

Dynamic MRI を用いた虚血性脳浮腫生成時における 水動態の局所解析

神保康志

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)

Local Analysis of Water Dynamics at the Ischemic Brain Edema Using Dynamic MRI

Yasushi JIMBO

Division of Neurosurgery, Molecular Neuroscience and Brain Disease, 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】虚血性脳血管障害において、脳浮腫は急性期死亡や機能予後不良の大きな原因となっているが、その生成メカニズムの全貌は明らかになっていない。現時点でも結論を見ていないものの一つが、浮腫を惹起する水の組織への主たる流入部位が虚血中心部なのか辺縁部なのかという点である。浮腫水の組織内への移動部位に関しては従来、含水量が最も高くなると考えられる虚血中心部の残存血流とする報告が多数を占めていた。しかし、虚血中心部では早期より微小循環の破綻が生じており、浮腫を惹起する血管内の水の供給源が断たれた状態であり、浮腫水はむしろ残存血流量が多く、ある程度微小循環が保たれている虚血辺縁部から組織に移動するのではないかと考えられた。

【方法】虚血性脳浮腫生成初期における血管から脳組織への水流入の部位的な定量化を、水のプロトンの代わりにその安定同位体である重水素 (Deuterium : D) に置換した重水 (D_2O) を用いた Dynamic MRI により試みた。中大脳動脈閉塞による脳梗塞モデルラットにおいて、脳浮腫生成の初期段階である虚血作成 2 時間後に生理食塩水により血清に等張化した D_2O を経静脈的に投与し、MRI を用いて脳組織内への D_2O 流入を経時的に観測したデータより、血管内から組織への単位時間あたりの水の移動量の正常対側比 (Ktrans %) を部位別に算出した。

【結果】Ktrans % は虚血中心部では低下していたが、虚血辺縁部ではむしろ対側非虚血半球より上昇しており、虚血組織への主たる水の流入部位は従来から考えられていた虚血中心部ではなく、虚血辺縁部からの流入量が大い事が示された。

【考察】血液脳関門の機能障害以前にすでに虚血中心部で脳含水量の増加が生じていることが示されてから、Klatzo が脳浮腫の分類として提唱した cytotoxic edema と vasogenic edema の 2

Reprint requests to: Yasushi JIMBO
Division of Neurosurgery Niigata University
Graduate School of Medical and Dental Science
1-757 Asahimachi - dori Chuo - ku,
Niigata 951-8510 Japan

別刷請求先：〒951-8510 新潟市中央区旭町通 1-757
新潟大学医歯学総合研究科脳神経外科学分野
神保康志

つの stage 間を補完する脳浮腫形成のメカニズムが存在することが予想され、Young らはこの状態を ionic edema と名付けた。Simard らは cytotoxic edema において細胞間腔の Na^+ 濃度の低下により浸透圧勾配が生じ、虚血辺縁部から Na^+ およびそれに付随する水が虚血中心部に引き寄せられ、虚血辺縁部での Epithelial Na^+ transporter の機能亢進の結果、虚血辺縁部からの Na^+ および水移動による虚血中心部の早期含水量増加が起こるといふ仮説を提唱した。今回の研究の測定条件は定義としての ionic edema の時期にあたり、その結果は Simard らの仮説を支持するものと考えられた。

【結論】 D_2O を用いた Dynamic MRI により虚血性脳浮腫生成初期における血管から脳組織への水流入の部位的な定量化を行った結果、虚血組織への主たる水の流入部位は虚血中心部ではなく虚血辺縁部からの流入量が大きい事が示された。

