
^3P -MRS による低体温時脳内リン エネルギー代謝動態と脳保護効果

(課題番号 11680833)

平成 11 年度～平成 12 年度科学研究費補助金 (基盤研究(C)(2)) 研究成果報告書

平成 13 年 3 月

研究代表者 田中 邦雄
(旭川医科大学医学部助教授)

は し が き

近年、外傷や虚血による脳損傷に対して低体温療法の臨床的有用性が見直されるようになった。30℃から32℃の低体温における脳保護効果はこれまで基礎的に確かめられているが、動物実験によって軽度低体温（33～34℃）時の脳内エネルギー状態は常温の場合と大差がないといわれている。したがって、脳保護効果のメカニズムは脳代謝の抑制によるのではなく、hypoxiaによってトリガーされた脳細胞内の二次的な生化学変化を抑制するためであると考えられているが、未だ十分に解明されていない。

本研究では、脳内リンエネルギー代謝動態を指標として、軽度低体温の脳保護作用機序を基礎的に明らかにすることを目的として立案した。すなわち、代謝物質の非侵襲的、経時的測定法である³¹P-MRS法を用い、常温群および軽度低体温群におけるジャービル脳を対象に虚血負荷を与え、虚血前、虚血中および負荷解除後におけるリン酸化合物代謝動態を観察するとともに、病理組織学的観察結果と総合して軽度低体温の脳保護効果について基礎的に検討した。

研究組織

研究代表者：田中邦雄（旭川医科大学医学部助教授）

研究分担者：中井啓文（旭川医科大学医学部助教授）

研究協力者：木村輝雄（旭川医科大学医学部助手）

研究協力者：日下部光俊（旭川医科大学技術専門職員）

研究経費

平成 11 年度	2,700 千円
平成 12 年度	1,100 千円
計	3,800 千円

研究発表

(1) 学会誌等

1. 田中邦雄: MRI の画像処理技術と問題点、臨床病理、48. 7:614-620 (2000)
2. T. Kimura, K. Sako, T. Gotoh, K. Tanaka and T. Tanaka: In Vivo Single-Voxel Proton MR Spectroscopy in Brain Lesions with Ring-like Enhancement, NMR in Biomed. (submitted)

(2) 口頭発表

1. 木村輝雄、田中邦雄、後藤卓美、吉田弘、村上昇、田中達也: 定位的放射線治療後の転移性脳腫瘍に対する ^1H -MRS による早期の治療効果判定、第 27 回日本磁気共鳴医学会大会、II-B-08、平成 11 年 9 月 17 日 (東京)
2. 木村輝雄、田中邦雄、田中達也、後藤卓美、尾野英俊、村上昇: 造影 MRI で ringlike に造影される脳病変の single-voxel ^1H -MR Spectroscopy による鑑別と病理組織学的所見との対応、第 39 回日本 ME 学会大会、1F2-6、平成 12 年 5 月 17 日 (東京)
3. 木村輝雄、田中邦雄: ^{31}P -MRS による軽度低体温時 gerbil 脳内リンエネルギー代謝動態と脳保護効果、第 3 回日本脳低体温療法研究会、8、平成 12 年 7 月 22 日 (名古屋)
4. 木村輝雄、田中邦雄、日下部光俊、中井啓文、田中達也: ^{31}P -MRS による軽度低体温時 gerbil 脳内リンエネルギー代謝動態と脳保護効果、第 28 回日本磁気共鳴医学会大会、I-2-12、平成 12 年 10 月 2 日 (京都)
5. 木村輝雄、田中邦雄、日下部光俊、中井啓文、田中達也、中田力: ^{31}P -MRS による gerbil 前脳一過性虚血後の軽度低体温の効果、第 40 回日本 ME 学会大会、平成 13 年 5 月発表予定 (名古屋)

研究成果

本研究では常温群（37℃）および軽度低体温群（34℃）におけるジャービル脳を対象に虚血負荷を与え、虚血前、虚血中および虚血負荷解除後の高エネルギーリン酸化合物代謝動態を経時的に観察するとともに、病理組織学的に虚血神経細胞障害の程度を検索し、軽度低体温による脳保護効果のメカニズムを基礎的に明らかにすることを目的として2年間研究を行った。以下に本研究で得られた成果をまとめる。

実験方法

実験動物

実験には、Mongolian gerbil (Male BW 50-60g; n=20)を用いた。10%urethan 溶液 0.5-0.6ml (1ml/100g)を腹腔内注射し、0.5%ハロセン、70%のN₂Oと30%のO₂により自発呼吸下で麻酔した動物に手術操作を行った。定位的にサーミスターを挿入して直腸温および海馬温をモニターした。常温群(直腸温で37℃、n=10)と軽度低体温群(直腸温で34℃、n=10)に³¹P-MRS測定の前1時間前から、測定中、測定3時間後まで体温をモニターしながら、保温装置および冷却装置を用いてそれぞれの体温に維持し、その後は両群とも室温に置いた。連続的に血圧をモニターするため、および血液ガスや血糖値測定のための動脈血を採取するためのカテーテルを右大腿動脈に挿入した。動脈圧は平均値で表した。虚血モデルは、腹側頸部切開の後、両側頸動脈を露出し、一時的な前脳虚血モデルを作る

