

Topical Magnetic Resonance (TMR) による虚血脳の *in vivo* エネルギー代謝の研究—EEG, γ -CBF との対比および PFC, グリセロールの治療効果に関して—

In vivo ^{31}P -NMR Studies on Cerebral Ischemia Using Topical Magnetic Resonance (TMR)—Correlation with EEG and γ -CBF and the Therapeutic Effect of PFC and Glycerol—

堀川義治 (京都府立医科大学脳神経外科)
 成瀬昭二 (同 上)
 田中忠蔵 (同 上)
 平川公義 (同 上)
 西川弘恭 (京都府立医科大学第一生理)
 亘 弘 (岡崎国立共同研究機構生理学研究所)

キーワード

in vivo ^{31}P -NMR spectrum, TMR, cerebral ischemia, PFC, glycerol

要 旨

Sequential metabolic changes in the rat brain were observed *in vivo* by using topical magnetic resonance (TMR) of ^{31}P -phosphorus during the course of transient cerebral ischemia and its recovery by restoration of circulation. Electroencephalography (EEG) and regional cerebral blood flow (γ -CBF) were also measured simultaneously.

The experimental cerebral ischemia was rendered to 35 Wistar rats by the method of Pulsinelli and Brierley. Reinstatement of the blood circulation to the cerebrum were made by untying the ligation of the common carotid arteries in 30 minutes after the ischemia.

^{31}P -NMR spectra, γ -CBF and EEG recovered in all cases of 30-minute ischemia. But there were marked discrepancy among them during the course of recovery from the ischemia.

Reversible changes of ^{31}P -NMR spectra were not observed in all cases of 120-minute ischemia and in a half case of 60-minute ischemia.

Effects of PFC (perfluorochemicals) and glycerol on the vulnerability of the brain after transient ischemia were proved by monitoring the *in vivo* ^{31}P -NMR spectrum.

1 はじめに

従来エネルギー代謝に関する研究は *in vitro* の系で、生化学的分析、定量を行う事により、高エネルギーリン代謝産物を測定する手法を用いて行われてきた。しかしこの方法では組織をとり出す際に、急速に進行する酵素反応を止めておく必要があり、また測定に際しては抽出等の処理をする必要がある。更に組織を取り出してしまうために、同一組織での時間経過を追う事が出来ない等の点が問題となっていた。最近 NMR 法の進歩により生体中で、ある関心領域から *in vivo* ^{31}P -NMR spectrum を得ることの出来る Topical Magnetic Resonance (TMR) が開発され注目を集めている。

一方、脳虚血における病態解析や治療は、近年臨床医学上重要な課題となっており、この病態時の脳内エネルギー代謝に関する研究も重要視されてきた。そこで我々は脳虚血時の脳内エネルギー代謝の研究に TMR 法を用い、同時に脳波、局所脳血流量の測定を行い比較検討を行った。更に治療薬剤の効果判定を、TMR 法を応用して行った。

