

筋分子拡散強調画像における拡散係数と筋組織虚血との関係

金谷 正一

明治鍼灸大学大学院 鍼灸臨床医学

要旨 : 拡散強調画像を用いて組織内拡散を拡散係数 (Apparent Diffusion Coefficient : ADC) で求め、血流阻害の筋組織におよぼす影響を ADC ならびにレーザー・ドップラー血流測定法による筋組織血流量により検討した。ウイスター系ラットの内側広筋を用い、対照群 (n=4)、50%血流阻害結紮群 (n=4)、心停止群 (n=4) の3群に分けた。その結果、筋血流量の減少に伴い ADC はわずかな減少を示し、結紮群ならびに心停止群では対照群に比し ADC は共に有意な低値を示した ($p < 0.05$)。血流を反映しない条件での ADC の変化は、組織障害に伴う生体内水の拡散の変化を示していると考えた。

I 緒 言

筋における現在までの NMR 研究は、筋組織内での水の状態や代謝産物含有量の変化を MRI (Magnetic Resonance Imaging) を用いた画像的な解析や MRS (Magnetic Resonance Spectroscopy) を用いた生化学的解析などが主であった^{15, 21, 22)}。近年、NMR を用いて、組織内の水の動きを拡散強調画像 (Diffusion Weighted Imaging : 以下 DWI と略す) として抽出することが可能となってきた⁵⁻¹⁷⁾。この方法は、先に発見された Hahn の spinecho 法¹⁾ の 180° パルスの前後に motion probing gradient (MPG : 以下 MPG と略す) パルスを付加することで、物質の拡散係数 (Diffusion Coefficient) を求める方法が、Stejskal と Tanner によって示された^{3, 4)}。これを MRI に応用し、生体から拡散係数を求めることができる⁶⁾。生体中の水の拡散係数には血流による寄与も含まれるため、これを見かけの拡散係数 (Apparent Diffusion Coefficient : 以下

ADC と略す) という。DWI は、基礎的ならびに臨床的に様々な病態解析の新しいパラメータとして有用視されてきている。基礎的研究において恵飛須ら⁸⁾ は、水とアセトンの DWI から得られた ADC が、従来の高分解能 NMR 法を用いて得られたそれらの拡散係数とほぼ一致する結果を得、生体および臨床応用への妥当性を明らかにしている。DWI は、臨床研究、ことに脳神経外科領域において、脳腫瘍の鑑別や急性脳虚血の検出などに用いられ成果をあげている^{6-14), 16, 18, 19)}。しかし、基礎的研究や臨床的な病態解析において、筋組織に対する DWI についての報告は少ない¹⁷⁾。これは従来の装置では、水の T2 緩和時間が短いため、筋組織を十分な S/N 比で測定することができなかったためである。

本研究は、DWI 測定に用いる MPG を強くし、測定パルスシーケンスを改良することで十分な S/N 比を得ることができた。本法により正常、血流阻害、心停止条件での大腿部筋の DWI から ADC

Key Words : 分子拡散強調画像 Diffusion Weighted Imaging : DWI, 拡散係数 Apparent Diffusion Coefficient : ADC, 虚血 Ischemia, レーザー・ドップラー血流計 Lazer Doppler flowmetry

を求め、一方、レーザー・ドップラー血流計により同部位の血流量を同時モニタし、血流障害時のADC変化が組織障害に起因することを検討した。

II 実験動物と方法

(a) 実験動物

実験動物としてウィスター系ラット（雄、体重250g～300g、9～10週齢）を用いた。これらのラットは、室温25℃、Light-dark cycle 12:12時間で飼育し、餌（日本クレア製、CE-2）と水は自由に摂取させた。ラットは、対照群と処置群に分けた。対照群は、処置群と同様の処置を行ったshamモデルを4匹、処置群は、結紮群と心停止群、各4匹ずつとした。

麻酔は、ネンプタール（ip, 30mg/kg）で導入し、音刺激に対する筋反射の消失を確認した後、ハロセン（流量0.4ml/min、濃度1%）を自家製マスクにて吸入させ、維持した。吸入麻酔が安定したのを確認し、自家製のアクリルMR測定台