ために、6.0 ナイロンを頸動脈にかけてそれを引くことによって15分間閉塞して虚血負荷を与えた。

オートラジオグラフィ

虚血の範囲はオートラジオグラフィで、コントロール、軽度低体温虚血群および常温虚血群に対し、 ^{14}C -IAP を使って定性的に検討した。 ^{14}C -IAP (0.6ml の生食に $10\ \mu\text{Ci}$) を1分以上かけて連続的に大腿静脈から注入後すぐに断頭し、脳を素早く取り出して凍結した。cryostat を用いて一連の冠状断面を $20\ \mu\text{m}$ の厚さで切断した。脳断面をカバーガラスに乗せ、 60°C で乾燥させた。オートラジオグラムは7日間、X線カセットの中で ^{14}C -methyl methacrylate standard で乾いた脳断面を Kodak SB-5 X-ray film に感光する事によって作製した。

^{31}P -MR スペクトル計測

^{31}P -MRS は、GX-270 FT-NMR スペクトロメーター（日本電子、静磁場強度 6.3 テスラ、リン共鳴周波数 109.25MHz）を用いて測定した。直径 12mm のサーフェスコイルに露出した頭蓋を置くとともに、gerbil をプローブに固定した。磁場均一性は水のプロトンシグナルの半値幅が 0.2ppm 以下となるように調整した。RF パルス幅を $15\ \mu\text{s}$ 、パルス繰り返し時間を 500msec とし、1 スペクトルあたり 600 回の信号積算（5 分間）を行ってスペクトルを得た。ブロードな baseline signal は convolution difference で取り除き、peak area の歪みを最小にするために line broadening を 800Hz の exponential 関数で3連続繰り返して行った。FID は 30Hz の exponential 関数でフィルターをかけた後に、フーリエ変換した。位相補正は baseline のスペクトルで視覚的におこなった。また、クレアチンリン酸 (PCr) のピークを基準とした無機リン酸 (Pi) の chemical shift

から細胞内 pH を計測した。虚血負荷前最初の 10 分間のスペクトルを baseline とし (2 本)、虚血負荷中 15 分間 (3 本分)、再灌流 35 分後まで (7 本分) 連続的に測定した。また、虚血 24 時間後 10 分間 (2 本分) および 1 週間後にも 10 分間 (2 本分) 測定した。

PCr、Pi および β -ATP の各リン酸化合物の定量は各ピークの面積で求め、虚血負荷前 2 つの baseline の平均値に対する百分率で表した。

病理組織学的検討

虚血 7 日後、全ての動物は実験終了後に 0.5%ハロセン、70%の N_2O と 30%の O_2 にて自発呼吸麻酔下で 10%の urethan 溶液を腹腔内に投与して sacrifice された。また、ヘパリン溶液と 10%ホルマリン溶液を経心臓的に注入した。灌流後すぐに脳を注意深く取り出した。脳をホルマリン溶液に 1 週間浸した後、brain matrix を用いて、3mm の冠状のブロックに切断した。処理された脳組織をパラフィンに包埋し、おのおのの組織塊から $6\mu m$ の厚さにカットし、H-E (Hematoxylin-Eosin) で染色した。両側海馬の CA-1 領域および大脳皮質の細胞層で観察される障害された細胞を光学顕微鏡的に分析するために、bregma から $-2.0mm$ と $0.0mm$ の冠状断面を基準断面として選んだ。虚血神経細胞障害の程度は両側海馬の CA-1 領域と両側大脳皮質の内錐体層における 200 倍率での正方形 (長方形) 中に含まれる虚血細胞数と正常神経細胞数を求め、全神経細胞数に対する虚血神経細胞数の百分率で表した。また、海馬と大脳皮質を H-E 染色した断面に隣接するパラフィン包埋した $6\mu m$ の断面をカットし、gelatin-coat されたスライドにマウントした後、GFAP 染色を行い astrocyte reactivity の評価に用いた。GFAP 免疫組織化学活性の relative transmittance distribution の評価は、画像解析装置 (WinROOF、Mitani Corporation、Japan) を用いて行っ

た。astrocytic reactivity は両側海馬の CA-1 領域と両側大脳皮質の内錐体層における 200 倍率での正方形（長方形）中における area fraction として分析した。なお、全てのデータは左右とも計測され、その平均値で表した。

