



# HOKKAIDO UNIVERSITY

|                     |                                                                                                 |
|---------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Title               | ラットを用いた脳脊髄液トレーサーMRIについての研究                                                                      |
| Author(s)           | 木野田, 直也                                                                                         |
| Description         | 配架番号 : 2893                                                                                     |
| Degree Grantor      | 北海道大学                                                                                           |
| Degree Name         | 博士(医学)                                                                                          |
| Dissertation Number | 甲第16401号                                                                                        |
| Issue Date          | 2025-03-25                                                                                      |
| DOI                 | <a href="https://doi.org/10.14943/doctoral.k16401">https://doi.org/10.14943/doctoral.k16401</a> |
| Doc URL             | <a href="https://hdl.handle.net/2115/95924">https://hdl.handle.net/2115/95924</a>               |
| Type                | doctoral thesis                                                                                 |
| File Information    | KINOTA_Naoya.pdf                                                                                |



学位論文

ラットを用いた脳脊髄液トレーサーMRI について  
の研究

**(Neurofluid tracer studies in rats using magnetic  
resonance imaging)**

2025 年 3 月

北 海 道 大 学

木 野 田 直 也



学位論文

ラットを用いた脳脊髄液トレーサーMRI について  
の研究

**(Neurofluid tracer studies in rats using magnetic  
resonance imaging)**

2025 年 3 月

北 海 道 大 学

木 野 田 直 也



# 目 次

|                |      |
|----------------|------|
| 発表論文目録及び学会発表目録 | 1 頁  |
| 要旨             | 2 頁  |
| 略語表            | 5 頁  |
| 全体の緒言          | 6 頁  |
| 第 1 章          | 10 頁 |
| 緒言             | 10 頁 |
| 方法             | 10 頁 |
| 結果             | 16 頁 |
| 考察             | 22 頁 |
| 第 2 章          | 23 頁 |
| 緒言             | 23 頁 |
| 方法             | 24 頁 |
| 結果             | 29 頁 |
| 考察             | 33 頁 |
| 第 3 章          | 34 頁 |
| 緒言             | 34 頁 |
| 方法             | 35 頁 |
| 結果             | 40 頁 |
| 考察             | 47 頁 |
| 総括及び結論         | 50 頁 |
| 謝辞             | 53 頁 |

利益相反 . . . . . 54 頁

引用文献 . . . . . 55 頁

## 発表論文目録および学会発表目録

本研究の一部は以下の論文に発表した。

1. Kinota N, Kameda H, Xiawei B, Fujii T, Kato D, Takahashi B, Morita R, Abo D, Majima R, Ishii H, Minowa K, Kudo K.

Blockage of CSF Outflow in Rats after Deep Cervical Lymph Node Ligation Observed Using Gd-based MR Imaging.

Magn Reson Med Sci. 2024 Oct 1;23(4):449-459. doi: 10.2463/mrms.mp.2023-0023. Epub 2023

May 30.PMID: 37258125 (Epub ahead of print: May 30, 2023)

本研究の一部は以下の学会に発表した。

1. Naoya Kinota, Hiroyuki Kameda, Kazuyuki Minowa, Kohsuke Kudo

Blockage of CSF Outflow via Nasal Lymphatic Pathway in Rats after Deep Cervical Lymph Node Ligation Observed Using Intrathecal Gd-based MR Imaging.

International Society for Magnetic Resonance in Medicine 2023

06/03/2023, Toronto, Canada.

2. Naoya Kinota.

Neurofluid MR imaging in rat models.

<sup>17</sup>O Labeled Stable Isotope Water Imaging Symposium

03/09/2024, Sapporo, Japan.

## 要旨

【背景と目的】脳脊髄液(cerebrospinal fluid, CSF)や脳間質液の循環は脳老廃物排泄に重要な役割を担う。CSF は頭蓋内で産生され、最終的に頭蓋外へ流出する。脳間質液動態は glymphatic 仮説の提唱もあり近年研究が進んでいるが、CSF の動態や流出経路の研究は脳間質液のそれと比較して進んでいなかった。CSF や脳間質液の動態を検討するため、小動物モデルを用いたトレーサー髄注下 magnetic resonance imaging (MRI)が行われる。溶質トレーサーであるガドリニウム(Gd)造影剤を用いた撮像では T1 強調像が用いられるが、信号変化からトレーサー濃度を正確に推定するのが難しいという問題点があった。また、 $^{17}\text{O}$  標識水( $^{17}\text{O}\text{-H}_2\text{O}$ )髄注下 MRI では用いる T2 強調像の信号変化からトレーサー濃度を推定する事が可能だが、空間・時間分解能の制限が強いという問題点があった。第1章では、ラットの CSF 頭蓋外流出経路として深頸部リンパ節(deep cervical lymph node: DCLN)に至る経路に注目し、DCLN 結紮モデルを作成し CSF 動態が変化するかどうか Gd 造影剤投与下 MRI で検討した。第2章と第3章では、溶質トレーサーである Gd 造影剤髄注下 MRI における定量的 R1 マップの連続撮像と溶媒トレーサーである  $^{17}\text{O}\text{-H}_2\text{O}$  髄注下 MRI における T2 強調像の sliding view scheme を用いた画質改善に取り組んだ。第2章ではファントムを用いて予備検討を行い、第3章では、その結果をラットで検証した。

### 第1章

【方法】両側 DCLN 結紮およびシャム手術ラットを各群 6 匹用意し、Gd-BTDO3A 髄注下に 3.0T MRI で T1 強調像を連続撮像した。CSF, CSF 流出路, 脳実質に関心領域(ROI)を設置し、各 ROI のベースラインからの信号比を比較した。時間信号曲線(TIC)の曲線特微量として流入最大勾配, ピーク時間, ピーク信号比, 消失半減期を計算し比較した。

【結果】DCLN 結紮群で大槽から注入されたトレーサーの吻側 CSF への到達遅延が見られた。TIC の比較では上鼻甲介 ROI において有意差を認めた。最大勾配は、上鼻甲介において結紮群で有意に小さかった( $P=0.011$ )。ピーク時間には有意差を認めなかった。ピーク信号比は上鼻甲介において結紮群で有意に小さかった( $P=0.011$ )。消失半減期は腹側 CSF において結紮群で有意に延長した(環椎レベル CSF,  $P=0.043$ ; 嗅球間 CSF,  $P=0.021$ ; 下垂体陥凹レベル CSF,  $P=0.021$ )。

【考察】DCLN 結紮で腹側 CSF 流の停滞および鼻腔内への CSF 流出低下を生じた。本研究で示された CSF 流出路障害による CSF 動態の変化は先行研究で示された DCLN 結紮後の脳実質内老廃物蛋白排泄障害と関連している可能性がある。

### 第2章

【方法】アガロースゲル  $^{17}\text{O}$ - $\text{H}_2\text{O}$  拡散ファントムを作成し T2 強調像を連続撮像し, sliding view scheme による信号雑音比の変化および  $^{17}\text{O}$ - $\text{H}_2\text{O}$  拡散による信号変化を観察した. R1 マップ撮像条件検討として, Gd 希釈造影剤を 0 から 0.5mM に調整したファントムを作成し, 8 つの flip angle ( $2^\circ$  から  $16^\circ$  まで  $2^\circ$  刻み) で gradient echo 法で MRI を撮像した (variable flip angle, VFA 法). すべての flip angle (8FAs) もしくは  $4^\circ$  と  $16^\circ$  の 2 つの flip angle (2FAs) についていずれも B1 補正ありとなしの両方で R1 マップを生成し精度を検討した. R1 値の standard としては fast spin echo inversion recovery 法を用いた.

【結果】 $^{17}\text{O}$ - $\text{H}_2\text{O}$  拡散ファントム撮像では, sliding view scheme を用いた再構成で概ね理論値 (加算幅  $n$  に対して  $\sqrt{n}$  倍) 通りの信号雑音比改善が確認された一方で, 急峻な信号変化に対しては window 幅を増やすことで時間方向の平均化が観察された. Gd 希釈造影剤ファントムでは, B1 マップ補正ありの flip angle  $4^\circ$  and  $16^\circ$  画像で standard と良好な一致が見られた.

【考察】 $^{17}\text{O}$ - $\text{H}_2\text{O}$  髄注下 MRI では, sliding view scheme を適用することで実行時間分解能を担保しながら信号雑音比の改善を行うことができたが, 急峻な信号変化の観察には window 幅を低めに設定する方がよいと考えられた. R1 マップについては, B1 マップ補正併用 flip angle  $4^\circ$  and  $16^\circ$  画像がラット撮像に使用可能と考えられた.

### 第3章

【方法】 $^{17}\text{O}$ - $\text{H}_2\text{O}$  髄注下 MRI として, 生理食塩水化 20mol%  $^{17}\text{O}$ - $\text{H}_2\text{O}$  ( $n=5$ ) もしくは生理食塩水 ( $n=3$ ) を Wistar ラット大槽から投与 ( $2.5\mu\text{L}/\text{min}$ , 30min) し T2 強調像を連続撮像した. CSF および脳実質に ROI を設置し各時相の信号変化率及び time-intensity curve (TIC) の曲線下面積 (area under the curve, AUC) を比較した. Gd 造影剤髄注下 MRI では, 雄 Wistar ラット 4 匹を用い, Gd-BTDO3A を投与し R1 マップ連続撮像を行った. マップは  $4^\circ$  画像を  $16^\circ$  の前に撮ったものを使用 (normal), 後に撮ったものを使用 (reverse), 造影前画像と造影後  $16^\circ$  画像のみで生成 (single FA) の 3 通りで比較した. CSF および流出路 ROI4 箇所および脳実質 ROI4 箇所について各時相の R1 値及び AUC を比較した. さらに, 両トレーサーの代表個体で相対濃度マップを作成し動態を比較した.

【結果】 $^{17}\text{O}$ - $\text{H}_2\text{O}$  髄注下 MRI では, 大槽で  $^{17}\text{O}$ - $\text{H}_2\text{O}$  群に有意な信号比低下を認めた. AUC は大槽 ( $P=0.039$ ) と環椎レベル CSF ( $P=0.036$ ) で有意差を認めた. Gd 造影剤髄注下 MRI では, CSF の ROI において single FA 法が normal および reverse 法と比較して R1 値を過小に算出する傾向が見られ, 大槽, 環椎レベルで R1 値に有意差を認めた. AUC の比較では環椎レベルで single FA と normal, reverse 間に有意差

を認めた. Normal と reverse は造影剤濃度が高い大槽の注入開始時と終了時を除いてほぼ同じ値を示した. 吻側の CSF ROI や鼻甲介, 脳実質 ROI では生成法間で有意差を認めなかった. 相対濃度マップ比較では  $^{17}\text{O}-\text{H}_2\text{O}$  は注入局所から吻側への移行に乏しく, Gd 造影剤と動態が異なっていた.

【考察】Sliding view の適用により先行研究よりも高い空間, 次回分解能での  $^{17}\text{O}-\text{H}_2\text{O}$  髄注下 MRI 撮像を達成した. VFA 法 R1 マップ連続撮像については normal と reverse の生成法間でほぼ差は見られず, single FA 法はトレーサー濃度が高い部位で R1 値を過小評価する場合があることと脳実質のようにトレーサー濃度が相対的に低い領域では VFA 法とほぼ同じ R1 値を算出可能であることを示した. 溶質トレーサーと溶媒トレーサーで髄注後動態が異なっている可能性が示された.

【結語】頭蓋外 CSF 流出路である DCLN 結紮により CSF の動態に変化を生じること示した. また, 溶質トレーサーである Gd 造影剤髄注下 MRI の定量連続イメージングと溶媒トレーサーである  $^{17}\text{O}-\text{H}_2\text{O}$  髄注下 MRI の画質改善を達成する手法を提案した. 得られた画像の比較からは溶質および溶媒トレーサーの髄注後動態は異なる可能性が示唆された.

## 略語表

|        |                            |
|--------|----------------------------|
| ANOVA: | analysis of variance       |
| AUC:   | area under the curve       |
| CSF:   | cerebrospinal fluid        |
| DCLN:  | deep cervical lymph node   |
| FOV:   | field of view              |
| FSE:   | fast spin echo             |
| IR:    | inversion recovery         |
| Gd:    | Gadolinium                 |
| MRI:   | magnetic resonance imaging |
| NEX:   | number of excitation       |
| ROI:   | region of interest         |
| SPGR:  | spoiled gradient echo      |
| TE:    | echo time                  |
| TIC:   | time-intensity curve       |
| TR:    | repetition time            |
| VFA:   | variable flip angle        |

## 全体の緒言

### (1) 背景

脳脊髄液(Cerebrospinal fluid: CSF)は頭蓋内で産生され、くも膜下腔を循環した後頭蓋外へ排泄される。脳組織は古典的なリンパ組織を欠くとされており、CSF 循環は脳老排物排泄において重要な役割を担うと考えられている。脳実質内の間質液動態については近年 glymphatic 仮説が提唱され(Iliff et al., 2013), これを支持する研究が多数報告され有力な学説となっている(Taoka and Naganawa, 2020)。脳実質内の間質液動態や CSF と脳実質間の CSF 交換については盛んな研究が行われてきたが、CSF の頭蓋外流出動態については未だ不明な点が多い。

古典的には、CSF は脈絡叢で産生されくも膜顆粒で吸収されと考えられてきた。しかしながら、近年の研究で産生、吸収いずれにおいても別の機構が存在すると報告されている。特に CSF 頭蓋外流出経路としては、鼻腔を経由するもの(Bradbury et al., 1981, Proulx, 2021, Decker et al., 2022, Silver et al., 2002, Brady et al., 2020), 脳実質を介して硬膜リンパ管や静脈から流出するもの(Hladky and Barrand, 2022, Iliff et al., 2013, Taoka and Naganawa, 2020, Naganawa and Taoka, 2022, Oshio, 2021), 硬膜リンパ管から直接吸収されるもの(Proulx, 2021, Ahn et al., 2019, Albayram et al., 2022, Naganawa and Taoka, 2022), 脳神経や脊髄神経根から吸収されるもの(Proulx, 2021, Brady et al., 2020, Sheng et al., 2022, Liu et al., 2018)などが報告されている。

これらの経路が CSF 流出全体においてそれぞれの程度の割合を占めるのかは不明確であるが、生物種間の差が大きいと想定されている。例えばヒトではくも膜顆粒が少なくとも部分的には CSF 流出に寄与すると考えられているが、齧歯類においてはくも膜顆粒はほぼ欠損し他の経路が CSF 流出を担うと報告されている(Proulx, 2021, Mollgard et al., 2023)。頭蓋内から流出した CSF や溶質タンパクの行き先は、鼻腔内、頸部リンパ管から頸部リンパ節、硬膜静脈から血管内など報告によって様々である。この中で、深頸部リンパ節(DCLN)は鼻腔から流出するリンパ管や頸静脈孔のリンパ管と接続しており、頭蓋から流出した溶媒や溶質の中継地点となっていると報告されている(Bradbury et al., 1981, Proulx, 2021, Iliff et al., 2013, Taoka and Naganawa, 2020, Xue et al., 2020, Zou et al., 2019, Muldoon et al., 2004)。

CSF や脳間質液の溶媒である水分子や溶質分子動態を観察する手法として、実験動物を用いたトレーサー髄注実験がある。Magnetic resonance imaging (MRI)は、投与されたトレーサーをたとえ生体深部であっても非侵襲的に画像化することが可能なモダリティである。トレーサーを髄腔内や脳実質内に投与しながら MRI を撮像することで、溶質や水分子が頭蓋内でどのような動態を示すか観察することができる。これに手術モデルや疾患モデルなどを組み合わせることで、特定の病態における CSF や脳間質液の動態変化を観察することができる。

MRI における髄注トレーサーとしては溶質トレーサーとしてガドリニウム(Gd)造影剤、溶媒トレーサーとして  $^{17}\text{O}$  標識水( $^{17}\text{O}\text{-H}_2\text{O}$ )が主に用いられてきた。(Kameda et al., 2024) ガドリニウム (Gd)造影剤はヒト臨床 MRI 撮像において静注投与薬として頻用されるトレーサーであり、齧歯類髄注モデルでは最も用いられている。複数の医薬品グレード製品が使用可能であり、分子量は製品毎に異なるが 600-1000Da 程度の水溶性分子で Gd 原子を含む。MRI においては T1 値の短縮(R1 値の延長), T2 値の短縮(R2 値の延長), T2\*値の短縮(R2\*値の延長)を示す。T1 値短縮による T1 強調像高信号化をイメージングすることが多く、齧歯類頭蓋内トレーサーイメージングにおいて確立された手法と言え、安定した結果を得ることができる手法である。髄注された Gd 造影剤はくも膜下腔に一定時間とどまり、生理的な流れに乗って頭蓋内へ広がり、脳実質や CSF 流出路へ移行するのが観察される。

Gd 造影剤髄注後のダイナミック MRI は、T1 強調像で評価されることが多い。2D 撮像であれば spin echo 系シーケンスあるいは gradient echo 系シーケンスのいずれも使われるが、3D 連続撮像では gradient echo 系高速撮像シーケンスの一つである spoiled gradient echo (SPGR)シーケンスが高速・高分解能で撮像可能でありよく用いられる。T1 強調像の問題点としては信号変化とトレーサー濃度が線形の関係とならず、特にトレーサー濃度が高い領域で Gd 濃度と信号値の変化に乖離を生じ信号変化量とトレーサー濃度変化を定量的に関係づけることが難しくなる点が挙げられる。これは T1 強調像の信号値があくまでも T1 コントラストを強調したものであり、プロトン密度、T2\*値など他のパラメータの影響も受けているためである。

T1 強調像の定量性に関する問題を解決する方法として、R1 値( $=1/\text{T1 値}$ )定量が考えられる。R1 値を直接測定することができれば、他の定量パラメータの影響を受けずに信号を評価する事が可能となる。また、R1 値の造影前後の変化量とトレーサー濃度変化に線形関係を仮定することができるため(Pintaske et al., 2006)、髄注 MRI においてより定量的な解析が可能となる。しかし、R1 値を算出するためには複数のコントラスト画像を取得して他のパラメータの影響を相殺し R1 を推定する必要

があり、時間分解能を大きく損なうことになる。R1 マップ撮像を高速化する手法も提案されているが、トレードオフとして定量値の精度を損なう可能性があると考えられる (Lee et al., 2018)。当研究室で今後より定量的な Gd 造影剤動態解析を行えるようにするため、R1 マップをダイナミック撮像する手法およびその定量精度について検討を行う必要がある。

$^{17}\text{O}$ - $\text{H}_2\text{O}$  は酸素の安定同位体である  $^{17}\text{O}$  を持つ水分子であり、 $^{17}\text{O}$  は酸素の安定同位体の中で唯一 MRI の信号変化をもたらす、自然中には 0.038% 程度存在している。 $^{17}\text{O}$  濃度を 10% 以上に濃縮した MRI 撮像用製剤が販売されており、動物実験及びヒト第 1 相試験において生体投与の安全性が確認されている (Kameda et al., 2024, Harada et al., 2022)。MRI における  $^{17}\text{O}$  の検出は、直接法と間接法の 2 種類が存在する。直接法は  $^{17}\text{O}$  を直接励起し信号検出する手法であり、RF パルスの送信や信号の受信において通常の MRI で用いられる  $^1\text{H}$  用とは異なる専用の機器が必要となる。間接法は、 $^{17}\text{O}$  と結合している  $^1\text{H}$  が T2 値変化を生じる事を利用して、薬剤投与前後で信号値を比較する事により  $^{17}\text{O}$  の存在を検出する。間接法は既存の  $^1\text{H}$  用 MRI 装置で撮像可能であり、直接法よりも高感度で  $^{17}\text{O}$  を検出可能であると報告されている。当研究室では、 $^1\text{H}$  用 MRI 装置のみ使用しているため、間接法により  $^{17}\text{O}$  イメージングを行っている。

