脳組織バイアビリティーの光学的モニタリング

川内 聡子

防衛医科大学 防衛医学研究センター 情報システム研究部門 (〒359-8513 埼玉県所沢市並木3-2)

Optical Monitoring of Brain Tissue Viability

Satoko KAWAUCHI

*Division of Biomedical Information Sciences, National Defense Medical College Research Institute
3-2 Namiki, Tokorozawa, Saitama 359-8513*

(Received January 16, 2012)

Light-scattering signal, which is sensitive to cellular/subcellular structural integrity, is a potential indicator of brain tissue viability, because metabolic energy is used in part to maintain the structure of cells in the brain. First, we examined how light scattering changed during viability loss of the brain without hemoglobins, for which diffuse reflectance measurements were performed for a rat global ischemic brain model made by perfusing the whole blood. After oxygen/glucose deprivation, we observed a unique triphasic scattering change (TSC), which almost coincided with cerebral ATP decrease in the brain. Secondly, we showed that TSC can be detected even in the presence of blood by using NIR light in a rat hypoxic brain model. The brain recovered when oxygen was restored during the TSC. These results suggest the usefulness of light-scattering signals for monitoring brain tissue reversibility after serious brain diseases and injuries including acute ischemic stroke and traumatic brain injury.

Key Words: Light scattering, Brain, Tissue viability, Anoxic depolarization, Diffuse reflectance measurement

1. はじめに

脳は虚血や低酸素に対して極めて脆弱な組織であり短時間で機能停止に陥るが、機能停止は必ずしも組織の不可逆的な変性を意味せず、血流再開などにより組織を救済しうる¹⁾。しかしながら、現在このような組織救済の可否の境界(クリティカルタイムゾーン)をリアルタイムに判定できる技術は無い。我々は、病態に伴う脳組織バイアビリティーの変化を、内因性光学信号(Intrinsic optical signal: IOS)を用いて非侵襲かつリアルタイムに捉える技術の確立をめざしている。IOSは組織・細胞の生理学的、生化学的、形態学的な状態を反映した光吸収・散乱に関わる信号であり、蛍光標識や造影剤を使用することなく真に非侵襲なリアルタイム診断が可能である。

組織のバイアビリティーの源はエネルギー代謝すなわちATP(adenosine triphosphate)の産生であり、ATPは主としてミトコンドリアの内膜にある電子伝達系の4つの酵素を電子が伝達する際に合成される。このATPを*in vivo*で直接計測することは困難であるが、興味深いことに、電子伝達に異常が起きると末端酵素のシトクロムc オキシダーゼ(cytochrome c oxidase: CcO)が²⁾、酸化-還元により光の吸収変化を起こす。CcOの活性中心であるheme

aa₃とCuAはそれぞれ605 nm, 830 nmに吸収ピークを持つが、酸素欠乏等による還元が起こると、前者の吸収は増大、後者の吸収は低下する²⁾。

光による脳組織バイアビリティー計測に関する研究としては、上記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³⁾。その後複数のグループにより研究が進められたが⁴⁻⁸⁾、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。

一方我々は、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¹⁾、これらの形態変化を反映する光の散乱が有効な指標になりうる考えた。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⁹⁾。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¹⁰⁾、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。

以上に基づき、我々は、光散乱信号を脳組織バイアビリティーの指標として利用すべく、これまで動物モデル

を対象とした研究を進めてきた。本稿では、これらについて紹介するとともに、本技術の今後について展望したい。

2. バイアビリティー低下に伴う三相性光散乱変化

我々は、脳組織のバイアビリティーが低下するとき光の散乱はどのように変化するかについて調べるため、ヘモグロビンによる光吸収の影響を除外したラット脳虚血モデル(脱血による酸素とグルコースの供給を停止するモデル)を対象に、上記CcOの光吸収変化と光散乱信号の同時計測を試みた¹¹⁾。麻酔下にラット頭部を固定し、露出させた脳表に一对の光ファイバ(コア径800 μm , 中心間隔2 mm)を接触させ、LEDの可視光(中心波長528 nmおよび621 nm)およびLDの近赤外光(ピーク波長830 nm)を脳組織に入射し、拡散反射光を計測した(Fig. 1)。得られた信号を波長解析し、CcOの酸化-還元に関する等吸収波長である620 nm付近において光散乱変化を、また605 nmおよび830 nmの光吸収変化からそれぞれheme aa₃およびCuAの還元をモニタリングした。