に仰臥位で固定した。直腸温は、サーモメーター（HEH-TM4、オムロン社製）の熱電対センサー（銅・コンスタンタン、0.41mm径）を直腸に3cm挿入し、測定した。体温保持のため、MR測定台に装着した自家製ポリエチレンチューブ保温マットに温水還流装置であるバスサーキュレーター（RTE-210、エムエス社製）で温水を環流した。マット上のラットの直腸温は実験中 $37 \pm 0.5^\circ\text{C}$ に維持した。

筋血流障害モデルラットは、右後肢大腿内側部を切開し大腿動・静脈を剖出後、森川¹⁵⁾らの方法に準拠し、大腿動脈に3-0絹糸を掛け、結紮した。レーザー・ドップラー血流計測定用プローブ装着部位を残存し、切創を縫合した。後に血管の結紮と再開通を遠隔的に操作できるよう図1に示すように、絹糸をテフロン製チューブに通し、体外に露出した。対照群と心停止群に加えられた処置は、筋血流障害モデルと同様の方法で行い、結紮は加えなかった。

Experimental Procedure

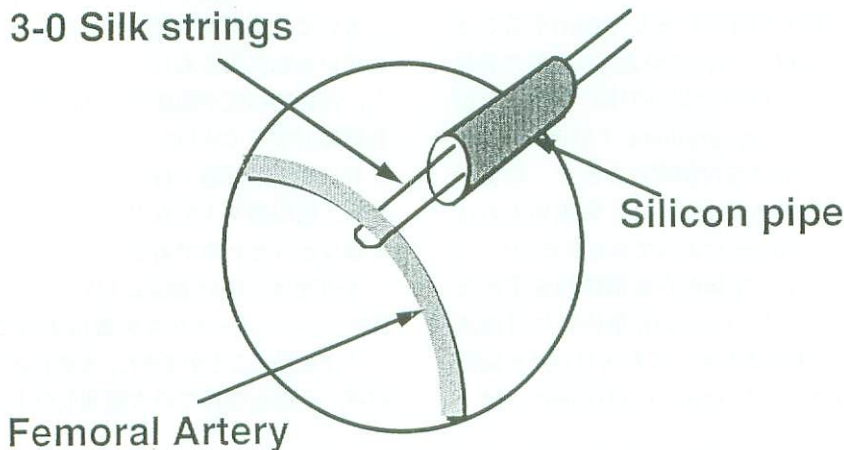


図1 ラット大腿動脈結紮方法

大腿を剖出し、3-0絹糸を掛け、テフロン製チューブに通し体外露出した。

(b) 筋組織血流測定

血流量 (ml/min/100 g) は、血管結紮前後においてレーザー・ドップラー血流計 (ALF21RD, アドバンス社製) により測定した。プローブは、前述の剖出した内側広筋の筋膜面近傍に装着した。結紮前20分間測定後、筋組織血流量が50%減少するように結紮糸を牽引し、sampling rate 1 point/sec で120分間経時的に局所の筋血流量を測定した。レーザー・ドップラー血流計のアナログデータを、AD変換 (BIOPAC システム社製) 後、パーソナルコンピュータによる波形解析システムソフト (Acknowledge, BIOPAC システム社製) によって解析した (図2)。

(c) DWI測定とADCの算出

DWI測定には、動物実験用MR装置 (CSI Omega System, 4.7テスラボア横置型超伝導磁石, Bruker社製) を用い、MR用プローブとして自作したSingle tune surface coil (長径40

mm, 短径25mm) をラットの右大腿部に密着するように装着した。測定条件は、マトリックスサイズ: 128×128, 測定領域 (FOV): 64mm³, スライス厚: 4 mm, エコー時間 (TE): 33msec, 繰り返し時間 (TR): 2000msec であった (図2)。

MPGによるb・factorの測定条件は、2つのMPGパルスの時間間隔 (II): 19.01ms, MPGパルスの印加時間 (d1): 7.01ms, MPGパルスの磁場強度 (G1): 0, 9, 12, 14の各数値であった。