$^{17}\text{O}$  間接法 MRI では、R1 および R2\* 値は  $^{17}\text{O}$  の存在により殆ど変動せず、 $R2(=1/T2)$  のみが増加する。従って、T2 コントラストを強調するシーケンスを用いれば  $^{17}\text{O}$  の存在を画像化することができ、定量も可能である。 $^{17}\text{O}$  間接法 MRI で最も頻繁に用いられているのが fast spin echo 法の T2 強調像である。このシーケンスは古典的なものであり撮像技術としては安定しているが、他の高速撮像シーケンスと比較すると単位時間あたりの k-space 信号充填速度は高いとはいえず、撮像時間の延長や、撮像高速を目指す場合の空間分解能低下が問題となる。

$^{17}\text{O}$ - $\text{H}_2\text{O}$  髄注下 MRI の先行研究は非常に少ないが、齧歯類における報告とヒトにおける報告が存在する。齧歯類においては、髄注下に T2 強調像を連続撮像したところ、CSF に分布しその後脳実質に移行しておりその動態は Gd 造影剤のそれに類似していたと報告されている。(Alshuhri et al., 2021, Zhu et al., 2023) ヒトにおける報告は一報のみであるが、腰椎レベルからの髄注後、1 時間時点ではくも膜下腔や脳実質に分布しその後洗い出されたと報告されている。(Kameda et al., 2024) 齧歯類の髄注ダイナミック撮像ではいずれもマルチスライス 2D T2 強調像が用いられていたが、脳実質のセグメンテーションは可能なものの CSF の定量評価は空間分解能が低く達成できていなかった。CSF を直接観察可能なレベルまで高分解能化できれば、

髄注された  $^{17}\text{O}$  の直後の動態を直接観察することができ、頭蓋内水動態解析において有用であると考えられる。

(2) 本研究で何を明らかにしようとしているか

第1章では、ラット CSF 流出路として深頸部リンパ節(DCLN)を介する経路に着目し、同経路のリンパ管を結紮して溶質トレーサーである Gd 造影剤大槽髄注下ダイナミック MRI を撮像することで CSF 流出に変化を生じるかどうかを検討した。

第2章および3章では、第1章で用いた Gd 造影剤髄注下 MRI を発展させて定量性が高くトレーサー濃度の推定が可能な撮像を達成すること、および第1章では行わなかった溶媒トレーサーである  $^{17}\text{O}\text{-H}_2\text{O}$  髄注下 MRI を用いて CSF 内の溶媒トレーサー動態解析を可能にすることを目標とした。Gd 造影剤使用下 MRI については定量値である R1 マップの連続撮像を、 $^{17}\text{O}\text{-H}_2\text{O}$  髄注下 MRI については画像再構成手法の工夫による画質改善を通じて高分解能画像の撮像を目指した。第2章ではファントムを用いて撮像条件の検討を行い、第3章でラットを用いた髄注下 MRI の検証を行った。

## 第一章

### 緒言

全体の緒言で述べたように、脳脊髄液の流出経路については複数の経路の存在が想定されている。この中で、深頸部リンパ節(deep cervical lymph node: DCLN)は鼻腔から流出するリンパ管や頸静脈孔のリンパ管と接続しており、頭蓋から流出した溶媒や溶質の中継地点となっていると報告されている(Bradbury et al., 1981, Proulx, 2021, Iliff et al., 2013, Taoka and Naganawa, 2020, Xue et al., 2020, Zou et al., 2019, Muldoon et al., 2004)。先行研究では、DCLN 周囲の組織を結紮して CSF 流出を阻害することで、疾患モデルマウスにおいてアミロイド $\beta$  やシヌクレイン $\alpha$  といった異常蛋白の沈着亢進が見られると報告されている(Wang et al., 2019, Zou et al., 2019, Lee et al., 2020)。加えて MRI を用いた研究で、片側 DCLN 結紮後 2 週間のマウスにおいて結紮側脳実質の間質液貯留が示唆されている(Chen et al., 2020)。以上のように、頭蓋外 CSF 流出経路障害は脳実質に病理的变化を生じることが示されてきたが、CSF の動態に変化を生じるかどうかについてはわかっていなかった。

Gd 造影剤髄注下ダイナミック MRI は実験動物を用いた生体イメージングの手法として比較的広く行われている方法である(Proulx, 2021, Iliff et al., 2013, Taoka and Naganawa, 2020, Ding et al., 2018, Ahn et al., 2019, Jiang et al., 2017)。この手法では、脳脊髄液や脳実質内間質液の動態を溶質トレーサーの分布を介して解析することが可能である。著者らは、DCLN 結紮と髄注下 MRI を組み合わせることで、頭蓋外 CSF 流出経路障害モデル動物における CSF 動態の解析を行うことができると考えた。

本研究では、Gd トレーサー髄注下 MRI で DCLN 結紮モデルラットにおける CSF 動態および脳実質内トレーサー動態の変化を検討した。

### 方法

#### 1. 実験動物及び前処置

本研究の内容は北海道大学動物実験委員会の承認を得(承認番号 20-0078)、関連するガイドラインを遵守して施行した。実験には 7-10 週齢のオス Wistar ラット(265-390g, ジャクソンラボラトリージャパン)13 匹を使用した。実験中、ラットはイソフ

ルラン投与で全身麻酔を行った。イソフルラン 4%で麻酔導入し、呼吸数 50-80 回/分をターゲットとして約 2% (1.8-2.2%)で維持麻酔を行った。ラットの直腸温を経時的にモニターし、 $36.5 \pm 1^\circ\text{C}$ を維持するよう加温パッドと加温水灌流で体温保持を行った。実験終了後の安楽死はイソフルラン過量投与にて施行した。

## 2.DCLN 結紮および大槽投与経路確保

麻酔導入後ラットを仰臥位とし、頸部正中切開を行って筋間を剥離し両側内頸動静脈外側に存在する DCLN を同定した。結紮群では、DCLN の頭側にあるリンパ管を含む軟部組織を 4-0 絹糸にて神経や血管を温存しながら結紮した。シャム手術群では、DCLN の露出まで行い結紮処置は行わなかった。いずれの群でも処置後創部を 4-0 絹糸で閉創した。次にラットを腹臥位とし、後頸部正中切開を加えて環椎後頭関節靱帯を露出した。23 ゲージ針を用いて小さな硬膜穿孔を作成し、直ちに外径 0.6 mm のポリエチレンカテーテル(PE10)を大槽内に 1mm 刺入し、接着剤で固定し髄腔内投与経路を作成した。後頭部の創部は 4-0 絹糸を用いて閉創した。

## 3.エバンスブルー色素髄注下予備実験

ラット 1 匹を用いて、髄注トレーサの頸部リンパ節移行および DCLN 結紮による流出ブロックを確認する予備実験を行った。頸部正中切開後、右 DCLN に対して結紮処置を、左 DCLN に対してシャム手技を行った。生理食塩水に溶解した 2%エバンスブルー溶液  $34\mu\text{L}$  をマイクロインジェクタで  $1.7\mu\text{L}/\text{min}$  で 20 分かけて髄腔内投与した。注入開始 60 分及び 90 分後に、DCLN および周囲リンパ管のエバンスブルー分布を実体顕微鏡下で観察した (図 1a)。

## 4.髄注ダイナミック MRI

12 匹のラット DCLN 結紮群( $n=6$ )とシャム群( $n=6$ )に分けて用いた。前述の手術後、ラットを MRI 用受信コイル内へ付属のイヤーバーを用いて固定した。Dynamic contrast MRI (DCE MRI)は 3.0T 臨床用スキャナ(Magnetom Prisma, シーメンスヘルスケア)、本体内送信コイル、直径 45mm 8 チャンネル phased array coil (高島製作所)を用いて行われた。撮像シーケンスには 3D spoiled gradient echo T1 強調像を用いた。撮像条件の詳細は以下の通りとした。TR: 8.72ms, TE: 3.6ms, flip angle:  $14^\circ$ , FOV:  $76 \times 66.5 \times 51.2\text{mm}$ , 撮像 matrix:  $192 \times 168 \times 256$ , 再構成マトリクス:  $384 \times 336 \times 256$ , 再構成解像度:  $0.2 \times 0.2 \times 0.2\text{mm}$ , NEX: 1, 1 相あたり撮像時間: 2 分 27 秒, 繰り返し回数: 43, 総スキャン時間: 105 分 21 秒。造影剤投与前に 3 相の造影前画像を撮像した後、生理食塩水に溶解した 10mmol/L Gd-BTDO3A(Gadovist, バイエル薬品)を  $1.7\mu\text{L}/\text{min}$  で 20 分間、合計  $34\mu\text{L}$  を MRI

対応マイクロインジェクタで髄腔内投与した。髄腔内注入開始と同時に造影後画像の撮像を開始し、40 相の dynamic scan を行った(図1b)。

## 5. データ処理および評価項目

画像処理および信号変化計測の関心領域(region of interest: ROI)設定は MATLAB(2022a), Metavol, ImageJ を用いて行った(Hirata et al., 2014, Schneider et al., 2012)。造影前 3 相の平均画像に対して、造影後各相の画像を 3 次元剛体補正で体動補正を行った。Metavol を使用して、ボリュームデータから 0.2mm 厚 2D 横断画像を 鼻腔レベル, Bregma 吻側 7.8mm, Bregma 吻側 0.4mm, Bregma 尾側 6.0mm, Bregma 尾側 10.0mm, ならびに環椎レベルの 6 断面を作成した。また、下垂体陥凹レベルの CSF ROI を取得するため、下垂体陥凹レベルで 2D 冠状断画像を取得した。CSF ROI は 4 箇所(環椎レベル CSF, Bregma 吻側 7.8mm 断面における嗅球間 CSF, Bregma 尾側 6.0mm の断面における松果体陥凹 CSF, 冠状断面における下垂体陥凹 CSF)で作成し、いずれも画像内における最大径の長方形 ROI を取得した。また、4 箇所の ROI(鼻腔レベルの上鼻甲介, Bregma 吻側 7.8mm 断面における両側嗅球, Bregma 吻側 0.4mm 断面における大脳, Bregma 尾側 10.0mm 断面における頸静脈孔外軟部組織)に対して、断面上の構造に沿った多角形 ROI を置いた。概略を図 2b に示す。各 ROI について、造影後 40 相における相対信号比の経時変化(Time-intensity curve: TIC)を造影前 3 相の平均を基準として算出した。造影後の相対信号比データにはウィンドウ幅 5 相の移動平均フィルタを用いて平滑化を行った。各 ROI の TIC は mean±standard deviation で表示した。CSF の ROI および鼻腔内 ROI 計 5 箇所(環椎レベル, 嗅球間, 松果体陥凹, 下垂体陥凹, CSF ROI 4 箇所(水色), CSF 流出部 ROI 2 箇所および脳実質 ROI 2 箇所(黄色))を設定した。各 ROI において、造影後 40 相における相対信号比の経時変化(Time-intensity curve: TIC)を造影前 3 相の平均を基準として算出した。造影後の相対信号比データにはウィンドウ幅 5 相の移動平均フィルタを用いて平滑化を行った。各 ROI の TIC は mean±Standard Deviation で表示した。CSF の ROI および鼻腔内 ROI 計 5 箇所(環椎レベル, 嗅球間, 松果体陥凹, 上鼻甲介)について TIC の最大勾配, ピーク時間, ピーク信号比, 半減期を計算し比較を行った。最大傾斜は注入開始からピーク時間までの間の隣接する 2 点の傾斜の最大値として算出した。半減期はピーク時間から最終相までのデータに対し、以下の様に指数近似を行って算出した。

$$SR(t) = a \times e^{-b \times (t - T_{peak})} + 1 \quad (1)$$

ここで、 $SR(t)$  および  $T_{peak}$  は、それぞれ時間  $t$  における信号比と信号比のピークタイミングを表し、 $e$  は自然対数の底である。 $a$  と  $b$  は各 ROI に対して個別のラットごとに

MATLAB 上で推定した。その後, (1)で算出した  $b$  を用いて次の式により信号消失半減期  $EH$  を計算した。

$$EH = \frac{\log 2}{b} \quad (2)$$

## 6.統計処理

統計処理は GraphPad Prism 9 を用いて行った。TIC の各相において two-way repeated measures ANOVA を用い, Sidak 補正を併用して結紮群とシャム群で比較した。最大勾配, ピーク時間, ピーク信号比, および信号半減期は, 環椎レベル, 嗅球間, 松果体陥凹, 下垂体陥凹, 鼻甲介の ROI について結紮群とシャム群間で比較した。連続変数の 2 群間比較には U-test を用いた。P<0.05を統計学的有意とした。

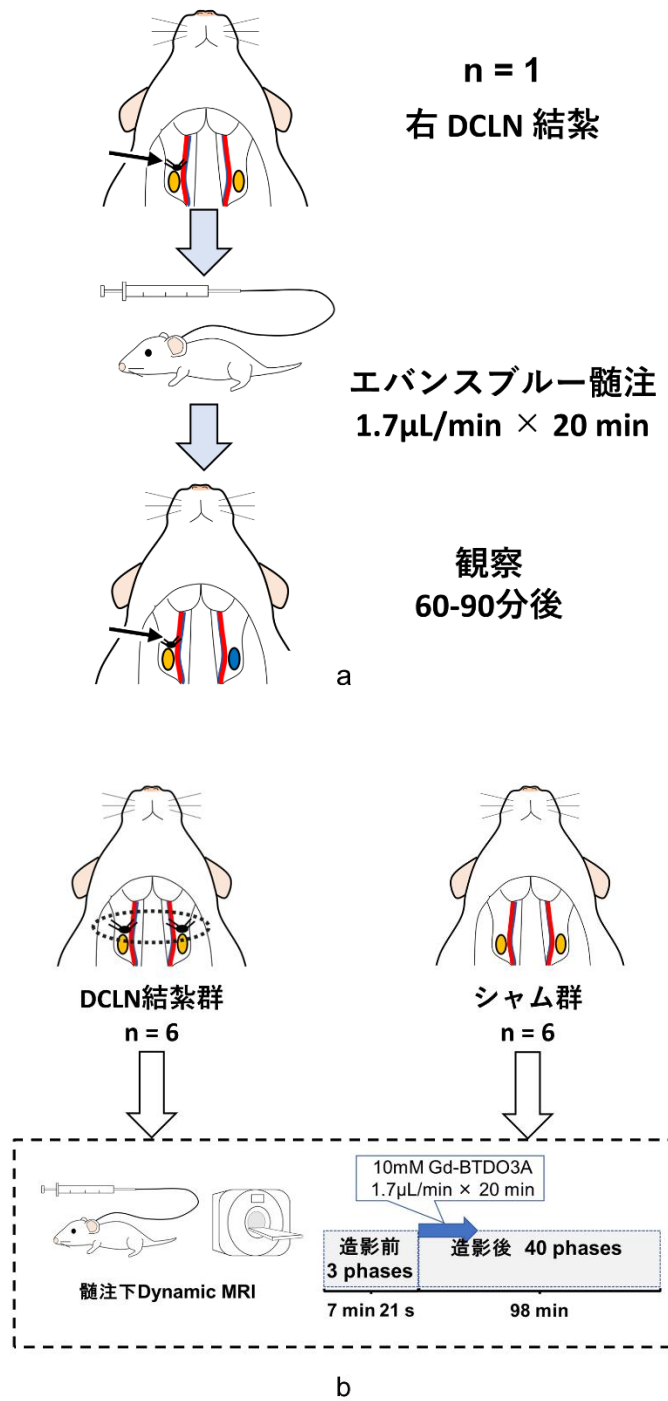


図1.実験概要シェーマ. (a)片側 DCLN 結紮下エバンスブルー色素髄注予備実験. (b)両側 DCLN 結紮下 Gd 造影剤髄注ダイナミック MRI 実験.

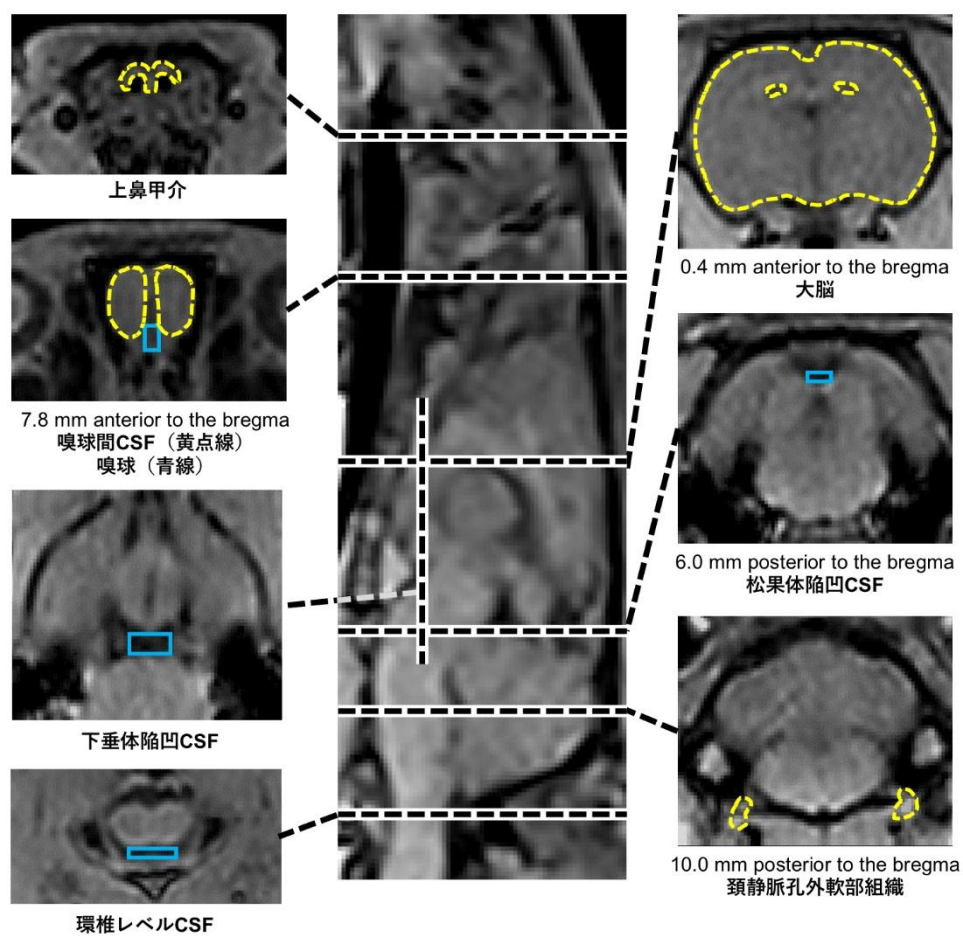


図 2.

CSF および脳実質 ROI.

## 結果

### 1. エバンスブルー色素を用いた予備実験

髄注された色素の DCLN への流出の経時変化およびシェーマを図 3 に示す. シャム手技側では, 左流入リンパ管および DCLN に髄注された色素が分布するのが確認された. 結紮側である右側では, 流出リンパ管の拡張と内部の色素充満が確認できたが, DCLN への色素分布はほぼ見られなかった. 上記より, DCLN 結紮モデルは CSF 頭蓋外流出経路の障害モデルとして機能していることが示された.

