

学 位 論 文 題 名

The Basic Study for Optical Diagnosis of
Brain Condition using Light Scattering

— Light Scattering Changes in Brain Mitochondria and Brain Tissue
during Anoxia —

光散乱を用いた脳の光診断のための基礎研究

— 無酸素状態における脳ミトコンドリアと脳組織の光散乱変化 —

学位論文内容の要旨

脳は虚血などによる酸素不足に対して、極めて脆弱である。虚血に伴い、血管系の変化・グリアとニューロンの体積変化・樹状突起の断片化・細胞内小器官の形態変化が起こるとされている。このような形態変化を計測することは、病態の診断をする上で重要である。MRI や CT は形態計測に対し、極めて有効である。しかしながら、大型であり救急治療室などで使用することは困難である。よって、形態計測のための、より簡便な方法が求められる。近年、光の非侵襲性を利用した光診断法が急速に発展しつつある。特に、近赤外領域の光は生体組織に対して高い透過性をもつため、臨床への応用が進んでいる。中でも、ヘモグロビンの酸素化度の変化に伴った吸収変化を利用し、循環系の酸素飽和度が測られている。一方、光散乱は吸収変化の定量化を妨げる要因としてみられ、生体計測への応用は遅れた。しかし、光散乱は組織の形態変化に対して感受性があり、また比較的簡素な機器で行う事が出来る。したがって、光散乱を利用して脳組織の状態を計測し、病態を診断し得る可能性がある。現在、酸素不足によって引き起こされる脳組織の構造変化と光散乱変化の関係付けはほとんど成されていない。

光散乱を用いて臨床的に脳の状態変化をモニターする事を将来的な目標とし、本研究では、無酸素状態における単離脳ミトコンドリアの光散乱変化と構造変化(Chapter 2)、無酸素状態におけるラットの脳組織の光散乱変化(Chapter 3)の測定を試みた。

ミトコンドリアは2重膜から成り、サイズが可視-近赤外光の波長に等しいため、生体中での光散乱の主要素の1つと考えられている。また、他の細胞内小器官よりもストレス下で顕著に構造を変えるとされている。したがって、無酸素状態における脳ミトコンドリアの形態変化と光散乱変化の測定を試みた。酸素不足は、細胞に対してイオンバランスの崩壊を招き、細胞自身の体積変化をも引き起こす。よって、ミトコンドリア以外の構造変化を除外するために、ラットの脳からミトコンドリアを単離し、実験を行った。ミトコンドリアの体積は、主に K^+ の出入りによってコントロールされている。流入は K^+/H^+ アンチポーターに、流出は ATP 依存性の K^+ チャンネ

ルによって引き起こされる。それぞれ、 Mg^{2+} 、ATP によって阻害され、どちらの阻害因子も細胞内に存在する。よって、より細胞内の条件に近付けるため、 Mg^{2+} 、ATP 存在下での実験も合わせて行った。ミトコンドリア溶液を無酸素状態にすることによって、光散乱が増加した。その際のミトコンドリアの構造を透過型電子顕微鏡で観察すると、マトリックスが収縮していた。再び酸素を与えると光散乱が減少し、マトリックスが伸張した。この現象は、 Mg^{2+} 、ATP 存在下でも観察された。よって、細胞内においても、無酸素によって脳ミトコンドリアのマトリックスが収縮し、光散乱が増加するであろう事が示唆された。

さらに、無酸素状態におけるラットの脳組織の光散乱変化の測定を試みた。ヘモグロビンによる吸収変化を取り除くため、可視・近赤外領域に吸収のない人工血液で血液置換したラットを用いた。しかしながら、ヘモグロビンを除いた後も、無酸素時には可視・近赤外領域にチトクローム類の吸収変化が現れる。したがって、無酸素時の光散乱変化を評価するため、数点の正確な等吸収点を決定する必要がある。心筋のミトコンドリアは、1ミトコンドリア当りのチトクローム類の濃度が高い。そのため、ミトコンドリアの形態変化に伴う光散乱変化に対し、チトクローム類の吸収変化の割合が高い。よって、心筋のミトコンドリアの差スペクトルを解析し、正確なチトクローム類の等吸収点を決定した。得られた等吸収点を用いて光散乱の変化を解析した。さらに、脳組織の光散乱変化とチトクロームオキシダーゼ内の CuA の酸化還元挙動と比較した。結果、血液置換したラットの呼吸酸素濃度を60%としたとき、CuA の還元と同時に光散乱の減少が始まった。そして、CuA の還元過程と平行して光散乱の減少が続いた。CuA の酸化還元挙動は細胞内の酸素濃度を反映し、吸光度変化は生体組織に対して高い透過性を持つ近赤外領域にある。よって、CuA の酸化還元変化から細胞内の酸素濃度変化を非侵襲的に計測する事が可能であり、臨床への応用も進んでいる。CuA の還元変化と脳組織の光散乱変化の同時性は、酸素濃度低下によって直ちに脳組織の構造変化が惹起されること示している。

