

慢性低灌流モデルマウスにおける認知機能障害メカニズム  
の解明を目的とした病態評価と測定手法開発

Disease evaluation and method development aimed at elucidation of  
cognitive dysfunction mechanism in chronic hypoperfusion model mice

岩手大学大学院 連合農学研究科

寒冷圏生命システム学専攻

漆畑 拓弥

## 目次

- 1 章 序論 血管性認知症と慢性低灌流モデル動物
  - 1-1 血管性認知症とは
  - 1-2 性脳低灌流を原因とした認知機能障害
  - 1-3 げっ歯類モデルによる慢性脳低灌流研究
  - 1-4 マルチモーダルイメージング研究
  - 1-5 本研究では
  
- 2 章 フラビン蛋白蛍光イメージングによる脳酸素代謝の評価と測定手法開発
  - 2-1 序論
  - 2-2 材料と方法
  - 2-3 結果
  - 2-4 考察
  
- 3 章 2光子顕微鏡を使用したカルシウムイメージングによる神経細胞レベルでの神経機能評価
  - 3-1 序論
  - 3-2 材料と方法
  - 3-3 結果
  - 3-4 考察
  
- 4 章 磁気共鳴スペクトロスコピー (MRS) を使用した脳代謝物の評価
  - 4-1 序論
  - 4-2 材料と方法
  - 4-3 結果
  - 4-4 考察
  
- 5 章 拡散 MRI を使用した神経線維損傷の評価
  - 5-1 序論
  - 5-2 材料と方法
  - 5-3 結果
  - 5-4 考察

## 6 章 神経機能障害に対するタウリンの効果の評価

6-1 序論

6-2 材料と方法

6-3 結果

6-4 考察

## 7 章 慢性低灌流モデルマウスにおける病変のまとめと考察（総合考察）

7-1 結果のまとめ

7-2 結紮後の急性期における神経活動の増加

7-3 結紮後の慢性期における神経機能及び繊維の病変

7-4 タウリン投与による神経機能障害の抑制

7-5 慢性低灌流モデルマウスにおける認知機能障害に至る機構

略語一覧

謝辞

参考文献

## 1. 序論 血管性認知症と慢性低灌流モデル動物

### 1-1 血管性認知症とは

血管性認知症（Vascular dementia : VaD）は認知症の原因疾患としては、アルツハイマー病（Alzheimer's disease : AD）について多く、脳血管障害に起因する認知症である。これは脳血管障害と認知症の間に因果関係が存在するものと定義される。血管性認知症の原因には、脳梗塞、脳出血、くも膜下出血に加えて、脳循環不全、低灌流、白質病変などの病型も含まれる。以前は、脳血管障害を有する認知症のほとんどが血管性認知症に分類されていたが、現在では脳血管障害はアルツハイマー病の増悪因子とみなされており、“脳血管障害を有するアルツハイマー病”という概念も広まっている。さらに最近では認知症に至らない比較的軽症の認知機能障害までも含んだ血管性認知障害（vascular cognitive impairment : VCI）という概念が提唱され、軽症の認知機能障害を含めて病早期から治療を開始すべきとされている（脳卒中学会 脳卒中治療ガイドライン 2009）。

### 1-2 慢性脳低灌流を原因とした認知機能障害

慢性脳低灌流は血管性認知症の原因のひとつであり、高血圧、糖尿病、アテローム性動脈硬化症、喫煙などの脳血管系に影響を与える障害を原因として生じる(Meyer et al., 2000, Valerio Romanini et al., 2013)。局所的な脳灌流が動脈の閉塞性病変によって減少したとき、局所脳血流は自己調節性の血管拡張によって維持され、結果として脳血液量の増加を引き起こす (Powers et al., 1984; Paulson et al., 1990)。血管が最大限拡張し、局所脳血流が低下すると、酸素摂取率が増加し正常な酸素代謝や神経活動を維持しようとする。この状態は misery

perfusion と呼ばれる (Yamauchi et al., 1996)。この状態は、脳卒中の予測因子であることが古くから知られており、近年まで治療介入は行われていなかったが、慢性低灌流を原因とした認知機能障害が知られたことで (Deary et al., 2003)、治療の必要性が検討されている。

慢性脳低灌流は脱髄などの虚血性白質病変の原因であることが知られており (Deary et al., 2003)、また、白質病変が強いほど免疫担当のグリア細胞であるミクログリアや、グリア細胞の1つであるアストロサイトが活性化することが報告されている (Wakita et al., 1994)。大脳白質の主な構成成分は軸索やミエリン形成細胞であるオリゴデンドロサイトなどのグリア細胞であり、灰白質は神経細胞体やグリア細胞が主である。白質の変化は脳卒中や認知障害、認知症のリスクを増加させる。慢性低灌流による白質の変化につながる最も初期の事象を理解することは、脳の損傷を早期段階で予防し、認知低下やその後の認知症発症の予防につながるといわれている (Prins et al., 2015)。

### 1-3 げっ歯類モデルによる慢性脳低灌流研究

マウスやラットなどのげっ歯類モデルが慢性低灌流を原因とした認知機能障害や白質病変の病態解析によく使用されている。慢性低灌流モデルは両側総頸動脈の結紮 (Lin et al., 2001, Tsuchiya et al., 1992) や狭窄 (Shibata et al., 2004)、もしくは片側の総頸動脈の結紮 (Yoshizaki et al., 2008) により作成される。げっ歯類モデル動物による慢性低灌流を原因とした白質病変についてはよく調べられており、ラットの両側結紮モデルでは脳梁における脱髄やグリア細胞の活性化などの白質病変が結紮の約1週間後から確認され (Lin et al., 2001)、マウスの片側結紮モデルでは一ヵ月後に脳梁における白質病変が確認されてい

る (Yoshizaki et al., 2008)。また、白質病変の程度は、脳梁>線条体>内包>前交連>視索の順に高いとされている (Shibata et al., 2004)。

慢性低灌流による認知機能障害については行動実験によって確認されている。片側結紮マウスでは結紮手術の1ヵ月後に、自発的な探索行動や不安のレベルの増加が確認されており (Zhao et al 2014)、また、短期記憶の欠損やわずかな長期の空間記憶の欠損が、物体認識試験やモリス水迷路などの実験によって確認されている (Yoshizaki et al., 2008, Zhao et al., 2014, Zuloga et al., 2015)。

慢性低灌流モデルマウスにおける血管反応の障害についてもこれまで報告されている。CO<sub>2</sub>吸入負荷による高炭酸ガス血症状態は血管反応を引き起こすが (Matsuura et al., 2000)、片側結紮モデルマウスにおけるCO<sub>2</sub>吸入時の血管拡張能は減少し、28日後に反応性が回復することが報告されている (Tajima et al., 2014)。また、神経活動に伴う血管反応性は片側結紮モデルマウスにおいて低下するが、慢性時に回復を示さないことが報告されており (Nishino et al., 2015)、慢性低灌流における神経機能もしくは、血管と神経の結合の障害が示されている。

また、このような障害が認められる片側総計動脈結紮モデルマウスにおいて、神経細胞死が起きないことも報告されている (Lee et al., 2011, Pimentel-Coelho et al., 2013, Nishino et al., 2015)。このことは、認知機能障害の原因が神経細胞そのものの機能障害や、神経細胞間の結合の障害にある可能性を示している。

#### 1-4 マルチモーダルイメージング研究

複数の測定機器を組み合わせて多角的に生命現象を調べる非侵襲の *in vivo* マルチモーダルイメージングは近年盛んに進められている。MRI や PET、

光イメージングなどを用いたマルチモーダルな研究は各々の測定法の弱点を補い、結果を強化することができるため非常に有用な手法である。*in vivo* かつ非侵襲の疾患モデルに対するマルチモーダルな研究アプローチは、個体間のばらつきが生む評価の不確かさを減少させ、病態の理解や治療への近道になると考えられている (Michael et al., 2004)。

#### 1-5 本研究では

これまでの慢性低灌流モデル動物の研究において、行動実験により認知機能障害が起きていることや、血管機能障害や、グリア細胞の活性化、白質病変が生じることは確認されているが、神経の機能障害を評価した研究は乏しく、認知機能障害や白質病変に至る直接的な疾患メカニズムはまだ明らかになっていない。また、慢性低灌流は神経細胞死を引き起こさないことから、神経細胞の絶対数の減少ではなく、神経細胞の機能障害が認知機能障害を引き起こしている可能性がある。したがって本研究では、慢性低灌流モデルマウスにおける神経機能や脳代謝物の変化を、フラビン蛍光イメージング、2光子励起レーザー顕微鏡によるカルシウムイメージング、MR スペクトロスコピー、拡散 MRI といった複数の *in vivo* の測定手法で測定し、比較検討することで、慢性性的な灌流低下が認知機能障害を引き起こす疾患メカニズムを明らかにすることを目的とした。

また、フラビン蛍光イメージングや拡散 MRI において脳血流の変化は結果に影響を与えることが知られている。慢性的に脳血流を減少させる慢性低灌流モデルにおいて、これらの手法による測定は脳血流によるノイズにより正確な評価ができない可能性がある。したがって、本研究において慢性低灌流モデルの疾患評価を正確に行うため、フラビン蛍光イメージングと拡散 MRI におけ

る脳血流の影響を除去することを目的とした補正法や解析法の開発を行った。本研究で開発された手法は、慢性低灌流モデルマウスに対してだけでなく、脳血管障害を伴う、脳卒中モデル動物や認知症モデル動物などに適用可能であり、これらの疾患についても新たな知見を得ることができる可能性がある。

本論文において、開発された測定手法や、各測定についての基本的な考察は各章末で行うが、慢性低灌流モデルマウスの病態に関する総合的な考察は第7章においてまとめて行う。

## 2. フラビン蛋白蛍光イメージングによる脳酸素代謝の評価と測定手法開発

### 2-1 序論

#### 2-1-1 フラビン蛋白蛍光イメージングとは

フラビン蛋白蛍光イメージング (flavoprotein autofluorescence imaging: FAI) とは、ミトコンドリアにおけるフラビン蛋白の自家蛍光を利用した脳神経活動を測定するイメージング技術である (Shibuki et al., 2003)。脳の神経活動に伴いミトコンドリアで酸素代謝が亢進すると、電子伝達系のフラビン蛋白は還元型から酸化型へと変化する。この酸化型のフラビン蛋白は青色 (472–488 nm) の励起光の下で緑色 (520–560 nm) の自家蛍光を発する (Benson et al., 1979)。したがって、この緑色の自家蛍光を捉えることで脳の活動を可視化することができる。神経活動を可視化するためによく行われている手法に、色素で脳を染色し、神経細胞の膜電位の変化や、細胞内のカルシウム濃度の変化、pH の変化などを捉える方法がある。しかしながら、色素による染色は染めムラや、色素の退色などの問題があり、安定した活動を記録することが困難である。一方で、フラビン蛍光蛋白イメージングは生体の自家蛍光を利用するため、色素による脳の染色を必要としない。したがって、フラビン蛋白蛍光イメージングは長期的な追跡調査に適した手法であるといえる。

#### 2-1-2 緑色蛍光イメージングの問題点

フラビン蛋白蛍光イメージングや、GCaMP などのカルシウムセンサー蛋白を利用したカルシウムイメージングなどの緑色蛍光イメージングは、脳血流の影響を受けることが知られている (Vanzetta et al., 1999, Vazquez et al., 2012)。神経活動に伴う脳血流の増加はヘモグロビンなどによる光の吸光や散乱を増加

させ、緑色蛍光を減衰させる。フラビン蛍光イメージングにおいても、感覚刺激による緑色蛍光増加の後、脳血流増加に伴う蛍光の減衰が生じる。血管拡張剤を与え血管反応を抑制することでこの信号の減衰は無くなり、フラビン蛍光の変化が電位変化と一致することから、この減衰は血流によるものであることが確認されている (Vazquez et al., 2012)。健康な動物では脳血流や脳血管反応は比較的安定しているため、吸光や散乱の増加に起因した光の減衰率は一定であり、フラビン蛍光の評価は減衰前のピークで問題ない。しかしながら、脳血管反応の障害や不安定な脳血流を生じるような疾患のモデル動物では血流による減衰が一定ではない。したがってフラビン蛋白蛍光イメージングの信号も不安定となり、フラビン蛋白蛍光イメージングは脳血管障害のある脳卒中や認知症モデル動物の病態評価には適さないとされる。

### 2-1-3 本研究では

本研究において、脳血管反応障害が報告されている慢性低灌流モデルマウスの病態評価を行うため、まずフラビン蛋白蛍光イメージングにおける脳血流の影響を除去し、純粋なフラビン蛍光変化を得ることができる補正法の開発を行った。その後、その補正法を使用し慢性低灌流モデルマウスの神経活動（酸素代謝）の変化を1ヶ月間追跡調査した。

## 2-2 材料と方法

### 2-2-1 補正法のコンセプト

フラビン蛍光イメージングにおける脳血流の影響の補正は、内因性信号イメージング (Intrinsic optical signal imaging: IOSI, Martin et al., 2006; Ma et al., 2013) との同時測定により達成されると考えた。上記のように、フラビン蛋白蛍光イメージングではフラビン蛍光 (神経活動) 由来のシグナルと脳血流 (ヘモグロビンによる吸光や散乱) 由来のシグナルの合算値が示される (Vazquez et al., 2012)。一方で、内因性信号イメージングは脳に照射された光の反射光を測定する方法であり、脳血流 (ヘモグロビンによる吸光や散乱) 由来のシグナルを測定することができる方法である (Martin et al., 2006)。したがって、フラビン蛋白蛍光イメージングの測定値から内因性信号イメージングの測定値を引くことで、純粋なフラビン蛍光を得ることができると考えた。

### 2-2-2 動物の準備

補正法の開発のために 15 匹、慢性低灌流の疾患評価のために 12 匹、合計 27 匹のオスの C57BL/6J マウスを実験に使用した。これらのマウスは 25°C に設定された 12 時間の明暗サイクルの部屋のケージ内で飼育され、適宜水と餌を与えた。

光イメージングのためにマウスの頭部には頭蓋窓 (Tomita et al., 2015) を設置した (図 1 AB)。頭蓋窓手術のために、フェイスマスクを介して空気、酸素、イソフルランの混合物 (誘導時 3%、手術中 2%) でマウスを麻酔した。頭頂部の除毛及び消毒の後に頭頂部の皮膚が切除され頭蓋を露出した。左側の体性感覚皮質上において直径約 4mm の円形状に頭蓋骨をドリルで削り、脳表を円

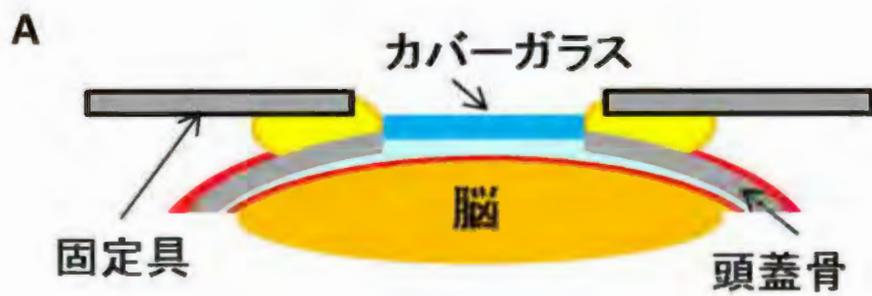


図1 A: 頭蓋窓手術の模式図。円形に頭蓋骨を除去しカバーガラスで密封することで頭蓋窓を作成した。B: 頭蓋窓。頭蓋窓は体性感覚野上に作成した。C: 頭部固定具。マウスの頭蓋窓の前後には専用に作られた固定具を取り付けた。

形に露出した。頭蓋の切除された部分に円形のカバーガラスを乗せ、歯科用セメントで固定した。また、実験時の動物の固定用に3Dプリンターで作成された自家製の固定具を頭蓋に歯科用セメントで接着した(図1C)。全ての実験は、頭蓋窓手術の後2週間以上後に行った。

慢性低灌流モデルマウス作成のために、左側の片側総計動脈結紮(unilateral common carotid artery occlusion: UCCAO)手術が実施された。手術のためにマウスはフェイスマスクを介して空気、酸素、イソフルランの混合物(誘導時3%、手術中2%)で麻酔された。マウスの頸部を除毛、消毒の後切開し、左の総頸動脈をシルク糸で結紮した後に、頸部の切開部を縫合した(図2)。

本研究における全ての動物実験は量子科学技術研究開発機構放射線医学総合研究所の倫理委員会の承認を得て行われた。

### 2-2-3 マウスの固定

麻酔はマウスの神経活動に影響を及ぼすため、測定を覚醒状態で行った(Takuwa et al., 2011)。顕微鏡下に発泡スチロール製のボールを設置し、エアコンプレッサーでボールを常に浮いた状態にした。マウスの体をそのボールの上に置き、マニピレーターに取り付けられた固定器具にマウスの頭部固定具をネジで固定した(図3)。この固定により、実験中マウスは自由に運動することが可能であり、動きによるシグナルのノイズはわずかであった。

### 2-2-4 フラビン蛍光イメージングと内因性信号イメージングの同時撮影

フラビン蛋白蛍光イメージングと内因性信号イメージングは2台のCCDカメラ(MiCAM02, Brainvision, Tokyo, Japan)で同時測定した(Takuwa et al., 2014)。空間分解能は192×128ピクセルであり、1フレームあたり0.1秒の測定を25秒

間行った (250 フレーム/トライアル)。信号対雑音比を改善するために、計 25 回のトライアルを 30 秒間隔で連続して行い画像を平均した。

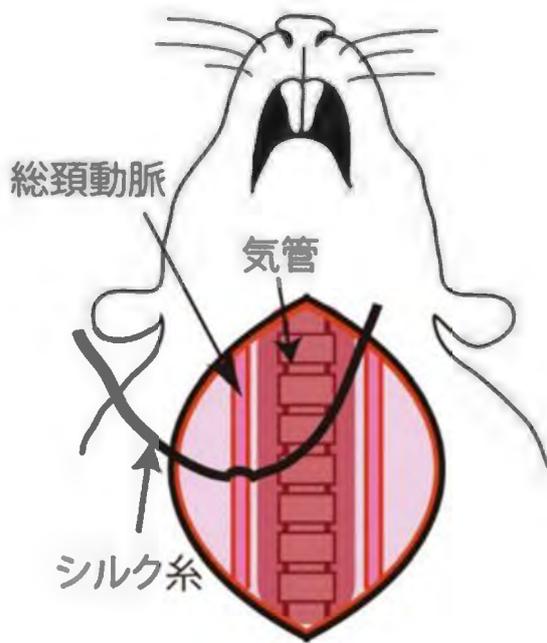


図2 片側総頸動脈結紮（UCCAO）手術の模式図。



図3 覚醒測定時におけるセッティングの模式図。フラビン蛍光イメージング及び2光子顕微鏡においてマウスを覚醒状態で測定した。

測定した顕微鏡の模式図を図4に示す。ハロゲンランプから同時に発せられた2本の光を、それぞれの波長のバンドパスフィルター(470nm、520nm)を介してマウスの頭蓋窓に照射した。470nmの波長で照射された青色の励起光により、酸化型フラビン蛋白は約535nmの波長の自家蛍光を発する。ロングパスフィルター(>490nm)により470nmの反射光は遮断され、ダイクロイックミラー(560nm)によって内因性信号イメージング用の光と分離された蛍光は、カメラの直前に置かれたバンドパスフィルター(535±20nm)を介し、フラビン蛋白蛍光イメージングの信号として記録した。もう一方の570nmの波長で照射された黄色の光の反射光はロングパスフィルター(>490nm)とダイクロイックミラー(560nm)を通過し、カメラの直前に設置されたバンドパスフィルター(570±10nm)を介して、内因性信号イメージングの信号として記録した。

#### 2-2-5 感覚刺激とCO<sub>2</sub>吸入負荷

体性感覚野における神経活動およびそれに伴う血管反応はマウスの頬ひげへの空気刺激によって誘導した。スティミュレーター(Master-8: A.M.P.I., Jerusalem, Israel)を10Hzの矩形パルス刺激(パルス幅50ms、オンセット間隔100ms)に設定し、約15psiの圧力でエアコンプレッサーからマウスの右の頬ひげの全体に2秒間空気を送った。

補正法の検証にはCO<sub>2</sub>吸入負荷による血管拡張反応を使用した。マウスの鼻と口を覆うマスクが設置され、混合ガス(5%CO<sub>2</sub>、21%O<sub>2</sub>、74%窒素)をマウスに2秒間送った(300ml/min)。CO<sub>2</sub>吸入時以外は空気をマウスに与えた(300ml/min)。