2 方法

1 実験的脳虚血の作成

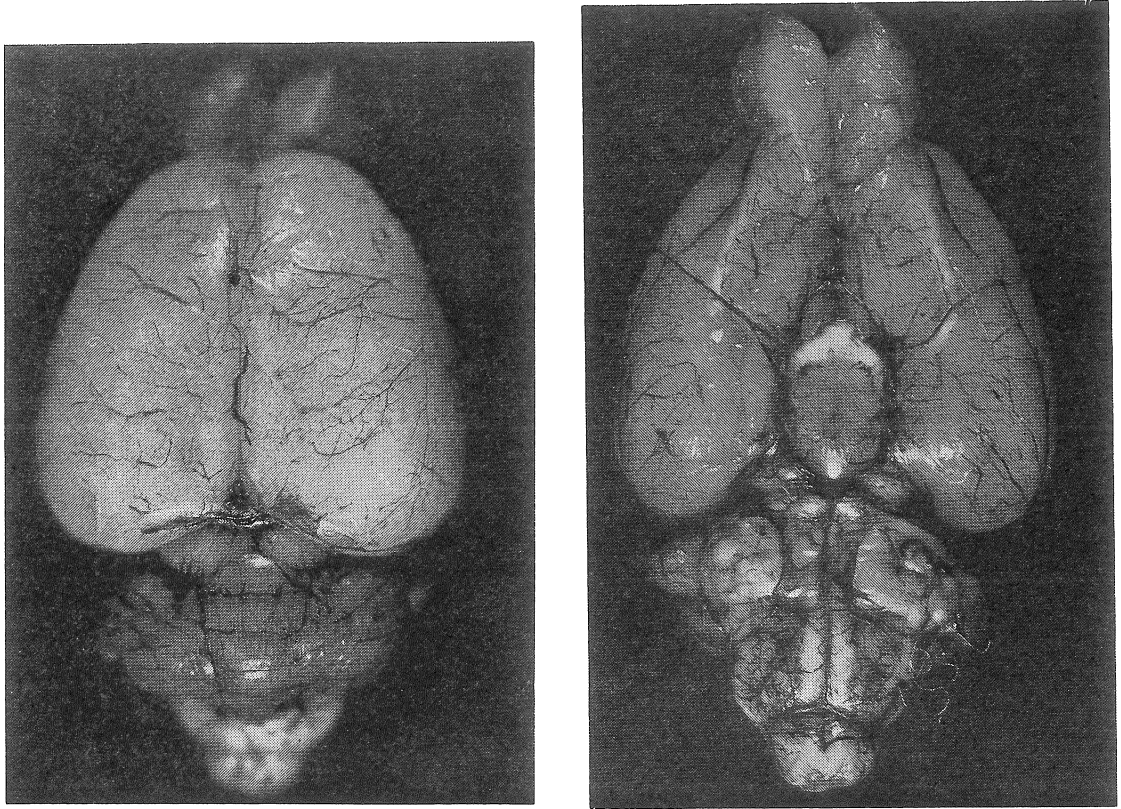
体重 200g の Wistar rat 35 尾を用い Pulsinelli と Brierley らの報告に従って^{14), 15)}、4 主幹動脈閉塞による脳虚血モデルを作成した。Pentobarbital 35mg/kg 腹腔内投与にて麻酔後、手術用顕微鏡

下に両側側頭筋、後頭部の筋肉を切除した。これは TMR 測定の際に筋肉からの signal が出来るだけ除かれる様に行った。第一頸椎の高さで alar foramen において両側椎骨動脈を電気凝固した。次いで両側の総頸動脈を露出し、絹糸にて結紮し、大脳全体にわたる虚血を作成した。再開通は、両側総頸動脈における結紮糸を手術用顕微鏡下に解除することにより行った。このモデルでは、脳幹、小脳の血流は前脊髄動脈を介しある程度確保されており、呼吸は障害されない。また虚血中の動脈血ガス分析を施行したが、その結果正常範囲内に保たれている事を確認した。図 1 は 4 主幹動脈結紮中に左心室から墨汁を注入したものの脳の背面と腹側面、およびこのモデルの模式図である。小脳、脳幹部、嗅脳は墨汁により黒染されているが、大脳半球は両側共に黒染されておらず、このモデルにおける虚血の範囲を明瞭に示している。

2 TMR 測定

TMR-32 spectrometer (Oxford Research Systems, Oxford, England) を使用した。この装置は超伝導磁石を用いており、磁場強度 1.8 Tesla、口径 20cm である。Profile coil により 1.5cm から 4.0cm 直径の球状の焦点磁場を作成出来る。測定には直径 1.8cm の焦点磁場を用い、共鳴周波数は ^{31}P で 32.5MHz で行い、直径 1.3cm の four-turn surface coil を用いた。パルス幅は 10 μsec で、くり返し時間 1 秒で 125 回から 500 回の加算を行い、フーリエ変換して ^{31}P -NMR スペクトルを求めた。