本研究において、無酸素状態に伴う単離脳ミトコンドリアと脳組織の光散乱変化が明らかにされた。無酸素状態によって、単離脳ミトコンドリアの光散乱は増加したが、ラットの脳組織では光散乱の減少のみが観察された。一方、無酸素によりラット海馬スライスの光散乱が減少し、続いて増加することが近年 Bahar らによって報告された。したがって、“丸ごと”の脳組織では、ミトコンドリアに由来する光散乱の変化は、覆い隠されているのかもしれない。この点に関しては、さらなる研究が必要である。本研究で得られた無酸素状態における脳ミトコンドリアと脳組織の光散乱に関する知見は、将来、光散乱を利用した脳の非侵襲計測から得られる信号の解釈に有用である。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 田 村 守

副 査 教 授 畠 山 昌 則

副 査 教 授 矢 澤 道 生

副 査 教 授 加 茂 直 樹 (大学院薬学研究科)

副 査 助教授 岩 井 俊 昭

(電子科学研究科・ナノテクノロジー研究センター)

学 位 論 文 題 名

The Basic Study for Optical Diagnosis of Brain Condition using Light Scattering

— Light Scattering Changes in Brain Mitochondria and Brain Tissue
during Anoxia —

光散乱を用いた脳の光診断のための基礎研究

— 無酸素状態における脳ミトコンドリアと脳組織の光散乱変化 —

本論文は生体組織の形態変化を反映する光散乱を組織の診断に応用することを目的として、動物レベル及び細胞レベルで低酸素下を中心に解析した結果を報告している。近年、光の非侵襲性を利用した光診断法が急速に発展しつつあり、特に、近赤外領域の光は生体組織に対して高い透過性をもつため、臨床への応用が進んでいる。中でも、ヘモグロビンの酸素化度の変化に伴った吸収変化を利用し、循環系の酸素飽和度が測られている。一方、光散乱は吸収変化の定量化を妨げる要因としてみられ、生体計測への応用は遅れた。しかし、光散乱は組織の形態変化に対して感受性があり、また比較的簡素な機器で行う事が出来る。したがって、光散乱を利用して脳組織の状態を計測し、病態を診断し得る可能性があるが、酸素不足によって引き起こされる脳組織の構造変化と光散乱変化の関係付けはほとんど成されていない。

光散乱を用いて臨床上に脳の状態変化をモニターする事を将来的な目標とし、本研究では、無酸素状態における単離脳ミトコンドリアの光散乱変化と構造変化(Chapter 2)、無酸素状態におけるラットの脳組織の光散乱変化(Chapter 3)の測定を述べている。

ミトコンドリアは2重膜から成り、サイズが可視-近赤外光の波長に等しいため、生体中での光散乱の主要素の1つと考えられている。また、他の細胞内小器官よりもストレス下で顕著に構造を変えるとされている。したがって、無酸素状態における脳ミトコンドリアの形態変化と光散乱変化の測定を試みた。酸素不足は、細胞に対してイオンバランスの崩壊を招き、細胞自身の体積変化をも引き起こす。よって、ミトコンドリア以外の構

造変化を除外するために、ラットの脳からミトコンドリアを単離し、実験を行った。ミトコンドリアの体積は、主に K^+ の出入りによってコントロールされている。流入は K^+/H^+ アンチポーターに、流出は ATP 依存性の K^+ チャンネルによって引き起こされる。より細胞内の条件に近付けるため、 Mg^{2+} 、ATP 存在下での実験も合わせて行った。ミトコンドリア溶液を無酸素状態にすることによって、光散乱が増加した。その際のミトコンドリアの構造を透過型電子顕微鏡で観察すると、マトリックスが収縮していた。再び酸素を与えると光散乱が減少し、マトリックスが伸張した。

次に、無酸素状態におけるラットの脳組織の光散乱変化の測定を試みた。ヘモグロビンによる吸収変化を取り除くため、可視・近赤外領域に吸収のない人工血液で血液置換したラットを用いた。その結果、ミトコンドリアのチトクローム酸化酵素成分である CuA の還元変化と脳組織の光散乱変化の同時性は、酸素濃度低下によって直ちに脳組織の構造変化が惹起されること示している。

本研究において、無酸素状態に伴う単離脳ミトコンドリアと脳組織の光散乱変化が明らかにされた。無酸素状態によって、単離脳ミトコンドリアの光散乱は増加したが、ラットの脳組織では光散乱の減少のみが観察された。本研究で得られた無酸素状態における脳ミトコンドリアと脳組織の光散乱に関する知見は、光散乱を利用した脳の非侵襲計測から得られる信号の解釈に有用である。

以上の結果はミトコンドリアの無酸素時の光散乱変化に新しい知見を与えたものであり、北海道大学博士(理学)の学位を授与される資格があるものと認める。