

## 学位論文題名

Characterization of [ $^{123}\text{I}$ ] iomazenil distribution  
in a rat model of focal cerebral ischemia  
in relation to histopathologic findings

( $^{123}\text{I}$ -イオマゼニルの分布に関する検討・局所脳虚血モデルラットを  
用いた病理組織学的所見との対比)

## 学位論文内容の要旨

GABA ( $\gamma$ -aminobutyric acid) 受容体は大脳皮質上に豊富に存在し、虚血によって容易に傷害される。中枢性ベンゾジアゼピン受容体(BZR)は GABA 受容体サブタイプである GABA-A 受容体上に存在し、BZR に特異的に結合する SPECT 製剤、 $^{123}\text{I}$ -イオマゼニル (IMZ)は虚血領域の生存脳神経検索に有用である。これまでも IMZ の有用性は動物実験において、あるいは臨床例の経過観察において多く報告されているが、虚血急性期における IMZ 分布を病理学的に検討した例は少ない。そこで、IMZ 分布低下が示す細胞傷害の程度を病理組織学的に評価する事を本研究の目的とし、IMZ 分布をプロスタグランジン誘導酵素の発現や神経細胞核 DNA の断片化、細胞膜構造蛋白の傷害と比較した。実験には 8~9 週齢の雄性SDラットを用いた。ナイロン糸を用いた血管内閉塞法により右中大脳動脈の永久閉塞を作成し、閉塞の作成から断頭までは 2 時間から 24 時間の 7 群、各群 4~6 匹とした。断頭 60 分前に  $^{123}\text{I}$ -IMZ 3mCi/kg を、5 分前に血流評価のための  $^{125}\text{I}$ -IMP 60  $\mu$  Ci/kg を各々異なる大腿静脈から投与し、断頭後は速やかに脳を摘出、ドライアイスにより直ちに凍結した。摘出・凍結された脳から 20  $\mu$  m の切片を作成し、2 核種オートラジオグラフィにて  $^{123}\text{I}$ -IMZ の分布と  $^{125}\text{I}$ -IMP の分布を評価した。また上記切片から連続して作成された 10  $\mu$  m の切片を用いて病理組織学的検討を行った。すなわち、プロスタグランジン誘導酵素発現の評価として COX-2 免疫染色を、断片化された 2 重鎖 DNA の検出のために dUTP 染色を、細胞膜構造保持の指標として MAP-2 (微小管関連蛋白) 免疫染色を施行した。ラット脳の断面の皮質上に左右各 12 の円形関心領域 (径 2mm) を想定し、全ての評価はこの関心領域ごとに行った。IMP 分布、IMZ 分布は関心領域の対健常側比(LNR)による半定量的評価とし、LNR<0.8 を有意な低下とした。

IMP 分布によって示される脳血流は 2 時間群で既に広範な低下を示した。IMZ 分布の低下領域は常に血流分布低下領域に含まれ、IMZ 分布低下を示さない血流分布低下領域は 2 時間群で最も広く、血流と IMZ 分布の低下範囲には 2 時間群でのみ有意差が認められた ( $P<0.01$ )。COX-2 の発現は IMZ 分布が保たれた領域の 16.7%、および IMZ 分布が低下した領域の 33.2% で認められた。血流分布の保たれた領域に COX-2 の発現は見られなかった。dUTP 染色陽性 (DNA の断片化) は IMZ 分布低下領域の 24.8%、MAP-2 染色の低下 (細胞膜構造蛋白の傷害) は同じく 73.9% で観察され、IMZ 分布の保たれた領域には dUTP 染色陽性も MAP-2 染色低下も認められなかった。MAP-2 染色の低下領域 (Group A)、MAP-2 染色の保たれた dUTP 染色陽性領域 (Group B)、MAP-2 染色が保たれ dUTP 染色陽性も見られない COX-2 陽性領域 (Group C)、病理組織学的評価で異常が認められない領域 (Group D) は、この順に低い IMZ の LNR 値を示し (Group A:  $0.120 \pm 0.152$ , Group B:  $0.488 \pm 0.166$ , Group C:  $0.626 \pm 0.186$ 、

