

脳虚血疾患における脳細胞組織内呼吸と  
代謝反応動態の無侵襲同時評価法の開発

(研究課題番号：09044287)

平成9年—平成10年度科学研究費補助金

(国際学術研究) 研究成果報告書

平成11年3月

研究代表者 犬伏俊郎

(滋賀医科大学・分子神経生物学研究センター・教授)

# 脳虚血疾患における脳細胞組織内呼吸と 代謝反応動態の無侵襲同時評価法の開発

課題番号 09044287

平成9年度－平成10年度科学研究補助金（国際学術研究）研究成果報告書

平成11年3月

研究代表者 犬伏 俊郎

（滋賀医科大学・分子神経生物学研究センター

・教授）

滋賀医科大学附属図書館



1998024736

## はしがき

脳の機能障害は早期の診断と迅速な処置が必須であることは云うまでもない。このために大がかりな装置を必要とせずに脳機能の計測法が待望されている。しかし、各磁気共鳴画像診断法（MRI）や陽電子断層法（PET）をはじめ、実際に人脳機能を計測できる装置は大がかりで、その計測は容易とはいえない。そこで、可視や近赤外光など人体には無害な媒体を利用して脳代謝反応の根幹となる酸素の動態が血中酸素濃度として画像化できる光CT技法の確立が待たれている所以である。人脳ではその大きさと複雑な形態から境界効果や散乱により脳実質における光量子伝搬の減衰が著しく、その実現にはさらに多くの障壁を乗り越えなければならない。そこで脳組織内に複数の極細光ファイバーを頭部表面に装着することでこれらの問題を克服し、あわせて局所の血中酸素濃度が計測でき、空間分解能にも優れた分光光度計の設計・試作を目指した。

本研究ではペンシルヴァニア大学、生物物理学科、チャンス教授等によって開発された人脳用多チャンネル近赤外分光高度計に自作したラット頭部用カップラーを接続して、ラット脳内酸素動態を計測した。本装置は6 cm X 13 cmのスペースに750と830 nmのそれぞれ2対の光源とそれを取り囲む13個の検出器から構成され、それぞれの検出器で検出される信号強度から2波長の吸光度画像が構築できる。一方、この様な分光学的手法では酸素しか計測できないため、脳組織内の代謝過程を無侵襲で正確にモニターできる核磁気共鳴（NMR）法の併用を試みた。ラットに虚血の病態モデルを作成し、核磁気共鳴（MR）装置による断層画像の撮影から、脳内代謝産物濃度マップを構築し、病態の進行や回復過程との関連を解明する。さらに、脳局所におけるグルコースの取り込みとそれに続く解糖系代謝反応ならびにクレブス回路内の回転速度など細胞内の化学反応過程を炭素-13による安定同位体標識を利用して非侵襲的に解析した。

以上、本研究は最新の電磁分光技術を集積・統合することから、さらに迅速、簡便でしかも正確に脳機能代謝が計測できる実用的装置の開発が可能であることを示唆するものであった。

## 研究組織

研究代表者：犬伏 俊郎（滋賀医科大学、分子神経生物学研究センター、教授）

研究分担者：森川 茂広（滋賀医科大学、分子神経生物学研究センター、  
助教授）

研究分担者：椎野 顯彦（滋賀医科大学、医学部、助手）

研究分担者：Takashi Yonetani（ペンシルヴァニア大学、医学部、教授）

研究分担者：Britton Chance（ペンシルヴァニア大学、医学部、名誉教授）

## 研究経費

平成 9 年度	2, 7 0 0 千円
平成 1 0 年度	2, 1 0 0 千円
合計	4, 8 0 0 千円

## 研究発表

- (1) 学会誌等（発表者名、テーマ名、学会誌名、巻号、年月日）
- (2) 口頭発表（発表者名、テーマ名、学会等名、年月日）

## 研究成果

### 1. はじめに

脳内の障害が細胞組織内において生命維持に関わる化学物質のレベルで非侵襲的に把握できる脳機能計測技法が求められている。核磁気共鳴 (MR) 法は生体内の代謝産物を無侵襲で検出できる優れた方法ではあるが、脳の活動に伴う脳内微小循環の変化や、脳内での酸素代謝を計測する点では必ずしも秀でた方法とはいえない。そこで、これらの計測に威力を発揮する可視・近赤外光による分光光度計測法を併用してこの欠点の克服を目指した。これにより、脳組織内の血行動態やヘモグロビンの酸素飽和度に関する情報を加味することから、脳組織内の代謝反応動態を正確に評価できることが期待される。また、このような脳機能計測技法は、脳機能障害の予知、治療計画の策定や、治療効果の判定、そして機能回復過程の追跡といった臨床応用への展開も見込まれるものである。