データ解析

Physiological and histopathological variables に対する軽度低体温群と常温群の間の有意差検定は unpaired t-test を用いて行った。³¹P-MRS 測定結果に対する軽度低体温群と常温群間の統計学的有意差は、おのおのの時点で unpaired t-test を用いて行った。なお、危険率 5%以下で有意差ありと判定し、実験結果は平均値±標準偏差で表した。

実験結果

動脈血 pH、二酸化炭素分圧、酸素分圧、血糖、血圧のいずれも常温群、軽度低体温群間で虚血前、虚血中および虚血後に有意な差は認められなかった (Table-1)。

Table 1
Physiological data in normothermic and mild hypothermic gerbils during MR spectroscopy experiments

	arterial pH		arterial PCO ₂ (mmHg)		arterial PO ₂ (mmHg)		BS(mg/dl)		MABP(mmHg)	
	NT	MHT	NT	MHT	NT	MHT	NT	MH	HT	MHT
Preischemia	7.36±0.03	7.33±0.02	36.1±3.8	38.2±2.1	106±4.3	104±3.2	120±21	109±31	115±5	103±6
Ischemia	7.28±0.03	7.32±0.03	42.7±4.2	43.2±3.1	107±5.8	102±3.8	135±16	130±26	144±8	128±7
Reperfusion										
60min	7.25±0.04	7.29±0.05	40.3±0.9	42.1±3.5	101±9.6	101±2.1	139±12	132±18	115±5	103±5
24hr	7.35±0.03	7.32±0.03	36.0±4.1	37.1±5.2	105±8.3	104±6.1	124±31	122±28	-	-
7days	7.36±0.03	7.33±0.02	36.2±4.3	38.9±4.4	101±5.1	110±4.6	119±21	112±20	-	-

NT: normothermia MHT: mild hypothermia MABP: mean arterial blood pressure

Figure-1 は、虚血前、虚血中および再灌流後の常温群と軽度低体温群における直腸温と海馬温の測定結果を示す。海馬温は直腸温より常温群で $0.7 \pm 0.08^\circ\text{C}$ 、軽度低体温群で $0.4 \pm 0.08^\circ\text{C}$ それぞれ低かった。直腸温は再灌流 5 分後に虚血前よりも軽度低体温群で $0.8 \pm 0.07^\circ\text{C}$ 、常温群で $1.0 \pm 0.15^\circ\text{C}$ それぞれ徐々に低下した。海馬温は虚血 15 分後に軽度低体温群で虚血前より $1.5 \pm 0.08^\circ\text{C}$ 、常温群で $1.3 \pm 0.11^\circ\text{C}$ 速やかに低下した。再灌流後海馬温は速やかに上昇し、約 16 分以内には虚血前のレベルに回復し、その後徐々に約 $0.3 \pm 0.07^\circ\text{C}$ 上昇した。また、直腸温は再灌流後徐々に上がり、30 分以内に虚血前のレベルに戻り、その後も徐々に約 $0.3 \pm 0.10^\circ\text{C}$ 上昇した。

