

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 15 日現在

機関番号：82406

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25750404

研究課題名(和文) 中枢神経疾患における拡延性脱分極の光イメージングと光制御に関する研究

研究課題名(英文) A study on optical imaging of spreading depolarization and its photobiomodulation in central nervous system disease

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・助教)

研究者番号：20506505

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：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近赤外拡散反射光イメージングを行い、梗塞巣と梗塞周辺脱分極(perinfarct depolarization: PID)を可視化できないか検討を行った。中大脳動脈閉塞後、虚血中心部では散乱が増加し、その周りをPIDの発生を示す散乱変化の波が繰り返し発生した。虚血中心部の散乱増加は梗塞による細胞の形態変化によるものと推察された。さらに同モデルに808 nmレーザー光を低強度照射したところ、PIDの発生回数と梗塞面積に減少傾向が見られた。これらは同光照射によるミトコンドリアのエネルギー産生増大によるものと推察された。

研究成果の概要(英文)：To understand the pathophysiology and to develop a new therapeutic technique for ischemic stroke, we performed near-infrared (NIR) diffuse reflectance imaging for a rat stroke model and examined whether an infarct core and periinfarct depolarization (PID) can be visualized by detecting light-scattering signal. After middle cerebral artery occlusion, light scattering increased in the ischemic core, around which a wave-like scattering change was generated and spread over the cortex repetitively, indicating occurrence of PIDs. The region with increased scattering in the ischemic core was thought to reflect cell morphological change associated with infarction. We also performed 808-nm low-intensity NIR laser irradiation to the rat brain and observed that both total number of the occurrence of PIDs and infarct region tended to decrease. These results might be caused by an increase in mitochondrial energy production by 808-nm NIR laser irradiation.

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 梗塞周辺脱分極 拡延性脱分極 光散乱 低出力光治療

1. 研究開始当初の背景

虚血性脳梗塞は、我が国の死亡原因の上位を占め、たとえ救命できてもその後の後遺症により患者とその家族に大きな負担を強いる。現在急性期に行われている血栓溶解薬 rt-PA (recombinant tissue plasminogen activator) を用いた血流再開による治療は、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残念ながら低い。この血栓溶解療法が、現在承認されている数少ない脳梗塞治療のひとつ（国外では唯一）である。このためさらなる虚血性脳梗塞の病態解明と治療法の開発が求められており、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（イメージング）する技術の確立が不可欠である。

脳が虚血に陥ると、数分で細胞膜のイオンポンプ機能が破綻し、細胞膜を介して大量のイオンの流入が起きる。この現象は虚血性または無酸素性脱分極（ischemic/anoxic depolarization）と呼ばれ、イオンのより戻しに大量のエネルギーを消費し、細胞をエネルギー危機的な状態に陥らせる^{1,2)}。脱分極発生後間もなくエネルギーが回復すれば組織は生存できるが、長く続くと不可逆的壊死（梗塞）に至る。この脱分極は局所に繰り返して発生して梗塞巣の周囲に波のように伝搬する性質があり、梗塞周辺脱分極（peri-infarct depolarization: PID）と呼ばれる²⁾。梗塞周辺領域（ペナンプラ）では組織は血流低下により電気的機能停止状態にあるが、エネルギーが回復すれば生存可能とされる³⁾。ここに PID が多発、伝搬すれば組織のエネルギー破綻が起き、梗塞巣の拡大につながる危険性がある²⁾。そのため脳梗塞の病態観察には、PID と梗塞巣・ペナンプラ（組織の可逆不可逆性）の可視化が重要であり、これには細胞・細胞小器官レベルの形態変化を反映する光散乱信号が有力な指標になると考えられる。

