

Studies on Quantitative Double-Labeled Autoradiography in the Rat Brain Using N-isopropyl-p-[125I]iodoamphetamine and 3H-deoxyglucose

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/7936

ラット脳における N-isopropyl-p-[¹²⁵I] iodoamphetamine と ³H-deoxyglucose を用いた定量的二重標識オート ラジオグラフィに関する研究

金沢大学医学部核医学講座 (主任：久田欣一教授)

隅 屋 寿

(昭和62年2月13日受付)

N-isopropyl-p-[¹²⁵I] iodoamphetamine (¹²⁵I-IMP) と ³H-deoxyglucose (³H-DG) による定量的二重標識オートラジオグラフィを 2,2-dimethoxypropane (DMP) を用いた化学洗浄法により行うための基礎的検討を行い、また実際の脳圧迫モデルの血流と代謝を同時に測定することによりその病態を脳循環代謝の面から検討した。標準線源の材料をゼラチン、脳ホモジネート、市販品で比較検討した結果、ゼラチンを用いれば簡便で正確なものが得られることがわかった。DMP による 3 時間の洗浄で ¹²⁵I-IMP の 98% が洗いだされたが、³H-DG は全く変化を受けず、また厚さ 6 μ のポリエチレンの膜によって ³H-DG のベータ線は完全に遮蔽された。したがって cross-contamination は 2% 以下であった。ラミナリアを用いて脳を圧迫し緩徐な脳圧迫モデルを作製することができた。このモデル 14 匹の脳血流および脳グルコース代謝を正常ラット 5 匹とともに測定した。オートラジオグラムをデジタル化し標準線源とデジタル値を比較することにより、脳局所の血流値およびグルコース代謝率を求めた。正常ラットでは血流、代謝はほぼ相関し両者の比であるグルコース・血流比 (glucose flow ratio, GFR) は 0.58 から 0.88 ($\mu\text{mol/ml}$) の間であった。24 時間圧迫モデルの圧迫部位では血流、代謝とも低下したが血流の低下が強く、GFR が増加し、嫌気性解糖によるものと考えられた。非圧迫部位では血流の低下と代謝の増加がみられ、その原因は脳浮腫によるものと考えられた。48 時間モデルの圧迫部位は壊死に陥っていたが、非圧迫部位では血流、代謝とも低下し GFR は正常化した。これは 24 時間後よりさらに脳浮腫が進行した結果と考えられた。このように脳圧迫モデルでは血流と代謝の時間的、空間的解離がみられた。この二重標識オートラジオグラフィ法は従来の方法に比べ、施行が容易で定量性にも優れており、種々のモデルの血流と代謝を同時に評価でき、各種の脳病態把握に有用な手段である。

Key words N-isopropyl-p-[¹²⁵I] iodoamphetamine, ³H-deoxyglucose, 2,2-dimethoxypropane, cerebral blood flow, cerebral glucose metabolism

中枢神経機能をそれと密接な関係をもつ脳血流、脳代謝でとらえようとする努力は、Kety ら¹⁾の N_2O をトレーサーとする全脳平均循環測定法に始まり、現在まで多くの研究者によって続けられている。そして脳の機能局在という観点から、脳の局所変化をとらえる脳局所循環測定法が開発され、現在では実際の臨床応

用が活発になされている。一方、種々の病態の患者の循環代謝動態を理解するためには、モデル動物における基礎的検討が重要であり、現在まで数多くの報告がみられる。この際、Landau ら²⁾により始められたオートラジオグラムを用いる方法は、Aukland ら³⁾により開発された水素クリアランス法に比べ、繰り返し測定

Abbreviations: CBF, cerebral blood flow; DG, deoxyglucose; DMP, 2,2-dimethoxypropane; GFR, glucose flow ratio; ³H-DG, ³H-deoxyglucose; IAP, iodoantipyrine; ¹²⁵I-IMP, N-isopropyl-p-[¹²⁵I] iodoamphetamine; rCBF, regional cerebral blood flow; rCMRgl, regional cerebral metabolic rate for glucose; rGFR, regional glucose flow ratio.

はできないものの、全脳の局所循環代謝動態が同時に測定できるため広く普及している。しかし、初期の報告⁴⁾⁵⁾では血流、代謝の一方のみしか測定しないことが多く、病的状態での血流、代謝の解離を同一モデルで捉えることが困難であった。しかし、最近では同一モデルに二種類のアイソトープを投与して、血流と代謝を同時に測定する二重標識オートラジオグラフィ法が報告されるようになってきた。これには二つの核種の半減期の差を利用する半減期法^{6)~11)}と、いずれか一方の核種を洗いだす化学洗浄法^{12)~15)}がある。前者の方が現在一般的であるが、一方 shelf-life にとらわれず、投与量の少なくてもよい、後者の化学洗浄法も Diemer ら¹²⁾¹³⁾によって報告され、有力な方法と考えられる。彼らは ¹⁴C 標識の iodoantipyrine (IAP) と ³H 標識の deoxyglucose (DG) を用いて、2,2-dimethoxypropane (DMP) により IAP が 100% 洗いだされたが、DG は全く洗いだされなかったと報告している。しかし、その後の検討で、2 日ないし 5 日間の洗浄でも IAP が完全に洗いだされず、またその場合、DG の一部も洗いだされるとの報告¹⁴⁾¹⁵⁾もみられ、洗浄時間、洗浄方法などについて詳細な検討が必要である。Diemer らが用いた IAP に対して、最近開発された N-isopropyl-p-[¹²⁵I] iodoamphetamine (¹²⁵I-IMP)^{16)~18)} は IAP に比べ脳血液分配係数 λ が高く、脳組織からの洗いが遅いため、血流の高い部位でも投与後約 2 分以内では λ の変化は無視でき、また計算式も簡便である^{5)18)~20)}。本研究の目的はこの DMP による化学洗浄法において、IAP に比べて脳血流用剤として優れている ¹²⁵I-IMP をグルコース代謝用剤である ³H-DG と同時に使用する二重標識オートラジオグラフィ法を確立し、さらに実際のモデルラットの血流と代謝を同時に測定することにより、その病態を脳循環代謝の面から解明することにある。

材料および方法

I. 基礎的検討

1. 定量化の為の標準線源の作製に関する検討

オートラジオグラフィで得られたイメージを定量化するためには標準線源が必要である。今回は、実際の脳組織と同じ程度の放射線吸収能を持つものとして、水 10 g にゼラチンを 2.5 g の割合で溶かし、これに既知濃度の ³H-DG を加えて凍結させた厚さ 20 μ の切片を標準線源として用いた。この既知濃度の標準線源をフィルムに露光させその黒化度と濃度との関係を求めた。また同時に脳ホモジネートにより作成した標準線源、および市販品の標準線源 ³H-マイクロスケール (アマシャム、英国) も同じフィルムに露光させ比較検

討した。

2. cross-contamination の検討

二重標識オートラジオグラフィ法で得られたイメージを独立に定量化するためには、オートラジオグラム上における 2 種類の核種の互いの影響、すなわち cross-contamination を最小にする必要がある。本論文の方法では DMP の洗浄力及び ³H 遮蔽に用いるルミラ膜の遮蔽力が問題となる。

1) DMP による ¹²⁵I-IMP の洗浄力

DMP の洗浄力をみるために ¹²⁵I-IMP のみを 10 μ Ci 静注したウイスターラットを静注 2 分後に断頭し、速やかに脳を摘出し、ドライアイスにて -70°C に冷却したヘキサンで凍結した。凍結した脳から 20 μ の連続切片を作成した。この切片を 15 枚ずつ 6 つのグループに分け DMP で満たしたガラス容器の中で震盪しながら洗浄し、0 分、10 分、30 分、1 時間、2 時間、3 時間後のそれぞれのグループの放射能をウェル型シンチレーションカウンターで測定した。切片をグループ分けするときはスライスのずれによる放射能の違いを少なくするため、6 つおきに切片を 15 枚ずつ集めた。また ³H-DG のみを 200 μ Ci 静注したウイスターラットを静注 45 分後に断頭し、¹²⁵I-IMP の時と同様に連続切片を作成し 4 つのグループに分け、DMP で 0 分、1 時間、2 時間、3 時間洗浄後、切片をかきとり、液体シンチレーションカウンターにて放射能を測定した。一方、ウルトロフィルム (LKB, スウェーデン) に 2 か月間切片を露光させ黒化度を測定した。

2) ルミラ膜による ³H-DG のベータ線の遮蔽力、および ¹²⁵I-IMP のガンマ線に対する影響

³H のベータ線の遮蔽に用いる厚さ 6 μ の均一なポリエチレン製のルミラ膜の遮蔽力を見るために 1) で作成した ¹²⁵I-IMP のみを投与したラットと ³H-DG のみを投与したラットの 2 種類の切片にルミラ膜をかぶせ、かぶせない切片と同時に 2 か月間露光させそれぞれのフィルムの黒化度を比較した。

II. 動物実験

脳圧迫モデルを作成しオートラジオグラフィを施行した。使用したのは雄性的ウイスターラット 19 匹 (体重 250~500 g) で、うち 5 匹が正常、5 匹が 24 時間圧迫モデル、9 匹が 48 時間圧迫の脳圧迫モデルである。ラットは実験施行 24 時間前より水以外は絶食とした。また実験中に動脈血ガス分析を施行し、PaO₂、PaCO₂、pH、および平均動脈血圧を測定した。

1. 正常ラット

ネブタール麻酔 (30 mg/kg) 下に気管切開後、チューブを挿入し気道を確保した。その後股動静脈にポリエチレンチューブ SP-31 (夏目製作所、東京) を用い