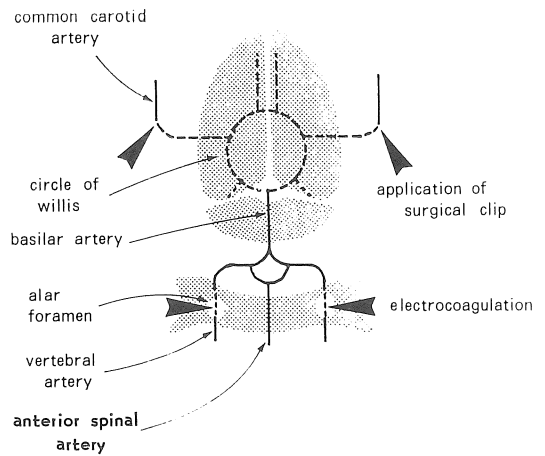
ラットはプラスチックテーブルに仰臥位に固定し、設定した焦点磁場内にラット頭部が位置する



(a)

(b)

图 1 大鼠脑的背侧 (a) 和腹侧 (b) 视图，经左侧心室灌注印度墨水，在 4 血管闭塞后。注意小脑、脑干和嗅叶被灌注，而双侧大脑半球未被灌注。该模型示意图由 Pulsinelli 和 Brierley (c) 报告。



(c)

様に固定し, surface coil が頭部に接する様に位置付けをして測定した. 虚血時間は 30 分, 60 分, 120 分の各群に分け, 各々で虚血前, 虚血中, 再開通後のスペクトルの変化を経時的に同一個体で観察した. また同一個体を用いて脳波を頭蓋骨上からモニターし, 脳の機能の指標とした.

3 局所脳血流量 (γ -CBF) の測定

本モデルの虚血の程度, および血流再開通後の γ -CBF の変化を知る目的で, 30 分間虚血群について検討した. 方法は水素クリアランス法を用いた. 直径 0.5 mm, 長さ 5 mm の水素電極を前頭頭頂部に設けた小穿孔から脳内に刺入し, 尾状核部から記録を行った. この際 rat を pancronium bromide にて非動化し, 自家製人工呼吸器を装着して調節呼吸を行った. 測定中動脈血ガス分析の値は正常範囲内にあることを確認した. 水素ガスは人工呼吸器を通して一定流量を気管チューブから流入させた. 使用した機種はユニークメディカル社製水素クリアランス式組織血流計 UH メーター PHG 201 を, 記録計には D 2 R-1 M を使用し, 血流量算出にはユニークメディカル社製デジタルデータユニット DDU-100 を使用した. 演算には height-over area method を用いた.

4 治療効果の検討

治療群としては perfluorochemicals (PFC, Fluosol-DA, 20%) 20 ml/kg を虚血前 30 分に静脈内に投与した. Glycerol は総頸動脈の結紮解除前 30 分 10% w/v glycerol 1g/kg を静脈内に投与した. この際結紮時間を 240 分まで延長して経時的に ^{31}P -NMR スペクトルの変化を観察し, 治療効果の検討を行った.

3 結果

正常 Wistar rat の脳から得た ^{31}P -NMR スペクトルを図 2 (a) に示す. 幅の広い高さの低い波

の上に数種のピークが認められる. 各々のピークは高磁場側からその chemical shift により I: β -ATP, II: α -ATP, α -ADP, NAD^+/NADH , III: γ -ATP, β -ADP, IV: phosphocreatine (PCr), V: phosphodiester, VI: inorganic phosphate (Pi), VII: sugar phosphate と同定された¹²⁾.

虚血時間を 30 分とし, 虚血前, 虚血中, 総頸動脈の血流を再開通させた後の経過を, 脳波の記録と合わせて図 2 に示す. 虚血後 ^{31}P -NMR スペ

