

Activity-Induced Manganese Dependent Contrast MRIを用いた鍼刺激によるラット脳賦活の検討

青木伊知男

明治鍼灸大学大学院 鍼灸臨床医学 脳神経外科学教室

要旨 従来の磁気共鳴画像法による脳機能画像は高い空間分解能を有するものの、微弱な体性感覚刺激における研究においては測定感度に問題があり、また小血管を中心に描出される特徴を有するため、賦活部位と信号領域にずれが生じる可能性があった。今回我々は、最近報告された、脳血流に依存せず局所の脳賦活を観察するActivity-Induced Manganese Dependent Contrast 磁気共鳴画像法 (AIM MRI) 法を用いて、ラット左前肢における、1) 置鍼 (対照)、2) 鍼通電刺激、3) 雀啄による鍼刺激、に伴う局所脳賦活領域を検討した。その結果、右大脳皮質一次感覚野の前肢領域において対側の対照領域に対する信号強度比は、それぞれ $105 \pm 9\%$ 、 $159 \pm 18\%$ 、 $144 \pm 15\%$ となり、雀啄による鍼刺激は、鍼通電刺激と共に有意な信号上昇を示した。AIM MRI法は、針電極による通電に伴う脳賦活が描出可能であることのみならず、従来得られなかった鍼刺激 (雀啄) による脳賦活領域の描出も可能であることが示された。

I はじめに

磁気共鳴画像法 (Magnetic Resonance Imaging; MRI) による脳賦活画像は、血流量と酸化ヘモグロビンとの割合を反映した BOLD 効果 (Blood Oxygen Level Dependent) による方法 (脳機能画像法: functional MRI; fMRI) ¹⁻⁴⁾、または賦活に伴う脳灌流量を観察する方法 (脳灌流画像法: perfusion MRI) ^{5, 6)} など、神経活動によって引き起こされた局所脳血流の変化を観察する方法が中心である。これらの手法は、非侵襲的に脳活動を観察する方法として優れた空間分解能および局在性を有するものの、脳活動に伴って生じる脳血流の変化に依存するため、得られた画像上の信号変化は主として血管に生じているとも考えられ、賦活領域と高信号領域に位置的な不一致が生じる恐れがある。

最近LinとKoretskyは、脳血流の変化に依存せず、神経活動を直接的に観察する新しいfMRIの可能性を示した⁷⁾。それはActivity-Induced Manganese (AIM) Dependent Contrast MRI (AIM MRI) と呼ばれ、MRIにおいて造影効果を持つマ

ンガンイオン (Mn^{2+}) が、神経活動に伴いカルシウムイオン (Ca^{2+}) チャネルを通過して細胞内に流入し、造影効果を発揮する現象をT₁強調画像により観察する方法である。神経活動に伴って細胞内に Ca^{2+} の流入が生じることは良く知られているが、 Ca^{2+} 自体はMRIで観察することは出来ない。一方、 Mn^{2+} はT₁およびT₂緩和時間の両方を短縮させる造影剤として知られ^{8, 12)}、 Mn^{2+} の存在はT₁強調画像において高信号となる。 Mn^{2+} は Ca^{2+} と同じイオン半径を持つ2価の常磁性陽イオンである。多くの生体系において Mn^{2+} は Ca^{2+} に似た振る舞いをし^{13, 14)}、神経興奮に伴ってligand-gatedやvoltage-gatedなどの Ca^{2+} チャネルを通過して細胞内に入ることが報告され¹⁵⁻¹⁷⁾、voltage-gated Ca^{2+} チャネル阻害薬であるverapamilは、神経内への Mn^{2+} の流入を阻害することが知られている¹⁶⁾。一度細胞内に流入した Mn^{2+} は比較的長い時間排出されないため、脱分極を繰り返す神経細胞において Mn^{2+} の蓄積が生じることが期待できる。通常、脳においては、血液脳関門 (Blood Brain Barrier; BBB) が存在するため、

平成10年12月10日受付、平成11年1月8日受理

Key words: 脳機能画像 functional MRI, 鍼刺激 acupuncture, マンガンイオン manganese ion, 脳賦活 brain activation
連絡先 〒629-0392 京都府船井郡日吉町 明治鍼灸大学脳神経外科

経動脈的に投与された Mn^{2+} の殆どは脳内に流入できないが、高張性マンニトールによってBBBを開き、微量の Mn^{2+} を頸動脈から定常的に灌流することで、脳内に Mn^{2+} を送り届ける手法が示された⁷⁾。これにより、何らかの原因で脱分極を生じた脳神経細胞に対して、その周囲に存在する Mn^{2+} が流入、細胞内に蓄積した結果、 T_1 強調MRIにおいて高信号として捉える事が可能となる。LinとKoretskyは、脳賦活によって生じるMRI信号のマンガン依存の変化は、 Ca^{2+} チャンネルを通る Mn^{2+} の蓄積によって細胞内の水の T_1 の短縮が引き起こされることによるとし、ラットにおいてグルタミン酸投与による脳賦活の描出が可能であり、また二酸化炭素負荷に伴う血流の増加によってAIM MRIの信号強度が変化しないことを示した⁷⁾。すなわち、AIM MRIにおける信号強度は、脳血流に依存しないため脳循環の変動を感受せず、神経細胞の脱分極に伴う Mn^{2+} の蓄積による T_1 緩和時間の短縮を反映するものであると言える。

LinとKoretskyの研究において、AIM MRIにより通電を用いた体性感覚刺激による脳賦活を捉え得ることが示唆された⁷⁾が、対照を用いた統計的な検討および鍼刺激に関する検討は未だなされていない。本研究では、予備実験にてグルタミン

酸投与によりAIM MRIの脳賦活描出の再現性および脳内 Mn^{2+} 分布を確認した上で、ラット前肢における、鍼通電刺激および雀啄による鍼刺激に伴う脳賦活領域の検討を行うことを目的とした。