キーワード：虚血性脳浮腫, 水動態, 重水素, MRI, ペナンブラ

緒 言

虚血性脳血管障害において、脳浮腫は急性期死亡や機能予後不良の大きな原因となっているが、その生成メカニズムの全貌は明らかになってはおらず、現時点での治療法は高浸透圧溶液の血管内投与、あるいは脳ヘルニア防止の為の外減圧術などの対症療法に止まっている¹⁾。虚血性脳浮腫生成のメカニズムに関して現時点においても結論を見ていないものの一つが、浮腫を惹起する水の組織への主たる流入部位が、虚血中心部なのか辺縁部なのかという問題である。不完全虚血(虚血後も残存血流が虚血部位に存在する)および完全虚血(断頭や心停止により血流を完全に遮断する)の比較実験により、浮腫を惹起する水はその大部分が血管より移動することが証明されている²⁾が、浮腫水の組織内への移動部位に関しては従来、含水量が最も高くなると考えられる虚血中心部の残存血流から組織に流入するという報告³⁾が多数を占めていた。しかし、虚血中心部においては早期より微小循環の破綻が生じている事⁴⁾が報告されるようになり、虚血中心部では浮腫を惹起する血管内の水の供給源が断たれた状態であり、浮腫水はむしろ残存血流量が多く、ある程度微小循環が保たれている虚血辺縁部から組織に移動し、細胞間腔(Inter-cellular space : ICS)を浸透圧勾配により移動して虚血中心部に達するとい

う仮説が提唱されるようになった⁵⁾。これらの相反する仮説が提唱されている背景の一つとして、虚血性脳浮腫生成は脳組織、脳血管系、脳室系を含み、生体内でそれらが相互に関係するシステムにおける事象であり⁵⁾、このシステム全体における水の動態を、生体において無侵襲に測定することが困難であった事があげられる。このシステム全体を無侵襲に測定するという課題を克服できる可能性のある測定法としては磁気共鳴イメージング(Magnetic Resonance Imaging : MRI)がある。MRIは生体の局所における水分子 H_2O に含まれるプロトンの単位体積当たりの総量および水分子の存在状態の差異により画像にコントラストをつける測定法であり⁶⁾、この特性を用いた脳浮腫における含水量の経時的変化の検討等が試みられている⁷⁾⁸⁾。このMRIにおいて、水のプロトンの代わりにその安定同位体である重水素(Deuterium : D)に置換した重水 D_2O を生体に経静脈投与しながら測定を行った場合、 D_2O は血清内で H_2O のプロトンと重水素である D_2O の D が交換し可及的に HDO となる⁹⁾。この HDO において重水素である D は MRI の信号源とならないため、HDO の含有量に応じて得られる信号強度は低下する。即ち画像上では局所において HDO はその量に応じた negative contrast を呈することになる。今回この特性を応用し、MRI を同一スライス面で連続撮像しながら、生理食塩水に

より血清に等張化した D₂O を経静脈的に投与し、投与後の脳組織および動脈血中の HDO 濃度を経時的に測定する Dynamic MRI の手法を用い、得られた画像に対しコンパートメント解析を行うことにより、血管内から組織への単位時間当たりの水の移動量 (Ktrans) および全組織に対する相対比として D₂O の細血管内濃度である V_p (plasma volume) の各 map を作成し、虚血病巣の中心部および辺縁部における Ktrans および V_p の正常対側比を検討した。

材料と方法

1. 動物および脳虚血作成手技

4～5 週齢、雄性 Sprague-Dawley ラット (体重 122.9 ± 32.5g) を、1.5% ハロセン、空気/笑気/酸素 = 1/0.7/0.3L/min で麻酔導入し、同時に直腸温をモニターし、これを feedback controlled heating lamp につなぐことで 37.0 °C に保った。麻酔導入後ハロセンは 1.0% とした。

