

拡散反射分光計測に基づく
ラット中枢神経疾患モデルの病態観察
Observations of pathophysiology in rat models of
central nervous system diseases based on
diffuse reflectance spectroscopy

平成 30 年度

東京農工大学大学院 生物システム応用科学府
生物機能システム科学専攻

川内聡子

目次

第1章	序論	1
1.1	はじめに	2
1.2	中枢神経疾患における病態観察の意義	2
1.2.1	脳循環代謝と中枢神経疾患	2
1.2.2	拡張性脱分極	3
1.2.3	虚血性脳梗塞	4
1.2.4	頭部外傷	5
1.3	脳組織バイアビリティー低下と内因性光学信号変化	6
1.3.1	内因性光学信号と拡散反射光	6
1.3.2	脳組織バイアビリティーの光学的モニタリング	7
1.4	本研究の目的と論文の構成	8
	図表	11
第2章	拡散反射光スペクトルに基づく血行動態と光散乱パラメータの算出	25
2.1	はじめに	26
2.2	理論および原理	26
2.3	実験方法	29
2.3.1	ファントムを用いた拡散反射光計測	29
2.3.2	ラット全脳低酸素モデルを用いた拡散反射光計測	29
2.4	実験結果および考察	30
2.4.1	ファントムを用いた定量化法の妥当性検証	30
2.4.2	ラット全脳低酸素モデルの拡散反射光計測と光学特性値の定量化	30
2.5	まとめ	32
	図表	33
第3章	ラット全脳低酸素モデルに対する光ファイバーおよび CCD を用いた多波長拡散反射光計測	41
3.1	はじめに	42
3.2	実験方法	42
3.2.1	CCD を用いたラット脳の拡散反射光イメージング	42
3.2.2	イメージングとファイバーによる拡散反射光の同時計測	43
3.2.3	モンテカルロシミュレーション	43
3.3	実験結果および考察	44
3.3.1	CCD を用いた拡散反射光イメージング	44

3.3.2	イメージングとファイバーによる拡散反射光の同時計測	45
3.4	まとめ	47
	図表	49
第4章	ラット局所脳局血モデルに対する脳血流と近赤外拡散反射光のイメージング	57
4.1	はじめに	58
4.2	実験方法	58
	4.2.1 ラット局所脳虚血モデルの作製	58
	4.2.2 近赤外拡散反射光と脳血流の同時イメージング	59
	4.2.3 細胞外直流電位の計測	59
	4.2.4 梗塞領域の評価	60
	4.2.5 統計解析	60
4.3	実験結果	60
	4.3.1 近赤外拡散反射光の時空間変化	60
	4.3.2 近赤外拡散反射光の増加領域と SD 発生回数との関係	61
	4.3.3 近赤外拡散反射光の増加信号の再現性とばらつき	61
	4.3.4 SD に対する脳血流反応とその反射光変化と梗塞領域との関係	62
4.4	考察	63
	4.4.1 観察結果のまとめ	63
	4.4.2 虚血中心部と周辺部における近赤外反射光のベースライン変化の解釈	63
	4.4.3 SD に伴う近赤外反射光のスパイク状変化の解釈	64
	4.4.4 SD に対する脳血流反応と近赤外反射信号	65
4.5	まとめ	65
	図表	66
第5章	衝撃波由来ラット軽症頭部外傷モデルに対するマルチスペクトルイメージング	73
5.1	はじめに	74
5.2	実験方法	74
	5.2.1 レーザー誘起衝撃波の発生と特性	74
	5.2.2 ラット脳への LISW の適用	75
	5.2.3 マルチスペクトルイメージング	75
	5.2.4 統計解析	76
5.3	実験結果	76

5.3.1	SD に関する光散乱特性の時空間変化	76
5.3.2	脳表血管径の変化	76
5.3.3	局所総ヘモグロビン濃度と組織酸素飽和度	78
5.4	考察	78
5.5	まとめ	81
	図表	83
第6章	結論	91
6.1	はじめに	92
6.2	総括	92
6.3	展望	94
	本論文に関する研究業績	97
	謝辞	103
	参考文献	105

第 1 章

序論

1.1 はじめに

脳は虚血や低酸素に対して極めて脆弱な組織であり，脳循環代謝異常は多くの中枢神経疾患の原因あるいは病態の中核をなしている。そのため，疾患のメカニズム解明と新たな治療法開発を目指した研究において，脳循環代謝異常とそれに伴う病態の進展を非侵襲的かつリアルタイムに可視化する技術が重要である。近年，このような中枢神経疾患において，拡張性脱分極と呼ばれる現象の病態との関わりが注目を集めている。この現象は，神経細胞の膜電位がほぼ完全に消失するほどの異常な脱分極が波状に拡大する現象で，組織に大きなエネルギー負荷を与えるため，各種疾患の病態悪化の原因となりうる。本研究は，脳循環代謝異常と拡張性脱分極の発生を，非侵襲的かつリアルタイムに観察可能な光学的手法を用い，各種疾患動物モデルにおける病態の進展を観察することを目的とする。

本章では，はじめに脳循環代謝の重要性と拡張性脱分極について説明し，本論文が対象とする中枢神経疾患（虚血性脳梗塞および頭部外傷）における病態観察の必要性と意義について述べる。次に，本論文に先立ち著者が，ラット脳虚血ないし低酸素モデルにおいて観察した脳組織のバイアビリティー低下に伴う特徴的な光学特性変化について述べ，最後に本研究の目的と論文の構成について記す。

1.2 中枢神経疾患における病態観察の意義

中枢神経系（脳および脊髄）に関わる疾患は，原因・病態ともに多岐にわたるが，多くの疾患において有効な診断・治療法が未確立であり，その克服は医学上最重要課題のひとつに位置づけられる。新たな診断・治療法を確立するためには，病態の理解が必要不可欠であり，原因病態の解明により始めて治療介入の道が拓かれる。

1.2.1 脳循環代謝と中枢神経疾患

脳組織は人間にとって最もエネルギーを必要とする臓器であり，脳重量は体重の約 2% にすぎないが，脳に循環する血液量は心拍出量の約 15% に相当し，全身の基礎代謝の約 20% が脳の酸素代謝に使用されている[1]。それゆえ，脳は虚血・低酸素に最も脆弱な組織のひとつであり，例えば脳血流量が低下すると，ある閾値以下で脳波（電気生理学的機能）が消失し，その後脳は不可逆的变化に至ることが知られている[1]。このような機能的あるいは組織学的変化が起きると，その領域に関連する脳機能が失われる。図 1.1 に人脳（内側面）の模式図を示す。人が人たる所以は，他の動物にはない大脳皮質の発達にあるといわれている。同図に示した大脳辺縁系が動物に共通した本能につかさどるのに対し，大脳皮質（連合野）は意識や記憶，情動や認知機能等の高次機能に関係し[2]，同領域は人脳の面積の約 75% を占める。本論文が対象とする虚血性脳梗塞および頭部外傷においても，これらの領域が損傷を受け機能喪失が問題となる。

脳のエネルギー代謝は，細胞質内で行われる解糖系と，ミトコンドリア内におけるクエン酸回路と電子伝達系の酸化的リン酸化により行われる。前者はグルコース 1 分子から 2

分子のアデノシン三リン酸 (Adenosine triphosphate, ATP) が作られるのに対し、後者ではグルコース 1 分子から 36 分子の ATP が生成され、ミトコンドリアにおける酸化リン酸化が効率の良い ATP すなわちエネルギー産生系であることがわかる[1]。後者のミトコンドリアにおける酸化リン酸化は、ミトコンドリア内膜にある複合体 I~IV (電子伝達系を構成する酵素) を電子が伝達し、末端酵素 (複合体 IV) のシトクロム c オキシダーゼにおいて酸素に電子伝達することで完成する (図 1.2)。複合体 I~IV を電子が伝達する際、プロトンがマトリックスから膜間腔に汲み上げられ、これにより電気化学的勾配が形成され、プロトンが逆流して ATP 合成酵素を回転させることで ATP が産生される[3]。産生した ATP は、神経細胞膜のイオンポンプの維持 (膜形態の維持) や神経伝達物質や神経ペプチドの合成等に使われる[1]。

1.2.2 拡張性脱分極

近年、片頭痛、虚血性脳梗塞、くも膜下出血、頭部外傷等の様々な中枢神経疾患において、拡張性脱分極 (spreading depolarization: SD) と病態との関わりが大きな注目を集めている[4,5]。SD は、通常の脳活動 (活動電位の発生やシナプス伝達) で生じる脱分極とは性質が異なり、細胞外からの強い機械的、化学的、あるいは電気的な刺激により誘発され、細胞膜を介して大量のイオンの流出入が起きる結果、膜電位が通常約-70 mV から約-10 mV まで変化し、ほぼ完全な脱分極に至る現象である。ひとたび発生すると周囲の細胞を次々に脱分極させ、波のように広く伝搬する性質があることからこのような名称で呼ばれる。その伝搬速度は 2-5 mm/min と比較的遅い。SD が起きると、続いてイオンのより戻し (再分極) にエネルギーを消費するため、組織にエネルギー負荷がかかることが知られる。これは正常な脳組織では特段問題にならないが、脳虚血などの血流低下が起きている状況下では、病態悪化の引き金になりうる[4,5]。

SD の発見は、1944 年ブラジルの生理学者 Aristides A. P. Leão が、痙攣発作の研究をしている過程で偶然発見した奇妙な電気生理学的現象を報告したことにさかのぼる[6]。この現象は、その後多くの研究者の興味の対象となり、長らく動物を対象にした実験でのみ観察される特異な現象と受け止められてきた。しかし最近約 10 年の間、画像診断技術の進歩と、とりわけ欧州の研究グループ COSBID (Cooperative Study on Brain Injury Depolarizations, www.cosbid.org) による精力的な取り組みにより[7-9]、認識が大きく変わった。SD は、虚血性および出血性脳梗塞の患者、あるいは頭部外傷の患者の脳で実際に起きることが報告され[7-9]、単なる病態の付帯現象ではなく、明らかに病態を悪化させる因子として理解されるようになった。これにより SD は診断と治療における重要ターゲットとして、これまで以上に高い注目を集めている。

SD は、細胞外電位の陰性シフトを伴い、膜電位の消失により電気的な神経活動は停止するため、同時に脳波の抑制が観察される (拡張性抑制, spreading depression)。そのため SD を計測する最も一般的な方法は、細胞外電位の記録である。電極を使用するため空間分解

能は制限されるが、膜電位の消失を直接観測できるため感度が高く、脱分極の持続時間を正確に記録し、脳波の抑制も同時観察できる利点がある。一方、電極の代わりに光イメージングを用いると、SD の発生と伝搬を広視野かつ高空間分解能で可視化することができる。SD は上述したように、細胞膜を介して大量のイオンの流出入が起きる現象であり[10]、水の移動も伴い、これにより細胞が膨化し、樹状突起やミトコンドリアが異常な形態を示すことが知られる[11,12]。生体組織では、細胞や細胞小器官が主要な光の散乱体となるため、このような形態変化が起きると組織の光散乱特性が変化し[13]、これをイメージングにより捉えることが可能となる。生体透過性の高い可視～近赤外領域における脳（灰白質）の等価散乱係数は、吸収係数より約 2 桁高いことから[14]、同波長の光を用いた拡散反射光イメージングは脱分極の可視化に有用である。

SD の病態との関わりを理解する上で、SD に伴う脳血流の応答パターンを知ることが重要である。図 1.3 に SD に対する血流レスポンスの模式図（仮説）を示す[5]。一般に正常な脳組織では、SD の発生に伴い一過性の血管拡張（vasodilation）、血流増加（hyperemia）が観察され、これが上述した SD に伴うエネルギー消費を補っていると考えられている。しかしこの血流応答パターンは、SD が発生・通過する組織のエネルギーレベルにより異なることが知られ、例えば虚血負荷に曝された組織では、SD の発生に同期して血流応答は減少に転じ、組織の帰結に影響を与えることが報告されている[15-17]。

1.2.3 虚血性脳梗塞

平成 29 年度の厚生労働省統計によると、脳血管疾患は死因の第 3 位を占め[18]、発症率では死因第 1 位の悪性新生物（腫瘍）をはるかにしのぎ、また要介護となる原因の第 1 位となっている。その原因の大部分を脳虚血が占めることが知られる。虚血性脳梗塞は、たとえ救命できても、その後の後遺症により患者の社会活動を大幅に制限するのみならず、患者家族にも大きな負担を強いることから、医学的・社会的に大きな問題となっている。

上述したように、脳は虚血に対して極めて脆弱であり、虚血後直ちにエネルギー産生異常、数分で電気生理学的機能停止となり、やがて細胞の膜形態が崩壊し不可逆的壊死（梗塞）に至る[19]。虚血後まだ細胞の形態が維持されていれば血流再開により組織は回復するが、壊死組織への血流再開は出血性合併症を高率に引き起こすため禁忌とされる。現在急性期に行われている血栓溶解薬 rt-PA を用いた血流再開は、発症後 4.5 時間以内に適用されるが、出血性合併症を避けるため施行率は残念ながら低い[20,21]。この血栓溶解療法が数少ない既承認の脳梗塞治療のひとつである。これまで期待された治療法は臨床試験で有効性が認められず[22]、さらなる病態解明と診断・治療法開発が求められている。それには、病態と治療効果を非侵襲リアルタイムでモニタリング（イメージング）する技術の確立が必要不可欠であると著者は考えている。

虚血性脳梗塞の病態は、時空間的に複雑に進行することが知られる。重度に血流が低下した虚血中心部では、虚血後数分で細胞膜上のイオンポンプが破綻し、細胞膜を介し大量

のイオンの流出入が起きる[19]。この現象が上述した拡張性脱分極 (SD) である。虚血中心部では、エネルギーの供給が限られているため、SD 発生後間もなくエネルギーが回復すれば細胞は生存できるが、長く続くと SD はイオンのより戻し (再分極) を伴わないターミナル (終末) 脱分極となり、細胞は壊死に至る[19,23,24]。虚血中心部で発生した SD は、梗塞周囲にも拡がり繰り返し発生する性質があり、梗塞周辺脱分極 (peri-infarct depolarization: PID) とも呼ばれる[25]。梗塞周辺領域 (ペナンプラ) では血流低下により電気生理学的機能停止状態にあるが、エネルギーが回復すれば生存可能とされる[26,27]。ここに SD が多発、伝搬すれば組織のエネルギー破綻が起き、梗塞拡大につながる危険性がある[25,28-30]。したがって、脳梗塞の病態観察では、梗塞巣、ペナンプラ、およびこれらで発生する SD をリアルタイムで可視化する技術が重要である。

1.2.4 頭部外傷

頭部外傷は、頭部に物理的な外力が加わることで起きる脳損傷と定義され[31]、その原因は、転倒・転落、車両衝突 (自転車を含む)、暴力・虐待、銃創、スポーツ外傷、爆発 (衝撃波) と様々である[31,32]。中でも 2017 年に米国ボストン大学の A. C. McKee 博士らが、米国プロフットボールリーグ (NFL) の元選手の死後脳を調査した結果、99%に慢性外傷性脳症 (Chronic traumatic encephalopathy, CTE) の病変が見られたと報告したことで[33]、コンタクトスポーツにおける度重なる頭部への衝突が大きな注目を集めている。CTE 患者の脳内では、異常構造に変化したタウたんぱく質が蓄積し、これが記憶障害、認知機能異常、抑うつ症状を引き起こしていると考えられている[34]。

このようなスポーツ外傷と同様、近年米国を中心に爆発衝撃波に起因する頭部外傷 (頭部爆傷, blast-induced traumatic brain injury: bTBI) が大きな社会問題となっている[35-38]。即製爆発装置 (IED: improvised explosive device) を用いたテロの増加が原因とされる[35-38]。米国防省の頭部外傷に関する統計によると、2000 年から 2017 年第 4 四半期までに発生した頭部外傷受傷者数 (主として bTBI) は約 38 万人にのぼり、そのうち 8 割以上が軽症と診断されている (図 1.4) [39]。爆発と関係しない通常の TBI の場合、軽症は脳震盪と同義とされ、後遺症が問題となることは少ない。しかし bTBI では、通常の画像診断で異常所見がないため軽症と診断されながら、慢性期に頭痛やめまい、記憶障害や情緒不安等、様々な高次脳機能障害を呈し、実態は軽症とかけ離れて患者は深刻な問題を抱える[35-38]。bTBI に関しては、これまでの数多くの研究者の努力にもかかわらず、メカニズムばかりか病態もいまだ不明な点が多く、その解明が急がれている。

一般に、bTBI のメカニズムは、爆発の直接的作用による一次メカニズム、爆発による飛散物の衝突や貫通による二次メカニズム、転倒やそれに伴う衝突に起因する三次メカニズム等に分けて考えられているが (図 1.5) [40]、軽症の bTBI の原因とされているのは一次メカニズム、すなわち衝撃波の直接的作用である[41]。このため軽症 bTBI の病態解明では、動物実験により衝撃波が脳に引き起こす現象を解明することが重要課題となっている。中

でも、脳が衝撃波に曝露されたときに生ずる現象の解明は、その後の病理カスケードと慢性期の病態に深く関わりと考えられることから、脳のリアルタイム観察が極めて重要である。頭部爆傷研究で一般的に用いられるショックチューブ、爆薬等を用いた動物実験においては、脳近傍への計測系の設置が容易でなく、脳のリアルタイム観測はほとんど行われていなかった。著者らは、独自のツールとしてレーザー誘起衝撃波 (LISW: laser-induced shock wave) を頭部爆傷研究に用いることを着想した (図 1.6a) [42]。LISW は、脳に局限して適用することができ、また衝撃波源のごく近傍にセンサーを設置できることから、上述したように他の衝撃波源では困難な衝撃波曝露時の脳のリアルタイムモニタリングを可能とする。先行研究において、著者らは LISW を適用したラット脳におけるリアルタイム光診断を行い、LISW 適用半球の大脳皮質に拡張性脱分極が発生・伝搬し、これに伴い一過性に血管拡張と高酸素血症が生じた後、低酸素血症が長時間続くことを観測した (図 1.6b) [42]。このような脳循環代謝異常は、頭部爆傷の重要な病態である可能性があり、本研究では衝撃波曝露直後からの血管 (細動脈, 細静脈) と脳実質の各領域における血行動態変化をより詳細に観察することが重要と考えた。

1.3 脳組織バイアビリティー低下と内因性光学信号変化

1.3.1 内因性光学信号と拡散反射光

生体透過性が比較的高い可視～近赤外領域の波長の光を生体組織に照射すると、組織に入射した光は、組織の吸収と散乱の影響を受けながら伝搬し、一部は外に戻ってくることが知られている。この戻り光を拡散反射光とよぶ (図 1.7) [43]。図 1.7 に示すように 1 対の光ファイバーを組織表面に接触させると、片側から組織に入射させた光の一部は、もう一方のファイバーで検出される。一般に、生体組織に由来する内因性の光吸収および散乱信号のことを内因性光学信号 (Intrinsic optical signal: IOS) といい、拡散反射光を計測することで取得できる。光吸収に関する代表的な IOS には、酸素化・脱酸素化ヘモグロビン、エネルギー代謝に関わるミトコンドリアの電子伝達系末端酵素シトクロム c オキシダーゼ、脂質、水等に由来するものがある。脳組織の場合、可視～近赤外領域における主たる光吸収体は、酸素化・脱酸素化ヘモグロビンとなる。図 1.8a にその光吸収スペクトルを示す[44]。同図において、ヘモグロビンは 500-600 nm において最も吸収が高いのに対し、近赤外領域では約 2 桁小さい。酸素化・脱酸素化により吸収特性が大きく異なることから、分光計測により組織酸素飽和度に関する情報を得ることができる。一方、光散乱信号は、生体組織中の光散乱体である細胞や細胞小器官の形態 (大きさ, 形状, 密度, 屈折率当) を反映する[45]。図 1.8b に示すように、波長 500-1000 nm において等価散乱係数の波長依存性は小さく、光散乱信号は波長が異なる場合でも似た挙動を示すことが多い。このように IOS を利用すると、生体組織・細胞の生理学的, 生化学的, 形態学的情報を非侵襲的かつリアルタイムに計測・イメージングすることが可能となる。さらに中枢神経組織においては、近年病態の成り立ちを考える際、ニューロン (神経細胞), 血管および血管を構成する細胞, グ

リア細胞を主要な構成単位とする Neurovascular unit (NVU) と呼ばれる概念が用いられる (図 1.9) [46]。IOS は、細胞と血行動態両方の情報を提供できるため、NVU のはたらきに関する情報をも提供しうる。

1.3.2 脳組織バイアビリティーの光学的モニタリング

著者らは本論文に先立ち、脳組織バイアビリティーを非侵襲的かつリアルタイムにモニタリングする研究に取り組んだ。脳は虚血後短時間で機能停止に陥るが、機能停止は必ずしも組織の不可逆的変性を意味せず、血流再開などにより組織を救済しうる[1]。しかしこのような組織救済の可否の境界 (クリティカルタイムゾーン) をリアルタイムに判定できる技術が無かった。著者らは、ラットモデルを対象に脳組織バイアビリティー低下に伴う内因性光学信号変化について調べ、脳組織バイアビリティーの光学的モニタリングの可能性につき検討を行った[47-49]。

組織のバイアビリティーの源は、エネルギー代謝すなわち ATP の産生である。上述したように ATP は主としてミトコンドリアの内膜にある電子伝達系の 4 つの酵素を電子が伝達することで産生される。酸素欠乏になると電子伝達に異常が起き、末端酵素シトクロム c オキシダーゼ (cytochrome c oxidase: CcO) の酸化-還元状態が変化し、これにより光吸収変化が起きることが知られている (図 1.10) [50]。CcO の活性中心である heme aa₃ と CuA はそれぞれ 605 nm, 830 nm に吸収ピークを持ち、酸素欠乏により還元が起きると、前者の吸収は増大、後者の吸収は低下する (図 1.10)。したがってこれらの吸収特性変化によりバイアビリティーに直結した信号を検出しうるが、血液存在下ではヘモグロビンによる強い光吸収の影響で検出感度が問題となる。

著者らは、バイアビリティーを維持するエネルギーは、細胞・細胞小器官の形態維持にも利用されることに着目し[19]、これらの形態変化を反映する光の散乱がバイアビリティーの有効な指標になると考えた。生体透過性の高い可視～近赤外領域では、脳組織の等価散乱係数は吸収係数よりも 2 桁高いことから[45]、光散乱は血液存在下においても感度の高いバイアビリティーの指標になると考えた。

そこで著者らははじめに、脳組織のバイアビリティーが低下するとき、組織の光散乱特性がどのように変化するか調べるため、ヘモグロビンによる光吸収の影響を除外したラット脳虚血モデル (脱血による酸素とグルコースの供給を停止するモデル) を対象に、上述した CcO の光吸収変化と光散乱信号の同時計測を試みた[47]。麻酔下にラット頭部を固定し、露出させた脳表に一对の光ファイバー (コア径 800 μm, 中心間隔 2 mm) を接触させ、緑色と赤色の LED および近赤外 LD の光を脳組織に入射し、拡散反射光を計測した (図 1.11)。CcO の酸化-還元に関する等吸収波長である 620 nm 付近において光散乱変化を、605 nm および 830 nm の光吸収変化からそれぞれ heme aa₃ および CuA の還元をモニタリングした。その結果、酸素とグルコースの供給停止から一定時間後、まず heme aa₃ の還元が開始し、続いて光散乱信号が三相性の変化 (増加-減少-増加) を伴って増大、その途中から CuA の還

元が進行するという現象を観測した(図 1.11)[47]。各時刻で凍結採取した脳の ATP 量を調べた結果、三相性光散乱変化 (Triphasic scattering change: TSC) の前後で ATP 量は有意に減少した(図 1.12) [48]。また細胞外直流電位の変化(陰性シフト)から、TSC は拡張性脱分極によるものと推察され(図 1.12) [48]、電子顕微鏡観察により、同光散乱変化は主として樹状突起やミトコンドリアの形態変化によるものと推察された(図 1.13) [47]。そこで次に、このような光散乱変化が血液存在下でも検出できるか調べるため、ラット低酸素モデルを対象に、広帯域光源(400~1000 nm)を用いてラット脳の経頭蓋骨的拡散反射光計測を行った[49]。その結果、波長 805 nm の信号強度は低酸素開始から一定時間後に三相性の変化(増加-減少-増加)を示し、その後高いレベルに保たれた。同時計測した 730 nm および 830 nm の信号も同様の変化を示したことから、バイアビリティー低下に伴う三相性光散乱変化(TSC)は血液存在下でも計測できることが示された。さらに TSC が起きる前に再酸素化を開始するとラットは 100%生存、TSC 後では 100%死亡したことから、TSC が脳組織のクリティカルタイムゾーンとなりうることが示唆された[49]。これらの結果は、光散乱信号が拡張性脱分極の発生と伝搬、および組織の不可逆的变化を検出するのに有用であることを示している。

1.4 本研究の目的と論文の構成

以上より本研究は、拡散反射分光法を用いて、各種中枢神経疾患動物モデルを対象に病態をリアルタイムに観察し、疾患のメカニズムを考察するとともに、光学計測の病態観察における有用性を論じることを目的とする。

本論文は、本章を含む 6 章から構成されている。

第 2 章では、拡散反射光スペクトルに基づき血行動態と光散乱パラメータを定量評価する新たな方法について述べ、光学ファントムを用いた実験により提案法の妥当性を検証した結果について述べる。また実際にラット全脳低酸素モデルで計測した拡散反射光スペクトルに同法を適用し、血行動態と光散乱パラメータを定量評価した結果について述べる。

第 3 章では、脳組織バイアビリティーモニタリングにおける拡散反射光の有用性をより詳細に検討するため、ラット全脳低酸素モデルを対象に、CCD を用いたイメージングとファイバー対を用いた計測それぞれの特性を明らかにし、両手法のバイアビリティーモニタリングにおける位置づけについて述べる。

第 4 章では、ラット局所脳虚血モデルを対象に、経頭蓋骨的に近赤外拡散反射光と脳血流の同時イメージングを行い、虚血後の SD の発生と梗塞の進展をリアルタイムに可視化できないか検討した実験について述べる。

第 5 章では、レーザー誘起衝撃波をラット頭部に適用した頭部爆傷モデルを対象に、マルチスペクトルイメージングを行い、衝撃波曝露による超急性期の脳循環代謝異常について明らかにした実験について述べる。

第 6 章では、総括と今後の展望について述べる。

なお、本研究において実施した動物実験は、全て防衛医科大学校実験動物倫理委員会の承認の下に実施された。

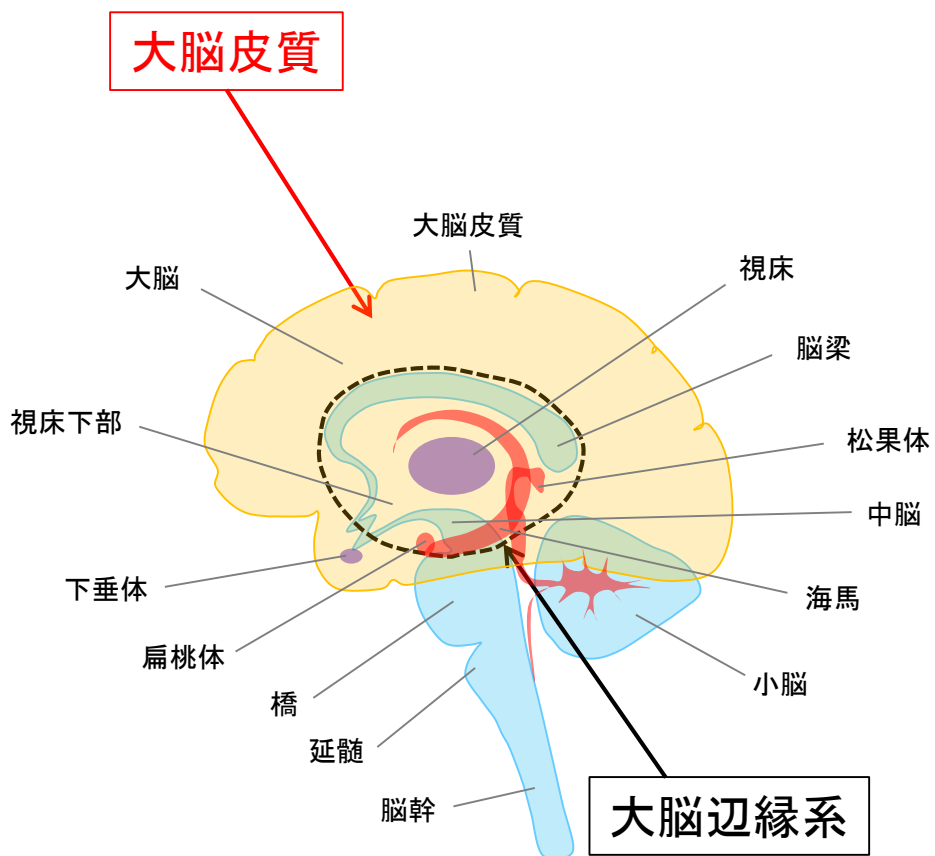
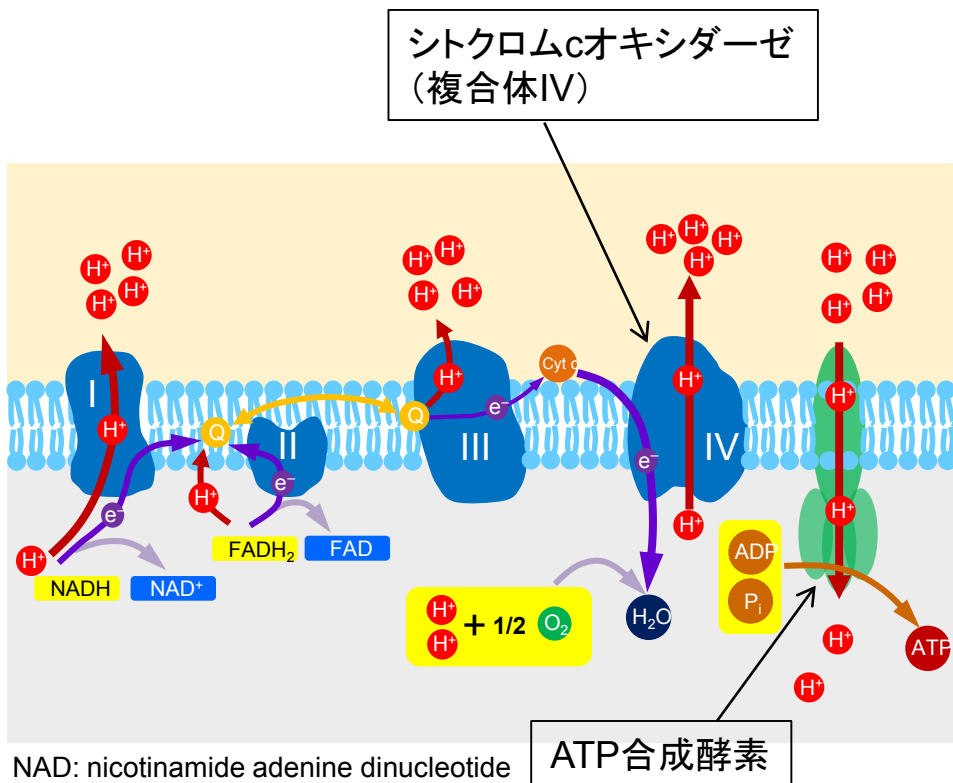


図1.1 人脳の構造(内側面)の模式図 [1]。



NAD: nicotinamide adenine dinucleotide
 FAD: flavin adenine dinucleotide
 Q: ubiquinone form of coenzyme Q10
 Cyt c: cytochrome c
 ADP: adenosine diphosphate
 P_i: inorganic orthophosphate
 ATP: adenosine triphosphate

