Manganese-Enhanced MRI（MEMRI）による
ラット海馬活動性の可視化
－虚血性神経障害と鍼通電による代謝活性化の検出－

†森　勇樹

明治鍼灸大学大学院　鍼灸臨床医学Ⅰ　脳神経外科学教室

要旨：近年，脳，特に海馬における神経再生が注目され，それに伴い海馬の変性や活動状態を*in vivo*で評価する方法の登場が期待されている．海馬を特異的に画像化する方法としてManganese-enhanced MRI（マンガン増強MRI；MEMRI）が報告されているが，この方法により海馬の変性や活動状態を検出し得る可能性がある．今回筆者は海馬の活動と変性を*in vivo*で可視化し解析することを目的に，海馬CA1錐体細胞の脱落が生じることで知られるラット一過性前脳虚血モデルについて，MEMRIを用いて検討した．さらに，正常ラットにおける鍼通電刺激が海馬の活動にどのような影響を及ぼすか，マンガン造影剤の海馬への取込を指標にMEMRIを用いて信号強度解析を行った．MEMRIにより，sham群では海馬領域の信号増強が観察されたが，一過性前脳虚血から2週間後の海馬領域では，MEMRIの信号増強は抑制され，その結果は病理組織学的所見と一致した．また鍼通電刺激により，マンガン投与から6時間後に海馬の信号増強が認められた．この信号増強は無刺激群では見られなかった．本研究によりMEMRIが海馬の神経変性を*in vivo*で検出し得ることを示すと共に，鍼通電に伴う海馬領域の代謝亢進を画像的に検出し得ることが示された．

Ⅰ．はじめに

高齢社会の到来に伴い，中枢神経系の変性疾患や脳血管障害などによるADLの低下に対する新たな治療法の確立が期待されている．パーキンソン病やアルツハイマー病を初めとする変性疾患，あるいは脳虚血や外傷では，最終的に神経細胞死を呈する．19世紀初頭に神経解剖学者Ramon y Cajalがその著書において，"成体ほ乳類の中枢神経系（脳と脊髄）は一度損傷を受けると再生しない"[1]と述べて以来，これまで成体ほ乳類の中枢神経系は再生しないものであり，一度神経細胞死が生じると回復は不可能であると考えられてきた．ところが近年，成体の脳に，神経細胞に分化可能な細胞である神経幹細胞の存在が発見されて以降，この常識は覆された[2]．神経幹細胞の移植[2-7]や，内在性幹細胞や神経栄養因子としてのタンパク質の活性化[3, 8-14]など，中枢神経系の神経再生研究が数多く試みられ，ヒトにおいても神経変性疾患に対する応用が検討されている[15, 16]．特に，主に記憶に関与するとされる海馬での神経再生研究は，動物実験において多く検討されており[3, 9, 14, 17]，その一例として，神経成長因子などを用いることによって海馬に隣接する脳室周囲で新規産生された神経細胞が，変性を来した海馬CA1領域に移動し，失った行動学的な記憶機能を取り戻すことができるというNakatomiらの報告がある[14]．しかしながら，これまでの神経変性，神経再生の研究は，*in vivo*での病理組織学的所見による検討が中心であり，*in vivo*での形態や機能画像的な検討はほとんど行われていない．

このように再生医学が大きく発展する中，鍼灸が再生医学の一翼をどのように担い得るか，その可能性と方法論について研究することは意義深い．海馬は，中枢神経系の中でも記憶や学習に深く関与し，臨床的には痴呆や精神疾患に関連の深い脳領域として知られ，神経解剖学や神経生理学の基礎研究だけでなく[18-21]，鍼灸刺激と関連する研究も報告されている[22-26]．体幹や末梢からの電気刺激が，脳における神経細胞の増殖や神経栄養因子に対して影響を与える可能性があることは多く報告されており，鍼灸刺激が海馬の活性化や神経再生に寄与する可能性がある[26-30]．これまで，鍼通

平成16年11月18日受付，平成17年１月６日受理
Key Words：Manganese-enhanced MRI，海馬，一過性前脳虚血，鍼通電，神経代謝
†連絡先：〒629-0392 京都府船井郡日吉町保野田ヒノ谷6　明治鍼灸大学メディカルMRセンター
Tel: 0771-72-1181(内線464)　Fax: 0771-72-0326　e-mail:y_mori@muom.meiji-u.ac.jp

電刺激によって脳皮質における神経活動をActivity-Induced Manganese Dependent Contrast MRI（AIM-MRI）を用いて画像的に観察した研究がラット[31]とウサギ[32]で報告されている．しかし，*in vivo*において鍼灸刺激と海馬の活動の関連を画像化した報告はなく，構造が複雑な海馬領域を高い空間分解能で解析することは，鍼灸刺激の記憶や学習に対する関与を調べるためだけでなく，痴呆や精神疾患に対する鍼灸治療の科学的根拠を確立するために重要である．

海馬は，構造や形態が複雑であり，核磁気共鳴画像法（Magnetic Resonance Imaging; MRI），X線断層画像法（Computed Tomography; CT），あるいは陽電子放射断層写真撮影法（Positron Emission Tomography; PET）など，臨床的に普及している画像法では，特異的に画像化することは困難である．近年，海馬を特異的に画像化する方法として，Manganese-Enhanced MRI（マンガン増強MRI; MEMRI）が注目されている[33-35]．マンガンイオンは，全身性投与後，脈絡叢から脳室に取り込まれ，海馬采（fimbria of the hippocampus）付近から歯状回や海馬CA1，CA2，CA3などの代謝活動が活発な細胞に，より多く取り込まれる．それによりT1強調磁気共鳴画像法によってアンモン角といわれる海馬の特異的な形状が造影される[33]．この手法は，海馬を限局的に造影するだけでなく，海馬の変性疾患や活動状態をも検出し得る可能性があるが，未だその報告はない．

今回我々は，海馬の神経変性と代謝の変化を*in vivo*で可視化し解析することを目的に，海馬CA1錐体細胞の脱落を生じることで知られるラット一過性前脳虚血モデルについて，MEMRIを用いて画像化を行った．さらに，正常ラットにおける鍼通電刺激が，海馬の活動にどのような影響を及ぼすか，マンガン造影剤の海馬への取り込み速度を指標に，MEMRIを用いて信号強度解析を行った．