II 対象と方法

実験動物の処置

雄性Wistarラット (n=30, 312±13 g (S.D.), 清水実験動物) を無作為に、置鍼群 (n=5)、鍼通電群 (n=5)、および雀啄群 (n=5) の3群、無刺激群 (n=5)、生理食塩水投与群 (n=5)、およびグルタミン酸投与群 (n=5) の3群、計6群に分け、前者3群を本実験における対象とし、後者3群を予備実験に使用した。ラットの麻酔は、ジエチルエーテル (ナカライテスク社製) により導入され、気管挿管後、齧歯類用の人工呼吸器 (Model 683, Harvard Instruments社製, 米国) を用いて、2.0%-2.3%のハロセン麻酔 (ハロタン, 武田薬品工業社製) により手術処置の間、維持した。手術及び実験中の投与酸素濃度は約50%である。薬剤投与のために左大腿静脈を、血圧および血液ガスの観察のために左大腿動脈を、および右内頸動脈に対して薬剤を投与するために右外頸動脈を、ポリエチレン・チューブ (PE-50, Clay

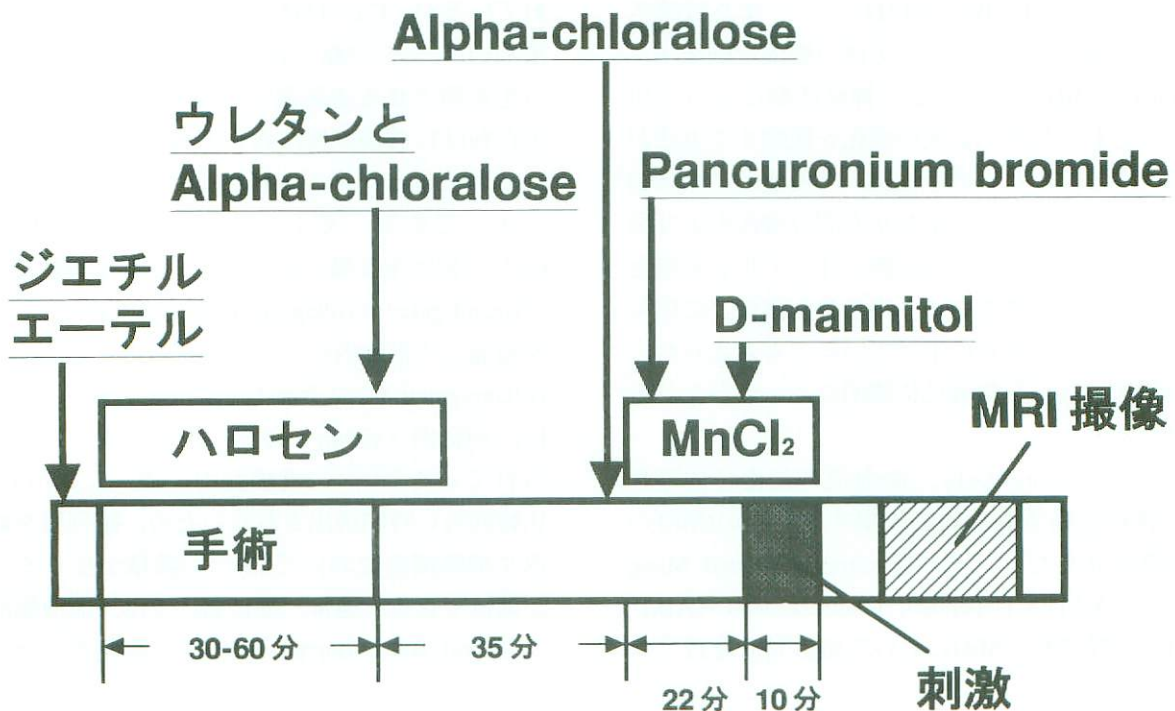


図1. AIM MRI実験プロトコール

AIM MRI 実験の手順を経時的に示す。手術に必要なハロセン麻酔の効果が刺激実験に及ぼす影響を少なくするために、ハロセン吸入停止後、少なくとも45分以上時間を空けて刺激を開始した。

Adams社製, 米国) で確保した. 大腿動脈を通して血圧が常時観測され, 30分毎に血液ガスを採取し, PaO₂, PaCO₂およびpHを計測 (Model 178, CORNIG社製, 米国), 生理的範囲に維持した. 体温は自動調節機能をもつ温風機により, 直腸温を約37°Cに維持した. 手術後, 腹腔内に α -クロラロース (alpha-chloralose, 34 mg/kg, ナカライトスク社製) およびウレタン (450 mg/kg, Aldrich chemical company社製, 米国) を混合した麻酔薬を投与した. 尾のピンチ刺激により, 苦痛が生じない十分な麻酔深度が保たれていることを確認した後, 体動を防止するために臭化パンクロニウム (pancuronium bromide, 2.5mg/kg, Organon社製, 米国) を静脈投与した. ハロセン麻酔の効果が刺激実験に及ぼす影響を除くために, ハロセン吸入停止後少なくとも45分間時間をおき, α -クロラロース (34 mg/kg) を追加投与した. その後, 緩衝生理食塩溶液 (pH-buffered saline solution) に溶かした塩化マンガン (MnCl₂, 120 mM, Sigma社製, 米国) をシリンジポンプ (Neuroscience社製, 米国) を用いて6.4 μ mol/min (3.2 ml/h) で右外頸動脈を通じ, 右内頸動脈から灌流した. 投与されたMnCl₂の合計量は0.205 mmol (MnCl₂溶液で1.71 ml), 投与時間は約32分であった. BBBを開くために, 25%マンニトール (D-mannitol, 5 ml/kg, Sigma社製, 米国) 溶液を刺激開始直前に右内頸動脈から投与した. 刺激後, 実験動物を測定プローブに固定し, MRIの撮像を行った (図1).

脳賦活刺激

対照となる置鍼群は, 2本の鍼灸用針 (ディスプレイサブル鍼KN-107J No.1 30 mm, セイリン社製) を左前肢皮下に約5 mm刺入し, マンニトール投与後, 刺激を加えなかった. 鍼通電群は, 置鍼群と同じ2本の鍼灸用針による電極を左前肢手掌相当部の皮下に約5 mm刺入し, 電気刺激装置 (STIMULATOR 2907, 日本電気三栄社製) に接続, マンニトール投与後, 直流10 V, 持続時間0.2 ms, 2 Hzの矩形波により10分間通電した. 雀啄群は, 置鍼群と同じ鍼灸用針をラットの前肢の背側第1および第2中手骨間 (合谷穴; LI4, 相当部位) に約5 mm刺入し, マンニトールを投与した後, 周期2 Hz, 振幅約3 mmで10分間, 刺入・抜鍼を繰り返す刺激 (雀啄) を加え

た.