てカニューレーションを行った。次に³H-DG (New England Nuclear 社, 英国) を 100 μCi (比放射能 5 mCi/μmol) 静注し, 静注 43 分後まで動脈血を約 60 μl ずつ経時的に 14 回採血した。動脈血サンプルは直ちに遠心して血漿を分離し, ³H とグルコースの濃度測定に用いた。血漿グルコース濃度は標準酵素反応により測定した。静注 43 分後に ¹²⁵I-IMP (日本メジフィジックス社, 宝塚) を 50 μCi (比放射能 1 mCi/mmol) 静注し, 2 分後まで同様に動脈血を 35 μl ずつ 10 回採血した。この動脈血サンプルは血中 ¹²⁵I-IMP の放射能濃度測定に用いた (図 1)。動脈血中の代謝されていない脂溶性の ¹²⁵I-IMP の割合を以下の方法で求めた。すなわち動脈血 20 μl にオクタノールを 2 ml 混ぜ, ボルテックスミキサーで 1 分間攪拌し 2000 回転/分で 10 分間遠心した。これによって脂溶性の IMP はオクタノール層に移行する。遠心後, オクタノール層を 1 ml とり全血のカウントに換算することによって, 代謝されていない真の ¹²⁵I-IMP の割合を求めた。2 分後すなわち ³H-DG 静注 45 分後にラットを断頭し I. 2. 1) と同様に, 厚さ 20 μ の連続切片を作成した。血流イメージは切片にルミラ膜をかぶせて ³H-DG のベータ線を遮蔽し X-Omat AR フィルム (Kodak, 米国) に 1, 2 か月露光させることによって得られた。代謝イ

メージは DMP で切片を 3 時間洗浄して ¹²⁵I-IMP を洗いだし ³H 専用のウルトロフィルムに 1, 2 か月露光させることにより得られた。時間節約のため同一切片ではなく, 隣合った切片を血流用, 代謝用として用いた。定量化のため既知濃度の標準線源を I. 1. の方法でゼラチンを用いて作製し, 切片と同じフィルムに露光させた。また ³H-DG によるグルコース代謝のオートラジオグラフィを施行する際に, DMP で洗浄した切片の一部にルミラ膜をかぶせておき, その部分が露光していないか毎回確認した。

得られたオートラジオグラム像を CCD カメラ TI-22A II (NEC, 東京) とパーソナルコンピュータ PC-9801 およびイメージメモリーボード [256×256 pixel×6 bit (64 段階)] (ADS, 奈良) を用いてデジタル化し, 標準線源の放射能濃度と, そのオートラジオグラムの黒化度をデジタル化した数値との間の相関及び回帰式を求めた。図 2 にデジタル装置のブロック図を示す。ラット全脳 18 か所の部位で関心領域をとりそれぞれのデジタル値を求め, この式により脳内各所の ¹²⁵I-IMP および ³H-DG の濃度を算出した。各部位は皮質として, 視覚領野, 聴覚領野, 頭頂葉, 体性感覚野, 前頭葉の 5 か所, 皮質下核として外側視床, 視床下核, アンモン核, 尾状核, 淡蒼球, 黒質, 上丘の

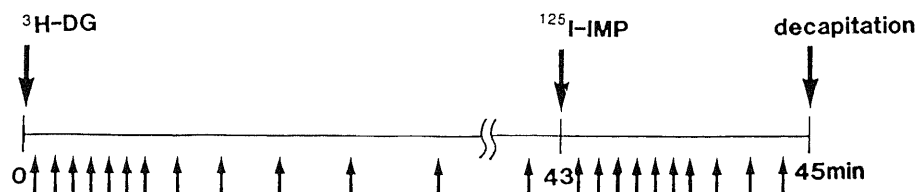


Fig. 1. Procedure of the measurement of simultaneous autoradiographic technique. Arrows indicate arterial blood sampling time.

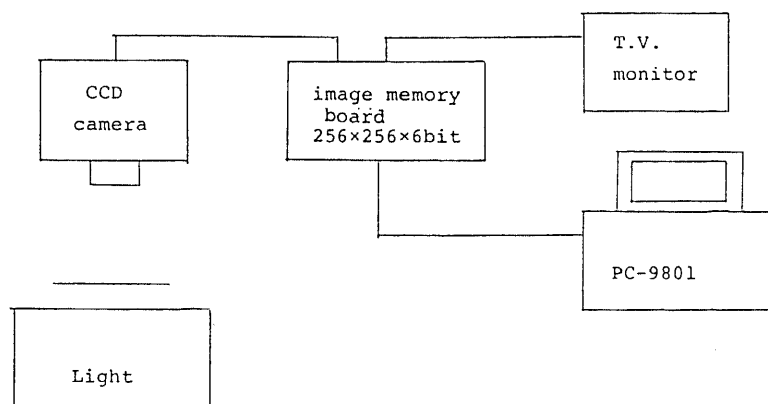


Fig. 2. Schematic diagram of digitizing system.

7か所, 脳幹部として蝸牛神経核, オリーブ, 下丘, 外側毛帯の4か所, 白質として脳梁と内包の2か所である。これらの位置は Paxinos ら²¹⁾の解剖図譜によった。局所脳血流値 (regional cerebral blood flow, rCBF) は reference sample 法²²⁾²³⁾を用いて以下の式により求めた。

$$F = \frac{Cb(T)}{\int_0^T Ca(t) dt}$$

ここで F は CBF 値 (ml/100 g/min), Cb(T) は T 分におけるラットの脳組織内放射能濃度 ($\mu\text{Ci/g}$), T は IMP 静注から断頭までの時間 (ここでは2分), Ca(t) は動脈血中の代謝されていない真の IMP 放射能濃度の時間的経過である。局所脳グルコース代謝率 (regional cerebral metabolic rate for glucose, rCMRgl) は Sokoloff ら²⁴⁾の式を用いて計算した。ただし, 血中グルコース濃度が 300 mg/dl を越える高血糖のラットは rCMRgl 測定に信頼がおけないため対象から除外した。反応速度および集中定数は文献値²⁴⁾を用いた。得られた rCMRgl 値を rCBF 値で除することにより局所グルコース代謝・血流比 (regional

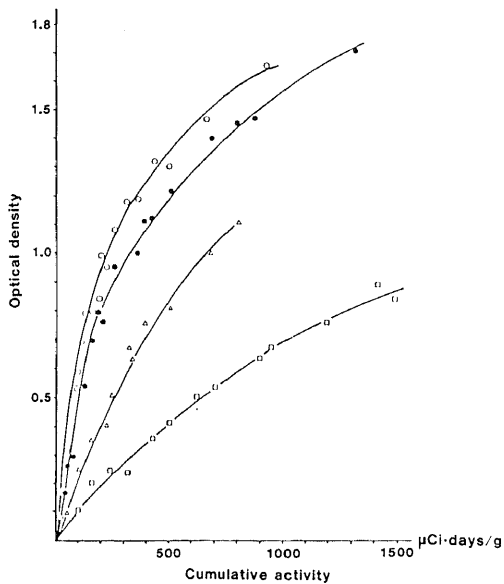


Fig. 3. Relationship between cumulative activity of standard and optical density. Materials of standard: ○—○, gelatin; ●—●, brain homogenate; △—△, commercially-available standard scale (tissue equivalents); □—□, commercially-available standard scale (polymer layers).

glucose flow ratio, rGFR) ²¹⁾を算出した。

2. 脳圧迫モデルラット

脳圧迫モデルラット作製のため, 海藻の一種であるラミナリアを用いた, これは15時間で約5倍に膨張する。ネブタール麻酔 (30 mg/kg) 下でラットの右体性感覚野直上の右硬膜外腔に, 抗生剤にて処理した 0.006~0.009 ml のラミナリアを留置した。24 時間後, および 48 時間後に正常ラットと同様にオートラジオグラフィを施行した。ラットを断頭後, ラミナリアを取り出し体積を測定した。得られたオートラジオグラムをデジタル化し, 正常ラットと同じ部位に左右とも関心領域をとり rCBF, rCMRgl, rGFR を求めた。得られた値を左右対応する部位で健側と患側と比較し, 有意差を検定した。また正常ラットで得られた値を正常値として患側, 健側とも正常値と比較し有意差を検定した。また圧迫部位の皮質は圧迫直下, その周辺, さらにその周辺と細かく関心領域をとり rCBF, rCMRgl, rGFR を求め健側および正常値と比較し有意差を検討した。また18箇所の部位を皮質, 皮質下核, 脳幹部, 白質の4つに分類し, 経時的に評価した。さらにモデルラットのオートラジオグラムをデジタル化し, CMRgl 像を CBF 像で除することにより GFR イメージを作製し視覚的評価も行った。

3. 統計学的検定法

得られたデータは平均±標準誤差 (mean±SEM) で表示した。患側と健側の有意差は paired t-test, 正常値との有意差は unpaired t-test により, それぞれ 5% 以下の危険率で有意差を検定した。

成 績

I. 基礎的検討

1. 定量化の為の標準線源の作製に関する検討

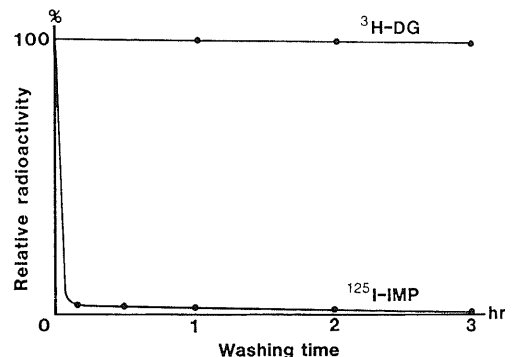


Fig. 4. Relationship between washing time by 2, 2-dimethoxypropane and relative activity of slice.

