

令和 5 年 6 月 28 日現在

機関番号：31311

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2022

課題番号：19K12773

研究課題名（和文）脳代謝物クリアランス特性の光学イメージング計測法の開発と応用

研究課題名（英文）Development and application of optical imaging measurement of brain metabolite clearance characteristics

研究代表者

片山 統裕（Katayama, Norihiro）

尚絅学院大学・総合人間科学系・教授

研究者番号：20282030

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、脳のクリアランス特性の時間変化を定量化するために研究代表者らが開発したfunctional integrative optical imaging法（fIOI法）を改良し、時間分解能と信号対雑音比を改善した。本手法を自発的に睡眠・覚醒状態を繰り返すin vivoマウスに適用し睡眠状態依存性を定量化した。その結果、睡眠期は覚醒期に比べてクリアランスが迅速化することが示された。これは、リアルタイムマイクロイオン泳動法を用いた従来の報告と同様の結果である。また、fIOI実験系を数理モデル化し、数値シミュレーションにより、本実験系の性能の限界の一端を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

高齢者にみられる孤発性アルツハイマー病は神経変性疾患であり、その原因として細胞の代謝産物であるアミロイド（A β ）が脳に蓄積し、神経細胞に変性を生じさせることが示唆されており、A β 等を脳から速やかに排出（クリアランス）することが予防や治療において重要であると考えられている。本研究では、研究代表者らが開発した、脳クリアランス特性の経時変化を定量化する機能的統合光学計測法（fIOI）の改良に取り組み、時間分解能と信号対雑音比を向上させることに成功した。本成果は、脳のクリアランス特性の研究に貢献することが期待される。

研究成果の概要（英文）：This study modified the functional integrative optical imaging (fIOI) method developed by the principal investigators to quantify temporal changes in brain clearance characteristics to improve temporal resolution and signal-to-noise ratio. The improved method was applied to in vivo mice that spontaneously repeat sleep-wake states to quantify the sleep state dependence. The results showed that clearance was more rapid during the sleep phase than during the wake phase. This result is similar to previous reports using real-time micro-iontophoresis. The fIOI experimental system was mathematically modeled, and numerical simulations revealed some of the limitations of the performance of this experimental system.

研究分野：生体医工学

キーワード：glymphatic system brain waste clearance diffusion in the brain functional IOI REM sleep optical imaging

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

高齢者にみられる孤発性アルツハイマー病は神経変性疾患であり、その原因として細胞の代謝産物であるアミロイド (A) が脳に蓄積し、神経細胞に変性を生じさせることが示唆されている。そのため、A を脳から速やかに排出 (クリアランス) することがアルツハイマー病の予防や治療において重要である。脳には他の臓器にある「リンパ管」が存在しない。最近になって Glymphatic 系と呼ばれる独特なクリアランス系の概念が提唱され、注目を集めている (Nedergaard et al. Science, 2013)。この概念によれば、脳脊髄液 (CSF) が動脈と脳実質の間隙 (血管周囲腔) を通って脳実質に流れ込み、間質液と交じり合って静脈側の血管周囲腔に流れ出ることにより、脳実質に分散する老廃物を洗い流しているとされる (図 1)。

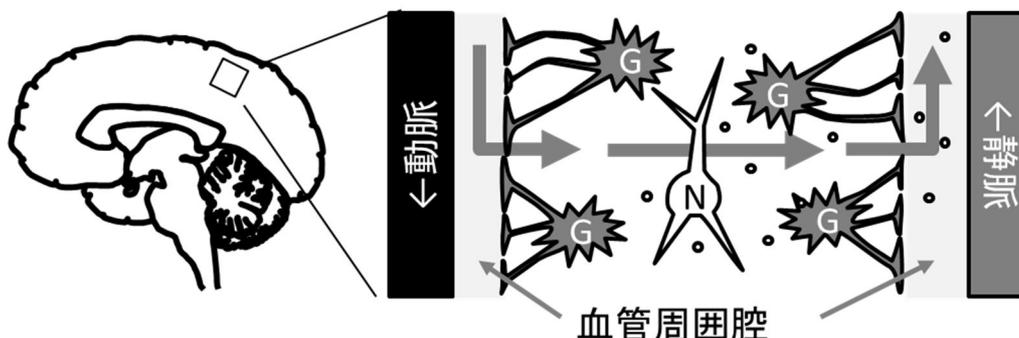


図 1 Glymphatic 系による脳の高速クリアランス機構。N:ニューロン, G: アストログリア。脳脊髄液が動脈血管周囲腔 脳実質 静脈血管周囲腔と流れて老廃物を洗い流す。

