

《短 報》

オートラジオグラフィ法によるラットの 脳血流脳代謝同時測定

隅屋 寿* 松田 博史* 関 宏恭* 石田 博子*
 久田 欣一* 森 厚文** 柴 和弘** 池田 清延***
 小島 一彦****

I. はじめに

最近局所脳血流測定用剤として N-isopropyl-p-[¹²³I] iodoamphetamine (以下 ¹²³I-IMP) が注目されている^{1,2)}。¹²³I-IMP は初回循環での脳への取り込みが高く脳組織からの洗い出しが遅いため、静注後一定時間であればその分布は脳血流を反映している。また微小塞栓物質を注入し測定する際と同様の理論式 (reference sample method)³⁾により血流絶対値を得ることができる⁴⁾。一方 ¹⁴C-2-deoxyglucose (以下 ¹⁴C-DG) はグルコースと同じ carrier で血液脳関門を通過し脳組織内に取り込まれ deoxyglucose-6-phosphate として脳内に蓄積される。また DG を用いた脳局所グルコース消費率の算出は Sokoloff⁵⁾によって報告されている。

¹²³I の半減期は約 13 時間であり、¹⁴C の半減期は約 5,730 年である。この半減期の差を利用して同一モデルに ¹²³I-IMP と ¹⁴C-DG を同時に注入しオートラジオグラフィを ¹²³I が減衰する前と十分に減衰した後の 2 回行えば、同一モデルで 2 種類の核種のオートラジオグラムが得られ血流と代謝を同時に測定することができる。

今回著者らは脳血流脳代謝同時測定法の試みと

して正常ラットおよび脳梗塞モデルラットに対し ¹²³I-IMP と ¹⁴C-DG とによる 2 核種標識オートラジオグラフィを施行した。またオートラジオグラム像をデジタル化することによって脳組織の放射能濃度を標準線源を用いて求め、血流と代謝の定量化を試みたので報告する。

II. 方 法

使用したのは雄性の Sprague-Dawley rat 3 匹 (体重 300~400 g) で、うち 2 匹は正常、他の 1 匹は動脈閉塞 48 時間後の脳梗塞モデルラットである。脳梗塞モデルは Tamura らの方法^{6,7)}に従いネンブタール麻酔下で経眼窩的に左中大脳動脈を嗅脳皮質枝と外側線条体動脈の分岐部で閉塞した。ジエチルエーテル吸入麻酔下に上下肢固定し股動静脈にポリエチレンチューブを用いてカニュレーションを行った。麻酔より覚醒後 ¹⁴C-DG (New England Nuclear 社製) を 10 μCi/1 ml (比放射能 1.7 mCi/mg) 静注し、静注後 43 分まで動脈血をカニューレから約 20 μl ずつ経時的に計 13 回採血した。動脈血サンプルは直ちに遠心して血漿を分離し、¹⁴C とグルコースの濃度測定に用いた。血漿グルコース濃度は標準酵素反応により測定した。静注 43 分後、¹²³I-IMP (日本メディフィジックス社製、放射化学的純度は ¹²³I, ¹²⁴I, ¹²⁶I がそれぞれ 94.7% 以上、5% 以下、0.3% 以下) を 2 mCi/2 ml (比放射能 1.7 mCi/mg) を静注し股動脈より 0.68 ml/min. で 2 分間、Harvard infusion-withdrawal pump Model 940 にて持続採血した。

¹²³I-IMP 静注 2 分後、すなわち ¹⁴C-DG 静注

* 金沢大学医学部核医学教室

** 同 アイソトープ総合センター

*** 同 医学部脳神経外科学教室

**** 同 医療技術短期大学部

受付：59年 7月 25日

最終稿受付：60年 11月 20日

別刷請求先：石川県金沢市宝町 13-1 (〒920)

金沢大学医学部核医学教室

隅屋 寿

45分後にラットを断頭し、可及的速やかに脳を摘出し、ドライアイスにて冷却したヘキサンで凍結した。凍結した脳から $20\text{ }\mu\text{m}$ の連続切片を作製し、オートラジオグラフィを施行した。オートラジオグラフィを切片作成直後から2日と、2か月後から60日の計2回行った。水10gに2.5gの割合でゼラチンを溶かし、それに既知濃度の $^{123}\text{I-IMP}$ 、および $^{14}\text{C-DG}$ を加えて凍結させたものを標準線源として同じフィルム(サクライメーディングフィルムCタイプ)に感光させた。

