

3-FDG を用いた ^{19}F MRI Adiabatic Fast Spin Echo 法の開発とアルツハイマー病遺伝子改変マウスの脳糖代謝測定への応用

藤原秀元

新潟大学大学院医歯学総合研究科

分子細胞医学専攻分子情報医学

脳神経外科学分野（主任：藤井幸彦教授）

Development of ^{19}F MRI Adiabatic Fast Spin Echo using 3-FDG and its application to cerebral glucose metabolism measurement of Alzheimer disease mouse model

Hidemoto FUJIWARA

Department of Neurosurgery, Course for Molecular and Cellular Medicine,

Niigata University Graduate School of Medical and Dental Science

(Director: Prof. Yukihiko FUJII)

要旨

【背景と目的】生体組織の糖代謝測定法として、 ^{18}F 2-FDG (2-fluoro-2-deoxy-D-glucose) を用いた Positron Emission Tomography (PET) が確立されているが、放射線被曝に対する厳密な対応の必要性から大掛かりな施設が必要であり、測定コストも大きい。磁気共鳴イメージング(MRI)は放射線を用いず、非侵襲的に生体の形態・機能を見ることができる優れた画像法である。今回、糖代謝イメージングを目的として、3-FDG (3-fluoro-3-deoxy-D-glucose) を用いた ^{19}F MRI を開発、正常マウスとアルツハイマー病遺伝子改変マウスに応用した。

【方法】実験は 7T 実験用磁気共鳴装置を使用し、 ^{19}F 3-FDG ファントムを用いて、パルスシーケンスの作成・調整を行った。この測定法を用い、3-FDG (500 mg/kg) を C57BL/6 正常マウスに経静脈的投与し、 ^{19}F MRI の測定をおこなった。得られた raw data は Matlab 上で自作のプログラムを用いて処理し、イメージ処理を最適化した。ついで、7 ヶ月齢雄のアルツハイマー病遺伝子改変マウス (5XFAD) と正常マウス (C57BL/6) (各 n=5) に対して ^{19}F 3-FDG MRI を施行、 β 3-FDG を目的分子としたイメージングの関心領域の解析を行い、大脳皮質、基底核、嗅脳の対小脳比を算出し比較検討を行った。更に両マウス(各 n=5)に対して ^{19}F 3-FDG MR spectroscopic imaging (MRSI)にて、3-FDG およびその代謝物(3-FD sorbitol)を同時測定し、3-FDG の代謝経路としてのポリオール経路の酵素(Aldose reductase)活性を比較した。

【結果】バンド幅 420Hz の Gaussian pulse で β 3-FDG の選択的励起をおこない、hyperbolic secant pulse によりスライス選択し、echo signal の保持には BIR4 adiabatic pulse による multi echo 採取をおこなう adiabatic fast spin echo 法を開発し測定に用いた。

正常マウスにおけるイメージ最適化には, Gaussian kernel を k-space に乗し zero filling を行ったのちに離散フーリエ変換を行うことで S/N 比と空間分解能の向上を得た. 5XFAD マウスと正常マウスとの ^{19}F 3-FDG MRI における対小脳比の相対信号の比較では, 5XFAD マウスの大脳皮質で正常マウスよりも有意に高値であった. ^{19}F 3-FDG MRSI では, Aldose reductase 活性を示す Sorbitol index に 5XFAD マウスと正常マウス間で有意差は認めなかった.

【結論】 3-FDG を用いた ^{19}F MRI adiabatic fast spin echo 法を脳糖代謝イメージングとしてマウス脳に応用した. ^{19}F 3-FDG MRI で, 7ヶ月齢の 5XFAD マウスの大脳皮質では, 相対的に β 3-FDG の取り込みが上昇していることが示された. この時, ^{19}F 3-FDG MRSI ではポリオール経路の亢進は認められなかった. 以上より β 3-FDG の取り込み上昇は, 解糖系の亢進を示唆している可能性が考えられた.

key words : Fluorine-19 Magnetic Resonance Imaging, Fluorodeoxyglucose (FDG), Adiabatic pulse, Alzheimer disease, Transgenic mice