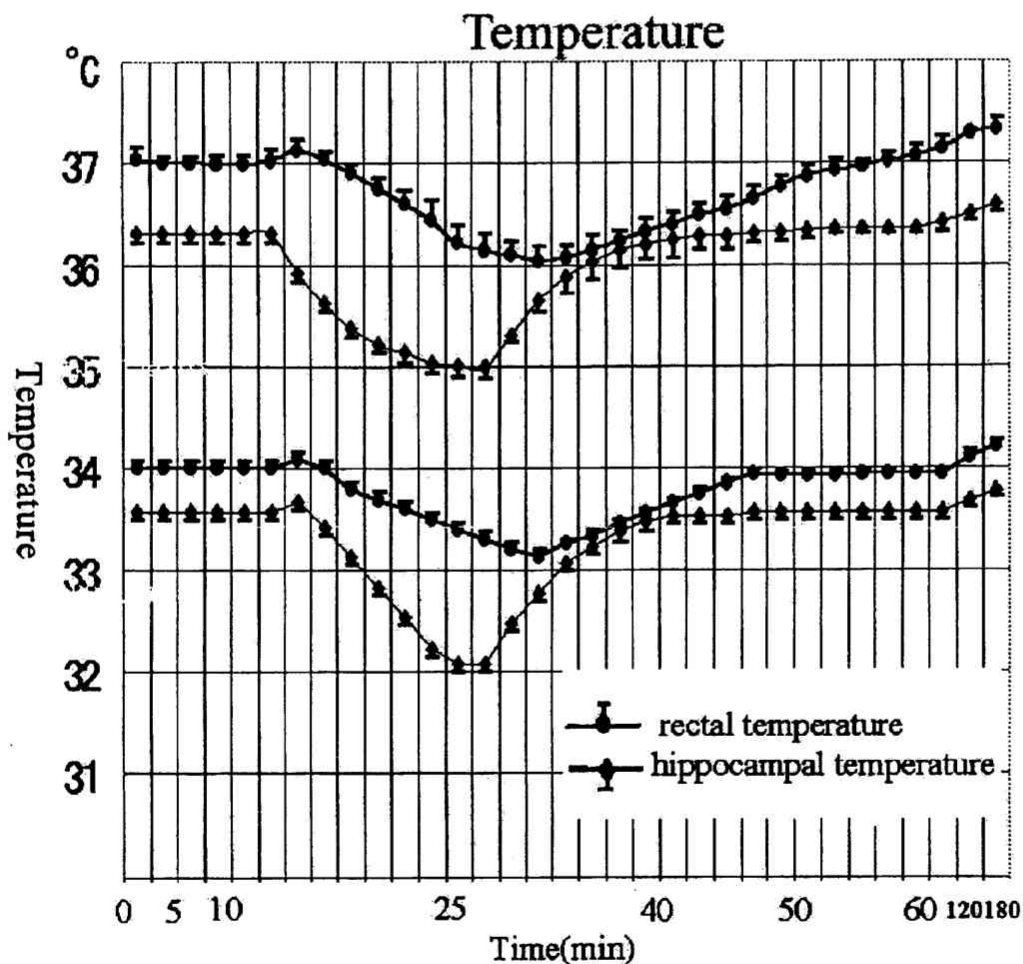


Fig. 1 虚血負荷に伴う直腸温と海馬温の経時的変化

Figure-2 にコントロール、常温群および軽度低体温群におけるオートラジオグラム
 グラムの代表例を示す。常温群と軽度低体温群間で虚血領域に違いはなかった。
 このモデルではコントロールと比べて前脳で高度の虚血を呈し、また椎骨脳底
 動脈の支配領域においては灌流されていることが観察できる。

