

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 4 月 14 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26293345

研究課題名(和文) 脳表のNADH自家蛍光を用いた脳虚血監視モニターの開発

研究課題名(英文) Development of energy monito for cerebral cortex using NADH fluorescence

研究代表者

武田 吉正 (Takeda, Yoshimasa)

岡山大学・大学病院・准教授

研究者番号：30294466

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 7,100,000円

研究成果の概要(和文)：NADH蛍光の測定ではコントロール画像に対する変化率を求めることでエネルギー状態を画像化しています。そのため、カメラが振動したり、被写体が移動したりすると変化率が求められなくなる弱点がありました。そこで、画像マッチング技術を用い、イメージをコントロール画像に追従させ、継続的に観察できるシステムを制作しました。この画像マッチング技術は画像を局所特徴量の画像に置き換え、統計的にパターンマッチングを行っています。

研究成果の概要(英文)：To visualize the changes in NADH fluorescence, the signal intensities of NADH fluorescence were divided by those in a control image and were shown in 256-gradation gray scale. Therefore, any movements in the camera and the subjects strongly diminish the quality of the image. In the present study, we used image matching method. This method replaces the original image to the image showing a local feature and executes the pattern matching with use of statistical technique.

研究分野：脳虚血時のエネルギー代謝とその治療

キーワード：脳虚血 ミトコンドリア モニター

1. 研究開始当初の背景

脳神経外科の手術では出血を防ぐため一時的に脳動脈を遮断することがあります。例えば、もやもや病という病気が脳の動脈が細くなり脳の血流不足のために一時的な手足の麻痺や言葉の障害を呈することがあります。治療しないと細い血管に多量の血液が流れるため血管が切れて頭蓋内出血を起こすことがあります。このもやもや病は日本人に比較的多く(10万人あたり6-10人)治療として中大脳動脈 浅側頭動脈吻合術が行われています。しかし、吻合中は出血を防ぐため中大脳動脈を閉塞して手術が行われます。そのため、手術時間が長くなると脳梗塞を発症する危険性が否定できません。特にもやもや病は側副血行が乏しく、その上血管が細いため吻合に長時間(45分程度)を要します。この血流遮断を安全に行うには脳のエネルギー状態をモニタリングする必要がありますと考えられます。

従来技術としては脳波、脳誘発電位、経頭蓋酸素飽和度が使用されてきました。しかしどのモニターも脳の機能や酸素飽和度を観察しており、脳がエネルギー不足に陥っているかどうかを判断することができません。そのため、本当に安全な血流遮断時間を求めることができません。

2. 研究の目的

脳表のエネルギー状態を非侵襲的に観察できるモニターが存在すればもっと安全に手術を行うことが可能になります。

- (1) 手術中に脳のエネルギー障害が検出されたら、血圧を上昇させることで側副血行を増加させたり、鎮静剤投与や脳冷却でエネルギー消費を低下させたりする事で患者の脳を保護することが可能です。
- (2) 手術中に脳のエネルギー障害が検出されなかったら、手術をしている脳神経外科医は安心して手術に集中できます。

本研究の目的は脳表のエネルギー状態を観察するモニターを開発する事にあります。その方法として NADH (Nicotinamide adenine dinucleotide: ニコチアミド・アデニン・ジヌレオチド) の蛍光を用います。神経細胞はミトコンドリアでエネルギーを産生しています。正常な状態ではミトコンドリアで酸素と NADH が結合しエネルギーを産生されます。NADH はミトコンドリア TCA サイクルで産生され、細胞内に存在する物質の中で最も多量に存在する分子です。動脈が遮断されると酸素供給が不足しエネルギー障害に陥ります。このとき NADH が蓄積します。これまでの研究で、脳のエネルギーが失われると、NADH 蛍光強度が30%以上増加することがわかっています。本研究はこの性質を利用し NADH 蛍光で脳のエネルギー障害部位を発光させ、脳神経外科手術の安全

性を高めることを目的にしています。

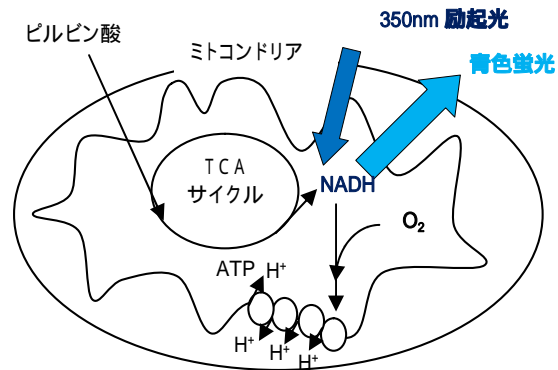


図1. ミトコンドリアではグルコースの代謝産物であるピルビン酸を原料としてエネルギー(ATP)を産生しています。ミトコンドリアはピルビン酸をミトコンドリア内(TCA サイクル)で分解し、NADH を大量に産生します。NADH は酸素と結合(燃焼)し、そのエネルギーで水素イオン(H⁺)を外にくみ出します。くみ出された水素イオンがミトコンドリア内に流入するエネルギーを使用してATPが産生されます。動脈が遮断されると最初に酸素が不足し NADH が燃焼できなくなり、蓄積します。NADH の蓄積は燃焼不良を示しており、神経細胞のエネルギー障害の指標になります。

