

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 2 日現在

機関番号：14202

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462213

研究課題名(和文) 脳の加齢変化に対する 7 T MRI 拡散テンソル法による定量解析と組織学的検討

研究課題名(英文) Aging changes of the diffusion anisotropy in the rat brain corpuscallosum on experimental 7-Tesla MR system

研究代表者

地藤 純哉 (Jito, Junya)

滋賀医科大学・医学部・助教

研究者番号：50534161

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：加齢に伴う脳機能の低下につながる白質変性を、ラット脳(脳梁部)を対象とし7.0-T MRIでFA値を測定する事で捉えられるかを主目的とした。生後18～102週までの間、4週ごとにFA値を計測した。同時に体重変化も観察した。FA値は生後102週まで生涯を通じ0.561から0.667まで増加し続けたが生後42週以降では有意差はなかった。一方体重はFA値より早期に一定に近づいた。ラットでは脳梁部白質のFA値は加齢により若年期と比し有意に増加し、体成長の終了後も増加が継続する。また壮年期以降も増加傾向を示した。これは加齢によりFA値が低下するヒトとは異なった変化であり新しい発見である。

研究成果の概要(英文)：The aging sometimes may cause the cognitive impairment. We evaluated the fractional anisotropy (FA) in the rat brain white matter can detect the aging change through its whole lifespan by using experimental 7-Tesla (7T) MR system. Diffusion tensor image data of the corpus callosum was obtained at every 4 weeks through postnatal 18 week (w) to 102w. The mean FA (mFA) from 5rats changed from 0.561 to 0.667 through their lifespan. The Post-hoc tests showed a significant difference between mFA at 18w, 22w and after 50w periods, between mFA before 30w periods and after 70w periods, between mFA before 34w periods and after 82w periods. Although mFA did not have a significant difference between any combinations of the periods after 42w until the last period, mFA tends to increase gradually until older age. This increase tendency was new finding, because there were no reports about the change of mFA through the whole lifespan and the FA value of human white matter was decreased with age.

研究分野：脳神経外科

キーワード：加齢 FA値 Diffusion 白質変化

1. 研究開始当初の背景

認知症の増加が社会問題となっている中、画像上明らかな病変が指摘できない通常に加齢変化においても脳機能や認知力の低下を来している例があり、その一因に脳白質線維の変性が関与していると考えられる。昨今ヒトを対象とした大脳白質の加齢変化を MRI の拡散強調画像を用いて解析することで、脳機能や認知力に影響を及ぼす白質線維の変化が微小構造レベルでとらえられつつある(1)。この解析には FA (fractional anisotropy) 値が用いられる(2,3)。生体内において水分子の拡散は内部の構造物により影響をうけるが、特に白質では神経線維に直交する方向で拡散が非常に遅くなるとされる。方向によって拡散の速さに差があることを「異方性 (diffusion anisotropy) が強い」といい、その指標として代表的なものが FA 値である(3)。これまでヒトを対象とした FA 値の研究では、正常群でも加齢に伴い FA 値が低下し(4)、軽度認知症を有する群やアルツハイマー病患者では更に低下すると報告されている(5,6,7,8)。神経心理テストとの関連については、FA 値測定は認知症状の有意な解析方法として脚光を浴びつつもある(6)。一方、ヒトの加齢変化における FA 値による解析では、軸索変性ではなくミエリン鞘の変性を示唆する所見を提示した報告もあるが(9)、組織学的な検証はなされていない。これまでに我々はこの FA 値を用い正常 rat の生後 10 週までの白質変化における変化を解析し組織学的な検証も加えた結果、FA 値の変化にはミエリン量の増加が有意に関与していることを報告した(10)。

しかしヒトにおいては FA 値と組織学的変化を終生にわたり経時的に行うことは難しい。そこで比較的短期間にその双方の分析が可能である rat を対象とし、脳白質の FA 値を終生にわたり経時的に測定することで、FA 値と加齢や老齢化による白質変化、さらに組織との関連を分析することは有用であると考えた。さらに rat を対象とした経時的な FA 値測定による白質変化の解析は研究開始時点では、成長期のみ報告がある(10)が生涯にわたる変化に関する研究及びその基礎実験は未発表であり、さらに 7T という高磁場 MRI を使用し、より精密なデータを取得できる点からも本研究は特異的である。生涯変化を捉えられれば、認知症、アルツハイマー病などの疾患において、FA 値を用いて解析する際に正常群の基礎データとなることから、研究意義は非常に高い。また、これまではヒトを対象とする解析のため、その病態解析において MRI 情報と病理組織変化は個別に解析されてきたが、その相関については不明な点が多く両者を直接比較した研究も今のところない。本研究は MRI による非侵襲的白質変性の定量評価とヒトでは観察不可能である組織変化との相関の架橋になりうる研究と位置づけられ、両者を統合できるという学術的

