

脳内代謝物質の拡散に関する検討

阿部 修¹, 入口紀男², 小島良紀¹, 大久保敏之¹,
斉藤延人³, 林 直人¹, 白水一郎¹, 妹尾淳史¹,
大友 邦¹, 佐々木康人¹

¹東京大学医学部付属病院放射線科 ²シーメンス旭メディテック

³東京大学医学部付属病院脳神経外科

はじめに

分子のブラウン運動レベルの微少な動きを画像化する拡散強調画像 diffusion weighted imaging (以下 DWI) は細胞骨格, 細胞膜透過性, 細胞内物質輸送および温度などの情報を含み, 臨床的には超急性期脳梗塞, 脱髄性疾患, 白質の異方性拡散, すなわち神経路の描出など通常の磁気共鳴画像では現れにくい情報を描出するのに効果を発揮している. しかしこれらの画像では主として自由水の水素原子からの情報を画像化しており, 通常 DWI はすなわち自由水の拡散強調画像を意味している. DWI で観察できる自由水拡散の変化は, 細胞内外に存在している, それぞれの分画の自由水の拡散の変化およびそれらの分画比率や, 両腔間の自由水交換率に依存する. DWI はそれらの要因の総和として構成され, 局所の細胞の性質を正確に反映しているとは言いにくい. また様々な情報を含有しているがゆえに, その変化が何に由来するものなのかを特定しにくい.

プロトン磁気共鳴スペクトロスコピー proton-magnetic resonance spectroscopy (以下 ¹H-MRS) で観測される代謝物質である N-acetylaspartate (以下 NAA) や choline containing compounds (以下 Cho), creatine and phosphocreatine (以下 Cre) は正常状態では

主に細胞内に存在しており, これらの拡散を検討することは細胞内環境変化の, より正確な把握を可能とする^{1)~4)}.

また超急性期脳梗塞症例において自由水の拡散が低下することが知られているが, その正確な機序はまだまだ明確にされていない. 脳梗塞超急性期における細胞内代謝物質の拡散を検討することは, 自由水拡散低下の機序の解明の手がかりになると思われる.

上記の点を明らかにするため, 7 tesla (以下 7T) の実験用 MR 装置を用いて, ¹H-MRS により観測可能な NAA, Cho および Cre の拡散を, stimulated echo acquisition mode (以下 STEAM) 法を用いて測定した. Phantom を用いて測定条件の妥当性を確認した後, 健常ラットにおいて代謝物質の正常拡散値を求め, 最終的に半球梗塞ラットを用いて, 超早期における梗塞半球の代謝物質の拡散に関して検討した.

対象・方法

使用装置は VARIAN 社製 (SIS 300/183) 7.05 T 水平型装置で, 傾斜磁場にはアクティブシールドが組み込まれている. 最大傾斜磁場は 120 mT/m で, 最大傾斜磁場までの立ち上がり時間は 200 μ s である. すべての実験にお

キーワード brain metabolite, diffusion, focal cerebral ischemia, magnetic resonance spectroscopy

いて 2 cm 径のプロトン用送受信型表面コイルを用いた。

撮像はすべて diffusion weighted STEAM 法を用い、TR/TE/TM=3000/80/10 ms, $\Delta=\delta=18$ ms, NEX=192 回とした。運動検出傾斜磁場 motion probing gradient (以下 MPG) は、等速度運動により生じる位相誤差の補正のために TE/2 時間の間に双極型の傾斜磁場として、合計 2 回 Z 軸方向に印加した。MPG の大きさを 0, 30, 50, 60, 70, 80 mT/m としたので、対応する b 値は 0, 500, 1391, 2003, 2726, 3561 s/mm² となる。STEAM 法の前に、4 回の chemical shift selective (以下 chess) 法による水抑制パルスを加えた。得られたスペクトルは 8192 ポイントに補間した後、phantom から得られたスペクトルでは、ラインブロードニング処理を行わず、ラット頭部から得られたスペクトルでは、2 Hz のラインブロードニング処理を行った。さらに NAA, Cre, Cho および lactate 各々に対して、位相補正・ベースライン補正を行った後、ローレンツ関数でフィッティングし、個々のピークの信号強度を求めた。b 値に対して、各ピークの信号強度の片対数をプロットし、 $S/S_0=e^{-bD}$ の等式から最小二乗法にて直線近似し、NAA, Cre, Cho および lactate の見かけの拡散係数 apparent diffusion coefficient (以下 ADC) を算出した。

1) Phantom study : phantom はラット脳の組織組成に近い濃度^{1)~3)}、すなわち NAA 60 mM, creatine 50 mM, 塩化 choline 10 mM に lactate 60 mM を加えた水溶液を pH=7.4 に調整したものをを用いた。関心領域 volume of interest (以下 VOI) を $6 \times 6 \times 6=216$ mm³ に設定し、温水循環装置と光ファイバー温度計を用いて、phantom を約 20°C に保温し、計 6 回測定した。