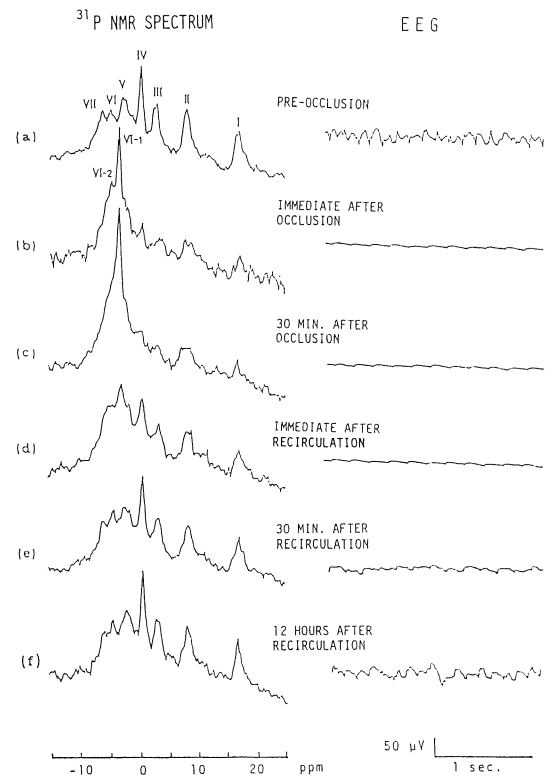


図 2 Sequential change of ^{31}P -NMR spectra and EEG in the rat brain during ischemia and restoration of circulation after 30 minutes of ischemia.

クトルは直ちに著明な変化を来した. すなわち Pi は著明に増加し, ATP の各ピークは減少した. この変化は虚血中次第に増強した. また Pi のピ

ークは高磁場側に偏位し、虚血30分後には偏位は最も大きくなった。脳波は虚血後直ちに平坦化し、虚血時間中持続した。30分間の虚血後、両側総頸動脈の血流を再開通させると、 ^{31}P -NMR スペクトルは急速に回復し始め、30分後にはほぼ虚血前のパターンに復した。一方脳波の回復は遅れ、虚血前のパターンに回復するのに約12時間を要した。この様に虚血後の脳エネルギー代謝と、機能の回復の間にはかなりの時間的なずれが存在していた。

Piのピークの chemical shift からは組織の pH を算出することが出来る¹⁶⁾。脳組織の pH は虚血前7.27から虚血30分後には6.52と変化していることになり、虚血により脳組織が酸性化したことがわかった。血流再開後はスペクトルパターンの回復と同時に Pi の chemical shift も回復し、30分後には元の位置に復した。また図2のスペクトルを注意深く観察すると、ピークVIは2本のピ

ークに分かれている (VI-1, VI-2)。これは虚血に対して筋組織の抵抗性が高く、筋組織内の Pi が偏位せずにもとの位置のままに出現し、脳組織に由来するピークとは分かれてきたものと考えられる。

水素クリアランス法にて測定した局所脳血流量の結果を ^{31}P -NMR スペクトルの結果と合わせて図3に示す。虚血により γ -CBF は本法では測定出来るレベル以下にまで低下した。再開通直後には γ -CBF は虚血前の値の約150%の値に上昇し (postischemic hyperemia)、その後次第に低下してゆき、90分後には虚血前の約60%の値を示した (postischemic hypoperfusion)。

一方虚血時間を種々に延長してゆき、血流再開後の ^{31}P -NMR スペクトルの回復の有無を検討した。表1の左端にその結果を示す。虚血時間を120分にまで延長すると全例で、60分間虚血例ではその半数で、 ^{31}P -NMR スペクトルの回復はみ