脳実質における代謝物質のクリアランスは、分子の拡散特性によって特徴付けられる。その測定方法の一つとして、Integrative Optical Imaging (IOI) 法 (Thorne & Nicholson, PNAS 2006) がある。IOI 法は、蛍光トレーサーを先端に充填した微小ガラス管を脳組織に挿入し、トレーサーを動物の脳局所に注入し、その拡散を蛍光イメージングする方法である。研究代表者らは、脳実質のクリアランス特性の経時変化を計測するために、IOI を約 60 秒の間隔で繰り返し行う手法 (機能的 IOI 法、fIOI) を開発してきた。そして、fIOI 法により、麻酔下のマウス的大脑皮質実質におけるクリアランス特性の時間経過を観察できることが確認された。しかし、麻酔深度を浅くすると、脳血流に由来するノイズが増加するため、このノイズを抑制する方法の開発が必要であった。

脳実質における代謝物濃度の時空間的な変動は、生成、拡散、流れ、吸着などの項からなる偏微分方程式によって表される (Sykova and Nicholson, Physiol. Rev. 2008)。ただし、実験データの解析では、便宜上、拡散以外の項を無視できると仮定されてきた。しかし、これまで無視されてきた bulk flow の項は、Glymphatic 系によって生じる間質液の流れに対応する可能性があり、睡眠・覚醒の状態によって大きく変化する可能性が示唆されている。一方、Glymphatic 系の活性によって間質液の bulk flow が生じるのかどうかについては、まだ意見が分かれており、明確な結論は出ていない (Sun BL et al., Prog. Neurobiol. 2018, Asgari M et al., Sci. Rep. 2016 など)。これらの問題を解決するためには、bulk flow などのパラメータを拡散定数と同時に推定し評価する必要があると考えられる。

2. 研究の目的

申請者らが開発した機能的 IOI 法 (fIOI 法) を自発的に睡眠・覚醒状態を繰り返す in vivo マウスに適用し、脳クリアランス特性の睡眠状態依存性を定量化する手法を確立することを、本研究の目的とする。これを実現するために、fIOI 法の時間分解能と信号対雑音比の改善、fIOI 法による脳実質クリアランス計測の数理モデル化とシミュレーション解析を行う。

3. 研究の方法

Glymphatic 系が睡眠によってどのように調節されるかを明らかにするためには、脳のクリアランス特性を数 10 秒の時間スケールで定量化する必要がある。研究代表者らは、そのための新しい実験・解析手法を開発してきた。この手法は、Integrative Optical Imaging (IOI) 法 (Thorne

&Nicholson、PNAS 2006) を基にした脳組織の拡散特性の計測法である。fI0I 法では、蛍光トレーサーを先端に充填した微小ガラス管を脳組織に挿入し、トレーサーを動物の脳局所に注入してその拡散を蛍光イメージングする。研究代表者らは、fI0I を約 60 秒間隔で繰り返し実施することによって、脳実質のクリアランス特性の時間経過を計測できることを示し、この手法を機能的 fI0I 法 (fI0I) と名付けた。さらに、頭蓋骨の観察窓の上に柔軟な透明樹脂シート (PDMS) を接着固定する手法 (PDMS 法、Hao et al., Sci. Rep. 2016) を導入した。これにより、脳圧が安定した状態で計測を行うことが可能となる。

本研究では、fI0I 実験系を蛍光トレーサー、光学系、画像収集系、さらに、画像解析方法のすべてのレベルで見直し、時間分解能の向上とノイズの抑圧をはかる。これにより、マウスの睡眠・覚醒サイクルに伴う脳クリアランス特性の変化を明らかにできるだけ性能を得ることを目指す。また、脳実質における分子の拡散の時空間的なダイナミクスを数理モデル化し、コンピュータシミュレーション解析する。これにより、この実験系の特性や性能の限界を明らかにする。

4. 研究成果

(1) 多波長 fI0I 計測のための実験系の開発

本研究では、まず従来の fI0I 法の時間分解能の向上に取り組んだ。マウスの脳のクリアランス特性をレム/ノンレム睡眠期で比較するためには、その周期より十分短い間隔でクリアランス・パラメータをサンプリングする必要がある。そこで、従来法より短時間で脳内分子の拡散特性を計測可能な蛍光トレーサーを探索した。その際、脳血流変動の影響を抑制するための光学系(で説明)に合致する蛍光特性を持つことも条件とした。最終的に、より低分子で高効率の蛍光トレーサーに変更することでサンプリング周期を上げられることを確認した。