図1.2 ミトコンドリアの電子伝達系とATP合成酵素。電子伝達系の末端酵素(複合体IV)がシトクロムcオキシダーゼである。

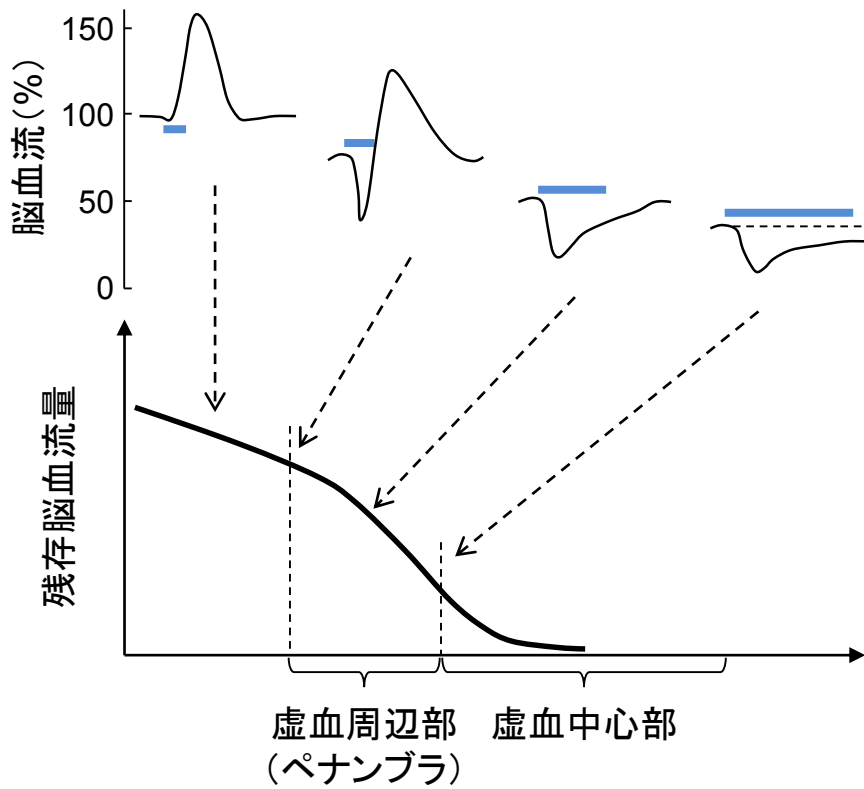


図1.3 SDに対する血流レスポンスの模式図(仮説)[5]。青色線が脱分極(SD)の発生を表す。

DoD numbers for traumatic brain injury worldwide -
Totals 2000-2018Q1

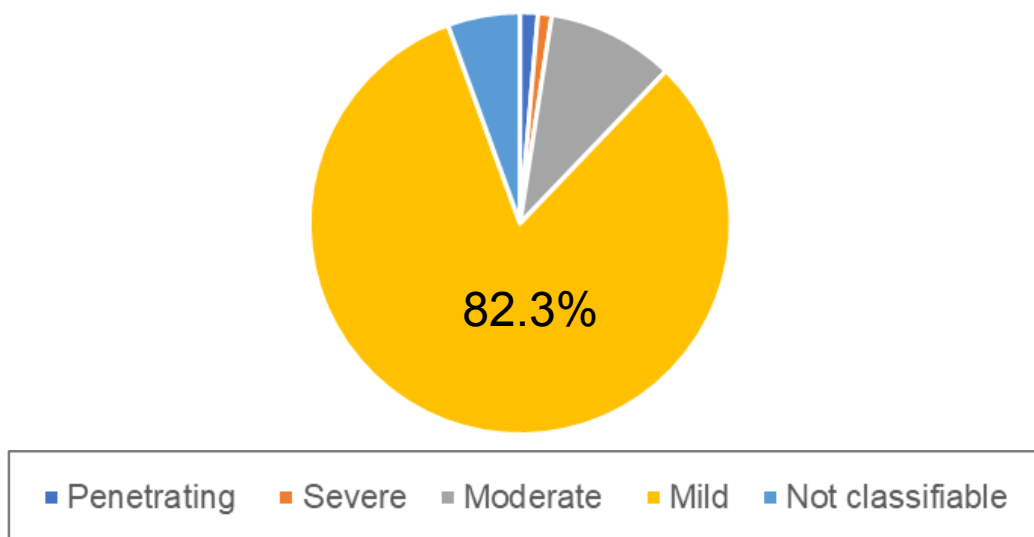


図1.4 米国における頭部外傷負傷者数の統計 [39]。

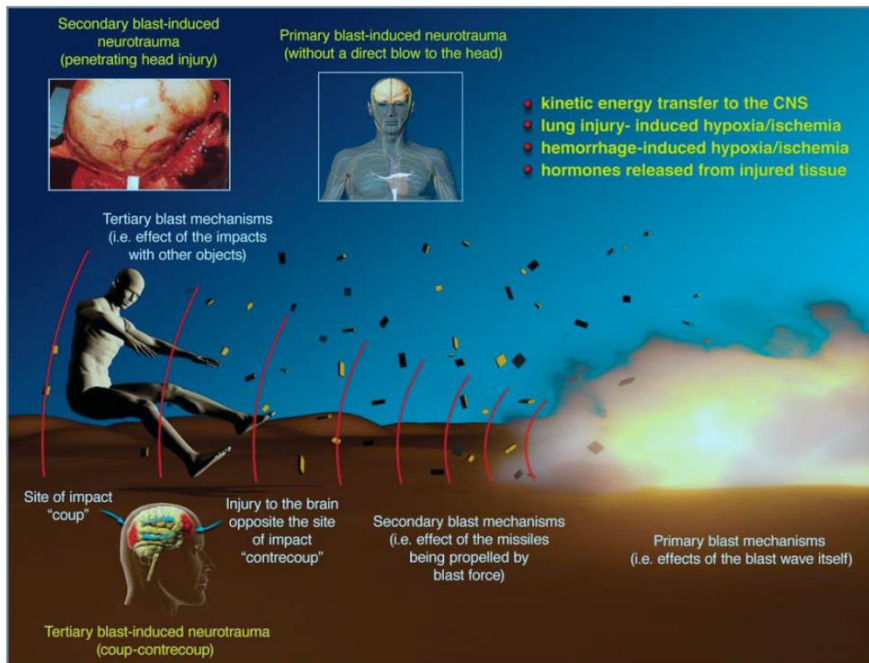
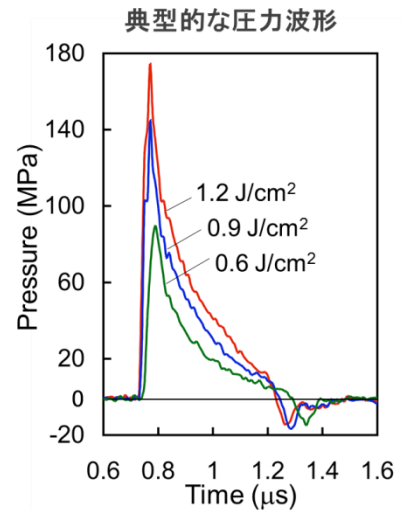
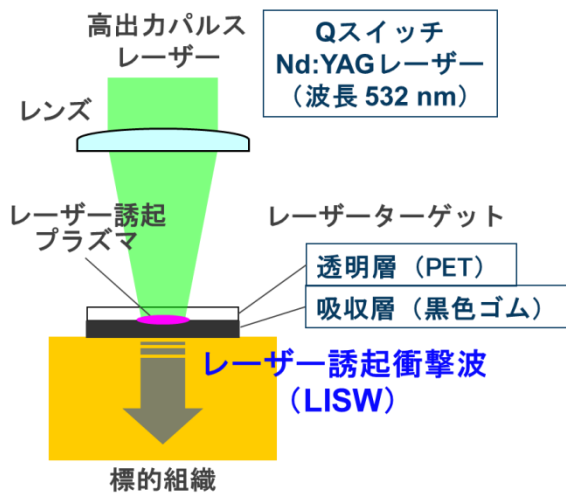


図1.5 頭部爆傷メカニズムの模式図 [40]。Ibolja Cernak and Linda J Noble-Haeusslein, "Traumatic brain injury: an overview of pathobiology with emphasis on military populations," *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 30(2), 255-266 (2010).

(a)



(b)

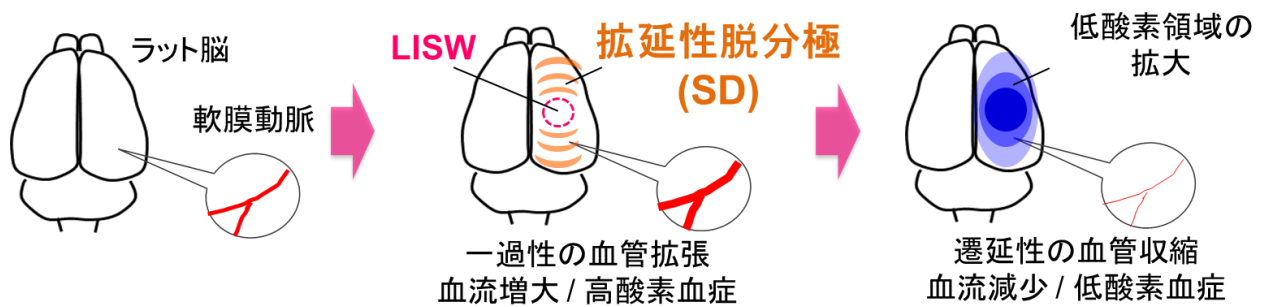


図1.6 (a) レーザー誘起衝撃波 (LISW) の発生原理と (b) LISW をラット脳に適用したモデルにおいて観察された現象の模式図 [42]。

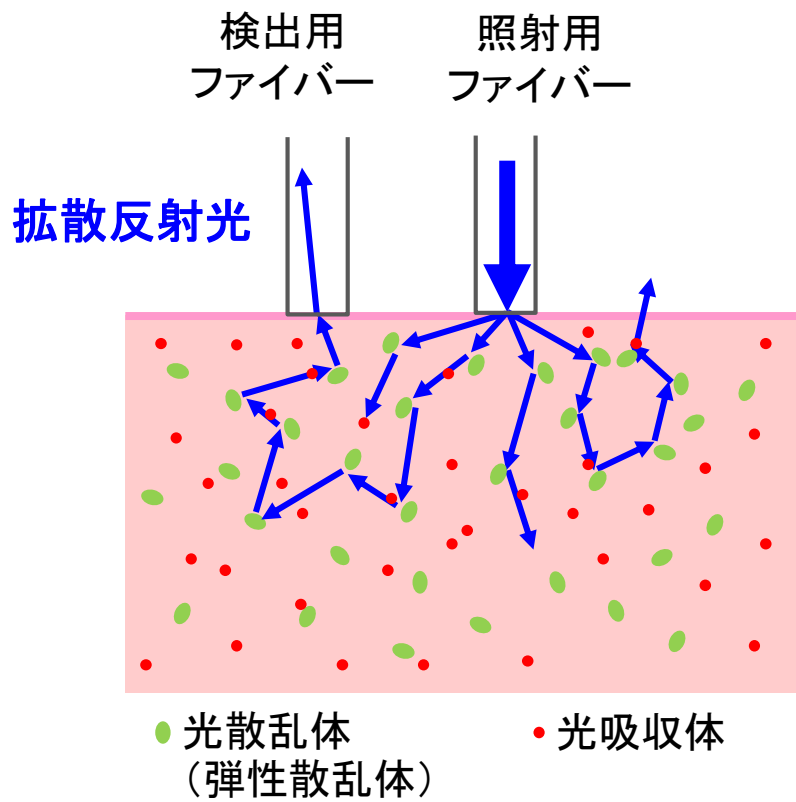


図1.7 拡散反射光の模式図。

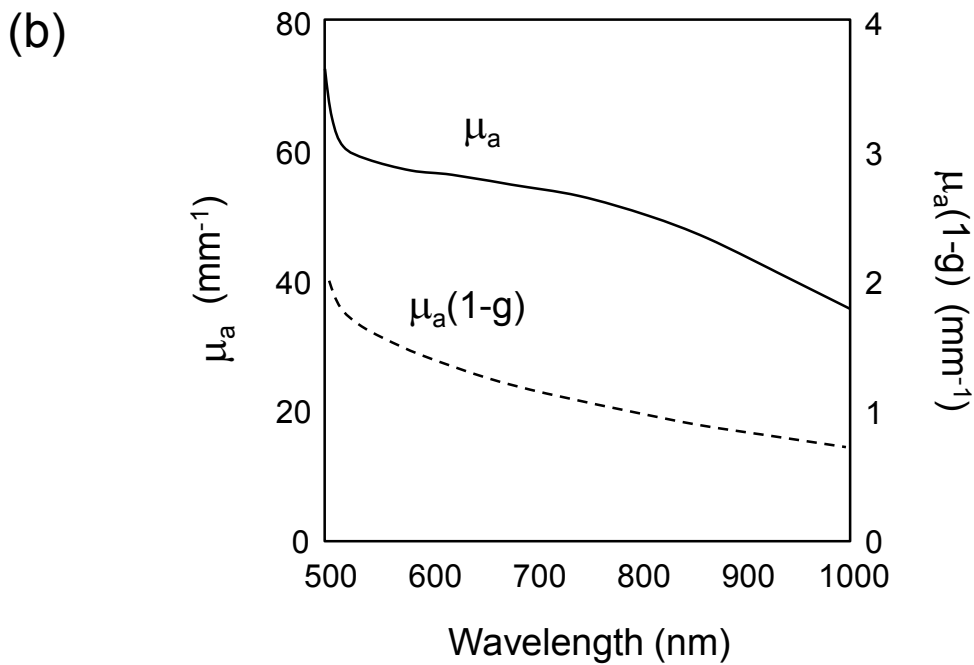
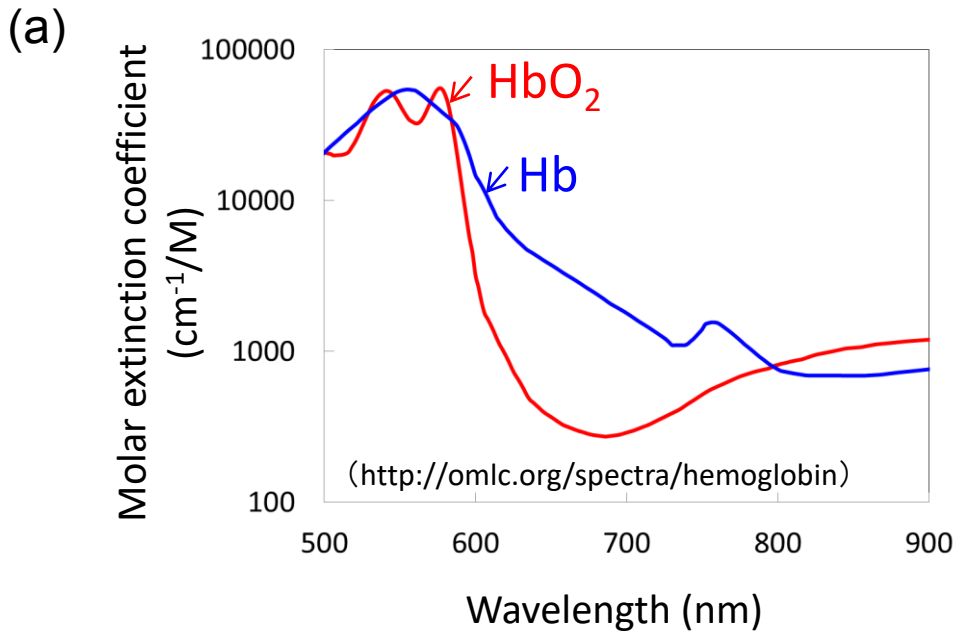


図1.8 (a) 酸素化および脱酸素化ヘモグロビンのモル吸光係数[44]および (b) 人脳の散乱係数および等価散乱係数の波長依存性[45]。

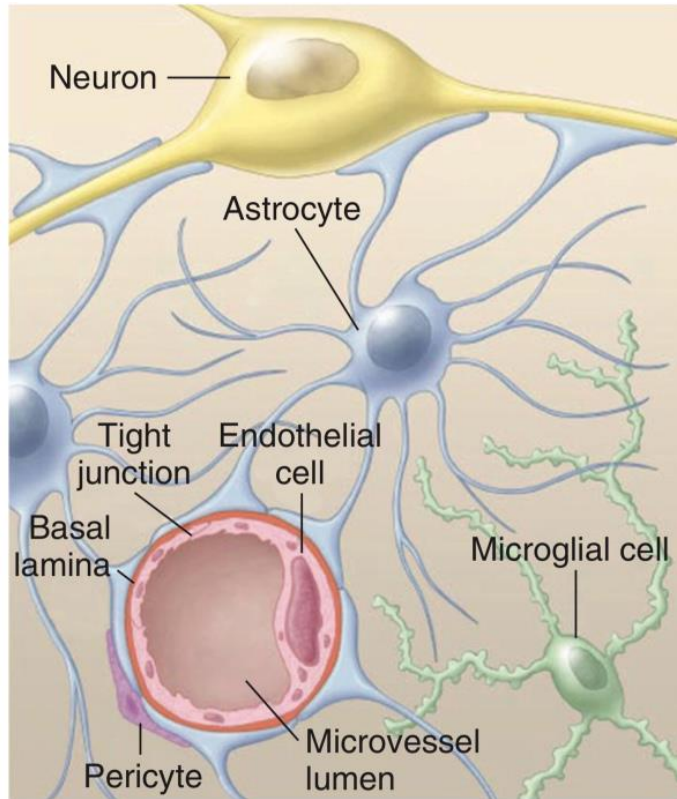


図1.9 神経-血管カップリングの構成[46]。Reproduced with permission from G. J. del Zoppo, "Stroke and neurovascular protection," *N. Engl. J. Med.* 354, 553-555 (2006)., Copyright Massachusetts Medical Society.

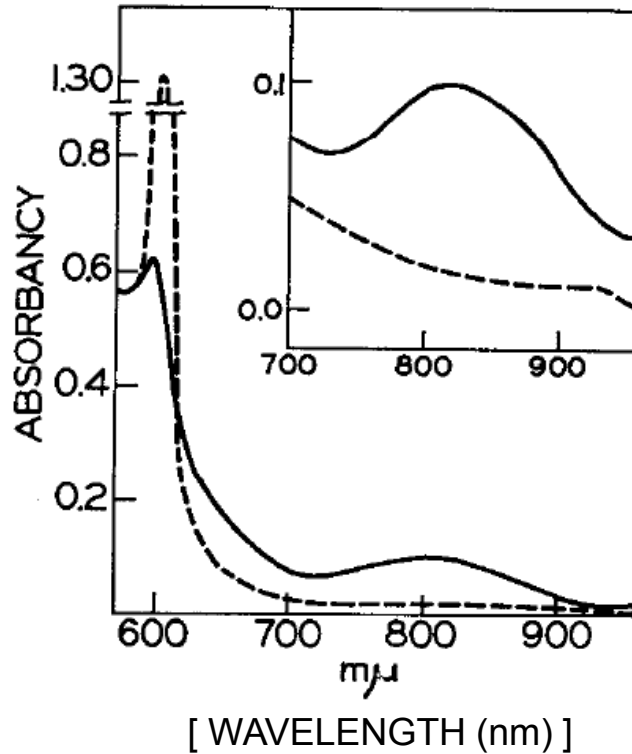


図1.10 ミトコンドリアの電子伝達系末端酵素シトクロムcオキシダーゼの酸化-還元による光吸収特性の変化[50]。This research was originally published in the *Journal of Biological Chemistry*. D. C. Wharton and A. Tzagoloff. *Studies on the electron transfer system LVII. The near infrared absorption band of cytochrome oxidase.* *J Biol Chem.* 1964; Vol 239:2036-2041. © the American Society for Biochemistry and Molecular Biology or © the Author(s).

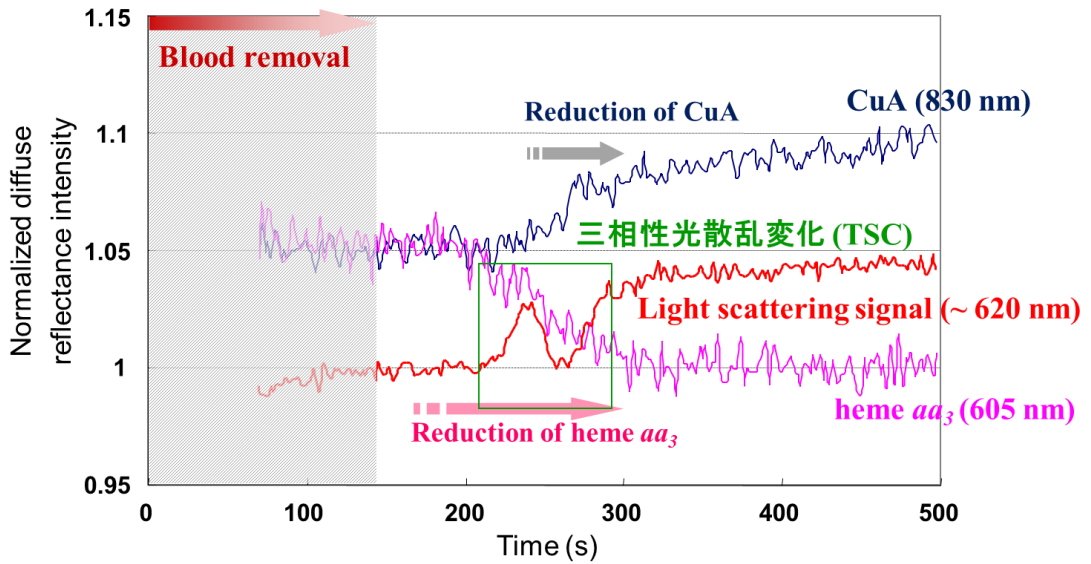
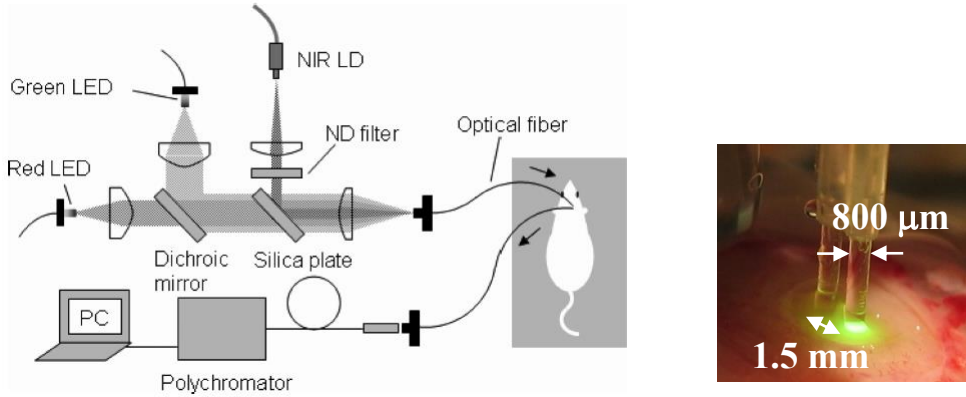


図1.11 脱血によるラット全脳虚血モデルにおける光散乱信号とシトクロムcオキシダーゼの酸化-還元に関する信号の変化の計測結果[47]。

Adapted with permission from [47] © The Optical Society.

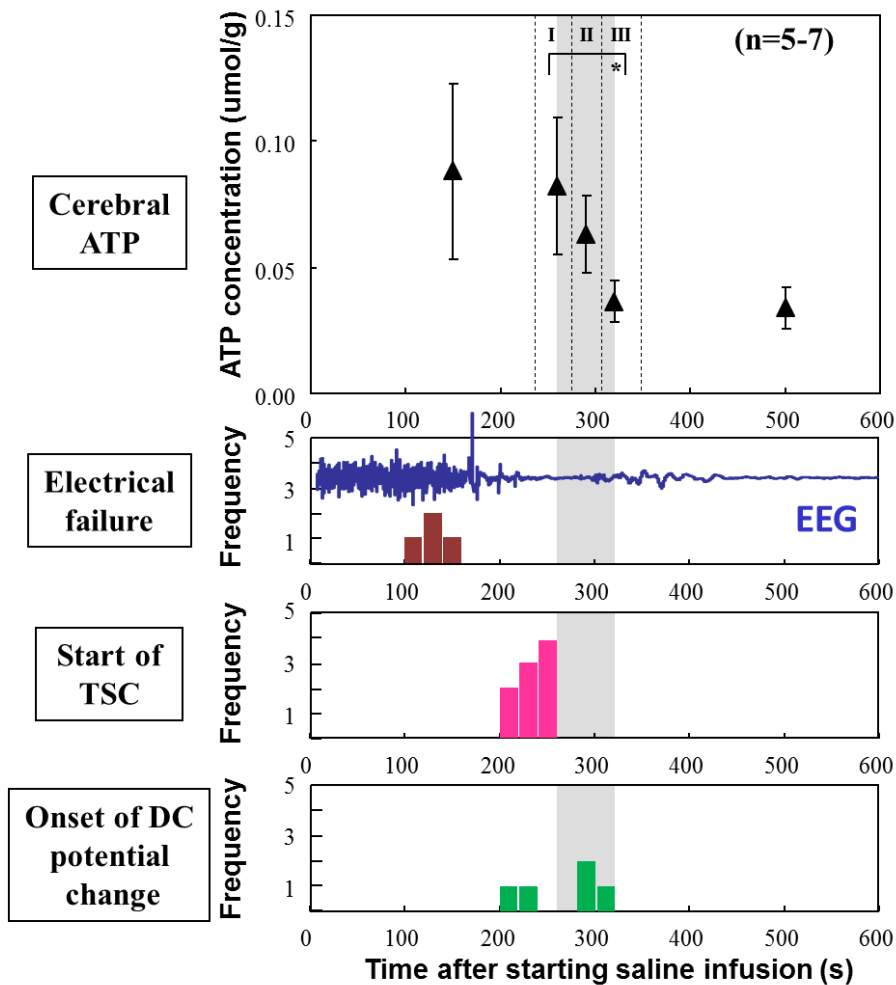
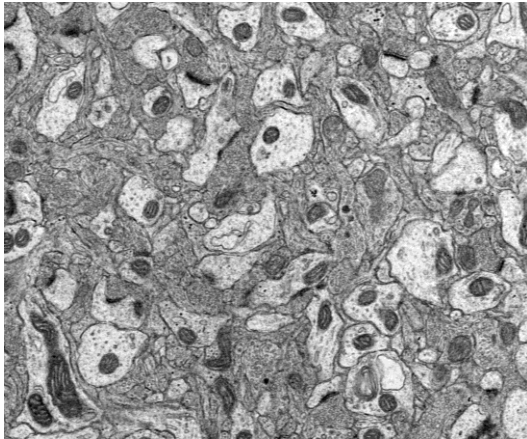
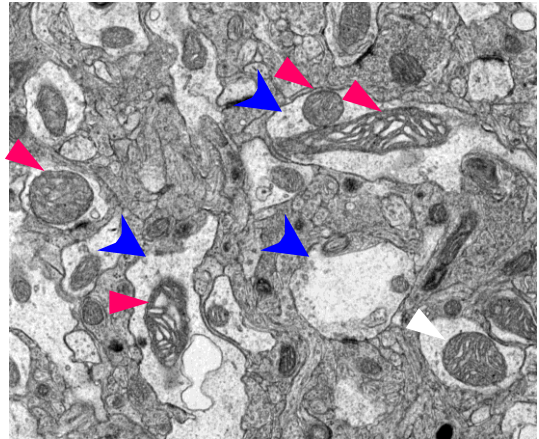


図1.12 ラット全脳虚血モデルにおける三相性光散乱変化とATP変化の関係[48]。
 Satoko Kawauchi, Shunichi Sato, Hidetoshi Oigawa, Hiroshi Nawashiro, Miya
 Ishihara, Makoto Kikuchi, "Light scattering change precedes loss of cerebral
 adenosine triphosphate in a rat global ischemic brain model," *Neuroscience
 Letters* 459(3), 152-156 (2009). doi: 10.1016/j.neulet.2009.05.014.



コントロール(t=0 s)

1 μm



三相性散乱変化後
(t=350 s)

1 μm

- 樹状突起の拡大
- ミトコンドリアの変形および拡大(著明なクリステの変形)

図1.13 ラット全脳虚血モデルにおける三相性光散乱変化前後の脳組織の電子顕微鏡観察結果[47]。Adapted with permission from [47] © The Optical Society.

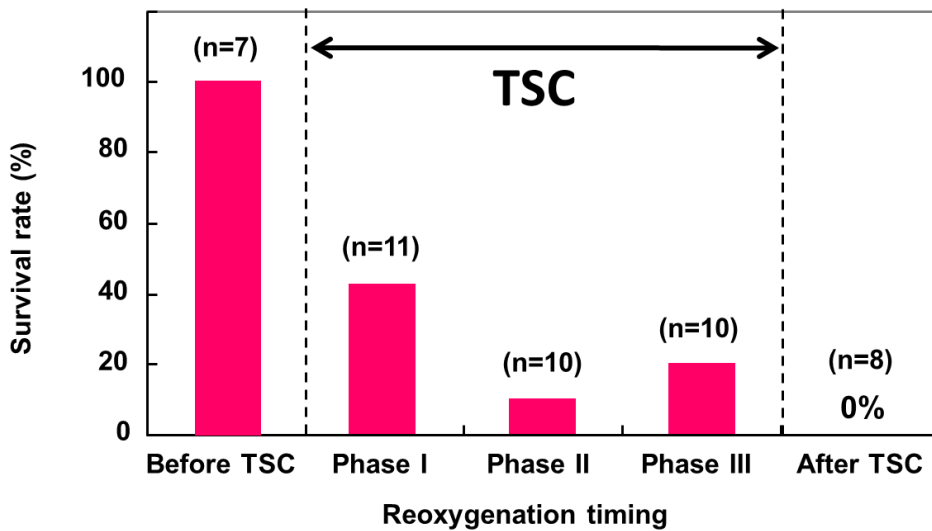
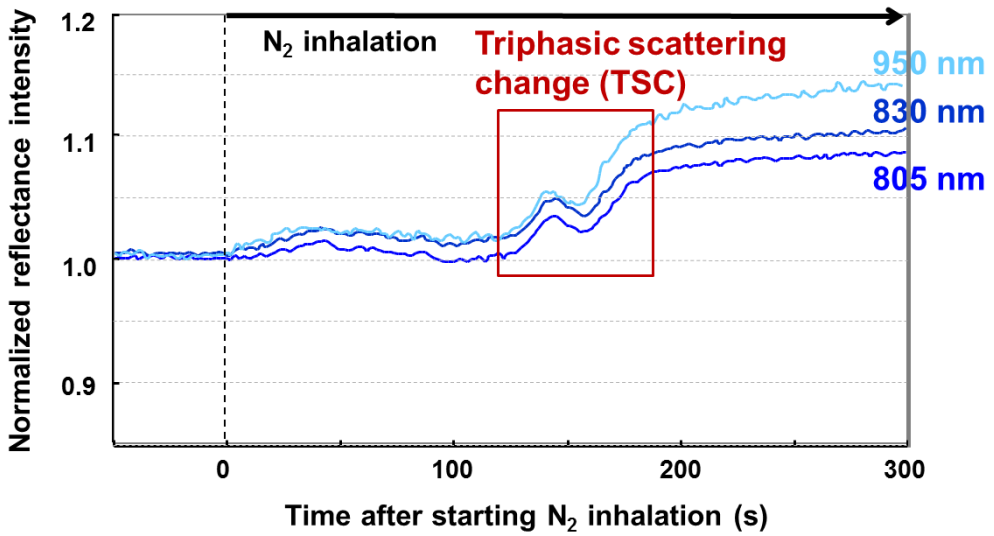


図1.14 ラット全脳低酸素モデルにおいて観察された三相性光散乱変化と脳組織の可逆・不可逆性との関係[49]。Satoko Kawauchi, Shunichi Sato, Yoichi Uozumi, Hiroshi Nawashiro, Miya Ishihara, Makoto Kikuchi, "Light-scattering signal may indicate critical time zone to rescue brain tissue after hypoxia," *Journal of Biomedical Optics* 16(2), 027002 (2011). doi: 10.1117/1.3542046.