背景が存在する。

2. 研究の目的

当大学にある世界でも希少な動物用高磁場 7T-MRI を使用し、生後約 2 年間 (rat の平均寿命 2-3 年である) の rat における脳梁部 (白質線維に富む構造物) を対象とし、拡散テンソル法で加齢による軸索、髄鞘の損傷に関連する FA 値を経時的に測定、定量的解析する。組織学的検討としては適宜、摘出した脳組織の免疫組織学的検査を行い MRI データと組織データとを比較検討することで加齢による白質変性の病態把握、解明を目指す。rat を対象とし加齢に伴い FA 値がいかに変化するかを解析することで加齢に伴い FA 値がヒト同様に減少するかを確認することを目的とする。加えて組織学的検索も行い老齢に伴う白質変化、特にミエリンとの関与を中心として病理学的解析を行いその変性の原因究明に寄与することも目的の一つである。

なお、MRI での白質変性が加齢によるものか、白質に存在する何らかの病的変化の結果なのかは現在でも不明であり rat を対象とし、MRI で経時的に加齢による白質変化を捉え、これに組織学的検索を付加することで非病的な通常の老齢変化の病態解析を行い、ひいてはヒトにおける「脳の加齢」に関連するバイオマーカーの発見することを本研究の主目的とする。

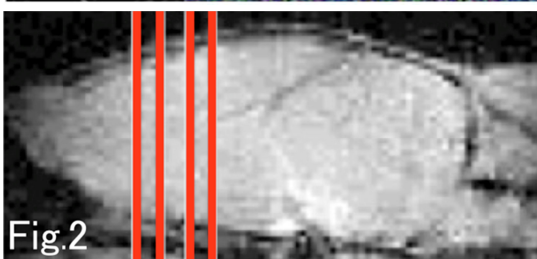
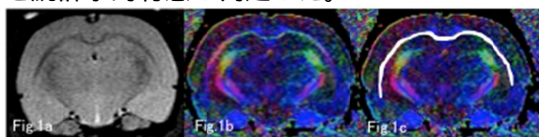
3. 研究の方法

7.0-T MRI にて雄 SD rat を対象動物、その脳梁部 (代表的白質構造物) を測定対象とし、生後 18 週から 102 週 (18w-102w) まで 5 匹分の FA 値測定を実施し経時変化を検討する。MRI 撮影は 4 週間おきに各週 5 匹を実施、撮影には bore 径 40cm の超伝導磁石 (7.0T/400 mm/SS, Japan Superconductor Technology Inc., Kobe, JAPAN) と最大磁場強度 400 mT/m の内径 12cm active shield 傾斜磁場コイルシステム (Magnex Scientific Ltd., Abingdon, UK) をセットした動物用 7.0-Tesla MR scanner (Unity INOVA, VARIAN Inc, Palo Alto, CA, USA) を使用した。

吸入麻酔下 (5% isoflurane/50% O₂) に、300 MHz に調整した自家製 radiofrequency coil をとりつけたボード上にラットの体躯を固定し、体動による artifact を最小限にするため頭部をスポンジにてパッキングした。撮影時は 1.5-1.8% isoflurane/50% O₂ で麻酔を維持し低体温を防ぐため暖気を magnet 内に送風した。

Diffusion-weighted image (DWI) は multiple-slice spin echo 法 [repetition time (TR) = 1700.0 ms, echo time (TE) = 38.0 ms, field of view (FOV) = 35 × 35 mm, scan matrix = 256 × 128 (zerofilled to 256 × 256 image matrix), slice thickness = 1 mm, number of averages = 6] を用い、motion