一方、特定波長の可視ないし近赤外光を低強度で組織に照射すると、ミトコンドリアの電子伝達反応が促進されることが知られている⁴⁾。電子伝達系末端酵素であるシトクロム c オキシダーゼ（CcO）は可視～近赤外領域に特徴的な光吸収特性を有している。CcO では O₂ と NO が競合して呼吸鎖における電子伝達を制御しており、CcO が光を吸収すると NO が光解離され、これにより電子伝達が促進され ATP 産生が増大すると考えられている。解離した NO は血管弛緩作用により血流を増大させる。現在までに同光治療法は、頭部外傷や脊髄損傷における神経細胞死抑制、神経再生促進に応用されているが、脱分極の制御・抑制に関する研究はこれまで報告がない。

2. 研究の目的

本研究は、ラット脳梗塞モデルを対象に組織の内因性光散乱信号により梗塞巣、ペナンプラおよび PID の発生と伝搬を可視化

できるか調べることを目的とした。また脳梗塞の新たな治療法として、特定波長の低強度近赤外光照射が PID を制御・抑制できるか、またこれが梗塞領域の縮小に寄与するかを光散乱イメージングと組織学的評価により調べた。

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) ラット脳梗塞モデルの作製

Sprague-Dawley ラット（10 週齢、オス、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 50 mg/kg の腹腔内投与による麻酔下に頭部を固定し、左頭頂骨（頭頂部と側頭部）を露出した。中大脳動脈（middle cerebral artery: MCA）の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 の長方形に開窓し、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。

(2) 近赤外拡散反射光と脳血流の同時イメージング

図 1 に実験装置図を示す。ラット頭部の左半球（左頭頂部および左側頭部、開窓部含む）を対象に、レーザースペックル血流画像装置（OZ-2, オメガウェーブ）を用いて脳血流画像を取得し、同装置の CCD カメラとハロゲンランプ（波長 800±40 nm のバンドパスフィルターと組み合わせて使用）を用いて拡散反射光画像の取得を行った。血流画像用の光源である波長 780 nm の半導体レーザーと、拡散反射光画像用のハロゲンランプの前にそれぞれシャッターを設置し、照明を交互に切り替え、これに同期した画像取得を行った。MCA 閉塞前および閉塞後の 90 分間、脳血流と拡散反射光の同時イメージングを行った。開窓部は脳表を直接、それ以外の領域は経頭蓋的に脳組織を観察した。MCA 閉塞による脳組織の散乱の時空間変化を解析するため、MCA 閉塞後の各時刻の画像から閉塞直後の画像を減算し差分画像を作成した。

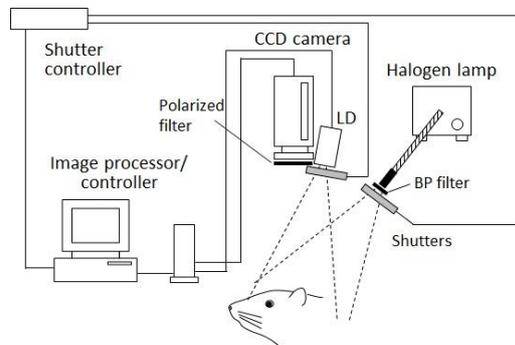


図 1 実験装置図

(3) 低強度近赤外光照射による光治療実験
 麻酔下にラット頭部を固定し、上述した方法により近赤外拡散反射光（光散乱信号）と脳血流の同時イメージングを開始した。続いて MCA 閉塞により梗塞を作製し、その直後から左半球全体に直径 14 mm で波長 808 nm の半導体レーザー光を平均パワー密度 160 mW/cm²、パルス繰り返し周波数 100 Hz で 2 分間照射した。照射終了後 90 分間イメージングを行い PID の発生と脳血流の観察を行った。翌日 TTC 染色（後述）により梗塞領域の評価を行った。808 nm 近赤外光照射群と非照射群で PID の発生回数、脳血流の変化、梗塞面積に違いが見られるか比較を行った。

(4) 梗塞領域の評価

TTC (2,3,5-triphenyltetrazolium chloride) 染色法により梗塞領域を評価した。同染色法はミトコンドリアの活性を指標とする。正常組織のミトコンドリアは TTC を脂溶性物質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。37°C の 2%TTC 溶液に摘出した脳を浸漬し、30 分後に組織の観察を行った。

