

令和 4 年 6 月 17 日現在

機関番号：82626

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K22990

研究課題名(和文) 拍動循環と脳機能・脳疾患の関連性：全脳摘出標本によるアプローチ

研究課題名(英文) Association of pulsatile circulation with brain function and brain disease: an approach using ex vivo whole brain preparations

研究代表者

高島 一郎 (Takashima, Ichiro)

国立研究開発法人産業技術総合研究所・情報・人間工学領域・上級主任研究員

研究者番号：90357351

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：これまで脳実質への拍動流効果はよく分かっていなかった。そこで、全脳摘出標本と人工血液循環装置を利用し、脳神経活動への拍動流の影響を検証した。まず、人工血液の拍動循環により、全脳標本の生理活性を5時間維持できる実験系を確立した。次に、拍動血流の異なる位相で外側嗅索に電気刺激を与えて神経活動を惹起し、梨状皮質における神経応答の解析を行った。その結果、局所電場電位記録法による神経応答が、拍動流の位相により変化する現象が明らかになった。本結果は、拍動血流が脳機能をモジュレートする可能性を示唆するものと考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

拍動循環により全脳標本を維持する実験系を確立した。本実験技術は、血液脳関門機能を保存したex vivoモデルとして脳血管性の病態発現機構の研究や、脳を標的とした創薬の研究分野に応用できる可能性がある。また、本研究では、拍動流の位相によって神経応答が変化することが初めて示された。現象のメカニズム解明にはさらなる研究が必要であるが、拍動流が脳機能を調節する可能性を示唆する本研究成果は、脳と心臓の新しい関係を探る第一歩と位置付けられる。人工心臓の研究開発やその脳実質への影響評価の分野においても、本実験技術に基づく脳機能解析の手法が有益な情報を提供できる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：The effects of pulsatile flow on brain parenchyma have not been well understood. Therefore, we examined the effect of pulsatile circulation on the brain using ex vivo whole brain preparations and an artificial blood circulation system. First, an experimental system was developed in which whole brain preparations could maintain physiological activity for 5 hours by pulsatile circulation of artificial blood. Next, electrical stimulation was given to the lateral olfactory tracts at different phases of the pulsatile flow to elicit neural activity, and the neural responses in the piriform cortex were analyzed. The results revealed a phenomenon in which local field potential activity changes relative to the phase of the pulsatile flow, suggesting that pulsatile circulation may modulate brain function.

研究分野：神経科学

キーワード：脳機能 血液循環 血液脳関門 心拍

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 我々の生体の血液循環は、心臓のつくる拍動流によって維持されている。では、生体にとって拍動する血流は本質的に必要なものであろうか？ 人工心臓の研究分野では古くからの議論であり、腎など様々な臓器機能を対象とした実験的・臨床的検討では、無拍動流による生体影響は少ないと言われていた。しかし研究開始当初、脳機能への影響を直接調べた研究はほとんどなく、脳実質への拍動流効果については不明であった。

(2) 脳磁図 MEG を使い、心拍計測しながら視覚刺激の検出能力を調べる実験を行った研究において、心拍に同期した脳活動信号を観測すれば、その心拍の直後に提示される視覚情報を被験者が検出できるかできないか、未来の状態を予測できる(Park et al., Nat Neurosci, 2014)という報告が行われた。この研究結果は、脳の感覚情報処理が心拍の影響を受ける可能性を示唆しており、脳活動に見られるゆらぎの一因として、拍動する血液循環が関与する可能性が考えられた。

(3) 初期の研究報告では、拍動流は高い運動エネルギーにより毛細血管に多くの血液を送り込み、物質代謝に有利に働くと考えられた(Shepard et al., Arch Surg, 1966)。しかし、その後の血管性認知症に関する研究において、加齢による血液脳関門(BBB)機能の低下が様々な脳疾患の引き金となること、そして、動脈硬化により圧力脈波が吸収されず、拍動流が脳毛細血管に突流入することで BBB の機械的破壊が生じる可能性が指摘された(O'Rourke et al., J Am Col Cardiology, 2007)。拍動する血流が脳細胞の生存にとって有利に働くのか不利なのかは不明であった。

