

①

博士論文

実験水頭症における

脳ブドウ糖代謝に関する研究

東北大学脳神経外科

日下 康子

①

博士論文

実験水頭症における

脳ブドウ糖代謝に関する研究

東北大学脳神経外科

日下 康子

1. 要約

東北大学脳神経外科では、乳幼児水頭症における症状発現以前の脳循環代謝の抑制、ラット水頭症モデル急性期における局所脳血流の減少に反した局所脳ブドウ糖代謝率の亢進を報告してきた。これらの矛盾より、水頭症下での嫌気性ブドウ糖代謝の発現を推察し、新しく開発されたイメージングプレート (imaging plates[®]; IP[®])、及び画像解析機 BAS3000[®] (Fujix Bio-Imaging Analyzer BAS3000[®], Fuji Photo Film, Tokyo, Japan) を用いることで、 $[^3\text{H}]$ 、 $[6\text{-}^{14}\text{C}]$ の連続注入による二重標識オートラジオグラフィの作製・画像解析を可能とし、実験水頭症モデルにおける脳ブドウ糖嫌気性代謝の発現を画像上初めて捉えることに成功し、測定し得た。その結果、水頭症慢性期よりも急性期に強く、特に知覚運動領野、視床において顕著な、嫌気性代謝の発現が認められた。これより脳ブドウ糖代謝障害が水頭症脳の不可逆的な組織障害

に先行する可能性が示唆され、早期治療の重要性が再認識された。

2. 研究背景

水頭症においては異常な脳室拡大による頭蓋内環境の変化が症状出現の機序と考えられているが^{1, 2, 3)}、神経学的および精神心理学的異常の発現、乳児における脳の発達や局所機能に及ぼす影響についての研究報告はほとんどされていない。東北大学脳神経外科では乳児水頭症における脳循環代謝の検討をpositron emission tomography(PET)を用いてO-15gases持続吸入法により行い、発達期脳では臨床症状が発現する以前に、脳循環と酸素代謝の抑制が連合野を中心に認められることを報告してきた⁴⁾。また、ラット実験水頭症モデルによる二重標識オートラジオグラフィによる脳循環代謝の検討では、水頭症急性期に局所脳血流量(regional cerebral blood flow; rCBF)の減少を認めたが、¹⁸F-Fluoro

-deoxyglucose(FDG)法により測定した局所脳ブドウ糖代謝率(regional cerebral metabolism rate of glucose; LCMR_{glc})はむしろ亢進していた⁵⁾。グルコース同族体であるFDGは、脳内でリン酸化された後Krebs cycleに入って酸化される前段階で、代謝されずに実験時間中はFDG-6-phosphate(FDG6P)の形で蓄積するため、本法により得られた脳ブドウ糖代謝率は好気性代謝と嫌気性代謝の総和を観察したものである^{6,7)}。臨床例でのPETによる検討では酸素代謝の減少を示し、FDG法を用いた検討ではブドウ糖代謝の亢進を示す部位が認められた矛盾から、脳局所における嫌気性代謝の発現を推察した。

3. 研究目的

新しく開発されたイメージングプレート(IP[®])を用いて、作成した実験水頭症モデルにおいて[³H]2-DG、[6-¹⁴C]glucoseの連続注入による二重標識オートラジオグラフィーの作

製を試み、各標識物質の代謝過程の違いを利用して、同一個体の同一脳切片により得られた各オートラジオグラフィ画像を比較することで、脳ブドウ糖代謝を嫌気性代謝と好気性代謝の二方向から検討し、画像間の差異から嫌気性代謝を捉えることを目的とした。さらにBAS3000[®]を用いた新画像解析方法により、脳局所における嫌気性ブドウ糖代謝の測定を試み、水頭症の脳室拡大の程度、発症後の期間の脳ブドウ糖代謝障害に与える影響を解析した。

4. 研究方法

(1) 実験的水頭症の作製

実験動物は、5週齢の体重90~95gのラット(male, Wistar)を用い、山木⁸⁾らの方法に準じて作製した。臨床での乳幼児水頭症に対応するモデルとして、若年で、かつカオリン大槽内注入操作、およびオートラジオグラフィ作製中の10回の採血に十分耐えられ得る週齢

として5週齢のラットを用いた。ラットを sodium pentobarbital (Nembutal[®]) 30mg/kg body weightの腹腔内投与による全身麻酔下に、動物用定位脳手術台に腹臥位で後頭部を挙上し固定した。耳介後縁から頸部にかけて正中切開を行い、後頭骨・第一頸椎間の硬膜を露出し、手術用顕微鏡下に26Gの注射針にて、カオリン混濁液 (Al_2SiO_4 200mgを生理的食塩水1mlに溶解) 0.1mlを大槽内に注入し作製した。対照群としては同量の生理食塩水を大槽内に注入したものを用いた。その後、行動・生理学的変化および神経症状を経時的に観察した。これらのモデルを、作製後7~10日後を水頭症急性期、4~6週後を水頭症慢性期とし、対照群との三群に、 $[^3H]2-DG$ および $[6-^{14}C]glucose$ の連続投与による二重標識オートラジオグラフィーを作製した (Fig.1)。

(2) [^3H]2-DG法および [$6\text{-}^{14}\text{C}$]glucose法の実験

方法

ラットは実験開始の約12時間前から絶食させ、sodium pentobarbital(Nembutal[®]) 30mg/kg body weightの腹腔内投与による全身麻酔下に、大腿動静脈にポリエチレンカテーテル(sp28/夏目製作所、IDO40mm、ODO80mm)を挿入し、仰臥位とした。血圧、体温、血糖を測定し、生理的条件下にあることを確認後、[^3H]2-DG(specific activity: 105mCi/mmol)(Amersham, Buckinghamshire, England)100 $\mu\text{Ci}/0.2\text{ml}/100\text{g}$ body weightを大腿静脈カテーテルより20秒かけて注入した。DG静注39分後に[$6\text{-}^{14}\text{C}$]glucose(specific activity:54.2mCi/mmol)(Amersham, Buckinghamshire, England)10 $\mu\text{Ci}/0.2\text{ml}/100\text{g}$ body weightを20秒かけて静注し、その6分後に断頭した。即ち、[^3H]2-DGはSokoloffらの方法⁹⁾に準じてDG静注45分後、[$6\text{-}^{14}\text{C}$]glucoseはHawkins^{10, 11, 12)}、Lear⁶⁾らの

方法により glucose 静注 6 分後に断頭されたことになる (Fig.1)。この 45 分間、経時的に大腿動脈カテーテルより 10 回採血し、サンプルを直ちに遠心分離し、血清を採取した。Liquid scintillation counter (2050CA, Packard, Downers Grove, Illinois) を用いて血清中の [^3H]2-DG、[6- ^{14}C] glucose 各々の経時的な濃度を測定した (Fig.2)。

(3) オートラジオグラフィーの作製

断頭後、脳を直ちに取出し dry ice powder で凍結させ、厚さ 20 μm の脳連続切片をクライオスタット (Histostat, American Optical) にて作製した。カバーガラス上に脳切片を取り 60°C のホットプレート上で温熱固定乾燥後、[^3H]、[^{14}C] 感受性のイメージングプレート (TR-IP[®]) に [^3H] 濃度を検定してある 8 段階の濃度を示す Autoradiographic [^3H] micro-scales (Amersham Corp.) と共に密着させ、X 線用カセットに入れて 7 日間、次に

[^{14}C]感受性のイメージングプレート (UR-IP[®]) に Autoradiographic [^{14}C] micro-scales (Amersham Corp.) と共に X線用カセットに入れて7日間密着させた。この間、環境放射能の影響を除外するため、X線用カセットはシールドボックス内に保管した。各々のイメージングプレート上の各トレーサーの放射線濃度は、image reader, image processor (a 32-bit work-station), laser beam printer, high-quality hard-copy printer (Fuji's Pictography[®]), imaging plate eraserから成る画像解析系統 (Fujix Bio-Imaging Analyzer BAS 3000[®], Fuji Photo Film, Tokyo, Japan) を用いて、 $50\ \mu\text{m} \times 50\ \mu\text{m}$ の pixel 毎の光学的濃度 (photostimulated luminescence; PSL) に換算され、モニター上に画像化された (spatial resolution; $50\ \mu\text{m}$)。各々の画像において、各 pixel の光学的濃度、即ち、単位面積 (A) あたりの PSL 値から background (B) の PSL 値を差し引いた値 $(\text{PSL} - \text{BG})/A$ は、同じイメージング

プレート (IP[®]) 上の micro scales の PSL 値から作製された各々の IP[®] 上での放射活性の検量線から、各々のトレーサー濃度に換算され、トレーサー濃度の画像へと変換された。

[6-¹⁴C]glucose の静注濃度 (10 μ Ci/0.2ml/100g body weight) は [³H]2-DG 静注濃度 (100 μ Ci/0.2ml/100g body weight) の 10 分の 1 (100 μ Ci/0.2ml/100g body weight) とすることで、モニター上の TR-IP[®] から得られた画像上で [6-¹⁴C] が [³H] の PSL 値に与える影響は小脳比にして 0.01% 以下であり¹⁴⁾、TR-IP[®] から得られた画像を [³H]2-DG の画像とみなし、検討した。この画像上に関心領域 (regions of interest; ROI) を設定し、光学的濃度 (PSL-BG)/A から [³H]2-DG の濃度を求めた^{13,14)}。TR-IP[®] 上の一つの ROI に対し、同一脳切片による UR-IP[®] から得られた [6-¹⁴C]glucose の画像上に同面積の ROI を同一部位におき、 [³H]2-DG と同様に [6-¹⁴C]glucose の濃度を求め、同一 ROI での [³H]2-DG、[6-¹⁴C]glucose 各々の濃度を求めた。