できあがったオートラジオグラムに対し浜松テレビ製テレビカメラ C-1000、A-Dコンバーターおよび横河ヒューレットパッカード製コンピューター YHP210を用いて、そのフィルム黒化度をデジタル化した。標準線源の放射能濃度とそのオートラジオグラムの黒化度をデジタル化した数値の間の相関および回帰式を求めた。この式によりラット脳内の $^{123}\text{I-IMP}$ および $^{14}\text{C-DG}$ の濃度を算出した。

$^{123}\text{I-IMP}$ による脳血流値の算出は次式に示すごとく reference sample 法^{8,9)}によった。

$$F = 100R \cdot C_b / (N \cdot A)$$

F: 血流値 ($\text{ml}/100\text{ g}/\text{min.}$)

R: 動脈血持続採血速度 ($\text{ml}/\text{min.}$)

C_b: 脳組織放射能濃度 ($\mu\text{Ci/g}$)

N: 動脈血中の代謝産物を除いた真の IMP の割合 (文献値 0.75 を用いた)

A: 全動脈血の放射能 (μCi)

得られた血流値を白赤黄緑青紫黒の7段階に分けてカラー表示した。

グルコース消費率は Sokoloff らの式に基づいて計算し⁵⁾、同様に7段階にカラー表示した。反応速度および集中定数は文献値を用いた⁵⁾。

III. 結 果

標準線源の放射能濃度とそのオートラジオグラムの黒化度のデジタル化した数値の間には、 $^{123}\text{I-IMP}$ で $r=0.99$ ($p<0.01$)、 $^{14}\text{C-DG}$ で $r=0.97$ ($p<0.05$) と良好な有意の相関が得られた。その直線回帰式はそれぞれ $Y=1.71X+4.8$ ($0.5\text{ }\mu\text{Ci/g}$

$<X<19.0\text{ }\mu\text{Ci/g}$)、 $Y=296X+9$ ($0.25\text{ }\mu\text{Ci/g}<X<0.15\text{ }\mu\text{Ci/g}$) となった。標準線源のオートラジオグラム上の黒化度と投与量比より求めた $^{14}\text{C-DG}$ の $^{123}\text{I-IMP}$ 像における cross-contamination は 3% 以下であった。また2回目の露光時には $^{123}\text{I-IMP}$ の標準線源はフィルム黒化を示さなかった。

正常ラットの視床レベル (Fig. 1b, c) では大脳皮質と視床に高い血流値およびグルコース消費率を認めた。線条体レベル (Fig. 2b, c) でも同様に大脳皮質と被殻に高い血流値およびグルコース消費率を認めた。このように正常ラットでは血流とグルコース代謝の一一致がみられた。

脳梗塞ラットの視床レベル (Fig. 1d, e) では患側の皮質の血流値および、グルコース消費率は健側に比べ 50% 低下していた。視床ではグルコース消費率は健側とほぼ同等なのにに対し血流値は 56% 増加していた。線条体レベル (Fig. 2d, e) では患側の皮質、被殻の血流値および消費率は健側に比べそれぞれ 60% ならびに 45% 低下していた。淡蒼球の血流値は健側に比べ 18% 増加していたが、消費率はほぼ同等であった。このように梗塞ラットの患側では視床と淡蒼球で血流とグルコース代謝の不一致がみられた。

IV. 考 察

オートラジオグラフィ法による脳血流およびグルコース代謝測定は、前者が $^{14}\text{C}^{10)}$ 、 $^{131}\text{I}^{11})$ ならびに ^{123}I で標識された iodoantipyrine (IAP)^{12,13)}、後者が $^{14}\text{C-DG}$ や $^{18}\text{F-fluorodeoxyglucose}^{14,15})$ を用いて施行されてきたが、最近血流と代謝を同時に測定する2核種標識オートラジオグラフィ法が報告されている^{11~15)}。2核種の組み合わせとしては ^{131}I と $^{14}\text{C}^{11)}$ 、 ^{123}I と $^{14}\text{C}^{11,12})$ および ^{18}F と $^{14}\text{C}^{14,15})$ がみられる。

