

口腔～門脈肝臓に至る Na^+ 受容器の中樞投射： Mn^{2+} 造影 MRI を用いた研究

助成研究者：森田啓之（岐阜大学 医学部 臓器病態学講座生理機能学）

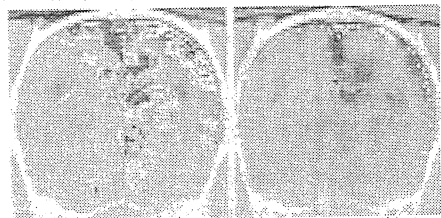
共同研究者：荻野孝史（国立精神神経センター 神経研究所）

瀬尾芳輝（京都府立医科大学 第1生理学講座）

村上政隆（国立共同機構生理学研究所 超微小形態生理）

磁気共鳴装置を用いた脳機能のマッピングは、非侵襲的であり、空間的あるいは時間的分解能にすぐれ、末梢感覚受容器刺激時の中樞興奮部位同定研究において大きなアドバンテージを有している。この目的のため、現在主にヘモグロビンの磁性変化（血流量変化）を検知する Bold 法（f-MRI, functional-magnetic resonance imaging）が用いられている。しかし、f-MRI は、興奮状態変化に伴う血流量変化を検知するため、直接的ではなく、またその信号強度変化もわずか数%と小さく、微小な刺激に対する応答を見ることは容易ではない。1997年 Lin と Koretsky は Mn^{2+} 造影剤を用いた T_1 -weighted MRI により、体性刺激に対する皮質興奮部位が同定できることを報告した。この方法は MRI 造影剤として Ca^{2+} アナログである Mn^{2+} を用い、神経細胞興奮時に Ca^{2+} チャンネルから流入する Mn^{2+} による T_1 緩和時間変化によりコントラストを作成する。このため、血行動態に依存しない、 Ca^{2+} 依存性細胞興奮を直接検知することができる。もし、この方法を用いて視床および視床下部の興奮部位を同定することができれば、自律神経系中枢を研究するに当たり、非常に有用な方法となる。本年度の研究では Mn^{2+} 造影 MRI を用い、 Na^+ 受容器刺激時の脳機能のマッピングを行い以下の結果を得た。

1. 内頸動脈内高張 NaCl 溶液投与に対し、皮質、視床および視床下部の室傍核、視索上核等に有意な信号強度増加が観察された（右図）。
2. これらの部位は Fos 発現部位とよく一致しており、ニューロン単位で興奮部位を描出できた。
3. 側脳室内高張 NaCl 溶液投与に対し、部位による信号強度増加の遅れが観察された。
4. より生理的でマイルドな刺激である口腔内高張 NaCl 投与に対し、味覚中枢と考えられる島皮質で信号強度増加が観察された。



内頸動脈内 1.5 M (左), 0.15 M (右)
 NaCl 溶液投与に対する応答。

以上の結果より、 Mn^{2+} 造影 MRI は皮質のみならず、視床および視床下部の興奮部位をニューロン単位で描出することが可能であり、空間的および時間的分解能が高い新たな自律神経系中枢研究手技となりえる可能性が示唆された。

10

助成番号 0146

口腔～門脈肝臓に至る Na⁺受容器の中樞投射：Mn²⁺造影 MRI を用いた研究

助成研究者：森田啓之（岐阜大学 医学部 臓器病態学講座生理機能学）

共同研究者：荻野孝史（国立精神神経センター 神経研究所）

瀬尾芳輝（京都府立医科大学 第1生理学講座）

村上政隆（国立共同機構生理学研究所 超微小形態生理）

【研究目的】

磁気共鳴装置を用いた脳機能のマッピングは、非侵襲的であり、空間的あるいは時間的分解能にすぐれ、末梢感覚受容器刺激時の中枢興奮部位同定研究において大きなアドバンテージを有している。この目的のため、現在主にヘモグロビンの磁性変化（血流量変化）を検知する Bold 法 (f-MRI, functional-magnetic resonance imaging) が用いられている。しかし、f-MRI は、興奮状態変化に伴う血流量変化を検知するため、直接的ではなく、またその信号強度変化もわずか数%と小さく、微小な刺激に対する応答を見ることは容易ではない。1997年 Lin と Koretsky [1]は Mn²⁺造影剤を用いた T₁-weighted MRI により、体性刺激に対する皮質興奮部位が同定できることを報告した。この方法は MRI 造影剤として Ca²⁺アナログである Mn²⁺を用い、神経細胞興奮時に Ca²⁺チャネルから流入する Mn²⁺による T₁緩和時間変化によりコントラストを作成する。このため、血行動態に依存しない、Ca²⁺依存性細胞興奮を直接検知することができる。もし、この方法を用いて視床および視床下部の興奮部位を同定することができれば、自律神経系中枢を研究するに当たり、非常に有用な方法となる。従って、以下の目的を達成するため本研究を計画した：1) Mn²⁺造影 MRI により、皮質のみならず視床および視床下部の興奮部位をニューロン単位で同定できるかどうかを評価する。2) 生体各所に存在すると考えられている Na⁺受容器を刺激した時の中枢興奮部位を同定する。