これらの値から Richards¹⁵⁾らの方法に準じて、各 ROI ごとの各トレーサー濃度の小脳比を算出して脳局所摂取率とし、その差 (tracer uptake difference; TUD) を求めることにより、半定量的に脳局所における嫌気性代謝を測定した。

$$\text{TUD} = \frac{[\text{ROI}[^3\text{H}]2\text{-DG}]}{[\text{cerebellar}[^3\text{H}]2\text{-DG}]} (\%) - \frac{[\text{ROI}[6\text{-}^{14}\text{C}]\text{glucose}]}{[\text{cerebellar}[6\text{-}^{14}\text{C}]\text{glucose}]} (\%)$$

実験終了後、脳を取り出し、実際に水頭症を呈していた水頭症急性期群 8 匹、慢性期群 8 匹について脳ブドウ糖代謝の検討を行ない、生理食塩水を大槽内に注入した 5 匹を対照群として用いた。11ヶ所の解剖学的構造部位を定位脳図譜¹⁶⁾を参照して関心領域 (ROI) とし、³H]DG、⁶⁻¹⁴C]glucose 各々の画像上の同じ部位に設定した同一面積の ROI 内のトレーサー濃度を小脳のトレーサー濃度比に換算した (Fig.3)。脳局所における各トレーサー濃度の

小脳比の平均値を対照群の同部位での平均値に対する変化率(%)で表わし、トレーサー別に水頭症急性期と慢性期とで比較検討した(Fig.4)。また、各トレーサーの脳局所摂取率の差(TUD)を算出し、対照群との差をFig.5に示した。脳局所におけるトレーサー間の有意差の検定にはunpaired t-testを用い、 $P < 0.05$ で有意差ありと判定した。また、各領域での水頭症急性期による脳局所摂取率の差(TUD)の変化度についても同様に検定した。

水頭症病期による水頭症の程度は、前交連を通る前額断面で両側側脳室最大幅(V)と脳の横幅(C)との比(V/C -index)²⁾を計測し、急性期群と慢性期群とで、unpaired t-testにより有意差を検討した。

5. 研究結果

カオリン注入群の水頭症の程度の体外計測は困難であり、実験動物は無作為に抽出してオートラジオグラフィーの作製を行った。カオリン注入群は麻酔覚醒後より体動・摂食ともに乏しく、体重増加は認められず、体重増加を示す対照群に対して差を示した。オートラジオグラフィー作製中に血圧低下、呼吸状態の悪化により死亡したモデル(n=5)は、解剖してみるといずれも著明な水頭症を呈していた。形成された水頭症の程度に関しては、 $V/C\text{-index}^{2)}$ を計測した結果、水頭症急性期群と慢性期群とのあいだに有意差($p < 0.05$)は認められず、水頭症群の実験中の生理的状态は安定していた(Table 1)。

脳ブドウ糖代謝率の検討では、Fig.3に示すごとく、急性期群、慢性期群とも対照群と比較して、大脳全般にわたって $[^3\text{H}]\text{DG}$ 、 $[6\text{-}^{14}\text{C}]\text{glucose}$ 各々の摂取率の低下が認められた(Fig.3)。各トレーサーの脳内摂取率を対照群

での脳内摂取率からの変化率で検討すると、各領域における脳内摂取率の低下が示された。また、両時期において白質では明らかな摂取率の低下は認められなかった。水頭症の病期による比較では、慢性期において、聴覚領野、視床で40%と顕著な低下を示し、急性期に比べて、摂取率低下の進行が認められたが、他の領域では逆に、急性期の方が摂取率低下が強い傾向にあり、脳局所により代謝障害の進行に違いが認められた(Fig.4)。各領域でのTUD(tracer uptake difference)の測定では、急性期群では知覚領野、運動領野、視床、視床下部、海馬で、慢性期群では知覚領野、運動領野で対照群と比べて有意に高値を示した($p < 0.05$)。なかでも知覚運動領野、視床は両時期を通じてTUDは10%以上と他の領域よりも高く、水頭症急性期に約15%と最も大きかった。運動領野、聴覚領野では病期の進行に伴うTUDの増加傾向が示されたが、視床下部、脳梁では急性期に比べて有意に($p < 0.05$)減少

し、能ブドウ糖代謝同様、TUDにおいても、
脳局所、水頭症病期によるばらつきが認めら
れた (Fig.5)。

Fig.6、7、8に水頭症急性期群、慢性期群、
対照群のそれぞれのオートラジオグラフィ
の画像の代表例を示した。画像は放射活性
強度による光学的濃度 $[(PSL-BG)/A]$ イメ
ージから、トレーサー濃度イメージに変換さ
れた画像である。

6. 考察

実験水頭症の脳循環代謝に関しては、これまでに脳血流の低下に反した局所脳ブドウ糖代謝率の増加、lactateの蓄積にともなうエネルギー貯蔵量低下、脳内電解質などの環境変化にともなう電子伝達系のエネルギー代謝障害、cytochrome oxidase活性の低下などが報告され、嫌気性代謝の存在が示唆されている^{1, 2, 5, 17, 18, 20}。しかし実際に嫌気性ブドウ糖代謝の測定を試みた報告はない。本研究は実験水頭症モデルにおける嫌気性代謝の発現を画像上描出し、測定し得た初めての報告である。水頭症におけるこれまでの局所脳ブドウ糖代謝率の報告では、測定法としてSokoloffらが発表したグルコース同族体であるDG法^{9, 21}、またはFDG法^{22, 23, 24, 25, 26, 27}を用いたオートラジオグラフィーが用いられている。理想的には、酸素消費量の測定がエネルギー代謝を直接測定することになるのだが、連続脳切片によりくまなく局所脳ブドウ糖代謝率の相対関

係を画像化でき、局所脳組織でトレーサー濃度を測定できるという利点を持つオートラジオグラフィ法を用いる場合、使用核種として O_2 radioactive isotopeは半減期が短く使用困難である。また、グルコースは脳内で glucose-6-Pにリン酸化されたあと、速やかに Krebs cycleに入って CO_2 へと数分で代謝されて脳から失われるため、オートラジオグラフィによる評価は困難だった。そのためグルコースと同じ輸送担体により blood brain barrier(BBB)を通過するグルコース同族体である DG、FDGが用いられてきた。しかし DG(FDG)は脳内に入りリン酸化され DG-6-phosphate(P) (FDG6P)となった後、実験時間中は代謝されずに脳内に蓄積するため、DG(FDG)法では Krebs cycle内で受ける好気性代謝のみでなく、その前段階である解糖系との総和が示されていることになる²⁸⁾。即ち、

$$GMg = [LCMRglc(DG) - LCMRglc(GLC)] / (1 - Fr1)$$

$$GMo = LCMRglc(DG) - GMg$$

GMg: glycolytic glucose metabolism

GMo: oxidative glucose metabolism

Frl: fraction of radiolabeled lactate produced
by glycolysis during the study that remains
in the brain at the end of the study

であるという。この場合、病的状態下で発現する嫌気性代謝を好気性代謝と区別し評価することはできないという欠点を持つことになる。片岡らはラット局所脳虚血モデルの虚血部周囲ではエネルギー貯蔵量が比較的保たれていながら、lactateが蓄積しDGの取り込みが高値となるのは嫌気性代謝によりグルコースの取り込みが高くなっているためと推察している^{29,30,31)}。Van deBergら³³⁾がラット痙攣誘発モデルにおいて、グルコースの取り込みの増加に反してKrebs cycle内のグルコース由来の炭素原子は増加しないことを示し、Bomontら³⁴⁾はhypoxia下におかれたラットで酵素法により測定した脳内lactateの増加から、DG法により測定されたLCMRglcの増加が嫌気性代謝

を反映していることを示唆しており、水頭症という病的状態下におけるrCBFの減少に反したDG法でのLCMRglcの増加が嫌気性代謝を示している可能性は十分に考えられる。Lear⁶⁾らが静注後6分以内であれば6-labeled glucoseが最もlabel lossが少なく、正常ラットにおいてほとんどの脳の領域でFDG法と相関したLCMRglc値となることを示し^{11,12)}、脳内でlactateが産生された場合は6分よりもさらに急速に脳内から血流により流出されることから³²⁾、Ackermann⁷⁾はラット痙攣誘発モデルにおける嫌気性代謝の発現をFDGと[6-¹⁴C]glucoseを用いた二重標識オートラジオグラフィによって描出しえた。しかしFDGは半減期が110分と短く、サイクロトロンセクターで合成する必要があるため、動物実験においても験者の被曝は避けられない。その点[³H]は商品化されているため、入手は容易で、β線源であることから験者の被曝については回避できるという利点がある。しかし、その一