第 2 章

拡散反射光スペクトルに基づく血行動態と 光散乱パラメータの算出

2.1 はじめに

第1章(1.3.2項)で述べたように、著者らは先行研究において、ラット全脳低酸素モデルを対象に経頭蓋骨的拡散反射光計測を行い、脳組織バイアビリティーの低下に伴い近赤外拡散反射光が三相性に変化し、その後増大すること、またこの時間帯が脳組織の救済可能なクリティカルタイムゾーンに相当することを示した[49]。この三相性変化は、波長600～850 nmにおいて波長依存性がほとんど見られなかったことから、光散乱変化によるものと推察されたが[49]、組織の散乱および吸収特性に関する定量評価は、方法が未確立のため行えていなかった。そこで拡散反射光データから組織の光吸収と光散乱特性を定量評価する方法を新たに提案し、先行研究と同じラット全脳低酸素モデルで計測されたデータについて解析することとした。本章でははじめに、拡散反射光スペクトルに基づき、組織の光吸収および光散乱パラメータを算出するための重回帰分析の理論と原理について述べ、光学ファントムを用いて提案法の妥当性を検証した実験結果について述べる。続いて実際にラット全脳低酸素モデルを対象に計測した拡散反射光データについて同法を適用し、バイアビリティー低下に伴う三相性の拡散反射光変化が散乱変化によるものか調べた実験結果について述べる。

2.2 理論および原理

ラット脳の吸収係数と等価散乱係数を推定するため、本研究では従来構築されたモンテカルロシミュレーション(MCS)と多重回帰分析を用いた拡散反射光スペクトルの定量化法を新たに修正して用いることとした。従来方法は、光路長が組織の散乱によらない、すなわち等価散乱係数が一定であるという仮定のもと、組織の吸収特性を推定するものであった[51]。本研究では、光路長が組織の散乱に依存し、等価散乱係数が増変することを前提に、吸収係数と等価散乱係数の両方を決定する方法を提案する。この手法では、吸光度スペクトルを目的変数とし、酸素化ヘモグロビン(HbO)と脱酸素化ヘモグロビン(HbR)のモル吸光係数を説明変数として回帰係数を求める。あらかじめ数値的に推定された変換ベクトルを用いて、回帰係数から散乱振幅係数とHbO、HbR濃度を求め、吸収係数と等価散乱係数を求める[52]。以下に方法の詳細を述べる。

図2.1に提案法のフローチャートを示す。各波長 λ における吸光度スペクトル $A(\lambda)$ は、 $A(\lambda) = -\log_{10} R(\lambda)$ と定義され、 $R(\lambda)$ は入射光スペクトルで正規化された拡散反射率スペクトルである。光散乱による減衰は、疑似的に吸収として扱うことができることから、吸光度スペクトル $A(\lambda)$ は、脳および頭蓋内の吸収と散乱による減衰の和として次のように近似することができる。

$$A(\lambda) = C_{\text{HbO}} l(\lambda, C_{\text{HbO}}, C_{\text{HbR}}, \mu_s') \epsilon_{\text{HbO}}(\lambda) + C_{\text{HbR}} l(\lambda, C_{\text{HbO}}, C_{\text{HbR}}, \mu_s') \epsilon_{\text{HbR}}(\lambda) + T(\lambda, \mu_s') + S(\lambda) \quad (1)$$

ここで、 l は平均光路長、 $T(\lambda)$ は脳組織（皮質）における光散乱による減衰、 $S(\lambda)$ は頭蓋骨における光の散乱と吸収による減衰である。脳組織の吸収係数は、HbOおよびHbRの濃度（ C_{HbO} 、 C_{HbR} ）のみに依存するとした（次式）。

$$\mu_a(\lambda) = C\varepsilon(\lambda) = C_{\text{HbO}}\varepsilon_{\text{HbO}}(\lambda) + C_{\text{HbR}}\varepsilon_{\text{HbR}}(\lambda). \quad (2)$$

また脳組織の等価散乱係数は次式で仮定できるものとした。脳組織をはじめとする生体軟組織の等価散乱係数は、波長の増加に対して単調に減衰する特性を示すため、次式で表される累乗関数により近似することが可能である[53]。

$$\mu_s'(\lambda) = a\lambda^{-b}, \quad (3)$$

ここで指数 b は一定と仮定し、文献で報告されている光学特性を用いて 1.38 とし [54]、頭蓋骨の光学特性は一定と仮定した。

式 (1) に対し、吸光度スペクトル $A(\lambda)$ を目的変数、モル吸光係数 $\varepsilon_{\text{HbO}}(\lambda)$ と $\varepsilon_{\text{HbR}}(\lambda)$ を説明変数として修正ランベルト・ベール則に基づく重回帰分析 (MRA1) を行うと、次の重回帰式で表現される回帰係数 α_{HbO} 、 α_{HbR} および α_0 を得ることができる。

$$A(\lambda) = \alpha_{\text{HbO}}\varepsilon_{\text{HbO}}(\lambda) + \alpha_{\text{HbR}}\varepsilon_{\text{HbR}}(\lambda) + \alpha_0 \quad (4)$$

回帰係数 α_{HbO} と α_{HbR} は吸光度スペクトルに対する各吸光係数の寄与を表し、それぞれ濃度 C_{HbO} と C_{HbR} に密接に関連する。回帰係数 α_0 は、

$$\alpha_0 = \bar{A} - \bar{\varepsilon}_{\text{HbO}} \cdot \alpha_{\text{HbO}} - \bar{\varepsilon}_{\text{HbR}} \cdot \alpha_{\text{HbR}}, \quad (5)$$

と表される。ここで、 \bar{A} 、 $\bar{\varepsilon}_{\text{HbO}}$ および $\bar{\varepsilon}_{\text{HbR}}$ はそれぞれ波長における $A(\lambda_k)$ 、 $\varepsilon_{\text{HbO}}(\lambda_k)$ および $\varepsilon_{\text{HbR}}(\lambda_k)$ の平均である。 α_0 は $A(\lambda)$ のバイアス成分を表す。したがって α_0 は、脳内の光散乱による減衰の吸光度スペクトル $A(\lambda)$ への寄与の度合いを表し、式 (3) の a に関係する。また同時に $A(\lambda)$ は組織の吸収係数と散乱係数の関数であることから、 α_0 は脳の吸収係数の影響も受ける。

回帰係数と C_{HbO} 、 C_{HbR} および a との関係調べるため、次の 16 の波長条件、 $\lambda = 500, 520, 540, 560, 570, 580, 584, 600, 605, 730, 760, 790, 800, 805, 830, 850$ nm において、種々の C_{HbO} 、 C_{HbR} および a の値もとで、頭蓋骨を通ったラット脳組織からの拡散反射光について MCS を行った。MCS のソースコードは Wang らによって開発されたものを使用した [55]。このコードでは光子の散乱角のサンプリングに Henyey-Greenstein 位相関数が適用され

る。シミュレーションモデルは、頭蓋骨と脳組織（皮質）の 2 層で構成され、実験で使用するファイバー配置を考慮した（ファイバーコア径 0.8 mm, 中心間隔 2.0 mm）。光の入射と検出領域は、ファイバー端面と頭蓋骨との境界に置き、一回のシミュレーションにおける入射光子数は 5,000,000 個とした。光子は、面内に等しい確率で入射させ、頭蓋骨および皮質を伝播し、ファイバーの最大受光角度以内の条件で戻った光子のみをカウントした。吸収係数 $\mu_{a,HbO}$ と $\mu_{a,HbR}$ は、モル吸光係数 ϵ_{HbO} および ϵ_{HbR} の文献値から求めた[56]。ここで血液のヘモグロビン濃度に関しては、ヘマトクリット値 44% でヘモグロビン 150 g/L を含む条件を、体積濃度 100%（100 体積%）のヘモグロビン濃度として換算した。シミュレーションにおける等価散乱係数に関する a の値には、 a の典型値に[18], それぞれ 0.5, 0.75, 1.0 および 1.25 をかけた 40,172, 60,258, 80,344 および 100,430 を用いた。等価散乱係数は、式 (3) より求めた。脳組織の C_{HbT} ($= C_{HbO} + C_{HbR}$) の入力値は、0.2, 1.0 および 5.0 体積% とし、組織酸素飽和度は $StO_2 = 60\%$ と仮定した。頭蓋骨の等価散乱係数と吸収係数の値は文献値を用いた[57]。すべてのシミュレーションにおいて、ファイバー、頭蓋骨および皮質組織の屈折率は、それぞれ 1.45, 1.5, および 1.4 とした。頭蓋骨および皮質組織の厚さは、それぞれ 0.35 mm および 4.65 mm に設定した。

図 2.2a および 2.2b は、MCS から得られた a の異なる条件下での、 α_{HbO} および α_{HbR} の値と、 C_{HbO} および C_{HbR} の関係を示す。図 2.2a において、 α_{HbO} の値は C_{HbO} の増加とともに増大している。同様の傾向が α_{HbR} 関しても見られる（図 2.2b）。図 2.2c は、異なる値の C_{HbO} および C_{HbR} における a と α_0 の関係を示す。 α_0 の値は a の値の増加に伴って減少している。また α_0 の値は C_{HbO} と C_{HbR} の増加に伴い増大している。したがって、回帰係数 α_{HbO} , α_{HbR} , および α_0 は、それぞれ C_{HbR} , C_{HbR} , および a に関係することは明らかである。しかし C_{HbO} , C_{HbR} , および a は、MRA1 のみを使用した場合、ひとつの回帰係数に決まらない。

そこで、MRA1 から得られた回帰係数 α_{HbO} , α_{HbR} , および α_0 から C_{HbO} , C_{HbR} , および a を推定するため、別の重回帰分析（MRA2）を用いることとした。MRA2 では、 C_{HbO} , C_{HbR} , および a を目的変数とみなし、式 (4) の回帰係数 α_{HbO} , α_{HbR} , および α_0 を説明変数とみなした。これらの関係は、 $C_{HbO} = \beta_{HbO} \cdot \alpha$, $C_{HbR} = \beta_{HbR} \cdot \alpha$, および $a = \beta_a \cdot \alpha$ と表せる。ここで、 $\alpha = [1, \alpha_{HbO}, \alpha_{HbR}, \alpha_0]^T$, $\beta_{HbO} = [\beta_{HbO,0}, \beta_{HbO,1}, \beta_{HbO,2}, \beta_{HbO,3}]$, $\beta_{HbR} = [\beta_{HbR,0}, \beta_{HbR,1}, \beta_{HbR,2}, \beta_{HbR,3}]$, および $\beta_a = [\beta_{a,0}, \beta_{a,1}, \beta_{a,2}, \beta_{a,3}]$ である。 $[\]^T$ は転置行列を表す。係数 $\beta_{HbO,i}$, $\beta_{HbR,i}$, および $\beta_{a,i}$ ($i = 0, 1, 2, 3$) は未知であり、解析前に決定しておかなければならない。信頼性の高い $\beta_{HbO,i}$, $\beta_{HbR,i}$, および $\beta_{a,i}$ を求めるため、前述と同様の MCS を用いた。 C_{HbO} および C_{HbR} から変換した吸収係数 μ_a と、係数 a により決定した等価散乱係数 μ_s' をシミュレーションの入力とし、拡散反射光を出力とした。種々の C_{HbO} , C_{HbR} , および a の値もと、次の 16 波長, $\lambda = 500, 520, 540, 560, 570, 580, 584, 600, 605, 730, 760, 790, 800, 805, 830, 850$ nm でシミュレーションを行い、合計 90 の拡散反射光スペクトルを計算した。各計算により求めた拡散反射光スペクトルについて式 (4) に基づき MRA1 を行うことで 90 のベクトル α と C_{HbO} , C_{HbR} , および a の組が生成される。係数ベクトルの β_{HbO} , β_{HbR} , お

および β_a はMRA2を行うことにより統計的に求めた。ひとたび β_{HbO} , β_{HbR} , および β_a が決まれば, C_{HbO} , C_{HbR} , および a は, MRA1 から求めた α_{HbO} , α_{HbR} , および α_0 により決まる。そして式(2)と(3)より, それぞれ吸収係数スペクトル $\mu_a(\lambda)$ および等価散乱係数スペクトル $\mu_s'(\lambda)$ が求まる。

2.3 実験方法

2.3.1 ファントムを用いた拡散反射光計測

上述した定量化に関する提案法の妥当性検証のため, 組織ファントムを用いて拡散反射光計測を行った。ファントムは, ①10%イントラリピッド溶液 (Fresenius Kabi AB), ②ラットから採取した酸素化ヘモグロビン, および③生理食塩水を混合して調製した。実験に使用した組織ファントムの組成を表1に示す。ファントムの光学特性は, 10%イントラリピッド溶液とヘモグロビン溶液の濃度により変化させた。等価散乱係数は, 典型的な脳組織の値を考慮して $9.35\sim 24.4\text{ cm}^{-1}$ の範囲となるよう, 10%イントラリピッド溶液の容積率を10%または15%とした[58]。吸収係数は $0.12\sim 7.48\text{ cm}^{-1}$ の範囲となるよう, 2.5 mmol/Lのヘモグロビン溶液を希釈して調製した。これらのファントムについて, 後述するラット脳の拡散反射光計測と同じ実験装置を用いて拡散反射光計測を行った。計測において光ファイバーはファントムの液表面に接触させた。実験装置の全光学系の分光特性を補正するため, ヘモグロビンを含まない15%イントラリピッド溶液をリファレンスとして使用し, 同サンプルの拡散反射光を計測した。式(3)の指数 b は, イントラリピッドの光学特性に基づき1.04とした[58]。設定した μ_s' と推定された μ_s' の相関, および設定した μ_a と推定された μ_a の相関につきそれぞれ調べた。

2.3.2 ラット全脳低酸素モデルを用いた拡散反射光計測

雄 Sprague-Dawley ラット (体重 200~280 g, n=5, 日本エスエルシー) に, 麻酔薬ペントバルビタールナトリウムを 50 mg/kg の用量にて腹腔内投与し, 脳定位固定装置 (SR-6R-HT, 株式会社成茂科学器械研究所) を用いて頭部を固定した。頭部剃毛の後, 頭皮を正中切開し, 頭頂骨を露出させた。露出させた頭頂骨は, 乾燥による骨の光散乱特性変化を防ぐため, 実験中つねに生理食塩水を低速で流し湿潤を保った。流す生理食塩水は, ラット体温 (後述) と同じ温度となるよう, 生理食塩水のボトルを水槽内に設置し, 恒温槽で定温に保った水を循環させることで水槽内の水温を約 32°C に維持するとともに, 流路を断熱材料で被覆した。ラット脳を低酸素にするため, ラットにマスクを装着し, 自発呼吸下で吸気を空気から 100% 窒素に切り替えることで低酸素負荷を与えた。低酸素負荷中のラットの呼吸循環動態をモニタリングするため, パルスオキシメータ (8600V, Nonin Medical, Inc) を用いて下肢にて動脈血酸素飽和度を計測した。体温は, 温度制御されたヒートマットを用いて $32.0 \pm 0.5^\circ\text{C}$ に保った。

実験装置図を図 2.3 に示す。先行研究と同様にラット脳の拡散反射光を経頭蓋骨的に計測

するため、一对の光ファイバー（コア径 800 μm ，中心間隔 2 mm）の先端を露出した右頭頂骨に接触させて固定した。このとき，注意深く太い血管（骨から透けて見える太い静脈）を避けてファイバー先端を設置した。光源にタングステンランプ（BPS120, B&W Tek, Inc.）を用い，熱線吸収フィルターを透過させ，波長 400~1000 nm の光をファイバーに導光した。頭部への入射パワーは 44 μW とした。拡散反射光を受光用ファイバーで検出し，マルチチャンネル分光器（PMA-11, 浜松ホトニクス株式会社）に導光し，スペクトルを 2 秒に 1 回連続的に記録した。毎実験終了後，ヘモグロビンを含まない 15%イントラリピッド溶液の拡散反射光スペクトルを計測し，定量化の際のリファレンス信号として用いた。

2.4 実験結果および考察

2.4.1 ファントムを用いた定量化法の妥当性検証

組織ファントムの吸収係数と等価散乱係数を推定するため，計測した組織ファントムの拡散反射光スペクトルについて上述した重回帰分析を行い，酸素化，脱酸素化ヘモグロビン濃度 C_{HbO} ， C_{HbR} および散乱に関する係数 a を求めた。図 2.4 は，設定した係数 a ，酸素化ヘモグロビン濃度 C_{HbO} ，脱酸素化ヘモグロビン濃度 C_{HbR} ，および総ヘモグロビン濃度 C_{HbT} ($C_{\text{HbO}} + C_{\text{HbR}}$) とそれぞれに関する推定値との関係を示す。図 2.4a と 2.4b において，推定された a と C_{HbO} は，設定値とよく一致している。図 2.4c では，推定されたすべての C_{HbR} はゼロ付近にあり，これは上述したように組織ファントムに用いたヘモグロビンがすべて酸素化ヘモグロビンであったことと矛盾しない。図 2.4d では，総ヘモグロビン濃度 C_{HbT} について設定値と推定値の良い一致が見られる。これらの結果は，対象試料の散乱に関する係数 a ， C_{HbO} ， C_{HbR} ，および C_{HbT} を推定する本提案法の妥当性を示している。図 2.5 は，吸収係数と等価散乱係数それぞれの設定値と推定値の関係を示している。両係数ともに，設定値と推定値の良い一致が確認される。設定値と推定値の相関係数は，吸収係数において 0.99，等価散乱係数において 0.96 であった。設定値と推定値の違いは，吸収係数で最少 4%，最大 15%，等価散乱係数で最少 0.6%，最大 23% であった。図 2.5 より，特に設定値と推定値のずれが大きかったのは，吸収係数と等価散乱係数いずれについても，組織ファントムの No.5 と No.6 であったことがわかる。これらは吸収係数が最も高い条件のものであり，吸収係数の範囲で 3~8 cm^{-1} に相当する。吸収体濃度の高い条件では，吸収体間の会合や凝集が起きやすかった可能性が考えられ，微視的に見ると実際の吸収特性が設定と異なったのかもしれない。一方，脳組織の光学特性を考えると，波長 650~1000 nm では $\mu_a = \sim 0.25 \text{ cm}^{-1}$ [ref] と低く，この値における設定吸収係数と推定吸収係数の相関は高いことが確認できる（図 2.5a）。以上より，提案する定量化法は，拡散反射光スペクトルから脳組織の吸収係数と等価散乱係数を推定する方法として妥当なものと考えられた。

2.4.2 ラット全脳低酸素モデルの拡散反射光計測と光学特性値の定量化

次に実際に，ラット脳を対象に計測した拡散反射光スペクトルに上述した定量化法を適

用し、低酸素負荷によるラット脳の吸収係数と等価散乱係数の変化につき評価を行った。ここでは先行研究で計測された近赤外拡散反射光の三相性変化が[49]、実際に散乱変化に由来ものかを明らかにするため、先行研究と同じ実験条件、実験装置を用いて計測した拡散反射光データについて解析を行った。図 2.6a は、低酸素中のラット脳の 805 nm および 730 nm における拡散反射光強度の時間変化を低酸素前の強度で規格化して示している。ここで 805 nm は、近赤外領域における酸素化ヘモグロビンと脱酸素化ヘモグロビンの等吸収点に相当する。窒素ガス吸入により低酸素を開始すると、805 nm の拡散反射光強度は約 80 s 後にわずかに増加し、100~190 s の間に緩やかに減少した。その後、190 s 付近から急激な増加-減少-増加となる三相性変化を示し、その後緩やかに増加し続けた。一方脱酸素化ヘモグロビンの吸収が支配的な波長 730 nm の拡散反射光強度は、低酸素開始直後から大きく減少し、その後 805 nm と似た変化の傾向を示した。これらの結果は、同じモデルを用いて観察された先行研究の結果と同様である (図 1.14a) [49]。次に図 2.6b と 2.6c に、計測した拡散反射光データについて上述した重回帰分析を行い、各種ヘモグロビン濃度 (C_{HbO} , C_{HbR} , および C_{HbT}) と散乱に関する係数 a の定量評価を行った結果を示す。またこれらの値から吸収係数と等価散乱係数を算出した結果を図 2.6d と 2.6e に示す。図 2.6b の各種ヘモグロビン濃度の結果から、上述した波長 730 nm の拡散反射光の最初の変化は、主として脱酸素化ヘモグロビンの増加によるものであること、またその後の 805 nm と 730 nm の拡散反射光の増加と減少 ($t=80\sim 190$ s) は、吸収と散乱の両方の変化によるものであることが示され、後者は急激な低酸素負荷に血管と細胞が反応した結果と推察された。続いて拡散反射光の三相性変化が観測された時間帯 ($t=190$ s 以降) に着目すると、805 nm と 730 nm の両波長における吸収係数の変化は小さいのに対して (図 2.6d)、等価散乱係数ははっきりとした三相性変化 (増加-減少-増加) を示していることがわかる (図 2.6e)。これらの結果は計測した全 5 匹のラットで再現して見られ、図 2.6a に示す拡散反射光の三相性変化は、主として脳の散乱変化によるものであることが示された。

先行研究で考察したように[48,49]、三相性の光散乱変化は拡張性脱分極 (SD, この場合無酸素性脱分極ともよぶ) によるものと考えられる[10]。SD が起きると、細胞膜を介して大量のイオンの流出入が起き、これにより水の移動が生じ、その結果、細胞体積や細胞小器官の形態が変化し、組織の散乱特性が変化しうる[11,12,59]。SD が発生する時間帯においては、同時にエネルギー代謝レベルも変化する可能性があることから、拡散反射光の変化にミトコンドリアの電子伝達系に関する光吸収特性も影響する可能性がある。今後、ヘモグロビン以外の光吸収体を考慮した定量化法を構築できれば、同拡散反射光の解析に有用と思われる。また第 1 章で述べたように、SD はその名が示す通り、局所に発生し時間とともに皮質を伝搬、拡大する性質を持つことから、SD に伴う組織の光学特性の変化も時空間的に変化していると考えられる。一方、本章で行った拡散反射光計測は、一対のファイバーを用いたいわばポイント計測であり、脳全体で起きる現象の一部を捉えた可能性がある。脳組織バイアビリティー低下に伴う拡散反射光の変化をより詳細に理解するためには、

CCD を用いた拡散反射光イメージングを行う必要があると思われた。

2.5 まとめ

本章では、モンテカルロシミュレーションと重回帰分析を用いて、拡散反射光スペクトルから組織の光吸収係数と等価散乱係数を定量評価する方法を提案し、組織ファントムを用いた実験により同法の妥当性を検証した。組織ファントムの光学定数の設定値と推定値の間に高い相関が得られたことから、提案解析法が対象試料の光学特性を評価するのに十分な性能を有することが示された。次に、実際にラット全脳低酸素モデルを対象に計測した拡散反射光データについて同法を適用し、低酸素中のラット脳の光吸収係数と等価散乱係数を評価した。その結果、バイアビリティー低下に伴う近赤外拡散反射光の三相性変化（増加-減少-増加）は、主として光散乱変化によるものであることが示された。この結果は、先行研究の考察の確からしさを裏付けた。一方、バイアビリティー低下に伴う三相性光散乱変化は、恐らく SD によるものであることを考えると、同散乱変化は皮質を伝搬する特性を持ち、光ファイバーで計測した変化は全体の現象の一部であると推察された。そこで次章では、同じラット全脳低酸素モデルを対象に CCD を用いた近赤外拡散反射光イメージングを行い、反射光がどのような時空間特性を示すのか、またその変化とファイバーで計測した変化はどのような関係にあるか調べることにした。

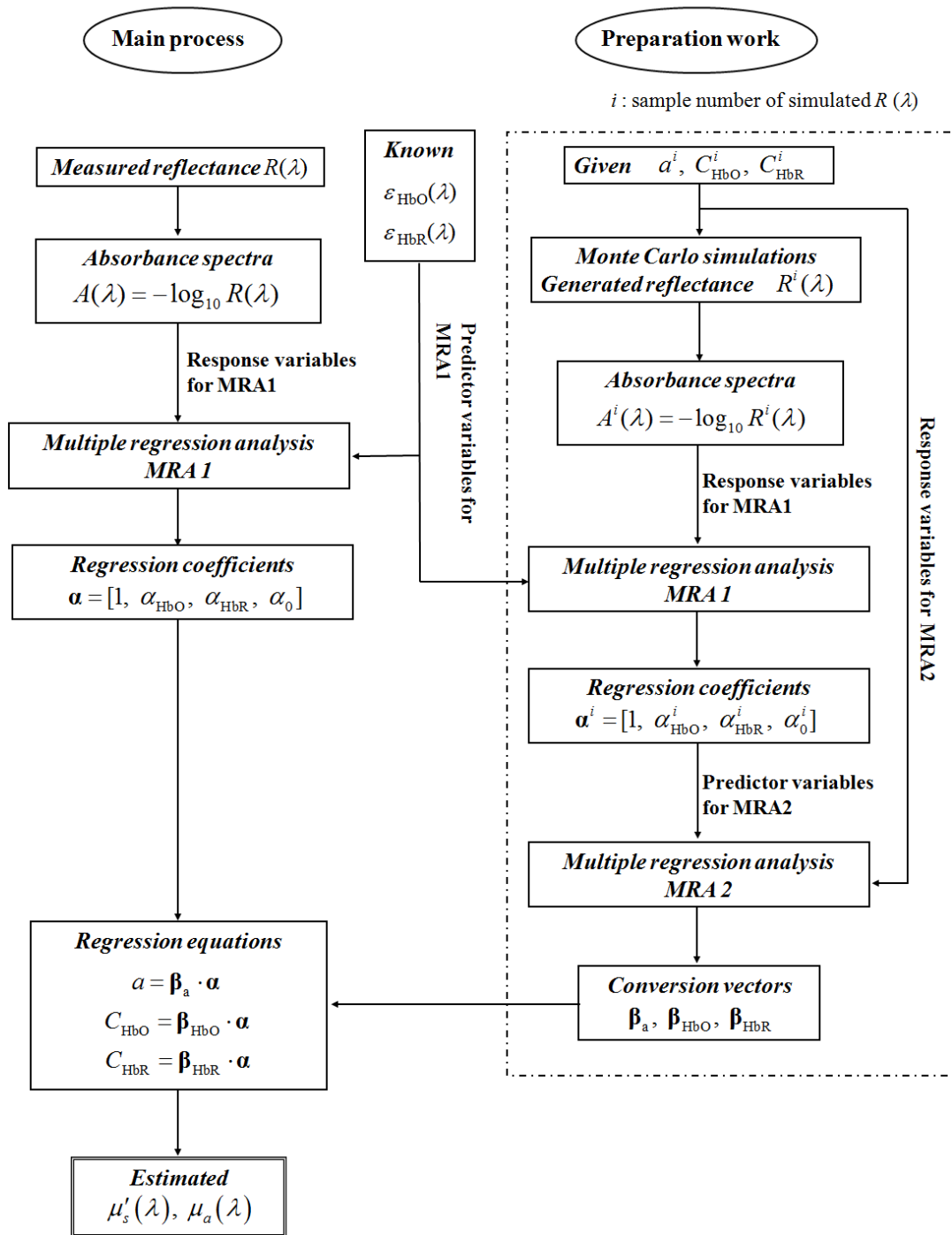


図2.1 モンテカルロシミュレーションと重回帰分析を用いた光学特性定量評価法のフロー図[52]。Satoko Kawauchi, Izumi Nishidate, Yoichi Uozumi, Hiroshi Nawashiro, Hiroshi Ashida, Shunichi Sato, "Diffuse light reflectance signals as potential indicators of loss of viability in brain tissue due to hypoxia: charge-coupled-device-based imaging and fiber-based measurement," *J. Biomed. Opt.* 18(1), 15003 (2013). doi: 10.1117/1.JBO.18.1.015003.

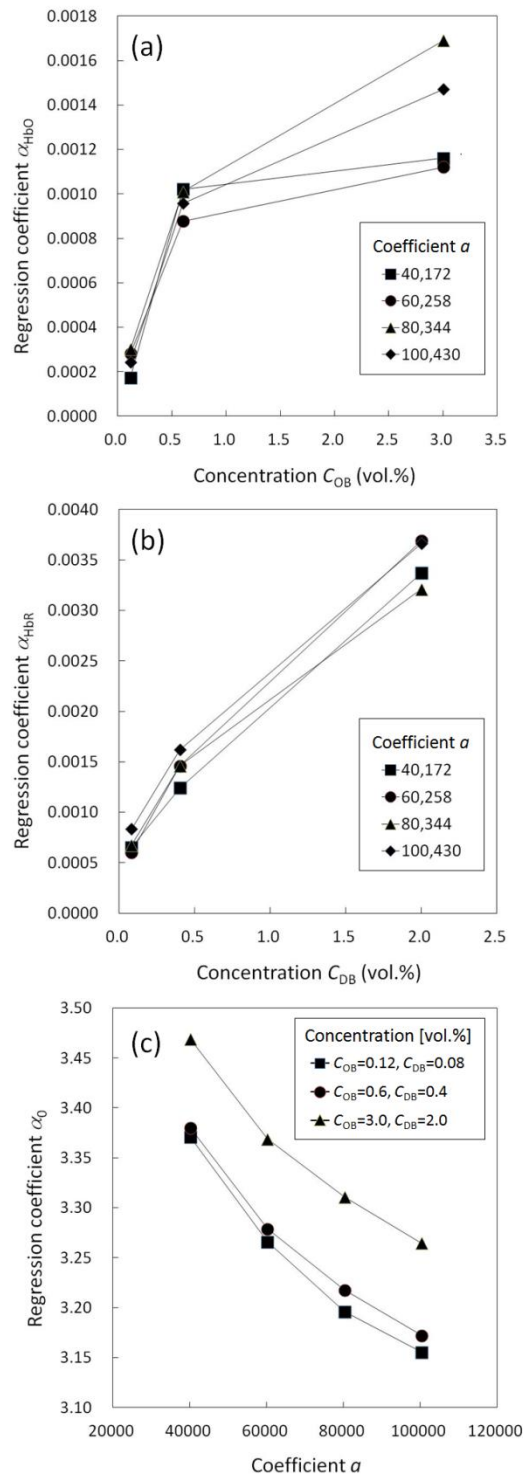


図2.2 酸素化ヘモグロビン濃度と回帰係数 α_{HbO} ，脱酸素化ヘモグロビン濃度と回帰係数 α_{HbR} ，および散乱に関する係数 a と回帰係数 α_0 の関係[52]。

Satoko Kawauchi, Izumi Nishidate, Yoichi Uozumi, Hiroshi Nawashiro, Hiroshi Ashida, Shunichi Sato, "Diffuse light reflectance signals as potential indicators of loss of viability in brain tissue due to hypoxia: charge-coupled-device-based imaging and fiber-based measurement," *J. Biomed. Opt.* 18(1), 15003 (2013). doi: 10.1117/1.JBO.18.1.015003.

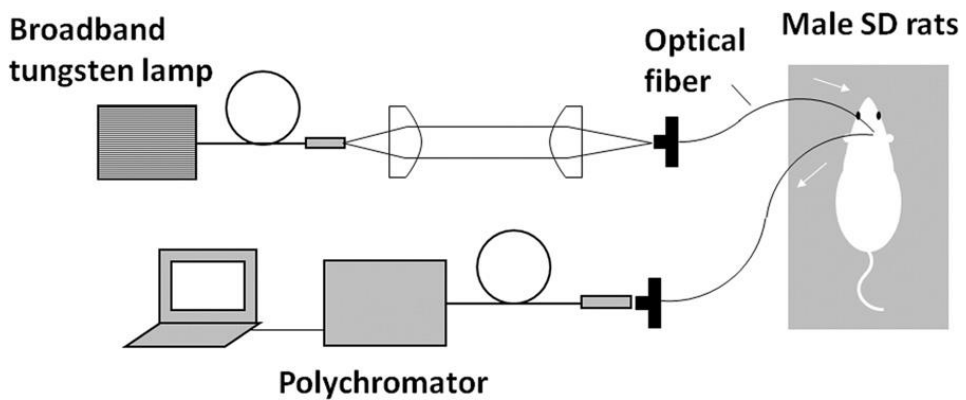


図2.3 ラット脳に対するファイバー型多波長拡散反射光計測の実験装置図[52]。
 Satoko Kawauchi, Izumi Nishidate, Yoichi Uozumi, Hiroshi Nawashiro,
 Hiroshi Ashida, Shunichi Sato, "Diffuse light reflectance signals as potential
 indicators of loss of viability in brain tissue due to hypoxia: charge-coupled-
 device-based imaging and fiber-based measurement," *J. Biomed. Opt.* 18(1),
 15003 (2013). doi: 10.1117/1.JBO.18.1.015003.

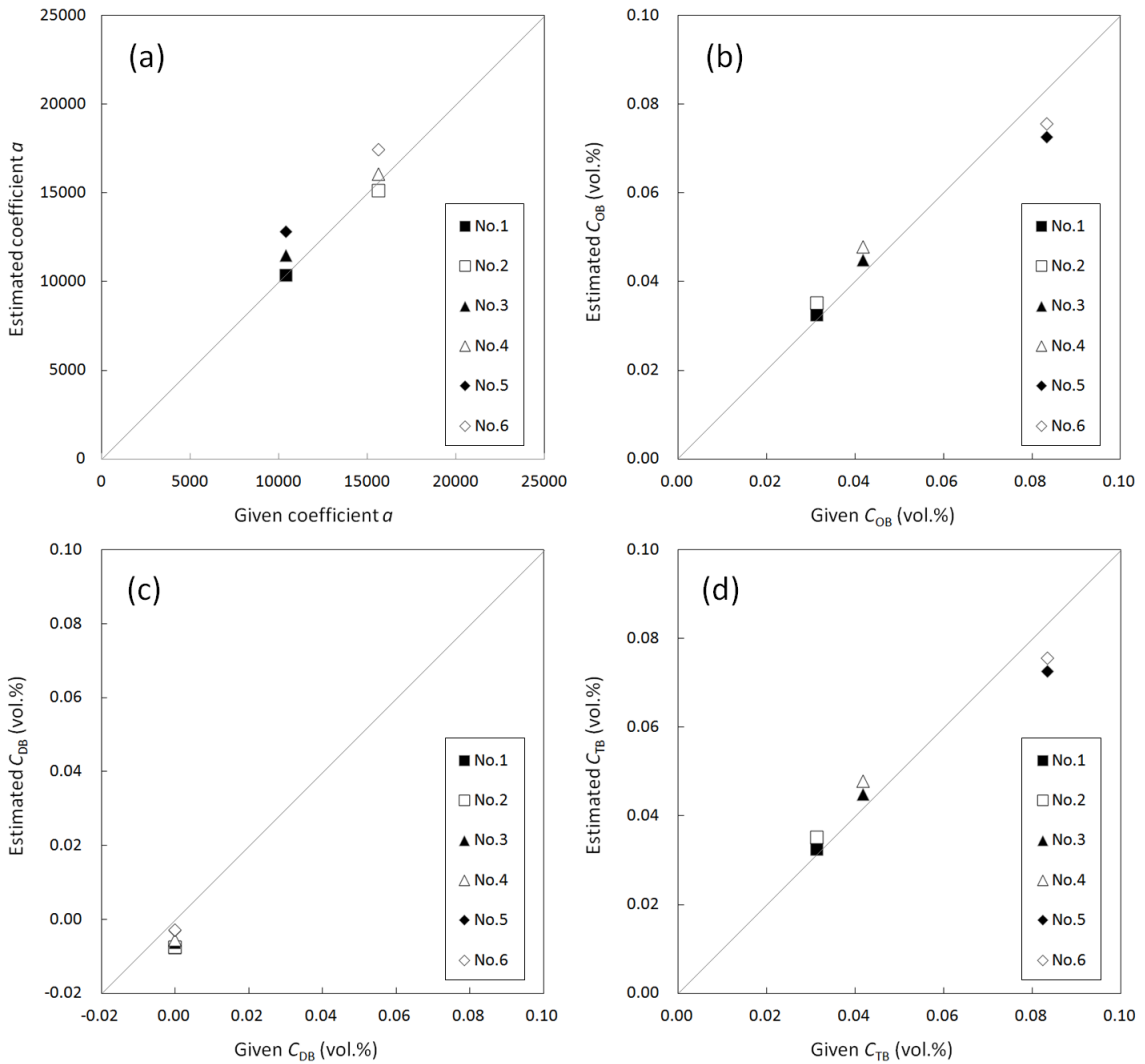


図2.4 提案定量化法の検証結果。各設定値と推定値の関係を表す[52]。
 Satoko Kawauchi, Izumi Nishidate, Yoichi Uozumi, Hiroshi Nawashiro,
 Hiroshi Ashida, Shunichi Sato, "Diffuse light reflectance signals as potential
 indicators of loss of viability in brain tissue due to hypoxia: charge-coupled-
 device-based imaging and fiber-based measurement," *J. Biomed. Opt.* 18(1),
 15003 (2013). doi: 10.1117/1.JBO.18.1.015003.