【研究方法】

全ての実験は体重 250 - 360 g の雄性 Wistar-Hamamatsu ラット (n=11) を用い、日本生理学会規定の “Guiding Principles for Care and Use of Animals in the Field of Physiological Science” に従って行った。

ラットはまず、enflurane 吸入により麻酔し、気管切開および挿管後、人工呼吸器に接続し (tidal volume 5 ml, ventilation rate 50/min, Harvard Apparatus, MA), 1% enflurane と 98.6% O₂/1.4% CO₂ + N₂O (1:1.5) の混合ガスにより人工呼吸した。MnCl₂ 投与用静脈カテーテルを大腿静脈から下大静脈に挿入し、動脈血サンプリング用カテーテルを大腿動脈から腹部大動脈に挿入した。腹壁を小切開し、麻酔薬投与用カテーテルを腹腔内に留置した。総頸動脈から分枝直後の右外頸動脈から、mannitol

投与用カテーテルを挿入した。カテーテル先端部は総頸動脈-内頸動脈分枝部に留置し、挿入部位から先端部までに存在する分枝は結紮し、投与した mannitol が内頸動脈を介して右脳に到達するようにした。手術後および実験終了後に動脈血をサンプリングし、hypercapnia および hypoxia でないことを確かめた。

手術操作終了後、Plexiglas で作製した MRI 用脳固定装置にラットを固定した。温水を循環させた water pad でラットを覆い、直腸温を 36.8 ± 0.3 °C に保った。コイルの中心が bregma から 6 mm 尾側になるように、直径 23 mm の表面コイルを設置した。腹腔カテーテルから, urethane (450 mg/kg b.w.)/ α -chloralose (50 mg/kg b.w.) を投与し、投与 15 分後に enflurane 吸入を中止した。この後も、O₂/CO₂ と N₂O ガスは持続的に吸入させた。Enflurane 中止 20 分後、pH-buffered bicine (100 mM, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) に溶解した 100 mM MnCl₂ (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) を静脈カテーテルからシリンジポンプを用い、5 ml/kg b.w./h のスピードで 52.8 分間投与した (投与総量 = 440 μ mol/kg b.w.)。MnCl₂ 投与開始 13.2 分後、血液-脳関門を破壊するため、外頸動脈から内頸動脈に向け挿入したカテーテルから 25 % D-mannitol (5 ml/kg b.w./1.5 min; Wako Pure Chemical Industries, Osaka) を投与した [2]。Na⁺受容器刺激は MnCl₂ 投与開始 39.6 分後に以下の方法で行った。1) 内頸動脈内 1.5 M NaCl 溶液投与 (1 ml/kg b.w., n=3)。2) 側脳室内 1.5 M NaCl 溶液投与 (10 μ l, n=2)。3) 口腔内 0.3 M NaCl 溶液投与 (1 ml, n=2)。

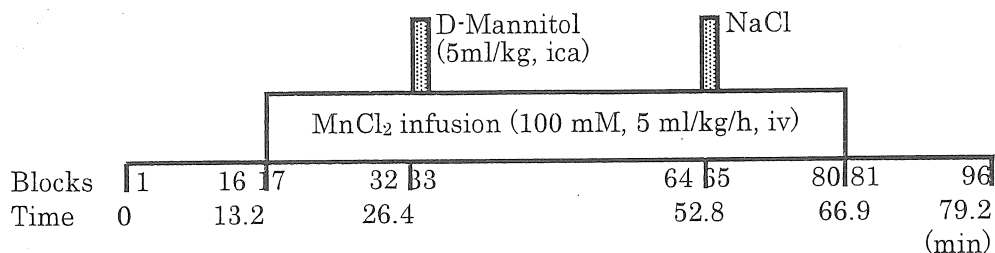


Figure 1. Time schedule of the experimental

BioSpec spectrometer (ABX-4.7/40, Bruker, Karlsruhe)を用いて、proton image を撮影した。この装置は、active shielded gradient (B-GA12, Bruker, Karlsruhe)を持つ、4.7 T の horizontal-bore magnet (内径 40 cm)を備えており、Para Vision operating software (version 2.1.1, Bruker, Karlsruhe)を用いて操作することができる。T₁-weighted coronal image の撮影パラメータは、field of view = 2.5 x 2.5 cm, data matrix 128 x 128, slice thickness 1 mm, relaxation delay 150 ms, echo-time 4.2 ms, number of slices 16, number of accumulations 2 とした。16 画像の撮影時間は 49.5 秒であり、これを 1 ブロックとし、1 実験は 96 ブロックより構成され、実験時間の合計は 79.2 分であった (Figure 1)。

