

# 第 16 回酸素ダイナミクス研究会

## 抄録集



2012 年 9 月 29 日(土) 9:25~16:50

島津製作所東京支社イベントホール

千代田区神田錦町 1 丁目 3

## 参加費・年会費・懇親会費・世話人会などのご案内

**参加費:** 会員 1000 円、非会員 3000 円、大学院生を含む学生 1000 円とさせていただきます

**年会費:** 研究会への入会を希望なされる方は、参加費 1000 円に加え年会費として 3000 円を承ります

**懇親会:** 研究会終了後に懇親会を近隣のお店で開催する予定です。ご参加頂ける方は、当日の研究会受付時にどうぞお申し出ください。懇親会費は 3000~4000 円程度を予定しております。

**世話人会:** 昼食(午後 12:10~13:20)の時間帯に、世話人会(運営委員会)を開催致しますので、委員はご出席ください。お弁当を準備する予定です。

## ごあいさつ

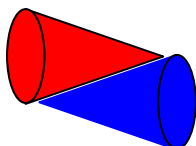
第 16 回酸素ダイナミクス研究会の世話人代表を担当させていただきます東海大学の桑平でございます。時が経つのは本当に早いもので、最初に本研究会を立ち上げるお話があったのは 16 年以上昔のことになります。私は最初から立ち上げに参加させて頂きましたが、この間 2008 年 8 月には、酸素に関する国際学会である International Society on Oxygen Transport to Tissue 2008 (ISOTT) を、北海道大学の故田村 守先生を名誉会長、佐賀大学(当時山形大学)の高橋英嗣先生を会長に、そして北里大学の小林弘祐先生と私が副会長を担当し、本研究会との共催の形で開催させて頂きました。本研究会の意義は、基礎医学と臨床医学の橋渡しとなるだけではなく、物理学、理工学、生物学など、多岐にわたる研究者の交流の場となり、議論を活発に交わすことで、この分野の研究をさらに発展させることにあります。この 16 年を振り返りますと、少しずつではありますが、その使命を果たしていると感じます。

今回特別講演は、生物に内在する酸素センシングメカニズムについて、酸素感受性チャネルの同定に成功され Nature Chemical Biology にも論文を掲載されました鹿児島大学の桑木共之先生にお願い致しました。大変楽しみに致しております。また、オーガナイズドセッションとしては、近年ますます臨床応用されている近赤外分光法(NIRS)の新しい解析法と題しまして、基礎と臨床の切り口で 4 演題を推薦頂きました。午前中の一般セッションでは 4 演題、また学生による特別セッションとして 3 演題推薦頂きました。「学生セッション」は初の試みではありますが、ぜひメンターのお立場の先生方にもご参加頂き、議論を盛り上げて頂ければと思います。

今年も充実した研究会にしたいと考えております。会員の皆様にはどうぞご参加を頂き、活発なご議論をお願い致したいと存じます。何卒宜しくお願い申し上げます。

2012 年 8 月吉日  
(ロンドンオリンピック開催中)

第 16 回酸素ダイナミクス研究会  
世話人代表 桑平 一郎



Oxygen Dynamics  
Society

# 第 16 回 酸素ダイナミクス研究会

2012 年 9 月 29 日 (土)

島津製作所東京支社イベントホール

千代田区神田錦町 1 丁目 3

❖ 9:00 開場

❖ 9:25 開会のあいさつ

桑平 一郎 (東海大学医学部附属東京病院呼吸器内科)

❖ 9:30-10:50 一般セッション

座長: 小林 弘祐 (北里大学大学院医療系研究科)

・トランスジェニックマウスを用いた腫瘍内 HIF 活性の生体光イメージング

門之園 哲哉 (東京工業大学大学院生命理工学研究科)

・心筋細胞シートにおけるエネルギー代謝

加川 友己 (早稲田大学ナノ理工学研究機構)

・Life with less oxygen

高橋 英嗣 (佐賀大学大学院工学系研究科先端融合工学専攻)

・睡眠時無呼吸症候群モデルラットの肺血管に対する低酸素暴露および  $\beta$  受容体遮断薬の効果

永井 恒志 (東京大学医学部法医学教室)

❖ 10:50-11:10 休憩

❖ 11:10-12:10 学生セッション

座長: 高橋 英嗣 (佐賀大学大学院工学系研究科先端融合工学専攻)

・単層培養系における局所酸素濃度の測定

前山 絵里奈 (早稲田大学大学院先進理工学研究科 修士 1 年)

・酸素勾配を形成する細胞培養マイクロデバイスの開発

内田 英幸 (慶應義塾大学大学院理工学研究科 修士 1 年)

・マウス背側皮膚窓への培養肝細胞組織移植による血管新生観察と組織酸素分圧測定

若杉 美樹 (慶應義塾大学大学院理工学研究科 修士 2 年)

❖ 12:10-13:20 昼食

❖ 13:20-14:20 特別講演

座長: 山田 勝也 (弘前大学大学院医学研究科統合機能生理学講座)

TRPA1 チャンネルによる高濃度酸素を含む有毒ガスの検出とその帰転

桑木 共之 (鹿児島大学大学院医歯学総合研究科統合分子生理学)

❖ 14:20-14:30 休憩

❖ 14:30-16:30 **オーガナイズド・セッション: NIRS の新しい解析法**

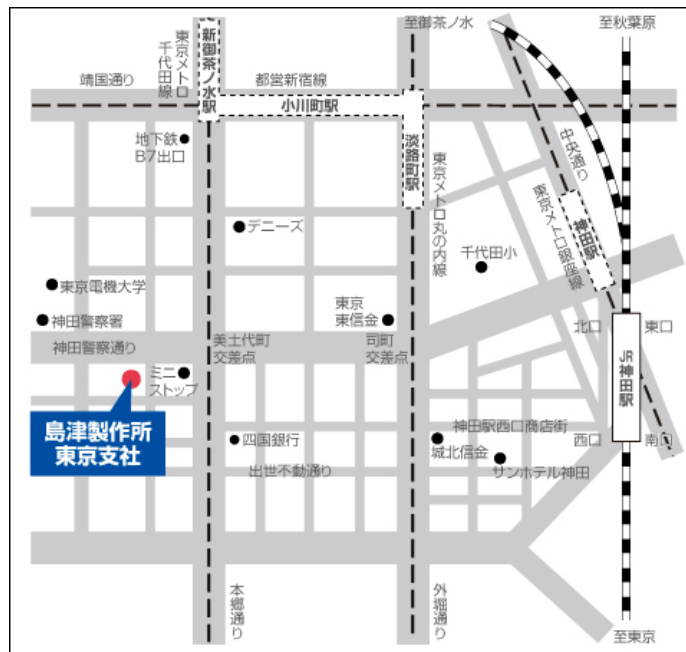
座長: 星 詳子 (東京都医学総合研究所) 酒谷 薫 (日本大学医学部脳神経外科)

- ・ NIRS 信号のアーチファクト評価と低減方法～脳賦活信号を抽出するために～  
河野 理 (東京都医学総合研究所)
- ・ 血流動態モデルに基づく新しい fNIRS 信号分離法  
山田 亨 (産業技術総合研究所ヒューマンライフテクノロジー研究部門)
- ・ 前頭前野の安静時脳血流酸素代謝の左右非対称性による不安心理状態の推定法  
石川 わかな (早稲田大学先進理工学研究科)
- ・ ワーキングメモリ課題に対する左右 oxy-Hb 変化の解析に基づく認知機能評価  
谷田 正弘 (資生堂リサーチセンター)

❖ 16:30-16:50 総会

❖ 16:50 閉会のあいさつ (終了後、懇親会)

**アクセス:** ◎地下鉄都営新宿線 小川町駅 東京メトロ千代田線 新御茶ノ水駅  
東京メトロ丸の内線 淡路町駅の B7 出口より 徒歩 6 分  
東京メトロ銀座線 神田駅より 徒歩 10 分  
◎JR 神田駅西口より 徒歩 10 分



参加費: 1000 円(会員) 3000 円(非会員) 1000 円(学生)

主催: 酸素ダイナミクス研究会 ([http://plaza.umin.ac.jp/~oxygen/Oxygen\\_Dynamics\\_Society/Welcome.html](http://plaza.umin.ac.jp/~oxygen/Oxygen_Dynamics_Society/Welcome.html))

世話人代表: 東海大学医学部附属東京病院呼吸器内科 桑平 一郎

151-0053 渋谷区代々木 1-2-5

TEL: 03-3370-2321(代表) E-mail: [kuwahira@tok.u-tokai.ac.jp](mailto:kuwahira@tok.u-tokai.ac.jp)

一般セッション

午前 9:30~10:50

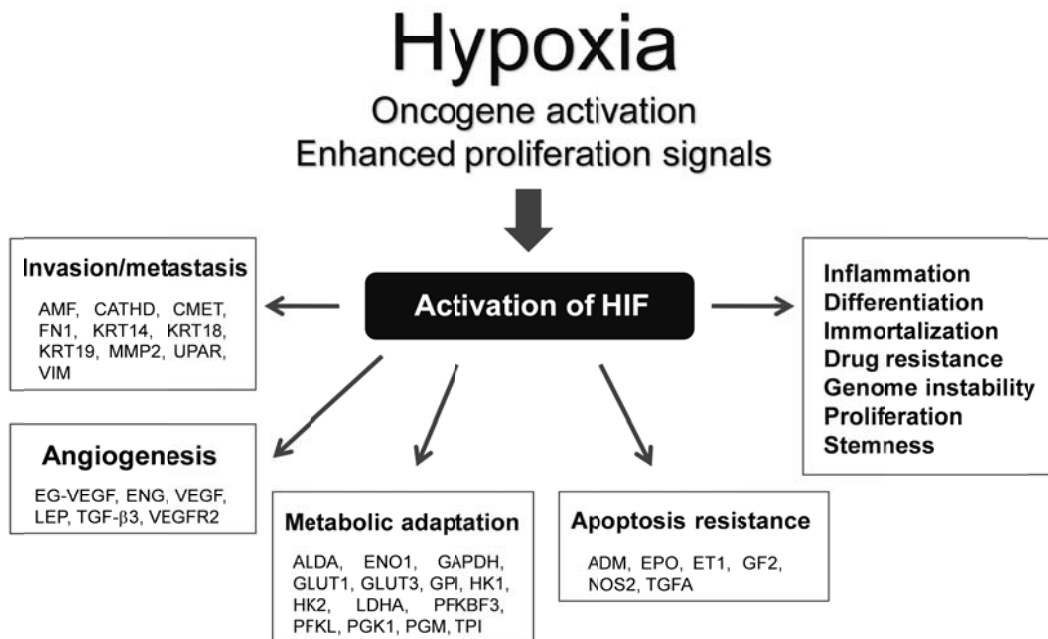
# トランスジェニックマウスを用いた腫瘍内 HIF 活性の生体光イメージング

門之園 哲哉, 口丸 高弘, 近藤 科江

東京工業大学大学院生命理工学研究科

がん治療において「低酸素」微小環境は重要な標的である。腫瘍内には十分な栄養や酸素が供給されない低酸素微小環境が存在し、この領域に存在するがん細胞は化学療法耐性、放射線治療耐性、アポトーシス耐性、転移・浸潤能を獲得するなど悪性度が高いことが知られている。さらにマクロファージや好中球などの免疫系細胞も低酸素環境において腫瘍悪性を促進することが明らかになりつつある。そこで我々は細胞の低酸素応答により誘導される Hypoxia inducible factor (HIF)に注目し、HIF が活性化している細胞を標的としたがん診断薬・治療薬の開発を進めている<sup>1,2)</sup>。転写因子 HIF は正常細胞においては低酸素応答のマスターレギュレーターとして機能するが、腫瘍内の低酸素やがん遺伝子の活性化、増殖シグナルの亢進等でも活性化され、発現誘導する一連の遺伝子の機能を介して、がんの増殖や悪性に深く関わっている。そのため、がん細胞をはじめ免疫系細胞や間質細胞も含めて HIF が活性化している細胞群を標的とすることで、腫瘍悪性化に関わる全ての細胞を一斉に攻撃することが可能になると考えている。

## Regulation of tumor-related genes by HIF



最近我々は、細胞内のHIF活性をモニターすることができるトランスジェニックマウスを構築した<sup>3)</sup>。マウスの生体内でHIFが活性化している細胞をリアルタイムに検出するためには、HIFの転写活性を利用した生体発光イメージングが有用である。そこで、HIF依存的なプロモーターの下流にHIF $\alpha$ の酸素濃度依存的分解ドメイン(ODDドメイン)とホタルルシフェラーゼの融合タンパク質をコードするレポーター遺伝子(5HRE-ODD-Luc、HOL)を組み込んだFVBトランスジェニックマウスを作成した。このHOLマウスの細胞内ではHIFの活性化に伴ってレポータータンパク質が生成され、個体レベル、組織レベル、細胞レベルのいずれにおいても内因性のHIF活性のイメージングが可能であったことから、がんの増殖・悪性化に伴うHIF活性化細胞の動態も検出できることが示唆された。

そこで次に、HIF活性化を指標とした短期発がん試験を検討した。そのためにHOLマウスを早期発がんモデルマウスRasH2と交配し、発がん感受性の高い病態イメージングマウスを構築した。このHOL/RasH2マウスを発がん誘導剤MNUで処理したところ、処理後9週目には内因性がんの発光シグナルが確認でき、がんの増殖を経時的に同一個体でモニターする事ができた。シグナルが見られた組織を解析すると、扁平上皮がん、扁平上皮性乳頭腫、肝臓血管腫、腺がんなどが存在していた。つまり、このマウスを用いれば、通常2年から半年かかる発がん試験を2カ月程度に短縮できるだけでなく、抗がん剤やがん治療法の評価を経時的に同一個体で行う事ができると示唆された。まだ検討すべき課題は多く残されているが、光イメージング技術を応用する事で、より簡便に、より少ない動物数で、より短期に発がん試験を行う事が可能であり、化学発がん試験用マウスとして発展させられる可能性を示した意義は大きいといえる。

今後、HOLマウスに様々な発がん刺激を与えたり、がん発症遺伝子改変マウスと交配したりして、特定のがんを発症する病態イメージングモデルマウスを構築できれば、がん発症メカニズムの解明や治療法の開発にも貢献できると期待される。

## 参考文献

1. Kizaka-Kondoh S. et al.: Selective killing of hypoxia-inducible factor-1-active cells improves survival in a mouse model of invasive and metastatic pancreatic cancer. *Clin. Cancer Res.*, **15**: 3433-3441, 2009.
2. Kuchimaru T. et al.: *In vivo* imaging of HIF-active tumors by an oxygen-dependent degradation protein probe with an interchangeable labeling system. *PLoS ONE*, **5**: e15736, 2010.
3. Kadonosono T. et al.: Detection of the onset of ischemia and carcinogenesis by hypoxia-inducible transcription factor-based in vivo bioluminescence imaging. *PLoS ONE*, **6**: e26640, 2011.