Group D:  $0.784 \pm 0.213$ )、各群間には有意差がみられた (C-D間  $p < 0.01$ 、B-C間  $p < 0.001$ 、その他の群間  $p < 0.0001$ )。

今回の実験で見られた脳虚血急性期における血流分布とIMZ分布の乖離はこれまでも同様の報告がなされているが、臨床例において急性期の評価でIMZ分布の保たれていた虚血領域は、MRIを用いたその後の経過観察でも脳梗塞に至らないことが報告されており、動物実験ではHE染色で壊死性変化をきたしていないことが確認されている。われわれの実験ではCOX-2はIMZ分布の保たれた領域にも観察され、COX-2がIMZ分布低下と同時、もしくはより早い段階で発現していることが示された。さらにCOX-2はIMZ分布の低下領域でも観察されており、COX-2の役割がBZR傷害後も継続されていることが示唆される。また、IMZ分布の保たれた領域ではDNAの断片化は見られず、細胞骨格も保たれていた。さらにGroup A, B, C, D各群のIMZ分布には有意な差が認められることからIMZの分布程度は細胞傷害の程度を反映していると考えられ、LNRによって細胞障害の程度を推測し得る可能性が示唆されたと考えられる。

核医学的手法による生存神経の検索は現在のところ脳血流やアセタゾラミド負荷に対する血管反応性、酸素代謝や糖代謝の評価に限られているが、これらにはいずれも星状膠細胞や神経鞘細胞等の情報が含まれており、厳密に言えば純粋な神経細胞の評価ではない。一方、中枢性BZRに特異的に結合するIMZの分布は神経細胞の直接的な情報とみなすことができる。中枢性BZRに特異的に結合する $^{11}\text{C}$ -フルマゼニル(FMZ)を用いた脳虚血発作発症直後のPET検査が、非可逆的傷害を受けた神経細胞と救済可能な神経細胞をよく分離する、という報告がある。 $^{11}\text{C}$ -FMZ PET検査は限られた施設でのみ施行可能であるが、今回用いた $^{123}\text{I}$ -イオマゼニルも中枢性BZRに特異的に結合するSPECT用製剤であり、施設内にサイクロトロンを備えていない一般的な多くの医療機関で施行可能である。

局所脳虚血モデルラットを用いた今回の実験で、脳虚血発作急性期における $^{123}\text{I}$ -IMZ分布と病理組織学的所見を対比し、IMZ分布低下は細胞核DNAの断片化や細胞構造の損傷よりも早期に見られる変化であることが始めて示された。さらにIMZ分布低下の程度が虚血による脳神経細胞傷害の程度の指標となる可能性が示唆された。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 宮 坂 和 男  
副 査 教 授 関 興 一  
副 査 教 授 玉 木 長 良

学 位 論 文 題 名

## Characterization of [ $^{123}\text{I}$ ] iomazenil distribution in a rat model of focal cerebral ischemia in relation to histopathologic findings

( $^{123}\text{I}$ -イオマゼニルの分布に関する検討・局所脳虚血モデルラットを  
用いた病理組織学的所見との対比)

GABA ( $\gamma$ -aminobutyric acid) 受容体は大脳皮質上に豊富に存在し、虚血によって容易に傷害される。中枢性ベンゾジアゼピン受容体 (BZR) は GABA 受容体サブタイプである GABA-A 受容体上に存在するが、BZR に特異的に結合する SPECT 製剤、 $^{123}\text{I}$ -イオマゼニル (IMZ) は虚血領域の生存脳神経検索に有用である。これまでも IMZ の有用性は多く報告されているが、虚血急性期における IMZ 分布の詳細な病理学的検討は見当たらない。そこで、IMZ 分布低下が示す細胞傷害の程度を病理組織学的に評価する事を本研究の目的とし、IMZ 分布をプロスタグランジン誘導酵素の発現や神経細胞核 DNA の断片化、細胞膜構造蛋白の傷害と比較した。

