

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年5月31日現在

機関番号：11501
 研究種目：基盤研究(C)
 研究期間：2010～2012
 課題番号：22500401
 研究課題名（和文）脳組織活性計測用OCTに関する基盤研究
 研究課題名（英文）Basic study on optical coherence tomography to monitor viability in brain
 研究代表者
 佐藤 学 (SATO MANABU)
 山形大学・大学院理工学研究科・教授
 研究者番号：50226007

研究成果の概要（和文）：脳組織活性と OCT 信号の関係に関して検討を行った。脳組織の温度を恒温に保った場合でも、心停止前に OCT の信号強度が増大する。周期的な組織温度変化に対しては、OCT 信号との間に負の相関関係があり、OCT の信号増大に麻酔薬の影響はない。ATP の生成に関係深いチトクローム C オキシダーゼ(CcO)の分光測定では、拡散反射光測定で、心停止に伴い、相対的に波長 1.2 μm の信号増大が確認され、CcO が還元状態に変化する結果が得られた。波長 0.5 μm ～0.9 μm に対する脳スライスの拡散反射・透過光スペクトル測定では、虚血時に、吸収係数の増大と散乱係数の減少が測定された。関係解明に関するさらなる検討が必要である。

研究成果の概要（英文）：Relation between brain viability and OCT signal has been investigated. Keeping the tissue temperature after overdose of anesthetic, the OCT signal has increased before cardiac arrest (CA). For periodical changes of temperature, the negative correlation relation between OCT signal and temperature was shown. There is no influence of anesthetizers for increase of OCT signal. Under the diffuse reflection measurement, the relative increase of 1.2 μm light was measured through CA to show the reduction of CcO. In defuse optical measurements from 0.5 μm to 0.9 μm using slices of brain, the increase of absorption coefficient and the decrease of scattering coefficient were measured. Further researches are necessary for applications.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2012年度	600,000	180,000	780,000
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：人間医工学・医用生体工学・生体材料学

キーワード：生体情報・計測

1. 研究の背景

2006年の死因では、がん、心臓病、脳血管疾患（脳梗塞、脳出血、クモ膜下出血）で58.2%を占めている。この脳血管疾患に加えて、交通事故などによる頭部外傷や新生児低酸素虚血症、さらにはインフルエンザによる脳炎な

どの際に、これらに対して脳の組織活性 (Viability) を迅速に測定し、適切な処置をすることが求められている。また、病状の進行や術後の回復時に、組織活性をベッドサイドで常時測定することも臨床的に強く望まれる。現在、これに対してMRIなどが挙げられるが、価格、サイズ、汎用性などの点で問題が

残る。

最近、ラット脳の組織活性を拡散光でモニターする研究が報告された。生きたラット脳の皮質にセットした入射・検出用の光ファイバーにより、生理食塩水を用いた虚血による組織活性低下の際のスペクトル変化とATP（アデノシン三リン酸）の濃度変化の測定から、波長620nmにおいて組織の散乱光強度の増加後、ATPの減少が起こることが実験的に確認された。これは、脳組織活性の光学モニターの可能性を示すはじめての報告である。脳組織は、6層構造の皮質（灰白質）と白質で構成される三次元構造なので、脳組織活性の光学モニターでは測定部位の同定に三次元空間分解能が必要不可欠であるが、拡散光による計測法では原理的に三次元空間分解能は困難である。

一方、光波断層画像計測法(OCT, optical coherence tomography)は、“超音波エコー法の光版”と理解され、その特徴は、組織に進達しやすい微弱な近赤外光による非侵襲性と、数 μm から数十 μm の高い三次元空間分解能である。すでに、眼科臨床で実用化されており、内視鏡型OCTやカテーテル型OCTをはじめ、さまざまな臨床応用が期待され、一般産業も含めて幅広い研究がなされている。

我々は、早くからOCTの基礎と応用に着眼して研究を行ってきた。小型・軽量・高速化からカメラを用いたOCTを構築し、ラットの脳組織を用いて測定を行い、過剰麻酔による安楽死によって脳組織活性が低下された場合、OCT信号が増大することをすでに報告した。しかし、応用へ向けては、さらに機構等に関する検討が必要なために本研究の提案に至った。

2. 研究の目的

脳組織活性へのOCT応用に関する応用展開へ向けては、基本的に組織活性の低下要因となる血流停止や組織温度とOCT信号との関係解明が必要不可欠であり、本研究では、3年間の研究期間内に、主にこれらの関係解明に関して知見を得ることを目的として取り組む。