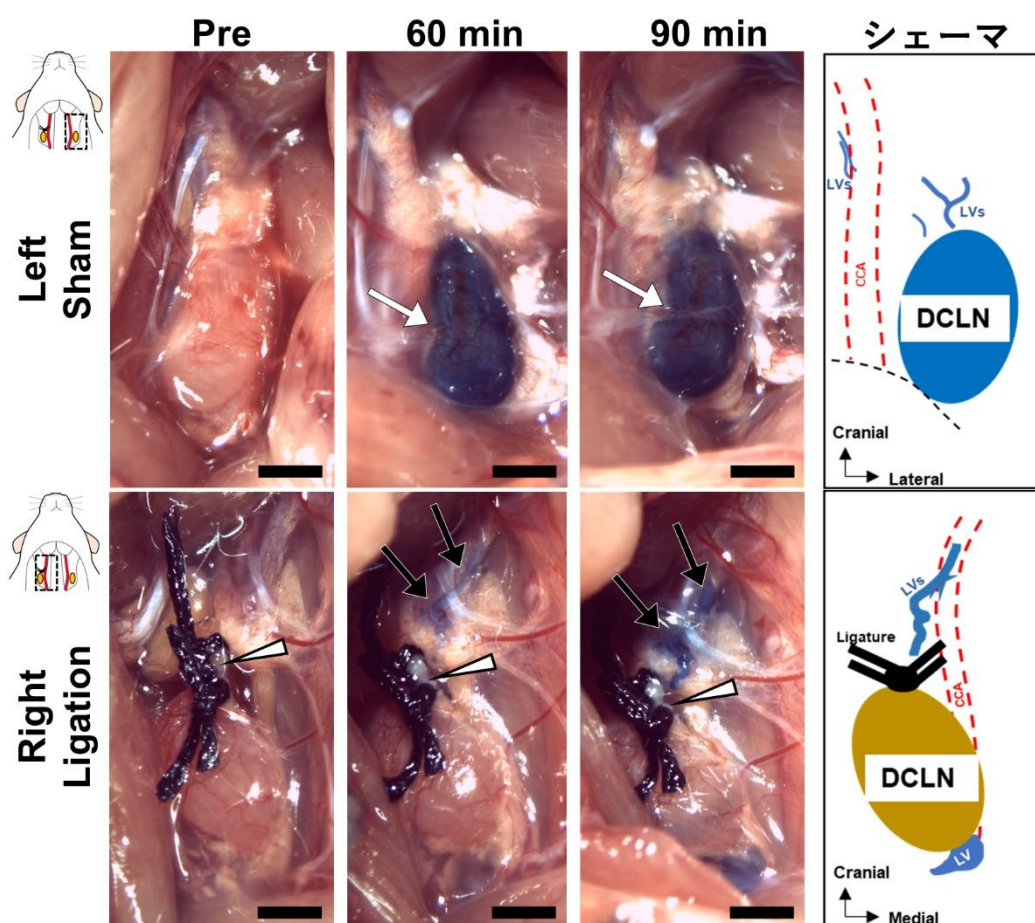


図 3. エバンスブルー色素予備実験の結果.

白矢印はシャム手技側 DCLN へのトレーサー移行を示す. 黒矢印に示すように, DCLN 結紮部頭側ではリンパ管の拡張とトレーサー分布が見られるが, 結紮部下流の DCLN にはトレーサー移行を認めない. スケールバーは 1mm を示す.

## 2. 髄注ダイナミック MRI

各群の代表的な個体に置ける髄注後信号の経時変化を図4に示す。大槽に投与された造影剤は腹側のくも膜下腔を吻側へ移動し、篩板を越えて鼻腔内へ分布するのが観察された。吻側のくも膜下腔や鼻腔内への造影剤到達はシャム個体の方が早く、ピークの信号もシャム群で高かった。後期相においては、結紮群で腹側くも膜下腔に造影剤の滞留が見られた。

各 ROI に置ける TIC の群間比較結果を図5に示す。環椎レベルにおいては20分の髄注が終了した直後に信号ピークを示し、これよりも吻側の ROI では、髄注部位から離れるに従ってピーク時間の遅延とピーク信号の低下を認めた。背側の CSF ROI である松果体陥凹では、他の ROI と比較してピーク時間は大幅に遅延していた。鼻腔の CSF ROI における TIC は早期ピークとその後の信号低下を示し、脳実質 ROI の TIC よりも CSF に置いた ROI のそれと類似していた。嗅球や脳の ROI では、CSF の ROI と比較して信号変化は小さく、MRI を撮像した造影後 98 分間では信号が上昇し続けた。頸静脈孔周囲の軟部組織においては、明らかな信号変化を認めなかった。Two-way repeated measures ANOVA では、鼻甲介 ROI において注入後 22.1 分から 39.2 分にかけてシャム群で信号が高く、有意差を認めた。

最大流入勾配、ピーク時間、ピーク信号比、および消失半減期の群間比較結果を図6に示す。最大流入勾配は両群とも注入部位に近い環椎レベルで最大であり、注入部位から離れて吻側に行くにつれて値が縮小し、群間の有意差は鼻甲介で認められた(シャム群,  $0.075 \pm 0.0061$ ; 結紮群,  $0.044 \pm 0.0086$  /min,  $P=0.011$ )。ピーク時間は吻側に行くに従って遅延し、結紮群でピーク時間が遅延する傾向が見られたが、有意な差は見られなかった(嗅球間 CSF: シャム群,  $31.0 \pm 2.53$ ; 結紮群,  $38.4 \pm 7.38$ ;  $P=0.18$ ; 鼻甲介: シャム群,  $37.2 \pm 4.22$ ; 結紮群,  $44.9 \pm 6.13$ ,  $P=0.14$ ; 環椎レベル CSF: シャム群,  $20.0 \pm 1.00$ ; 結紮群,  $21.6 \pm 2.40$ ;  $P=0.39$ ; 下垂体陥凹 CSF: シャム群,  $25.3 \pm 2.53$ ; 結紮群,  $27.0 \pm 0.00$  min,  $P=0.30$ )。ピーク信号比も同様に吻側に行くに従って低下し、群間の有意差は鼻甲介 ROI で認められた(シャム群,  $2.12 \pm 0.19$ ; 結紮群,  $1.72 \pm 0.11$ ;  $P=0.011$ )。信号半減期はいずれの ROI においても結紮群で延長する傾向が見られ、有意差は環椎レベル、下垂体陥凹 CSF、嗅球間 CSF において見られた(環椎レベル CSF: シャム群,  $30.5 \pm 2.70$ ; 結紮群,  $44.4 \pm 12.6$ ;  $P=0.043$ ; 下垂体陥凹 CSF: sham,  $30.2 \pm 2.49$ ; 結紮群,  $41.3 \pm 7.57$  min;  $P=0.021$ ; 嗅球間 CSF: シャム群,  $30.2 \pm 2.67$ ; 結紮群,  $44.8 \pm 7.47$  min;  $P=0.021$ )。

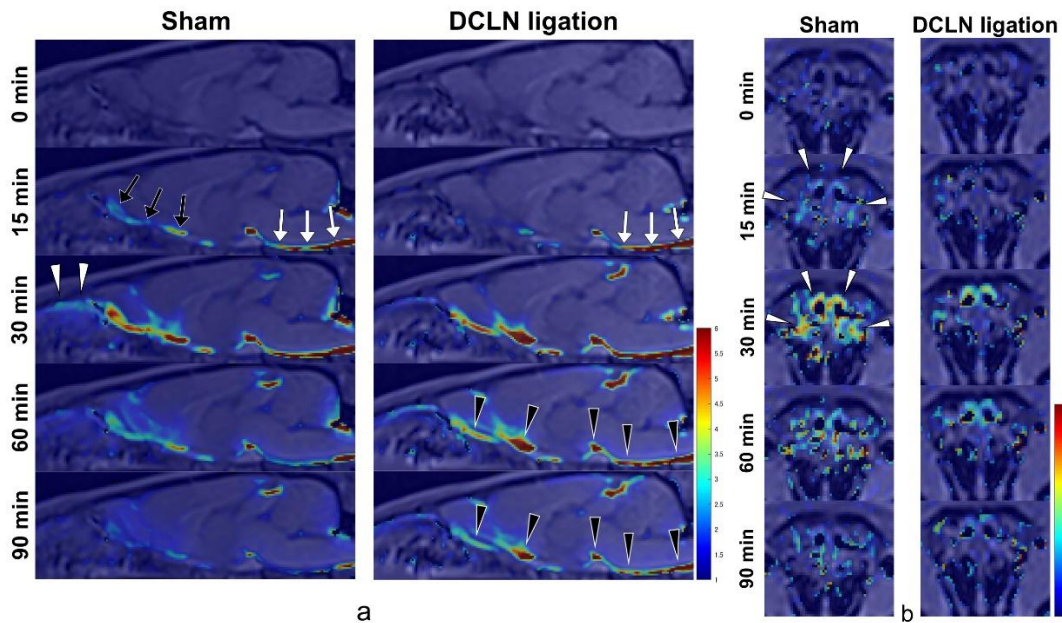


図 4. 代表的個体における Gd 髄注後トレーサー動態。

矢状断における全脳の画像(a)および横断面における鼻腔内断面(b)を示す。造影前との相対信号比をカラーマップとして造影前画像にオーバーレイしている。髄注開始後、トレーサーは腹側くも膜下腔を吻側へ移動する(白矢印)が、シャム個体の方が15分時点での吻側到達が早く(黒矢印)、15-30分時点での鼻腔内トレーサー分布もシャム個体の方が明瞭に見られる(白矢頭)。造影後期には、結紮個体で腹側くも膜下腔にトレーサー滞留が見られる(黒矢頭)。

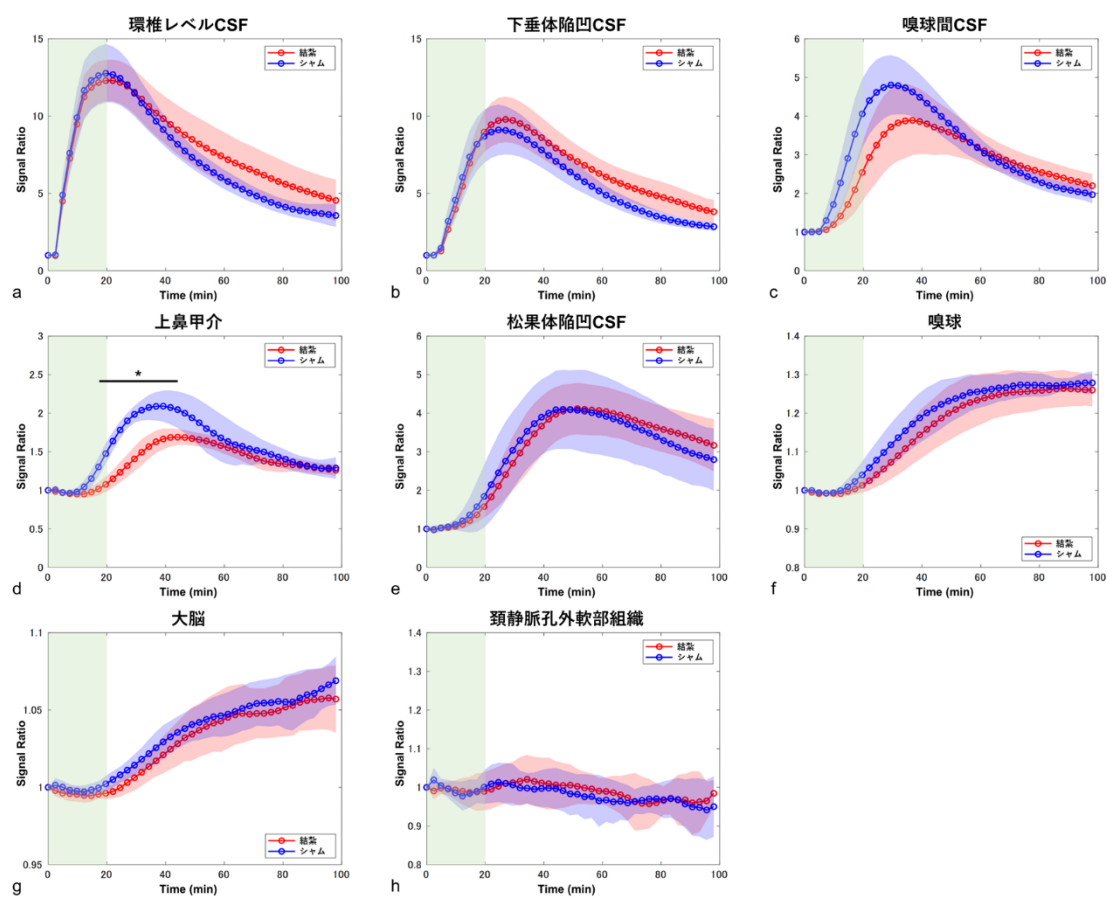


図5. 各 ROI における TIC.

背景の緑色部分は 20 分間のトレーサー注入時間を示す.

\*は  $P < 0.05$  を示す.

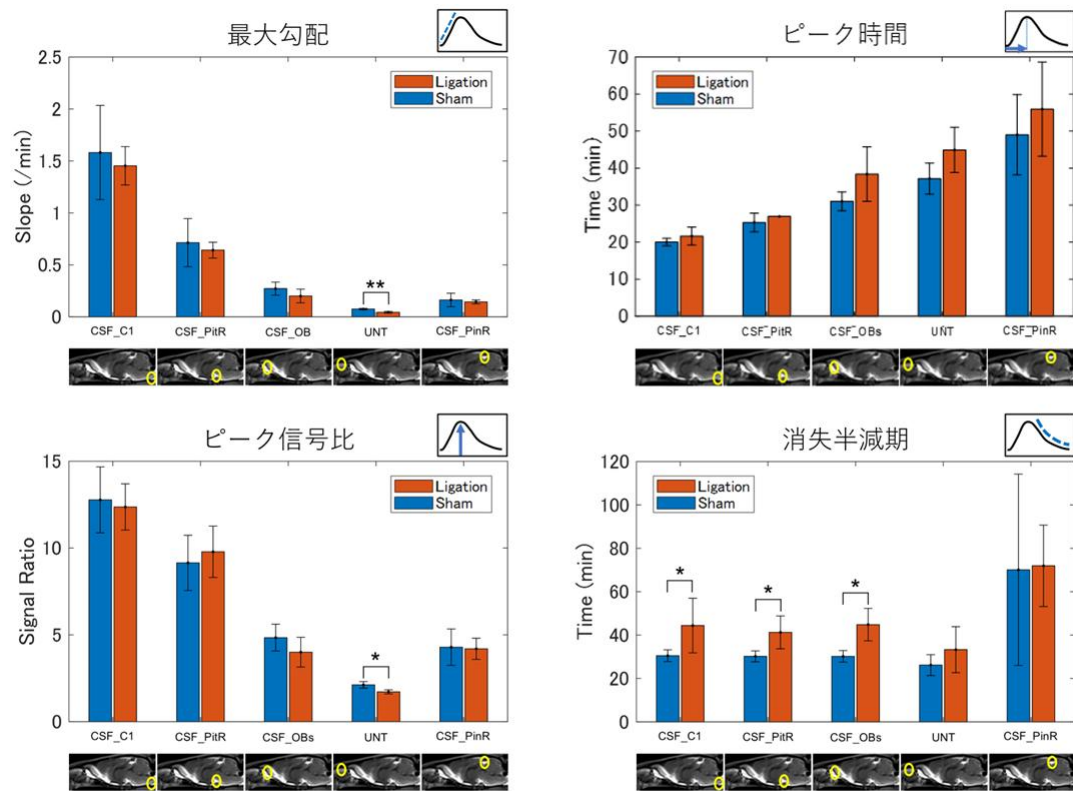


図 6.各 ROI におけるカーブ特徴量.

CSF\_C1,環椎レベル CSF; CSF\_PitR,下垂体陥凹レベル CSF; CSF\_OBs,嗅球間 CSF, UNT, 上鼻甲介;CSF\_PinR, 松果体陥凹レベル CSF.

\*は  $P < 0.05$  を示す.

## 考察

### (1) 本研究で得られた新知見

本研究では、DCLN 結紮が CSF 頭蓋外流出路を障害することで頭蓋内の CSF 溶質動態や鼻腔からの流出経路動態が変化することを初めて示した。また、その変化が腹側くも膜下腔および鼻腔内で主に生じることを示した。これは、鼻腔経路がラット CSF 頭蓋外排泄経路の主要な経路の一つであることとも一致する所見である。

CSF の流出障害は、先行報告で示されたような脳実質からの老廃物排泄障害と関連している可能性があり、また、流出障害を長期間維持することができれば水頭症モデルの作成なども期待できる可能性がある。今後は慢性期モデルの検討や疾患モデル、遺伝子組換えモデルなどとの組み合わせの検討などについても行っていきたい。

本研究においては臨床機スペックの 3.0T MRI に専用受信コイルを組み合わせることで、ラット頭蓋内のトレーサー動態を観察することが可能であることを示した。一般的には、齧歯類の脳神経系イメージングは 3.0T よりも大きな静磁場強度を持つ前臨床機で行われることが多い。しかしながら、本研究では臨床機スペックのハードウェアを用いながら前臨床機に近い空間/時間分解能で画像化する事が可能であることを示した。臨床機を用いて前臨床撮像を行う潜在的なメリットとしては、パラレルイメージングや部分フーリエ変換を含む画像再構成スキームについて臨床撮像と同様の発展的なものを使用可能であること、ヒト撮像に用いられる発展的なシーケンスを前臨床撮像にも適応できること、前臨床撮像と臨床撮像で同様なシーケンスを適応でき橋渡しの役割を担うことが出来る可能性があることが挙げられる。本研究は当研究室におけるラット脳 MRI 撮像初期のデータであり、今後さらなるシーケンスの最適化余地があると考えている。また、トレーサー動態の解析のみならず脳実質に及ぼされる変化を捉えることが出来るようなイメージング、特に脳脊髄液腔の定量や脳実質信号の定量解析を行えるようなシーケンスの策定にも取り組む予定である。

### (2) 先行研究との比較

2010 年代後半以降、ヒトおよび齧歯類において上矢状静脈洞周囲や後頭蓋窩の硬膜リンパ管での CSF 吸収および頸静脈孔周囲リンパ管からの流出が頭蓋外流出経路として注目される様になった (Albayram et al., 2022)。しかしながら、本研究の結果では注入されたトレーサーは腹側のくも膜下腔に主に分布し、鼻腔から頭蓋外に排出されていた。また、背側くも膜下腔のトレーサー動態は腹側よりも大幅に遅く、頸静脈孔周囲からのトレーサー排泄も確認できなかった。先行報告では蛍光トレーサー投与後の組織学的検討が多く、生体における多数経路からの動的なトレーサー排

泄を量的に評価するのが難しかったのが不一致の一因であった可能性がある。尚、2024 年になって、鼻腔および頭蓋底部の脳神経周囲から鼻咽腔周囲リンパ管叢を経由して頸部リンパ管から DCLN に至るルートが CSF 流出路として重要であると報告がなされた(Yoon et al., 2024)。この報告で強調された鼻腔及び頭蓋底部脳神経周囲経由から頸部リンパ節へ至る CSF 流出路は、本研究で得られた結果と概ね整合するものと考えられる。