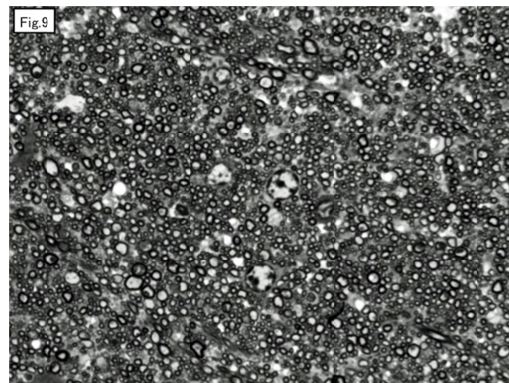
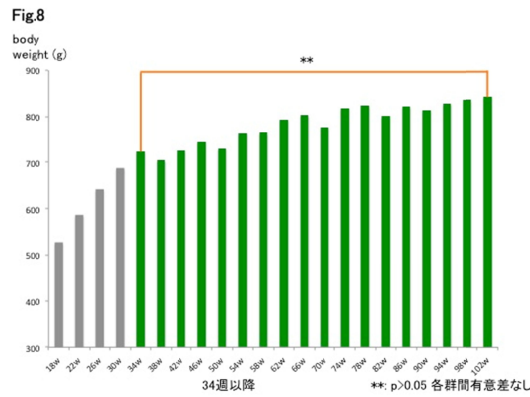
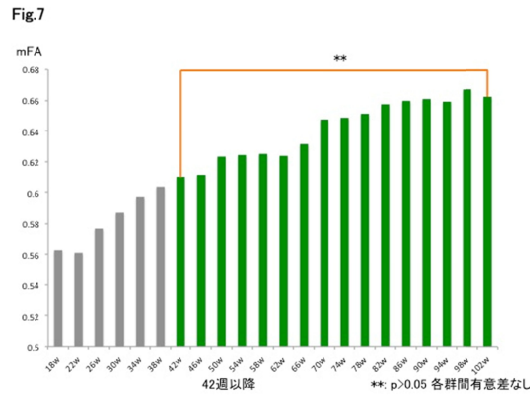
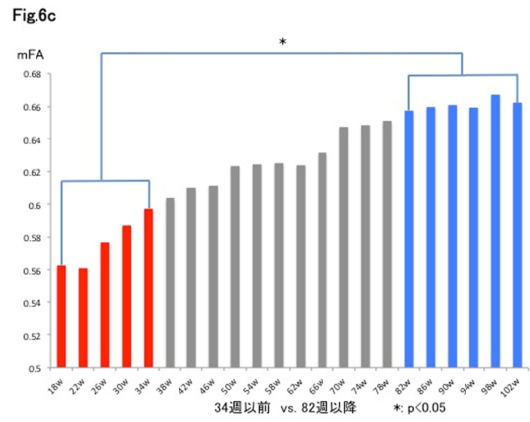
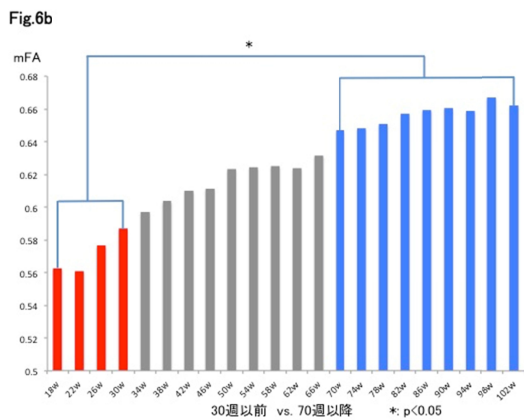
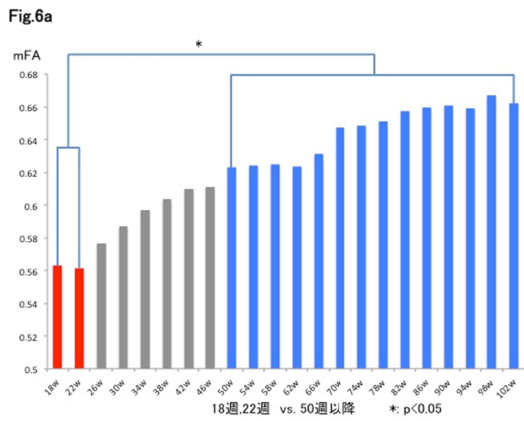
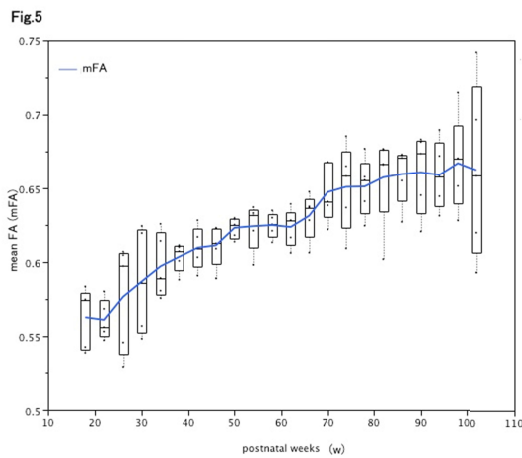
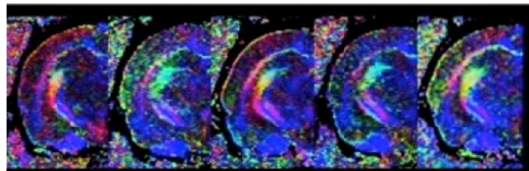
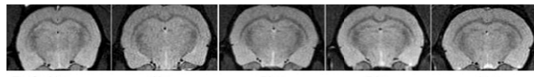
probing gradient (b-value = 812 sec/mm² : gradient duration = 4.6 ms, diffusion time = 12.0 ms) は異なる 6 方向を印加し、DWI と T2-weighted image (= b0 images) fig 1(Fig 1a)を作成した。総撮影時間は 2 時間 32 分であった。拡散テンソルを多変数線型回帰法により計算し、Color map image (Fig.1b) を Pajevic らの報告した手法で作成した(11)。Color map 上の赤、緑、青成分は三次元方向成分を示しており赤が dorsal-ventral 方向、緑が medial-lateral 方向、青が caudal-rostral 方向を示す。計算と画像作成は IDL (Interactive Data Language; Research Systems, Boulder, CO, USA) を使用した homemade software にて実施した。FA 値測定は嗅球後端と小脳前端の midpoint を slice の中心とする前後 2 slice、計 4 slice の脳梁部分を対象とし(Fig.2, red lines)、Region of interest (ROI) を各 slice の Color map 上に manual で設定した(fig 1c, white area)。各ラットから算出した 4 slice 分の FA 値の総平均を当該ラット脳梁部の全体平均 FA 値とした。これを各期間で 5 匹分測定しその平均値を mean FA 値 (mFA) として算出した。また rat 体重についても測定し rat の成長、加齢による体重変化を継続測定し FA 値変化との比較検討も行った。組織検索としては 0.1%のリン酸緩衝食塩水にて灌流固定した生後 28 週から 16 週ごとの脳を作成し、4%のパラホルムアルデヒドで組織固定後に脳梁の白質に垂直断面となる症切片を形成し、1%の OsO₄ で後固定、アセトンによる段階的な脱水処置後に LUVEAC(R) (NAKALAI TESQUE, INC. Kyoto, Japan) で包埋した。電子顕微鏡顕体の要領で 750 nm 厚の semithin section を作成し 1%のホウ砂混合下 1%トルイジンブルーで染色した後、1000 倍拡大の顕微鏡視野に 2560 pixel x 1920 pixel (81.01 μm x 60.75 μm; 4922.28 μm²) の計測フレームを設定し、領域内の髓鞘、軸索の面積を計測することでミエリン量の定量も試みている。有意差検定は analysis of variance (ANOVA) にて実施した。post-hoc test として Tukey 's all-pairwise-comparison test を追加した。全ての統計検討は統計ソフト JMP (SAS institute, NC, USA) を用い実施し、p<0.05 を統計学的有意と判定した。