3. 研究の方法

血流停止時のOCT信号の増大の機構解明として、次のことを行った。

(1) 生きたラット脳組織
OCT画像測定、心電測定、分光測定、組織温度測定

(2) 生きた脳組織スライス
透過・反射スペクトル測定による吸収係数・散乱係数スペクトル測定

4. 研究成果

(1) 組織温度を維持した際のOCT信号変化

我々の先行研究では、麻酔下のラットの頭蓋骨頭頂部を歯科用ドリルで研磨し、脳の3D断層画像を10min間隔で210min間測定し、安楽死の際、心停止前に脳組織内部の灰白質、白質におけるOCTの信号強度が増大することを確認した。この際、まず、我々は組織温度の低下に着目した。局所的な脳梗塞などによる組織活性低下では、組織は常に恒温に保たれているので、組織温度が恒温に保たれても先行研究と同じようにOCT信号の増大が起きることを確認するのは重要である。

OCTは、波長 $1.3\mu\text{m}$ のSLDを用いて、鉛直断層画像の領域は $4\text{mm}\times 4\text{mm}$ で、深さ 2.8mm に渡って400枚の断層画像を測定した。画素サイズは、 $160\times 160\text{pixel}$ で、測定速度は深さ固定の場合に30frames/secである。OCTの3D測定部位の近くに熱電対を組織に埋め込んで組織温度をモニターした。安楽死時の温度低下を補うためにラットの胴体に帯状ヒーターを巻き付けて心拍低下時に頭部の組織温度が低下しないように温度を制御した。2匹のラットに対して安楽死用の過剰麻酔から心停止(cardiac arrest)を経ての組織温度の経過を図1に示す。ほぼ一定に組織温度が保たれていることがわかる。その際、脳組織内でのOCT信号の初期値に対する相対信号強度の変化を図2に示す。相対信号強度は次のように求めた。基準となる最初の3D測定画像に対し、深さ方向の平均画像を求め、血管を避けて、画面内に5点、深さ強度プロファイルを評価するポイントを決める。各ポイントにおいて測定時間ごとの強度プロファイルを求め、灰白質、白質に相当する深さ部位での平均信号強度を求める。最初の平均信号強度で規格化したそれぞれの平均信号強度が相対信号強度である。

以上より、脳組織を恒温状態に保っても先行研究の結果と同様に脳組織内でOCT信号の増大が起こることが確認された。

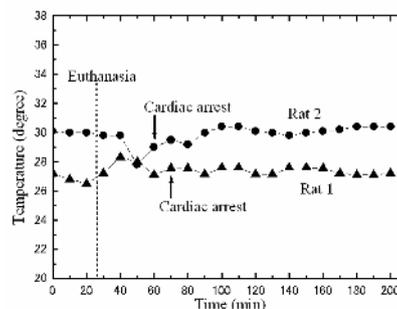


図1 ラット脳を恒温に保持した際の組織温度変化

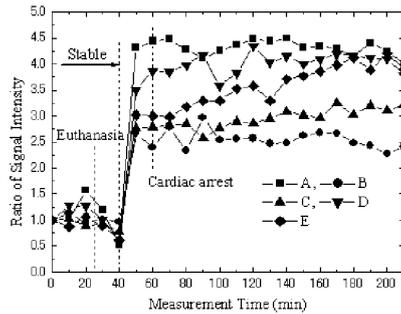


図2 ラット脳を恒温に保持した際の OCT 信号の相対信号強度変化

(2) 周期的組織温度変化に対する OCT 信号強度変化

体温が低下すると、心拍数と組織温度が低下するので、ATP の生成レートは低下する。組織温度 20°C では、代謝停止により神経組織の機能停止も報告されている。 20°C でもイオンの能動輸送によるATPの消費があるので、代謝停止によりATP は低下または枯渇する。そこで、組織温度低下でATP 濃度が減少すると考えて、組織活性低下とOCT 信号増大との機構検討のために、組織温度を変えた場合のOCT 信号強度を測定し、相関関係を検討した。

