

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 6 月 7 日現在

機関番号：82406

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23700497

研究課題名（和文） 光散乱を用いた脳組織バイアビリティーの診断・イメージング法に関する研究

研究課題名（英文） A study of the method of diagnosing/imaging brain tissue viability using light scattering

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・助教

研究者番号：20506505

研究成果の概要（和文）：脳梗塞等の患者の救済を目的とした新しい非侵襲リアルタイムな脳組織バイアビリティー診断法の開発をめざして、光散乱を用いた光学的手法につき動物実験による有効性の検証を行った。バイアビリティー低下に伴って観測される光散乱変化のメカニズム解明のためその信号源について調べるとともに、散乱の時空間変化と脳組織可逆・不可逆性との関係を明らかにした。また虚血性脳梗塞の増悪因子とされる梗塞周辺脱分極の光散乱イメージングの可能性を検証した。本成果は同疾患の病態解明と治療法開発にも役立つものと期待される。

研究成果の概要（英文）：For the development of non-invasive, real-time diagnostic technique for monitoring brain tissue viability such as in stroke patients, we investigated the validity of a light-scattering-based optical method by animal experiments. We examined signal sources of light-scattering change associated with loss of brain tissue viability, and revealed the relationship between spatiotemporal change in light scattering and reversibility of the brain tissue. We also performed light-scattering imaging of peri-infarct depolarization which can be associated with expansion of infarct area. The results will provide new insight into not only diagnosis but also pathophysiology and new therapeutic approach for the stroke.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,400,000	0	3,400,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：脳神経科学・融合脳計測科学

キーワード：脳形態計測・光脳科学

1. 研究開始当初の背景

(1) 脳は虚血や低酸素に対して極めて脆弱な組織であり、虚血または低酸素になると直ちに機能停止に陥るが、機能が停止しても血流再開等により組織を救済可能な時間帯があることが知られている。しかしながら現在、このクリティカルタイムゾーンを非侵襲的

かつリアルタイムに診断する技術は確立していない。またこの時間帯を過ぎた脳への血流再開はかえって出血性合併症を高率に引き起こし禁忌とされる。そのため、脳神経外科、救命救急の臨床の現場において、非侵襲的かつリアルタイムに脳組織バイアビリティー（組織の可逆・不可逆性）を診断する方

法の確立が強く求められている。

(2) 非侵襲計測が可能な光による脳組織バイアビリティー診断法に関する研究は、ミトコンドリアの電子伝達機構の解明に関わった Chance らが、1980 年代にネコとイヌを用い *in vivo* において cytochrome c oxidase (CcO) の光吸収特性からエネルギー代謝計測を試みたのが有名である。その後複数のグループにより研究が進められたが、組織中で強い光吸収を有するヘモグロビンの影響により信号の解釈が容易でなく、CcO の光吸収を指標とした診断法は今なお開発途上にある。一方研究代表者らは、細胞のエネルギーが細胞・細胞小器官の形態維持にも利用されることに着目し、これらの形態変化を反映する光散乱が脳組織バイアビリティーの有効な指標になりうると考えた。一般に光の散乱は、生体組織中の散乱体である細胞・細胞小器官の形態変化を鋭敏に捉えうる。また生体透過性の高い可視～近赤外の領域では、脳組織の等価光散乱係数は吸収係数よりも 2 桁高いことから、光散乱は血液存在下においても感度の高いバイアビリティーの指標になると期待される。

(3) 研究代表者らはこれまでにラット全脳低酸素モデルを対象に一对の光ファイバーを用いて拡散反射分光を行い、光散乱信号がバイアビリティーの低下に伴い特徴的な三相性変化 (triphase scattering change: TSC) を伴って増大することを見出した。この三相性変化は、ATP の低下にほぼ同期し、激しいイオンの流出入を伴う無酸素性脱分極 (anoxic depolarization: AD, 虚血性脱分極ともいう) に関係したものであることが示された。TSC 開始前に脳の再酸素化を開始するとラットは 100% 生存、TSC 後では 100% 死亡したことから、TSC を上記クリティカルタイムゾーンとみなしうると考えた。しかし TSC の最中に再酸素化を開始した場合、ラットの生存は確率的であり、その原因は解明されていない。上述した AD (anoxic depolarization) は、脳局所に誘起され時間とともに周囲に伝搬する性質があり、また発生後短時間で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に至ることが知られる。したがって光散乱と脳組織バイアビリティーの関係について理解を深めるためには、AD に関連した光散乱の時空間的变化と脳組織の可逆・不可逆性との関係を理解することが重要といえる。