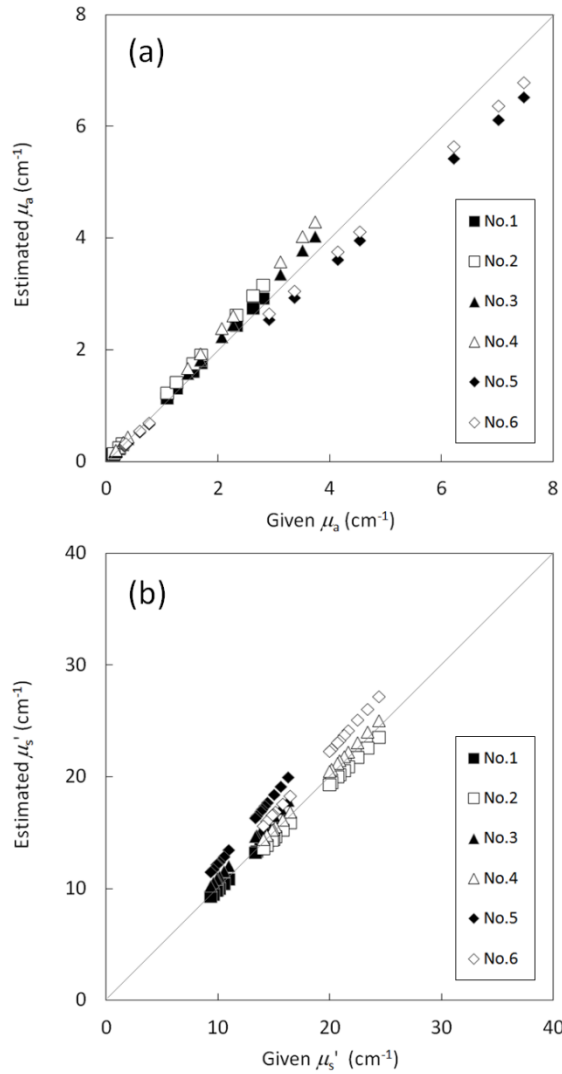


図2.5 提案定量化法の検証結果。吸収係数と等価散乱係数それぞれの設定値と推定値の関係を示す[52]。

Satoko Kawauchi, Izumi Nishidate, Yoichi Uozumi, Hiroshi Nawashiro, Hiroshi Ashida, Shunichi Sato, "Diffuse light reflectance signals as potential indicators of loss of viability in brain tissue due to hypoxia: charge-coupled-device-based imaging and fiber-based measurement," *J. Biomed. Opt.* 18(1), 15003 (2013). doi: 10.1117/1.JBO.18.1.015003.

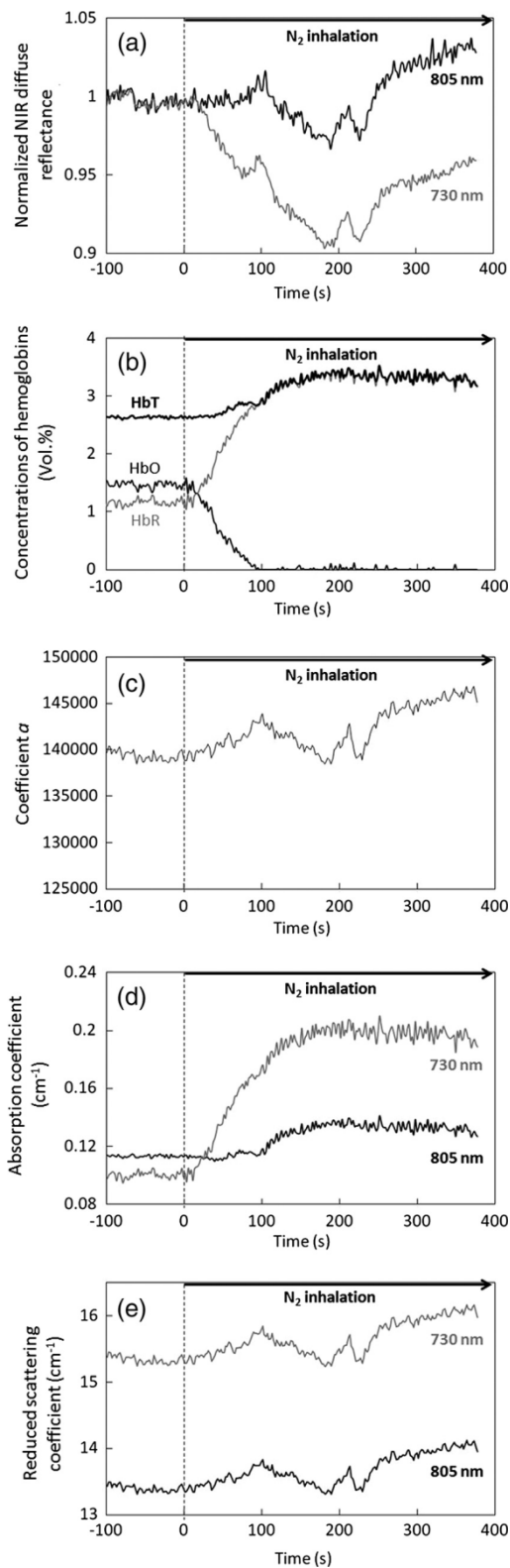


図2.6 ラット全脳低酸素モデルを用いたファイバー型拡散反射光計測結果。上から、近赤外拡散反射光，総ヘモグロビン濃度，散乱振幅，吸収係数，等価散乱係数の時間変化を示す[52]。Satoko Kawauchi, Izumi Nishidate, Yoichi Uozumi, Hiroshi Nawashiro, Hiroshi Ashida, Shunichi Sato, "Diffuse light reflectance signals as potential indicators of loss of viability in brain tissue due to hypoxia: charge-coupled-device-based imaging and fiber-based measurement," *J. Biomed. Opt.* 18(1), 15003 (2013). doi: 10.1117/1.JBO.18.1.015003.

表2.1 ファントムの種類と組成。

Sample No.	10%-Intralipid solution	Hb solution (2.5 mmol/L)	Saline
1	10%	2.8%	87.2%
2	15%	2.8%	82.2%
3	10%	4.2%	85.8%
4	15%	4.2%	80.8%
5	10%	8.3%	81.7%
6	15%	8.3%	76.7%

第 3 章

ラット全脳低酸素モデルに対する光ファイバー
および CCD を用いた多波長拡散反射光計測

3.1 はじめに

ラット全脳低酸素モデルを対象に、一対の光ファイバーを用いて経頭蓋骨的に拡散反射計測を行うと、低酸素開始から一定時間後に、三相性の光散乱変化が観測される(図 1.14a) [49]。先行研究において、この散乱変化は、再酸素化によるラット救済可能な時間帯(クリティカルタイムゾーン)に相当することが示され[49]、脳組織バイアビリティー低下の有用な指標になりうると考えられた。同散乱変化は、拡延性脱分極(spreading depolarization: SD,あるいはターミナル(終末)脱分極)によるものであることを考えると、皮質全域を伝搬する特性を持ち、光ファイバーを用いたポイント計測で検出された散乱信号は、現象の一部を捉えたにすぎないと推察された。そこで本章では、同じラット全脳低酸素モデルを対象に、①CCDを用いた拡散反射光イメージングを行い、散乱変化の時空間特性を明らかにするとともに、再酸素化によるラット救済の可否との関係を調べた。次に、イメージングとファイバー型計測それぞれの脳組織バイアビリティーモニタリングにおける有用性を調べるため、②イメージングとファイバー両者による拡散反射光の同時計測を行い、信号変化の比較から、各方法の位置づけを考察した。②のファイバー型拡散反射光計測においては、計測深度と拡散反射光変化の関係を調べるため、異なるファイバー間隔で検討を行った[52]。

3.2 実験方法

第2章と同様、雄 Sprague-Dawley ラット(体重 200~280 g, 日本エスエルシー)に、麻酔薬ペントバルビタールナトリウムを 50 mg/kg の用量にて腹腔内投与し、脳定位固定装置(SR-6R-HT, 株式会社成茂科学器械研究所)を用いて頭部を固定した。頭部剃毛の後、頭皮を正中切開し、頭頂骨を露出させた。露出させた頭頂骨は、乾燥による骨の光散乱特性変化を防ぐため、実験中つねに生理食塩水を低速で流し湿潤を保った。このとき流す生理食塩水の温度はラット体温(約 32°C)と同じになるよう、2.3.2 項に述べた方法により制御した。ラット脳を低酸素にするため、ラットにマスクを装着し、自発呼吸下で吸気を空気から 100%窒素に切り替えることで低酸素負荷を与えた。低酸素負荷中のラットの呼吸循環動態をモニタリングするため、パルスオキシメータ(8600V, Nonin Medical, Inc)を用いて下肢にて動脈血酸素飽和度を計測した。体温は、温度制御されたヒートマットを用いて 32.0 ± 0.5°C に保った。

3.2.1 CCD を用いたラット脳の拡散反射光イメージング

図 3.1a に CCD を用いたラット脳に対する拡散反射光イメージングの実験装置図を示す。ラット大脳皮質からの拡散反射光を経頭蓋骨的に観察するため、光源にハロゲンランプ(HL 100E, HOYA-Schott)を使用し、バンドパスフィルター(800 ± 70 nm)を通過した近赤外光を照明に用いた。照明光は、正反射を避けるため斜めの角度で、ラット頭頂部全域に広く照射された。拡散反射光は 8 ビット CCD(XC-HR57, Sony)を用いて撮像し、キャプチャー

ボード (DOMINO Iota, Euresys Inc.) を用いて 1 frame/s で画像を取得し、コンピュータに保存した。拡散反射光の時空間変化を可視化するため、画像ソフトウェア (Open eVision 1.1., Euresys Inc.) を用いて各時刻の差分画像を作成した。このとき、拡張性脱分極に伴う散乱変化が開始する直前の時刻の画像をベースライン画像とし、各時刻の画像から減算した。またヒストグラム平坦化により差分画像のコントラストを明瞭化した。得られたモノクロ差分画像は、画像解析ソフトウェア (ImageJ, National Institutes of Health) を用いて疑似カラー画像に変換した。

拡散反射光の時空間変化と再酸素化によるラット救済の可否の関係を調べるため、低酸素開始から一定時間後、異なるいくつかの時刻において吸気ガスを 100%窒素から酸素に切り替えた。再酸素化により生存したラットについては、実験日より 2 週間飼育し、体重と動作の異常の有無を記録・観察した。本実験では合計 20 匹のラットを対象とした。このうち 4 匹のラットは低酸素のみ (再酸素化なし) の条件、残りの 16 匹は低酸素後、再酸素化を行う条件とした。再酸素化は、SD による拡散反射光変化が観察される時間帯を三つに分け、①初期 (6 匹)、②中期 (5 匹)、③後期 (5 匹) とした。

3.2.2 イメージングとファイバーによる拡散反射光の同時計測

図 3.1b にラット脳に対する拡散反射光イメージングとファイバー型拡散反射光計測を同時に行う実験装置図を示す。本実験では、ファイバー型拡散反射光計測に波長 730 nm の半導体レーザーを用い、これと干渉しないようイメージングには中心波長が長いバンドパスフィルター (850 ± 70 nm) を使用した。ファイバー型計測用の 730 nm-LD 光の CCD への入射を回避するため、CCD の前にシャープカットフィルター (transmission, >780 nm) を設置した。画像の取得と解析は 3.2.1 項と同様の方法にて行った。

ファイバー型拡散反射光計測を行うため、一対の光ファイバー (コア径 550 μm) を露出したラット右頭頂骨上に、太い血管を避けて設置した。光源に波長 730 nm の半導体レーザー (以下 LD とする) (TCLDM9, THORLABS, Inc.) を使用し、第 2 章の実験と同じマルチチャネル分光器 (PMA-11, 浜松ホトニクス株式会社) を用いて拡散反射光を検出した。730-nm LD の頭部への入射パワーは 2.5 μW とした。計測深度の異なる条件で拡散反射光計測を行うため、ファイバーの中心間隔を 1.0, 2.0, および 3.0 mm に変化させた。各ファイバー条件における計測深度を推定するため、モンテカルロシミュレーションにより拡散反射光の組織内伝搬特性を調べた。本実験では合計 10 匹のラットを対象とし、各ファイバーの中心間隔につき、3 匹 (1.0 mm)、4 匹 (2.0 mm)、および 3 匹 (3.0 mm) とした。

3.2.3 モンテカルロシミュレーション

ファイバー型拡散反射光計測における脳内光伝搬特性につき調べるため、第 2 章と同様 Wang らが開発したコードをもとにモンテカルロシミュレーションを行った[55]。シミュレーションモデルは第 2 章と同様、頭蓋骨と脳組織の二層モデルとし、頭蓋骨と脳組織の厚

みはそれぞれ 0.35 mm, 2.65 mm とした。頭蓋骨と脳組織（皮質）の光学特性値には、文献値を用いた[45,57]。一回のシミュレーションにおける入射光子数は 1,000,000 個とし、入射ファイバー面内の光子分布はガウシアン分布とした。

3.3 実験結果および考察

3.3.1 CCD を用いた拡散反射光イメージング

図 3.2 は、窒素ガス吸入により低酸素負荷を与えたラット脳の典型的な拡散反射光画像の時間変化を示す。これらの画像は、低酸素後の大きな拡散反射光変化の発生前 ($t=115$ s) の画像を各時刻の画像から差分したものである。低酸素開始直後、拡散反射光強度は皮質の全領域において、約 60 s 間増加、減少し、その後一定時間、ほとんど変化しなかった（データ提示なし）。低酸素開始から約 130 s 後、拡散反射光強度は皮質の両側最外側の領域で局所に増加しはじめ（図 3.2b の矢印, $t=140$ s）、その後強度が増加した領域は、約 6 mm/min の速度で正中に向かって拡大・伝搬した（図 3.2b, $t=140$ -240 s）。そして約 240 s 後以降、拡散反射光は皮質の全領域で増加した（図 3.2b, $t=240$ -1030 s）。他の 3 例のラットについて同様の実験を行ったところ、図 3.2b に示す傾向の拡散反射光の時空間変化が全例で再現して見られた。全 4 例について解析した結果、強度が増加した領域は、低酸素開始後 $t=127 \pm 15$ s から $t=223 \pm 15$ s の間に両側頭部から出現し皮質全域に拡がることがわかった。

著者らは先行研究において、同じラット全脳低酸素モデルにおいてファイバー型拡散反射光計測を行い（ファイバーは右頭頂部中央に設置）、拡散反射光の三相性変化が低酸素開始後 128 ± 14 s から 64 ± 10 s の間に見られることを示した[49]。この三相性の拡散反射光変化は、第 2 章で述べたとおり、光散乱変化によるものであることが示された（図 2.6）。同三相性光散乱変化は、これまでに直流電位測定により、大量のイオンの流出入を伴う SD に関係することが示されている（図 1.12）[48]。したがって、図 3.2 に示す拡散反射光強度の時空間変化は、SD の発生・伝搬によるものと推察される。これまでに同様の拡散反射光の波状の変化が、マウス脳虚血モデルを対象にした経頭蓋骨的イメージング（波長 635 nm を使用）により観察されている[60]。図 3.2 に示した結果は、低酸素ないし無酸素条件による脳組織バイアビリティー低下に伴う波状の拡散反射光変化を、ラット脳で経頭蓋骨的に観察した最初の報告といえるだろう。

このような拡散反射光の時空間的な変化と脳組織の可逆・不可逆性の関係を調べるため、ラットを再酸素化する実験を行った。図 3.3 は、低酸素開始後、両側頭部に反射光の増加領域が現れた後 ($t=171$ s) に再酸素化を行ったラットの拡散反射光の差分画像を示している。このラットは再酸素化により生存した。まず低酸素開始から約 140 s 後に、図 3.2 で見られたように、反射光強度が両側頭部最外側の局所で増大し（図 3.3, $t=141$ s）、反射光の増加領域は正中に向かって拡大した ($t=141$ -161 s)。その後、拡大する反射光増加領域の先端が半球の中央付近に達した時刻 ($t=171$ s) で吸気ガスを窒素から酸素に切り替えた。すると再酸素化により、同領域の拡大は止まり、時間とともに反射光増加領域は消失した ($t=181$ -251 s)。

再酸素化から一定時間後、上矢状静脈洞に沿った領域で反射光強度が増加する様子が観察された ($t=271$ s)。これは低酸素後、脳組織でエネルギー需要が増加し、これに応じて脳血流が増加したことによるものと推察される。

本研究では、低酸素開始後、異なる 3 つの時間帯で再酸素化を開始し、各条件におけるラットの生存率を調べた。はじめに、再酸素化を反射光増加領域が出現して間もなく行うと (Fig. 9a)、ラットの生存率は 67% ($n=6$) であった。続いて、再酸素化を反射光増加領域の先端が半球中央付近に到達したタイミングで行うと (Fig. 9b)、ラットの生存率は 80% ($n=5$) であった。最後に、再酸素化を反射光増加領域がさらに拡大し、正中に到達したタイミングで行うと、ラットの生存率は 20% ($n=5$) であった。これらの結果は、反射光増加領域の皮質における占有面積が脳組織の可逆・不可逆性と関係することを示唆している。しかしなぜ再酸素化のタイミングが同じでも生存率が確率的になるのか、理由は不明であり、今後検討が必要である。

3.3.2 イメージングとファイバーによる拡散反射光の同時計測

上述した二つの拡散反射光計測法の脳組織バイアビリティーモニタリング法としての有用性を検証するため、同じラットモデルを対象に両手法による拡散反射光の同時計測を行った。図 3.5 にイメージングにより計測した近赤外拡散反射光 (図 3.5a) とファイバー対を用いて計測した信号 (図 3.5b、ファイバーの中心間隔を 3.0 mm とした) それぞれの典型的な時間変化を示す。イメージングの計測信号は、ファイバーと同じ計測位置に関心領域 (Region of interest: ROI) を設定して評価した。低酸素開始後、イメージングで計測した拡散反射光強度は、10~40 s の間に減少、増加、再び減少し、その後約 100 s 間、ほとんど変化しなかった (図 3.5a)。第 2 章で述べたように、同ラットモデルでは、低酸素開始直後から急速にヘモグロビンの脱酸素化が進むことから、この最初の信号変化は、急激な低酸素負荷に対する血管および細胞の応答に伴う組織の光学特性変化を反映したものと考えられた。続いて低酸素開始から約 150 s 後、反射光強度は急激に増加しはじめ、その後高いレベルに保たれた。時刻約 150 s は、イメージングで観察される反射光増加領域の到達時間に一致したことから、この時刻の急激な信号増加は SD の伝搬をあらわしている。一方、ファイバーで計測した 730 nm の拡散反射光強度は、低酸素開始後約 40 s 間、減少、増加、再び減少し、イメージングの結果と似た傾向を示した。730 nm は脱酸素化ヘモグロビンの吸収が支配的な波長であることから、最初の信号の減少は急速なヘモグロビンの脱酸素化を反映したものと考えられる。続く増加と減少は、イメージングのときと同様、急激な低酸素負荷に対する血管および細胞の応答に伴う組織の光学特性変化を反映したものと推察される。続いて 100~170 s の間、拡散反射光強度の三相性変化 (増加-減少-増加) が観測され、その後信号強度は高いレベルに保たれた。この三相性変化は、第 2 章で述べたように (図 2.6a および 2.6e)、SD に伴う三相性光散乱変化をあらわしている。

これらの結果から、低酸素負荷後の SD による拡散反射光の変化は、イメージングとファ

イバー計測のいずれによっても検出されるが、イメージングで観測される拡散反射光の変化は三相性を示さないことがわかった。この両計測法による信号変化の違いは、計測した全ラットにおいて確認された。その理由には、両計測法の計測深度の違いが関係していると推察された。図 3.6 に示すように、ラットをはじめとする哺乳類の大脳皮質は 6 層構造をなし、各層には特徴的な形態と機能を持つ神経細胞が分布することが知られている。これまでに行ったモンテカルロシミュレーションにおいて、ファイバーの中心間隔 3.0 mm における拡散反射光の組織内伝搬経路は、皮質の深部領域（第 6 層）に到達することが示されている[61]。このことは、計測される信号が皮質全層に存在するニューロン、グリアおよびこれらの細胞小器官、ならびに樹状突起や血管構造に関係することを示している。一方、CCD を用いたイメージングでは、皮質の表層、恐らく第 1 層から第 2-3 層が主たる検出領域となり、計測される信号は主として同領域のニューロン、グリア、および血管構造の変化、ならびに樹状突起や樹状突起棘の影響を大きく受けると推察される。

そこで拡散反射光変化の計測深度依存性を調べるため、ファイバー中心間隔が異なる 3 条件（間隔 1.0 mm, 2.0 mm, および 3.0 mm）について拡散反射光計測を行い、各条件における計測深度をモンテカルロシミュレーションにより調べた。図 3.7 にその結果を示す。まずモンテカルロシミュレーションから、中心間隔 1.0 mm, 2.0 mm, および 3.0 mm における拡散反射光の計測深度は、それぞれ約 0.5 mm, 1.0 mm, および 1.5 mm となり（図 3.7a-c, 左）、これらはそれぞれ大脳皮質の第 1-3 層, 第 1-4 層, および第 1-5 層ないし 6 層に相当する[61]。一方、拡散反射光の時間変化について見ると（図 3.7a-c, 右）、まず中心間隔 1.0 mm の条件では、信号は低酸素開始後約 150 s において単調増加を示し、三相性変化は見られなかった（図 3.7a）。これに対して、中心間隔が 2.0 mm と 3.0 mm の条件では、同時間帯において明瞭な三相性変化が観察された（図 3.7b および 3.7c）。これらの結果は、実験したすべてのラットにおいて再現して見られ、ファイバー型拡散反射光計測により観測される三相性変化は大脳皮質の深部領域に由来し、そのためイメージングでは検出されないものと考えられた。

拡散反射光計測に用いるファイバー条件、特に中心間隔は、拡散反射光の光吸収と光散乱に対する検出感度にも影響を及ぼしうる[62]。そこで上述した各ファイバー間隔における拡散反射光強度と吸収係数変化または等価散乱係数変化との関係につきモンテカルロシミュレーションを用いて調べた。ここで用いる光学定数は、第 2 章で得られたラット脳の推定値（図 2.6）を考慮した。拡散反射光強度の等価散乱係数依存性を調べるシミュレーションでは、吸収係数を $\mu_a = 0.3 \text{ cm}^{-1}$ で一定とし、等価散乱係数を 5, 10, および 15 cm^{-1} の 3 条件に変化させた。拡散反射光強度の吸収係数依存性を調べるシミュレーションでは、等価散乱係数を $\mu_s' = 16 \text{ cm}^{-1}$ で一定とし、吸収係数を 0.1, 0.2, および 0.3 cm^{-1} に変化させた。結果を図 3.8 に示す。ファイバー間隔 1.0 mm のとき（図 3.8a, 3.8d）、拡散反射光は光散乱変化に対して大きく変化しているのに対して、光吸収変化に対しては変化が小さいことがわかる。これに対して中心間隔 2.0 mm（図 3.8b, 3.8e）と 3.0 mm（図 3.8c, 3.8f）では、等価

散乱係数の変化に対する拡散反射光の変化は比較的小さく、吸収係数の変化に対して拡散反射光の変化は比較的大きい。これらの結果は、ファイバー間隔が小さく光路長が比較的短い条件においては、拡散反射光は散乱変化に対して感度が高く、吸収変化に対して感度が低いのに対し、ファイバー間隔が大きく光路長が比較的長い条件においては、散乱変化に対して感度が低下し、吸収変化に対して感度が増すことを示している。図 3.7 において、低酸素開始直後のヘモグロビンの脱酸素化による拡散反射光強度の減少率が、ファイバー間隔 3.0 mm の条件で最も大きいのは (図 3.7c)、中心間隔が大きいと吸収変化に対する感度が高くなる上述のシミュレーション結果と一致するものといえる。また今回イメージングに関するシミュレーションは行っていないが、計測深度の相似性から考えると、イメージングではファイバー中心間隔 1.0 mm のときと同様の吸収・散乱に対する感度特性となると推察される。したがって CCD を用いたイメージングで計測した拡散反射光の変化は、主として散乱変化によるものと考えられる。

興味深いことに、図 3.5 においてファイバーで計測した拡散反射光の三相性変化の開始時間は、イメージングで計測した拡散反射光の単調増加のタイミングに比べて早い。全ラットで比較すると、ファイバーで検出される三相性変化の開始は 142 ± 37 s であるのに対し、イメージングで検出される変化の開始は 175 ± 25 s であり、その差は 33 ± 12 s であった。これらの結果は、ファイバーで検出される三相性の拡散反射光変化 (光散乱変化) が、低酸素負荷による脳組織のバイアビリティー低下をより早期に捉えることを示している。

3.4 まとめ

本章では、拡散反射光計測の脳組織バイアビリティーモニタリング法としての有用性をより詳細に検証するため、ラット全脳低酸素モデルを対象に 2 つの検討を行った。まずバイアビリティー低下に伴う拡散反射光の時空間変化につき調べるため、CCD を用いて経頭蓋骨的近赤外拡散反射光イメージングを行った。低酸素開始から数分後、両側頭部の最外側局所に、反射光強度の増加した領域が出現し、その領域は約 6 mm/min の速度で正中に向かって拡大した。同領域は SD によるものと考えられ、その領域の拡大率は再酸素化によるラットの生存率と関係した。次に、イメージングとファイバー計測両者の有用性を調べるため、同じ低酸素モデルを対象に、両者の同時計測を行い信号変化を比較した。その結果、脳組織バイアビリティーの低下を示す拡散反射光の変化は、イメージングでは三相性変化とならず、三相性変化はファイバー計測においてのみ見られる現象であること、またそのファイバーで計測される変化は、イメージングにより捉える変化より早期に現れることがわかった。両者の信号変化の違いは、計測深度の違いによるものと推察され、ラット大脳皮質の深さ依存的な解剖学的特性に関係していると推察された。以上より、拡散反射光の時空間変化を捉えるイメージングと、より早期の変化を検出可能なファイバー計測それぞれに利点があり、両者を組み合わせることで信頼性の高い脳組織バイアビリティーモニタリングが可能になると考えられた。次章では、より実際の病態に近いラット局所脳虚血モ

デル（虚血性脳梗塞モデル）を対象に，梗塞領域（不可逆的壊死領域）と梗塞周辺領域で発生する SD の発生を同時に可視化できないか検討を行った。

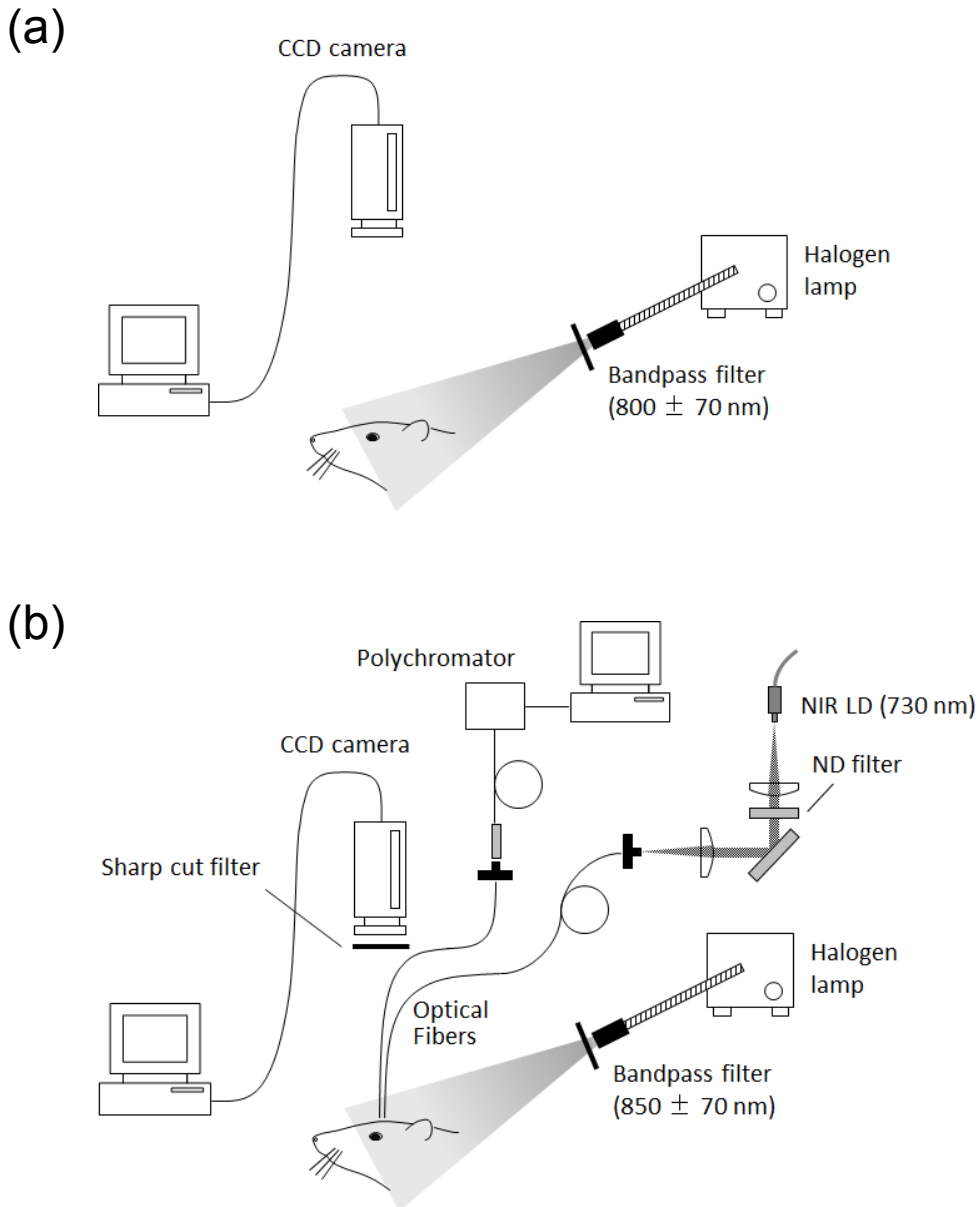


図3.1 ラット脳に対する(a) CCDを用いた拡散反射光イメージングと(b) イメージングとファイバーによる拡散反射光の同時計測の実験装置図[52].
 Satoko Kawauchi, Izumi Nishidate, Yoichi Uozumi, Hiroshi Nawashiro, Hiroshi Ashida, Shunichi Sato, "Diffuse light reflectance signals as potential indicators of loss of viability in brain tissue due to hypoxia: charge-coupled-device-based imaging and fiber-based measurement," *J. Biomed. Opt.* 18(1), 15003 (2013). doi: 10.1117/1.JBO.18.1.015003.

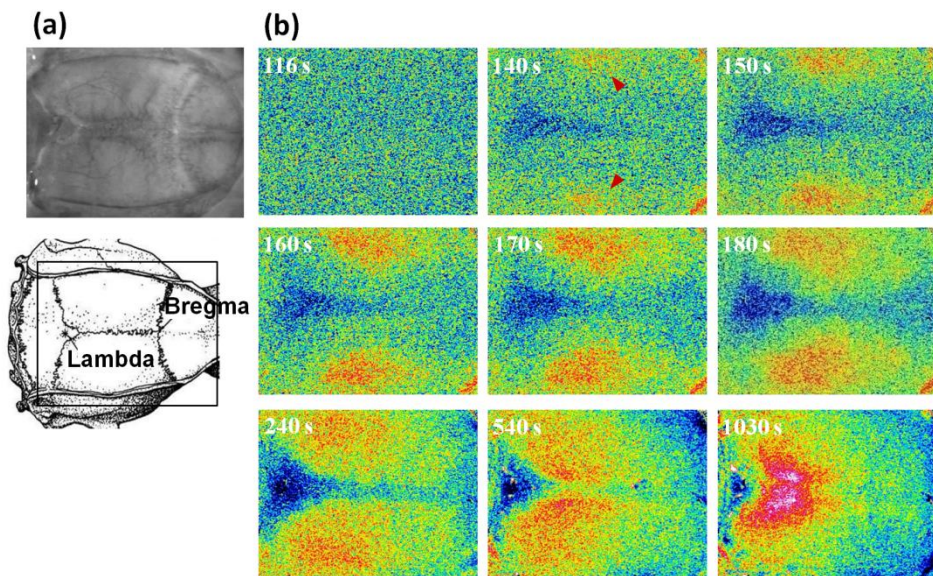


図3.2 ラット全脳低酸素モデルを用いた近赤外拡散反射光イメージング結果(再酸素化なし)[52]。

Satoko Kawauchi, Izumi Nishidate, Yoichi Uozumi, Hiroshi Nawashiro, Hiroshi Ashida, Shunichi Sato, "Diffuse light reflectance signals as potential indicators of loss of viability in brain tissue due to hypoxia: charge-coupled-device-based imaging and fiber-based measurement," *J. Biomed. Opt.* 18(1), 15003 (2013). doi: 10.1117/1.JBO.18.1.015003.

