

平成 30 年 6 月 14 日現在

機関番号：82406

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K01856

研究課題名(和文)細胞の活動を反映する光散乱パターンを用いた脳梗塞イメージング法の開発

研究課題名(英文)Development of optical imaging method for brain ischemic stroke using light scattering speckle pattern associated with cellular motility

研究代表者

川内 聡子(Kawauchi, Satoko)

防衛医科大学校(医学教育部医学科進学課程及び専門課程、動物実験施設、共同利用研究・防衛医学研究センター)講師

研究者番号：20506505

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、虚血性脳梗塞の病態解明と治療法開発のため、ラット脳梗塞モデルを対象に細胞小器官の活動を反映する微細な光散乱パターン(スペックルパターン)を用いて、脳組織のバイアビリティーの時空間変化をin vivoで可視化できないか検討を行った。近赤外レーザー光を用いラット脳を経頭蓋骨的に観察したところ、血流が最も低下した領域で時間とともにスペックルパターンが増強する様子が観察され、細胞小器官の動きが低下する様子を捉えたものと推察された。この領域は翌日に梗塞になることが確認され、同光散乱パターンが組織バイアビリティー低下の指標になりうることを示唆された。

研究成果の概要(英文)：To understand the pathophysiology and to develop a new therapeutic method for ischemic stroke, we performed transcranial diffuse reflectance imaging for a rat stroke model with near-infrared (NIR) laser illumination and examined whether spatiotemporal changes in tissue viability (development of infarction) can be visualized by the speckle pattern intensity associated with cellular motility in the tissue. After middle cerebral artery occlusion (MCAO), we observed that the speckle pattern intensity increased in the ischemic core with time later than ~30 min after MCAO, indicating decrease in cellular motility, and the region with increased speckle pattern intensity became infarction at 24 h after MCAO. These results suggest that the light scattering speckle pattern signal would be useful for monitoring spatiotemporal changes in tissue viability in rat brains after focal cerebral ischemia.

研究分野：医用生体光学

キーワード：脳梗塞 光イメージング 光散乱 梗塞周辺脱分極

1. 研究開始当初の背景

脳梗塞は、我が国の死亡原因の上位を占め、その後の後遺症のため医学的・社会的に大きな問題となっている。脳は虚血に対して極めて脆弱であり、虚血後直ちにエネルギー産生異常、数分で電気生理学的機能停止となり、やがて細胞の膜形態が崩壊し不可逆的壊死（梗塞）に至る¹。虚血後まだ細胞の形態が維持されていれば血流再開により組織は回復しうるが、壊死組織への血流再開は出血性合併症を高率に引き起こすため禁忌とされる。現在急性期に行われている血栓溶解薬 rt-PA を用いた血流再開は、発症後 4.5 時間以内に適用されるが、出血性合併症を避けるため施行率は低い。そのため、さらなる病態解明と新たな治療法の開発が急務であり、それには病態と治療効果を非侵襲リアルタイムでモニタリングする技術の確立が不可欠である。しかしながら、脳組織の不可逆的損傷（梗塞）すなわち組織・細胞のバイアピリティー消失をモニタリングする技術は確立されていない。

細胞では恒常的に、細胞小器官が能動的に運動を行っており、これが細胞のエネルギー代謝やバイアピリティーと直接的に関連することが知られている²。バイアピリティーが消失すると細胞小器官の動きが停止することから、これを検出できれば梗塞領域の有力な指標になりうる。一般に、レーザー光のようなコヒーレント光（位相の揃った光）を物体に照射し、その反射光を観察すると、きらきら輝く明暗の斑状模様を見ることができる（スペックルパターン）。このパターンは、物体（散乱体）が静止していれば光波が互いに干渉しあうことで強められるが、運動している場合は光波の干渉が弱まりパターンは失われる。よってこのパターンの強弱から細胞のバイアピリティーに関する情報を得られる可能性がある。このような原理を用いて、顕微鏡下で単一細胞のバイアピリティーを評価する試みがなされているが³、生体組織を対象にした観察は調べた限り見あたらない。我々は、ラット全脳低酸素モデルを用いた予備実験において、血流減少後、組織が不可逆的な状態になるとスペックルパターンが増強される現象を観察した。これは細胞小器官の動きの停止を捉えた可能性があり、パターンの強弱を数値化しマッピングすることで梗塞領域の可視化に応用できると予想した。