4. 研究成果

(1) PID と梗塞巣・ペナンプラの近赤外拡散反射光イメージング

図 2 にラット脳梗塞モデルを対象に行った近赤外拡散反射光イメージング結果の一例を示す。図 2a が近赤外拡散反射光の元画像、図 2b-h が MCA 閉塞後約 12~16 分における差分画像（MCA 閉塞直後の画像で減算）である。これと同じ視野をレーザースペックル血流画像装置で観察した結果を図 3 に示す。MCA 閉塞前の血流画像（図 3a）で Y 字に見える血管が MCA であり、これを閉塞し拡散反射光イメージングを 90 min 行った後の血流画像が図 3b である。破線部が血流遮断領域（虚血中心部）を表している。

MCA を閉塞すると、拡散反射光強度は直後から虚血中心部付近において増加しはじめ（散乱増加）、その辺縁部局所から波状の散乱変化が発生し、虚血中心部の周りを巡回しながら左半球皮質全体に伝搬した（図 2b-h）。この散乱変化の波は繰り返し発生し、図 2b-h は同ラットにおける 2 回目の波状の散乱変化の発生、伝搬を示している。波の発生地点では散乱は減少し（図 2b 矢印）、その後散乱の増加領域が伝搬し、それを追うように散乱減少領域が続いた（図 2c-h）。同ラットでは、この散乱変化の波が 90 min で 10 回発生し、伝搬速度は約 2 mm/min であった。これは一般的な PID の発生回数と伝搬速度に同じであり^{2,5)}、別のラットを対象に行った直流電位の計測結果からも梗塞周辺脱分極（PID）の発生と伝搬を表していることが確認された。他の 3 例のラットについても実験を行った

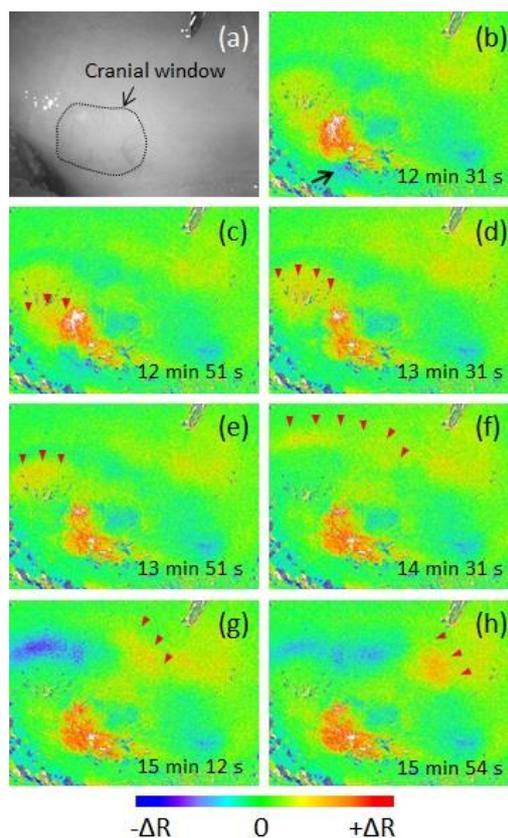


図 2 ラット脳梗塞モデルの近赤外拡散反射光イメージングの結果。(a) 明視野像。左が前頭部側、右が後頭部側である。(b)-(h) 同ラットにおける 2 回目の PID 発生による拡散反射光の変化。時刻は MCA 閉塞終了からの時間、画像は各時刻の拡散反射光画像から MCA 閉塞直後の拡散反射光画像を減算した結果を示す。(b)の矢印は PID の発生地点を、(c)-(h)の矢頭は PID による散乱の波の先頭を指している。