図3は標準線源の濃度と黒化度との関係である。ゼラチンによる標準線源、脳ホモジネートによる標準線源および市販の標準線源はいずれもその黒化度とよく相関していたが、ゼラチンによる標準線源が最も脳ホモジネートによる標準線源と類似した曲線が得られた。市販品の標準線源は組織吸収による補正を行っても濃度が濃くなるにつれ脳ホモジネートの曲線との違いが大きくなった。

2. cross-contamination の検討

1) DMP による ^{125}I -IMP の洗浄力

DMP による洗浄で ^{125}I -IMP を投与したラットの脳切片の放射能は10分で急激に減少し3時間後には2%以下に減少したが、 ^3H -DG を投与したラットの脳切片の放射能には変化がなかった(図4)。露光後のイメージで、 ^3H -DG を投与したラットの脳切片は洗浄を行っていない切片と黒化度において有意の変化はなかった。

2) ルミラ膜による ^3H -DG のベータ線の遮蔽力、

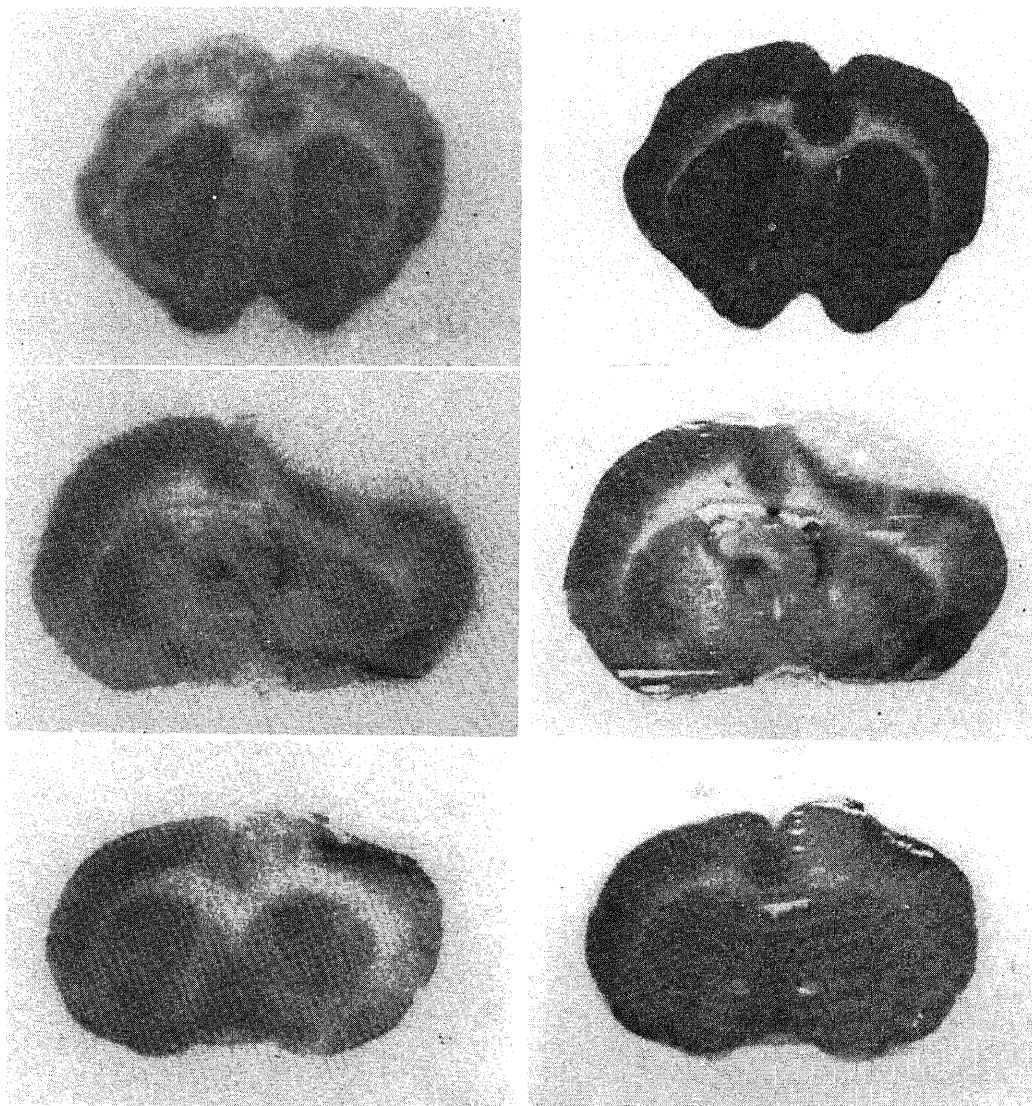


Fig. 5. 5a. Examples of autoradiograms of CBF (left) by N-isopropyl-p-[^{125}I] iodoamphetamine and CMRgl (right) by ^3H -deoxyglucose at the level of caudate putamen, upper row: normal rat, middle row: model rat 24hr after gradual compression, lower row: model rat 48hr after gradual compression.

および¹²⁵I-IMPのガンマ線に対する影響

切片にルミラ膜をかぶせて露光させると¹²⁵I-IMPを投与したラットの脳切片によるオートラジオグラムの黒化度に変化はなかったが、³H-DGを投与したラットの脳切片は全く露光を示さなかった。したがってルミラ膜による³H-DGのベータ線の遮蔽は完全であり、¹²⁵I-IMPのガンマ線に対する影響も無視できる。

II. 動物実験

使用したラットのPaO₂, PaCO₂, pH, 平均動脈圧はそれぞれ82.1±2.6 mmHg, 39.2±0.4 mmHg, 7.361±0.006, 132±6 mmHg (mean±SEM)であった。オクタノール抽出率は0.80±0.005 (mean±

SEM)であった。得られたオートラジオグラムを図5に示す。

1. 正常ラット

表1に正常ラットの結果を示す。正常ラットのrCBFは皮質, 基底核部で高い値を示し, 最も高い部位は下丘の137±14 ml/100 g/min (mean±SEM)であった。白質の値は低く最も低い部位は内包39±6 ml/100 g/minである。rCMRglもrCBFと同じ分布を示し, 皮質, 基底核部で高い値を示し, 白質の値は低かった。両者の比であるrGFRは0.58±0.08 μmol/mlから0.88±0.09 μmol/mlの間に分布した。正常ラットでは有意の左右差は認めなかった。またDMP

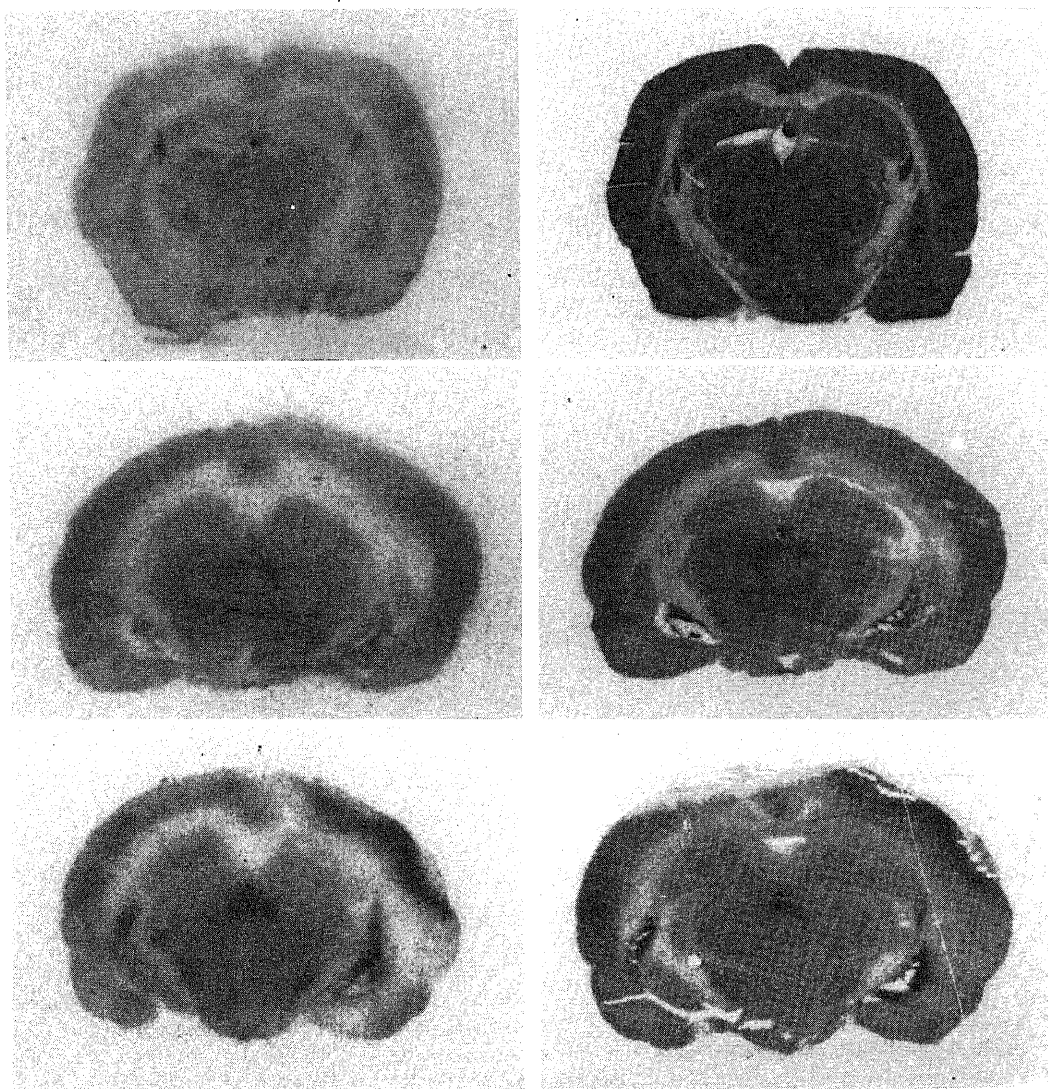


Fig. 5. 5b. Examples of autoradiograms of CBF (left) and CMRgl (right) at the level of thalamus.