^{131}I と ^{14}C を用いる場合の利点は、 ^{131}I が入手容易であり shelf life も長いため使いやすいことである。しかし ^{131}I のエネルギーが高いため散乱線により像が不鮮明となる。また半減期が 8 日と長いため 2回目の露光までの期間が長くなる欠点を有する。 ^{18}F と ^{14}C を用いる場合の利点は ^{18}F

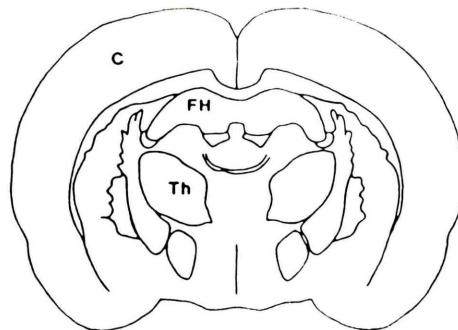


Fig. 1a Coronal section of a rat brain at the level of the thalamus. C: cortex, FH: hippocampal fimbria, and Th: Thalamus.

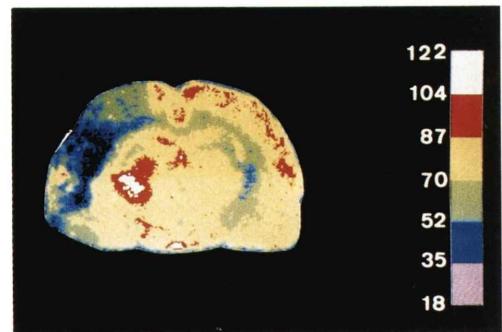


Fig. 1d CBF distribution by ^{123}I -IMP 48 hours after left middle cerebral artery occlusion. Marked reductions in blood flow are present at the cortex and the hippocampal fimbria. Marked increase in blood flow is present at the thalamus.

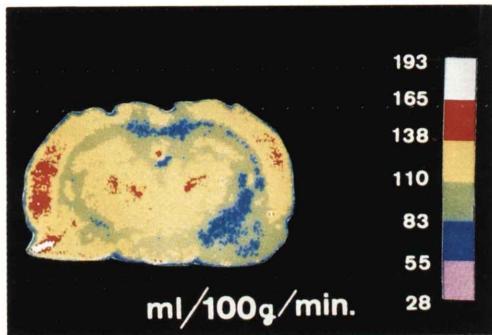


Fig. 1b Cerebral blood flow (CBF) distribution by ^{123}I -IMP autoradiography in a normal rat.

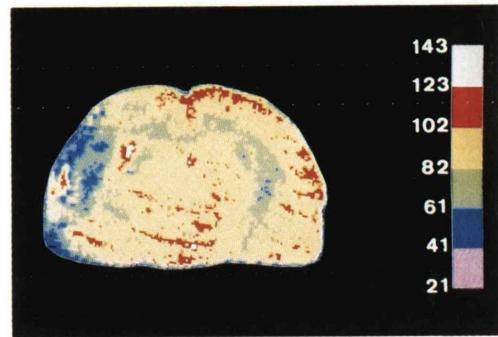


Fig. 1e Glucose metabolic rate distribution by ^{14}C -DG 48 hours after left middle cerebral artery occlusion. Reduction in glucose metabolism is present at the cortex.

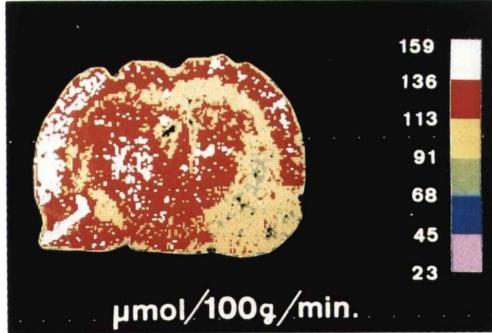


Fig. 1c Glucose metabolic rate distribution by ^{14}C -DG autoradiography in a normal rat.