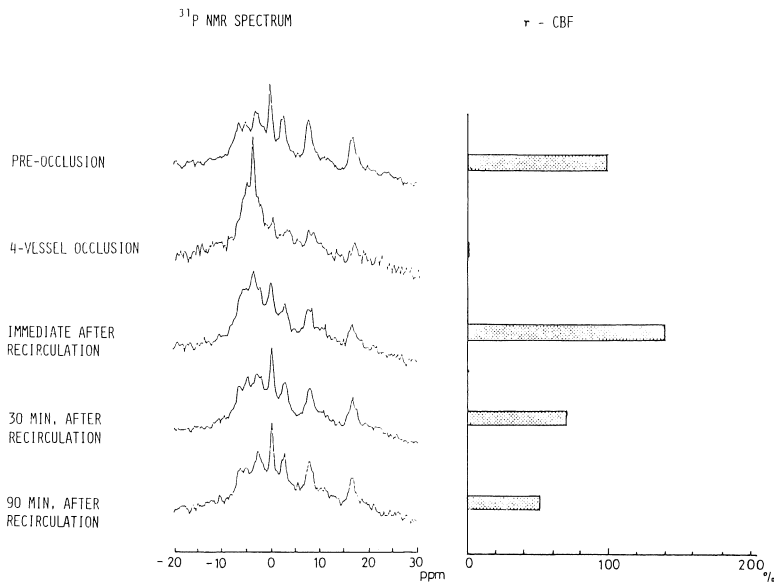


図3 Sequential changes of ^{31}P -NMR spectra and γ -CBF during ischemia and restoration of circulation after 30 minutes of ischemia. Regional CBF was expressed as the percentage compared with the control value.

表 1 Cases of recovery in ^{31}P -NMR spectrum after recirculation following various duration of ischemia with or without treatment.

DURATION OF C. C. OCCLUSION	UNTREATED	TREATED WITH PFC	TREATED WITH PFC AND GLYCEROL
30 MIN.	15 (15)	—	—
60 MIN.	3 (6)	—	—
120 MIN.	0 (6)	8 (8)	—
240 MIN.	—	0 (4)	4 (5)

PFC: Fluosol-DA 20 ml/kg i. v. 30 min. before C. C. occlusion

GLYCEROL: 1g/kg i. v. 30 min. before recirculation

(): examined cases

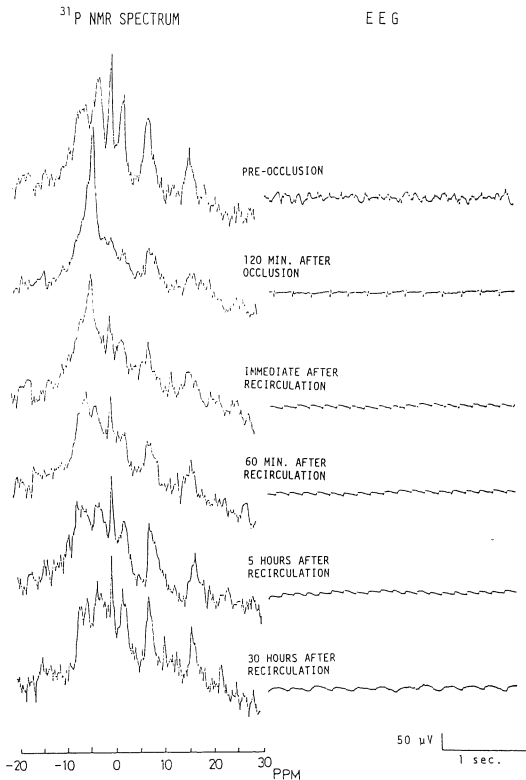


図 4 Sequential changes of ^{31}P -NMR spectra and EEG in the rat brain during ischemia and restoration of circulation after 120 minutes of ischemia. This rat was treated with PFC.

られなかった。

次に PFC, Glycerol による治療効果を ^{31}P -NMR スペクトルの回復の有無を目安として検討した。結果を表 1 に示す。正常ラットに PFC, Glycerol を投与した場合、スペクトルパターンには変化はみられなかった。虚血 30 分前に PFC (Fluosol-DA) を静脈内に投与した場合には、120 分間の虚血にもかかわらず、全例で ^{31}P -NMR スペクトルの回復がみられた。典型的な例を、同時に記録した脳波と共に図 4 に示した。 ^{31}P -NMR スペクトルはすみやかに回復してきたが、脳波は 30 時間後にもまだ回復を示さず、平坦なままであった。更に虚血時間を 240 分にまで延長すると、PFC の投与にもかかわらずスペクトルの回復は全例でみられなかった。さらにこの場合、血流再開前 30 分に Glycerol を静脈内に投与すると 80% の例で、一時的に ^{31}P -NMR スペクトルの改善傾向が認められた。