従来の技術では血流遮断によるエネルギー障害の発生を検出することは不可能でした。本研究は、ミトコンドリア内に集積する内因性物質 NADH が蛍光物質であることに着目し、NADH 蛍光で酸素不足を検出し、神経細胞障害の発生前に対応することを目的にしています。中大脳動脈 浅側頭動脈吻合術は難易度が高い手術ですが、本研究により、脳の酸素需給バランスを持続的にモニターしながら手術を進めることが可能になると考えます。また、NADH 蛍光は侵襲性がありません。その点においても有用性が高いと考えられます。

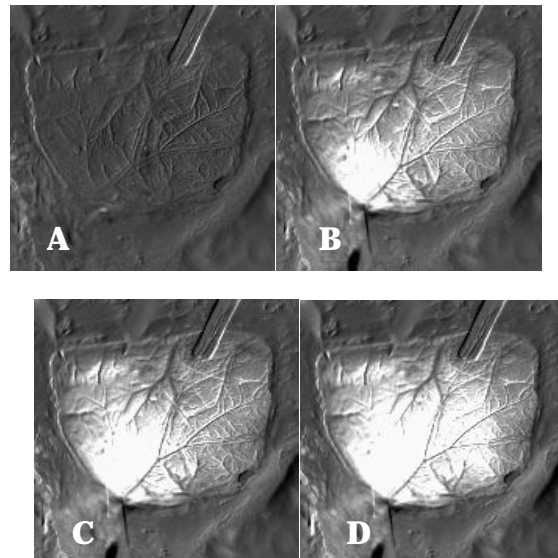


図2．ラットの中大脳動脈の起始部を遮断し脳梗塞を作成したときの NADH 蛍光の変化を示しています(A→B→C→D)。動脈を遮断すると起始部(B左下)から末梢に向かって、NADH 蛍光(白色部分)増加領域が拡大していくことがリアルタイムに観察できます。この画像は、血流遮断前の画像をコントロールデータとし、以降の画像の信号強度の変化率を画像化しています。上記画像は蛍光強度の20%以上の増加を白、20%以上の低下を黒で表し、その間を256階調のグレースケールで表示しています。

3．研究の方法

岡山大学に動物実験計画書を提出し、承認を得た後に研究を施行しました。全身麻酔下にラットの左頭頂側頭骨を切削し、脳表が透けて見える程度に露出しました。右大腿動脈にカテーテルを挿入し血液ガス分析で人工呼吸器を調節し、血圧を持続的にモニターしました。脳表に3.8%の生理食塩水を持続的に灌流し脳温を37℃に維持し、直腸温は加温ウォーターブランケットで37℃にコントロールしました。後頭部より頭蓋内に血液を注入し、人工的にも膜下出血モデルを製作しました。

<ミトコンドリア NADH 蛍光の測定>

ラットの30cm側方に350nm励起光照射用キセノン光源(150W)と電子冷却高感度 CCDカメラを設置しました。脳表の NADH 蛍光(450nm)を15秒毎に撮影し、30μm×30μmの分解能で NADH 蛍光を測定しました。

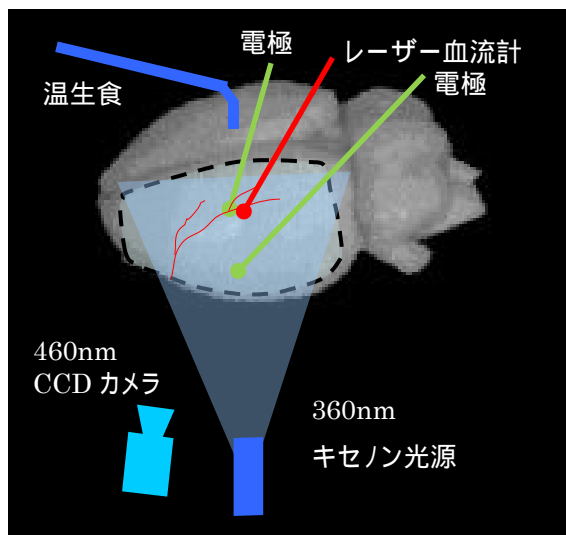


図3．ラットを用いた NADH 蛍光測定実験系

<細胞外電位の測定>

先端径5μmのガラス電極で直流電位(DCポテンシャル)を測定しました。電極の保持にマイクロマニピュレータを使用し、2本のガラス電極をラットの頭頂部と側頭部の脳表

(750μm)に刺入しました。これにより NADH 蛍光上昇部位ではエネルギーが失われ膜電位が消失することを確認しました。

<脳血流量の測定>

オメガウェーブ社製レーザー脳血流計を用い、細胞外電位測定部位の脳血流量を非侵襲的に持続的に計測しました。

<組織学的検討>

一部のラットでは24時間後にホルマリンによる灌流固定を行いパラフィン切片を製作しました。ヘマトキシリン・エオジン染色を行い、脳表から750μmに存在する大型錐体細胞の障害発生率を測定しました。