^{14}C -IAP Autoradiography

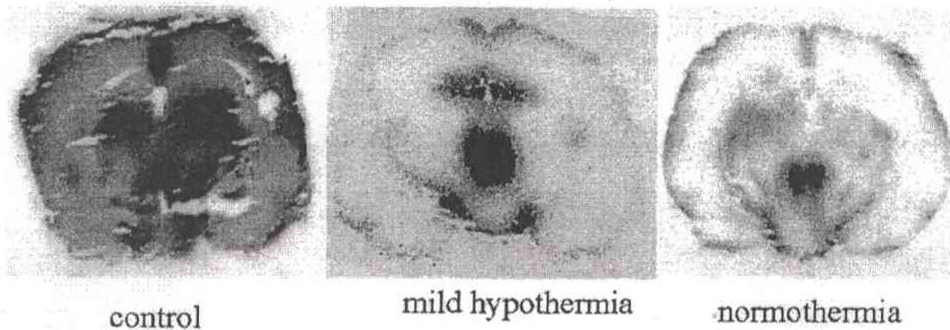


Fig. 2 コントロール、常温群および軽度低体温群における
 オートラジオグラム代表例

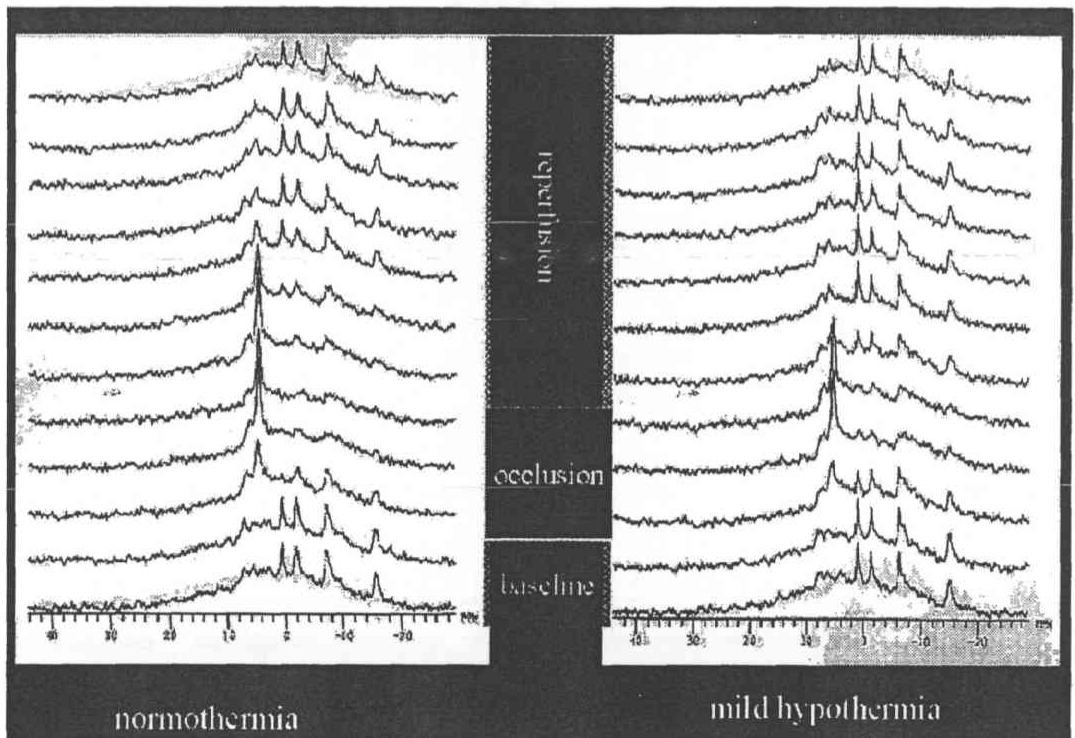


Fig. 3 虚血負荷に伴うリン共鳴スペクトルの経時的変化

Figure-3 に虚血前、虚血中および再灌流後における常温群と軽度低体温群から得られた共鳴スペクトルの経時変化の代表例を示す。また、Figure-4 に両群における ATP、PCr、Pi レベルおよび細胞内 pH の経時変化を示す。虚血前および虚血中における各リン酸化合物レベルおよび細胞内 pH とともに常温群と軽度低体温群の間で統計学的有意差はなかった。虚血 15 分後、ATP および PCr は常温群、軽度低体温群ともにそれぞれ base line の 30% および 20% まで急激に低下した。また、虚血 15 分後 Pi は baseline の 4.7 倍まで急激に増加した。細胞内 pH は常温群で 7.07 ± 0.10 から 6.66 ± 0.06 に、また軽度低体温群では 7.07 ± 0.07 から 6.71 ± 0.09 にそれぞれ低下した。再灌流後、各リン酸化合物レベルは虚血前のレベルに回復していった。軽度低体温群では再灌流 10 分から 25 分の間でその回復は常温群に比べて有意に早かった。軽度低体温群における ATP および