4. 研究成果

雄の SD rat の mean lifespan もしくは median lifespan は 20.5 ヶ月から 24.2 ヶ月と報告されており(12)、今回我々は生後 102w までの測定を実施していることから、SD rat 脳梁白質部における FA 値変化を、概ね一生涯にわたって捉えたことになる。MR 画像においては、b0 image では加齢に伴う脳梁部の変化を視覚的に捉えることは難しいが (Fig.3)、FA 値を基に作られる Color map image では 30w にくらべ 42w 以降で脳梁部の描出がより明瞭となっており、FA 値の増加が推察できる。実際に測定した脳梁部 mFA は生後 102w まで生涯を通じ 0.561 から 0.667 までの範囲で増加傾向を示した (Fig.4)。生後早期、若年期である 18w、22w に比べ壮年期の 50w 以降の各週では有意に mFA は高値であった。また生後 30 w 以前に比べ老齢期にかかる 70w 以降、生後 34w 以前に比べ 82w 以降の各週では mFA が有意に高値となった (p<0.05)(Fig. 6a-c)。生後 42w 以降における各週群間比較では有意な差はないが、緩徐な増加傾向を認める (Fig.7)。これまでの報告でヒトにおいて正常群でも加齢に伴い FA 値は低下し(4)、軽度認知症を有する群やアルツハイマー病患者では更に FA 値が低下すると報告されており (5,6,7,8)、今回の研究以前に我々は、rat においても同様に FA 値が低下傾向を示すという仮説をたてていたが、実際には白質線維に富む脳梁部の FA 値は加齢に伴い若年期と比較し、高齢期で有意に増加し壮年期以降も増加傾向を示す結果となった。この結果は加齢により FA 値が低下するヒトとは明らかに異なった現象であり、これまで一生涯にわたる rat の白質における FA 値変化を捉えた研究がないことから新しく、貴重な発見である。体重変化との比較では、体重は成長に伴い 34 週頃まで増加するが、それ以降の各週群間においては有意差がなくなり mFA より早期に plateau に近づいた (Fig.7,8)。体成長の終了後でも mFA の増加は継続していることを示す。我々は SD rat の生後 10 週までの FA 値の変化を解析し組織検索の結果、ミエリン量の増加が FA 値上昇に有意に関与していることを以前報告しており (10)、体成長終了後も髓鞘発達が継続し、ミエリン量が増加するため mFA が増加している可能性もある。高齢期にも mFA が増加傾向を示すことに関してはこれまでに高齢期 rat では有髓軸索の volume は有意に減少するが白質における有髓軸索と髓鞘の密度は有意に増加するとの報告(13)から、密度上昇による diffusion anisotropy の増加が脳梁における FA 値増加に寄与していること考察できる。しかし本研究における組織検索に関しては、Fig.9 に示すミエリン染色組織を作成し画像解析手技を用い定量分析の途上であり、現在ミエリン量と mFA の変化に有意な関連を得るには至っていない。加齢による mFA 増加の原因究明に