予備実験1において, 対照となる生理食塩水投与群では, マンニトール投与2分後に0.2 mlの生理食塩水を右外頸動脈を通じて右内頸動脈に投与した. グルタミン酸投与群では, マンニトール投与直後, グルタミン酸 (L-glutamic acid: 総量0.2 ml, 10 mg/kg, Sigma社製, 米国) 溶液を右外頸動脈を通じて右内頸動脈に投与した. 予備実験2において, 対照となる無刺激群では, 鍼の刺入を行わず, マンニトール投与後も刺激を加えなかった.

MRI測定

4.7 T水平型実験用MRI装置 (CSI-II-Omega, Bruker社製, ドイツ) および直径65 mmのshielded gradientコイルを使用した. 受信および送信コイルは, 自家製の直径25 mmの表面コイルを使用した. T₁強調画像にはスピン・エコー法およびグラディエント・エコー法を使用し, スピン・エコー法は, TR=400 ms, TE=12 ms, マトリックスサイズ=256×256, field of view (FOV)=28 mm, スライス厚=1 mm, 積算回数=8を使用した. グラディエント・エコー法は, TR=150 ms, TE=5.4 ms, マトリックスサイズ=256×256, 表面コイルの中心におけるフリップ角=50°, field of view (FOV)=28 mm, スライス厚=1 mm, 積算回数=8を用いた. 1回の撮像に要した時間は, スピン・エコー法およびグラディエント・エコー法あわせて約20分であった.

画像処理および統計解析

画像処理は, UNIXコンピュータ (PWS Type C, 日本コンピュータ社製) 上で動作するソフトウェアMRVision (MRVision社製, 米国) および, パーソナルコンピュータ (Power Macintosh 8500, Apple社製, 米国) 上で動作するソフトウェア言語IDL (Interactive Data Language, Research systems社製, 米国) を使用した. 統計処理において群間比較を行うために, 画像上で関心領域 (Region of Interest; ROI) を設定した部位の対側に対する信号比を求めた. 統計解析は, 解析ソフトウェアStatView J-4.5 (Abacus Concepts社製, 米国) を使用し, un-paired t 検定および多重比較Dunnnett検定により有意水準を1%とした. また全てのデータを平均値±標準偏差 (mean±S.D.) で表した.

III 結果

実験動物のモニター

ラットの平均血圧は、 $MnCl_2$ 溶液投与前 115.2 ± 7.3 mmHg, 投与後 104.3 ± 13.5 mmHgで、 $MnCl_2$ 溶液により約10%低下した。マンニトール投与後、血圧は平均 ± 20 mmHg変動したが、すぐにベースラインに戻った。またグルタミン酸投与、鍼通電刺激および鍼刺激中に、血圧は平均 ± 18 mmHg変動したが、刺激終了後ベースラインに戻った。血液ガスおよびpHは生理的範囲に維持され、 $pH = 7.37 \pm 0.17$, $PaCO_2 = 39.2 \pm 4.0$ mmHg, および $PaO_2 = 119.8 \pm 8.9$ mmHgであった。

予備実験 1 生理食塩水およびグルタミン酸投与によるAIM MRIの比較実験

対照となる生理食塩水投与群におけるAIM MRIが得られた。図2 aにその典型例を示す。得られた画像において、脳室以外に高信号領域は見られなかった。ROIを大脳皮質 (cerebral cortex) および尾状核-被殻部 (caudate-putamen) に設定し、対側に対する信号強度比を算出した。図2 bに典型的なROIの選択を示した。その値は大脳皮質で $103 \pm 6\%$ 、尾状核-被殻部で $99 \pm 7\%$ であった。

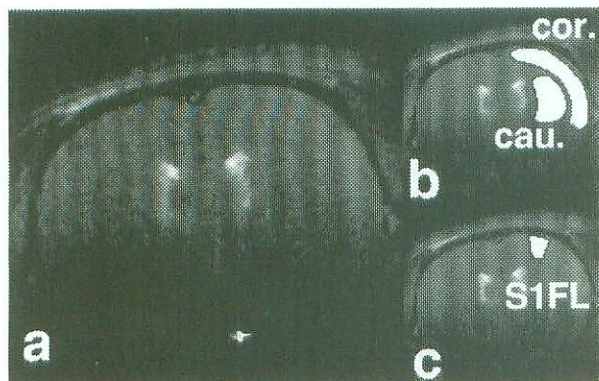


図2. 生理食塩水投与群 (対照) のAIM MRIの典型的な一例と関心領域の設定

図中に示した矢状断のスライス位置における、生理食塩水投与群のAIM MRIの典型的な一例と関心領域の設定を示す。a) 生理食塩水投与群におけるAIM MRIの典型的な一例。脳室に高信号領域が見られた。無刺激群および置鍼群に関しても、脳室以外に高信号は見られず、生理食塩水投与群と同様の結果となった。b) 大脳皮質 (cortex; cor.) および尾状核-被殻部 (caudate-putamen; cau.) の関心領域 (ROI) を図中に白色の領域として記入した。c) 右大脳皮質一次感覚野の前肢領域 (primary somatosensory cortex, forelimb region; S1FL) のROIの設定を図中に白色の領域として記入した。

グルタミン酸投与群におけるAIM MRIが得られた。得られた画像において、右側の大脳皮質お

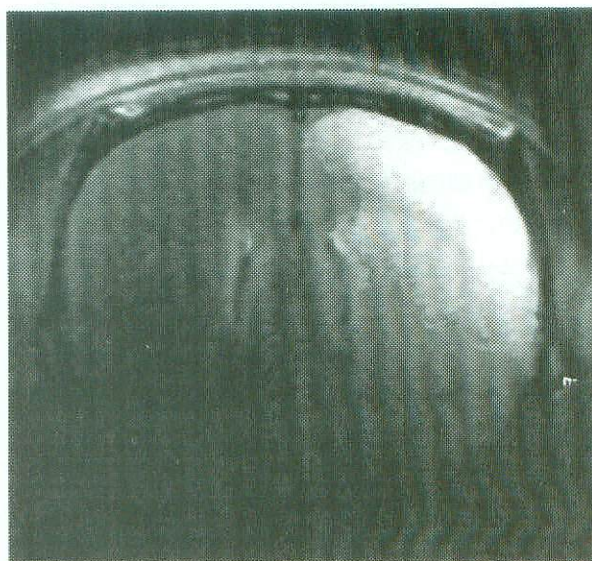


図3. グルタミン酸投与によるAIM MRIの典型的な一例
刺激側の脳全体に及ぶ広範囲かつ顕著な高信号が見られた。これは、 Mn^{2+} が脳全域に分布していることを示す。ただし、神経細胞の少ない脳梁では、造影効果が小さい。スライス位置は、図2と同様である。