で洗浄後の切片にルミラ膜をかぶせると、その部分は露光を示さなかった(図6)。

2. 脳圧迫モデルラット

表2, 3に非圧迫部の, 表4に圧迫部位の結果を示す。ラミナリアの体積は24時間, 48時間後にそれぞれ 0.052 ± 0.04 ml, 0.097 ± 0.04 ml (mean \pm SEM) となった。24時間圧迫モデルの圧迫部位の直下ではrCBFは 25 ± 5 ml/100 g/minと健側, 正常値と比べて有意に低下していた。rCMRglは 61 ± 13 μ mol/100 g/minと健側に比べて有意に低下していた。rGFRは 2.36 ± 0.19 μ mol/mlと健側, 正常値と比べて有意に増加していた。その周辺ではrCBFが 52 ± 10 ml/100

g/minと正常値に比べて有意に低下し, rCMRglが 82 ± 9 μ mol/100 g/minと有意の変化がなく, rGFRが 1.85 ± 0.26 μ mol/minと正常値に比べて有意に増加している部位を認めた。さらにその周囲の体性感覚野ではrCBFが 47 ± 3 ml/100 g/minと健側, 正常値と比べて有意に低下し, rCMRglが 74 ± 7 μ mol/100 g/minと健側に比べて有意に低下し, rGFRが 1.61 ± 0.09 μ mol/mlと正常値に比べて有意に増加していた。圧迫部位以外の患側のrCBFは健側に比べ, 尾状核で有意に減少していた。患側のrCMRglは圧迫部位以外では内包においてのみ有意に減少していた。rGFRは患側と健側で有意の変化を認めなかった。正

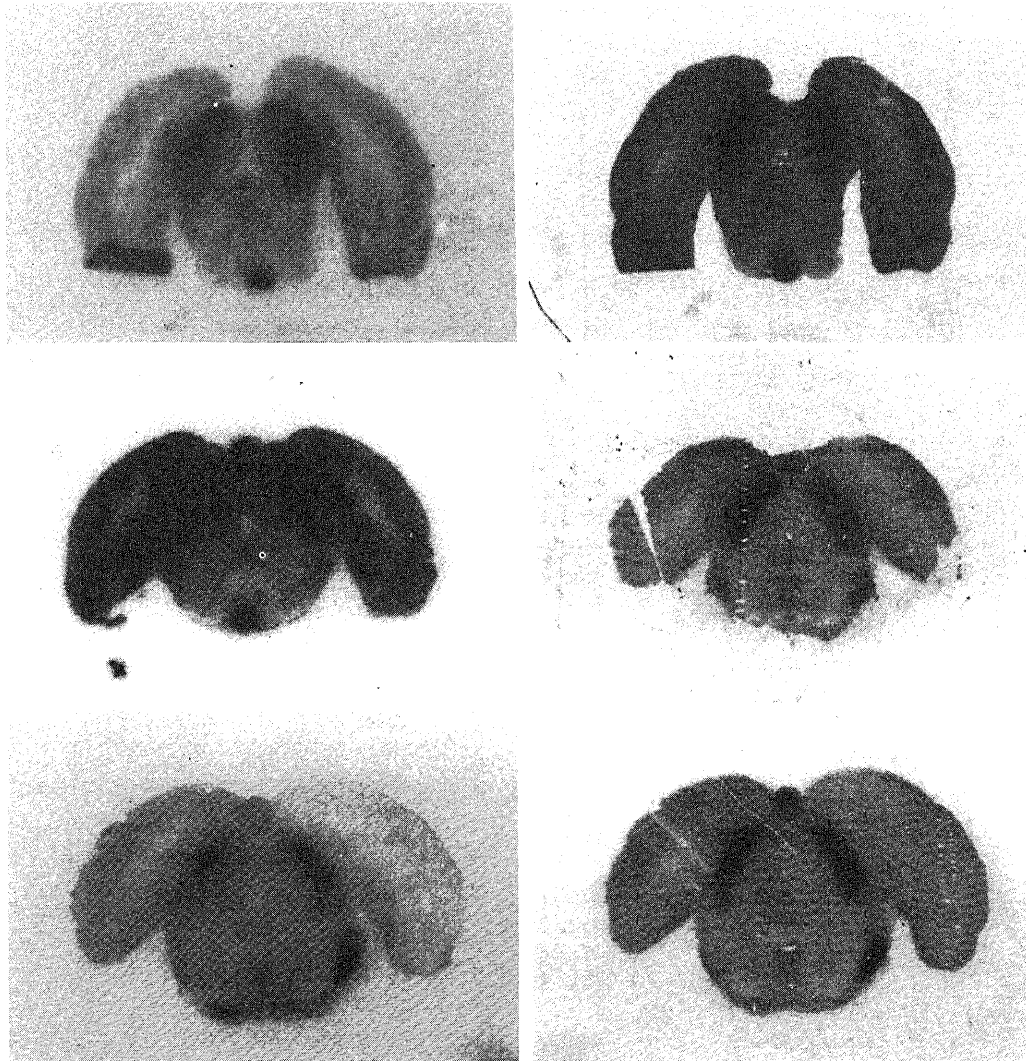


Fig. 5. 5c. Examples of autoradiograms of CBF (left) and CMRgl (right) at the level of inferior colliculus.

常値との比較では患側の聴覚領野、アンモン核、尾状核、健側の聴覚領野、アンモン核および脳梁でrCBFが有意に減少していた。rCMRglは患側の視床下核、尾状核、淡蒼球、黒質、下丘、外側毛帯、内包、健側の頭頂葉、体性感覚野、視床下核、尾状核、淡蒼球、内包および脳梁で有意に増加していた。rGFRは患側では外側視床、尾状核、蝸牛神経核、オリブを除くすべての部位で、健側ではすべての部位で有意に増加していた。図7に24時間後のCBF像、CMRgl像、GFR像をデジタル化したものをカラーで示す。aでは圧迫部位の、bでは白質のrGFR増加がよく把握できる。

48時間圧迫モデルの圧迫部位の直下では脳組織が壊死に陥っており測定不能であったが、その周囲にrCBFが 94 ± 9 ml/100 g/minと健側に比べて有意に増加し、rCMRglが 62 ± 8 μ mol/100 g/minと健側に比べ有意に増加している部位を認めた。この部位のrGFRは 0.66 ± 0.06 μ mol/mlと健側に比べ減少していた。さらにその周囲の体性感覚野ではrCBFが 44 ± 6 ml/100 g/minと健側、正常値に比べ有意に減少し、rCMRglが 45 ± 7 μ mol/100 g/minと健側に比べ有

意に減少し、rGFRが 1.08 ± 0.17 μ mol/mlと有意の変化のない部位を認めた。圧迫部位以外の患側のrCBFは圧迫部位、前頭葉を除く皮質の各部位、尾状核、淡蒼球、内包で健側に比べ有意に減少していた。患側のrCMRglは頭頂葉で健側に比べ有意に減少し

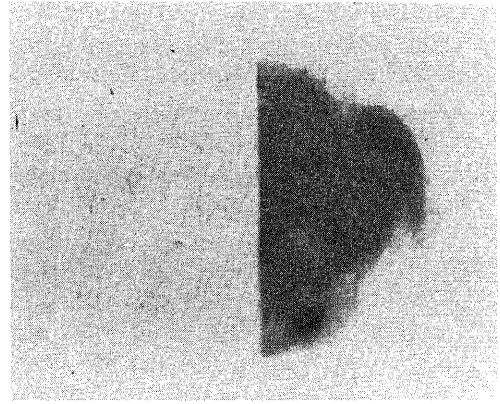


Fig. 6. An autoradiogram obtained by washing a slice with DMP covered with thin polyethylene membrane on the left half.

Table 1. Regional cerebral blood flow (rCBF) values, regional cerebral metabolic rate for glucose (rCMRgl) values and regional glucose flow ratio (rGFR) of normal rats

Structure	rCBF ml/100g/min	rCMRgl μ mol/100g/min	rGFR μ mol/ml
Cortical areas			
Visual cortex	70 ± 9	52 ± 9	0.77 ± 0.09
Auditory cortex	106 ± 14	69 ± 11	0.68 ± 0.15
Parietal cortex	69 ± 10	55 ± 9	0.88 ± 0.09
Somatosensory area	85 ± 8	62 ± 9	0.75 ± 0.11
Frontal cortex	56 ± 4	60 ± 10	0.81 ± 0.09
Subcortical structures			
Lateral thalamus	72 ± 8	59 ± 6	0.88 ± 0.09
Subthalamic nucleus	65 ± 7	48 ± 5	0.70 ± 0.08
Ammon's horn	70 ± 6	54 ± 8	0.77 ± 0.10
Caudate putamen	89 ± 5	57 ± 8	0.63 ± 0.09
Globus pallidus	61 ± 5	44 ± 6	0.72 ± 0.10
Substantia nigra	63 ± 5	50 ± 8	0.73 ± 0.09
Superior colliculus	80 ± 8	53 ± 7	0.75 ± 0.07
Brain stem structures			
Cochlear nucleus	123 ± 12	86 ± 13	0.76 ± 0.06
Olive	59 ± 3	41 ± 7	0.58 ± 0.08
Inferior colliculus	137 ± 14	75 ± 14	0.72 ± 0.06
Lateral lemniscus	54 ± 6	35 ± 5	0.70 ± 0.07
White matter			
Corpus callosum	41 ± 2	28 ± 4	0.72 ± 0.11
Internal capsule	39 ± 6	18 ± 3	0.66 ± 0.05

Values are mean \pm SEM (N=5).