その結果、酸素とグルコースの供給停止から一定時間後、まずheme aa₃の還元が開始し、続いて光散乱信号が三相性の変化(増加-減少-増加)を伴って増大、その途中からCuAの還元が進行するという興味深い現象を観測した(Fig. 2)¹¹⁾。さらにこの三相性光散乱変化(triphasic scattering change: TSC)と脳組織のATP濃度との関係を調べたところ、ATP濃度はTSCの前後で有意に減少し(Fig. 3 (a))、またTSCの開始はATP低下に先立つことがわかった(Fig. 3 (c))¹²⁾。これらの結果は光散乱、すなわち細胞の形態変化がミトコンドリアのエネルギー代謝と密接に関係することを示している。さらに脳の電的機能停止(脳波の停止)はTSCに先立って起き(Fig. 3 (b))、機能停止後しばらく細胞の形態は維持されること、またDCポテンシャル(細胞外直流電位)の計測からTSCは虚血性脱分極によるものであることが示唆された(Fig. 3 (d))¹²⁾。虚血性脱分極は細胞膜内外のイオンが激しく流出する現象で、細胞外直流電位の急激な減少を特徴とし、細胞・細胞小器官の形態変化を伴い、長く続く不可逆的な神経細胞死につながる事が知られている¹³⁾。

Fig. 1 Diagram of the experimental setup for diffuse reflectance measurement of rat brains.¹¹⁾

Fig. 2 Time courses of light scattering signal (diffuse reflectance intensity at 623 nm: R_{623}) and absorption signals related to the reduction of heme aa₃ (R_{605}/R_{623}) and CuA (R_{830}/R_{623}) in cytochrome c oxidase after starting saline infusion at 24 °C.¹¹⁾ Decrease in R_{605}/R_{623} represents increase in the tissue absorption at 605 nm due to reduction of heme aa₃, while increase in R_{830}/R_{623} represents decrease in the tissue absorption at 830 nm due to reduction of CuA.

透過型電子顕微鏡観察の結果、光散乱変化後の組織において樹状突起の膨化やミトコンドリアの変形が見られ、ミトコンドリア内部ではクリステの偏りやマトリックスの収縮が観察された(Fig. 4)¹¹⁾。観測された散乱変化は、このような細胞・細胞小器官レベルの形態変化によるものと推察された。

3. 経頭蓋骨的in vivo光散乱計測

次に上記のTSCがin vivo(血液存在下)においても検出可能かどうか調べるため、ラット脳低酸素モデルを対象に広帯域光源(タングステンランプ、400~1000 nm)を用いて拡散反射光計測を行った¹⁴⁾。ラットにマスクを装着し、吸気ガスを空気から窒素ガスに切り替えることにより、自発呼吸下で脳を低酸素にし、散乱が支配的な近赤外光を用いて組織の散乱変化を検出した。同時にヘモグロビンの等吸収波長である569 nm、脱酸素化ヘモグロビン(deoxy-Hb)の吸収が優位な560 nmにおける信号変化から、それぞれ総ヘモグロビン(total-Hb)、脱酸素化ヘモグロビン(deoxy-Hb)の濃度変化を求めた。モンテカルロシミュレーションにより、上記光ファイバ配置では光計測領域の最大深度は波長560 nmで0.8 mm、波長805 nmで1.5 mmと見積もられたことから、いずれも大脳皮質の情報を取得していると考えられる。

Fig. 5 (a)に、窒素ガス吸入による波長730, 805および830 nmにおける拡散反射光強度の時間変化(時刻 $t=0$ sで規格化)を示す。窒素吸入開始後、805 nmの信号強度は直後にわずかに増加した後に減少し、時刻約150 sにおいて三相性の変化(増加-減少-増加)を示し、その後高いレベルに保たれた。波長730 nmおよび830 nmの信号変化も同時刻において三相性の変化を示しその後増大した。低酸素開始直後(~50 s)の信号変化は急激な低酸素に伴う血液増加による散乱変化を表していると考えられる。

これらと同時計測した脳のヘモダイナミクスに関する

Fig. 3 ATP concentration of cerebral cortex tissue as a function of time after starting oxygen/glucose deprivation by saline infusion.¹²⁾ An asterisk (*) indicates statistical significance ($p < 0.05$). Each plot represents the mean value with standard deviation. Mean starting time points of each phase of the triphasic scattering change (TSC) and its ending time point are shown by four vertical dashed lines: 236 (± 15) s, 273 (± 17) s and 306 (± 15) s for starting time points of the first, second and third phases, respectively, and 348 (± 19) s for the ending time point of the TSC. Frequency histograms of the time points of cessation of EEG activity ($n = 4$) (b), the start of TSC ($n = 9$) (c), and the onset of DC potential change ($n = 5$) (d). The time zone of ATP exhaustion is shown by a gray shadow.