方で、従来のフィルム法によるオートラジオグラフィー作製には、 β 線のエネルギーが弱いために、フィルムへの露光に約一ヶ月を要するうえに、画像自体の鮮明さに欠けるといふ欠点があった。IP[®]は従来のフィルム法に比べて数千倍の感受性、安定した定性性を持ち、密着後約7日間で鮮明な画像を得ることが可能であり^{3,5)}、今回の実験は、TR-IP[®]と UR-IP[®]を使い分けることで $[^3\text{H}]\text{DG}$ と $[6\text{-}^{14}\text{C}]\text{glucose}$ の連続注入による二重標識オートラジオグラフィーの作製を可能とし、さらに各トレーサーの代謝過程の違いを利用して実験水頭症モデルにおける嫌気性代謝の発現を画像上捉えることを試みた新しい手法である (Fig.9)。さらに、IP[®]を用いることにより、長半減期核種である $[^3\text{H}]$ 、 $[6\text{-}^{14}\text{C}]$ の組み合わせによる二重標識法が可能となったことで、短半減期核種であるFDGと $[^{14}\text{C}]$ との組み合わせによる二重標識法に比べて実験時間に余裕ができ、オートラジオグラフィー作製時の放射

活性の損失による誤差を少なくできる利点が上げられる。水頭症モデルにおける嫌気性代謝の発現には部位差があり、その割合が数%から約20~30%と予想される⁸⁾こと、水頭症脳では拡大した脳室の圧排により脳局所で体積差が生じることから、生検法よりも優れた解像度を持つBAS3000[®]を用いた画像解析によりTUD測定時の誤差を小さくでき、数%から約20~30%と予想されるTUDの測定に有利と考えられた。実験水頭症のモデルには形成される水頭症の程度、脳実質の細胞密度に固体差が生じ、また、同一モデル内で解剖学的に同一領域であっても、拡大した脳室による圧迫の程度により差が生じることになる。今回用いた二重標識オートラジオグラフィ法では、個体、脳切片、ROIの設定部位・面積が同一となり、50 μ mの高解像度を有することから、それらの問題は解決されることが考えられる。従って、従来のDG法により得られたブドウ糖代謝の好気性代謝と嫌気性代謝の総和を

示す $[^3\text{H}]\text{DG}$ によるオートラジオグラフィーと、好気性代謝のみを表わす $[6\text{-}^{14}\text{C}]\text{glucose}$ によるオートラジオグラフィーとで、脳局所において認められた画像上の差は(Fig.6,7,8)、嫌気性代謝の存在を示していると考えられる。興味深いことに、小脳比による脳局所の検討では、rCBFの減少がより強いと報告されている水頭症慢性期よりも、水頭症急性期の方が嫌気性代謝がより強く脳全般にわたって認められた(Fig.4)。これは対照群との比較で有意に嫌気性代謝の発現を示した解剖学的部位が急性期の方に多いことでも示され(Fig.5)、急性期にすでに脳ブドウ糖代謝が障害されていることを示していると考えられる。嫌気性代謝を示す $[\text{LCMRglc}(\text{DG}) - \text{LCMRglc}(\text{GLC})]$ の値については、グルコースの6位のC原子が6分以内であればグルコース代謝経路中のアミノ酸プールに捕えられ留まっているというもの、高代謝部位では CO_2 としての脳内からの損失は様々で、最高で10%の損失を示す領

域が認められることから⁶⁾、正常値として絶対値を示すには無理があると考えられる。そこで、単一標識法よりも小さな差の検出に優れている二重標識オートラジオグラフィーを用い、さらに従来のフィルム法よりも放射性物質への感受性、画像解像度の高いIP[®]、BAS3000[®]を用いることにより、小脳比により相対的に求めた対照群でのTUDを基準とし、実験水頭症モデルにおけるTUDを求め比較した。水頭症群各期においてTUDが有意差をもって増加したことは、脳ブドウ糖代謝障害にともない嫌気性代謝が発現したと考えられる。小林ら²⁾による細胞内代謝の低下を示すcAMP濃度の減少がカオリン注入後1週目より脳の全部位に認められ、大脳皮質、白質以外では、いったん回復傾向を示し、6~8週後に再び全部位で低下するとの報告や、我々の乳幼児水頭症例でのPET O-15 gas持続吸入法での検討により、脳酸素代謝障害が大脳皮質にまで広く及んでいることが明らかとなったこと³⁶⁾

と、今回の検討で嫌気性代謝の発現が水頭症作成1~2週後の急性期から脳全般にわたって認められたことは一致する。脳局所で嫌気性代謝が発現する領域は急性期、慢性期を通じてほぼ全域に認められたが、慢性期になって対照群との間に有意差を示す領域が減少したのは(Fig.5)、我々の対象とした水頭症慢性期(カオリン注入後4~6週)が、cAMP濃度の回復・再度減少の時期²⁾と重複していたためとも考えられる。カオリン実験水頭症では、脳室は1~2週まで急速に拡大し、その後は拡大の程度が減じ、4~6週で最大となり、以降横這い状態となるのが一般的経過と考えられている^{2,37,38)}。すなわち、大槽内カオリン注入1~2週後の今回急性期とした時期は急速な脳室拡大と急性頭蓋内圧亢進の時期であり、4~6週後の今回の慢性期とした時期は正常或いは、正常以下の頭蓋内圧で脳室拡大を認める時期と推測されている^{2,36,37)}。今回検討した実験水頭症の脳室拡大の程度(V/C index)に急

性期と慢性期とで有意差は認められなかったことから、カオリン注入後1~2週にはすでに脳室拡大が形成されており、カオリン注入の影響と脳室拡大による急激な頭蓋内圧亢進、脳組織の圧迫、さらに軽度ながらも脳血流の低下も加わり、脳細胞内に環境変化が生じ、それらが誘因となって、脳グルコース代謝経路の一部が嫌気性代謝へ移行すると推測される。カオリン水頭症モデルは先天性水頭症モデルに比べて水頭症の程度が軽く^{1,38)}、また今回の実験でも急性期と慢性期の間に脳室拡大の程度に差が認められなかったことより、脳ブドウ糖代謝における酸化的リン酸化の障害が脳室拡大による組織障害に先行する可能性が示唆された。脳局所における嫌気性代謝のLCMRglcに対する比率はこれまでの実験水頭症におけるDG(FDG)法によるLCMRglcの報告や^{6,16,24,39,40)}、今回対照群との比較により示された如く約15%であったが、嫌気性代謝ではATP産生率が低く、その持続によりエネ

ルギ一貯蔵量が低下し、さらに、脳室拡大の持続、脳血流量低下の進行が加わり、水頭症の進行にともなう脳細胞環境の増悪、脳ブドウ糖代謝の低下、組織障害の進行も加わり、局所脳ブドウ糖要求量は減少し、嫌気性代謝の比率も減少してしまふと考えられる。また、運動領野、聴覚領野では他の領域とは逆に、慢性期に嫌気性代謝は増加傾向を示したが、カオリン水頭症では前角の拡大が強く²⁵⁾、この脳室拡大の部位差が嫌気性代謝発現・減少時期のずれに影響を与えているとも考えられる。一方、脳血流障害によるLCMRglcの低下は K_1 (血清一組織間の担体輸送係数)、 K_2 (組織一血清間の逆担体輸送係数)の変化により生じるが^{29,41)}、 K_1 、 K_2 の変化の度合いがトレーサー間で大きく違わないかぎり、グルコースとDGは同じ担体で輸送されることから、LCMRglcの差の原因を脳血流障害だけに求めることは困難である。西本らはカオリン水頭症において大脳皮質 cytochrome oxidase 活性

の低下を示し、慢性期の間質性浮腫による細胞間隙増大により relative hypoxia 同様の病態がおこり嫌気性代謝が出現していると考察している^{18,42,43})。我々の検討では間質性浮腫出現以前の水頭症急性期に嫌気性代謝がすでに出現していると示唆されたことから、血流障害が軽度で、脳組織に対するブドウ糖・酸素供給が保たれていても、脳実質体積、頭蓋内圧などの脳細胞環境の急激な変化により脳内 ATP の産生消費バランスがくずれ、脳内エネルギー貯蔵量が次第に低下し、水頭症の進行とあいまってさらに脳循環代謝障害が進行していくと考えられた。不均一な脳細胞環境下では障害の発現時期・程度に部位差があり、これは水頭症のさまざまな症状発現に深く関わっていると考えられた。

7. 結論

本研究では、新しいオートラジオグラフィ法、画像解析法であるIP[®]、BAS3000[®]を用いることにより、[³H]DG、[6-¹⁴C]glucoseの連続注入による二重標識オートラジオグラフィの作製、脳代謝測定を可能とし、実験水頭症における脳ブドウ糖代謝障害、嫌気性代謝の発現を初めて捉えることに成功した。

測定結果より、水頭症急性期において、脳細胞内でのグルコースの酸化的リン酸化の障害はすでに始まっており、好気性代謝障害、嫌気性代謝の出現によるエネルギー貯蔵量の低下が早期からの組織障害に深くかかわっている可能性が示唆された。

水頭症に対する早期治療の重要性が再認識されるとともに、水頭症下での組織障害の指標として、脳酸素消費率の検討の重要性が、特に症状発現の捕えにくい乳幼児では意義深いと考えられた。

8. 文献

- 1) 東健一郎、朝久 浩、相本秀臣 ほか
(1989) 先天性および後天性水頭症における脳の水分、電解質ならびにエネルギー代謝の比較検討. 小児の脳神経 13(1), 15-24.
- 2) 小林清吉 (1989) ラット実験水頭症における脳代謝について — 脳組織のATPおよびCyclic Nucleotideの変動. 久留米医誌, 48, 256-267.
- 3) 片岡喜由、柳瀬尚人、三谷 章 ほか
(1995) 先天性水頭症ラット海馬ニューロンにおける虚血誘発性カルシウム動員の分析. 厚生省特定疾患「難治性水頭症」調査研究班平成6年度研究報告書, 124-127.
- 4) Shirane R., Sato S., Sato K. et al. (1992) Cerebral blood flow and oxygen metabolism in infants with hydrocephalus. Child's Nerv Syst, 8, 118-123.