ADCの算出は、Spin echo法のT2強調画像において180°パルスの前後にMPGパルスを加えて信号の減衰を測定する方法が用いられている^{5-14, 16, 18, 19}。これは、プロトンが全く拡散しない場合、最初に加えたMPGによって変わったスピンの位相は第2のMPGパルスにて元に戻される。そのため信号の減衰は生じない。しかし、自由に拡散しているプロトンの場合、傾斜磁場があると、時間と共に次々に位相が変わるため、第1のMPGによる位相の変化は第2のMPGにて元に戻せない。そのため信号が低下する。Spin echo画像における信号強度は、次式により得られる^{2, 5-14, 16, 18, 19}。

$$S \propto f(v) \cdot \rho \cdot [1 - \exp(-TR/T1)] \cdot \exp(-TE/T2) \cdot \exp(-b \cdot D)$$

十分にTR, TEが長い時、

$$S \propto f(v) \cdot \rho \cdot \exp(-TE/T2) \cdot \exp(-b \cdot D) \quad (1)$$

ここで、f(v)は流速、ρはプロトン密度、Dは(ADC)で、b (gradient factor) は、傾斜磁場総量に gyromagnetic factor γ を乗じたものの2乗の積分値の3軸における総和であり、例えば、MPGパルスのみを印加した場合には、次のように求められる。

$$b = \gamma^2 \sum \{G1^2 \cdot d1^2 \cdot (2d1/3 + II) \quad (1=x, y, z)$$

但し、G1: NPGパルスの磁場強度

d1: MPGパルスの印加時間

II: 2つのMPGパルスの時間間隔

b・factorを0, 413, 735, 1000sec/mm²と変えてそれぞれ拡散強調画像S1, S2, S3, S4を測定し、画像の各点の信号強度とb・factorとの関係に(1)をあてはめ、ADCを求めた。

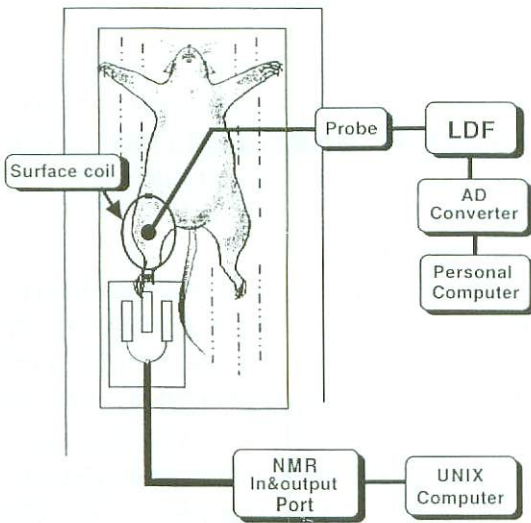


図2 血流量ならびにMRI 想定装置の模式図

図上はLDF (レーザー・ドップラー血流計) を用いた血流量測定、図下はNMRを用いたADC測定を示す。使用機種は4.7テスラ, CSI Omega systemを用い、Matrix size: 128 × 128, FOV: 64mm, slice: 4mm, TE: 33msec, TR: 2000msec で測定を行った。