2. 研究の目的

本研究は、上述した微細な光の散乱パターン（スペックルパターン）が細胞の不可逆的損傷（梗塞領域の進展）とどのような関係にあるか調べるため、ラット局所脳虚血モデルを対象に、スペックルパターンの強弱の時空間特性を明らかにするとともに、脳血流変化および梗塞領域との関係につき調べ、その梗塞進展の指標としての有用性につき検討す

ることを目的とした。

3. 研究の方法

本研究に関わるすべての動物実験は、防衛医科大学校動物実験倫理委員会による承認を受けて行われた。

(1) 微細な光散乱パターンの数値化とマッピング

上述したように、細胞小器官の活動すなわちバイアピリティーの指標になると予想される微細な光散乱パターン（レーザー光照射によるスペックルパターン）は、散乱体が静止していると明暗が強く像が粗くなる。このとき画像の輝度分布（輝度の最少値～最大値の範囲）は広がる性質を持つため、この広がりを表す輝度の分散値をマッピングすれば、スペックルパターンの強弱をマッピングでき、細胞のバイアピリティー消失を可視化しうると考えた。本研究では数 100 μm の空間分解能を維持するため、5～80 ピクセル角の領域ごとに分散値をマッピングする画像処理プログラムをソフトウェア LabVIEW により作成した。分散値の増加は、血球および細胞小器官の動きの静止、すなわちバイアピリティーの消失に対応と考えられる。

(2) ラット脳梗塞モデルの作製

Sprague-Dawley ラット（10 週齢，雄，日本エスエルシー）を対象に、ペントバルビタールナトリウム麻酔下（50 mg/kg，腹腔内投与）に頭部を固定し、左頭頂骨を露出した。中大脳動脈（middle cerebra; artery: MCA）左遠位部付近の頭頂骨を歯科用ドリルを用いて約 3 mm×4 mm の大きさに開窓し、露出した MCA を電気メスにより凝固切開し血流を遮断した。

(3) ラット脳の近赤外レーザー光の拡散反射光画像と脳血流画像の取得

図 1 に実験装置図を示す。ラット頭部左半球全域（左頭頂部および側頭部，開窓部を含む）をレーザースペックル血流画像装置（OZ-2，オメガウェーブ）の波長 780 nm レーザー光で照明し、同装置の CCD にて後方散乱光画像（ I_{speckle} ）と血流画像（ I_{CBF} ）を取得した。あわせて梗塞周辺脱分極（per i infarct

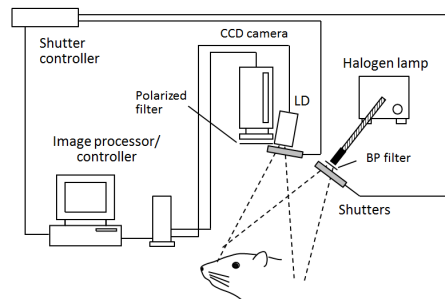


図 1 実験装置図

depolarization: PID) の発生をモニタリングするため、上述したレーザー光と交互にハロゲンランプ光 (波長 800 ± 40 nm のバンドパスフィルターの透過光) で頭部を照明し、拡散反射画像 (I_{PID}) を同じ CCD で取得した。この実験系により、異なる 3 種類の画像を同一個体、同一視野において、MCA 閉塞前から閉塞 90 分後まで連続して取得し、上述したソフトウェアにて画像解析を行った。

(4) 梗塞領域の評価

上記イメージングを行った 24 時間後に、TTC(2,3,5-triphenyltetrazolium chloride) 染色法により梗塞領域の評価を行った。同染色はミトコンドリアの活性を指標とするもので、正常組織のミトコンドリアは TTC をホルマザンに還元し組織を赤色に染色するのに対し、梗塞領域は染色されず白く残る。摘出したラット脳を 37 °C の 2% TTC 溶液に浸漬し、30 分後に染色領域の観察を行った。