### 2. 脳内代謝の非侵襲的計測の意義

一方、脳内では唯一のエネルギー源となるグルコースの脳内取り込みは脳の神経細胞のレベルで活動状態を知る鋭敏な尺度である。このグルコースの1-位炭素を $^{13}\text{C}$ で標識し、脳内の取り込まれた $^{13}\text{C}$ をMRで追跡することから、このグルコースの脳内の特定の部位での取り込み速度を求め、脳代謝機能の尺度とすると同時に、グルコースの脳内分布を画像化して、局所的な脳の活動度を詳細に検討するためにきわめて重要な情報になる。さらに、グルコースの取り込みに引き続く代謝過程をグルコースに含まれる $^{13}\text{C}$ 標識にて追跡し、TCA回路内への移行速度と回路内でのグルタミンの代謝回転速度が求められる。もう一つの脳活動の指標とする。同時に肝臓におけるグルコース代謝反応速度を求め、肝ミトコンドリア活性度と肝機能の関連をも知ることができる。

### 3. $^{13}\text{C}$ NMR標識法の意義

生体内の化学物質を画像化する手段として知られるPETは不安定な放射性同位元素を含む薬物を利用するため、その薬物を調製するためのサイクロトロンが必要で、これを含む装置自体が大がかりでしかも際だって高額であり、これが救急医療の現場で検査に利用できる機会はきわめて稀であろう。これに対し、MR装置はPETよりも格段に安価で、しかも、今日、市中病院を含め臨床現場に数多くの装置が導入されているのは衆知の事実である。その上、元来MR法は生体内の化学物質が無侵襲で検出でき、代謝反応に係わる個々の物質を克明に追跡できる優れた利点を持っている。しかも、PETをはじめ医療で用いられる検査法の多くが放射性同位元素を利用し、それを含む試薬は保存や取り扱いが煩雑で、しかも、生体にとって決して安全とはいえないのに対し、NMRの標識化合物、ことに本研究で利用する質量数13の炭素原子 ( $^{13}\text{C}$ ) は安定同位元素であるため、取り扱いが容易で、その上、生体にとっても負荷が軽く、繰り返し何度も投与ができる長所を持っている。このMRが持つ、患者に優しいという特色を最大限に活かし、本研究では脳機能の無侵襲計測法の開発を行った。

NMRにおける標識法の最大の特徴はその標識が含まれる全ての化学物質をNMRスペクトル上で分離・同定できることにある。一般的に放射性同位元素を用いる標識法が標識原子の放射性を測定しているため、標識された出発物質が代謝され、異なった分子に標識元素が移動しても、それを前者と区別できない。この点、NMRの標識法は、分子のなかの原子を一つ一つを識別するために、前駆体とその反応生成物が同時に区別して追跡で、しかもその間の反応経路に関わる個別の化合物が識別できるきわめて有利な特徴を持っている。従って、標識化合物の人体組織への取り込みのみならず、その代謝反応過程が追跡でき、体内での化学変換速度も計測できる。

又、MR画像法は臨床検査手段として日常的に利用される程に定着しているが、これは生体内で最も多量に存在する水分子の中の、しかもNMR信号としては最も測定し易い水素核、 $^1\text{H}$ を測定している。 $^1\text{H}$  MR画像では形態についての情報しか引き出せないが、 $^{13}\text{C}$  MR画像は化学的情報を含むため臨床検査に利用できることにたいする期待が高まっている。