の半減期が 110 分と短いため数日の間隔で 2 回目の露光が可能となることである。しかし最大の欠点は近くにサイクロトロンを必要とすることであり一般的でない。 ^{123}I と ^{14}C を用いる場合の利点は ^{123}I の半減期が 13 時間と ^{131}I よりも短く、放出されるガンマ線および内部転換電子のエネルギーがそれぞれ 159 keV と 127 keV でありオートラジオグラフィに適することである。今回用いた ^{123}I は $^{124}\text{Te} (\text{p}, 2\text{n}) ^{123}\text{I}$ 反応により製造されており半減期 4.2 日の ^{124}I が 5% 以下および半

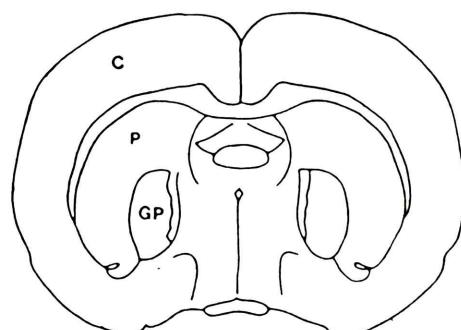


Fig. 2a Coronal section of a rat brain at the level of the putamen. C: cortex, P: putamen, GP: globus pallidus.

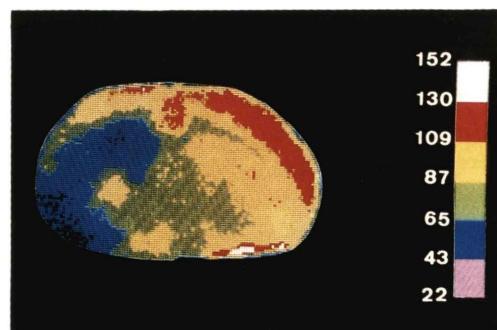


Fig. 2d CBF distribution by ^{123}I -IMP autoradiography 48 hours after left middle cerebral artery occlusion. Marked flow reductions at the cortex and putamen, and a slight flow increases at the globus pallidus are seen in the affected side.

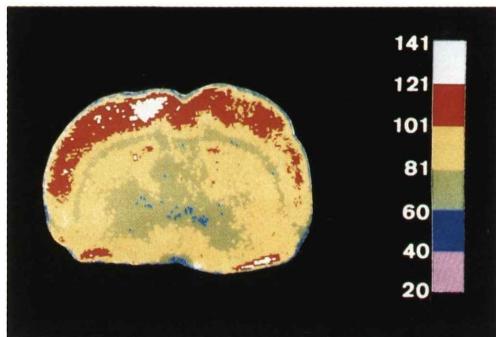


Fig. 2b CBF distribution by ^{123}I -IMP autoradiography in a normal rat.

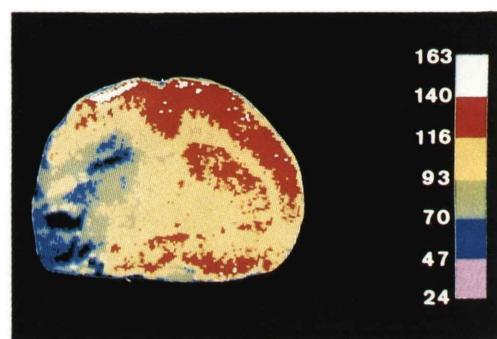


Fig. 2e Glucose metabolic rate distribution by ^{14}C -DG 48 hours after left middle cerebral artery occlusion. Marked reductions of glucose metabolism are present in the cortex and putamen, but the glucose metabolism of the globus pallidus is not reduced.

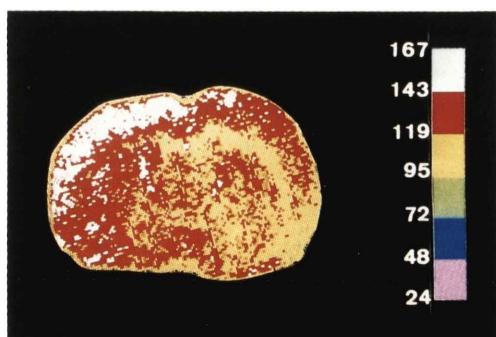


Fig. 2c Glucose metabolic rate distribution by ^{14}C -DG autoradiography in a normal rat.

