

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月21日現在

機関番号：13301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22791180

研究課題名（和文）静注用  $^{15}\text{O}$  標識薬剤による脳循環代謝測定の迅速化と薬物療法効果判定の有効性の検討研究課題名（英文）Acceleration of Cerebral Blood Flow and Oxygen Metabolism Measurement with Injectable  $^{15}\text{O}$  labeled Radiotracers and Effectiveness of Drug Treatment

研究代表者

小林 正和 (KOBAYASHI MASATO)

金沢大学・保健学系・助教

研究者番号：30444235

研究成果の概要（和文）：本研究では、静注用  $^{15}\text{O}$  標識薬剤と非侵襲迅速持続投与法を用いた脳循環代謝測定法を確立し、正常及び脳虚血再灌流モデル動物における適切な脳循環代謝測定値の算出と薬物療法効果判定に対する有効性を検討した。非侵襲迅速持続投与法は既に関済済みの非侵襲持続投与法に膜型血漿分離器を組み合わせた手法であり、各脳領域の測定値が簡便、迅速かつ正確に算出可能であった。また、イソフルランガス麻酔の脳循環代謝値への影響も確認可能であった。

研究成果の概要（英文）：We developed cerebral blood flow and oxygen metabolism measurement combining injectable  $^{15}\text{O}$  labeled artificial blood cell and noninvasive rapid steady-state method. The cerebral blood flow and oxygen metabolism of normal and cerebral ischemia-reperfusion model rat was measured and then effectiveness of drug treatment was evaluated using this method. New rapid steady-state method was developed by combining membrane plasma separator to conventional steady-state method and cerebral blood flow and oxygen metabolism of normal and cerebral occlusion region was calculated easily, rapidly and accurately. Influence of isoflurane gas anaesthesia was confirmed using the method.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：核医学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・放射線科学

キーワード：核医学(PET)、画像解析、脳循環代謝

## 1. 研究開始当初の背景

気体状  $^{15}\text{O}$  ガス PET を用いた脳循環代謝検査法は、定量性が高く脳血管障害を正確に診断可能であることから臨床上有用であるもの

の、煩雑な作業を伴うことなど問題もあるため、申請者は簡便 PET 検査法を開発し、脳虚血患者において有用性を報告してきた。しかし、この手法を小動物実験に適用したところ、

気体状  $^{15}\text{O}_2$  ガス吸入による鼻腔・口腔の高放射能が脳 PET 画像の画質に及ぼす影響や、小動物 PET 装置による撮像に適したガス供給が技術的に困難であったため、気体状  $^{15}\text{O}_2$  ガスと比べ取り扱いが容易な液体状の静注用  $^{15}\text{O}_2$  人工赤血球をこれまで開発してきた(Tiwari VN, Kiyono Y, Kobayashi M, et al, Nucl Med Biol. 2010;37(1):77-83.). しかし、いまだ明確に解決していない脳虚血領域の経時変化と静注用  $^{15}\text{O}_2$  標識人工赤血球を用いた薬物療法効果判定に対する有効性を検討するためには、非侵襲持続投与法の更なる時間短縮化が必要である。

## 2. 研究の目的

本研究では、静注用  $^{15}\text{O}$  標識薬剤と非侵襲迅速持続投与法を用いた脳循環代謝測定法を確立し、正常及び脳虚血再灌流モデル動物における適切な脳循環代謝測定値の算出と薬物療法効果判定の有効性を検討する。

## 3. 研究の方法

### (1) 非侵襲持続投与法の更なる迅速化の検討

既に確立済みの非侵襲持続投与法は、連続的に薬剤流量を調節可能なプログラマブルシリンジポンプを利用し、生体内に急速投与した静注用  $^{15}\text{O}$  標識薬剤の放射能減衰を補完するために、この薬剤を持続的に投与することで簡便な脳循環代謝測定値の算出を可能とした。しかし、急性期脳虚血領域の経時変化を半減期 2 分の  $^{15}\text{O}$  薬剤を用いて観察するためには更なる時間短縮化が必要であった。そこで、脳循環代謝測定値の一つである脳酸素摂取率測定に必要な血液成分中の血漿分離において、市販の膜型血漿分離器を使用し、動脈血をカテーテルから直接分離器に移動させることで迅速に血液内放射能測定が可能な非侵襲迅速持続投与法が確立できると考えた。

### (2) 正常及び脳虚血再灌流モデルラットを用いた脳循環代謝測定値の算出

酸素- $^{15}\text{O}$  標識人工赤血球には、hemoglobin 含有 liposome vesicle( $^{15}\text{O}$ -HbV)を用いて、脳循環代謝測定を行うこととした。中大脳動脈閉塞再灌流モデルラットを作製後、 $\text{C}^{15}\text{O}$  標識 HbV、 $^{15}\text{O}_2$  標識 HbV、 $\text{H}_2^{15}\text{O}$  の順番