4 考 察

1974 年に生体の ^{31}P -NMR スペクトルがはじめて測定されて以来⁴⁾、生体のエネルギー代謝を非侵襲的に、定量的に測定する手段として、 ^{31}P -NMR は注目を集めてきた。しかし多くの研究は、分離された組織、器官を用いたもので、*in vivo* での測定とはいえなかった^{2), 4), 9), 13)}。近年 surface

coil を用いることにより生体表面近くの情報を *in vivo* で取り出すことが出来る様になった⁶⁾。更に、TMR (Topical Magnetic Resonance) の方法が開発され、生きたままの状態では生体の深部に位置する組織、器官から ³¹P-NMR スペクトルが得られる様になった^{10), 11), 12), 17)}。

従来、surface coil 法あるいは TMR 法を用いて、虚血脳の ³¹P-NMR スペクトルを観察した報告は散見される⁶⁾。しかし虚血脳の可逆性に言及した報告は少ない。そこで我々は TMR 法を用いることにより、*in vivo* の系で、虚血脳の可逆性について検討を行った。

虚血による ³¹P-NMR スペクトルの変化は、従来の報告と同様に、PCr, ATP の各ピークの減少と Pi の増加およびその高磁場側への偏位で総括される変化を示した。*in vitro* における生化学的方法を用いた報告によると、虚血脳でのエネルギー代謝は、一定時間内の虚血後血流を再開通させると、可逆的な変化を示すといわれている^{2), 5), 7), 8), 18)}。我々は *in vivo* の系でこの事実を実証し、すでに報告した^{10), 11), 12)}。では、虚血および血流再開後の脳内での血流、機能はどのような変化を生じているのだろうか。今回の実験はラット主幹4動脈結紮モデルについて行われたものであるが、TMR 測定と同一個体から連続的に記録した脳波の結果から考えると、脳の機能もこのモデルにおいては可逆的なものであった。しかしエネルギー代謝の回復過程との間には、明らかな時間的ずれが存在していた。一方局所脳血流量の変化も、血流再開後、一過性の hyperemia の時期を経て hypoperfusion へと移行するという dynamic な変化を示し、³¹P-NMR スペクトル、EEG の回復過程のいずれとも異なる経過をたどった。

以上、今回我々の行った実験からは、虚血により ³¹P-NMR スペクトル、EEG、 γ -CBF は直ちに低下し、30分間の虚血後血流を再開通させると、³¹P-NMR スペクトル、EEG、 γ -CBF は回復するが、その回復の過程には解離が存在すること

が *in vivo* の系で確認されたのである。

では何故このような解離が存在するのだろうか。脳は血液によって運ばれる酸素、glucose により、好氣的な条件でエネルギー代謝を維持し、その機能を営んでいる。我々の行った実験では1回の ³¹P-NMR スペクトルの測定に125~500秒の時間を要し、1回の γ -CBF の測定にも10~15分を要する。そこでこの時間よりも早く生じる変化をとらえる事は出来ないことになる。すなわち、虚血に陥る過程を細かく解析する事は出来なかった。しかし血流再開後の回復の過程において、まず γ -CBF が回復し、次いで ³¹P-NMR スペクトルの回復、最後に脳波の回復という時間的経過での解離が観察されたことは意義ある事と思える。言いかえると、血流が回復しなければエネルギー代謝は回復せず、エネルギー代謝の回復がなければ機能の回復はないのである。この意味で、³¹P-NMR スペクトルは脳波よりも鋭敏に病態の変化をあらわすものと言える。

一方、局所脳血流量では血流再開後、hyperemia, hypoperfusion 等の時期を有しながら ³¹P-NMR スペクトルにはこれに相当する変化がみられず、正常のパターンに回復した。これはエネルギー代謝を維持するためには、ある閾値とも言える値以上の血流量が必要であり、その値以下になった場合にはじめてエネルギー代謝の障害として現われてくるものと思える。Astrup らは虚血脳では活動電位の障害はエネルギー代謝の障害よりも少ない血流低下で生じるとし、また長時間の虚血脳では、脳の integrated function としての脳波は、エネルギー代謝よりも回復が遅れるという事実をあげている¹⁾。我々の結果は *in vivo* の系で実験的にエネルギー代謝、局所脳血流量、脳波の間でのこのような関係を実証したものと思える。また空間的にも、虚血巣周囲にこのような虚血への移行型とも言える病態が存在する可能性を示唆するものと思える。