(4) 脳血管系を保存して全脳を摘出し、基礎研究に供する実験技術(BrainEx 技術)に著しい進歩があった。イエール大学がブタ頭部を身体から切り離れた状態で 36 時間の生存に成功した(Vrselja et al., Nature, 2019)というニュースが世界に発信され、この技術が今後どう利用されてゆかが注目された。同様、申請者らは、げっ歯類の全脳を摘出し、脳研究へ利用する技術を確立していた。げっ歯類においては、細い血管の処置に高度な手技が必要であり、~8 時間程度、脳の生理活性を維持することができていた(Kajiwara et al., Eur J Neurosci, 2007)。ただし、当時の申請者らは、脳灌流には人工血液を定常流として循環させる方式を採用していたため、拍動流によりげっ歯類の全脳機能を維持できるかどうかは不明であった。

2. 研究の目的

生体の血液循環は心臓のつくる拍動流によって維持されているが、生物進化の過程で脳が拍動ポンプの特徴を何らかの情報処理に活用する戦略はなかったのだろうか？これが本研究の学術的な問いである。無拍動流の生体影響は人工心臓分野で古くから議論され、臓器機能への影響についての報告は散見されるものの、脳実質への拍動流作用についての知見は著しく乏しい。そこで本研究課題では、動物から取り出した全脳摘出標本と人工血液循環装置を利用し、拍動流周期の様々なタイミングで脳神経活動を計測する実験を行う。拍動する血液循環により脳活動がモジュレートされるかどうかを検証し、脳機能への拍動流作用に関して新しい知見を得ることを研究の目的とする。

3. 研究の方法

(1) 全脳摘出標本を拍動血流により維持する実験技術の確立

動物(モルモット)から脳血管系を保存したまま全脳を摘出して実験チャンバー内に置き、椎骨動脈よりカニューレーションを行って人工血液を脳灌流する。従来手順では、灌流速度 1~2 mL/min, 15 分で血管系の結索処置を行い、その後、灌流速度を 6~7 mL/min で維持し、液温を 90 min かけて 30~32 °C まで上昇させた後、一定に保つ。本研究では、従来手順に従って標本作製、30~32 °C の定常流で 15min 間の脳灌流を行った後にポンプを拍動流制御に切り替えた。その後、全脳標本の生理活性を経時的に計測した。

(2) 拍動流位相に同期した神経応答の解析

神経ネットワークの構成がシンプルで、神経応答の解釈が比較的容易な梨状皮質を計測対象とした。拍動流の様々な位相で神経線維束(外側嗅索)に電気刺激を与え、梨状皮質における神経細胞集団の応答を局所電場電位(LFP: Local Field Potential)記録法および膜電位イメージング法により計測した。外側嗅索に与えた単一電気刺激パルスは 10-100 μ A, 200 μ s であり、ペアド刺激時の刺激間隔は 30-250 ms とした。膜電位イメージングには、電位感受性色素 Di-4-ANEPPS を利用した。

(3) 局所血流変化と神経応答の解析

上記解析では、拍動血流波形は脳への流入点(椎骨動脈へのカニューレ)で超音波流量計によりモニタリングを行った。しかし、脳循環の過程で血流波形は変化していると考えられるため、次のステップとして、神経応答を計測する局所脳部位での血流変化の計測を試みた。脳に光ファイバー(0.25mm)を刺入し、光ファイバー式レーザー血流計により局所血流変化を測定し、外側嗅索への電気刺激で惹起した皮質神経応答との同時計測を行った。

(4) コリン作動性神経の機能低下モデル

脳血流拍動による神経応答の調節機構に、コリン作動系システムが関与している可能性を検証する。全脳標本において前脳基底部分マイネルト核に起始するコリン作動系の賦活化操作、あるいは、コリン作動系の機能に傷害を持つモデル動物の全脳標本利用を想定しつつ、まずは実験操作が容易な *in vivo* 系で評価を行った。動物のマイネルト核に免疫毒素 192IgG-サポリン(0.3 μ L, 0.5 μ g/ μ L)を投与し、4週間後にコリン作動性ニューロンの減少と皮質応答の関係を解析した。神経応答の記録にはLFPおよび膜電位イメージングを利用した。