Ⅱ．対象と方法

本研究におけるすべての実験は「実験動物の飼育及び保管等に関する基準」（昭和53年3月総理府（現：内閣府）告示第6号）を遵守し，明治鍼灸大学研究倫理委員会による承認（平成15年6月18日：15-19号）を得て行った．

実験1：MEMRIによる一過性前脳虚血に伴う海馬CA1領域変性の検討

1．対　象

10 - 11週齢のWistar系雄性ラット9匹（体重290 - 310g，日本チャールス・リバー社）を用いた．ラットを無作為にsham群（n = 5）と虚血群（n = 4)に分けた．虚血群ではPulsinelliらの方法に準じた四動脈結紮法により一過性前脳虚血モデルを作成した[36]．1日目に，4.0％イソフルラン吸入麻酔薬に酸素と空気を混合したガス麻酔で導入されたラットを気管挿管し，齧歯類用の人工呼吸器（CWE社製，USA）を用いて2.0％の同麻酔薬で維持した．麻酔下でラットの後頸部から第一頸椎を露出し，バイポーラー（RADIONICS社製，USA）で両側の椎骨動脈を焼灼することで，永久閉塞を起こした．その翌日，同麻酔薬を用いたガス麻酔下（2.0 - 2.5 ％，フェイスマスクを使用）に，頸部前面より総頸動脈を露出し，血管クリップで10分間，頸動脈を閉塞させることによって一過性前脳虚血モデルを作成した．sham群は，両側の椎骨動脈の閉塞のみを起こし，総頸動脈は露出するものの，血管クリップによる閉塞は行わなかった．虚血後14日目に，再び4.0 ％の同麻酔薬で導入されたラットを気管挿管し，齧歯類用の人工呼吸器を用いて2.0 ％の同麻酔薬により維持した．50 mMの塩化マンガン水溶液（$MnCl_2$ -$4H_2O$，Sigma社製，USA）をシリンジポンプ（KD Scientific社製，USA）を用いて2.0 ml/hの速さで尾静脈より注入した．使用した$MnCl_2$溶液は，浸透圧を調整するため100 mM溶液を蒸留水を用いて調製し，後に生理食塩水を使用して50 mMに希釈した[37]．$MnCl_2$の投与量は，過去の報告と予備実験において造影効果を検討した後，75 mg/kgとした[33,38]．$MnCl_2$投与24時間後に下記の条件でMRI撮像を行った．

2．MRI測定

MRI撮像には4.7 T水平型実験用MRI装置（BioSpec，Bruker社製，ドイツ）を用いた．受信および送信コイルには直径30 mmのLitz coil（Doty Scientific, Inc社製，USA）を使用した．T1強調画像にはマルチスライスのスピン・エコー

法を使用し，冠状断面と水平断面の2セットを撮像した．各パラメータはTR＝177 ms，TE＝9.5 ms，マトリックスサイズ＝256×256，field of view（FOV）＝32 mm，スライス数＝6，スライス厚＝1.2 mm，スライス間隔＝1 mm，積算回数＝12を使用した．加えて，スライス間のギャップを埋めるために，スライスを尾側に1 mmずらして同じパラメータで，冠状断面と水平断面の2セットを撮像した．すべての画像の撮像（冠状断2セット，水平断2セット）に要した時間は約40分であった．

3．病理組織学的所見

MRI撮像後，速やかに脳を摘出し，10 %ホルマリン溶液にて7日間固定した．その後アルコール系列によって脱水し，パラフィンに包埋した．ミクロトームを用いて約5 μm厚に薄切し，ヘマトキシリン&エオジン染色を施した．染色された組織は光学顕微鏡（VANOX-S，OLYMPUS社製）にて観察するとともに，顕微鏡に接続されたデジタルカメラ（DP12，OLYMPUS社製）を用いて写真撮影を行った．

4．画像処理および統計解析

画像処理には，UNIXコンピュータ上で動作するソフトウェアMRVision（MRVision社製，USA)を使用した．関心領域を，Paxinosらの脳地図[39]より，Bregmaから尾側へ5 mmのスライスにおいて海馬CA1とCA3の両領域に設定し（図1），両領域の信号比を算出した後，群間比較を行った．また，病理組織学的所見において撮像された400倍拡大画像から，400×400 μm^2内の正常な神経細胞数をカウントし，群間比較を行った．統計解析はパーソナルコンピュータ（PowerBook G4，Apple社製，USA）上で動作するソフトウェアMicrosoft Excel 10.1.5（Microsoft社製，USA)を使用し，unpaired t検定により有意水準を5 %とした．

実験2：MEMRIによる鍼通電刺激が海馬神経活動に与える影響についての検討

1．対象と方法

10 - 11週齢のWistar系雄性ラット11匹（体重310 - 360 g，清水実験材料）を用いた．ラットを無作為に無刺激群（n ＝ 5)と鍼通電刺激群(n＝6)に分け，すべての動物に実験1と同様の方法で50 mMの塩化マンガン水溶液を尾静脈より注入した．鍼通電刺激群には，$MnCl_2$投与開始から5時間後，酸素と空気を混合したイソフルランガス麻酔下（2.0 - 2.5 %，フェイスマスクを使用)のラットに鍼灸用針（ディスポーザブル鍼 直径0.18 mm，30 mm，セイリン社製)を右後頸部の正中と右外耳孔の中間に約10 mm刺入し，電気刺激装置（DPS-160B-122D，ダイヤメディカルシステム社製)に接続した．ラットをプラスチックケージ内に移し，覚醒させてから通電刺激を開始した．刺激は，持続時間1 ms，刺激頻度を2 Hzと20 Hzを2分間隔で切り替え，頸部の筋収縮が視認できる最小の電流量を用いて60分間行った．その結果，5 - 8 mAの電流量の範囲内で，筋収縮が認められた．刺激途中でラットが動き，鍼灸用針が抜けたものは例数から除外した．無刺激群には，同麻酔を用いたガス麻酔（2.0 - 2.5 %，フェ