次に Pulsinelli と Brierley による脳虚血モデル

ではどの位の虚血時間が不可逆的な障害を脳に与えるかという点で、 ^{31}P -NMR スペクトルの回復を指標として検討を加えたわけであるが、今回の実験からは約 60 分前後の虚血時間がこの critical point になっている事がわかった。このモデルは前脊髄動脈を介した側副血行が存在する。ラットの不完全虚血である。今回の結果を、虚血の程度、範囲の異なる他のモデルと直接比較するには問題があるが、大筋において今までの報告ともほぼ一致する値である。一方、我々の行った anoxic anoxia に関する実験の結果では、critical point は 4~6 分にあり⁷⁾、虚血性脳障害と無酸素性脳障害との障害の種類の差異によるものとして、非常に興味深いものである。

30 分間虚血の多くの例では、一度 EEG, γ -CBF, ^{31}P -NMR スペクトルの回復をみたわけであるが、その後数日経た後にラットは死亡するものが多い。この原因についての検討は今回行っていないが、虚血による脳損傷の全体を知る上で今後検討してゆかねばならない問題点と考えている。

一般に *in vitro* の研究により、虚血脳では脳浮腫を伴い、血流再開後には vasogenic factor の増大により虚血性脳浮腫が増強され、更に強い脳損傷を来たすと言われている。また長時間虚血後再開通を行ったものは、剖検にて大脳全域の著明な腫脹を生じており、再開通後の脳浮腫が重大な病態となっていることが考えられた。我々が治療薬として用いた PFC は、その作用機序から考え、酸素運搬能を高める事で虚血性脳損傷の軽減に効果を有し、更に Glycerol は浸透圧効果により虚血性脳浮腫の軽減に効果を示したものと思われる。これらの薬剤の効果が、エネルギー代謝の回復を指標として *in vivo* の系で今回明らかにされたものとする。

今回の実験において、 ^{31}P -NMR スペクトル、EEG, γ -CBF を比較検討する事により、虚血後のエネルギー代謝および機能の可逆性について検討

を行ってきた。更に PFC, Glycerol 等の薬剤の影響を検討する事により、血流再開後の脳浮腫の影響がエネルギー代謝の回復に大きく関与している事が *in vivo* の系で確認された。

今日 NMR は臨床的にも NMR-CT として広く普及しつつある。現段階では ^1H を用いた画像に注意が向けられているが、これに加えて一部では ^{31}P -NMR スペクトルをヒトで測定し、診断に応用しようという試みもある。

TMR の利用は以上の様に *in vivo* の系を対象として大きな利点を持っている。しかしまだ改善すべき点は多く残されている。TMR 装置そのものの性能の向上はいうまでもないが、 ^1H , ^{31}P のみならず他の核種への応用も期待される。また NMR 法では磁場の均一性が要求されるため、今回の実験でも γ -CBF を TMR 測定とは同時にモニターする事が出来ず、別の個体で測定したのであるが、一般には、磁場に影響を与える計測器を装置内に持ち込む事が出来ない。そこで磁場に影響のない各種測定機器および方法の開発も待たれるところである。いずれにせよ、 ^{31}P -NMR スペクトルにより生体のエネルギー代謝の研究は *in vitro* から *in vivo* への大きな方法論的改革もたらされつつあり、本法の今後の限りない発展が期待される。