## 心筋細胞シートにおけるエネルギー代謝

加川友己<sup>1</sup>、坂口勝久<sup>2</sup>、関根秀一<sup>3</sup>、清水達也<sup>3</sup>、常田聡<sup>4</sup>、岡野光夫<sup>3</sup>

<sup>1</sup>早稲田大学・ナノ理工学研究機構, <sup>2</sup>早稲田大学・理工学研究所, <sup>3</sup>東京女子医科大学・先端生命医科学研究所, <sup>4</sup>早稲田大学・先進理工学部・生命医科学科

### 背景と目的

生体内および生体外における三次元生体組織構築の試みの 1 つに、細胞シート工学法を用いたものがある。これは温度応答性培養皿を用いて細胞培養することで、細胞同士がつながった細胞のシート（1層）を作成する技術であり、この細胞シートを積層化することで厚い組織を作製することが原理上可能である。しかし一度に複数枚の細胞シートを積層すると、枚数が多い場合に細胞が壊死してしまう。これは酸素・栄養分の供給、および老廃物を除去するための血管網が存在しないためであり、心筋細胞シートの場合、最大でも3枚程度が限界である。細胞シートを壊死させることなく積層化する手段として、ラット皮下を培養床として心筋細胞シートの移植を反復操作する（血管新生を待って、次のシートの移植を行う）方法が開発されている。その結果、約1mm厚の密な心筋組織の構築に成功している（Shimizu et al., *FASEB J.* **20**, 708 (2006)）。同様の手法を生体外で実現させるため、現在、生体組織（ラット皮下環境）を模倣した微小流路付きコラーゲンゲル培養床上で積層化心筋細胞シートを灌流培養する手法の開発を進めている。

生体外培養環境は、生体内移植環境と様々な点で異なる。特に、供給される酸素量や栄養素の種類の違いは、培養組織細胞のエネルギー代謝に大きな影響を及ぼすことが考えられる。将来的に生体外の灌流培養系で構築した三次元生体組織を臨床に用いる場合、構築組織がどのようなエネルギー代謝を行っているのか、特に生体内組織とどのような面で異なるのかを知ることが重要となる。そこで本研究では、現行の灌流培養系で構築される三次元心筋組織が実際にどのようなエネルギー代謝を行っているのかを、培地成分解析から予測することを試みた。

### 方法

新生仔ラット心筋細胞を温度応答性培養皿上で4日間、5%CO<sub>2</sub>、37℃環境下で培養した。その後培養皿を20℃環境下に移すことで confluent に達した細胞を細胞外基質を保持したままシート状に回収した。回収した心筋細胞シートを3枚積層したものを、微小流路付きコラーゲンゲル上に接着させ培地に浸した後、微小流路に培地を流すことで灌流培養を開始した。培地は1-2日毎にサンプリングし成分解析に使用した。

## 結果と考察

灌流開始後 5 日目に、別に作製し 3 枚積層した細胞シートを、培養中のシートに重ねた。この操作を数日間隔で繰り返すことで最大 12 枚の細胞シートから成る 3 次元心筋組織の構築に成功した。細胞シートの積層枚数が 3、6、9、12 枚と増えるに従って、正味のグルコース消費速度・乳酸生成速度は共に有意に増加し、構築された心筋組織がその厚さに応じた代謝を行っていることが確認された。続いて、好氣的代謝の指標としてグルコース消費に対する乳酸生成のモル比 (Lac/Glc 比) を計算した。その結果、積層枚数に関わらずモル比はグルコースの嫌氣的解糖から予想される値 2 を超えた (図 1)。このことから、構築心筋組織の代謝は嫌氣的解糖がメインであることが示唆された。

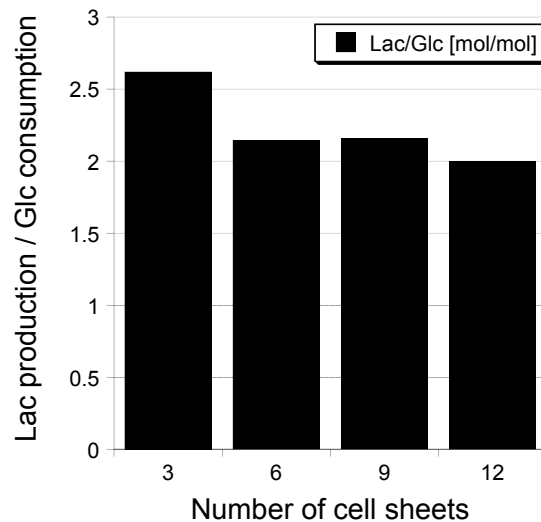


図 1. 組織構築過程における積層心筋細胞シートによる乳酸生成／グルコース消費のモル比.  
積層枚数に関わらず 2 を超えており、嫌氣的代謝が優位であることが示唆される。

## 結言

今回見積もった Lac/Glc 比からは、現行の灌流培養系において積層細胞シートから構築される心筋組織が嫌氣的代謝を優位に行っていることが予測された。これは、培養組織に十分に酸素が供給されていないことを示唆している。従って、効率的に酸素供給が行えるような培養手法を検討・開発することが、今後の組織構築研究において鍵になると考えられる。

## 謝辞

本研究は、総合科学技術会議により制度設計された最先端研究開発支援プログラム (FIRST) により、日本学術振興会を通して助成されたものです。

## Life with less oxygen

高橋英嗣

佐賀大学大学院工学系研究科先端融合工学専攻

生体における酸素輸送の最終プロセスである毛細血管から細胞内ミトコンドリアへの酸素移動は拡散の法則に支配される。このプロセスが、細胞、臓器、個体の形態や機能に大きく関わっていることは、本研究会会員には周知の事であろう。とりわけ、固形がんで顕著な、拡散性酸素輸送の限界に起因する低酸素微小環境は大きな注目を集めている。

今回の発表では、一層の培養細胞内に、拡散性酸素移動に伴う酸素濃度勾配を作る簡便な方法<sup>(1)</sup>を紹介する。さらに、ミトコンドリア酸素代謝をミトコンドリア膜電位イメージング法で可視化することにより、酸素供給源からミトコンドリアへの拡散性酸素供給の限界距離（anoxic front、AF）を可視化できることを示す。AFはCOS-7およびHep3B細胞でおおむね $\sim 500 \mu\text{m}$ となり、この時、酸素分圧勾配は約 $1 \text{ mmHg/cell}$ であった。

AF付近の低酸素微小環境ではHIF-1 $\alpha$ の発現が予測される。HIF-1 $\alpha$ 発現とAFの関係を検討するために、HIF-1 $\alpha$ 誘導の鍵となるPHDs（prolyl hydroxylase domain proteins）の非特異的ブロッカであるDMOG（ $1 \text{ mM}$ ）であらかじめ処理した細胞でAFを観察した所、AFがDMOG非処理細胞に比べ2～3倍以上に延長し、酸素供給源から $1 \sim 2 \text{ mm}$ の深さまでミトコンドリア膜電位が維持された。

HIF-1 $\alpha$ 発現はミトコンドリア呼吸を大きく抑制することが知られている。従って、Fickの拡散法則からは、PHD抑制によるAFの延長は、ミトコンドリア呼吸＝細胞内酸素フラックス低下に伴う拡散性酸素濃度勾配の低減から説明可能であるが、このストーリーには無視できない問題がある。

ミトコンドリアの膜電位は呼吸鎖酵素間の電子（還元等量）伝達に伴い形成され、電子伝達には分子状酸素が必要である。ところが、今回の実験では、ミトコンドリア呼吸が抑制されているにも関わらずミトコンドリア膜電位が維持されている、すなわち Life with less oxygen という現象が観察された。これに対する解答のひとつとして、ミトコンドリア呼吸鎖の複合体IIの役割について論じたい。

<sup>(1)</sup> Takahashi E and Sato M: Imaging of oxygen gradients in monolayer cultured cells using green fluorescent protein. Am J Physiol Cell Physiol. 299: C1318-23, 2010.

# 睡眠時無呼吸症候群モデルラットの肺血管に対する低酸素暴露

## およびβ受容体遮断薬の効果

### 【演者】

永井恒志（東京大学医学部法医学教室）

### 【共同演者】

桑平一郎（東海大学医学部附属東京病院呼吸器内科）

白井幹康（国立循環器病研究センター心臓生理部）

吉田謙一（東京大学医学部法医学教室）

### 【目的】

睡眠時無呼吸症候群（sleep apnea syndrome, SAS）は睡眠時に舌根沈下に伴う無呼吸（10秒以上の呼吸停止）を繰り返すことにより、心血管障害・中枢神経障害・糖代謝障害など全身性に病態を形成する症候群である。特に、SASが夜間就寝中（深夜0時から午前6時）に心筋梗塞による心臓突然死を起こす相対危険度は2.57倍と明らかに高く、致死的な一面を有していることが知られる[1]。

また高血圧とSASとは密接な関係を有している。SASが高血圧を合併している頻度は50%であり、逆に高血圧の30%にSASを認める[2]。特に薬剤耐性高血圧におけるSAS合併率は80%に及ぶ[3]。高血圧は動脈硬化性疾患の原因となるため、SASにおいては血圧コントロールが極めて重要であり、種々の降圧薬が日常臨床では使用されている。

SASでは交感神経の持続的活性化が最も重要な病態の一つとされている。我々は、global alveolar hypoxia時の交感神経活性化は、β受容体（βAR）機構を介して肺血管拡張性に作用し、肺局所機構で生じた低酸素性肺血管収縮（hypoxic pulmonary vasoconstriction, HPV）を緩和することを報告している[4]。したがって、SASにおける交感神経活性化は、無呼吸時のHPVを抑制的に制御し、肺循環系および右心系を保護している可能性がある。他方、SAS時の高血圧症に対して、降圧薬としてはβ遮断薬が有用であるとの見方が優勢である[5][6]。しかし、我々は、β遮断薬の使用はHPVを増強し、肺高血圧、右室肥大の進展、場合によっては、極度の肺血管収縮により急性呼吸不全・急性肺性心を来たして突然死を引き起こす可能性があるのではないかと考えた。

そこで我々は、その検証を進めるため、SAS病態を模倣した間歇的低酸素暴露（intermittent hypoxia, IH）ラットを用いて、HPVの交感神経性制御に関する研究を進めてきた。本研究会では、その成績の一部を報告する。

### 【方法】

SDラット（雄、7週齢）を室内気対照群（計30匹）と間歇的低酸素暴露群（IH群）（計31匹）に分けた。IH群は90秒毎に4%と21%O<sub>2</sub>に暴露し、1日8時間、6週間連続で行った。その後、大型放射光施設SPring-8にて、人工呼吸管理下で低酸素暴露（10%O<sub>2</sub>）およびβ受容体遮断薬投与下で肺微小血管造影を行った。β受容体遮断薬としてはPropranolol（β<sub>1,2</sub>遮断薬）とSR59230A（β<sub>3</sub>選択的遮断薬）を用いた。血管造影の際には同時に右室圧、大動脈圧、心拍数を測定した。また6週暴露後に代謝ケージを用いて24時間塩酸蓄尿を行い、尿中catecholamine濃度を測定した。また6週暴露後の肺組織を使用してWestern blottingを行い、β受容体の蛋白発現の程度を検証した。組織の免疫染色ではβ<sub>3</sub>ARの発現分布を調べた。

## 【結果】

6 週暴露後の対照群と IH 群とで、右室圧、大動脈圧、心拍数、体重、心重量に差はなかった。尿中カテコラミン濃度は IH 群で著明に高値であった。IH 群の肺組織における  $\beta$  受容体の発現量は  $\beta_1$ 、2AR では変化していないが、 $\beta_3$ AR は増加していた。血管造影では、低酸素暴露で対照群は HPV を生じたが、IH 群では HPV が極めて強く抑制されていた。IH 群では Propranolol、SR59230A 共に投与後に HPV を生じた。

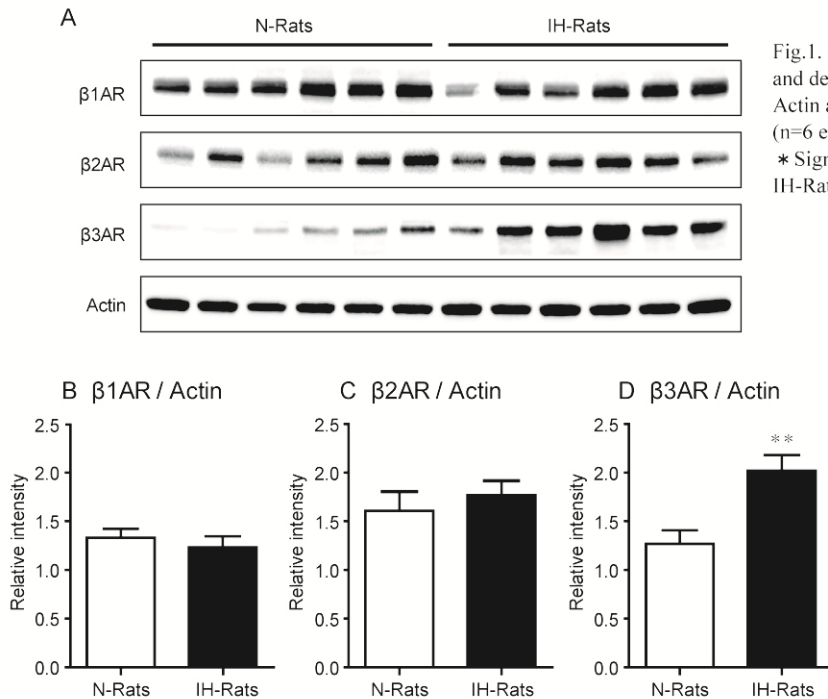


Fig.1. Representative Western blot bands (A) and densitometric analysis of  $\beta_{1,2,3}$ AR and Actin as internal standard in N and IH-Rats (n=6 each) using lung homogenate (B, C, D). \* Significant difference between N-Rats and IH-Rats (\* P<0.05; \*\* P<0.01).