#### 4. $^{13}\text{C}$ NMR信号の高感度検出法

元来、炭素原子は有機化合物の骨格を構成するため広範な有機化合物に含まれ、よって $^{13}\text{C}$  NMRは生体に重要な数多くの有機代謝産物を網羅することができる。しかも $^{13}\text{C}$ の天然存在比が約1%と低いために標識が容易で、個々の有機化合物中の特定の炭素が識別されるためにその反応経路が追跡できる極めて有効な手段として発展してきた。しかし、 $^{13}\text{C}$ 核のNMRはこの様に多くの利点を持つが、その反面NMR感度が $^1\text{H}$ にくらべて1/100程度と極めて低く、ことに長時間の計測が許されない生体試料では、 $^{13}\text{C}$ 標識前駆体の大量投与を余儀なくされるためいまだに生体NMR、ことに臨床での利用が遅れている。そこで感度向上を図るために他核間の多量子相関NMR法を応用して炭素原子に直結する水素原子の $^1\text{H}$ 信号を検出し、間接的に $^{13}\text{C}$ 核の情報を得る方法を採用する。FIG. 1には我々が開発してきた勾配磁場を利用する他核間多量子遷移法のNMRパルス系列を示している。これにより、①  $^{13}\text{C}$ 核の直接測定に比べ64倍高い感度で $^{13}\text{C}$ 核の情報が抽出でき、②極端に長い $^{13}\text{C}$ 核の緩和時間の代わりに短い $^1\text{H}$ 核により早い繰り返し積算が可能、といった利点を持ち、単位時間内での飛躍的なS/Nの向上が得られる。これによりはじめて、生体中では微量で、しかも、たえず消長を繰り返す代謝物質中に標識された $^{13}\text{C}$ を限られた時間内に追跡が可能になる。

#### 5. 近赤外分光法による脳組織内酸素濃度の計測

近赤外(NIR)分光光度計は共同研究者の一人であるペンシルヴァニア大学、医学部、生物物理学科のブリトン・チャンス教授が開発したものをを用いた。本装置は750と830nmの近赤外光源を2対持ち、その周りをダイオード検出器が取り囲む平面のプロープ構造を有し、人前頭葉からの信号検出を主たる目的としている。その大きさは6cm X 13cmで、光源と検出器の距離は約3cm程度である(写真1、2)。今回、我々はラット頭部からの信号検出のために、長さ1mの光ファイバーを用いてこの検出器のラット頭部用アダプターを作成した。その装着部を写真3に示す。実験ではラット頭部の表皮・筋肉を剥離して、頭蓋骨を露出させ、そこに装着部(写真3)の光ファイバーが直接頭蓋骨に接触するようにアダプターを設置した。この様なアダプター装着によるラット頭部

