

超高磁場拡散 MRI で脱髄を追う [大会長賞記録]

矢野竜太郎¹, 畑 純一^{1~3}, 関 布美子^{1,2}, 石原良祐¹,
小牧裕司^{1,2}, 疋島啓吾⁴, 田中謙二⁵, 岡野栄之¹

¹慶應義塾大学大学院医学研究科生理学教室 ²実験動物中央研究所

³国立研究開発法人理化学研究所 ⁴沖縄科学技術大学院大学

⁵慶應義塾大学医学部精神・神経科学教室

はじめに

近年、小動物を用いた脳神経構造の網羅的研究が盛んに行われている。Diffusion tensor imaging (DTI) を含む神経線維描出技術は非常に有用な技術であり、なかでも髄鞘の形態変化である髄鞘化や脱髄と関連させた報告¹⁾が数多くされ、magnetic resonance imaging (MRI) による神経変性疾患の評価の有用性を高めている。

これに伴い、Cuprizone 投与による可逆性脱髄モデルマウス²⁾を用いた、MRI による脱髄の評価が近年報告³⁾されている。小動物を用いた脱髄の評価は、前臨床研究において MRI による評価の正確性を向上させることに非常に有用である。現在までに、この脱髄モデルマウスを拡散 MRI にて評価し、実際に脱髄が重度に進行した場合に fractional anisotropy (FA) が低下するという報告があるが、どの程度の脱髄が拡散 MRI により検出可能であり、また脱髄の進行とその進行を止め、再髄鞘化させた場合、脱髄と回復の過程を拡散 MRI による評価で、判別可能か、組織学的情報と関連した詳細な報告はされていない。本研究では、高磁場小動物用 MRI と免疫組織科学を併用することで、脱髄と拡散 MRI の関連の詳細を調査した。

方法と対象

1. 脱髄モデルマウス

本研究では、脱髄モデルとして Cuprizone 投与による可逆性脱髄モデルマウスを使用した。B6/J マウスを対象に 0.2% の Cuprizone 含有飼料を与えることで脳梁および皮質にて、脱髄を誘導した。投与 5 週から通常の飼料に切り替え再髄鞘化を促した。Control 群、Cuprizone 投与 2 週, 3 週, 4 週, 通常の飼料に切り替え 1 週, 2 週, 4 週の各ポイント (Fig. 1a) で灌流固定し、標本脳に対して MRI 計測および組織学的解析を実施した。計測対象として、Bregma より後方に -2.0 mm の脳領域にて、白質領域である脳梁⁴⁾、灰白質領域である皮質の聴覚野⁵⁾を対象とした (Fig. 1b)。

2. MRI 計測

7T MRI (Biospec ; Buker biospin) を用いて、22 mm 内径のボリュームコイルを使用し拡散 MRI 撮影を実施した。マウスの標本脳に対し造影剤による MRI 染色を施し、高分解能 3D DTI-Spin Echo 法を用いた。撮像条件は TR/TE = 600/20 ms, NA = 1, b-value = 1000, 2000 s/mm², MPG = 30 axes, spatial resolution = (125 μ m)³, acquisition time = 2 days とした。拡散 MRI の値として、DTI と diffusion kurtosis imaging (DKI) の解析には、diffu-

キーワード diffusion tensor imaging, myelin, demyelination model mouse

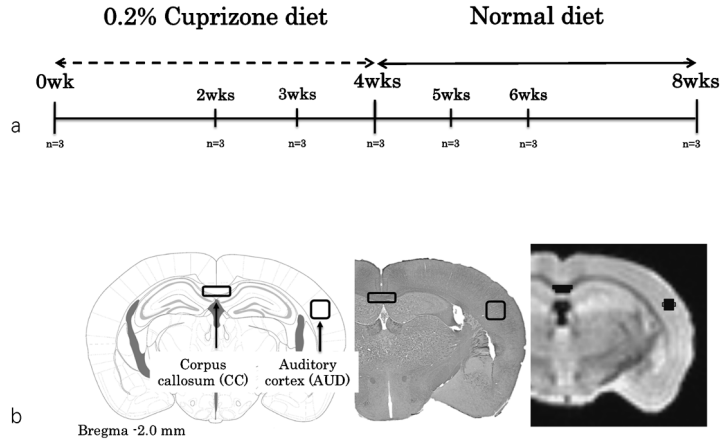


Fig. 1. Time table & brain regions of interest (ROIs)

sion toolkit および diffusion kurtosis estimator⁶⁾を使用した。これらの解析より、FA, apparent diffusion coefficient (ADC), radial diffusivity (RD), mean kurtosis (MK) を各拡散パラメータ値として評価に用いた。Fig. 1a に示す各ポイントの標本脳 (n=3) を撮影し、脱髄および再髄鞘化を評価した。Fig. 1b に示す脳梁と皮質の各領域に region of interest (ROI) を設定し、群間比較を行った。

