大木明子 1,2, 齋藤茂芳 1,3, 福地一樹 1

1. 大阪大学医学系研究科保健学専攻生体物理工学講座
2. 京都大学医学部附属病院放射線部
3. 国立循環器病研究センター先端医療技術開発部

はじめに

編集委員企画

プレミアム

新生児低酸素性虚血性脳症(Hypoxic-Ischemic Encephalopathy: HIE)とは、胎児や新生児が低酸素 及び虚血状態にさらされ仮死状態になることで引き起こされる脳障害である.先進国においては出生児 1000に対して 1~8人に発症するといわれており、他の地域ではさらに多くの患児が存在する<sup>1</sup>.標準的 治療法としては低体温療法が存在するが、死亡率の大きな改善は見られない<sup>2</sup>.生存児にも脳性麻痺、て んかん、精神発達遅延などの長期的な障害を残すため、新生児疾患の中でも特に重篤で予後不良の疾患 であると言える<sup>3</sup>. HIE は臨床症状から病態を判定することが困難であるため磁気共鳴診断法(magnetic resonance imaging: MRI)などの画像診断装置が果たす役割は大きい.しかし臨床現場では患児の蘇生 措置が優先されるために、十分なデータを経時的に評価することは容易ではない.筆者らは HIE モデル 動物を作製し、超高磁場の前臨床用 MRI を用いて病態を評価した.本稿ではその研究内容を概説する.

1. モデル動物について

新規の治療法や診断法の開発のためにヒトを対象として実験することには大きな制約があるため、疾 患モデル動物を用いた基礎検討が不可欠となる.モデル動物を用いるメリットは、一定の環境下におい て生理的ばらつきをコントロールできること、組織学的評価を行えることなどが挙げられる.作製過程 において動物種、週齢、作製方法などを統一することで同程度の臓器別あるいは全身性の疾患が作成さ れる.近年では病態の分子機構の解明という観点においても数々のモデルが開発されている. HIE のモ デル動物に関しては、1960年に成体ラットに無酸素と外科処置を施したモデルが報告されており4、そ の後手技の改良が重ねられ Rice-vannuciモデルが開発された5.このモデルでは麻酔下で新生仔ラット

(生後7日齢)の片側頸動脈を結紮・離断後,低酸素下に暴露してHIEの病態を作製する(Fig.1).病 理学的評価や行動実験などに広く使われており,HIEモデル動物として最も一般的に使用されている. Rice-vannuciモデルでは低酸素の負荷時間を長く温度を高くすることで重症度は増加するという特徴が あり 6.7,この特徴を生かして作製条件を変えることで軽度から重度までの病態を作成することが可能で ある.



Fig. 1 Rice らの HIE モデル動物の作製法

2. イメージング技術を用いた HIE モデルの評価

画像検査による評価は、評価者の主観が入りにくく、経時的な評価が可能であることから臨床現場で も用いられている. HIE の診断では、拡散強調画像(diffusion weighted image : DWI)で発症数時間 後以内から高信号を示し MRS (magnetic resonance spectroscopy : MRS) も有用であることから、MRI が早期診断に適したイメージング手法であると言える.また、MRI を用いた小動物実験においては専用 の高磁場装置が開発されている.筆者が使用した機器はブルカー社製の 7T MRI (BioSpec 70/30 USR) である.30cm のボア径を持ち、マウスやラットなどのげっ歯類からウサギや小型のサルまで撮影するこ とが出来る.100µm 程度の高い分解能を有するため小・中動物の撮像に適しており、発症から治療後ま でを経時的にイメージングすることが可能である.筆者らは、化学交換飽和移動(chemical exchange saturation transfer : CEST)法や Neurite Orientation Dispersion and Density Imaging (NODDI) といった先端的な MRI 技術を用いて HIE モデルの脳内水分子の拡散や代謝状態について検討を行った. 以下にその内容を解説する.

