

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 3 日現在

機関番号：82626

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25560437

研究課題名(和文) 神経活動依存的に変動する脳内乳酸濃度の全脳計測

研究課題名(英文) Realtime measurement of whole brain lactate level during neural activation

研究代表者

高島 一郎 (Takashima, Ichiro)

独立行政法人産業技術総合研究所・ヒューマンライフテクノロジー研究部門・研究グループ長

研究者番号：90357351

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：脳内で産生される乳酸に着目し、脳賦活の指標という観点から、乳酸濃度変動を全脳スケールで経時計測することを試みた。摘出した *in vitro* 全脳標本を利用し、膜電位イメージング法で脳神経活動を捉え、脳静脈/滲出脳脊髄液中の乳酸濃度変動を酵素電極法により同時記録した。この結果、脳賦活化レベルと乳酸産生レベルの間には正の相関が見られること、乳酸濃度の変化量は脳灌流液中のグルコース濃度の影響を受けることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：We investigated the relationship between neural activation and lactate production in the brain. In this study, the isolated whole brain preparation of the guinea pig was used. The brain was perfused through the vertebral artery with a complex saline solution whose glucose concentration was experimentally manipulated. After applying electrical stimulation to the brain, we monitored evoked neural activity by optical imaging technique with a voltage-sensitive dye. During the experiment, changes of lactate level were continuously measured in the exuded fluid from the brain by using an oxygen electrode method. As a result, a positive correlation relationship was found between brain activation and ensuing change in lactate, and the lactate production level depended on the glucose concentration in the perfusate.

研究分野：脳機能イメージング

キーワード：脳活動 乳酸 グルコース 膜電位イメージング

1. 研究開始当初の背景

(1) ヒトの脳は体重に対する比率は 2%ほどであるが、全身のグルコース消費の 25%という極めて高いエネルギー消費を行っている。この事実に対し、脳は大量のグルコースと酸素を使って高負荷で情報処理を行う器官である、という考えが通説であった。しかし、ヒト視覚野での PET 研究(Fox et al., 1988)により、視覚刺激によって脳血流量やグルコース消費は 50% 増加するが、酸素消費は高々 5% しか増加しないことが報告された。脳活動亢進時、脳は酸素を使わずにエネルギーを得ている、というこの結果は、当該分野に大きなインパクトを与えた。その後の研究により、グルコースの大部分は安静時の脳の恒常性維持に使われ、神経細胞が活動し脳が情報処理を行う際のエネルギー源にはグルコースでなく乳酸を使っているらしい、という結果が次々と報告された(Prichard et al., 1991 等)。その脳内乳酸の出所としては、神経細胞と毛細血管を結ぶグリア細胞が、自身に蓄積しているグリコーゲンあるいは血管から取り込んだグルコースを嫌氣的に解糖し、得られた乳酸を神経細胞に供給している、という仮説(ANLS モデル: Astrocyte-Neuron Lactate Shuttle 仮説, Pellerin et al., 1994) が有力視されていた。しかし、ANLS 仮説への反証報告(Fillenz, 2005, Occhipinti et al., 2011) も多く、未だ脳内での乳酸産生現象の実体はあまりよく分かっていなかった。研究開始当初においては、脳内乳酸を高分解能で計測する適当な手段がないことが、当該分野研究を進める上で大きな障害になっていた。

(2) 研究開始当初、全脳摘出標本を用いた実験中に、脳賦活後の脳静脈 / 滲出脳脊髄液中に高濃度の乳酸が検出される現象を確認していた。全脳摘出標本とは、生体から脳のみを取り出し、通常の脳血管循環系を介した方法で脳にエネルギーと酸素を供給し、脳の生理活性を維持できる極めてユニークな脳標本である。脳内乳酸計測の困難さが、関連研究分野の障害であった事を知り、全脳摘出標本を利用すれば容易に乳酸計測が可能であると考えた。予備実験において、単離全脳標本にグルコースを含む人工血液を脳灌流し、電気刺激により脳を賦活化させた前後で、全

脳を循環して滲出した溶液をサンプリングして分析したところ、脳賦活後に高濃度の乳酸が検出されることを確認していた。全脳摘出標本実験系を利用すれば、脳賦活化レベルを制御しつつ、全脳での乳酸産生の時間変動を解析することができる可能性が考えられた。