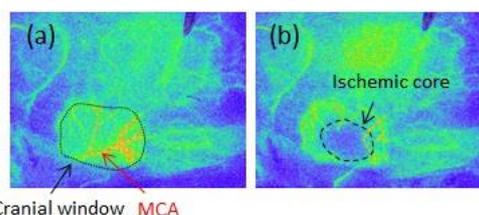


図 3 MCA 閉塞前後のレーザースペックル血流画像。(a) MCA 閉塞前。点線は開窓した領域を示す。(b) MCA 閉塞後。破線部が血流遮断領域を示す。

結果、散乱変化の波の発生回数は 4~10 回、伝搬速度は約 2 mm/min であった。

MCA 閉塞後、虚血中心部付近では散乱の波（PID）の発生に伴い散乱光強度は増加し、かつその面積は拡大する傾向を示した。図 4a は、図 2 と同じラットの同一視野における MCA 閉塞から 90 min 後（10 回の PID 発生後）の拡散反射光の差分画像

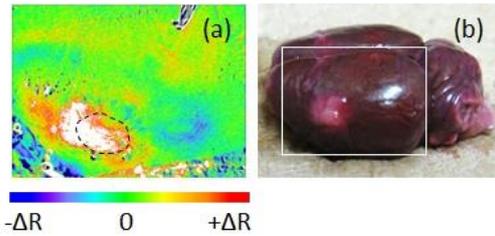


図4 (a) MCA 閉塞から 90 分後の近赤外拡散反射光の差分画像。破線は図 3b と同じ血流遮断領域を示す。(b) TTC 染色により評価した梗塞領域。

を示す。白色部は表示の最大値を越えた領域を表している。散乱増加領域は破線で示す虚血中心部に重なり、この領域は 24 時間後に評価した梗塞領域と概ね一致した (図 4b)。我々は先行研究において、無酸素性脱分極に伴う脳組織の散乱増加が細胞の不可逆的損傷に関係することを示した⁶⁾。今回観察された虚血中心部内の散乱増加は、虚血による細胞の損傷ないしそれに関連する形態変化を捉えたものと推察される。一方、PID に伴う散乱変化の波は、散乱の減少と増加の両方からなり、これらは細胞の膨化による散乱減少 (散乱体密度の減少)、あるいはミトコンドリアの膨化や樹状突起の形態異常 (dendritic beading) による散乱増加 (散乱体体積の増加) によるものと推察された^{7,8)}。また PID は一般にペナンプラで発生することが知られるが、図 2b は PID の発生地点を明確に示している。この結果は、同イメージング法がペナンプラに関する情報も提供しうることを示している。

以上の結果より、ラット脳梗塞モデルを対象とした近赤外拡散反射光イメージングにより、光散乱変化に基づき梗塞巣、梗塞周辺領域 (ペナンプラ)、および梗塞周辺脱分極 (PID) を可視化しうることを示された。そこで次に、同イメージング法を PID のモニタリングに用いて、低強度近赤外光照射により PID が抑制・制御されうるか調べる実験を行った。

(2) 低強度近赤外光照射による光治療実験
ラット脳梗塞モデルを対象に、低出力近赤外レーザー光照射が PID の発生回数、脳血流および梗塞領域に与える影響につき調べた。レーザー光の波長は、ミトコンドリアの電子伝達系末端酵素シトクロム c オキシダーゼの光吸収特性を考慮し 808 nm とした。また光照射条件は先行研究において ATP 産生増大効果が報告されているものに準じた。

808 nm の光照射を行った結果、虚血後 90 min 間の PID の発生回数は非照射群で 7.9 ± 3.9 回 (平均 \pm SD, $n=8$)、最大 15 回であったのに対し、光照射群では 5.2 ± 1.9 回 ($n=6$)、最大 8 回と低下し、統計学的有