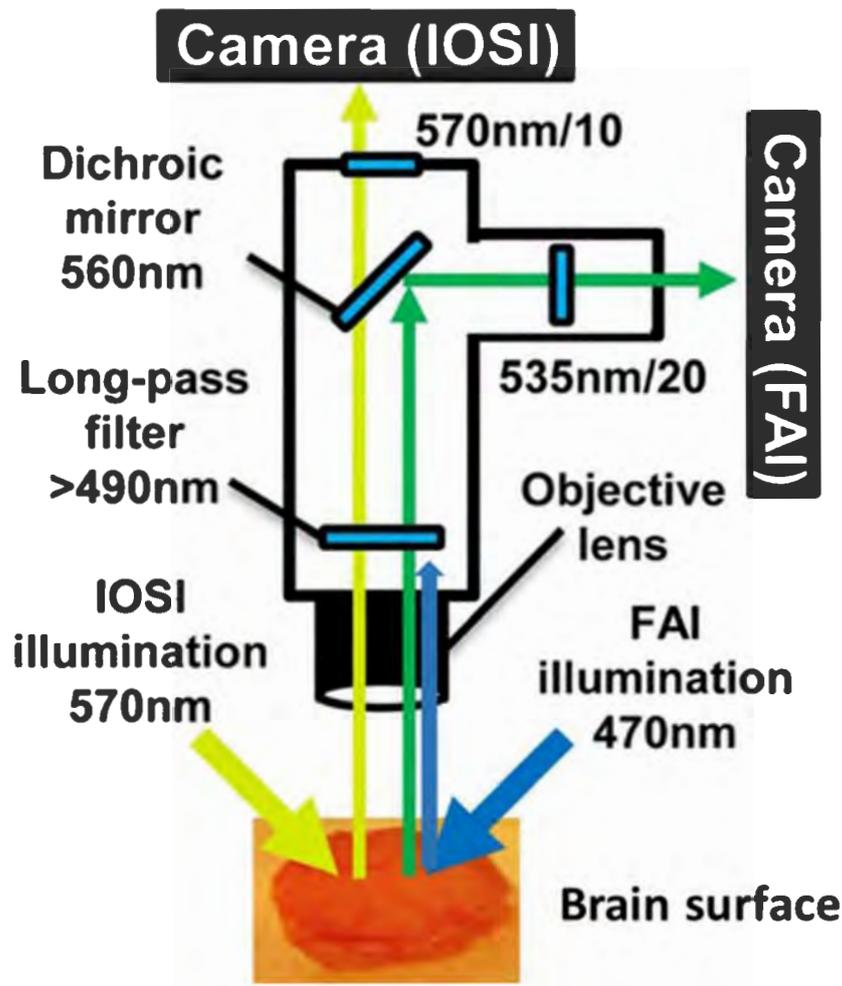


図4 フラビン蛍光イメージング (FAI) 及び内因性信号イメージング (IOSI) に使用された実験装置の模式図。2種の波長 (470nm と 570nm) の光をマウスの頭部に照射し、それぞれのイメージングのためにフィルターを介し、2台の CCD カメラにより同時測定を行った。

#### 2-2-6 フラビン蛍光蛋白イメージングの補正法

フラビン蛋白蛍光イメージングにはフラビン蛋白の自家蛍光による信号変化だけでなく、脳血流変化による吸光や散乱の信号変化も含む。この補正法の目的はフラビン蛋白蛍光イメージングにおける脳血流の影響を除去し、神経活動より変化する純粋なフラビン蛋白の自家蛍光を推定することである。同じ脳血流変化が起きた場合のフラビン蛍光イメージングにおける信号変化率と、内因性信号イメージングにおける信号変化率は異なるため、まず 2 つの測定手法間の脳血流変化による信号変化の比率を求めた。安静状態（10 秒間）における各タイムポイントのフラビン蛋白蛍光イメージングと内因性信号イメージングの測定値から散布図が作成され、回帰直線を求めた。この回帰直線の傾きは 2 つの測定手法の脳血流変化による信号変化の比である。したがって、補正フラビン蛋白蛍光イメージングの信号値（Corrected FAI signal）は次の式で求めた。

$$\text{Corrected FAI signal} = \text{FAI signal} - \text{IOSI signal} \times \text{Slope}$$

実験ごとに回帰直線（図 5B）の傾きを求め、全てのフレーム（250 フレーム）および全てのピクセルで補正フラビン蛋白蛍光イメージング信号を求めた。

#### 2-2-7 補正法の検証

CO<sub>2</sub> 吸入負荷は神経活動を引き起こさずに血管反応を引き起こすことができる（Matsuura et al., 2000）。また、神経活動に伴う脳血管反応と、CO<sub>2</sub> 吸入による脳血管反応は別の機構で機能しており、CO<sub>2</sub> 吸入中に感覚刺激を与えることで追加的な血管反応を引き起こすことができることも報告されている（Takuwa et al., 2014）。この CO<sub>2</sub> 吸入負荷による強制的な血管反応を利用して 2 種類の補正法の検証実験を行った。1 つ目は安静時の CO<sub>2</sub> 吸入時におけるフラビン蛍光イメージングの補正である。このとき、脳血管反応は起きるが神経活動は生じな

いため、フラビンの蛍光変化は無いが、脳血流による吸光や散乱は増加する。すなわち、補正前のフラビン蛍光イメージングの信号は減衰し、補正後の信号は一定であれば、補正が過大もしくは過小に求められていないことを確かめることができる。2つ目に CO<sub>2</sub> による血管反応と同時に感覚刺激を行ったときのフラビン蛍光イメージングの補正を行うことで検証を行った。CO<sub>2</sub> による血管反応と感覚刺激を同時に行われると追加的な血管反応により、感覚刺激のみ場合よりもフラビン蛍光イメージングの信号減衰が大きいことが予想される。しかし、実際の神経活動は同等であるためフラビン蛋白の蛍光変化は等しいはずである。したがって、補正後の感覚刺激のみの場合と CO<sub>2</sub> 吸入を追加した場合の信号変化の比較を行った。

#### 2-2-8 補正フラビン蛍光イメージングを使用した慢性低灌流モデルマウスの病態評価

検証実験によりフラビン蛍光変化が補正法を使用することで正しく測定できていることが確認されたとき、この方法により慢性低灌流モデルマウスの神経活動を評価した。モデルマウスの測定は UCCAO 手術前、手術の 2、7、14、21、27 日後に行った。個体ごとに手術前のフラビン蛍光信号を 1 とし、手術後の変化率のピークを求めた。

#### 2-2-8 データ解析

フラビン蛍光イメージングと内因性信号イメージングの信号は、刺激前における 10 秒間の安静時をベースラインとしたときの変化率として計算した。感覚刺激による信号の変化率がもっとも大きかったピクセルを中心に直径 1mm の領域を関心領域 (region of interest: ROI) として選択し、信号値の時間変

化率を ROI 内の平均値から求めた。

結果における数値は、記述が無い限り平均値±standard deviation (SD) を示す。統計解析は paired t-test または、One-way ANOVA を行った後の Tukey-Kramer 法、また Pearson の積率相関分析によって行われた。P<0.05 を有意とした。

## 2-3 結果

### 2-3-1 安静時における FAI と IOSI 信号

安静時における FAI と IOSI の信号変化の代表例を図 5A に示す。これらの関係を調べるため、各タイムポイントにおける FAI と IOSI 信号値の散布図を作成し、最小 2 乗法で回帰直線を求めた (図 5B)。FAI と IOSI の信号値は正の相関を示し ( $r^2=0.937\pm 0.0631$ 、 $P<0.001$ )、回帰直線の傾きは  $0.758\pm 0.115$  であった。代表的な個体の回帰直線の式と相関係数を表 1 に示す。この回帰直線の傾きを使用し、補正 FAI 信号値を求めた。

### 2-3-2 感覚刺激時の未補正 FAI 信号と補正 FAI 信号の比較

補正前の FAI と補正 FAI の刺激 1 秒前から 6 秒間におけるそれぞれの画像を図 6A に示す。また、ROI 内平均値の時間変化の波形を図 6B に示す。未補正 FAI は刺激 2 秒後において、刺激中にもかかわらず信号の減衰が確認された。一方、補正後の FAI は 2 秒後における信号の減衰は見られず、山形の信号変化を示した。また信号値のピークは未補正 FAI ( $1.44\pm 0.26$ ) と比較して、補正 FAI ( $2.41\pm 0.31$ ) が有意に高い値を示した (図 6C)。

### 2-3-3 安静時における CO<sub>2</sub> 吸入負荷による補正法の検証

代表的な CO<sub>2</sub> 吸入負荷後の未補正 FAI、IOSI、補正 FAI の波形を図 7A に示し、それぞれの CO<sub>2</sub> 吸入前と吸入 17 秒後の画像を図 7B に示す。IOSI 信号値は CO<sub>2</sub> 吸入の約 15 秒後から大幅な減少を示し、約 17 秒後にピークを示した。未補正 FAI 信号値は IOSI 信号値よりも変化率は小さいものの、IOSI 信号値と同様な時間変化を示した。補正後 FAI 信号値は 25 秒の測定時間においてほぼ変化

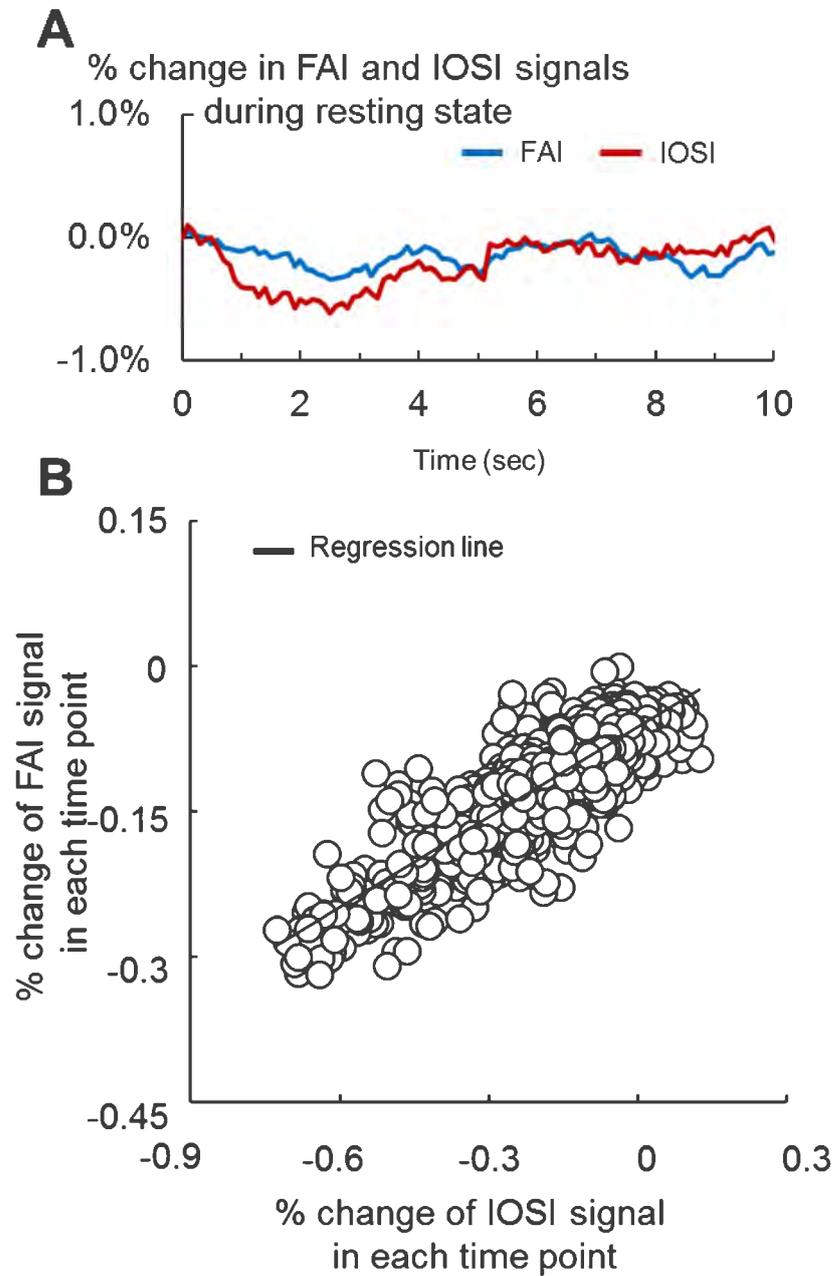


図5 A:同時測定によって得られた安静時におけるフラビン蛍光イメージング (FAI: 青) と内因性イメージング (IOSI: 赤) の信号変化。B:安静時における FAI 信号値と IOSI 信号値の散布図。回帰直線 (黒) 傾きを補正法に使用した。

表 1 安静時の各タイムポイントにおける FAI と IOSI の回帰直線と相関関係。

<b>Animal No.</b>	<b>Regression line</b>	<b>Correlation coefficient</b>
Animal 1	$y = 0.71x + 0.28$	$r^2 = 0.84$
Animal 2	$y = 0.60x + 0.93$	$r^2 = 0.93$
Animal 3	$y = 0.65x + 0.35$	$r^2 = 0.91$
Animal 4	$y = 0.93x + 0.06$	$r^2 = 0.92$

ランダムに選ばれた、代表的な 4 個体の安静時における回帰直線の式と相関係数が示される。

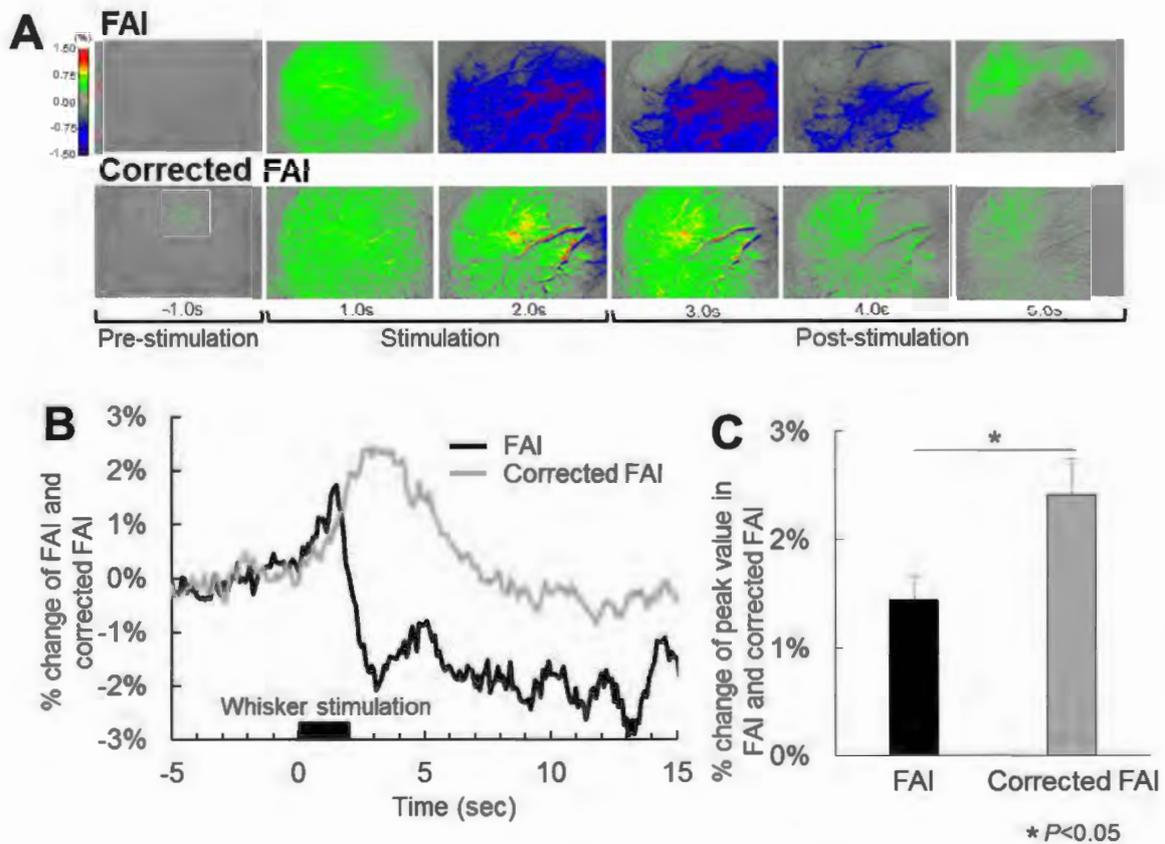


図6 A:フラビン蛍光イメージング (FAI) 画像 (上) と補正 FAI 画像 (下) の代表例。マウスの神経を頬ひげへの空気流刺激により賦活した。各画像は左から刺激前 (-1.0s)、刺激期間 (1.0s と 2.0s)、及び刺激後 (3.0-5.0s) が示される。B:FAI 及び補正 FAI における全ての動物の平均時間応答曲線。黒い四角は感覚刺激期間 (2s) を示す。C:FAI (黒) と補正 FAI (灰色) における信号変化率のピークの平均値。\*P<0.05。

を示さなかった。

#### 2-3-4 感覚刺激時における CO<sub>2</sub> 吸入負荷による補正法の検証

感覚刺激のみを行った場合と、CO<sub>2</sub> 吸入と感覚刺激の両方を行った場合の未補正 FAI の時間変化と補正後 FAI の時間変化をそれぞれ図 8AB に示す。未補正 FAI において CO<sub>2</sub> 吸入と感覚刺激を行った場合、感覚刺激のみの場合に比べて刺激後の信号値の減衰が大きかった。補正 FAI では 2 つの波形は同様な時間変化を示し、ピークの値 (Air :  $1.39 \pm 0.39$ 、Air + CO<sub>2</sub> :  $1.34 \pm 0.54$  に有意な変化は無かった (図 8C)。

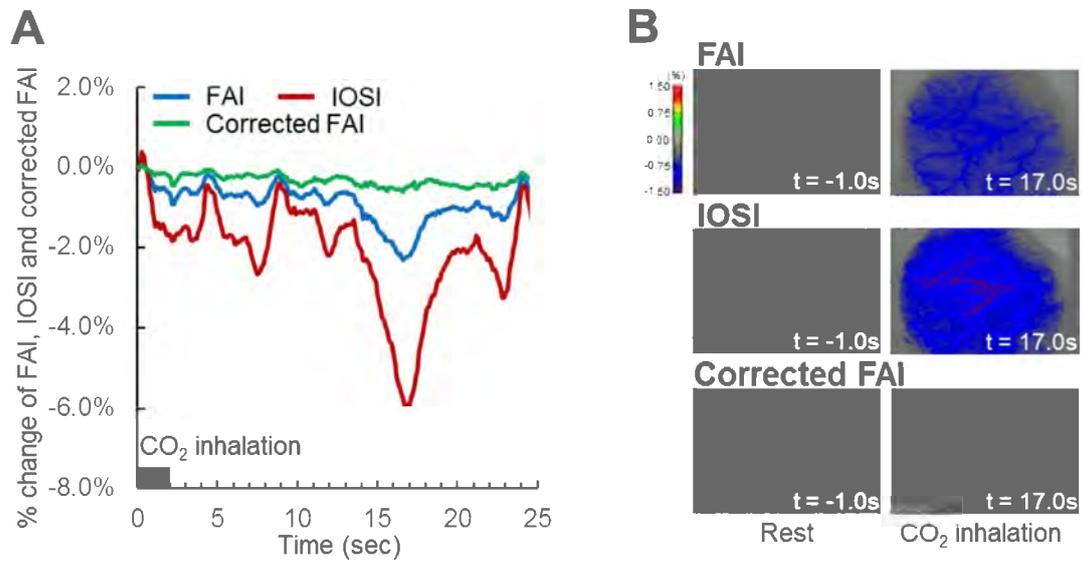


図7 安静時のCO<sub>2</sub>吸入による補正法の検証。A:CO<sub>2</sub>吸入後のフラビン蛍光イメージング (FAI) と内因性信号イメージング (IOSI) と補正 FAI の時間応答曲線。黒い四角は CO<sub>2</sub> 吸入時間を示す。B:FAI と IOSI と補正 FAI の代表的な画像。CO<sub>2</sub> 吸入前 (左, -1.0s) と CO<sub>2</sub> 吸入による血流変化時 (右, 17.0s) を示す。

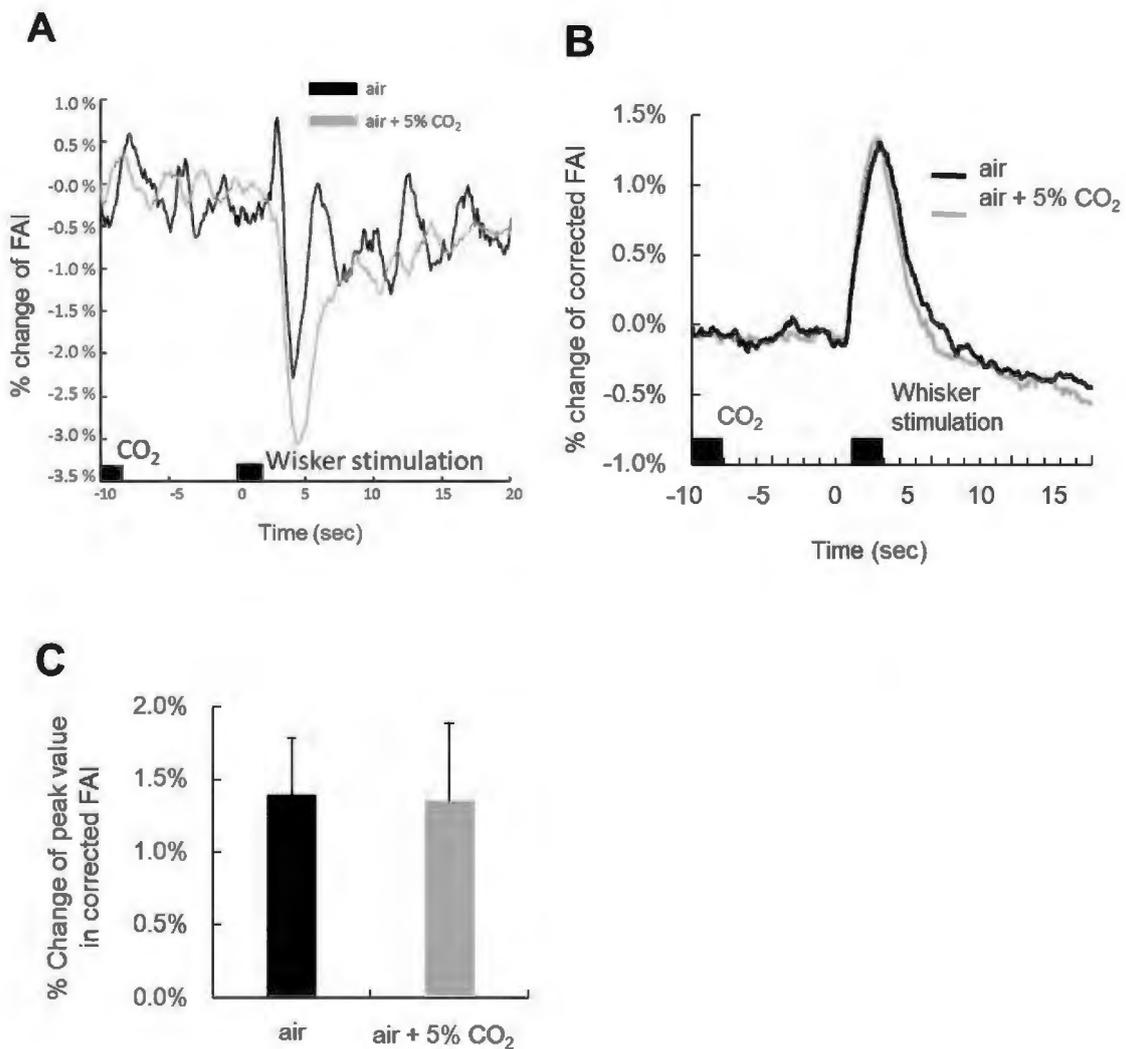


図8 神経活動時のCO<sub>2</sub>吸入による補正法の検証。A:未補正のフラビン蛍光イメージング (FAI) の時間応答曲線。マウスには感覚刺激のみ (黒)、または感覚刺激とCO<sub>2</sub>吸入の両方 (灰色) を与えた。B:補正FAIの時間応答曲線。感覚刺激のみ (黒)、感覚刺激とCO<sub>2</sub>吸入の両方 (灰色) の結果を示す。C:全ての動物における補正FAIの信号変化率の平均ピーク値。感覚刺激のみ (黒)、感覚刺激とCO<sub>2</sub>吸入の両方 (灰色)。