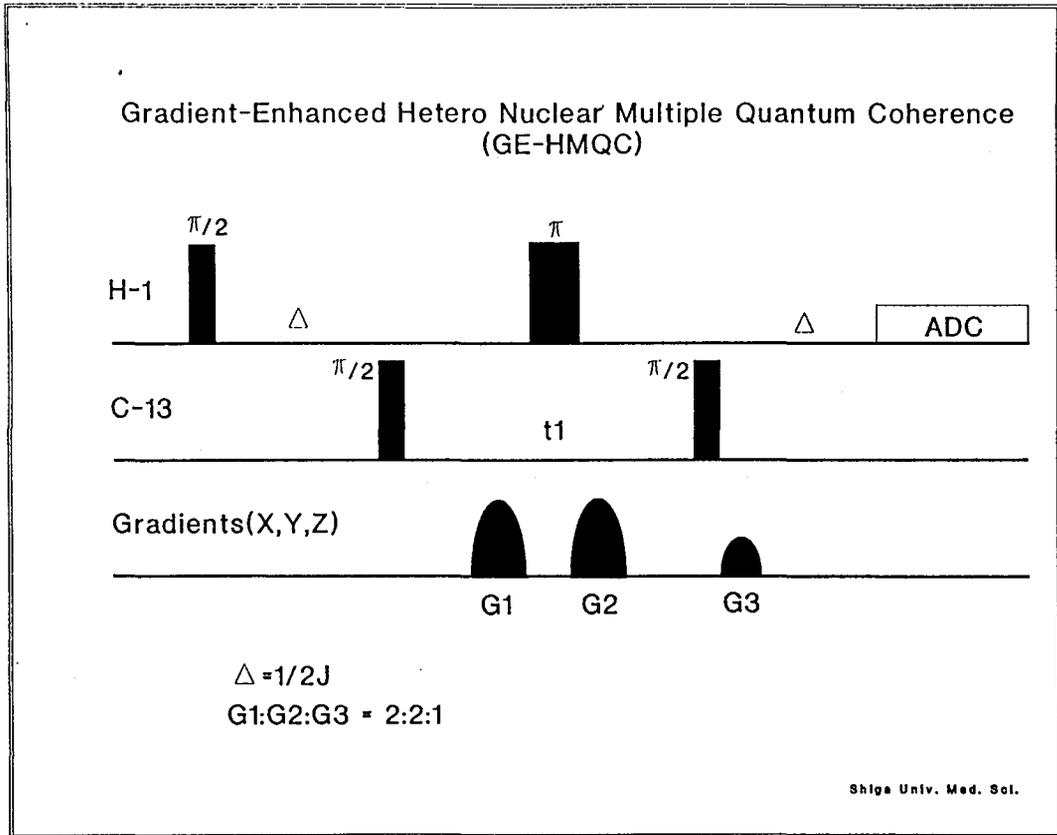


Fig. 1 HMQC法のパルス系列ダイアグラム

からの信号計測中の場面を写真4に示した。

本装置の検出器は750と830nmの一对の光源中心に設置し、それを取り巻く半径約3mmの円周上に検出用の光ファイバーを配置した。そして、この配置が2組構成できる様にもう一对の光源にさらに5個の検出用ファイバーを設置し、合計13個の検出器で信号計測を行った。光源750nmは酸素化型(オキシ)ヘモグロビンに特有の吸収波長に、そして、光源830nmは非酸素化型(デオキシ)ヘモグロビンの吸収に相当する。Fig. 2には各検出器で測定された両波長の吸光度の変化をプロットしたもので、赤色は750nm、緑色は830nmに対応する。1回の測定には約30秒を要し、縦線で囲まれた部分は2分間の100%窒素ガスの吸入による低酸素状態を、その他の部分は100%酸素の吸入を示している。Fig. 2の図上ではラット大脳の前部が上、後部が下に対応する。例えば、Fig. 2上段中央(前中央部)では低酸素状態のときには赤色の750nmの吸光度、すなわち、オキシ・ヘモグロビンの濃度が漸次減少し、これとは反対に緑色、830nmの吸光度、すなわちデオキシ・ヘモグロビンの濃度が増加していることが分かる。このような変化は全3回の低酸素状態で同様に観察され、酸素吸入時には両波長の吸光度が基線へ戻る事が認められた。従って、脳内の血中酸素濃度の動態を近赤外光で計測できることを示している。

また、このような計測において両波長の吸光度の和はヘモグロビンの全量に対応し、83

0 nmの吸光度と750 nmにおける吸光度の差は血中デオキシ・ヘモグロビンの濃度に対応する。Fig. 3には各検出器における吸光度から得たデオキシ化と血液容量の画像を示した。本図では左側がラット脳の前部、右側が後部に対応する。図から分かるように、大脳前部の広範な領域において低酸素状態では顕著なデオキシ化が見られる。しかし、後半部では信号強度の変化が前部に比べて小さいために変化が観察されなかった。これは、光源のラット頭部への装着が不適切で光の脳内への供給が不十分であったことが類推される。一方、ヘモグロビンの全量は低酸素状態でも大きな変化を示さないことが明らかになった。

## 6. EPI-HMQC法による高速2次元化学シフト画像

前述のHMQC法のパルス系列に位置情報を加味する位相エンドード磁場勾配パルスを加えることで<sup>1</sup>H MRによる<sup>13</sup>C NMR信号の1次元、及び、2次元化学シフト画像が得られる。NMR信号としては高感度の<sup>1</sup>H核を利用しているとはいえ、生体内で低濃度の<sup>13</sup>C-標識代謝産物を計測するには長大な時間を必要とする。そこで、計測時間の短縮を目指して、MR画像の高速スキャン法として代表されるエコー・プラナー (EPI) 法を本方法に取り入れ、<sup>13</sup>C MR信号の高速撮像を試みた。

以上、NMR及びNIR法で得られた知見をまとめた。これらはいずれも基本的には、脳病態の非侵襲的検出を目指したものである。したがって時間的な問題さえ解決すれば、複数の分析を同一個体に対して行うことが可能である。これらの手法や他の診断法が有機的に結びつけば、個々の情報の意義も飛躍的に向上する。統合的な代謝評価を目指したこうした取り組みの蓄積が、近い将来の脳機能の無侵襲計測に必ず役立つと確信する。