減期13日の ^{128}I が0.3%以下含まれている。しかし今回の検討では ^{123}I -IMPと ^{14}C -DGのcross-contaminationは3%以下と低値であり2回目の露光でも ^{123}I -IMPは黒化しなかったためほぼ独立した2種類のオートラジオグラムと考えられる。

IMPとIAPにより得られた脳血流値はほぼ一致することが報告されている⁸⁾。本法の正常ラットでも今までのIAPでの報告^{10,12)}と同じよう

値が得られた。しかも IAP の脳血液分配係数 0.8 に対し IMP は約 25 と高値を示し reference sample method を用いることができ IAP に比べ計算が簡便となる。

オートラジオグラムをデジタル化し、標準線源のデジタル値と比較すれば脳内の放射能濃度を定量的に測定することが可能である¹⁶⁾。また種々の画像処理により画質改善も可能となり、カラー表示すれば視覚的な定量的評価も容易となる。

Tamura らは今回用いた脳梗塞モデルにおいて患側の皮質、被殻ならびに視床に血流低下がみられたのに対し患側の淡蒼球および黒質の増加がみられたという^{8,17)}。しかし著者らの今回の検討では患側の視床では健側よりも高度の血流増加が認められた。この差異の原因は今回は 1 回のみの検討なので言及しがたいため、今後発症時期との関連も含めさらに検討する予定である。また皮質や被殻の血流低下の程度に比べグルコース消費率の低下の程度は少なく佐古ら¹⁴⁾の結果と類似した。しかし血流増加のみられた患側の淡蒼球と視床では代謝はほとんど健側と同等であり、血流と代謝の不一致が見られた。このような皮質下核での血流と代謝の不一致は Mies ら¹¹⁾の Halothane 麻酔下での検討でも報告されており興味深い所見である。

V. 結 語

¹²³I-IMP と ¹⁴C-DG を用いて 2 核種標識オートラジオグラフィを行い、正常ラットと脳梗塞モデルラットで脳血流および脳グルコース代謝の同時測定法を試みた。得られた結果は次のとくである。

- (1) 間隔を 2か月あけることによりほぼ独立した 2種類のオートラジオグラムを得ることができた。
- (2) 得られたオートラジオグラムをデジタル化し標準線源と比較することにより定量的測定が可能となった。
- (3) 正常ラットでは脳血流と脳代謝の一致が見られたが、脳梗塞モデルラットでは皮質下で両者の不一致がみられた。

¹²³I-IMP をご提供下さいました日本メディフィジックス社に感謝致します。

文 献

- 1) Winchell HS, Baldwin RM, Lin TH: Development of I-123-Labeled amines for brain studies: localization of I-123 iodophenylalkyl amines in rat brain. *J Nucl Med* **21**: 940-946, 1980
- 2) Winchell HS, Horst WD, Braun L, et al: N-Isopropyl-¹²³I-p-iodoamphetamine: single-pass brain uptake and washout; binding to brain synaptosomes; and localization in dog and monkey brain. *J Nucl Med* **21**: 947-952, 1980
- 3) Malik AB, Kaplan JE, Saba TM: Reference sample method for cardiac output and regional blood flow determinations in the rat. *J Appl Physiol* **40**: 472-475, 1976
- 4) 松田博史, 関 宏恭, 石田博子, 他 : N-isopropyl-p-[¹²³I] iodoamphetamine による局所脳血流測定。医学のあゆみ **29**: 463-465, 1984
- 5) Sokoloff L, Reivich M, Kennedy C, et al: The [¹⁴C] deoxyglucose method for the measurement of local cerebral glucose utilization: theory, procedure, and normal values in the conscious and anesthetized albino rat. *J Neurochem* **28**: 897-916, 1977
- 6) Tamura A, Graham DI, McCulloch J, et al: Focal cerebral ischaemia in the rat: 1. description of technique and early neuropathological consequences following middle cerebral artery occlusion. *J Cereb Blood Flow Metabol* **1**: 53-60, 1981
- 7) Tamura A, Graham DI, McCulloch J, et al: Focal cerebral ischaemia in the rat: 2. regional cerebral blood flow determined by [¹⁴C] iodoantipyrine autoradiography following middle cerebral artery occlusion. *J Cereb Blood Flow Metabol* **1**: 61-69, 1981
- 8) Lear JL, Ackermann RF, Kameyama M, et al: Evaluation of [¹²³I] isopropylidoamphetamine as a tracer for local cerebral blood flow using direct autoradiographic comparison. *J Cereb Blood Flow Metabol* **2**: 179-185, 1982
- 9) Kuhl DE, Barrio JR, Huang SC, et al: Quantifying local cerebral blood flow by N-isopropyl-p-[¹²³I] iodoamphetamine tomography. *J Nucl Med* **23**: 196-203, 1982
- 10) Sakurada O, Kennedy C, Jehle J, et al: Measurement of local cerebral blood flow with iodo[¹⁴C] antipyrine. *Am J Physiol* **234**: H59-H66, 1978
- 11) Mies G, Niebuhr I, Hossmann KA, et al: Simultaneous measurement of blood flow and glucose metabolism by autoradiographic techniques. *Stroke* **12**: 581-588, 1981
- 12) Lear JL, Jones SC, Greenberg JH, et al: Use of