別刷請求先

951-8585

新潟市中央区旭町通 1-757

新潟大学脳研究所脳神経外科学分野 藤原秀元

Reprint requests to: Hidemoto FUJIWARA

Department of Neurosurgery, Brain Research Institute, Niigata University

1-757 Asahimachi-dori, Chuo-ku, Niigata 951-8585 Japan

諸言

[^{18}F]2-FDG PET は生体組織のブドウ糖摂取率を定性・定量できる優れた放射性同位元素診断法であり¹⁾, 悪性腫瘍の全身診断に広く用いられている²⁾³⁾と共に, 脳のブドウ糖摂取率を測定することにより, アルツハイマー病をはじめとした脳疾患の診断に広く用いられている⁴⁾⁵⁾. 一方, 磁気共鳴イメージング(MRI)は放射線を用いず, 原理的に非侵襲的な生体の形態・機能を見ることができるとして優れた画像法である⁶⁾. 日常臨床で広く行われている MRI は, プロトンの密度と存在状態によって決まる因子によって画像にコントラストを付けている. 生体組織においてプロトンは水分子を構成しているものが圧倒的に多いため, 日常臨床で用いられる MRI の多くは水を構成するプロトンの状態により画像のコントラストが決定されるが, 理論的に目的とするスピンの奇数/2 であればプロトン以外の元素を含んだ分子の画像化が可能である. しかし, 生体内の水のプロトン濃度が約 80M であるのに対し, 通常生体内に含まれる他の分子の濃度はたかだか数十 mM であり, 約 1/1000 から 1/10000 のオーダーであるために, 測定時間の延長や高空間分解能を得ることが困難であるなどの欠点を持っている. 中田らはこれらの欠点を, 高速イメージング法を導入することにより克服し, 世界で初めての天然に存在する ^{19}F 化合物を用いた ^{19}F 2-FDG MRI によるラット脳の画像の取得に成功している⁷⁾. 一方, 2-FDG はヘキソキナーゼ親和性が高いために, PET に比較して比較的少量のトレーサーが必要となる MRI においては, その毒性が問題となる可能性がある⁸⁾. 今回我々は高速イメージングおよび周波数・スライスの同時選択を行う ^{19}F MRI を開発した. 更に, hexokinase 親和性が弱いために毒性がほとんど認められない⁹⁻¹¹⁾ ^{19}F 3-FDG をトレーサーとして用い, アルツハイマー病遺伝子改変マウスおよび正常マウスの糖代謝について比較検討を行い, 知見を得た.

対象と方法

全ての測定は, 7 Tesla 横型ボアの実験用磁気共鳴装置 (MR) である Inova 300 (Agilent Inc, Palo-Alto, California, USA) を用いて行った. RF 送信には birdcage coil, 受信には quadrature surface coil を用いた. 送信用コイルおよび受信用コイルのチューニングおよびインピーダンスマッチングには, ネットワークアナライザを用い, ^1H MR 撮影では 299.6MHz, ^{19}F MR 撮影では 281.9MHz を中心周波数とした. また全ての動物実験は, 新潟大学動物実験倫理委員会を経て学長承認を受け, 新潟大学脳研究所統合脳機能研究センター内で行った (承認番号: 28 新大研第 89 号 5, 28 新大研第 490 号 1).

1. パルスシーケンスの開発

パルスシーケンスのソースコードは Unix コンピューター上で, Agilent 社のパルスシーケンススクリプトを用いコーディング, デバッグを行った. ファントムを用いた実証実験として, ^{19}F 3-FDG を精製水に溶解し 10mM の濃度とした溶液を作成し, ϕ 20mm のチューブに封入したものをを用いた. まず, 3-FDG の ^{19}F MR spectroscopy 上の chemical shift の

ピークの選択的励起の最適条件を確立する目的で、バンド幅 15000Hz の *adiabatic half passage* を用い測定を行った結果、 α および β -3FDG の 2 つのピークが描出した (図 1-a). パルスシーケンスとして MRI の手法を用いる場合、イメージ撮像の目的とするピークは 1 つに絞る必要がある. そこで、420Hz とバンド幅が非常にせまい *Gaussian pulse* を用いて励起をおこなった (図 1-b). この *Gaussian pulse* を用い目的とする分子のケミカルシフト周波数の選択的励起を行い、 180° *hyperbolic secant pulse* を 2 つ組み合わせることによる *refocusing pulse* にてスライス選択をおこなう *adiabatic fast spin echo* 法を作成した (図-2). すべての *raw data* の画像化は *windows machine* 上の *Matlab* (*MathWorks, Natick, Massachusetts, USA*) を用い、自作プログラムを作成することにより行った.

2. 正常マウスの脳のイメージ取得とイメージ処理法の最適化

日本チャールズリバー社 (横浜, 神奈川) より購入した C57BL/6 マウスを用いた. 動物は、通常の 12 時間の明暗サイクル条件下で飼育され、食餌は自由に摂取可能とした. ウレタン (1.2g/kg) を腹腔内投与することで麻酔を導入し、大腿静脈に留置した PE10 ポリエチレンチューブより、3-FDG (500mg/kg) を投与した. マウスは、MRI 撮像用のクレードル上に腹臥位で配置し、バイトバーおよび円筒型マスクを用いて頭部固定し、自発呼吸下に 2 L/min (空気/酸素/笑気 1/0.3/0.7 L/min) の送気をうけた. 直腸温は $37 \pm 0.5^\circ\text{C}$ に保った. ファントム測定にて開発した *adiabatic fast spin echo* 法を用いて β 3-FDG を撮像目的として、 ^{19}F MRI の測定をおこなった. 得られた *raw data* は *MATLAB* 上にて自作のプログラムにより、*raw data* に 2 次元 *Gaussian kernel* を乗ずることにより S/N 比の改善を行い、*zero filling* を行った後に、離散フーリエ変換を行い画像を算出した. この過程において最適化された撮像とイメージ処理法を、以下のアルツハイマー病遺伝子改変マウスと正常マウスの比較の実験に用いた.