最後に、文部省科学研究費補助金の交付に対し、深く感謝の意を表します。

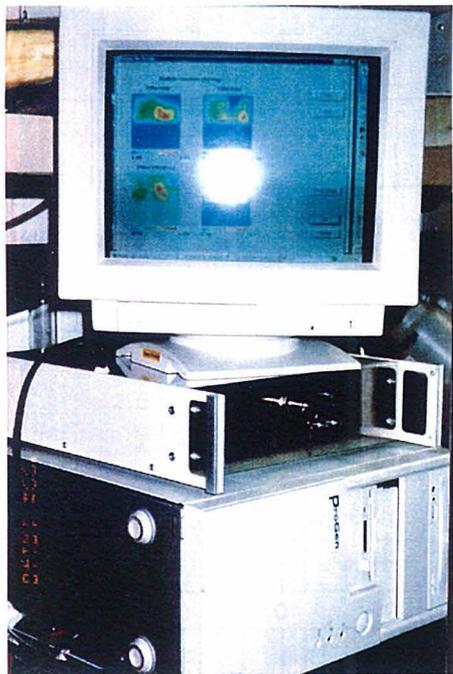


写真1

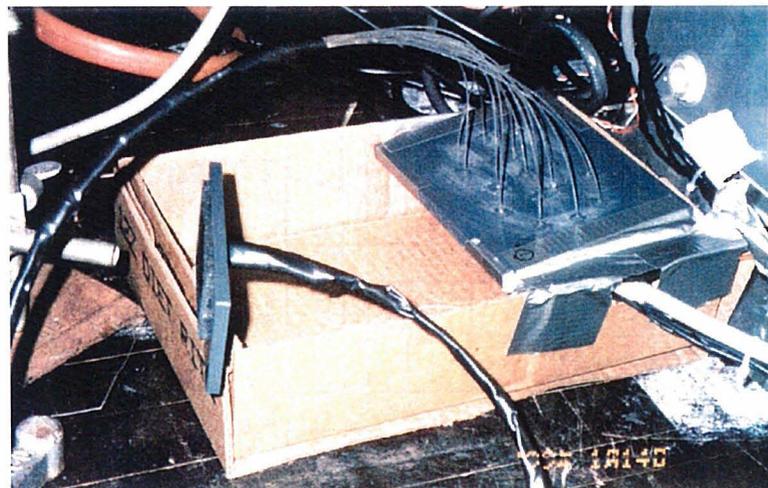


写真2

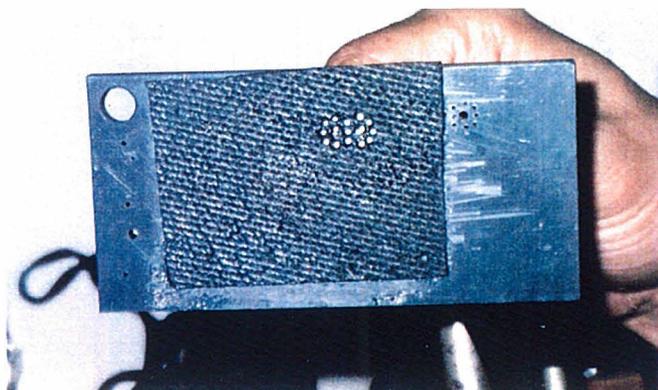


写真3