永久局所脳虚血モデルは、Koizumi¹⁰⁾ の手技を改良した suture model を用い、左中大脳動脈を閉塞した。手術用顕微鏡下に前頸部正中切開後、左総頸動脈、外頸動脈、内頸動脈を露出し、左総頸動脈近位部と左外頸動脈を 3-0 絹糸で結紮したのち、左総頸動脈の動脈壁を切開し、塞栓子 (直径 0.32 ± 0.04mm) を左内頸動脈へ挿入した。塞栓子はナイロン糸の先端にシリコンコーティングを施し、あらかじめ作成しておいた。塞栓子の挿入中に、軽い抵抗が得られることをもって塞栓子が前中大脳動脈近位部に挿入され、左中大脳動脈への血流が遮断されたものとして固定した。また、大腿静脈内に PE-50 ポリエチレンチューブを挿入し、D₂O 注入ルートとして用いた。

2. MRI 撮像およびプロトコール

自作固定装置を用いてラットの頭部を定位置に固定し、マグネット内に仰臥位にて留置した。マグネット内では 1.0% ハロセン、空気/笑気/酸素 = 1/0.7/0.3L/min で麻酔を維持した。測定中は直腸温をモニターし、自作 air conditional unit

で体温を維持し、また実験小動物用パルスオキシメータ MouseOX[®] (STARR Life Sciences Co, USA) にて、SpO₂ 96～98% に維持した。

動物実験用 MR 装置は 7T 横型マグネットシステム (Varian Unity-INOVA-300, Varian Inc, Palo Alto, CA, USA) を用い、RF の送受信には内径 4cm の Quadrature Coil を用いた。

Gradient-echo 3 plane scout scan を撮像した後、Spin-echo multislice sequence (TE 500msec, TR 14msec) で Coronal scout scan を得て、これによりラット脳の撮像位置が一致するようにし、嗅脳と前脳の境界を 1 スライス目とした axial slice を撮像スラブとし、基底核が最も大きく描出される位置を解析スライスとした。

永久局所脳虚血モデル作成後 2 時間以内に、拡散強調画像 (Diffusion Weighted Image : DWI)、T1 map/PD (Proton Density) map 画像を得た。その後、Fast spin echo (Rapid Acquisition with Relaxation Enhancement : RARE) 法による撮像開始 10 分後に、モデルラット大腿静脈に留置しておいた PE-50 ポリエチレンチューブより 100% D₂O 生理食塩水 2ml (循環血漿量の約 15%) の急速静注を行った。RARE 法では、空間分解能 128 × 128 μ の画像を約 30 秒間で撮像し、同一スライスで 160 枚、連続 1 時間 25 分の撮像を行った。その後、Gd-DTPA (Gd-diethylene-triamine pentaacetic acid) 0.1ml 急速投与による脳灌流画像 (Perfusion Image : PI) の撮像を行い、最終的に T1 map/PD map 画像を得て終了とした。各シークエンスのパラメーターは以下の如くである。

① DWI : Spin Echo, FOV 40 × 40mm, Matrix 128 × 128, TR 2000msec, TE 40msec, NEX 2, b-値 0, 750, 1500sec/mm² (X, Y, Z 軸に対し各々の b-値で撮像)

② T1 map/PD map : Snapshot Flash with Inversion Recovery, FOV 40 × 40mm, Matrix 128 × 128, TI 30-6000ms (6 points)

③ D₂O study : Fast spin echo, FOV 40 × 40mm, Matrix 128 × 128, TR 1000msec, effective TE 40msec, ETL 8, ESP 10, Average 2, 160 scans