3. アルツハイマー病モデルマウスと正常マウスに対する ^{19}F MR を用いた脳糖代謝測定

3-1 実験動物

アルツハイマー病遺伝子改変マウス (B6SJL-Tg(APPSwFlon, PSEN1**M146L***L286V*)6799Vas/Mmjax mice: 5XFAD)¹²⁾ を *Jackson Laboratory* 社 (*Bar Harbor, Maine, USA*) より購入した. 雄性 5XFAD マウスと雌性 B6/SJL F1 マウスを交配させることにより得られた、ヘミ接合 5XFAD マウス (雄, 7-8 カ月齢) を実験に用いた. 正常対照マウスとして、C57BL/6 マウス (雄, 7-8 カ月齢) を日本チャールズリバー社より購入した. マウスは通常の 12 時間の明暗サイクル条件下で飼育され、食餌は自由に摂取可能とした. MR 撮像 12 時間前からは絶食とし飲水のみ可能とした. ウレタン (1.2 g/kg) を腹腔内投与することで麻酔を導入し、大腿静脈に留置した PE10 ポリエチレンチューブより、3-FDG (500 mg/kg) を投与した. マウスを自発呼吸下に頭部を固定して体温管理をおこない、MR 撮影を施行した. 以下の二つの実験で、5XFAD マウス 10 匹および C57BL/6

マウス 10 匹の計 20 匹を用いた。

3-2 ¹⁹F 3-FDG MRI

5XFAD マウスと C57/BL6 マウス(各 n=5)を用いた。まず、形態画像として¹H MRI (Spin echo, TR/TE = 500/15 ms) を取得し、解剖学的指標とした。¹⁹F 3-FDG MRI は、3-FDG 投与の 1 時間後から撮像を開始し、 β 3-FDG を選択的に励起するように調整された adiabatic fast spin echo 法にておこなった。撮像パラメータは以下の通りである。Excitation with 5 ms Gaussian pulse, 3 mm thickness, 64 × 32 matrix image, TR 2000 ms, Echo Train 16, TE for first echo (= effective TE) 11.7 ms, echo spacing 2.51 ms, Number of acquisitions 1024, total scan time 68 minutes. 得られた画像は、画像処理ソフトウェア MRVision (MRVision Co. Winchester, MA, USA)を用い、¹⁹F MR 画像と¹H MR 画像を co-registration し、関心領域(regions of interest: ROIs) を皮質(Cortex), 基底核 (basal ganglia: BG), 嗅脳(Olfactory bulb: OB), 小脳(cerebellum: Cbl) の 4 つに手動で設けた(図 4-a)。それぞれの ROI の信号強度は、5XFAD マウスにおいて、アミロイド沈着がほぼみられない¹²⁾小脳の信号強度で除し、標準化した相対信号強度 (relative signal intensity: rSI) として算出し、それぞれ、Cortex/Cbl, BG/Cbl, OB/Cbl として提示した。

3-3 ¹⁹F 3-FDG MR spectroscopic imaging (MRSI)

3-FDG は 2-FDG と異なり、hexokinase 親和性が低いために毒性が低い一方、脳内において Aldose reductase (AR)により Sorbitol (3-FD sorbitol)へと変換されるものが存在する(ポリオール経路)¹³⁾。単位時間当たりの変換率を MRSI を用いて測定することにより AR 活性の半定量が可能である¹⁴⁾¹⁵⁾。¹⁹F 3-FDG MRI で得られた結果が、AR 活性の変化を反映しているかを¹⁹F MRSI を用いて検討した。5XFAD および C57BL/6 mice (各 n=5)を用い、3-FDG (500mg/kg) を大腿静脈より投与し、投与 30 分後から MRSI (Spin Echo 法) の撮像をおこなった。撮像パラメータは以下の通りである。TR/TE 1690/2.54 ms, FOV 16 x 16 mm, phase encode 8 x 8 steps, slice thickness 4 mm, bandwidth 10 KHz. Number of acquisitions 32, total scan time 57.7 minutes. MRSI の ROIs は、4mm 厚の軸位断の¹H MRI の両側の頭頂皮質 (Cortex) と基底核 (BG)に設けた(図 5-a)。取得した raw data は、MATLAB 上で、2次元離散フーリエ変換, phase correction, peak fittings を自作のプログラムを用いておこなった。得られたスペクトルにおいて、 α 3-FDG, β 3-FDG および 3-FD sorbitol の 3 つのピーク下の面積から、以下の計算式より Sorbitol index を求めた。Sorbitol Index (%) = 3-FD sorbitol / (α 3-FDG + β 3-FDG) × 100¹⁴⁾¹⁵⁾。これより、3-FDG の代謝物としての Sorbitol の生成、すなわち、Aldose reductase 活性によるポリオール経路への単位時間内の解糖系に対する相対的流入率を求めた。

3-4 統計解析

統計学的解析は、SPSS version 22.0(IBM Corporation, Armonk, NY, USA)を用い、Mann-Whitney U 検定でおこなった。P 値 0.05 未満は統計学的に有意差ありと判定した。デ

ータは平均値±標準偏差で表示した.

結果

1. パルスシーケンスの開発

3-FDG は, ^1H MRI における水プロトンのように1つのピークのみでなく, ^{19}F MR スペクトロスコピー上, 高磁場側の β anomer (β 3-FDG) および α anomer (α 3-FDG) の2つのピークが約 5ppm (7T では 1400Hz) の間隔をおいて存在しているために(図 1 -a), 通常の非選択的励起パルスによる slice selection のみを用いた Gradient Echo 法などのパルスシーケンスでは図 2-a の 10mM 3-FDG イメージの如く phase encode 方向にケミカルシフト・アーチファクトを生じてしまう. このために, パルスシーケンス上で slice selection および frequency selection を行わなければならない. これを克服する為に, バンド幅 420Hz の Gaussian pulse で frequency selection を行い, hyperbolic secant pulse を用いた 180° パルスにて slice selection を行う^{16,17)} fast spin echo 法を用いた. しかし, FDG のような水に比し微弱な信号の検出を行うためには信号の減衰を出来る限り抑制するために正確な 180° pulse が必要であり, 通常の ^1H -MRI に用いられる通常の Sinc ないしは SLR pulse¹⁷⁾を用いた 180° pulse では信号が減衰してしまう. これを克服する為に multi echo における 180° pulse には BIR4 adiabatic pulse¹⁷⁾を用いた adiabatic fast spin echo 法を開発し測定に用いた. このパルスシーケンスを用いることにより, S/N 比が高く, 脳全体から均一に MR 信号を得ることが可能になった (図 2-b) .