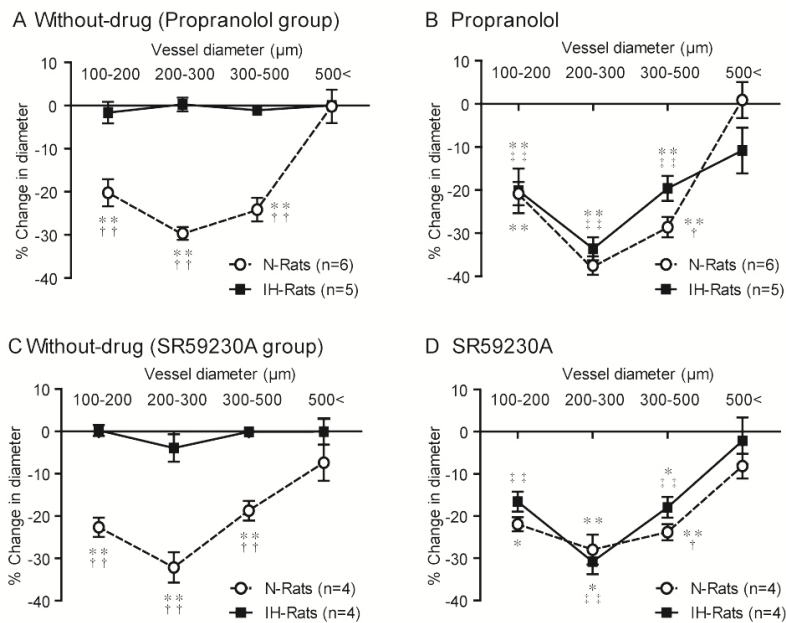
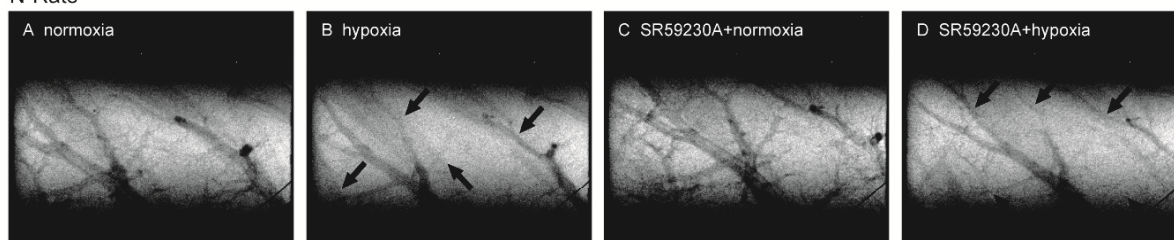


Fig.2. Relationship between vessel size and the magnitude of pulmonary vasoconstriction (% decrease in vessel diameter) in response to acute hypoxia (10%  $O_2$  for 10 min) in N-Rats and IH-Rats with or without  $\beta$ AR-blocker administration. Using  $\beta$ AR-blockers are Propranolol for lipophilic non-selective  $\beta_1$ - $\beta_2$ AR-blocker and SR59230A for lipophilic selective  $\beta_3$ AR-blocker. \* Significant reduction in vessel diameter compared to normoxic exposure (\* P<0.05; \*\* P<0.01). †Significant difference between N-Rats and IH-Rats (†P<0.05; ††P<0.01). ‡Significant difference compared to Without-drug group (‡P<0.05; ‡‡P<0.01).

## N-Rats



## IH-Rats

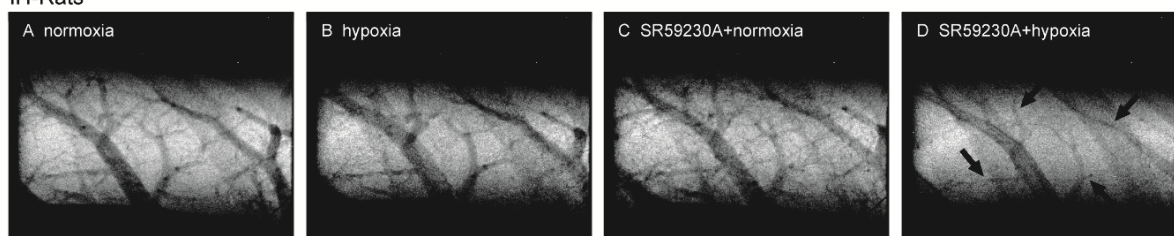


Fig.3. Representative microangiogram images showing the branching pattern of small pulmonary arteries during normoxia and in response to hypoxia with or without SR59230A. Images were recorded after 10 min exposure of normoxia, hypoxia (10% O<sub>2</sub>), SR59230A + normoxia, and SR59230A + hypoxia in same lung field. Black arrows point to branches of pulmonary arteries that have constricted in response to acute hypoxia. IH has no response to hypoxia without SR59230A, however, significant vasoconstriction reveals with SR59230A. The tungsten wire in the right below of each image is reference of 50  $\mu$ m diameter.

## 【結論】

IH 群では尿中カテコラミン濃度が高値であり、交感神経活性が亢進している。IH6 週暴露後の 24 時間蓄尿でもカテコラミン濃度が上昇していたことより、持続性の交感神経活性化を生じていることが明らかになった。交感神経は肺血管に対して拡張性に働くため、IH 群では低酸素暴露でも HPV を生じなかったと考えられる。IH 群では  $\beta$  3AR の発現が亢進していたため、Propranolol だけでなく、 $\beta$  3AR 遮断薬である SR59230A を使用した。両薬剤ともに HPV を惹起したことから、IH では  $\beta$  1 ないし/かつ 2AR を介して HPV を抑制するだけでなく、 $\beta$  3AR をも介した抑制機序が機能していることが明らかとなった。

$\beta$  3AR の高発現は種々の病態モデルにおいて観察され、また  $\beta$  3AR は  $\beta$  1、2AR に比してより高濃度のカテコラミンで活性化されると報告されている [7]。交感神経活性化が著しい病態では  $\beta$  3AR を介する心血管系の調節作用が惹起され、何らかの心肺循環保護作用を呈するものと推測される [8] [9]。IH に当てはめると、繰り返す HPV は右心系圧負荷と静脈還流障害をもたらし、SAS においてその重症度を上昇させると考えられる。そのため  $\beta$  1、2AR だけでなく  $\beta$  3AR を介した強力な HPV 抑制機構を機能させ、静脈系の循環を維持していると考えられることができる。したがって降圧薬およびさまざまな目的で使用される Propranolol を始めとする種々の  $\beta$  AR 遮断薬には、SAS の重症度を上昇させる可能性があると考えられる。

## 【謝辞】

本研究は、科学研究費補助金・基盤研究 A (課題番号 23249038) および基盤研究 C (課題番号 23590843) の支援を受けた。

## 【参考文献】

1. Gami AS, Howard DE, Olson EJ, Somers VK. Day-night pattern of sudden death in obstructive sleep apnea. *N Engl J Med* 2005; **352**: 1206-14.
2. Somers VK, White DP, Amin R, et al. Sleep apnea and cardiovascular disease: an American Heart Association/American College Of Cardiology Foundation Scientific Statement from the American Heart Association Council for High Blood Pressure Research Professional Education Committee, Council on Clinical Cardiology, Stroke Council, and Council On Cardiovascular Nursing. In collaboration with the National Heart, Lung, and Blood Institute National Center on Sleep Disorders Research (National Institutes of Health). *Circulation* 2008; **118**: 1080-111.
3. Logan AG, Perlikowski SM, Mente A, et al. High prevalence of unrecognized sleep apnoea in drug-resistant hypertension. *J Hypertens* 2001; **19**: 2271-7.
4. Shirai M, Shindo T, Ninomiya I. beta-Adrenergic mechanisms attenuated hypoxic pulmonary vasoconstriction during systemic hypoxia in cats. *Am J Physiol* 1994; **266**: H1777-85.
5. Kraiczi H, Hedner J, Peker Y, Grote L. Comparison of atenolol, amlodipine, enalapril, hydrochlorothiazide, and losartan for antihypertensive treatment in patients with obstructive sleep apnea. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; **161**: 1423-8.
6. Jimenez JA, Greenberg BH, Mills PJ. Effects of Heart Failure and its Pharmacological Management on Sleep. *Drug Discov Today Dis Models* 2011; **8**: 161-166.
7. Moens AL, Yang R, Watts VL, Barouch LA. Beta 3-adrenoreceptor regulation of nitric oxide in the cardiovascular system. *J Mol Cell Cardiol* 2010; **48**: 1088-95.
8. Emorine LJ, Marullo S, Briend-Sutren MM, et al. Molecular characterization of the human beta 3-adrenergic receptor. *Science* 1989; **245**: 1118-21.
9. Nahmias C, Blin N, Elalouf JM, Mattei MG, Strosberg AD, Emorine LJ. Molecular characterization of the mouse beta 3-adrenergic receptor: relationship with the atypical receptor of adipocytes. *EMBO J* 1991; **10**: 3721-7.

学生セッション

午前 11:10~12:10



## 単層培養系における局所酸素濃度の測定

前山絵里奈<sup>1)</sup> 加川友己<sup>2)</sup> 関根佳織<sup>3)</sup> 関根和希<sup>4)</sup> 清水達也<sup>4)</sup> 常田聡<sup>1)</sup> 岡野光夫<sup>4)</sup>

1)早稲田大学大学院 先進理工学研究科 生命医科学専攻

2)早稲田大学 ナノ理工学研究機構

3)東海大学医学部 専門診療学系 小児科学専攻

4)東京女子医科大学 先端生命医科学研究所

近年再生医療が注目され、組織工学技術による三次元組織の構築が追及されている。その一つとして、本研究室では生体外において細胞シートを積層化することによる三次元心筋組織の構築が行われているが、構築心筋組織は嫌氣的代謝が優位であると示されている。これは、培養液中の酸素濃度が血液中の酸素濃度に比べ低いために、細胞へ十分な酸素が供給されていないことが原因の1つであると考えられる。よって将来的に、機能的な心筋組織の構築を実現するためには、酸素運搬体などを用いて培養を行うことにより培養細胞へ効率的に酸素を供給する培養手法の確立が必要となる。そこで本研究では、まず心臓を構成する各種細胞の酸素要求性を調べることを目的とし、培養液中における局所酸素濃度の測定系を確立した。

実験に使用した細胞は、心臓を構成する細胞種である心筋細胞、線維芽細胞、血管内皮細胞、平滑筋細胞としてそれぞれ、ヒト iPS 細胞由来の心筋細胞、ヒト心線維芽細胞(HCF)、正常ヒト心臓微小血管内皮細胞(HMVEC-C)、正常ヒト大動脈血管平滑筋細胞 (HASMC) 細胞を用いて培養皿に播種し、培養液中の酸素濃度分布の測定を行った。また比較のため、ラットの初代培養心筋細胞、及び正常ヒト皮膚線維芽細胞 (NHDF) の測定も行った。

培養液中の酸素濃度分布の測定に際しては、図1のように細胞を播種した培養皿を電子天秤の上に乗せ、マニピュレータを用いて酸素センサーを培養皿底面に向けて降下させた。底面にセンサーが接触した際の重さを電子天秤を用いて検出し、培養皿底面から培養液表面までの培養液中の酸素濃度分布の測定を行った。図2に計測データの一例を示す。培養液中に生じる酸素濃度勾配の実測値と、培養皿内中の細胞数より、1細胞あたりの酸素消費速度を見積もることで、ヒトの心臓を構成する細胞種間の相対的な酸素要求性の違いについて明らかにしていく。今後は心筋細胞などの酸素を必要とする細胞へ効率的に酸素を供給する培養手法の構築を目指していく。

謝辞：本研究は、総合科学研究開発支援プログラム (FIRST) により、日本学術振興会を通して助成されたものです。

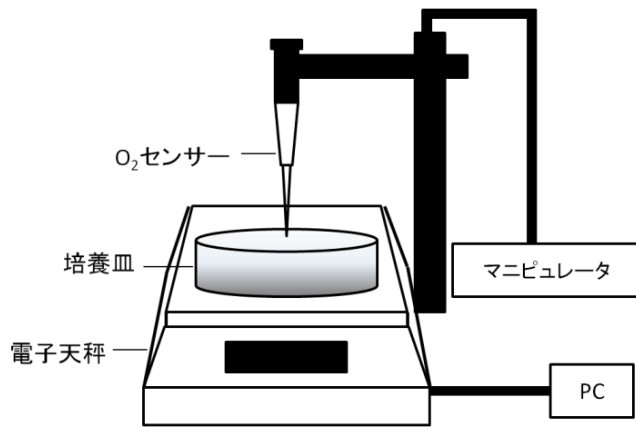


図 1. 培養液中における酸素濃度分布測定系の全体図

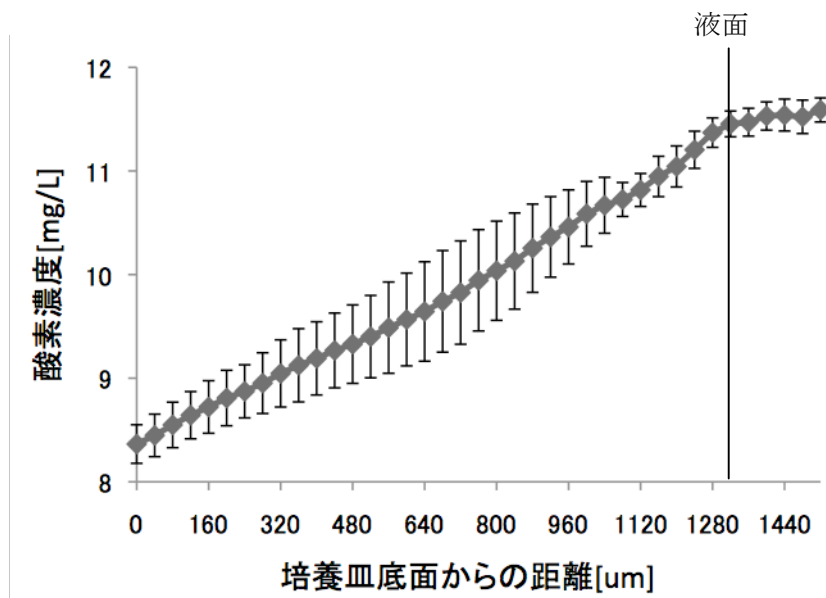


図 2. 培養液中の酸素濃度分布計測データの一例  
(ラット初代培養心筋細胞を使用)

# 酸素勾配を形成する細胞培養マイクロデバイスの開発

## Development of a Microdevice Forming Oxygen Gradient for Cell Culture

内田英幸<sup>1</sup>, 佐藤安沙子<sup>2</sup>, 宮山 明<sup>1</sup>, 塚田孝祐<sup>1, 2</sup>

<sup>1</sup>慶應義塾大学大学院 理工学研究科 基礎理工学専攻

<sup>2</sup>慶應義塾大学 理工学部 物理情報工学科

**Abstract:** Oxygen is delivered to tumor tissue by blood flow via abnormal and dysfunctional microvessels, which forms heterogeneity of tissue oxygenation in the tumor. Mimicking the oxygen gradient for cellular experiments *in vitro* is important in order to clarify the mechanisms involved in tumor biology. In this study, we designed a polydimethylsiloxane(PDMS) microdevice integrated with micro-channels to generate oxygen gradient, which enables visualizing cellular distribution under a microscope. Phosphorescence-based partial oxygen measurements quantified the oxygen gradient in the device, and the gradient can be controlled by changing oxygen gas concentration. These results suggest that the microdevice can be applied to clarify cellular mechanisms in cancer biology and immunology.