雄性SDラット(体重 300~350 グラム)の右中大脳動脈を閉塞して2~24 時間後に断頭、2 核種オートラジオグラフィにて  $^{123}\text{I}$ -IMZ の分布と  $^{125}\text{I}$ -IMP の分布を評価した。プロスタグランジン誘導酵素発現の評価として COX-2 免疫染色を、断片化された 2 重鎖 DNA の検出のために dUTP 染色を、細胞膜構造保持の指標として MAP-2 (微小管関連蛋白) 免疫染色を施行した。ラット脳断面の皮質上に左右各 12 の円形関心領域(径 2mm)を想定し、全ての評価はこの関心領域ごとに行った。IMP 分布、IMZ 分布は関心領域の対健常側比(LNR)による半定量的評価とし、LNR < 0.8 を有意な低下とした。

IMP 分布によって示される脳血流は2時間群で既に広範な低下を示した。IMZ 分布の低下領域は常に血流分布低下領域に含まれ、IMZ 分布低下を示さない血流分布低下領域は2時間群で最も広く、血流と IMZ 分布の乖離領域は時間とともに縮小した。血流分布の保たれた領域には COX-2 の発現は見られなかった。dUTP 染色陽性 (DNA の断片化) や MAP-2 染色の低下 (細胞膜構造蛋白の傷害) は IMZ 分布の低下領域でのみ観察された。MAP-2 染色の低下領域 (Group A)、MAP-2 染色の保たれた dUTP 染色陽性領域 (Group B)、MAP-2 染色が保たれ dUTP 染色陽性も見られない COX-2 陽性領域 (Group C) は、この順に低い LNR を示した。

臨床例において IMZ 分布の保たれた虚血領域は脳梗塞に至らないことが報告されており、動物実験では HE 染色で壊死性変化をきたしていないことが確認されている。われわれの実験では COX-2 が IMZ 分布低下と同時にしくはより早い段階で発現し、BZR 傷害後その役割が継続されていることが示唆された。また、IMZ 分布の保たれた領域では DNA の断片化は見られず、細胞骨格も保たれていることが示された。さらに Group A, B, C, D 各群の IMZ 分布には有意な差があり、LNR によって細胞障害の程度を推測し得る可能性が示唆されたと考えられる。

局所脳虚血モデルラットを用いた今回の実験で、脳虚血発作急性期における 123I-IMZ 分布と病理組織学的所見を対比し、IMZ 分布が COX-2 発現と同時にしくは発現後に低下し、分布低下が細胞核 DNA の断片化や細胞構造の損傷よりも早期に見られる変化であることを始めて示した。さらに IMZ 分布低下の程度が虚血による脳神経細胞傷害の程度の指標となる可能性を示唆した。

発表後、玉木教授から血流遮断の手技や低下の程度、染色結果の評価法、IMZ の臨床利用について、宮坂教授から実験に使用した動物モデルの血管閉塞の手技や安定性、対健常側比の病的低下の基準、超急性期における MRI との有用性の比較について、関教授より実際的な IMZ の利用について質問がなされた。これらに対して申請者は、今回の結果や過去の報告に基づいておおむね適切に回答した。

この論文は虚血脳の神経 viability 判定において、既に有用性が報告されている IMZ の分布を病理組織学的な反応や変化と対比して、IMZ 分布が保たれた領域では DNA も断片化されていないことを明らかにし、IMZ 分布の程度が細胞傷害の指標となり得る可能性を示唆した。審査員一同はこれらの成果を高く評価し、大学院過程における研鑽や取得単位と併せて申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。