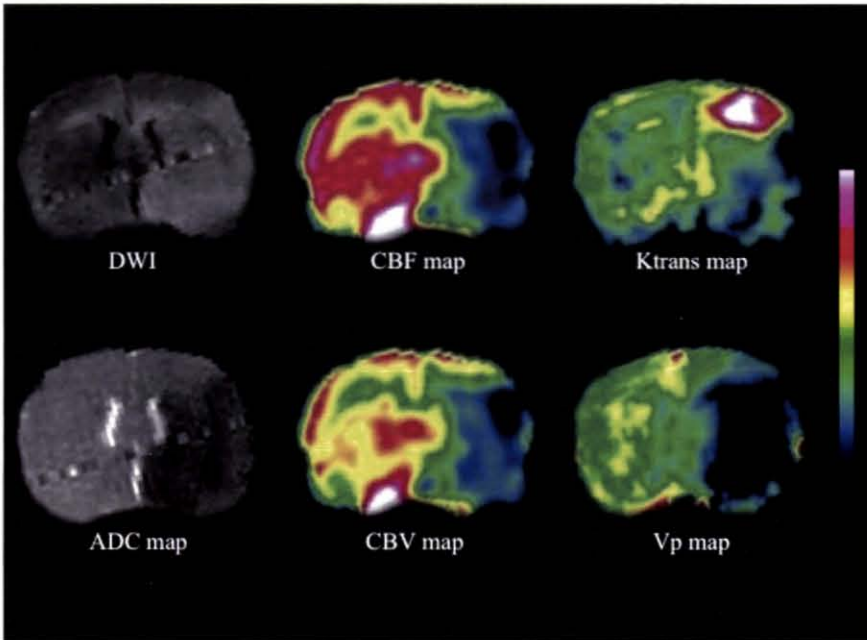


図1 代表例の DWI, ADC map, CBF map, CBV map, Ktrans map, Vp map
DWI 高信号の領域は ADC が低下している。MRI 画像解析ソフトを用いて、脳灌流画像 (CBF map, CBV map), D_2O 動態パラメーター map (Ktrans map, Vp map) を作成した。

④ PI : Two Shot Echo Planner Imaging, FOV 40×40 mm, Matrix 128×128 , TR 1000ms, TE 20ms, 160 scans

3. モデリングおよび画像解析

モデリングに関しては、投与された D_2O は直ちに血管内に混和し、時間経過とともにある分配係数に従って血液中から組織内に移行した後、組織内から再び血液中へ戻るという最も単純なモデルを仮定した。

D_2O 投与後の動態パラメーターの pixel by pixel basis の計算には、MRI 画像解析ソフト Nordic ICE ver. 2.3.9 (Nordic Neuro Lab, Bergen, Norway) を用いた。このソフトウェア内の DCE module を用いることで、 D_2O の血管内から組織への単位時間当たりの水の移動量 (Ktrans) および全組織に対する相対比として D_2O の細血管内

濃度である Vp (plasma volume) を定量化し、Ktrans map, Vp map を作成した。また同ソフト内の Perfusion module を用いることで、Gd-DTPA 投与後の磁化率効果から、CBF map, CBV map を作成した (図1)。また、Trace ADC map, T1 map, PD map の作成には、別の MRI 画像解析ソフト MR Vision ver. 1.6.8 (MR Vision Co. MA, USA) を用いた。

Region of interest (ROI) の設定は、Trace ADC map, CBF map, CBV map をもとに行なった。ADC map 健側比 80% 以下の領域を虚血中心部 (core), ADC map 健側比 80% 以上かつ CBF map 健側比 80% 以下の領域を虚血辺縁部 (penumbra) と定義し、また、虚血中心部から辺縁部にかけての領域を比較検討するために、CBV 健側比 20% 以下の領域, 20~40% の領域, 40~60% の領域, 60~80% の領域, 80% 以上の領域の 5 つの ROI を設