**Keywords:** Oxygen microgradient, Microdevice, Cell culture

### 1. 背景・目的

腫瘍組織内の脆弱な新生血管は不規則な分岐を繰り返し、血流は部分的な停滞や逆流を呈するため、腫瘍内には不均一な低酸素領域が形成される<sup>[1]</sup>。腫瘍内の酸素濃度勾配は血管形成や転移に関与する重要な因子であるが、生体外実験において酸素勾配を形成させることが技術的に困難であることから、酸素勾配を考慮した研究報告は極めて少ない。しかし、近年マイクロデバイスを用いて微小環境を制御する技術が確立され、生物医学領域への応用が活発となっている。マイクロデバイスにより微小環境の勾配を形成するデバイスの開発も行われているが、大部分が試薬やタンパク質の濃度勾配と細胞活性に関する検討である<sup>[2]</sup>。

本研究では微細加工技術を利用して酸素勾配を形成するマイクロデバイスを開発し、細胞培養実験に応用することを目的とした。

### 2. 実験方法

#### 2.1 培養用マイクロデバイス

Fig 1に示した培養用マイクロデバイスは高いガス透過性を有する Polydimethylsiloxane (PDMS) により作製した。2本のチャンネルにそれぞれ O<sub>2</sub> ガス、N<sub>2</sub> (95%) CO<sub>2</sub> (5%) 混合ガスを流入し、チャンネル間に酸素勾配を形成した。N<sub>2</sub> CO<sub>2</sub> チャンネルを分岐させ、一度の実験で duplicate を得られるように設計した。勾配度は PDMS の厚みに大きく依存するため<sup>[3]</sup>、2枚の薄膜によってチャンネルから培養領域までの距離を制御した。一つはチャンネルを密閉するための厚み約 50 μm の PDMS 薄膜。もう一方はリン光物質 Pd-TCPP(Ex. 532 nm/Em. 620 nm) を PDMS に混合した厚み約 100 μm の酸素プローブ薄膜である。これにより、リン光寿命法を用いることでデバイス上の酸素分圧(pO<sub>2</sub>)の継時計測を可能にした。酸素プローブ薄膜上にコラーゲンコートをし、細胞培養を行った。

チャンバー内を N<sub>2</sub> CO<sub>2</sub> 混合ガスを充填することで、pO<sub>2</sub> を 1 mmHg 以下に保ち、そこにデバイスを設置した。周囲が低酸素環境になることで、O<sub>2</sub> ガスは自然拡散し、O<sub>2</sub> チャンネル直上を pO<sub>2</sub> 最大とする酸素勾配を形成した。

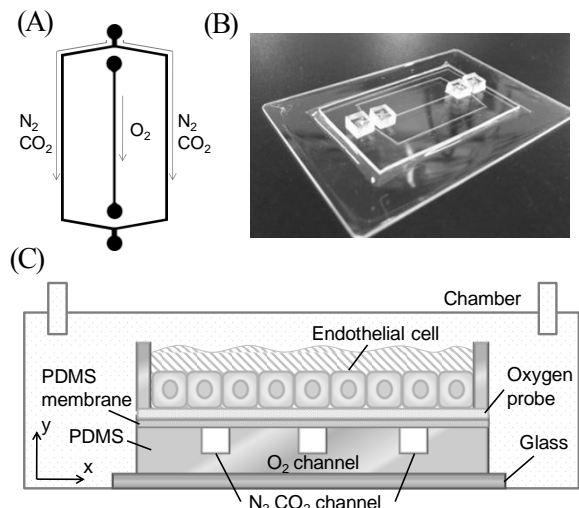


Fig. 1 Schematic diagram of microdevice.

(a) Pattern of microchannel. (b) Photograph of the actual device.

(c) Cross-sectional view of oxygen micro gradient system.

#### 2.2 酸素拡散シミュレーション

Fig. 1(C) のデバイス断面図の 2 次元空間において酸素拡散のシミュレーションを行い、O<sub>2</sub> チャンネル・N<sub>2</sub>CO<sub>2</sub> チャンネル間に形成される酸素勾配を評価した。拡散方程式は (1) 式で表わされ、(2) 式の差分表現を用いて数値解析により処理を行った。プログラミング言語は C++ を用いて実装した。

$$\frac{\partial P(t, x, y)}{\partial t} = D \left( \frac{\partial^2 P(t, x, y)}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 P(t, x, y)}{\partial y^2} \right) \quad (1)$$

$$P(t + \Delta t, x, y) = P(t, x, y) +$$

$$\frac{D\Delta t}{\Delta x^2} \{P(t, x - \Delta x) - 2P(t, x) + P(t, x + \Delta x)\} +$$

$$\frac{D\Delta t}{\Delta y^2} \{P(t, y - \Delta y) - 2P(t, y) + P(t, y + \Delta y)\} \quad (2)$$

$$\left[ \begin{array}{l} P : \text{酸素分圧 (mmHg)} \\ D : \text{拡散係数 (mm}^2/\text{s)} \end{array} \right]$$

なお、PDMSの拡散係数を $4.1 \times 10^3 \text{ mm}^2/\text{s}$ 、水の拡散係数を $2.1 \times 10^3 \text{ mm}^2/\text{s}$ とした。 $\text{O}_2$ ガス濃度100%と20%の2種類において検討を行い、 $\text{O}_2$ チャンネル内をそれぞれ760 mmHg、151 mmHgと仮定した。 $\text{N}_2\text{CO}_2$ チャンネル内及び境界面は0 mmHgとした。

### 2.3 酸素勾配測定

デバイス上に形成された酸素勾配は酸素消光作用を利用したリン光寿命法により定量的に評価した。Nd:YAG レーザー(第2高調波: 532 nm)からの出射光を酸素プローブに照射し、発生するリン光をPMT(光電子増倍管)で受光した。リン光減衰波形から算出したリン光寿命 $\tau$ を(3)式の Stern-Volmer 式に代入し  $p\text{O}_2$  を求めた。なお、 $\tau_0=0.538 \text{ ms}$ 、 $k_q=0.197 \text{ mmHg}^{-1}\text{ms}^{-1}$ とした。 $\text{N}_2\text{CO}_2$ 混合ガスの流量を0.01 MPa、 $\text{O}_2$ ガスの流量を100 ml/minとし、 $\text{O}_2$ ガス濃度100%と20%の2種類において検討を行った。 $\text{O}_2$ チャンネル直上を $d=0$ とし、 $\text{N}_2\text{CO}_2$ チャンネル方向へ1 mm間隔で測定を行った。

$$\frac{\tau_0}{\tau} = 1 + \tau_0 k_q [\text{O}_2] \quad (3) \quad \left[ \begin{array}{l} \tau_0: \text{無酸素下のリン光寿命} \\ k_q: \text{消光定数} \end{array} \right]$$

### 2.4 細胞培養評価

作製したデバイス上で細胞培養が可能か評価を行った。酸素プローブ薄膜上にコラーゲンコートをし、HUVEC(ヒト臍帯静脈由来血管内皮細胞)を $5.0 \times 10^3 \text{ cells}/\text{cm}^2$ で播種した。播種後、24時間及び96時間インキュベーター内で培養し、Calcein-AM(Ex. 488 nm/Em. 515 nm)により染色した。染色30分後、共焦点顕微鏡により蛍光画像を取得した。

## 3. 結果・考察

### 3.1 酸素勾配測定

シミュレーション結果より、 $\text{O}_2$ チャンネル直上を $p\text{O}_2$ 最大とする酸素勾配が形成されていることが確認された(Fig. 2)。また、 $\text{O}_2$ ガス濃度を100%から20%に変化させたところ、全体的に $p\text{O}_2$ が減少し酸素勾配の傾きが変化した。リン光寿命法による測定結果も同様に、酸素勾配の形成及び $\text{O}_2$ ガス濃度に応じた勾配の変化が見られた。なお、各チャンネル間において勾配の差異はなく、チャンネルに対して平行方向において $p\text{O}_2$ の変化は見られなかった。100% $\text{O}_2$ の $d=0$ 付近において、シミュレーション結果に比べ低い値が出たが、原因として境界条件の設定が挙げられる。 $\text{O}_2$ チャンネル内を760 mmHgと仮定したが、チャンパー内は1 mmHg以下の低酸素環境となっておりチャンネル内の $p\text{O}_2$ が設定した条件より低下していた可能性がある。また、リン光寿命法は高酸素濃度において精度が低下するという点も挙げられる。

シミュレーション及び測定結果より、 $\text{O}_2$ ガス濃度を調節することにより、勾配の制御が可能であることが示された。生体内の環境を考慮すると、 $\text{O}_2$ ガス濃度20%以下が望ましいと言える。目的に応じてガス濃度を変化させることにより、腫瘍組織内の低酸素環境、虚血再灌流、高酸素療法など様々なモデルにおける検討が可能になる。

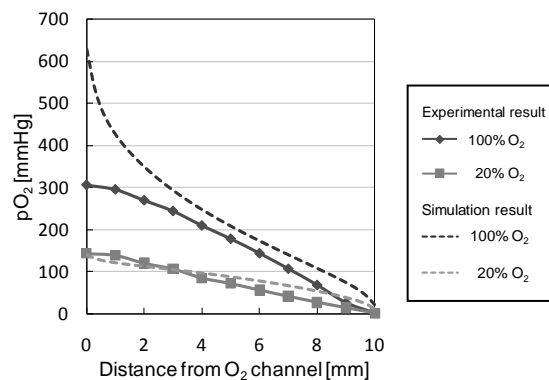


Fig. 2  $p\text{O}_2$  measurement on device.

### 3.2 細胞培養評価

取得した蛍光画像よりデバイス上において、内皮細胞の接着が見られた(Fig. 3)。また、培養時間24 hと96 hの画像より、内皮細胞の増殖を確認した。これにより、本デバイスの生体応用が可能であることが示された。

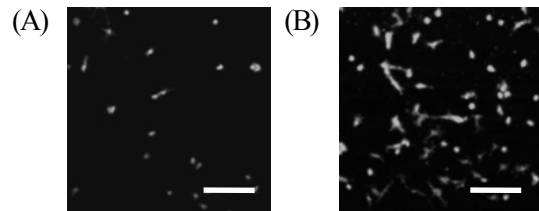


Fig. 3 Fluorescence images of HUVEC cultured for (a) 24 and (b) 96 hours on the device. Scale bar is equal to 200  $\mu\text{m}$

## 4. 結論

酸素勾配を形成するマイクロデバイスの開発を行った。デバイス上の $p\text{O}_2$ 測定結果から、酸素勾配の形成が確認され、本デバイスの有用性が示された。チャンネルに流入する $\text{O}_2$ ガス濃度を調節することにより、勾配の制御が可能である。また、内皮細胞の蛍光画像よりデバイス上において細胞の接着・増殖が確認され、生体応用が可能であることが示された。

本デバイスにより、腫瘍組織における酸素勾配が細胞に与える影響について詳細な検討が可能となる。ガス濃度の調整やタンパク質を添加することにより、対象とするモデルにより近い環境を *in vitro* にて模擬できる。腫瘍細胞や免疫細胞に応用することで、低酸素環境における転移能や免疫機能の機序の解明につながることを期待される。

## 参考文献

- [1] Thomlinson RH *et al.*, "The histological structure of some human lung cancers and the possible implications for radiotherapy", *British journal of cancer*, vol. 9, pp539-49 (1955)
- [2] Khademhosseini A *et al.*, "Microscale technologies for tissue engineering and biology", *Proc Natl Acad Sci USA*, vol. 103, pp2480-7 (2006)
- [3] Adler M *et al.*, "Generation of oxygen gradients with arbitrary shapes in a microfluidic device", *Lab on a Chip*, vol. 10, pp388-91 (2010)

# マウス背側皮膚窓への培養肝細胞組織移植による 血管新生観察と組織酸素分圧測定

若杉 美樹<sup>1</sup>, 牛山 明<sup>2</sup>, 谷下 一夫<sup>1,3</sup>, 須藤 亮<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>慶應義塾大学大学院 理工学研究科 総合デザイン工学専攻

<sup>2</sup>国立保健医療科学院 生活環境研究部

<sup>3</sup>慶應義塾大学 理工学部 システムデザイン工学科

## 【緒論】

生体肝移植にはドナー不足などの問題があり、生体肝移植に代わる肝疾患の治療法として、肝臓組織工学が注目されている。組織工学とは、細胞から移植可能な組織をデザインすることである。治療効果を持つような大きさを持った組織には、酸素・栄養供給のための毛細血管ネットワークが必要となる。

従来研究では、生体外において肝細胞組織内に毛細血管を構築すること(血管化)に成功していない。生体外では、細胞の培養環境が限られたパラメータの組み合わせでしかなく、生体内を完全に模擬することができないからである。

一方、生体内では創傷治癒や部分肝切除からの再生など、状況に応じて血管新生が行われる理想的な環境が備わっている。そこで、生体内の微小循環と移植した小型肝細胞を可視化し、小型肝細胞の組織化、血管化のプロセスを明らかにすることが、生体外での組織工学の研究に役立てられると考えた。

本研究では、皮下組織の血管網を可視化できる背側皮膚窓に着目して、移植した小型肝細胞と血管網を観察した。また、移植組織の細胞動態と血管化には酸素分圧が関連しているため、生体内の酸素分圧も測定した。

## 【実験方法】

### ＜細胞片移植＞

EGFP ラットの小型肝細胞を二段階コラゲナーゼ法により分離した。小型肝細胞は成熟肝細胞よ

りも未分化な細胞で、増殖が旺盛で長期培養が可能であるという特徴を持つ<sup>[1]</sup>。相分離法で作製した多孔質 PLGA(ポリ乳酸-グリコール酸共重合体)薄膜<sup>[2]</sup>を 5 mm×10 mm に裁断しコラーゲンコーティングを施した。PLGA は生体吸収性、生体適合性があるため、移植の足場として適している。PLGA 薄膜上に、小型肝細胞を播種し(図 1A)、約 6 日後に細胞同士を積層することで(図 1B)、細胞同士が接着した積層組織片を(図 1C)。約 8 日後、積層した移植片をヌードマウス(BALBnu/CrlCrIj)に装着した背側皮膚窓に移植した。

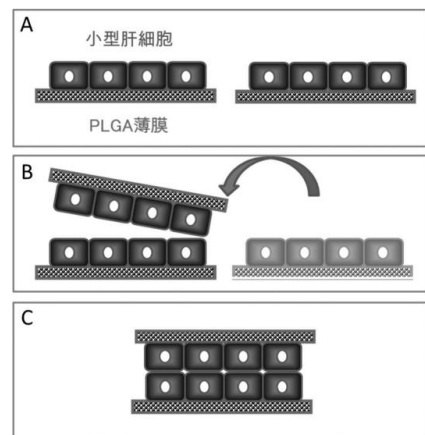


図 1 積層移植片の作成

小型肝細胞播種から 0 日目(A), 6 日目(B), 8 日目(C)

### ＜顕微鏡観察＞

観察は 2~3 日毎に移植から 20 日程度、蛍光顕微鏡を用いて行った。移植細胞の形態変化、組織構築は移植細胞に導入された EGFP の観察で行った。血管造影は赤血球(RBC)を DiI で染色して作製した DiI-RBC または Rhodamine B isothiocyanate-dextran 溶液により行った。