よび尾状核-被殻部の全域にわたる広範囲で著明な高信号が見られた。図3にその典型例を示す。生理食塩水投与群と同様にROIを設定し、対側に対する信号強度比を算出した。その値は大脳皮質で $213 \pm 34\%$ 、尾状核-被殻部で $198 \pm 30\%$ であった。グルタミン酸投与群における信号強度比は、生理食塩水投与群に対して有意に高値であった (図4)。

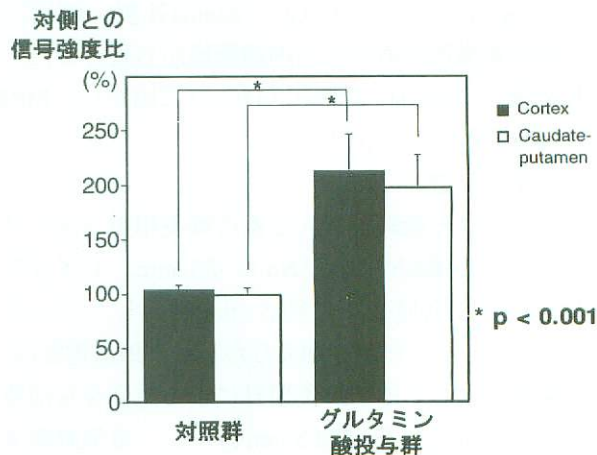


図4. グルタミン酸投与群と生理食塩水投与群とのAIM MRI信号強度比の比較

グルタミン酸投与群の対側に対する信号強度比は、大脳皮質で $213 \pm 34\%$ 、尾状核-被殻部で $198 \pm 30\%$ 。生理食塩水投与群では、大脳皮質で $103 \pm 6\%$ 、尾状核-被殻部で $99 \pm 7\%$ であり、AIM MRIにおけるグルタミン酸投与群の信号強度は、対照となる生理食塩水投与群に対して有意に高値であった。

予備実験 2

無刺激および置鍼のAIM MRIの比較実験

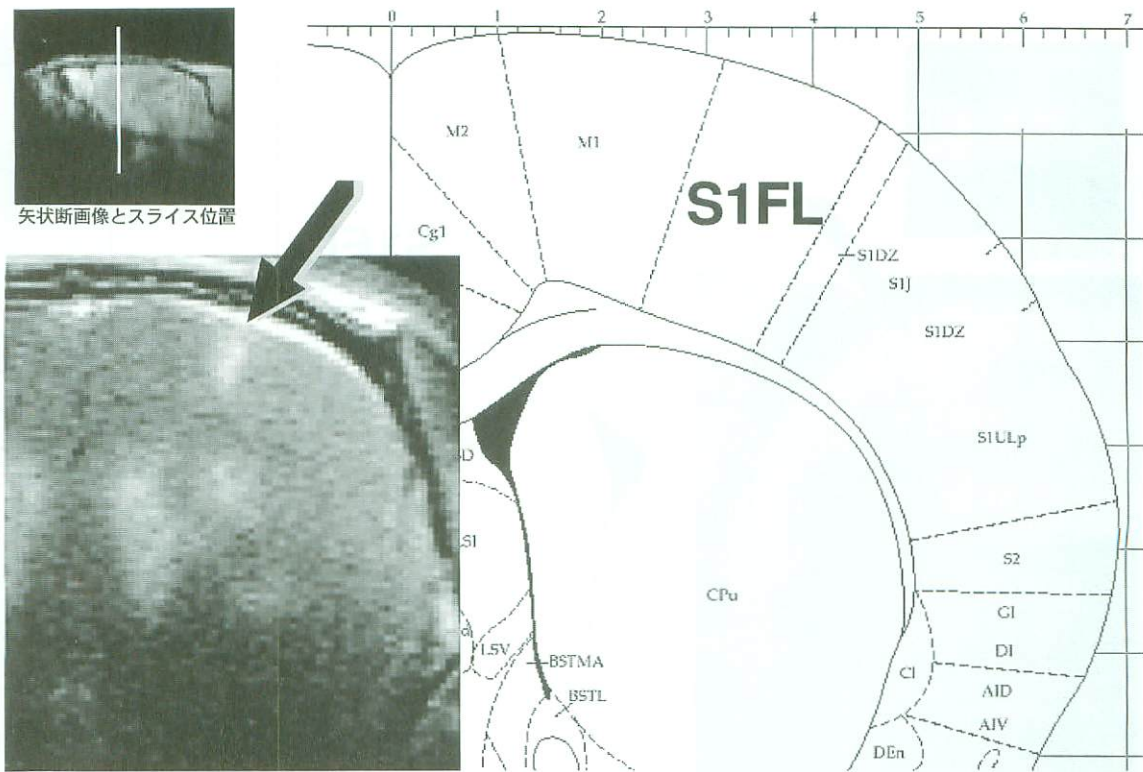


図5. 前肢の鍼通電によるAIM MRIの典型的な一例

図中に示した矢状断のスライス位置における、前肢の鍼通電によるAIM MRIの典型的な一例および脳地図 (Paxinos G, Watson C: The Rat Brain in Stereotaxic Coordinatesより) を示す。右大脳皮質一次感覚野の前肢領域に、局所的な高信号領域が観察された。この例では、尾状核-被殻部の一部にも小さな高信号が見える。

対照となる無刺激群におけるAIM MRIが得られた。得られた画像において、脳室以外に高信号領域は見られなかった。右大脳皮質一次感覚野の前肢領域 (primary somatosensory cortex, forelimb region; S1FL) にROIを設定し、対側に対する信号強度比を算出した。図2cにその典型的なROIの選択を示した。信号強度比の値はS1FLで $103 \pm 7\%$ であった。

置鍼群におけるAIM MRIが得られた。得られた画像において、脳室以外に高信号領域は見られなかった。無刺激群と同様にROIを設定し、対側に対する信号強度比を算出した。その値はS1FLで $105 \pm 9\%$ であった。置鍼群における信号強度比は、無刺激群に対して有意差が認められなかった。