ていた。rGFRは頭頂葉、外側視床、内包で健側に比べ有意に増加していた。正常値との比較では患側の体性感覚野を除く皮質、尾状核、淡蒼球、内包、健側の視覚領野、聴覚領野、体性感覚野、尾状核、淡蒼球および脳梁でrCBFが有意に減少していた。rCMRglは患側の淡蒼球、健側の体性感覚野、淡蒼球で有意に減少していた。rGFRは健側の外側視床のみで有意に増加していた。

皮質、皮質下、脳幹部、白質の各部位の経時的変化を図8に示す。CBFはどの部位も時間とともに減少してゆくが、CMRglは24時間で一時的に増加し、48時間後には正常に比べ減少している。GFRは24時間で増加し、特に白質で著明であり、48時間で正常化している。

考 察

オートラジオグラムを定量化する際の標準線源とし

ては脳組織のホモジネート²⁵⁾、ゼラチン⁸⁾、あるいは市販のもの¹¹⁾が報告されているが、今回の³Hのようにエネルギーの低い核種を使用する場合、自己吸収を考慮する必要がある。これについて三者を比較検討した報告はない。自己吸収を考慮した場合、オートラジオグラフィを施行する臓器すなわち脳組織のホモジネートを用いるのが理想的であるが、均一なものを得るには煩雑である。今回の検討では市販品の標準線源は、濃度が高くなるほど脳ホモジネートによる標準線源との差が大きくなり定量性に乏しい。また濃度がすでに決っているので任意の濃度の標準線源は得られない。今回標準線源をゼラチンの割合が20%になるように作成したところ、その黒化度と濃度との関係は脳ホモジネートにより作製した標準線源のものとはほぼ同じで、この標準線源がオートラジオグラムを定量化するうえで簡便、かつ正確なものであるといえる。また任意の濃度の標準線源を作製することが可能であり、実

Table 2. rCBF values, rCMRgl values and rGFR values of model rat 24hr after gradual compression

Structure	rCBF ml/100g/min		rCMRgl μmol/100g/min		rGFR μmol/ml	
	I	C	I	C	I	C
Cortical areas						
Visual cortex	63±6	69±13	79±11	88±14	1.27±0.15*	1.33±0.11**
Auditory cortex	68±8*	65±8*	85±11	94±11	1.27±0.09**	1.44±0.04**
Parietal cortex	65±8	62±6	75±5	82±7*	1.21±0.11*	1.34±0.10**
Somatosensory area	☆	64±7	☆	89±10**	☆	1.41±0.11**
Frontal cortex	51±8	56±8	85±11	92±12	1.69±0.14**	1.66±0.07**
Subcortical structures						
Lateral thalamus	63±3	61±6	67±8	73±5	1.06±0.10	1.22±0.06*
Subthalamic nucleus	61±8	66±7	66±7*	75±6**	1.09±0.10*	1.14±0.04**
Ammon's horn	45±5*	51±3*	65±5	68±4	1.58±0.24*	1.35±0.10**
Caudate putamen	63±9* ##	73±10	82±11*	87±12*	1.31±0.05	1.20±0.03**
Globus pallidus	50±7	50±8	61±7*	70±12*	1.27±0.12**	1.44±0.14**
Substantia nigra	66±11	70±9	70±7*	70±8	1.15±0.15*	1.03±0.11**
Superior colliculus	59±6	59±6	73±8	71±9	1.29±0.10**	1.28±0.14**
Brain stem structures						
Cochlear nucleus	104±13	106±14	99±15	107±13	0.55±0.09	1.02±0.07*
Olive	63±7	63±7	61±11	59±10	1.00±0.17	0.94±0.12*
Inferior colliculus	106±14	100±10	122±17*	123±15*	1.14±0.04**	1.22±0.05*
Lateral lemniscus	68±6	74±8	73±8**	77±9	1.10±0.12*	1.12±0.14*
White matter						
Corpus callosum	23±4**		47±6*		2.25±0.24**	
Internal capsule	33±4	44±6	37±4* #	48±6**	1.07±0.11**	1.10±0.06**

I, ipsilateral; C, contralateral.

Values are mean±SEM (N=5).

* p<0.05, ** p<0.01, vs. normal value (Table 1) by Student t-test.

p<0.05, ## p<0.01, vs. contralateral value by Student t-test.

☆ The details are listed in Table 4.

Table 3. rCBF values, rCMRgl values and rGFR values of model rat 48hr after gradual compression

Structure	rCBF ml/100g/min		rCMRgl μ mol/100g/min		rGFR μ mol/ml	
	I	C	I	C	I	C
Cortical areas						
Visual cortex	47 \pm 7* #	54 \pm 5*	48 \pm 8	49 \pm 9	1.26 \pm 0.30	0.94 \pm 0.15
Auditory cortex	35 \pm 6** ##	52 \pm 5**	46 \pm 7	50 \pm 7	1.36 \pm 0.28	0.98 \pm 0.10
Parietal cortex	39 \pm 5* ##	54 \pm 4	47 \pm 6#	53 \pm 7	1.32 \pm 0.18##	1.00 \pm 0.15
Somatosensory area	☆	57 \pm 4**	☆	49 \pm 6**	☆	0.89 \pm 0.13
Frontal cortex	37 \pm 4*	45 \pm 5	47 \pm 8	51 \pm 9	1.32 \pm 0.22	1.21 \pm 0.22
Subcortical structures						
Lateral thalamus	56 \pm 4	65 \pm 5	40 \pm 7	39 \pm 6	0.69 \pm 0.10#	1.60 \pm 0.07*
Subthalamic nucleus	61 \pm 6	63 \pm 6	34 \pm 5	36 \pm 5	0.58 \pm 0.08	0.58 \pm 0.07
Ammon's horn	53 \pm 6	58 \pm 5	41 \pm 7	42 \pm 7	0.79 \pm 0.11	0.71 \pm 0.09
Caudate putamen	51 \pm 4** #	59 \pm 4**	39 \pm 7	41 \pm 7	0.68 \pm 0.10	0.71 \pm 0.18
Globus pallidus	42 \pm 3** #	47 \pm 3*	28 \pm 4*	29 \pm 4*	0.63 \pm 0.06	0.59 \pm 0.07
Substantia nigra	65 \pm 7	68 \pm 7	39 \pm 6	36 \pm 5	0.62 \pm 0.09	0.57 \pm 0.09
Superior colliculus	62 \pm 6	64 \pm 6	38 \pm 6	37 \pm 5	0.61 \pm 0.09	0.59 \pm 0.08
Brain stem structures						
Cochlear nucleus	104 \pm 14	108 \pm 13	62 \pm 13	66 \pm 13	0.69 \pm 0.13	0.71 \pm 0.13
Olive	62 \pm 7	63 \pm 6	36 \pm 5	35 \pm 5	0.60 \pm 0.12	0.58 \pm 0.11
Inferior colliculus	96 \pm 13	99 \pm 13	73 \pm 10	72 \pm 10	0.79 \pm 0.10	0.78 \pm 0.10
Lateral lemniscus	57 \pm 5	56 \pm 5	35 \pm 6	34 \pm 6	0.63 \pm 0.10	0.63 \pm 0.09
White matter						
Corpus callosum	26 \pm 2**		18 \pm 2		0.70 \pm 0.12	
Internal capsule	23 \pm 4* ##	30 \pm 4	19 \pm 4	20 \pm 4	0.84 \pm 0.18##	0.56 \pm 0.11

I, ipsilateral; C, contralateral.

Values are mean \pm SEM (N=9).

* p < 0.05, ** p < 0.01, vs. normal value (Table 1) by Student t-test.

p < 0.05, ## p < 0.01, vs. contralateral value by Student t-test.

☆ The details are listed in Table 4.

Table 4. rCBF values, rCMRgl values and rGFR values of the compression sites of model rats 24hr and 48hr after gradual compression

Structure	rCBF ml/100g/min		rCMRgl μ mol/100g/min		rGFR μ mol/ml	
	24hr	48hr	24hr	48hr	24hr	48hr
Area just beneath the compression site	25 \pm 5** ##	★	61 \pm 13##	★	2.36 \pm 0.19** ##	★
Area just around the compression site	52 \pm 10*	94 \pm 9##	82 \pm 9	62 \pm 8##	1.85 \pm 0.26*	0.66 \pm 0.06#
Non-compressed area in Somatosensory area	47 \pm 3** #	44 \pm 6** ##	74 \pm 7#	45 \pm 7#	1.61 \pm 0.09*	1.08 \pm 0.17

Values are mean \pm SEM (N=5 for 24hr model, N=9 for 48hr model).

* p < 0.05, ** p < 0.01, vs. normal value of somatosensory area (Table 1) by Student t-test.

p < 0.05, ## p < 0.01, vs. contralateral value by Student t-test.

★ Values are not available due to tissue necrosis.

用的である。

近年報告されている二重標識オートラジオグラフィの多くは半減期法^{9)~11)}である。すなわち短半減期の核種によるオートラジオグラフィを施行し、その減衰を待って長半減期の核種による二回目の露光が施行される。しかしこの方法の欠点は、半減期が短い場合は一回当りの投与量が多く、また素早く露光を開始する必要があり、実験において時間的制約を受ける。また逆に最初の核種の半減期が長い場合、2回目の露光まで時間がかかり過ぎる。例えば今回の著者の方法では¹²⁵Iの半減期が約60日のため、2回目の露光までに数半

減期すなわち約1年を費やしてしまう。また短半減期核種で血流を、長半減期核種で代謝を測定する場合には、血流が減少し、代謝が増加する部位では、短半減期核種に対する長半減期核種の影響は無視できない¹²⁾。これに対しいずれか一方の核種を洗いだす化学洗浄法によるオートラジオグラフィでは、短半減期核種の減衰を待たずに2回目の露光を開始でき、わずかの投与量でも短期間に血流と代謝の両イメージが得られる。また同一切片ではなく隣接する連続切片を用いれ

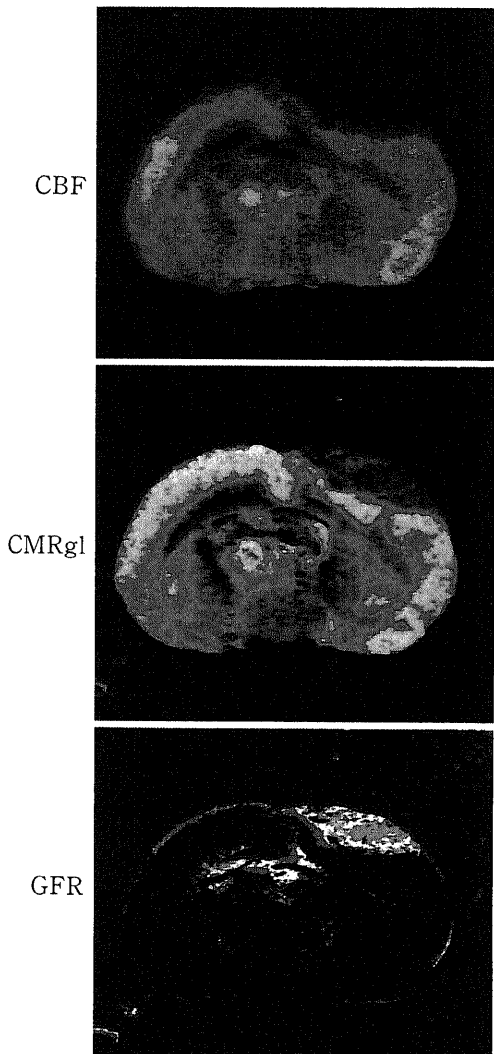


Fig. 7. 7a. Digitized image of CBF (upper), CMRgl (middle) and GFR (below) at the level of compression area of the model rat 24 hr after gradual compression.