Mn²⁺造影 MRI の妥当性を検討するため、同一刺激を用い、Mn²⁺造影 MRI により同定されたニューロンと Fos immunohistochemistry により染色されたニューロンを比較した。Mn²⁺造影 MRI 実験と同様の手術操作を行ったラットを用い、内頸動脈内に 1.5 M NaCl 溶液 (1 ml/kg b.w., n=2) あるいは 25 % D-mannitol 溶液 (5 ml/kg

b.w., n=2) を投与した。投与終了 90 分後、経心臓的に phosphate-buffered saline (pH 7.4), その後 4% paraformaldehyde で灌流し、脳を取り出し、4 °C 4% paraformaldehyde 中に一晩保存した。翌日 vibratome (Model VT1000E, Leica Instruments) を用い 40 μm の切片を作製し、4 °C にて一晩 1 次抗体 (c-fos Ab-2, Oncogene Science, Manhasset, NY) と反応させた後、ABC 法にて染色した [3]。画像の統計は Excel98 (Microsoft) と NIH Image (version 1.63) を用いて行った。血管および脳室を除外するため、各ピクセルにつき、ブロック 17-32 (血液-脳関門を破壊する前の MnCl_2 投与) とブロック 1-16 (MnCl_2 投与前) で t test を実施した。ブロック 17-32 が有意に大きければ、そのピクセルは血管あるいは脳室であるとして以降の統計処理からは除外した。ブロック 49-64 とブロック 65-80 で回帰検定を行い、後者の傾きが有意に大きければ、ブロック 65-80 の値をブロック 49-64 の傾きで補正した後、両者の間で t test を実施した。Table 1 のシグナル強度は one-way ANOVA, Fos のデータは t test を用いて解析した。

【研究結果】

画像の信号強度は control および NaCl 刺激時とも、 T_1 relaxation rate とよく相関していた (Figure 2)。Figure 3 にスライス 10 の右皮質、室傍核、外側手綱核、側脳室、矢状静脈洞の T_1 -weighted MRI 信号強度を示す。血液-

脳関門が正常な状態では、 MnCl_2 投与により皮質と矢状静脈洞のみ信号強度が増加したが、他の実質部分は信号強度の有意な変化は見られなかった。しかし、D-mannitol 投与により血液-脳関門を破壊すると、脳実質部分での信号強度の変化が認められた。さらに、内頸動脈内高張 NaCl 溶液投与により、脳内 NaCl あるいは浸透圧受容器を刺激すると、右皮質、室傍核、外側手綱核で有意な信号強度の増加が見られたが、側脳室および矢状静脈洞では有意な変化はなかった。

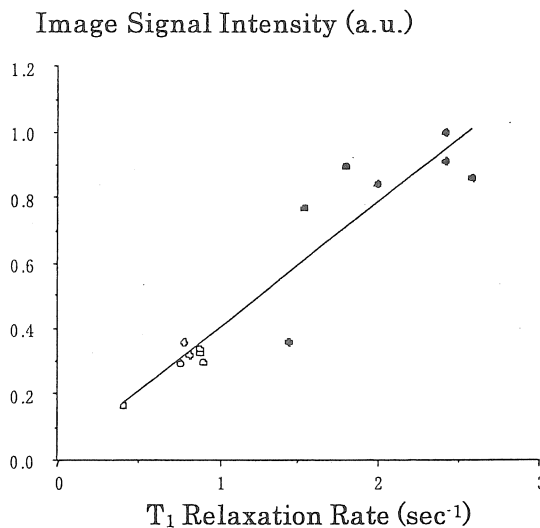


Figure 2. Relationship between image signal intensity and T_1 relaxation rate. Regression line is $y=0.39x+0.02$ ($r^2=0.88$). ○: before NaCl stimulation. ●: after NaCl stimulation.