無麻酔状態では、活発な自発性脳活動や自律神経活動が生じるため、脳血流変動などに由来する光学的ノイズが発生する。fI0I 法の信号対雑音比を向上させるためにはこのノイズを抑制する必要がある。その対策として、光学ノイズ源の活動を fI0I と同時に計測し、オフラインの信号処理によってノイズをキャンセルする方法を検討した。光学イメージングをマルチスペクトル化し、蛍光トレーサーを変更することで、この問題に対処できることが分かった。複数の LED 光源と照射タイミングをイメージングデバイスと同期させるための制御回路を設計・製作し、イメージングデータを処理して光学ノイズを除去するソフトウェアを開発した。動物実験では、マウスの麻酔濃度を下げて、弱い自発性脳活動が観察される状態でこの実験系を用いた計測試験を行った結果、信号対雑音比が約 20% 向上することが確認された。

(2) fI0I 法の数理モデル化とシミュレーション

グリンパティック系による大脳皮質のクリアランス現象を、細胞外空間における低分子の拡散、間質液流、血管周囲腔への排出などを考慮した反応拡散方程式で記述し、3次元有限差分法を用いた数値シミュレーションモデルを構築した。主要なモデルパラメータは、テトラメチルアンモニウム (TMA) イオンを用いたイオン拡散計測法や統合光学イメージング法 (fI0I) によって計測された大脳皮質の拡散特性に関する先行研究のデータを使用した。本研究では fI0I 法を用いるため、従来の研究では問題にならなかった蛍光トレーサーの細胞外マトリクスへの吸着や細胞外空間の袋小路構造への蓄積の効果も考量する必要がある。この特性を模擬するためのモデル項のパラメータ値に関しては、他のグループによる実験報告が存在しないため、予備実験で得られたデータから概算を見積、シミュレーション結果が実験データに合うようにパラメータ値を調整した。

最近の脳クリアランス系に関する研究では、細胞外空間における老廃物の輸送が間質液の流れによると考えるバルクフロー説(間質液の流れによる輸送)と単純拡散説の間で論争がある。数値シミュレーションを用いてこれらの説を検討した。その結果、間質液流の影響はわずかであり、単純拡散説を支持する結果が得られた。また、間質液流の効果があっても fI0I 法で観測可能な範囲を下回ることがわかった。

(3) 脳クリアランス特性の睡眠・覚醒態依存性解析

動物実験は、手術後十分な時間が経過した回復したマウスで行った。fI0I 法を用いたイメージングと同時に大脳皮質脳波と頸部 EMG を記録した。実験後にこれらの信号を用いて睡眠・覚醒状態を推定し、それぞれの状態における「脳のクリアランスの良さ」を反映していると考えられる蛍光強度の変化を定量化し、比較した。その結果、蛍光強度の減衰は、睡眠状態の方が覚醒状態よりも早い傾向があることが確認された。これは、睡眠状態のほうがより迅速に脳のクリアランスが生じることを示唆し、他の研究グループがリアルタイムイオン泳動法などを用いて報告した結果と一致する。さらに、睡眠状態をノンレム睡眠とレム睡眠にわけてクリアランス特性を比較したが、2つの状態間に明確な差異が確認できなかった。

本手法では、大脳皮質の「健康状態」が重要と考えられるが、Open Skull という難し手術が必要であるため、個体間のよるばらつきが大きかったと考えられた。そのため、大脳皮質の健康状態を反映するパラメータを評価に加えたところ、大脳皮質の健康状態が良い個体では、レム睡