2. 研究の目的

本研究は、光散乱を用いた非侵襲的リアルタイム脳組織バイアビリティーモニタリング法の開発をめざして、動物実験による有効

性検証を行うことを目的とする。具体的には (1) 研究代表者らが先行研究において見出した脳組織バイアビリティーのクリティカルタイムゾーンの指標となりうる三相性光散乱変化 (TSC) のメカニズムを明らかにするため、光散乱の深さ分解計測を行いその信号源について検討を行う。

(2) TSC が発生する時間帯の光散乱信号の時空間変化について調べ、これと組織可逆・不可逆性との関係を明らかにする。

(3) 近年、虚血性脳梗塞において、梗塞層の周辺で発生する拡張性脱分極 (梗塞周辺脱分極, peri-infarct depolarization: PID) が梗塞層拡大の増悪因子となっている可能性が指摘されている。この梗塞周辺脱分極の発生と伝搬を近赤外光散乱イメージングにより経頭蓋骨的に可視化できるか調べる。

3. 研究の方法

(1) 三相性光散乱変化のメカニズムの解明 (深さ分解光散乱計測による信号源の検討)

麻酔下にラット頭部を固定し、一对の光ファイバー (コア径 550 μm) を露出した頭蓋骨表面 (右半球中央) に接触させ、送光用ファイバーに 730 nm 半導体レーザー光を導光し、これを組織に入射させ、組織中を伝搬し頭外に戻ってきた光 (拡散反射光) を受光用ファイバーで検出し、強度変化をポリクロメータで計測した (図 1)。大脳皮質は 6 層からなり、深さによって分布する細胞の種類・形態・機能が異なることが知られている。本研究では、ラット全脳低酸素モデルにおいて観測された三相性光散乱変化 (TSC) の信号源を明らかにするため、ファイバーの中心間隔を 1.0, 2.0, 3.0 mm と変化させ、最大計測深度がそれぞれ 0.5, 1.5, 2.0 mm (計測領域がそれぞれラット大脳皮質の I-III 層, 1-IV ないし V 層, I-V ないし I-VI 層に相当) となるようにして計測を行った。各ファイバー間隔での計測深度は、モンテカルロシミュレーションにより求めた (図 2)。同モデルでは、ラットにマスクを装着し自発呼吸下にて吸入ガスを空気から窒素に変えることにより脳を低酸素にした。体温は $32.0 \pm 0.5^\circ\text{C}$ に維持した。

(2) 光散乱信号の時空間変化と組織可逆・不可逆性の関係についての検討

光散乱信号の時空間変化について調べるため、ラット全脳低酸素モデルを対象に CCD カメラを用いた経頭蓋骨的近赤外拡散反射光イメージングを行った (図 1)。麻酔下にラット頭部を固定し頭蓋骨を露出させ、タングステンランプとフィルターにより得られた近赤外光で頭部を照明し、CCD カメラを用いて反射光イメージングを行い、差分画像により散乱変化を取得した (光散乱イメージング)。照明光の波長は 800 ± 70 nm または

850±70 nm とした。低酸素開始後、異なるタイミングで吸入ガスを窒素から酸素に変えることで再酸素化を行い、光散乱信号の時空間変化とラットの生存率との関係につき調べた。ラットの体温は $32.0 \pm 0.5^\circ\text{C}$ に維持した。

(3) ラット局所脳梗塞モデルにおける梗塞周辺脱分極の近赤外光散乱イメージング

ラット局所脳梗塞モデルを対象に、(2)と同様の方法でラット脳の経頭蓋骨的光散乱イメージングを行った。麻酔下にてラット頭部を固定し、ラット左側頭筋を除去し、側頭骨に直径 3 mm の穴をあけ、中大脳動脈を電気メスにて焼灼し閉塞させた。