4. 研究成果

図 2 に MCA 閉塞前および閉塞 90 分後の 780 nm レーザー光の反射画像 (図 2a, 2b), その分散値マップ画像 (図 2c, 2d), ハロゲンランプ光の反射画像 (図 2e, 2f), および血流除算画像 (図 2g, MCA 直後に血流が 50%以下

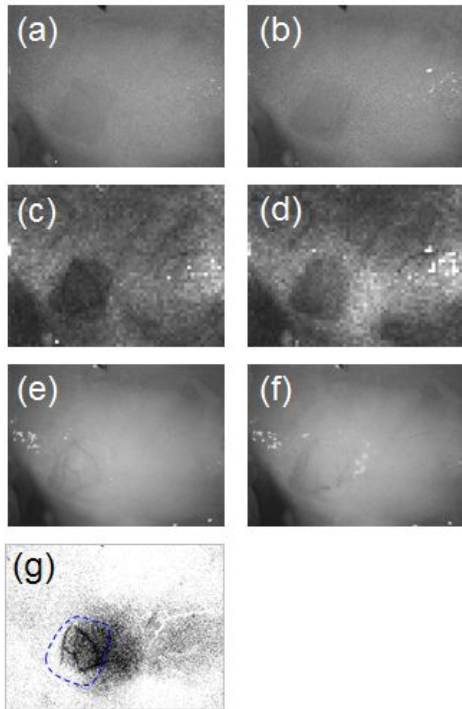


図 2 ラット MCA 閉塞モデルのイメージング結果。MCA 閉塞前 (左, a, c, e) および閉塞 90 分後 (右, b, d, f) における 780 nm レーザー光の反射画像 (a, b), その分散値マップ画像 (c, d), ハロゲンランプ光の反射画像 (e, f), および血流除算画像 (g, MCA 直後に血流が 50%以下に低下した虚血中心領域を黒で描出) を示す。

に低下した虚血中心領域を黒で描出) を示す。レーザー光の反射画像では、ハロゲンランプ光の反射画像では見られない斑状のスペックルパターンが確認された。このスペックルパターンの強弱を表す画像輝度の分散値マップの MCA 前後の比較を図 2c と 2d に示す。分散値は、虚血後 90 分において、主として虚血中心部付近で増加し (図 2d), このような明瞭な変化はレーザー光の反射画像では見られなかった。この虚血前後の分散値の増加は、細胞小器官の動きの低下だけでなく、血球の動きの低下 (血流減少) も反映していると考えられる。一方、虚血後の梗塞領域の形成、すなわち組織バイアピリティーの低下は、虚血後一定時間をかけて進展することが知られる。またその間、梗塞周辺領域から繰り返し発生する梗塞周辺脱分極 (PID) が梗塞拡大の一因になっていると考えられている。そこで次に、MCA 閉塞後の分散値マップ画像と血流画像の変化を PID の発生時間ごとに追跡した。

MCA 閉塞後のレーザー光反射画像の分散値マップとその差分画像をそれぞれ図 3 と図 4 に示す。またこれに対応する血流変化を図 5 に示す。図 4 と図 5 の差分画像は、MCA 閉塞後約 30 分の画像をベースラインとし、各時刻の画像から減算したものである。虚血後の分散値は、PID の発生回数の増加、時間経過とともに増加し (図 3), その差分画像から、分散値の増加は主として虚血中心領域で起きていることが分かる (図 4)。図 5 は虚血後の血流変化を示し、赤色は血流増加、青色は