4. 研究成果

(1) 拍動血流下における全脳の生理活性評価

循環ポンプをパソコンで外部制御することにより、内頸動脈血管の圧力波形を模擬した血液循環流の発生を試みた。超音波流量計を用いて脈動流を測定しながら、脳動脈の拍動を模擬する制御プログラミングを行った結果、循環ポンプの機械的な動作速度の限界から、拍動数には上限が設定されるものの、実際の内頸動脈血流波形に近い尖頭状の拍動流波形を再現することができた。さらに、再現した人工拍動流を実際の脳標本に適用し、脳の生理活性を維持可能かどうかの評価実験を行った結果、約5時間にわたり全脳の生存を確認できた(図1)。

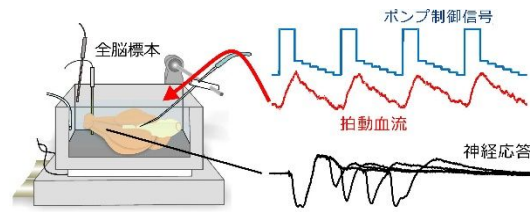


図1 拍動血流による全脳標本の維持

(2) 神経応答と拍動位相の関係

外側嗅索への単発刺激とペアド刺激に対する梨状皮質LFP応答を計測し、計測波形から単シナプス性応答と多シナプス性応答を解析した。その結果、入力刺激が与えられた拍動流位相に依存して、多シナプス性応答の波形が変化する現象が見られた。また、ペアド刺激に対しては第二刺激に対する応答振幅が変化することが明らかになった(図2)。観測された応答波形の変化を要約すると以下の通りであった。

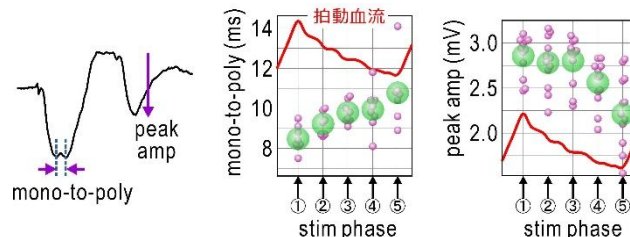


図2 拍動位相により神経応答が変化

中央: mono-to-poly 応答ピーク時間間隔

右: poly 応答のピーク値

- ・単発刺激に対し、単シナプス性応答と多シナプス性応答が観測されるが、拍動位相により多シナプス性応答のみが変化した。単 - 多シナプス応答のピーク時間間隔は8~11 msで分布し、拍動血流速度が遅くなる位相で応答ピーク間隔が広がる現象が見られた(図2中央)。
- ・60 ms 間隔でペアド刺激を行い第二刺激に対する応答を解析した結果、拍動血流速度が遅くなる位相では、連続する神経入力に対する応答が77%程度に小さくなる現象が見られた(図2右)。
- ・200 ms 間隔のペアド刺激では、第二刺激に対する神経応答が大きくなる促進現象(ファシリテーション)が見られたが、拍動位相による応答振幅の変化はなかった。

以上のLFP応答波形の変化特性は、梨状皮質の抑制性神経細胞を脱落させたモデル動物で記録される応答変化(Kajiwara et al., Neurosci Lett, 2015)と類似していることから、拍動血流は特に脳の抑制系ネットワークの機能に影響を与えている可能性が示唆された。皮質の応答変化パターンは膜電位イメージング法でも解析を行い、論文準備中である。

(3) 局所脳血流変化の計測

全脳標本に循環させる人工血液には、レーザー血流計測の原理となる散乱体(赤血球)が含まれていない。そこでまず、人工血液にナノバブルを混入させ、血流中バブルからの散乱光計測を試みた。ナノバブル自体が生理活性に与える影響は無視できると考えたが、得られる信号強度が小さく血流計測が不可能であった。次に、人工血液にサブミクロン径ポリスチレンビーズ(粒径0.226-0.275 μ m)を混入して計測を行った。得られる信号強度に多少の改善が期待されたものの、利用できるビーズ濃度を高めることができず、また、予想以上に光ファイバー刺入による脳へのダメージが大きく、脳標本の生存時間が制限された。本研究期間内では、ファイバーを全脳標本に刺入して行う毛細血流のスポット測定は成功しておらず今後の課題となった。