前肢の鍼通電刺激および雀啄による鍼刺激のAIM MRIの比較実験

対照となる置鍼群は、予備実験2に記載した群と同じものである。ROIの設定および信号強度比の算出も同一である。

鍼通電群におけるAIM MRIが得られた。図5にその典型例を示す¹⁸⁾。得られた画像において、

脳室以外に大脳皮質のS1FLを中心とした高信号領域が見られた。置鍼群と同様にS1FLにROIを設定

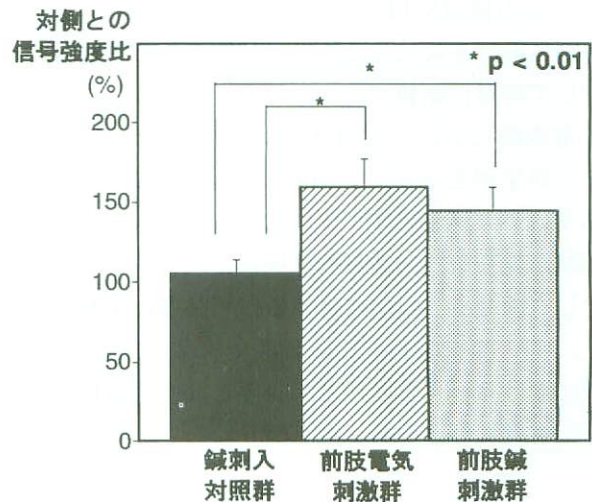


図6. 鍼通電群および雀啄群と置鍼群 (対照) との右大脳皮質一次感覚野の前肢領域におけるAIM MRI信号強度比の比較

鍼通電群、雀啄群および置鍼群 (対照) のAIM MRI信号強度比 (平均値 ± 標準偏差) を示す。右大脳皮質一次感覚野の前肢領域 (S1FL) に関心領域を設定し、対側に対する信号強度比を算出、その値は鍼通電群で $159 \pm 18\%$ 、雀啄群で $144 \pm 15\%$ 、置鍼群で $105 \pm 9\%$ であった。一次感覚野の前肢領域において、AIM MRIにおける鍼通電群および雀啄群の信号強度比は、対照となる置鍼群に対して有意に高値であった。

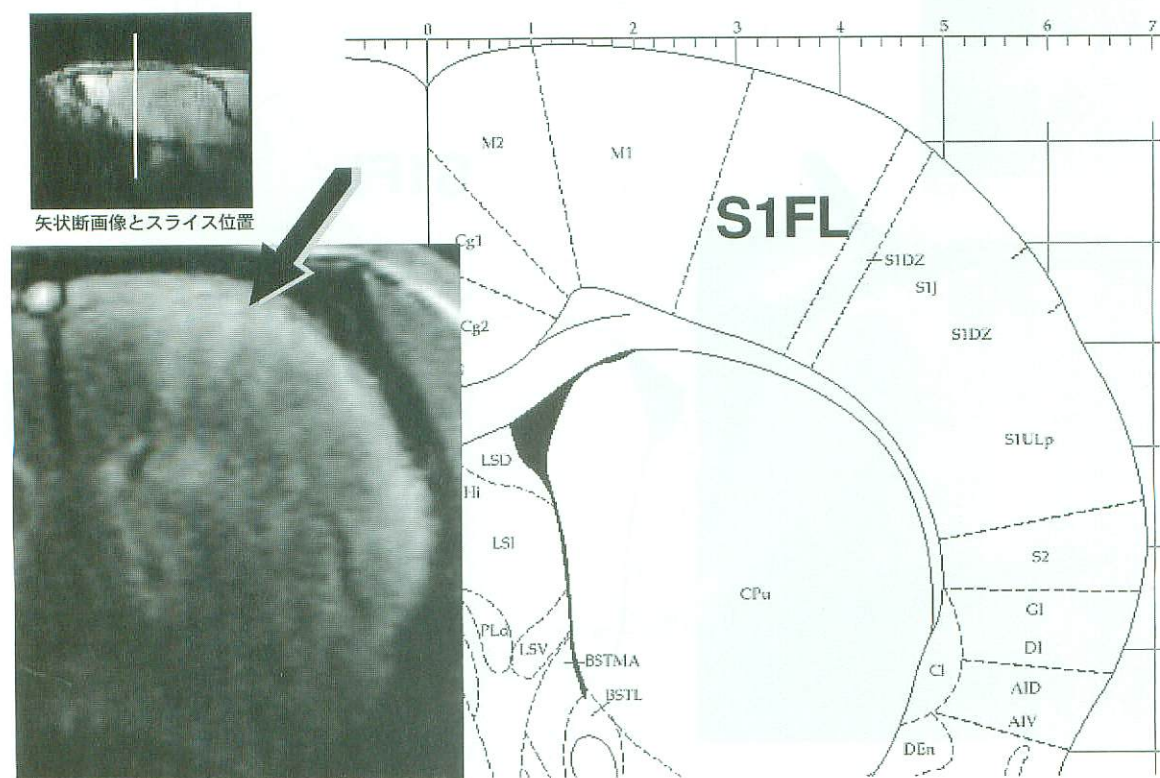


図7. 前肢の鍼刺激(雀啄)によるAIM MRIの典型的な一例
 図中に示した矢状断のスライス位置における、前肢の鍼刺激(雀啄)によるAIM MRIの典型的な一例および脳地図(Paxinos G, Watson C: The Rat Brain in Stereotaxic Coordinatesより)を示す。大脳皮質一次感覚野の前肢領域付近に、局所的な高信号領域が観察された。この例では、柱状に数本の高信号が見られる。

定し(図2c)、対側に対する信号強度比を算出した。その値はS1FLで $159 \pm 18\%$ であった。鍼通電群における信号強度比は、対照となる置鍼群に対して有意に高値であった(図6)。

雀啄群におけるAIM MRIが得られた。図7にその典型例を示す¹⁸⁾。得られた画像において、脳室以外に大脳皮質のS1FLを中心とした高信号領域が見られた。置鍼群と同様にS1FLにROIを設定し(図2c)、対側に対する信号強度比を算出した。その値はS1FLで $144 \pm 15\%$ であった。雀啄群における信号強度比は、対照となる置鍼群に対して有意に高値であった(図6)。

IV 考察

置鍼群、鍼通電群、および雀啄群の3群において、AIM MRIが得られた。左前肢の、鍼通電群および雀啄群の両方において、右脳S1FLでの対側に対する信号強度比は、対照となる置鍼群に対して有意に高値であった。予備実験1において、グルタミン酸投与群における大脳皮質および尾状核-被殻部全域に信号増強が観測され、その対側