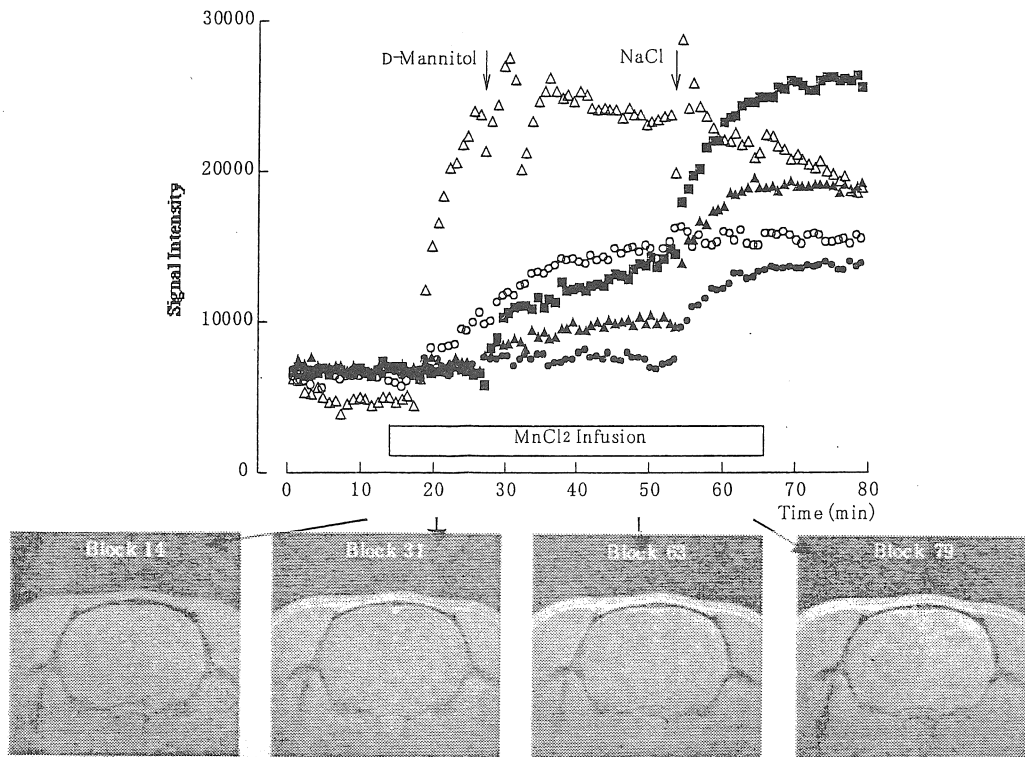


Figure 3. Upper panel: Time-course of T₁-weighted MRI signal intensity changes in the cortex (■), paraventricular hypothalamic nucleus (●), lateral habenular nucleus (▲), lateral ventricle (◇), and superior sagittal sinus (ρ) from slice 10 of a rat. Time 0 is the start of MRI imaging. The period of MnCl₂ infusion is shown by the horizontal bar and the points at which the mannitol and NaCl injections were given are shown by the arrows. Lower panel: T₁-weighted images of the same rat before MnCl₂ infusion (block 14), after MnCl₂ infusion (block 31), after mannitol injection (block 63), and after hypertonic NaCl injection (block 79). (Reprinted from Morita et al. [4].)

Figure 3 と同一ラットのスライス 11 およびスライス 12 を Figure 4 の中段に示す。内頸動脈内高張 NaCl 溶液投与に対し、皮質、視床、および視床下部に有意な信号強度の増加が認められた。特に、体液浸透圧調節に重要な役割を演じていることが知られている、室傍核および視索上核はニューロン形状に一致して明瞭に増加した。これらの信号強度増加部位は、Fos 陽性細胞の分布とよく一致していた (Figure 4 上段および下段)。室傍核および視索上核の信号強度の変化および Fos 陽性細胞数を Table 1 に提示する。D-mannitol により血液-脳関門を破壊すると、わずかながら有意な信号強度の増加が起こった。引き続き内頸動脈内 NaCl 投与により、更なる信号強度の増加が起こった。この結果と一致し、D-mannitol 投与に比べ、NaCl 投与の方が Fos 陽性細胞数は有意に多かった。