2. 正常マウス脳のイメージ取得とイメージ処理法の最適化

図 3 に ^{19}F 3FDG-MRI にて取得された k-space およびその離散フーリエ変換(discrete Fourier transformation:DFT)により得られたイメージを示す. ^{19}F 3-FDG は組織中に数 mM 程度しか存在しないために, raw image を直接 DFT した場合には図 3 下段左のように S/N 比の低い画像になってしまう. これを克服し, かつ空間分解能を保つために, Gaussian kernel を k-space に乗し zero filling を行うことにより妥当な S/N 比と 1pixel あたり $156 \mu\text{m} \times 156 \mu\text{m}$ の空間分解能を得ることが可能であった.

3. ^{19}F 3-FDG MR -アルツハイマー病モデルマウスと正常マウスの比較-

^{19}F -3FDG MRI および ^1H MRI の代表画像を図 4 -b に示した. ^{19}F image において, 正常マウス (上段) においては, 小脳の信号強度と比べて, 大脳皮質の信号強度が低下した. 一方で, 5XFAD マウス (下段) においては, その差ははっきりしない. Relative signal intensity の比較では, 5XFAD マウスにおいて, Cortex/Cbl が有意に高値であった($P=0.009$) (図 4 -c). ^{19}F 3-FDG MRSI により求めた代表 spectrum を図 5-b に示した. 各代謝物の chemical shift は以下の通りである. β 3-FDG: -119.5 ppm, α 3-FDG -124.5 ppm,

3-fluoro-3-deoxy-D-sorbitol -137.7 ppm. この3者のピーク下面積より算出した Sorbitol index を表1に示す. 5XFAD マウスと正常マウスで, Sorbitol index に有意差は認めなかった.

考察

MRIは形態画像の他, diffusion tensor imagingやfunctional MRIといった機能的画像や灌流画像に加え, 分子イメージング, 代謝イメージングの可能性を秘めている¹⁸⁾¹⁹⁾. 今回, 非侵襲的な脳代謝イメージング手法としての,¹⁹F MRIの開発をおこなった.

¹⁹Fは¹Hに次ぐ高い磁気回転比をもつ. このことは¹Hに次いで高い測定感度を得られるということの意味する. また通常は生体内物質には含まれない元素であるため, バックグラウンドに妨害されることなく測定が可能である.

中田らは, ラットにおける¹⁹F標識グルコース誘導体, 2-FDGを用いた¹⁹F MRIのイメージングにおいて, 2-FDG-6リン酸のselective excitationにsoft long sinc pulseを使用し, partial saturation spin echo法を用い, イメージングに成功した⁷⁾. また, ウサギに対する¹⁹F 3-FDG MRIにおいても, 3-FDGの α および β anomerのselective excitationにsoft long sinc pulse, partial saturation spin echo法を用いた⁸⁾. 今回我々はadiabatic fast spin echo法を用い画像化を試みたが, 本方法においても良質な画像を得ることが可能であった.

グルコースはグルコーストランスポーターを介して, 細胞内に取り込まれたあとhexokinaseに触媒され, グルコース6リン酸となり, その後も解糖系, TCA回路へと入りATP産生に寄与する²⁰⁾. 一方で, 副経路として, 細胞内に取り込まれたグルコースが, Aldose reductaseに触媒され, sorbitolへと変換されるポリオール経路が存在する²¹⁾. 2-FDGはグルコースと競合して細胞内に取り込まれ, hexokinaseにより2-FDG 6リン酸となるが, それに続く解糖系酵素であるisomeraseの基質とならず, 細胞内に蓄積する(metabolic trapping)と考えられている. これに対し, 3-FDGは, hexokinase親和性が2-FDGよりも低いために, aldose reductaseの基質となり, ポリオール経路へと流入する¹³⁾. ポリオール経路の詳細な意義は不明であるが, 主に脳, 水晶体, 精巣において, aldose reductase活性が高いことが報告されている²¹⁾. 老齢ラットや糖尿病ラットの脳を対象とした3-FDG¹⁹F MR spectroscopyでは, aldose reductase活性が高いと報告されており, 細胞内でグルコースが相対的に過剰な病態に伴いポリオール経路が活性化される可能性が示唆されている¹⁴⁾²²⁾. また, ポリオール経路は糖尿病の合併症とも関連し, その亢進においては, NADPHが消費されることから, 還元型グルタチオン低下をきたし活性酸素消去能の低下を引き起こすことも示唆されている²³⁾.