Time Course

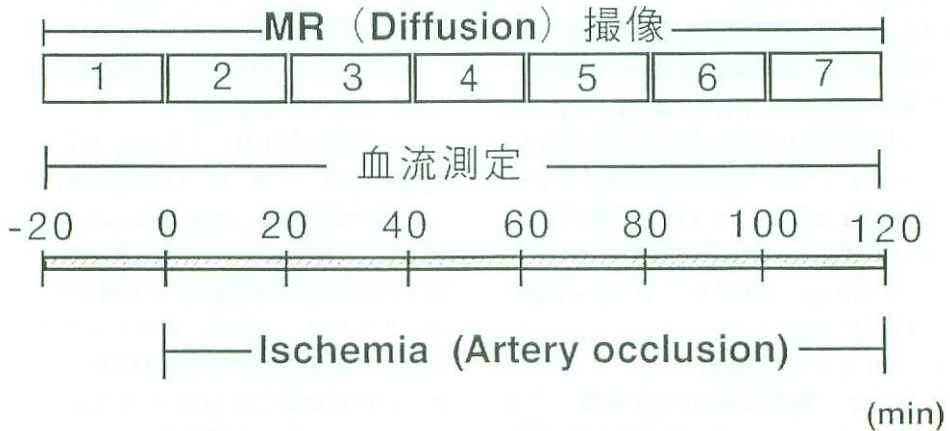


図3 血流量ならびにMR測定方法

MR測定：20分間隔，7回の測定を行った。

血流測定：図に示すようMR測定と同時期に測定を行った。

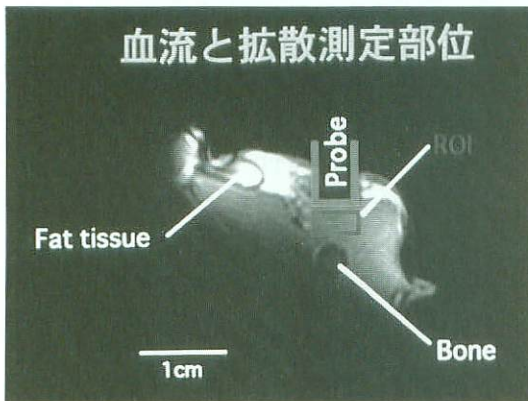


図4 MR画像によるプローブ装着部位ならびにADCの算出部位

プローブはMR画像上では黒く抜け、筋膜に垂直に圧が加わらないように装着した。血流測定部位でのADCは、選択されたROIにより算出した。

(d) 測定手順

図3に示すとおり筋組織血流量と同時期に測定

を行い、得られたDWIをパーソナルコンピュータ(MRvision, Sun sparc station 10)にてADC画像に変換後、筋組織血流量測定領域でのROIを選択し、ROI内のADCの平均値を算出した(図4)。

(e) 統計解析方法

各測定時間におけるADCの測定値について群変量($n=4$)、経時を要因とする分割法モデルによる拡散分析を行った。なお経時変化については直線性の変化と2次曲線性の変化のいずれであるかを直交分解し、検討した。各測定時点における、群間の有意差検定を各群の平均値の差についてTukey法による多重比較検定を行い、 $p<0.05$ のものを有意差ありとした。