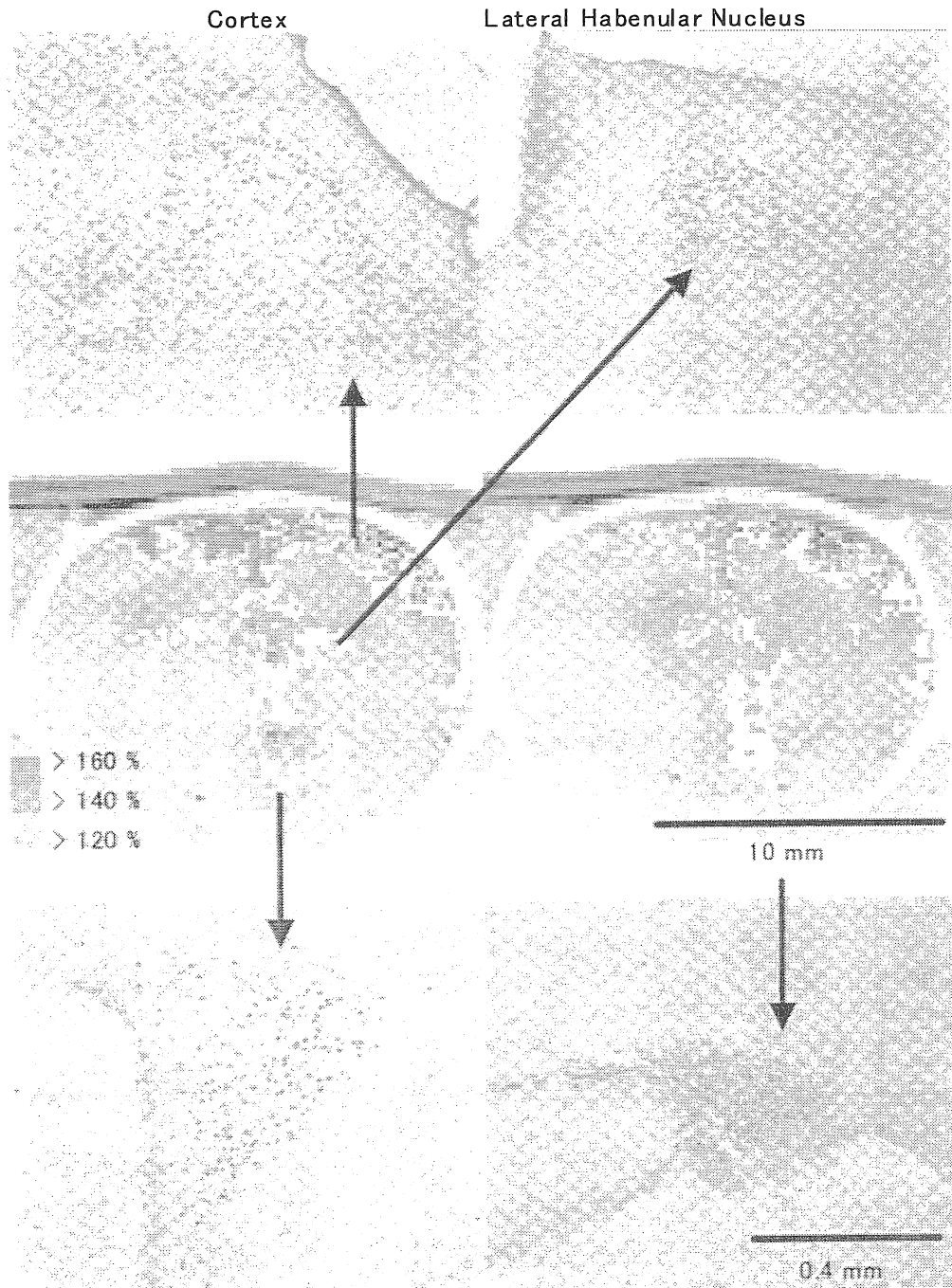


Figure 4. Activation of the rat brain by the intracarotid arterial injection of hypertonic NaCl injection. The top and bottom panels show Fos-immunoreactivity in the cortex, lateral habenular nucleus, paraventricular hypothalamic nucleus, and supraoptic nucleus. The middle panel shows T₁-weighted images (slice 11 and 12). Areas in which the signal intensity increased significantly ($p < 0.05$) are shown in color. (From ref. 4)

Table 1

Signal intensity and number of Fos-positive cells in the paraventricular hypothalamic nucleus (PVN) and supraoptic nucleus (SON).

	MnCl ₂	D-mannitol	NaCl
Signal Intensity (%)			
PVN (n=27)	102.4±0.4	118.6±1.4*	156.9±3.1*†
SON (n=23)	101.0±1.0	115.3±2.5*	150.3±5.4*†
Fos-positive cells			
PVN (n=10)		73.7±12.7	151.2±15.4†
SON (n=10)		112.9±8.8	183.3±8.0†

The data are presented as the mean ± SEM. For the signal intensity, 27 (paraventricular hypothalamic nucleus) and 23 (supraoptic nucleus) region of interest were used from 3 rats. For Fos-positive cell count, 10 slices were obtained from 4 rats (2 for D-mannitol and 2 for NaCl injection). The signal intensity results are presented as a percentage of the averaged signal intensity before MnCl₂ infusion, while the number of Fos-positive cells is expressed as the number of cells in an area. *P<0.05 compared to MnCl₂ infusion. †P<0.05 compared to D-mannitol injection. (From ref. 4)