- 5) Sato S., Shirane R. and Yoshimoto T.
(1992) Regional cerebral blood flow and regional cerebral metabolic rate of glucose in experimental hydrocephalus measured by double tracer methods of autoradiography. Current Tr Hyd (Tokyo), 2, 1-4.
- 6) Lear J. and Ackermann R. (1988) Comparison of cerebral glucose metabolic rates measured with fluorodeoxyglucose and glucose labeled in the 1, 2, 3-4, and 6 positions using double label quantitative digital autoradiography. J Cereb Blood Flow Metab, 8, 575-585.
- 7) Ackermann R. and Lear J. (1989) Simultaneous measurement of cerebral anaerobic and aerobic metabolism. J Cereb Blood Flow Metab 9, Suppl. 1, 238.
- 8) 山木垂水、小竹源也、成瀬昭二 ほか
(1977) ラット実験的脳水腫作成法.

腦外, 5, 537-540.

- 9) Sokoloff L, Reivich M., Kennedy C. et al.
(1977) The [^{14}C]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.
- 10) Lu D.M., Davis D.W. and Hawkins R.A.
(1983) Regional cerebral glucose utilization measured with [^{14}C]glucose in brief experiments. Am. J. Physiol 245 (Cell Physiol. 14), 428-438.
- 11) Hawkins R., Mans A., Davis D. et al.
(1985) Cerebral glucose use measured with [^{14}C]glucose labeled in the 1, 2, or 6 position. Am J Physiol, 248, 170-176.
- 12) Hawkins R., Mans A., Davis D. et al.
(1985) Comparison of [^{14}C]glucose and [^{14}C]deoxyglucose as tracers of brain

- glucose use. Am J Physiol, 254, 310-317.
- 13) Ryu J.H., Yanai K. and Watanabe T.
(1994) Marked increase histamine H₃ receptors in the striatum and substantia nigra after 6-hydroxydopamine-induced denervation of dopaminergic neurons: an autoradiographic study. Neurosci Letters, 178(1), 19-22.
- 14) Yamane Y., Ishide N., Kagaya Y. et al.
(1995) Quantitative double-tracer autoradiography with tritium and carbon-14 using imaging plates: Application to myocardial metabolic studies in rats. J Nucl Med, 36, 518-524.
- 15) Richards H., Bucknall R., Jones H. et al.
(1989) The uptake of [¹⁴C]deoxyglucose into brain of young rats with inherited hydrocephalus. Exp Neurol, 103, 194-198.

- 16) Palkovits M. and Brownstein M.J. (1988):
Maps and guide to microdissection of the
rat brain. Elsevier Science Publishing Co.,
Inc., New York
- 17) 若生直秀 (1985) 実験的水頭症ラット
における [^{14}C]デオキシグルコース法を用
いた局所脳グルコース代謝に関する研究.
脳神経, 35(7), 693-701.
- 18) 西本 博, 片山 容一, 辻 典明 (1995)
水頭症の大脳皮質 cytochrome oxidase
activity に及ぼす影響 - カオリン水頭症
model における検討 -. 厚生省特定疾
患「難治性水頭症」調査研究班平成6年
度研究報告書, 154-157.
- 19) 林 成之、坪川孝志、牧山康秀 (1987)
水頭症における routed CSF migration と
脳内エネルギー代謝と細胞骨格タンパク
の障害. 小児の脳神経, 12(1), 11-17.

- 20) Chumas P.D., Drake J.M., Del Bizio M.R. et al. (1994) Anaerobic glycolysis preceding white-matter destruction in experimental neonatal hydrocephalus. J Neurosurg, 80, 491-50.
- 21) 宮岡 誠, 伊藤昌徳、和田美弦 ほか (1985) 先天性水頭症ラットに対する V-P シャント 前後における脳局所グルコース代謝の変化. 小児脳神, 13, 389-393.
- 22) Lear J., Ackermann R., Kameyama M. et al. (1984) Multiple radionuclide autoradiography in evaluation of cerebral function. J Cereb Blood Flow Metab, 4, 264-269.
- 23) Miller A. and Kiney C. (1981) Metabolism of [^{14}C]glucose in brief experiments. Am J Physiol, 245, 428-438.

- 24) Olds J., Frey K., Ehrenkaufner R. et al.
(1985) A sequential double-label autoradiographic method that quantifies altered rates of regional glucose metabolism. *Brain Res*, 361, 217-224.
- 25) Phelps M., Huang S.C., Hoffman E. et al.
(1979) Tomographic measurement of local cerebral glucose metabolic rate in humans with (F-18)2-Fluoro-2-deoxy-D -glucose: Valication of method. *Ann Neurol*, 6, 371-388.
- 26) Reivich M., Kuhl D., Wolf A. et al. (1979)
The [^{18}F]fluorodeoxyglucose method for the measurement of local cerebral glucose utilization in man. *Circ Res*, 44, 127 -137.
- 27) Sako K., Kato A., Diksic M. et al. (1985)
Use of short-lived ^{18}F and long-lived ^{14}C in double tracer autoradiography for simultaneous measurement of LCBF and LCGU. *Stroke*, 15, 896-900.

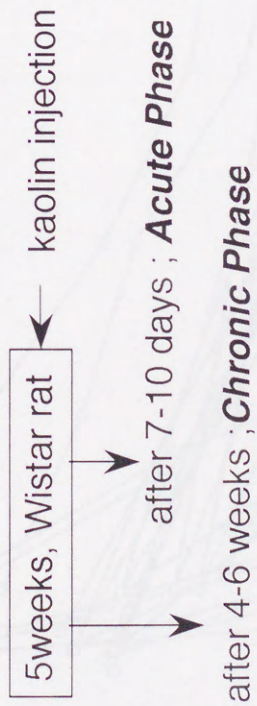
- 28) Ackermann R.F. and Lear J.L. (1989)
Glycolysis-induced discordance between
cerebral glucose metabolic rates measured
with fluorodeoxyglucose and glucose. J
Cereb Blood Flow Metab, 9, 774-785.
- 29) 片岡和夫、山田和雄、早川徹ほか
(1983) 局所脳虚血におけるグルコース
利用率の可逆性. 脳神経, 35(8), 765-770.
- 30) Pulsinelli W.A., Levy D.E. and Duffy T.E.
(1982) Regional cerebral blood flow and
glucose metabolism following forebrain
ischemia. Ann Neurol, 11, 491-501.
- 31) Salford L.G., Plum F. and Siesjo B.K.
(1973) Graded hypoxia-oligemia in rat
brain.1. Biochemical alternations and
their implications. Arch Neurol, 29,
227-233.

- 32) Lear J.L. and Kasliwal R. (1991) Autoradiographic measurement of cerebral lactate transport rate constants in normal and activated conditions. J Cereb Blood Flow Metab, 11, 576- 580.
- 33) Van deBerg C.J. and Bruntink R. (1985) Glucose oxidation in the brain during seizures: experiments with labeled glucose and deoxyglucose. In Hertz L(ed), Glutamine, Glutamate, and GABA, Alan R. Liss, Inc., New York, 1983, pp619-624
- 34) Bomont L., Bilger A., Boyet S. et al. (1992) Acute hypoxia induces specific changes in local cerebral glucose utilization at different postnatal ages in the rat. Dev. Brain Res, 66, 33-45.
- 35) Hamaoka T. (1990) Autoradiography of new era replacing traditional x-ray film: bio-imaging analyzer BAS2000. Cell Technology, 9, 456-462.

- 36) 白根礼造、高橋俊栄、原 康子 ほか
(1995) 乳児水頭症における脳酸素代謝障害 - PET O-15 gas 持続吸入法による検討 - . 厚生省特定疾患「難治性水頭症」調査研究班平成6年度研究報告書, 205-209.
- 37) 村田高穂、森 惟明、半田 肇 ほか
(1979) 実験水頭犬におけるCT. 第2報: 脳室拡大およびperiventricular lucencyと頭蓋内圧との関係. 脳神経, 31, 313-321.
- 38) 中村三郎、森安信雄 (1977) 水頭症における脳室壁および脈絡叢の微細形態学的変化. 文部省科学研究班. 水頭症の病態研究発表講演集, 33-40.
- 39) Richards H.K., Pickard J.D. and Punt J.
(1985) Local cerebral glucose utilization in experimental chronic hydrocephalus in the rat. *Z Kinderchir*, 40(Suppl)1, 9.
- 40) 平山昭彦、松本 悟 (1976) 実験的水頭症. 小児脳神経, 1, 17-27.

- 41) 西本 博、片山容一、木下浩作 ほか
(1993) 間質性浮腫の大腦皮質 cytochrome oxidase activity に及ぼす影響 - infusion edema model における検討 - . 厚生省特定疾患「難治性水頭症」調査研究班平成4年度研究報告書, 111-115.
- 42) Sutton L., Greenberg J. and Welsh F.
(1990) Blood flow and metabolism in vasogenic oedema. Acta Neurochir, suppl.51, 397-400.
- 43) 西本 博、片山容一、木下浩作 ほか
(1994) 間質性浮腫の大腦皮質 cytochrome oxidase activity に及ぼす影響 - infusion edema model における脳血流、ブドウ糖代謝との比較検討 - . 厚生省特定疾患「難治性水頭症」調査研究班平成5年度研究報告書, 66-70.

