時間経過を反映するものと考えている。今回の検討では血液脳関門の機能障害の検出には *in vitro* の Evans blue のほうが *in vivo* の Gd-DTPA より鋭敏であったが, 死後に漏出した可能性もあり他の *in vitro* の手法による評価が今後必要である。Gd-DTPA および Evans blue の投与量, 投与後の時間経過, 作用機序ならびにそれぞれの所見の違いはあるものの, 血液脳関門障害の程度および状態が同じ線量の照射であっても部位により異なる可能性が示唆される。

### 結 語

陽子線 (プロトン) の極めて良好な線量分布を利用してラット脳の局所放射線壊死を作成し, MRI により放射線照射による変化を捉えた。60 Gy 1 回照射後 5 ヶ月目の MRI で脳梁を中心に異常を促え, Gd-DTPA による造影を認めた。Gd-DTPA は血液脳関門の機能評価法として有用であるが, *in vitro* の Evans blue の漏出と一致しない部位があり, その解明が今後必要である。また実験的に照射後の経時的な MRI 所見と組織変化との関係を明らかにすることは脳の放射線障害の病態を把握するために重要である。今回報告した手法を用いることで, 今後放射線照射に生じる正常脳障害の病態の解明が推められることを期待する。

### 謝 辞

プロトン照射に御尽力いただいた放射線医学総合研究所サイクロトン管理課の皆様へ深感謝します。本研究の一部は平成2年度文部省科学研究費 (奨励研究 A 02770695) の助成を受けた。

### 文 献

- 1) G. E. Sheline, W. M. Wara, V. Smith, et al. : Therapeutic irradiation and brain injury. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 6 : 1215-1228, 1980.
- 2) L. S. Constine, A. Konski, S. Ekholm, et al. : Adverse effects of brain radiation correlated with MR and CT imaging. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 15 : 319-330, 1988.
- 3) J. T. Cunes, D. W. Laster, M. R. Ball, et al. : MRI of radiation injury to the brain. *AJR*, 147 : 119-124, 1986.
- 4) E. H. Oldfield, R. Friedman, T. Kinsella, et al. : Reduction in radiation-induced brain injury by use of pentobarbital or lidocaine protection. *J Neurosurg*, 72 : 737-744, 1990.
- 5) M. P. Remler, W. H. Marcussen, J. Tiller-Borsich: The late effects of radiation on the blood brain barrier. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 12 : 1965-1967, 1986.
- 6) W. Calvo, J. W. Hopewell, H. S. Reinhold, et al.: Time- and dose-related changes in the white matter of the rat brain after single doses of Xrays. *Br J Radiol*, 61 : 1043-1052, 1988.
- 7) E. J. Hall : Radiobiology for the radiologist (3rd Ed). pp271-274 J. B. Lippincott Company, Philadelphia, 1988.
- 8) J. R. Fike, C. E. Cann, K. Turowski, et al. : Radiation dose response of normal brain. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 14 : 63-70, 1988.
- 9) C. Hecht-Leavitt, R. I. Grossman, W. J. Curran Jr, et al. : MR of brain radiation injury : Experimental studies in cats. *AJNR*, 8 : 427-430, 1987.

## Development of Radiation Necrosis in Rat Brains and Its Evaluation with MRI

Takahiro HASHIMOTO<sup>1</sup>, Hiroo IKEHIRA<sup>1</sup>, Koichi ANDO<sup>1</sup>,  
Yoshihiko YOSHII<sup>2</sup>, Takeshi HIRAOKA<sup>3</sup>, Koichi SIBAYAMA<sup>4</sup>,  
Hiroshi FUKUDA<sup>1</sup>, Yukio TATENO<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Divisions of Clinical Research,*  
<sup>3</sup>*Physics, and* <sup>4</sup>*Hospital,*  
*National Institute of Radiological Sciences,*  
*4-9-1 Anagawa, Chiba-shi, Chiba 260,*  
<sup>2</sup>*Department of Neurosurgery, Tsukuba University*

Radiation brain damage, especially radiation necrosis, is most critical and well-known sequelae after cranial irradiation. However, the etiology of radiation necrosis has not been fully understood. In order to characterize and to investigate the pathogenesis of radiation necrosis, the experimental techniques in small animals and the evaluation methods should be refined.

The authors developed focal radiation brain damage in rats utilizing protons of a single dose of 60Gy with superior dose distribution and demonstrated the lesions caused by radiation on MRI with 2T magnet. The damaged lesion was not uniform within the radiation field 5 months after radiation. The corpus callosum was the most vulnerable site which showed low intensity on T<sub>1</sub> weighted spin echo images with marked enhancement after Gd-DTPA administration. These MRI findings are common in patients with radiation necrosis. Discrepancy between the area of Gd-DTPA enhancement on MRI and that of Evans blue extravasation on excised brain might be attributed to the different response and pathological conditions in different brain structures following a single dose of radiation of 60Gy.

Further investigation on radiation brain damage in rats can be encouraged with the elegant methods of both protons radiation and high resolution MRI described here.