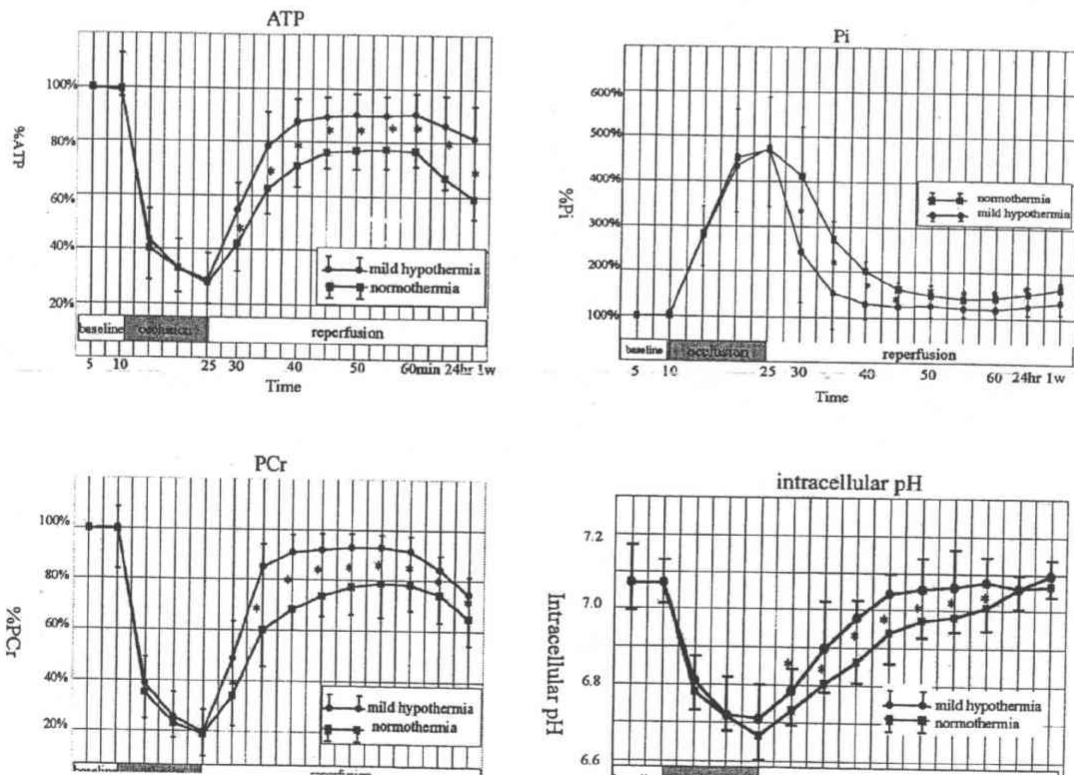


Fig. 4 常温群および、軽度低体温群におけるリン酸化合物濃度および細胞内 pH の経時的変化

PCr レベルは baseline の $90.2 \pm 7.8\%$ 、 $92.9 \pm 5.6\%$ まで回復した。また、常温群では ATP および PCr レベルは base line の $73.3 \pm 7.0\%$ 、 $78.3 \pm 13.4\%$ までの回復に止まり、軽度低体温群の方が Pi レベルは常温群よりも有意に早く base line の約 20%のレベルまで回復していた。再灌流後、軽度低体温群における細胞内 pH は常温群よりも有意に早く baseline レベルまで回復した。虚血 1 週間後、ATP、PCr は軽度低体温群において baseline の $74.5 \pm 6.9\%$ 、 $81.6 \pm 11.9\%$ に、また常温群においては $64.9 \pm 10.6\%$ 、 $59.3 \pm 7.3\%$ までそれぞれ徐々に減少した。一方、Pi は軽度低体温群において baseline の $135.4 \pm 14.8\%$ に、また常温群においては $165.7 \pm 24.6\%$ まで徐々に増加した。

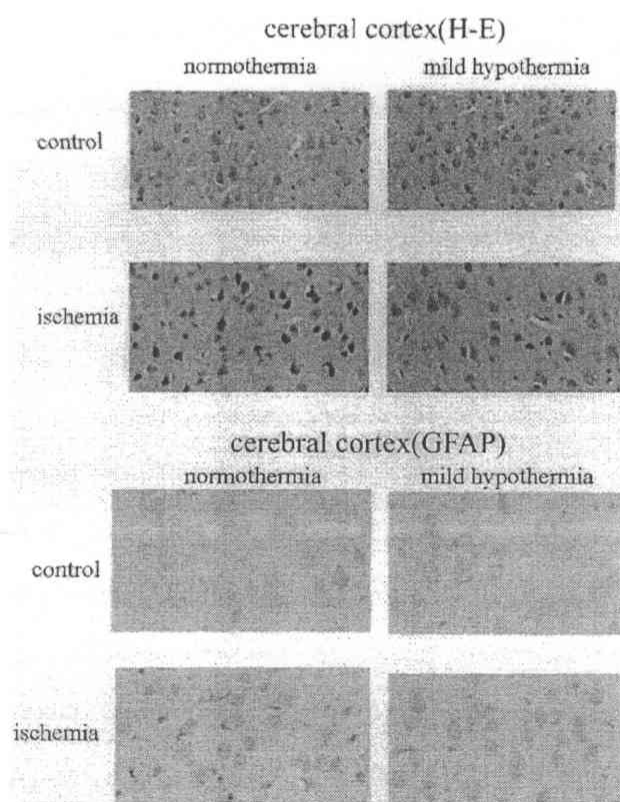


Fig.5a 大脳皮質と海馬の CA-1 領域における組織標本

Figure- 5a に常温群と軽度低体温群における大脳皮質と海馬の CA-1 領域における神経細胞障害を表した組織標本写真を示す。壊死性神経細胞は濃染された核とエオジン好性の細胞質によって同定される。Table 2 は軽度低体温群と常温群における海馬と大脳皮質における神経細胞障害の数をまとめたものである。海馬における虚血性神経細胞障害は常温群で $82 \pm 10\%$ であったのに対して、軽度低体温群では $35 \pm 15\%$ しか障害されていなかった。また、大脳皮質における虚血性