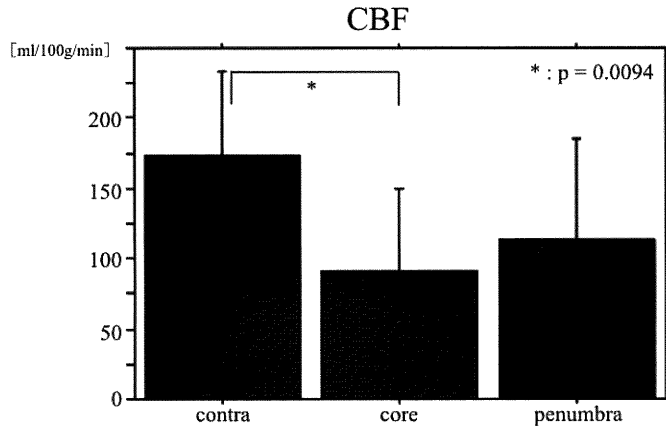


図2 虚血中心部 (core), 虚血辺縁部 (penumbra), 健側 (contra) における CBF の比較
PI により得られた CBF は健側より虚血中心部で有意に低下していた ($p = 0.0094$).

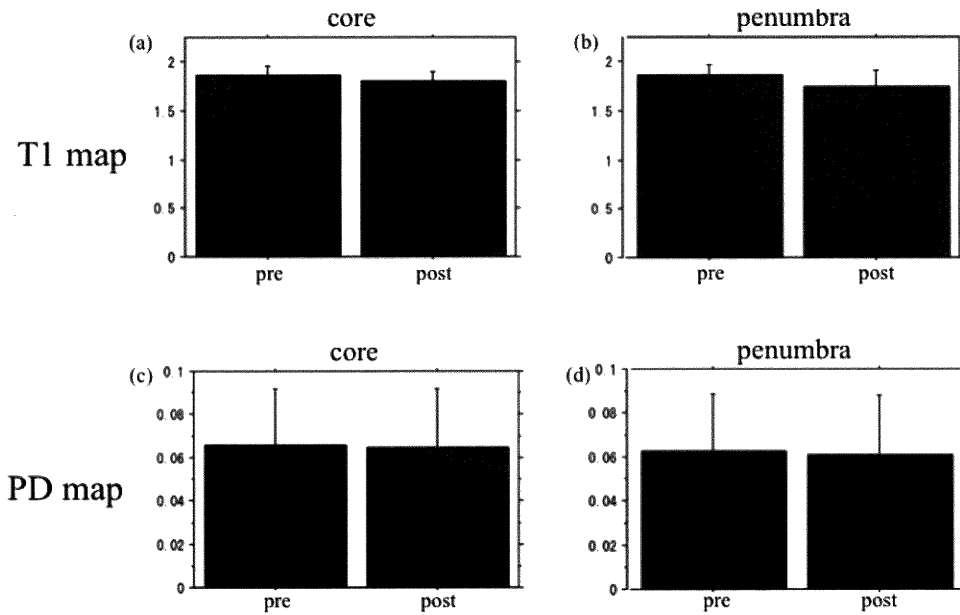


図3 Gd-DTPA 投与前後での虚血中心部 (core) ならびに虚血辺縁部 (penumbra) における T1 map, PD map の比較
(a, b, c, d) T1 map, PD map いずれも明らかな有意差はなく, 観測時点においては, まだ脳浮腫の出現ないしは血液脳関門の破綻が認められていないことが確認された.