3. CEST イメージングを用いた HIE モデルの脳代謝状態の評価

CEST イメージングとは、生体内バルク水と交換可能な代謝物のプロトンとの磁化の化学交換をター ゲットにしたイメージング法であり、アミドプロトン (O=C-NH)、アミノプロトン (-NH2)、ヒドロ キシルプロトン (-OH) の三種類を対象とする<sup>8</sup>. これらのプロトンに固有の周波数のラジオ波を印加す ることで対象のプロトンが飽和され、バルク水のプロトンと化学的に交換される. CEST イメージング では、このバルク水の信号変化を画像化する. 化学シフトは高磁場装置ほど広範になるため、CEST イ メージングでは高磁場 MRI の使用が有利になる. 現在までの HIE モデル評価に関しては、新生仔豚モ デルに amide proton transfer (APT) イメージングを応用した報告があるが<sup>9</sup>、標準的撮影法との比較 検討や複数の代謝物評価はされていない. そこで筆者らは、前臨床用 MRI により複数のオフセット周波 数を用いた CEST イメージングで HIE モデルを経時的に評価した<sup>10</sup>. 日齢8のWistar ラット13匹に対して、イソフルラン吸入麻酔下(導入期3%、維持期1.5%)で左頸 動脈を露出し、7-0絹糸で結紮及び切離した.保温器内で45分間回復させた後、34℃で加湿されたチャ ンバーに入れて1時間低酸素(酸素8%)に暴露した.低酸素暴露から2時間後と24時間後に7TMRI (BioSpec 70/30 USR; Bruker Biospin, Ettlingen, Germany)を用いてCEST 画像,DWI,T2強調 画像,MRSを撮影した.

DWI 撮影は multi-shot echo-planar imaging を用いた. 撮像条件は TR/TE = 3000/33 ms, NEX = 1, 軸数 = 30, b 値 = 0, 250, 500, 750, 1000 s/mm<sup>2</sup>, FOV = 19.2 × 19.2 mm<sup>2</sup>, matrix size = 128 × 128 である. T<sub>2</sub>強調画像では rapid acquisition with relaxation enhancement (RARE) を用いた. 撮像条 件は, TR/TE = 4000/33 ms, NEX = 4, rare factor = 8, FOV = 19.2 × 19.2 mm<sup>2</sup>, matrix size = 256 × 256 である. CEST 画像は magnetization transfer RARE を用いた. 撮像条件は TR/TE = 4000/43 ms, NEX = 1, FOV = 19.2 × 19.2 mm<sup>2</sup>, matrix size = 128 × 128 である. プリサチュレーションパルス強度 は 3.0µT, 測定範囲は±5.0 ppm (0.5ppm 間隔), B0 補正には WASSR 法を使用した. CEST 画像にお いては複数のオフセット周波数 (3.5, 2.0, 1.0, 0.5 ppm) で Magnetization Transfer Ratio asymmetry (MTRasym) マップを作成し, 虚血領域とその反対側の MTRasym (%) を算出した. MRS では虚血 部位及びその反対側に 2×2×2 mm<sup>3</sup> の関心領域を設定した. PRESS 法を使用し, TR/TE = 2500/20 ms とした. シミングには fast automatic shimming by mapping along projections を用いた. 解析は LCmodel を使用し, 代謝物評価を行った.

負荷 2 時間および 24 時間後には, DWI 画像の高信号と apparent diffusion coefficient (ADC) マッ プの低信号が観察された (Fig. 2A, C, E, G). CEST 画像では, 負荷 2 時間および 24 時間後において 3.5 ppm と 2.0 ppm で虚血側 MTRasym は有意に低下した (Fig. 3C, D, G, H). CEST 画像では 24 時間後の MTRasym の低下が顕著であり, DWI 画像と比較すると信号変化の領域や様相が一致しないこ とが分かった. MRS では虚血 2 時間後から乳酸の増加が観察された (Fig. 4A). 24 時間後には乳酸増加 に加えてクレアチン, コリン, グルタミン酸, グルタミンの低下が観察された (Fig. 4C). 以上の結果か ら, CEST 画像における信号変化は虚血による pH の低下, エネルギー代謝障害, 細胞死など 9.11 を反映 していたと考えられる. CEST イメージングを用いることで形態変化のみならず脳の代謝状態を早期に 画像化できる可能性が示唆された.