アルツハイマー病(AD)は認知症をきたす最大の原因疾患であるが, 臨床症状の出現以前からアミロイド β の沈着や神経障害が進行するとされ, その早期診断のバイオマーカーとしてアミロイドPETや髄液アミロイド β , FDG-PETがあげられる²⁴⁾²⁵⁾. FDG-PETで評価しうる脳ブドウ糖摂取率は, neurometabolic couplingとしてシナプス機能を反映するとされ²⁶⁾, 神経活動を客観的に評価するツールとして有用である. 近年のADに対する疾患修正

療法(免疫抗体療法)では、早期に治療介入することでアミロイドプラークの減少が得られたとする報告もみられ²⁷⁾、発症前駆期の病態およびそれをどう捉えていくかは注目すべき課題である。

今回われわれの用いた AD 遺伝子改変マウス, 5XFAD マウスは, スウェーデン型(K670N, M671L), フロリダ型(I176V), ロンドン型(V717I)の家族性アルツハイマー病遺伝子変異に基づくヒトアミロイド前駆蛋白および, 二つの変異 (M146L, L286V)をもつヒトプレセニリン 1 遺伝子を過剰発現している¹²⁾。A β 42 が過剰産生され, 生後 2 ヶ月からアミロイド沈着が海馬台や大脳皮質を中心に始まり, 4 ヶ月齢を過ぎると, 認知記憶障害が出現する。6~7 ヶ月齢では中等度のアミロイド斑が生じ, 9 ヶ月齢を過ぎた時点で神経脱落が出現し, 以後は重度のアミロイド沈着と神経脱落にいたる。この経過より今回の実験に用いた 7 ヶ月齢の 5XFAD マウスは比較的病初期と考えられた。

本実験の¹⁹F 3-FDG MRI において, Relative signal intensity が 5XFAD マウスの皮質で上昇しており, β 3-FDG の取り込みの上昇が示された。これは解糖系, ポリオール経路, あるいは両者, のどれを反映しているのか, という疑問が生ずる。これを明らかにするために, ¹⁹F 3-FDG MRSI を追加した。Aldose reductase 活性の指標である Sorbitol index に差がなく, 3-FDG のポリオール経路への流入は 5XFAD マウスと正常マウスで相違はみられなかった。この結果からは, ¹⁹F 3-FDG MRI での 5XFAD マウスの β 3-FDG の皮質の取り込み上昇は, ポリオール経路の亢進によるものではなく, 解糖系の亢進を反映している可能性が考えられた。

AD 患者においては, [¹⁸F]2FDG PET で脳糖代謝低下を認め, 特に後部帯状回から楔前部にかけての糖代謝低下は, AD 早期診断の指標であると考えられている²⁸⁾。AD モデルマウスに対する FDG PET おいても, 脳糖代謝の低下が報告されている²⁹⁾一方, 生後 6~12 ヶ月の比較的病初期においては, 脳糖代謝の上昇が多く報告されている³⁰⁾⁻³²⁾。2-deoxy-D-[¹⁴C]glucose (2DG)を用いたオートラジオグラフィ法を用い ex vivo で詳細な取り込みの分布をみた報告では, アミロイドプラーク周囲での糖取り込み上昇が顕著であり, プラーク周囲のグリオーシスや炎症がその原因である可能性が報告されている³⁰⁾。

さらに, AD 病初期における糖代謝の上昇は, 近年注目されている AD の病態としての神経過活動³³⁾との関連が考えられる。4~10 ヶ月齢の AD モデルマウスの大脳皮質においては, アミロイドプラーク周囲の神経細胞の過活動性が二光子 Ca イメージングで捉えられており³⁴⁾, GABA 作動性抑制性介在ニューロンの障害による神経過活動およびそれに伴う epileptiform discharge の出現が示されている³⁵⁾。神経過活動はアミロイド沈着を進行させ, やがてシナプス障害, 神経細胞脱落に至る³³⁾。また, アミロイド沈着の分布は, default mode network(DMN)を構成する部位とほぼ一致すると報告されているが³⁶⁾, アルツハイマー病初期において DMN を中心とした神経ネットワークの神経過活動を原因とした障害が生じていると考えられている³⁷⁾。さらに, AD モデルマウスにおけるネットワーク異常および認知機能障害の改善には, 抗てんかん薬であるレベチラセタムが神経過活動を抑制す

ることにより有用であることが報告されている³⁸⁾。このようにアルツハイマー病初期では神経細胞の過活動がみとめられ、これによる ATP の需要増加³⁹⁾が糖摂取率上昇、解糖系亢進の一因である可能性が考えられる。一般に臨床所見として認められる糖代謝の低下は、既に神経細胞脱落およびその結果としての皮質領域の萎縮が比較的高度に進行し、これが神経過活動による糖代謝上昇を上回る影響を与えるために、結果として糖摂取率低下の所見を示すものと想定される。近年、ヒトに対する研究においても、家族性アルツハイマー病を発症前から追跡した臨床研究⁴⁰⁾や若年にてアミロイドプラークが蓄積する Down 症候群⁴¹⁾にて認知機能低下が未だ生じていない病初期に^{[18F]2FDG PET}にて脳局所の集積上昇が報告されており、今回の ^{19F} 3-FDG MRI の結果は、これらの報告と同様、アミロイド蓄積の早期の病態を反映しているものと考えられた。