は更なる組織学的検索が必要である。



参考文献

1. Lebel C et.al. Age-related regional variations of the corpus callosum identified by diffusion tensor tractography.. Neuroimage. 2010 1;52(1):20-31.

2. Basser PJ et.al. MR diffusion tensor spectroscopy and imaging. Biophys J 1994 66:259-267.
3. Basser PJ et.al. Microstructural and physiological features of tissues elucidated by quantitative-diffusion-tensor MRI. J Magn Reson B 1996 111:209-219.
4. Helenius et al. Diffusion-weighted MR imaging in normal human brains in various age groups, AJNR. Am. J. Neuroradiol. 2002 23(2): 194-199.
5. Rose SE et.al. Diffusion indices on magnetic resonance imaging and neuropsychological performance in amnesic mild cognitive impairment. J Neurol Neurosurg Psychiatry. 2006 77(10):1122-1128.
6. Huang J et.al. Diffusion tensor imaging of normal-appearing white matter in mild cognitive impairment and early Alzheimer disease: preliminary evidence of axonal degeneration in the temporal lobe. AJNR Am J Neuroradiol. 2007 28(10):1943-1948.
7. Grieve SM et.al. Cognitive aging, executive function, and fractional anisotropy: a diffusion tensor MR imaging study. AJNR Am J Neuroradiol. 2007 28(2):226-235
8. Lee DY et al. Regional pattern of white matter microstructural changes in normal aging, MCI, and AD. Neurology. 2009 24;73(21):1722-1728.
9. Inano S et al. Effects of age and gender on white matter integrity. AJNR Am J Neuroradiol. 2011 32(11):2103-2109
10. Jito J et.al. Maturational changes in diffusion anisotropy in the rat corpus callosum: Comparison with quantitative histological evaluation. J Magn Reson Imaging. 2008 26;28(4):847-854
11. Pajevic S et al. Color schemes to represent the orientation of anisotropic tissues from diffusion tensor data: application to white matter fiber tract mapping in the human brain. Magn Reson Med 1999 42:526-540,
12. Kuramoto K et al. Spontaneous dwarf rat: a novel model for aging research. Geriatr Gerontol Int. 2010 10(1):94-101.
13. Xu Q, et al. Age related changes in the myelinated fibers of corpus callosum. Neurosci Lett. 2011 25;499:208-222

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)

〔学会発表〕(計 2 件)

「ラット脳における加齢による白質変性に対する 7T MRI 拡散テンソル法による定量解析」

1) 地藤純哉、2) 井藤隆太 3) 大西健 4) 河野浩人、5) 松井宏樹、6) 吉村弥生、7) 高木健治、8) 横井俊浩、8) 新田直樹、10) 深見忠輝、11) 辻篤司、12) 中澤拓也、13) 野崎和彦

第 39 回日本脳神経 CI 学会総会 (2016.1.29-30) 東京

「Aging changes of the diffusion anisotropy in the rat brain corpus callosum on experimental 7-Tesla MR system」

1) Jito.J, 2) Ito.R, 3) Nozaki,K
European Congress of Radiology 2016 (2016 2016.3.2-6) Vienna, Austria

〔その他〕

ホームページ等

<http://shiga-neurosurgery.com/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

地藤 純哉 (JITO, Junya)
滋賀医科大学・医学部・助教
研究者番号：50534161

(2) 研究分担者

野崎 和彦 (NOZAKI, Kazuhiko)
滋賀医科大学・医学部・教授
研究者番号：90252452

(3) 連携研究者

なし