III 結果

(a) 筋組織血流量の変動について

レーザー・ドップラー血流計で得られた対照群と結紮群の筋血流量の経時的変動を図5に示す。

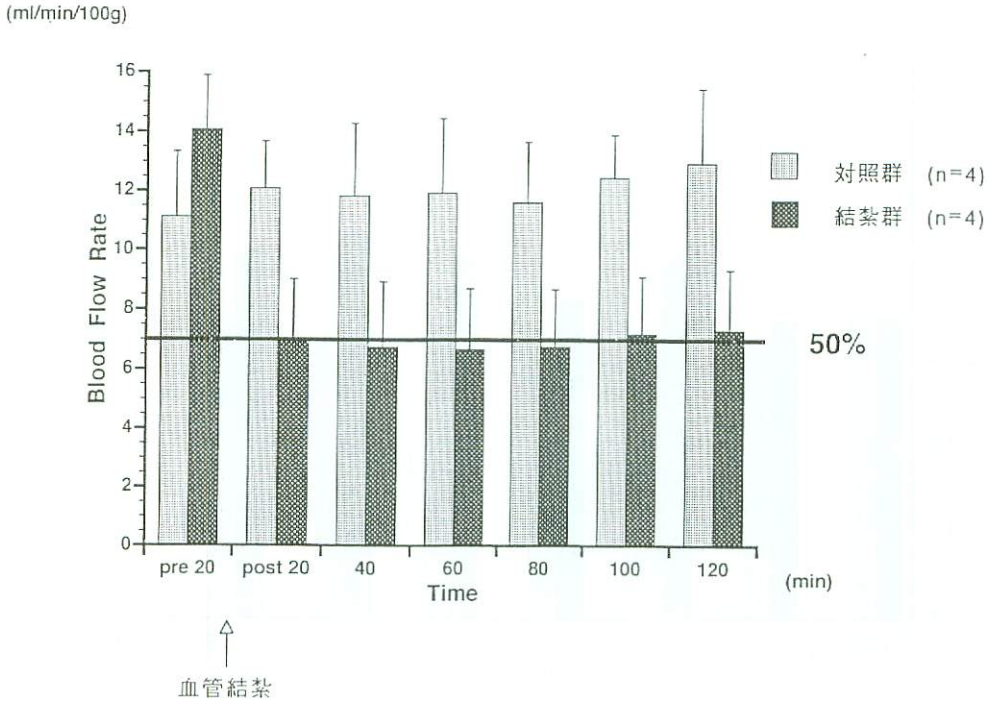


図5 対照群と結紮群における筋組織内の血流量の変化

横軸は経時の変化を時間 (min) で示し、縦軸はレーザー・ドップラー血流計により測定された血流量 (ml/min/100g) を示した。

内側広筋筋組織血流量は結紮前20分間において、対照群では $11.1 \pm 2.2 \text{ ml}$ (mean \pm S.D., 以下同じ)、結紮群では $14.1 \pm 1.8 \text{ ml}$ で両者はほぼ同じ値を示し、有意差は認められなかった。しかし、結紮直後より20分間では、対照群では $12.1 \pm 1.6 \text{ ml}$ 、結紮群では $7.0 \pm 2.0 \text{ ml}$ で、結紮群においては対照群に対し人為的に平均で50%前後(47.5~51.8%)に血流が阻害された値を示し、有意差が認められた ($P < 0.01$)。結紮群は結紮後120分間の測定期間中においてわずかに増加傾向がみられた。対照群は、全測定期間中に有意差は認められなかった。

(b) 筋組織拡散係数変動について

対照群と処置群における拡散係数の経時的変動を図6に示す。筋組織内拡散係数は結紮前20分間

で対照群 (1.69 ± 0.13) $\times 10^{-3} \text{ mm}^2/\text{sec}$ (mean \pm S.D., 以下同じ)、結紮群 (1.68 ± 0.21) $\times 10^{-3} \text{ mm}^2/\text{sec}$ とほぼ同じ値を示し有意差が認められなかった。結紮直後から120分間における分割法モデルによる分散分析の結果より、拡散係数の平均値について、3群のうちで対照群が最も高く、次いで結紮群、心停止群の順であり、各平均値の間には有意差が認められた ($P < 0.05$)。また、3群の経時の変化を示す直線の勾配については、対照群は緩やかな右上がりを示し、結紮群ならびに心停止群はゆるやかな減少傾向にあり右下がりを示し、対照群との間に有意差が認められた ($P < 0.05$)。各測定時点における Tukey 法による多重比較検定の結果は、40分時点より120分までの5回の測定時点において対照群と心停止群との間