頸部リンパ流を阻害することによる齧齒類脳形態変化については、最近になってプレプリント論文が見られた。この報告では、頸部リンパ節切除に放射線照射を併用したリンパ流阻害で水頭症および脳実質の浮腫性変化が報告されている(Cheon et al., 2024)。同様に、本モデルを発展させることで慢性期水頭症モデルを作成できる可能性が考えられる。ただ、生体ではリンパ管の一時的な結紮障害のみでは容易に側副路を形成する可能性も考えられるため、今後慢性期モデルの確立においてはリンパ節切除モデルをはじめとしたより高度な流出障害を生じるモデルの導入も含め検討を行いたい。

### (3) Limitation

本研究の limitation としては急性期モデルのみの検討であり、慢性期モデルについての検証は行っていない点が挙げられる。これについては(2)でも述べたが強いリンパ流障害を惹起することで慢性期阻害モデルを作成した報告が上がっており、これも参照しながら慢性期モデルの検証も行う予定である。加えて、MRI で得られた信号は T1 強調像の相対信号であり定量パラメータではないため、トレーサー濃度と完全に線形な関係を想定できる訳ではない点に注意が必要である。また、本検討では脳実質に移行したトレーサーの洗い出しについて撮像時間が短く信号が十分にピークアウトせず検討することができなかった。髄注後個体で脳実質からの洗い出しを観察するには3時間を越える撮像時間が必要になると考えられラット個体への麻酔負担も大きく、実質からの溶質分子流出については直接実質内注入など他の手法の使用も検討したい。最後に本研究で得られた所見はラットにおける CSF 溶質分子動態でありヒトにおけるそれとは異なっている可能性がある点に注意が必要である。

## 第 2 章

### 緒言

第 1 章において、溶質トレーサーである Gd 造影剤を用い T1 強調像でトレーサー動態を解析した。この手法は確立された手法で先行報告も多い。しかしながら、T1 強調像はトレーサー濃度により R1 値と R2\*値という 2 つのパラメータが同時に変動し結果信号変化からトレーサー濃度は推定しづらいという問題点がある。このため、第 1 章の解析では TIC の解析や TIC の曲線特徴量を用いて解析を行いモデル動物における溶質動態の変化を見いだしたが、定量的な解析、例えば投与されたトレーサーの CSF や脳実質における具体的な濃度の推定には至らなかった。加えて、第 1 章の実験を行った時点では CSF と脳実質の両方を同時に評価可能な溶媒トレーサー髄注下 MRI を撮像するには至っていなかった。

Gd 造影剤髄注下 MRI に関する定量性の問題は、定量的な値である T1 値およびその逆数である R1 値を分離して得ることができれば解決される。R1 値は Gd 造影剤濃度と線形の関係性が想定されるため、造影前後の R1 値変化量からトレーサー濃度を推定する事が可能だからである。(Pintaske et al., 2006) ラット全脳 T1 強調画像に用いられる 3D SPGR T1 強調像をベースにして R1 マップを取得することができる (Fram et al., 1987)。この R1 マップ生成手法では複数の flip angle で画像を撮像し、コントラストの変化から R1 値を算出し、variable flip angle 法 (VFA 法) と呼称される。この手法は第 1 章の撮像手法の延長線上にあり、本研究室の環境で適用しやすい。VFA 法でラット髄注下 MRI を撮像するのを最終的な目標として、本章では R1 値算出で最もスタンダードとされている fast spin echo inversion recovery 法 (FSE-IR 法) と VFA 法の比較をファントムで行って条件設定を行うこととした。VFA 法では、撮像する flip angle の数を増やせばより正確な値が推定出来るが撮像時間は延長する。2 種類の flip angle が VFA 法における最小 flip angle 数であるが、2 種類のコントラストから生成した R1 マップの精度が許容可能なものであるか、検証する必要があると考えられる。さらに、flip angle を変えてコントラストを変え定量値推定を行っているため、flip angle の補正を行うことで定量精度が向上すると報告されている。(Lee et al., 2018) 本検討では、B1 マップによる flip angle 補正の有無での VFA 法定量精度も検証することにした。尚、本研究でスタンダードとする FSE-IR 法は flip angle の不均一性に対しては robust とされている。

全体の緒言で述べたように、溶媒トレーサーである  $^{17}\text{O}\text{-H}_2\text{O}$  を用いた間接法 MRI では R2 値のみが変動するため信号変化からトレーサー濃度を推定可能で、R2 マッ

ブ取得を行わなくても定量解析を行うことが可能である。しかしながら、 $^{17}\text{O}$ - $\text{H}_2\text{O}$  間接法 MRI の最大の問題点は画像の空間分解能と時間分解能を上昇させづらいという点にある。齧歯類を用いた同手法の先行報告の空間分解能はラットを用いたもので  $0.3 \times 0.3 \times 1.5\text{mm}$ 、マウスを用いたもので  $0.2 \times 0.2 \times 0.5\text{mm}$  程度であり、大槽に投与された  $^{17}\text{O}$ - $\text{H}_2\text{O}$  の CSF 内動態を脳実質へのトレーサー分布と分離して評価することは難しかった (Alshuhri et al., 2021, Zhu et al., 2023)。しかしながら、CSF のトレーサー動態を評価するためには Gd 造影剤の画像と同様に CSF と脳実質を分離して評価できる高時間分解能連続撮像を達成する必要があると考えられた。

MR 画像の信号雑音比 (SNR) は撮像時の空間分解能と反比例し撮像時の加算回数の平方根と比例する。そのため、空間分解能を高く、加算回数を減らす設定にすることによって SNR は低下する。 $^{17}\text{O}$  間接法 MRI の先行研究では脳実質が評価可能な程度の空間分解能に設定し、かつ加算回数を上昇させることで SNR の問題に対応していたが、加算回数を増やすと時間分解能の低下は避けられない。このトレードオフを解消するため、本研究では speech MRI などを用いられる sliding view scheme を用いる事を考えた (Narayanan et al., 2004)。この手法では、該当するタイムポイントの前後複数相の k-space data も合算して画像再構成することで実効時間分解能を担保しながら信号雑音比を大幅に改善することが可能となる。本章ではまず sliding view scheme を適用する work flow の確立、SNR 改善の確認、および  $^{17}\text{O}$  拡散の経過をファントムで画像化可能なことを検証することとした。

以上、本章では sliding view scheme を用いた T2 強調像連続撮像による SNR の改善および  $^{17}\text{O}$  拡散過程可視化の実行可能性をファントムで検証した。また、Gd 造影剤の定量評価のためのファントムも撮像し、FSE-IR 法をスタンダードとして VFA 法 R1 マップ精度検証を行った。

## 方法

### 1. ファントム作成および MRI 撮像

Sliding view scheme を用いた 2D T2 強調像連続撮像の実行可能性を検証するため、以下の実験を行った (図7)。1.5% アガロースゲルをトレーに充填し、中央に 1.6cm 大、深さ 3cm の円筒形空洞を開けたものをファントムとして使用した。MRI は 3T スキャナ、本体内送信コイル、1 チャンネルループ型コイル (高島製作所) を用いて行った。ファントムを MRI 室内で検査前 24 時間静置し、撮像時はスキャン位置セッ

ティング後 15 分静置してから撮像とした。撮像断面内でファントムの穴の中が空気であると MRI 撮像時に磁化率アーチファクトで歪みが発生するため、これを防ぐために 0.6ml の生理食塩水を満たした。穴の上に 0.4ml の生理食塩水化 10%mol  $^{17}\text{O}-\text{H}_2\text{O}$  (大陽日酸)を充填した細径チューブを用意し固定した。横断像でシングルスライス MRI 撮像を開始し、12 相の造影前撮像の信号収集終了直後から次相の信号収集が開始するまでの約 2 秒の間に  $^{17}\text{O}-\text{H}_2\text{O}$  をシリンジで後押しして穴の中へ注入し、造影後撮像を継続した。T2 強調像の撮像条件は以下の通りである。TR, 4500ms; TE, 102ms; flip angle,  $90^\circ$ ; refocus angle,  $180^\circ$ ; エコートレイン, 16; Band width, 100Hz/Px; FOV,  $60 \times 60\text{mm}$ ; スライス厚, 1.0mm; スライス枚数, 1; 撮像 matrix,  $256 \times 256$ ; 再構成 matrix,  $256 \times 256$ ; 面内分解能,  $0.23 \times 0.23 \text{ mm}$ ; NEX, 1; 1 相あたり撮像時間, 0分51秒; 繰り返し回数: 90, 総スキャン時間: 76 分 30 秒。

Variable flip angle(VFA)法による R1 値算出の精度を検証するため、以下のファントムを作成し実験を行った。15ml サンプルチューブに Gd-BTDO3A (Gadovist, バイエル薬品)を生理食塩水で希釈して 0 から 0.5 mM の10種類に調整したものを  $15 \times 12\text{cm}$  大のタッパー内に配置し、間隙をポリビニルアルコール液で充填してファントムとした。ファントムを MRI 室内で検査前 24 時間静置し、撮像時はスキャン位置セッティング後 15 分静置してから撮像とした。MRI は 3T スキャナ、本体内送信コイル、頭部撮像用 20 チャンネル受信コイルを用いて行った。Gold standard として、2D fast spin echo inversion recovery (FSE-IR)法を用いて R1map を算出した (TR, 15 000ms; TE, 11ms; flip angle,  $90^\circ$ ; refocus angle,  $180^\circ$ ; TI, 50/500/1000/2000/4000 ms; エコートレイン, 6; Band width, 150 Hz/Px; スライス厚, 5mm;スライス枚数, 1; FOV,  $160 \times 160\text{mm}$ ; 撮像マトリクス,  $192 \times 192$ ; 再構成マトリクス,  $192 \times 192$ ; 面内分解能,  $0.83 \times 0.83 \text{ mm}$ ; NEX, 1; 1TI 画像あたり撮像時間, 8 分 15 秒; 全撮像時間, 41 分 15 秒)。VFA 法としては、flip angle 2 から  $16^\circ$  まで  $2^\circ$  刻みの 8 つの flip angle で 3D SPGR sequence による撮像を行った (TR, 8ms; TE, 2.55ms; flip angle, 2/4/6/8/10/12/14/16  $^\circ$ ; Band width, 180 Hz/Px; partial Fourier read/phase/slice, 0.88/1.0/1.0; 3D elliptical scan, off; FOV,  $160 \times 160 \times 80\text{mm}$ ; 撮像マトリクス,  $192 \times 192 \times 50$ ; 再構成 matrix,  $192 \times 192 \times 50$ ; 空間分解能,  $0.83 \times 0.83 \times 3 \text{ mm}$ ; 1flip angle 画像あたり撮像時間, 1 分 55 秒; 全撮像時間, 15 分 20 秒)。Flip angle 補正のため 2D マルチスライス B1 map (Chung et al., 2010)の撮像を以下の様に行った (TR, 10000ms; TE: 2.11ms, flip angle,  $8^\circ$ ; エコートレイン, 56; phase partial Fourier, 0.875; スライス厚, 3.0mm; ギャップ, 0.6mm; スライス間隔, 3.6mm; スライス枚数, 32; FOV,  $76 \times 76\text{mm}$ ; 撮像マトリク

ス, 96 × 96; 再構成マトリクス, 96 × 96; 面内分解能, 0.79 × 0.79 mm; NEX, 1; 撮像時間, 0 分 20 秒).

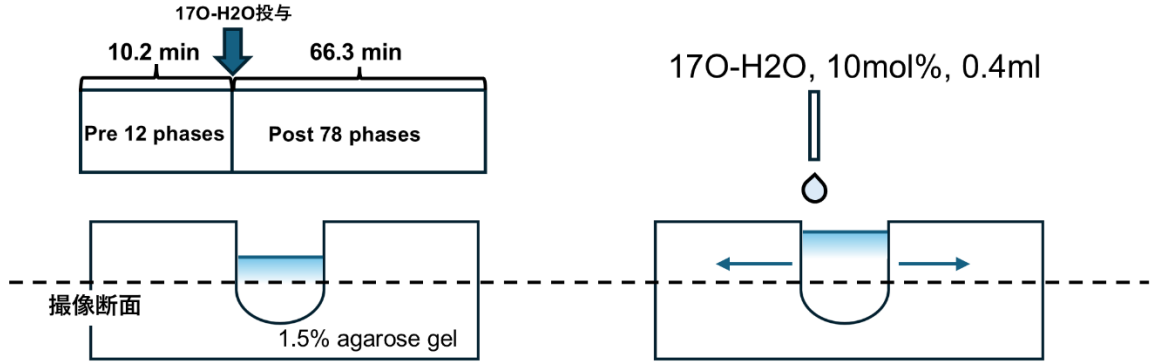


図 7.  $^{17}\text{O}$ - $\text{H}_2\text{O}$  ファントム実験のシェーマ.

## 2. ファントム T2 強調画像 **sliding view** 再構成およびその検討

撮像された 2D T2 強調画像の raw data をコンソールから出力し, MATLAB 上で各時相の k-space data を構成した. Sliding view 再構成では, 該当する時相の前後で収集された信号を組み入れて画像化する(図8). 本研究では, 1 枚の画像を再構成するのに用いた時相の数を window 幅と定義した. 例えば, window 幅 5 では該当する時相および前 2 相, 後 2 相の全 5 時相の k-space data を平均化したのち再構成を行う. ファントム画像において window 幅を 1, 3, 5, 7 に設定し, T2 強調画像連続撮像のデータを得た.

各 window 幅について造影前 8 相目の画像を取り出し, 直径 10 ボクセルの正方形 ROI を FOV 中央の水中(ROI1)および辺縁の空气中(ROI2)に置き(図 9a), 以下の様に信号雑音比(SNR)を計算した(図9a).  $M$ ,  $SD$  はそれぞれ平均値, 標準偏差を表す.

$$SNR = \left(2 - \frac{\pi}{2}\right)^{1/2} \times \frac{M_{ROI1}}{SD_{ROI2}} \quad (3)$$

得られた各 SNR について, window 幅 1 における SNR 値を 1 とした相対 SNR を得た. 尚, ROI は各 window 幅で同じ位置およびサイズとした.

さらに, 各 window 幅の画像において, 直径 4 ボクセルの正方形 ROI を FOV 中央の水中および 1cm 離れたアガロースゲル内の 2 カ所に取得し(図 9f), 信号の経時変化をプロットした. ここでも ROI は各 window 幅で同じ位置およびサイズとした.

$^{17}\text{O}$  投与前後の T2 強調像の信号変化から, 以下の式を用いて  $^{17}\text{O}$  濃度を推定することが出来る. (Kameda et al., 2024)

$$Density_{^{17}\text{O}}(\%) = -\frac{1}{TE \times R2_{^{17}\text{O}}} \times \log\left(\frac{SI_{pre}}{SI_{post}}\right) + NA_{^{17}\text{O}} \quad (4)$$

TE はシーケンスのエコー時間,  $R2^{^{17}\text{O}}$  は  $^{17}\text{O}$  の R2 値(=1/T2 値)で 3.3 /sec, SI は信号値,  $NA_{^{17}\text{O}}$  は自然中の  $^{17}\text{O}$  存在比(0.038%)である. Window 幅 5 の画像について, 造影前画像 12 相のうち信号が安定するまでの最初の 5 相を不使用とし, 6-10 相目の信号の平均値を  $SI_{pre}$  として, 造影後各相について  $^{17}\text{O}$  濃度推定マップを作成しカラーマップ表示した.

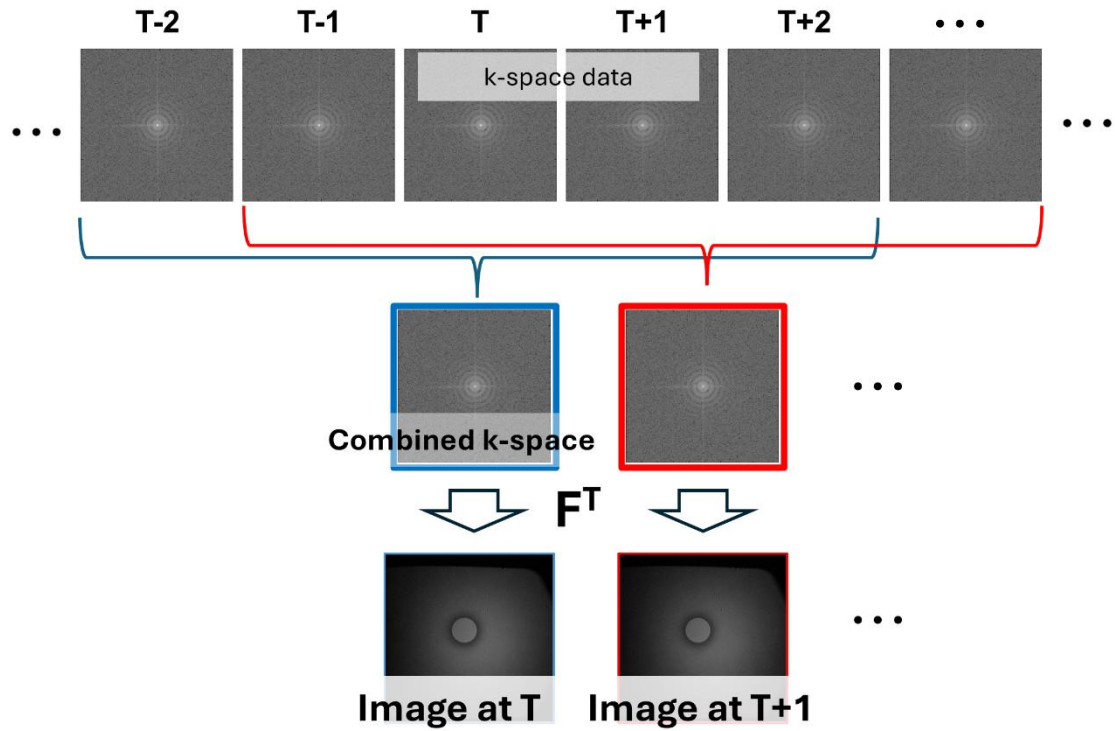


図8. Sliding view 再構成.

Window 幅 5 における再構成を示す.  $F^T$  は二次元 Fourier 変換を示す.

### 3. ファントムを用いた R1 マップ精度検証

Golden standard として用いた FSE-IR 法の R1 値は各 TI における信号 SI を以下の計算式に MATLAB 上で fitting して算出した.

$$SI = |M_0(1 - 2e^{-R1 \times TI})| \quad (5)$$

VFA 法の R1 値は以下の計算式より算出した(Fram et al., 1987). まず, gradient echo sequence における信号式

$$SI = Mo \times \frac{(1 - e^{-R1 \times TR}) \times e^{-R2^* \times TE} \times \sin\theta}{1 - \cos\theta \times e^{-R1 \times TR}} \quad (6)$$

において

$$Y = \frac{SI}{\tan\theta}, X = \frac{SI}{\sin\theta}, \varepsilon_1 = e^{-R1 \times TR}, \varepsilon_2 = e^{-R2^* \times TE} \quad (7)$$

と置くことで

$$Y = \varepsilon_1 \times X + Mo \times \varepsilon_2 \times (1 - \varepsilon_1) \quad (8)$$

が得られる. 各ボクセルにおいて, 複数の flip angle から対応する数の組の X,Y が算出でき, これを XY 平面上にプロットし近似直線の傾きを算出することで  $\varepsilon_1$  を経由して R1 を得ることができる. B1 補正は, 被写体に照射される RF パルスの不均一を補正する手法である. あるボクセルにおいて, コンソール上で設定する補正前 flip angle ( $\theta_{app}$ ) と実際に局所に与えられる flip angle ( $\theta_{eff}$ ) は B1 マップから得られる補正係数  $\alpha$  を用いて

$$\theta_{eff} = \alpha \times \theta_{app} \quad (9)$$

の関係が成り立つ. VFA 法では flip angle に依存して信号が変化するため flip angle の補正を行うことで精度が高まると報告されている. (Lee et al., 2018) B1 補正ありのデータでは  $\theta_{eff}$  を, 補正なしのデータでは  $\theta_{app}$  を式(6)に代入して計算を行った. R1 マップ生成は, 8 つの flip angle 画像すべてを用いて計算したもの(8FAs)および 4°と 16°の 2 つの flip angle のみを用いて計算したもの(2FAs)の 2 通りを用意した. それぞれにおいて B1 補正ありなしで計算を行い, 全部で 4 通りの R1 マップを生成した.