### <酸素分圧測定>

りん光の酸素消光作用を利用して移植組織内外の酸素分圧を測定した。Pd-TCPP 溶液を尾静脈から組織に浸潤させ、パルスレーザーを照射し、消光波形から Stern-Volmer の関係式  $\frac{1}{\tau} = \frac{1}{\tau_0} + K_q[pO_2]$  を用いて酸素分圧を計算した。測定箇所を、細胞が残り血管新生した部位(新生血管部位)、細胞が残っているが血管新生していない部位(未新生血管部位)、細胞数が減少している部位(細胞減少部位)の3つに分類し、比較として未移植個体の酸素分圧を測定した。

### 【結果および考察】

移植細胞は、移植後 30 分静置することで移植先の皮下組織に生着した。移植後 2 週目までは、肝細胞に特徴的な形態を維持しており、3 週目頃にかけて繊維状に伸展した細胞が観察されることがあった。

移植前の積層組織片では肝細胞に特異的な構造である毛細胆管が形成されていたが、この構造は移植後も維持され、移植 3 週目にかけて太くなる様子も観察された(図 2)。

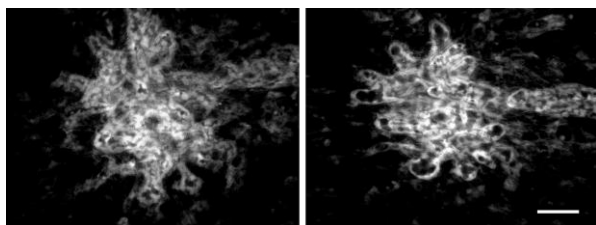


図 2 毛細胆管様構造の変化  
(left: day6, right: day9, scale bar=100  $\mu$ m)

移植後 2~3 週目には、移植細胞の管状構造ができ、DiI-RBC の蛍光観察から、一部は血流を有していることが分かった(図 3A)。また、Rhodamine B isothiocyanate-dextran の蛍光観察からは、移植細胞に取り囲まれていない新生血管も観察された(図 3B)。

以上より、移植細胞は少なくとも約 3 週は形態を維持し、血管新生を促進することが示唆された。

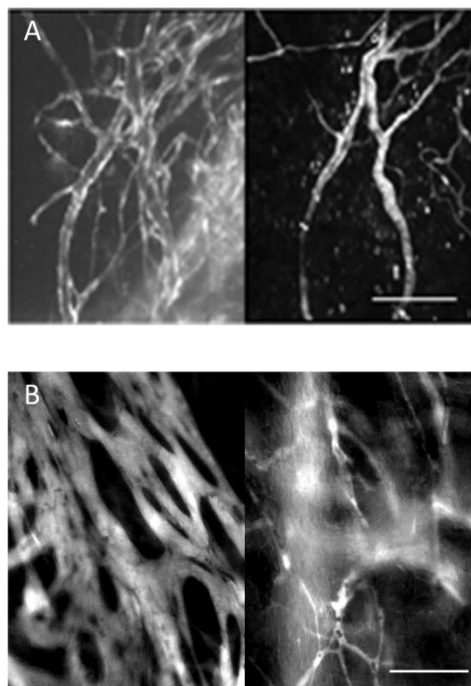


図 3 血管新生の観察  
(A)移植細胞に囲まれた部位、  
(B)移植組織に囲まれていない部位  
(left: EGFP, right: DiI-RBC(A), Rhodamine B isothiocyanate-dextran(B), scale bar=100  $\mu$ m)

新生血管が構築された後、移植から 3 週目に酸素分圧を測定したところ図 4 のようになった。組織の酸素分圧は、未新生血管部位で最も低く、新生血管部位と細胞減少部位でほぼ同等の値となり、血管新生により酸素供給が高まったと考えられる。

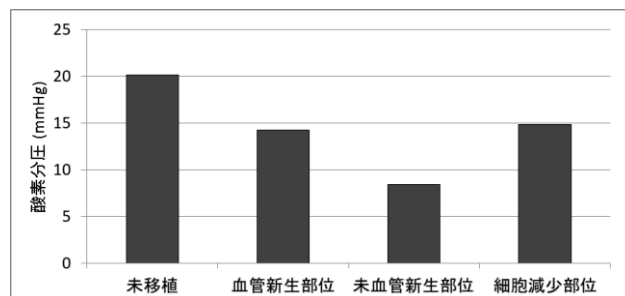


図 4 酸素分圧測定

### 【参考文献】

- [1] Sudo *et al.*, *FASEB J* **19** (12): 1695-1697, 2005
- [2] Kasuya *et al.*, *Biomaterials* **33** (9): 2693-2700, 2012

特別講演

午後 13:20~14:20

## 特別講演

TRPA1 チャンネルによる高濃度酸素を含む有毒ガスの検出とその帰転

桑木共之

鹿児島大学大学院医歯学総合研究科 統合分子生理学

TRP チャンネルは 1989 年にショウジョウバエの遺伝子が同定されて以来、世界中で精力的に研究され、温度・機械刺激・浸透圧・カプサイシンを初めとする種々の化学物質・pH 等を検出するセンサーとしての役割が明らかになってきた。最近我々は TRP チャンネル活性化の分子メカニズムを明らかにする目的で種々の TRP チャンネルの酸化感受性を定量し、TRPA1 チャンネルが最も感受性が高いことを明らかにした (Nature Chemical Biology 7:701-711, 2011)。しかも、TRPA1 を発現させた培養細胞に種々の酸素濃度溶液を加えたところ、TRPA1 の活性化状態は通常の大気圧における酸素分圧 (152 mmHg) よりも少し低い 137 mmHg で最低であり、それよりも高酸素でも低酸素でも、それぞれ別々のアミノ酸残基の修飾によって活性化されることが明らかになったのである。

体内（血中）の酸素濃度は頸動脈小体のグロムス細胞によってモニターされ、低酸素を検出すると呼吸が増加するという低酸素呼吸増強反射は既に確立された生理機構である。一方、高酸素の検出系はこれまでに知られておらず、高酸素呼吸抑制反射は頸動脈小体の基礎活動の抑制に由来すると説明されてきた。TRPA1 は高酸素を直接検出可能であるというユニークな性質を持っており、しかも鼻粘膜からの求心路である三叉神経や気道の迷走神経求心性線維に分布することから、血中の酸素濃度が変化する以前に外界のガス環境変化を検出して警告を発する系として機能している可能性がある。

上述の「TRPA1 アラーム仮説」を検証するために TRPA1 欠損マウスと対照野生型マウスとを用いて以下の実験を行った。(1) 忌避／近接行動を利用して、酸素濃度や刺激物質の検出に寄与している可能性を調べる。(2) 酸素濃度変化による呼吸出力変化を比較する。(3) 酸素濃度変化による迷走神経の活性化を比較する。(4) 低酸素及び高酸素環境で長期間飼育し、心血管系および活性酸素種への影響を調べる。

TRPA1 欠損マウスは、(1) ホルマリン蒸気で充満した部屋に平気で侵入し、(2) 吸入酸素濃度を変化させても中等度低酸素領域での呼吸増大と高酸素領域での呼吸抑制が起こらず、(3) 同領域での迷走神経の活性化も起こらず、(4) 飼育環境酸素濃度変化による心血管系の障害が増悪した。

ある種の微生物、線虫、昆虫では酸素忌避行動を示すことが知られ、酸素毒性を最小限にするために断続的呼吸を行っている昆虫も知られている。しかしながら、脊椎



動物では高酸素感受性に関する研究は皆無であった。ヒトを含む哺乳類にも存在する TRPA1 チャンネルが高酸素感受性を示すという我々の研究成果は、できてしまった活性酸素種を不活性化する Superoxide dismutase 等の既に知られている防御機構に加え、毒性を発揮する前に過剰な酸素の取り込みを抑制する警告系が哺乳類にも存在している可能性を示している。

聴覚障害者に対する緊急警報装置としてワサビの蒸気を噴出させる装置を開発した功績で日本人研究者が 2011 年のイグノーベル賞を受賞した。彼らは、ワサビの「臭い」が寝ている聴覚障害者を起こしたと考えているが、ワサビ成分のアリルイソチアネートは強力な TRPA1 活性化作用を持つので、嗅覚神経だけでなく三叉神経もその機序に関与している可能性がある。

以上の結果と考察から、TRPA1 チャンネルは、高・低濃度酸素やホルマリン、アリルイソチアネートなどの有毒ガスの検出とそれに引き続く回避行動・呼吸抑制・覚醒などをトリガーする警報装置としての役割を果たしている、と結論した。

オーガナイズド・セッション

午後 14:30~16:30

# NIRS 信号のアーチファクト評価と低減方法

～脳賦活信号を抽出するために～

河野 理、 星 詳子

東京都医学総合研究所 ヒト統合脳機能プロジェクト

## 1. はじめに

NIRS 信号によって、脳賦活信号を検出するためには、NIRS における様々なアーチファクトの発生メカニズムを知り、実験パラダイムや解析方法の工夫が必要になる。ここでは、NIRS 信号のアーチファクトを、1) 装置系アーチファクト、2) 体動アーチファクト、3) 生理的アーチファクト、4) Modified Beer-Lambert Law の近似誤差によるアーチファクト、5) 画像化アーチファクトに分類し、その評価および対策方法について検討する。その中で、特に、報告者らが提案した独立成分分析を用いた皮膚血流低減方法および3波長による吸光度変化の最小二乗誤差を用いたアーチファクト指標について紹介する。

## 2. アーチファクト評価の分類と対策

### 2-1) 装置系アーチファクト

装置系アーチファクトの混入を防ぐためには、適切な装置管理が必要となる。すなわち、光ファイバは丁寧に取扱い、実験に入る前には、ファントムを用いて、性能チェックを行い、装置系のアーチファクトが混入していないかを確認しておくことが重要である。一般に、半導体レーザは、温度によって、その特性が変わるため、NIRS 信号が変化する。よって、温度コントロールが付加されている装置では、その設定温度になるまでの時間を待って、測定を開始する等の注意が必要である。温度コントロールが付加されていない装置では、室温を一定に保つ等の工夫が必要となる。

### 2-2) 体動アーチファクト

#### ・ファイバと頭表との接触状態の変化

ファイバと頭表との接触面は、装置と生体とのインターフェースであり、NIRS 信号の質を決定する最も重要な部分である。多くの体動アーチファクトは、この接触面の接触状態が変化することによって、引き起こされている。その発生メカニズムから、更に、1) 体動による光ファイバケーブルの張力変化、2) 頭部の加速度的な動き、3) 接触面での筋肉の動きがある。1) に関しては、光ファイバの一部を頭部に固定し、ファイバヘッドに張力変化が伝わらないようにすることで、アーチファクトの軽減が可能である。2) に関しては、ファイバヘッドを頭部にしっかりと固定し、頭に加速度的な変化を与えないように、被験者に説明する必要がある。3) に関しては、光ファイバが前額部に設定された場合は、眉を上げたり、眉間にしわを

寄せたりしないように、側頭部に設置された場合は、口を動かしたり、歯を噛みしめたりしないように注意する必要がある。しかしながら、2)、3)に関して、乳幼児等に関して、その対策は困難であり、様々な動きのアーチファクトを軽減する補正方法が提案されている。

#### ・姿勢変化

頭部を傾たり、大きく姿勢を変化させることは、頭部の血流状態を変化させ、それに伴うアーチファクトが発生する。特に、タスクに同期して、頭部を傾たり、大きく姿勢を変化させた場合は、脳賦活信号との区別をすることに困難が生じるので、注意をする必要がある。

### 2-3) 生理的アーチファクト

#### ・心拍、呼吸および血圧変動

一般に、心拍、呼吸および血圧変動が原因となるアーチファクトは、バンドパスフィルタや加算によって、軽減することができる。しかしながら、リアルタイム性を必要とするブレインマシンインターフェースなどの応用においては、加算等が使用できない場合があり、短い距離の送受光ファイバによって得られた信号を用いる様々な適応フィルタによる軽減が試みられている。

#### ・頭皮（筋肉等を含む）血流変化

筋肉等を含む頭皮血流変化によるアーチファクトは、タスクに同期する場合があるため、脳賦活信号との区別が困難となっており、そのアーチファクトの低減に関して、いくつかの手法が提案されている。しかしながら、現時点では、手法による低減率や精度、妥当性の点で、多くのユーザが納得して使用できるレベルに到達しておらず、更なる研究を続けていく必要がある。

#### ・発汗（ファイバ接触面への混入）

計測中の発汗により、ファイバ接触面の状態が変化し、アーチファクトが発生する場合がありますと考えられる。

### 2-4) Modified Beer-Lambert Law の近似誤差アーチファクト

現在、広く普及している光脳機能イメージング装置では、NIRS 信号を算出する計算式として、Modified Beer-Lambert Law において、散乱変化は NIRS 信号に寄与しないとし、単層媒体モデルに適用したものが用いられている。この仮定が成り立たない場合、それに起因したアーチファクトが発生することに注意しておく必要がある。

### 2-5) 画像化アーチファクト

光マッピング（トポグラフィー）の画像化アルゴリズムは、計測された信号値を送受光ファ

イバ間隔の midpoint に対応させ、線形補間あるいはスプライン補間を用いる。すなわち、画像化において、空間感度分布が考慮されていないため、解剖学的構造の異なる頭部領域での信号値の比較は困難となる。更に、脳賦活位置と送受光ファイバ配置の位置関係によって、得られる画像が異なるという結果が得られており、これらのことを考慮したうえでの解析が必要となる。

### 3. 独立成分分析を用いた皮膚血流低減方法

報告者らは、fNIRS 信号に独立成分分析を適用し、独自に、空間均一係数を導入することによって、頭皮血流相当成分を自動的に判別し、頭皮血流を軽減することに成功した。適用例として、左側頭部に光脳機能イメージング装置(FOIRE-3000、島津製作所製)の送受光ファイバ(52 チャンネル、送光ファイバ: 16 本、受光ファイバ: 16 本)、前額部にレーザ組織血流計(FLO-C1、オメガウェーブ社製)のセンサを設定し、前レスト(15 秒)ー右指タッピング(2Hz: 30 秒)ー後レスト(15 秒)を 6 回繰り返すタスクパラダイムを実行した。図 1 に、頭皮血流変化が計測されたある繰り返し時の oxyHb の変化を示す。図 1 の第 57 チャンネルは、レーザ組織血流計からのアナログ入力が行われており、タスクに関連した頭皮血流の変化が計測されていることがわかる。また、図 1 のいくつかのチャンネルにおいて、頭皮血流成分が重畳されていると思われる信号変化が計測されていることがわかる。計測された oxyHb のタイムコースに対して、独立成分分析を行ったところ、空間均一係数の極めて高い成分が出現した。そこで、この成分が頭皮血流成分である可能性が高いと判別し、その成分を除去したところ、重畳されていた頭皮血流成分が軽減され、手の運動野に相当する領域に限局した賦活が抽出された。例えば、図 1 の 48 チャンネル(楕円点線で囲まれている部分)の信号は、運動領域と異なった位置に現れ、レーザ組織血流計で計測された波形の挙動と似ているため、頭皮血流信号成分の可能性が考えられるが、図 2 において、この信号成分が見事に抑制されていることがわかる。