眠期に脳のカリブランスが早くなる傾向が観察された。今後は、より健康な大脳皮質から得られたデータを蓄積することにより、本研究で得た結果の検証を進めていく必要があると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 10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 外川 龍之介、中尾 光之、虫明 元、片山 統裕	4. 巻 60
2. 論文標題 網膜極座標系を用いた大脳皮質網膜地図のモデルベース推定法	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 生体医工学	6. 最初と最後の頁 38 ~ 45
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.11239/jsmbe.60.38	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 Togawa R., Nakao M., Katayama N.	4. 巻 EMBC2021
2. 論文標題 Estimation of Retinotopic Map of Awake Mouse Brain Based upon Retino-Cortical Response Model	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 43rd Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine & Biology Society (EMBC)	6. 最初と最後の頁 4092-4094
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1109/EMBC46164.2021.9630950	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 Choilek Siwalee, Karashima Akihiro, Motoike Ikuko, Katayama Norihiro, Kinoshita Kengo, Nakao Mitsuyuki	4. 巻 19
2. 論文標題 Subjective sleep quality, quantitative sleep features, and their associations dependent on demographic characteristics, habitual sleep/wake patterns, and distinction of weekdays/weekends	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Sleep and Biological Rhythms	6. 最初と最後の頁 369 ~ 381
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s41105-021-00326-9	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 Katsuya Uchida, Kentaro Hasuoka, Toshimitsu Fuse, Kenichi Kobayashi, Takahiro Moriya, Mao Suzuki, Norihiro Katayama, Keiichi Itoi	4. 巻 11
2. 論文標題 Thyroid hormone insufficiency alters the expression of psychiatric disorder-related molecules in the hypothyroid mouse brain during the early postnatal period.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific reports	6. 最初と最後の頁 6723 - 6723
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-86237-8	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 Makoto Osanai, Hideki Miwa, Atsushi Tamura, Satomi Kikuta, Yoshio Iguchi, Yuchio Yanagawa, Kazuto Kobayashi, Norihiro Katayama, Tetsu Tanaka, Hajime Mushiake	4. 巻 1293
2. 論文標題 Multimodal Functional Analysis Platform: 1. Ultrathin Fluorescence Endoscope Imaging System Enables Flexible Functional Brain Imaging.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Advances in experimental medicine and biology	6. 最初と最後の頁 471 - 479
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 Tetsu Tanaka, Norihiro Katayama, Kazuhiro Sakamoto, Makoto Osanai, Hajime Mushiake	4. 巻 1293
2. 論文標題 Multimodal Functional Analysis Platform: 2. Development of Si Opto-Electro Multifunctional Neural Probe with Multiple Optical Waveguides and Embedded Optical Fiber for Optogenetics.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Advances in experimental medicine and biology	6. 最初と最後の頁 481 - 491
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 Norihiro Katayama, Mitsuyuki Nakao, Tetsu Tanaka, Makoto Osanai, Hajime Mushiake	4. 巻 1293
2. 論文標題 Multimodal Functional Analysis Platform: 3. Spherical Treadmill System for Small Animals.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Advances in experimental medicine and biology	6. 最初と最後の頁 493 - 500
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 Hajime Mushiake, Tomokazu Ohshiro, Shin-Ichiro Osawa, Ryosuke Hosaka, Norihiro Katayama, Tetsu Tanaka, Hiromu Yawo, Makoto Osanai	4. 巻 1293
2. 論文標題 Multimodal Functional Analysis Platform: 4. Optogenetics-Induced Oscillatory Activation to Explore Neural Circuits.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Advances in experimental medicine and biology	6. 最初と最後の頁 501 - 509
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 Ryota Amano, Akihiro Karashima, Ikuko Motoike, Norihiro Katayama, Kengo Kinoshita & Mitsuyuki Nakao	4. 巻 18
2. 論文標題 Consistency index of daily activity pattern and its correlations with subjective ratings of QOL	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Sleep and Biological Rhythms volume	6. 最初と最後の頁 297-304
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s41105-020-00271-z	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 Amano R., Karashima A., Motoike I., Katayama N., Kinoshita K., Nakao M.	4. 巻 41
2. 論文標題 Relationship between Dynamics of Physiological Signals and Subjective Quality of Life and Its Lifestyle Dependency	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 2019 41st Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society (EMBC)	6. 最初と最後の頁 546-549
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1109/EMBC.2019.8857083	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 -