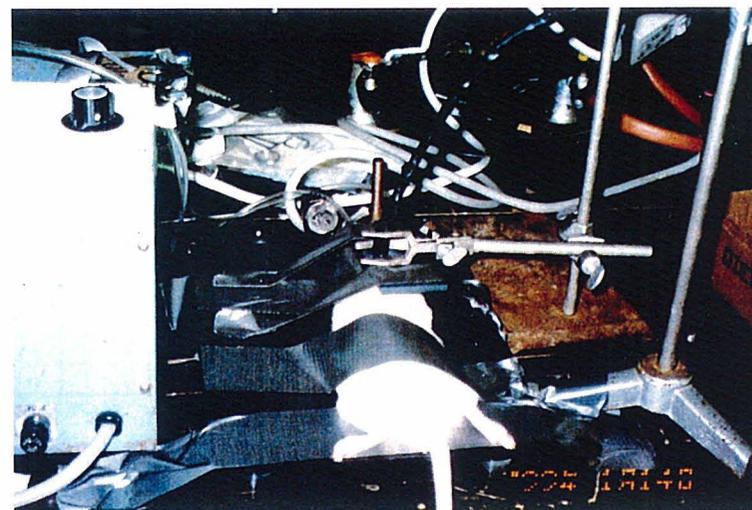


写真4

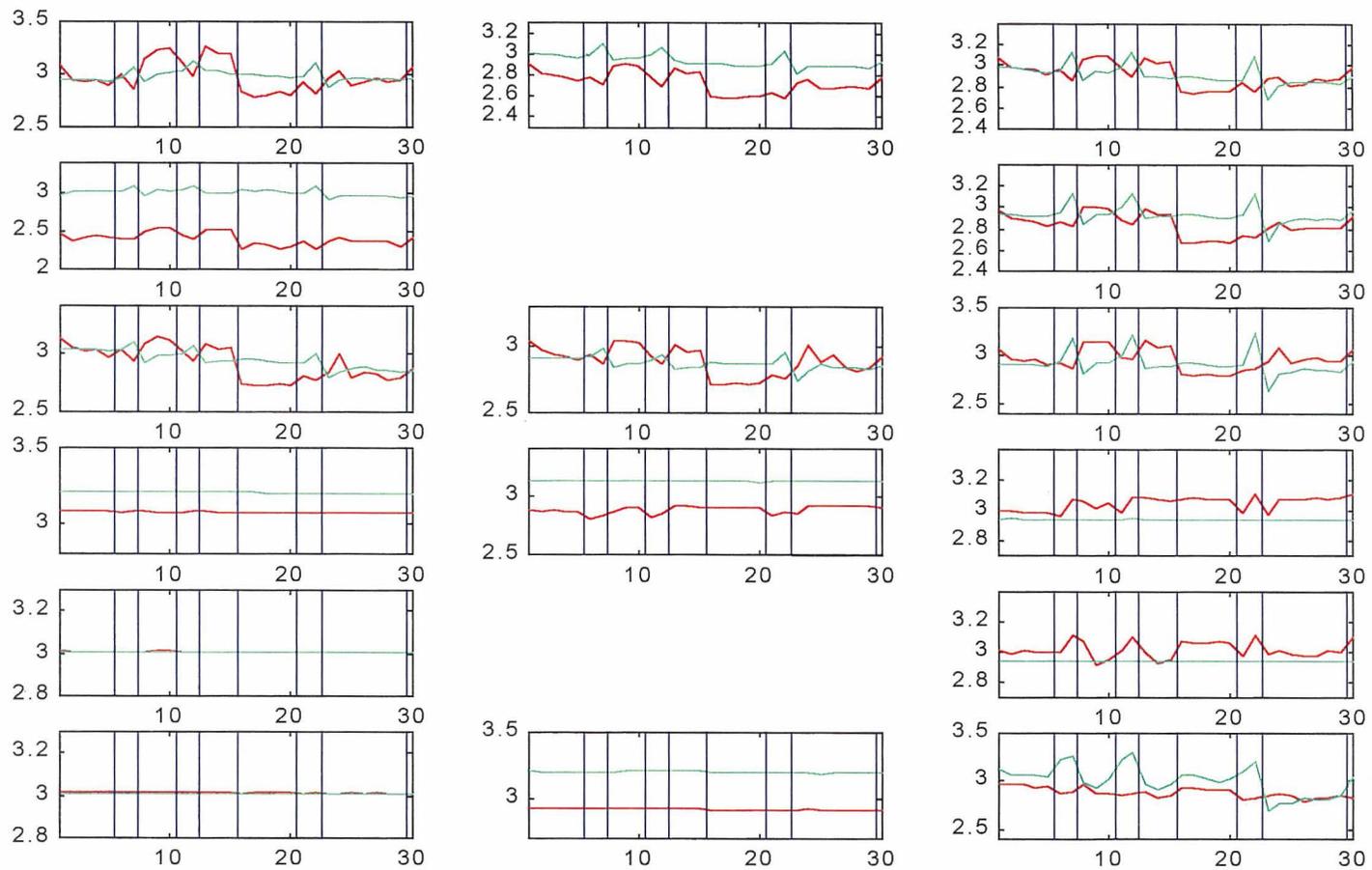


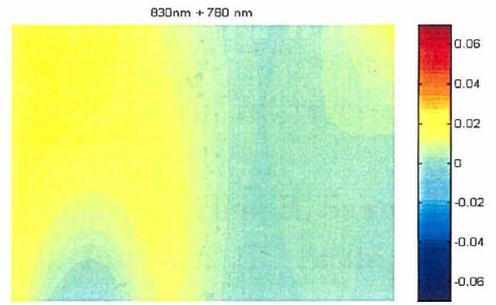
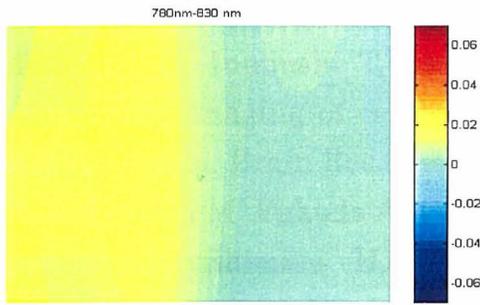
Fig. 2 ラット脳におけるN I R吸光度係数の変化