1) Experimental Hydrocephalus Model



2) RI Injection Time Course

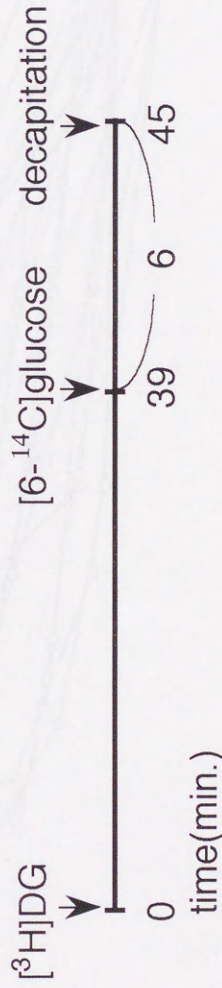


Fig. 1

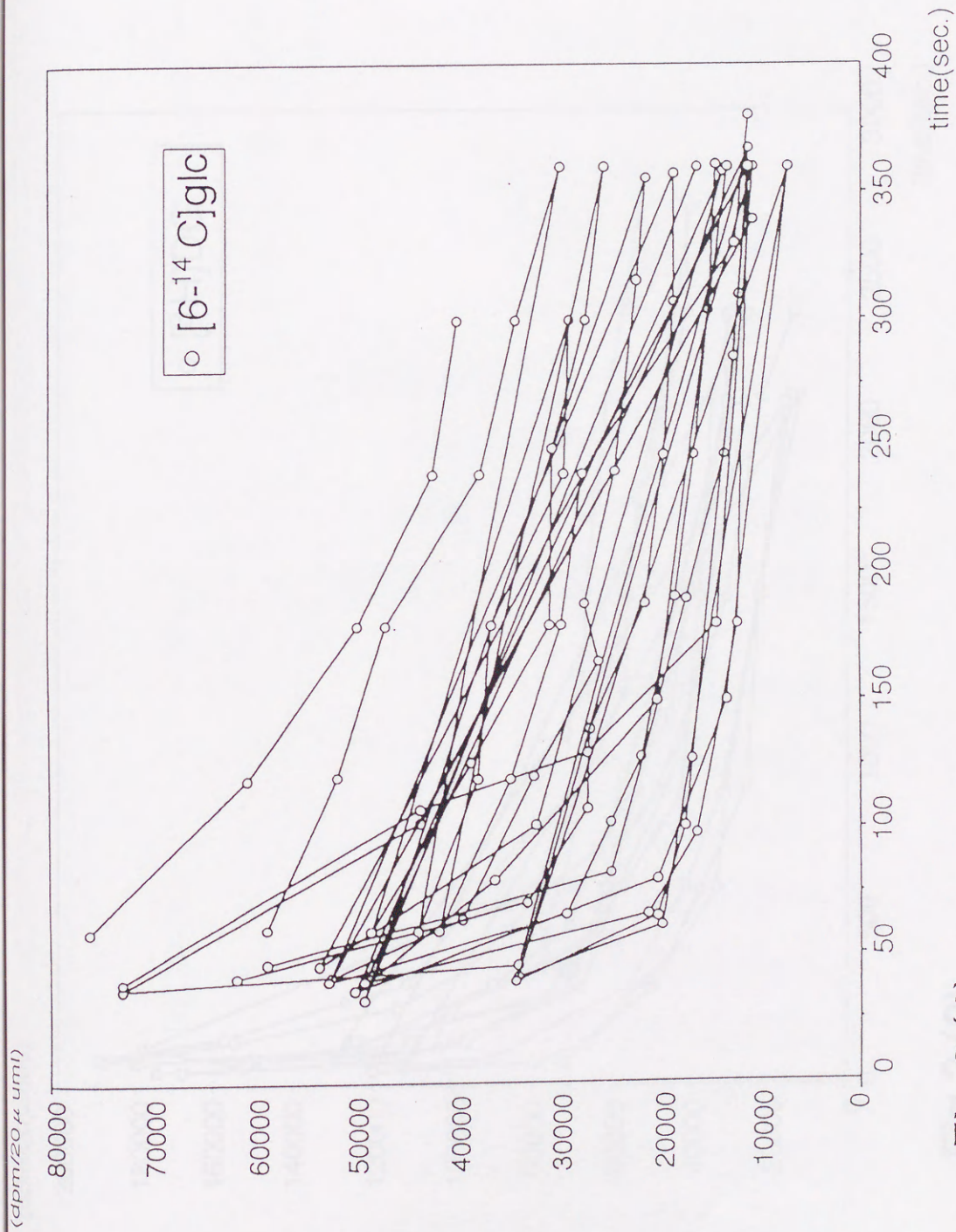


Fig.2 (1)

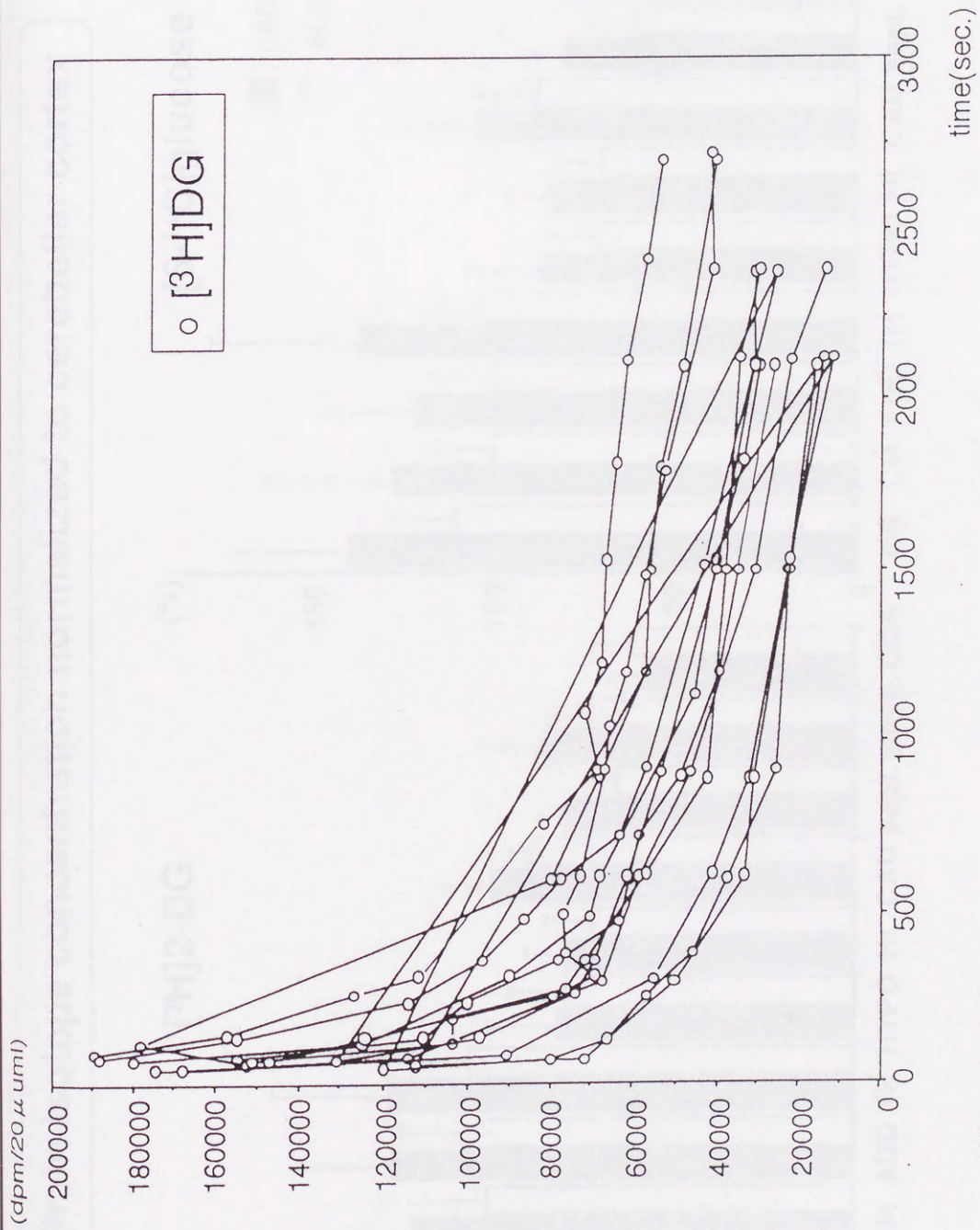


Fig.2 (2)