<ニホンザルを用いた実験>

ニホンザルにケタラルを筋注し麻酔を導入し、気管挿管後にイソフルランで全身麻酔を維持しました。体位は腹臥位とし、全身の温度管理には温風灌流装置を用い、直腸温を37℃に維持しました。開頭後、30cm側方に350nm励起光照射用キセノン光源(150W)と電子冷却高感度 CCDカメラを設置し、脳表の NADH 蛍光(450nm)を100μm×100μmの分解能で60秒毎に撮影しました。ガラス電極とレーザー脳血流計を側頭葉に設置し、NADH 蛍光と膜電位、脳血流量の関係を観察しました。

<ヒューマン・インターフェイスの改善>

現在、使用している画像解析プログラムは研究目的に制作しており、使用前に各種設定を行う必要があります。本研究では臨床で使用することを念頭に、手術中に使用しやすいヒューマン・インターフェイスを作成しました。

4．研究成果

NADH 蛍光の測定ではコントロール画像に対する変化率を求めることでエネルギー状態を画像化しています。そのため、カメラが振動したり、被写体が移動したりすると変化率が求められなくなる弱点がありました。そこで、画像マッチング技術を用い、イメージをコントロール画像に追従させ、継続的に観察できるシステムを制作しました。この画像マッチング技術は画像を局所特徴量の画像に置き換え、統計的にパターンマッチングを行っています。

ラットを用いたくも膜下出血の実験では、脳のエネルギーが失われて回復していく過程を検証しました。その結果、くも膜下出血発症後3分以内に一過性のエネルギー障害が前頭葉より発生し全脳性に伝播していました。エネルギー障害持続時間は1分から10分程度で、持続時間はくも膜下出血の強度に依存していました。エネルギー障害中は脳波活動を認めずエネルギー障害時間が長いほど脳波活動の回復に長時間を要し、エネルギー

ー消失時間が長いと、エネルギー状態が回復しても脳波活動の再開に長時間を要する傾向にありました。また、エネルギー回復後も一過性のエネルギー障害が発生し、脳表を伝播していく様子が観察されました。この一過性のエネルギー障害が伝播してくる方向は様々であり、頭蓋底部より起始していると推定されました。エネルギー障害時間や脳波活動停止時間は組織障害度と強い相関関係にあり、早期の脳障害が予後に強い影響を及ぼすと考えられました。

臨床での使用を目標に、(1)最適な露光時間の決定。(2)励起光と蛍光観察の光学フィルター群の決定。(3)臨床で使用可能なヒューマン・インターフェイスの作成を行いました。

(1)励起光源の照射時間が延長すると光酸化により蛍光強度の低下が観察され、一方、短すぎると呼吸性変動の影響を受けることがわかりました。そのため、二秒程度の照射時間が適当と考えられました。

(2)光学フィルターには透過帯域の狭いバンドパスフィルターを用いる方法と、透過帯域の広いカットオフ型フィルターを用いる方法があります。カットオフ型フィルターを組み合わせることで受光光量は大幅に増加しました。一方、CCDカメラは赤外線領域の感度が高く、その対策が必要であることが判明しました。

(3)ヒューマン・インターフェイスの改善を行った後、ニホンザルを用いて、脳神経外科手術のシミュレーションを施行しました。その結果、手術操作により被写体が移動しても自動的に画像が追従し、良好な解析結果を得ることに成功しました。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1件)

Shimizu T, Hishikawa T, Nishihiro S, Shinji Y, Takasugi Y, Haruma J, Hiramatsu M, Kawase H, Sato S, Mizoue R, Takeda Y, Sugi K, Morimatsu H, Date I.
NADH fluorescence imaging and the histological impact of cortical spreading depolarization during the acute phase of subarachnoid hemorrhage in rats.
J Neurosurg. 2017;27:1-7 査読有り

〔学会発表〕(計 3件)

武田吉正、山根延元、脳のエネルギー状態のイメージング装置 中央西日本メディカル・イノベーション 2017

2017年3月14日(岡山市)

武田吉正、脳低温療法の現状と近未来 日本蘇生学会 2016年11月11日(久留米市)

武田吉正、蘇生中に施行する低体温療法 日本臨床麻酔学会 2016年11月4日(高知市)

〔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〕

ホームページ等 無し

6. 研究組織

(1)研究代表者

武田 吉正 (TAKEDA Yoshimasa)

岡山大学・大学病院・准教授

研究者番号: 30294466

(2)研究分担者

山根 延元 (YAMANE Nobumoto)

岡山大学・自然科学研究科・准教授

研究者番号: 80174762