に対する信号強度比は、対照となる生理食塩水投与群に対して有意に高値であった。予備実験2において、置鍼群は無刺激群に対して有意差が認められなかった。また全ての群において、脳室に信号増強が観察された。

予備実験1の結果から、グルタミン酸投与群における大脳皮質および尾状核-被殻部の全域にわたる広範囲な高信号領域はLinとKoretskyの報告と一致し、大脳皮質で得られた $213 \pm 34\%$ の高信号は、彼らの報告の値 $238 \pm 23\%$ に近い値となった⁷⁾。このことから、AIM MRIによる脳賦活の描出が再現され、本実験に使用した手法により脳賦活の描出が可能であることが示された。また、神経細胞が多く存在する大脳皮質および尾状核-被殻部全域に渡って比較的均一な高信号が得られたことから、本実験で用いた持続的な Mn^{2+} 投与方法により、AIM MRIは、脳室などの神経細胞が存在しない領域を除く、脳半球全域の賦活を感受し得ることが示唆された。

予備実験2の結果から、置鍼はAIM MRIにおいて感受性を持たないことが示された。その理由

として、AIM MRIの感度面での限界、大脳皮質への到達過程における修飾などが考えられる。また、鍼灸臨床における置鍼術では、鍼灸針が皮膚を貫通する切皮、皮下や筋肉への刺入、鍼灸針の留置、および抜鍼など複合的な刺激が加わるものの、本実験では脳内に Mn^{2+} が入り得る状態になる以前に、切皮および刺入を終えており、得られたAIM MRIには、これらの刺激が反映されていない。そのため、本実験における結果を、単純に臨床における置鍼術と比較して考察することは出来ないと考えられる。

鍼通電群におけるS1FL領域を中心とした局所的な高信号領域の存在は、LinとKoretskyの報告における針電極を用いた通電刺激の一例と一致し、大脳皮質のS1FL領域で得られた 159 ± 18 %の高信号は、報告された一例の150%とほぼ等しい値となった⁷⁾。鍼通電群におけるS1FL領域を中心とした局所的な高信号は、対照となる置鍼群に対し有意であり、ゆえにAIM MRIによって前肢通電に伴う脳賦活を描出可能であることが示された。これらの高信号領域は、鍼通電による刺激が大脳皮質のS1FL領域に投射、その領域で生じた神経発火に伴う細胞内への Mn^{2+} の流入および蓄積によって T_1 緩和時間の短縮が起これ、 T_1 強調画像における高信号になったと考えられる。

最大で20~30%程度とされる従来のBOLD効果によるfMRIと比較して、AIM MRIで得られる信号変化は極めて大きなものである³⁾。BOLD効果をもたらす酸化型ヘモグロビンと還元型ヘモグロビンの存在比の変化によって得られる磁化率の変動と、AIM MRIの T_1 強調画像において信号上昇をもたらす Mn^{2+} の蓄積から生じる T_1 緩和時間の変動を一概に比較することは難しいが、後者は造影物質が直接組織に蓄積されることから、より大きな信号変化となることが期待できる。これは、従来検出不可能であった、より微弱な刺激を検出しうる可能性があることを意味する。またLinとKoretskyが指摘するように、BOLD効果によるfMRIで起こりうる「賦活領域と高信号領域の位置的不一致」や「賦活部位周辺の血管の影響の混入」は、AIM MRIでは存在せず、より詳細でかつ直接的な脳賦活の検出が可能である。

鍼灸臨床において常用される刺激方法である雀啄における脳賦活画像はこれまで報告がなく、今

回初めて検出された。雀啄群におけるS1FL領域を中心とした局所的な高信号は対照となる置鍼群に対し有意であり、ゆえにAIM MRIによって鍼刺激(雀啄)に伴う脳賦活を描出可能であることが示された。現在までに行われた鍼刺激による脳賦活画像の検討は、動物においては報告はなく、ヒトに関して1995年にYoshidaによってBOLD効果による脳機能画像の鍼灸刺激への応用が初めて示唆され¹⁹⁾、皮膚における比較的広い刺激領域をもつローラー鍼による報告がある²⁰⁾。1998年にChoらにより鍼刺激による視覚野領域の賦活の報告があるが²¹⁾、我々の行った追試では再現しなかった。鍼刺激は、皮膚における刺激面積が狭く、比較的弱い刺激強度であるため、ヒトによる1.5 Tの磁場強度での脳機能画像においては、感度の面から現時点では再現性のある測定が困難であると考えられる。今回のAIM MRIによる結果は、今後、刺激パラダイムや解析方法の検討などにより、鍼灸刺激におけるさらに詳細な脳機能研究の端緒を開くものと期待できる。

AIM MRIにおいて脳室内のCSFに由来した高信号が見られることは先に報告があり^{22, 7)}、脳室には神経細胞が存在しないため、この領域での信号上昇は神経賦活が伴わないものである。これは、CSFへの Mn^{2+} の分泌あるいは漏出によるもの、およびBBBの存在しない組織への Mn^{2+} の沈着によるものであると考えられる。このような神経賦活が伴わない信号上昇を除外することは、今後、本法により脳機能を評価するうえでの課題となると思われる。

AIM MRIの問題点として、 Mn^{2+} は、その濃度や投与量によっては、生理的状态における脳賦活を観察する上で障害となる恐れがある。最も深刻な Mn^{2+} の性質は、LinとKoretskyが指摘するように、循環機能に与える急性毒性である。 Mn^{2+} は Ca^{2+} に擬態し、その濃度に依存して Ca^{2+} agonistと Ca^{2+} antagonistの両方の役割を持つ^{23, 24)}。例えば、1.8mMでは Mn^{2+} は Ca^{2+} の流入を阻害し、0.3mMでは逆に促進する²⁵⁾。今回の実験における Mn^{2+} の投与は、あらかじめ行われた予備実験により、実験動物の生理状態に深刻な影響を及ぼさない投与量、濃度および投与速度を確認した上で行われた。その結果、 $MnCl_2$ 溶液灌流前後で約10