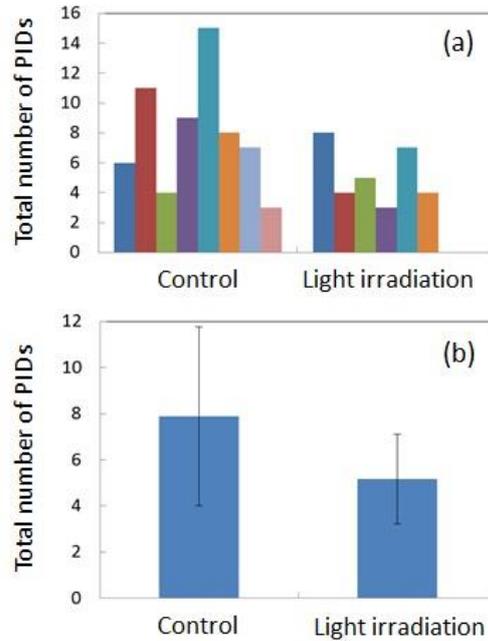


図5 非照射群 (コントロール) と照射群での PID の発生回数の比較。(a) ラット毎の PID 発生回数。(b) 平均 \pm SD。

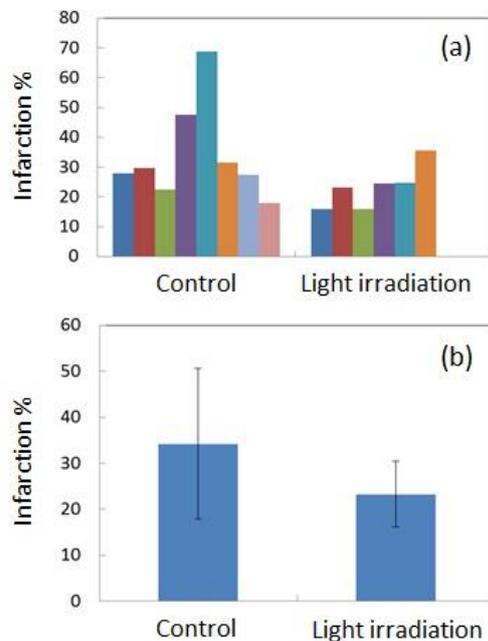


図6 非照射群 (コントロール) と照射群での梗塞面積率の比較。(a) ラット毎の梗塞面積率。(b) 平均 \pm SD。

意差は見られなかったものの PID の抑制傾向が観測された (図 5)。一方、光照射前後の脳血流画像について比較したところ、光照射群で血流増大を示す結果にはならなかったが、梗塞領域について解析した結果、非照射群では左半球全体に占める梗塞面積

の割合が $34 \pm 16\%$ (平均 \pm SD, $n=8$) であるのに対し, 光照射群では $23 \pm 7\%$ ($n=6$) となり, 統計学的有意差は見られなかったものの光照射群で梗塞の縮小傾向が見られた (図 6)。これらの結果は, 低出力近赤外光照射が, 梗塞周辺脱分極の抑制と梗塞縮小に一定の効果を有することを示唆するものと考えられる。

脱分極の抑制と梗塞縮小効果の機序には, シトクロム c オキシダーゼの光励起による電子伝達反応の促進および ATP 産生増大が考えられる。今後より最適な光照射のタイミングや照射部位を検討することにより, より高い光治療効果が得られると期待される。特に光照射のタイミングに関しては, PID の発生をリアルタイムにモニタリングし, これに合わせて光照射を行うことが重要と考えられ, 今後さらなる検討を進める計画である。拡張性脱分極は, 脳梗塞に限らず近年頭部外傷, くも膜下出血, てんかん, 片頭痛等の様々な中枢神経疾患の病態との関わりが注目されている。同光治療法により脱分極の制御が可能になれば, これらの重要な疾患の新たな治療法の選択肢にもなりうるものと期待される。