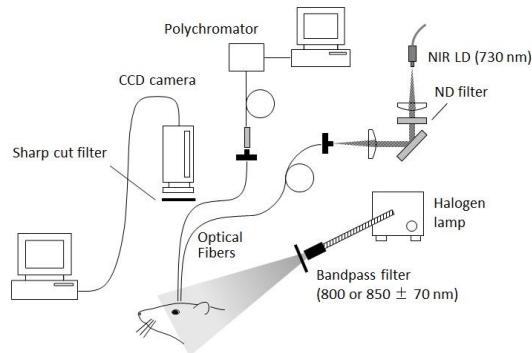


図 1 実験装置図

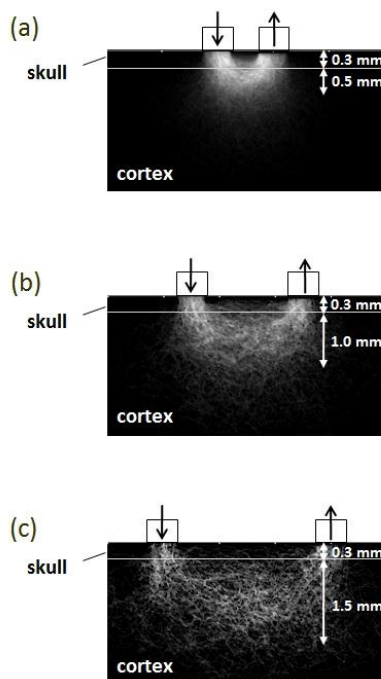


図 2 モンテカルロシミュレーションにより計算した拡散反射光の組織内分布。図はそれぞれファイバーの中心間隔が 1.0 mm (a), 2.0 mm (b), 3.0 mm (c)のときの結果を示す。

4. 研究成果

(1) 三相性光散乱変化のメカニズムの解明 (深さ分解光散乱計測による信号源の検討)

ファイバーの中心間隔を 1.0, 2.0, 3.0 mm としたときの拡散反射光の計測結果を図 3 に示す。先行研究において三相性光散乱変化が観測された低酸素開始から約 3 min (180 s) 後の時間帯に注目して見ると、ファイバー間隔が 1.0 mm の条件では三相性変化が見られないのに対して、ファイバー間隔を 2.0 mm または 3.0 mm とした条件では三相性光散乱変化が観測された。三相性変化はファイバー間隔が大きい条件 (計測深度が大きい条件) においてより顕著であった。この結果は、三相性光散乱変化が脳皮質の比較的深部の領域 (V 層ないし VI 層) の細胞の形態変化に由来していることを示している。さらに同時時間帯において皮質の浅い領域に見られる散乱変化 (単調増加) の開始は、深部に由来する散乱変化の開始よりも有意に遅かった。このことは、皮質深部の光散乱変化が脳組織バイアビリティー低下の早期のアラームとして有用であることを示している。このような散乱変化の深さ依存性は、脳皮質の各層に分布する細胞の種類・形態や虚血・低酸素に対する脆弱性の違いを反映したものと推察された。

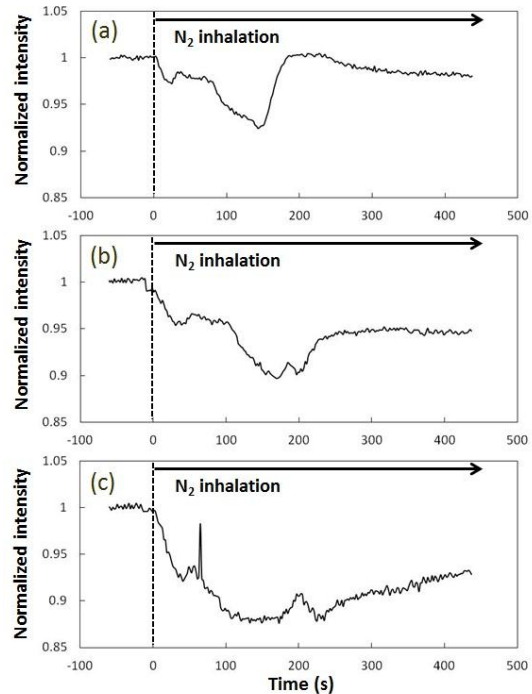


図 3 ラット全脳低酸素モデルに対する拡散反射光計測結果。時刻 $t=0$ にて低酸素 (窒素吸入) を開始した。図はそれぞれファイバーの中心間隔が 1.0 mm (a), 2.0 mm (b), 3.0 mm (c)のときの結果を示す。