FSE-IR 法で撮像されたものと同じ断面を使用して VFA 法の R1 値定量を行った. 得られた R1 マップに対し, ImageJ 上でサンプルチューブ内に円形 ROI を置き

R1 値を算出した. 取得した値を x 軸に FSE-IR 法, y 軸に VFA 法の算出値をプロットし, R1 値を比較した.

#### 4. 統計処理

統計処理は GraphPad Prism 9 を用いて行った. R1 マップファントム検討における FSE-IR と VFA 法の R1 値相関は線形回帰により近似直線と決定係数  $R^2$  を算出して評価した.

### 結果

#### 1. ファントム画像の **sliding view** 再構成検討

Sliding view window 幅 1, 3, 5, 7 における相対信号雑音比と  $^{17}\text{O}$ - $\text{H}_2\text{O}$  ファントム撮像における信号変化を図 9 に示す. 相対信号雑音比は window 幅を広げることで増加し(window 幅 3, 1.68; window 幅 5, 1.98; window 幅 7, 2.59), 理論値(window 幅  $n$  においてベースラインから  $\sqrt{n}$  倍, 図 9b 点線)と類似した値となった. ファントム中央部の  $^{17}\text{O}$ - $\text{H}_2\text{O}$  注入部位は, 注入直後に大きく信号低下を示しその後信号が徐々に上昇した(図 9e). 注入直後の信号低下は window 幅を大きくするにつれて傾斜がなだらかになり, sliding view による時間方向の平均化を反映していると考えられた. 周囲のアガロースゲルの信号は  $^{17}\text{O}$ - $\text{H}_2\text{O}$  の拡散に伴って経時的に信号低下を示し, window 幅を増加させることでノイズが低減した(図 9f). window 幅 5 画像から計算された推定  $^{17}\text{O}$  濃度マップを図 10f に示す. 注入後に中央部分の  $^{17}\text{O}$  濃度が急激に上昇し周囲に拡散する様子が確認できる. 本実験からは, sliding view scheme により信号雑音比が改善し, 時間方向に緩やかな信号変化の評価には window 幅を大きく設定することが有用である一方, 時間方向に急峻な信号変化を捉えるためには window 幅を狭く設定すると有利であることが示唆された.

#### 2. R1 値ファントム検証

結果を図 10 に示す. IR 法を standard とした時の R1 値精度は, B1 補正ありの再構成において 2FAs, 8FAs の近似直線勾配は 1 付近かつ強い相関を示した(2FAs, slope=0.98 and  $R^2=0.95$ ; 8FAs, slope=1.00 and  $R^2=0.95$ ). B1 補正なしでは, 2FAs, 8FAs いずれも強い相関を示すものの, standard に対して R1 値を過小評価する傾向が見られた(2FAs, slope=0.82 and  $R^2=0.94$ ; 8FAs, slope=0.83 and  $R^2=0.94$ ). 生成された R1 マップの視覚評価では, B1 補正なしの画像ではファントムの辺縁部分で R1 値が他の画像よりも高値に算出され中心部では低値となってお

り, B1 不均一を反映した所見と考えられた. 以上の結果より, 以後の rat dynamic R1 mapping 検討において B1 補正あり 2FAs(FA= 4 and 16°)で撮像を行うことが妥当であると判断した.

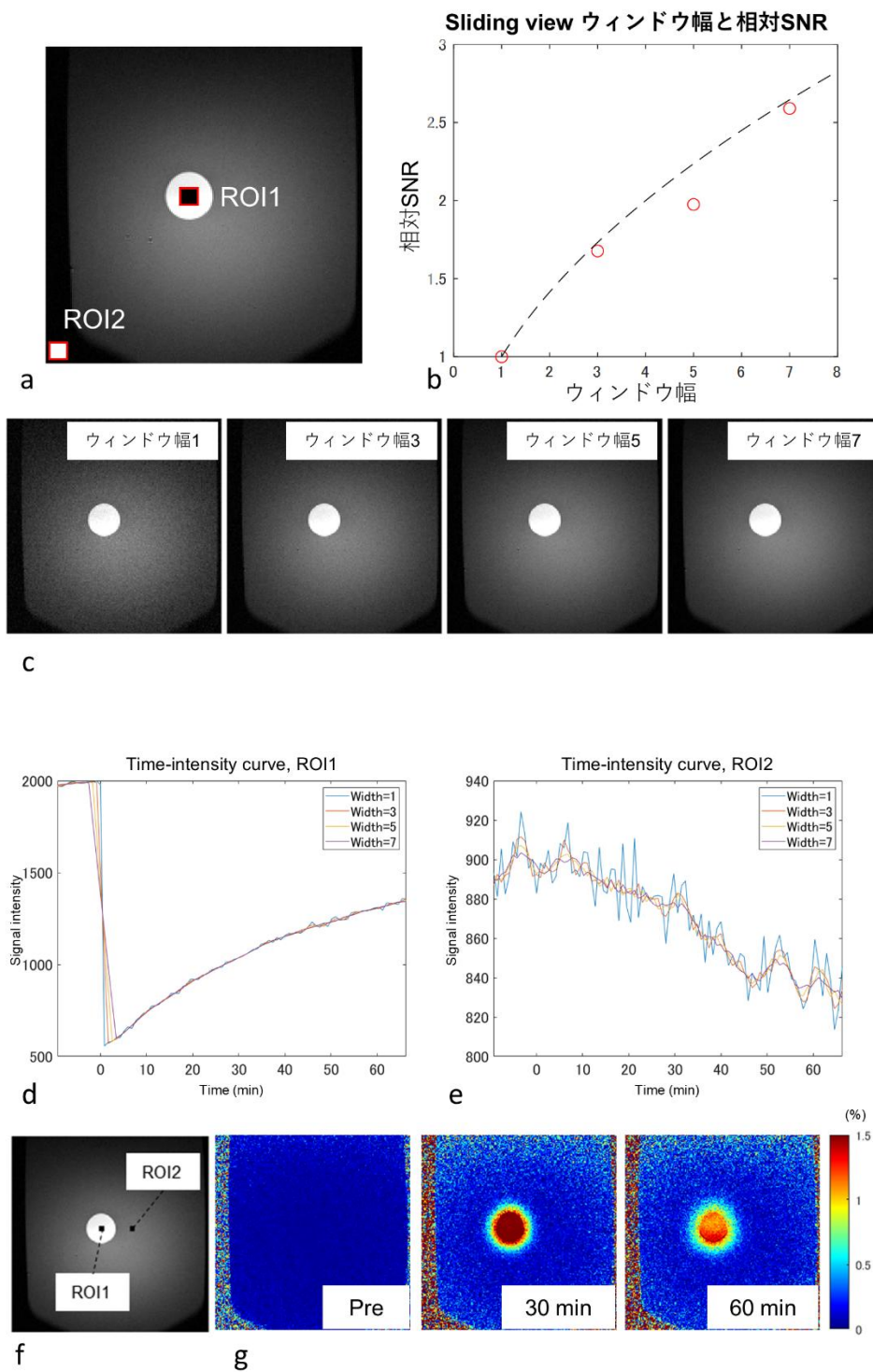


図9.  $^{17}\text{O}$ - $\text{H}_2\text{O}$  拡散ファントム.

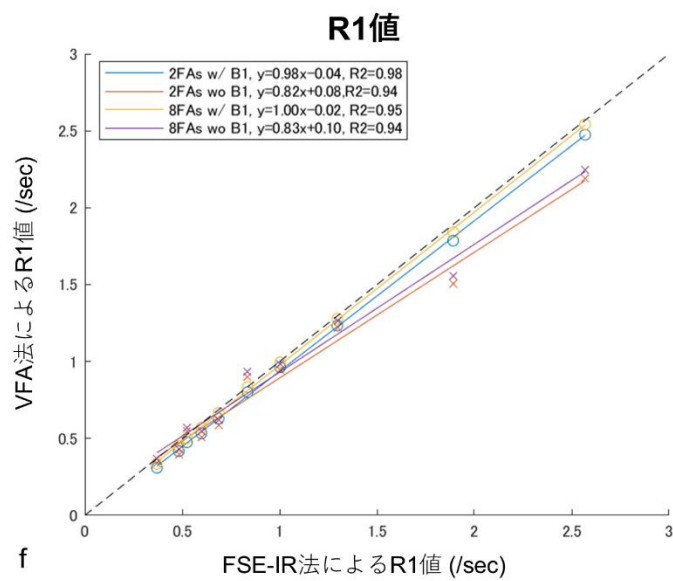
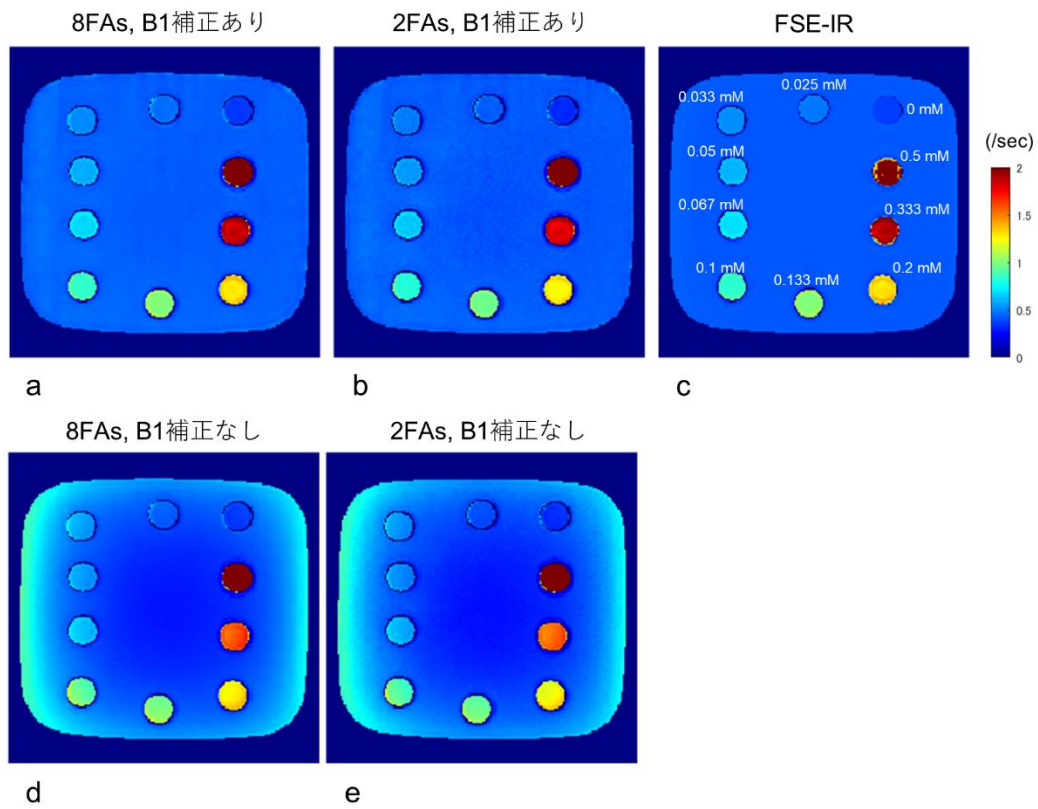


図10. R1 値測定ファントム画像および R1 値プロット.

c 内の数字はそれぞれのサンプルチューブ内の Gd-BT3OA 濃度を示す.

## 考察

### (1) 本研究で得られた新知見

$^{17}\text{O}$ - $\text{H}_2\text{O}$  撮像においては, FSE T2 強調像に sliding view 再構成を適用することで, 時間分解能を担保しながら SNR を上昇させる事ができ, 3T 機でも齧歯類を用いた先行研究と遜色のない空間分解能を保ちながら高い時間分解能で $^{17}\text{O}$ の拡散を画像化する事が可能である事を示した. 図 9g に示すように 1%未満の $^{17}\text{O}$ 濃度に相当するような信号変化を検出することができており, ラット髄注実験において CSF の信号変化を検出するには十分であろうと考えられる.

R1マップファントム撮像については, 2FAs の VFA 法に B1 マップ補正を併用する事で高い精度で R1 値を測定することが可能である事を示した. 2FAs であれば通常の single FA SPGR T1WI と比較して撮像時間は 2 倍で抑えられ, B1 マップはスキヤンの最初に数十秒の画像を一度撮像するのみであるので, ラットの撮像としては実現可能な範疇であると考えられた.

### (2) 先行研究との比較

$^{17}\text{O}$ - $\text{H}_2\text{O}$  拡散ファントム撮像における空間分解能は  $0.23 \times 0.23 \text{ mm}$  であり, 前臨床機を用いた先行研究の分解能と遜色ない値を達成できている (Alshuhri et al., 2021, Zhu et al., 2023). VFA 法において B1 マップ補正が有用であるという点は先行報告と一致する結果である.

### (3) Limitation

Sliding view を導入することで時間方向への平均化が生じており, 急峻な信号変化を捉えることを目的とした撮像においては注意が必要と考えられる. 注入開始時の急速なトレーサー濃度上昇が想定され, 急峻な信号変化を検出するためには長い window 幅が適切ではない可能性がある.

本検討では静的なファントムを用いて R1 値測定手法を評価したが, Gd 造影剤の拡散過程はアガロースゲル中では極めて遅いため, 動的な拡散ファントムを用意することはできなかった. トレーサー濃度が経時的に変化する中で連続撮像しながら R1 値を算出することに伴う信号変動の有無については, 3 章で検討する.

### 第3章

#### 緒言

第2章におけるファントム実験で、 $^{17}\text{O}$ - $\text{H}_2\text{O}$  間接法 MRI に sliding view 適応が可能であり、ほぼ理論値通りに信号雑音比の改善が得られる事を述べた。加えて、2つの flip angle からなる VFA 法 R1 マップ生成に B1 マップ補正を併用することで高い精度で R1 値定量が可能である事も示した。本章ではこれらをラット画像髄注下 MRI に適用することを目指した。

$^{17}\text{O}$ - $\text{H}_2\text{O}$  間接法 MRI によるラット撮像の先行報告における空間分解能は、全体の緒言からの繰り返しになるがラットを用いたもので  $0.3 \times 0.3 \times 1.5\text{mm}$ 、マウスを用いたもので  $0.2 \times 0.2 \times 0.5\text{mm}$  程である。(Alshuhri et al., 2021, Zhu et al., 2023) これらの分解能では、CSF に独立して ROI を置くのが難しく、本研究ではこれよりも高い分解能で CSF に独立した ROI を置くことが出来る条件にて撮像することを目指した。第1章では再構成分解能  $0.2\text{mm}$  の T1 強調像で CSF ROI を評価可能であったが、下垂体陥凹は矢状断よりも冠状断で ROI が取りやすかったため冠状断で評価を行っていた。しかしながら、T2 強調像は 2D 撮像するため冠状断評価が難しくなり、矢状断断面のみで ROI を置く必要があり、 $0.2\text{mm}$  より高い面内分解能を設定するのが望ましいと考えられた。これに sliding view scheme による SNR 改善を組み合わせ、髄注された  $^{17}\text{O}$ - $\text{H}_2\text{O}$  の CSF および脳実質内動態を評価することを目指した。

Gd 造影剤髄注下 MRI については、B1 マップ補正併用 2FAs VFA 法のラット撮像における適用を検証した。また、造影剤濃度がダイナミックに変化する中で連続撮像を行うと、各時点のコントラスト画像において Gd 濃度は異なることになり、画像シリーズの組み合わせによってマップ画像の信号値が変動しないかどうか検証が必要と考えられる。本検討では R1 マップ生成に用いる画像の組み合わせを変えて算出される R1 値が変動しないかどうか検証することとした。

先行報告において、R1 マップ連続撮像の時間分解能を向上させるため、造影前の各ボクセルで縦磁化マップを算出し造影後の  $R2^*$  値変化に伴ったコントラスト変動を無視できると仮定することで造影後の R1 マップを単一 flip angle のコントラスト画像から生成可能であるとする報告がある。(Lee et al., 2018) この手法を用いることが出来れば造影後 R1 マッピングの時間分解能を 2 倍にすることができるが、VA 法で生成された R1 値との直接比較は報告されていない。我々は、VFA 法撮像時のデータから単一 flip angle による R1 マップ (single FA 法) も生成し比較することで VFA 法と single FA 法の R1 値精度比較が可能と考えた。以上より、ラット Gd 造影剤髄注

モデルにおいて既存の複数コントラストから R1 マップを生成する VFA 法およびシングルコントラストから生成する single FA 法でそれぞれ R1 マップを作成し、ダイナミック R1 マップの精度を検証することとした。

上記した条件で溶質トレーサー、溶媒トレーサーの双方を定量的に解析することが出来れば、両者を比較することが可能になると思われる。先行研究では相対信号の変化を比較しており、定量的なトレーサー濃度として両者を比較した先行研究はなかった。本章では、得られた信号からトレーサー濃度を推定し定量的な値として両者の比較が可能かどうかの初期検討も行うこととした。

## 方法

### 1. 実験動物および手術処置

本研究の内容は北海道大学動物実験委員会の承認を得(20-0078), 関連するガイドラインを遵守して施行した。実験には 8 週齢のオス Wistar ラット (245-290g, ジャクソンラボラトリージャパン)12匹を使用した。実験中, ラットはイソフルラン投与で全身麻酔を行った。ラットの麻酔, 呼吸数維持, 体温維持, 実験終了後の安楽死はいずれも1章と同様に行った。

本実験では, 可能な限り髄液漏出を避けるため, 先端熱形成したガラス管を用いてラット大槽投与ルートを確認する手法を用いた。麻酔導入後ラットを腹臥位とし, 後頸部正中切開を加えて環椎後頭関節靱帯を露出した後, ポリエチレンチューブに接続したガラス管を用いて穿刺し, 先端を大槽内に 1mm 進めて接着剤を用いて固定した。創部は 4-0 絹糸を用いて閉創した。

### 2. MRI 撮像条件

8 週齢の雄 Wistar rat を 12 匹使用した(Gd 群 4 匹,  $^{17}\text{O}$  水群 5 匹, 生理食塩水群 3 匹)。前述の手術後, ラットを MRI 用受信コイル内へ付属のイヤバーを用いて固定した。MRI は 3.0T スキャナ(Magnetom Prisma, シーメンスヘルスケア), 体内送信コイル, 1 チャンネルループ型コイル(高島製作所)を用いて行った。Gd 群では B1 mapping 撮像後, 3D R1 マップ(1 相あたり 3 分 0 秒)の連続撮像を行った。 $^{17}\text{O}$ - $\text{H}_2\text{O}$  群および生理食塩水群では 2D T2 強調像(1 相あたり 1 分 28 秒)の連続撮像を行った。造影前画像を撮像した後, 造影後画像撮像開始と同時に, 大槽に留置されたガラス管よりマイクロインジェクタを使用して Gd 群では 8.3 mmol/L Gd-BTDO3A を 2.5  $\mu\text{L}/\text{min}$  で 30 分間,  $^{17}\text{O}$ - $\text{H}_2\text{O}$  群では生理食塩水化 20mol%  $^{17}\text{O}$ - $\text{H}_2\text{O}$ (太陽日