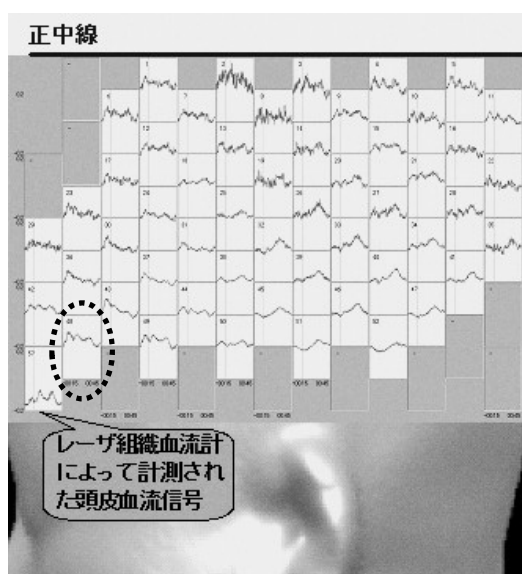


図 1. 頭皮血流変化が計測された時の oxyHb の変化

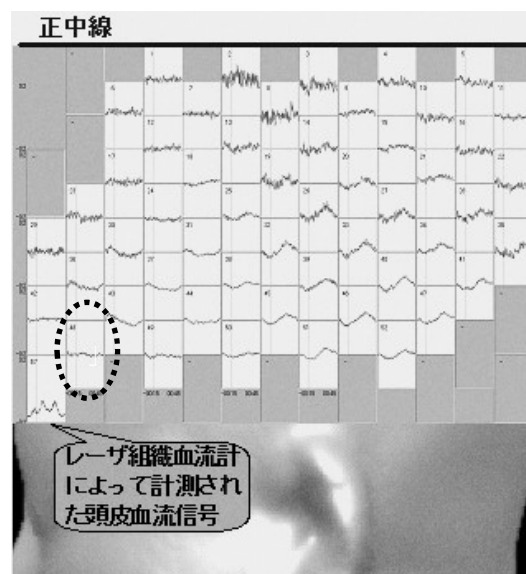


図 2. 頭皮血流成分を軽減したときの oxyHb 変化

#### 4. 3波長による吸光度変化の最小二乗誤差を用いたアーチファクト定量指標

報告者らは、Modified Beer-Lambert Law が成り立たなくなる指標として、吸光度変化の最小二乗誤差を導入し、この指標が、ヘモグロビンに因らないアーチファクトの検出に利用できることを発見した。図3に、ファイバヘッドのファントム底面への接触距離を変化させた場合の計算上の oxyHb 信号と deoxyHb および最小二乗誤差の挙動を示す。図4に、ベビーオイルをファントムとファイバの接触面に垂らした場合の計算上の oxyHb 信号と deoxyHb および最小二乗誤差の挙動を示す。これらの信号変化は、接触面の状態変化によって引き起こされるアーチファクトであるが、アーチファクトに追従して最小二乗誤差が変化していることがわかる。

発汗やわずかな動きによる接触面の状態変化によって引き起こされるアーチファクトの判別は、信号の波形解析からは困難であると考えられるが、最小二乗誤差を用いることで、それらのアーチファクト判別が可能になると考えられた。

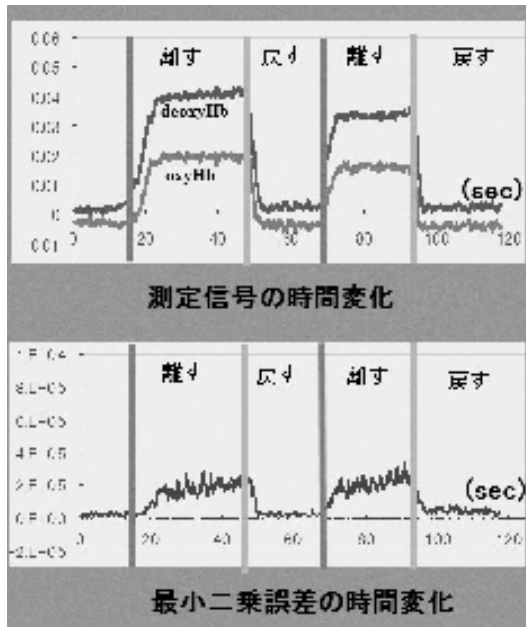


図3 接触距離変化と NIRS 信号および最小二乗誤差変化

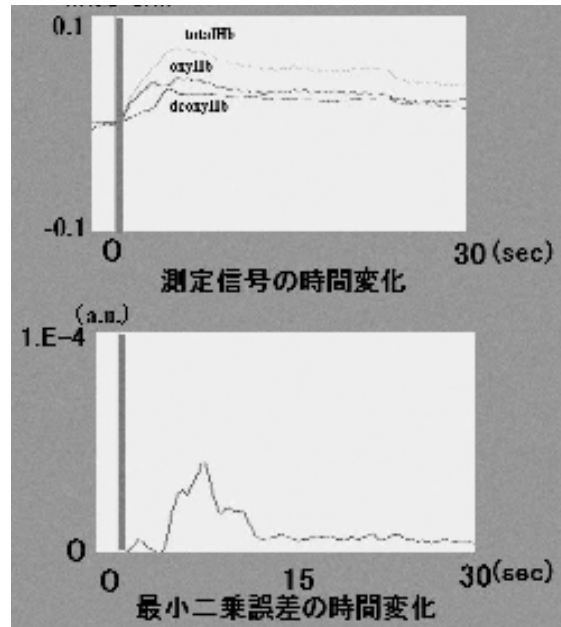


図4 ベビーオイルによる NIRS 信号および最小二乗誤差変化

# 血流動態モデルに基づく新しい fNIRS 信号分離法

○山田 亨<sup>1</sup>, 梅山伸二<sup>1</sup>, 松田圭司<sup>1</sup>

<sup>1</sup>(独)産業技術総合研究所 ヒューマンライフテクノロジー研究部門

## 1. はじめに

fNIRS (functional Near-Infrared Spectroscopy)とは、脳神経活動に伴って当該局所で生じる血流変化を近赤外線分光法に基づいて計測する手法である。計測では通常図1のように、頭皮上に 30 mm 程度の距離で置かれた光源と検出器間を伝播した光の強度変化を観測する。したがって原理上、fNIRS 信号には全ての伝搬経路上の光学的変化の影響が反映される。表層組織については、刺激呈示や課題遂行に伴う血流変化はほとんどないと長い間信じられてきたが、近年、刺激や課題と機能相関の乏しい脳領域でも広く信号が観測されることが複数の研究者から報告されるに至り<sup>1-3</sup>、こうした false positive な信号変化をいかに排除するかが大きな技術課題となってきた。これに応えるべく我々が近年行ってきた血流動態モデルに基づく新しい信号分離法<sup>4</sup>について以下に述べる。

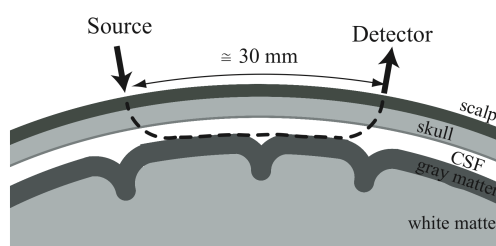


図 1 fNIRS 計測のプローブ配置と光伝搬

## 2. 頭部血流変化における二つの異なる様相 - Hemodynamic modality model -

脳組織で神経活動が生じると、実際の酸素消費を大きく上回る血流供給が生じることが知られている。組織への酸素供給の場となる毛細血管は容積変動しない性質をもつため、この過程ではオキシヘモグロビンが血管内を満たしていくに従ってデオキシヘモグロビンは減少すると期待される。他方、動脈での拍動、自律神経性の血管収縮拡張、さらには姿勢変化に伴う動静脈での鬱血などでは、血管の容積変動が生じる一方で血管内血液の酸素飽和度はほぼ一定している。このような過程ではオキシヘモグロビンとデオキシヘモグロビンはその血液の酸素飽和度に応じた割合で同じ方向に増大/減少すると期待される。

このような様相の異なる二つの血流成分の影響が fNIRS 信号に混在している状況は、以下の二つの式で表される。

$$\begin{pmatrix} \Delta\text{HbO} \\ \Delta\text{HbR} \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} \Delta\text{HbO}_F \\ \Delta\text{HbR}_F \end{pmatrix} + \begin{pmatrix} \Delta\text{HbO}_S \\ \Delta\text{HbR}_S \end{pmatrix}, \quad \begin{pmatrix} \Delta\text{HbR}_F \\ \Delta\text{HbR}_S \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} k_F & 0 \\ 0 & k_S \end{pmatrix} \begin{pmatrix} \Delta\text{HbO}_F \\ \Delta\text{HbO}_S \end{pmatrix} \quad (1)$$

ここで、 $\Delta\text{HbO}$ ,  $\Delta\text{HbR}$  は通常の fNIRS 計測で得られたオキシ、デオキシヘモグロビンの時間変化データである。二つの血流成分のオキシ、デオキシヘモグロビンの時間変化を添字 F, S で区別し、以下では脳機能成分 (functional component) と全身性成分 (systemic component) と呼ぶことにする。 $k_F$ ,  $k_S$  はそれぞれ脳機能成分と全身性成分におけるオキシ、デオキシヘモグロビン変化量の間になり立つ比例関係の比例定数である。上述のように、これらの比例係数は異なる値をもつと考えられるため、以下のように成分分離が可能となる。

$$\begin{pmatrix} \Delta\text{HbO}_F \\ \Delta\text{HbR}_F \end{pmatrix} = \frac{1}{k_F - k_S} \begin{pmatrix} -k_S & 1 \\ -k_F k_S & k_F \end{pmatrix} \begin{pmatrix} \Delta\text{HbO} \\ \Delta\text{HbR} \end{pmatrix}, \quad \begin{pmatrix} \Delta\text{HbO}_S \\ \Delta\text{HbR}_S \end{pmatrix} = \frac{1}{k_F - k_S} \begin{pmatrix} k_F & -1 \\ k_F k_S & -k_S \end{pmatrix} \begin{pmatrix} \Delta\text{HbO} \\ \Delta\text{HbR} \end{pmatrix} \quad (2)$$

上式における定数  $k_F, k_S$  の値を何らかの方法で知ることができれば、我々は通常の fNIRS 計測で得られたデータを脳機能成分と全身性成分へと信号分離することが可能となる。

### 3. 二つの血流成分の定数 $k_F, k_S$ の推定

上に述べた二つの血流成分は、その生理学的機序も組織学的由来も異なる。従って各成分の時間変化は互いに高い情報独立性を示すと考えられる。そこで我々はこの二成分間の相互情報量  $I(k_F, k_S)$  を以下のように計算し、

$$I(k_F, k_S) = \sum_{\Delta\text{HbO}_F} \sum_{\Delta\text{HbO}_S} p(\Delta\text{HbO}_F, \Delta\text{HbO}_S) \cdot \log \frac{p(\Delta\text{HbO}_F, \Delta\text{HbO}_S)}{p(\Delta\text{HbO}_F) \cdot p(\Delta\text{HbO}_S)} \quad (3)$$

その値を最小化する定数  $k_F, k_S$  の組み合わせを用いた成分分離が最も妥当な結果を与えるものと考えた。ここで、 $p(X)$  は変数  $X$  の確率密度分布であり、 $p(X, Y)$  は変数  $X, Y$  の同時確率密度分布である。これらは、ある  $k_F, k_S$  の組み合わせの下で式(2)により算出される各血流成分  $(\Delta\text{HbO}_F, \Delta\text{HbR}_F)^T$  と  $(\Delta\text{HbO}_S, \Delta\text{HbR}_S)^T$  の正規化ヒストグラムに基づいて与えることができる。

さて、神経科学で広く用いられる BOLD fMRI の計測理論は、異なる個体、領野、生理条件においても脳神経活動に伴う局所血流反応はユニバーサルであるとの前提の下に構築されている。この前提に従うなら、式(2)中の脳機能成分の比例定数  $k_F$  もまたユニバーサルな値を想定できるであろう。そこで我々は過去の fNIRS 研究の中から、何らかの手段で表層血流の影響を排除している研究 16 例を調べた。報告内で示された  $\Delta\text{HbO}_F$  と  $\Delta\text{HbR}_F$  のグラフから  $k_F$  の値を試算したところ、 $k_F = -0.56 \pm 0.12$  という値を得た。

一方、全身性成分の定数  $k_S$  については事情が異なる。例えば、拍動や自律神経性の血管収縮拡張に由来する血流変化は主に動脈血の変動であるため、 $\text{HbO}_S$  が大きく変動する一方で動脈血にほとんど含まれない  $\text{HbR}_S$  の変化はわずかである。したがって  $k_S$  はゼロに近い値を示す。また、姿勢変化に伴う鬱血では  $\text{HbR}_S$  が比較的多い静脈の受動的拡張が少なからず寄与するため、より大きな正值を示すと考えられる。このように、 $k_S$  は当該血管の血液酸素飽和度と密接な関係を持つため、課題の種類や観測部位直下の動静脈分布などによって異なり得る。

以上の考察に基づき、我々はすべての実験において  $k_F = -0.6$  に固定し、また各実験において相互情報量  $I(k_F = -0.6, k_S)$  を最小化する  $k_S$  を定めた。そして、これらの  $k_F, k_S$  を用いて式(2)により成分分離を行った。

### 4. 実験方法

実験は産業技術総合研究所人間工学実験委員会の承認の下で行われた。7名の被験者に以下に述べる実験内容を文書と口頭で説明し、書面による実験協力の承諾を得た。



#### 4. 1. 装置・プローブ位置

計測には島津製作所 OMM-3000 に独自に開発したプローブとホルダシステムを組み合わせて使用した。各被験者には予め、次節に記す脳機能課題時の fMRI 計測を行って左右大脳半球上の一次運動野を特定し、その各直上位置に一組ずつプローブを配置した。サンプリングレート 40Hz で計測された  $\Delta\text{HbO}$  と  $\Delta\text{HbR}$  のデータは 10Hz にダウンサンプルしたのち、1Hz のローパスフィルタ処理を行った。

#### 4. 2. 実験課題

非脳機能課題として①おじぎ(上体 30° 前傾)、②息止めを、また脳機能課題として③左右片側手指運動課題の実験を行った。非脳機能課題実験①②は(安静 20 秒→課題 20 秒)の5回繰り返し→安静 20 秒の実験デザインを用い、脳機能課題実験③には(安静 20 秒→左手指運動 20 秒→安静 20 秒→右手指運動 20 秒)の5回繰り返し→安静 20 秒の実験デザインを用いた。