### 2-3-5 補正 FAI による慢性低灌流マウスの神経活動評価

補正 FAI を使用し慢性低灌流マウスの神経活動の変化を経時的に追跡測定した（手術前、2、7、14、21、28 日後）。未補正の FAI において刺激後の信号減衰は、手術前に比べ手術後のいずれの場合も小さかった（図 9A）。補正後の FAI はいずれの場合も増加を示し、約 2 秒後にピークを迎えた（図 9B）。慢性低灌流モデルマウスへ感覚刺激を行ったとき、ほとんど同じ領域で補正 FAI 信号の増加を示した（図 10A）。手術前に対するピーク値の変化率を図 10B に示す。それぞれの値は 2 日目では  $1.86 \pm 0.32$ 、7 日目では  $1.42 \pm 0.60$ 、14 日目では  $1.00 \pm 0.51$ 、21 日目では  $0.68 \pm 0.36$ 、28 日目では  $0.65 \pm 0.30$  であった。手術前と比較して 2 日後において有意な信号値の増加が認められ（ $P < 0.05$ ）、21 日目と 28 日目において有意な低下が認められた（ $P < 0.05$ , それぞれ）。

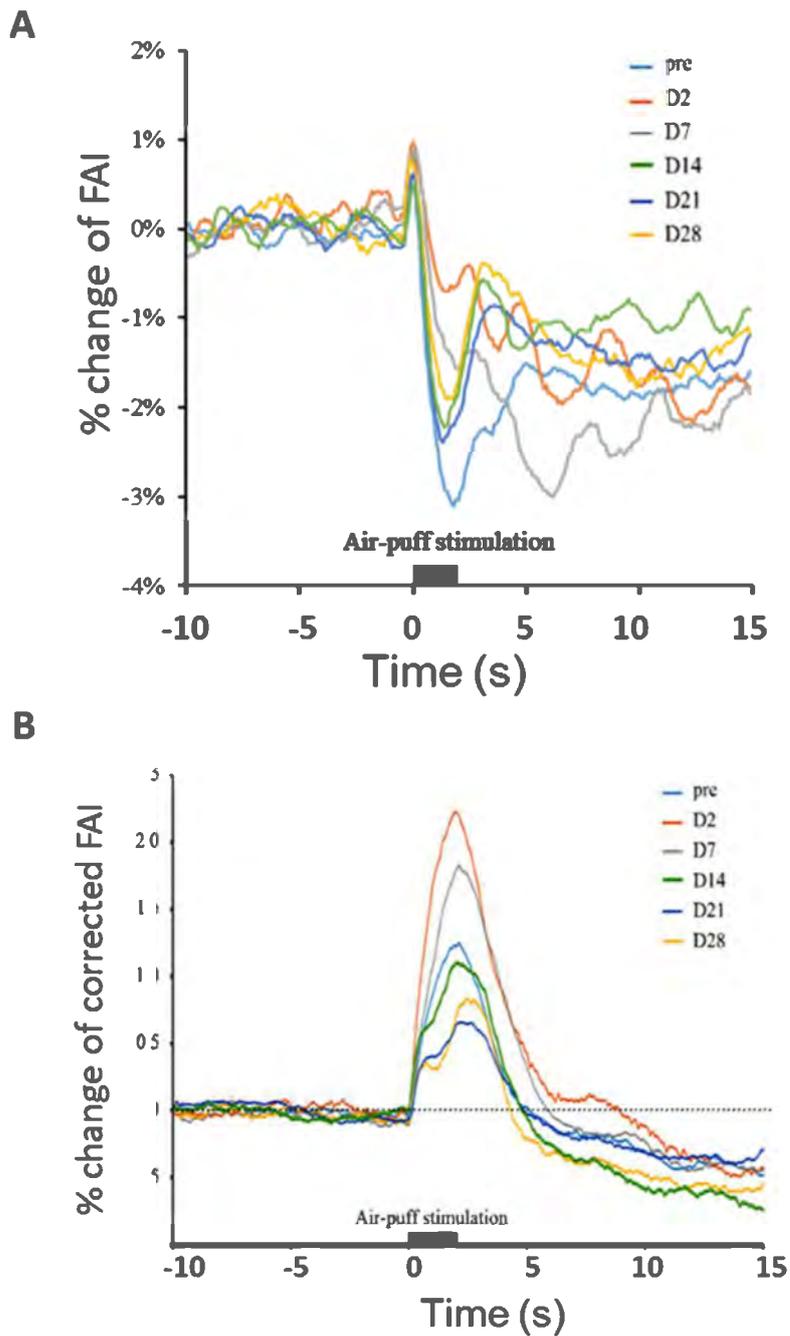


図9 A: 慢性低灌流モデルマウスにおけるフラビン蛍光イメージング (FAI) の時間応答曲線。結紮前 (Pre)、結紮から 2,7,14,21,28 日目における結果がそれぞれ示される。黒い四角は感覚刺激期間を示す。B:慢性低灌流モデルマウスにおける補正 FAI の時間応答曲線。結紮前 (Pre)、結紮から 2,7,14,21,28 日目における結果をそれぞれ示す。黒い四角は感覚刺激期間を示す。

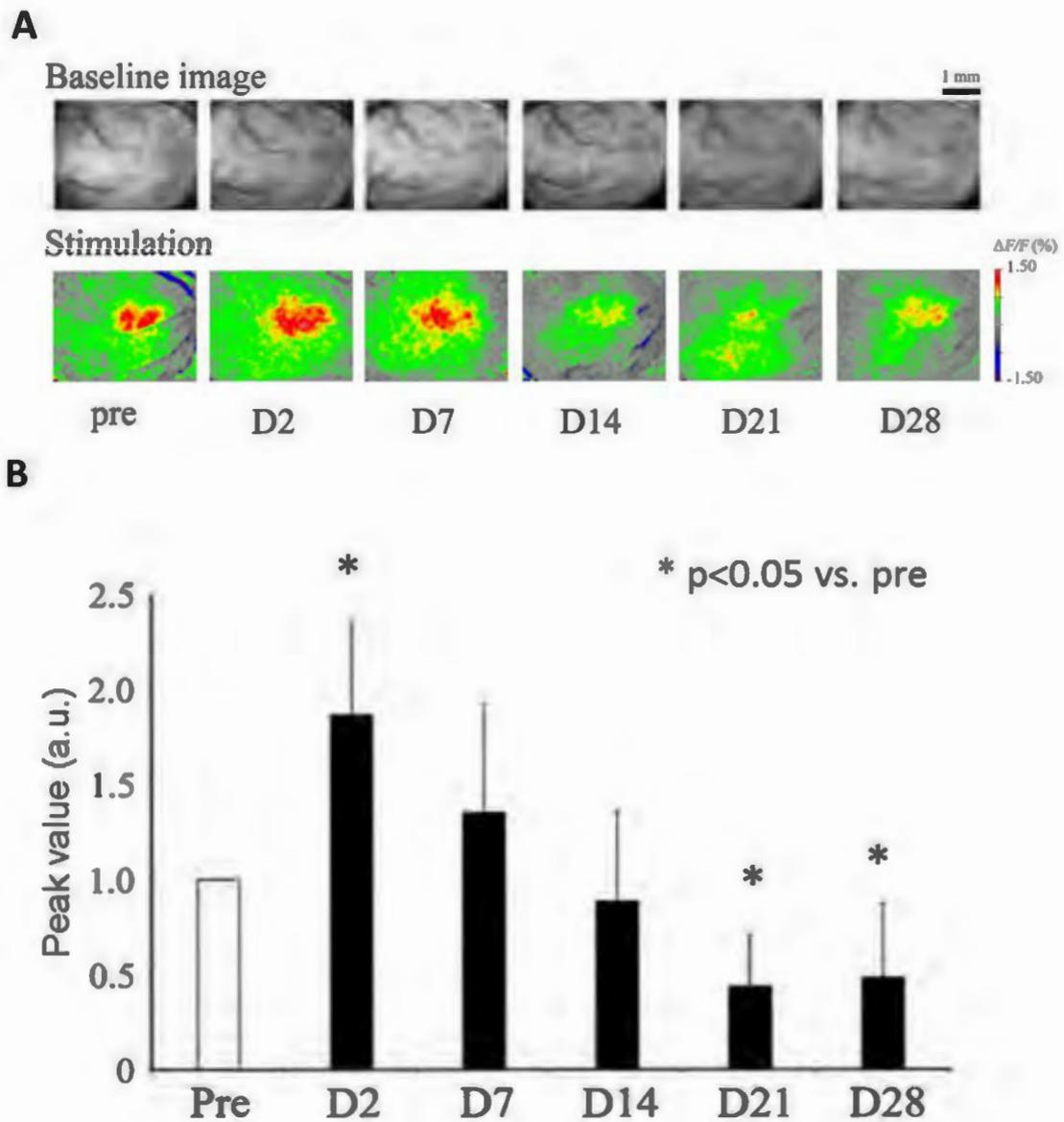


図 10 A:慢性低灌流モデルマウスにおける補正フラビン蛍光イメージング (FAI) 画像の変化。ベースライン画像 (上) と刺激期間中 (2.0s:下) の画像を示す。B:補正 FAI の信号変化率のピーク値の変化。結紮後における各値は結紮前 (Pre) に対する変化率の値を示す。\*は Pre に対して有意な違いがあるかを示す。\*P<0.05。

## 2-4 考察

本章の研究により、フラビン蛋白蛍光イメージングにおける脳血流の影響は除去され、慢性低灌流モデルマウスにおけるフラビン蛍光変化量は病態の時期により変化することが明らかとなった。我々の補正法で得られた補正 FAI 信号値の変化は、脳血管反応を薬剤で抑制した過去の研究におけるフラビン蛍光変化と類似しており (Vazquez et al., 2012)、脳血流による影響を除去できたといえる。本研究により開発された補正法は脳血管障害モデルの神経評価だけでなく様々な研究において有用であると考えられる。

フラビン蛋白蛍光イメージングに影響を与えた脳血管反応による吸光や散乱の増加の明確なメカニズムはよく理解されていない。現在の技術で脳の蛍光変化を引き起こす全ての要因を完全に同定することは非常に難しい。本研究の補正法における重要な点は、吸光や散乱の情報を得るために実際の測定値 (IOSI) を使用したことである。IOSI を使用することで吸光や散乱の原因となる要素の特定は必要なく、実際の信号変化の合計から補正 FAI の計算を行うことができる。また、酸素化ヘモグロビンと脱酸素化ヘモグロビンの吸強係数は異なっているが、FAI や IOSI で使用される波長はそれらの吸光係数が等しくなる点である。したがって、酸素化ヘモグロビンと脱酸素化ヘモグロビンの存在比の変化を考慮する必要が無い。

開発されたフラビン蛋白蛍光イメージングの補正法は、CO<sub>2</sub> 吸入負荷を使用した 2 つの検証実験により確かめられた。CO<sub>2</sub> 吸入負荷による高炭酸ガス血症状態は神経活動に変化を与えず血管拡張を引き起こすことが報告されている (Matsuura et al., 2003)。安静時に CO<sub>2</sub> 吸入負荷を行った場合に IOSI 信号値及び

未補正 FAI 信号値は血流増加に伴う吸光や散乱の増加により減衰を示し、一方で、補正 FAI 信号値は測定期間中ほぼ一定であった (図 7)。フラビン蛍光は神経活動に伴う酸素代謝の増加により輝度の増加を示すため、安静時の変化は僅かであると考えられる。したがって、補正 FAI の信号値が一定であったことは、信号値の過大もしくは過小な補正が無いということが示唆される。また、感覚刺激時に CO<sub>2</sub> 吸入による過剰な血管反応を誘発する検証実験は、脳血管障害モデルにおいて本補正法が有効であるかのシミュレーションであるといえる。この実験において補正前では異なっていた FAI 信号値が補正により同様な変化を示した (図 8)。マウスに対して行った感覚刺激は同じであるため、この結果は妥当であり、補正法が脳血管障害モデルの評価において有用であることが示された。これら、2つの検証実験により、本補正法はフラビン蛋白蛍光イメージングにおいて脳血流の影響を除去し、純粋なフラビン蛍光変化のみを評価できる方法であるといえる。

図 6C に示すように、未補正の FAI 信号値と補正後の FAI 信号値のピークは有意に異なっていた。つまり、未補正の FAI において血管反応が起きる前のピークを評価する方法では、神経活動量の変化を過小に評価している可能性がある。健康な動物において神経変化と脳血流反応は相関し、高い再現性を示すことが報告されている (Matsuura et al., 2001)。そのため、健康な動物における神経活動の評価は未補正の FAI でも可能であるものの、本補正法を使用することでより正確な評価が可能になる可能性がある。

一方で、本補正法を使用することで値はベースラインの値に対する変化率に変換される。したがって、刺激無しの条件でのフラビン蛍光の絶対値の比

較には不向きであるため、例えば、安静時のミトコンドリアの機能評価に用いることができない。また、安静時における神経活動は脳血流に大きな影響を与えないと仮定して、安静時における FAI と IOSI 測定値の回帰直線の傾きを補正法に用いているが、脳血流に変化が見られるほど安静時の自発発火が増加するような病態モデルでは、この補正法を使用した正確な評価はできない可能性がある。

開発された補正法を使用し、慢性低灌流モデルマウスの神経機能は経時的に測定された。補正 FAI 信号値のピークは、結紮手術の 2 日後に増加を示し、21 日後と 28 日後に減少を示した (図 10)。フラビン蛍光は酸素代謝の亢進により蛍光の増加を示すため、この結果は結紮直後における賦活時の神経活動が増加することと、21 日後以降に神経活動が減少すること示している。本章で明らかとなった慢性低灌流モデルマウスにおける酸素代謝の病変については第 7 章において、他の章の結果を踏まえて総合的に考察を行う。

### 3. 2光子顕微鏡を使用したカルシウムイメージングによる神経細胞レベルでの神経機能評価

#### 3-1 序論

##### 3-1-1 2光子励起顕微鏡によるカルシウムイメージング

近年の蛍光イメージング装置の発展や蛍光蛋白質の開発に伴い、個々の脳神経細胞や脳神経回路網の活動をリアルタイムでイメージングする方法は、空間的かつ時間的な知見を得るために非常に有用な手段のひとつとされている。特に、2光子励起レーザー顕微鏡は、試料の深部（~1mm）において高時空間解像度の蛍光観察が可能であり、1つの波長の励起光で多重蛍光観察が可能であることなどから脳神経科学の研究において非常に有効なツールとされている（Denk et al., 1990）。*in vivo* 研究において2光子励起顕微鏡は血管、神経細胞、グリア細胞、脳内蛋白質など様々なものの機能的及び経時的な観察に使用されているが、その中で多数のニューロンの活動の計測を行うのが2光子励起機能的カルシウムイメージング法である（Stosiek et al., 2003）。カルシウムイメージングの原理は、ニューロンの活動電位発生時に生じる細胞内カルシウムの濃度上昇を、カルシウム蛍光指示薬の蛍光変化として捉えることで、ニューロンの活動を計測するというものである。このカルシウムイメージングの技術が2光子顕微鏡での*in vivo* 研究に応用されている。この方法は、一時視覚野におけるニューロンの視覚応答性の研究に使用されその有用性がこれまでに示されている（Ohki et al., 2005）。

##### 3-1-2 本研究では

本研究では慢性低灌流モデルマウスにおけるニューロンレベルでの神

経活動の疾患による変化を調べるために、遺伝子導入技術により神経細胞に特異的にカルシウム感受性蛍光蛋白である GCaMP3 を発現させた遺伝子改変マウスを使用して、2光子顕微鏡によるカルシウムイメージングを行った。マウスの脳領域は血管を目印としての特定を行い、1ヶ月にわたって同じ領域が測定された。フラビン蛍光イメージングによる評価と同様に頬ひげへの感覚刺激による神経活動の測定と評価を行うとともに、安静時の自発活動についても測定し評価を行った。

## 3-2 材料と方法

### 3-2-1 動物の準備

合計 10 匹のオスの遺伝子改変マウス (GCaMP3: 神経細胞にカルシウム感受性蛋白を発現) を実験に使用した。遺伝子改変マウスは過去の研究に基づき (Chen et al., 2012, Zariwala et al., 2012)、放射線医学総合研究所で作成した。これらのマウスに対して 2 章の材料と方法に記述されるように飼育及び頭蓋窓手術、UCCAO 手術を実施した (2-2-2)。これらのマウスを UCCAO 手術前、7、14、21、28 日後に 2 光子励起顕微鏡で測定した。

### 3-2-2 2 光子励起顕微鏡による測定

血管の染色のために 10 mM になるように生理食塩水に溶かしたスルホロダミン 101 (SR101; MP Biomedicals, Irvine, CA) を測定の直前にマウスの腹腔内に投与した (8  $\mu$ L/g body weight)。覚醒状態のマウスを 2 章の材料と方法に記述される方法 (2-2-3) と同様に 2 光子励起顕微鏡の対物レンズ下に固定し、励起波長 900 nm の 2 光子パルスレーザー光 (TCS-SP5 MP, Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany) によってリアルタイムイメージングを行った。マウスの脳から発せられた蛍光をビームスプリッターにより分離し、SR101 と GCaMP の蛍光を記録するために 2 つのバンドパスフィルター (SR101 : 610 $\pm$ 75 nm、GCaMP: 525 $\pm$ 50 nm) を介して検出した。1 つの平面画像は 512 $\times$ 512 ピクセルで構成され、1 ピクセルあたり 0.9  $\mu$ m である (図 11)。

神経細胞の機能画像を 4 フレーム/秒の時間分解能で測定し、皮質表面からの深度は約 200  $\mu$ m であった。安静時の自発発火測定実験では 4 分間の測定を 2 分間のインターバルで 3 回行った。感覚刺激時の実験では 30 秒の測定を 30 秒のインターバルで 3 回行い、測定開始の 10 秒後から 2 秒間マウスの頬ひげに空