[学会発表] 計20件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 佐藤龍之介・外川龍之介・中尾光之・片山統裕
2. 発表標題 マウス行動試験用CAVE型バーチャルリアリティシステムの開発
3. 学会等名 電子情報通信学会 MEとバイオサイバネティックス研究会 (MBE)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 岡 賢太郎・外川龍之介・中尾光之・片山統裕
2. 発表標題 時空間パターン視覚刺激で誘発されるマウス大脳皮質内因性光信号応答の解析
3. 学会等名 電子情報通信学会 MEとバイオサイバネティックス研究会 (MBE)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 一戸陸玖・片山統裕・中尾光之
2. 発表標題 概日リズム制御下における大腸腫瘍発達のコンピュータシミュレーション
3. 学会等名 電子情報通信学会 MEとバイオサイバネティクス研究会 (MBE)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 片山統裕・外川龍之介・中尾光之
2. 発表標題 眼位変動に頑健な視覚野網膜地図のモデルベース推定法
3. 学会等名 第17回 空間認知と運動制御研究会 学術集会 (旧 JAXA ワーキンググループ)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 鈴木真生, 内田克哉, 内田竜生, 中尾光之, 井樋慶一, 片山統裕
2. 発表標題 一過性甲状腺機能低下症マウスの大脳皮質局所脳波解析
3. 学会等名 日本生体医工学会生体信号計測・解釈研究会第63回研究会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 岡野峻也, 外川龍之介, 岡賢太郎, 中尾光之, 片山統裕,
2. 発表標題 In vivo フラビンタンパク蛍光イメージングにおける血液量変動由来ノイズの補正法
3. 学会等名 電子情報通信学会MEとバイオサイバネティクス研究会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 高橋明久, 田中健也, 中尾光之, 片山統裕
2. 発表標題 機能的統合光学イメージング (f10) 法によるマウス脳実質におけるドリフト拡散特性の解析,
3. 学会等名 電子情報通信学会MEとバイオサイバネティクス研究会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 片山統裕, 吉田侑冬, 中尾光之
2. 発表標題 大脳皮質血液量動態の光学計測に基づいた機能コネクティビティ解析
3. 学会等名 第59回日本生体医工学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 片山 統裕, 吉田 侑冬, 中尾 光之
2. 発表標題 内因性光信号イメージングに基づくマウス大脳皮質機能ネットワーク解析
3. 学会等名 第61回生体信号計測・解釈研究会 (日本生体医工学会専門別研究会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中村和浩, 片山統裕, 小山内実, 木下俊文
2. 発表標題 磁性体造影剤を用いた MRI 血管径画像法とその評価
3. 学会等名 第62回日本脳循環代謝学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 鈴木真生, 内田克哉, 内田竜生, 中尾光之, 井樋慶一, 片山統裕
2. 発表標題 一過性甲状腺機能低下症マウスの局所脳波解析
3. 学会等名 第51回東北生理談話会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中村和浩, 片山統裕, 小山内 実, 木下俊文
2. 発表標題 MRI血管径画像法で用いる磁性体造影剤の検討
3. 学会等名 電子情報通信学会MEとバイオサイバネティクス研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 鈴木真生, 内田克哉, 中尾光之, 井樋慶一, 片山統裕
2. 発表標題 メチマゾール誘発一過性甲状腺機能低下症マウスの行動, 脳波, 及び脳血流動態の解析
3. 学会等名 文部科学省新学術領域研究 学術研究支援基盤形成 先端モデル動物支援プラットフォーム 若手支援技術講習会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 外川龍之介, 中尾光之, 片山統裕
2. 発表標題 眼球運動に頑健な網膜地図推定アルゴリズム
3. 学会等名 文部科学省新学術領域研究 学術研究支援基盤形成 先端モデル動物支援プラットフォーム 若手支援技術講習会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ryunosuke Togawa, Mitsuyuki Nakao, Norihiro Katayama
2. 発表標題 Development of a retinotopic map estimation algorithm robust against eye movement
3. 学会等名 Neuro2019 (The 42nd Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society & The 62nd Annual Meeting of the Japanese Society for Neurochemistry)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中村和浩, 小山内実, 稲垣良, 片山統裕, 木下俊文
2. 発表標題 2 光子顕微鏡を用いた血管拡張能の測定
3. 学会等名 第52回日本生体医工学会東北支部大会講演論文集
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

フラビン緑色自家蛍光(GAF)を利用した自発性脳活動の機能イメージング解析 http://www.biomdl.ecei.tohoku.ac.jp/kata/ios1/ 多機能集積化電極等による多次元生理機能解析支援 http://www.biomdl.ecei.tohoku.ac.jp/physio-shien/index.html
--

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	中尾 光之 (Nakao Mitsuyuki) (20172265)	東北大学・情報科学研究科・教授 (11301)	

6. 研究組織（つづき）

	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	若森 実 (Wakamori Minoru) (50222401)	東北大学・歯学研究科・教授 (11301)	
研究分担者	内田 克哉 (Uchida Katsuya) (40344709)	東北大学・情報科学研究科・助教 (11301)	

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