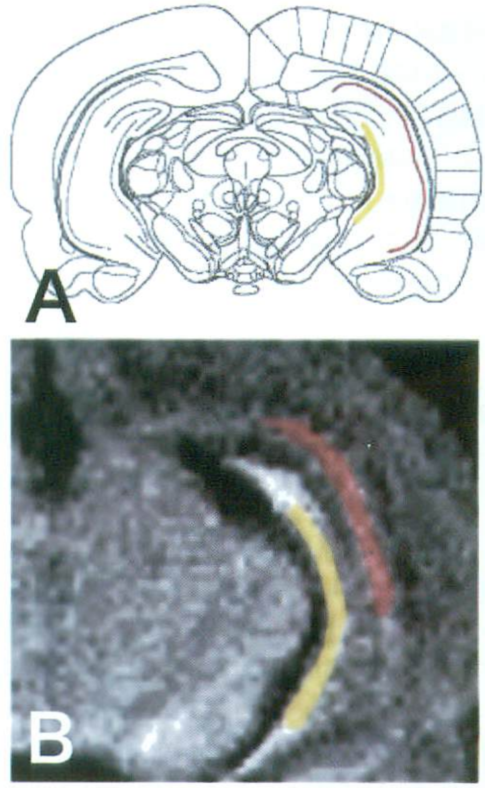

図1：実験1の関心領域設定

Paxinosの脳地図上の選択スライス全体像（A）とMRI画像上の関心領域の設定図（B）．脳地図上の海馬CA1（A，赤線）とCA3（B，黄線）より，MEMRIの海馬CA1（B，赤）とCA3（B，黄）の両領域を関心領域とした．スライス位置はBregmaより尾側へ5 mmとした．

イスマスクを使用)のみを行い，刺激は加えなかった．刺激終了後，マンガン注入から６時間の時点で4.0 %の同麻酔薬で導入後，気管挿管を行い，齧歯類用の人工呼吸器（CWE社製，USA）を用いて2.0 %の同麻酔薬により維持し，下記の条件でMRI撮像を行った．またマンガン投与から24時間後に再び人工呼吸器による麻酔を行い，同条件でMRI撮像を行った．

２．MRI測定

実験２におけるMRI撮像条件は実験１と同様に行った．

３．画像処理および統計解析

画像処理は，パーソナルコンピュータ(PowerBook G4，Apple社製，USA)上で動作するソフトウェアImageJ 1.32J（NIH，USA)およびデータ処理言語IDL（Interactive Data Language，Re-serch Systems社製，USA）を使用した．関心領域を両側の海馬CA1と歯状回(Dentate Gyrus; DG）に設定し，$MnCl_2$による海馬の信号増強効果を算出するために中脳水道後部の脳室壁の信号強度に対するそれぞれの信号比を算出し，群間比較を行った．統計解析はパーソナルコンピュータ（PowerBook G4，Apple社製，USA)上で動作するソフトウェアStatView 5.0.1 (SAS社製，USA)を使用し，Bonferroni/Dunn検定により有意差の判定を行った．有意水準は５%とした．

Ⅲ．結　果

１．実験１：MEMRIによる一過性前脳虚血に伴う海馬CA1領域変性の検討

一過性前脳虚血を施した虚血群，およびsham群の両群において，虚血後15日，$MnCl_2$投与後24時間のMEMRIを測定した．図2にその典型例を示す．$MnCl_2$全身性投与により，対照となるsham群ではCA1の層が造影されたが（図2-A)，虚血群は，この部位の信号増強が少なかった（図2-B)．CA1/CA3の信号強度比を比較すると，sham群では0.88 ± 0.02であったのに対して，虚血群は0.76 ± 0.05と有意に低かった（P<0.005 (P = 0.0015)）(図3)．

同部位の病理標本のCA1領域において，sham群では均等に並ぶ正常な細胞が観察されたが，虚血群では，sham群に比べ細胞密度が低く，核がヘマトキシリンにより濃染された細胞像が多く観察された（図4-D)．病理標本の400×400 μm^2内に存在する正常神経細胞数は，sham群は20.5 ± 5.7個であったのに対して，虚血群は10.7 ± 6.4個と有意に少なかった（P < 0.01 (P = 0.0094)）(図5)．

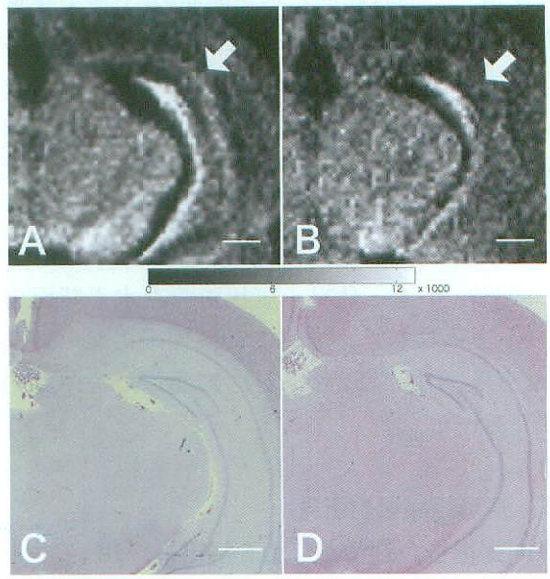

図２：一過性前脳虚血に伴う海馬領域のMEMRIの典型例と病理組織所見

海馬領域のMEMRI（A，B）とH&E染色画像（C，D）の典型例を示す．スケールは1 mmを示す．$MnCl_2$全身性投与から24時間後のT1強調画像において，対照となるsham群ではCA1の層が造影され（A，矢印)，虚血群では信号増強が少なかった（B，矢印)．

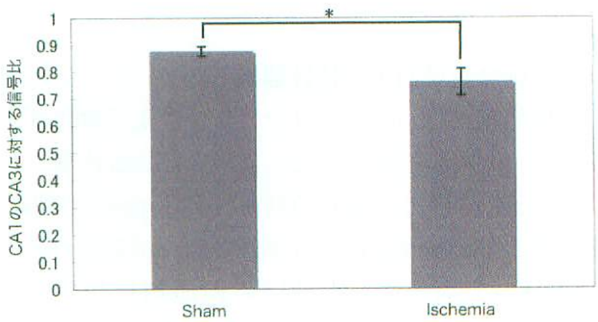

図３：一過性前脳虚血に伴うCA1/CA3の信号比の比較

図1で設定したCA1，CA3各領域に対する信号比は，sham群では0.88±0.02であったのに対して，虚血群が0.76±0.05であり，有意に低値であった．(*：P < 0.005 (P = 0.0015))