(2) 光散乱信号の時空間変化と組織可逆・不可逆性の関係についての検討

図4にラット脳の経頭蓋骨的近赤外光散乱イメージングの結果を示す。窒素吸入により脳を低酸素にすると、約2 min後に両側頭部局所に脱分極波(AD)の発生を示す散乱増加領域が出現した(図4c, t=140 s)。この領域は左右対称に約6 mm/minの速さで正中線に向かって拡がり(図4c-e, t=140-180 s)、約4 min後に皮質全体の散乱が増加した(図4f-g, t=240-540 s)。この散乱増加は主として樹状突起の形態変化によるものと推察される。同様の傾向は計測したすべてのラットで再現した(n=4)。散乱増加領域の発生時間は $t=127 \pm 15$ sであり、皮質全体に拡がる時間は $t=223 \pm 15$ sであった。

このような散乱の時空間変化と組織可逆性との関係を調べるため、散乱変化をモニタリングしながらラットの再酸素化を行った。散乱増加領域が両側頭部局所に出現して間もなく吸入ガスを酸素に切り替えると、散乱増加領域は進行を停止し時間とともに消失した。このときラットは生存した。一方、散乱増加領域が皮質全体に拡がったタイミングで再酸素化した場合は、散乱変化は元に戻らずラットは死亡した。散乱増加領域が異なる次の3つの時刻で再酸素化を行ったところ、

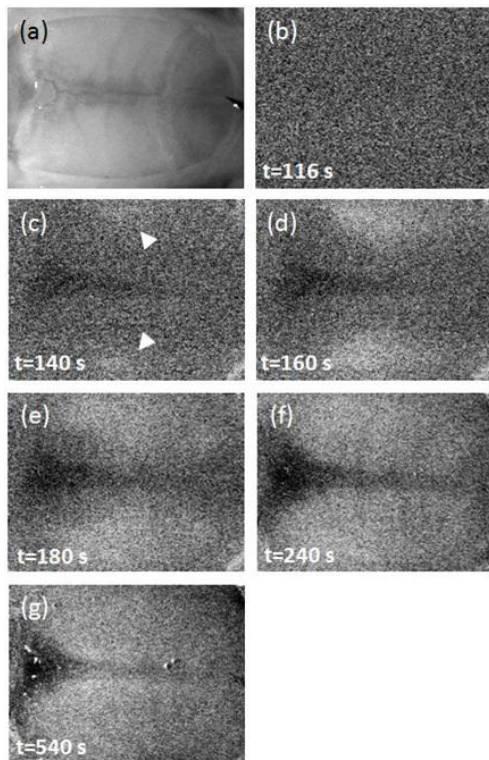


図4 ラット脳の経頭蓋骨的近赤外光散乱イメージングの結果。(a) 明視野像。右が前頭部側、左が後頭部側である。(b)-(g) 無酸素性脱分極(AD)発生前の画像との差分イメージ。t=0で窒素ガス吸入を開始している。白く明るい領域が散乱の増加を表す。

1) 散乱増加領域の出現直後に再酸素化を行ったときラットの生存率は67% (n=6), 2) 散乱増加領域が図4dのように半球中央に達したときに再酸素化を行ったところ生存率は80% (n=5), 3) 散乱増加領域が両半球全体に拡がったときに再酸素化を行ったところ生存率は20% (n=5)であった。この結果は、散乱増加領域の皮質全体に占める割合が大きいと脳組織の可逆性が低下することを示している。

上記(1)および(2)の結果から、脳組織バイアビリティーの非侵襲的かつリアルタイムなモニタリング法として拡散反射光計測は有用であり、特に無酸素性脱分極(ad)に伴う光散乱変化は組織の可逆・不可逆性と密接に関係し組織救済のクリティカルタイムゾーンの検出に有効と考えられた。CCDカメラを用いたイメージング法は、この脱分極に伴う光散乱変化の発生と伝搬の二次元情報を得るのに有力なツールである一方、ファイバー対を用いた計測では深部の計測が可能であり、これによってバイアビリティー低下を早期検出できる可能性が示された。両計測法を組み合わせることで信頼性の高い脳組織バイアビリティーモニタリングが行えると期待される。