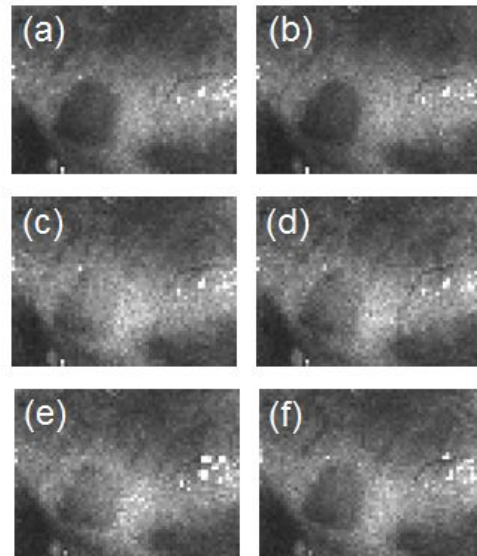


図 3 ラット MCA モデルの MCA 後の 780 nm レーザー光の反射画像の輝度の分散値マップ。MCA 後の時刻とそれまでに発生した PID の回数: (a) 30 min 50 s, 9 回, (b) 54 min 54 s, 11 回, (c) 60 min 40 s, 14 回, (d) 78 min 30 s, 15 回, (e) 88 min 50 s, 16 回, (f) 90 min, 17 回。

血流減少，白色は血流変化がほとんどない領域を表している。この結果は，虚血後の分散値の増加は，すでに血流が低下し血流変化がほとんど起きていない領域で起きていることを示している。このことは，虚血後に観察された分散値の増大が，血球の動きの低下に

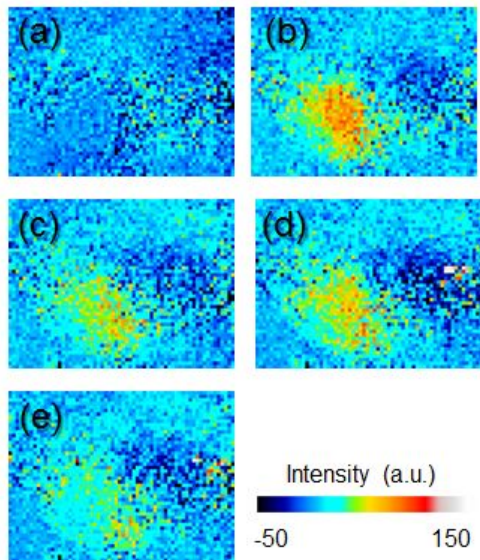


図4 ラット MCA モデルの MCA 後の輝度の分散値マップの差分画像。MCA 閉塞後 30 min 50 s の画像を各時刻の画像から減算したものを示す。MCA 後の時刻とそれまでに発生した PID の回数：(a) 54 min 30 s , 11 回 ,(b) 60 min 40 s , 14 回 ,(c) 78 min 30 s , 15 回 ,(d) 88 min 50 s , 16 回 ,(e) 90 min , 17 回。

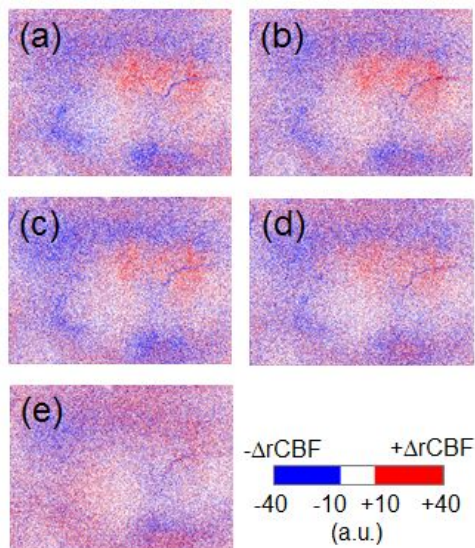


図5 ラット MCA モデルの MCA 後の血流差分画像。MCA 閉塞後 30 min 50 s の画像を各時刻の画像から減算したものを示す。MCA 後の時刻とそれまでに発生した PID の回数：(a) 54 min 30 s , 11 回 ,(b) 60 min 40 s , 14 回 ,(c) 78 min 30 s , 15 回 ,(d) 88 min 50 s , 16 回 ,(e) 90 min , 17 回。