Brain isotope concentration normalized to cerebellar cortex

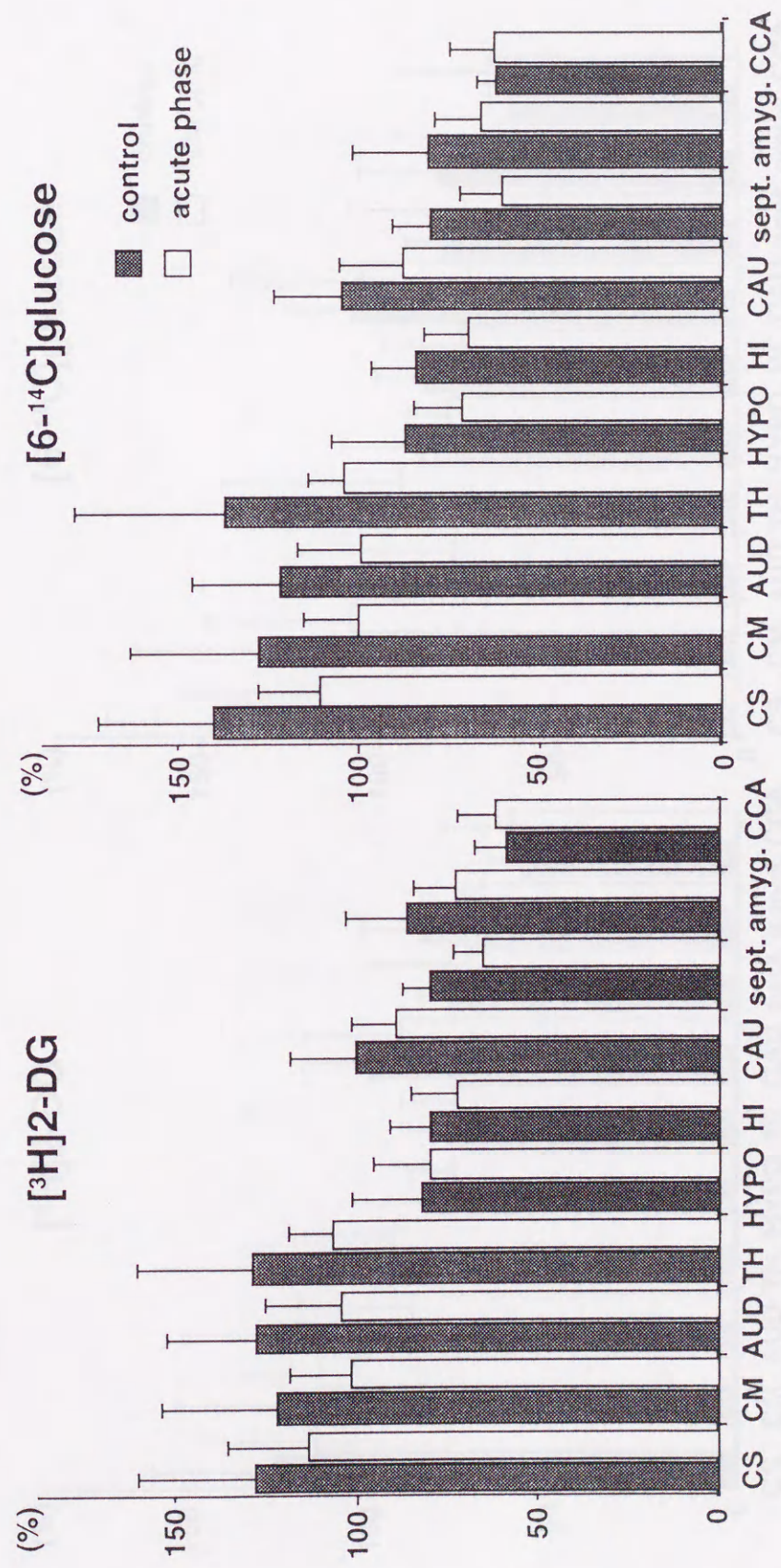


Fig. 3(1)

Brain isotope concentration normalized to cerebellar cortex

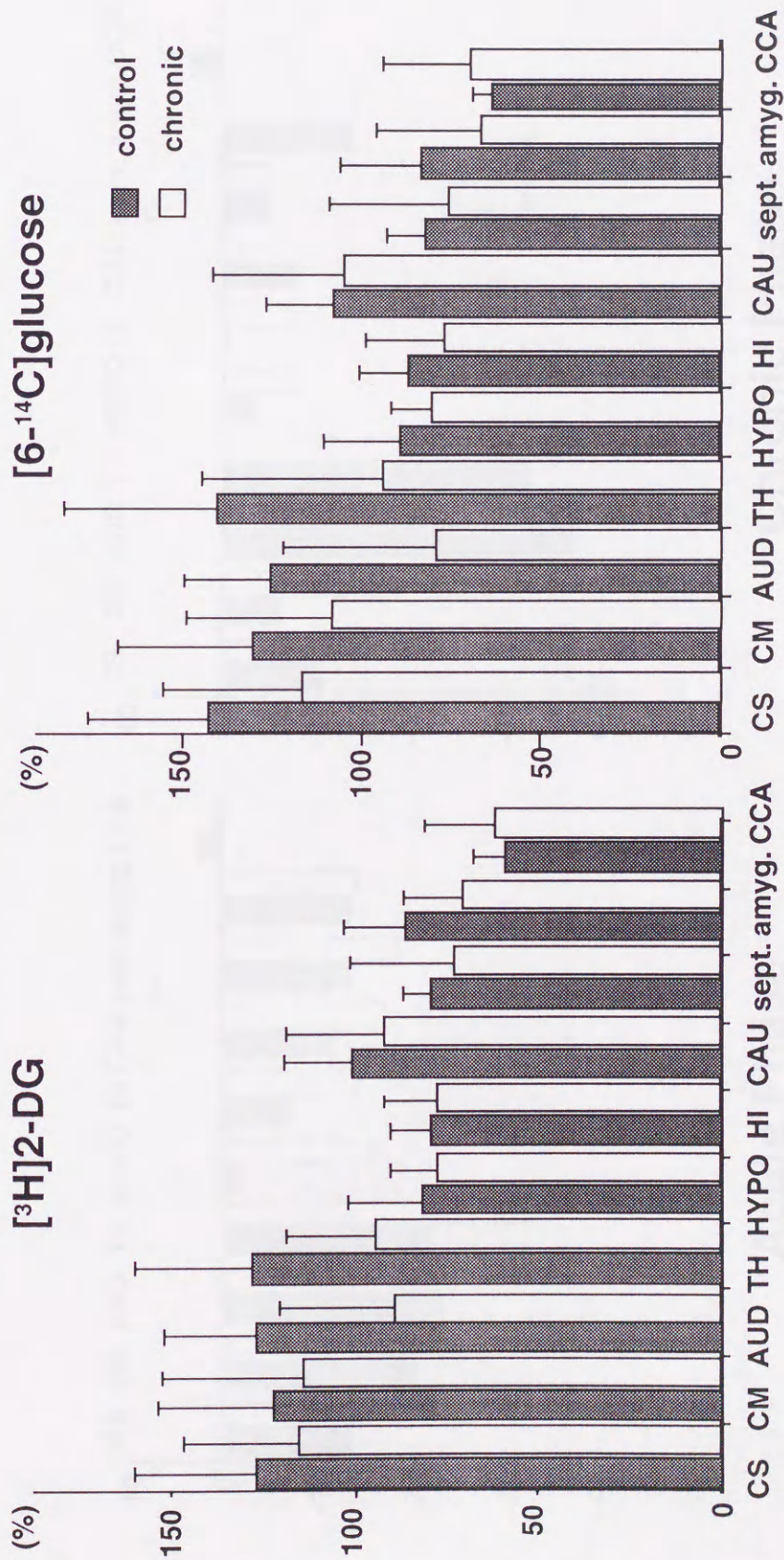
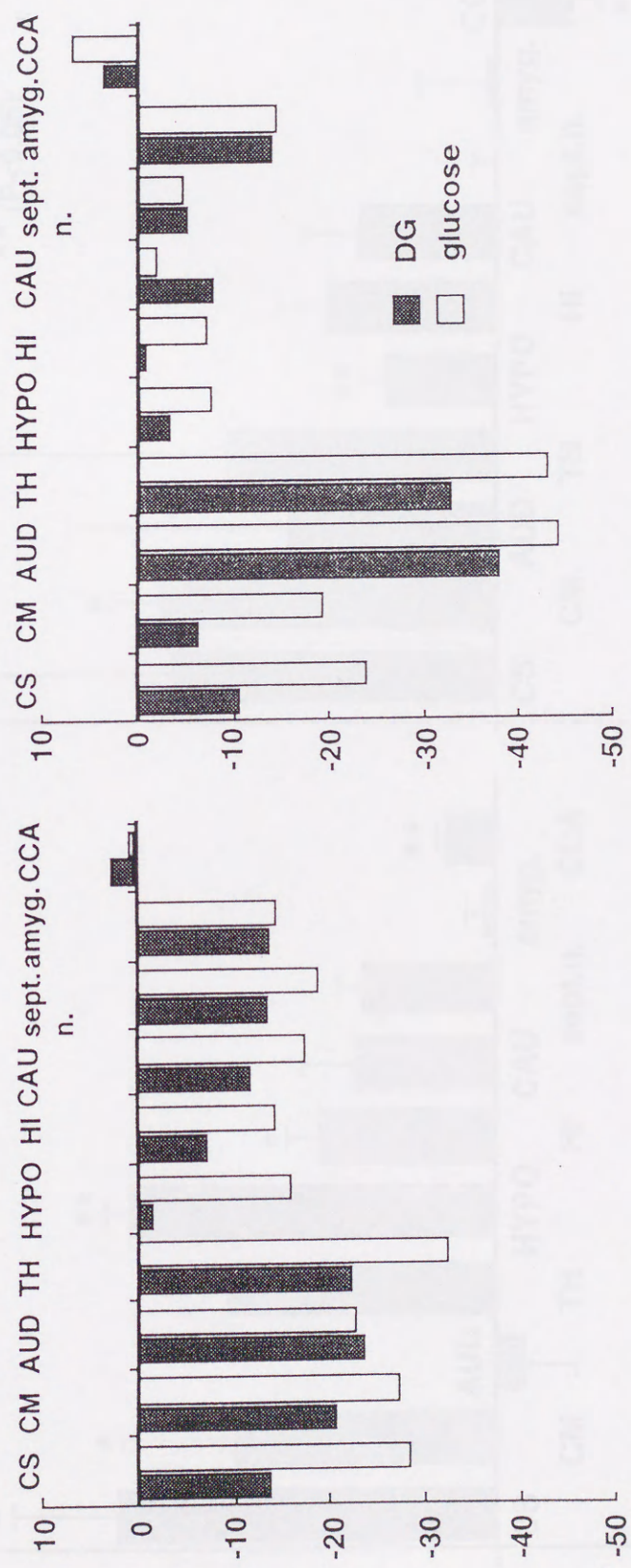