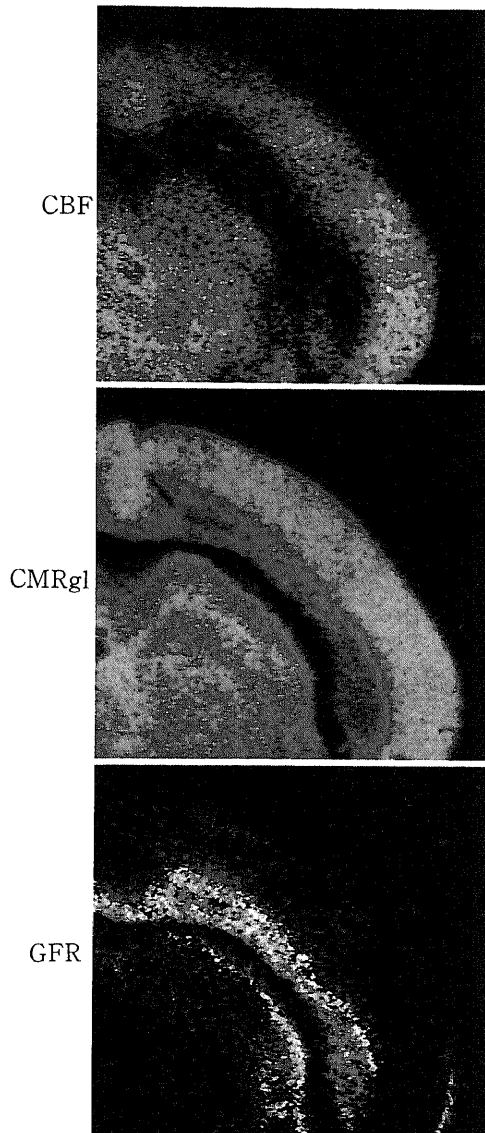


Fig. 7. 7b. Digitized image of CBF (upper), CMRgl (middle) and GFR (below) at the level of corpus callosum of the model rat 24 hr after gradual compression.

ば同時に露光を開始でき、さらに時間を短縮できる。今回著者は化学洗浄物質としてDMPを用いた。これは以前IAPの洗浄に用いられた報告¹²⁾¹³⁾はあるが、IMPの洗浄に使用したという報告はまだない。今回の検討ではDMPによる洗浄でIMPはその98%以上が洗いだされたが、³H-DGはまったく変化を受けずDMPが¹²⁵I-IMPのみを洗いだしていることが確認できた。最近、³H-DGがDMPによって洗いだされるという報告¹⁴⁾¹⁵⁾もあるが、これは洗浄時間が2日、5日と非常に長過ぎるためであると思われる。洗浄時間を3時間にすれば著者の結果では³H-DGはまったく変化

を受けない。

ルミラ膜を切片にかぶせると¹²⁵I-IMPのガンマ線は影響を受けないが、³H-DGのベータ線は完全に遮蔽された。ルミラ膜の厚さは6 μ であり飛程が約2, 3 μ のベータ線の遮蔽に都合がよいと考えられる。この遮蔽は完全であり、代謝のみが増加する場合でも半減期法のみによる場合と違い、血流に対する代謝の影響は全く無視することができる。また洗浄後の切片にルミラ膜をかぶせて露光させることにより、¹²⁵I-IMPが完全に洗いだされているか容易に確認できた。フィルムの各々の核種に対する感度の違いを考慮しても、¹²⁵I

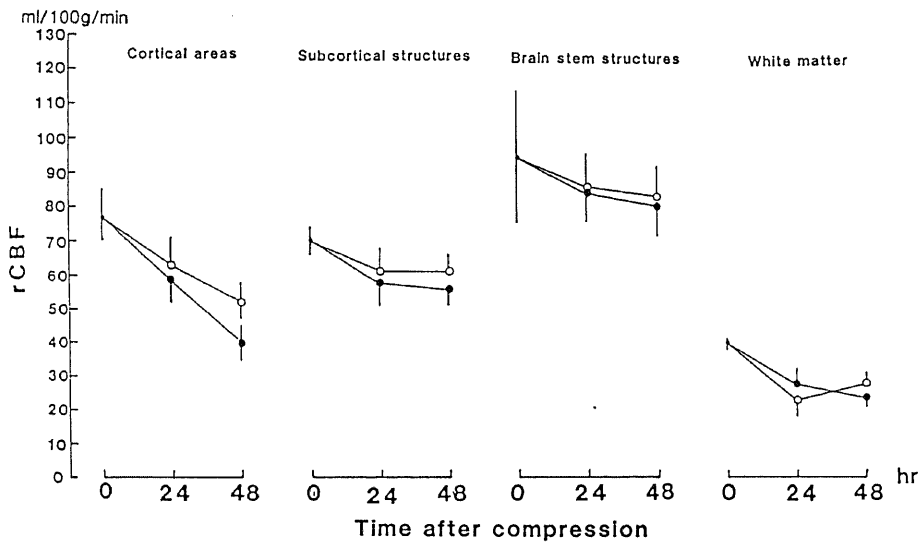


Fig. 8. 8a. Time course of rCBF at four kinds of brain structure. ●—●, ipsilateral; ○—○, contralateral.

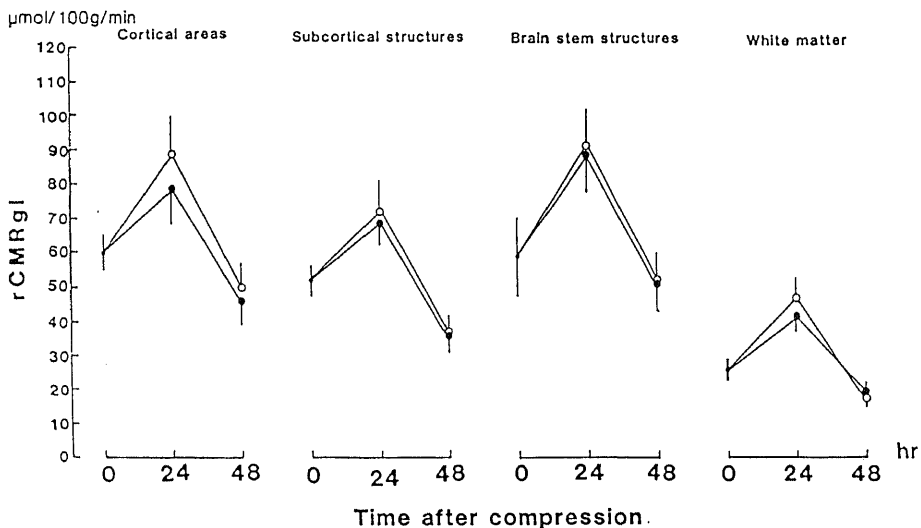


Fig. 8. 8b. Time course of rCMRgl at four kinds of brain structure. ●—●, ipsilateral; ○—○, contralateral.

に対する ^3H の影響は全く無視でき、また ^3H に対する ^{125}I の影響は 2% 以下である。圧迫モデルのイメージ上でも実際に血流と代謝の分離が確認できた。したがって、本法は二重標識オートラジオグラフィとして cross-contamination の少ない優れた方法である。

オートラジオグラムをデジタル化し標準線源のデジタル値と比較すれば、脳内の放射能濃度を定量化することが可能である^{26)~28)}。また画像間の演算も可能で CMRgl と CBF の比である GFR イメージなども容易に作製できる。カラー表示すれば視覚的な評価も可能である。

正常ラットの rCBF は 39~137 ml/100 g/min, rCMRgl は 18~86 $\mu\text{mol}/100\text{ g/min}$ の間に分布した。この値は Lear⁵⁹⁾, Sakurada⁴⁾, Sako⁷⁾, Sokoloff²⁴⁾ の報告に比べかなり低いが、Mies⁸⁾ のネンプター麻酔下での報告とよく一致した。麻酔の rCBF, rCMRgl に対する影響は無視できない²⁹⁾ が、今回は生理的パラメーターを測定し、正常範囲内にあることを確認しながらネンプター麻酔下で実験を行った。Mies⁸⁾ はハローセン麻酔下では血流と代謝の不一致が見られたが、ネンプター麻酔下では見られなかったと報告している。今回の検討でも rCMRgl と rCBF には左右差は認めず、両者の比である GFR も 0.58~0.88 $\mu\text{mol}/\text{ml}$ と全脳で大きな変化は認めなかった。したがってこ

のラットを圧迫モデルに対するコントロールとしても問題はないと考えられる。

脳圧迫モデルとしてはバルーンを用いた Jennett³⁰⁾, Dempsey³¹⁾ のネコを使った実験, Miller³²⁾ のイヌを使った実験があるが、これらは水素クリアランス法を用いたもので、オートラジオグラフィで全脳の血流を検討したものではない。水素クリアランス法による血流測定は繰り返し行える利点はあるが脳のごく一部の血流しか測定することが出来ない³³⁾³⁴⁾。また圧迫モデルを用いる場合、電極の先の位置が圧迫によりずれ、正確な位置を確認できない可能性がある。これに対しオートラジオグラフィ法は繰り返し測定は出来ないが、全脳の血流情報を一時に評価することが可能であり、圧迫モデルの局所血流の変化を捉えるのに、水素クリアランス法に比べ優れていると考えられる。

急性硬膜下血腫と慢性硬膜下血腫はまったく違った病態であるとされている³⁵⁾。急性圧迫モデルの報告はいくつかみられるが^{30)~32)36)}慢性圧迫モデルの報告はない。Ford³⁶⁾ はイヌを用いて数日間経過をみているが最初の圧迫自体は急性であり慢性ではない。今回、緩徐圧迫としてラミナリアを用いた。これは水分を吸って徐々に膨らみ、15 時間で約 5 倍の容積になり、緩徐な圧迫モデルを作製することができた。このラミナリアを使った圧迫モデルは今までに全く報告のない