気流刺激を与えた。刺激についての詳細は2章の材料と方法に記述されて

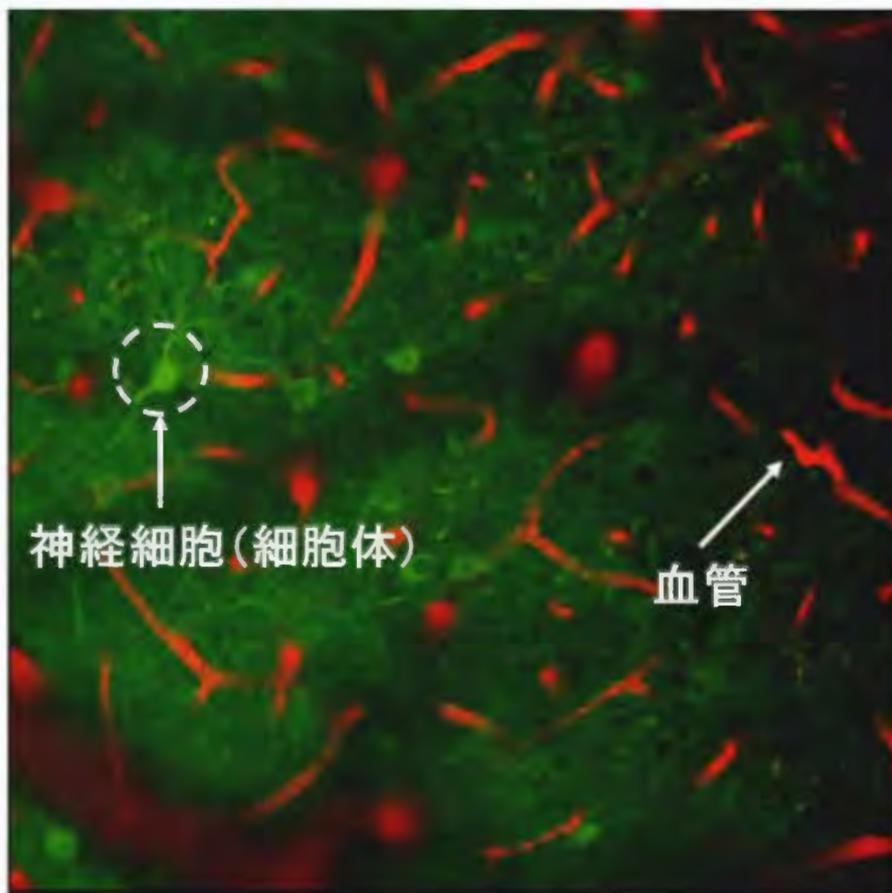


図 11 2光子励起レーザー顕微鏡により測定された画像。赤が SR101 により染色された血管、緑が GCaMP3 (神経細胞) を示す。

いる (2-2-5)。

### 3-2-3 2 光子カルシウムイメージングの画像解析

2 光子顕微鏡によるカルシウムイメージング画像の解析は、数値計算ソフトウェア Matlab (MathWorks, MA, USA)を使用して行った。神経細胞の自発発火の評価の場合では、まず、マウスが運動したタイミングのデータの削除を行った。具体的には、血管画像 (赤) を使用し、トライアル内の平均画像から 20% 以上ずれた時間をマウスが運動したと定め、データから除去した。次に、動きの補正を NoRMCorre (Pnevmatikakis et al., 2017) を使用して行った。時間軸方向の maximum intensity projection (MIP) 処理により得られた画像上に手書きで円形の ROI を描き、ROI 内の平均値輝度の時間変化を求めた。データを 1 分ごとに分離し、輝度が平均値+2×SD 以上を示したときに発火と定義し、発火細胞数と発火頻度を求めた。発火細胞数は単位時間 (1 分間) において同一細胞が何度発火しても 1 個とカウントしたものであり、発火頻度は 1 分間において 1 細胞が発火した数の平均値である。各個体の領域ごとに結紮前に対する発火細胞数と頻度の変化率を求めた (図 12)。

感覚刺激時の解析では運動時のデータは除去されず、すべてのタイムポイントにおけるデータを使用した。上記のように動きの補正が実施され、10 秒間にわたる安静時の平均画像で全タイムポイントの画像が割られ変化率の画像を求めた。刺激期間中の画像を MIP 処理し、その画像を使用して ROI を手書きで描いた。ROI 内の平均変化率が、バックグラウンドにおける刺激中の平均変化率+SD 以上を示した場合に、刺激に反応して発火した細胞として数をカウントした (図 13)。また、刺激に反応して発火した細胞の信号変化率のピークを求めた。自発発火の評価と同様に、UCCAO 前に対する変化率として評価した。

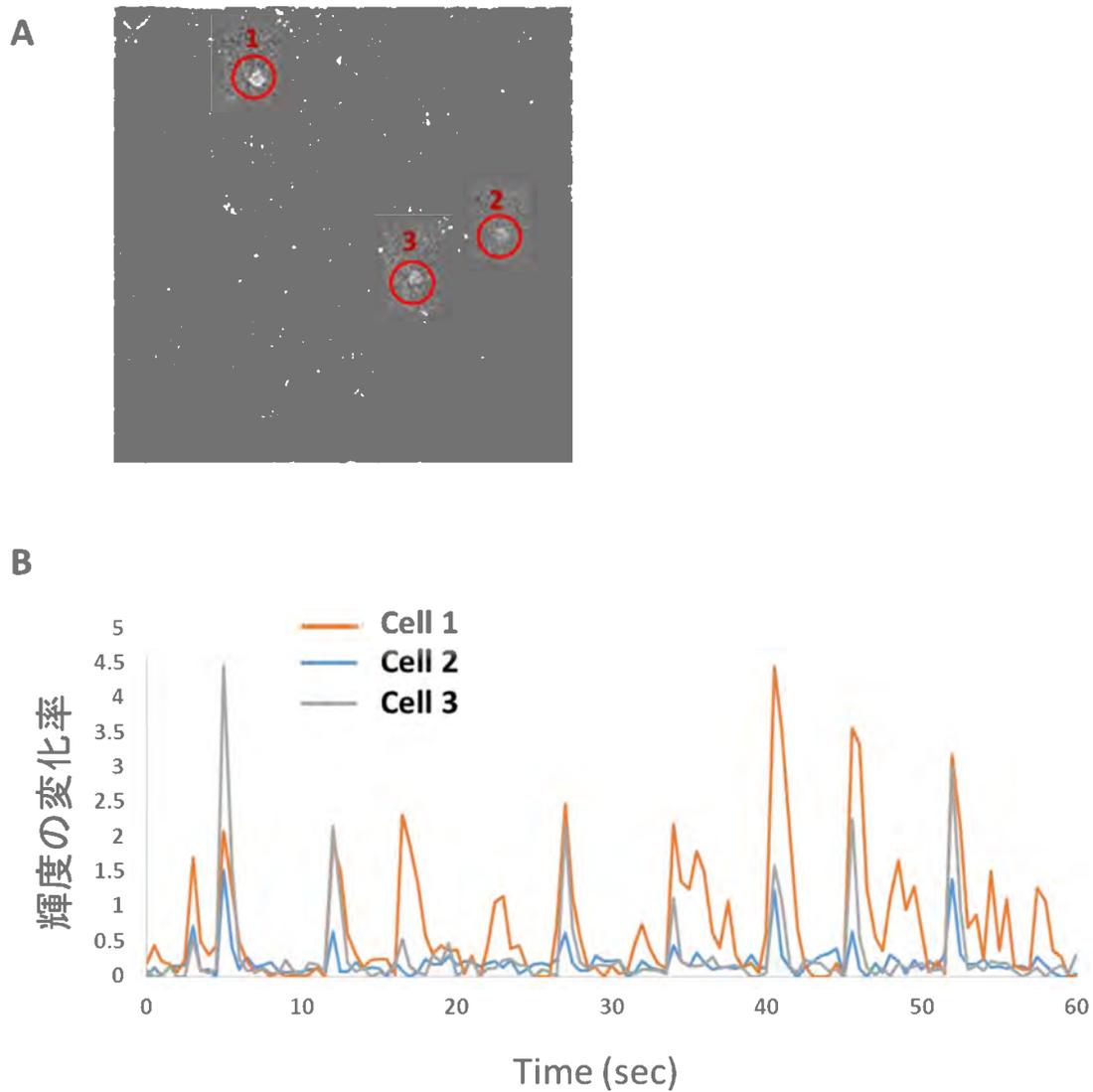


図 12 A:緑色蛍光の輝度変化率画像。この画像上に関心領域 (ROI) を描き神経発火細胞数及び、発火頻度を求めた。B:代表的な神経細胞の輝度変化率。輝度が平均値+2×SD 以上を示したときに発火と定義した。各波形は図 12A の細胞に対応している。

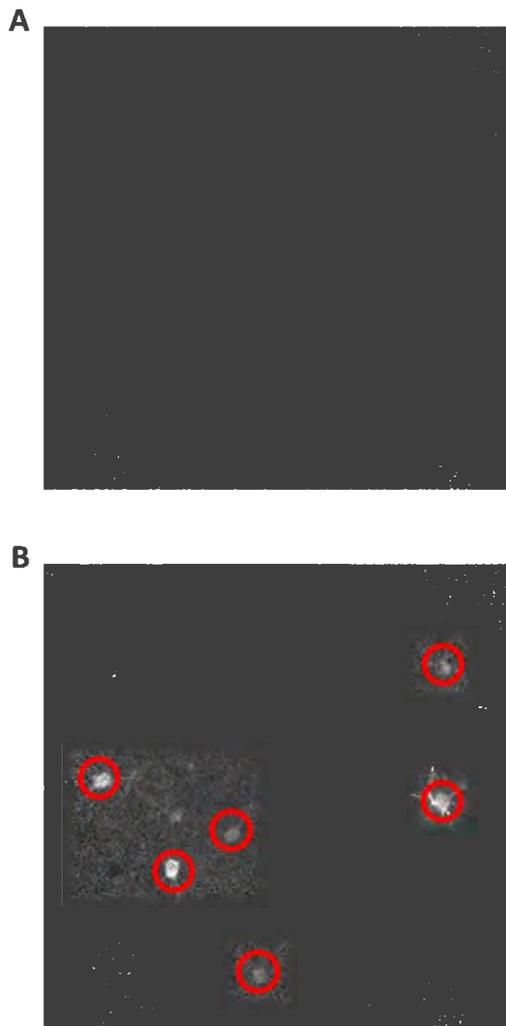


図 13 緑色蛍光の輝度変化率画像。A:感覚刺激前のベースライン画像。B:感覚刺激中における輝度変化率画像。この画像上に関心領域 (ROI) を描き神経発火細胞数及び、輝度変化を求めた。

#### 3-2-4 統計解析

マウスの個体や領域ごとに神経活動の基底値が異なるため、結果は個体ごとに結紮手術前に対する変化率を求め、その後、全個体で平均した。結果における数値は、平均値±standard deviation (SD)を示す。統計解析は One-way ANOVA を行った後の Tukey-Kramer 法によって行われた。 $P < 0.05$  を有意とした。

### 3-3 結果

#### 3-3-1 安静時における神経活動の変化

安静時におけるマウスの自発発火について、自発発火細胞数と自発発火頻度を調べた。手術前と比較した単位時間当たりの自発発火細胞数は、結紮手術の7日後に有意な増加を示した ( $1.22 \pm 0.35$ ,  $P < 0.05$ ) (図 14A)。14日後における有意な違いは確認されなかったが ( $0.89 \pm 0.25$ )、21日後 ( $0.68 \pm 0.19$ ,  $P < 0.001$ ) と28日後 ( $0.66 \pm 0.23$ ,  $P < 0.001$ ) において有意な減少が示された (図 14A)。

細胞あたり自発発火頻度は結紮手術の7日後 ( $0.97 \pm 0.12$ ) と14日後 ( $0.95 \pm 0.20$ ) では有意な変化を示さなかったが、21日後 ( $0.82 \pm 0.12$ ,  $P < 0.01$ ) と28日後 ( $0.87 \pm 0.16$ ,  $P < 0.05$ ) において有意な減少を示した (図 14B)。

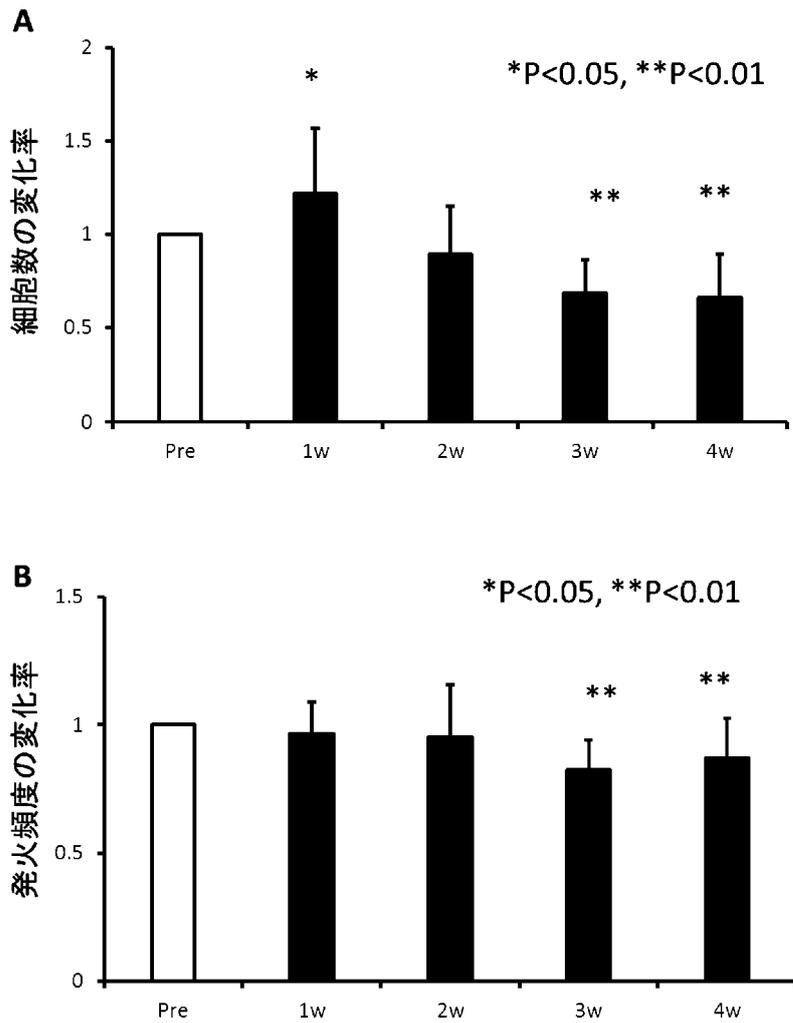


図 14 慢性低灌流モデルマウスにおける自発神経発火の変化。A: 自発発火細胞数の変化。各値は結紮前 (Pre) に対する発火細胞数の変化率を示す。B: 自発発火頻度の変化。各値は結紮前 (Pre) に対する発火頻度の変化率を示す。図 AB 共に\*は Pre に対する有意な違いを示す。\*P<0.05、\*\*P<0.01。

### 3-3-2 賦活時における神経活動の変化

感覚刺激時のマウスの神経活動について、感覚刺激に反応して蛍光輝度変化を示した細胞数と輝度変化について調べた。手術前と比較して、発火細胞数は結紮手術の7日後に有意な増加を示した ( $1.41 \pm 0.62$ ,  $P < 0.01$ )。14日後 ( $1.26 \pm 0.87$ )、21日後 ( $1.17 \pm 0.61$ )、28日後 ( $1.19 \pm 0.49$ ) における発火細胞数に有意な違いは無かった (図 15)。

刺激に反応して発火を示した細胞の平均輝度変化の波形を図 15A に示し、輝度変化のピークの平均値を図 15B に示す。輝度変化のピーク値は結紮前に比べて7日後に有意な増加を示した ( $1.21 \pm 0.24$ ,  $P < 0.05$ ) (図 16)。14日後 ( $0.97 \pm 0.34$ ) 及び21日後 ( $0.92 \pm 0.23$ ) における有意な結紮前との違いは無かったが、28日後 ( $0.76 \pm 0.25$ ,  $P < 0.01$ ) において有意な低下が確認された。

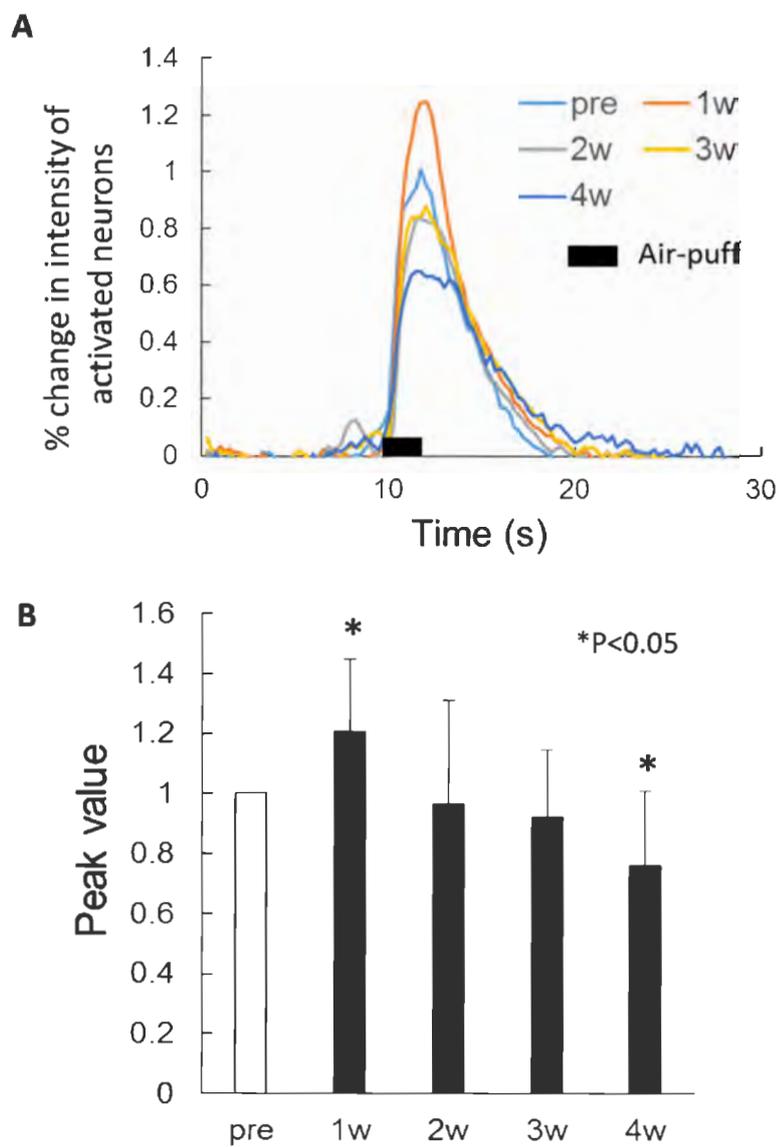


図 15 慢性低灌流モデルマウスにおける、神経細胞の感覚刺激に対する輝度変化。A:感覚刺激に反応を示した細胞の時間反応曲線。B:緑色蛍光の輝度変化率のピーク値の変化。結紮後における各値は結紮前 (Pre) に対する変化率の値を示す。\*は Pre に対して有意な違いがあるかを示す。\*P<0.05。

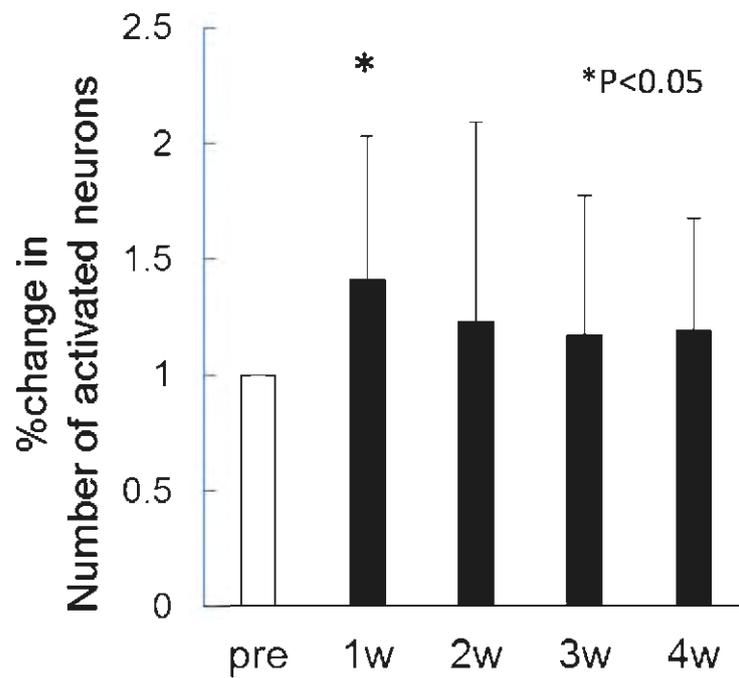


図 16 慢性低灌流モデルマウスにおける、神経細胞の感覚刺激に対する発火細胞数の変化。結紮後における各値は結紮前 (Pre) に対する変化率の値を示す。\* は Pre に対して有意な違いがあるかを示す。\*P<0.05。

### 3-3 考察

2光子顕微鏡によるカルシウムイメージングを使用して、慢性低灌流マウスにおける安静時の自発発火細胞数、自発発火頻度の変化や、感覚刺激に反応を示す細胞数や、輝度変化率の経時的な変化を調べた。安静時および感覚刺激時には共に結紮手術の1週後に有意な神経活動の増加を示し、3週または4週後には有意な神経活動の低下を示した（図14-16）。

脳の神経細胞は外部からの入力無くとも恒常的な発火活動を示す。例えば光の無い暗闇においても視覚野が常に活動を示すことや (Fiser et al., 2004)、スライス標本においても自発的な活動を示すことが報告されている (Sanchez et al., 2000, Mao et al 2001)。脳の自発活動の意味は十分には解明されていないが、神経系の恒常性を保つために重要な働きをしていることが考えられる。脳の自発活動は興奮性ニューロンと抑制性ニューロンによって調節されるが、本研究でカルシウムセンサー蛋白として使用した GCaMP3 は興奮性ニューロンに特異的な発現を示す。したがって、本研究で明らかとなった、自発神経発火の慢性低灌流モデルマウスにおける病変は神経細胞全体のものではなく、興奮性ニューロンに特異的なものであることに注意する必要がある。

慢性低灌流モデルマウスの結紮手術直後と慢性期（4週後）において、感覚刺激による神経賦活に対する反応の違いを示した。GCaMP3 は神経活動に伴う細胞外からの  $\text{Ca}^{2+}$  の流入に応じて蛍光輝度変化を示すため、輝度変化率の違いはすなわち、カルシウム流入量の違いを示している。カルシウム流入の調節機構の異常は、認知症を含む様々な神経変性疾患の原因であることが言われている (Bading, 2013)。