に投与して PET 撮像を行った。その際、 $^{15}\text{O}_2$  人工赤血球と  $\text{H}_2^{15}\text{O}$  は(1)で確立した非侵襲迅速持続投与法を用いてラットに投与し、各データを取得した。また、麻酔の影響を考慮し、麻酔薬の投与量もシリンジポンプを用いて可能な限り低減するよう心がけた。ラット屠殺後、3テスラ MRI により MRI 画像を取得し、脳スライス作製後、スライスの一部は RNAlater<sup>®</sup> により RNA を安定化した状態で凍結した。同様なスライスを用いて core が未染色となる 2,3,5-triphenyltetrazoliumchloride (TTC)を用いた免疫組織学的染色画像を取得した。染色結果から予想される各脳領域を凍結スライスから抽出後、両大学が既に所有している DNA マイクロアレイや Real time-PCR 測定を用いて各領域の遺伝子発現を観察し、既に報告されている遺伝子解析結果から core および penumbra 領域を正確に判別するよう試みた。これらの画像を画像解析ソフトにより融合し、遺伝子解析結果をこの融合画像に反映させることで、core、penumbra および正常領域の脳循環代謝測定値を算出した。また、再灌流後 1, 5, 24 時間経過後のラットにおいても同様に検討し、各脳領域の経時変化も観察した。

### (3) 薬物療法の治療効果判定に対する非侵襲的迅速持続投与を用いた静注用 $^{15}\text{O}_2$ 標識人工赤血球の有効性の検討

本研究で確立した脳循環代謝測定を利用して、市販の麻酔薬を脳保護・蘇生効果や脳虚血後の神経細胞障害抑制を評価するために、我々は、動物を用いた分子イメージング研究で麻酔薬として良く用いられるイソフルランガス麻酔を利用した。方法は、前述の(2)の実験方法とほぼ同様としたが、抱水クロラル麻酔を行った正常ラットの PET 撮像を行った後、イソフルランガス麻酔を更に行い再度撮像した。ガス麻酔前後の脳循環代謝測定結果を比較することで、その影響の変化が確認可能かを検討した。

## 4. 研究成果

(1) 非侵襲持続投与法の更なる迅速化の検討  
非侵襲迅速持続投与法の確立する前に、本研究を行う前に開発してきた非侵襲持続投与法を用いて、 $^{15}\text{O}$ 標識水を用いた正常ラットの

脳血流量測定が正確に測定可能かどうかを検討した。この手法は、急速投与法と連続的投与量増加法を組み合わせた手法であり、Excel内に組み込んだVisual basicを用いてプログラムを構築したものである。このプログラムを用いて<sup>15</sup>O標識水を投与し、ラット体内の放射能を確認したところ、投与開始後2分に体内放射能が一定となり、脳画像上のノイズも低減されたことから、正確な脳血流量が測定可能となった(図1)。したがって、<sup>15</sup>O標識薬剤を用いた動物の脳血流量を簡便かつ正確に測定する手法が確立できたため、脳循環代謝研究において権威ある国際雑誌に掲載された(Kobayashi M. et al, J Cereb Blood Flow Metab. 2011;31(2):527- 531)。また、この手法により、動脈採血量が0.1mLと非常に微量となり、投与量においては、従来の持続投与法で1匹あたり2-3 mL必要だったのに対し、本法では約1.2 mLとなったため動物の負担が非常に軽減された。加えて、測定時間も短縮されたが、急性期脳梗塞の脳循環代謝測定には更なる時間短縮化が必要であったため、血液内放射能測定の迅速化を考え、膜型血漿分離機の使用を試みた結果、動脈血液内の放射能測定が従来よりも10分程度の短縮された。<sup>15</sup>Oの半減期が約2分であるため、この時間短縮は脳虚血領域の時間変化や薬物療法の治療効果判定の検討における<sup>15</sup>Oの放射能測定において非常に重要な意味を持つと思われた。