2) 健常ラット : 体重 250~350 g の雄 Wistar rat 8 匹に対して、硫酸アトロピン 0.1 mg/kg

を腹腔内注入した後、経口的に挿管し、N₂/O₂=4/1, halothane 1~1.5% で人工呼吸し、循環温水を用いてラット体温を計測中 37±1°C にコントロールした。大腿動脈を確保し、計測中常時血圧モニターを行い、MR 装置に移送する前に血液ガスデータを 1 回測定した。必要があれば呼吸回数および酸素濃度を微調整して、もう 1 回測定した。T₂ 強調像 (TR/TE=1500/40 ms) を撮像後、左大脳半球に、梗塞ラットとほぼ同様な位置に $3.6 \times 3.6 \times 6.0$ mm³ の VOI を設定・計測した。

3) 梗塞ラット : あらかじめ先端を加熱して棍棒状にした 4-0 ナイロン糸を用意した^{5),6)}。体重 250~350 g の雄 Wistar rat 8 匹に対して、健常ラットと同様な前処置を行った後、頸部正中を切開、左総頸・内外頸動脈を露出し、それぞれの分枝を熱凝固・切離した。結紮した総頸動脈より上記ナイロン糸を挿入しウイリス輪まで進めて抵抗を感じた時点で、直ちに固定・縫合した後、MR 装置に移送した。梗塞導入後約 30 分後に DWI (TR/TE=1500/40 ms, $\Delta/\delta=19/16$ ms, MPG=70 mT/m, MPG は三軸同時に印加, $b=1226.7$ s/mm²) を撮像し、左半球梗塞範囲を十分含むように $3.6 \times 3.6 \times 6$ mm³ の VOI を設定し、梗塞導入後 1 時間より計測を開始した。DWI の撮像時間が梗塞導入後早期のため、梗塞範囲が不明確のラットでは、梗塞導入後 24 時間後に pentobarbital 1.5 ml を腹腔内投与後、断頭し脳を取りだし、2 mm 厚の切片を作成し、2,3,5-triphenyl-tetrazolium chloride (以下 TTC) を用いて染色し半球梗塞の成否を確認した。

結 果

Phantom における ADC は、NAA 0.65 ± 0.02 , creatine 0.85 ± 0.03 , choline 1.05 ± 0.06 ($\times 10^{-3}$ mm²/s) と文献値とよく一致し

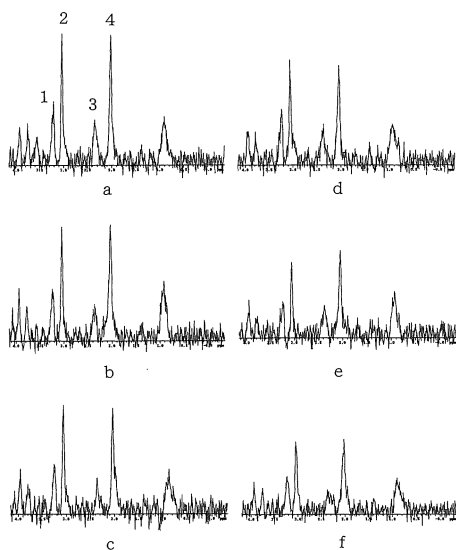


Fig. 1. Representative diffusion weighted localized proton spectra of normal rat brains (TR/TE/TM=3000/80/10 ms, VOI=3.6 × 3.6 × 6.0 mm³, 192 acquisitions, Δ=δ=18 ms). The series of spectra was acquired with 2 Hz line broadening at six b factors ranging from 0, 500, 1391, 2003, 2726 and 3561 s/mm² from a to f. Line widths remained essentially unchanged at increasing diffusion weighting, indicating that residual eddy current effects were minimal. Assignments: 1, choline containing compounds; 2, creatine and phosphcreatine; 3, glutamine/glutamate; 4, N-acetylaspartate.

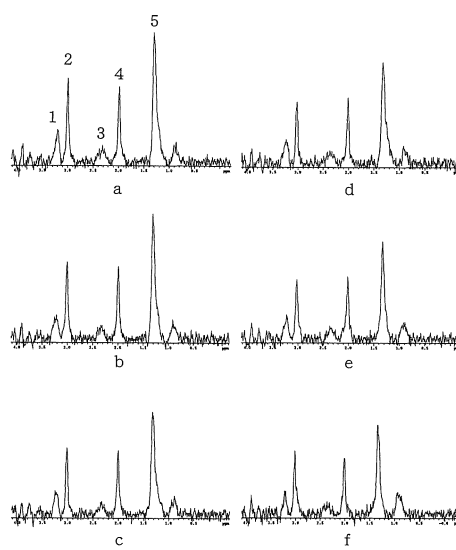


Fig. 2. Representative diffusion weighted localized proton spectra of rat brains 1 hour after occlusion of the middle cerebral artery (TR/TE/TM=3000/80/10 ms, VOI=3.6 × 3.6 × 6.0 mm³, 192 acquisitions, Δ=δ=18 ms). The series of spectra was acquired with 2 Hz line broadening at six b factors ranging from 0, 500, 1391, 2003, 2726 and 3561 s/mm² from a to f. Assignments: 1, choline containing compounds; 2, creatine and phosphcreatine; 3, glutamine/glutamate; 4, N-acetylaspartate; 5, lactate.

た^{1),2),4)}. Lactate の ADC は 0.95 ± 0.02 ($\times 10^{-3}$ mm²/s) であった。梗塞ラットでは DWI および TTC による染色標本で半球梗塞が全例確認できた。健常および梗塞導入後 1 時間後より計測を開始したラット脳内代謝物質の ADC はそれぞれ, NAA 0.18 ± 0.02 , 0.14 ± 0.01 , Cre 0.18 ± 0.01 , 0.15 ± 0.01 , Cho 0.19 ± 0.02 , 0.15 ± 0.03 と, 統計学的な有意差が認められた (Student's t-test. いずれも $p < 0.01$)。梗塞導入後の lactate の ADC は 0.14 ± 0.03 ($\times 10^{-3}$ mm²/s) と他の代謝物質に比べてほぼ等しいか, やや低値を示した。

考 察

脳梗塞急性期に脳内に存在する自由水プロトンの拡散が低下することはよく知られた事実であるが, その正確な機序は確定されていない。

温度変化は拡散に対して大きな影響を与えるが, 梗塞時における脳内温度の低下は実際のところ $1 \sim 2^{\circ}\text{C}$ に過ぎないという報告があり⁷⁾, また Van der Toorn らの試算によれば, ラット大脳半球梗塞において彼らが得た creatine 29% および NAA 19% の ADC の低下は温度のみの寄与ならば, それぞれ 15 および 9°C もの温度低下に相当するという¹⁾。

Cytotoxic edema の際には細胞外液に存在す

る水の流入が起こり、細胞内の粘稠度を低下させる、すなわち拡散を促進するように見える。しかし同時に起こる細胞内器官の構築の改変により、細胞内の粘稠度は上昇し、むしろ拡散の低下を促すと思われる。

現在脳虚血における自由水の ADC の低下には、細胞外腔の構造的なゆがみが重要な役割を果たしていると考えられている^{1),8)~10)}。細胞外腔の構造的なゆがみが生じることにより、もともと ADC の高かった細胞外液腔に存在する自由水分画が減少し、もともと ADC の低い細胞内液腔に移動することにより、観測される voxel の自由水 ADC が減少するというものである。しかし正常状態ではほぼ全量が細胞内腔に存在すると思われる代謝物質の ADC が、急性期脳梗塞時に低下する主たる原因として、細胞外腔のゆがみのみを想定することには無理がある。脳梗塞時には細胞内腔にも細胞内器官の構造破壊によって構造的なゆがみが出現するとすれば、代謝物質の ADC 低下を説明することが可能となり、さらには水の ADC の低下に大きな役割を果たしている可能性がある。

今回我々の研究では脳梗塞時における代謝物質の ADC が低下することが示されたが、ほぼ細胞内にのみ存在する代謝物質の拡散を検討することにより、脳虚血における水の拡散の低下の機序、より正確な細胞内環境などを判定する非侵襲的な手段の一つになると思われた。