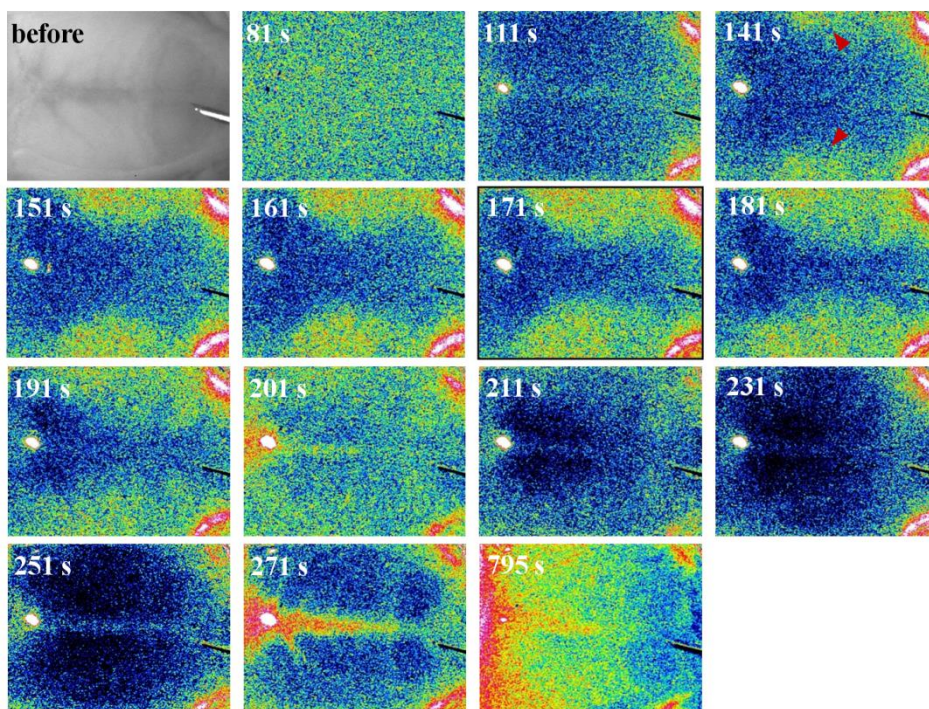


図3.3 ラット全脳低酸素モデルを用いた近赤外拡散反射光イメージング結果(再酸素化あり)[52]。

Satoko Kawauchi, Izumi Nishidate, Yoichi Uozumi, Hiroshi Nawashiro, Hiroshi Ashida, Shunichi Sato, "Diffuse light reflectance signals as potential indicators of loss of viability in brain tissue due to hypoxia: charge-coupled-device-based imaging and fiber-based measurement," *J. Biomed. Opt.* 18(1), 15003 (2013). doi: 10.1117/1.JBO.18.1.015003.

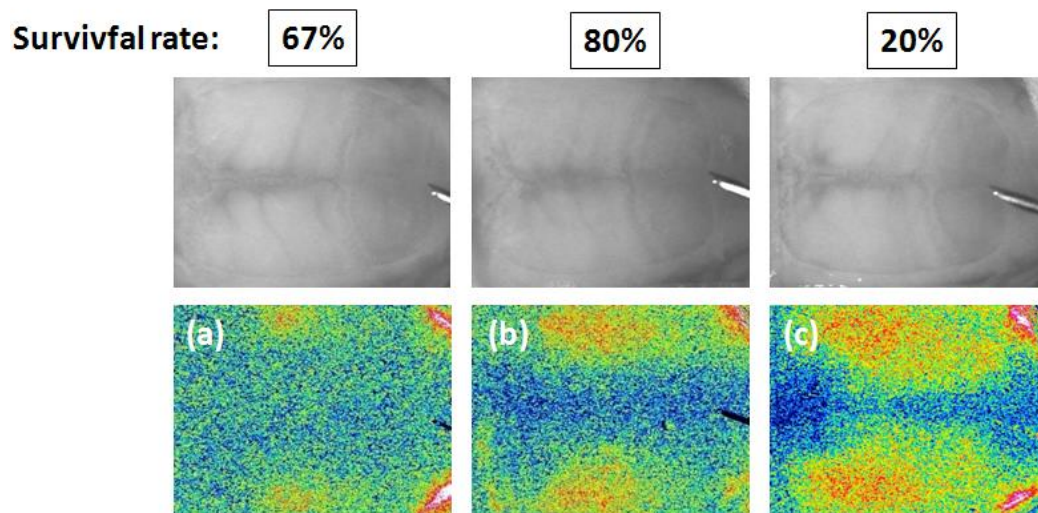


図3.4 ラット全脳低酸素モデルを用いた近赤外拡散反射光イメージング結果(散乱増加面積と生存率の関係)[52]。

Satoko Kawauchi, Izumi Nishidate, Yoichi Uozumi, Hiroshi Nawashiro, Hiroshi Ashida, Shunichi Sato, "Diffuse light reflectance signals as potential indicators of loss of viability in brain tissue due to hypoxia: charge-coupled-device-based imaging and fiber-based measurement," J. Biomed. Opt. 18(1), 15003 (2013). doi: 10.1117/1.JBO.18.1.015003.

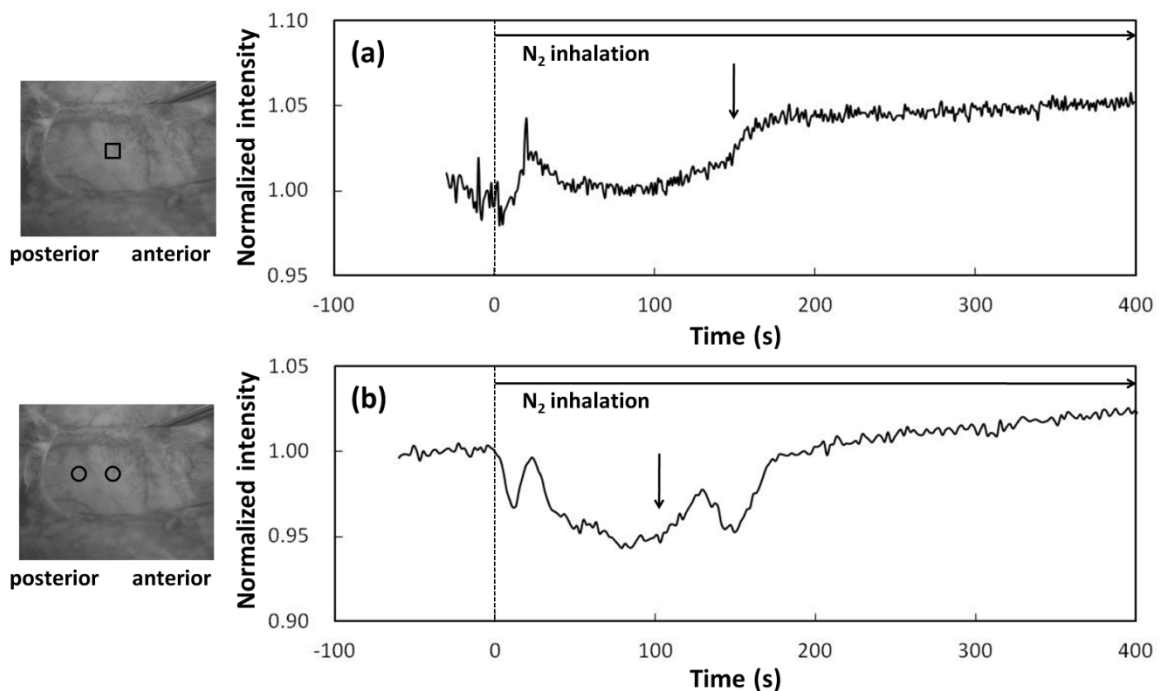


図3.5 ラット全脳低酸素モデルを用いた近赤外拡散反射光計測結果:イメージング(上)とファイバー計測(下)の比較[52]。矢印はSDIによる信号変化の開始を示す。Satoko Kawauchi, Izumi Nishidate, Yoichi Uozumi, Hiroshi Nawashiro, Hiroshi Ashida, Shunichi Sato, "Diffuse light reflectance signals as potential indicators of loss of viability in brain tissue due to hypoxia: charge-coupled-device-based imaging and fiber-based measurement," *J. Biomed. Opt.* 18(1), 15003 (2013). doi: 10.1117/1.JBO.18.1.015003.

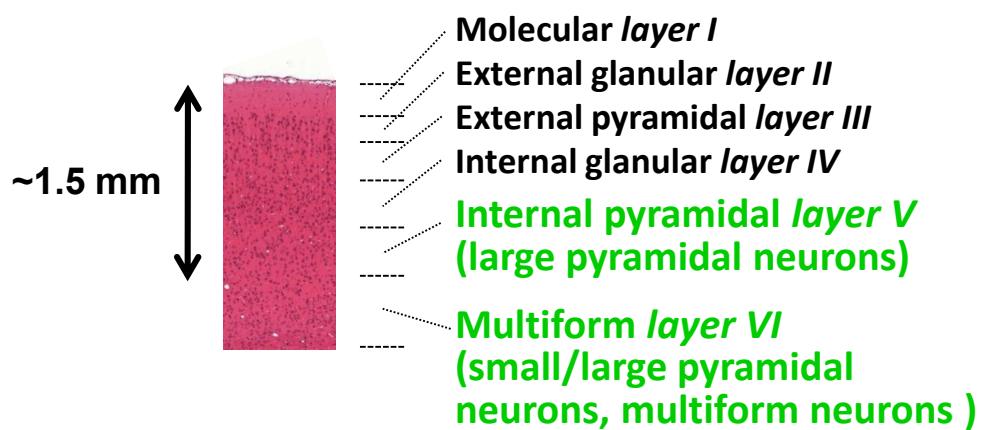


図3.6 ラット大脳皮質の層構造 [61]。

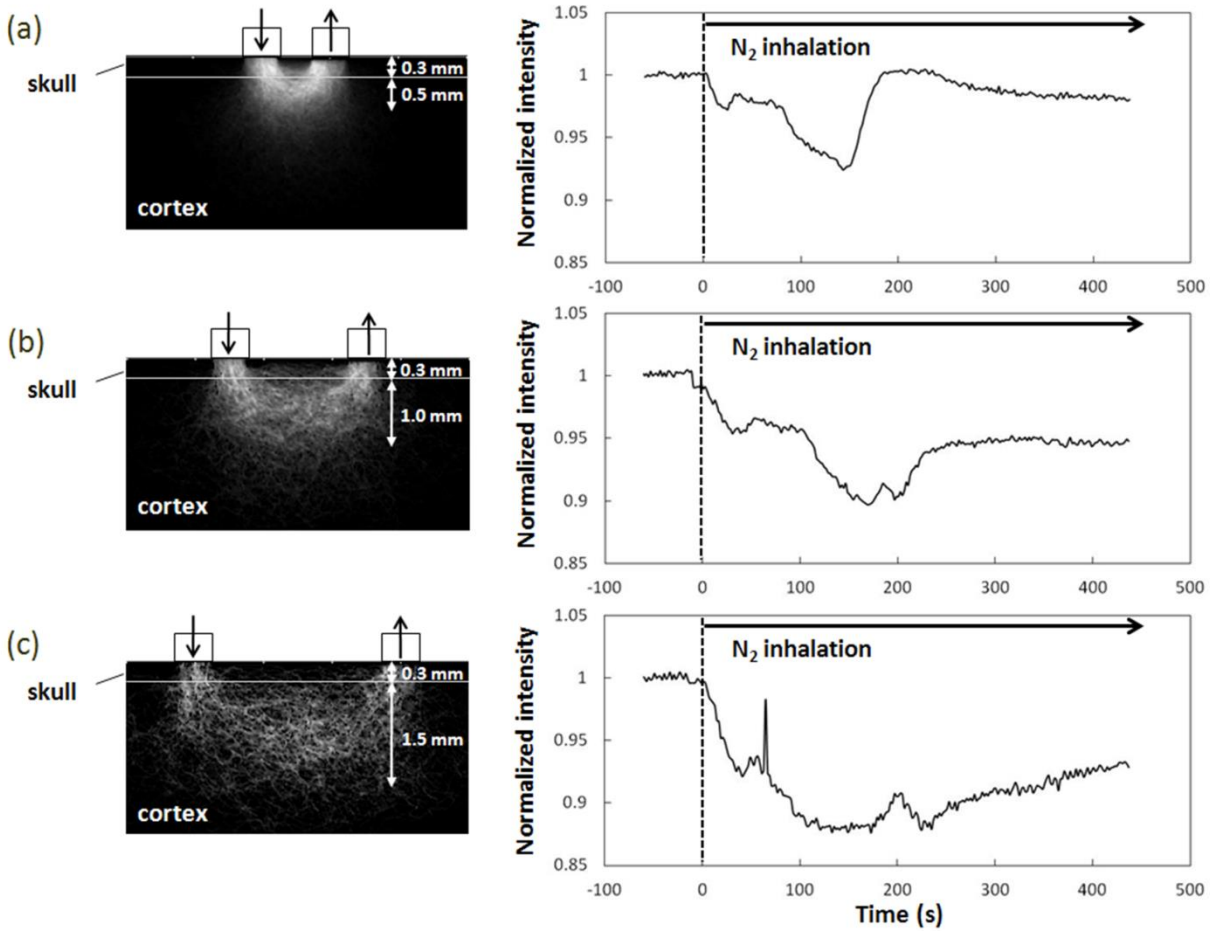


図3.7 ファイバー間隔の違いによる計測深度と低酸素後の信号変化の違い。
(a) 1.0 mm, (b) 2.0 mm, (c) 3.0 mm[52]。

Satoko Kawauchi, Izumi Nishidate, Yoichi Uozumi, Hiroshi Nawashiro, Hiroshi Ashida, Shunichi Sato, "Diffuse light reflectance signals as potential indicators of loss of viability in brain tissue due to hypoxia: charge-coupled-device-based imaging and fiber-based measurement," *J. Biomed. Opt.* 18(1), 15003 (2013). doi: 10.1117/1.JBO.18.1.015003.

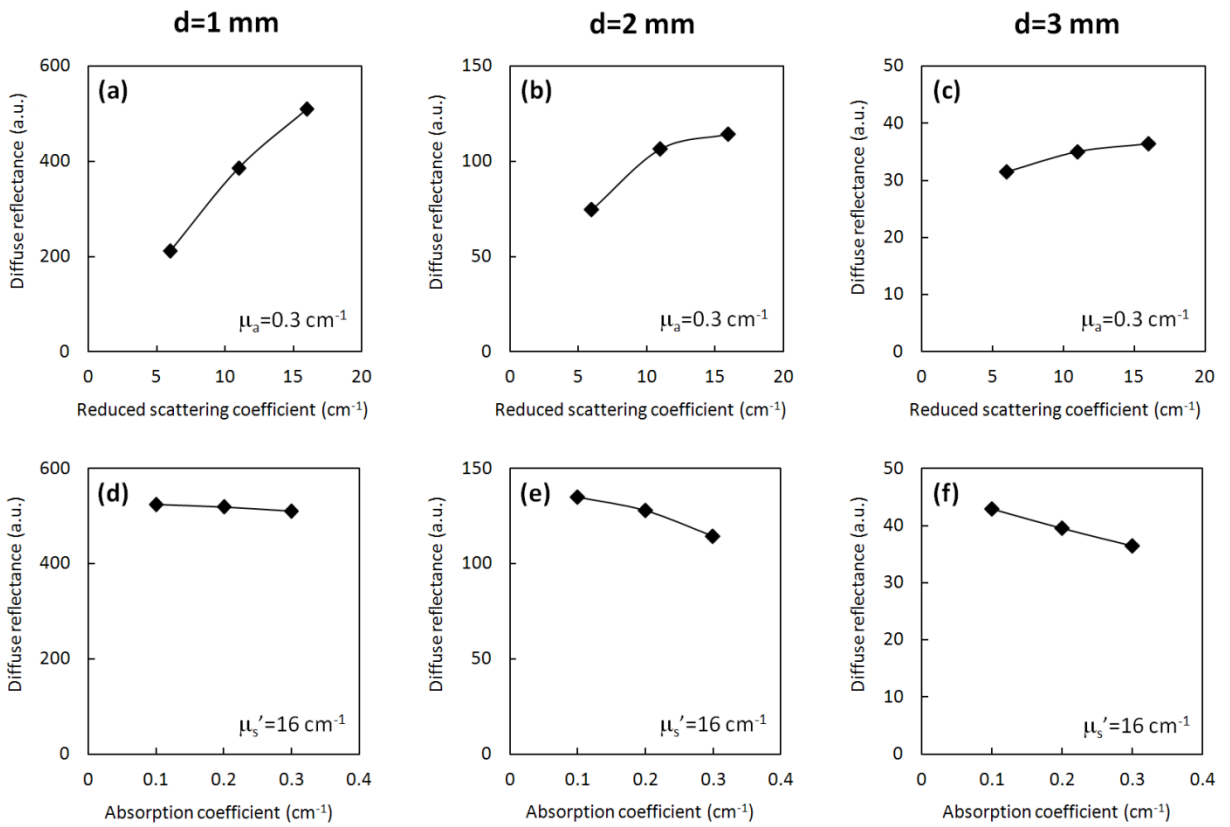


図3.8 異なるファイバー間隔(d)における吸収係数変化または等価散乱係数変化に対する拡散反射光変化の関係 [52]。

Satoko Kawauchi, Izumi Nishidate, Yoichi Uozumi, Hiroshi Nawashiro, Hiroshi Ashida, Shunichi Sato, "Diffuse light reflectance signals as potential indicators of loss of viability in brain tissue due to hypoxia: charge-coupled-device-based imaging and fiber-based measurement," *J. Biomed. Opt.* 18(1), 15003 (2013). doi: 10.1117/1.JBO.18.1.015003.

第4章

ラット局所脳局血モデルに対する脳血流と
近赤外拡散反射光のイメージング

4.1 はじめに

第1章(1.2.3項)で述べたように、虚血性脳梗塞の病態は時空間的に複雑に変化することが知られている。脳血管の狭窄や閉塞により脳虚血が起きると、重度の血流低下により虚血中心部は梗塞(不可逆的壊死領域)に進展し、その周りには、血流減少により細胞の電氣的活動は停止しているが、まだ膜構造は保たれており血流が再開すれば回復可能なペナンプラと呼ばれる領域が存在する[19,26,27]。虚血性脳梗塞では、この領域を救済することが最重要とされるが[27]、ペナンプラでは拡張性脱分極(SD)が繰り返し発生することが知られ[63-65]、これが組織にエネルギー負荷を与え梗塞拡大の一因になっていると考えられている[28-30]。SDは大量のイオンの流出入を伴う現象であるため、イオンのより戻しにエネルギーを消費する[5,19]。またSDは脳血流変化を伴い、その性質はSDが発生・通過する組織のエネルギーレベルにより異なることが知られ、一般に正常組織では、一過性の血流増大が見られるが、虚血負荷に曝された組織では血流減少に転じ、これが組織の帰結に影響を与えることが報告されている[4,5,66]。しかしSDの発生が梗塞を進展させる機序の全容はいまだ解明されておらず、虚血性脳梗塞の病態解明において、SDの発生、脳血流の変化、および梗塞の進展を同時に非侵襲リアルタイムでモニタリングする技術の確立が重要といえる。

前章までに、組織の光散乱特性変化を感度良く検出する近赤外拡散反射光は、SDの発生・伝搬と組織の不可逆的变化を可視化するのに有用であることを示した。本章では、ラット局所脳虚血モデルを対象に、経頭蓋骨的近赤外拡散反射光イメージングとレーザースペクトル脳血流イメージングを同時に行い、近赤外拡散反射光(光散乱信号)の変化、脳血流の変化、および梗塞の形成がどのような関係にあるか調べ、同イメージング法の脳虚血の病態観察における有用性につき考察した[67]。

4.2 実験方法

4.2.1 ラット局所脳虚血モデルの作製

雄 Sprague-Dawley ラット(体重 320–380 g, 日本エスエルシー)に、麻酔薬ペントバルビタールナトリウムを腹腔内投与し(50 mg/kg 初回ボラス投与, 15 mg/kg/h にて維持)、脳定位固定装置(SG-6N, 株式会社成茂科学器械研究所)を用いて頭部を固定した。頭部剃毛の後、頭皮を正中切開し、左頭頂骨を露出させた。図 4.1a に左中大脳動脈と頭蓋骨の開窓位置の模式図を示す。中大脳動脈(middle cerebral artery: MCA)を露出させるため、左頭頂上側頭部から筋肉を除去し、歯科用ドリルを用いて MCA 遠位部付近の骨を約 3 mm×約 4 mm の大きさに開窓した。これら外科処置および後述するイメージングの準備完了後、手術顕微鏡下で電気メスを用いて MCA(末梢二箇所)を凝固切開し血流を遮断した。実験中、温度制御されたヒートマットを用いて体温を $32.0 \pm 0.5^\circ\text{C}$ に維持し、下肢に装着したパルスオキシメータ(8600V, Nonin Medical, Inc)により動脈血酸素飽和度をモニタリングした。露出させた頭頂骨は、乾燥による骨の光散乱特性変化を防ぐため、実験中つねに生理食塩水

を低速で流し湿潤を保った。本実験に使用したラットの数は、拡散反射光と脳血流の同時イメージングに 5 例 (Rat No. 1-5), 細胞外直流電位の計測に 4 例 (Rat No. 6-9) であり, 出血が発生または虚血ができなかった 4 例は除外した。

4.2.2 近赤外拡散反射光と脳血流の同時イメージング

図 4.2b に近赤外拡散反射光と脳血流の同時イメージングの実験装置図を示す。脳血流画像は、レーザースペckル血流画像装置 (OZ-2, オメガウェーブ) を用いた取得した。開窓部を含む左半球全体を同装置の半導体レーザー光 (波長 780 nm) で照明し, 脳組織の血流を頭蓋骨と開窓部を通して CCD (10 bit, 639 x 480 pixels, 1/60 s/frame) で観察した。血流画像と同一視野の拡散反射光画像を取得するため, 同じ CCD を用いて拡散反射光イメージングを行った。光源にハロゲンランプ (HL 100E, HOYA-Schott) を用い, バンドパスフィルター (800 ± 40 nm) を透過させた光をラット頭部に斜めより照射し, 脳組織からの拡散反射光を頭蓋骨と開窓部を通して CCD で検出した。両画像を連続取得するため, 両光源の前にメカニカルシャッター (SSH-R, シグマ光機) を設置し, シャッターコントローラ (SSH-C4B, シグマ光機) を用いて照明を交互に切り替え, ソフトウェア (LSI+LRI+S V314, オメガウェーブ) を用いてシャッターに同期させて画像を取得した。これにより各画像を ~1 frame/s で記録した。ベースライン画像を 5 min 間取得した後, 上述した方法により MCA を閉塞し (3~5 min), 90 min 間イメージングを行った。照明に用いた近赤外光は, 頭蓋骨の透過性が高く, また計測中頭蓋骨における近赤外光透過性と脳血流の変化は限定的であることから, 観察された拡散反射光変化は脳組織に由来するものとみなせる。本実験で使用したラットの頭蓋骨の厚みは 0.5~1.0 mm であり, 頭蓋骨越しに観察した脳表血管径から, 経頭蓋骨的に取得した脳血流画像および拡散反射光画像の空間分解能はおおよそ 0.5 mm と見積もられた。MCA 閉塞後の各時刻の画像変化を調べるため, 差分画像を解析ソフトウェア (RIA-V102, LIA-V321, オメガウェーブ) を用いて作成した。血流減少率の算出には, 画像ソフトウェア (Makali`I Ver. 2.1, 国立天文台) を用いた。

4.2.3 細胞外直流電位の計測

SD の発生を確認するため, 上述した拡散反射光イメージングと同時に細胞外直流電位の計測を行った。左頭頂骨の前頭部に手術顕微鏡下で直径約 2 mm の穴を開け, 自作した Ag-AgCl 電極を脳表に接触させた。このとき接触抵抗を下げるため, 電極先端に少量の導電ペーストを塗布した。参照電極 (Ag-AgCl 電極, RC5, World Precision Instruments) を背部皮下に留置し, 両電極間の電位を直流増幅器 (DAM-50, World Precision Instruments) と A/D 変換器 (Model ML825, ADInstruments) を介して記録した。

4.2.4 梗塞領域の評価

梗塞領域を TTC (2,3,5-triphenyltetrazolium chloride) 染色により評価した。本方法は一般的な梗塞評価法であり、ミトコンドリアの活性を指標としている。正常組織では、ミトコンドリアは TTC を脂溶性物質ホルマザンに還元し、組織を赤色に染めるが、梗塞領域は染色されず白く残る。イメージング終了から 24 時間後、ペントバルビタール深麻酔下にラット脳を速やかに取り出し、生理食塩水で洗浄した後、2%TTC (Sigma-Aldrich Japan) 溶液に浸漬し、遮光下にて 37°C で 30 min 静置した。溶液から脳を取り出し、梗塞領域を観察した。

4.2.5 統計解析

結果は平均値±標準偏差 (SD) であらわす。SD の発生回数と拡散反射光強度の増加領域との相関は、ピアソンの相関係数検定により調べた。梗塞または非梗塞になった領域における MCA 閉塞後の拡散反射光強度の変化はウェルチの t 検定によって解析した。梗塞または非梗塞領域における SD に対する 4 つの異なる血流反応の発生率の違いは、2 元配置分散分析法と事後検定を用いて解析した。これらの方法は、データの正規性および等分散性の検定に基づき選定された。統計解析は GraphPad Prism ソフトウェア (Prism 6 for Windows, GraphPad software, Inc.) を用いて行った (正規性の検定を除く)。正規性の検定にはエクセル統計 2012 (Social Survey Research Information Co., Ltd.) を用いた。p<0.05 を統計学的有意とみなした。

4.3 実験結果

4.3.1 近赤外拡散反射光の時空間変化

図 4.2 にラット MCA 閉塞モデルを対象に行った拡散反射光と脳血流の同時イメージングの結果の一例を示す (Rat No. 5)。図 4.2a は、近赤外拡散反射光の MCA 閉塞前の元画像、図 4.2b は、これと同じ視野の MCA 閉塞直後の脳血流画像を MCA 閉塞前の画像で除算した画像で、血流減少率 50%以上の領域 (虚血中心部) を黒色で示している。図 4.2c と 4.2d は、同じ視野の MCA 閉塞後の異なる時刻の近赤外拡散反射光画像の変化を示す。画像は、MCA 閉塞後 1.5-3 min (図 4.2c) および 14-16 min および 31 min (図 4.2d) の画像から MCA 閉塞直後の画像を減算した差分画像を示す。MCA を閉塞すると、直後から虚血中心部の辺縁部局所において拡散反射光の変化の波が発生し、虚血中心部の周囲を伝搬し、左大脳皮質全域に広がった。このような拡散反射光変化の波は繰り返し発生し、波の発生地点でははじめ反射光強度は増加し、その領域を先頭に反射光強度が減少した領域が続いた。波状の散乱光変化は、虚血中心部のまわりを放射状または旋回性に伝搬し、複数の波の伝搬が時間的に重なることもあった。同ラットでは、時間的に重複あるいは連続した複数の波の発生が合計 5 回、単独の波の発生が合計 3 回観察され、MAC 閉塞後 90 分間で合計 17 の波の発生・伝搬が観察された。図 4.2c と 4.2d はそれぞれ 1 回目と 5 回目の連続した波の発生の一部を示している。このような反射光変化の波の発生回数の増加とともに、虚血中心部周囲

の散乱光強度は増加し（図 4.2c, d），虚血中心部の反射光強度も時間経過とともに増加した（図 4.2d, t = 31 min 10 s）。

虚血中心部の周りを伝搬する拡散反射光変化の波は，SD の発生と伝搬を表していると考えられることから，別のラットを対象に拡散反射光イメージングと細胞外直流電位の計測を同時に行った（Rat No. 7）。図 4.3 に結果を示す。MCA 閉塞後，脱分極（SD）の発生を示す電位の陰性シフトが繰り返し発生する様子が観察された。電位のシフトは，反射光変化の波の通過に対応するスパイク状変化（急峻な反射光の増加）に一致した。電位の陰性シフト（脱分極）は約 1 min 間継続し，その後電位は増加し回復した（再分極）。再分極には約 1～4 min かかり，その間反射光強度は減少し，その後回復した（図 4.3）。本研究では，全 5 匹のラットにおいて SD の発生回数は 4 回～17 回であった。SD の平均伝搬速度は約 3.0 mm/min であり，SD に関する他の文献値と一致した[25]。

4.3.2 近赤外拡散反射光の増加領域と SD 発生回数の関係

図 4.4a 上段は，MCA 閉塞後の一連のあるいは単独の SD 発生後の近赤外拡散反射光の変化を示している（図 4.2 と同じ Rat No. 5）。各画像は，MCA 閉塞後の各時刻の拡散反射光画像から MCA 閉塞直後の画像を減算した差分画像である。図 4.4a 下段は，脳血流の除算画像（MCA 閉塞後の画像を閉塞前の画像で除算）で，血流減少率 50%以上の領域を黒色で示している。同図の SD の番号（SDs または SD #1, 2, 3, …）と対応する個々の SD の数を図 4.4b に示す。MCA 閉塞後，拡散反射光は虚血中心部周囲において増加し，その領域は SD の発生回数の増加とともに拡大する傾向を示した。このような拡散反射光の変化は，主として脳血流が軽度～中程度に減少した領域（残存血流量 50%-90%に相当）に見られた。虚血中心部の反射光強度も時間とともに増加し，MCA 閉塞後 90 min に反射光強度が増加した領域（MCA 閉塞後 2%-5%増加）は，24 h 後に梗塞になることが示された（図 4.4c）。このような反射光の増加領域を定量的に評価するため，図 4.4a 上段の画像を二値化した（図 4.4a 中段）。このとき評価領域の反射光の変化の最大値の 10%を閾値として用いた。図 4.5 は，二値化画像の高輝度ピクセル数と SD の発生回数の関係を全 5 例のラットについて調べた結果を示す。SD の総発生回数は 4～17 回とばらついたが，反射光の増加面積はすべてのラットにおいて，SD の発生回数の増加に伴い対数的に増大した。同面積と SD の発生回数の間には相関が見られ（図 4.5b），ピアソンの相関係数は 0.7686 であった。

4.3.3 近赤外拡散反射光の増加信号の再現性とばらつき

図 4.6a は，全 5 例のラットの MCA 閉塞後 90 min における拡散反射光の差分画像（MCA 閉塞直後との差分）と血流除算画像（MCA 閉塞前の画像で除算，黒い領域が血流減少領域を表す）を示す。各画像中の実線曲線は TTC 染色により評価した梗塞領域を示す。反射光強度が顕著に増大領域は，すべてのラットにおいて梗塞になった領域の内部に位置した。またその領域は，主として閉塞した MCA の近傍に見られ，虚血中心部とその周辺領域の両

方に拡がって分布した。加えて同領域は、梗塞領域の前頭部側に位置する傾向が見られ、血流減少の程度とは必ずしも一致しないことがわかった。本実験では複数のラット (Rat No. 1 と No. 2) で、非梗塞領域でも反射光強度が増加する傾向が見られたことから、全 5 例のラットについて梗塞領域と非梗塞領域の反射光強度が増加した領域に ROI を設定し (合計 156 の ROI)、反射光強度の増加率を比較した。その結果、梗塞領域における反射光強度の増加率は、非梗塞領域に比べて有意に高いことが示され (図 4.6b)、反射光強度の有意な増大が梗塞と関係することが示唆された。

4.3.4 SD に対する脳血流反応とその反射光変化と梗塞領域との関係

上述したように、SD の発生は一過性の脳血流変化を伴い、その性質は SD が発生・通過する組織のエネルギーレベルにより異なり、組織の帰結を関係することが知られる[4,5]。そこで全 5 例のラットの虚血中心部、周辺部および正常領域に複数の ROI を設定し、反射光強度変化と血流変化を解析した。図 4.7a は、各領域の典型的な信号変化を示す。ROI 1 (a1, b1), ROI 2 (a2, b2), および ROI 3 (a3, b3) は梗塞領域に位置し、それぞれ MCA 閉塞直後の血流減少率が約 40%, 60%, および 80%の領域に相当する。ROI 4 (a4, b4) は正常領域に設定された。MCA 閉塞後、拡散反射光強度はすべての領域で、ベースラインの緩やかな増加と、これに SD の通過を示すスパイク状変化が重畳した変化を示した。SD に伴う反射光のスパイク状変化は、ほぼすべてのケースで三相性 (増加-減少-回復) となり、その振幅は非梗塞領域よりも梗塞領域の方が小さく、また梗塞領域では血流減少率が大きいほど小さかった。この傾向は全 5 例のラットについて同様に見られた (図 4.7b, 図 4.6a と同じ合計 156 の ROI について解析)。

一方、血流変化は反射光の変化よりも複雑であった。図 4.7c は、今回観測された SD に対する 4 つの血流反応パターンを、対応する拡散反射光のスパイク状変化とともに示す。血流反応パターンは、i) 血流増加 (Hyperemia), ii) 一過性の血流減少に続く血流増加 (Inverse/Hyperemia), iii) 血流減少 (Inverse), iv) 血流変化なし (No flow) の 4 種類であった。i) 血流増加パターンは、反射光強度の変化から、脱分極に続く再分極に一致して見られたのに対して、iii) 血流減少パターンは、反射光強度の増加すなわち脱分極と同期して観察された。各パターンの発生確率について梗塞領域と非梗塞領域で比較したところ (図 4.7d)、非梗塞領域では、i) 血流増加の発生確率が $65\% \pm 17\%$ となり、他のすべてのパターンの発生確率より有意に高かった。一方、梗塞領域では各パターンの発生確率は、i) 血流増加が $30\% \pm 12\%$, ii) 一過性の血流減少に続く血流増加が $21\% \pm 13\%$, iii) 血流減少が $34\% \pm 20\%$, iv) 血流変化なしが $15\% \pm 9\%$ となり、各パターン間に有意差は見られなかった。これらの結果は、虚血後 90 min の間の血流反応パターンが、一般的に正常領域で見られる i) 血流増加であっても、梗塞になりうることを示している。

図 4.7e は、全 5 例のラットそれぞれにおける血流反応パターンの空間分布を示す。同一の ROI でも時間経過に伴い反応パターンが変化したことから、ある ROI において 50%以上

を占めたパターンをその ROI における血流反応パターンとして表示した。その結果、梗塞領域ではすべてのラットにおいて iii) 血流減少と iv) 血流変化なしのパターンが、閉塞した MCA の下流に局在して見られることがわかった。一方、i) 血流増加と ii) 一過性の血流減少に続く血流増加のレスポンスは、主として閉塞した MCA の上流または前頭部側の側方に見られた。