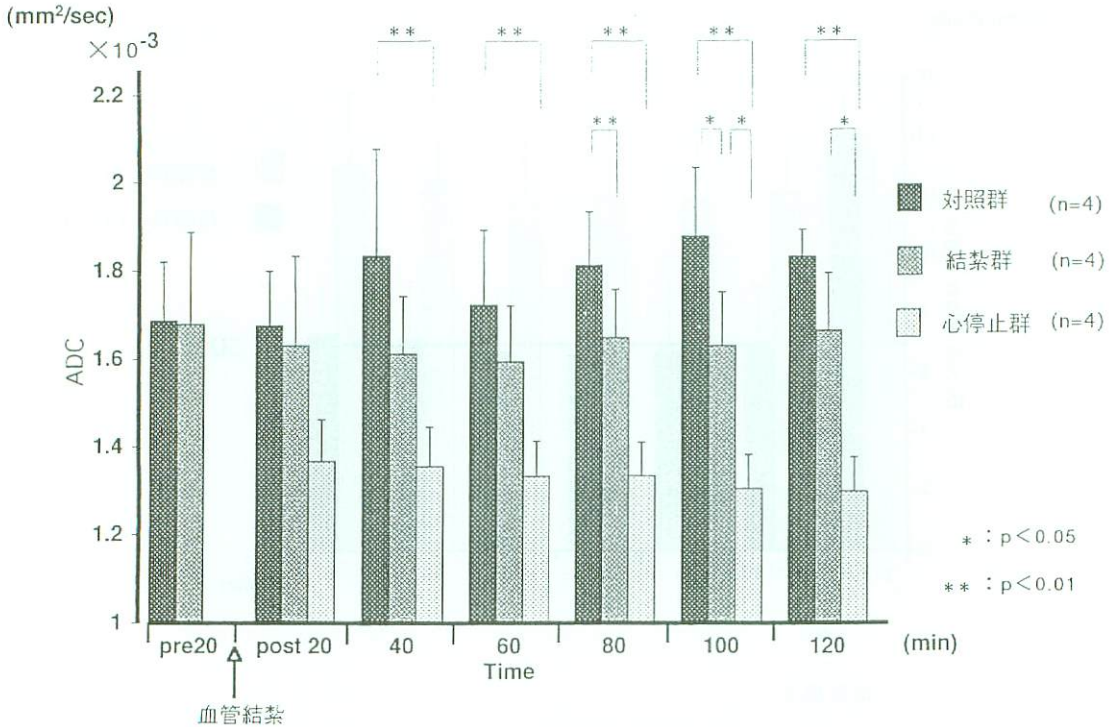


図6 対照群と実験群（結紮群，屠殺群）における筋組織内のADCの変化

横軸は時間経過を（min）で示し，縦軸はDWIより算出されたADC（ $\text{mm}^2/\text{sec} \times 10^{-3}$ ）を示した。

で有意な群間差を認め（ $P < 0.01$ ），100分の測定時点で対照群と結紮群との間で有意な群間差を認めた（ $P < 0.05$ ），また結紮群と心停止群の間で結紮後80分より120分の3回の測定時点において有意な群間差を認めた（80分，120分： $P < 0.01$ ，100分： $P < 0.05$ ）。

IV 考 察

一般に，生体組織での水の動きは，血流，リンパ流，髄液流のような総体流（bulk flow）と拡散からなっている²³。ADCには拡散以外に総体流，ことに血液の相対量の寄与がある。筋組織内の血流を多く含む毛細血管内流は，巨視的には規則的な流速パターンを持つ一様な流れとみなせる。

しかし，信号強度が画素単位から成り立つMRIにおいては，微細な径の毛細血管の走行はその画素内で複雑に変化する。この場合，血管内の水分子の動きは，見かけ上，血管の平均屈曲間距離を移動するランダムな動きとなり，拡散と区別がつきにくくなる。そこで，両者を一括しIVIM（intravoxel incoherent motion）と称している⁶。このIVIM画像から算出された見かけのADCにより拡散および総体流の内の灌流（perfusion）に関する画像を得ることが理論上は可能である⁷。本研究で得たIVIM画像は，DWIであるといえる。血管結紮による血流量減少に伴うADCの変動が認められないことおよび，使用したb-factorでは，灌流の成分が無視できることである^{6-14, 16, 18, 19}。

ADCに影響する因子である温度(体温)について、Hasegawa¹⁶⁾らは、正常と脳虚血ラットにおけるADCに脳温度変化が正確に反映されると述べている。また、ヒト筋組織においてDanielら¹⁷⁾は、局所血液量とADCの温度依存性の同時測定で、2.7°C加熱時と3.5°C冷却時とで、血液量ならびにADCの増減を確認している。本研究では温水環流装置により体温を維持しており、直腸温は $37 \pm 0.5^\circ\text{C}$ に保持した。

血管結紮による血流障害に対する筋組織の変化は、酸素欠乏または代謝産物の貯留によると推測され、血流障害の持続により機能欠損さらには変性(壊死)を生じる²⁰⁾。血管結紮による脳虚血でのDWI実験から伊藤ら⁹⁾は、ADCの低下時に代謝障害による Na^+/K^+ ポンプ等の能動輸送の低下と細胞外スペースの減少による細胞内浮腫が見られると述べている。これらのことから本研究における血流障害に伴う筋組織内の水分子運動(拡散)の減少は、筋組織内の代謝障害およびそれに付随する減少を間接的に表すものと推測される。伊藤らの実験の脳組織に比し、本研究での筋組織血流障害負荷時のADCの変化が小さいのは、大腿動脈以外での複数の側副血行路を有するため、50%血流障害では完全虚血条件ではなかったことによると考えられる。したがって、脳組織ほどの大きな障害は起こらないため、脳虚血と同様の著明な画像的变化や係数変動は認められなかったものと推測される。一方、組織血流の完全に途絶した心停止群においてChangら⁵⁾は、ラットの心停止した直後から筋肉内の水のプロトンT1を測定し、死後数時間以内のT1の変化は、細胞内の水分子が細胞の生理的状態からの変化を認識していると述べている。すなわちT1の変化が、細胞内での生体高分子の構造が変化したことを示唆している^{5, 23)}。これらの死後における組織の変化から、本研究で対照群と比較した心停止群の有意なADCの減少は、死後における組織の変化をとらえたと推測される。また、測定期間中、対照群ならびに結紮群の両群は、呼吸運動や心拍動による動きのアーチファクトを含んだ状態で測定を行われたの