本章の研究で明らかとなった慢性低灌流モデルマウスにおける神経機能の病変については第7章において、他の章の結果を踏まえて総合的に考察を行う。

## 4. 磁気共鳴スペクトロスコピー（MRS）を使用した脳代謝物の評価

### 4-1 序論

#### 4-1-1 磁気共鳴スペクトロスコピー（MRS）とは

磁気共鳴スペクトロスコピーはMR装置を使用して、生体中の代謝物を非侵襲的に測定し、様々な病態解析を行うことができる方法である（Frahm et al., 1989）。高磁場MR装置の普及が進んだことや、簡便に解析できるソフトウェアの開発が進んだことで、脳を対象としたMRSは広く一般的に使用されている（Provencher, 2001）。<sup>1</sup>H-MRSは様々な代謝物における水素原子からの信号を、縦軸に信号強度、横軸に周波数としたスペクトルを得る方法である。一般に、生体の脳白質における水の濃度は35Mとされているが、MRSが対象とする脳代謝物の濃度は高くても15mM程度である。脳代謝物は水に対して1/1000程度の濃度しかないため、そのままの状態では代謝物の小さなピークは水の大きなピークに埋もれてしまう。そのため、MRSデータを取得する場合には水の信号は抑制して測定される。水の抑制により解析可能となったMR信号のケミカルシフトの違いから代謝物の特定や評価を行う。

#### 4-1-2 MRSにより測定される代表的な脳代謝物

N-アセチルアスパラギン酸（NAA）：MRSにおけるNAAのピークは、2.0ppmに認められる。NAAは脳内に大量に存在するアミノ酸で、神経細胞のミトコンドリアで作られ、軸索から細胞外液へ一定の割合で流出する。NAAの量は、神経細胞の密度やミトコンドリアの機能の指標とされており、NAAの低下は神経細胞の消失（不可逆性）や軸索の障害（神経の機能低下）を反映しているといわれる。

クレアチン (Cr) とクレアチンリン酸 (PCr) : MRS においてクレアチンとクレアチンリン酸は 3.0ppm と 3.9ppm に重なったピークとして観察され、2つの化合物を分離して観察することは困難であるため、総クレアチン (t-Cr) として評価される。これらはエネルギー代謝に関連する代謝物であり、クレアチンリン酸は代謝されてもクレアチンに変化するため、t-Cr としてみたときの総量は変化しない。t-Cr のピークは年齢や疾患による変化が少ないといわれ、他の脳代謝物濃度の指標とされることもある (Govind et al., 2015)。一方で、グリア細胞の増殖時に総量が増える傾向にあるともいわれる。

グルタミン酸 (Glu) とグルタミン (Gln) : グルタミン酸とグルタミンは似た構造を持つため、MRS において 2.3ppm 付近に両者が重なった状態で観察される。グルタミン酸は興奮性神経伝達物質であり、シナプス全細胞から細胞外に放出される。グルタミン酸は神経系において毒性を持つことが知られ、虚血状態において細胞死を引き起こすことが知られる (Choi, 1988)。過剰となったグルタミン酸はグルタミンに変換される。グルタミンは浸透圧調整作用を持つため、細胞内にグルタミンが過剰に存在すると浮腫を生じる。

$\gamma$ -アミノ酪酸 (GABA) : MRS において GABA は 2ppm と 2.3ppm と 3ppm に3つのピークを示すが、これらのピークは GABA より脳内の濃度が高く強いシグナルを示す NAA (2.0ppm)、Glu と Gln (2.3ppm)、t-Cr (3.0ppm) のピークに重なっているためこれらの化合物との区別は困難とされてきた。しかし近年の MRS 測定技術の発展により GABA の検出が可能となってきた (Puts et al., 2012)。GABA は中枢神経系における抑制性の神経伝達物質としてよく知られている (Tyagaraja et al., 2014)。

タウリン (Tau) : タウリンは中枢神経系において2番目に豊富なアミノ酸であり、MRS では 3.3ppm にピークが認められる。タウリンは抑制性の神経伝

達物質としての役割や、細胞膜構造の維持、神経保護作用などの役割を持つことが知られている (Wu et al., 2010)。虚血状態下においてタウリンは多量に放出され、興奮性毒性に対する神経保護効果を持つことが報告されている (Saransaari et al., 1997)。

#### 4-1-3 本研究では

慢性低灌流マウスにおける神経活動などの疾患による変化は脳代謝産物の変化を引き起こしている可能性がある。したがって、本研究では、慢性低灌流マウスにおける脳代謝産物の変化を明らかにするため、フラビン蛋白蛍光イメージングやカルシウムイメージングの実験で神経活動の増加が示唆された結紮手術直後と、認知機能障害が報告されている結紮手術の 1 ヶ月後における脳代謝産物の MRS による評価を行った。

## 4-2 材料と方法

### 4-2-1 動物の準備

合計 7 匹のオスの C57BL/6J マウスを実験に使用した。これらのマウスに対して 2 章の材料と方法に記述されるように飼育及び UCCAO 手術を実施した(2-2-2)。MRS の測定は UCCAO 手術前と手術の 2 日後と 28 日後に行った。

### 4-2-2 MRS 測定

MRI 測定中、マウスは 1.5~2.0%のイソフルランを含む、酸素と空気の混合ガス(1:5)で麻酔した。直腸温度を光ファイバー温度計(FOT-M, FISO, Quebec, QC, Canada)でモニターし、加熱パッド(Temperature control unit, Rapid Biomedical, Rimpar, Germany)によって  $37.0 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$  に維持した。また、測定中には温風を自動加熱装置により調整し、MRI 装置内に送風した。MRI 測定中マウスをうつぶせの状態、ハンドメイドのイヤバーで所定の位置に固定した。

$^1\text{H}$ -MRS 測定のための関心領域(ROI)を大脳皮質に  $3.0 \times 3.0 \times 1.5\text{mm}$  の大きさで選択した。シグナル取得は PRESS (point-resolved spectroscopy) シーケンス(Bottomley, 1987)と outer-volume suppression 法(Roux et al., 1998)を組み合わせで行った(number of repetitions = 192; TR = 4000 msec; TE = 20 msec; spectral bandwidth = 4 kHz; number of data points = 2048)。

### 4-2-3 MRS データ解析

MRS のデータ解析は LCModel を使用して行った(Provencher et al., 2001)。MRS 測定値は LCModel の modified water scaling 法を用いて定量分析した。LCModel が 20 以下の標準偏差(%SD)を示したとき(%SD がより小さいほど信頼性の高いデータであるとされる)、代謝物(NAA、t-Cr、Glu、Gln、GABA、

Tau) の濃度は信頼性があるとして評価した (Atwood et al., 2007)。

#### 4-2-4 統計解析

結果における数値は、平均値±standard deviation (SD) を示す。統計解析は One-way ANOVA を行った後の Tukey-Kramer 法によって行われた。P<0.05 を有意とした。

### 4-3 結果

#### 4-3-1 MRS による脳代謝物測定

慢性低灌流モデルマウスの結紮手術前、結紮手術の2日後、28日後における皮質の脳代謝物の濃度を図17に示す。全てのマウスにおいて、NAA、t-Cr、グルタミン酸、タウリンの%SDは5以下であり、これらの3群の平均は3未満であった。また、全ての個体におけるグルタミンとGABAの%SDは15以下であり、これらの3群の平均は10未満であった。

NAAの濃度は結紮前 ( $5.99 \pm 1.15 \mu\text{mol/g}$ ) に比べ、結紮2日後 ( $7.18 \pm 0.77 \mu\text{mol/g}$ ) に有意な増加を示した ( $P < 0.05$ )。結紮28日後におけるNAAの濃度 ( $6.36 \pm 0.79 \mu\text{mol/g}$ ) は結紮前と比較して有意な違いはなく、結紮2日目と比較して有意な低下を示した ( $P < 0.05$ )。また、グルタミン酸の濃度も結紮前 ( $8.30 \pm 1.71 \mu\text{mol/g}$ ) に比べ、結紮2日後 ( $9.84 \pm 1.37 \mu\text{mol/g}$ ) に有意な増加を示した ( $P < 0.05$ )。結紮28日後におけるグルタミン酸の濃度 ( $8.70 \pm 1.65 \mu\text{mol/g}$ ) は結紮前及び結紮2日目と比較して有意な違いは無かった。t-Cr、グルタミン、GABA、Tauの全ての代謝物において結紮による有意な濃度の変化は2日後、及び28日後において示されなかった (t-Cr; Pre:  $5.87 \pm 0.97 \mu\text{mol/g}$ , day2:  $6.15 \pm 0.68 \mu\text{mol/g}$ , day28:  $5.84 \pm 0.93 \mu\text{mol/g}$ 、グルタミン; Pre:  $3.65 \pm 1.15 \mu\text{mol/g}$ , day2:  $3.64 \pm 0.53 \mu\text{mol/g}$ , day28:  $3.59 \pm 0.86 \mu\text{mol/g}$ 、GABA; Pre:  $1.96 \pm 0.35 \mu\text{mol/g}$ , day2:  $2.33 \pm 0.66 \mu\text{mol/g}$ , day28:  $1.86 \pm 0.42 \mu\text{mol/g}$ 、Tau; Pre:  $7.48 \pm 1.98 \mu\text{mol/g}$ , day2:  $8.10 \pm 0.56 \mu\text{mol/g}$ , day28:  $6.86 \pm 1.30 \mu\text{mol/g}$ )。

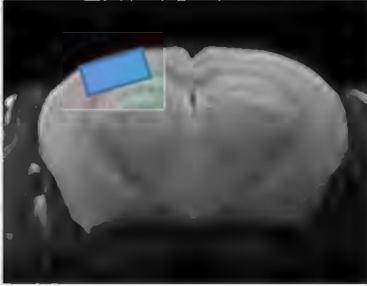
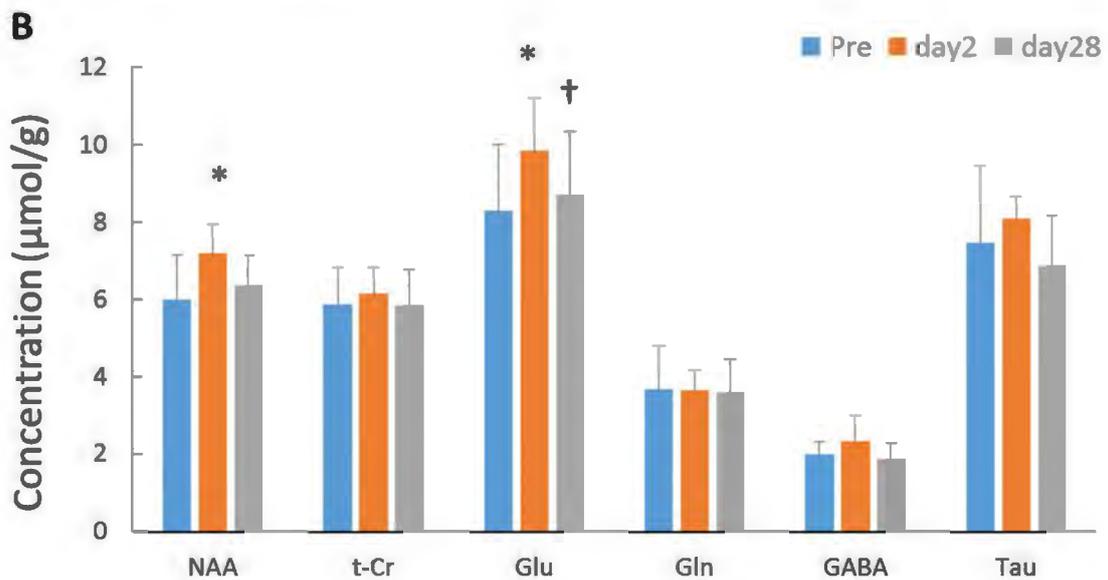
**A****B**

図17 A: MR スペクトロスコピー (MRS) 測定領域。マウスの結紮側における大脳皮質 (青) の脳代謝産物が測定された。B:MRS により求められた脳代謝産物濃度。結紮手術前 (Pre)、2 日後及び 28 日後の結果を示す。\*は Pre に対する有意な違いを示し、†は 2 日後に対する有意な違いを示す。\*、†ともに  $P < 0.05$ 。

#### 4-4 考察

本章の研究では MRS を使用した脳代謝産物測定により、慢性低灌流モデルマウスにおける結紮 2 日後の NAA とグルタミン酸の増加を明らかとなった (図 17B)。この結果は、脳代謝物濃度の指標とされる総クレアチンの濃度に変化が無かったことや、これらの物質において LCModel の %SD が低かったことから確からしい結果であるといえる。

脳梗塞を引き起こすような急激な脳虚血状態においては、酸素及びグルコースの欠乏の結果として好気代謝が停止し、嫌気性代謝の亢進により乳酸の量が増加する (Cataldo et al., 1986, Schurr et al., 1997)。そしてその後、グルタミン酸の興奮毒性により神経細胞死を引き起こる (Lau et al., 2010)。MRS において乳酸は 1.3ppm 周辺で 2 峰性のピークとして観察されるが、一般に正常組織では観察することができず、このような嫌気代謝が亢進するような状態において観察される。本章の研究において、乳酸の有意なピークを確認することはできなかった。したがって、慢性低灌流モデルマウスにおける嫌気代謝の亢進は 2 日後や 28 日後においてなかったことが考えられる。

また、脳梗塞は細胞性浮腫を生じることが知られている。脳浮腫のマーカであるグルタミンに変化は無かったことは、慢性低灌流モデルマウスにおいて脳浮腫が生じていない可能性を示唆している。

本章の研究で明らかとなった慢性低灌流モデルマウスにおける脳代謝産物の変化については第 7 章において、他の章の結果を踏まえて総合的に考察を行う。

## 5. 拡散 MRI を使用した神経線維損傷の評価

### 5-1 序論

#### 5-1-1 拡散 MRI とは

拡散 MRI とは、生体内の水分子が拡散する方向および速度を MRI 装置で計測する手法である。拡散 MRI により得られる水拡散の情報から、脳の白質における繊維束の走行や組織特性などを研究することができる。水分子は何も障壁が無ければ、全ての方向に均一に拡散する（等方性拡散）。一方で、生体内においては水分子の移動を抑制する組織が多く存在する。特に白質組織内においては、水分子の拡散方向は神経線維束の方向によって強く制限される。そのため、水分子は繊維束と並行する方向によく拡散し、直行する方向にはあまり拡散しない（異方性拡散）。このような水分子の拡散を評価する方法にテンソルモデルを使用した方法がある（Basser et al., 1994）。このモデルでは、3次元の楕円球で水の拡散を表現する方法で、3つの固有ベクトルから構成される。テンソルモデルを用いた拡散強調 MRI を、拡散テンソルイメージング（Diffusion Tensor Imaging; DTI）という。DTI は神経の損傷を評価するための重要なツールとして使用されている（Abe et al., 2002, Taoka et al., 2016）。DTI においてよく使用される尺度に平均拡散能（Mean Diffusivity; MD）と異方性比率（Fractional Anisotropy; FA）がある。MD は拡散テンソルの3方向の固有ベクトルの平均であり、水拡散が大きい場合に高くなる。FA は各ボクセルにおける水拡散の異方性を表すもので、等方性に近い水拡散では FA は低く、異方性の高い水拡散の場合には FA は高くなる。本研究においてこの MD と FA の値を評価した。

#### 5-1-2 慢性低灌流モデルマウスにおける DTI 研究の問題点

これまでにDTIを使用した慢性低灌流に関する研究は両側総計動脈結紮 (bilateral common carotid artery occlusion: BCCAO) ラットモデルにおいて行われている (Soria et al., 2013, Wang et al., 2015)。これら2つの研究において、視神経や視索における結果は一致していたものの、認知機能に關与する皮質や海馬、白質における結果は異なっていた。一方では皮質における MD の変化を示さなかったが (Wang et al 2015)、もう一方は MD の増加を示した (Soria et al., 2013)。この DTI による研究結果の違いは、それぞれの慢性低灌流モデル動物における脳血流低下量の違いに起因する可能性がある。拡散 MRI では水の拡散だけでなくボクセル内の毛細血管流 (Intravoxel incoherent motion; IVIM) も信号に影響を与える (Le Bihan et al., 1986, Iima et al., 2015, Ichikawa et al., 2017)。血流の影響が拡散 MRI に与える影響の尺度として使用される IVIM の擬似拡散係数 ( $D^*$ ) は脳血流の値と正の相関を示すことや (Hu et al., 2015, Shen et al., 2016)、肝硬変による肝臓の血流低下は  $D^*$  の減少を引き起こすことなどが報告されている (Patel et al., 2010)。つまり、慢性低灌流モデルなどの脳血流に変化があるモデル動物では、ニューロンの損傷と血流変化の両方が DTI の結果に影響を及ぼす可能性がある。したがって、このような脳血管疾患モデル動物では脳血流が及ぼす DTI パラメータへの影響を考慮した評価が必要となる。

### 5-1-3 本研究では

本研究では、慢性低灌流モデルマウスの神経線維の損傷を調べるため、DTI による水拡散の測定を行った。また、脳血流の変化を Arterial spin-labeling (ASL) MRI により測定した。脳血流が DTI パラメータに与える影響を調べるために、脳血流を考慮しない評価法 (paired t-test) と、考慮した評価法 (Pearson 相関解析及び、脳血流を共変量とした共分散分析) の両方を行った。

## 5-2 材料と方法

### 5-2-1 動物の準備

合計 10 匹のオスの C57BL/6J マウスを実験に使用した。これらのマウスは 2 章の材料と方法に記述されるように飼育及び UCCAO 手術を実施した (2-2-2)。DTI および ASL 測定は UCCAO 手術の 1 ヶ月後に実施した。

### 5-2-2 MRI 測定

MRI 測定中マウスを 1.5~2.0%のイソフルランを含む、酸素と空気の混合ガス (1:5) で麻酔した。直腸温度を光ファイバー温度計 (FOT-M, FISO, Quebec, QC, Canada) でモニターし、加熱パット (Temperature control unit, Rapid Biomedical, Rimpar, Germany) によって  $37.0\pm 0.5^{\circ}\text{C}$  に維持した。また、測定中には温風を自動加熱装置により調整し、MRI 装置内に送風した。MRI 測定中マウスをうつぶせの状態、ハンドメイドのイヤーパーで所定の位置に固定した。

DTI 測定は 4-shot spin-echo echo-planar imaging (EPI)シーケンスを用いて実施した( $\text{TR} = 3.5\text{s}$ ,  $\text{TE} = 23\text{ ms}$ ,  $\text{FOV} = 2.56\text{ cm} \times 2.56\text{ cm}$ ,  $\text{matrix size} = 128 \times 128$ ,  $\text{slice thickness} = 1\text{ mm}$ ,  $\text{gradient directions} = 30$ ,  $\Delta = 10\text{ ms}$ ,  $\delta = 5\text{ ms}$ )。使用した b 値は 0 と  $670\text{ s/mm}^2$  であった。

脳血流の測定は Rapid acquisition with relaxation enhancement (RARE)画像取得による Flow-sensitive alternating inversion recovery (FAIR) ASL 法によって実施した( $\text{TR} = 12\text{ s}$ ,  $\text{TR} = 46.8\text{ ms}$ ,  $\text{FOV} = 2.56\text{ cm} \times 2.56\text{ cm}$ ,  $\text{matrix size} = 128 \times 128$ ,  $\text{slice thickness} = 1\text{ mm}$ , and RARE factor = 72)。選択スライスと非選択スライスの両方において、22 個の異なる反転時間 (inversion times ; TI) での画像を取得した (30, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1100, 1200, 1300, 1400, 1500, 1600, 1700, 1800, 1950, 2100, 2300 ms.)。定量的な脳血流量 (Cerebral blood flow :

CBF) の値はすべての TI における選択スライス画像と非選択スライス画像の信号差から計算した (Kim et al., 1995)。

### 5-2-3 DTI 及び CBF データ処理

データ解析は MatLab を使用して行った。最小二乗法を用いて、ボクセルごとの拡散テンソルを推定した。拡散テンソルの固有値 ( $\lambda_1, \lambda_2, \lambda_3$ ) を使用し、以下の式により平均拡散能 (MD) と異方性比率 (FA) を計算した。

$$MD = (\lambda_1 + \lambda_2 + \lambda_3) / 3 \quad \text{Eq. 1}$$

$$FA = \sqrt{\frac{3}{2}} \sqrt{\frac{(\lambda_1 - MD)^2 + (\lambda_2 - MD)^2 + (\lambda_3 - MD)^2}{\lambda_1^2 + \lambda_2^2 + \lambda_3^2}} \quad \text{Eq. 2}$$

背側皮質 (dorsal cortex)、白質領域である脳梁と外包 (Corpus callosum and External capsule : CC+EC)、海馬 (hippocampus) における関心領域 (ROI) を FA マップ上に手動で描き(図 18B)、各 ROI について MD、FA、CBF の平均値を計算した。

### 5-2-4 補正 MD または FA マップ

共分散分析 (Analysis of covariance : ANCOVA) による解析が有意な影響を明らかにした場合に補正 MD マップまたは補正 FA マップを作成した。ここでは MD マップについての補正方法を説明する (FA にも適用可能)。最初に、ランダムに選ばれた 1 匹の動物の MD マップをテンプレートとし、残りの動物の MD マップの位置合わせを MatLab の Image Processing Toolbox を使用して行った。次に、全ての動物のデータを使用して、各ピクセルにおける MD と CBF の回帰直線の傾き (Slope( $X_i, Y_j$ )) を最小二乗法により推定した。各ピクセルにおける平均 MD (MDave( $X_i, Y_j$ )) と補正 MD (MDcorr( $X_i, Y_j$ )) は以下の式により求め

た。

$$MD_{ave}(Xi, Yj) = \frac{1}{n} \sum_{k=1}^n MD_k(Xi, Yj) \quad \text{Eq. 3a}$$

$$MD_{corr}(Xi, Yj) = \frac{1}{n} \sum_{k=1}^n (MD_k(Xi, Yj) + (CBF_{ave} - CBF_k(Xi, Yj)) \times Slope(Xi, Yj))$$