文 献

- 1) Van der Toorn A, Dijkhuizen RM, Tulleken CAF, Nicolay K : Diffusion of metabolites in normal and ischemic rat brain measured by localized ¹H MRS. *Magn Reson Med* 1996 ; 36 : 914-922
- 2) Merboldt KD, Horstmann D, Hanicke W, Bruhn H, Frahm J : Molecular self-diffusion of intracellular metabolites in rat brain *in vivo* investigated by localized proton NMR diffusion spectroscopy. *Magn Reson Med* 1993 ; 29 : 125-129
- 3) Wick M, Nagatomo Y, Prielmeier F, Frahm J : Alteration of intracellular metabolite diffusion in rat brain *in vivo* during ischemia and reperfusion. *Stroke* 1995 ; 26 : 1930-1934
- 4) Nicolay K, van der Toorn A, Dijkhuizen RM : *In vivo* diffusion spectroscopy : an overview. *NMR Biomed* 1995 ; 8 : 365-374
- 5) Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, Cummins R : Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. *Stroke* 1989 ; 20 : 84-91
- 6) Belayev L, Alonso OF, Busto R, Zhao W, Ginsberg MD : Middle cerebral artery occlusion in the rat by intraluminal suture : neurological and pathological evaluation of an improved model. *Stroke* 1996 ; 27 : 1616-1623
- 7) Morikawa E, Ginsberg MD, Dietrich WD, Duncan RC, Kraydieh S, Globus MY, Busto R : The significance of brain temperature in focal cerebral ischemia : histopathological consequences of middle cerebral occlusion in the rat. *J Cerebral Blood Flow Metabolism* 1992 ; 12 : 380-389
- 8) Le Bihan D : Molecular diffusion, tissue microdynamics and microstructure. *NMR Biomed* 1995 ; 8 : 375-386
- 9) Van der Toorn A, Sykova E, Dijkhuizen RM, Vorisek I, Vargova L, Skobisova E, Van Lookeren-Campagne M : Dynamic changes in water ADC, energy metabolism, extracellular space volume, and tortuosity in neonatal rat brain during global ischemia. *Magn Reson Med* 1996 ; 36 : 52-60
- 10) Niendorf T, Dijkhuizen RM, Norris DG, Van Lookeren-Campagne M, Nicolay K : Biexponential diffusion attenuation in various states of brain tissue : implications for diffusion-weighted imaging. *Magn Reson Med* 1996 ; 36 : 847-857

Diffusion Weighted Proton Spectroscopy of Intracellular Metabolites in Rats with Focal Cerebral Ischemia

Osamu ABE¹, Norio IRIGUCHI², Yoshiki KOJIMA¹,
Toshiyuki OKUBO¹, Nobuhito SAITO³, Naoto HAYASHI¹,
Ichiro SHIROUZU¹, Atsushi SENO¹, Kuni OHTOMO¹,
Yasuhito SASAKI¹

¹*Departments of Radiology and ³Neurosurgery, Faculty of Medicine, Tokyo University
7-3-1 Bunkyo-ku, Tokyo 113*

²*Siemens Asahi Medical Technology, Tokyo*

In order to acquire specific insights regarding molecular mobility in the intracellular environment associated with cytotoxic edema during early focal cerebral ischemia, it is necessary to assess the diffusion properties of metabolites such as N-acetylaspartate (NAA), creatine and phosphocreatine (Cre), and choline containing compounds (Cho) which exist exclusively in the intracellular space under normal conditions. The purpose of the present study is to clarify metabolite diffusion during early focal ischemia using STEAM sequence and a strong magnetic field of 7 tesla, so as to assess the pathophysiology of the reduction in diffusion observed in an ischemic cerebral hemisphere. The *in vitro* diffusion coefficients at 20°C were found to be $1.05 \pm 0.06 \times 10^{-3} \text{ mm}^2/\text{sec}$ (mean \pm standard deviation) for Cho, $0.85 \pm 0.03 \times 10^{-3} \text{ mm}^2/\text{sec}$ for Cre, $0.65 \pm 0.02 \times 10^{-3} \text{ mm}^2/\text{sec}$ for NAA and $0.95 \pm 0.02 \times 10^{-3} \text{ mm}^2/\text{sec}$ for lactate. The apparent diffusion coefficients (ADC) for these metabolites in eight rats with cerebral hemispheric infarction were significantly reduced from $0.19 \pm 0.02 \times 10^{-3} \text{ mm}^2/\text{sec}$ to $0.15 \pm 0.03 \times 10^{-3} \text{ mm}^2/\text{sec}$ for Cho, from $0.18 \pm 0.01 \times 10^{-3} \text{ mm}^2/\text{sec}$ to $0.15 \pm 0.01 \times 10^{-3} \text{ mm}^2/\text{sec}$ for Cre and from $0.18 \pm 0.02 \times 10^{-3} \text{ mm}^2/\text{sec}$ to $0.14 \pm 0.01 \times 10^{-3} \text{ mm}^2/\text{sec}$ for NAA (Student's t-test $p < 0.01$), the comparison values determined from eight normal rats. The ADC for lactate was $0.14 \pm 0.03 \times 10^{-3} \text{ mm}^2/\text{sec}$. Up to the present, increase in extracellular tortuosity has been suggested as playing a major role in the reduction of ADC in water seen during early cerebral ischemia. This explanation, however, is not applicable to changes in ADC for the metabolites, since the metabolites exist exclusively in the intracellular space. If both water and the metabolites diffuse in a similar fashion during early cerebral ischemia, the decrease in ADC for these metabolites may indicate that an increase of tortuosity in the intracellular spaces other than that in the extracellular spaces plays an important role in the reduction of ADC in water.