文 献

- 1) Astrup, J., Siesjö B.K. and Symon, L.: Thresholds in cerebral ischemia — The ischemic penumbra. *Stroke*, 12: 723-725, 1981.
- 2) Carter, L.P., Yamagata, S. and Erspanner, R.: Time limits of reversible cortical ischemia. *Neurosurgery*, 12, 620-623, 1983.
- 3) Hollis, D.P., Nunnchy, R.L., Taylor, G.J., Weisfeldt, J.L. and Jacobus, W.E.: ^{31}P -NMR studies of heart physiology. *J. Mag. Reson.*, 29: 319-330, 1978.
- 4) Hoult, D.I., Busby, B.J.W., Gadian, D.G., Radda, G.K., Richards, R.E. and Seeley, B.J.:

- Observation of tissue metabolites using ^{31}P nuclear magnetic resonance. *Nature*, **252**: 285-287, 1974.
- 5) 小暮久也: 血行再建と脳のエネルギー代謝. *脳外* **8**: 313-329, 1980.
 - 6) Kogure, K., Namon, R., Alonso, O.: Nuclear magnetic resonance—Brain imaging and high energy phosphates. *J. Carebr. Blood Flow Metabol* **1**, Suppl., 1: s 70-s 71, 1981.
 - 7) Levy, D. E. and Duffy, T. E.: Cerebral energy metabolism during transient ischemia and recovery in gerbil. *J. Neurochem.*, **28**: 68-70, 1977.
 - 8) Ljunggren, B., Ratchenson, R. E. and Siesjö, B. K.: Cerebral metabolic state following complete compression ischemia. *Brain. Res.*, **73**: 291-307, 1974.
 - 9) McLaughlin, A. C., Takeda, H. and Chance, B.: Rapid ATP assays in perfused mouse liver by ^{31}P NMR. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **76**: 5445-5449, 1979.
 - 10) 成瀬昭二, 堀川義治, 田中忠蔵, 平川公義, 西川弘恭, 肥塚 泉, 高田宗春, 亘 弘: Topical magnetic resonance (TMR) による虚血脳の *in vivo* エネルギー代謝の研究—虚血時および再開通時のリン化合物の経時的変化—. *脳神経*, **35**: 603-609, 1983.
 - 11) Naruse, S., Horikawa, Y., Tanaka, C., Hirakawa, K., Nishikawa, H. and Watari, H.: *In vivo* measurement of energy metabolism and the concomitant monitoring of electroencephalogram in experimental ischemia. *Brain Res.* (296: 370-372), 1984.
 - 12) Naruse, S., Takada, S., Koizuka, I. and Watari, H.: *In vivo* ^{31}P NMR studies on experimental cerebral infarction. *Jpn. J. Physiol.* **33**: 19-28, 1983.
 - 13) Nishikawa, H., Fujii, T., Yamada, S., Yoshizaki, K. and Watari, H.: ^{31}P nuclear magnetic resonance study on perfused brain slices of guinea pig. *J. Biochem.* **87**: 663-666, 1980.
 - 14) Pulsinelli, W. A. and Brierley, J. B.: A new model of bilateral hemispheric ischemia in the unanesthetized rat. *Stroke*, **10**: 267-272, 1979.
 - 15) Pulsinelli, W. A., Levy, D. E. and Duffy, T. E.: Regional cerebral blood flow and glucose metabolism following transient forebrain ischemia. *Ann. Neurol.*, **11**: 449-509, 1982.
 - 16) Seo, Y., Yoshizaki, K., Morimoto, T., Murakami, M. and Watari, H.: pH measurement by means of ^{31}P nuclear magnetic resonance and application to biological system. *J. Biochem.*, **94**, 729-734, 1983.
 - 17) 横野 諭, 宮崎正夫, 小栗頭二, 亘 弘, 成瀬昭二: ^{31}P nuclear magnetic resonance を用いた無酸素状態および蘇生時における *in vivo* 脳内エネルギー代謝の研究. *京府医大誌*, **92**: 1227-1232, 1983.
 - 18) Welsh, F. A., O'Corrner, M. J., Marcy, V. R., Spatacco, A. J. and Johns, R. L.: Factors limiting regeneration of ATP following temporary ischemia in cat brain. *Stroke*, **13**: 234-242, 1982.