Fig. 4 Transmission electron microscopic images of cortical surface tissues at (a) 50 s and (b) 350 s after starting saline infusion, corresponding to before and after the triphasic scattering change, respectively.¹¹⁾ Image (b) shows remarkably enlarged dendrites (arrowheads) and enlarged, deformed mitochondria with irregular cristae (arrows). Scale bar in each panel represents 1 μ m.

Fig. 5 Time courses of normalized diffuse reflectance intensities at 730, 805 and 830 nm (a), EEG activity (b), normalized diffuse reflectance intensity at 569 nm (R_{569}), indicating relative change in total-Hb concentration (c), and normalized diffuse reflectance intensity at 560 nm (R_{560}) divided by R_{569} , indicating relative change in deoxy-Hb concentration (d). Nitrogen gas inhalation was started at $t = 0$.

IOSの変化をFig. 5 (c)と(d)に示す。(c)はtotal-Hb濃度変化を表す信号(信号の減少がtotal-Hbの増加を表す)。(d)はdeoxy-Hb濃度変化を表す信号(信号の減少がdeoxy-Hbの増加を表す)である。窒素吸入開始後、ヘモグロビンの脱酸素化は急激に進行し、約 $t = 40$ sではほぼ一定になると(Fig. 5 (d))、続いてtotal-Hb(血流量)が急激に増加し(Fig. 5 (d))、約 $t = 120$ sをピークに減少に転じた。この血流量の変化は、急激な低酸素に反応した血流増加とそれに続く血流低下を表している。上述した近赤外の拡散反射光強度の三相性変化(Fig. 5 (a))は、この血流増加のピークを過ぎた時間帯に観察され、脳組織内のヘモグロビンの脱酸素化から約110 s後(Fig. 5 (d))、EEGの消失すなわち脳の電気生理学的機能停止(脳波の平坦化)から約60 s後に開始した(Fig. 5 (b))。これらの結果は実験を行った全12匹のラットで再現して見られ、三相性変化の開始時間は 128 ± 14 s、開始から終了までの時間は 64 ± 10 sであった¹⁴⁾。

三相性変化の各相の信号変化率の波長依存性を調べたところ、いずれにおいても波長650-850 nmの領域では波長依存性が小さかったことから、近赤外の信号変化は主

として散乱変化由来であることが示された¹⁴⁾。すなわち、我々が脱血モデルで観測した酸素とグルコースの供給停止後の三相性光散乱変化(TSC)(Fig. 2)が、血液存在下においても観測できることが確認できた。この結果に基づき、さらに我々は光散乱信号が脳組織の可逆・不可逆性とのように関係するか調べるため、自発呼吸によるラット脳の再酸素化を試み、光散乱変化と再酸素化によるラット救済の可否との関係につき調べた¹⁴⁾。

4. 光散乱信号と脳組織可逆・不可逆性の関係

上述したラット脳低酸素モデルで観測された三相性光散乱変化(TSC)は、脱血モデルで観測されたのと同様に虚血性脱分極によるものと推察される。第一相の散乱増大は、脱分極に伴う細胞内外のイオンの流出入によるもので、このときまだATPの低下は開始していないと考えられる¹²⁾。それに続く第二相の散乱減少は、イオンのより戻しによるものと考えられるが、このプロセスは大量のエネルギーを消費するため¹⁵⁾、ATPは急減し細胞膜の Na^+/K^+ ポンプが破綻、これにより再びイオンの移動が起き散乱が増大した(第三相)と推察される。これより我々は、少なくとも第二相までは細胞は可逆的な状態にあると予想した。各相で再酸素化したラットの生存率をFig. 6に示す。TSC開始前に再酸素化したラットの生存率は100%($n=8$, n は対象ラットの総数)であり、第一相、第二相、第三相における生存率は、それぞれ43%($n=14$)、10%($n=10$)、20%($n=10$)、TSC後に再酸素化したラットの生存率は0%($n=8$)であった。第一相から第三相の間、ラットの生死は確率的であり¹⁴⁾、TSCが脳組織救済のためのクリティカルタイムゾーンとなることが示された。このことは光散乱信号が脳組織バイアビリティーの有効な指標となりうることを示唆している。