神経細胞障害は、常温群で約 $59 \pm 11\%$ であったのに対して軽度低体温群では 24

±13%しか障害されていなかった。常温群では軽度低体温群よりも海馬や大脳皮質において有意により多くの神経細胞障害を示した(P<0.01)。

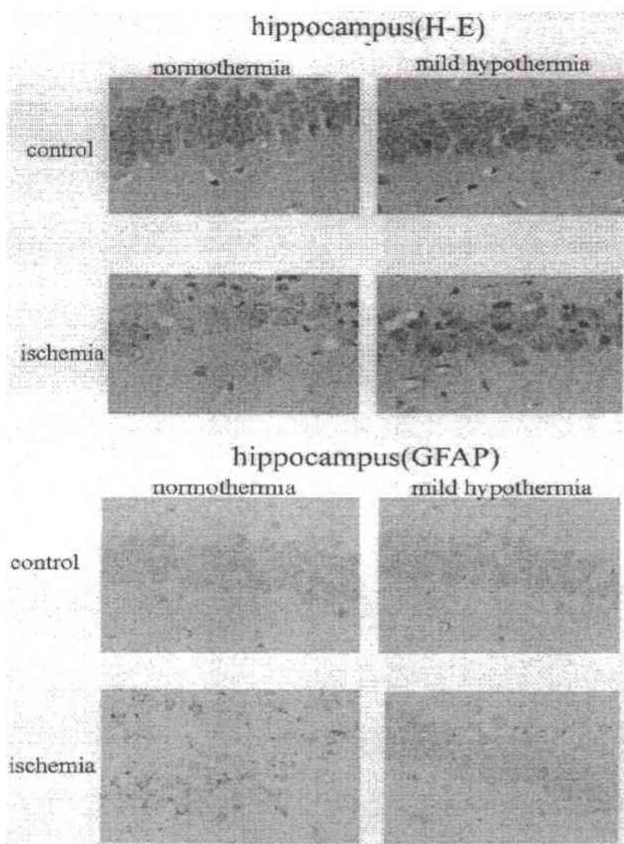


Fig.5 b 大脳皮質と海馬の CA-1 領域における GFAP 活性

Figure- 5b は常温群と軽度低体温群における大脳皮質と海馬の CA-1 領域における GFAP reactivity をそれぞれ表したものである。コントロールでは GFAP 陽性 astrocyte は主に白質で見られ、海馬や大脳皮質にはほとんどみられない。GFAP 陽性 astrocyte は小さい核で明瞭であり、明るく、GFAP に細胞質が染まって見える。Table 2 は軽度低体温群と常温群における虚血群とコントロール群の海馬と大脳皮質における astrocyte reactivity をまとめたものである。

Table 2

Neuronal injury and astrocyte reactivity in mild hypothermic and normothermic group

	Hippocampus(H-E)	cortex(H-E)	hippocampus(GFAP)	cortex(GFAP)
MHT(%)	35±15 (0) *	24±15 (0) *	2.56±1.56 (0.37±0.28) *	1.03±0.84 (0.07±0.07)*
NT (%)	82±10 (0)	59±11 (0)	4.48±1.27 (0.15±0.12)	4.74±1.96 (0.04±0.03)

(): control MHT: mild hypothermia NT: normothermia

*p<0.01 compared to the normothermic and control group

astrocyte reactivity は、海馬において常温群では 4.48±1.27%(コントロール 0.15±0.12%)であったが、軽度低体温群では 2.56±1.56%であり(コントロール 0.37±0.28%), 大脳皮質では常温群で 4.74±1.96%(コントロール 0.4±0.03%)

であったが、軽度低体温群では $1.03 \pm 0.84\%$ であった(コントロール $0.70 \pm 0.07\%$)。常温群では軽度低体温群よりも海馬や大脳皮質において有意に高い astrocyte reactivity を示した ($P < 0.01$)。

考 察

neuronal damage に至る様々な process を低体温がどのようにして阻止するのかという点に関してはまだ明らかにされていない。低体温における neuroprotection のメカニズムの一つとして、これまで脳代謝 (CMR) の減少が一般に受け入れられていた。すなわち、hypothermia に関連した代謝活性が減少し、結果的にグルコースや酸素に対する脳代謝率 (CMR) の減少が起こるというものである。さらに、高エネルギーリン酸の枯渇と乳酸の蓄積の減少率も hypothermia によると報告されている。このように、hypothermia の脳への効果はもっぱら脳代謝率 (CMR) の減少によるものと信じられてきた。しかし、温度が数度さがると約 20% の CMR が下がるが、たとえ CMR が 50% 下がったとしても脳梗塞の領域を必ずしも減少させるとは限らない。さらに、hypothermia であるにも関わらず虚血脳で乳酸の蓄積が認められている。したがって、低体温における neuroprotection のメカニズムは CMR の減少だけでは説明できない。しかし、hypothermia によるエネルギー需要の低下は、ATP store の preservation や再灌流の間 complex 4 を傷害し、組織のエネルギー状態を危うくするフリーラジカルの産生をより少なくすることの一因になると考えられる。この仮説は hypothermia が postischemic oxygen radical activity や endogenous antioxidants と lipid peroxidation の消費を制限しているという事実によって支持されている。また hypothermia では、エネルギー需要量に対する高エネルギー