Fig. 2 虚血直後~24 時間後の HIE モデルの MRI 画像



Fig. 3 虚血直後~24 時間後の HIE モデルの MTRasym マップ



Fig. 4 虚血直後~24 時間後の HIE モデルの MRS

## 4. NODDIを用いた新生児低酸素性虚血性脳症モデルラットの重症度評価

NODDIとは、水分子の拡散を細胞内の制限拡散(intracellular volume fraction: ICVF)、細胞間の 束縛拡散(orientation dispersion index: ODI)、脳脊髄液の自由拡散(isotropic volume fraction: ISO) の3つのコンパートに分ける新しい拡散 MRI の手法である<sup>12</sup>. 拡散 MRI を用いた HIE の評価において は、見かけの拡散定数(apparent diffusion coefficient: ADC)や拡散異方性(fractional anisotropy: FA)の値が低下することが報告されているが、必ずしも重症度や回復程度を反映するとは言えない<sup>13</sup>. 筆者らは、従来のパラメータのみでは評価困難であった HIE の病態を、NODDI を用いて検討した<sup>14</sup>.

生後8日目のWistar ラット13匹を対象とした.麻酔下で片側頸動脈を結紮・離断後,1時間又は2時間の低酸素負荷を行い,軽度群(6匹)と重度群(7匹)を作製した.負荷の1,24,72,168時間後に7TMRIを用いて拡散強調画像,T2強調画像,arterial spin labelling (ASL) 画像を撮影した.拡散強調画像はmulti-shot echo-planar imagingを用いた.撮像条件はTR/TE = 3000/33 ms, NEX = 1,軸数 = 30, b 値 = 0, 1000, 2000 s/mm<sup>2</sup>, FOV = 19.2 × 19.2 mm<sup>2</sup>, matrix size = 128 × 128 である. ASL 画像とT2強調画像ではRAREを用いた.ASL 画像の撮像条件はTR/TE = 12000/46 ms, NEX = 1, rare factor = 72, FOV = 19.2 × 19.2 mm<sup>2</sup>, Matrix = 128 × 128 である.T2強調画像の撮像条件は,TR/TE = 4000/33 ms, NEX = 4, rare factor = 8, FOV = 19.2 × 19.2 mm<sup>2</sup>, matrix size = 256 × 256 である. 関心領域は虚血側の皮質,白質,線条体に手動で設定し重度群と軽度群を比較した.DWI 画像より ADC 値と FA 値, NODDI 画像より ICVF 値, ISO 値, ODI 値, ASL 画像より cerebral blood flow (CBF) 値を算出した.

負荷1時間後には両群のCBF 値は低下したが,重症度による差は認められなかった.ADC 値は,軽 度群では1時間後から低下し,168時間後に回復傾向が認められた(Fig.5C,G).重度群においても1 時間後に低信号が見られ,168時間後には皮質の低信号と線条体の高信号が観察された(Fig.5K,O). FA 値に関しては,障害側で低下し,168時間後の重度群では軽度群より有意に低値となった(Fig.5H, P).NODDI 画像では,1時間後に両群で ICVF 値と ODI 値は高値を示した(Fig.6B,C,H,I).168 時間後には重度群で障害部位が顕著になり,ICVF 値と ISO 値は ADC マップの高信号領域と一致して 特に高値を示した(Fig.6J,K).ISO 値と ICVF 値は負荷から24時間以降,ODI 値は1~168時間以降 に重度別での有意差を認めた.負荷直後の ODI 値の増加は細胞性浮腫による神経突起構造の乱れによる ものと考えられ,168時間後の ICVF 値と ISO 値の上昇は血管性浮腫との関連が示唆される<sup>15,16</sup>.本研 究では HIE の軽度及び重度モデルを作製することに成功し,早期に HIE の重度判定が可能であると示 唆された.HIE の重症度は治療介入において重要なファクターとなるため,今後は MRI 画像を用いた治 療法の選択や効果判定への応用などが期待される.



Fig. 5 虚血直後~168 時間後の HIE モデルの MRI 画像(上段:軽度群,下段:重度群)



Fig. 6 虚血直後~168 時間後の HIE モデルの NODDI 画像 (上段:軽度群,下段:重度群)

結語

本稿では前臨床 MRI を用いた HIE モデル動物の評価にいて概説した. MRI を始めとするイメージン グ装置のニーズは臨床診断のみならず,機能及び代謝の評価や細胞レベルでの評価にも広がっている. また,近年の実験動物では HIE のような外科処置モデルだけでなく自然発症モデルや遺伝子改変モデル も開発されており,これらを活用することで研究対象は拡大していくと考えられる.前臨床イメージン グ機器と疾患モデル動物とを用いた研究が今後の医療に大きく貢献していくことが期待される.