に対し、心停止群は体動のアーチファクトを全く含んでいない状態で撮像されたため、著明なADCの減少を示したと考えられる。これらの結果から、大腿動脈結紮を行い、血流障害におけるADCが、血流障害に伴う組織障害の有用な減少としてとらえたと考えられ、ADCが組織障害の新しいパラメータであることを示唆している。

本研究においてDWIにより虚血筋組織のADCを算出し、筋組織血液量との関係について検討したが、虚血筋組織血流の経時的測定に対し、DWIによる撮像時間は、1回のADC測定に20分間の時間を要し、結紮直後の血流変化に伴うADC算出は不可能であった。撮像時間は、 $\text{TR} \times \text{マトリックス} \times \text{データ収集回数}$ で示され、マトリックスは画像精度(空間分解能)を決定する。撮像時間(時間分解能)と空間分解能の両者の関係は相反的で、時間分解能をあげると空間分解能は低下する。今後、空間分解能の低下をある程度妥協し、時間分解能をあげることで、さらに細かいポイントで検討することが必要であると考えた。また、測定中のアーチファクトの問題に対し、実験動物のわずかな動きは、微細運動である分子拡散において大きな影響を及ぼすため、測定期間中の固定方法を改善することで、呼吸・心拍動の動きに対するアーチファクトの軽減を検討する必要があると考えた。

V 結 語

拡散強調画像(DWI)を用いてラットにおける筋組織拡散係数(ADC)ならびにレーザー・ドップラー血流計による筋組織血液量を同時測定し、50%血流減少条件では、ADCの対照群に対する有意な低値を得た。また、心停止群でもADCの対照群に対する有意な減少が得られた。血流を反映しない条件でのDWIから得られたこれらADCの変化は、組織障害に伴う生体内水の拡散の変化を示している。

VI 謝 辞

稿を終えるにあたり、終始御指導頂きました明

治鍼灸大学整形外科学教室 勝見泰和教授に深謝いたします。また、多大なる御助言を頂いた同大学脳神経外科学教室 田中忠蔵教授、梅田雅宏講師、第二東洋医学臨床教室 片山憲史講師、統計解析にあたり多大なる御助言を頂きました武田薬品工業株式会社研究システム部 和田武夫博士に深謝いたします。