２．実験２：MEMRIによる鍼通電刺激が海馬神経

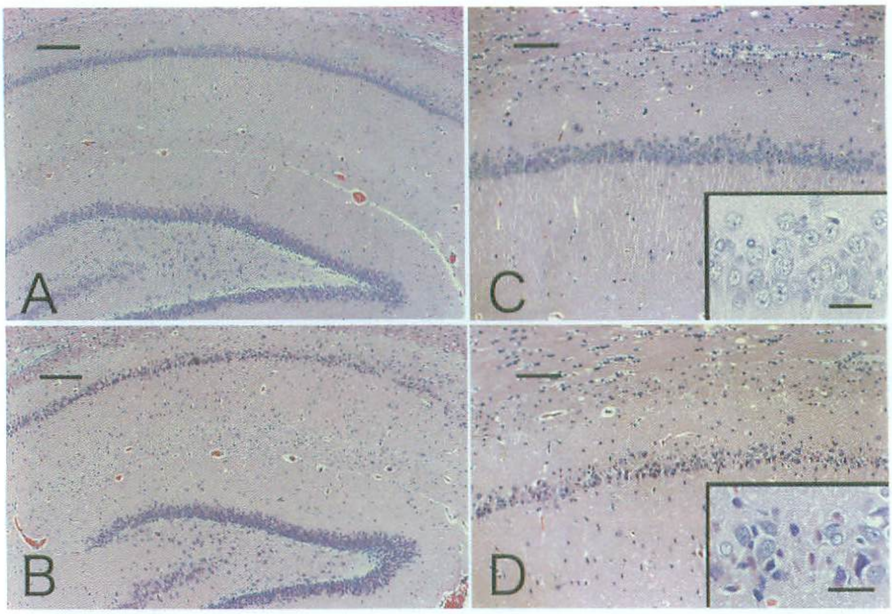

図４：一過性前脳虚血に伴う病理組織所見

sham群（A, C）と虚血群（B, D）の海馬領域におけるH&E染色画像の典型例．40倍拡大画像（A, B），100倍拡大画像（C, D）を示す．また各群の400倍拡大画像をそれぞれC, Dの挿入画像に示す．スケールはそれぞれ，500μm，200μm，50μm．sham群では均等に並ぶ正常な細胞が見られたが，虚血群では，sham群に比べ細胞間が大きく離れ，細胞密度が低くなっている．また虚血群の画像では，ヘマトキシリンに濃染したpyknosisなどの異常が見られる．

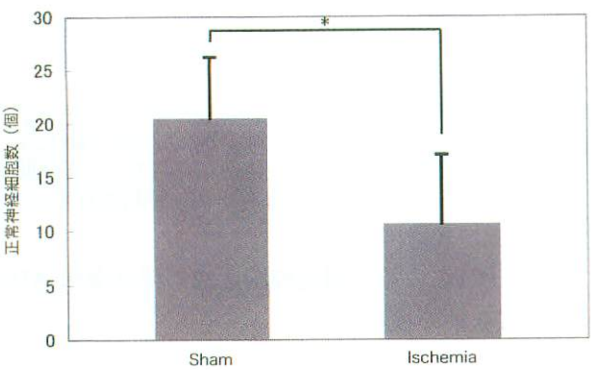

図５：CA1における正常神経細胞数の比較

400倍に拡大した病理組織学的所見画像より，海馬CA1領域で400×400 μ㎡内の正常な神経細胞をカウントし，群間比較した．sham群では20.5±5.7個であったのに対して，虚血群が10.7±6.4個であり，有意に減少していた．（*：P＜0.01（P＝0.0094））

活動に与える影響についての検討

正常ラットにおいて，鍼通電刺激群および対照群におけるMEMRIが得られた．$MnCl_2$投与から6時間後の無刺激群の典型例を図6-A，6-Bに，$MnCl_2$投与から6時間後に1時間の刺激を行った鍼通電刺激群の典型例を図6-C，6-Dに，また$MnCl_2$投与から24時間後の無刺激群の画像を図6-E，6-Fに示す．鍼通電刺激群では，刺激10分後に得られた画像において，脳室以外に，両側の海馬の構造の一部であるCA1とDGに沿って高信号になっている領域が見られた．この領域は，対照となる無刺激群（CA1 ＝ 0.92 ± 0.11，DG ＝ 1.04 ± 0.07）に対して，鍼通電刺激群は，CA1 ＝ 1.08 ± 0.06，DG ＝ 1.21 ± 0.10と，両領域で有意に高値であった（$P < 0.01$（CA1: $P = 0.0067$，DG: $P = 0.0051$））（図7）．また無刺激群，鍼通電刺激群ともに$MnCl_2$投与から24時間後には図6-Eに示すような海馬に限局した高信号が観察された．

Ⅳ．考　察

本研究では，2つの主要な知見が得られた．1）実験１の結果から，10分間の一過性前脳虚血施行から2週間後の海馬領域において，虚血群の海馬CA1領域に，神経細胞の脱落や虚血によるものと思われる変化が確認された．またMEMRIでのCA1/CA3の信号強度比は，虚血群がsham群に対して有意に小さかった．2）実験２の結果から，鍼刺激による海馬の造影では，対照群には見られなかったコントラスト上昇が，鍼通電刺激後に両側の海馬の構造の一部であるCA1とDGに観察された．