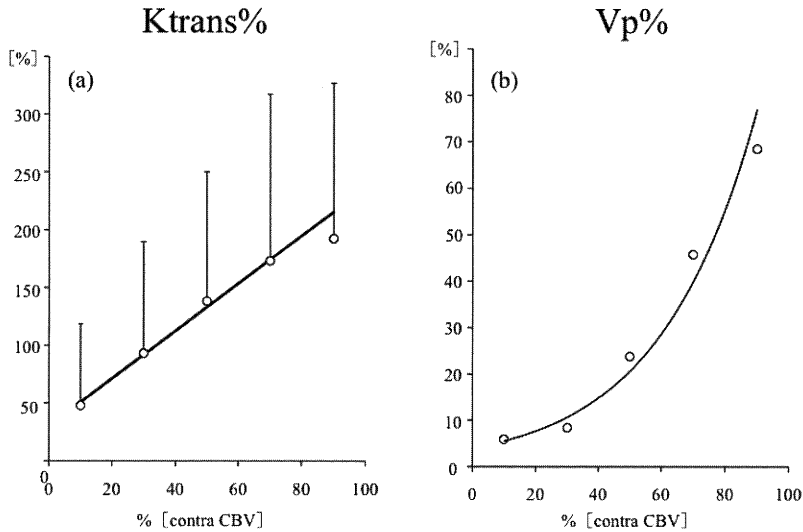


図4 健側CBVに対する正常対側比として算出した各CBVでのKtrans%, Vp%の比較
 (a) CBV低下の大きい虚血中心部ではKtrans%は低下していたが、虚血辺縁部においてはむしろ健側より上昇していた。(b)また、CBVの低下に伴いVp%は急激な低下をきたし、虚血組織では広範囲にわたり微小循環の破綻が認められると考えられた。

定し、各々のROIにおける正常対側比Ktrans%, Vp%を比較した。

4. 統計学的処理

統計用ソフトはStat View ver. 5.0 (SAS Institute Inc, Cary, North Carolina, USA)を用い、Post-hoc test (Fisher's PLSD), Paired two group t-test, linear regressionにて検定を行い、すべてのデータは平均±SDで表記した。また、 $p < 0.05$ を有意とした。

結 果

全ての動物実験モデルにおいて虚血側のADCは低下しており、PIより得られたCBFは健側(contra)よりcoreで有意に低下していた($p = 0.0094$) (図1, 2)。また、Gd-DTPA投与前後でcoreならびにpenumbraにおけるT1 map, PD mapに明らかな有意差はなく(図3-a, b, c, d),

観測時点においては、まだ脳浮腫の出現ないしは血液脳関門(Blood Brain Barrier: BBB)の破綻が認められていないことが確認された。PIより得られたCBV mapにおいて、CBV低下の大きい虚血中心部ではKtrans%は低下していたが、虚血辺縁部においてはむしろ対側非虚血半球(健側)より上昇していた(図4-a)。また、CBVとVp%の関係をplotするとCBVの低下に伴いVp%は急激な低下をきたし、虚血組織では広範囲にわたり微小循環の破綻が認められると考えられた(図4-b)。

考 察

脳浮腫生成の源となる血漿からの水の主たる移動部位として、虚血中心部では辺縁部と比較し脳含水量の増加が著しいこと⁸⁾¹¹⁾、脳虚血において浮腫液を組織に導く力となる浸透圧上昇を惹起する主な因子であるナトリウム¹²⁾¹³⁾、および乳酸¹⁴⁾の上昇が虚血中心部においてより顕著であること

が、脳浮腫を惹起する水が虚血中心部から脳組織内に移動することの間接的な裏付けとされている。しかし、これらの報告がその裏付けとなるためには、虚血性脳浮腫生成時には脳組織内を移動する水の量が無視できるほど小さいという前提が必要であり、そのような検証は著者らが調べた限りではなされていない。今回の実験においては、CBV が対側非虚血半球（健側）の 20% 以下の虚血中心部において、脳浮腫のソースとなる脳小血管（細動脈～毛細血管～細静脈）における有効血液量 V_p %, すなわち僅かながらでも残存血流が存在する小血管の割合は健側のわずか 5.9% であり、 K_{trans} % も健側の 50% 以下に低下している。これに対し、虚血辺縁部において K_{trans} % は健側の約 2 倍であり、このことから虚血性脳浮腫の起源となる水の移動は、BBB が保たれている脳浮腫発生早期においては虚血辺縁部の血管を介する経路が主体であり、虚血中心部の脳浮腫生成には辺縁部において血管から脳組織内に移動した水が ICS あるいは Glia などを通じて中心部に貯留する可能性を示していると考えられた。