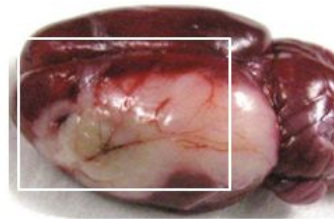


図6 TTC 染色結果(図2~5と同じラット脳の結果)。白い四角は図2~5の画像視野に対応する。

よるものではなく，細胞小器官の活動低下によるスペckルパターンの変化によるものである可能性を示唆している。また虚血後，側副血行路による血流増加が見られる領域(図5の赤色の領域)においては，分散値の増大は起きていないことから，分散値の増大がバイアビリティーの低下によるものと推察される。図6に示すTTC染色の結果から，分散値が増大した領域は翌日梗塞になることが確認された。同様の傾向は計測した全5例のラットで確認された。

さらに虚血直後からの分散値の時空間変化とPIDとの関係につき解析した結果，PIDは，分散値が増加した領域の外側を伝搬することが分かった。PIDの発生・伝搬には一定の血流ないしエネルギーが必要であり，PIDの通過領域の内側はバイアビリティーが低下した領域とみなすことができる。観察された分散値の増大は，PID通過領域の内側に位置したことから，分散値の増大が脳組織バイアビリティー低下の指標になりうることを示唆された。

<引用文献>

1. K. A. Hossmann: Viability thresholds and the penumbra of focal ischemia. *Ann. Neurol.*, 36: 557-565, 1994.
2. B. Herman and D. F. Albertini: A time-lapse video image intensification analysis of cytoplasmic organelle movements during endosome translocation. *J. Cell Biol.*, 98: 565-576, 1984.
3. Y. Hirakawa, T. Hasegawa, and T. Masujima: Laser Speckle Microscope for Instantaneous Determination of Condition of Single Living Cell. *Jpn. J. Appl. Phys.*, 44(Part 2): 1-7, 2004.

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 2 件)

S. Kawauchi, I. Nishidate, H. Nawashiro, S. Sato: Near-infrared diffuse reflectance signals for monitoring spreading depolarizations

and progression of the lesion in a male rat focal cerebral ischemia model. J. Neurosci. Res., 96: 875-888, 2017. doi: 10.1002/jnr.24201.

川内聡子：中枢神経疾患と拡張性脱分極：病態との関わりと光イメージングの有用性．レーザー学会第 498 回研究会報告（ニューロフォトニクス），RTM-16：49-54，2016．

〔学会発表〕(計 4 件)

川内聡子，西舘泉，苗代弘，佐藤俊一，拡散反射分光法を用いたラット中枢神経組織のリアルタイム病態観察，第 15 回医用分光学研究会，筑波大学(つくば)，2017．

川内聡子，拡散反射分光法によるラット中枢神経の病態リアルタイム観察，第 21 回酸素ダイナミクス研究会，島津製作所(東京)，2017．

川内聡子，中枢神経疾患と拡張性脱分極：病態との関わりと光イメージングの有用性，レーザー学会第 498 回研究会(ニューロフォトニクス)，東京農工大学(東京)，2016．

S. Kawauchi, W. Okuda, I. Nishidate, H. Nawashiro, S. Sato, Spatiotemporal characteristics of spreading depolarization, hypoxemia and vasoconstriction caused by a laser-induced shock wave in the rat brain, Photonics West BiOS 2015, The Moscone Center (San Francisco), 2016.

川内聡子，西舘泉，苗代弘，佐藤俊一，拡散反射法イメージングによる脳梗塞の病態観察：可視と近赤外の比較，第 13 回医用分光学研究会，ホテルグランドヒル市ヶ谷(東京)，2015．

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

なし

6．研究組織

(1)研究代表者

川内 聡子 (KAWAUCHI, Satoko)
防衛医科大学校・防衛医学研究センター・
生体情報・治療システム研究部門・講師
研究者番号： 20506505

(2)研究分担者

佐藤 俊一 (SATO, Shunichi)
防衛医科大学校・防衛医学研究センター・
生体情報・治療システム研究部門・教授
研究者番号： 90502906