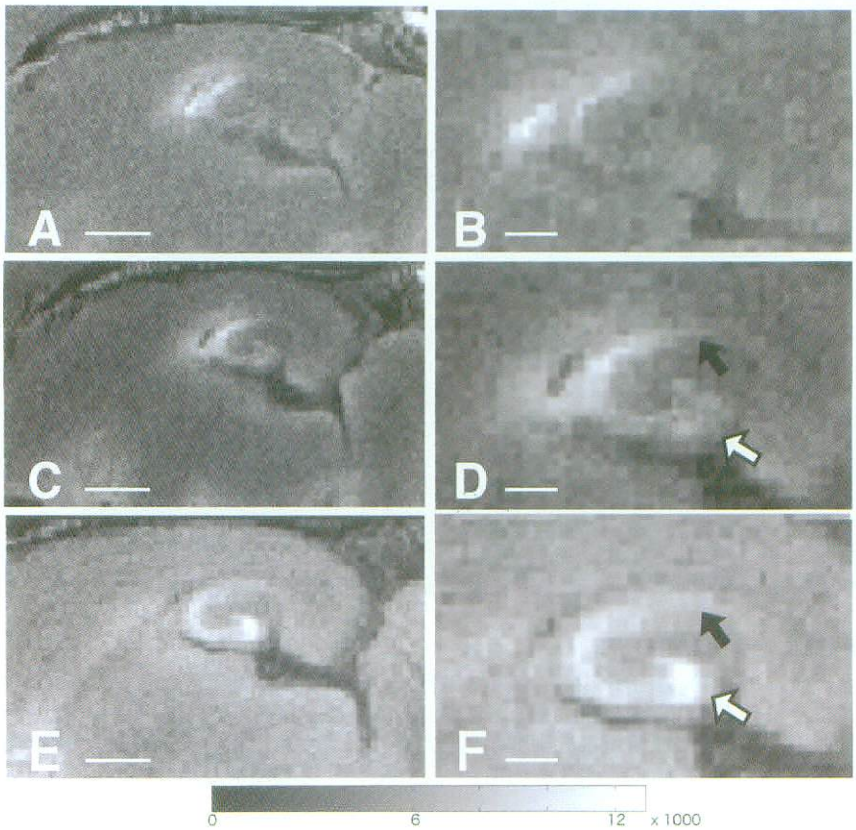

図６：鍼通電刺激によるMEMRIの典型例

$MnCl_2$投与から6時間後の水平断のスライス位置における無刺激群（A，B），鍼通電刺激群（C，D），$MnCl_2$投与から24時間後（E，F）のMEMRIの典型例．B，D，Fは海馬領域の拡大図．スケールはA，C，Eが2 mm，B，D，Fが1 mmを示す．24時間後の画像では信号増強によってCA1（F，黒矢印）および歯状回（F，白矢印）の構造が見られる．6時間後における無刺激群ではこの構造が観察されないのに対し，鍼通電刺激群では観察される（C，D）．無刺激群では，$MnCl_2$投与6時間後において，海馬采およびCA2の一部のみが造影されている（A，B）．

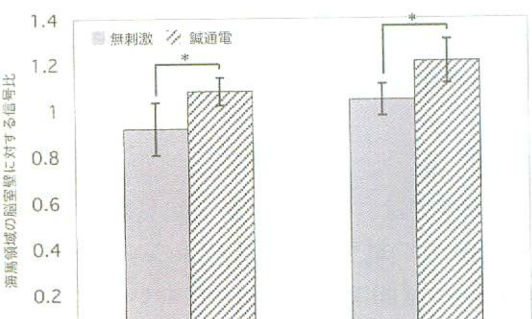

図７：鍼通電刺激によるMEMRIの信号強度比の比較

$MnCl_2$による海馬に限局した信号増強効果を算出するために中脳水道後部の脳室壁の信号強度に対するそれぞれの信号比を算出した．$MnCl_2$投与から6時間後のCA1，DG両領域に対する信号比は，鍼通電刺激群がCA1 = 1.08±0.06，DG = 1.21±0.10であり，対照となる無刺激群（CA1 = 0.92±0.11，DG = 1.04±0.07）に対して，両領域で有意に高値であった．（＊：$P < 0.01$（CA1：P = 0.0067，DG：P = 0.0051））

１．MEMRIによる一過性前脳虚血に伴う海馬CA1領域変性の検討

四動脈結紮法は大脳に血流を供給する主要な4本の動脈を一過性に閉塞する方法であり，大脳を中心に脳虚血が引き起こされる．短時間の虚血では，虚血から約1週間から10日経過した時点で，海馬CA1領域にアポトーシスが起こり，いわゆる二次的な神経細胞死が引き起こされることが過去の多くの研究で知られている[36, 40-43]．本研究の目的は，細胞が障害された結果，細胞の活動性が低くなる状態におけるMEMRI信号比の差を検討することにあり，そこで，細胞死が最も顕著に見られる時期を選択した．虚血から1週間後でアポトーシスによる変成が最も著明に現れるが，神経死（ネクローシス）には至らないとされている[41]．また虚血から4週後には，ネクローシス後に消失した神経細胞が増加することが知られている[43]．

本実験の虚血群において，病理組織学的所見に見られた，細胞の存在する間隔が広くなり，正常な神経細胞数が減少したことは，このような神経細胞死によるものと考えられ，過去の報告と一致する[36, 41]．アポトーシスと同時に神経脱落が最も強く表れる時期は，この領域における細胞の活動が最も低下していることが考えられるため，本実験では，虚血施行から14日目にMEMRIの観察を行った．その結果，本研究の実験１において，sham群ではMEMRIによって海馬CA1領域の信号増強が生じたのに対し，虚血群では同領域の信号増強が起こらなかった．

全身性に投与された$MnCl_2$は，血液-脳脊髄液関門を通過して脳室内に運ばれる．この過程で，Mn^{2+}の多くは血漿中や脳脊髄液中のタンパクと結合し，化合物を形成すると考えられる．神経細胞が正常である場合，脳室内のマンガン化合物は，金属トランスポータ等によるエンドサイトーシスと軸索輸送などの経路で海馬采から海馬の神経細胞内へ取り込まれ，蓄積すると推察される[33]．虚血群で海馬CA1領域の信号増強が見られなかった原因として，病理組織学的所見より明らかなように，CA1領域内の正常な代謝活動を行う細胞数が減少した結果，マンガンが代謝に伴って取り込まれ蓄積し得る細胞の数が減少し，信号増強が起こらなかったと推察される．

本研究から，MEMRIにより，海馬領域の神経細胞障害を*in vivo*で検出し得ることが示された．

２．MEMRIによる鍼通電刺激が海馬神経活動に与える影響についての検討

MEMRIにおいて，$MnCl_2$の全身性投与後，少なくとも2時間後には海馬の選択的な信号増強は観察されず，また24時間後には，選択的な信号増強が生じることが報告されている[33]．予備実験において，刺激を与えない覚醒下のラットの海馬領域が限局して造影されるのは，$MnCl_2$投与から約12時間後であることを確認した（事前検討データ）．本研究では，鍼刺激による海馬におけるマンガン取り込みの変化を検討するために，無刺激では海馬に信号増強が生じない，投与から6時間後に比較を行った．実験２において，鍼通電刺激群では$MnCl_2$投与から6時間後に，信号増強が海馬CA1領域と歯状回で生じた．この領域の信号増強は，無刺激群での6時間後の画像で観察されなかったことから，鍼通電刺激によってマンガンの海馬への取り込みが促進されたと考えられる．