TSCの間、ラットの生存が確率的であり、また予想に反して第三相でもラットが生存したのは、散乱変化の原因と考えられる虚血性脱分極が脳皮質の局所に発生し不均一に広がるため¹⁶⁾、光計測の位置により散乱変化開始時間が変化することが影響している可能性がある。同モデルを対象にCCDカメラを用いて虚血性脱分極の光散乱イメージングを試みたところ、脱分極に由来

Fig. 6 Survival rates of rats by reoxygenation before, during, and after the triphasic scattering change.

する光散乱の波は再現性よく両側頭部局所に始まり、時間とともに脳全体に伝播・拡大することがわかった(Fig. 7)¹⁷⁾。また本実験において救済できなかったラットでは、いずれも酸素再投与後に脳のヘモダイナミクスの回復が得られなかった。これには、TSCの原因と考えられる虚血性脱分極が、血管虚脱や血管収縮を伴う現象であることが関係している可能性がある¹⁸⁾。今後、光散乱変化の時空間的な拡がりや血管の健全性および組織の可逆・不可逆性との関係につき明らかにし、臨床応用を視野に研究を進める計画である。

5. おわりに

本研究は、ラット全脳虚血モデル(脱血モデル)において観測されたバイアビリティー低下に伴う三相性光散乱変化が、脳組織のATP濃度の低下とほぼ同期すること、またその散乱変化は虚血性脱分極によるものであることを示した。そして*in vivo*におけるラット脳低酸素モデルを用いた多波長拡散反射計測により、このような光散乱変化が近赤外光を用いることにより血液の存在する条件においても観測可能なことを明らかにした。さらに再酸素化実験により、三相性光散乱変化は組織救済のためのクリティカルタイムゾーンとなりうることが示唆された。今後この散乱変化のメカニズムと組織の可逆・不可逆性との関係の詳細を明らかにすることで、本光散乱計

Fig. 7 NIR reflectance images of the rat brain before (a) and after nitrogen gas inhalation started at $t=0$ s (b-g).¹⁷⁾ (b-g) Difference images (after minus before). Arrowheads in (c) indicate regions of scattering wave generation.

測による脳組織バイアビリティー診断技術を確立したいと考えている。また光散乱を用いた診断法は、広く脱分極のモニタリングへの応用が期待される。各種病態に起因する激しい脱分極波の発生は大量のエネルギーを消費するため組織に有害である。このような脱分極波の重要例として、虚血性脳梗塞の治療標的として注目される梗塞層周囲のペナンプラ領域で起きる脱分極(Peri-infarct depolarizations: PIDs), 頭部外傷およびクモ膜下出血において関与が指摘される拡延性脱分極(spreading depolarization)等がある¹⁹⁻²²⁾。これらを対象とした光散乱イメージングは、脳循環代謝の病態解明にも重要な役割を果たすものと期待される。

謝 辞

本研究は、防衛医科大学校情報システム研究部門 佐藤 俊一博士、同脳神経外科学講座 苗代 弘博士と共同で行われたものである。また前所属の同医用工学講座 石原 美弥博士、菊地 眞博士には多くのご支援をいただいた。本研究の一部は(財)福田記念医療技術振興財団、(財)興和生命科学振興財団の研究助成を得て実施された。関係各位に深く感謝の意を表します。