(3) ラット局所脳梗塞モデルにおける梗塞周辺脱分極の近赤外光散乱イメージング

図5にラット局所脳梗塞モデルを対象に経頭蓋骨的な光散乱イメージングを行った結果の一例を示す。左中大脳動脈(遠位部)を閉塞すると約1分後、同血管の支配領域である左側頭部の局所に脱分極の発生を示す散乱低下領域が出現し、時間とともに左半球皮質全体に拡大した。これは、脱分極が虚血領域に発生した後、周囲に放射状に伝搬し、正常領域にも拡大した様子を捉えている。この散乱低下は主として脱分極による細胞の膨化によるものと考えられた。このような拡延性脱分極は、一度発生するとイオンのより戻しに大量のエネルギーを消費するため、正常組織ではさほど毒性は高くないが、梗塞層や梗塞周辺のペナンプラ領域では組織にとってダメージとなる。光散乱により可視化された脱分極の波は、血管閉塞から1時間以内に4~10回発生し(n=3)、伝搬速度は平均約2.0 mm/minであり、一般的な梗塞周辺脱分極の文献値と一致した。近赤外光を用いた経頭蓋骨的な光散乱イメージングは、ラット脳の梗塞周辺脱分極の検出に有用であり、脳梗塞の病態解明と治療法開発のための研究にも寄与するものと期待される。

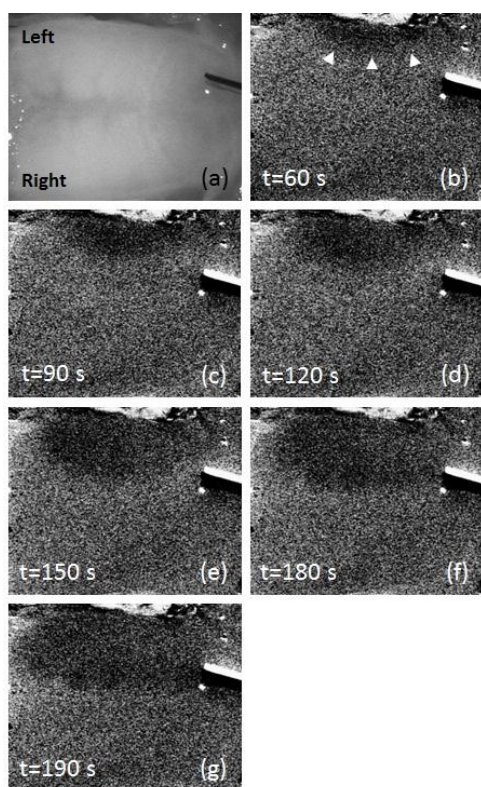


図 5 ラット局所脳梗塞モデルに対する経頭蓋骨的近赤外光散乱イメージングの結果。(a) 明視野像。(b)-(g) 梗塞周辺脱分極(PID)発生前の画像との差分イメージ。t=0 で血管閉塞を完了している。矢頭(b)が脱分極の波を示している。

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)

〔雑誌論文〕(計 2 件)

(1) Satoko Kawauchi, Izumi Nishidate, Yoichi Uozumi, Hiroshi Nawashiro, Hiroshi Ashida, Shunichi 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, *Journal of Biomedical Optics*, 18(1), 015003 (13 pages), 2013, 査読有
DOI: 10.1117/1.JBO.18.1.015003

(2) 川内聡子, 脳組織バイアビリティーの光学的モニタリング, *レーザー研究*, 40 巻, pp. 236-240, 2012, 査読有

〔学会発表〕(計 4 件)

①川内聡子, 脳組織の生命活動指標としての拡散反射光による診断, PST-net 招待講演会, 2013 年 2 月 22 日, 東京

②川内聡子, 西館泉, 苗代弘, 佐藤俊一, 脳組織バイアビリティーの指標としての拡散反射光の時空間変化, 一般社団法人レーザー学会第 437 回研究会(ニューロフォトニクス), 2012 年 12 月 7 日, 東京

③川内聡子, 佐藤俊一, 魚住洋一, 苗代弘, 石原美弥, 菊地真, 脳組織バイアビリティーの可逆性と不可逆性の光イメージング, 第 23 回日本脳循環代謝学会総会, 2011 年 11 月 4 日, 東京

④川内聡子, 佐藤俊一, 魚住洋一, 苗代弘, 石原美弥, 菊地真, ラット脳低酸素モデルにおける光散乱信号の光ファイバーとイメージングによる同時計測, 第 50 回日本生体医工学会大会, 2011 年 4 月 29 日, 東京

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・助教

研究者番号: 20506505