文 献

- 1) Hahn EL : Spin echoes. *Phys Rev*, 80 : 580~594, 1950.
- 2) Carr H Y, Purcell E M : Effect of diffusion on free precession in nuclear magnetic resonance experiments. *Phys Rev*, 94 : 630~635, 1954.
- 3) Stejskal E O, Tanner J E : Spin echoes in the presence of a time-dependent field gradient. *J Chem Phys*, 42 : 288~292, 1965.
- 4) Stejskal E O : Use of spin echoes in a pulsed magnetic field gradient to study anisotropic, restricted diffusion and flow. *J Chem Phys*, 43 : 3597~3606, 1965.
- 5) Chang D C, Hszlewood C F, Woessner E E : The spin-lattice relaxation times of water associated with early post mortem changes in skeletal muscle. *Biochem, Biophys, Acta*, 43(1) : 253~258, 1976.
- 6) Le Bihan D, Breton E, Lallemand D et al : MR imaging of intravoxel incoherent motions: application to diffusion and perfusion in neurologic disorders. *Radiology*, 161 : 401~407, 1986.
- 7) Le Bihan D, Breton E, Lallemand D et al : Separation of diffusion and perfusion in intravoxel incoherent motion MR imaging. *Radiology*, 168 : 497~505, 1988.
- 8) 恵飛須俊彦, 成瀬昭二, 堀川義治ら : 拡散強調画像の基礎的研究及び臨床応用, 日本磁気共鳴医学会雑誌, 11(1) : 20~28, 1991.
- 9) 伊藤 哲, 前田正幸, 石井 靖ら : 分子拡散を指標とした病態解析, 最新医学, 49(1) : 40~46, 1994.
- 10) 成瀬昭二, 恵飛須俊彦, 堀川義治ら : 拡散強調画像, 画像診断, 14(1) : 28~38, 1994.
- 11) 玉川洋一, 佐久間肇 : 拡散画像—拡散強調画像と拡散係数画像—, 画像診断別冊, 10(1) : 165~171, 1993.
- 12) 佐久間肇, 野村新之, 多上智康ら : Diffusion イメージング, *Clinical Imagiology*, 9(2) : 61~67, 1993.
- 13) 恵飛須俊彦, 成瀬昭二, 堀川義治ら : 分子拡散強調画像 MRI 画像の脳神経疾患への応用, *BRAIN AND NERVE*, 43(7) : 677~684, 1991.
- 14) 恵飛須俊彦, 成瀬昭二, 堀川義治ら : 脳における分子拡散強調画像, 脳・頭頸部の MRI 診断 : 111~117, 1991.
- 15) Morikawa S, Kido C, Inubushi T : Observation of rat hind limb skeletal muscle during arterial occlusion and reperfusion by ^{31}P MRS and ^1H MRI. *Magn Reso Imaging*, 9 : 269~274, 1991.
- 16) Hasegawa Y, Lawrence L L, Christopher H. Sotak et al : Temperature dependent change of apparent diffusion coefficient of water in normal and ischemic brain of rats. *Journal of cerebral blood flow and metabolism*, 14 : 383~390, 1994.
- 17) Daniel M, Anne L W, Agnes M et al : Simultaneous temperature and regional blood volume measurements in human muscle using an MRI fast diffusion technique. *MRM*, 29 : 371~377, 1993.
- 18) Larsson H B W, Thomsen C, Frederiksen J et al : In vivo magnetic resonance diffusion measurement in the brain of patients with multiple sclerosis. *Magn Reso Imaging*, 10 : 7~12, 1992.
- 19) Michael E M, Yoram C, John K et al : Diffusion weighted MR imaging of anisotropic water diffusion in cat central nervous system. *Radiology*, 176 : 439~445, 1990.
- 20) James J Smith, John P. Kampine, 村松準 監訳 : 循環の生理, 医学書院 : 227~230, 第2版, 1989.
- 21) 片山憲史, 西川弘恭, 成瀬昭二ら : ^{31}P -MRS によるヒト骨格筋エネルギー代謝の観察, 日本磁気共鳴学会雑誌, 9(3) : 161~168, 1989.
- 22) 片山憲史, 田中忠蔵, 池内隆治ら : 運動負荷における ^{31}P -MRS と ^1H -MRI の関係, 全日本鍼灸学会雑誌, 41(2) : 254~257, 1991.
- 23) 上平 恒, 逢坂 明 : 講談社サイエンティフィック—生体系の水, 講談社, 1989.

Relation between Muscle Ischemia and Apparent Diffusion Coefficient in Molecule Diffusion-Weighted Imaging.

KANAYA Shoichi

Department of Orthopedics, Meiji College of Oriental Medicine.

Summary: With the advancement of NMR techniques, it has recently become possible to detect the behavior of water molecules in the tissue by calculating an apparent diffusion coefficient (ADC) on a diffusion-weighted imaging.

Since the degree of ADC is affected by blood flow or diffusion, we studied the relation between muscle ischemia and after the interruption of blood flow.

As a results, blood flow in the ligation group decreased approximately but the ADC value showed only a slight decrease.

ADC in the ligation and immobile groups showed significantly lower values compared with the control group ($p < 0.05$).

These results suggested that the change in ADC under these conditions showed a change in diffusion of water molecules in living tissue.