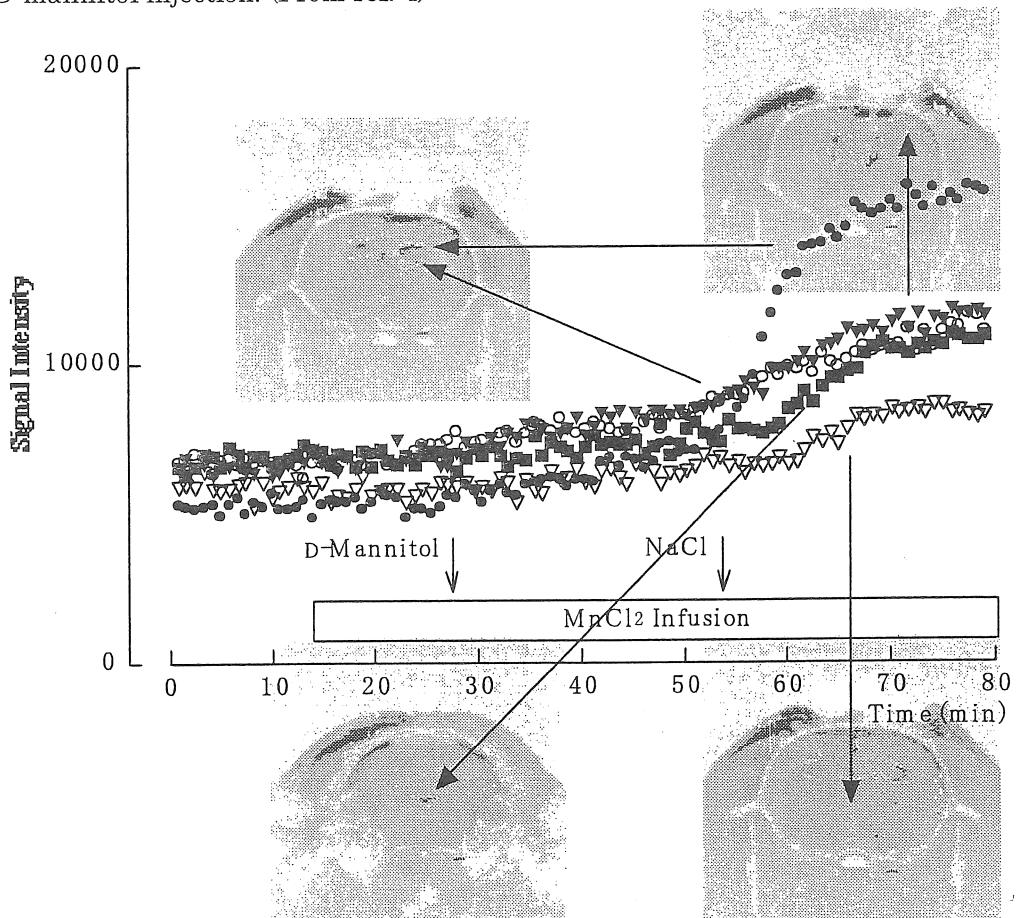


Figure 5. Time-course of T₁-weighted MRI signal intensity changes in the upper (●) and lower (○) wall of the lateral ventricle, cortex (▽), paraventricular hypothalamic nucleus (∇), and locus ceruleus (■) in response to lateral ventricular injection of 1.5 M NaCl (10 μl). Time 0 is the start of MRI imaging. The period of MnCl₂ infusion is shown by the horizontal bar and the points at which the mannitol and NaCl injections were given are shown by the arrows.

右側脳室に 1.5 M NaCl 溶液を 10 μ l 投与した時の信号強度変化と T₁-weighted MRI 画像を Figure 5 に示す。まず、投与部位近傍の側脳室上下壁で信号強度増加が起こり、ほぼ同時に大脳皮質、次いで青斑核、最終的には室傍核、視索上核に興奮が広がっていることが分かる。側脳室周囲の興奮から視床下部興奮までの時間遅れは 5~7 分であった。

口腔内 1.5 M NaCl 溶液投与に対する T₁-weighted MRI 信号強度変化を Figure 6 に示す。信号強度増加は 20~30 % と内頸動脈投与および側脳室投与に比べ小さいながらも有意な信号強度増加が、味覚中枢が存在すると考えられている島皮質に認められた。