(4) コリン作動系障害による神経応答変化

マイネルト核のコリン作動性神経を機能低下させた動物モデルでは、皮質神経応答が増大することが明らかになった(図3)。コリン作動性神経細胞の60%の脱落で、LFP振幅は3倍に増加した。マイネルト核の賦活化により皮質に放出されたアセチルコリンは、脳血管を弛緩させる。モデル動物では、この血管制御機能が低下しているため、上記(2)で観測した拍動流による神経調節作用も変化している可能性がある。現在、本モデル動物の全脳標本を用いて、拍動流による神経調節作用へのコリン系の関与を解析中であり、成果発信に向けた準備を進めている。

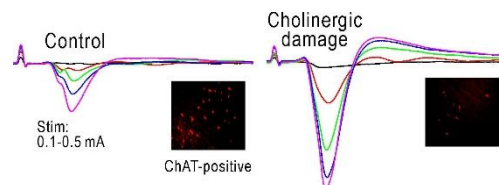


図3 コリン作動系の障害と神経応答の関係

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Kunori Nobuo, Takashima Ichiro	4. 巻 10
2. 論文標題 An Implantable Cranial Window Using a Collagen Membrane for Chronic Voltage-Sensitive Dye Imaging	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Micromachines	6. 最初と最後の頁 789 ~ 789
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/mi10110789	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Kunori Nobuo, Takashima Ichiro	4. 巻 741
2. 論文標題 Cortical direct current stimulation improves signal transmission between the motor cortices of rats	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Neuroscience Letters	6. 最初と最後の頁 135492 ~ 135492
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.neulet.2020.135492	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Dezawa Shinnosuke, Nagasaka Kazuaki, Watanabe Yumiko, Takashima Ichiro	4. 巻 335
2. 論文標題 Lesions of the nucleus basalis magnocellularis (Meynert) induce enhanced somatosensory responses and tactile hypersensitivity in rats	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Experimental Neurology	6. 最初と最後の頁 113493 ~ 113493
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.expneurol.2020.113493	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Takashima Ichiro, Kajiwara Riichi	4. 巻 11
2. 論文標題 Voltage-Sensitive Dye versus Intrinsic Signal Optical Imaging: Comparison of Tactile Responses in Primary and Secondary Somatosensory Cortices of Rats	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Brain Sciences	6. 最初と最後の頁 1294 ~ 1294
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/brainsci11101294	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 6件）

1. 発表者名 後藤、長坂、仲田、高島、山本
2. 発表標題 Modulation of excitatory/inhibitory balance by change in brain temperature
3. 学会等名 第43回日本神経科学大会（国際学会）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 出澤、長坂、渡辺、高島
2. 発表標題 The nucleus basalis of Meynert modulates somatosensory neural activity and tactile sensitivity in rats
3. 学会等名 第43回日本神経科学大会（国際学会）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 後藤、高島、九里
2. 発表標題 Neonatal hypoxic-ischemic brain injury causes motor dysfunctions
3. 学会等名 第44回日本神経科学大会（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 後藤、出澤、高島、山本
2. 発表標題 Effects of brain temperature on somatosensory evoked potentials
3. 学会等名 第44回日本神経科学大会（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 出澤、田村、加藤、高島
2. 発表標題 Transcranial direct current stimulation (tDCS) improves mechanical nociceptive threshold in 6-OHDA-induced Parkinson's rats
3. 学会等名 第44回日本神経科学大会（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 田村、出澤、仲田、加藤、高島
2. 発表標題 The effect of transcranial direct current stimulation (tDCS) on forelimb motor function in 6-OHDA-induced rat model of Parkinson's disease
3. 学会等名 第44回日本神経科学大会（国際学会）
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	梶原 利一 (Kajiwara Riichi) (60356772)	明治大学・理工学部・専任准教授 (32682)	
研究分担者	富永 貴志 (Tominaga Takashi) (20344046)	徳島文理大学・神経科学研究所・教授 (36102)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------