参考文献

- 1) K. A. Hossmann: Ann. Neurol. **36** (1994) 557.
- 2) D. C. Wharton and Q. H. Gibson: in *Biochemistry of copper* ed. J. Peisach (Academic Press, New York, 1966) p.235.
- 3) M. Tamura, O. Hazeki, S. Nioka, B. Chance, and D. S. Smith: Adv. Exp. Med. Biol. **222** (1988) 359.
- 4) M. Tsuji, H. Naruse, J. Volpe, and D. Holtzman: Pediatr. Res. **37** (1995) 253.
- 5) G. Nollert, T. Shin'oka, and R. A. Jonas: Thorac. Cardiovasc. Surg. **46** (1998) 167.
- 6) C. E. Cooper, M. Cope, R. Springett, P. N. Amess, J. Penrice, L. Tysczuk, S. Punwani, R. Ordridge, J. Wyatt, and D. T. Delpy: J. Cereb. Blood Flow Metab. **19** (1999) 27.
- 7) Y. Kakihana, A. Matsunaga, K. Tobo, S. Isowaki, M. Kawakami, I. Tsuneyoshi, Y. Kanmura, and M. Tamura: Eur. J. Cardiothorac. Surg. **21** (2002) 434.
- 8) I. Tachtsidis, M. Tisdall, T. S. Leung, C. E. Cooper, D. T. Delpy, M. Smith, and C. E. Elwell: Physiol. Meas. **28** (2007) 199.
- 9) J. R. Mourant and I. J. Biji: in *Biomedical Photonics Handbook* ed. T. Vo-Dinh (CRC Press, Boca Raton, 2003) (Chap. 29.)
- 10) P. van der Zee, M. Essenpreis, and D. T. Delpy: Proc. SPIE **1888** (1993) 454.
- 11) S. Kawauchi, S. Sato, H. Ooigawa, H. Nawashiro, M. Ishihara, and M. Kikuchi: Appl. Opt. **47** (2008) 4164.
- 12) S. Kawauchi, S. Sato, H. Ooigawa, H. Nawashiro, M. Ishihara, and M. Kikuchi: Neurosci. Lett. **459** (2009) 152.
- 13) M. Balestrino: J. Neurosci. Methods **59** (1995) 99.
- 14) S. Kawauchi, S. Sato, Y. Uozumi, H. Nawashiro, M. Ishihara, and M. Kikuchi: J. Biomed. Opt. **16** (2011) 027002.
- 15) T. Takano, G. F. Tian, W. Peng, N. Lou, D. Lovatt, A. J. Hansen, K. A. Kasischke, and M. Nedergaard: Nat. Neurosci. **10** (2007) 754.
- 16) C. R. Jarvis, T. R. Anderson, and R. D. Andrew: Cereb. Cortex **11** (2001) 249.
- 17) S. Kawauchi, S. Sato, Y. Uozumi, H. Nawashiro, M. Ishihara, and M. Kikuchi: Proc. SPIE **7907** (2011) 79070M.
- 18) H. K. Shin, A. K. Dunn, P. B. Jones, D. A. Boas, M. A. Moskowitz, and C. Ayata: J. Cereb. Blood Flow Metab. **26** (2006) 1018.
- 19) C. Dohmen, O. W. Sakowitz, M. Fabricius, B. Bosche, T. Reithmeier, R. I. Ernestus, G. Brinker, J. P. Dreier, J. Woitzik, A. J. Strong, and R. Graf: Co-Operative Study of Brain Injury Depolarisations (COSBID): Ann. Neurol. **63** (2008) 720.
- 20) A. J. Strong, M. Fabricius, M. G. Boutelle, S. J. Hibbins, S. E. Hopwood, R. Jones, M. C. Parkin, and M. Lauritzen: Stroke **33** (2002) 2738.
- 21) J. P. Dreier, S. Major, A. Manning, J. Woitzik, C. Drenckhahn, J. Steinbrink, C. Tolias, A. I. Oliveira-Ferreira, M. Fabricius, J. A. Hartings, P. Vajkoczy, M. Lauritzen, U. Dirnagl, G. Bohner, and A. J. Strong: COSBID study group: Brain **132** (2009) 1866.
- 22) C. Iadecola: Nat. Med. **15** (2009) 1131.

レーザーワード

内因性光学信号 (intrinsic optical signal)

一般に、生体組織に由来する内因性の光吸収ないし散乱信号のことを言う。前者の代表は、酸素化・脱酸素化ヘモグロビン、エネルギー代謝に関わる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、脂質、水等に由来する信号であり、後者は、生体組織中の光散乱体である細胞や細胞小器官の形態(大きさ、形状、密度、屈折率等)を反映する信号である。このような内因

性光学信号を利用することにより、生体組織・細胞の生理学的、生化学的、形態学的情報を非侵襲的かつリアルタイムに計測・イメージングすることが可能となる。医学生物学分野においては、造影剤や蛍光標識など、外因性物質を利用した診断・イメージングが多用されているが、内因性光学信号を用いた計測・イメージングは簡便であり、安全性が高いという特長を有する。(川内 聡子)