Fig. 3(2)

(%) Changes from Control



Chronic Phase

Acute Phase

Fig. 4

% change of tracer uptake difference from control

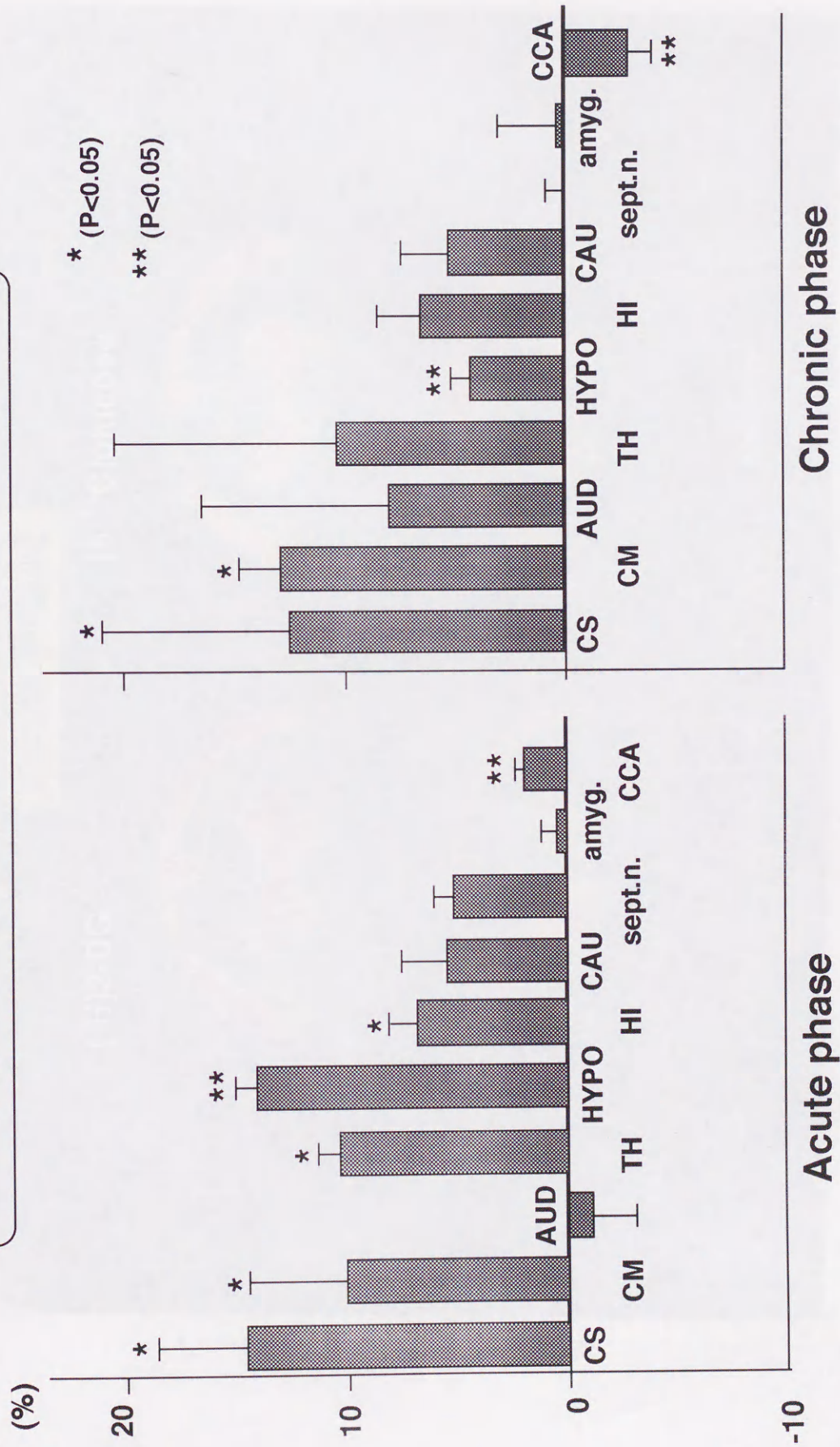
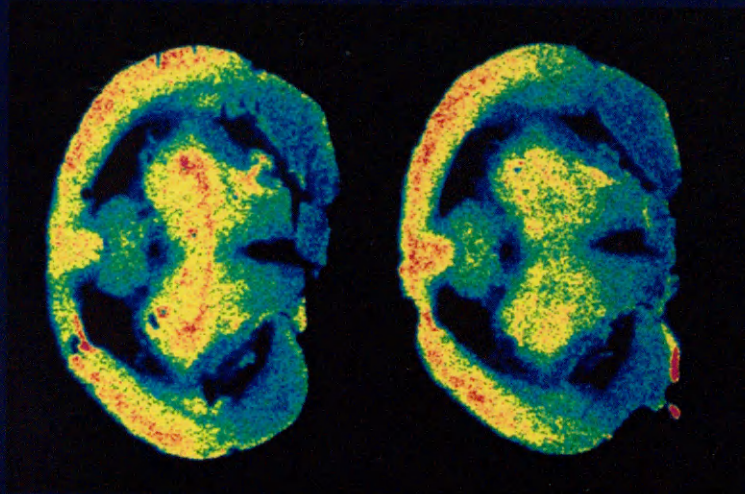
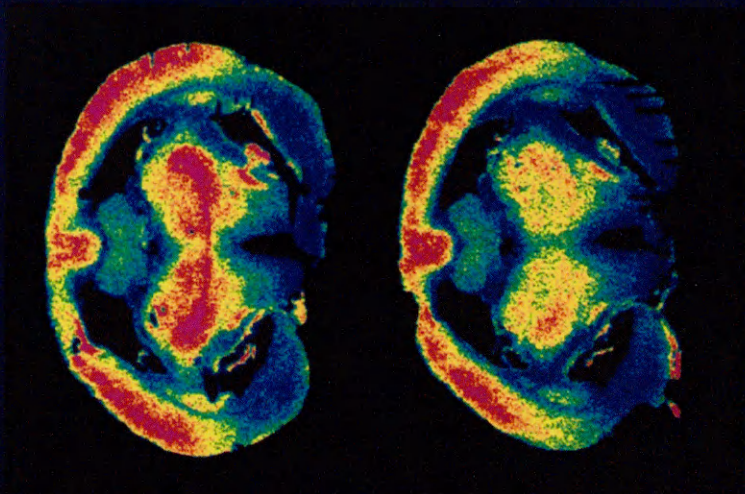