脳浮腫研究の勃興期において、Klatzo は脳浮腫の分類として、脳虚血による ATP 枯渇により Na^+-K^+ ATP ポンプが停止し、その結果細胞外の Na^+ が急激に細胞内に貯留し、その結果として虚血早期に脳組織を形成する細胞群の腫脹を生じる cytotoxic edema, および虚血数時間後から生じる BBB 機能障害に伴う血管から脳組織内への血漿蛋白およびそれらと共に流入する水により生じる vasogenic edema の 2 つの stage を提唱した¹⁵⁾。そのメカニズムから理解できるように、前者は脳組織の含水量の増加、すなわち狭義の脳浮腫を伴わない。その後の研究により、脳虚血においては BBB が機能障害を呈する前にすでに虚血中心部において脳含水量の増加が生じていることが動物実験において示され¹¹⁾、cytotoxic edema と vasogenic edema の間を補完する脳浮腫形成のメカニズムが存在することが予想されていた。Young ら¹⁶⁾ は、BBB 機能が保たれている時点での含水量増加のメカニズムに関して、Endothelial Cell における Na^+ transporter の機能亢進¹⁷⁾、および虚血組

織の acidification による Na^+-H^+ antiporter による虚血組織内への血漿成分からのナトリウム流入¹⁸⁾ が虚血組織での含水量増加を促している可能性を指摘し、この状態を ionic edema と名付けた。しかし、この仮説においても、 Na^+ transporter の driving force は何かという疑問が残された。Simard ら⁵⁾ はこれに対する仮説として、cytotoxic edema において ICS の Na^+ 濃度が低下し、これが ICS の浸透圧勾配を生じさせることにより、虚血辺縁部から Na^+ およびそれに付随する水を虚血中心部に引き寄せることで、虚血辺縁部での Epithelial Na^+ transporter の亢進を生じ、結果的に虚血辺縁部から中心部への Na^+ および水の移動による虚血中心部における早期の含水量増加を引き起こすという仮説を提唱している。今回のわれわれの測定条件は、定義としての ionic edema が生ずる時期に行われており、その結果は Simard らの仮説を支持するものと考えられた。

実験においてラットに投与した D_2O は水の 2 つのプロトン分子を重水素で置換したものであり、粘性、分子の大きさなどが H_2O と異なっており、完全に H_2O と等価ではない¹⁹⁾ もの、MRI において negative contrast agent として使用することにより、他の手法では得られない生体における組織内の水動態の評価が可能であり、各種動物モデルへの応用により脳浮腫生成メカニズムの更なる評価が可能となることが期待される。

今回の研究において、脳浮腫生成の初期段階では、浮腫を生じさせる水は虚血中心部周囲の微小循環障害が軽微な部位から脳組織内に移動すると考えられた。この虚血辺縁部は、いわゆる penumbra と呼ばれるエネルギー代謝はある程度傷害されているものの膜電位は保たれている部位²⁰⁾、およびその周囲の虚血性障害を免れた部位を含むと考えられ、残存血流も比較的豊富であるために、虚血中心部と比較し血管内投与した薬剤がこの部位まで届きやすいと考えられる。今後この部位に存在する水チャンネルや Na^+ transporter を標的とした薬剤を開発することにより虚血性脳浮腫を予防する道が開かれる可能性があると考えられる。

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大学院医歯学総合研究科脳神経外科学分野 藤井幸彦教授、新潟大学統合脳機能研究センター長中田力教授、御指導いただきました新潟大学統合脳機能研究センター生体磁気共鳴学分野 五十嵐博中教授に深謝申し上げます。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いたします。