Eq. 3b,

式における  $CBF_{ave}$  は全個体の dorsal cortex と CC+EC における CBF の平均値である。

#### 5-2-5 統計解析

統計解析を MatLab の Statistics and Machine Learning Toolbox を使用して行った。結果の段落おける全ての値は平均値±SD として表示する。最初に、結紮側と対側の MD、FA、CBF の違いを paired t-test でテストした。CBF と IVIM パラメータの  $D^*$  の正の相関が報告されているので (Hu et al., 2015, Patel et al., 2010)、CBF と DTI パラメータ (FA、MD) 間における Pearson 相関解析を行った。また、結紮側と対側の MD と FA の違いを、CBF を共変量とした ANCOVA を行った。P<0.05 を統計的に有意であるとした。

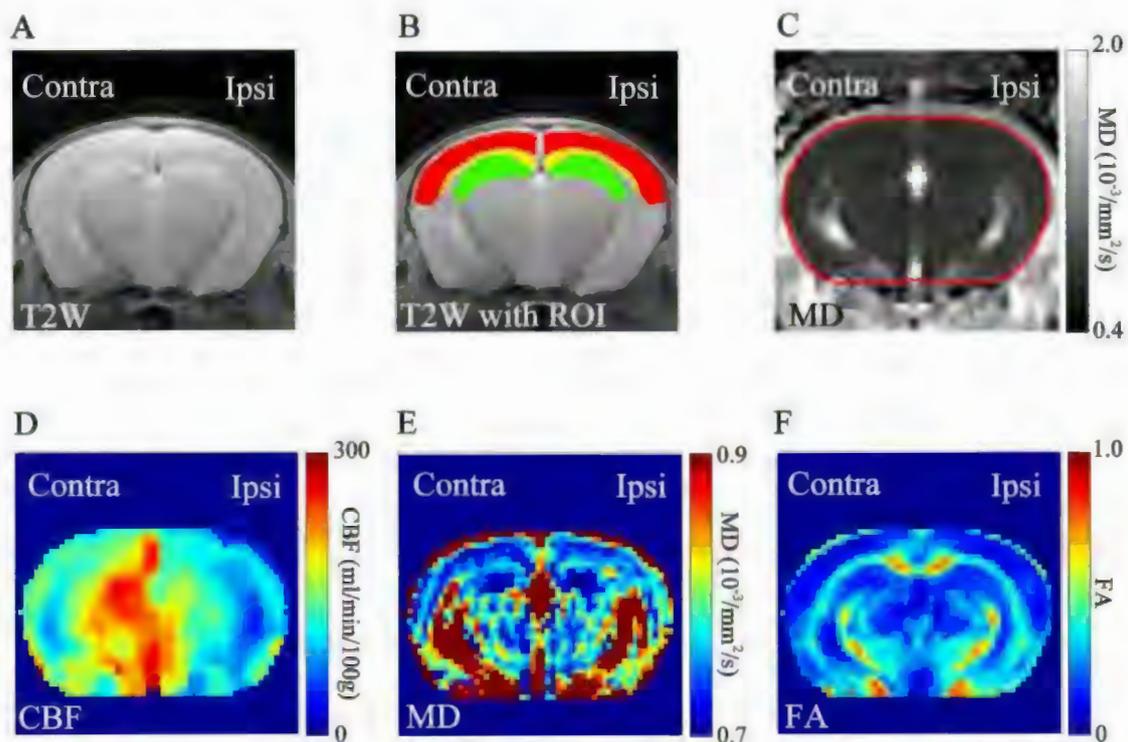


図 18 MRI 測定により得られる代表的な個体の画像。A:慢性低灌流モデルマウスの T2 強調画像。結紮側 (右 : Ipsi) と対側 (左 : Contra) における構造上の違いは無かった。B : T2 強調画像上に描かれた関心領域。関心領域は皮質 (赤)、脳梁と外包 (CC+EC:黄)、海馬 (緑) に描かれた。C : 選択された脳領域を赤で示した、広いカラースケールの MD マップ。D:脳血流 (CBF) マップ。E:狭いカラースケールの MD マップ。F : FA マップ。

### 5-3 結果

#### 5-3-1 Paired t-test による結紮側と対側の比較

UCCAO 手術の 4 週後における T2 強調画像は、全ての個体で脳損傷に起因する信号変化を示さなかった (図 18A)。図 18C-F に CBF、MD、FA マップを示す。各領域 (背側皮質、CC+EC、海馬) における結紮側と対側の違いを Paired t-test で検定を行った (図 19)。CBF の値は皮質 (結紮側  $113.3 \pm 18.9$ 、対側  $158.9 \pm 26.1$  ml/min/100g)、CC+EC (結紮側  $102.0 \pm 18.8$ 、対側  $147.9 \pm 18.2$  ml/min/100g)、海馬 (結紮側  $124.8 \pm 7.8$ 、対側  $196.3 \pm 8.3$ ) であり全ての領域で結紮側と対側において有意な違いを示した ( $P < 0.001$ ) (図 19A)。MD の値は皮質 (結紮側  $0.779 \pm 0.0380$ 、対側  $0.783 \pm 0.369 \times 10^{-3} \text{mm}^2/\text{s}$ )、CC+EC (結紮側  $0.855 \pm 0.0641$ 、対側  $0.844 \pm 0.0543 \times 10^{-3} \text{mm}^2/\text{s}$ )、海馬 (結紮側  $0.798 \pm 0.0171$ 、対側  $0.799 \pm 0.0164 \times 10^{-3} \text{mm}^2/\text{s}$ ) でありどの領域においても有意な変化を示さなかった (図 19B)。FA の値は皮質 (結紮側  $0.141 \pm 0.024$ 、対側  $0.149 \pm 0.025$ )、CC+EC (結紮側  $0.325 \pm 0.019$ 、対側  $0.305 \pm 0.020$ )、海馬 (結紮側  $0.174 \pm 0.050$ 、対側  $0.165 \pm 0.064$ ) でありどの領域においても有意な変化を示さなかった (図 19C)。

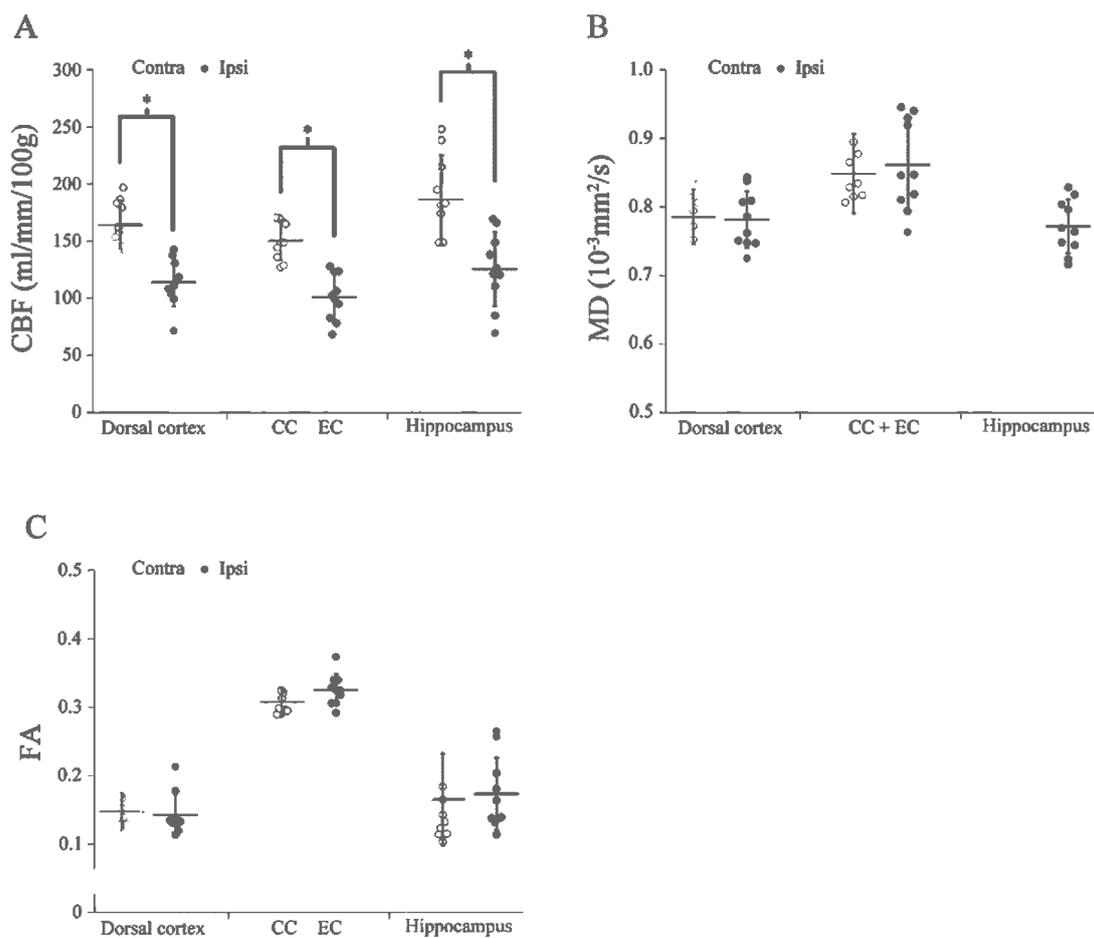


図 19 皮質、CC+EC、海馬における脳血流 (CBF : A)、MD (B)、FA (C) の平均値。白丸及び黒丸はそれぞれ各マウスの対側 (白) 及び結紮側 (黒) の値を示す。\*は対側と結紮側における有意な違いを示す。P<0.05。

### 5-3-2 CBF と DTI 計算値 (MD、FA) の Pearson 相関解析

Pearson 相関解析は CBF と MD の皮質における有意な正の相関 (結紮側  $r = 0.866$ ,  $P < 0.001$ 、対側  $r = 0.644$ ,  $P < 0.001$ ) を示した (図 20A)。同様に CC+EC (結紮側  $r = 0.812$ ,  $P < 0.001$ 、対側  $r = 0.667$ ,  $P < 0.001$ ) と海馬 (結紮側  $r = 0.455$ ,  $P < 0.01$ 、対側  $r = 0.714$ ,  $P < 0.001$ ) においても有意な正の相関を示した (図 20BC)。皮質における FA と CBF についても同様の解析を行ったが、結紮側 ( $r = 0.0115$ ) と対側 ( $r = -0.104$ ) のどちらの領域においても有意な相関は示さなかった (図 21A)。同様に CC+EC (結紮側  $r = 0.0954$ 、対側  $r = 0.301$ ) と海馬 (結紮側  $r = 0.239$ 、対側  $r = 0.194$ ) においても相関は示さなかった (図 21BC)。

### 5-3-3 共分散分析 (ANCOVA) を用いた結紮側と対側の比較

Pearson 相関解析は CBF と MD の有意な相関関係を示したため、CBF を共変量とした ANCOVA で解析を行った。結果は表 2 にまとめられている。表において CBF×CCAO は CBF と結紮の間に相互作用があるか、つまり相関の傾きに違いがあるかを検定しており、CBF effect は CBF の違いによる値の変化があるか、また CCAO effect は結紮の有無による値の違いがあるかどうかを検定している。ANCOVA による解析は皮質 (CBF×CCAO,  $P = 0.408$ ; CBF effect,  $F = 22.5$ ,  $P = 0.0002$ ; CCAO effect,  $F = 9.45$ ,  $p = 0.0073$ ) と CC+EC (CBF×CCAO,  $P = 0.728$ ; CBF effect,  $F = 20.9$ ,  $P = 0.0003$ ; CCAO effect,  $F = 16.9$ ,  $p = 0.0008$ ) における有意な結紮側と対側における MD の違いを明らかにした。一方で、海馬では有意な結紮側と対側における MD の違いは無かった (CBF×CCAO,  $P = 0.728$ ; CBF effect,  $F = 10.3$ ,  $P = 0.0056$ ; CCAO effect,  $F = 1.23$ ,  $p = 0.284$ )。

FA と CBF は有意な相関関係を示さなかったものの、同様な解析が FA についても行われた。全ての ROI について ANCOVA による解析は有意な結紮

側と対側における FA の違いを示さなかった (皮質 : CBF×CCAO,  $P=0.969$ ; CBF effect,  $F=0.0898$ ,  $P=0.768$ ; CCAO effect,  $F=5.89e-5$ ,  $p=0.994$ ; CC+EC : CBF×CCAO,  $P=0.0853$ ; CBF effect,  $F=0.116$ ,  $P=0.116$ ; CCAO effect,  $F=0.291$ ,  $p=0.597$ ; 海馬 : CBF×CCAO,  $P=0.0837$ ; CBF effect,  $F=0.990$ ,  $P=0.335$ ; CCAO effect,  $F=0.804$ ,  $p=0.383$ ) 。

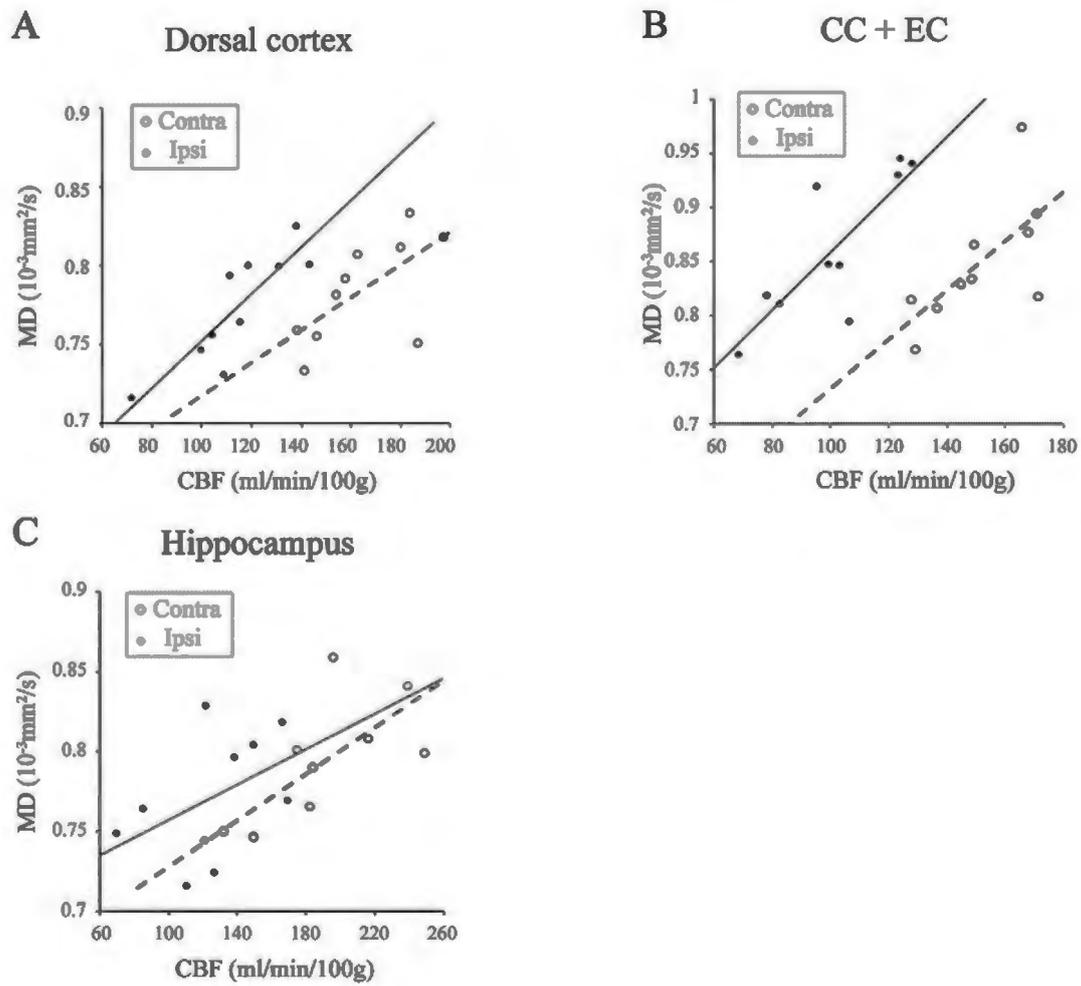


図 20 皮質 (A)、CC+EC (B)、海馬 (C) における CBF に対する MD の散布図。白丸は対側、黒丸は結紮側における各個体の値を示し、破線は対側における回帰直線、直線は結紮側における回帰直線を示す。CBF と MD は全ての関心領域 (ROI) において有意な正の相関を示した ( $P < 0.05$ )。

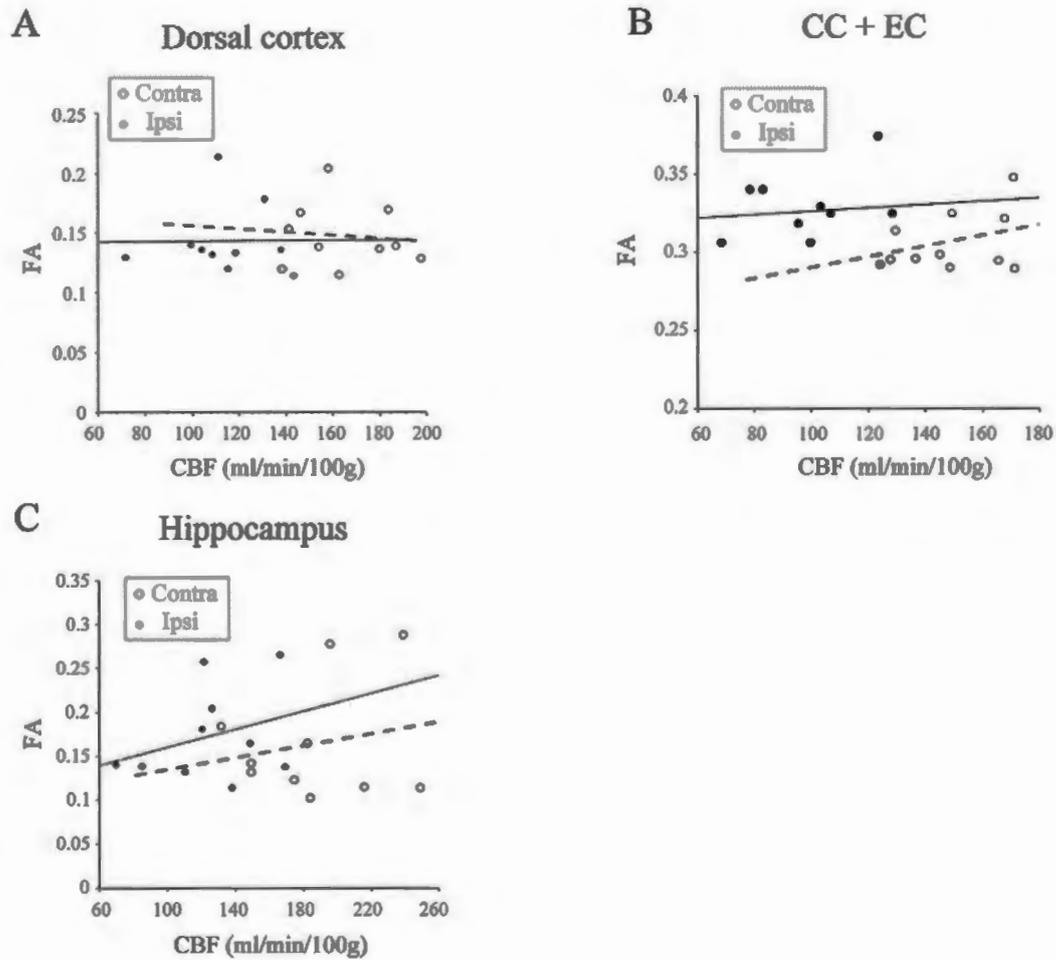


図 21 皮質 (A)、CC+EC (B)、海馬 (C) における CBF に対する FA の散布図。白丸は対側、黒丸は結紮側における各個体の値を示し、破線は対側における回帰直線、直線は結紮側における回帰直線を示す。CBF と FA は全ての関心領域 (ROI) において有意な相関を示さなかった。

表 2 ANCOVA Table

	MD			FA		
	Dorsal cortex	CC+EC	Hippocampus	Dorsal cortex	CC+EC	Hippocampus
CBF×CCAO	0.720 (0.408)	0.130 (0.728)	0.130 (0.728)	0.00150 (0.969)	0.0354 (0.853)	0.0437 (0.837)
CBF effect	22.5 (0.0002) *	20.9 (0.0003) *	10.3 (0.0056) *	0.0898 (0.768)	0.116 (0.738)	0.990 (0.335)
CCAO effect	9.45 (0.0073) *	16.9 (0.0008) *	1.23 (0.284)	5.89e-5 (0.994)	0.291 (0.597)	0.804 (0.383)

CBF×CCAO は CBF と結紮の間の相互作用、CBF effect は CBF の違いによる値の変化、CCAO effect は結紮の有無による値の違いの検定結果を示している。括弧内における数値は P 値であり、P<0.05 が統計的に有意とされた。

#### 5-3-4 補正 MD マップ

ANCOVA による解析の結果に基づき、CBF が MD に及ぼす影響が除去された補正 MD マップが作成した (図 22)。比較対象として平均 MD マップも作成した。この研究における皮質と CC+EC の  $CBF_{ave}$  (Eq. 3b 参照) は 130 ml/min/100 g であり、この値が補正 MD マップの計算に使用された。補正 MD マップ (MD<sub>corr</sub>) において皮質は結紮側で対側に比べ高い値を示しているように見えた (図 22、矢尻)。また、海馬において ANCOVA は有意な結紮側と対側の違いを示さなかったが、補正 MD マップは対側に比べ結紮側で高い値を示しているように見えた (図 22、矢印)。