$MnCl_2$の全身性投与後，24時間後にはマンガンは全脳へ広がり，皮質層構造や視床下部などを中心に特徴的な造影が得られる[33]．海馬にはとりわけ著しい増強効果が認められる．海馬に限局した信号増強が生じる機序として，１）海馬の錐体細胞はグルタミン酸受容体を多く持つ[44, 45]ため，代謝が活発で，マンガンの取り込みが生じやすい，２）脈絡叢から脳室内に取り込まれたマンガンが，海馬采から歯状回やCA1，CA3などの海馬の細胞内へ取り込まれるような一種の輸送経路が存在する，などの仮説が考えられる．実験１の結果より，障害のある細胞ではマンガンの取り込みが生じない，または減少することから，MEMRIが海馬における神経細胞の代謝活動を反映していると考えられる．特定のにおい刺激によって，嗅神経の軸索輸送および糸球体を介した嗅球への取り込みが特異的に亢進することが知られており[46]，鍼刺激により海馬へのマンガンの取り込みが促進されたという本研究の結果は，海馬における神経細胞の代謝活動の亢進が，脳室内から海馬采および海馬領域へのマンガンの取り込み速度を促進させた可能性がある．これまでの報告[26-30]では，鍼刺激が海馬領域のどの細胞の活動に対して，影響を及ぼすか詳細に検討したものはない．本研究で使用した方法では，鍼通電刺激による海馬周辺へのマンガン取り込みの促進の原因として，１）海馬のニューロンの活性化，２）グリア細胞の活性化，あるいは３）軸索輸送の促進によるもののいずれかを証明するには至っていない．今後，鍼通電刺激が海馬のどの細胞に対して影響を与えるかについて，カルシウムチャンネル阻害剤や軸索輸送阻害剤を用いた検討，あるいは免疫組織学的研究等が必要である．

MEMRIでは，Mn^{2+}は，その濃度や投与量によっては，循環機能に与える急性毒性を持つ問題がある．今回の実験における$MnCl_2$の投与は，過去の報告[33, 37]と予備実験において実験動物の生理状態に深刻な影響を及ぼさない投与量，濃度および投与速度を確認した上で行われた．マンガンの局所濃度が1 mMを超えた場合，T2緩和時間の短縮のため，T1強調画像上では暗転することが

知られている[47]．また，免疫細胞を使用した*in vivo*での実験より，1 mM以下のマンガン濃度では，細胞毒性が確認されていない[47]．以上の点より，今回の研究では毒性のレベルを下回っていると考えられる．また，一度Mn^{2+}が蓄積された細胞では，それが長時間排出されないため，経時的な変化を追跡する必要がある研究には適用が困難であると考えられるが，比較的長い測定時間を要する高分解能画像や3次元でのMRI撮像には有利である．本法は海馬の神経活動を*in vivo*で検出し得る新しい画像法としての役割を期待させる．

今回の通電方法では，覚醒下の刺激であるにもかかわらず，筋収縮を起こすために，過去の動物実験[48]で使用されているものより強い電流が必要であったことから，ラットにおける閾値が高かったことが考えられる．覚醒下のラットで実験を行うため，動きによって針が脱落することを防止することを考慮し，深部まで針を刺入した（約10 mm）．そのため，目的とする筋以外の領域に針が多く接触した結果，特定の局所に与える電流密度の低下が起こったことが一つの原因と考えられた．今後，対照実験等により，$MnCl_2$を投与してからの刺激時期，刺激量，刺激部位など最も効果的な刺激法を設定すべきであると考える．

V．結　語

ラット脳において，MEMRIにより一過性脳虚血による障害領域が*in vivo*で検出された．また，鍼通電刺激によってマンガン造影剤の海馬への取り込み速度が促進されることが示された．本研究により，MEMRIが海馬の神経変性を*in vivo*で検出する有用な方法であることを示すと共に，これまで確認されていなかった鍼通電に伴う海馬領域の代謝亢進がMEMRI法で描出可能であることが示唆された．

本法は，再生医学において神経再生のメカニズムを詳細に検討する際に，極めて有用であると考えられ，今後，鍼灸の再生医療への適応の可能性を探る際にも，重要な手法になると考えられた．

謝　辞

本研究に際し，終始御指導を賜りました明治鍼灸大学脳神経外科学教室田中忠蔵教授，樋口敏宏教授に深甚なる謝意を捧げます．そして御助言ならびにご協力を賜りました同医療情報学教室梅田雅宏講師，青木伊知男講師，京都府立医科大学放射線科学教室成瀬昭二助教授，公立南丹病院脳神経外科恵飛須俊彦先生，明治鍼灸大学第三生理学教室川喜田健司教授，岡田薫講師に深く感謝致します．また，病理標本撮影にご協力を賜りました明治鍼灸大学解剖学教室松浦忠夫教授，星伴路講師に心から感謝致します．共に実験にご協力をいただいた同大学大学院鍼灸臨床医学Ｉ河合裕子，中越明日香各氏ならびに同大学学部生の柴田さやか，徳富義浩，村上あかり，津原理恵各氏に感謝致します．

参考文献

1) Ramon y Cajal S : Degeneration and regeneration of the nervous system. May R, translator. New York, Hafner, 1928.
2) Gage FH : Mammalian neural stem cells. Science, 287 : 1433-1438, 2000.
3) Arlotta P, Magavi SS, Macklis JD : Induction of adult neurogenesis : molecular manipulation of neural precursors in situ. Ann N Y Acad Sci, 991 : 229-236, 2003.
4) Bjorklund A, Lindvall O : Cell replacement therapies for central nervous system disorders. Nat Neurosci, 3 : 537-544, 2000.
5) Lacza Z, Horvath E, Busija DW : Neural stem cell transplantation in cold lesion : a novel approach for the investigation of brain trauma and repair. Brain Res Brain Res Protoc, 11 : 145-154, 2003.
6) Magavi SS, Macklis JD : Induction of neuronal type-specific neurogenesis in the cerebral cortex of adult mice: manipulation of neural precursors in situ. Brain Res Dev Brain Res, 134 : 57-76, 2002.
7) Wechsler LR, Kondziolka D : Cell therapy: replacement. Stroke, 34 : 2081-2082, 2003.
8) Kozorovitskiy Y, Gould E : Adult neurogenesis: a mechanism for brain repair? J Clin Exp Neuropsychol, 25 : 721-732, 2003.
9) Larsson E, Mandel RJ, Klein RL, Muzyczka N, et al : Suppression of insult-induced neurogenesis in adult rat brain by brain-derived neurotrophic factor. Exp Neurol, 177 : 1-8, 2002.
10) Fallon J, Reid S, Kinyamu R, Opole I, et al : In vivo induction of massive proliferation, directed migration, and differentiation of neural cells in the adult mammalian brain. Proc Natl Acad Sci U S A, 97 : 14686-14691, 2000.