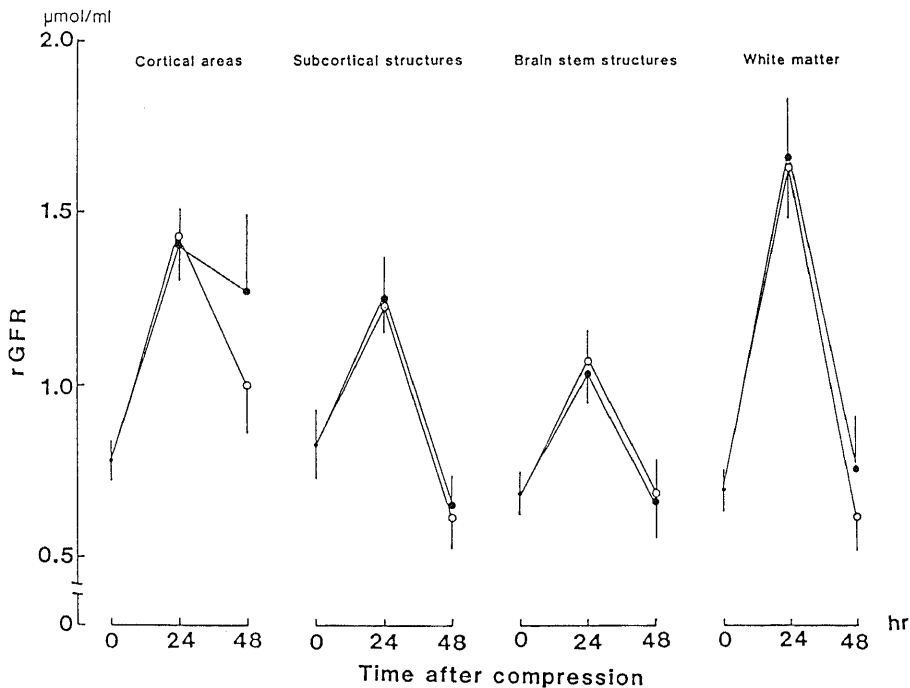


Fig. 8. 8c. Time course of rGFR at four kinds of brain structure.
●—●, ipsilateral; ○—○, contralateral.

ものである。しかしこのモデルも実際の慢性硬膜下血腫に比べれば増大の速度は速すぎ亜急性モデルというべきものであろう。

24時間圧迫モデルの圧迫直下では rCBF, rCMRgl とも減少していたが rCBF 減少が著しく rGFR が増加していた。圧迫モデルにおける圧迫部位の脳循環をオートラジオグラフィ法で論じた報告は少ないが、動脈閉塞モデルの場合と同じように³⁷⁾圧迫部の rGFR の増加は rCBF 減少、すなわち虚血に伴う酸素不足により嫌気性解糖が起こっているものと考えられる。

圧迫部位以外の患側、および健側では rCMRgl の増加がみられた。これは血流低下に伴う嫌気性解糖の亢進とは考えがたい。何故なら、血流低下は病巣以外ではそれほど著しくなくグルコース代謝に影響を与える閾値には達していないからである。むしろ、圧迫部位に発生し、周辺組織および対側半球に進展した脳浮腫の結果と考えられるのかもしれない。虚血における脳浮腫³⁸⁾の発生機序として、虚血内モノアミンの合成が抑制された結果、神経終末からノルエピネフリンなどのモノアミンが異常放出され、それが血管壁や細胞膜の水の透過性の変化を引き起こすことが示唆されている³⁹⁾。この病巣でのモノアミン放出は脳梁や脳幹などの神経投射系を介して他の部位にも cyclic AMP を増加させ、これが細胞膜の透過性を変化させた結果、K の放出、Na の流入を捉すと考えられる。この際、これを阻止しようとする機序が作動し、一時的にエネルギー需要が高まった結果 rCMRgl が増加したものと考えられるかもしれない。実際に、病巣に近いほど、rGFR は増加しており、脳浮腫の波及を示唆するものと考えられる。したがって24時間モデルの結果は diaschisis^{40)~42)}により対側半球代謝が一様に抑制されるとする従来の機序とは異なっており興味深い。

48時間圧迫モデルの圧迫直下の組織は完全に壊死に陥っていた。この周囲にみられた血流、代謝増加領域に関しては、Pappius ら⁴³⁾の組織凍結傷害によるその周囲の帯状の代謝増加領域と類似している。彼らはこの帯状の代謝の増加は組織傷害3~5日後に最も高いことから、微小血管の新生に伴うものと推論している。従って今後、病理学的検討も必要であろう。48時間では患側の非圧迫部位ではもはや rCMRgl の増加はみられず血流、代謝とも低下し rGFR も正常化した。これは脳浮腫がさらに進行するためアシドーシスになり⁴⁴⁾、ミトコンドリアの傷害が持続する結果 ATP が減少し、解糖系の酵素反応に傷害を与えた可能性が示唆される。この ATP の低下は虚血の程度が強い程著明である⁴⁵⁾。

圧迫モデルの血流、代謝を全脳単位で論じた報

告^{30)~32)36)}、あるいは血流のみで論じた報告⁴⁶⁾はあるが部位別に血流、代謝を同一モデルで検討した報告はなく、今回の結果は定量的二重標識オートラジオグラフィ法によって初めて得られたものである。この方法によれば全脳各所の血流と代謝を種々のモデルで同時に測定することが可能であり、各種の脳病態把握に有用な手段と考えられる。

結 論

¹²⁵I-IMP と ³H-DG を用いた定量的二重標識オートラジオグラフィを DMP を用いた化学洗浄法により行うための基礎的検討を行い、また実際に脳圧迫モデルラットを用いて脳血流と脳代謝を測定し以下の結論を得た。

1. DMP による3時間の洗浄で ¹²⁵I-IMP はその98%以上が洗いだされたが、³H-DG は全く変化を受けなかった。またルミラ膜を切片にかぶせることにより ³H-DG のベータ線は完全に遮蔽されたが、¹²⁵I-IMP のガンマ線は影響を受けなかった。したがってこの方法による cross-contamination は2%以下で、他の半減期法等による報告より優れている。また従来法では評価不可能であった cross-contamination の程度を毎回評価することが可能である。

2. ゼラチンを標準線源として用いたところ、脳ホモジネートより簡便に均一な物が作製可能であり、精度においても市販品のものよりはるかに優れていたため、定量化の精度が向上した。

3. 今回、水分を吸収して徐々に膨化するラミナリアを硬膜外腔に挿入することにより初めて緩徐脳圧迫モデルラットを作製し得た。

4. このモデルの血流と代謝を測定したところ、24時間後の圧迫部位で GFR が増加し嫌気性解糖によるものと考えられた。非圧迫部位では血流の軽度低下、代謝の増加がみられ、初期の脳浮腫の関与によるものと考えられた。

5. 48時間後の圧迫部位は壊死に陥っていたが、非圧迫部位では血流、代謝とも低下し、さらに脳浮腫が進行した結果と考えられた。

6. この二重標識オートラジオグラフィ法は従来の方法に比べ cross-contamination が少ないため定量性に優れ、またトレーサーの shelf-life の制約をほとんど受けないため、二重標識オートラジオグラフィ法として有力な方法である。

謝 辞

稿を終えるに臨み、終始御指導、御校閲を賜りました恩師久田欣一教授に深く感謝致します。また貴重な御指導、御助言を賜りました金沢大学医学部脳神経外科池田清延講師、

金沢大学アイソトープ総合センター森 厚文助教授, 柴和弘助手, 金沢大学医学部付属病院アイソトープ部飯田泰治技官, 金沢大学医学部核医学講座松田博史先生ならびに教室員各位に深く御礼申し上げます。