図3の測定系は、OCT、組織温度測定用のデジタルマルチメーター、心電測定用アンプ、組織温度制御用の氷水パットとシートヒーターで構成される。光学窓を作り付けた後、組織温度モニター用の熱電対をOCT の測定部位の横に埋め込む。以後、組織温度とは、この熱電対の温度を指す。各時刻での測定は、三次元断層画像測定、心電信号測定、熱電対の電圧測定である。測定開始後は、温度を制御しながら10 分間隔で上の測定を繰り返す。まず、氷水パットで胴体を覆い、組織温度を下げ、 20°C 付近まで低下したら、氷水パットを除いてシートヒーターで温める。組織温度が回復したら、シートヒーターから氷水パットに切り替え、これを繰り返す。図4は、組織温度の時間変化であり、 $22^{\circ}\text{C}\sim 29^{\circ}\text{C}$ まで4周期で、測定時間は570min である。これに伴い心拍数は、図5に示すように100~350 回/min で変化し、組織温度と心拍数との相関係数は、 $+0.788$ であった。最初の測定の400 枚の平均鉛直断層画像から血管を避けてA 点からE 点の5 点を選び、図6のように2 つの深さ領域 I $564\mu\text{m}\sim 914\mu\text{m}$ と深さ領域II $1486\mu\text{m}\sim 1836\mu\text{m}$ に対して、平均信号強度を求める。領域I, II において相対信号強度(RSI)として算出する。これより、組織温度変化に対し、5 点のそれぞれの深さでのRSI の時間変化が求まる。さらに、RSI 変化を平均的に見るために、深さ領域I において5 点の値を平均し

た結果が、図7である。ここで矢印は追加麻酔である。図4と比べると、低い組織温度でRSI が高くなる傾向があり、両者の対応が200min 以降は比較的よいことがわかる。他のラットで同様の測定を行った結果も含めて、図8に示す。全体で負の相関係数となるのがわかり、4匹の相関係数の平均では、RSI と組織温度との相関係数は、 -0.419 、RSI と心拍数との相関係数は、 -0.480 であることが分かった。

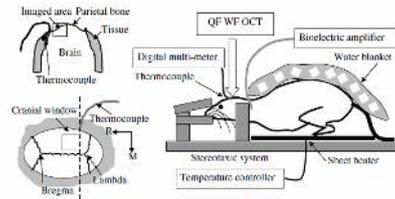


図3 測定システム

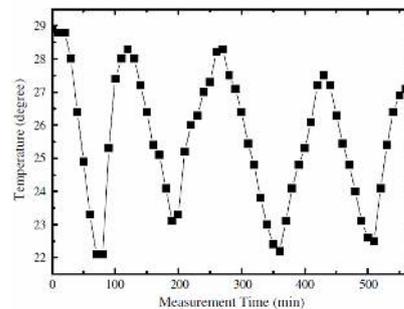


図4 組織温度の時間変化

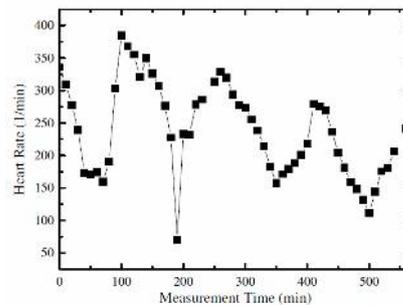


図5 心拍数の時間変化

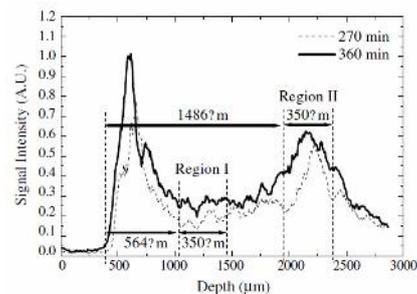


図6 OCT 信号強度プロファイル

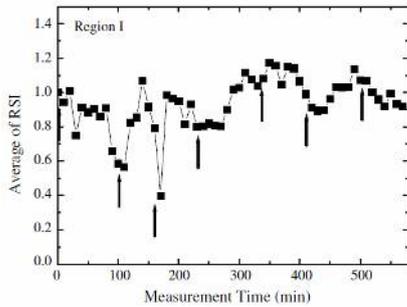


図7 5点平均でのRSIの時間変化

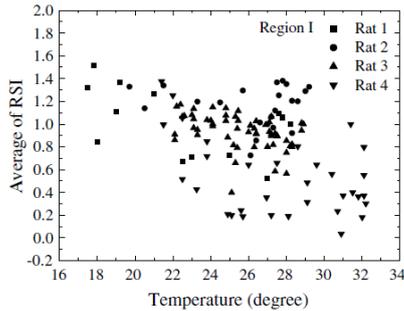


図8 RSIと組織温度の相関関係

(3) 心停止時の脳組織の分光特性変化

組織活性とはATPの濃度であり、ATP濃度の増減と密接に関係するのが、細胞内酵素のチトクロームcオキシダーゼ(Cc0)であり、その吸収スペクトル変化よりCc0の酸化還元状態を知ることができる。