2. 研究の目的

定常状態の脳が、必要なエネルギーの大部分を好氣的グルコース代謝により得ていることに疑いの余地はない。しかし、脳機能活動亢進時に関しては異論があり、脳は嫌氣的グルコース代謝の産物である「乳酸」をエネルギー基質として好んで積極的に利用しているらしい、という議論が現在まで続いている。そこで本研究は、脳内で産生される乳酸に着目し、脳賦活化の指標という観点から、乳酸を全脳的に経時計測することに挑戦する。全脳摘出標本というユニークな実験系の導入により、脳神経活動と脳内乳酸濃度の同時計測を可能とし、脳活動 - 乳酸応答の関係を詳細に解析する。「脳活動量は脳内で産生された乳酸量を計測すれば知ることができるのだろうか？」この疑問を解決することを本研究の目的とする。

3. 研究の方法

(1) 全脳乳酸変動の連続計測

脳内乳酸の動態を、従来と比べて極めて高効率に解析できる新しい単離全脳実験系を確立する。

(2) 脳温と乳酸産生の関係

脳灌流液の温度を制御することにより、脳温を変化させる操作を行う。脳の温度が上がるとニューロンの自発発火活動も亢進するので、脳のエネルギー要求は高くなると考えられる。脳温を変化させたとき、脳が産生する乳酸量がどう変化するかを明らかにする。

(3) 脳賦活化と乳酸産生の関係

外側嗅索の電気刺激により脳の賦活化を行い、惹起された脳神経活動を膜電位イメージングで捉えながら、脳が産生する乳酸量を計測し、脳賦活化と乳酸変動の関係を明らかにする。

(4) 血糖値と乳酸産生の関係

通常、脳灌流液中のグルコース濃度 15mM で調製を行っているが(高血糖側)、脳灌流液のグルコース濃度を低血糖域まで段階的に下げることにより、脳が産生する乳酸量がどう変化するのかを明らかにする。

4. 研究成果

(1) 脳神経活動とそれに伴う乳酸変化を同時計測できる単離全脳実験系を確立した(図1)。従来は乳酸計測に12時間のオフライン分析を要したが、脳神経活動の膜電位イメージングを行いながら、同時に30秒に1回の時間分解能で乳酸濃度を連続計測することが可能となった。代謝応答の実験系としては十分な時間分解能を達成した。

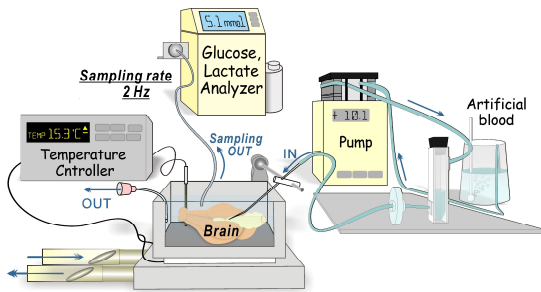


図1 全脳乳酸計測の実験系。動物から全脳を取り出し人工血液を脳灌流する。脳灌流後の溶液を2Hzでサンプリングし、乳酸変動を記録した。

(2) 脳灌流液の温度を制御することにより、脳温を変化させる実験を行った。この結果、脳温を上げると脳の自発的なニューロン発火が増えるにも関わらず、全脳が産生する乳酸量に変化がないという結果が得られた。この実験結果については、脳が乳酸産生量を変化させるのは、情報処理を行う脳機能現象(=あるニューロン集団の同期的発火により、一瞬にして大量のエネルギー需要が発生する状況)時のみであり、脳の恒常性の維持(=安静時の細胞膜電位の維持や、自発発火活動亢進による脳の内部状態の遷移)では乳酸変動は生じない、という可能性を示唆するものと考えられた(図2)。

一方、脳への電気刺激を繰り返して脳賦活化を行うと、全脳が産生する乳酸量が逐次的に増え、脳活動量と乳酸産生量の間に正の相

関が認められるという結果が得られた(図3)。この実験結果は、脳内乳酸計測により脳活動量を推定するという本研究の基礎となるアイデアを支持する重要な結果であると考えられた。