また, ^{125}I -IMP を提供下さいました日本メジフィジックス社に感謝致します。

文 献

- 1) Kety, S. S. & Schmidt, D. F.: The determination of cerebral blood flow in man by use of nitrous oxide in low concentration. *Am. J. Physiol.*, **143**, 53-66 (1945).
- 2) Landau, W. M., Fraygang, W. H., Roland, L. P., Sokoloff, L. & Kety, S. S.: The local circulation of the living brain; values in the unanesthetized and anesthetized cat. *Trans. Am. Neurol. Assn.*, **80**, 125-129 (1955).
- 3) Aukland, K., Bower, B. F. & Berliner, R. W.: Measurement of local blood flow with hydrogen gas. *Circ. Res.*, **14**, 164-187 (1964).
- 4) Sakurada, O., Kennedy, C., Jehle, J., Brown, J. D., Carbin, G. L. & Sokoff, L.: Measurement of local cerebral blood flow with iodo [^{14}C] antipyrine. *Am. J. Physiol.*, **243**, H59-H66 (1978).
- 5) Lear, J. L., Ackermann, R. F., Kameyama, M. & Kuhl, D. E.: Evaluation of [^{125}I] isopropylidoamphetamine as a tracer for local cerebral blood flow using direct autoradiographic comparison. *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, **2**, 179-185 (1982).
- 6) Jones, S. C., Lear, J. L., Greenberg, J. H. & Reivich, M.: A double label autoradiographic technique for the quantitative measure of cerebral blood flow and glucose metabolism. *Acta Neurol. Scand.*, (Suppl 72), 202-203 (1979).
- 7) Sako, K., Kato, A., Diksic, M. & Yamamoto, L. Y.: 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 (1984).
- 8) Mies, G., Niebuhr, J. & Hossmann, K. A.: Simultaneous measurement of blood flow and glucose metabolism by autoradiographic techniques. *Stroke*, **12**, 581-588 (1981).
- 9) Lear, J. L., Jones, S. C., Greenberg, J. H. & Fedora, J.: Use of ^{125}I and ^{14}C in a double radioisotope autoradiographic technique for simultaneous measurement of LCBF and LCMRgl. *Stroke*, **12**, 589-597 (1981).
- 10) 亀山元信, 井戸達雄: ポジトロン放出核種を使用した多重標識オートラジオグラフィ. *核医学*, **19**, 1233-1236 (1982).
- 11) 佐古和広, 加藤天美, 小島敬太郎, Dicsic, M., Yamamoto, L., 米増祐吉: ^{18}F -fluorodeoxyglucose と ^{14}C -iodoantipyrine を用いた定量的二重標識オートラジオグラフィ. *脳神経*, **36**, 649-656 (1984).
- 12) Diemer, N. H. & Rosenzorn, J.: Determination of local cerebral blood flow and glucose metabolism or transfer by means of a double autoradiographic method. *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, **1** (Suppl. 1), S72-S73 (1981).
- 13) Gjedde, A. & Diemer, N. H.: Double-tracer study of the fine regional blood-brain glucose transfer in the rat by computer-assisted autoradiography. *J. Cereb. Blood flow Metab.*, **5**, 282-289 (1985).
- 14) Jones, S. C. & Greenberg, J. H.: Evaluation of a double-tracer autoradiographic technique for the measurement of both local cerebral glucose metabolism and local cerebral blood flow. *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, **5**, 335-337 (1985).
- 15) Ginsberg, M. D., Smith, D. W., Wachtel, M. S., Gonzalez, Carvajal M. & Busto, R.: Simultaneous determination of local cerebral glucose utilization and blood flow by carbon-14 double-label autoradiography: method of procedure and validation studies in the rat. *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, **6**, 273-285 (1986).
- 16) Winchell, H. S., Baldwin, R. M. & Lin, T. H.: Development of I-123-labeled amines for brain studies: localization of I-123 iodophenylalkyl amines in rat brain. *J. Nucl. Med.*, **21**, 940-946 (1980).
- 17) Winchell, H. S., Horts, W. D., Braun, L., Oldendorf, R. & Parker, H.: N-isopropyl-[^{125}I] p-iodoamphetamine: single-pass brain uptake and washout; binding to brain synaptosomes; and localization in dog and monkey brain. *J. Nucl. Med.*, **21**, 947-952 (1980).
- 18) Kuhl, D. E., Barrio, J. R., Huang, S. C., Selin, C., Ackermann, R. F., Lear, J. L., Wu, J. L. & Lin, T. H.: Quantifying local cerebral blood flow by N-isopropyl-p-[^{125}I] iodoamphetamine (IMP) tomography. *J. Nucl. Med.*, **23**, 196-203 (1982).
- 19) 隅屋 寿, 松田博史, 関 宏恭, 石田博子, 久田欣一, 森 厚文, 柴 和弘, 池田清延, 小島一彦: オー

トラジオグラフィ法によるラットの脳血流脳代謝同時測定. 核医学, 23, 167-172 (1986).

20) 関 宏恭: N-isopropyl-p-[I-123] Iodoamphetamine による局所脳血流に関する研究. 十全医会誌, 95, 279-294 (1986).

21) Paxinos, G. & Watson, C.: The rat brain in stereotaxic coordinates. 1st ed., plate 1-24, Academic Press, New York, 1982.

22) Malik, A. B., Kaplan, J. E. & Saba, T. M.: Reference sample method for cardiac output and regional blood flow determinations in the rat. J. Appl. Physiol., 40, 472-475 (1976).

23) Ishise, S., Pegram, B. L., Yamamoto, J., Kitamura, Y. & Frohlich, E.: Reference sample microsphere method: cardiac output and blood flows in conscious rat. Am. J. Physiol., 239: H433-H449 (1980).

24) Sokoloff, L., Reivich, M., Kennedy, C., DesRosiers, M. H., Patlak, C. S., Pettigrew, K. D., Sakurada, O. & Shinohara, M.: The [¹⁴C] 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 (1977).

25) Unnerstall, J. R., Niehoff, L., Kuhar, M. J. & Palacios, J. M.: Quantitative receptor autoradiography using [³H] Ultrofilm: application to multiple benzodiazepine receptors. J. Neurosci. Meth., 6, 59-73 (1981).

26) Yonekura, Y., Brill, A. B., Som, P., Bennett, G. W. & Fand, I.: Quantitative autoradiography with radiopharmaceuticals, part 1: digital film analysis system by videodensitometry. J. Nucl. Med., 24, 231-237 (1983).

27) Alexander GM & Schwartzman R. J.: Quantitative computer analysis of autoradiographs utilizing a charge-coupled device solid-state camera. J. Neurosci. Meth., 12, 29-36 (1984).

28) Lewellen, T. K., Graham, M. M. & Spence, A. M.: Quantitative autoradiography using a personal computer. J. Nucl. Med., 27, 549-554 (1986).

29) Kawae, Y. & Iriuchijima, J.: Changes in cardiac output and peripheral flow on pentobarbital anesthesia in the rat. Jpn. J. Physiol., 34, 283-294 (1984).

30) Jennett, W. B., & Stern, W. E.: Tentorial herniation, the midbrain and the pupil. J. Neuro-

surg., 18, 598-609 (1960).

31) Dempsey, R.J. & Kindt, G. W.: Experimental augmentation of cerebral blood flow by mannitol in epidural intracranial masses. The Journal of Trauma., 22, 449-454 (1982).

32) Miller, J. D., Stanek, A. E. & Langfitt, T. W.: Cerebral blood flow regulation during experimental brain compression. J. Neurosurg., 39, 186-196 (1973).

33) Halsey, J. H., Capra, N. F. & McFarland, R. S.: Use of hydrogen for measurement of regional cerebral blood flow. Problem of intercompartmental diffusion. Stroke, 8, 351-357 (1977).

34) Heiss, W. D. & Traupe, H.: Comparison between hydrogen clearance and microsphere technique from rCBF measurement. Stroke, 12, 161-167 (1981).

35) Keplan, A.: Subdural hematoma, acute and chronic, with some remarks about treatment. Surgery, 4, 211-248 (1938).

36) Ford, L. E. & McLaurin, R. L.: Mechanisms of extradural hematomas. J. Neurosurg., 760-769 (1963).

37) Hossman, K. A., Niebuhr, I. & Tamura, M.: Blood flow and metabolism in the rat brain during experimental tumor development. Acta Neurol. Scand., 60, (Suppl. 72), 576-577 (1979).

38) Kogure, K., Busto, R. & Scheinberg, P.: Energy metabolites and water content in rat brain during the early stage of development of cerebral infarction. Brain, 97, 103-114 (1974).

39) Raichle, M. E., Hartman, B. K. & Elchling, J. C.: Central noradrenergic regulation of cerebral blood flow and vascular permeability. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 72, 3726-3730 (1975).

40) Meyer, J. S., Shinohara, Y. & Kanda, T.: Diaschisis resulting from acute unilateral cerebral infarction. Arch. Neurol., 23, 241-247 (1970).

41) Fujiyama, M., Tanaka, K. & Takeya, Y.: Bilateral reduction of hemispheric blood flow in patients with unilateral cerebral infarction. Stroke, 5, 648-653 (1974).

42) Slater, P., Reivich, M. & Goldberg, H.: Diaschisis with cerebral infarction. Stroke, 8, 684-690 (1977).

43) Pappius, H. M.: Local cerebral glucose utilization in thermally traumatized rat brain. Ann.

Neurol., 9, 484-491 (1981).

- 44) Hillered, L., Siesjo, B. K. & Arfors, K. E.: Mitochondrial response to transient forebrain ischemia and recirculation in the rat. *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, 4, 438-446 (1984).
- 45) Ishihara, N., Welch, K. M.A. & Meyer, J. S.:

Influence of cerebral embolism on brain monoamines. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiat.*, 42, 874-853 (1979).

- 46) Rosenϕrn, J.: Reduction of regional cerebral blood flow during brain retraction pressure in the rat. *J. Neurosurg.*, 56, 826-829 (1982).

Studies on Quantitative Double-Labeled Autoradiography in the Rat Brain Using N-isopropyl-p-¹²⁵Iiodoamphetamine and ³H-deoxyglucose Hisashi Sumiya, Department of Nuclear Medicine, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920—J. Juzen Med. Soc., 96, 321—337 (1987)

Key words: N-isopropyl-p-¹²⁵Iiodoamphetamine, ³H-deoxyglucose, 2,2-dimethoxypropane, cerebral blood flow, cerebral glucose metabolism

Abstract

Fundamental Evaluation was made to perform a double-labeled autoradiography using N-isopropyl-p-¹²⁵Iiodoamphetamine (¹²⁵I-IMP) and ³H-deoxyglucose (³H-DG) by the chemical washing method with 2,2-dimethoxypropane (DMP). As the standard for quantification, gelatin was found to be the most convenient material producing a correct result as compared to brain homogenate and commercially-available standard scale. Though more than ninety-eight percent of ¹²⁵I-IMP was washed out from brain slices by three-hour washing with DMP, neither the activity nor distribution of ³H-DG was influenced by DMP. The beta-ray of ³H-DG was completely stopped by a thin polyethylene membrane of 6 μ thickness. A gradual compression model was obtained by inserting laminaria at the epidural space of the rat brain. The measurements of regional cerebral blood flow (rCBF) and regional cerebral metabolic rate for glucose (rCMRgl) were performed on fourteen compression models and five normal control rats. Images of autoradiogram of brain slices and standards were digitized using a microcomputer and CCD camera system. Radioactivity of brain slices was calculated by comparing the digital counts of brain slices to standards. Coupling of rCBF and rCMRgl was observed in normal rats and the glucose flow ratio (GFR) value ranged from 0.58 to 0.88 (μmol/ml). A marked decrease in rCBF and a mild decrease in rCMRgl were observed in the area just beneath the compression in the model after twenty-four hours. The elevation of the rGFR indicated occurrence of anaerobic glycolysis. A mild decrease in rCBF and a mild increase of rCMRgl were observed in other parts of the compression area, which seemed to be due to early cerebral edema. Compression site of the model after forty-eight hours was in necrosis. rCBF and rCMRgl also decreased in other sites, which seemed to be due to the progression of cerebral edema. Temporal and spatial discrepancy of rCBF and rCMRgl was observed in the model rat. This autoradiographic technique is superior in convenience and quantification to previously reported methods. It seemed to be useful for evaluating both rCBF and rCMRgl simultaneously in model rats under various conditions and for understanding the pathogenesis of cerebral diseases.