11) Kuhn HG, Winkler J, Kempermann G, Thal LJ, et al : Epidermal growth factor and fibroblast growth factor-2 have different effects on neural progenitors in the adult rat brain. J Neurosci, 17 : 5820-5829, 1997.
12) Palmer TD, Markakis EA, Willhoite AR, Safar F, et al : Fibroblast growth factor-2 activates a latent neurogenic program in neural stem cells from diverse regions of the adult CNS. J Neurosci, 19 : 8487-8497, 1999.
13) Wagner JP, Black IB, DiCicco-Bloom E : Stimulation of neonatal and adult brain neurogenesis by subcutaneous injection of basic fibroblast growth factor. J Neurosci, 19 : 6006-6016, 1999.
14) Nakatomi H, Kuriu T, Okabe S, Yamamoto S, et al : Regeneration of hippocampal pyramidal neurons after ischemic brain injury by recruitment of endogenous neural progenitors. Cell, 110 : 429-441, 2002.
15) Curtis MA, Penney EB, Pearson AG, van Roon-Mom WM, et al : Increased cell proliferation and neurogenesis in the adult human Huntington's disease brain. Proc Natl Acad Sci U S A, 100 : 9023-9027, 2003.
16) Jin K, Peel AL, Mao XO, Xie L, et al : Increased hippocampal neurogenesis in Alzheimer's disease. Proc Natl Acad Sci U S A, 101 : 343-347, 2004.
17) Zharkovsky T, Kaasik A, Jaako K, Zharkovsky A : Neurodegeneration and production of the new cells in the dentate gyrus of juvenile rat hippocampus after a single administration of ethanol. Brain Res, 978 : 115-123, 2003.
18) Gould E, Beylin A, Tanapat P, Reeves A, et al : Learning enhances adult neurogenesis in the hippocampal formation. Nat Neurosci, 2 : 260-265, 1999.
19) Hollup SA, Molden S, Donnett JG, Moser MB, et al : Place fields of rat hippocampal pyramidal cells and spatial learning in the watermaze. Eur J Neurosci, 13 : 1197-1208, 2001.
20) Okabe S, Collin C, Auerbach JM, Meiri N, et al : Hippocampal synaptic plasticity in mice overexpressing an embryonic subunit of the NMDA receptor. J Neurosci, 18 : 4177-4188, 1998.
21) Shors TJ, Townsend DA, Zhao M, Kozorovitskiy Y, et al : Neurogenesis may relate to some but not all types of hippocampal-dependent learning. Hippocampus, 12 : 578-584, 2002.
22) Bucinskaite V, Theodorsson E, Crumpton K, Stenfors C, et al : Effects of repeated sensory stimulation (electro-acupuncture) and physical exercise (running) on open-field behaviour and concentrations of neuropeptides in the hippocampus in WKY and SHR rats. Eur J Neurosci, 8 : 382-387, 1996.
23) Deng QS, Fang ZC, Yin Y : Ionic mechanism of acupuncture on improvement of learning and memory in aged mammals. Am J Chin Med, 23 : 1-9, 1995.
24) Hui KK, Liu J, Makris N, Gollub RL, et al : Acupuncture modulates the limbic system and subcortical gray structures of the human brain: evidence from fMRI studies in normal subjects. Hum Brain Mapp, 9 : 13-25, 2000.
25) Ying SX, Cheng JS : Effects of electro-acupuncture on C-FOS expression in gerbil hippocampus during transient global ischemia. Acupunct Electrother Res, 19 : 207-213, 1994.
26) Jang MH, Shin MC, Lee TH, Lim BV, et al : Acupuncture suppresses ischemia-induced increase in c-Fos expression and apoptosis in the hippocampal CA1 region in gerbils. Neurosci Lett, 347 : 5-8, 2003.
27) Liang XB, Liu XY, Li FQ, Luo Y, et al : Long-term high-frequency electro-acupuncture stimulation prevents neuronal degeneration and up-regulates BDNF mRNA in the substantia nigra and ventral tegmental area following medial forebrain bundle axotomy. Brain Res Mol Brain Res, 108 : 51-59, 2002.
28) Kim EH, Kim YJ, Lee HJ, Huh Y, et al : Acupuncture increases cell proliferation in dentate gyrus after transient global ischemia in gerbils. Neurosci Lett, 297 : 21-24, 2001.
29) Yun SJ, Park HJ, Yeom MJ, Hahm DH, et al : Effect of electroacupuncture on the stress-induced changes in brain-derived neurotrophic factor expression in rat hippocampus. Neurosci Lett, 318 : 85-88, 2002.
30) Zhang WT, Jin Z, Cui GH, Zhang KL, et al : Relations between brain network activation and analgesic effect induced by low vs. high frequency electrical acupoint stimulation in different subjects: a functional magnetic resonance imaging study. Brain Res, 982 : 168-178, 2003.
31) 青木伊知男：Activity-Induced Manganese Dependent Contrast MRIを用いた鍼刺激によるラット脳賦活の検討. 明治鍼灸医学, 23 : 7-17, 1998.
32) Chiu JH, Cheng HC, Tai CH, Hsieh JC, et al : Electroacupuncture-induced neural activation detected by use of manganese-enhanced functional magnetic resonance imaging in rabbits. Am J Vet Res, 62 : 178-182, 2001.
33) Aoki I, Wu YJ, Silva AC, Lynch RM, et al : In vivo detection of neuroarchitecture in the rodent brain using manganese-enhanced MRI. Neuroimage, 22 : 1046-1059, 2004.

34) Watanabe T, Michaelis T, Frahm J : Mapping of retinal projections in the living rat using high-resolution 3D gradient-echo MRI with Mn2+-induced contrast. Magn Reson Med, 46 : 424-429, 2001.
35) Watanabe T, Radulovic J, Spiess J, Natt O, et al : In vivo 3D MRI staining of the mouse hippocampal system using intracerebral injection of $MnCl_2$. Neuroimage, 22 : 860-867, 2004.
36) Pulsinelli WA, Brierley JB, Plum F : Temporal profile of neuronal damage in a model of transient forebrain ischemia. Ann Neurol, 11 : 491-498, 1982.
37) Silva AC, Lee,JH, Aoki I, Koretsky AP : Manganese-enhanced magnetic resonance imaging (MEMRI) : methodological and practical considerations. NMR Biomed, 17, 2004, in press.
38) Lee,JH, Silva AC, Merkle H, Koretsky AP : Contrast enhancement as a function of time and dose after intravenous $MnCl_2$ Administration using high resolution manganese enhanced MRI (MEMRI) of mouse brain, Proc Intl Soc Mag Reson Med, 11 : 18, 2004.
39) Paxinos G, Watson C : The Rat Brain In Stereotaxic Coordinates Fourth Edition. Academic Press, San Diego,1998.
40) Kirino T : Delayed neuronal death in the gerbil hippocampus following ischemia. Brain Res, 239 : 57-69, 1982.
41) Kirino T, Tamura A, Sano K : Delayed neuronal death in the rat hippocampus following transient forebrain ischemia. Acta Neuropathol (Berl) , 64 : 139-147, 1984.
42) Pulsinelli WA, Levy DE, Duffy TE : Regional cerebral blood flow and glucose metabolism following transient forebrain ischemia. Ann Neurol, 11 : 499-502, 1982.
43) Kiprianova I, Freiman TM, Desiderato S, Schwab S, et al : Brain-derived neurotrophic factor prevents neuronal death and glial activation after global ischemia in the rat. J Neurosci Res, 56 : 21-27, 1999.
44) Riedel G, Micheau J, Lam AG, Roloff E, et al : Reversible neural inactivation reveals hippocampal participation in several memory processes. Nat Neurosci, 2 : 898-905, 1999.
45) Arnth-Jensen N, Jabaudon D, Scanziani M : Cooperation between independent hippocampal synapses is controlled by glutamate uptake. Nat Neurosci, 5 : 325-331, 2002.
46) Pautler RG, Koretsky AP : Tracing odor-induced activation in the olfactory bulbs of mice using manganese-enhanced magnetic resonance imaging. Neuroimage, 16 : 441-448, 2002.
47) Aoki I, Wu YJ, Silva AC, Koretsky AP, et al : In vitro cell labeling for manganese enhanced magnetic resonance imaging. Proc Intl Soc Mag Reson Med 11 : 164, 2004.
48) 矢野忠，石崎直人，福田文彦：神経血流に及ぼす鍼通電刺激の影響について．日本温泉気候物理医学会雑誌，61 : 141-147, 1998.

Visualization of Hippocampal Metabolism using Manganese-Enhanced MRI in Rats - Detection of Ischemic Damage and Electroacupuncture-Induced Metabolic Change -

†MORI Yuki

Department of Neurosurgery, Graduate school of Acupuncture and Moxibustion, Meiji University of Oriental Medicine

Abstract

Introduction: The hippocampus has a high potential to reproduce neurons after degenerative disorder or ischemic damage. Its dysfunction is known to be closely correlated to dementia and varioun mental diseases. For this reason, the development of new techniques to evaluate cell degeneration and metabolism in the hippocampus is highly desired.
Manganese chloride ($MnCl_2$) alters the magnetic resonance (MR) signal intensity by changing the longitudinal relaxation time (T_1) and signal enhancement is detected in T_1-weighted MRI. Manganese enters the ventricles via the choroid plexus within a few minutes after systemic administration and can enhance hippocampal formations in one day. This imaging method is called Manganese-enhanced MRI (MEMRI). Recently, various reports have demonstrated that electroacupuncture (EA) has the potential to increase brain cell metabolism. This study suggests MEMRI has the potetial to visualize hippocampal metabolic changes in rats after transient forebrain ischemia and EA stimulation.
Materials and Methods: Two examinations were performed. 1) Nine male Wistar rats were divided into a sham-operated control group and a group subjected to transient forebrain ischemia. A 10-minute transient forebrain ischemia was induced using the four-vessel occlusion method described by Pulsinelli. Fourteen days after ischemia, the animals were infused with a 50mM $MnCl_2$ solution from the tail vein. Two days later, MR images were acquired. 2) Eleven male Wistar rats were divided into a control group without stimulation (NS) and an electroacupuncture group (EA). All animals were infused with 50mM $MnCl_2$ solution from the tail vein. For the EA group, five hours after $MnCl_2$ infusion, two acupuncture electrodes were placed on the right side of the posterior region of the neck and inserted 10mm subcutaneous ly and connected to a stimulator. There after 5-8mA electric stimuli were given for one millisecond each. Stimulus frequency was alternated every two minutes between two and 20Hz. Stimulation was conducted for 60 minutes. After the stimulation, MRI was performed using a 4.7 Tesla MR scanner (Bruker Medical, Germany). Coronal and horizontal slices of T_1-weighted MRI were acquired using a conventional spin-echo sequence with a volume coil.
Results: In contrast to the sham group, signal enhancement of the CA1 region could not be observed on MEMRIs from the ischemia group 14 days after the occlusion. This finding coincides with necrobiotic histological findings.
In the EA experiment, both areas, CA1 and DG, were enhanced in the EA-treated group after six hours, while enhancement of the same structures could only be seen in the control group after 24 hours.
Discussion: Delayed ischemic changes in the hippocampal region after transient forebrain ischemia as well as increased manganese uptake to the hippocampus due to EA stimulation were sensitively detected using MEMRI. Manganese uptake from the fimbria hippocampus to the CA1 region and the dentate gyrus was significantly accelerated by EA stimulation due to increased metabolism in the stimulated hippocampal nerve cells. We therefore suggest that MEMRI is new *in vivo* imaging technique that provides not only morphological information but also information on the metabolic activity of hippocampal cells.

Received on November 18, 2004 ; Accepted on January 6, 2005
† To whom correspondence should be addressed.
Meiji University of Oriental Medicine, Hiyoshi-cho, Funaigun, Kyoto 629-0392, Japan