ギーリン酸の枯渇の時間経過が著明に遅れているので、hypothermia は虚血中エネルギーの枯渇の量を少なくして傷害を減らしている可能性がある。本研究では、虚血前および虚血中の高エネルギーリン酸化合物レベルは常温群と軽度低体温群で有意な違いを認めなかった。しかし、再還流後軽度低体温群では、PCr、ATP、Pi および pH とも常温群よりも速やかに回復し、約 10-20%の回復の差を認めた。再還流の間 ATP はより早く補給されるので、回復する能力をもった細胞膜の potential や虚血神経細胞やグリア細胞の生き残ったものの統合性 (integrity) の再確立が得られる。少なくとも一部分、hypothermia によって代謝に必要とされる酸素やグルコースの量が減少し、細胞のエネルギー消費が減少することによって neuronal viability の preserve を助けていると考えられる。それゆえ、超急性期において軽度低体温は虚血脳のエネルギー産生過程に対して脳保護効果をもたらす可能性がある。正常脳においては、hypothermia は 1℃あたりわずか 5%の metabolic activity を減らし、エネルギーの貯蔵に影響しないことから、hypothermia で保護された程度は完全に細胞の代謝活性によるものではないことが示唆されている。本実験においても、虚血前に比べて虚血時に軽度低体温群および常温群とも PCr および ATP レベルの 70-80%の低下および pH の低下と Pi レベルの 470%までの増加が観察されたが、これらは両群間で有意差を認めなかった。このことは、これまで報告されているように軽度低体温のエネルギー状態は常温の場合と差がないことを示している。したがって、hypothermia の効果は neuronal viability を維持するのに必要な脳血流の閾値を低くしている可能性があり、はじめに脳梗塞に陥った領域の周囲の、まだ脳梗塞に陥っていない viable な組織の ischemic penumbra の割合が広がることを考えられる。また、今回の実験では、虚血 1 時間前から虚血後 3 時間まで両群とも体温を維持し、その後両群とも室温に戻した。24 時間後や 1 週間後に

軽度低体温群で baseline の 15-25%、常温群で 25-40%の PCr および ATP レベルの低下、また軽度低体温群で baseline の 135%、常温群で 166%の Pi レベルの上昇を認めた。このことは、再還流後も高エネルギーリン酸の枯渇がさらに進んでいること、また常温群でより進んでいることを示す。また再還流後、常温群では海馬温は再還流 16 分後に虚血前のレベルまで戻り、その後徐々に 0.3°C 程度 baseline よりも高くなり、hyperthermia になっていることを推測させる。hyperthermia は局所および全体の虚血障害を助長し、進行させるといわれている。これは、hypothermia でみられたのとは反対の方向ではあるが、同様の機序の多くに関与しているものと考えられる。したがって、常温群での虚血性組織障害は再還流後もさらに進行した可能性がある。

degenerating process は虚血中にすでに起こっている可能性があるが、虚血に引き続く secondary mechanism によって neuronal death に至る経路に含まれたミトコンドリアや細胞の障害を抑制するために介在できる therapeutic time window がある。すなわち、hypothermia の neuroprotective 効果は、少なくとも一部はミトコンドリアレベルで electron transport chain enzyme、特に complex 4 に対する障害やフリーラジカルの産生によるということよりも、むしろ酸素に対する電子伝達系の正常な流れによって可能となる、統合されたミトコンドリアの機能を制限することによって理解されている。さらに、再還流後の組織障害として遅発性虚血性神経細胞障害の進行も当然関与していることが推察される。したがって、軽度低体温としては虚血後 3 時間まで低体温を維持した条件では不十分である可能性も考えられる。

³¹P-MRS で得られた結果では、常温群と軽度低体温群の間で障害の程度の差が約 10-20%であったのに対して、病理組織所見では両群の間に障害の程度の差が 30-40%であった。この解離の理由の一つとして、虚血に陥った前脳だけで

なく、虚血に陥っていない脳幹部や小脳など頸動脈の支配領域外の領域も含めて測定された可能性がある。すなわち虚血時に前脳は高度の虚血であることと、脳にはエネルギーのリザーブがないことから、そのエネルギー代謝（供給）はほぼ0であるはずなのに、PCr および ATP が両群ともに 20-30%認められているということからもその可能性が示唆される。また、病理組織の結果が実際の全体の障害よりも強調された結果になっている可能性がある。なぜならば、病理組織学的に観察された海馬 CA-1 領域や大脳皮質は虚血に対して選択的に障害されやすい部位であるからである。海馬温が直腸温に比べて虚血直後および再還流直後で速やかに変化したのは、この虚血モデルが前脳のほぼ全域で高度の虚血が認められたことから、海馬温は血流の影響を大きく受けていたものと考えられる。本実験では、海馬温は脳虚血時に低下するが、再還流後は少なくとも一時的に baseline よりも上がる可能性が示された。再灌流後脳温が上がる理由としては、一つは血流が戻ったためと、もう一つは戻った血流による虚血侵襲後に続発する虚血細胞の2次的な化学反応の結果であることが考えられる。

軽度低体温は常温の場合とエネルギー状態に差がないのにも関わらず、脳虚血に対して著明な neuroprotective effect が ^{31}P -MRS による測定結果や組織学的に認められたのは、脳代謝率の減少によるというよりも、むしろ虚血後に neuronal death に導く secondary mechanism を抑制しているためと考えられる。さらに、 ^{31}P -MRS によって高エネルギーリン酸化合物が軽度低体温群でより早くかつより高いレベルまで回復したことから、secondary mechanism の抑制はミトコンドリアレベルで起こっていることを示唆する。