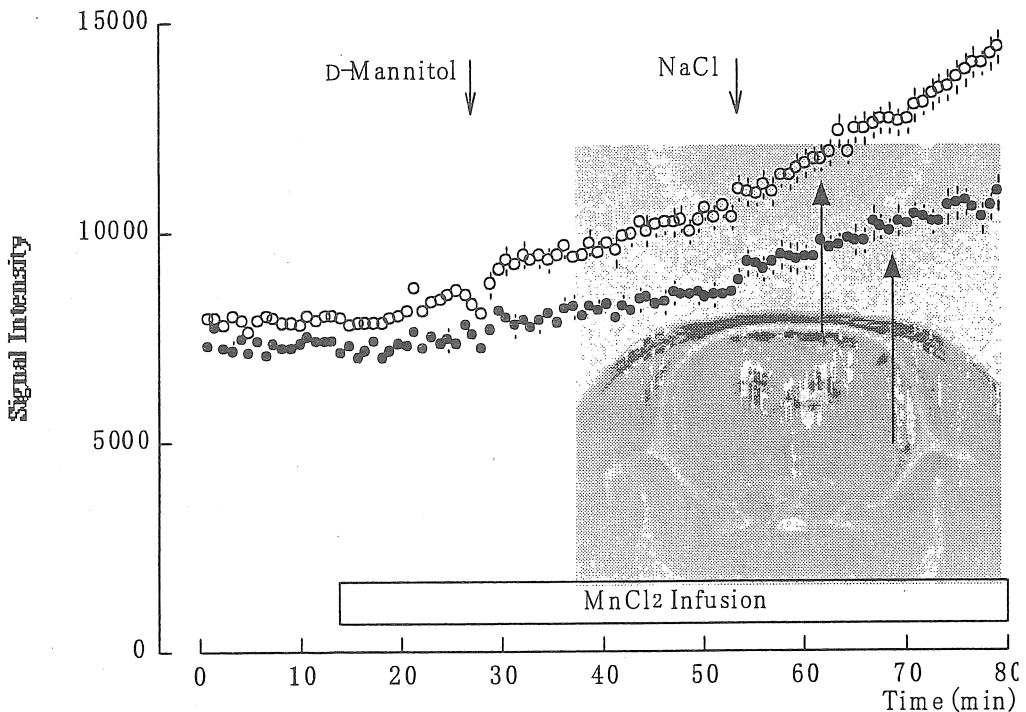


Figure 6. Time-course of T₁-weighted MRI signal intensity changes in the insular cortex (●) and frontal cortex (○) in response to oral administration of 1.5 M NaCl (1 ml). Time 0 is the start of MRI imaging. The period of MnCl₂ infusion is shown by the horizontal bar and the points at which the mannitol and NaCl injections were given are shown by the arrows.

【考察】

脳機能の研究において MRI は、その空間的および時間的分解能の高さゆえ、大きなアドバンテージを持っている。これまで、中枢の機能的活動を調べるため、血行動態の変化を調べる f-MRI が主に用いられてきた。本研究では、より直接的な神経細胞活動状態、すなわち細胞内 Ca²⁺濃度を Ca²⁺アナログである Mn²⁺を造影剤として用いて評価した。中枢の Na⁺あるいは浸透圧受容器を刺激すると、室傍核および視索上核が興奮することが知られている [3]。本研究において、これらのニューロンが Mn²⁺造影 MRI により、明瞭に描出された。

Mn²⁺投与だけでは、脳実質の信号強度は増加しなかったことから、Mn²⁺は血液-脳関門を通過しないことが分かる。従って、Mn²⁺を神経細胞周囲に到達させるために、D-mannitol による浸透圧ショックにより血液-脳関門を破壊する必要がある [2]。当然、D-mannitol 投与により、中枢浸透圧受容器は刺激されると考えられる。実際、皮質、視床、視床下部において T₁-weighted MRI の信号強度は増加した。細胞内に流入した Mn²⁺は細胞内でトラップされ、その半減期は2~3月である [5, 6]。従って、もし D-mannitol により神経細胞が最大限に興奮すると、後に続く NaCl 溶液投与によりそれ以上の Mn²⁺取り込み、すなわち信号強度増加は起こらないはずである。しかし、実際には NaCl 投与により、さらなる信号強度の増加が認められた (Figure 3 and Table1)。これらの結果は、興奮する神経細胞数あるいは各神経細胞の興奮程度が、D-mannitol 投与に比べ NaCl 投与の方が大きかったことを示唆する。今回の Fos 陽性細胞数の結果もこの推論を支持し、有意に多数の Fos 陽性細胞が NaCl 投与で認められた。さらに、Fos での実験と同様の部位に Mn²⁺造影 MRI の信号強度増加が認められ、自律神経中枢研究におけるこの方法の有用性が確かめられた。

側脳室 NaCl 投与実験では、部位により信号強度増加立ち上がりの遅れが存在することが確かめられた。まず、投与部位である右側脳室周囲で興奮が起こり、皮質、青斑核、視床下部へと興奮部位が広がっていった。時間遅れは、青斑核で2~3分、視床下部で5~7分であった。青斑核は脳脊髄液の循環、また視床下部は側脳室から実質への拡散を介して、高張 NaCl 溶液が興奮部位に到達したと思われる。一方、皮質の興奮は側脳室周囲の興奮とほぼ同時に起こり、神経投射による興奮伝播と思われる。また、NaCl 味覚刺激に対し、味覚中枢である島皮質に信号強度増加が認められた。従って、生理的で微小な刺激に対しても、その中枢経路同定に Mn²⁺造影 MRI は有用である可能性が示唆された。