謝辞

本稿で紹介した研究成果は樋口隆弘教授(岡山大学医歯薬総合研究科,ヴュルツブルク大学心臓分子 イメージング研究部門), 辻雅弘教授(京都女子大学食物栄養学科),畑純一講師(東京慈恵会医科大学 再生医学研究部)との共同研究を含みます.この場をお借りして厚く御礼を申し上げます.なお,研究 内容は JSPS 科研費 JP19K17254 の助成を受けたものです. 参考文献

- Douglas-Escobar, M. & Weiss, M. D. Hypoxic-ischemic encephalopathy: a review for the clinician. JAMA Pediatr. 169, 397-403 (2015).
- Edwards, A. D. *et al.* Neurological outcomes at 18 months of age after moderate hypothermia for perinatal hypoxic ischaemic encephalopathy: synthesis and meta-analysis of trial data. *BMJ.* 340, c363 (2010).
- Lai, M. C. & Yang, S. N. Perinatal hypoxic-ischemic encephalopathy. J Biomed Biotechnol. 2011, 609813 (2011).
- 4. Levine, S. Anoxic-ischemic encephalopathy in rats. Am J Pathol. 36, 1-17 (1960).
- Rice, J. E., 3rd, Vannucci, R. C. & Brierley, J. B. The influence of immaturity on hypoxic-ischemic brain damage in the rat. *Ann Neurol.* 9, 131-141 (1981).
- Tuor, U. I. *et al.* Differential progression of magnetization transfer imaging changes depending on severity of cerebral hypoxic-ischemic injury. *J Cereb Blood Flow Metab.* 28, 1613-1623 (2008).
- Liu, Y., Silverstein, F. S., Skoff, R. & Barks, J. D. Hypoxic-ischemic oligodendroglial injury in neonatal rat brain. *Pediatr Res.* 51, 25-33 (2002).
- Ward, K. M., Aletras, A. H. & Balaban, R. S. A new class of contrast agents for MRI based on proton chemical exchange dependent saturation transfer (CEST). J Magn Reson. 143, 79-87 (2000).
- Zheng, Y. & Wang, X. M. Measurement of Lactate Content and Amide Proton Transfer Values in the Basal Ganglia of a Neonatal Piglet Hypoxic-Ischemic Brain Injury Model Using MRI. AJNR Am J Neuroradiol. 38, 827-834 (2017).
- Ohki, A. *et al.* Comparison of Chemical Exchange Saturation Transfer Imaging with Diffusion-weighted Imaging and Magnetic Resonance Spectroscopy in a Rat Model of Hypoxic-ischemic Encephalopathy. *Magn Reson Med Sci* (2020).
- Cheong, J. L. *et al.* Proton MR spectroscopy in neonates with perinatal cerebral hypoxic-ischemic injury: metabolite peak-area ratios, relaxation times, and absolute concentrations. *AJNR Am J Neuroradiol.* 27, 1546-1554 (2006).
- Zhang, H., Schneider, T., Wheeler-Kingshott, C. A. & Alexander, D. C. NODDI: practical in vivo neurite orientation dispersion and density imaging of the human brain. *Neuroimage*. 61, 1000-1016 (2012).
- Brissaud, O. *et al.* Efficiency of fractional anisotropy and apparent diffusion coefficient on diffusion tensor imaging in prognosis of neonates with hypoxic-ischemic encephalopathy: a methodologic prospective pilot study. *AJNR Am J Neuroradiol.* 31, 282-287 (2010).
- 14. Ohki, A. *et al.* Neurite orientation dispersion and density imaging for evaluating the severity of neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy in rats. *Magn Reson Imaging*. 62, 214-219 (2019).
- Wang, Z. *et al.* A study of neurite orientation dispersion and density imaging in ischemic stroke. *Magn Reson Imaging*. 57, 28-33 (2019).
- 16. Wang, S. *et al.* Characterization of white matter injury in a hypoxic-ischemic neonatal rat model by diffusion tensor MRI. *Stroke.* 39, 2348-2353 (2008).