結論

3-FDG を用いた脳糖代謝測定ツールとしての、Adiabatic fast spin echo 法による ^{19F} MRI を開発した。さらにそれをアルツハイマー病遺伝子改変マウスと正常マウスに応用し、比較的病初期のアルツハイマー病遺伝子改変マウスの大脳皮質において 3-FDG の取り込み上昇が示された。この 3-FDG の取り込み上昇は、ポリオール経路の亢進ではなく、解糖系の亢進を反映している可能性が考えられた。

謝辞

稿を終えるにあたり、研究の機会を与えてくださいました新潟大学脳研究所脳神経外科学分野 藤井幸彦教授、ご指導を賜りました新潟大学脳研究所統合脳機能研究センター 五十嵐博中教授、MRI 測定解析の御支援を賜りました新潟大学保健学研究科放射線医学分野 大久保真樹教授、Singapore 国立大学 Bingwen Zheng 先生に深く感謝申し上げます。また研究を支えていただきました脳研究所脳神経外科ならびに統合脳機能研究センターの皆様にも併せて感謝申し上げます。

参考文献

- 1) Phelps ME: Positron computed tomography studies of cerebral glucose metabolism in man: theory and application in nuclear medicine. *Semin Nucl Med* 11: 32-49, 1981.
- 2) Bomanji JB, Costa DC, and Ell PJ: Clinical role of positron emission tomography in oncology. *Lancet Oncol* 2:157-164, 2001.
- 3) Farwell MD, Pryma DA and Mankoff DA: PET/CT imaging in cancer: current applications and future directions. *Cancer* 120: 3433-3445, 2014.
- 4) Van Heertum RL, Greenstein EA and Tikofsky RS: 2-deoxy-fluorogluco-positron emission tomography imaging of the brain: current clinical applications with

- emphasis on the dementias. *Semin Nucl Med* 34: 300-312, 2004.
- 5) Herholz K, Carter SF and Jones M: Positron emission tomography imaging in dementia. *Br J Radiol* 80 Spec No 2: S160-167, 2007.
 - 6) Haacke EM, Brown RW, Thompson MR and Venkatesan R: *Magnetic resonance imaging: physical principles and sequence design*. John Wiley & Sons, Inc., USA, pp. 1-15, 1999
 - 7) Nakada T, Kwee IL, Griffey BV and Griffey RH: ^{19}F 2-FDG NMR imaging of the brain in rat. *Magn Reson Imaging* 6: 633-635, 1988.
 - 8) Nakada T, Kwee IL, Griffey BV and Griffey RH: ^{19}F MR imaging of glucose metabolism in the rabbit. *Radiology* 168: 823-825, 1988.
 - 9) Romaschin A, Taylor NF, Smith DA and Lopes D: The metabolism of 3-deoxy-3-fluoro-D-glucose by *Locusta migratoria* and *Schistocerca gregaria*. *Can J Biochem* 55: 369-375, 1977.
 - 10) Halama JR, Gatley SJ, DeGrado TR, Bernstein DR, Ng CK and Holden JE: Validation of 3-deoxy-3-fluoro-D-glucose as a glucose transport analogue in rat heart. *Am J Physiol* 247: H754-759, 1984.
 - 11) Nakada T, Kwee IL, Card PJ, Matwiyoff NA, Griffey BV and Griffey RH: Fluorine-19 NMR imaging of glucose metabolism. *Magn Reson Med* 6: 307-313, 1988.
 - 12) Oakley H, Cole SL, Logan S, Maus E, Shao P, Craft J, Guillozet-Bongaarts A, Ohno M, Disterhoft J, Van Eldik L, Berry R and Vassar R: Intraneuronal beta-amyloid aggregates, neurodegeneration, and neuron loss in transgenic mice with five familial Alzheimer's disease mutations: potential factors in amyloid plaque formation. *J Neurosci* 26: 10129-10140, 2006.
 - 13) Berkowitz BA, Moriyama T, Fales HM, Byrd RA and Balaban RS: In vivo metabolism of 3-deoxy-3-fluoro-D-glucose. *J Biol Chem* 265: 12417-12423, 1990.
 - 14) Kwee IL, Nakada T and Suzuki N: ^{31}P and 3-fluoro-3-deoxy-D-glucose ^{19}F in vivo NMR spectroscopy of aged rat brain. *NMR Biomed* 4: 38-40, 1991.
 - 15) Kwee IL and Nakada T: In vivo pharmacokinetics of aldose reductase inhibitors: 3-fluoro-3-deoxy-D-glucose NMR studies in rat brains. *NMR Biomed* 2: 44-46, 1989.
 - 16) Silver MS, Joseph RI and Hoult DI: Selective spin inversion in nuclear magnetic resonance and coherent optics through an exact solution of the Bloch-Riccati equation. *Phys Rev A Gen Phys* 31: 2753-2755, 1985.
 - 17) De Graaf RA: *In vivo NMR spectroscopy: principles and techniques*. 2nd ed. John Wiley & Sons Ltd, England, pp. 248-275, 2007.
 - 18) Suzuki K, Igarashi H, Huber VJ, Kitaura H, Kwee IL and Nakada T: Ligand-based molecular MRI: ^{17}O JVCPE amyloid imaging in transgenic mice. *J*

Neuroimaging 24: 595-598, 2014.