我々は、in vivoでのOCT信号変化とATP濃度変化との関係を検討する際、血液が存在する場合のCc0の分光情報を知ることが重要と考え、ヘモグロビンの分光特性から2つの波長に着目し、Cc0の分光特性変化よりCc0の酸化還元に関する情報を得ようとした。ここでは、波長 $1.2\mu\text{m}$ 、 $1.45\mu\text{m}$ の2波長による拡散反射光計測システム(図9)を用いて測定したラットの心停止に伴う各波長の検出信号強度の時間変化について述べる。

測定は2匹のラットで2回行った。2台のロックインアンプの出力信号と心電信号を5回測定後、心停止用の過剰麻酔を投与し、前述のように拡散反射光の測定を継続した。過剰麻酔投与後、いずれの波長の信号も出力信号が増大し、その後安定した。Cc0では、酸化から還元への状態変化で、波長 $1.45\mu\text{m}$ の吸収係数の変化は少ないが、波長 $1.2\mu\text{m}$ では吸収係数が減少する。波長 $1.45\mu\text{m}$ の信号強度に対する波長 $1.2\mu\text{m}$ の相対信号強度の時間変化を図10に示す。どちらのラットとも心拍数が低下し、波長 $1.2\mu\text{m}$ の相対信号強度が増大する結果が得られ、この結果はCc0の還元状態への変化を示唆するものであり、先の報告と傾向が一致した。

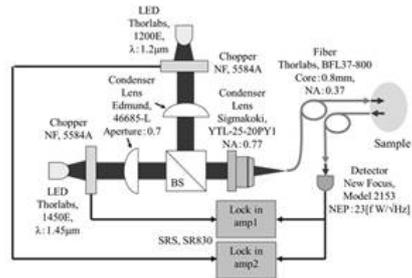


図9 2波長拡散反射光測定系

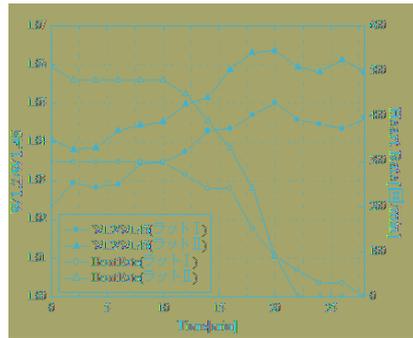


図10 過剰麻酔に伴う心拍数と相対拡散反射光強度変化

(4) 虚血時の脳スライスの光学特性変化

ラット脳スライスを用いた実験では、脳脊髄液中に、厚さ $400\mu\text{m}$ のスライス試料を保持し、酸素とグルコース濃度を低下させた際の吸収係数と拡散係数の変化を評価した。拡散反射光計測による測定結果とモンテカルロシミュレーションの結果を比較して、両係数を波長 $500\text{nm}\sim 900\text{nm}$ に渡って求めた。その結果、吸収係数は約0.3倍の増大、散乱係数は約0.4倍の減少が確認された。In situ脳組織とスライス脳組織とは散乱特性の変化に違いがあり、詳細については今後の検討が必要である。

以上、脳組織活性とOCT信号の関係に関して検討を行った。主に、心停止前のOCT信号の増大は、恒温状態でも生じて、組織温度と負の相関があり、麻酔薬によらないことがわかった。これらは、ATPが生化学的な反応で生成されるため、組織活性との関係を示唆する重要な情報である。また、発表論文は、米国光学会のVirtual Jourl. Bio.Opt.で数回取り上げられ、神経科学分野でのOCT応用の新たな可能性が示すことができた。今後、機構解明に関して、組織内での形態変化のイメージング等、さらなる研究が必要である。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計7件)