酸)を 2.5  $\mu\text{L}/\text{min}$  で 30 分間, 生理食塩水群では生理食塩水を 2.5  $\mu\text{L}/\text{min}$  で 30 分間投与した. MRI のスキャンパラメータは以下の通りである. B1 mapping: TR: 12660ms, TE: 2.41ms, flip angle:  $8^\circ$ ; echo train length, 84; phase partial Fourier, 7/8; Band width, 500 Hz/Px; スライス厚, 2.0mm; ギャップ, 0.4mm; スライス間隔, 2.4mm; スライス枚数, 24; FOV,  $76 \times 76\text{mm}$ ; 撮像マトリクス,  $96 \times 96$ ; 再構成マトリクス,  $96 \times 96$ ; 面内分解能,  $0.79 \times 0.79\text{mm}$ ; NEX: 1, 撮像時間: 0 分 26 秒. R1 マッピング: TR, 9ms; TE, 2.6ms; flip angle, 4 and  $16^\circ$ ; Band width, 130 Hz/Px; FOV:  $76 \times 54 \times 38.4\text{mm}$ ; 撮像マトリクス,  $256 \times 184 \times 32$ ; 再構成マトリクス:  $512 \times 398 \times 32$ ; 再構成分解能,  $0.15 \times 0.15 \times 1.2\text{mm}$ ; NEX, 2; 1 サイクルあたり撮像時間, 3 分 00 秒; 繰り返し回数, 33; 総スキャン時間, 99 分 00 秒. 2D T2 強調像: TR: 4000ms, TE: 145ms, flip angle:  $90^\circ$ ; refocus angle:  $180^\circ$ ; echo train length, 12; Band width, 100 Hz/Px; スライス厚, 1.0mm; ギャップ, 0.2mm; スライス間隔, 1.2mm; スライス枚数, 12; FOV,  $40.1 \times 51\text{mm}$ ; 撮像 matrix,  $252 \times 320$ ; 再構成 matrix,  $252 \times 320$ ; 面内分解能,  $0.16 \times 0.16\text{mm}$ ; NEX: 1, 1 相あたり撮像時間: 1 分 28 秒, 繰り返し回数: 72, 総スキャン時間: 105 分 36 秒. また, 標準脳画像作成及び脳実質 3D ROI 作成のため, 以下の条件で 3D T2 強調像(3D-T2 Space) (Mugler et al., 2000)を撮像した. TR: 2500 ms, TE: 301 ms, flip angle:  $90^\circ$ ; refocus angle, variable (T2 var mode); echo train length, 150; partial Fourier read/phase/slice, 1.0/0.875/0.875; FOV,  $76 \times 54.6 \times 44.8\text{mm}$ ; 撮像マトリクス,  $192 \times 138 \times 160$ ; 再構成マトリクス:  $384 \times 276 \times 224$ ; 再構成分解能,  $0.2 \times 0.2 \times 0.2\text{mm}$ ; NEX, 1.4; 撮像時間, 6 分 42 秒.

### 3. $^{17}\text{O}\text{-H}_2\text{O}$ 髄注下 T2 強調像の画像処理および評価項目

$^{17}\text{O}\text{-H}_2\text{O}$  髄注個体 ( $n=5$ ) および生理食塩水髄注個体 ( $n=3$ ) のデータを用いた. ファントム実験の検討結果より, 再構成時の sliding view window 幅を決定した. 各個体の矢状断画像において, 中心スライス(12 スライス中 7 スライス目)において長方形 CSF ROI 4 カ所(大槽, 環椎レベル, 下垂体陥凹, 嗅球腹側)を手動的に置き(図1 1), 信号の経時変化を比較した. 大脳 ROI 4 カ所(小脳, 脳幹, 腹側大脳, 嗅脳)は 3-6 で作成した個体毎の 3D ROI を用いて評価した. 尚, 造影前画像のうち最初の 5 相は信号不安定となりうるため除外し, sliding view の幅も考慮して 6 から 10 相目の信号の平均をベースライン信号値とした.

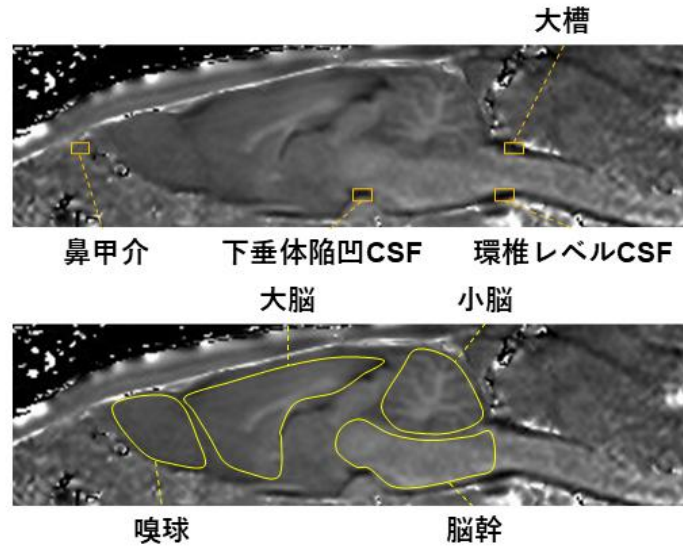


図11. ラット CSF および脳実質 ROI のシェーマ.

#### 4. Gd 造影剤髄注下 MRI からの R1 マップ生成および評価項目

Gd 造影剤髄注個体(n=4)を用いた. 本研究のラット VFA R1 mapping 撮像では, 1つの flip angle 毎に 1 分 30 秒の撮像時間を要し, これを 2つの flip angle で交互に繰り返した(図12). この際, どのタイムポイントのデータを用いて R1 値を計算するか, 2通りの手法((normal:4°-16°の経時順で map を作成, reverse:16°-4°の経時順で map を作成) が考えられる. それぞれについて R1 マップ生成を行った. VFA 法の R1 値算出時は第2章の式(4)への fitting で行った. 加えて, 造影前画像から縦磁化を推定し, 造影後画像は 16 °画像のみを用いて R1 を算出する single FA 法も検討した(Lee et al., 2018). この手法では, 造影前の画像から縦磁化を推定し, 造影剤の流入による R2\*値の変動が信号値に与える影響を無視できると仮定して計算を行う. この仮定の下では  $M_0$  と  $\varepsilon_2$  をまとめて1つの定数として扱い, 式(4)より

$$M = M_0 \times \varepsilon_2 \quad (10)$$

$$\varepsilon_1 = \frac{M - Y}{M - X} \quad (11)$$

と変形できる. これにより, 単一の flip angle から得られる一組の X,Y および造影前画像から得られた M を用いて R1 が一意に定まる.

各個体の矢状断画像において、中心スライス(32 スライス中 17 スライス目)において長方形 CSF ROI 4 カ所(大槽, 環椎レベル, 下垂体陥凹, 嗅球腹側)を手動的に置き, 信号の経時変化を比較した. 大脳 ROI 4 カ所(小脳, 脳幹, 腹側大脳, 嗅脳)はと同様の 3D ROI を用いて評価した. 各手法で得られた TIC から AUC を計算し, 手法間で比較した. 尚, 造影前 R1 マップ 2 相の平均をベースライン値とした.

## 5. トレーサー濃度変換, 相対濃度比変換

$^{17}\text{O}-\text{H}_2\text{O}$  投与群および Gd 投与群の代表個体において, 信号変化よりトレーサー濃度を算出し, 投与トレーサー濃度で除した相対濃度比マップを作成した.  $^{17}\text{O}$  の濃度マップは, 造影前 6-10 相目の平均画像を基準とし, 式(4)で算出した. Gd 造影剤の濃度マップは, 以下の式を用いて算出した.  $R1_t$ ,  $R1_{pre}$  はそれぞれあるタイムポイント及び造影前の R1 値を示す. 造影剤の  $r1$  値としては, 先行文献を参照し 5.0 /mmol/sec を用いた. (Pintaske et al., 2006)

$$GdDensity_t = \frac{R1_t - R1_{pre}}{r1} \quad (12)$$

各ボクセルにおける相対濃度比(DensityRatio)は以下の式で算出した.  $Density_t$  は時間  $t$  において式(4)もしくは式(12)から算出されたトレーサー濃度を示す. ITD (initial tracer density) はチューブから投与されるトレーサーの濃度を示し,  $^{17}\text{O}-\text{H}_2\text{O}$  においては 20mol%, Gd 造影剤においては 8.3 mmol/L を用いた.

$$DensityRatio_t = \frac{Density_t}{ITD} \quad (13)$$

$^{17}\text{O}-\text{H}_2\text{O}$  と Gd 造影剤はそれぞれ異なるトレーサーであるが, 本研究では両トレーサーの髄注速度, 総量を同一の値とした. 従って, 先行研究の通りに両トレーサーが類似した髄注後動態を示すのであれば, 上記の式で計算された相対濃度比のマップは類似した分布を示すことが期待される.

## 6. 標準脳画像作成および脳領域マスク画像作成

ANTs (<https://stnava.github.io/ANTs/>), SPM12 (version Jan-2020, <https://www.fil.ion.ucl.ac.uk/spm/software/spm12/>) を用いて全 12 個体のラット脳 3DT2WI データを統合して標準脳を作成し, 標準脳データ上に ImageJ を用いて各脳領域の 3D ROI を作成した. 各個体脳から標準脳への標準脳のマスク画像を標準脳変換時の逆変換(各個体から標準脳への変換に用いた affine 変換の逆変換お

よび逆向きの非線形変換)で各個体のデータ上に投影した後, MATLAB 上で検討に  
用いた分解能に合わせてマスク画像のリスケージングを行った(図 8b).

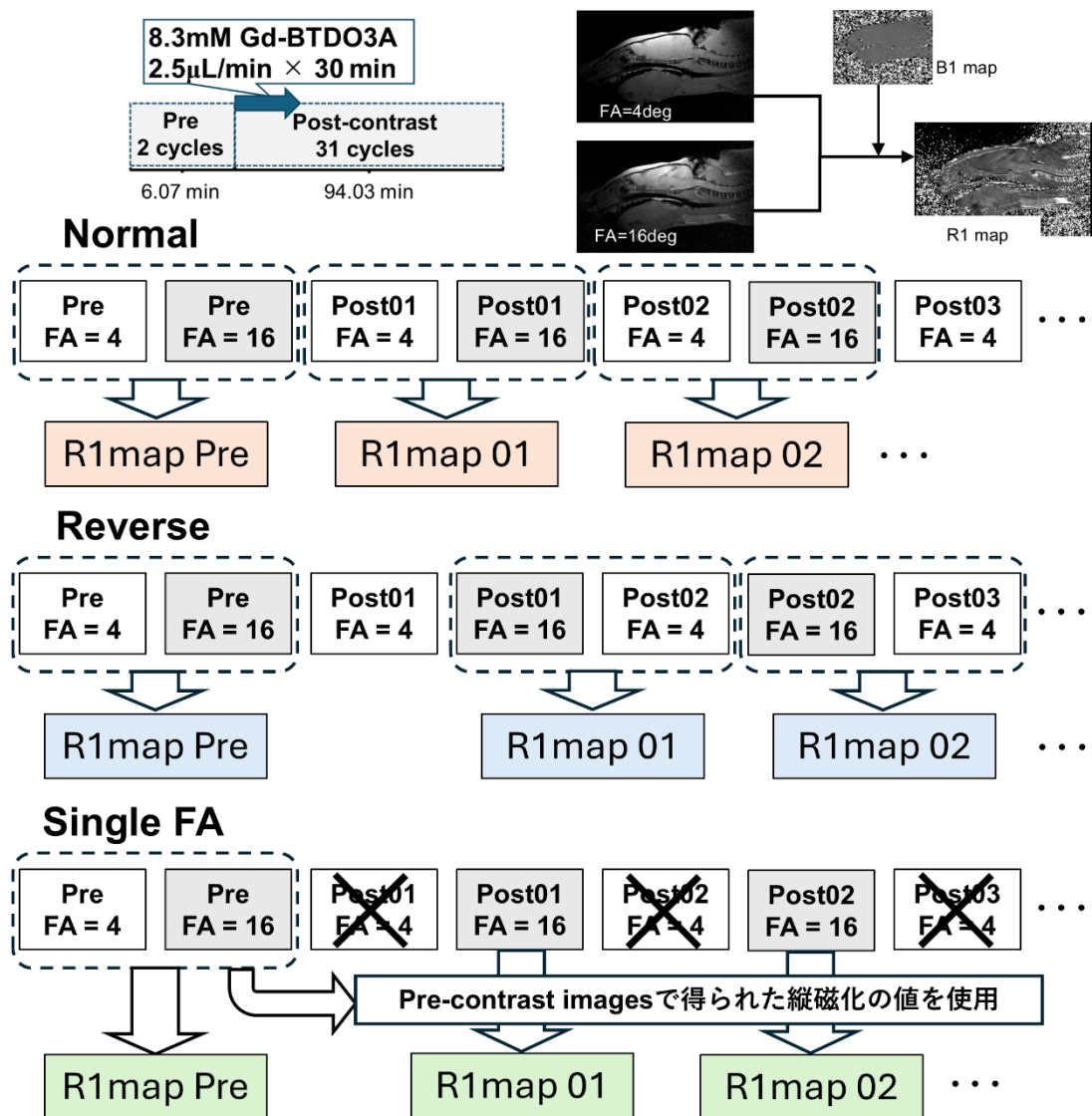


図12. R1 マップ生成手法.

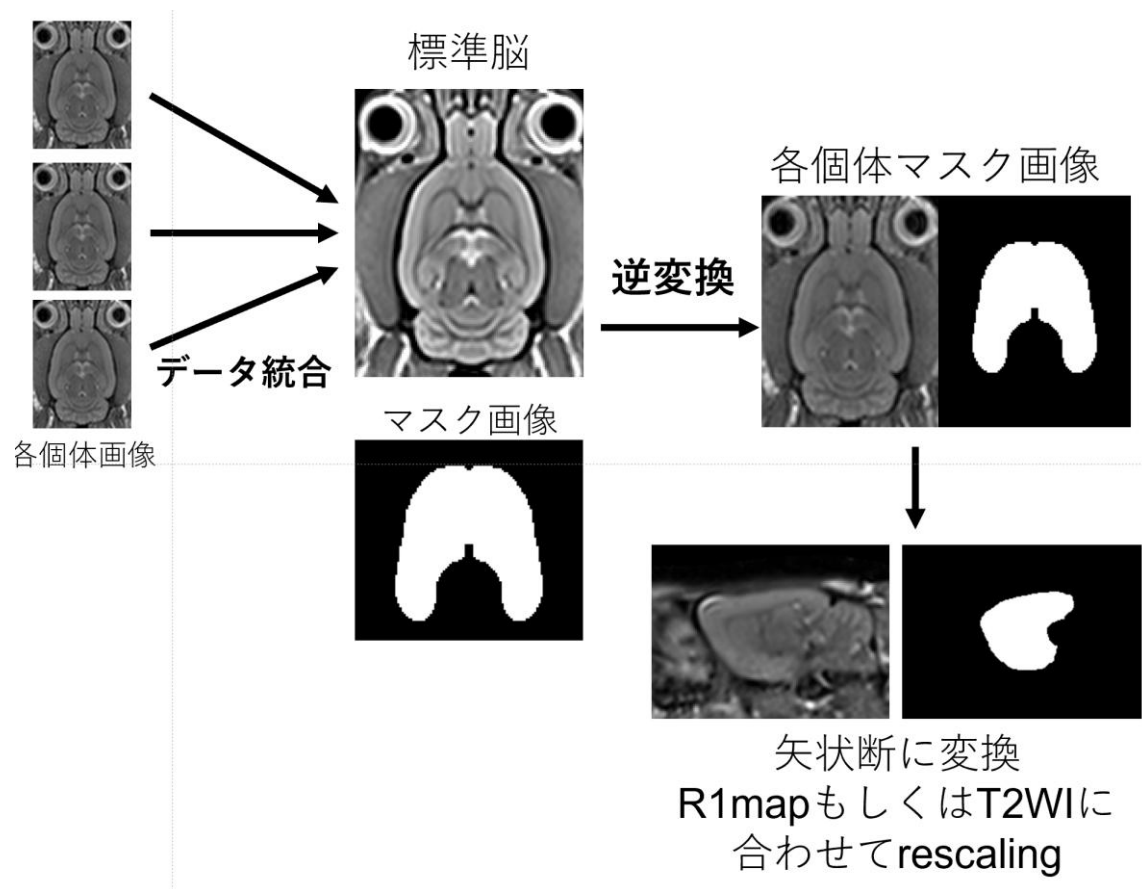


図 13. ラット標準脳作成と各個体脳実質領域マスク ROI 作成シェーマ.

## 7. 統計処理

統計処理は GraphPad Prism 9 を用いて行った. 各 ROI の TIC から AUC を算出し, R1マップ検討においては計算法間, 2D T2 強調像検討においては  $^{17}\text{O-H}_2\text{O}$  群と生理食塩水群間で Mann-Whitney's U-test を用いて比較した. また, TIC の各相において two-way repeated measures ANOVA を用い, Sidak 補正を併用して R1 マップ検討においては 3 つの計算法間, 2D T2 強調像の検討においては  $^{17}\text{O-H}_2\text{O}$  群と生理食塩水群間で比較した.  $P < 0.05$  を統計学的有意とした.

## 結果

### 1. ラット $^{17}\text{O-H}_2\text{O}$ 髄注下 MRI

SNR と  $^{17}\text{O}$ - $\text{H}_2\text{O}$  注入に伴う急峻な信号変化検出のバランスを考慮し, sliding view window 幅を 5 としてラット撮像画像の再構成および  $^{17}\text{O}$  濃度 map 変換を行った. 各 ROI の  $^{17}\text{O}$  濃度変化は図 14 に示すとおりである. 大槽では  $^{17}\text{O}$ - $\text{H}_2\text{O}$  投与開始後急激な信号低下が見られ, 投与時間の 30 分間維持されその後急激に信号回復した. Two-way repeated measures ANOVA では 8 分 48 秒から 27 分 52 秒の間で有意差を認め, TIC の AUC にも群間差が見られた ( $P=0.036$ ). 環椎レベル CSF では  $^{17}\text{O}$ - $\text{H}_2\text{O}$  群で信号低下傾向が見られるが, two-way repeated ANOVA で有意差は見られず, AUC 比較では群間差を認めた ( $P=0.036$ ). 下垂体陥凹レベル CSF, 4 カ所の脳実質 ROI ではいずれも  $^{17}\text{O}$ - $\text{H}_2\text{O}$  投与後の信号変化において two-way repeated ANOVA, AUC 比較共に有意差を認めなかった.

## 2. ラット Gd 造影剤髄注下時 R1 マップ

CSF ROI および脳実質 ROI における, 計算法毎の R1 値 TIC は図 15 に示すとおりである. CSF および脳実質いずれの ROI においても造影剤投与後 R1 値上昇が見られた. CSF ROI に置いては, single FA 法で算出された R1 値が VFA 法の normal, reverse いずれよりも小さく算出される傾向が見られた. この傾向は注入部位に近い ROI でより目立ち, two-way repeated measures ANOVA では大槽, 環椎レベル CSF で有意差を認めた (大槽: normal-single FA, 3 分, 12-24 分, 33 分; reverse-single FA, 18 分-21 分; 環椎レベル CSF: normal-single FA, 21 分-39 分; reverse-single FA, 21 分-42 分). AUC の比較では, 環椎レベル CSF で single FA は normal, reverse よりも有意に小さな AUC となった (normal-single FA,  $P=0.029$ ; reverse-single FA,  $P=0.029$ ). VFA 法の normal-reverse 間では殆どの ROI とタイムポイントにおいて 2 つの計算順で R1 値およびその AUC に差を認めなかったが, 最もトレーサー濃度が高い大槽において, トレーサー濃度が大きく変動する注入開始時点と注入終了時点において差が見られた (3 分, 33 分の 2 点). 脳実質 ROI では, single FA および VFA いずれの手法を用いても R1 値はほぼ同一であり AUC にも有意差を認めなかった.