- 19) Igarashi H, Tsujita M, Kwee IL and Nakada T: Water influx into cerebrospinal fluid is primarily controlled by aquaporin-4, not by aquaporin-1: 170 JJVCPE MRI study in knockout mice. *Neuroreport* 25: 39-43, 2014.
- 20) Oehr P, Biersack HJ and Coleman RE: PET and PET-CT in Oncology: Transport and metabolism of glucose and FDG. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, pp29-32, 2004.
- 21) Jeffery J and Jörnvall H: Enzyme relationships in a sorbitol pathway that bypasses glycolysis and pentose phosphates in glucose metabolism. *Proc Natl Acad Sci USA* 80: 901-905, 1983.
- 22) Kwee IL, Igarashi H and Nakada T: Aldose reductase and sorbitol dehydrogenase activities in diabetic brain: in vivo kinetic studies using ^{19}F 3-FDG NMR in rats. *Neuroreport* 7: 726-728, 1996.
- 23) Barnett PA, González RG, Chylack LT Jr and Cheng HM: The effect of oxidation on sorbitol pathway kinetics. *Diabetes* 35: 426-432, 1986.
- 24) Albert MS, DeKosky ST, Dickson D, Dubois B, Feldman HH, Fox NC, Gamst A, Holtzman DM, Jagust WJ, Petersen RC, Snyder PJ, Carrillo MC, Thies B and Phelps CH: The diagnosis of mild cognitive impairment due to Alzheimer's disease: recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement* 7: 270-279, 2011.
- 25) Sperling RA, Aisen PS, Beckett LA, Bennett DA, Craft S, Fagan AM, Iwatsubo T, Jack CR Jr, Kaye J, Montine TJ, Park DC, Reiman EM, Rowe CC, Siemers E, Stern Y, Yaffe K, Carrillo MC, Thies B, Morrison-Bogorad M, Wagster MV and Phelps CH: Toward defining the preclinical stages of Alzheimer's disease: recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement* 7: 280-292, 2011.
- 26) Magistretti PJ: Role of glutamate in neuron-glia metabolic coupling. *Am J Clin Nutr* 90: 875S-880S, 2009.
- 27) Sevigny J, Chiao P, Bussière T, Weinreb PH, Williams L, Maier M, Dunstan R, Salloway S, Chen T, Ling Y, O'Gorman J, Qian F, Arastu M, Li M, Chollate S, Brennan MS, Quintero-Monzon O, Scannevin RH, Arnold HM, Engber T, Rhodes K, Ferrero J, Hang Y, Mikulskis A, Grimm J, Hock C, Nitsch RM and Sandrock A: The antibody aducanumab reduces A β plaques in Alzheimer's disease. *Nature* 537: 50-56, 2016.

- 28) Minoshima S, Giordani B, Berent S, Frey KA, Foster NL and Kuhl DE: Metabolic reduction in the posterior cingulate cortex in very early Alzheimer's disease. *Ann Neurol* 42: 85-94, 1997.
- 29) Macdonald IR, DeBay DR, Reid GA, O'Leary TP, Jollymore CT, Mawko G, Burrell S, Martin E, Bowen CV, Brown RE and Darvesh S: Early detection of cerebral glucose uptake changes in the 5XFAD mouse. *Curr Alzheimer Res* 11: 450-460, 2014.
- 30) Poisnel G, Hérard AS, El Tannir El Tayara N, Bourrin E, Volk A, Kober F, Delatour B, Delzescaux T, Debeir T, Rooney T, Benavides J, Hantraye P and Dhenain M: Increased regional cerebral glucose uptake in an APP/PS1 model of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 33: 1995-2005, 2012.
- 31) Luo F, Rustay NR, Ebert U, Hradil VP, Cole TB, Llano DA, Mudd SR, Zhang Y, Fox GB and Day M: Characterization of 7- and 19-month-old Tg2576 mice using multimodal in vivo imaging: limitations as a translatable model of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 33: 933-944, 2012.
- 32) Rojas S, Herance JR, Gispert JD, Abad S, Torrent E, Jiménez X, Pareto D, Perpiña U, Sarroca S, Rodríguez E, Ortega-Aznar A and Sanfeliu C: In vivo evaluation of amyloid deposition and brain glucose metabolism of 5XFAD mice using positron emission tomography. *Neurobiol Aging* 34: 1790-1798, 2013.
- 33) Stargardt A, Swaab DF and Bossers K: Storm before the quiet: neuronal hyperactivity and A β in the presymptomatic stages of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 36: 1-11, 2015.
- 34) Busche MA, Eichhoff G, Adelsberger H, Abramowski D, Wiederhold KH, Haass C, Staufenbiel M, Konnerth A and Garaschuk O: Clusters of hyperactive neurons near amyloid plaques in a mouse model of Alzheimer's disease. *Science* 321: 1686-1689, 2008.
- 35) Verret L, Mann EO, Hang GB, Barth AM, Cobos I, Ho K, Devidze N, Masliah E, Kreitzer AC, Mody I, Mucke L and Palop JJ: Inhibitory interneuron deficit links altered network activity and cognitive dysfunction in Alzheimer model. *Cell* 149: 708-721, 2012.
- 36) Sperling RA, Laviolette PS, O'Keefe K, O'Brien J, Rentz DM, Pihlajamaki M, Marshall G, Hyman BT, Selkoe DJ, Hedden T, Buckner RL, Becker JA and Johnson KA: Amyloid deposition is associated with impaired default network function in older persons without dementia. *Neuron* 63: 178-188, 2009.
- 37) Palop JJ and Mucke L: Network abnormalities and interneuron dysfunction in Alzheimer disease. *Nat Rev Neurosci* 7: 777-792 2016.
- 38) Sanchez PE, Zhu L, Verret L, Vossel KA, Orr AG, Cirrito JR, Devidze N, Ho K, Yu