3. 組織学的評価

Fig. 1a に示す各ポイントで、還流固定した標本脳 (n=3) に対し、組織学的解析を実施した。25 μ m 厚の凍結切片を作成し、ミエリンの主要構成タンパクである proteolipid protein (PLP) の免疫組織化学によって、ミエリンの組織学的評価を行った。Proteolipid protein, platelet-derived growth factor receptor alpha, c-fms mRNA の *in situ* hybridization を行い、オリゴデンドロサイト (OL), オリゴデンドロサイトプロジェニター (OPC), ミクログリアの mRNA を検出し、脱髄・再髄鞘化の背景にある細胞動態を評価した。染色後の脳切片を光学顕微鏡 (BZ-X710; KEYENCE) により、デ

ジタル画像化し取得した。取得したデジタル組織データに対し、PLP の免疫染色画像に対しては、Image J を用いた二値化⁷⁾により同面積内でのシグナル面積の割合の変化を算出した。*in situ* hybridization による検出を行った画像に対しては、同面積内でのシグナルの数をカウントすることで群間での変化を評価した。

4. 相関解析

拡散 MRI により取得した各拡散パラメータの変化が組織学的解析の変化とどの程度相関するかを解析するため、脳梁および皮質の各領域において無相関検定により相関の有無を検定した。脱髄時、再髄鞘化時を判別することが可能な拡散パラメータがあるのかを検証するため、髄鞘が同程度であり、細胞動態が異なる時の拡散パラメータに違いがあるのか t 検定を実施した。

結果と考察

本研究の結果を以下に示す。Cuprizone 投与前、投与 4 週後、通常飼料に切り替え 4 週後の拡散 MRI と組織学的解析の代表的な画像を

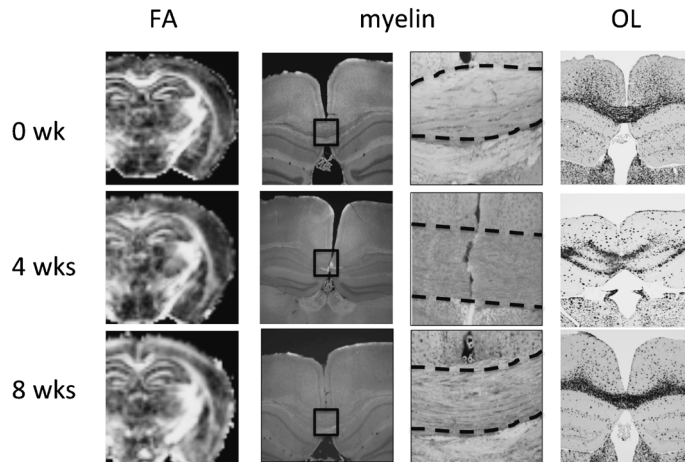


Fig. 2. MRI images & histological examples

Fig. 2 に示した．各ポイントを比較すると，特に脳梁においては投与前，投与後，回復後で明らかなシグナルの増減を確認することができた．この結果を踏まえ，MRI 画像と組織学的解析の結果をそれぞれ数値化し，群間比較を実施した結果を Fig. 3 に示した．通常の飼料に切り替えてから 1 週間の時点では，細胞動態や髄鞘の免疫染色からも分かるように脱髄はいまだに進行しており，MRI でも脱髄の最も進行したポイントがピークとなることが確認された．この MRI でのシグナルの変化と組織学的評価を比較すると，最も有意な相関があったのは髄鞘と FA，および MK であった．

Fig. 3 より髄鞘が同程度であるときは投与 3 週と 6 週であると確認された．この時，各細胞動態を t 検定により比較すると有意な違いを検出した．同様の解析を各拡散パラメータで行ったところ有意な違いは検出できず，細胞動態で示される脱髄と再髄鞘化の違いを拡散 MRI により判別することは困難であった．以上のことは，拡散 MRI は純粋な構造の変化を鋭敏に検出することは可能であるが，類似しているが活動状態の異なる脳内を判別することは困難であることを示唆している．しかし，本研究により，拡散 MRI は程度の異なる髄鞘の構

造状態と相関し，高精度に判別することが可能だと示唆された．これは，今後の髄鞘変性疾患を観察する上での強力な根拠となるだけでなく，脳における病態の進行状態の非侵襲的な診断ツールへの発展が期待される．

結 語

脱髄および髄鞘化などの髄鞘の変化に対し，拡散 MRI は実際の脳内の髄鞘の程度に応じた感度の高い変化を示すことを明らかにした．髄鞘の動態に関しての判別は拡散 MRI 単独では困難であるが，MRS⁸⁾ などとの併用による非侵襲的な髄鞘変性疾患評価法につながることを期待される．