%の血圧低下が見られたものの、この程度の血圧変化は生理的範囲内と考えられ、 Mn^{2+} が循環機能に与える悪影響を小さく留めることが可能であった。 Mn^{2+} 投与量は、MRIの測定感度が許す限り少ないことが望ましく、今後更なる最適化が必要であると考えられる。また、BBBを開くために行う高濃度のマンニトール投与が脳神経発火に与える影響については不明な点が多い。そこで、マンニトール投与がMRIの信号強度に影響を与えているか否かを検討するための予備実験を行った。その結果、経時的に撮像された T_1 強調MRIにおける信号強度は、マンニトール投与前後において有意に変化しなかった。ゆえに、本実験の麻酔条件においては、マンニトール投与がMRI信号強度に影響を及ぼさないと考えられた。

麻酔深度の設定はAIM MRIの信号強度に大きな影響を及ぼす。あらかじめ行われた予備実験において、麻酔深度が深すぎる場合（ハロセン麻酔2.0%）は脳賦活そのものが抑制され、体性感覚刺激によりS1FLは高信号を示さなかった。これは、 Mn^{2+} が投与されBBBが開いた状態であっても、脳活動が抑制されている状態では、AIM MRIにおいて高信号とはならないことを示している。逆に麻酔深度が浅すぎる場合（ α -クロラロースを15 mg/kgおよびウレタン450 mg/kgの混合を一回投与）では、脳半球の全域に高信号が観察された。これは、麻酔深度が浅い場合は、外的な刺激を加えない状態でも、脳神経細胞に脱分極が生じていることを示している。これらの結果を基に、本実験における麻酔条件が設定されたが、今回使用した条件がLinとKoretskyの研究における条件とやや異なるのは、実験時間やラットの系統の差異などにより生じたものであると思われる。鍼刺激など微弱な刺激によるAIM MRI実験においては、麻酔条件によって実験結果が大きく変化する可能性があるため、麻酔深度は注意深く最適化される必要があると考えられた。

AIM MRIの適用の限界として、最も大きなものは「ヒトに対して適用が困難」である点である。それは、ヒトに対して毒性を持つ Mn^{2+} を投与することが出来ず、また高張性マンニトールの局所投与が出来ないためである。しかしながら、本法は動物実験においては、現在のところ最も高感度

な脳賦活画像が作成できる手法であると思われる。また、一度 Mn^{2+} の蓄積が生じた細胞では、それが長時間排出されないため、例えば神経細胞の抑制に関する研究などに必要な経時的な観測は困難である。将来、MRIに対する高い感受性を備えたままで、より無害かつ利便性の高い Ca^{2+} 様造影剤が利用可能となることが期待される。

AIM MRIによる脳賦活画像を使用して脳機能を評価する際、問題となるのは「賦活領域」と「非賦活領域」との閾値をどの信号強度で決定するかであり、加えて、脳室や前述の麻酔が浅いために生じる高信号のような「与えた刺激に対して非特異的に信号増強が生じる領域」をどのように除外するかである。さらに、細胞内に入る Mn^{2+} 流量や蓄積された Mn^{2+} の濃度などの定量的評価が必要であると考えられ、それは T_1 緩和時間の定量的測定等を同時に行うことにより、将来実現され得ると思われる。定量的な Mn^{2+} 動態測定の可能性とAIM MRIが持つ脳賦活に対する極めて高い感度と空間分解能は、 Mn^{2+} の持つ毒性などの幾つかの問題点を考えてもなお、新しい脳機能画像としての役割を期待させるのに十分である。

V 結 語

ラット脳において、 T_1 緩和時間を短縮させる効果を持つ Mn^{2+} が、神経細胞の興奮に伴い、 Ca^{2+} チャネルを通過して細胞内に流入することで T_1 強調画像において造影効果を持つAIM MRIが得られた。予備実験において、グルタミン酸投与におけるAIM MRIの脳賦活描出の再現性が確認され、鍼を前肢に留置するのみではAIM MRIに信号増強をもたらさないことが示された。前肢における針電極を用いた通電刺激および鍼刺激（雀啄）によって、ラット前肢領域の一次感覚野において著明な信号増強が観察され、これらの刺激の大脳皮質感覚野領域への投射が画像上において確認された。本研究により、鍼通電に伴う脳賦活がAIM MRI法で描出可能であることを統計的に示すと共に、従来得られなかった鍼刺激（雀啄）による脳賦活領域の描出も可能であることが示された。本法は鍼刺激による脳賦活を直接的に描出する方法として有用であり、今後の鍼灸研究の有力な一手段となりうると考えられた。

VI 謝 辞

本研究に際し、終始御指導を賜りました明治鍼灸大学脳神経外科学教室田中忠蔵教授に深甚なる謝意を捧げます。そして御助言ならびにご協力を賜りました同恵飛須俊彦助教授、梅田雅宏講師、同第2生理学教室福田耕治教授、Carnegie Mellon University, The Pittsburgh NMR Center for Biomedical Research, Department of Biological Sciences, Associate ProfessorであるALAN P. KORETSKY, Ph.D, 京都府立医科大学放射線科学教室成瀬昭二助教授、同脳神経外科学教室樋口敏宏講師、明治鍼灸大学第三生理学教室川喜田健司教授に深く感謝いたします。また、終始実験に御協力いただきました京都府立医科大学竹上徹郎氏、明治鍼灸大学学部生の中越明日香氏には特に感謝いたします。共に議論を深めてくれた同大学院鍼灸臨床医学研究科脳神経外科学教室福永雅喜、染谷芳明、渡辺康晴各氏ならびに同研修生秋山瑞希氏に感謝いたします。