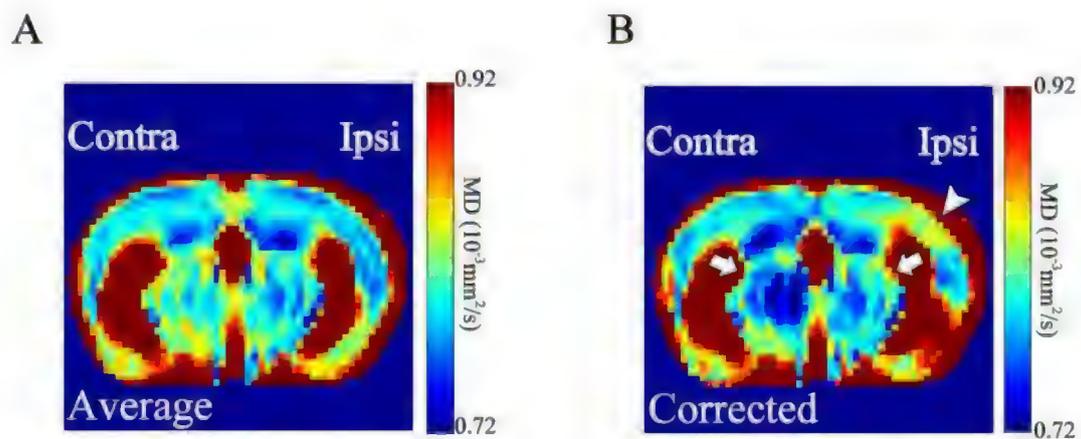


図 21 A : 全個体の平均 MD マップ。B:血流の影響を補正した MD マップ。矢印は背側皮質、矢尻は海馬の位置を示す。

#### 5-4 考察

本研究では、慢性低灌流モデルマウスにおける神経線維損傷について調べるため、拡散 MRI を使用してマウスの脳内の水拡散について評価を行った。また、急性虚血性脳卒中患者 (AIS) において、DTI パラメータと ASL により測定された脳血流は相関関係を示すことが報告されているため (Hu et al., 2015)、ASL を使用して DTI に対する脳血流の影響について調べた。この研究により、脳血流の影響を考慮しない DTI の評価では慢性低灌流モデルマウスにおける脳内水拡散の変化を捉えることはできなかったが、共分散分析 (ANCOVA) を使用した脳血流の影響を考慮した解析では、皮質及び白質領域 (脳梁+外包) における結紮側と対側の有意な水拡散の違いを明らかとした。ASL による脳血流測定と DTI を組み合わせたこのような MRI による疾患評価は、動物モデルによる疾患評価や臨床研究において稀にしか使用されない。しかしながら、神経損傷による水拡散の変化だけでなく、疾患による脳血流の変化も DTI パラメータに影響を及ぼすため、疾患モデル、特に脳卒中や認知症などの脳血管障害が知られる疾患での DTI の結果を正確に評価するためには、水拡散による影響と血流による影響の 2 つを分離して評価する必要があるということを本研究結果は示唆している。

本研究において、CBF と MD は全ての ROI において正の相関を示した (図 20)。これは MD の値が CBF の違いによって影響を受けるということを示唆している。CBF と MD の間に有意な相関が確認されたため、CBF を共変量として使用した共分散分析 (ANCOVA) による統計解析を行った (表 2)。ANCOVA は分散分析に回帰分析の原理を応用し、複数の要素が値に変化を与える場合に、他の要素の影響を考慮して目的の要素を総合的に群間比較する方法である。本

研究において CCAO 手術は、脳血流の低下と、神経線維損傷による水拡散の変化を及ぼすことが予想された。これらは両方とも DTI に影響を与えるため、どちらか一方の影響による DTI 計算値の変化を調べるために ANCOVA は非常に適していた。ANCOVA による検定は、t-test で有意な変化を示さなかった皮質と白質 (CC+EC) における有意な増加を明らかにした (表 2)。この結果は、脳血流低下が DTI に及ぼす影響により、神経線維損傷による水拡散の変化がマスクされてしまうことを示唆している。

FA についても MD と同様な ANCOVA による分析は行われたが、結紮側と対側の有意な FA の違いは示されなかった (表 2)。DTI に影響を及ぼすといわれる IVIM 効果を生じる毛細血管の微小灌流は、ボクセル内における特定の流れ方向を持たない。一方で、FA は水拡散の異方性の程度を示す値である。FA を求める式 (Eq. 2、材料と方法、5-2-3) について、CBF の変化が 3 つの固有値 ( $\lambda$ ) の値に対して同じだけ増加させるのであれば、結果として FA の値は変化しない。したがって、CBF に関する FA の変化が MD の変化と比較してほとんど無いことは合理的である。

以前の慢性低灌流ラットモデルにおける DTI 研究では、皮質と白質について MD が減少する (Soria et al., 2013)、または変化しないことを報告している (Wang et al., 2015)。これらの研究で用いられた b 値 (Soria et al., 2013:  $b=1000$  s/mm<sup>2</sup>、Wang et al., 2015:  $b=800$  s/mm<sup>2</sup>) は我々が使用した b 値 ( $b=670$ ) よりも大きい。使用する b 値が高いほど CBF による影響は少なくなるものの、過去の研究で使用された b 値においても DTI における脳血流の影響が無視できないことが報告されている (Shen et al., 2016)。したがって、以前の慢性低灌流ラットモデルにおける DTI 研究では CBF による MD の減少により神経線維損傷による

MD の増加が覆い隠されていた、また、CBF による MD の減少が神経線維損傷による MD の増加よりも大きかったため、上に示すような結果になった可能性がある。

我々の研究により慢性低灌流マウスの皮質と白質 (CC+EC) における MD の増加が明らかとなった。MD の増加は水拡散能の増加を示しており、これは神経線維の損傷に起因することが考えられる。本章の研究で明らかとなった慢性低灌流モデルマウスにおける神経線維の病変については第 7 章において、他の章の結果を踏まえて総合的に考察を行う。

## 6. 慢性低灌流による神経機能障害に対するタウリンの治療効果の評価

### 6-1 序論

#### 6-1-1 神経に対するタウリンの作用

タウリンは中枢神経系において2番目に豊富なアミノ酸である。現在までにタウリンは多くの生理学的機能に関与していることが報告されている。例えば、中枢神経系の発達における成長因子であることや (Sturman, 1993)、膜構造の維持に関与していること (Moran et al., 1988)、カルシウムの輸送に関与すること (Lombardini et al., 1985)、浸透圧調整物質であること (Solia et al., 1988)、抑制性の神経伝達物質であること (Okamoto et al., 1983)、また、グルタミン誘発性の神経毒に対する神経保護作用を持つことなどが報告されている (Tang et al., 1996, Edrissi et al., 1999)。また、タウリンが脳卒中やアルツハイマーに対して予防効果や治療効果を持つことがこれまでに報告されている (Menzie et al., 2013, Kim et al., 2014)。

本研究では、慢性低灌流モデルマウスに対するタウリンの効果を調べるために、慢性低灌流モデルマウスに長期的なタウリンの経口投与を行い、神経機能障害の変化を補正フラビン蛍光イメージングで測定した。

## 6-2 材料と方法

### 6-2-1 動物の準備

合計 10 匹のオスの C57BL/6J マウスを実験に使用した。これらのマウスに対して 2 章の材料と方法に記述されるように飼育及び頭蓋窓手術、UCCAO 手術を実施した (2-2-2)。タウリンを UCCAO 手術の 1 週間前からマウスの飲み水に 80mM になるよう溶かし、経口投与した。これはマウスが一日にタウリンを 25mg (0.2mmol) 摂取するように計算された量である。これらのマウスにおける補正フラビン蛍光イメージングをタウリン摂取前とタウリン 1 週間摂取後 (結紮前)、結紮の 2、7、14、21、28 日後に実施した。

### 6-2-2 補正フラビン蛍光イメージング

マウスの感覚刺激時における神経活動の測定のために 2 章に示された補正フラビン蛍光イメージングを実施した。測定方法や刺激方法、及び補正方法は 2 章に記述されている (2-2)。

### 6-2-3 統計解析

補正フラビン蛍光イメージングの値は、結紮前 (タウリン 1 週間摂取) に対する変化率を個体ごとに求め評価した。結果における数値は、平均値 ± standard deviation (SD) を示す。結紮手術前に対する変化は One-way ANOVA を行った後の Tukey-Kramer 法によって統計解析をした。また、タウリン未摂取個体と摂取個体における値の比較を unpaired t-test で行った。P<0.05 を有意とした。

### 6-3 結果

#### 6-3-1 タウリン摂取による神経活動の変化

タウリンを一週間摂取させた個体では、摂取前と比較した補正フラビン蛍光の変化率は  $0.81 \pm 0.34$  であり有意な変化を示さなかった ( $P=0.092$ )。タウリン摂取 7 日後に結紮手術を行い、補正フラビン蛍光の変化を調べた。タウリン摂取個体は結紮の 2、7、14、21、28 日後のいずれの日においても、結紮前に対する有意な補正フラビン蛍光のピークの変化を示さなかった (2 日後 ;  $0.89 \pm 0.49$ 、7 日後 ;  $0.99 \pm 0.26$ 、14 日後 ;  $1.01 \pm 0.29$ 、21 日後 ;  $0.97 \pm 0.21$ 、28 日後 ;  $1.09 \pm 0.29$ )。結紮 2 日目においてタウリン未摂取個体は摂取個体に対して有意に高い値を示した ( $P<0.05$ )。結紮 21 日後と 28 日後においてタウリン未摂取個体は摂取個体に対して有意に低い値を示した ( $P<0.01$ 、それぞれ)。また、タウリン摂取個体において、全ての測定時点における結紮前 (Pre) との有意な蛍光変化の違いは示されなかった。

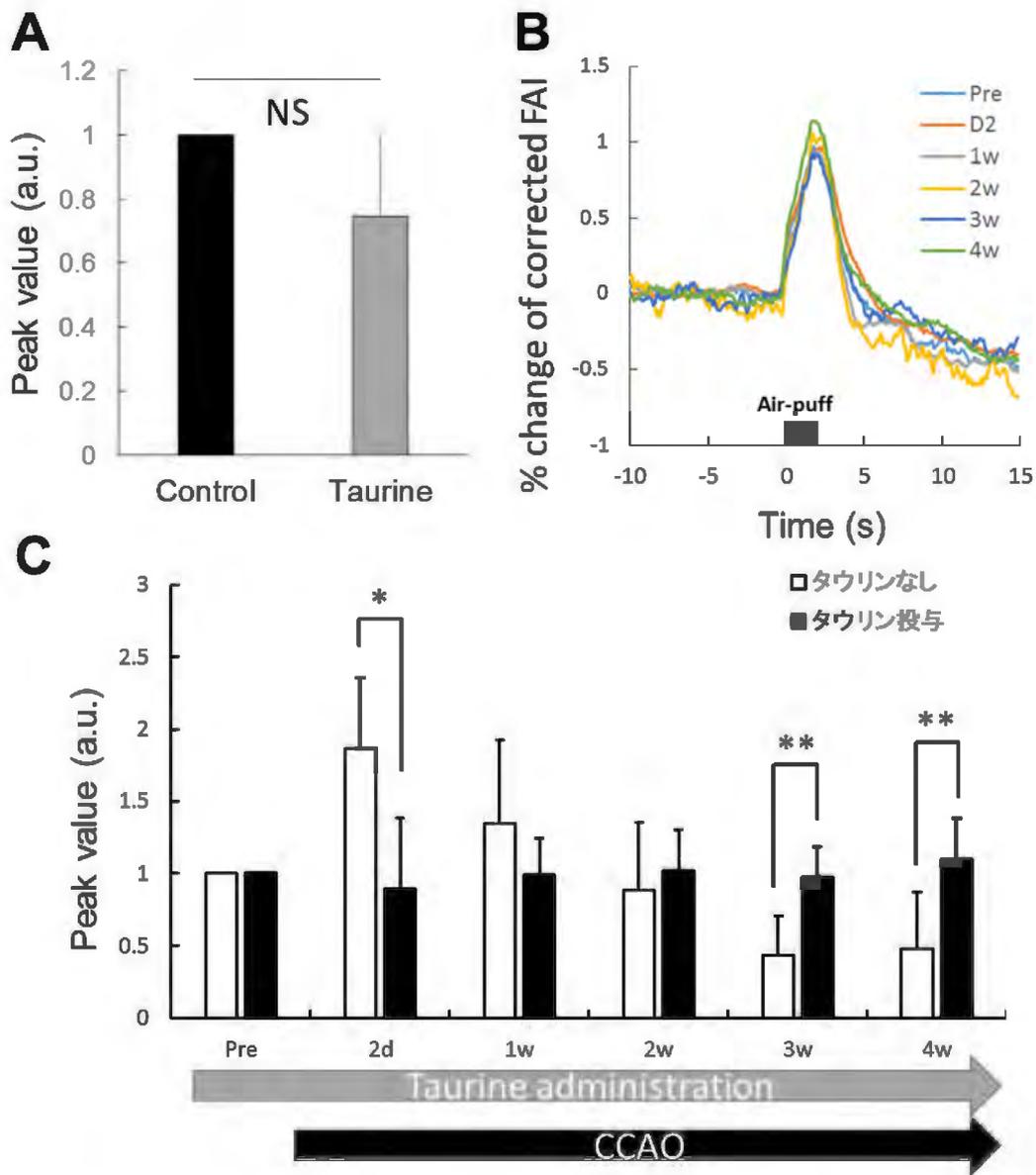


図 23 タウリン投与による慢性低灌流モデルマウスの補正フラビン蛍光イメージングの変化。A:タウリン未摂取個体とタウリン摂取(1週間)個体の補正FAIの信号変化率の平均ピーク値。B:タウリンを摂取させた慢性低灌流モデルマウスの補正フラビン蛍光変化。結紮前(Pre)、2,7,14,21,28日後における時間反応曲線をそれぞれ示す。C:補正FAIの信号変化率のピーク値の変化。結紮後における各値は結紮前(Pre)に対する変化率の値が示される。白いバーはタウリン投与なし個体(図10と同じ)、黒いバーはタウリン投与ありの個体における結紮手術後の経時変化を示す。\*はタウリン投与の有無による結紮手術から同時期の個体に違いがあるかを示す。\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ 。

#### 6-4 考察

本章の研究では、タウリンを長期的に摂取させた個体に対して結紮手術を行い、補正フラビン蛍光イメージング（第 2 章）による感覚刺激時における神経活動の評価を行った。タウリンを長期的に摂取させた個体では結紮から 2 日目の補正 FAI 信号値の増加や、21 日後や 28 日後における減少を示さず、タウリン未摂取の個体との有意な違いが示された（図 23C）。この結果は、タウリンには慢性低灌流による神経機能障害を抑制する効果があることを示唆している。

タウリンを正常のマウスに 1 週間摂取させた結果、有意ではないものの ( $P=0.092$ ) 僅かな減少を示した（図 23A）。タウリンは抑制性の神経伝達物質であることが報告されているため (Okamoto et al., 1983)、感覚刺激時の神経活動の減少を示したと考えられる。

本章の研究で明らかとなった慢性低灌流モデルマウスの神経活動に対するタウリンの影響については第 7 章において、他の章の結果を踏まえて総合的に考察を行う。

## 7. 慢性低灌流モデルマウスにおける病変のまとめと考察（総合考察）

### 7-1 結果のまとめ

本研究では慢性低灌流モデルマウスの認知機能障害に至るメカニズムの解明を目的として、補正フラビン蛍光イメージングによる感覚刺激時の脳酸素代謝（第2章）、2光子顕微鏡を使用したカルシウムイメージングによる安静時および感覚刺激時の脳神経活動（第3章）、MRスペクトロスコピー（MRS）を使用した脳代謝産物（第4章）、拡散MRIを使用した神経線維損傷（第5章）について、慢性低灌流モデルマウスを対象に行動実験による認知機能障害（Yoshizaki et al., 2008, Zhao et al., 2014, Zuloga et al., 2015）が明らかとされている1ヶ月後まで追跡調査を行い、慢性低灌流により引き起こされるこれらの病変を明らかとした。また、脳卒中や認知症に対して予防効果や治療効果があると知られるタウリン（Menzie et al., 2013, Kim et al., 2014）を摂取させた慢性低灌流モデルマウスの神経活動の変化を補正FAIにより評価した（第6章）。各測定の結果のまとめが表3に示されている。

本研究において示される、結紮直後における神経活動の増加や、脳代謝物の変化、また慢性期における神経機能の低下という現象は、本研究において、初めて明らかとなった現象であり、慢性低灌流を原因とした認知機能障害のメカニズムの解明に大きく寄与することが期待される。

表3 各測定結果のまとめ

	Pre	2day	7day	14day	21day	28day
賦活時酸素代謝	-	↑	→	→	↓	↓
安静時自発発火細胞数	-	-	↑	→	↓	↓
安静時自発発火頻度	-	-	→	→	↓	↓
賦活時神経活動量	-	-	↑	→	→	↓
賦活時発火細胞数	-	-	↑	→	→	→
NAA濃度	-	↑	-	-	-	→
グルタミン酸濃度	-	↑	-	-	-	→
神経線維損傷	-	-	-	-	-	↑
賦活時酸素代謝(タウリン)	-	→	→	→	→	→

↑はPreに対する有意な増加、→はPreに対する変化が無いこと、↓はPreに対する有意な減少を示す。

## 7-2 結紮後の急性期において神経活動は増加する

賦活時の酸素代謝、安静時の自発発火細胞数、賦活時の GCaMP3 の輝度変化率及び、発火細胞数は結紮の急性期（2 日後と 7 日後）において増加を示した。この結果は脳の代謝産物である NAA をグルタミン酸の濃度が増加していることから確からしい結果であるといえる。神経細胞死を有する脳梗塞を引き起こすような劇的な脳虚血状態においては、嫌気代謝の亢進に伴う乳酸の増加により、脳組織の pH が増加し酸性化する（Mutch et al., 1984）。この酸性化はアストロサイトから多量のグルタミン酸を放出させ、グルタミン酸の興奮性毒性が神経細胞死を引き起こすことがこれまでに報告されている（Beppu et al., 2014）。しかしながら、本研究における MRS の測定結果では検出可能な乳酸のピークは確認されなかった（4 章）。したがって、脳梗塞を生じるほどの急激な虚血（正常の 20%以下）の場合における神経の過活動と、慢性低灌流における穏やかな血流の低下（正常の 60%程度）の場合における神経の過活動の引き金となるメカニズムは異なる可能性がある。

自発発火の評価において急性期における発火細胞数は増加を示したものの、個々の細胞の発火頻度は変化を示さなかった。すなわち、この時点では、正常時に活動していた神経細胞の機能はまだ病変を示さないが、正常時において活動を示さない異常な神経細胞が活動していることを示唆している。個々のニューロンはそれぞればらばらに自発的な活動を示すのではなく、同期した活動を示す性質が知られている（Boddeke et al., 1997）。慢性低灌流マウスにおける自発神経細胞の増加は、同期して活動を行う神経細胞の増加を示している可能性がある。

また、カルシウムイメージングの実験において 2 日後には、輝度変化率の増加及び、刺激に反応した細胞の数が増加を示した。反応して発火を示した

細胞の増加は、刺激に対する閾値が減少しているためであると考えられる。また、GCaMP3 の輝度変化の増加はカルシウム流入量の増加を示唆していると考えられる。結紮後の急性期において、神経細胞におけるカルシウムの調節機構が異常を示していることが示唆された。補正 FAI では確認された急性期のミトコンドリアにおける酸素代謝の増加はこれらの神経活動の変化の結果によるものであると考えられる。この酸素代謝の増加の結果は、ミトコンドリアの機能に関連する NAA が増加を示したことによって支持される。

慢性低灌流状態では、酸素摂取率が増加することが知られているが (Yamauchi et al., 1996)、酸素摂取率の増加が原因で神経の過活動が引き起こされるのか、神経の過活動が原因で酸素摂取率が増加するのか今回の結果からはわからなかった。本研究によって得られた結果では、慢性低灌流における神経の過剰な活動が引き起こされているという事実は明らかであるものの、脳血流低下から神経の過活動へとつながるメカニズムを完全に明らかにすることはできなかった。

### 7-3 結紮後の慢性期における神経機能及び繊維の病変

安静時の自発発火の評価では、結紮後の慢性期 (21 日後または 28 日後) において発火細胞数だけでなく発火頻度も減少を示した。この結果は、結紮後の慢性期における神経機能や、自発発火パターンの異常を示唆している。また、感覚刺激時のカルシウム流入の異常を示したものの、刺激に反応して発火する細胞の数は結紮前と有意な違いを示さなかったことは、刺激に対する反応性が最低限保たれている可能性を示唆している。

また、拡散 MRI により皮質及び白質 (脳梁と外包) における神経線維の損傷 (水の拡散強度の増加) が明らかとなった。この神経線維損傷の結果は、

過去の脳切片における白質病変の結果 (Yoshizaki et al., 2008) と一致している。拡散 MRI により MD (水の拡散強度) の増加が確認されたが、FA (水の拡散異方性) は変化を示さなかった。神経線維の損傷が起きているのであれば FA の減少が起きることが予測される。慢性低灌流モデルにおいてグリオシスが起きることが報告されており (Soria et al., 2013)、このような状態は軸索の損傷後にグリア瘢痕を誘導する可能性がある。したがって、ニューロンの損傷や脱髄に起因する FA の減少は、グリア瘢痕に起因する FA 増加によっておおいさくされた可能性がある。また、慢性低灌流モデルマウスでは結紮の 1 ヶ月後において神経細胞死による神経密度の変化が無いことが報告されている (Lee et al., 2011, Pimentel-Coelho et al., 2013, Nishino et al., 2015)。この事実は、NAA の濃度が結紮前と同じであることから、本研究においても同様であると考えられる。