【今後の課題】

Bold 法による fMRI は、興奮状態変化に伴う血流量変化を検知し、その信号強度変化はわずか数%と小さい。一方、Mn²⁺造影 MRI は血行動態に依存しない、Ca²⁺依存性細胞興奮を直接検知することができ、数十%の大きな信号強度変化を観察できる。本研究では Mn²⁺造影 MRI を用い、高張 NaCl 溶液刺激に対する、中枢の興奮部位を同定した。Mn²⁺造影 MRI と Fos の結果はニューロン単位で一致し、十分な空間分解能があることが確かめられた。また、高張 NaCl 溶液拡散に伴う、興奮部位の移動も検知でき、時間分解能も高い。しかし、Mn²⁺は血液-脳関門を通過せず、Mn²⁺を興奮細胞周辺に分布させるために、血液-脳関門を破壊する必要がある。また、一度取り込まれた Mn²⁺は2~3ヶ月間細胞内に留まるため、同一細胞の興奮の時間経過を見ることはできない。Mn²⁺造影に伴うこれらの短所を克服する、新しい造影剤の開発が今後の課題となる。

【文献】

1. Lin, Y-J., Koretsky, A.P.: Manganese ion enhances T_1 -weighted MRI during brain activation: an approach to direct imaging of brain function. *Magn. Reson. Med.*, 38: 378-388, 1997.
2. Nagy, Z., Pappius, H.M., Mathieson, G., Hüttner, I.: Opening of tight junctions in cerebral endothelium, I. Effect of hyperosmolar mannitol infused through the internal carotid artery. *J. Comp. Neur.*, 185: 569-578, 1979.
3. Morita, H., Yamashita, Y., Nishida, Y., Tokuda, M., Hatase, O., Hosomi, H.: Fos induction in rat brain neurons after stimulation of the hepatoportal Na-sensitive mechanism. *Am. J. Physiol.*, 272: R913-R923, 1997.
4. Morita, H., Ogino, T., Seo, Y., Fujiki, N., Tanaka, K., Takamata, A., Nakamura, S., Murakami, M.: Detection of hypothalamic activation by manganese ion contrasted T_1 -weighted magnetic resonance imaging in rats. *Neurosci. Lett.*, 2002 (in press).
5. Cotzias, G., Horiuchi, M., Fuenzalida, S., Mena, I.: Clearance of tissue manganese concentrations with persistence of the neurological picture. *Neurology*, 18: 376-382, 1968.
6. Newland, M., Cox, C., Hamada, R., Oberdoerster, G., Weiss R.: The clearance of manganese chloride in the primate. *Fundam. Appl. Toxicol.*, 9: 314-328, 1987.

DETECTION OF CENTRAL ACTIVATION BY MANGANESE ION CONTRASTED T₁-WEIGHTED MAGNETIC RESONANCE IMAGING IN RATS

Hironobu Morita¹, Takashi Ogino², Yoshiteru Seo³, Masataka Murakami⁴

From the ¹Department of Integrative Physiology, Gifu University School of Medicine, 40 Tsukasa-Machi, Gifu 500-8705, Japan, ²Department of Biochemistry and Cellular Biology, National Institute of Neuroscience, National Center of Neurology and Psychiatry, Kodaira, Tokyo, Japan, ³Department of Physiology, Kyoto Prefectural University of Medicine, Kyoto, Japan, and the ⁴Department of Molecular Physiology, National Institute for Physiological Sciences, Okazaki, Japan

Summary

To examine the usefulness of Mn²⁺ contrasted MRI in central imaging, images obtained using T₁-weighted MRI were compared with Fos expression, which is known to increase after activation of voltage-dependent Ca²⁺ channels. Intravenous infusion of MnCl₂ elicited a rapid increase in the T₁-weighted MRI signal intensity in the vessels and ventricles, but not in the brain parenchyma, suggesting that Mn²⁺ did not diffuse freely across the blood-brain barrier. When the blood-brain barrier was broken by right intracarotid arterial injection of 25 % D-mannitol, an increased signal intensity was seen in the right brain. Intracarotid arterial injection of hypertonic NaCl elicited rapid and striking increases in signal intensity in the paraventricular hypothalamic nucleus, supraoptic nucleus, and preoptic area, which are thought to be involved in central osmotic regulation. These observations were consistent with the Fos expression results. Using this technique, a time course of central activation induced by an intracerebroventricular injection of hypertonic NaCl solution was detected. Furthermore, a central activation induced by more physiological stimulus, i.e., an oral administration of hypertonic NaCl was also detected. These results indicate that Mn²⁺ contrasted MRI has reasonable spatial and temporal resolution and is a useful technique for investigating a functional activation of the brain.