Fig. 5

Acute Phase

[³H]2-DG

[6-¹⁴C]glucose



Aerobic + Anaerobic

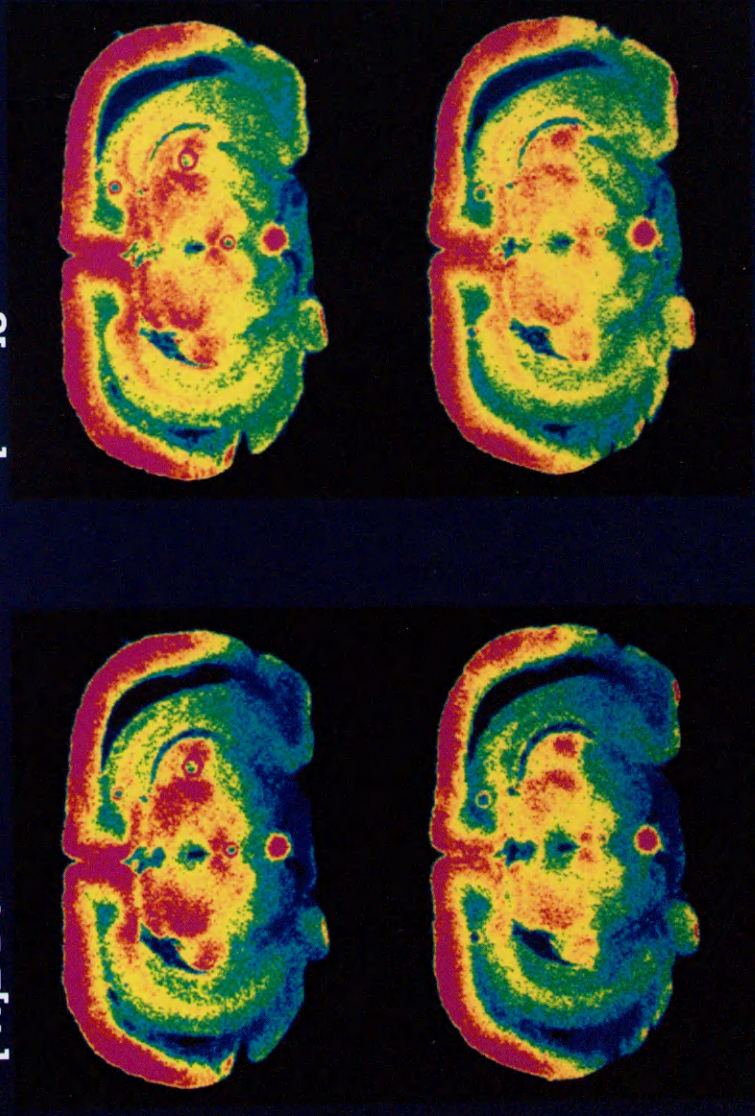
Aerobic

Fig.6

Chronic Phase

[³H]2-DG

[6-¹⁴C]glucose



Aerobic + Anaerobic

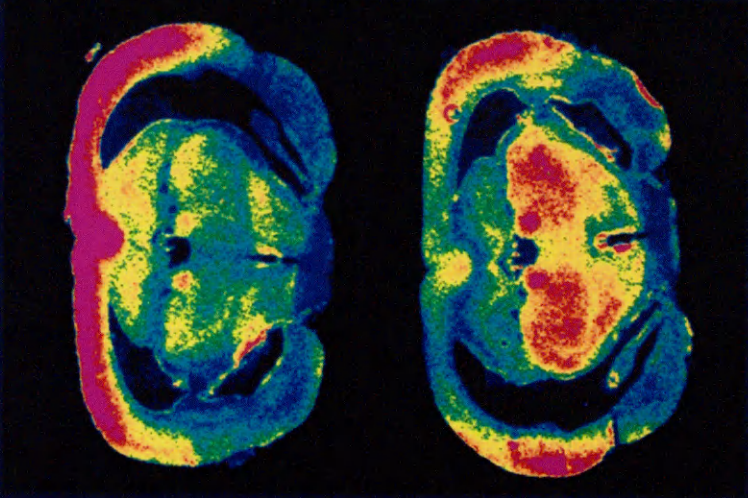
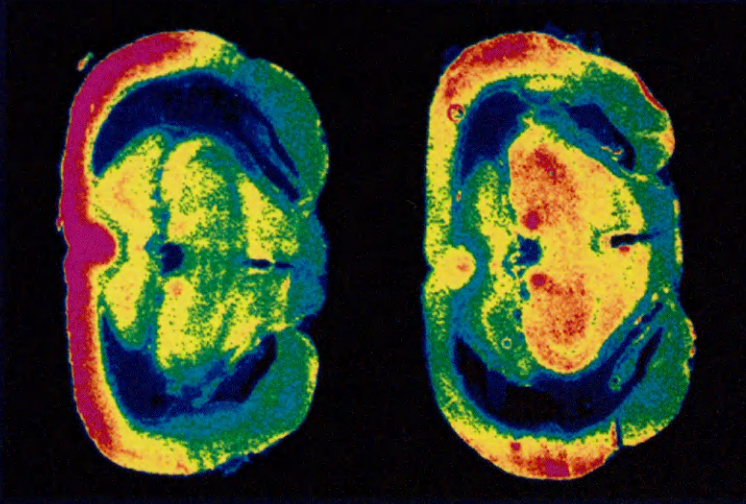
Aerobic

Fig.7

Chronic Phase

[³H]2-DG

[6-¹⁴C]glucose



Aerobic + Anaerobic

Aerobic

Fig.8

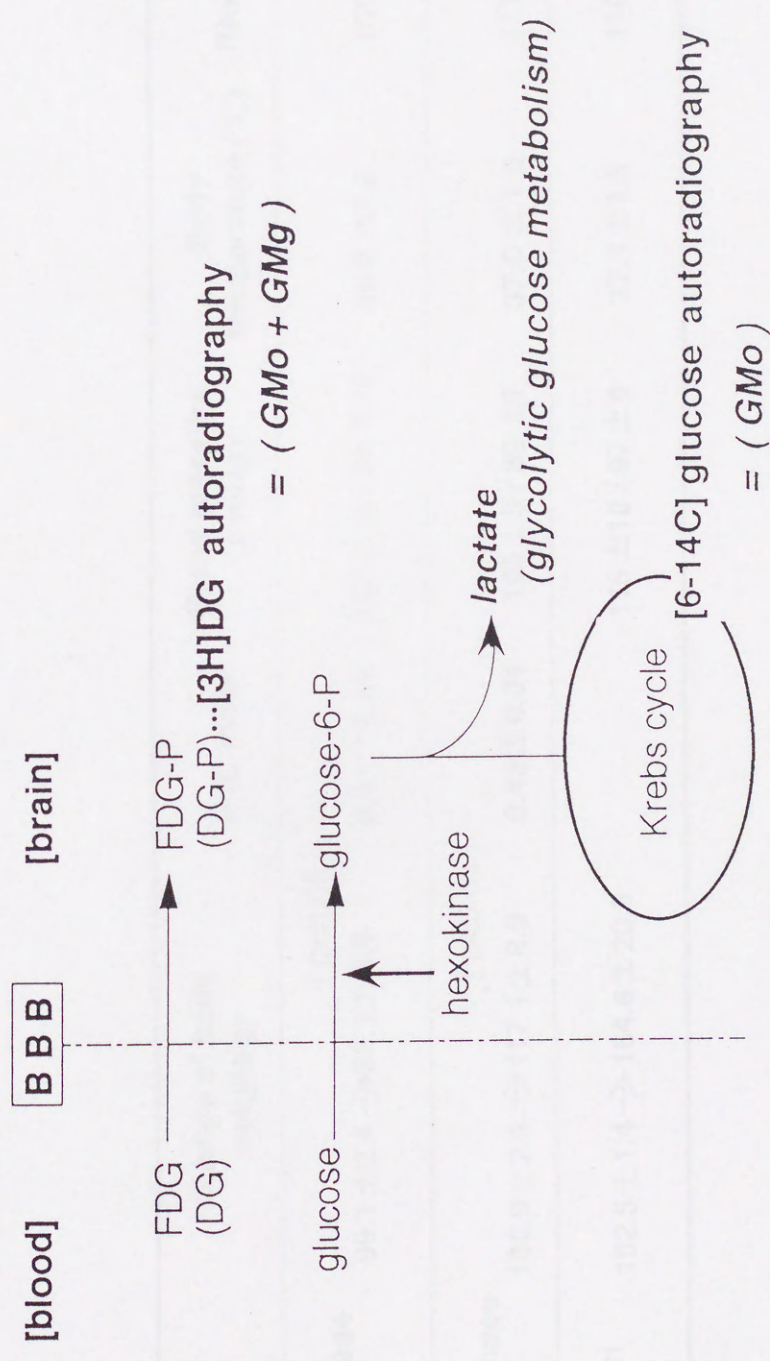


Fig. 9

	Change of body weight(g)	V/C index	Blood pressure (mmHg)	Body temperature (°C)	Blood sugar
Acute phase (n=8)	99.1 ± 2.4 → 93.1 ± 6.6 * (p<0.05)	0.41 ± 0.03	112 ± 12 / 95 ± 10	36.8 ± 1.8	105.2 ± 4.6
Chronic phase (n=8)	100.9 ± 2.4 → 117.1 ± 8.9 * (p<0.05)	0.43 ± 0.04	108 ± 9 / 89 ± 7	37.0 ± 1.0	111.3 ± 18.4
Control (n=5)	102.5 ± 1.4 → 164.6 ± 20.6		115 ± 10 / 97 ± 9	37.1 ± 1.5	110.0 ± 3.9

Table 1

Таблица 1

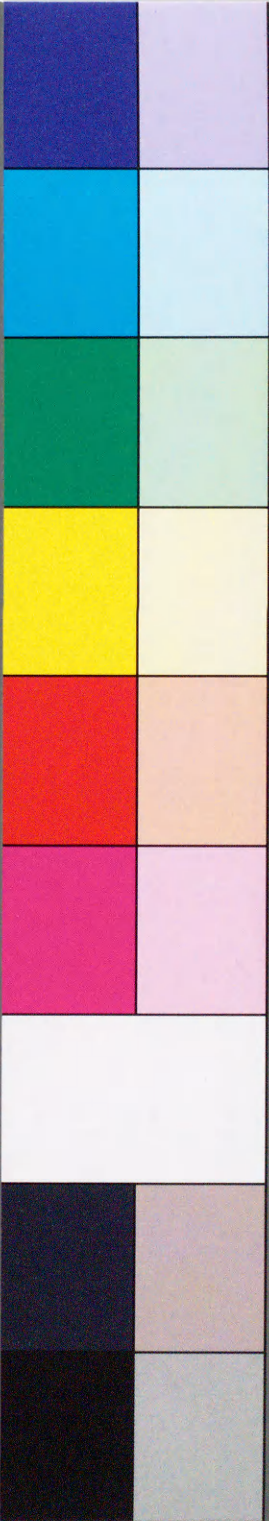
№ п/п	Исходные данные	Результат	Поправка	Среднее значение	Среднее квадратическое отклонение	Среднее квадратическое отклонение в процентах
1	100 ± 0,1	100 ± 0,1	0 ± 0,1	100 ± 0,1	0,1	0,1%
2	100 ± 0,1	100 ± 0,1	0 ± 0,1	100 ± 0,1	0,1	0,1%
3	100 ± 0,1	100 ± 0,1	0 ± 0,1	100 ± 0,1	0,1	0,1%

inches 1 2 3 4 5 6 7 8
cm 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19

Kodak Color Control Patches

© Kodak, 2007 TM: Kodak

Blue Cyan Green Yellow Red Magenta White 3/Color Black



Kodak Gray Scale



© Kodak, 2007 TM: Kodak

A 1 2 3 4 5 6 M 8 9 10 11 12 13 14 15 B 17 18 19