4.4 考察

4.4.1 観察結果のまとめ

虚血性脳梗塞の病態生理を理解するために、動物モデルを対象とした光学イメージングが近年盛んに行われている[60,68-72]。しかし組織の細胞・細胞小器官の形態変化を感度良く反映する近赤外拡散反射光（主として光散乱信号）の時空間変化に焦点をあてた研究はほとんどない。本研究では、ラット局所脳虚血モデルを対象に、経頭蓋骨の近赤外拡散反射光イメージングを行い、MCA 閉塞後の反射光の変化が、繰り返し発生する SD の伝搬を明瞭に示すこと、虚血中心部周囲の反射光強度は、SD の発生回数の増加に伴い増大することを示した。虚血中心部の反射光強度もまた時間とともに増加し、虚血中心部と周辺領域の反射光増加領域は、24 時間後に梗塞になることが示された。さらに反射光強度が増加しかつ梗塞になった領域は、SD に対する悪性の血流反応パターン（減少あるいは変化なし）と関係する一方、SD に対する血流反応が良性（増加あるいは減少後増加）であっても、最終的に梗塞になる領域があることがわかった。これらの結果は、近赤外拡散反射光が、脳血流画像では捉えられない虚血後早期の組織損傷の進展を検出しうることを示唆している。

4.4.2 虚血中心部と周辺部における近赤外反射光のベースライン変化の解釈

上述したように虚血中心部では、MCA 閉塞後 90 分間、局所脳血流量（rCBF）の変化はほとんどなかったのに対し、近赤外反射光強度は時間とともに増加した。Heiss と Rosner は、rCBF が梗塞発生の閾値以下に低下しても、脳組織が梗塞になるには、一定時間 rCBF の低下が持続する必要があると報告した[73]。彼らは微小電極を用いてネコ MCA 閉塞モデルの神経細胞活性を記録し、rCBF が閾値を下回ったとき、細胞が壊死に至るのに 30 分～3 時間要することを示した。Memezawa らは、ラット MCA 閉塞モデルを用いて、病理組織学的分析に基づき同様の結果を報告した[74]。一方著者らは先行研究において、ラット全脳虚血モデル（虚血中心部のモデルとみなせる）における脳組織バイアビリティーの低下が、光散乱の増加ならびに樹状突起およびミトコンドリアの形態変化と関連することを観察した[47]。以上のことから、虚血中心部で観察された反射光強度の増加は、梗塞に向かう細胞の形態学的変化によるものと推察される。

一方、虚血中心部周辺領域（ペナンブラ）では、反射光強度の増加した領域が、SD の発生回数の増加とともに増大した。ペナンブラで繰り返し発生する SD は、長らく梗塞を拡大

させる原因として考えられている[28-30,75]。SD は、崩れたイオンバランスを回復するのにエネルギーを消費するため、SD が繰り返し起きるとエネルギー危機的なペナンプラの状態は悪化する。Higuchi らは、ラット MCA 閉塞モデルを対象に、細胞外直流電位の計測とミトコンドリアのエネルギー代謝に関わる蛍光イメージングを行い、組織学的評価結果と比較した[76]。そして繰り返し起きる SD は、神経損傷の重症度を増すが、ターミナル（終末）脱分極が起こらなければ組織は梗塞に至らないことを示した。同様に Takeda らは、ラット MCA モデルの脳組織から抽出した ATP やグルコースのエネルギー代謝産物について調べ、繰り返し発生する SD は必ずしもエネルギーの枯渇を起こさず、持続的な（ターミナルな）血流減少と関係するような散発的な SD が梗塞に寄与すると結論づけた[77]。このような虚血後超急性期にペナンプラで起きる神経損傷は、樹状突起や樹状突起棘の形態変化と関連することが示されている。Murphy らは、二光子励起蛍光顕微鏡を用いて全脳虚血にしたマウス大脳皮質の *in vivo* イメージングを行い、SD の通過に伴い樹状突起棘の構造が消失する様子を観察した[60]。また同モデルについて赤色光を用いた拡散反射光イメージングを行い、樹状突起の形態変化は光散乱の増加を伴うこと、またその形態変化は再灌流により回復することを示した。Risher らは、マウス脳梗塞モデルを対象に二光子励起蛍光顕微鏡観察を行い、樹状突起の形態が可逆的な数珠状変化から不可逆的な数珠状変化に移行する様子を捉え、不可逆的变化に至るのに 3 時間かかることを示した[78]。これらの事実から、本研究で虚血中心部周辺領域に観察された近赤外拡散反射光強度の増大は、梗塞そのものではなく、可逆的な損傷による形態変化をあらわしていると推測される。

本研究では上述したように、虚血後 90 min 間に反射光強度が増加した領域は、24 時間後に梗塞になることが確認された。一方、虚血後 90 min 間に反射光強度の変化が見られずとも、24 時間後に梗塞になる領域も存在した（図 4.6）。このような領域は全 5 例のラットで見られた。先の考察で述べたように、脳組織が梗塞に至るのには一定時間（30～3 時間）必要であるが[73,74]、本研究ではイメージングを虚血後 90 min 行った。一方、第 3 章で述べたように、ラット全脳低酸素モデルでは脳組織が不可逆の状態に至ると、皮質全域で反射光強度が増大することが示されている（図 3.2）[52]。これらのことから、上述したイメージング観察中には反射光強度の増加がなかった領域では、虚血後 90 min 以降に信号強度が増加した可能性がある。

4.4.3 SD に伴う近赤外反射光のスパイク状変化の解釈

SD の発生に伴う脳組織の急激な光散乱（反射光）変化が、これまでに脳スライスを用いた *in vitro* 実験において、細胞外電位の変化、細胞体積変化、およびミトコンドリアの脱分極との関係においてよく調べられている[12,79]。光散乱信号は、ほぼ完全な脱分極の発生に同期して増加し、この間細胞の膨化とミトコンドリアの脱分極が生じる。その後、光散乱信号は再分極と同期して減少し始め、その後回復し、再分極の間、細胞体積とミトコンドリアの膜電位は回復する。本研究で観測された近赤外拡散反射光と細胞外直流電位の変化

(図 4.3) は、これら *in vitro* 研究の結果と合っている。関連する細胞の形態変化に関して、脱分極中の散乱の増加は、樹状突起の数珠状変化およびミトコンドリアの膨化によるものと推察される[13,80,81]。一方、*in vivo* の条件では、SD は大きな血行動態変化を伴うことから[70,72]、近赤外拡散反射光であってもヘモグロビンによる光吸収変化の影響を受ける可能性がある。しかし本モデルの図 4.7c の結果を見る限り、その影響は小さいように見える。

4.4.4 SD に対する脳血流反応と近赤外反射信号

局所脳虚血において繰り返し発生する SD とその病変拡大との関係については、これまでに多くの研究が行われている[4,5,66,82]。そしてその中で、SD が関係する脳血流低下がエネルギー危機にあるペナンプラを悪化させることが示されている。SD に伴う血流減少反応は、主に虚血中心部近傍で起きることが報告されているが[83]、SD に対する血流反応の分布は単純ではなく[84]、とりわけ側副血行路の有無に依存し複雑なようである[82,85]。たとえ SD に対して血流増加反応が起きた場合でも、ヘモグロビンの酸素飽和度は減少にも増加にもなることがあり、エネルギー代謝の帰結に影響しうる[86]。本研究では、虚血中心部および周辺部の反射光強度が増加しかつ梗塞になった領域において、SD に対する 4 つの異なる血流反応パターンが観察された (図 4.7c, 4.7e)。その 4 つのパターンの発生確率には有意差は見られず、全 5 例のラットで分布が不均一となる傾向が見られた。ラットの脳血管構築を考慮すると[87]、本研究で i) 血流増加および ii) 一過性の血流減少に続く血流増加が支配的であったのは、主として閉塞した MCA の前頭部側の上流に相当し、側副血行が維持されていた領域だったと推察される。一方、iii) 血流減少および iv) 血流変化なしの反応が支配的だった領域は、閉塞した MCA の支配領域に相当し、側副血行に乏しかった領域だったと推察される。このような血流反応分布の不均一性は、灌流圧が SD に対する血流反応を決定する重要な因子とする事実と関係するものと思われる[88]。

4.5 まとめ

近赤外拡散反射光イメージング法は、ラット局所脳虚血モデルにおける SD の発生と早期の病変の進展を経頭蓋骨的かつリアルタイムにモニタリングするのに有用であることが示された。脳梗塞の病態イメージングでは、局所脳血流、酸素代謝率等の血液循環代謝をパラメータとしたものが多く研究されているが、本研究で提案する光散乱を指標にしたイメージングは、細胞の膜形態すなわち組織の可逆・不可逆性に関する直接的な情報を得られる可能性があり、より包括的な脳梗塞の病態解明に寄与するものと期待される。本研究結果が示したように、虚血性病変の進展は個体ごとにばらつくだけでなく、同一個体でも時空間的に複雑に変化する。同イメージング法は、虚血性脳梗塞の病態の理解だけでなく、新規治療介入法の研究において威力を発揮するものと期待される。

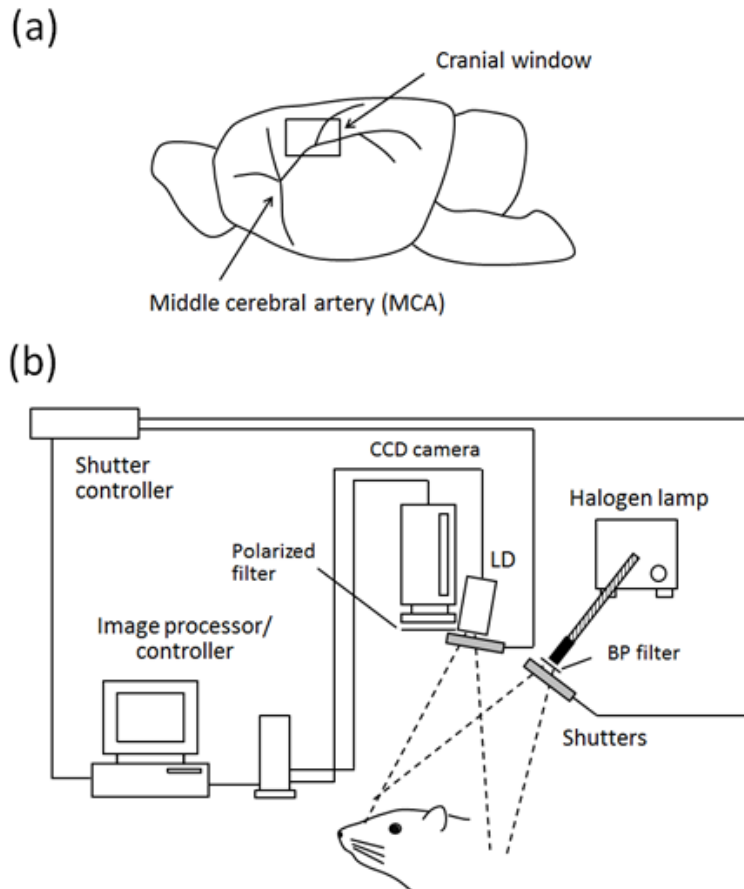


図4.1 ラット脳梗塞モデルに対する拡散反射光と脳血流の同時イメージング実験装置図[67]。Satoko Kawauchi, Izumi Nishidate, Hiroshi Nawashiro, Shunichi Sato, "Near-infrared diffuse reflectance signals for monitoring spreading depolarizations and progression of the lesion in a male rat focal cerebral ischemia model," *J. Neurosci. Res.* 96, 875-888 (2017). doi: 10.1002/jnr.24201.

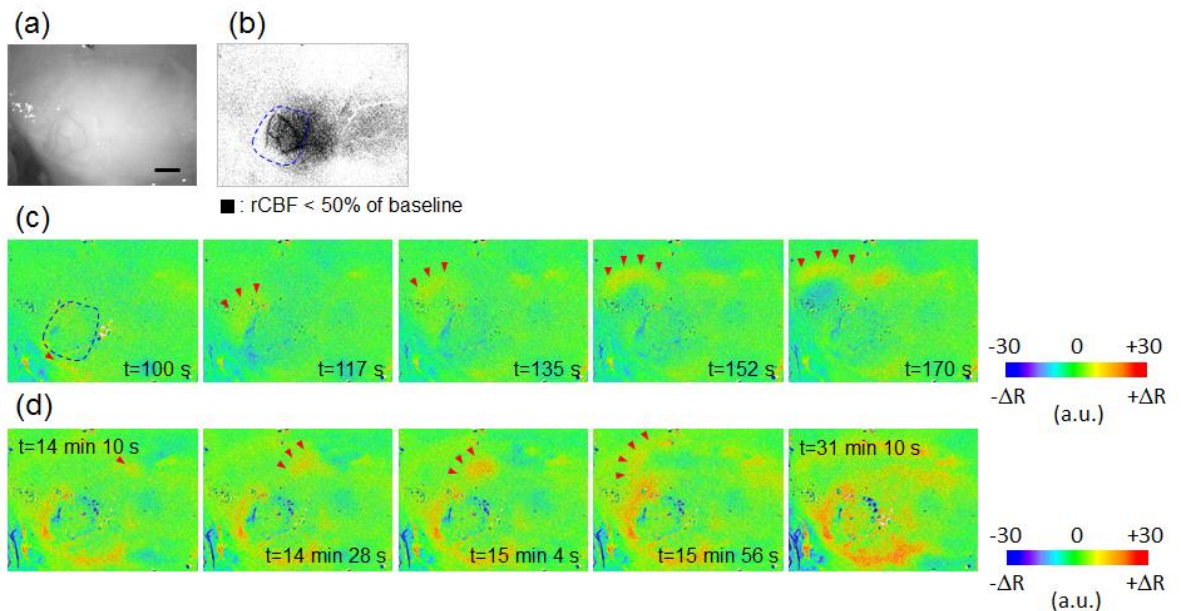


図4.2 ラット脳梗塞モデルの近赤外拡散反射光と脳血流の同時イメージング結果。(a) MCA閉塞前の拡散反射光画像。左が前頭部側。(b) MCA閉塞直後の血流画像を閉塞前の画像で除算した結果。黒色領域は血流減少率50%以上の領域(虚血中心部)を表す。(c, d) MCA閉塞後1.5-3 min (c) および14-16 minおよび31 min (d) における拡散反射光画像を閉塞前の画像で減算した差分画像[67]。
Satoko Kawauchi, Izumi Nishidate, Hiroshi Nawashiro, Shunichi Sato, " Near-infrared diffuse reflectance signals for monitoring spreading depolarizations and progression of the lesion in a male rat focal cerebral ischemia model," J. Neurosci. Res. 96, 875-888 (2017). doi: 10.1002/jnr.24201.

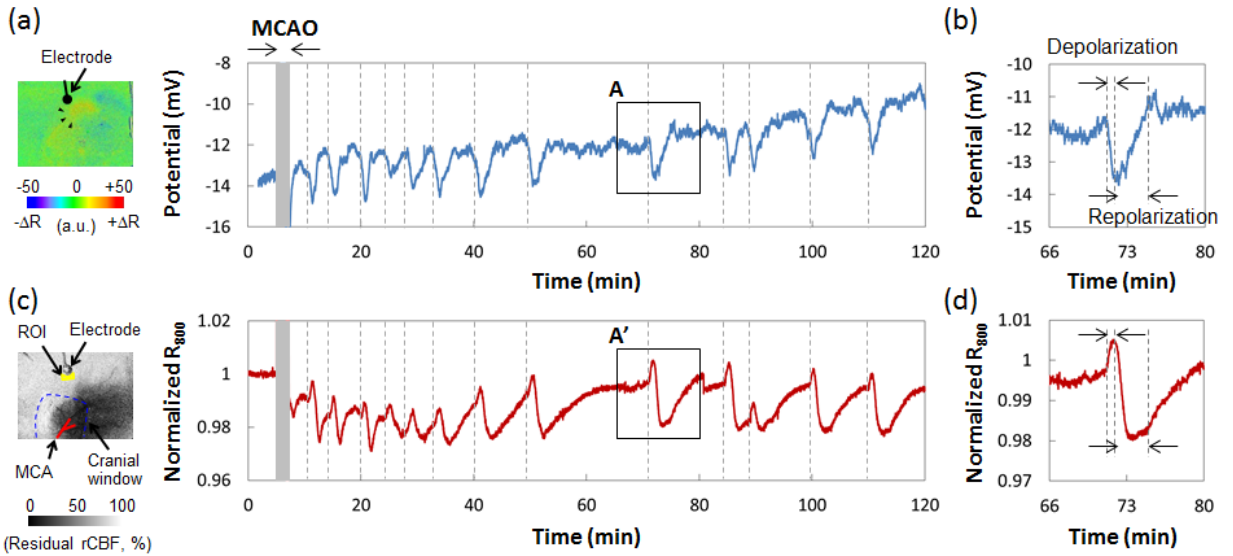


図4.3 ラット脳梗塞モデルにおける近赤外拡散反射光の変化(a,b)と細胞外直流電位(c,d)の関係[67]。

Satoko Kawauchi, Izumi Nishidate, Hiroshi Nawashiro, Shunichi Sato, " Near-infrared diffuse reflectance signals for monitoring spreading depolarizations and progression of the lesion in a male rat focal cerebral ischemia model," *J. Neurosci. Res.* 96, 875-888 (2017). doi: 10.1002/jnr.24201.

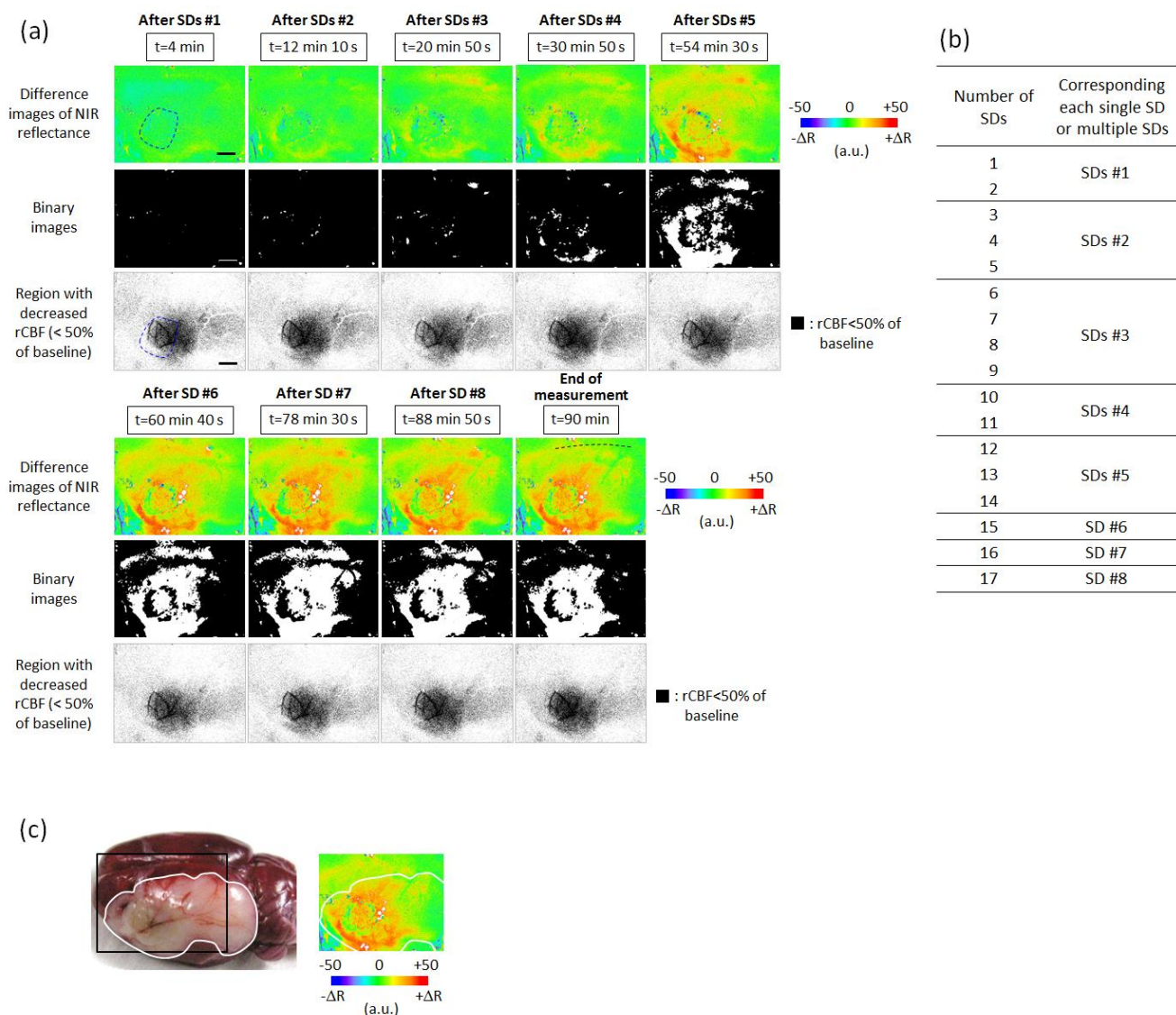


図4.4 ラット脳梗塞モデルにおける近赤外拡散反射光と脳血流の変化。(a) 各SD後の変化を示す。中段は上段の拡散反射光差分画像の二値化画像。(b) SDの発生回数と一連ないし単独のSDの番号との関係。(c) MCA90分後の拡散反射光の変化とTTCで評価した梗塞領域の関係[67]。

Satoko Kawauchi, Izumi Nishidate, Hiroshi Nawashiro, Shunichi Sato, "Near-infrared diffuse reflectance signals for monitoring spreading depolarizations and progression of the lesion in a male rat focal cerebral ischemia model," *J. Neurosci. Res.* 96, 875-888 (2017). doi: 10.1002/jnr.24201.

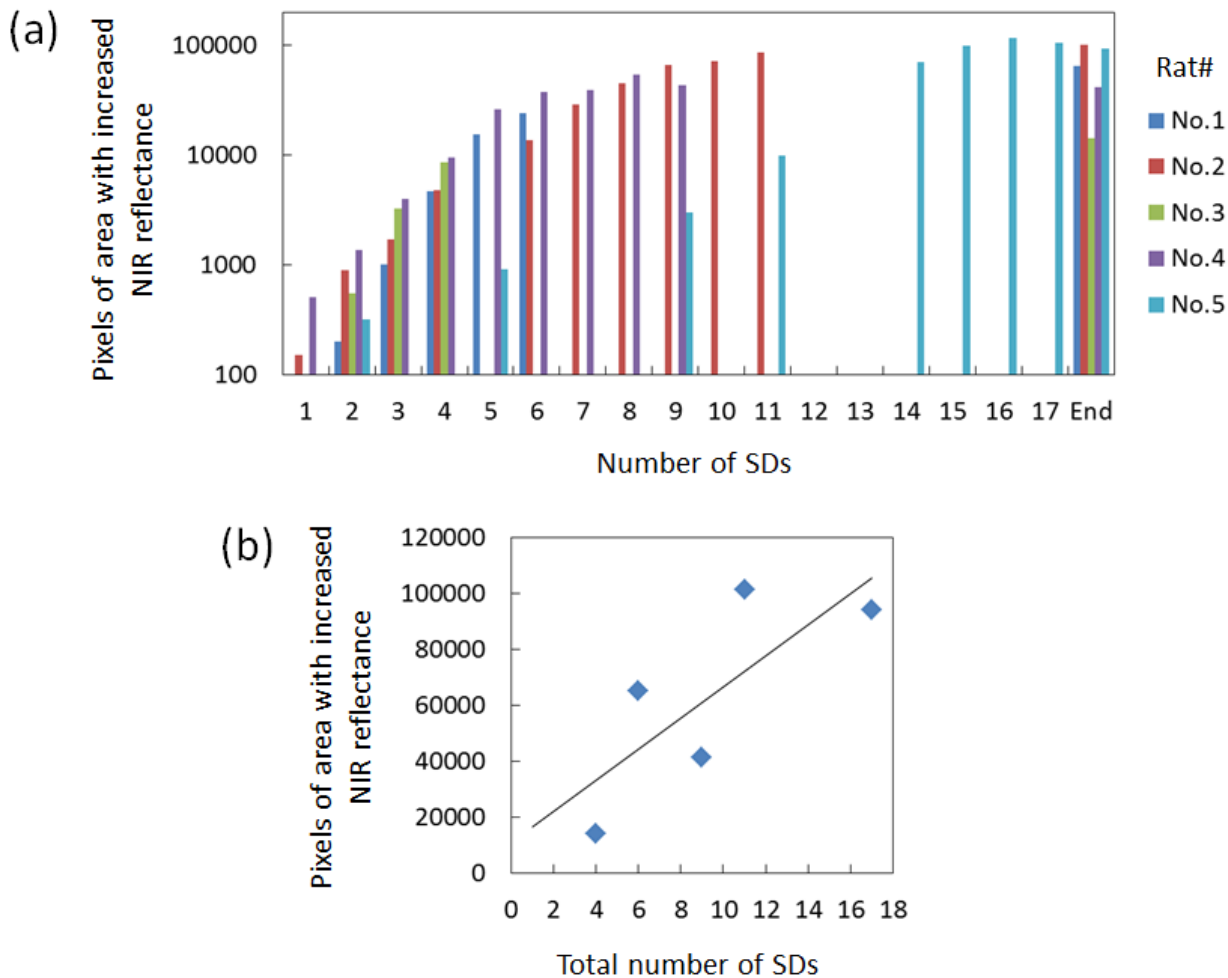


図4.5 拡延性脱分極の発生回数と拡散反射光増加面積の関係[67]。
 Satoko Kawauchi, Izumi Nishidate, Hiroshi Nawashiro, Shunichi Sato, " Near-infrared diffuse reflectance signals for monitoring spreading depolarizations and progression of the lesion in a male rat focal cerebral ischemia model," *J. Neurosci. Res.* 96, 875-888 (2017). doi: 10.1002/jnr.24201.

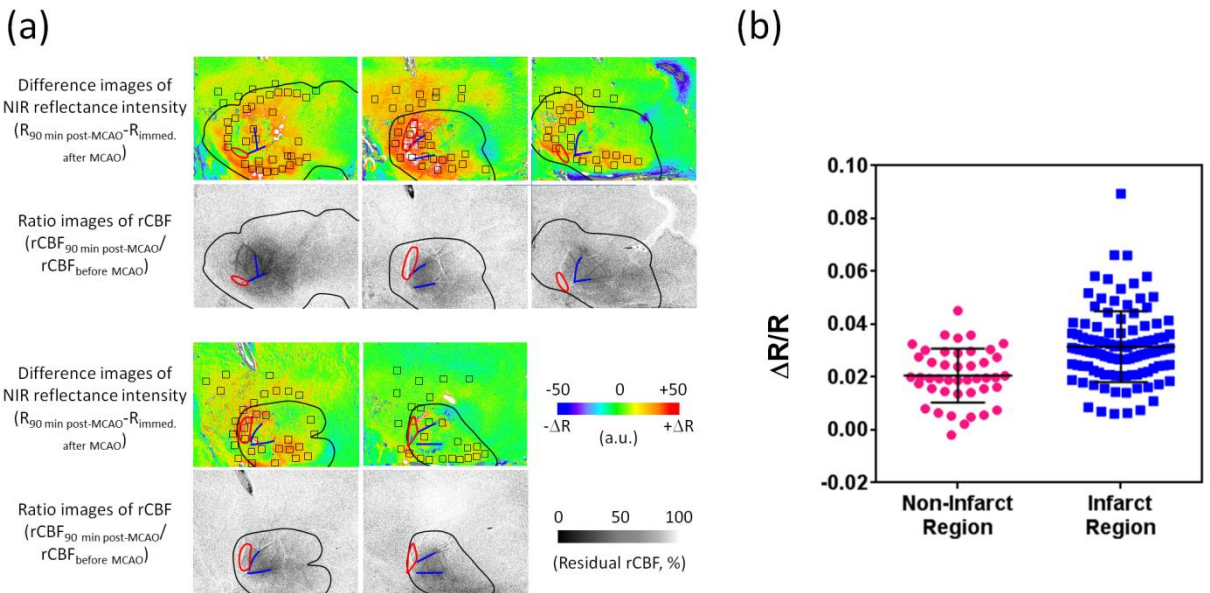


図4.6 (a) 全5例のラットのMCA閉塞後90 min間の拡散反射光の変化(上段, MCA閉塞後90 minの画像を閉塞前の画像で減算)と血流除算画像(下段, MCA閉塞後90 minの画像を閉塞前の画像で除算, 黒い領域が血流減少領域を表す)。左上からSDの発生回数が多い順に並べた。各画像の黒色実線曲線はTTC染色により評価した梗塞領域を, 青線は閉塞したMCAを示す。拡散反射光差分画像に示したROIは(b)の解析に用いた。(b) 全5例のラットの梗塞領域と非梗塞領域におけるMCA閉塞後90 min間の拡散反射光強度の変化率。 $**p < 0.01$ [67]。

Satoko Kawauchi, Izumi Nishidate, Hiroshi Nawashiro, Shunichi Sato, " Near-infrared diffuse reflectance signals for monitoring spreading depolarizations and progression of the lesion in a male rat focal cerebral ischemia model," *J. Neurosci. Res.* 96, 875-888 (2017). doi: 10.1002/jnr.24201.

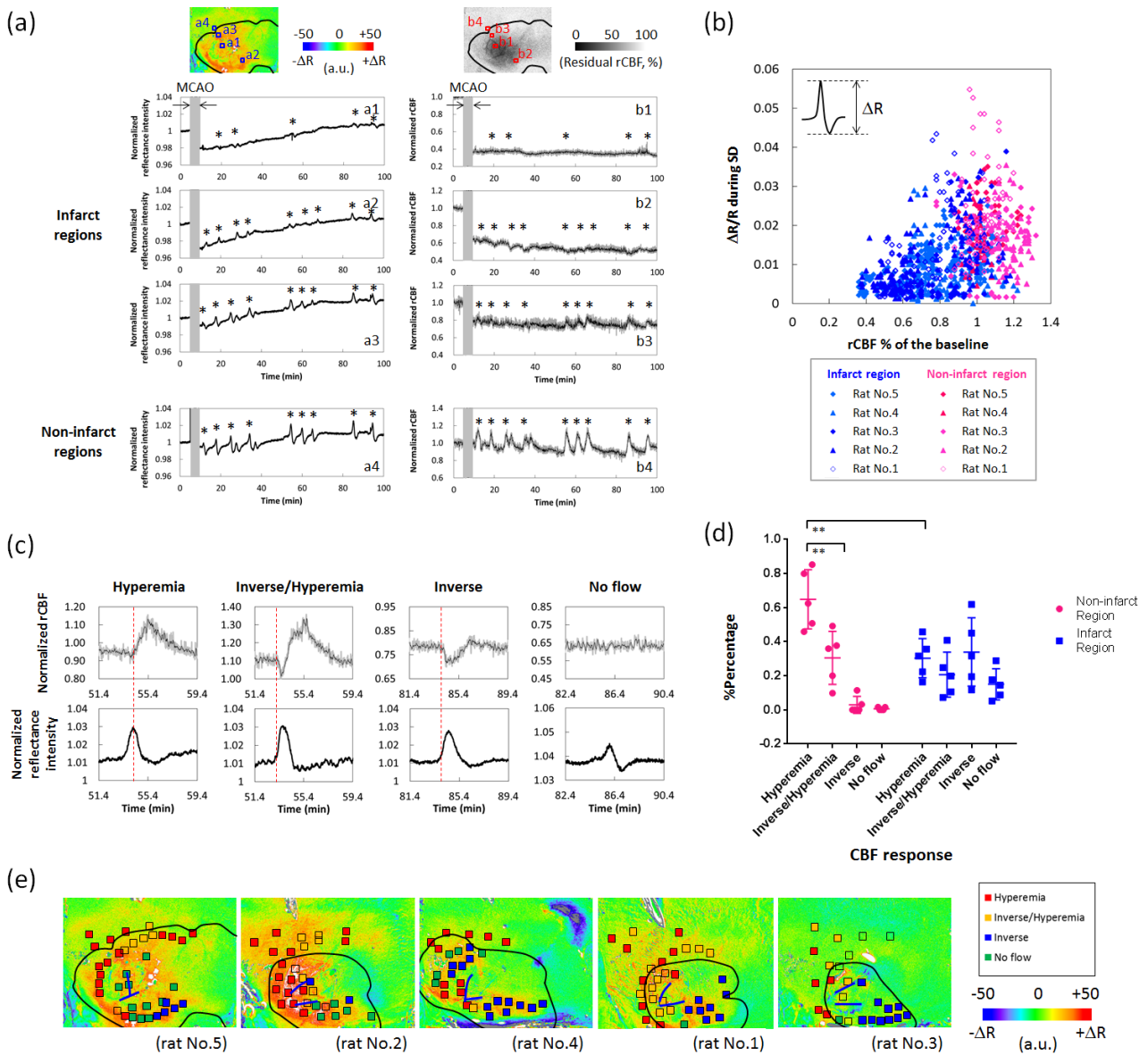


図4.7 ラット脳梗塞モデルにおける拡散反射光と脳血流の変化(血流パターンの詳細解析結果)。(a) 梗塞および非梗塞領域における拡散反射光と脳血流の時間変化。(b) 拡散反射光のスパイク状変化の血流減少率依存性。(c) SDの発生に伴って観察された4種類の血流レスポンスパターン(上段)と対応する拡散反射光の変化(下段)。血流変化のパターンは左から、i) 血流増加, ii) 一過性の血流減少に続く血流増加, iii) 血流減少, iv) 血流変化なし, に対応する。(d) 梗塞領域と非梗塞領域における各血流レスポンスパターンの発生率。 $**p < 0.01$ 。(e) 全5例のラットにおけるMCA閉塞後90 min間の拡散反射光強度の変化と梗塞領域(黒実線曲線)と血流反応パターンの空間分布の関係[67]。Satoko Kawauchi, Izumi Nishidate, Hiroshi Nawashiro, Shunichi Sato, "Near-infrared diffuse reflectance signals for monitoring spreading depolarizations and progression of the lesion in a male rat focal cerebral ischemia model," *J. Neurosci. Res.* 96, 875-888 (2017). doi: 10.1002/jnr.24201.