### 5. 結果

①おじぎ、および②息止め課題での結果を図 2a(左)および b(右)に示す。

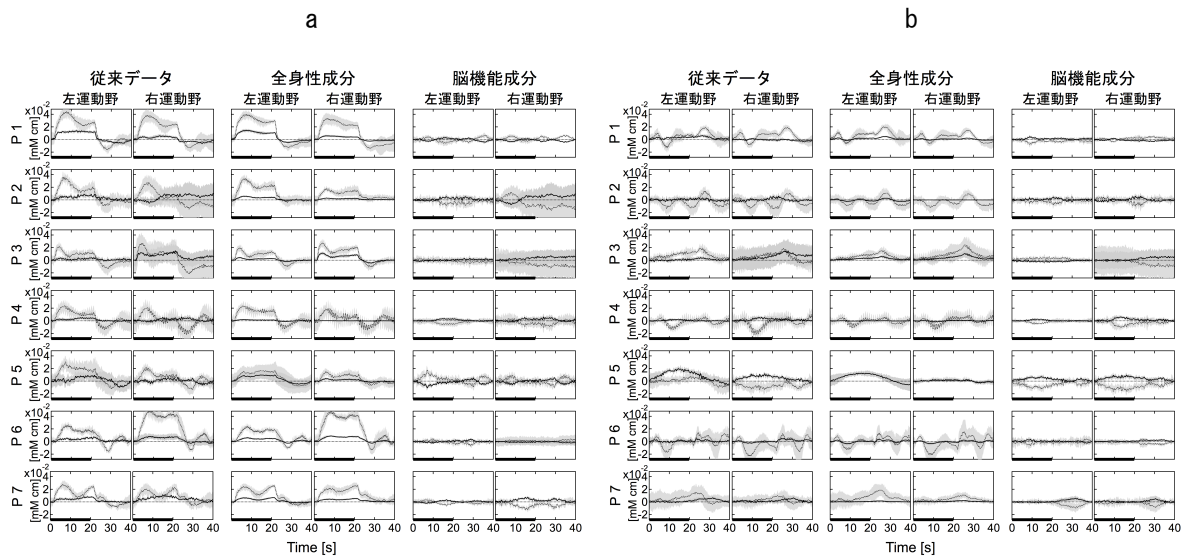


図 2 おじぎ課題(a)と息止め課題(b)時の従来の fNIRS データとその分離信号の比較  
点線, オキシヘモグロビン; 実線, デオキシヘモグロビン; 太線, 課題遂行時間

従来通りに計測された fNIRS 信号は、おじぎ課題ではどの被験者でもオキシヘモグロビンが大きく変化し、これと同じ方向にデオキシヘモグロビンは小さな変化を示した。体動によるこのような信号変動はすでに報告されている通りのものであった。我々の信号分離法を用いると、これらの変動のほとんどは全身性成分に帰属し、脳機能成分はほとんど平準化されていることが分かる。息止め課題での従来信号の変化はおじぎ課題に比較して、被験者間でかなり形が異なる。しかしこの場合も、やはりその変動はほとんどが全身性成分に帰属し、脳機能成分は平準化されたことが分かる。

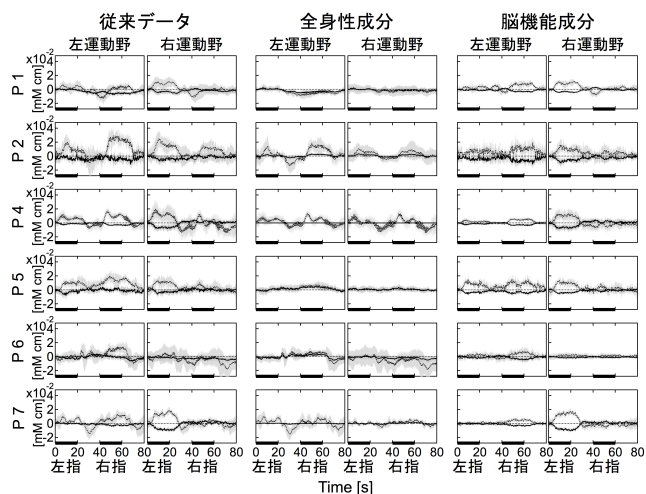


図3 手指運動時のfNIRSデータと分離信号の比較  
 点線, オキシヘモグロビン; 実線, デオキシヘモグロビン; 太線, 課題遂行時間

表1 手指運動で生じるオキシヘモグロビン変化量の片側性に関する paired t-test

被験者	従来データ		全身性成分		脳機能成分	
	左運動野	右運動野	左運動野	右運動野	左運動野	右運動野
P 1	-0.6465	1.3431	0.9758	-0.2331	-2.029	2.235*
P 2	-3.673*	0.7312	-2.893*	-0.8236	-1.842	4.148*
P 4	-2.093	1.472	-1.171	-1.091	-3.302*	5.109*
P 5	-0.9369	4.828*	-0.5803	-0.3060	-1.115	4.202*
P 6	-1.089	1.074	-0.1817	0.8092	-3.131*	2.226*
P 7	-0.9161	3.968*	0.03681	-0.5551	-2.223*	4.589*

\*は統計的有意性( $p < 0.05$ )を示す。

の比較などにより、我々はこの信号分離法の妥当性や安定性を検証した。それらについては発表時に示して専門家諸氏のご意見を仰ぎたい。従来の市販装置で計測されたNIRSデータが持つ情報のみに基づき脳機能活動由来の血流変化を分離できるこの手法は、過去に得たデータに対しても適用可能である。我々のこのような研究が、fNIRSを用いた研究の質を向上させる一助となれば、幸いである。

文献：

- 1) Takahashi T, et al., Influence of skin blood flow on near-infrared spectroscopy signals measured on the forehead during a verbal fluency task, *NeuroImage*, **57**, 991–1002. (2011).
- 2) Yamada T, et al., Multidistance probe arrangement to eliminate artifacts in functional near-infrared spectroscopy, *J. Biomed. Opt.*, **14**, 064034 (2009).
- 3) Minati L, et al., Intra-and extra-cranial effects of transient blood pressure changes on brain near-infrared spectroscopy (NIRS) measurements. *Journal of neuroscience methods* **197**, 283–288 (2011).
- 4) 山田亨, 梅山伸二, 生体光計測装置、プログラム及び生体光計測方法, 特願 2011-113081.

③左右手指運動課題での結果を図3に示す。従来信号は左右を問わず運動時にオキシヘモグロビンの増大が、ベースラインの変動とともに認められる。一方で脳機能成分はベースラインが非常によく平準化されているとともに、遂行手指の反対半球の運動野で信号が顕著に生じていることが分かる。課題で用いた手指の左右の違いにより生じるオキシヘモグロビン変化量の差(片側性)について paired t-test を行った結果を表1に示す。多くの被験者で、従来データよりも脳機能成分で、より高い信号の片側性が得られることが分かる。

6. まとめ

以上の結果や、紙面の都合で示さなかった  $k_s$  の推定安定性の評価、多重配置計測との同時計測やシミュレーションと

## 前頭前野の安静時脳血流酸素代謝の左右非対称性による不安心理状態の推定法

### Prediction of Psychological Anxiety levels based on asymmetry of cerebral blood flow and oxygen metabolism in the prefrontal cortex at Rest

○石川わかな<sup>1)</sup>、福田行克<sup>1)</sup>、松本隆<sup>1)</sup>、竹本尚大<sup>2)</sup>、辻井岳雄<sup>2)</sup>、酒谷薫<sup>2)</sup>

1)早稲田大学先進理工学研究科、2)日本大学医学部

【背景】特に先進国ではストレスが原因の病気が急速に増加しており、ストレスを評価・管理する方法の確立が必要となっている。現在、精神的なストレス度合いを評価する方法として主に心理テストによるものがあるが、これは主観的で誤診につながる可能性もある。また、ストレス研究ではストレスが人によって異なるためストレスタスクの設計が困難であることから、より簡単で非侵襲的なストレス反応の評価法の開発が重要となっている。我々は near-infrared spectroscopy (NIRS)により計測した前頭前野 (PFC)の安静時神経活動から不安心理状態を推定する方法を開発した。

【対象と方法】2CH NIRS (PNIRS-10, Hamamatsu Photonics, Japan)により成人(n=39, 44.69±34.31 yrs)の PFC の安静時の酸素化ヘモグロビン濃度変化を3分間計測した。被験者には計測前に心理テスト State Trait Anxiety Inventory (STAI)を回答してもらい、計測時は「3分間椅子に座って安静にする」よう指示した。Laterality Index at Rest (LIR)を算出することで PFC 活動の左右の非対称性を評価し、LIR と STAI 値の関連性を検討した。LIR は各時刻の酸素化ヘモグロビン濃度から3分間における酸素化ヘモグロビン濃度最小値を引いたもので、最小値からの差分を表す。図1に  $\Delta oxyL_t - \Delta oxyL_{min}$  の例を示す。これにより各項が正の値となり、分母が0の値に限りなく近づくことで起きる LIR の発散を防ぐ。正 LIR は安静時において右 PFC、負 LIR は安静時において左 PFC の神経活動が活発であると解釈される。

$$LIR = \frac{\sum_{t \in \text{analysis interval}} ((\Delta oxyR_t - \Delta oxyR_{min}) - (\Delta oxyL_t - \Delta oxyL_{min}))}{\sum_{\text{analysis interval}} ((\Delta oxyR_t - \Delta oxyR_{min}) + (\Delta oxyL_t - \Delta oxyL_{min}))}$$

$$\Delta oxyR_{min} = \min_{t \in \text{analysis interval}} \Delta oxyR_t$$

$$\Delta oxyL_{min} = \min_{t \in \text{analysis interval}} \Delta oxyL_t$$

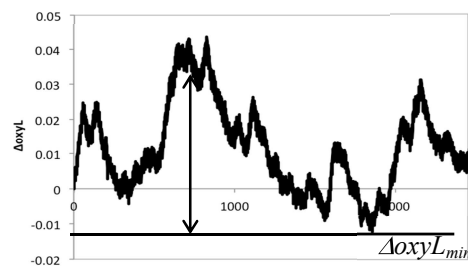


図1 典型的な  $\Delta oxyL_t$  と  $\Delta oxyL_{min}$  の例

【結果】安静時の PFC 活動において、全ての被験者に神経活動を反映する酸素化ヘモグロビンの濃度変化が見られた。振幅は被験者間で異なっていたが、LIR と STAI 値の間に有意

な正相関( $r=0.513$ ,  $p=0.0008$ )が見られた(図 2(a))。これは高不安であるほど右 **PFC** がより活発に働く事を示唆していると思われる。また、若年層( $n=19$ , 20-24 yrs)と高齢者層( $n=20$ , 60-79 yrs)に分けて同様に LIR と STAI 値の相関を調べた結果、それぞれ若年層は  $r=0.525$ ,  $p=0.021$ (図 2(b))、高齢者層は  $r=0.536$ ,  $p=0.015$ (図 2(c))の正の相関が見られた。これは、LIR と STAI 値の相関に年齢の影響はないことを示唆している。

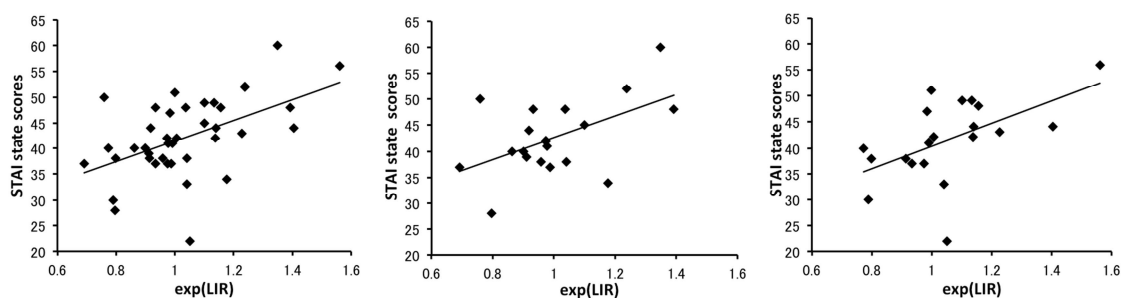


図 2 (a) All STAI vs. exp(LIR) (b) Young STAI vs. exp(LIR) (c) Old STAI vs. exp(LIR)

【考察】ニューロイメージングの研究では、ネガティブ感情[1][2]や自律神経系、内分泌系のストレス反応[3]に対し右 **PFC** が重要な役割を果たすことが報告されている。また、NIRS 実験において、ストレス課題中に右 **PFC** が優位に働く被験者は過剰な身体的ストレス反応を示す傾向にあり、左 **PFC** が優位に働く被験者はストレス反応においてあまり変化が見られなかったことも報告されている。[4-7] 本研究より、安静時における **PFC** の脳活動左右差とストレスには関連があり、高不安であるほど右 **PFC** が優位に働く事を示唆していると思われる。LIR は不安に関連した脳機能を評価する際にタスクを必要とせず、ストレス関連の病気や症状の診断補助に応用可能と考えられる。

#### 【参考文献】

- [1] G. L. Ahern, G. E. Schwartz, Differential lateralization for positive and negative emotion in the human brain: EEG spectral analysis. *Neuropsychologia* 23, 745{755, 1985}.
- [2] AH. Kemp, K. Griffiths, KL. Felmingham, SA Shankman, W. Drinkenburg, M. Arns, CR. Clark, RA. Bryant, Disorder specificity despite comorbidity: resting EEG alpha asymmetry in major depressive disorder and post-traumatic stress disorder. *Biol Psychol.* 85:350{354, 2010}.
- [3] C. Tsigos, GP. Chrousos, Hypothalamic-pituitary-adrenal axis, neuroendocrine factors and stress. *J Psychosomatic Res* 53: 865{871, 2002}.
- [4] M. Tanida, K. Sakatani, R. Takano, K. Tagai, Relation between asymmetry of prefrontal cortex activities and the autonomic nervous system during a mental arithmetic task: Near infrared spectroscopy study, *Neurosci Lett* 369, 69{74, 2004}.

- [5] M. Tanida, M. Katsuyama, K. Sakatani, Relation between mental stress-induced prefrontal cortex activity and skin conditions: a near infrared spectroscopy study, *Brain Res* 1184: 210{216, 2007}.
- [6] M. Tanida, M. Katsuyama, K. Sakatani K, Effects of fragrance administration on stress-induced prefrontal cortex activity and sebum secretion in the facial skin. *Neurosci Lett* 432: 157{161, 2008}.
- [7] K. Sakatani, M. Tanida, M. Katsuyama, Effects of aging on activity of the prefrontal cortex and autonomic nervous system during mental stress task. *Adv Exp Med Biol* 662: 473{478, 2010}.