#### 7-4 タウリン投与による神経機能障害の抑制

タウリンの長期的な摂取を行いながら、結紮後の神経活動の経時変化を補正 FAI によって調査した実験では、タウリン未摂取の個体で確認されたような結紮手術直後の神経活動の増加や、慢性期の減少を示さなかった。この結果は、タウリンの抑制性神経伝達物質としての効果が (Okamoto et al., 1983)、結紮直後における神経の過活動を抑制したため、過活動によるグルタミン酸の興奮毒性による神経機能の障害を引き起こさなかったためであると考えられる。しかしながら、このように結論付けるには本研究で行った実験だけでは不十分であり、タウリンの摂取を結紮 1 週後に終了し、その後の神経活動の変化を調査する実験や、MRS の脳代謝物測定により、2 日後におけるグルタミン酸が増加を示さず、タウリンの増加を示すような結果が必要になると考えられる。また、タウリンは興奮性神経毒に対する神経保護作用や (Tang et al., 1996)、カル

シウム流入の調節作用を持つことも報告されているため(Lombardini et al., 1985)、そのような作用により結紮による神経機能障害が抑制された可能性もある。

#### 7-5 慢性低灌流モデルマウスにおける認知機能障害に至る機構

慢性低灌流マウスが認知機能障害に至る過程において、最初に起こるのは脳血流の減少であり、それに伴い脳血流量を維持するため脳血管拡張が起こるため、脳血管反応性の低下が起きる(Powers et al 1984、Paulson et al 1990)。そのとき、神経細胞は自発発火の増加と、刺激に対する過度な神経活動を示すことが本研究で明らかになった。このときの、神経の過活動に対する脳血流や血管反応性の低下によるエネルギーや酸素の供給不足が後の神経機能障害につながると思われる。これはタウリンにより結紮直後の神経活動の増加が抑制されたときに、神経機能低下が確認されなかったことに支持される。また、グルタミン酸による興奮毒性は軸索などの神経線維の損傷を引き起こすことが知られている(Banker and Larroche 1962)。このような神経機能の低下や、神経線維の損傷が、慢性低灌流マウスにおける、認知機能障害を示唆するような行動異常(Yoshizaki et al., 2008, Zhao et al., 2014, Zuloga et al., 2015)を引き起こす可能性がある。

しかしながら、このように結論付けるには追加の検証実験を行う必要がある。我々が作成したモデルマウスによる行動実験や、上述のタウリンの検証実験(7-5)を行うことで、このメカニズムの確証が強まってくると考えられ、今後の課題としたい。

略語一覧

AD	Alzheimer's disease	アルツハイマー病
ANCOVA	Analysis of covariance	共分散分析
ASL	Arterial spin-labeling	
BCCAO	Bilateral common carotid artery occlusion	両側総計動脈結紮
CBF	Cerebral blood flow	脳血流量
CC	Corpus callosum	脳梁
CCD	Charge coupled device	電荷結合素子
Contra	Contralateral	対側
Cr	Creatine	クレアチン
D	Diffusion coefficient	拡散係数
D*	Pseudo diffusion coefficient	擬似拡散係数
DTI	Diffusion Tensor Imaging	拡散テンソルイメージング
EC	External capsule	外包
FA	Fractional anisotropy	異方性比率
FAI	Flavoprotein autofluorescence imaging	フラビン蛋白蛍光イメージング
GABA	Gamma-aminobutylic acid	$\gamma$ -アミノ酪酸
Gln	Glutamine	グルタミン
Glu	Glutamic acid	グルタミン酸

IOSI	Intrinsic optical signal imaging	内因性信号イメージング
Ipsi	Ipsilateral	同側
IVIM	Intravoxel incoherent motion	
MD	Mean diffusivity	平均拡散能
MIP	Maximum intensity projection	最大値投影
MRI	Magnetic resonance imaging	磁気共鳴画像法
MRS	Magnetic resonance spectroscopy	磁気共鳴スペクトロスコピー
NAA	<i>N</i> -acetylaspartate	<i>N</i> -アセチルアスパラギン酸
PCr	Phosphocreatine	クレアチンリン酸
PET	Positron emission tomography	ポジトロン断層法
ROI	Region of interest	関心領域
SD	Standard deviation	標準偏差
SR101	Sulforhodamine 101	スルホロダミン 101
Tau	Taurine	タウリン
t-Cr	Total creatine	総クレアチン
TI	Inversion times	反転時間
UCCAO	Unilateral common carotid artery occlusion:	片側総計動脈結紮
VaD	Vascular dementia	血管性認知症
VCI	Vascular cognitive impairment	血管性認知障害

## 謝辞

本研究を遂行し学位論文をまとめるに当たり、多くの方々のご指導とご助力をいただきました。主指導教員を引き受けてくださいました岩手大学農学部教授 山下哲郎先生には厚く御礼申し上げます。博士後期課程から受け入れてくださり、山下先生の研究内容とは直接的には関連しない研究テーマについて丁寧に指導していただき、本当にありがとうございました。また、研究だけでなく多くの相談に真剣に応じてくださった、岩手大学理工学部助教 若林篤光先生には深く感謝しております。本学位論文作成に当たり、審査委員として多くのご助言をいただきました、弘前大学農学生命科学部教授 牛田千里先生、山形大学農学部教授 木村直子先生、岩手大学理工学部助教 坂田和実先生には深く感謝いたします。

本研究は量子科学技術研究開発機構放射線医学総合研究所で主に遂行され、多くの方々のご支援とご指導をいただきました。本研究における多くの画像測定技術やマウスの取り扱いについてご指導いただいた放医研脳機能イメージング部 田桑弘之先生と、MRI 測定技術や画像解析技術について指導いただいた放医研分子イメージング診断治療研究部 小島隆行先生に深く感謝いたします。また、同研究所における私の研究生活を助けていただきました、脳機能イメージング部脳疾患トランスレーショナル研究チームと、分子イメージング診断治療研究部医工連携画像研究チームの皆様には深く感謝しております。

最後に、私に研究の楽しさを教えてくださり、研究の道へと導いてくださった松浦哲也先生に深い感謝の意を表して謝辞といたします。

## 参考文献

Abe O, Aoki S, Hayashi N, et al. Normal aging in the central nervous system: quantitative MR diffusion-tensor analysis. *Neurobiol Aging* 2002; 23:433-441.

Atwood T, Robbins ME, Zhu JM. Quantitative *in vivo* proton MR spectroscopic evaluation of the irradiated rat brain. *J Magn Reson Imaging*. 2007; 26:1590-1595.

Bading H. Nuclear calcium signalling in the regulation of brain function. *Nat Rev Neurosci*. 2013; 14:593-608.

Banker BQ, Larroche JC. Periventricular leukomalacia of infancy. A form of neonatal anoxic encephalopathy. *Arch Neurol*. 1962; 7:386-410.

Basser PJ, Mattiello J, LeBihan D. MR diffusion tensor spectroscopy and imaging. *Biophys J*. 1994; 66:259-267.

Benson RC, Meyer RA, Zaruba ME, et al. Cellular autofluorescence—is it due to flavins? *J Histochem Cytochem*. 1979; 27:44-48.

Beppu K, Sasaki T, Tanaka KF, et al. Optogenetic countering of glial acidosis suppresses glial glutamate release and ischemic brain damage. *Neuron*. 2014; 81:314-320.

Boddeke HW, Best R, and Boeijinga PH. Synchronous 20 Hz rhythmic activity in hippocampal networks induced by activation of metabotropic glutamate receptors *in vitro*. *Neurosci*. 1997; 76:653-658.

Bottomley PA. Spatial localization in NMR spectroscopy *in vivo*. *Ann NY Acad Sci*. 1987; 508:333-48

Cataldo AM, Broadwell RD. Cytochemical identification of cerebral glycogen and

glucose-6-phosphatase activity under normal and experimental conditions. II. Choroid plexus and ependymal epithelia, endothelia and pericytes. *J Neurocytol.* 1986; 15:511-524.

Chen Q, Cichon J, Wang W, et al. Imaging neural activity using Thy1-GCaMP transgenic mice. *Neuron.* 2012; 76:297-308.

Choi DW. Glutamate neurotoxicity and diseases of the nervous system. *Neuron.* 1988; 1:623-34.

Deary IJ, Leaper SA, Murray AD, et al. Cerebral white matter abnormalities and lifetime cognitive change: A 67 year follow up of the Scottish Mental Survey of 1932. *Psychol Aging.* 2003; 18:140-148.

Denk W, Strickler JH, Webb WW. Two-photon laser scanning fluorescence microscopy. *Science.* 1990; 248:73-6.

El Idrissi A, Trenkner E. Growth factors and taurine protect against excitotoxicity by stabilizing calcium homeostasis and energy metabolism. *J Neurosci.* 1999; 19:9459-9468.

Fiser J, Chiu C, Weliky M. Small modulation of ongoing cortical dynamics by sensory input during natural vision. *Nature.* 2004; 431:573-578.

Frahm J, Bruhn H, Gyngell ML, et al. Localized high-resolution proton NMR spectroscopy using stimulated echoes: Initial applications to human brain *in vivo*. *Magn. Reson. Med.* 1989; 9:79-93.

Govind V, Young K, Maudsley AA. Corrigendum: proton NMR chemical shifts and coupling constants for brain metabolites. *NMR Biomed.* 2015; 28:923-924.

Hu LB, Hong N, Zhu WZ. Quantitative Measurement of Cerebral Perfusion with Intravoxel Incoherent Motion in Acute Ischemia Stroke: Initial Clinical Experience. *Chin Med J* 2015;

128:2565–2569.

Ichikawa S, Motosugi U, Hernando D, et al. Histological Grading of Hepatocellular Carcinomas with Intravoxel Incoherent Motion Diffusion-weighted Imaging: Inconsistent Results Depending on the Fitting Method. *Magn Reson Med Sci*. 2017; in printing.

Iima M, Yano K, Kataoka M, et al. Quantitative non-Gaussian diffusion and intravoxel incoherent motion magnetic resonance imaging: differentiation of malignant and benign breast lesions. *Invest Radiol*. 2015; 50:205-211.

Kim HY, Kim HV, Yoon JH, et al. Taurine in drinking water recovers learning and memory in the adult APP/PS1 mouse model of Alzheimer's disease. *Sci Rep*. 2014; 12:4:7467.

Kim SG. Quantification of relative cerebral blood flow change by flow-sensitive alternating inversion recovery (FAIR) technique: application to functional mapping. *Magn Reson Med* 1995; 34:293-301.

Lau A, Tymianski M. Glutamate receptors, neurotoxicity and neurodegeneration. *Pflugers Arch*. 2010; 460:525-542.

Le Bihan D, Breton E, Lallemand D, et al. MR imaging of intravoxel incoherent motions: application to diffusion and perfusion in neurologic disorders. *Radiology* 1986; 161:401-407.

Lee J S, Im DS, An YS, et al. Chronic cerebral hypoperfusion in a mouse model of Alzheimer's disease: an additional contributing factor of cognitive impairment. *Neurosci. Lett*. 2011; 489:84-88.

Lin JX, Tomimoto H, Akiguchi I, et al. White matter lesions and alteration of vascular cell composition in the brain of spontaneously hypertensive rats. *Neuroreport*. 2001; 12: 1835–1839.

Lombardini JB. Effects of taurine on calcium ion uptake and protein phosphorylation in rat

retinal membrane preparations. *J Neurochem.* 1985; 45:268–275.

Ma H, Zhao M, Schwartz TH. Dynamic Neurovascular Coupling and Uncoupling during Ictal Onset, Propagation, and Termination Revealed by Simultaneous *In Vivo* Optical Imaging of Neural Activity and Local Blood Volume. *Cerebral Cortex.* 2013; 23:885-899.

Mao BQ, Hamzei-Sichani F, Aronov D, et al. Dynamics of spontaneous activity in neocortical slices. *Neuron.* 2001; 32:883-98.

Matsuura T, Fujita H, Kashikura K, et al. Evoked local cerebral blood flow induced by somatosensory stimulation is proportional to the baseline flow. *Neurosci Res.* 2000; 38:341–348.

Matsuura T, Kanno I. Quantitative and temporal relationship between local cerebral blood flow and neuronal activation induced by somatosensory stimulation in rats. *Neurosci Res.* 2001; 40:281-90.

Menzie J, Prentice H, Wu JY. Neuroprotective Mechanisms of Taurine against Ischemic Stroke. *Brain Sci.* 2013; 3:877-907.

Meyer JS, Rauch G, Rauch RA, et al. Risk factors for cerebral hypoperfusion, mild cognitive impairment, and dementia. *Neurobiol Aging.* 2000; 21:161-169.

Michael M, Geoffrey D. Multimodality Imaging. *Stroke.* 2004; 35:2632-2634.

Moran J, Salazar P, Pasantes-Morales H. Effect of tocopherol and taurine on membrane fluidity of retinal rod outer segments. *Experimental Eye Research.* 1988; 45:769–776.

Mutch WA, Hansen AJ. Extracellular pH changes during spreading depression and cerebral ischemia: mechanisms of brain pH regulation. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1984; 4:17-27.

Nishino A, Tajima Y, Takuwa H, Long-term effects of cerebral hypoperfusion on neural density and function using misery perfusion animal model. *Sci Rep.* 2016; 27:6:25072.

Ohki K, Chung S, Ch'ng YH, et al., Functional imaging with cellular resolution reveals precise micro-architecture in visual cortex. *Nature.* 2005; 433:597-603.

Okamoto K, Kimura H, Sakai Y. Evidence for taurine as an inhibitory neurotransmitter in cerebellar stellate interneurons: Selective antagonism by TAG (6-aminomethyl-3-methyl-4H,1,2,4-benzothiadiazine-1,1-dioxide). *Brain Res.* 1983; 265:163–168.

Patel J, Sigmund EE, Rusinek H, et al. Diagnosis of cirrhosis with intravoxel incoherent motion diffusion MRI and dynamic contrast-enhanced MRI alone and in combination: preliminary experience. *J Magn Reson Imaging* 2010; 3:589-600.

Paulson OB, Strandgaard S, Edvinsson L. Cerebral autoregulation. *Cerebrovasc Brain Metab Rev.* 1990; 2:161-192.

Pimentel-Coelho PM, Michaud JP, Rivest S. Effects of mild chronic cerebral hypoperfusion and early amyloid pathology on spatial learning and the cellular innate immune response in mice. *Neurobiol Aging.* 2013; 34:679-93.

Provencher SW. Automatic quantitation of localized *in vivo* 1H spectra with LCModel. *NMR Biomed.* 2001; 14:260–264.

Puts NA, Edden RA. *In vivo* magnetic resonance spectroscopy of GABA: a methodological review. *Prog Nucl Magn Reson Spectrosc.* 2012; 60:29-41.

Powers WJ, Grubb RL, Jr., Raichle ME. Physiological responses to focal cerebral ischemia in humans. *Ann Neurol.* 1984; 16:546-552.

Prins ND, Scheltens P. White matter hyperintensities, cognitive impairment and dementia: an update. *Nat Rev Neurol*. 2015; 11:157-165

Pnevmatikakis EA, Giovannucci A. NoRMCorre: An online algorithm for piecewise rigid motion correction of calcium imaging data. *J Neurosci Methods*. 2017; 291:83-94.

Roux P, Gilles RJ, McKinnon GC, et al. Optimized outer volume suppression for single-shot fast spin-echo cardiac imaging. *J Magn Reson Imaging*. 1998; 8:1022-1032.

Sanchez-Vives MV, McCormick DA. Cellular and network mechanisms of rhythmic recurrent activity in neocortex. *Nat Neurosci*. 2000; 3:1027-34.

Saransaari P, Oja SS. Enhanced taurine release in cell-damaging conditions in the developing and ageing mouse hippocampus. *Neuroscience*. 1997; 79:847-54.

Schurr A, Payne RS, Miller JJ, et al. Glia are the main source of lactate utilized by neurons for recovery of function posthypoxia. *Brain Res*. 1997; 774:221-224.

Shen N, Zhao L, Jiang J, et al. Intravoxel incoherent motion diffusion-weighted imaging analysis of diffusion and microperfusion in grading gliomas and comparison with arterial spin labeling for evaluation of tumor perfusion. *J Magn Reson Imaging*. 2016; 44:620-632.

Shibata M, Ohtani R, Ihara M, et al. White matter lesions and glial activation in a novel mouse model of chronic cerebral hypoperfusion. *Stroke*. 2004; 35:2598–2603.

Shibuki K, Hishida R, Murakami H, et al. Dynamic imaging of somatosensory cortical activity in the rat visualized by flavoprotein autofluorescence. *J Physiol*. 2003; 15:919-927.

Solia JM, Herranz AS, Herreras O, et al. Does taurine act as an osmoregulatory substance in the rat brain. *Neurosci Lett*. 1988; 91:53–58.

Soria G, Tudela R, Márquez-Martín A, et al. The ins and outs of the BCCAO model for chronic hypoperfusion: a multimodal and longitudinal MRI approach. *PLoS One* 2013; 8:e74631.

Stosiek C, Garaschuk O, Holthoff K, et al. *In vivo* two-photon calcium imaging of neuronal networks. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003; 100:7319-7324.

Sturman JA. Taurine in development. *Physiol Rev*. 1993; 73:119-147.

Tajima Y, Takuwa H, Kokuryo D, et al. Changes in cortical microvasculature during misery perfusion measured by two-photon laser scanning microscopy. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2014; 34:1363-1372.

Takuwa H, Autio J, Nakayama H, et al. Reproducibility and variance of a stimulation-induced hemodynamic response in barrel cortex of awake behaving mice. *Brain Res*. 2011; 1369:103-111.

Takuwa H, Matsuura T, Nishino A, et al. Development of new optical imaging systems of oxygen metabolism and simultaneous measurement in hemodynamic changes using awake mice. *J Neurosci Methods*. 2014; 237:9-15.

Tang XW, Deupree DL, Sun Y, et al. Biphasic effect of taurine on excitatory amino acid-induced neurotoxicity. *Adv Exp Med Biol*. 1996; 403:499-505.

Taoka T, Fujioka M, Kashiwagi Y, et al. Time Course of Diffusion Kurtosis in Cerebral Infarctions of Transient Middle Cerebral Artery Occlusion Rat Model. *J Stroke Cerebrovasc Dis*. 2016; 25:610-617.

Tomita Y, Kubis N, Calando Y, et al. Long-term *in vivo* investigation of mouse cerebral microcirculation by fluorescence confocal microscopy in the area of focal ischemia. *J. Cereb. Blood Flow Metab*. 2005; 25:858–867.

Tsuchiya M, Sako K, Yura S, et al. Cerebral blood flow and histopathological changes following permanent bilateral carotid artery ligation in Wistar rats. *Exp Brain Res.* 1992; 89: 87–92.

Tyagarajan SK, Fritschy JM. Gephyrin: a master regulator of neuronal function? *Nat Rev Neurosci.* 2014; 15:141-56.

Valério Romanini C, Dias Fiuza Ferreira E, Correia Bacarin C, et al. Neurohistological and behavioral changes following the four-vessel occlusion/internal carotid artery model of chronic cerebral hypoperfusion: comparison between normotensive and spontaneously hypertensive rats. *Behav Brain Res.* 2013; 252:214-221.

Vanzetta I, Grinvald A. Increased cortical oxidative metabolism due to sensory stimulation: implications for functional brain imaging. *Science.* 1999; 286:1555-1558.

Vazquez AL, Fukuda M, Kim SG. Evolution of the dynamic changes in functional cerebral oxidative metabolism from tissue mitochondria to blood oxygen. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2012; 32:745-758.

Wakita H, Tomimoto H, Akiguchi I, et al. Glial activation and white matter changes in the rat brain induced by chronic cerebral hypoperfusion: an immunohistochemical study. *Acta Neuropathol.* 1994; 87:484–492.

Wang X, Lin F, Gao Y, et al. Bilateral common carotid artery occlusion induced brain lesions in rats: A longitudinal diffusion tensor imaging study. *Magn Reson Imaging* 2015; 33:551-558.

Wu JY, Prentice H. Role of taurine in the central nervous system. *J Biomed Sci.* 2010; 24;17 Suppl 1:S1.

Yamauchi H, Fukuyama H, Nagahama Y, et al. Evidence of misery perfusion and risk for recurrent stroke in major cerebral arterial occlusive diseases from PET. *J Neurol Neurosurg*

Psychiatry. 1996; 61:18-25.

Yoshizaki K, Adachi K, Kataoka S, et al. Chronic cerebral hypoperfusion induced by right unilateral common carotid artery occlusion causes delayed white matter lesions and cognitive impairment in adult mice. *Exp Neurol*. 2008; 210:585–591.

Zariwala HA, Borghuis BG, Hoogland TM, et al. A Cre-dependent GCaMP3 reporter mouse for neuronal imaging in vivo. *J Neurosci*. 2012; 32:3131–3141.

Zhao Y, Gu JH, Dai CL, et al. Chronic cerebral hypoperfusion causes decrease of O-GlcNAcylation, hyperphosphorylation of tau and behavioral deficits in mice. *Front Aging Neurosci*. 2014; 10:6:10.

Zuloaga KL, Zhang W, Yeiser LA, et al. Neurobehavioral and imaging correlates of hippocampal atrophy in a mouse model of vascular cognitive impairment. *Transl Stroke Res*. 2015; 6:390-398.

脳卒中学会（2015）「脳卒中治療ガイドライン」協和企画.