VII 参考文献

- 1) Kwong KK, Belliveau JW, Chesler DA, Goldberg IE, et al: Dynamic magnetic resonance imaging of human brain activity during primary sensory stimulation. Proc Natl Acad Sci U S A, 89(12):5675-9, 1992.
- 2) Menon RS, Ogawa S, Kim SG, Ellermann JM, et al: Functional brain mapping using magnetic resonance imaging. Signal changes accompanying visual stimulation. Invest Radiol, 2: S47-53, 1992.
- 3) Ogawa S, Tank DW, Menon R, Ellermann JM, et al: Intrinsic signal changes accompanying sensory stimulation: functional brain mapping with magnetic resonance imaging. Proc Natl Acad Sci U S A, 89(13): 5951-5, 1992.
- 4) Ogawa S, Menon RS, Tank DW, Kim SG, et al: Functional brain mapping by blood oxygenation level-dependent contrast magnetic resonance imaging. A comparison of signal characteristics with a biophysical model. Biophys J, 64(3): 803-12, 1993.
- 5) Silva AC, Zhang W, Williams DS, Koretsky AP: Multi-slice MRI of rat brain perfusion during amphetamine stimulation using arterial spin labeling. Magn Reson Med, 33(2): 209-14, 1995.
- 6) Williams DS, Detre JA, Leigh JS, Koretsky AP: Magnetic resonance imaging of perfusion using spin inversion of arterial water. Proc Natl Acad Sci USA, 89(1): 212-6, 1992.
- 7) Lin YJ, Koretsky AP: Manganese ion enhances T₁-weighted MRI during brain activation: an approach to direct imaging of brain function. Magn Reson Med, 38(3): 378-88, 1997.
- 8) Mendonca-Dias MH, Gaggelli E, Lauterbur PC: Paramagnetic contrast agents in nuclear magnetic resonance medical imaging. Semin Nucl Med, 13(4): 364-76, 1983.
- 9) Burnett KR, Goldstein EJ, Wolf GL, Sen S, et al: The oral administration of MnCl₂: a potential alternative to IV injection for tissue contrast enhancement in magnetic resonance imaging. Magn Reson Imaging, 2(4): 307-14, 1984.
- 10) Cory DA, Schwartzentruber DJ, Mock BH: Ingested manganese chloride as a contrast agent for magnetic resonance imaging. Magn Reson Imaging, 5(1): 65-70, 1987.
- 11) Fornasiero D, Bellen JC, Baker RJ, Chatterton BE: Paramagnetic complexes of manganese(II), iron(III), and gadolinium(III) as contrast agents for magnetic resonance imaging. The influence of stability constants on the biodistribution of radioactive aminopolycarboxylate complexes. Invest Radiol, 22(4): 322-7, 1987.
- 12) Gerald CF, Sherry AD, Brown RD 3d, Koenig SH: Magnetic field dependence of solvent proton relaxation rates induced by Gd³⁺ and Mn²⁺ complexes of various polyaza macrocyclic ligands: implications for NMR imaging. Magn Reson Med, 3(2): 242-50, 1986.
- 13) Hunter DR, Komai H, Haworth RA, Jackson MD et al.: Comparison of Ca²⁺, Sr²⁺, and Mn²⁺ fluxes in mitochondria of the perfused rat heart. Circ Res, 47(5): 721-7, 1980.
- 14) Shibuya I, Douglas WW: Indications from Mn-quenching of Fura-2 fluorescence in melanotrophs that dopamine and baclofen close Ca²⁺ channels that are spontaneously open but not those opened by high [K⁺]_o; and that Cd preferentially blocks the latter. Cel Calcium, 14(1): 33-44, 1993.
- 15) Drapeau P, Nachshen DA: Manganese fluxes and manganese-dependent neurotransmitter release in presynaptic nerve endings isolated from rat brain. J Physiol (Lond), 348: 493-510, 1984.
- 16) Narita K, Kawasaki F, Kita H: Mn and Mg influxes through Ca channels of motor nerve terminals are prevented by verapamil in frogs. Brain Res, 510(2): 289-95, 1990.
- 17) Kita H, Narita K, Van der Kloot W: Tetanic stimulation increases the frequency of miniature end-plate potentials at the frog neuromuscular junction in Mn²⁺-, CO²⁺-, and Ni²⁺-saline solutions. Brain Res, 205(1): 111-21, 1981.
- 18) Paxinos G, Watson C: The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates, Compact third edition, Academic Press,

1997

- 19) Yoshida T, Tanaka C, Umeda M, Higuchi T, ukunaga M, Naruse S: Non-invasive measurement of brain activity using functional MRI: toward the study of brain response to acupuncture stimulation, *Am J Chin Med* 23(3-4):319-25, 1995
- 20) Higuchi T, Fukunaga M, Umeda M, Ebisu T, Tanaka C, Naruse S, Ueda S: Functional brain mapping in motor task and somatosensory stimulation using echo planar MRI, *Nippon Rinsho* 55(7):1688-93, 1997
- 21) Cho ZH, Chung SC, Jones JP, Park JB, Park HJ, Lee HJ, Wong EK, Min BI: New findings of the correlation between acupoints and corresponding brain cortices using functional MRI, *Proc Natl Acad Sci U S A* Mar 3, 95(5): 2670-3, 1998
- 22) London R E, Toney G, S A Gabel, Funk A: Magnetic resonance imaging studies of the brains of anesthetized rats treated with manganese chloride. *Brain Res Bull*, 23: 229-235, 1989
- 23) Horner WH, Kligfield P: Antidysrhythmic and dose-related hemodynamic effects of manganese in perfused isolated rabbit hearts. *J Cardiovasc Pharmacol*, 4(1): 149-56, 1982.
- 24) Gerdin B, McCann E, Lundberg C, Arfors KE: Selective tissue accumulation of manganese and its effect on regional blood flow and haemodynamics after intravenous infusion of its chloride salt in the rat. *Int J Tissue React*, 7(5): 373-80, 1985.
- 25) Low W, Brawarnick N, Rahamimoff H: The inhibitory effect of Mn^{2+} on the ATP-dependent Ca^{2+} pump in rat brain synaptic plasma membrane vesicles. *Biochem Pharmacol*, 42(8): 1537-43, 1991.

Evaluation of Brain Activation with Acupuncture Stimulation using Activity-Induced Manganese Dependent Contrast MRI in the Rat

AOKI Ichio

Department of Neurosurgery, Graduate School of Acupuncture and Moxibustion, Meiji University of Oriental Medicine

Summary : Since it is difficult to examine brain activation induced by acupuncture stimulation using BOLD contrast functional MRI, a new method of functional MRI using manganese ion (Mn^{2+}) as a contrast agent was recently developed by Lin and Koretsky.

The new method which is called activity-induced manganese dependent contrast magnetic resonance imaging (AIM MRI) shows high sensitivity in detecting NMR signals from the activated brain with high spatial resolution, compared with other functional MRI methods. Using this method, brain activation induced by electroacupuncture and the sparrow-pecking method of acupuncture on the rat forelimb was examined. Signal intensity ratios of the forelimb region in the primary somatosensory cortex to the contralateral region were $159 \pm 18\%$ with electroacupuncture and $144 \pm 15\%$ with the sparrow pecking method of acupuncture, in contrast to $105 \pm 9\%$ with retaining needle as the control. The signal intensity on AIM MRI was significantly increased by both the electroacupuncture and the sparrow-pecking method compared with that in the control group ($P < 0.01$). AIM MRI was suitable for examining brain activation by minimal stimulation such as acupuncture.