文 献

- 1) Chandran P, Upadhyay J, Markosyan S, et al. : Magnetic resonance imaging and histological evidence for the blockade of cuprizone-induced demyelination in C57BL/6 mice. *Neuroscience* 2012 ; 202 : 446-453
- 2) Matsushima GK, Morell P : The neurotoxicant, cuprizone, as a model to study demyelination and remyelination in the central nervous system. *Brain*

超高磁場拡散 MRI で脱髄を追う

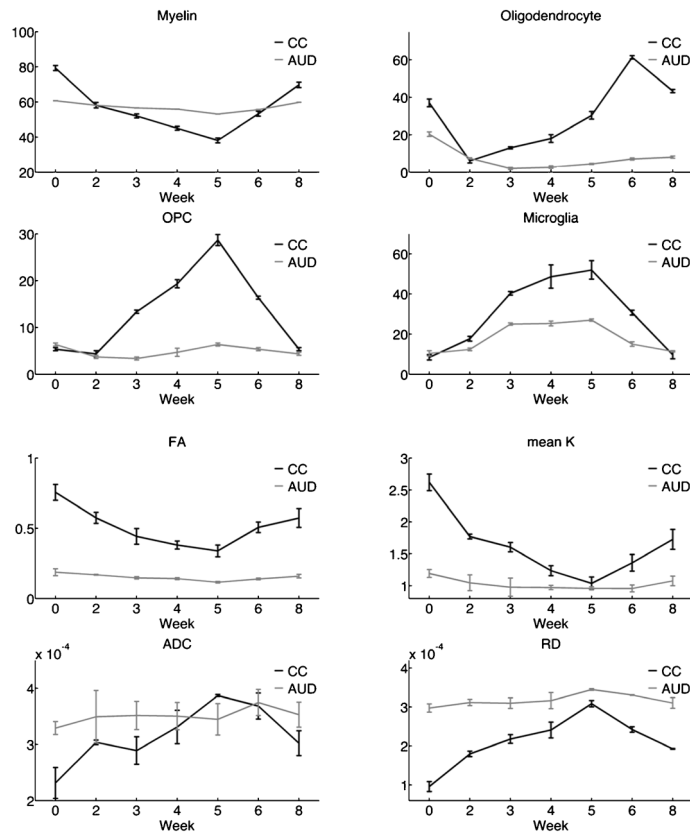


Fig. 3. MRI & histological analysis results

- Pathol 2001 ; 11 : 107-116
- 3) Thiessen JD, Zhang Y, Zhang H, et al. : Quantitative MRI and ultrastructural examination of the cuprizone mouse model of demyelination. NMR Biomed 2013 ; 26 : 1562-1581
 - 4) Torkildsen O, Brunborg LA, Myhr KM, Bø L : The cuprizone model for demyelination. Acta Neurol Scand Suppl 2008 ; 188 : 72-76
 - 5) Skripuletz T, Lindner M, Kotsiari A, et al. : Cortical demyelination is prominent in the murine cuprizone model and is strain-dependent. Am J Pathol 2008 ; 172 : 1053-1061
 - 6) Tabesh A, Jensen JH, Ardekani BA, Helpert JA : Estimation of tensors and tensor-derived measures in diffusional kurtosis imaging. Magn Reson Med 2011 ; 65 : 823-836
 - 7) Falangola MF, Guilfoyle DN, Tabesh A, et al. :

- Histological correlation of diffusional kurtosis and white matter modeling metrics in cuprizone-induced corpus callosum demyelination. NMR Biomed 2014 ; 27 : 948-957
- 8) Praet J, Orije J, Kara F, et al. : Cuprizone-induced demyelination and demyelination-associated inflammation result in different proton magnetic resonance metabolite spectra. NMR Biomed 2015 ; 28 : 505-513

Following Demyelination with Ultra-high-field Diffusion MR Imaging [Presidential Award Proceedings]

Ryutaro YANO¹, Junichi HATA¹⁻³, Fumiko SEKI^{1,2},
Ryosuke ISHIHARA¹, Yuji KOMAKI^{1,2}, Keigo HIKISHIMA⁴,
Kenji F. TANAKA⁵, Hideyuki OKANO¹

*¹Department of Physiology, Keio University School of Medicine
35 Shinanomachi, Shinjuku-ku, Tokyo 160-0016*

²Central Institute for Experimental Animals

³Institute of Physical and Chemical Research

⁴Okinawa Institute of Science and Technology Graduate University

⁵Department of Neuropsychiatry, Keio University School of Medicine

For a comprehensive study of neurological structure, the value of the evaluation method using DTI is increasing. Although the association with the myelin sheath is said to be deep, no detailed study on the extent of myelin and conditions is available. We evaluated the reversibility of demyelination by ultra-high magnetic field diffusion MRI and immunohistochemistry in mouse models that were administered cuprizone. DTI sensitively detected and correlated the changes in the actual brain structure with the changes in the myelin sheath. It was not affected by the difference in the states of the brain caused by demyelination and remyelination.