## 3. ラット髄注後相対濃度比マップ

代表個体における結果を図 16 に示す. Gd 造影剤個体では吻側 CSF へのトレーサー移行および脳実質への移行が確認できる. しかしながら,  $^{17}\text{O}$ - $\text{H}_2\text{O}$  個体において, トレーサーは頸部局所に限局して髄注終了後すぐに不明瞭化し, 吻側 CSF への移行は明らかでなかった.

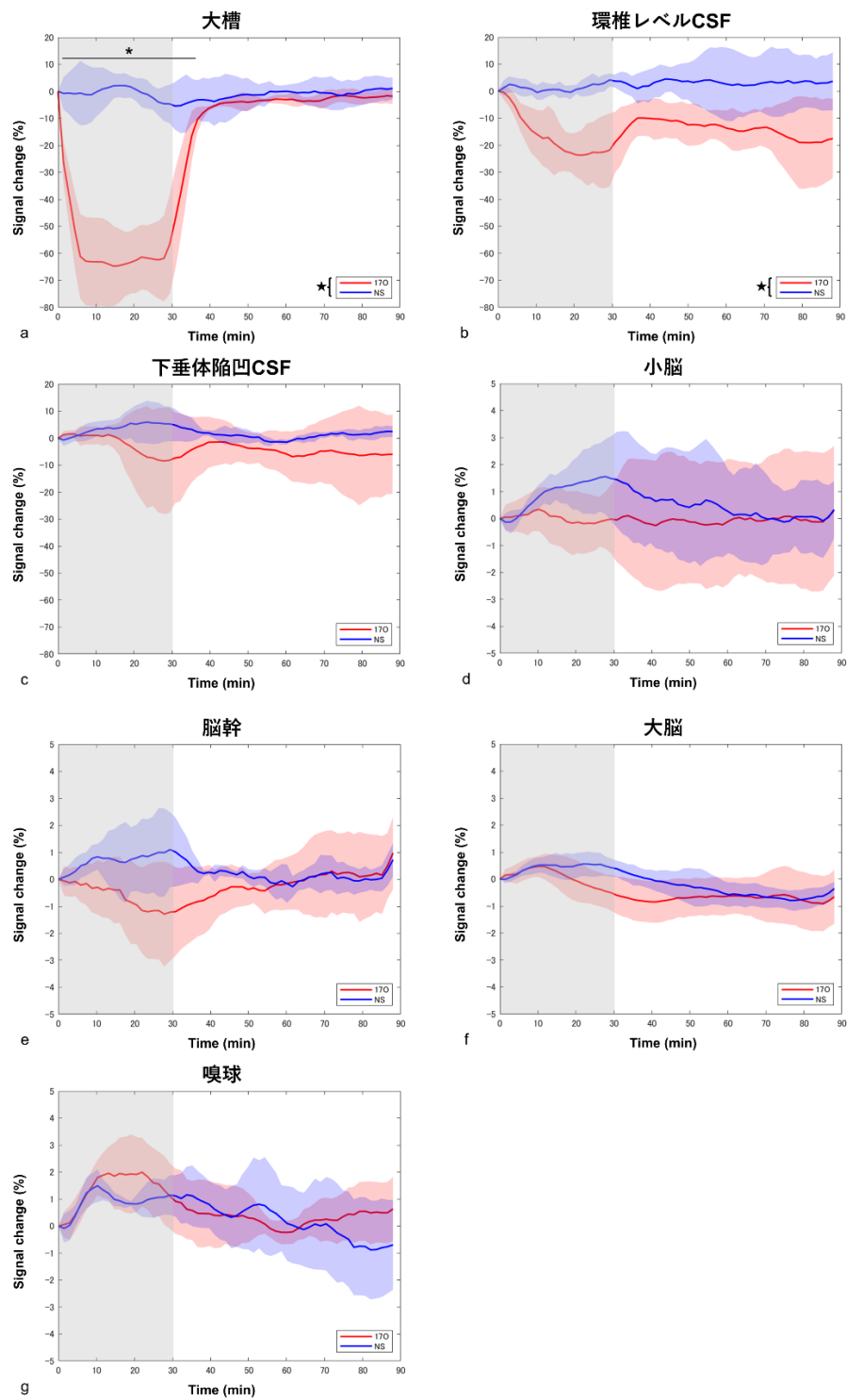


図14.  $^{17}\text{O}$ - $\text{H}_2\text{O}$  および生理食塩水投与群の信号変化比較.

灰色の領域は 30 分の注入時間を示す.\*は two-ray repeated ANOVA における  $P<0.05$  を示す. ★は AUC 比較における  $P<0.05$  を示す.

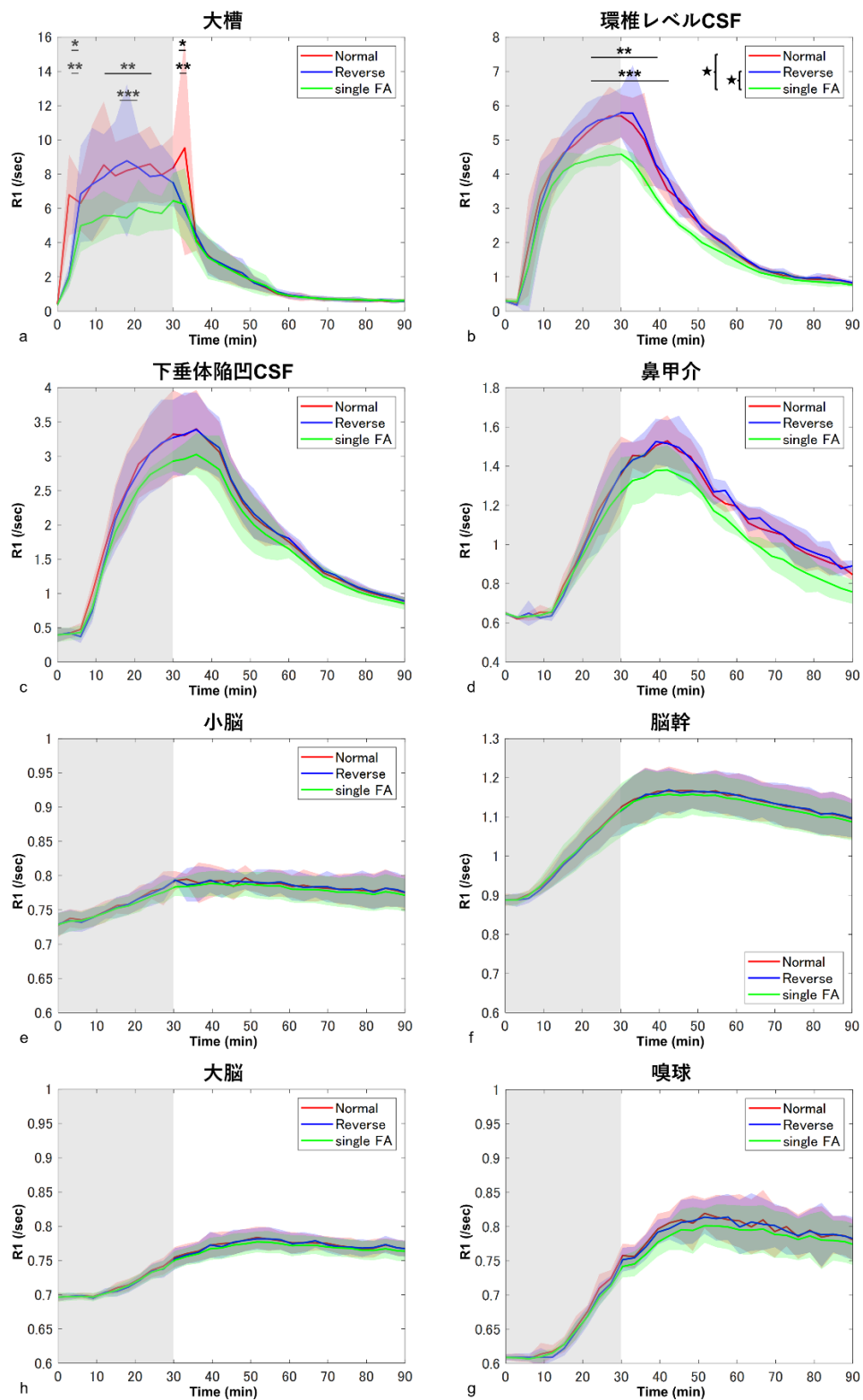


図15. Gd 造影剤群 R1 マップ TIC の生成手法間比較.

灰色の部分は 30 分の注入時間を示す. \*は normal-reverse 間, \*\*は normal-single FA 間, \*\*\*は reverse-single FA 間について two-way repeated measures ANOVA で  $P < 0.05$  である範囲を示す. ★は AUC 比較における  $P < 0.05$  を示す.

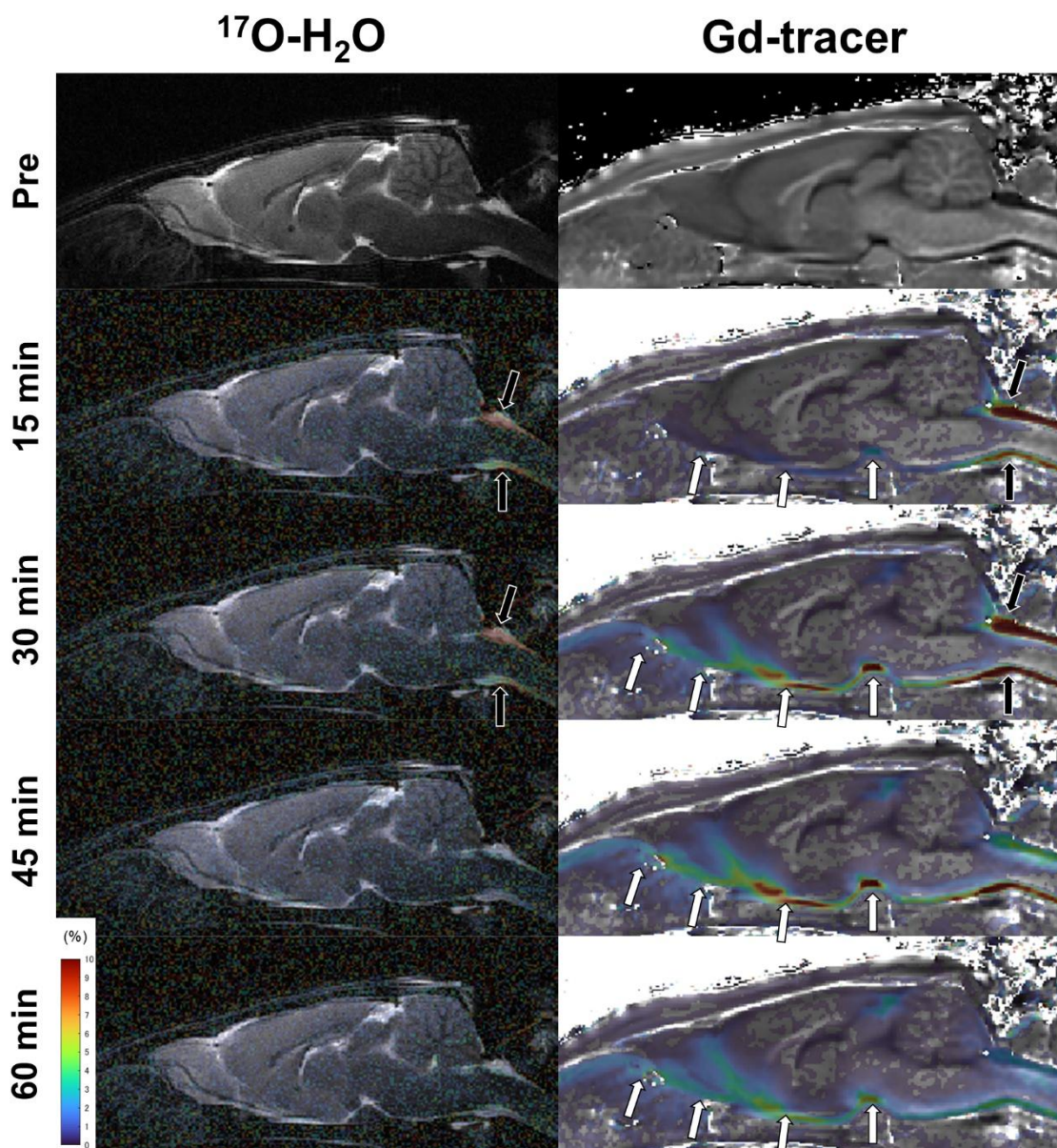


図 16. 代表個体における  $^{17}\text{O}\text{-H}_2\text{O}$  および Gd 造影剤の注入後動態

Pre 画像の上に、投与されたトレーサー濃度に対する相対濃度比(%)のカラーマップを重ねている。両トレーサーで、注入部位の大槽と腹側の頸髄レベル CSF に注入時間の 30 分までトレーサー分布を認める(黒矢印)。Gd 造影剤ではトレーサーの吻側移行を認めるが(白矢印),  $^{17}\text{O}\text{-H}_2\text{O}$  では明らかでない。

## 考察

### (1) 本研究で得られた新知見

$^{17}\text{O}$ - $\text{H}_2\text{O}$  髄注実験においては、2D T2 強調像でラット CSF を脳実質と分離して観察可能な分解能で $^{17}\text{O}$  間接法連続撮像を施行することが可能であった。今回の検討では、先行報告に倣ってラット全脳をカバーするように 2DT2 強調像をマルチスライスで撮像した。今後の検討において、例えば脳表投与や脳実質内投与など、より局所的な評価のみでよいのであれば、スライス枚数の削減や撮像関心領域の縮小などによってより高分解能や高速な撮像条件を調整することが可能であると考えられる。

大槽投与された  $^{17}\text{O}$  トレーサーは投与局所では明瞭な信号変化を捉え環椎レベル CSF でも信号変化を観察した他は、吻側のくも膜下腔にはっきりした信号変化を検出することができなかった。また、脳実質内へのトレーサー移行も本検討では明らかではなかった。図 16 のカラーマップに示すとおり、溶質トレーサーである Gd 造影剤と  $^{17}\text{O}$ - $\text{H}_2\text{O}$  は髄注後動態が異なっているように思われる。これについては、先行研究を参照した考察を先行研究との比較で述べる。

溶質トレーサーである Gd 造影剤を用いた検討では、T1 強調像の相対信号ではなく VFA 法による R1 値のダイナミック撮像がラット脳撮像において実行可能である事を示した。VFA 法の使用画像順については、4°画像を 1 相分ずらしても有意な信号変化が見られたのは非常に急峻で大きな濃度変化を生じた大槽の注入開始および終了時のみであったため、通常のマップ生成方法(本研究における normal 法)を常に使用して問題ないと考えられる。

さらに、先行研究で報告されている single FA 法による R1 マッピングと VFA 法を初めて比較し、今回の検討条件においては single FA 法で CSF 領域の R1 値が過小評価となる部位がある一方、脳実質では single FA 法を用いて VFA とほぼ一致する R1 値が算出できる事を示した。Single FA 法と VFA 法の R1 値差は、信号式(6)より局所のトレーサー濃度、トレーサーの  $r_1$  値および  $r_2^*$  値(R1 値および  $R_2^*$  値延長の濃度係数)、MR シーケンスの  $R_2^*$  変動への鋭敏さ、背景組織の  $R_2^*$  値など様々な要素が関与すると考えられる。これは今回検討における差が部位によって不均一であった理由と考えられる。今回の検討では、差を生じる要素の個別検討までは行うことが出来なかったが、single FA により R1 値過小評価となる部位と差を生じない部位のいずれもが一個体の画像の中に存在しうることを示した。今後の Gd 造影剤を用いたラット脳撮像においては、Single FA 法と VFA 法のいずれかを用いる事でより定量的にトレーサー動態を解析することが可能になると考える。

## (2) 先行研究との比較

先行研究では single FA 法によるラット Gd 造影剤髄注下 R1 マップの連続撮像を報告しているが、VFA など他手法と in vivo で精度比較は行われていなかった。また、Gd 造影剤の影響による R2\*短縮が推定の正確性を損なう可能性についても先行報告の時点ですでに認識されており、R2\*マッピングを検討したものの十分な画質で撮像できないため検討を断念したと記載されていた(Lee et al., 2018)。我々の研究環境においてもラット全脳の 3D R2\*ダイナミック撮像は行えていないが、VFA 法ダイナミック撮像データを用意してそこからのマップ生成手法を変えて比較することで、Gd 濃度によっては single FA 法が R1 過小評価となり得ることを示した。過小評価の程度は Gd 濃度によって不均一となり単純な補正係数では修正が難しいと考えられ、single FA 法で算出される R1 値の解釈には注意が必要と考えられた。一方で、Gd 濃度が低い脳実質では single FA 法によって VFA 法とほぼ一致する値を得ることができており、撮像条件、トレーサー濃度、解析領域を含め適切な設定を置けば single FA 法は有用な手法であるのも事実と考えられる。

ラット  $^{17}\text{O}\text{-H}_2\text{O}$  髄注実験における時間分解能と空間分解能は、緒言でも述べたとおり先行研究においては高磁場前臨床機を用いて  $0.3\times 0.3\times 1.5\text{mm}$ , 3 分/相程度であった。本検討では、sliding view scheme で SNR を上昇させることにより、 $0.16\times 0.16\times 1.2\text{mm}$  と先行研究よりも大幅に高分解能化し、かつ実効時間分解能を 1 分 28 秒と約 2 倍へ上昇することが可能になった。

先行研究において、 $^{17}\text{O}\text{-H}_2\text{O}$  髄注後のトレーサーは CSF を介して脳実質に分布し MRI で観察可能で、その動態は Gd 造影剤のそれとよく一致すると報告されていた。しかしながら、図 14, 16 で示されたように、今回の検討上は  $^{17}\text{O}\text{-H}_2\text{O}$  髄注後トレーサー分布は限局性に近いものであり、脳実質へのトレーサー移行も明らかではなかった。Gd 造影剤投与個体では、吻側へトレーサーが回り脳実質まで移行する様子を捉えることに成功しており、これは先行研究の結果や第一章の結果と一致するものであった。今回の  $^{17}\text{O}\text{-H}_2\text{O}$  髄注検討結果が先行研究と一致しなかった理由として、実験条件の違いに起因するという仮説をいくつか挙げてみる。まず、今回使用した  $^{17}\text{O}\text{-H}_2\text{O}$  は 20mol% であり、先行研究で用いられた 90mol% よりも低いものであった。これは、脳実質の  $^{17}\text{O}$  移行が観察できなかった理由の一つである可能性があるものの、CSF の信号変化すらも注入部位以外で微弱であった理由としては考えづらいと思われる。先行研究上、大槽に投与された  $^{17}\text{O}\text{-H}_2\text{O}$  は、Gd 造影剤における動態と同様に CSF に乗って脳表へ移行し脳実質内へ移行すると想定されている。従って、CSF のトレーサー濃度は脳実質のそれよりも大幅に高くならなければならないはずであ