- GQ, Palop JJ and Mucke L: Levetiracetam suppresses neuronal network dysfunction and reverses synaptic and cognitive deficits in an Alzheimer's disease model. Proc Natl Acad Sci USA 109: E2895-2903, 2012.
- 39) Shulman RG and Rothman DL: Brain Energetics and Neuronal Activity. John Wiley & Sons Ltd, England, pp. 111-124, 2004.
- 40) Benzinger TL, Blazey T, Jack CR Jr, Koeppe RA, Su Y, Xiong C, Raichle ME, Snyder AZ, Ances BM, Bateman RJ, Cairns NJ, Fagan AM, Goate A, Marcus DS, Aisen PS, Christensen JJ, Ercole L, Hornbeck RC, Farrar AM, Aldea P, Jasielec MS, Owen CJ, Xie X, Mayeux R, Brickman A, McDade E, Klunk W, Mathis CA, Ringman J, Thompson PM, Ghetti B, Saykin AJ, Sperling RA, Johnson KA, Salloway S, Correia S, Schofield PR, Masters CL, Rowe C, Villemagne VL, Martins R, Ourselin S, Rossor MN, Fox NC, Cash DM, Weiner MW, Holtzman DM, Buckles VD, Moulder K and Morris JC: Regional variability of imaging biomarkers in autosomal dominant Alzheimer's disease. Proc Natl Acad Sci USA 110: E4502-4509, 2013.
- 41) Haier RJ, Alkire MT, White NS, Uncapher MR, Head E, Lott IT and Cotman CW: Temporal cortex hypermetabolism in Down syndrome prior to the onset of dementia. Neurology 61: 1673-1679, 2003

Figure legend

図1 Gaussian pulse による 10mM 3-FDG 溶液における周波数選択

(a) Adiabatic half passage (バンド幅 15000Hz) による励起では, 3-FDG の β anomer および α anomer の両者のピークがみられる.

(b) Gaussian pulse(バンド幅 420Hz)による励起では 3-FDG の β anomer のみが励起される.

両者とも 1pulse で TR=1sec, 128 回加算している.

図2 ϕ 20mm のチューブに入った 100mM 3-FDG 溶液の ^{19}F -MRI (Gradient Echo と Adiabatic Fast Spin Echo)

通常の ^1H -MRI 撮像法で用いられる Gradient Echo では slice selection を行った場合, 通常の励起条件では frequency selection は理論上同時に行うことはできない. 3-FDG は β anomer と α anomer の 2つのピークを持つために, phase encode 方向に縁取りのようなケミカルシフト・アーチファクト (矢印) が生じる(a). 今回開発した Adiabatic pulse を用いた Fast Spin Echo では, 励起で frequency selection を行い, refocus 時に slice selection を行っている. また Adiabatic Pulse を refocusing pulse に用いることにより, surface coil 上でも正確な flip angle を得ることができ, 直径 20mm の surface coil を用いた場合, マウス

脳のコイルに直行する方向では全脳にわたり均一な信号を得ることができる(b).

図3 画像処理法

上段は各処理段階の k-space および kernel を示す. ノイズの低減には frequency encode 方向, phase encode 方向共に gaussian filter を用い 2 次元的に kernel を作成した. 下段は対応する k-space を 2D Discrete Fourier Transformation した画像. 右下の画像が最終的に評価に用いた画像である.

図4 ^{19}F 3-FDG MRI

(a) 関心領域 (Regions of Interest: ROIs) を, ^1H MRI 上で, 大脳皮質(Cortex), 基底核(basal ganglia: BG), 嗅脳(olfactory bulb: OB), 小脳(cerebellum: Cbl)の 4 箇所を手動で設けた.

(b) 代表画像 (上段: C57BL/6、下段: 5XFAD, 左列: ^1H MRI, 右列: ^{19}F MRI)

(c) 相対信号強度 (relative signal intensity: rSI) の比較において, C57BL/6 マウスと比べて, 5XFAD マウスで Cortex/Cbl が有意に高値を示した.

(表示は平均値±標準偏差, Mann-Whitney U test (* $p < 0.05$, NS: no significance))

図5 ^{19}F 3-FDG MR spectroscopic imaging

(a) 軸位断の ^1H MRI 上で, 大脳皮質(Cortex), 基底核(basal ganglia: BG)にそれぞれ $2 \times 2 \text{mm}$ の関心領域 (Regions of Interest: ROIs) を両側に設定した.

(b) ^{19}F 3-FDG MR spectroscopic imaging から得られた各 ROI でのスペクトラムを, 3 つのピーク (β 3-FDG, α 3-FDG, 3-fluoro-3-deoxy-sorbitol) へと fitting をおこなった.

それぞれのピークにおけるピーク下面積を, 両側の平均値にて算出し, 解析に用いた.

表1 Sorbitol index (^{19}F 3-FDG MRSI)

Sorbitol Index (%)	C57BL/6	5XFAD	
皮質	14.06 ± 1.19	14.09 ± 1.57	NS
基底核	14.12 ± 0.92	14.11 ± 1.69	NS

平均値±標準偏差, Mann-Whitney U 検定 (NS: no significance)