参 考 文 献

- 1) Hofmeijer J, Algra A, Kappelle LJ and van der Worp HB: Predictors of life-threatening brain edema in middle cerebral artery infarction. *Cerebrovasc Dis* 25: 176-184, 2008.
- 2) Siesjö BK: Pathophysiology and treatment of focal cerebral ischemia. Part I: Pathophysiology. *J Neurosurg* 77: 169-184, 1992.
- 3) Hatashita S and Hoff JT: Biomechanics of brain edema in acute cerebral ischemia in cats. *Stroke* 19: 91-97, 1988.
- 4) Dawson DA, Ruetzler CA and Hallenbeck JM: Temporal impairment of microcirculatory perfusion following focal cerebral ischemia in the spontaneously hypertensive rat. *Brain Res* 749: 200-208, 1997.
- 5) Simard JM, Kent TA, Chen M, Tarasov KV and Gerzanich V: Brain oedema in focal ischaemia: molecular pathophysiology and theoretical implications. *Lancet Neurol* 6: 258-268, 2007.
- 6) Mugler JP III: Basic principles. In: Edelman RR, Hesselink JR, Zlatkin MB, Cruess JV (eds), *Clinical magnetic resonance imaging*. 3rd ed, Saunders Elsevier, Philadelphia, pp 23-57, 2006.
- 7) Quast MJ, Huang NC, Hillman GR and Kent TA: The evolution of acute stroke recorded by multi-modal magnetic resonance imaging. *Magn Reson Imaging* 11: 465-471, 1993.
- 8) Knight RA, Dereski MO, Helpert JA, Ordidge RJ and Chopp M: Magnetic resonance imaging assessment of evolving focal cerebral ischemia. Comparison with histopathology in rats. *Stroke* 25: 1252-1261, 1994.
- 9) St Lawrence KS and Lee TY: An adiabatic approximation to the tissue homogeneity model for water exchange in the brain: II. Experimental validation. *J Cereb Blood Flow Metab* 18: 1378-1385, 1998.
- 10) Koizumi J, Yoshida Y, Nakazawa T and Ooneda G: Experimental studies of ischemic brain edema. I: A new experimental model of cerebral embolism in rats in which recirculation can be introduced in the ischemic area. *Jpn J Stroke* 8: 1-8, 1986.
- 11) Menzies SA, Betz AL and Hoff JT: Contributions of ions and albumin to the formation and resolution of ischemic brain edema. *J Neurosurg* 78: 257-266, 1993.
- 12) Hatashita S, Hoff JT and Salamat SM: An osmotic gradient in ischemic brain edema. *Adv Neurol* 52: 85-92, 1990.
- 13) Yushmanov VE, Kharlamov A, Yanovski B, LaVerde G, Boada FE and Jones SC: Inhomogeneous sodium accumulation in the ischemic core in rat focal cerebral ischemia by ^{23}Na MRI. *J Magn Reson Imaging* 30: 18-24, 2009.
- 14) Igarashi H, Kwee IL, Nakada T, Katayama Y and Terashi A: ^1H magnetic resonance spectroscopic imaging of permanent focal cerebral ischemia in rat: longitudinal metabolic changes in ischemic core and rim. *Brain Res* 907: 208-221, 2001.
- 15) Klatzo I: Neuropathological aspects of brain edema. *J Neuropathol Exp Neurol* 26: 1-14, 1967.
- 16) Young W and Constantini S: Ionic and water shifts in injured central nervous tissues. In: Salzman SK, Faden AI (eds), *The Neurobiology of Central Nervous System Trauma*. Oxford University Press, New York, pp 123-130, 1994.
- 17) Dermietzel R and Krause D: Molecular anatomy of the blood-brain barrier as defined by immunocytochemistry. *Int Rev Cytol* 127: 57-109, 1991.
- 18) Kimelberg HK: Current concepts of brain edema. *J Neurosurg* 83: 1051-1059, 1995.
- 19) Kushner DJ, Baker A and Dunstall TG: Pharmacological uses and perspectives of heavy

water and deuterated compounds. Can J Physiol
Pharmacol 77: 79-88, 1999.

cerebral ischemia - the ischemic penumbra.
Stroke 12: 723-725, 1981.

20) Astrup J, Siesjö BK and Symon L: Thresholds in

(平成 23 年 12 月 20 日)