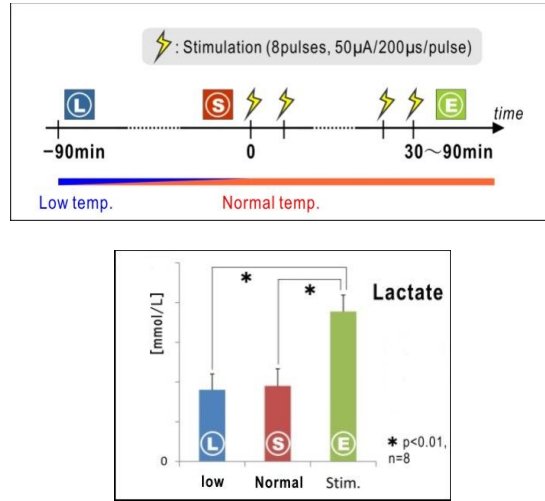


図2 脳温変化と脳賦活化による脳内乳酸産生の関係。上図：実験プロトコル。脳温を低温から平常温に変化させて乳酸濃度を計測(時刻LおよびS)。その後、外側嗅索の電気刺激を繰り返して脳を賦活化させ乳酸濃度を計測(時刻E)。下図：乳酸産生は脳温に依存せず、神経興奮によって亢進する。

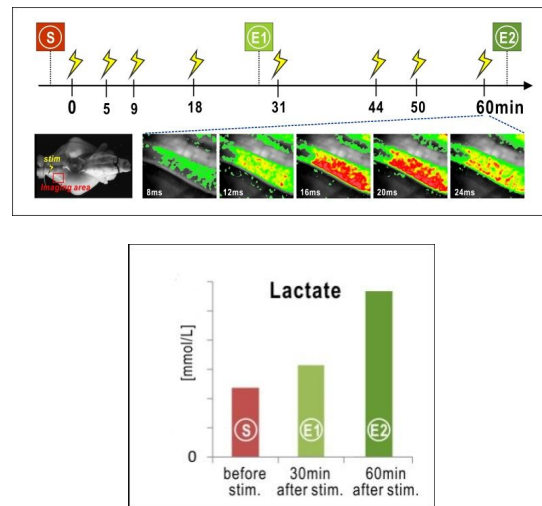


図3 脳賦活化レベルと脳内乳酸産生の関係。上図：実験プロトコル。60分間にわたり外側嗅索の電気刺激を繰り返し、3時刻(S, E1, E2)において乳酸濃度を計測。下図：脳を活動させるほど、より多くの乳酸が産生された。

(3) 脳灌流液中のグルコース濃度を低下させると、乳酸産生が増えることが観測された。これは、グリア細胞が自身に蓄積しているグリコーゲンを嫌氣的に解糖して生じたものと考えられた。実験では 20 分間に及び低血糖状態を維持した。低血糖中、外側嗅索の電気刺激に対する梨状皮質の応答は消失したが、その後、血糖値を基に戻すと、神経応答も復活した。しかし低血糖状態が続いたことで、乳酸値のベースレベルの上昇が観測された。この結果は、脳組織へのダメージが乳酸ベースレベルを引き上げたものと考えられた。一方、低血糖状態を短時間に制限した場合には、一過性に上昇した乳酸濃度がベースラインに戻ることに、また、低血糖状態時に脳電気刺激を行うと、相加的に乳酸濃度が上昇することも確認された。

本研究課題では、脳神経活動と乳酸の全脳計測を同時にリアルタイムで行うための新しい実験系を確立した。その後、本実験系を利用し、(1)脳活動量と乳酸産生量の間には正の相関があること、(2)脳温が乳酸産生に影響しないこと、(3)血糖値を低下させた場合にも脳賦活時と同様の乳酸応答が記録されること、が明らかとなった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表](計4件)

N. Rahman, Y. Watanabe, N. Higo, I. Takashima, Effect of transcranial direct current stimulation on permeability of blood-brain barrier in the rat, 1st Brain Stimulation Conference, 2015年3月2-4日, Singapore

R. Kajiwara, M. Doi, T. Kuwabara, I. Takashima, Experimental system for visualization of olfactory network dynamics, 第14回 LS-BT 合同研究発表会, 2015年2月3-4日, つくば

N. Rahman, K. Nagasaka, N. Kunori, Y. Watanabe, N. Higo, I. Takashima, Effect of transcranial direct current stimulation on the permeability of the rat blood-brain barrier, 第37回 日本神経科学大会, 2014

年9月11-13日, 横浜

I. Takashima, R. Kajiwara, K. Hyodo, Relationship between neural activation and lactate production as assessed with isolated whole brain preparation, 第13回 LS-BT 合同研究発表会, 2014年2月18-19日, つくば

6. 研究組織

(1) 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・人間情報研究部門・システム脳科学研究グループ長

研究者番号: 90357351