第5章

衝撃波由来ラット軽症頭部外傷モデルに対する マルチスペクトルイメージング

5.1 はじめに

近年米国を中心に爆発に起因する頭部外傷が社会問題となっている。特に、目立った外傷がなく通常の画像診断で異常が認められないため軽症と診断されながら、めまいや頭痛、記憶障害や社会的行動異常を発症する比率が非常に高くなっている。このような脳損傷は、爆発に伴う衝撃波に起因すると考えられ、頭部爆傷 (blast-induced traumatic brain injury, bTBI) と呼ばれるが、そのメカニズムは不明であり、医学的対処法は確立していない[35-38]。著者らは、取扱いが容易で再現性・制御性に優れたレーザー誘起衝撃波 (Laser-induced shock wave: LISW) を小動物に適用し、他の衝撃波源では困難な各種実験を進めている。これまでにラット脳の光学的リアルタイム観察により、頭部への LISW 適用により大脳皮質に拡張性脱分極 (SD) が発生し、適用側の皮質全体に拡大・伝搬し、その領域で低酸素血症が長時間 (最長約 3 時間) 続くことを報告した[42]。このような SD の発生とそれに続発する脳循環代謝異常は、その後の組織損傷に関係する可能性があるが、その詳細はわかっていない。本章では、LISW を適用したラット脳のマルチスペクトルイメージングを行い、衝撃波に起因する脳循環代謝異常をより詳細に調べることを目的とする。特に、衝撃波曝露直後から低酸素血症が持続する過程において、大脳皮質の細動脈、細静脈、および脳実質の血行動態がどのような時空間特性を持つかを明らかにすることで、現象の背景にあるメカニズムを考察する。

5.2 実験方法

5.2.1 レーザー誘起衝撃波の発生と特性

LISW の発生原理を Fig.5.1a に示す。光吸収体 (天然黒色ゴムシート, 厚さ 0.5 mm) と透明層 (ポリエチレンテレフタレート板, 厚さ 1.0 mm) を接着した構造のターゲットに、高出力ナノ秒パルスレーザーを照射すると、レーザーが黒色ゴムに吸収されてプラズマが誘起され、その膨張に伴って衝撃波 (LISW) が発生する。このターゲットを標的組織上に置き、レーザー光を照射することで標的部位に衝撃波を適用することができる。本実験では、Nd:YAG レーザーの第二高調波 532 nm 光 (パルス幅 ~6 ns FWHM, Brilliant b, Quantel) をスポット径 4 mm, フルエンス 1.25 J/cm^2 でターゲットに照射し LISW を発生させた (ピーク圧力 ~104 MPa, 力積 ~19 Pa·s)。LISW の典型的な圧力時間波形を Fig.5.1b に示す。先行研究において、フルエンス 1.25 J/cm^2 で経頭蓋骨的にラット脳に LISW を適用すると、実験したすべてのラットで SD の発生が確認され、脳の出血はないか限定的であったことから、同フルエンスが軽症~中程度の脳損傷を模擬するのに適すると考えた。実際の爆発衝撃波と比べると、この LISW のピーク圧力は 2-3 桁高く、時間幅は 2-3 桁短い、生体損傷に関わる主要パラメータである力積 (正圧力の時間積分値) は同等であることから、同条件の LISW により bTBI を模擬しうると考えられる。

5.2.2 ラット脳への LISW の適用

雄 Sprague-Dawley ラット (体重 300–400 g, 日本エスエルシー) に, 麻酔薬ペントバルビタールナトリウムを腹腔内投与し (50 mg/kg 初回ボラス投与, 約 15 mg/kg/h にて維持), 脳定位固定装置 (SG-6N, 株式会社成茂科学器械研究所) を用いて頭部を固定した。頭部剃毛の後, 頭皮を正中切開し, 左頭頂骨を露出させた。マルチスペクトルイメージングにより脳表を観察するため, 手術顕微鏡下にて開窓器を用いて左頭頂部に直径約 4.5 mm の窓を作成した。除去した骨のあとに, 直径 4.4 mm, 厚さ約 0.5 mm のポリメチルメタクリレート (PMMA) 製の透明ディスクを置き, 歯科用セメントで固定した。図 5.1b に, 作成した窓の位置と LISW 適用位置の模式図を示す。LISW 適用中心と窓の中心の距離は, 約 7 mm とした。窓を作成した後, 後述するイメージング装置下にラットを移動した。温度制御されたヒートマットを用いてラットの体温を $37.0 \pm 0.5^\circ\text{C}$ に維持し, 下肢に装着したパルスオキシメータ (8600V, Nonin Medical, Inc) により動脈血酸素飽和度をモニタリングした。

5.2.3 マルチスペクトルイメージング

衝撃波を適用したラット脳における局所総ヘモグロビン濃度 (rC_{Hb}), 組織酸素飽和度 (StO_2), 血管の形態 (脳表血管径) および SD を観測するため, 上述した窓を通してラット大脳皮質のマルチスペクトルイメージングを行った。図 5.1c に実験装置図を示す。照明光源にハロゲンランプ (HL 100E, HOYA-Schott) を用い, 6 つのバンドパスフィルターを装着したフィルターホイール (FW102C, Thorlabs) を回転させて照明光の波長を切り替え, ラット頭部に照射した。バンドパスフィルターの中心波長は, 520, 540, 560, 580, 600, および 800 nm, バンド幅は 10 nm FWHM (520-600 nm) または 40 nm FWHM (800 nm) とした。脳組織からの拡散反射光を CCD (12 bit, 1034 x 779 pixels, 1/30 s/frame, scA1000-30fm, Basler AG) と単焦点レンズ ($f=50$ mm, M118FM50, Tamron Co., Ltd.) を用いて検出した。フィルターホイールを付属のソフトウェアを用いて約 1.5 s 毎に回転させ, 同ホイールの出力信号と LabVIEW ソフトウェア (National Instruments) を用いて, ホイールの回転と画像取得を同期させた。LISW 発生用のターゲットは, ラットの左前頭部の頭蓋骨上に置き, 鉗子で保持した。このときターゲット下面のゴムと頭蓋骨の間に, 音響インピーダンス整合のため超音波ゼリーを塗布した。ベースライン画像を 2 分間取得した後に, LISW をラット頭部に適用し, 60 分間イメージングを行った。計測終了後, ラット脳と同じ位置に標準拡散板 (SRS-99-020, Labsphere, Inc.) を置き, 各波長で画像を取得した。ラット脳のすべての拡散反射光画像を標準拡散板の画像で除算し, これを拡散反射率 $r(\lambda)$ 画像として後述する光学特性値ならびに血行動態パラメータの算出に用いた。

得られた拡散反射光画像 (520, 540, 560, 580, および 600 nm) から, 散乱振幅 a (SD の指標として使用, $\mu_s' = a\lambda^{-b}$), rC_{Hb} , StO_2 の画像を得るため, MATLAB ソフトウェア (Mathworks) を用いて第 2 章 (2.2 項) と同様の重回帰分析を行った。結果は数値画像データとして得られ, 同ソフトウェアを用いて疑似カラー画像に変換された。前章までに述

べたように、SD の発生・伝搬は光散乱信号変化と関係することから、本実験では散乱振幅 a により SD の伝搬を可視化し、その伝搬速度の算出には、光散乱変化を反映する 800 nm の拡散光画像を用いた。脳表血管径は、酸素化・脱酸素化ヘモグロビンの等吸収波長である 520 nm の拡散反射光画像を元に、LabVIEW ソフトウェアを用いて画像強度のラインプロファイルから求めた。観察された細動脈と細静脈は、径の大きさ、位置と走行、および StO_2 (LISW 適用前) の値から区別した。また細動脈と硬膜の血管は、それぞれ起始部の径の大きさにより見分けた[89]。

5.2.4 統計解析

得られたデータに適用する統計解析法は、データの正規性および等分散性の検定に基づき選定された (Ekuseru-Toukei 2012 statistical software package, Social Survey Research Information Co., Ltd.)。脳表血管径の変化は、ノンパラメトリック多重比較検定 Dunn の方法により解析した。 $r\text{C}_{\text{Hb}}$ および StO_2 の変化は、パラメトリック多重比較検定 Dunnett の方法またはノンパラメトリック多重比較検定 Dunn の方法により調べた。これらの多重比較検定には GraphPad Prism ソフトウェア (Prism 6 for Windows, GraphPad software, Inc.) を用い、 $p < 0.05$ を統計学的有意とみなした。結果は、パラメトリック検定法を用いた場合に平均値 ± 標準偏差 (SD)、ノンパラメトリック検定法を用いた場合に平均値 ± 標準誤差 (SEM) であらわす。

5.3 実験結果

5.3.1 SD に関する光散乱特性の時空間変化

図 5.2 に LISW 適用後のラット大脳皮質における散乱振幅 a の差分画像 (LISW 適用前の画像を各時刻の画像から除算した) を示す (Rat No. 3)。LISW 適用後 1 min 21 s、画像左上の比較的大きな細静脈で散乱振幅の増加が見られ、画像右端 (ラット前頭部側) では脳実質および細動脈において散乱振幅が増加した領域が現れた。この散乱振幅が増加した領域は、時間とともに左側 (ラット後頭部側) に向かって波のように伝搬し、これは SD の伝搬を表している。このような SD に関連する散乱振幅の波の変化は全 4 例のラットで見られ、うち 1 例のラット (Rat No. 4) では、二回目の SD の伝搬が、最初の SD 伝搬開始から 5 min 45 s に見られた。脳実質を伝搬する SD の進行速度は、 2.96 ± 0.55 mm/min (mean \pm SD, $n=4$) あり、これは従来報告された KCl や針刺しにより発生した SD の伝搬速度と同様であった [4,5,23]。

5.3.2 脳表血管径の変化

図 5.3 は、図 5.2 と同じラット大脳皮質の波長 520 nm (酸素化・脱酸素化ヘモグロビンの等吸収波長) の反射光画像を示す。細動脈と細静脈がそれぞれ異なる変化を示している様子が観察される。まず細動脈 (軟膜細動脈) A は、SD の伝搬方向と順行性に走行している

動脈であるが、その血管径は、LISW 適用直後ほとんど変化せず、SD の伝搬中に著明に拡大し、伝搬後間もなく回復した (図 5.3a)。このような血管拡張は、SD の伝搬方向と垂直方向に走行する細動脈 B では見られなかった (図 5.3b)。一方細静脈は、観察視野内において SD の伝搬方向に対して順行性に走行するものは観察されず、代わりに径の大きさが場所によって大きく異なることがわかった。そこで本実験では、径の小さい細静脈 (直径 80 μm 未満, 細静脈 C とする) と大きい細静脈 (直径 80 μm 以上, 細静脈 D とする) に分けて解析を行った。LISW 適用直後、これら 2 つのタイプの細静脈は、ともに LISW 適用位置からの距離や走行方向に関係なく著明な収縮を起し (図 5.3c, 5.3d)、その程度は径の小さい細静脈 C においてより顕著であった。この細静脈 C と D の血管収縮は、SD 伝搬中に回復する傾向を示したが、伝搬直後には再度収縮した。

図 5.4 は、同ラットの LISW 適用後約 60 分間の細動脈 A と B および細静脈 C と D それぞれの血管径の時間変化を示す (Rat No. 3)。ここでは図 5.3 に示した各細動脈、細静脈からランダムに 3 箇所ずつ選んで直径を評価した。衝撃波曝露後、細動脈 A の直径はわずかに減少し、続いて SD の伝搬中、急激に最大約 80% 増加した。伝搬後間もなく、直径はベースラインレベルに戻るか、一部のもの約 20% 減少し、その後 50 分間、変化がないか時々減少 (最大 30%) する傾向を示した。対照的に細動脈 B は変化が小さく、SD の伝搬中であっても血管径はほとんど変化せず、SD 伝搬直後は変化しないものと、減少するものが混在した。一方、細静脈 C と D の血管径は、衝撃波曝露直後約 1 分間にそれぞれ約 45%、約 25% と顕著に減少し、SD の伝搬に伴い回復した。しかし SD 伝搬直後、再度 20~30% 減少し、その後再び回復傾向に転じた (図 5.4c, 5.4d)。興味深いことに、LISW 適用から約 7 分後、細静脈の血管径はともに LISW 適用前より拡大しはじめ、約 20 分後に最大となり、径の増加率は約 20~55% に達した。この傾向は径の小さい細静脈 C において顕著であった。その後、細静脈 C の血管径はベースラインレベルに回復したが、細静脈 D は戻らなかった。

図 5.4 に示した血管径の時間変化に基づき、6 つの特徴的な時刻を選定し、全 4 例のラットについて上記 4 つのタイプの細動脈と細静脈の血管径を評価し、統計解析を行った。結果を図 5.5 に示す。選定した時刻は、① LISW 適用前 (t_0)、② LISW 適用直後 (t_1)、③ SD 伝搬中 (t_2)、④ SD 伝搬直後 (t_3)、⑤ SD 伝搬後約 20 分 (t_4)、および⑥ SD 伝搬後約 50 分 (t_5) であり、それぞれ図 5.4a に示した矢頭の時刻に対応する。観察可能な血管をすべて解析対象とし、細動脈 A (SD と順行性に走行) については 5 つの血管から合計 14 か所、細動脈 B (SD と垂直ないし逆行性に走行) については 3 つの血管から合計 8 箇所、細静脈 C (血管径が 80 μm 未満) については 8 つの血管から合計 17 箇所、細静脈 D (血管径が 80 μm 以上) については 7 つの血管から合計 10 箇所を解析した。LISW 適用前の各血管径は、細動脈 A が $48 \pm 4 \mu\text{m}$ ($n=14$, 平均 \pm SEM)、細動脈 B が $44 \pm 5 \mu\text{m}$ ($n=8$)、細静脈 C が $53 \pm 4 \mu\text{m}$ ($n=17$)、および細静脈 D が $150 \pm 13 \mu\text{m}$ ($n=12$) であった。図 5.5 は、図 5.4 に見られた特徴的な変化が全ラットで観察されたことを示している。細動脈 A の血管径は、時刻 t_2 において有意に増加し、変化率は $59 \pm 9\%$ (平均 \pm SEM) であった。細動脈 B では、 t_2 において有意差な

く、 t_3 で有意に減少した(-10±3%)。細静脈CとDの血管径は、 t_1 においてそれぞれ-22±4%、-20±2%とともに有意に減少し、SD伝搬後約20分(t_4)、ともに有意に増加した(34±4%、25±3%)。これらの解析にRat No. 4の二回目のSDは含まなかった。

5.3.3 局所総ヘモグロビン濃度と組織酸素飽和度

図5.6は、図5.2~5.4と同じラット大脳皮質の局所総ヘモグロビン濃度(rC_{Hb})と組織酸素飽和度(StO_2)の疑似カラー画像を示す。画像は、細動脈、細静脈、および脳実質の各領域に応じた異なるレベルの信号分布を表している。衝撃波曝露直後($t=1$ min 11 s)、 rC_{Hb} と StO_2 はともにほぼ全域で減少し、特に脳実質で顕著に減少した。その後 rC_{Hb} と StO_2 は、画像右端の領域で増加しはじめ($t=1$ min 21 s)、その領域は画像の左側に向かって移動・伝搬した($t=2$ min 29 sまで)。この変化はSDの伝搬に対応し(図5.2)、SDに対する血流増加反応を示している。SD伝搬後、 rC_{Hb} と StO_2 は大きく減少し($t=3$ min 26 s)、その後 rC_{Hb} は時間とともに回復する傾向を示したが、脳実質の一部の rC_{Hb} は計測終了時まで低かった

($t=66$ min 37 s)。一方、 StO_2 はSD伝搬後、全領域で低値となり、特に脳実質と細静脈の StO_2 はSD伝搬後約40分まで大きく低下し、脳実質の StO_2 低下は計測終了時まで続いた。

図5.7は、図5.5と同じ6つの時刻における脳実質、細動脈、および細静脈における rC_{Hb} と StO_2 の変化を全4例のラットについて解析した結果を示す。合計39の関心領域(ROIs)を解析対象とし、このうち24のROIを脳実質に、7つのROIを細動脈(SDと順行性に走行)に、8つのROIを細静脈に設定した。LISW適用直後(t_1)、 rC_{Hb} はすべての領域で有意に減少した。ベースラインからの減少率は、脳実質で約8%、細静脈で約9%、および細動脈で約5%であった。SD伝搬中(t_2)、 rC_{Hb} は脳実質と細動脈においてそれぞれ約21%と約25%有意に増加したが、SD伝搬直後(t_3)、 rC_{Hb} は脳実質と細静脈においてそれぞれ約6%と約11%有意に減少した。SD伝搬後約20分以降(t_4 と t_5)、 rC_{Hb} はすべての領域で回復し有意差は見られなかった。 rC_{Hb} のこれらの変化に対応して、 StO_2 も変化した但那の変化の詳細はより複雑であった。まずLISW適用直後(t_1)、 StO_2 は脳実質と細静脈においてそれぞれ約29%、約11%と有意に減少し、直後のSD伝搬中(t_2)は逆にそれぞれ約64%、約18%と有意に増加した(ベースラインからの変化率)。SD伝搬直後(t_3)、 StO_2 は脳実質において約46%、細動脈において約10%それぞれ有意に減少した。そしてその後、 StO_2 は全領域で計測終了まで有意に低いままであった。上述したように rC_{Hb} はSD伝搬後約20分以降、すべての領域で回復したことから、同時間帯において rC_{Hb} と StO_2 の挙動に乖離が見られたといえる。図5.8gは、下肢で計測した動脈血酸素飽和度(SpO_2)を示すが、同値は衝撃波曝露後どの時刻においても有意な変化を示さなかったことから、上述したラット大脳皮質の StO_2 の変化は脳局所に生じたものであることを示している。

5.4 考察

衝撃波曝露時に脳に生じる現象のリアルタイム観察は、bTBIの病態生理とメカニズムを

理解するのに極めて重要である。なぜなら、衝撃波により引き起こされる初期のイベントは、その後の慢性期の症状につながる病理カスケードの引き金となりうるからである。本研究では、マルチスペクトルイメージングにより、ラット大脳皮質における脳血管および脳実質における血行動態変化について、衝撃波を曝露した瞬間から詳細に観察した。そして脳血管径、 rC_{Hb} 、および StO_2 の特徴的な変化を観測し、次の 4 つの時間に着目して考察することが有用と考えた。

Phase I ($t = t_1$) : LISW 適用直後 (SD 発生前の約 1 分間)。細静脈の収縮と乏血/低酸素血症が発生。

Phase II ($t = t_2$) : SD 伝搬中 (約 2 分間)。SD に対する一過性の著明な血流増加反応、すなわち脳実質における rC_{Hb} と StO_2 の増加および細動脈の拡張が発生。

Phase III ($t = t_3$) : SD 伝搬後早期 (20 分未満)。細動脈の収縮と乏血/低酸素血症が発生。

Phase IV ($t = t_4 \sim t_5$) : SD 伝搬後後期 (40 分以上)。低酸素血症が持続。乏血と血管収縮は起きない (酸素供給と需要のミスマッチ)

以下に観察結果から考えられる病態とメカニズムについて考察する。

Phase I は、衝撃波の直接的かつ即時的な脳血行動態への影響を表しており、主として細静脈と毛細血管の収縮が特徴的である。これまでに、皮質の毛細血管径は、血管を構築する細胞のうちペリサイト (周皮細胞) によりコントロールされ[90]、神経病理学的条件下では、ペリサイトの収縮により毛細血管が狭窄することが報告されている[91,92]。また急性期の脳損傷で起きる能動的な静脈の収縮も主としてペリサイトの収縮によることが示されている[93]。したがって、Phase I に見られた乏血と細静脈の収縮は、ペリサイトないし他の血管壁細胞の収縮によるものと推察される。このようなペリサイトの収縮は、酸素ラジカルおよび窒素ラジカル (例えばパーオキシナイトライト) の発生により引き起こされることが、マウス虚血-再灌流モデルを用いた研究において示されている[92]。これは本研究のモデルと異なるが、同様のメカニズムは衝撃波を用いた本モデルでも起きうると考えられる。衝撃波による機械的刺激は、細胞内カルシウム (Ca^{2+}) 濃度を上昇させ[94,95]、これにより内皮細胞型一酸化窒素合成酵素 (endothelial nitric oxide synthase, eNOS) が活性化され、NO の産生が増加する[96]。このとき同時に、細胞内 Ca^{2+} 濃度の増加は、ミトコンドリアにおける活性酸素 (ROS) の生成を促す可能性がある[97]。ミトコンドリアで生成される ROS は主としてスーパーオキシドアニオン (O_2^*) であることが知られ、これは NO と容易に反応しパーオキシナイトライトを生成する[98]。したがって衝撃波を頭部に適用する本モデルにおいて、パーオキシナイトライトは生じる可能性があり、ペリサイトの収縮も起こりうる。図 5.2 に示す散乱振幅の結果は、衝撃波適用直後、比較的大きい細静脈が収縮に伴い散乱の増大を示すことをあらわしている。細静脈の収縮は、同血管壁の細胞収縮を伴うものと推察され、これにより細胞膜を構成する脂質分子やコラーゲン分子 (これらは光散乱体とみなされる) の局所濃度が増加し[99]、散乱信号が増加した可能性が推察される[13,53,80]。

続いて Phase II は SD の発生・伝搬が特徴的であるが、ここで注目すべきことは、SD が伝搬する前にすでに皮質の rC_{Hb} と StO_2 は、上述した衝撃波の直接的作用により、細静脈の収縮とともに減少していたことである。一般に SD は、通常の酸素濃度条件で起きる場合、一過性の著明な血流増加反応を伴うことが知られ、これが SD による大量のエネルギー消費を補っていると考えられている[4,5]。しかし例えば、虚血性脳梗塞の梗塞周辺領域（ペナンブラ）のような酸素供給が十分でない領域では、SD に対する血流反応が、一過性の増加のパターンから「減少」パターンに変わり、これが脳組織をより悪化させると考えられている[5]。本研究で観測した衝撃波由来の SD は、伝搬時すでに組織酸素飽和度が低下していたにもかかわらず（図 5.6b, $t=1 \text{ min } 11s$ ）、著明な血流増加反応を伴い予想に反した。これは、上述した衝撃波の機械的刺激により発生した NO が、血管拡張因子として働いたことによるものかもしれない。また注目すべきことに、SD に伴う血管拡張は、SD の伝搬方向と順行性に走行する細動脈において明瞭に観察された（図 5.3）。この現象は、血管の局所刺激（例えば KCl 塗布）により生じた血管拡張が、血管作動因子の働きにより血管に沿って伝導する現象に類似している[100-102]。SD の伝搬方向と順行性に走行する細動脈は、その上流が SD の発生源側に位置するため、このような伝導現象が起きると考えられる。

Phase III で観測された SD 後の乏血/低酸素血症と細動脈の血管収縮は、同モデルを対象に行ったファイバー型拡散反射光計測の結果と同様である[42]。その研究では、SD 伝搬後、低酸素血症と乏血がとともに計測終了まで（1 時間以上）観測された。一方本研究では、SD 伝搬後約 20 分以内の Phase III において、細動脈の収縮と乏血は回復し、Phase IV では低酸素血症のみが観測された。この違いは、計測方法と波長の違いによる観測深度の違いによるものと推察される。先行研究では、光ファイバー対を用いて可視～近赤外領域で拡散反射光計測を行ったのに対し、本研究では可視域の拡散反射光イメージングを行った。その観測領域は、先行研究ではラットの大脳皮質全層（第 1～6 層）、本イメージングでは皮質表層（主として第 1 層）と見積られる[52]。一方ラット大脳皮質の血管構造は、脳表から深部に向かうにつれて大きく変化し、脳表には比較的径の大きい細動脈や細静脈が脳表に沿って走行し、毛細血管密度は深部に行くほど高くなることが知られる[103,104]。ラット脳における SD に伴う血行動態変化を深さ分解ドップラー血流計測により観測した研究では、観測深度により SD に対する血流反応が異なることが報告されている[16]。現時点ではメカニズムの詳細は明らかではないが、少なくとも皮質深部で起きる SD 後の低酸素血症は、深部の乏血・血管収縮によるものと推察され、浅部で起きる SD 後の低酸素血症には、これとは別の後述のメカニズムが作用していると推測される。浅部ではなぜ乏血が回復しても低酸素血症が続くのか。まずその現象自体は、いわゆるハイパーメタボリック状態と解釈でき、血管からの酸素供給が不十分な状態、および/または、組織の酸素消費が過剰な状態、と言い換えることができる。このような状態は通常の SD では見られない。とりわけ興味深いのは、全身をめぐる血液の動脈血酸素飽和度は低下していないにもかかわらず（図 5.8g）、脳表細動脈を含む酸素飽和度が有意に低下したことである。これには SD 伝搬後の脳組織の

酸性度の変化が関係しているかもしれない。SD が発生すると、細胞外の乳酸の増加と組織 pH の減少が 30 分以上続くことが報告されている[105]。このような組織酸性度の変化は本実験モデルの SD 後にも起きうる。加えて、低酸素血症が起きても脳血液量が保たれている今回のような場合、酸素供給が不十分な状態でグルコースが供給され続けていることを意味し、これは乳酸の蓄積と低酸素血症脳アシドーシス（酸血症）を加速する[106]。組織 pH が低下すると、ヘモグロビンの酸素親和性が下がるため（この現象はヘモグロビン酸素解離曲線として知られる）、脳表細動脈の酸素飽和度が低下すると考えられる。

衝撃波曝露直後の Phase I から Phase IV に至る一連の過程を考えると、衝撃波の直接的な作用による乏血/低酸素血症、SD によるエネルギーの大量消費、SD 後の乏血/低酸素血症と、すべてが組織にエネルギー負荷を与えるプロセスであり、その結果 Phase IV では、たとえ StO_2 が低下していても、細胞の酸素代謝は亢進している可能性がある。なぜなら、一連の過程で低下した細胞の機能を回復させるために、細胞ではタンパク質の合成や ATP の産生が必要であり、これにより酸素が消費されるからである[107]。このような酸素およびエネルギー代謝の増大に対処するとき、酸素供給に関わる毛細血管密度が低い脳表領域は、より酸素供給と需要のミスマッチが起きやすいといえる。さらに衝撃波伝搬に関する物理的特性を考えると、頭蓋骨直下に存在する脳表（本実験ではイメージング用窓の直下）には、衝撃波の反射（骨と脳脊髄液界面で起きる）により生じるキャビテーション由来の組織損傷が加わる可能性があり[108]、深部組織では見られない現象が起きる可能性がある。

5.5 まとめ

本章では、レーザー誘起衝撃波を適用したラット脳のマルチスペクトルイメージングを行い、衝撃波曝露後の脳表血管径の変化、細動脈、細静脈、および脳実質の各領域における局所総ヘモグロビン濃度と組織酸素飽和度の時空間変化につき調べた。その結果、衝撃波の直接的かつ即時的な作用により血行動態異常が発生し、これに続いて拡張性脱分極 (SD) の発生と伝搬により血行動態異常が悪化する二段階の現象が観測された。また細動脈と細静脈では、衝撃波に対して全く異なる変化を示すことも明らかとなった。興味深いことに、SD 伝搬後、乏血/細動脈の収縮とともに低酸素血症が観測されたが、その後乏血/細動脈の収縮が回復しても、低酸素血症は長時間持続することがわかった。このことは、明らかな酸素供給-需要のミスマッチが持続していることを示している。SD 伝搬後の持続性低酸素血症は、その後の病態プロセスに影響を与える重要なイベントと考えられ、今後同モデルの組織学的変化（神経細胞死の有無等）を明らかにすることで、bTBI のメカニズムの解明に近づくものと期待される。

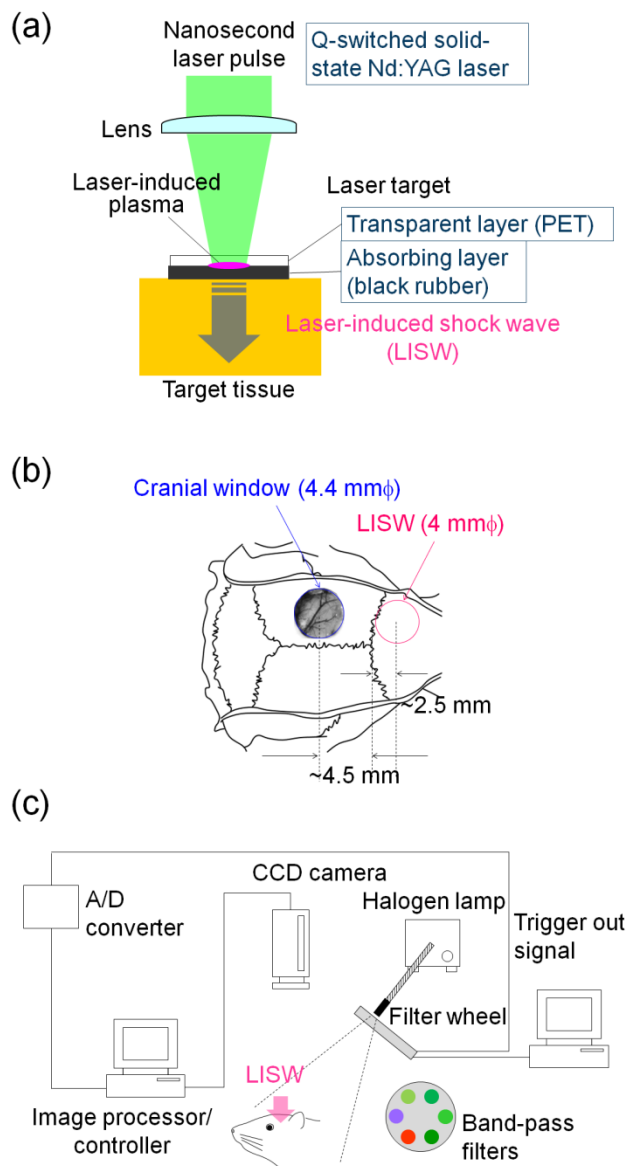


図5.1 LISW適用ラット脳のマルチスペクトルイメージングの実験装置図。(a) LISWの発生。(b) LISW適用位置と開窓位置。(c) イメージングの実験装置。
 Satoko Kawauchi, Wataru Okuda, Hiroshi Nawashiro, Shunichi Sato, Izumi Nishidate, "Multispectral imaging of cortical vascular and hemodynamic responses to a shock wave: observation of spreading depolarization and oxygen supply-demand mismatch," *J. Biomed. Opt.* 24(3), 1-17 (2019). doi: 10.1117/1.JBO.24.3.035005.

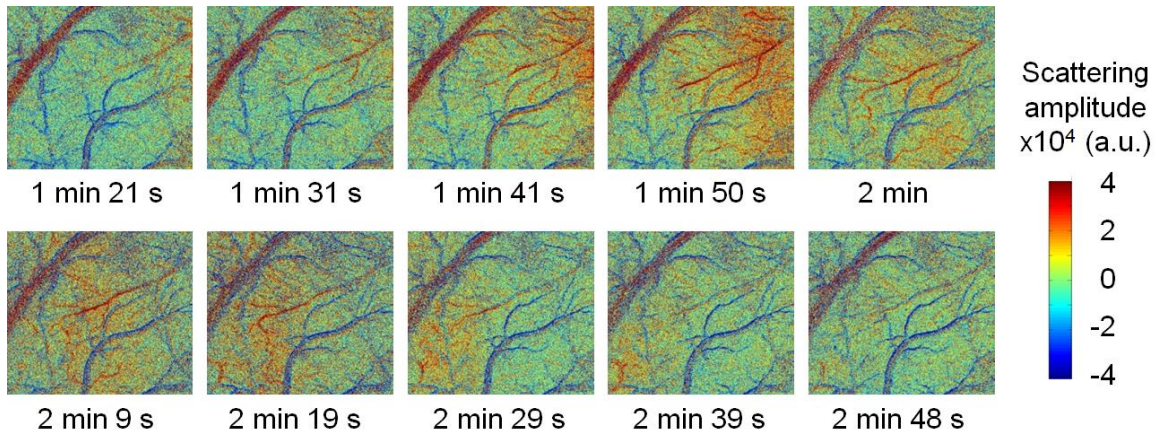


図5.2 LISW適用によるラット脳の光散乱変化(SDの伝搬を表す)。時刻はLISW適用後の時間に対応する。

Satoko Kawauchi, Wataru Okuda, Hiroshi Nawashiro, Shunichi Sato, Izumi Nishidate, "Multispectral imaging of cortical vascular and hemodynamic responses to a shock wave: observation of spreading depolarization and oxygen supply-demand mismatch," *J. Biomed. Opt.* 24(3), 1-17 (2019). doi: 10.1117/1.JBO.24.3.035005.