り, 実際図 13 に示すように Gd 造影剤髄注後 R1 値変化は CSF で脳実質よりも大きくなっている。したがって, 先行研究で脳実質の信号変化が観察できているのであれば, 本研究の条件においては少なくとも CSF への  $^{17}\text{O}\text{-H}_2\text{O}$  分布が広範囲に観察されるはずと考えられる。トレーサーの投与速度と総投与時間は, 本研究ではラットを用いた先行研究よりも高い値を設定しており(先行研究では  $1.8\text{uL}/\text{min}\times 28\text{min}$ , 本研究では  $2.5\text{uL}/\text{min}\times 30\text{min}$ ), 注入速度に起因する分布不十分は考えづらいと思われる。全身麻酔薬(イソフルラン)や体温, 実験中ラット体位についても先行文献と類似しておりかつ比較的一般的な条件であった。現時点では, 先行研究結果との乖離について明確な原因を特定できていない。今後は乖離要因のさらなる検討を行うとともに,  $^{17}\text{O}\text{-H}_2\text{O}$  実験では局所以外にトレーサーが分布しづらいことを仮定した実験の計画, 具体的には大槽髄注ではなく大脳脳表や脳実質内への直接投与実験なども検討していきたい。

### (3) Limitation

$^{17}\text{O}$  間接法 MRI の sliding view scheme では, 第2章でも述べた通り時間方向への平均化を生じるため TIC の平均化を生じ急峻な信号変化の評価において好ましくない場合があると考えられる。また, この再構成手法は被写体の動きに対して脆弱であるため体幹部など動きのある部位では適応しづらい可能性がある。他の手法を用いた SNR 改善としては, 圧縮センシングを用いたノイズ除去, 主成分分析を用いたノイズの分離, deep learning を用いたノイズ除去などが候補となり得ると考えられる。Gd 造影剤を用いたダイナミック R1 マップについては, 本研究で提示した VFA 法でトレーサー高濃度部位も含めて定量が可能となったと考えるが, 2つの flip angle で撮像するため従来の T1 強調像と比較して時間分解能が半分に低下するのは弱点である。Single FA 法の使用により従来と同等の時間分解能を達成できる一方, 本研究で示されたようにトレーサー濃度が高いと R1 値過小評価に陥る場合がある。従って, single FA 法を用いるには MR シーケンスや造影剤濃度などの条件を事前に調整し, 少数のラット個体で validation を行い VFA 法との誤差を評価してから本実験を行うことでより妥当性の高い解析となると考えられる。

## 総括

### 1. 結論

本研究では、第1章では溶質トレーサー髄注下 MRI の手法と頸部リンパ管流出障害モデルを組み合わせ、頭蓋外 CSF 流出経路の障害により頭蓋内 CSF や流出路に動態変化を生じる事を示した。第2章および第3章では第1章で用いた撮像法の定量性に関する課題を克服するとともに、これまで先行研究でも達成できていなかった高分解能 T2強調像連続撮像の手法を確立し、 $^{17}\text{O}$ - $\text{H}_2\text{O}$  間接法 MRI で CSF と脳実質双方を分離して解析することに成功した。さらに、改善されたそれぞれの撮像法を用いて溶質および溶媒トレーサーの動態マップ化し、両者の髄注後動態が異なっている可能性を示した。

### 2. 本研究から得られた新知見

#### 第1章

- ・ DCLN 結紮が CSF 頭蓋外流出路を障害することで頭蓋内の CSF 動態や鼻腔からの CSF 流出経路動態が変化することおよび変化が腹側くも膜下腔および鼻腔内で主に生じていることを示した。
- ・ 臨床機スペックの 3T MRI に専用受信コイルを組み合わせることで、ラット頭蓋内のトレーサー動態を観察する空間分解能・時間分解能で撮像することが可能であることを示した。

#### 第2章

- ・  $^{17}\text{O}$ - $\text{H}_2\text{O}$  間接法 MRI のファントム撮像においては、FSE T2 強調像に sliding view 再構成を適用することで、時間分解能を担保しながら SNR を上昇させる事ができ、 $^{17}\text{O}$  の拡散を画像化することができることを示した。
- ・ R1マップファントム撮像においては、2つの flip angle 画像からなる VFA 法に B1 マップ補正を併用する事で高い精度で R1 値を測定することが可能である事を示した。

#### 第3章

- ・  $^{17}\text{O}$ - $\text{H}_2\text{O}$  髄注下 MRI において、3T 臨床スペック機で先行研究より高い空間分解能、時間分解能での T2 強調画像を撮像した。そしてこの手法により、ラット  $^{17}\text{O}$ -

H<sub>2</sub>O 髄注実験において CSF を脳実質と分離して観察可能な分解能での撮像を達成した。

- ・ 溶質トレーサーである Gd 造影剤を用いた検討では、T1 強調像の相対信号ではなく VFA 法による R1 値のダイナミック撮像が生体ラット脳撮像において実行可能である事を示し、さらに手法による算出定量値の差を評価し、先行研究で報告されている single FA 法がトレーサー濃度の高い領域において R1 値過小評価となりうることを示した。

- ・ <sup>17</sup>O-H<sub>2</sub>O および Gd 造影剤の髄注条件をそろえて実験することで代表個体におけるトレーサー動態を試験的に比較し、両者のラット頭蓋内における動態が異なっている可能性を示した。

### 3. 新知見の意義

第1章で示された、頭蓋内の CSF 動態が頭蓋外の状態に影響を受けるという点は、今後認知症や水頭症などの脳内老廃物排泄異常や CSF 流出異常が想定される疾患において頭蓋外の流出路異常が病態に影響しうる事を示唆していると考えられる。

第2-3章においては、溶質および溶媒の髄注 MRI における技術的な改善を達成した。MRI を用いた実験において空間分解能、時間分解能、SNR および信号の定量性は撮像の制約となる重要なポイントであり、今後さらなる改善を目指す予定である。

### 4. 新知見から今後どのような研究が展開されうるか

第1章で作成した DCLN 結紮モデルは急性期モデルであったため、今後は慢性期モデルの作成を検討する予定である。また、他の疾患モデル動物との組み合わせについても考えたい。

第 2-3 章で得られた知見により、今後当研究室の実験環境下で溶質および溶媒トレーサーの両者において分布の定量評価を行うことが出来るようになった。R1 マップ連続撮像はヒト臨床画像においても SPGR T1強調像連続撮像を行う場合があるので single FA 法 R1 マップを適応できる可能性があり、今後適応の可能性について検討したい。

### 5. 今後の課題

第 1 章からの発展に際しては、慢性期水頭症となったとされる最近の先行研究も参考とし、慢性期モデルを念頭に置いて研究を進めたい。頸部リンパ流阻害による溶質や溶媒の動態変化を定量的に解析する手法は本研究第 2-3 章で道筋がついたと考えているが、これ以外の定量評価、例えば非造影環境下の脳実質の信号定量や含水量の推定、および hydrography による CSF 体積の定量などと言った撮像の最適化にも今後取り組む必要があると考えている。

第 2-3 章の結果については、 $^{17}\text{O}\text{-H}_2\text{O}$  動態が先行研究と大きく異なっていた理由を明確に出来ていない点が最大の課題であり、今後さらなる検証が必要と考えているが、 $^{17}\text{O}\text{-H}_2\text{O}$  髄注後にトレーサーが局所のみに限局する仮定の下での実験も今後計画したい。Gd 造影剤の定量については、VFA 法を用いれば CSF の Gd 造影剤動態の定量評価が可能となること、脳実質のトレーサー評価のみであれば single FA 法で十分であるとの結論が得られた。今後の研究に組み込むことで CSF や脳間質液の動態について定性的な信号変化を越えて定量的な動態解析を進めたい。

## 謝辞

本研究にあたり、終始懇切なる指導を頂きました、指導教員の亀田浩之先生、工藤與亮教授に深い感謝の意を表します。

また、実験動物飼育、実験および画像解析に際してご尽力いただきました画像診断学教室大学院生の藤井宝顕様、加藤大祐様、柏夏薇様、周思密様、技術補助員の吉田寿美恵様、井田頼子様、MRI シーケンスの策定および調整について貴重な助言を頂きましたシーメンスヘルスケアジャパンの漆畑勇太様、MRI 撮像時ラット固定、保温用部品の作成をいただきました北海道大学電子科学研究所技術部の楠崎真央様、武井将志様に深く感謝申し上げます。

最後に、本論文は北海道大学病院放射線診断科の皆様をはじめとして当該分野内外の先生方、その他の多くの方々のご指導とご協力に 支えられ完成したものであり、この場をお借りして全ての方々への心からの感謝の意 を表します。

## 利益相反

開示すべき利益相反はない。

本研究の一部は以下の科研費の助成の下で行った。

1. 水と溶質の同位体イメージングによる脳間質の恒常性維持機構の解明  
(22K15856)
2. MRI と同位体顕微鏡を用いたマルチスケールの水分子イメージング  
(24K02388)
3. 安定同位体水分子イメージングによる Glymphatic System の水動態解明  
(24K02388)

## 引用文献

- AHN, J. H., CHO, H., KIM, J. H., KIM, S. H., HAM, J. S., PARK, I., SUH, S. H., HONG, S. P., SONG, J. H., HONG, Y. K., JEONG, Y., PARK, S. H. & KOH, G. Y. 2019. Meningeal lymphatic vessels at the skull base drain cerebrospinal fluid. *Nature*, 572, 62-66.
- ALBAYRAM, M. S., SMITH, G., TUFAN, F., TUNA, I. S., BOSTANCIKLIOGLU, M., ZILE, M. & ALBAYRAM, O. 2022. Non-invasive MR imaging of human brain lymphatic networks with connections to cervical lymph nodes. *Nat Commun*, 13, 203.
- ALSHUHRI, M. S., GALLAGHER, L., WORK, L. M. & HOLMES, W. M. 2021. Direct imaging of glymphatic transport using H217O MRI. *JCI Insight*, 6.
- BRADBURY, M. W., CSERR, H. F. & WESTROP, R. J. 1981. Drainage of cerebral interstitial fluid into deep cervical lymph of the rabbit. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 240, F329-F336.
- BRADY, M., RAHMAN, A., COMBS, A., VENKATRAMAN, C., KASPER, R. T., MCQUAID, C., KWOK, W. E., WOOD, R. W. & DEANE, R. 2020. Cerebrospinal fluid drainage kinetics across the cribriform plate are reduced with aging. *Fluids Barriers CNS*, 17, 71.
- CHEN, Y., DAI, Z., FAN, R., MIKULIS, D. J., QIU, J., SHEN, Z., WANG, R., LAI, L., TANG, Y., LI, Y., JIA, Y., YAN, G. & WU, R. 2020. Glymphatic System Visualized by Chemical-Exchange-Saturation-Transfer Magnetic Resonance Imaging. *ACS Chem Neurosci*, 11, 1978-1984.
- CHEON, H., WOO, D. C., CHA, S., CHAE, Y. J., MAENG, I., OH, S. J. & JEON, J. Y. 2024. Impact of Cervical Lymphatic Obstruction on Brain Pathophysiology in Cervical Lymphedema Animal Models. *bioRxiv*.
- CHUNG, S., KIM, D., BRETON, E. & AXEL, L. 2010. Rapid B1+ mapping using a preconditioning RF pulse with TurboFLASH readout. *Magn Reson Med*, 64, 439-46.
- DECKER, Y., KRAMER, J., XIN, L., MULLER, A., SCHELLER, A., FASSBENDER, K. & PROULX, S. T. 2022. Magnetic resonance imaging of cerebrospinal fluid outflow after low-rate lateral ventricle infusion in mice. *JCI Insight*, 7.

- DING, G., CHOPP, M., LI, L., ZHANG, L., DAVOODI-BOJD, E., LI, Q., ZHANG, Z. & JIANG, Q. 2018. MRI investigation of glymphatic responses to Gd-DTPA infusion rates. *J Neurosci Res*, 96, 1876-1886.
- FRAM, E. K., HERFKENS, R. J., JOHNSON, G. A., GLOVER, G. H., KARIS, J. P., SHIMAKAWA, A., PERKINS, T. G. & PELC, N. J. 1987. Rapid calculation of T1 using variable flip angle gradient refocused imaging. *Magn Reson Imaging*, 5, 201-8.
- HARADA, T., KUDO, K., KAMEDA, H., SATO, R., SHIRAI, T., BITO, Y., FUJIMA, N., TSUNETTA, S., NOGAWA, T., MAEDA, K., HAYASHI, H. & SASAKI, M. 2022. Phase I Randomized Trial of (17) O-Labeled Water: Safety and Feasibility Study of Indirect Proton MRI for the Evaluation of Cerebral Water Dynamics. *J Magn Reson Imaging*, 56, 1874-1882.
- HIRATA, K., KOBAYASHI, K., WONG, K. P., MANABE, O., SURMAK, A., TAMAKI, N. & HUANG, S. C. 2014. A semi-automated technique determining the liver standardized uptake value reference for tumor delineation in FDG PET-CT. *PLoS One*, 9, e105682.
- HLADKY, S. B. & BARRAND, M. A. 2022. The glymphatic hypothesis: the theory and the evidence. *Fluids Barriers CNS*, 19, 9.
- ILIFF, J. J., LEE, H., YU, M., FENG, T., LOGAN, J., NEDERGAARD, M. & BENVENISTE, H. 2013. Brain-wide pathway for waste clearance captured by contrast-enhanced MRI. *J Clin Invest*, 123, 1299-309.
- JIANG, Q., ZHANG, L., DING, G., DAVOODI-BOJD, E., LI, Q., LI, L., SADRY, N., NEDERGAARD, M., CHOPP, M. & ZHANG, Z. 2017. Impairment of the glymphatic system after diabetes. *J Cereb Blood Flow Metab*, 37, 1326-1337.
- KAMEDA, H., KINOTA, N., KATO, D., FUJII, T., HARADA, T., KOMAKI, Y., SUGIMORI, H., ONODERA, T., TOMIYASU, M., OBATA, T. & KUDO, K. 2024. Magnetic Resonance Water Tracer Imaging Using 17 O-Labeled Water. *Invest Radiol*, 59, 92-103.
- LEE, H., MORTENSEN, K., SANGGAARD, S., KOCH, P., BRUNNER, H., QUISTORFF, B., NEDERGAARD, M. & BENVENISTE, H. 2018. Quantitative Gd-DOTA uptake from cerebrospinal fluid into rat brain using 3D VFA-SPGR at 9.4T. *Magn Reson Med*, 79, 1568-1578.

- LEE, Y., CHOI, Y., PARK, E. J., KWON, S., KIM, H., LEE, J. Y. & LEE, D. S. 2020. Improvement of glymphatic-lymphatic drainage of beta-amyloid by focused ultrasound in Alzheimer's disease model. *Sci Rep*, 10, 16144.
- LIU, S., LAM, M. A., SIAL, A., HEMLEY, S. J., BILSTON, L. E. & STOODLEY, M. A. 2018. Fluid outflow in the rat spinal cord: the role of perivascular and paravascular pathways. *Fluids Barriers CNS*, 15, 13.
- MOLLGARD, K., BEINLICH, F. R. M., KUSK, P., MIYAKOSHI, L. M., DELLE, C., PLA, V., HAUGLUND, N. L., ESMAIL, T., RASMUSSEN, M. K., GOMOLKA, R. S., MORI, Y. & NEDERGAARD, M. 2023. A mesothelium divides the subarachnoid space into functional compartments. *Science*, 379, 84-88.
- MUGLER, J. P., 3RD, BAO, S., MULKERN, R. V., GUTTMANN, C. R., ROBERTSON, R. L., JOLESZ, F. A. & BROOKEMAN, J. R. 2000. Optimized single-slab three-dimensional spin-echo MR imaging of the brain. *Radiology*, 216, 891-9.
- MULDOON, L. L., VARALLYAY, P., KRAEMER, D. F., KIWIC, G., PINKSTON, K., WALKER-ROSENFELD, S. L. & NEUWELT, E. A. 2004. Trafficking of superparamagnetic iron oxide particles (Combidex) from brain to lymph nodes in the rat. *Neuropathol Appl Neurobiol*, 30, 70-9.
- NAGANAWA, S. & TAOKA, T. 2022. The Glymphatic System: A Review of the Challenges in Visualizing its Structure and Function with MR Imaging. *Magn Reson Med Sci*, 21, 182-194.
- OSHIO, K. 2021. What Is the "Glymphatic System"? *Magn Reson Med Sci*.
- PINTASKE, J., MARTIROSIAN, P., GRAF, H., ERB, G., LODEMANN, K. P., CLAUSSEN, C. D. & SCHICK, F. 2006. Relaxivity of Gadopentetate Dimeglumine (Magnevist), Gadobutrol (Gadovist), and Gadobenate Dimeglumine (MultiHance) in human blood plasma at 0.2, 1.5, and 3 Tesla. *Invest Radiol*, 41, 213-21.
- PROULX, S. T. 2021. Cerebrospinal fluid outflow: a review of the historical and contemporary evidence for arachnoid villi, perineural routes, and dural lymphatics. *Cell Mol Life Sci*, 78, 2429-2457.
- SCHNEIDER, C. A., RASBAND, W. S. & ELICEIRI, K. W. 2012. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods*, 9, 671-5.

- SHENG, J., LI, Q., LIU, T. & WANG, X. 2022. Cerebrospinal fluid dynamics along the optic nerve. *Front Neurol*, 13, 931523.
- SILVER, I., KIM, C., MOLLANJI, R. & JOHNSTON, M. 2002. Cerebrospinal fluid outflow resistance in sheep: impact of blocking cerebrospinal fluid transport through the cribriform plate. *Neuropathol Appl Neurobiol*, 28, 67-74.
- TAOKA, T. & NAGANAWA, S. 2020. Glymphatic imaging using MRI. *J Magn Reson Imaging*, 51, 11-24.
- WANG, L., ZHANG, Y., ZHAO, Y., MARSHALL, C., WU, T. & XIAO, M. 2019. Deep cervical lymph node ligation aggravates AD-like pathology of APP/PS1 mice. *Brain Pathol*, 29, 176-192.
- XUE, Y., LIU, X., KOUNDAL, S., CONSTANTINOU, S., DAI, F., SANTAMBROGIO, L., LEE, H. & BENVENISTE, H. 2020. In vivo T1 mapping for quantifying glymphatic system transport and cervical lymph node drainage. *Sci Rep*, 10, 14592.
- YOON, J. H., JIN, H., KIM, H. J., HONG, S. P., YANG, M. J., AHN, J. H., KIM, Y. C., SEO, J., LEE, Y., MCDONALD, D. M., DAVIS, M. J. & KOH, G. Y. 2024. Nasopharyngeal lymphatic plexus is a hub for cerebrospinal fluid drainage. *Nature*, 625, 768-777.
- ZHU, Y., WANG, G., KOLLURU, C., GU, Y., GAO, H., ZHANG, J., WANG, Y., WILSON, D. L., ZHU, X., FLASK, C. A. & YU, X. 2023. Transport pathways and kinetics of cerebrospinal fluid tracers in mouse brain observed by dynamic contrast-enhanced MRI. *Sci Rep*, 13, 13882.
- ZOU, W., PU, T., FENG, W., LU, M., ZHENG, Y., DU, R., XIAO, M. & HU, G. 2019. Blocking meningeal lymphatic drainage aggravates Parkinson's disease-like pathology in mice overexpressing mutated alpha-synuclein. *Transl Neurodegener*, 8, 7.