<引用文献>

- 1) K. A. Hossmann: Viability thresholds and the penumbra of focal ischemia. *Ann. Neurol.*, 36: 557-565, 1994.
- 2) K. A. Hossmann: Periinfarct depolarizations. *Cerebrovasc. Brain Metab. Rev.*, 8: 195-208, 1996.
- 3) P. Ramos-Cabrer, F. Campos, T. Sobrino, J. Castillo: Targeting the ischemic penumbra. *Stroke*, 42: S7-11, 2011.
- 4) M. R. Hamblin, T. N. Demidova: Mechanisms of low level light therapy. *Proc. SPIE*, 6140: 642802, 2006.
- 5) M. Nedergaard, J. Astrup: Infarct rim: effect of hyperglycemia on direct current potential and [14 C]2-deoxyglucose phosphorylation. *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, 6: 607-615, 2012.
- 6) S. Kawauchi, I. Nishidate, Y. Uozumi, H. Nawashiro, H. Ashida, S. Sato: Diffuse light reflectance signals as potential indicators of loss of viability in brain tissue due to hypoxia: charge-coupled-device-based imaging and fiber-based measurement. *J. Biomed. Opt.*, 18: 15003 (13 pages), 2013.
- 7) N. Zhou, G. R. Gordon, D. Feighan, B. A. MacVicar: Transient swelling, acidification, and mitochondrial depolarization occurs in neurons but not astrocytes during spreading depression. *Cereb. Cortex*, 20:

2614-2624, 2010.

- 8) P. G. Aitken, D. Fayuk, G. G. Somjen, D. A. Turner: Use of intrinsic optical signals to monitor physiological changes in brain tissue slices. *Methods*, 18: 91-103, 1999.

5. 主な発表論文等

【雑誌論文】(計 2 件)

- ① 川内聡子, 西舘泉, 苗代弘, 佐藤俊一, ラット脳梗塞モデルにおける梗塞巣および梗塞周辺脱分極の近赤外拡散反射光イメージング, 日本レーザー医学会誌, 査読有, 35 巻, 2014 年, pp. 125-131.
- ② S. Kawauchi, I. Nishidate, H. Nawashiro, S. Sato, Near-infrared diffuse reflectance imaging of infarct core and peri-infarct depolarization in a rat middle cerebral artery occlusion model, *Proc. SPIE*, 査読有, 8928, 2014, pp. 89280K (6 pages).

【学会発表】(計 6 件)

- ① S. Kawauchi, I. Nishidate, H. Nawashiro, S. Sato, Combined imaging of near-infrared diffuse reflectance and cerebral blood flow for a rat stroke model: progression monitoring and differentiation of the lesions, The 5th Asian and Pacific-Rim Symposium on Biophotonics, 2015.4.23, Pacifico Yokohama (Kanagawa, Yokohama).
- ② S. Kawauchi, I. Nishidate, H. Nawashiro, S. Sato, Simultaneous imaging of near-infrared diffuse reflectance and blood flow for a rat stroke model: pathophysiology analysis using light scattering signals, SPIE Photonics West BiOS 2015, 2015.2.1, San Francisco (United States).
- ③ 川内聡子, 佐藤俊一, 西舘泉, 苗代弘, 竹村俊哉, ラット脳梗塞モデルを用いた近赤外拡散反射光と脳血流の同時イメージング: 光散乱信号の有用性, 第 35 回日本レーザー医学会総会, 京王プラザホテル (東京).
- ④ S. Kawauchi, I. Nishidate, H. Nawashiro, S. Sato, Near-infrared diffuse reflectance imaging of infarct core and peri-infarct depolarization in a rat middle cerebral artery occlusion model, SPIE Photonics West BiOS 2014, 2014.2.2, San Francisco (United States).
- ⑤ 川内聡子, 西舘泉, 苗代弘, 佐藤俊一, ラット局所脳梗塞モデルにおける梗塞巣および梗塞周辺脱分極の近赤外拡散

反射光イメージング, 第34回日本レーザ医学学会総会, 2013.9.17, 国立がん研究センター(東京).

- ⑥ S. Kawauchi, I. Nishidate, H. Nawashiro, S. Sato, Diffuse-reflectance imaging of peri-infarct depolarization in a rat middle cerebral artery occlusion model, JSAP-OSA Joint Symposia 2013 (The 74th JSAP Autumn Meeting 2013), 2013.9.17, Doshisha University (Kyoto, Kyotanabe).

[図書] (なし)

[産業財産権] (なし)

[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・
情報システム研究部門・助教
研究者番号: 20506505

(2) 研究協力者

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