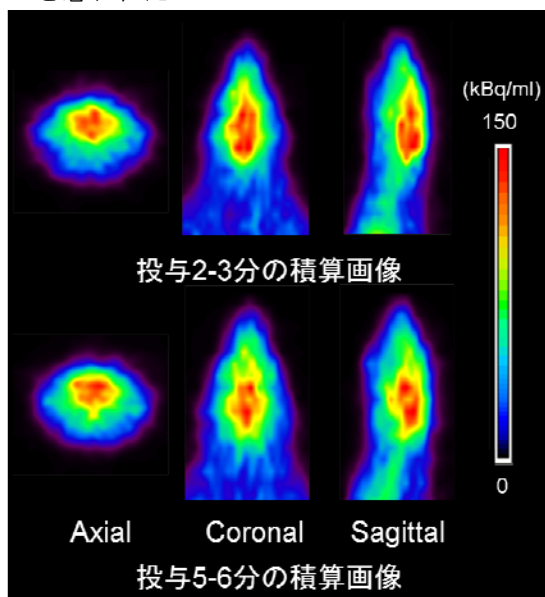


図1：ラットの脳血流量画像

(2) 脳虚血再灌流モデルラットを用いた脳循環代謝測定値の算出

(1)で確立した非侵襲迅速持続投与法を利用して、<sup>15</sup>O-HbVによる正常および脳虚血再灌流ラットにおける脳循環代謝測定を行った。<sup>15</sup>O-HbVと<sup>15</sup>O標識水を正常と脳虚血再灌流ラットにそれぞれ投与した結果、両薬剤とも投与後2分で脳内および血液内の放射能が定常状態に達し、正常ラットにおける脳酸素代謝率は全脳で $6.2 \pm 0.4$  mL/min/100gと既に報告されている数値と同等の結果が得られたため、非侵襲迅速持続投与による<sup>15</sup>O-HbVを用いた脳循環代謝測定法を確立できた。また、脳虚血再灌流モデルラットにおける脳虚血領域の経時的变化を観察するため、遺伝子測定技術により完全梗塞領域およびペナンプラ領域の正確な判別を目指したが、遺伝子測定結果が思うように安定しなかったため、MRIと免疫染色画像を使用して完全梗塞領域のみを正確に区別したところ、虚血再灌流後1, 5, 24時間経過後の完全梗塞領域の脳酸素代謝率はそれぞれ $1.2 \pm 0.3$ ,  $1.1 \pm 0.5$ ,  $0.9 \pm 0.5$  mL/min/100gであった(図2)。我々は、これらの結果の一部を論文化して、(1)で確立した手法と同様に脳循環代謝研究で権威ある国際雑誌に掲載された(Kobayashi M. et al, J Cereb Blood Flow Metab. 2012;32(1):33- 40)。

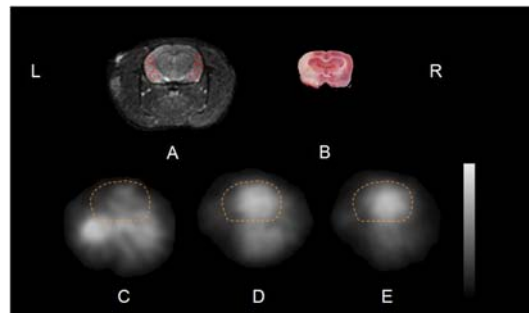


図2：脳虚血再灌流モデルラットの脳循環代謝画像

(3) 薬物療法の治療効果判定に対する非侵襲的迅速持続投与を用いた静注用<sup>15</sup>O<sub>2</sub>標識人工赤血球の有効性の検討

(2)の実験において、<sup>15</sup>O-HbVと非侵襲迅速持続投与法の組み合わせにより、正常と脳虚血再灌流モデルラットの脳循環代謝値が迅速、簡便かつ正確に測定可能であると判明したため、次に、イソフルランガス麻酔薬を用いた脳保護効果の評価を行った。その結果、麻酔時の

脳循環代謝測定値が麻酔なしのそれと比較して著しく低下した。しかし、その脳保護効果については更なる研究が必要であった。本研究成果は、様々な脳疾患の病態解明における基礎研究の発展に貢献すると思われる。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 8 件)

① Kobayashi M., Mori T., Kiyono Y., Tiwari VN., Maruyama R., Kawai K., Okazawa H., Cerebral Oxygen Metabolism of rats using injectable  $^{15}\text{O}$ -oxygen with a steady-state method, Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism, 32(2012), 33-40, 査読有

② Kobayashi M., Kiyono Y., Maruyama R., Mori T., Kawai K., Okazawa H., Development of an  $\text{H}_2^{15}\text{O}$  steady-state method combining a bolus and slow increasing injection with a multi-programming syringe pump, Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism, 31(2011), 527-534, 査読有

[学会発表] (計 25 件)

① 小林正和,  $^{15}\text{O}$  酸素ガス標識ヘモグロビンを使用した脳循環代謝測定法の開発. 第 14 回福井大学高エネルギー医学研究センター研究発表会, 2011 年 7 月 29 日, 福井大学高エネルギー研究センター(福井県)

② Kobayashi M., Development of a new steady-state method using injectable  $^{15}\text{O}_2$  for measurement of oxygen metabolism in the rat brain. The 25rd International Symposium on Cerebral Blood Flow and Metabolism & the 10th International Conference on Quantification of Brain Function with PET (Brain 11&Brain PET 11), 2011.5.24-28, Centre de Convencions Internacional de Barcelona(Spain)

③ 小林正和,  $^{15}\text{O}$  ガス標識ヘモグロビンを用いた脳循環代謝測定の検討. 第 50 回日本核医学会学術総会, 2010 年 11 月 11-13 日, 大宮ソニックシティ(埼玉県)

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称: 分子イメージングにより代謝機能を測定するための検査薬

発明者: 川井恵一, 玉井郁巳, 國嶋崇隆, 中西猛夫, 小林正和

権利者: 金沢大学

種類: 特許

番号: 特願 2012-044231

出願年月日: 2012 年 2 月 29 日

国内外の別: 国内

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

小林 正和 (KOBAYASHI MASATO)

金沢大学・保健学系・助教

研究者番号: 30444235

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし