解 説

神経-グリア回路と磁気共鳴スペクトロスコピー (MRS)

高 堂 裕 平

量子科学技術研究開発機構 脳機能イメージング研究部 脳疾患トランスレーショナル研究グループ*

Neuron-Glia Circuit and Magnetic Resonance Spectroscopy (MRS)

Yuhei Takado

Brain Disorder Translational Research Group, Department of Functional Brain Imaging,
National Institutes for Quantum and Radiological Science and Technology*

概要

近年、神経科学領域における神経回路の評価において、非侵襲にマウスからヒトまで共通して用いることのできる磁気共鳴画像装置 (MRI) の利用が広まってきている。技術の進歩により装置が高磁場化し、より一層その有用性が増している。磁気共鳴スペクトロスコピー (MRS) は、高磁場化の恩恵を受けた撮像法の一つであり、脳の局所における脳内代謝物の測定を可能にする手法である。本手法を用いることで、脳の一定領域における神経伝達物質、エネルギー代謝に関わる代謝物、浸透圧調整物質等、種々の脳内代謝物の測定が可能となる。本稿では、神経回路の評価に有用な分析手法である MRS の概要について紹介し、MRS で測定される脳内代謝物から伺える神経-グリアカップリングの脳機能における重要性についても述べてみたい。

1. は じ め に

磁気共鳴スペクトロスコピー (Magnetic Resonance Spectroscopy: MRS) は構造を主体とする脳画像と異なり、脳の特定部位の機能情報を取得する分析技術である。原理としては、通常の MR 画像では水分子の水素原子由来の信号を利用するのに対し、MRS では水信号を抑制し、水分子よりもずっと低濃度の脳内代謝物の水素原子由来の信号を測定する。この原理に基づき、MRS では生体の脳において選択した脳の関心領域の代謝物量を測定する。比較対象 (病態研究の場合は野生型モデル、もしくは同一対象の経時的な比較) との差異から測定した代謝物濃度の増減を考え、脳機能を推測する分析手法である。他の一般的な全脳を対象とする画像技術では、撮像後の解析によって情報を活用することができるが、MRS は撮像後に新たな測定領域を追加することはできないため、実験前の計画が非常に重要である。その実験計画を考えるには、次の点を理解することが求められる。

①MRS で脳機能の何がわかるのか。②データ取得方法。③データの解析方法。④データの解釈。

これらに習熟するには、MRS を使用してみるこ

が最も手っ取り早い。上記を理解しやすく記載された和書は数少なく、MRS の神経科学領域における利用が増えにくい原因となっていると思われる。そこで本稿では、MRS の強みや特徴について初学者にも理解しやすいよう極力専門用語は避けて記載し、読者の皆様に MRS の概要を理解しやすい記載となることを心掛けた。近年、MRS 撮像に関するハードウェア及びソフトウェアの両面の進化により脳内代謝物測定の定量性が高まり MRS の利便性が増している。本稿がいくらかでも読者に有益な情報を提供し、MRS が神経回路そして神経-グリアカップリングの評価に一層有効に利用される技術となることを期待する。

2. MRS で神経回路をどのように評価できるのか

本章では MRS で神経回路をどのように評価できるのかについて述べてみたい。MRS 実験で得られる情報は、使用する MRI 装置の磁場強度や撮像シーケンスによって異なるが、マウスやラットの小動物用は通常は超高磁場装置 (7T 以上) が用いられる。磁場強度が高いほど検出できる代謝物の種類が増え、撮像時間も短縮できる一方で、磁場の不均一性が増しやすいくともあり、部位によっては撮像しにくい脳領域があることも知っておきたい。マウス脳を対象とした場合、

* 〒 263-8555 千葉県千葉市稲毛区穴川 4-9-1

図1 マウス脳のスペクトル例．脳皮質の領域から約15分間の測定によりこのようなスペクトルが得られる．一番上がRawデータ，2番目がフィッティング後のスペクトル，3番目がそれらの差分，そして以後は各代謝物のピークを示す．

7T装置でも磁場の不均一性が問題となることは少なく安定して各脳領域で撮像できる．さらにはクライオプロープといった高性能の検出用コイルを用いることで信号雑音比 (SNR) を2倍以上に，すなわち7T装置であれば14Tに相当する性能で脳内代謝物を測定できる．代表的な脳内代謝物のスペクトル上の位置については図1で示し，関心領域の大きさについての目安は図2に示した．また，検出できる脳内代謝物とその代謝物の意義については表1にまとめた．MRSの脳内代謝物量の変動を解釈するには各脳内代謝物の意義の理解が不可欠である．

小動物用MRI装置 (7T以上) で測定できる脳内代謝物としては，N-アセチルアスパラギン酸 (NAA)，

コリン含有化合物 (Cho)，クレアチン (Cre)，ミオイノシトール (mI)，グルタミン酸 (Glu)，グルタミン (Gln)， γ -アミノ酪酸 (GABA)，グルタチオン (GSH)，アミノ酸やグルコース，乳酸等があげられる．Creは脳内に比較的均一に存在することから各脳内代謝物濃度の標準化の指標として用いられ，NAA/Cr等と表記することが多い．NAAは神経細胞のミトコンドリアで生成されることから，神経機能を反映するマーカーとされる．Choは細胞膜のターンオーバーの指標とされ，腫瘍などの細胞増殖が盛んな病変で増加する．mIはアストロサイトに多く存在するとされ，アストロサイトのマーカーとして利用されることが多い¹⁾．Glu，GABAはそれぞれ興奮性・抑制性の神経伝達物質であ

表 1 代表的な脳内代謝物

名称	略称	ケミカルシフト (ppm)	意義
N-アセチルアスパラギン酸	NAA	2.01, 2.60	神経細胞のミトコンドリアで産生され、神経マーカーとされる。
コリン含有化合物	tCho	3.22	細胞膜に存在し、細胞増殖で増加する。
クレアチン	tCr	3.02, 3.94	エネルギー代謝に関与し、脳内に均一にひろがる基準値として用いる。
ミオイノシトール	mI	3.56, 4.06	アストロサイトに存在し、グリオーシスの指標とされる。
グルタミン酸	Glu	2.04, 2.35, 3.75	プレシナプスに高濃度に存在する興奮性神経伝達物質。
グルタミン	Gln	2.12, 2.46, 3.76	アストロサイト内でグルタミン酸からグルタミンに変換される。
GABA	GABA	1.89, 2.28, 3.01	抑制性神経伝達物質。
グルコース	Glc	3.43, 3.80	エネルギー代謝に関与。
乳酸	Lac	1.33	グルコースから乳酸に代謝されて神経細胞にて利用されるとの説あり。
グルタチオン	GSH	3.77	酸化ストレスの指標。
タウリン	Taur	3.246, 3.420	浸透圧調整物質。

図2 マウス脳の関心領域の例。一度に1か所の測定が行われ、磁場強度により変動するが、筆者の所属する施設では1か所あたり20分弱の測定となる。

り、脳活動における興奮・抑制バランスの評価に用いられる²⁾。

3. MRS データの取得方法

MRS データをどのようにとるかの概略を模式図に示した(図3)。MRSは試験管内の内容物の分析(量の測定や蛋白構造の解析)に用いる核磁気共鳴分光法(NMR)の生体版ととらえていただくとイメージしやすいと思われる。実際の測定の手順としては以下ようになる。1. はじめに関心領域(VOI)を決定する。冒頭にも記載したが、VOIを設定するには脳の何を調

べるのか、目的を事前に検討しておくことが重要である。検討した脳部位のスペクトルに病態による変化が出ているかを判断するには基準となる値が必要であるため、複数例において同一の領域を撮像することが重要である。例外としては、同一被験者での経時的な変化をみる場合がある。その場合においても、同一箇所の経時的な変化となるため撮像は特定のVOIを決めることが必要である。VOIの大きさは加算回数の増減により調整が可能である。なお、MRI撮像のときのSNRと同様に、MRSにおいても下記があたりまえのため、それぞれのMRS撮像条件(関心領域のサイズ、加算回数)を設定する際に参考にされたい。

(式) $(\text{SNR}) \propto (\text{静磁場強度}) \times (\text{関心領域の脳容積}) \times (\sqrt{\text{加算回数}})$

上記の式から、例えば7Tと14Tで同じ領域のスペクトルを取得しようとする、理論的には14Tでは4分の1の加算回数で済むことがわかる。また、ケミカルシフトの影響により高磁場のほうがスペクトルで見られるピークの分離がよくなるため、個々のピークの検出のしやすさも高くなる。2. シミングと呼ばれる操作でVOI内の磁場の均一性を整え撮像を行う。代謝物を測定したのちに、水抑制を行わない方法で少ない加算回数で水信号を取得しておく、各代謝物の濃度を算出することができる。時間の制約があり、水信号を取得できない場合は、Cre比での検討を行う。

マウスやラット等の小動物の実験では麻酔での鎮静が通常であったが、麻酔はさまざまに脳機能に影響することが知られている。そこで筆者の所属する研究部

NMR: 試験管内の内容物を分析する手法 ⇒ *in vivo* NMR = MRS

図3 MRS の概要を図示. NMR は試験管内の内容物を分析する手法であるが, MRS はいわば *in vivo* NMR ととらえると理解しやすいかもしれない.

では覚醒下での実験系も構築し測定に成功している²⁾. 覚醒下では脳活動時の MRS を測定することが可能となり, 通常の静的な状態の MRS と区別するために functional MRS (fMRS) と呼ぶこともある. 技術的難易度は上がるが, 評価内容が異なってくるため覚醒下での MRS 測定では注意点も多い. 詳細は総説を参照されたい³⁾.

MRS 実験後は, Raw データを解析する手順が必要となる. その解析にはこれまで LCModel (エルエイシステムズ) という商用ソフトが国内外で広く用いられている. 脳内の水濃度を参照とし, Basis set と呼ばれる基準代謝物データを用いて, 各代謝物濃度を算出することができるソフトである. LCModel による解析の一部を図 4 に示した. この商用ソフトは長らく開発者の Stephen Provencher 氏の労により改良が行われてきたが, 最近開発者が引退を宣言したため, LCModel はフリーソフトとなった. 参照下リンク⁴⁾で入手可能であるが, ユーザーインターフェース等がまだ整っていない点もあり, もうしばらくフリー版の運用には時間を要すると見込まれる. さらに LCModel 以外のフリーソフトも報告されており, 今後は解析手法が今一度国際磁気共鳴医学会での MRS コミュニティで検討される可能性があるため, 動向を注視する必要がある.

4. MRS データの解釈と MRS の強み

Raw データを解析し各種脳内代謝物濃度を得たのち, その解析結果を解釈するには基準値との比較が重

要である. 同一対象との経時的比較であれば前回の値を基準値に, 異なる対象との比較であれば複数の対象動物の値を基準値として用いる. 脳の領域によって代謝物の値は異なるため, 脳の同一領域での測定が必要で, なおかつ撮像条件 (シーケンスや MRI マシン, 解析条件等) をそろえることが必要となる. 基準値と比べて, 例えば先述の NAA が低下していれば神経障害や神経機能障害の可能性が推測され, mI の値が変動していればアストロサイトの機能変化を考慮することとなる.

MRS で測定される脳内代謝物濃度は, 関心領域内に局在する総量を反映し, 細胞内・細胞外の区別は行われない. 細胞内・細胞外の区別を行うには, マイクロダイアリシス等を用いることが必要となる. 一方, 細胞内・細胞外の区別ができずとも, 非侵襲に脳内代謝物濃度を測定できるメリットは大きく, マウスやラットでの測定手法をダイレクトにヒトに応用できるのが最大の利点である. 近年の医学研究において常に出口を求められる風潮には賛否両論あると思われるが, 神経科学研究の究極の目標はヒト脳の理解であることには間違いなく, 今後もトランスレーショナル研究の重要性は疑いがない. したがって, 神経科学領域においても今後 MRS の活用の幅が広がることと想像される.

5. MRS で神経-グリアカップリングを評価する

アストロサイトは脳の最大のエネルギー源であるグルコースを乳酸に変換し, その乳酸は神経細胞へ輸送

図4 マウス脳の海馬におけるスペクトルのLCModel解析結果の例。黒色の波形がRaw データであり、赤色の波形がフィッティング後のデータである。黄色枠で囲んだ数値が脳内代謝物濃度であり、赤色枠で囲んだのが脳内分子の種類である。

されて消費される、というアストロサイト-ニューロン乳酸シャトル（ANLS）仮説が先行研究により示されてきた⁵⁾。さらに近年、アストロサイトはグルコースからグルタミン酸を生成し、Volume-regulated anion channel（VRAC チャンネル）を通し神経活動を制御する可能性も示されてきた⁶⁾。筆者らは、MRS 及び二光子顕微鏡を用いた検討で、グルコース投与後にマウスの脳内グルタミン酸濃度が上昇し、神経活動の上昇が持続的に引き起こされることを見出した⁷⁾。これは、アストロサイトのグルコース代謝を介した新たな興奮・抑制バランスの制御機構である可能性が示唆される。

アストロサイトは容積変化を示しうる細胞である⁸⁾。これまでの種々の先行研究から、アストロサイトの容積変化によって生じる生体微小フローを介した浸透圧調整物質（タウリンや mI, グルタミン酸）を主とする脳内代謝物の移動が、広域な神経活動の調整に寄与する可能性を筆者は考えている。毛内らは、電気刺激法

によりアストロサイト活動性を操作可能であることを見出している⁹⁾。さらに非侵襲に脳深部の刺激が可能な超音波でのアストロサイト賦活が報告され、注目を集めている¹⁰⁾。アストロサイトの容積変化が形成する生体微小フローに伴っておこる浸透圧調整物質（グルタミン酸、タウリン等）の脳の隙間の移動は、神経活動の興奮/抑制バランスに作用するのか、そして超音波刺激によるアストロサイト賦活は、神経の興奮・抑制バランスの修飾を行えるのか。このような問いの解決に、MRS を用いたマクロイメージングで得られる情報が有用であると考えている。

6. おわりに

MRS 実験を測定系に用いるには、まずトライしてみることが必要である。ターゲットとする動物（ないしヒト）を決め、その対象動物（被験者さん）及びコントロール群に対し同一領域での MRS 実験を行って

みる．そして解析を行い，結果をみてばらつきの程度を確認する．再テスト信頼性で測定結果に数パーセントの変動が言われているため，疾患と健常の比較を可能にするにはそれ以上の差の検出が必要となることに留意する．本稿がいくらかでも神経科学者の MRS 実験への興味を掻き立てるものとなることを願う．

謝辞

本稿を執筆するにあたって，量研・脳機能イメージング研究部の樋口真人部長をはじめ，覚醒下測定ツールを共同開発した田桑弘之博士，多くの実験を支えてくださった内田翔子さん，新田展大博士，その他皆様の多大なるご支援・ご協力に改めて感謝申し上げます．

参 考 文 献

- 1) Takado, Y., Igarashi, H., Terajima, K., et al. (2011): Brainstem metabolites in multiple system atrophy of cerebellar type: 3.0-T magnetic resonance spectroscopy study, *Movement Disorders*, Vol.26(7), pp.1297–1302.
- 2) Takado, Y., Takuwa, H., Sampei, K., et al. (2020): MRS-measured Glutamate versus GABA reflects excitatory versus inhibitory neural activities in awake mice, *bioRxiv*, 2020.10.25.353888.
- 3) Just, N. (2020): Proton functional magnetic resonance spectroscopy in rodents, *NMR in biomedicine*, p.e4254.
- 4) <http://s-provencher.com/lcmodel.shtml>.
- 5) Pellerin, L., Magistretti, P.J. (1994): Glutamate uptake into astrocytes stimulates aerobic glycolysis: a mechanism coupling neuronal activity to glucose utilization, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, Vol.91(22), pp.10625–10629.
- 6) Yang, J., Vitery, MdC., Chen, J., et al: (2019): Glutamate-releasing SWELL1 channel in astrocytes modulates synaptic transmission and promotes brain damage in stroke, *Neuron*, Vol.102(4), pp.813–827.e6.
- 7) Kubota, M., Shimojo, M., Takado, Y., et al. (2021): Dynamic alterations in the central glutamatergic status following food and glucose intake: in vivo multimodal assessments in humans and animal models, *JCBFM*, in press.
- 8) Danny, L., Sergei, B., Volodymyr, G., Simard, J.M. (2007): Cytotoxic edema: mechanisms of pathological cell swelling, *Neurosurgical Focus FOC*, Vol.22(5), pp.1–9.
- 9) Monai, H., Ohkura, M., Tanaka, M., et al. (2016): Calcium imaging reveals glial involvement in transcranial direct current stimulation-induced plasticity in mouse brain, (2041-1723 (Electronic)).
- 10) Oh Sj Fau-Lee, J.M., Lee Jm Fau-Kim H.-B., Kim Hb Fau-Lee J., et al. (2019): Ultrasonic Neuromodulation via Astrocytic TRPA1, (1879-0445 (Electronic)).