# CW Images (Unit: OD)

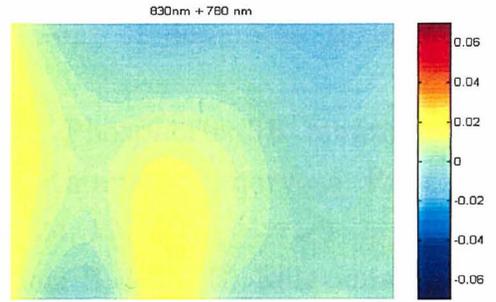
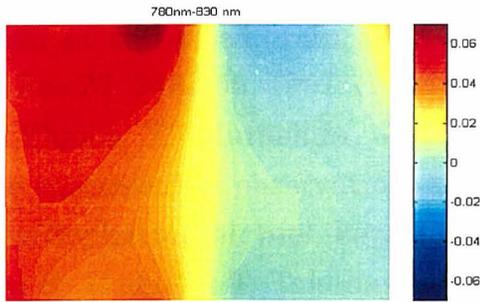
## Deoxygenation

## Blood Volume

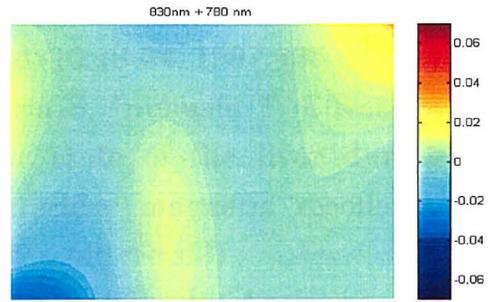
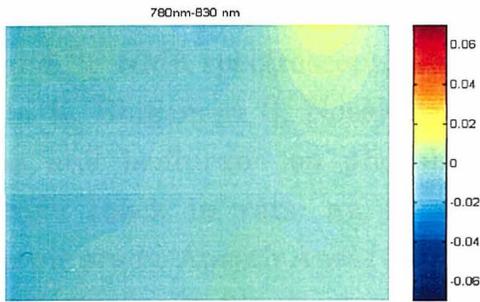
Baseline  
(100%O<sub>2</sub>)



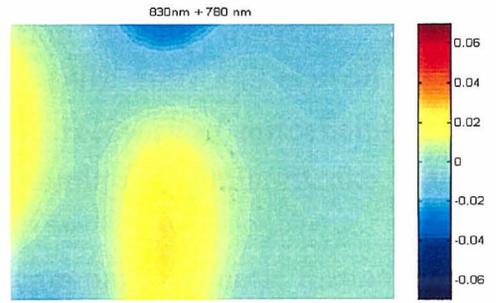
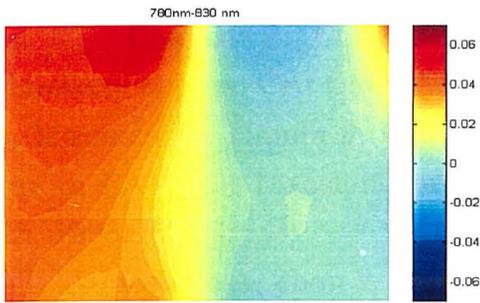
(100%N<sub>2</sub>)



(100%O<sub>2</sub>)



(100%N<sub>2</sub>)



(100%O<sub>2</sub>)

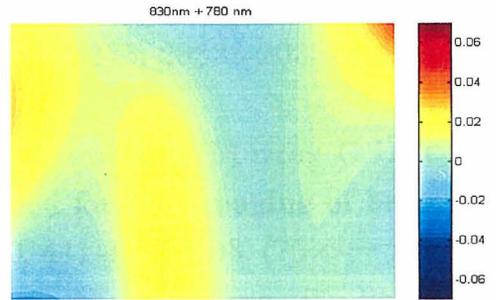
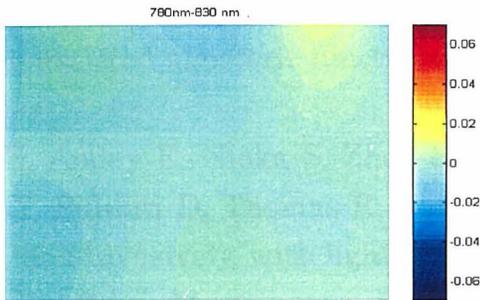