- ¹²³I and ¹⁴C in a double radionuclide autoradiographic technique for simultaneous measurement of LCBF and LCMRgl. *Stroke* **12**: 589-597, 1981
- 13) Jones SC, Lear JL, Greenberg, JH, et al: A double label autoradiographic technique for the quantitative measure of cerebral blood flow and glucose metabolism. *Acta Neurol Scand (Suppl)* **72**: 202-203, 1979
- 14) 佐古和廣, 加藤天美, 小畠敬太郎, 他: ¹⁸F-fluoro-deoxyglucose と ¹⁴C-iodoantipyrine を用いた定量的二重標識オートラディオグラフィー. *脳神経* **36**: 649-656, 1984
- 15) 亀山元信, 井戸達雄: ポジトロン放出核種を使用した多重標識オートラディオグラフィー. *核医学* **19**: 1233-1236, 1982
- 16) Yonekura Y, Brill AB, Som P, et al: Quantitative autoradiography with radiopharmaceuticals, part 1: digital film-analysis system by videodensitometry: concise communication. *J Nucl Med* **24**: 231-237, 1983
- 17) 田村 晃, 折井弘武, 長島 正, 他: 画像診断の基礎的研究 I. 脳梗塞モデルにおけるオートラディオグラフィー法による脳循環測定. *日本医放会誌* **43**: 377-380, 1983

Summary

Simultaneous Measurement of Cerebral Blood Flow and Metabolism in Rats by Autoradiographic Technique

Hisashi SUMIYA*, Hiroshi MATSUDA*, Hiroyasu SEKI*, Hiroko ISHIDA*,
 Kinichi HISADA*, Hirofumi MORI**, Kazuhiro SHIBA**,
 Kiyonobu IKEDA*** and Kazuhiko KOJIMA****

*Department of Nuclear Medicine, School of Medicine, **Radioisotope Center,
 Department of Neurosurgery, *School of Paramedicine, Kanazawa University,
 13-1, Takara-machi, Kanazawa 920, Japan

We performed an autoradiographic technique for the simultaneous quantitative measurements of local cerebral blood flow (reference sample method) and local cerebral metabolic rate for glucose (Sokoloff's method) using N-isopropyl-p-[¹²³I]iodoamphetamine and ¹⁴C-2-deoxyglucose, respectively.

¹²³I is a gamma emitting isotope with a half-life of 13 hours and can be detected with adequate resolution on standard autoradiographic films. Autoradiograms were made before and after decay of ¹²³I, ¹²⁴I and ¹²⁶I; the time interval between the 2 exposures and the concentrations of the 2 tracers were adjusted to avoid significant cross-contamination. In this way, film exposures were obtained which could be processed quantitatively

like single tracer autoradiograms. The validity of the method for the investigation of local coupling of flow and metabolism was tested under physiological conditions and focal cerebral ischemia in rats.

Coupling was observed in the entire brain in healthy rats and cortical surface and putamenal region of the brain in rats with ischemia. On the other hand, uncoupling was observed in globus pallidus and thalamus in rats with ischemia.

The technique seems to be useful to assess the precise local cerebral blood flow and glucose metabolism under various conditions.

Key words: N-isopropyl-p-[¹²³I]iodoamphetamine, ¹⁴C-2-deoxyglucose, Cerebral blood flow, Cerebral glucose metabolism.