- (1)佐藤 学, 西舘 泉, “光コヒーレンストモグラフィの神経科学分野への応用”, レーザー研究, 査読有, Vol.40, No.4 pp.248-253(2012).
- (2)Manabu Sato, Daisuke Nomura, Tetsushi Kitano, Takashi Tsunenari, and Izumi Nishidate, “Variations in signal intensity with periodical temperature changes in vivo in rat brain: analysis using wide-field optical coherence tomography”, Appl. Opt., 査読有, Vol. 51, No.10, pp.1436-1445 (2012).
- (3)Manabu Sato, Daisuke Nomura, Takashi Tsunenari, and Izumi Nishidate, “In vivo rat brain measurement of changes in signal intensity depth profiles as a function of temperature using wide-field optical coherence tomography”, Virtual. Jour. Bio.Opt, Vol.6, Iss.1 (2011) (Jan 3 2011 Issue, selected from Appl.Opt.).(2)よりセレクトされて掲載)
- (4)Izumi Nishidate, Keiichiro Yoshida, and Manabu Sato, “Changes in optical properties of rat cerebral cortical slices during oxygen glucose deprivation”, Appl. Opt, 査読有, vol.49, No.34, pp.6617-6623 (2010).
- (5)Manabu Sato, Daisuke Nomura, Takashi Tsunenari, and Izumi Nishidate, “In vivo rat brain measurement of changes in signal intensity depth profiles as a function of temperature using wide-field optical coherence tomography”, Appl. Opt, 査読有, vol.49, No.30, pp.5686-5696 (2010).
- (6)Manabu Sato, Daisuke Nomura, Takashi Tsunenari, and Izumi Nishidate, “Measurement of signal intensity depth profiles in rat brains with cardiac arrest maintaining primary temperature by wide-field optical coherence tomography”, Virtual Journal of Biomedical optics, Vol.5, Iss.13 (2010) (Oct 22 2010 Issue, selected from Appl. Opt.) ((2)よりセレクトされて掲載)
- (7) Manabu Sato, Daisuke Nomura, Takashi Tsunenari, and Izumi Nishidate, “Measurement of signal intensity depth profiles in rat brains with cardiac arrest maintaining primary temperature by wide-field optical coherence tomography”, Appl. Opt, 査読有, Vol.49, No.26, pp.4851-4858 (2010).

[学会発表] (計20件)

- (1)佐藤 学, 西舘 泉, “ラット脳組織の光学イメージング”, レーザー学会学術講演会第33回年次大会講演, E230aVI04, (2013.1.28) 姫路商工会議所.
- (2)佐藤 学¹, 西舘 泉, “脳組織活性モニターへのOCT応用の検討”, レーザー学会第437回研究会, RTM-12-64, (2012.12.7) 東京 東北大学東京分室.
- (3)奥野 智之, 佐藤 学, 吉田 慧一郎, 西舘 泉, “虚血様条件下におけるラット脳スライ

スの分光イメージング”, Optics & Photonics Japan 2012, 25pp5 (2012.10.23) 東京 タワーホール船堀.

- (4)佐藤 学, “脳組織活性モニターへのOCT応用の研究”, 電子情報通信学会技術研究報告, Vol.112, No.142, pp.13-18 (2012.7.19) 米沢市山形大学.
- (5)中條弘人, 野中一平, 三浦寛樹, 西舘 泉, 佐藤 学, “心停止に伴うラット脳での2波長反射特性測定”, 第59回2012年春季応用物理学会, 16a-B9-11 (2012.3.12) 東京 早稲田大学.
- (6)北野哲史, 野中一平, 山崎漁太, 深見忠典, 西舘 泉, 佐藤 学, “心拍低下に伴うラット脳でのOCT信号強度と脳波のState entropyの同時測定”, 第59回2012年春季応用物理学会, 16a-B9-10, (2012.3.12) 同上.
- (7)北野 哲史, 野村 大輔, 恒成 隆, 西舘 泉, 佐藤 学, “ラット脳での周期的温度変化に対するOCT画像測定”, Optics & PHOTONICS Japan 2011, 30pF3 (2011.11.28) 大阪大学コンベンションセンター.
- (8)佐藤 学, “光波コヒーレンス断層画像測定法の原理とその新展開”, 2011 第3回光材料・応用技術研究会 (2011.11.18) 京都市.
- (9)野村大輔, 北野哲史, 恒成隆, 西舘 泉, 佐藤 学, “In vivo ラット脳組織における組織温度変化に対するOCT信号強度測定”, 春季第58回応用物理学関係連合講演会, 27a-BH-5 (2011) 震災に付き資料公開のみ.
- (10)中篠弘人, 三浦寛樹, 佐藤 学, “in vivo ラット脳組織活性モニターへの近赤外分光法の検討”, 応用物理学会第65回学術講演会, 26pA03 (2010.11.26) 東北大学.
- (11)野村大輔, 北野哲史, 恒成隆, 西舘 泉, 佐藤 学, “In vivo ラット脳組織におけるOCT信号強度への温度影響の検討”, 応用物理学会第65回学術講演会, 26pA02 (2010.11.26) 同上.
- (12)吉田 慧一郎, 西舘 泉, 佐藤 学, “虚血条件下におけるラット脳スライスの内因性光信号イメージング”, Optics & Photonics Japan 2010, 9pP19 (2010.11.8) 中央大学.

[その他]

<http://msatolab.yz.yamagata-u.ac.jp/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐藤 学 (SATO MANABU)
山形大学・大学院理工学研究科・教授
研究者番号: 50226007

(2) 研究分担者

西舘 泉 (NISHIDATE IZUMI)
東京農工大学・大学院生物システム
応用科学府・准教授
研究者番号: 70375319