Fig. 3 ラット頭部のNIR画像

## 研究発表

### (1)学会誌等

1. Ono Y, Morikawa S, Inubushi T, Shimizu H, Yoshimoto T. T2\*-weighted magnetic resonance imaging of cerebrovascular reactivity in rat reversible focal cerebral ischemia. *Brain Res.* 744:207-215, 1997. (5 ページ)
1. Nishino H, Kumazaki M, Fukuda A, Fujimoto I, Shimano Y, Hida H, Sakurai T, Deshpande SB, Shimizu H, Morikawa S, Inubushi T. Acute 3-nitropropionic acid intoxication induces striatal astrocytic cell death and dysfunction of the blood-brain barrier: involvement of dopamine toxicity. *Neurosci Res* 27: 343-355, 1997. (15 ページ)
3. Kato T, Shioiri T, Murashita J, Inubushi T. Phosphorus-31 magnetic resonance spectroscopic observations in 4 cases with anorexia nervosa. *Prog. Neuro-Psychopharmacol. Biol. Psychiat.* 21:719-724, 1997. (29 ページ)
4. Morikawa S, Inubushi T, Takahashi K, Shigemori S, Ishii H: Relationship between gluconeogenesis and phosphoenergetics in rat liver assessed by in vivo <sup>13</sup>C and <sup>31</sup>P NMR spectroscopy. *NMR Biomed.* 10:18-24, 1997. (35 ページ)
5. Takahashi K, Shigemori S, Nosaka S, Morikawa S, Inubushi T. Effects of halothane and isoflurane on phosphoenergetic state of the liver during hemorrhagic shock in rats: an in vivo <sup>31</sup>P nuclear magnetic resonance spectroscopic study. *Anesth Analg* 85:347-52, 1997. (43 ページ)
6. Sapire KJ, Gopinath SP, Farhat G, Thakar DR, Gabrielli A, Jones JW, Robertson CS, Chance B: Cerebral oxygenation during warming after cardiopulmonary bypass. *Crit Care Med* 25, 1665-1662, 1997. (49 ページ)
7. Shiino A, Matsuda M, Handa J, Chance B. Poor recovery of mitochondrial redox state in CA1 after transient forebrain ischemia in gerbils. *Stroke*, 29, 2421-2425, 1998. (57 ページ)
8. Yonetani T, Tsuneshige A, Zhou Y, Chen X. Electron paramagnetic resonance and oxygen binding studies of  $\alpha$ -nitrosyl hemoglobin: a novel oxygen carrier having no-assisted allosteric functions. *J Biol Chem* 273, 20323-20333, 1998. (63 ページ)
9. Chance B, Anday E, Nioka S, Zhou S, Hong L, Worden K, Murray C Li T, Ovetsky Y, Pidikiti D, Thomas R. A novel method for fast imaging of brain function, non-invasively, with light. *Opt Expr* 10, 411-422, 1998. (75 ページ)
10. Chance B, Cope M, Gratton E, Ramanujam N, Tromberg B. Phase measurement of light absorption and scatter in human tissue. *Rev Sci Inst*,

Aachen, Germany.

1. 犬伏俊郎 MRS の基礎 第26回日本磁気共鳴医学会大会 ワークショップ「MRSの臨床」1998年9月24-26日、京都.
11. 森川茂廣、犬伏俊郎、石井久成 ラット中大脳動脈一時虚血モデルに対する  $^1\text{H}$  Echo Planar Spectroscopic Imaging (EPSI) の応用 第26回日本磁気共鳴医学会大会 1998年9月24-26日、京都.
12. 鈴木英司、柏木厚典、前川聡、西尾善彦、日高秀樹、森川茂廣、犬伏俊郎、井藤隆太、村田喜代史、吉川隆一  $^1\text{H}$ -、 $^{31}\text{P}$ -磁気共鳴による糖尿病性皮膚潰瘍発症における骨格筋エネルギー代謝異常測定の意義に関する検討 第26回日本磁気共鳴医学会大会 1998年9月24-26日、京都.
13. 森川茂廣、犬伏俊郎 高速MRI、MRSを用いたラット一時脳梗塞モデルの虚血変化と回復過程の追跡 第10回日本脳循環代謝学会総会 1998年11月17-18日、豊中市.
14. S. Morikawa, T. Inubushi and H. Ishii. Diffusion-weighted EPI and  $^1\text{H}$  Echo Planar Spectroscopic Imaging Studies of Rat Transient Middle Cerebral Artery Occlusion Model. International Symposium on Ultrafast Magnetic Resonance Imaging in Medicine (ISUM '99), 1999. 1. 27-29, Kyoto.