# ワーキングメモリ課題に対する左右 oxy-Hb 変化の解析に基づく認知機能評価

谷田 正弘<sup>1</sup>, 酒谷 薫<sup>2</sup>

<sup>1</sup>資生堂リサーチセンター <sup>2</sup> 日本大学医学部

## 1. はじめに

2005年に65歳以上の人口比が二割を超え、世界一の高齢社会となった日本では、脳の衰えや認知症予防に対する社会的な関心が高まっている。最近になって、認知機能の低下は比較的若い年代で生じていることが明らかになっており、予防的医療の観点から、あらゆる世代を対象とするポピュレーションアプローチの必要性が提唱されている。一方、ニューロイメージング研究の分野では、種々の認知課題を遂行した時の脳活動変化が報告され、認知機能の客観評価法として注目されて来た。しかしながら、こうした研究に多用される PET や fMRI などの大型医療機器は、高コストで拘束性が高く、普通に暮らす人々を対象として、あまり手間をかけずに認知低下の潜在的リスクを抱えた人を選定し、日常的な改善の確認に用いるには不向きであった。

ここでは、健康ドックや高齢者施設などで、認知低下の予防活動を実践するのに適した評価ツールの提供を目指して、簡便で拘束性の低い 2channel タイプの NIRS (near-infrared spectroscopy) を使用して、認知機能の個人差と改善を評価する試みについて紹介する。

## 2. 評価に適した課題の設定

言葉や図形などを記名させ、一定時間後に呈示した刺激が憶えた中にあるかどうかをキ押しなどで判定させる記憶課題は、正確さ (Accuracy) と反応の速さ (Reaction time) を同時に調べられることから、認知機能の評価に多用されている。中でも短期記憶の保持限界である 20 秒内に記録と判定を繰り返すワーキングメモリ (Working memory: WM) 課題は、前頭前野の皮質 (Prefrontal cortex: PFC) を強く賦活することがわかっている。この検討では、できるだけ短い時間で左右 PFC の NIRS パラメータの増減を捉え、また個人内での繰り返しによる変化を評価できる方法の確立を目指して、同一個人内での意識水準の違いに対応して、PFC の酸素化ヘモグロビン (oxy-Hb) の変化が増減したと報告されている Sternberg's test (ST) を基に<sup>1)</sup>、より時間的手続きを短縮した課題を作成した。

この課題は、CRT 上に 1 秒間呈示される数字を記憶し、2 秒後に呈示された数字が、直前に記憶した数字の中にあるか否かを、「はい」または「いいえ」のボタンで、できるだけ速く正確に判定してもらい。オリジナルの条件では 1)、1 文字を記憶する試行と順に呈示される 6 文字を記憶する試行を別々に行うものであったが、判定時間

を短縮するため、1 文字を呈示して記憶する試行と一度に 6 個の数字を呈示して記憶する試行を交互に、それぞれ 8 回ずつ繰り返して行い、正答率と平均反応時間を算定して、ワーキングメモリ能の評価に用いた。課題遂行時間は被験者の反応の速さにより異なるが、健常女性の平均的な遂行時間は約 80 秒であった。

## 3. NIRS による PFC ラテラルリティの解析法

従来の連続光を用いた NIRS 計測では、パスレングスの情報が得られないため、無毛の額部では、個人内の左右光路長に大きな部位差はないものと仮定して比較する。しかしながら、個人間でもかなりの違いが存在するため、以前に暗算ストレス負荷時の PFC ラテラルリティと自律神経活動との相関を報告した結果では、右側優位の度合いを、 $(\text{右} \Delta \text{oxy-Hb} - \text{左} \Delta \text{oxy-Hb}) / (\text{右} \Delta \text{oxy-Hb} + \Delta \text{左} \text{oxy-Hb})$  のように指数化しないと有意差のある結果が得られなかった<sup>2)</sup>。また、この指数化は、両側ともに oxy-Hb が上昇する被験者にしか適用ができないため、中年層を対象に、暗算に比べて脳賦活の小さい ST の年代変化を検討するのは難しいと考えられた。

そこで今回は、新たなラテラルリティ解析の試みとして、2 チャンネル時間分解型分光分析装置 (TRS-20; 浜松ホトニクス社製) の fitting & change モードを用いて、2 組の光プローブを左右の前額部 (脳波 10-20 法の Fp1, Fp2 に各プローブの中央を配置) に装着し、ST に対する左右 PFC の oxy-Hb 変化を計測した。

fitting & change モードは、計測開始時に時間分解法により平均パスレングスを算定し、以後は初回に得られたパスレングス情報を用いて連続光によるヘモグロビン濃度変化を計算して記録して行く手法である。これにより、従来の連続光 NIRS に比べて、oxy-Hb 変化の個人間比較の精度が向上しているものと考え、以下のように左右 oxy-Hb 変化の単純差分により右側優位度 (RL) を算定して解析に使用した。

$$RL = (\text{右} \Delta \text{oxy-Hb}) - (\text{左} \Delta \text{oxy-Hb})$$

## 4. 健常女性の認知機能の評価する

全て右利きの 40 歳以上の中年女性に、NIRS 計測をしながら ST 課題を行ってもらい、20-22 歳の若年女性と成績を比較した。

各年代とも判定ミスは少なく、20 代群と 40 代群では有意な正答率の差は見られなかった。一方、記憶検索時の平均反応時間は、40 代になると 20 代群に比べて

有意な増加が見られた。

左右 PFC での oxy-Hb 変化を年代別に比較した結果、若年女性群は明らかな右側優位のラテラルリティを示したが、中年女性群では、ほとんど左右差が見られず、加齢によるラテラルリティの消失が確認された<sup>3)</sup>。また 20 代群では、40 代群に比べて、ST 課題中の右側優位度(RL)が有意に大きかった。

図 1 に、20 代女性 15 例と 40 代女性 19 例、計 34 例での相関散布図を示した。ST 課題中の右側優位度(RL)と平均反応時間との間に、有意な正相関が認められた( $r=+0.46$ ,  $p<0.01$ )。

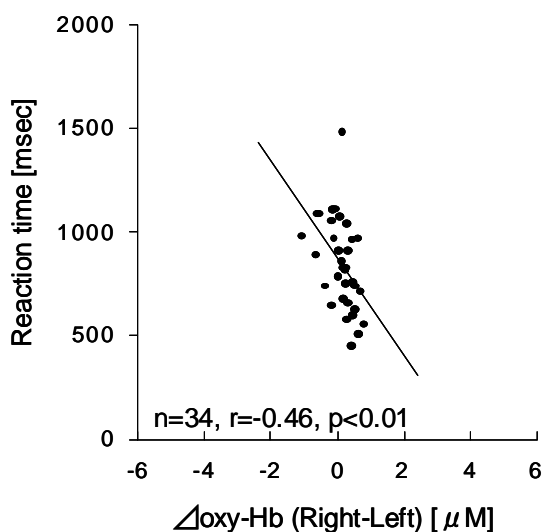


図 1 反応時間と前頭前野右側優位度の相関

この結果は同年代であっても、右優位度が小さくなった女性ほど、記憶の検索に時間がかかる事を示しており、課題中の右側優位度が高い女性ほど記憶した数字の検索がより円滑に出来るものと考えられた。

## 5. 健康食品による予防的な改善の評価

若年群が記憶課題に対して右側優位か左側優位を示すのに対して、高齢になると両側脳を使うようになる現象は、HAROLD (Hemispheric Asymmetry Reduction in Older Adult) モデルとして知られている<sup>4)</sup>。HAROLD の生起は、加齢により脳全体の活動が衰えて、片側では記憶作業に対応できなくなるのが一因と考えられている。20 代と 40 代女性の結果では、ST 中の PFC 活動が右側優位を示したか否かに関わらず、目だって正答率の落ちた被験者は無く、普段の健忘についての自覚にも差は見られなかった。従って、この手法で捉えられた反応時間の低下は、加齢によって認知が低下して行く前段階として生じる注意水準や集中力の低下などによって、記憶の検索が円滑に出来なくなっている状態を

反映しているとも考えられる。このことから、ST に対して右側優位を示さなくなった中年女性の脳血流を、何らかの日常的な方法で賦活し、20 代型の PFC 活動パターンに戻してやる事ができたとすれば、初期段階の認知低下を予防的に改善できるのではないかと期待された。

健康食品の成分として用いられ、脳血流改善効果が知られているイチヨウ葉エキスは、軽度の記憶機能低下が認められる健常人に経口摂取させた場合にも認知の速度を上げる効果があると報告されている<sup>5)</sup>。前項までに示した手法で健常レベルでの認知改善が捉えられるかどうかを確認するために、イチヨウ葉エキスを配合した市販の健康食品を、商品と同処方(アクティブ)と主成分を除去した処方(プラセボ)に基づき、同一外見を持つタブレットに成型した。全て右利きの 40 代後半の女性 19 名を、アクティブ群(9 例、1 日 4 錠を 6 週間内服)とプラセボ群(10 例、同じ)に分類し、前項に示したと同様の方法で、ST 中の両側 PFC の  $\Delta$ oxy-Hb を連用前後に計測し、平均反応時間と比較した。

アクティブ群では、連用 6 週間後の ST 中の反応時間が連用前に対して有意に短縮し、課題遂行中の PFC 活動の右側優位度(RL)が有意に増加した。プラセボ群では、連用前後で両指標の差は見られなかった。

## 6. 報告のまとめ

本研究の結果から短期記憶の保持機能には、主に右側前頭前野の活動が関与し、課題中の右側優位度が高いほど、記憶数字の検索がより円滑に出来ると考えられた。さらにイチヨウ葉エキスを含有した健康食品の連用により、ワーキングメモリ課題遂行中の前頭前野の神経活動が右優位に変化し、作業記憶課題に対する反応時間が短縮した。

以上の結果から、NIRS を用いてワーキングメモリ課題遂行時 PFC のヘモグロビン濃度変化を計測する事により、健常女性の認知機能変化の個人差を定量的に評価できること、また日常的な認知改善手段の評価に活用できる可能性が示唆された。

## 参考文献

- [1] Tsujii T, Yamamoto E, Ohira T, Saito N, Watanabe S, Psychopharmacology, 194, 83-91, 2007
- [2] Tanida M, Sakatani K, Takano R, Tagai K, Neurosci. Lett. , 369, 69-74, 2004
- [3] Tanida M, Sakatani K, Tsujii T, Neurological Research, 3 (2), 114-119, 2012
- [4] Dolcos F, Rice HJ, Cabeza R., Neurosci Biobehav Rev. , 26 (7), 819-25, 2002
- [5] Rai GS, Shovlin C, Wesnes KA, Curr. Med. Res. Opin, 12, 350-355, 1991

平成23年度 酸素ダイナミクス研究会運営委員会

会 長:

小林 弘祐 (北里大学大学院医療系研究科)

運営委員:

伊藤俊之 (京都府赤十字血液センター)

黄田育宏 (東京都医学総合研究所ヒト統合脳機能プロジェクト)

桑平一郎 (東海大学医学部附属東京病院呼吸器内科)

小久保謙一 (北里大学医療衛生学部医療工学科臨床工学専攻)

酒谷 薫 (日本大学医学部脳神経外科学系光量子脳工学分野)

高橋英嗣 (佐賀大学大学院工学系研究科先端融合工学専攻)

浜岡隆文 (立命館大学スポーツ健康科学部)

正本和人 (電気通信大学先端領域教育研究センター)

増田和実 (金沢大学人間社会研究域人間科学系)

星 詳子 (東京都医学総合研究所ヒト統合脳機能プロジェクト)

山田勝也 (弘前大学大学院医学研究科統合機能生理学講座)

会計監事:

古賀俊策 (神戸芸術工科大学応用生理学人間工学研究室)

南山 求 (広島国際大学保健医療学部臨床工学科)

事務局:

〒840-8502

佐賀市本庄町1番地

佐賀大学大学院工学系研究科先端融合工学専攻医工学コース

高橋英嗣

電話 0952-28-8635

電子メール: [eiji@cc.saga-u.ac.jp](mailto:eiji@cc.saga-u.ac.jp)



# 酸素ダイナミクス研究会会則

## 総則

第一条 本会は酸素ダイナミクス研究会（Oxygen Dynamics Society）と称する。

第二条 本会の事務局を佐賀市本庄町1、佐賀大学工学系研究科先端融合工学専攻医工学コース 高橋研究室に置く。

第三条 本会は、生体における酸素の輸送と代謝に関連する研究の発展を図ることを目的とし、またこの目的達成に必要な事業を行う。

## 会員

第四条 本会は本会の目的に賛同するものをもって構成し、会員の種類は正会員および賛助会員とする。会員は本会の行う諸事業に参加し、本会の発行する印刷物の配布を受けることができる。

第五条 正会員は、酸素の輸送と代謝に関連する領域の研究者で、本会の目的に賛同する者とする。

第六条 賛助会員は、本会の目的に賛同し本会の事業を援助する個人または団体とする。

第七条 会員の入会と退会に関しては、酸素ダイナミクス研究会運営細則（以下細則という）にて別に定める。

## 役員

第八条 本会に次の役員を置く。

1. 会長 一名
2. 運営委員 若干名
3. 会計監事 二名

第九条 会長は総会の議決を経て正会員の中より選出され、本会を代表して会務を統括する。

第十条 運営委員ならびに会計監事の選出方法は、細則にてこれを定める。

第十一条 運営委員は本会の運営、庶務、経理その他の会務を分掌し、必要に応じて運営委員会を開くものとする。運営委員会は会長および運営委員をもって構成する。

第十二条 会計監事は本会の会計状況を監査し、総会に報告する。

第十三条 会長、運営委員、会計監事の任期は二年とし、再任を妨げない。

## 総会

第十四条 総会は本会の最高決定機関であって、会長が毎年一回これを招集する。総会議長の選出方法ならびに総会の承認基準は細則による。

第十五条 次の事項は総会の承認を必要とする。

1. 会長の選出
2. 会則の制定と改廃
3. 会費の額の変更
4. 予算ならびに事業の計画
5. 会計監査報告
6. その他本会に関する重要な事項
- 7.

## 会計

第十六条 本会の経費は、会費、各種補助金、寄付金および預金利息等をもってこれに充てる。会費の金額は細則にてこれを定める。

第十七条 本会の事業年度は、毎年四月一日より翌年三月三十一日までとする。

## 酸素ダイナミクス研究会運営細則

### 会員の入退会

一. 本会に入会を希望するものは、本会事務局で定める書式に記入して事務局へ提出すること。入会を認められた会員は、当該年度の会費を遅滞なく納めるものとする。

二. 会員は会長に届け出てその許可を得て退会することができる。

三. 会長は次の会員を退会させることができる。

1. 会費を長期に滞納した会員
2. 運営委員会で理由を挙げて本会会員として不適当と決議された会員

### 会費

四. 正会員の年会費は3,000円、賛助会員の年会費は一口30,000円とし、会員はこれを前納する。既納の会費は、理由の如何にかかわらず返還しない。

### 総会

五. 総会議長は運営委員の互選によりこれを選出する。総会の承認は出席者の多数決による。賛否同数の場合は議長がこれを決する。

六. 本則第十四条の規定にかかわらず、会長は必要と認められるときには臨時総会を招集することができる。

### 役員

七. 本会の運営委員ならびに会計監事は、当面、正会員の中より会長が委嘱する。

（平成22年9月4日 一部改訂）

付則：本会則は平成八年九月二八日より施行する。