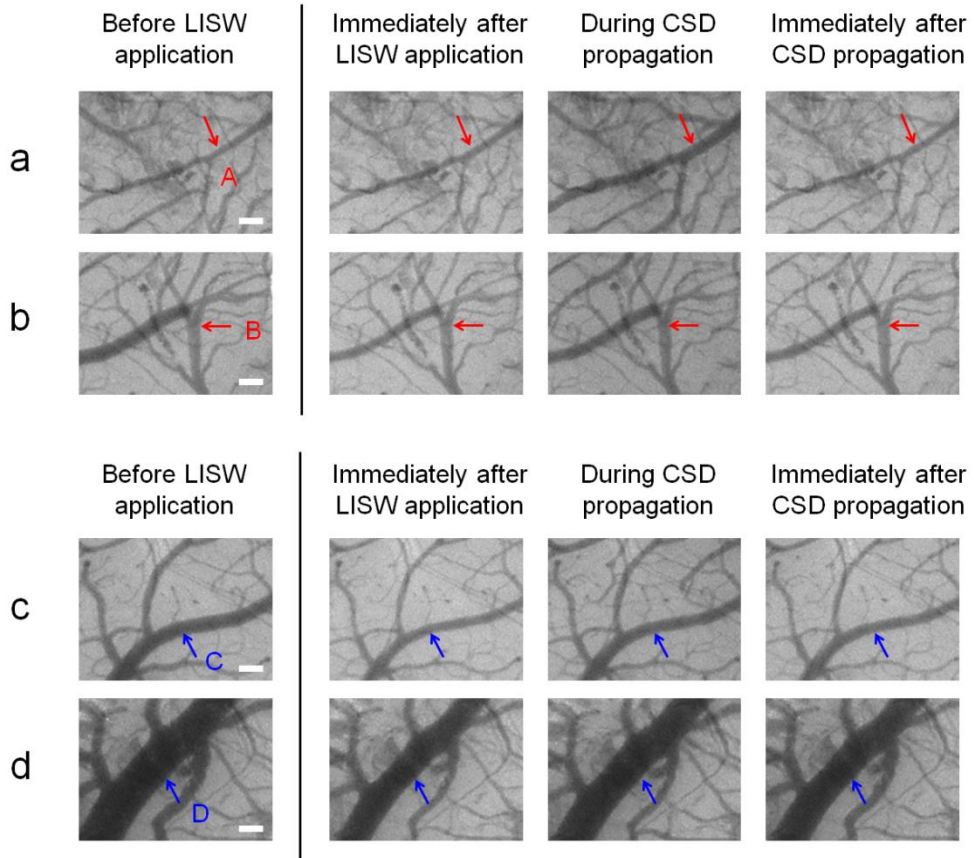
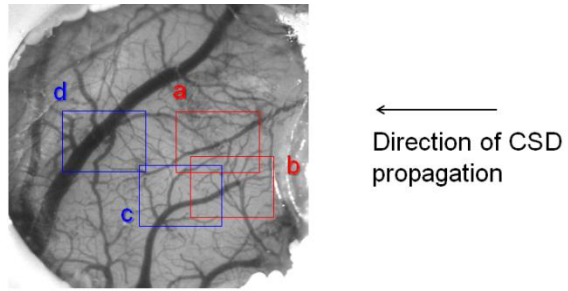


図5.3 LISW適用による脳の血管形態変化。(A, B) 細動脈。(C, D) 細静脈。
 Satoko Kawauchi, Wataru Okuda, Hiroshi Nawashiro, Shunichi Sato, Izumi Nishidate, "Multispectral imaging of cortical vascular and hemodynamic responses to a shock wave: observation of spreading depolarization and oxygen supply-demand mismatch," *J. Biomed. Opt.* 24(3), 1-17 (2019). doi: 10.1117/1.JBO.24.3.035005.

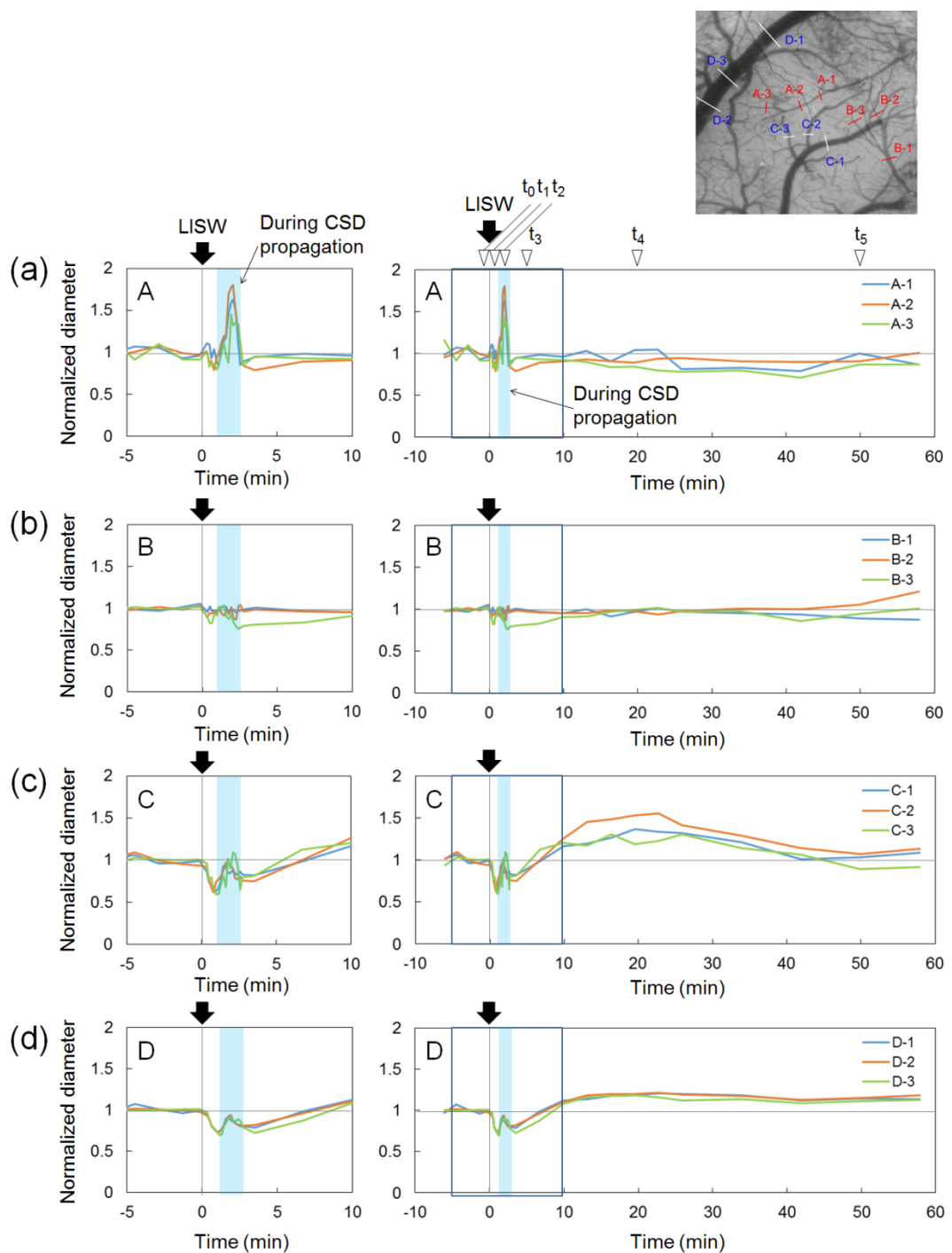
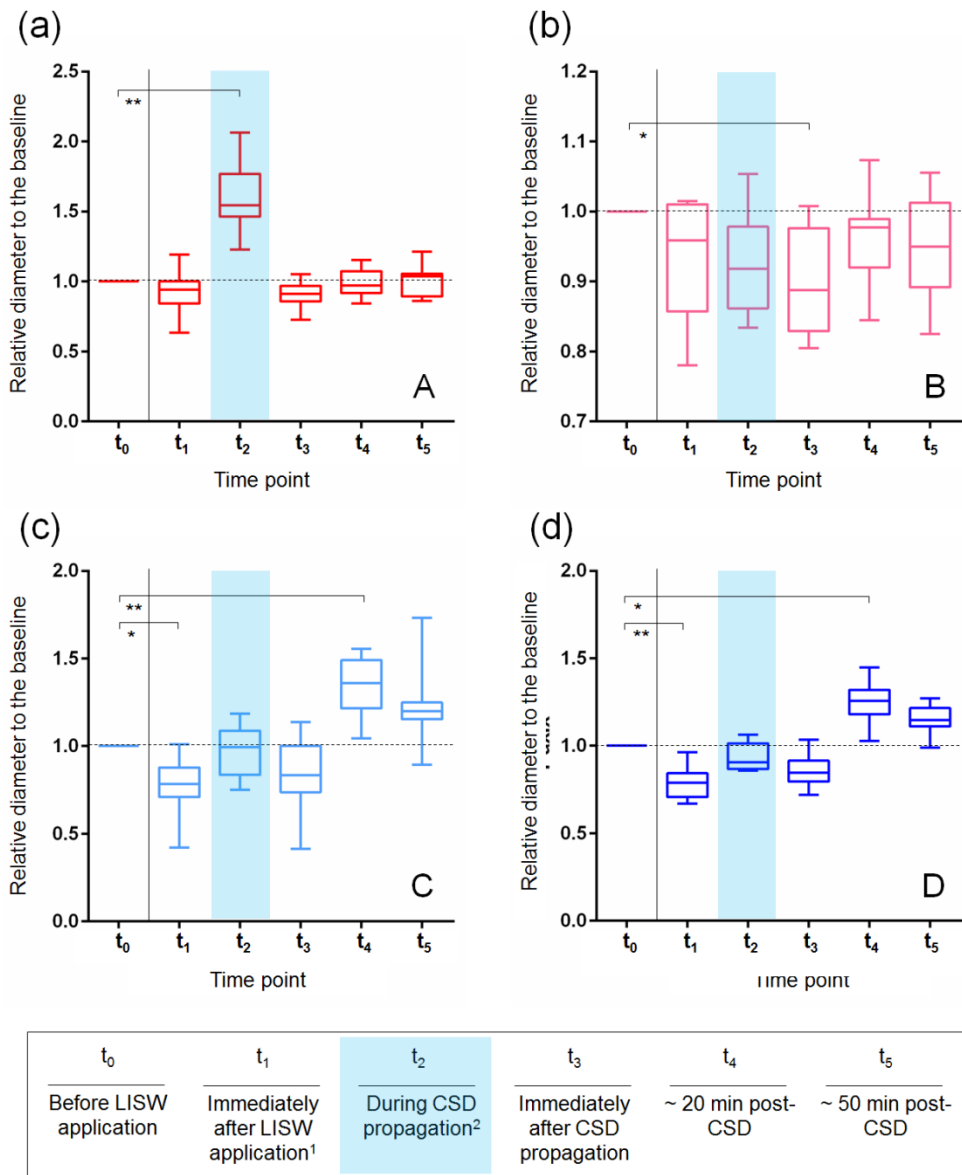


図5.4 LISW適用後の血管径の変化。(a, b) 細動脈。(c, d) 細静脈。
 Satoko Kawauchi, Wataru Okuda, Hiroshi Nawashiro, Shunichi Sato, Izumi Nishidate, "Multispectral imaging of cortical vascular and hemodynamic responses to a shock wave: observation of spreading depolarization and oxygen supply-demand mismatch," *J. Biomed. Opt.* 24(3), 1-17 (2019). doi: 10.1117/1.JBO.24.3.035005.



¹ time point just before CSD propagation

² time point when the arteriole reaches maximum diameter

図5.5 LISW適用後の血管径の変化(ラット4例の結果)。(a, b) 細動脈。(c, d) 細静脈。

Satoko Kawauchi, Wataru Okuda, Hiroshi Nawashiro, Shunichi Sato, Izumi Nishidate, "Multispectral imaging of cortical vascular and hemodynamic responses to a shock wave: observation of spreading depolarization and oxygen supply-demand mismatch," *J. Biomed. Opt.* 24(3), 1-17 (2019). doi: 10.1117/1.JBO.24.3.035005.

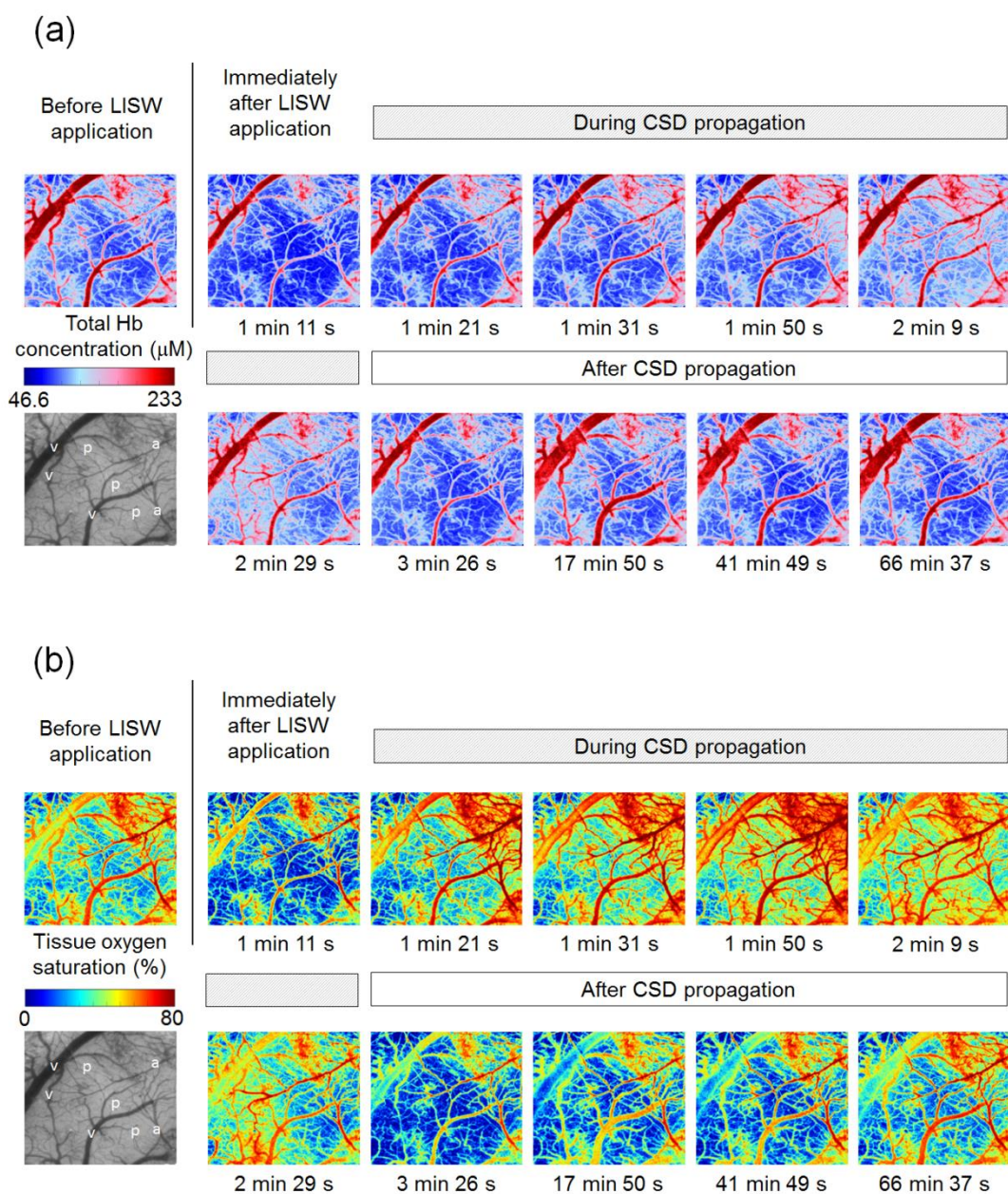


図5.6 LISW適用後の総ヘモグロビン量(a)と組織酸素飽和度(b)の変化。
 Satoko Kawauchi, Wataru Okuda, Hiroshi Nawashiro, Shunichi Sato, Izumi Nishidate, "Multispectral imaging of cortical vascular and hemodynamic responses to a shock wave: observation of spreading depolarization and oxygen supply-demand mismatch," *J. Biomed. Opt.* 24(3), 1-17 (2019). doi: 10.1117/1.JBO.24.3.035005.

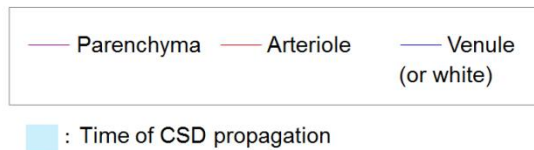
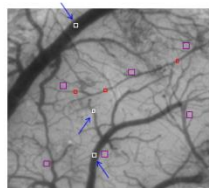
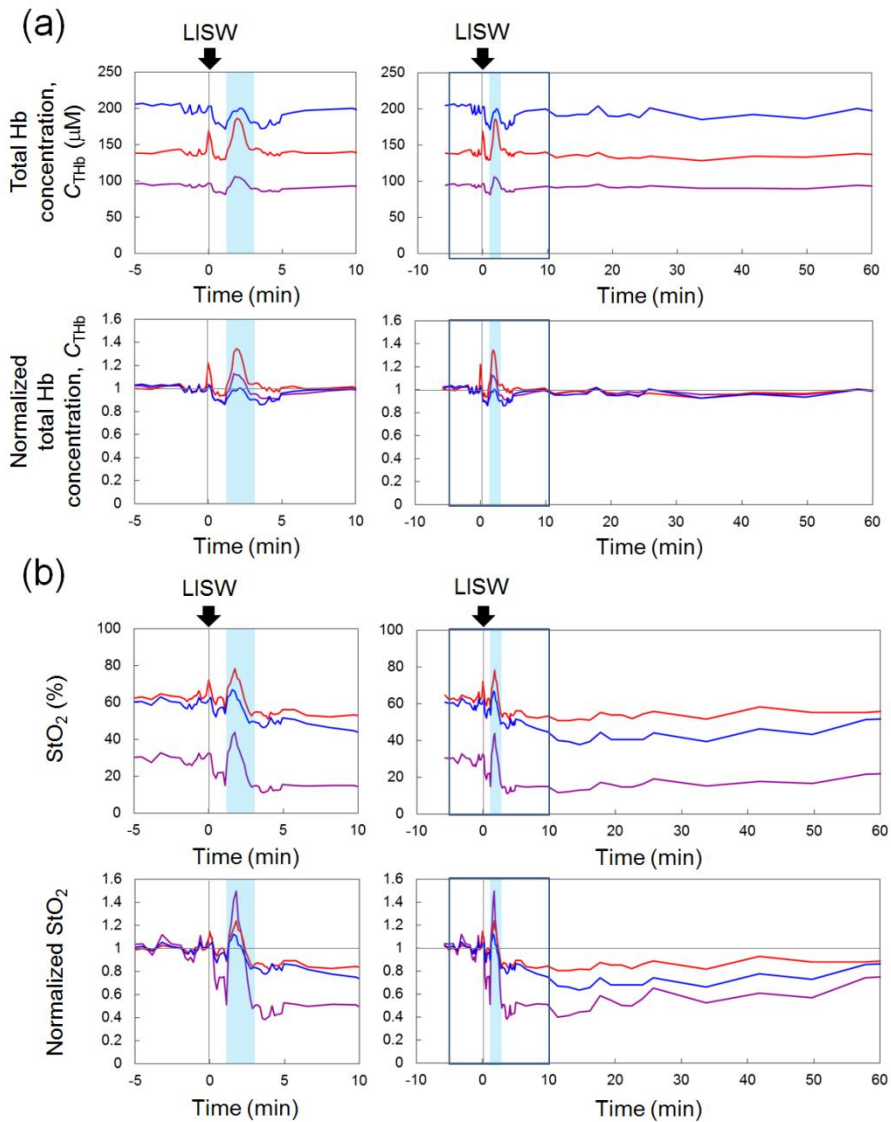
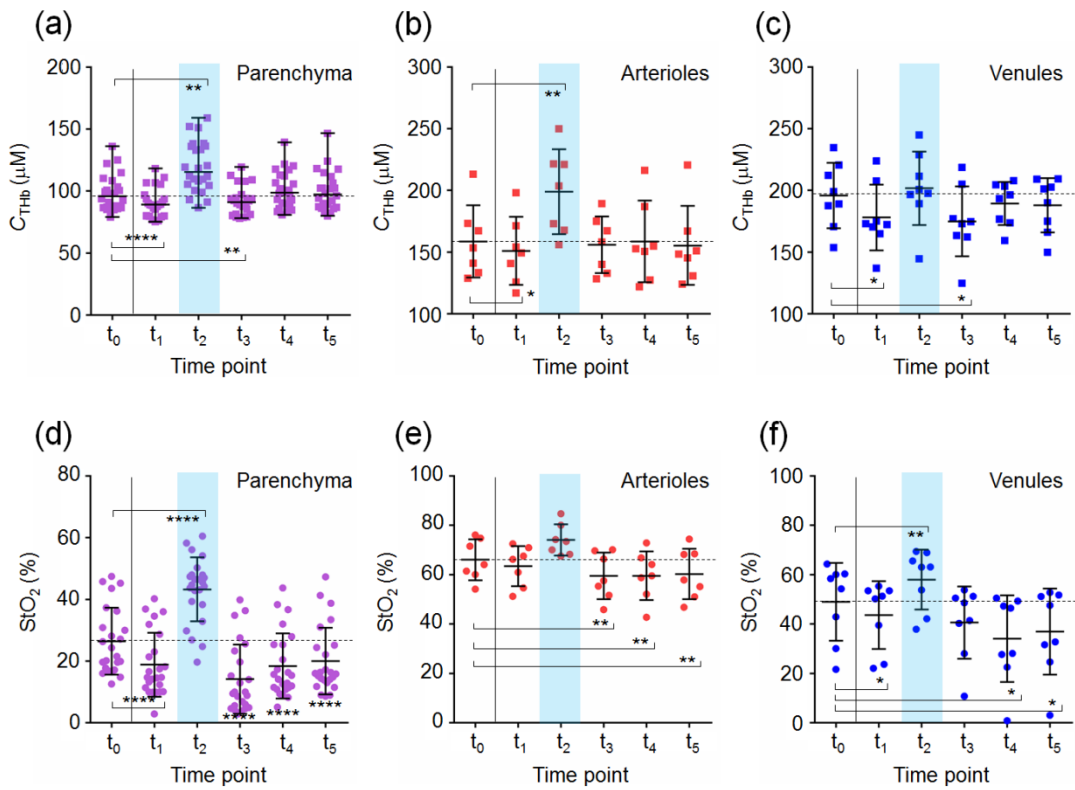


図5.7 LISW適用後の総ヘモグロビン量(a)と組織酸素飽和度(b)の変化: 脳実質, 細動脈, および細静脈の領域依存性を示す。
 Satoko Kawauchi, Wataru Okuda, Hiroshi Nawashiro, Shunichi Sato, Izumi Nishidate, "Multispectral imaging of cortical vascular and hemodynamic responses to a shock wave: observation of spreading depolarization and oxygen supply-demand mismatch," *J. Biomed. Opt.* 24(3), 1-17 (2019). doi: 10.1117/1.JBO.24.3.035005.



(g)

	t ₀	t ₁	t ₂	t ₃	t ₄	t ₅
SpO ₂ (%)	90.5±0.3	91.8±0.6	90.0±0.7	87.0±3.4	92.3±0.3	91.3±0.9

(Mean±SEM)

t ₀	t ₁	t ₂	t ₃	t ₄	t ₅
Before LISW application	Immediately after LISW application ¹	During CSD propagation ²	Immediately after CSD propagation	~ 20 min post-CSD	~ 50 min post-CSD

¹ time point just before CSD propagation

² time point when the arteriole reaches maximum diameter

図5.8 LISW適用後の脳実質、細動脈、および細静脈における総ヘモグロビン量 (a-c)と組織酸素飽和度(d-f)の変化(4例の結果)。

Satoko Kawauchi, Wataru Okuda, Hiroshi Nawashiro, Shunichi Sato, Izumi Nishidate, "Multispectral imaging of cortical vascular and hemodynamic responses to a shock wave: observation of spreading depolarization and oxygen supply-demand mismatch," *J. Biomed. Opt.* 24(3), 1-17 (2019). doi: 10.1117/1.JBO.24.3.035005.

第 6 章

結論

6.1 はじめに

本研究は、脳循環代謝異常と拡張性脱分極の発生を、非侵襲的かつリアルタイムに観察可能な拡散反射分光法を用い、ラット中枢神経疾患モデルを対象に病態を可視化し、結果に基づき疾患メカニズムを考察するとともに、光計測法の有用性を示した。本研究では、医学的・社会的背景から、虚血性脳梗塞と頭部外傷の病態観察をめざし、次の3つの動物モデルを用いて実験を行った。一つ目はラット全脳低酸素モデル(①)で、時間とともに脳組織バイアビリティーが低下するモデルである。これは脳組織が不可逆的変化に至る過程の基礎的データを提供した。二つ目は中大脳動脈閉塞によるラット局所脳虚血モデル(②)で、より実際の虚血性脳梗塞の病態に近いモデルとして使用した。三つ目はレーザー誘起衝撃波を用いたラット頭部外傷モデル(③)で、爆発に起因する軽症頭部外傷の現象解析をめざした。得られた拡散反射光データに基づき、血行動態と光散乱パラメータを算出するため、重回帰分析を用いた定量化法を提案し、これを解析に用いた(①と③)。各モデルの目的に合わせて光ファイバー計測および/またはイメージングを選択し、特徴的な病態を計測・可視化した。

6.2 総括

本研究による成果は以下のとおりである。

(1) 拡散反射光スペクトルに基づく血行動態と光散乱パラメータの算出(第2章)

モンテカルロシミュレーションと重回帰分析を用いて、拡散反射光スペクトルから組織の光吸収係数(血行動態パラメータ)と等価散乱係数(主として細胞の形態変化を反映)を定量評価する方法を提案し、組織ファントムを用いた実験により同法の妥当性を検証した。組織ファントムの光学定数の設定値と推定値の間に高い相関が得られ、提案法が対象試料の光学特性を評価するのに十分な性能を有することを示した。次に、同提案法を実際に、ラット脳を対象に計測した拡散反射光データ(光ファイバーを使用)に適用した。その結果、先行研究で観測されたバイアビリティー低下に伴う近赤外拡散反射光の三相性変化(増加-減少-増加)は、主として光散乱変化によるものであることが示された。この三相性光散乱変化は、拡張性脱分極(SD、ここでは無酸素性脱分極またはターミナル(終末)脱分極)によるものと考えられ、散乱変化は主として樹状突起とミトコンドリアの形態変化によるものと推察された。

(2) 脳組織バイアビリティー低下に伴う拡散反射光の時空間変化の解析(第3章)

上述した脳組織バイアビリティー低下に伴う三相性光散乱変化がSDによるものであることを考えると、同散乱変化は大脳皮質を伝搬する特性を持ち、光ファイバーで計測された三相性変化は現象全体の一部を捉えたにすぎないと推察された。そこで第3章では、ラット全脳低酸素モデルを対象に次の2つの検討を行った。まず拡散反射光の時空間変化につき調べるため、CCDを用いて経頭蓋骨的近赤外拡散反射光イメージングを行った。その

結果、低酸素開始から数分後、両側頭部の最外側局所に、SDの発生を示す反射光強度の増加領域が出現し、その領域が正中に向かって拡大する様子が観察された。同領域の拡大率は、再酸素化によるラットの生存率と関係した。次に、イメージングとファイバー計測の両者を同時に行い、信号変化を比較した。その結果、①脳組織バイアビリティーの低下を示す拡散反射光の変化は、イメージングでは三相性にならず、三相性変化はファイバー計測でのみ見られる現象であること、②ファイバーで計測される変化は、イメージングで捉える変化より早期に検出されることがわかった。両者の信号変化の違いは、計測深度の違いによるものと推察され、ラット大脳皮質の深さ依存的な解剖学的特性が関係していると思われた。両計測法を組み合わせることで、信頼性の高い脳組織バイアビリティーモニタリングが可能になると期待される。

(3) 虚血性脳梗塞における拡張性脱分極と梗塞進展のモニタリング (第4章)

第4章では、より実際の病態に近いラット局所脳虚血モデルを対象に、拡散反射光と脳血流の経頭蓋骨的同時イメージングを行い、梗塞領域(不可逆的壊死領域)と梗塞周辺領域で発生するSDを可視化できないか検討した。中大脳動脈閉塞後、虚血中心部辺縁局所において、SDの発生を示す拡散反射光の変化の波が繰り返し発生・伝搬し、その波の発生回数の増加とともに、虚血中心部周囲で反射光強度が増加した。虚血中心部内部の反射光強度も時間とともに増大し、強度が増加した領域は24時間後に梗塞になることが確認された。このような領域、すなわち反射光強度が増大し梗塞になった領域は、SDに伴う悪性の血流反応パターン(減少あるいは変化なし)と関係する一方、血流反応パターンが良性(増加あるいは減少後増加)であっても最終的に梗塞になることがわかった。これらの結果は、主として光散乱変化を反映する近赤外拡散反射光が、脳血流画像では捉えられない虚血後早期の組織損傷を検出し、梗塞領域を予測しうることを示唆している。以上より、近赤外拡散反射光イメージング法は、ラット局所脳虚血モデルにおけるSDの発生と早期の病変の進展を経頭蓋骨のかつリアルタイムにモニタリングするのに有用であることが示された。

(4) 衝撃波に起因する脳血行動態異常の可視化 (第5章)

第5章では、衝撃波曝露により脳で起きる現象を明らかにするため、レーザー誘起衝撃波を適用したラット脳のマルチスペクトルイメージングを行った。本実験では頭蓋骨を開窓し大脳皮質を直接観察した。得られた画像に基づき、衝撃波曝露後の脳表血管径の変化、細動脈、細静脈、および脳実質における局所総ヘモグロビン濃度と組織酸素飽和度の時空間変化を解析した。その結果、衝撃波の直接的かつ即時的作用により血行動態異常が発生し、これに続いてSDの発生と伝搬により血行動態異常が悪化する二段階の現象が観測された。また細動脈と細静脈では、衝撃波に対して全く異なる変化を示すことも明らかとなった。興味深いことに、SD伝搬後、乏血/細動脈の収縮とともに低酸素血症が観測されたが、その後乏血/細動脈の収縮が回復しても、低酸素血症は長時間持続することがわかった。こ

のことは、組織の酸素供給不足、および/または、酸素消費が過剰になっていることを示唆しており、明らかな酸素供給-需要のミスマッチが持続していることを示した。このような現象は細胞にダメージを与え、脳の二次的損傷を起こすものと推察された。

以上総括すると、拡散反射分光法は、脳組織の光吸収および光散乱特性変化をモニタリングでき、ラット中枢神経疾患モデルの脳循環代謝異常、拡張性脱分極の発生と伝搬、および組織の可逆・不可逆的变化を計測・可視化するのに有用である。

6.3 展望

本研究により得られた成果に基づき、今後の展望を以下に述べる。

(1) 心停止後の脳の生死判定

ラット全脳低酸素モデル (①) で見られた三相性光散乱変化は、SD によるものであり、脳の不可逆的变化に至る過程を示している。この変化は、近赤外光を用いて人脳においても非侵襲的かつリアルタイムに、かつベッドサイドで検出することが原理的に可能と考えられる。2018年にドイツ、シャリテ大学病院の J. P. Dreier 教授は、脳死患者9名の家族の同意のもと、生命維持装置停止後の脳波を記録し、血液循環が停止すると、間もなく脳波は平坦化し（電気生理学的機能停止）、数分後にターミナル（終末）SD が発生することを報告した[109]。そして SD の発生は、それ自体が脳の死を意味するのではないが、死に向かう変化の始まりであると述べた。脳の生死判定は、心停止後あるいは脳卒中後の患者救済のためだけでなく、心停止後の臓器提供の観点からも重要である。現在日本における脳死判定は、深い昏睡、瞳孔の散大と固定、脳幹反射の消失、平坦な脳波、自発呼吸の停止の5項目を行い、6時間以上経過した後と同じ検査をすることで、状態が変わらず不可逆であることを確認する。上述した近赤外光を用いた人脳の生死判定ができれば、脳死に関する客観的な指標を提供し、より早期の臓器移植の実現に寄与するかもしれない。

(2) SD の抑制をターゲットにした脳梗塞治療法の開発

虚血性脳梗塞では、梗塞周囲のペナンプラをいかに救済するかが重要であるが、ここで繰り返し発生する SD はペナンプラを悪化し、梗塞を拡大させると考えられている。そのため SD の抑制は、脳梗塞治療法開発において重要ターゲットのひとつとされている。本研究では、ラット局所脳虚血モデルを対象に、経頭蓋骨的近赤外拡散反射光イメージングを行い、SD の発生と梗塞の進展を可視化できることを示した。つまりこれを SD を抑制する治療実験に用いれば、SD の抑制とその梗塞縮小効果をリアルタイムに判定できる可能性がある。これは治療実験を大幅に加速する。SD を抑制できる薬剤には、細胞膜を安定化させる抗てんかん薬ガバペンチンやトピラマートがあり、これらが第一候補になりうる。一方、特定波長の可視～近赤外の光を低強度で組織に照射すると、ミトコンドリアの電子伝達反応が促進（ATP 産生が増大）され、血流が増大する効果があることが知られる

(Photobiomodulation) [110]。電子伝達系末端酵素であるシトクロム c オキシダーゼ (CcO) が光を吸収すると NO が光解離され、電子伝達が促進されて ATP 産生が増大すると考えられている。解離した NO は血管弛緩作用により血流を増大させると考えられる。すなわち photobiomodulation には、SD の抑制と梗塞の縮小効果が期待でき、上記イメージングはこの効果をリアルタイムに検出できる可能性がある。

(3) bTBI の病態とメカニズムの解明

レーザー誘起衝撃波を適用したラット脳のリアルタイム観察は、衝撃波による非常に複雑な脳の血行動態変化を明らかにした。本論文では、その現象の背景にある病態生理について考察し、いくつかの仮説について述べた。中でも重要なのが、衝撃波による細胞内カルシウム濃度の上昇とそれによる内皮細胞型一酸化窒素合成酵素 (eNOS) の活性化と NO の増加である。カルシウム濃度の上昇は、ミトコンドリアにおける活性酸素 (スーパーオキシドアニオン) の生成も促進する可能性があり、これは NO と容易に反応して毒性の強いパーオキシナイトライトを産生する。これら一連の反応は、その後の酸化ストレス、神経炎症、血液脳関門の破綻に関係する可能性があり、bTBI における重要な上流のイベントを意味している可能性がある。これらの仮説を検証するため、カルシウムイオンと NO に関する *in vivo* イメージングを行うことが重要と考えられる。あわせて同モデルの慢性期の組織学的・行動学的変化を調べることにより、軽症頭部爆傷の病態とメカニズムが解明されることが期待される。

本論文に関する業績

学術論文

1. Satoko Kawauchi, Izumi Nishidate, Yoichi Uozumi, Hiroshi Nawashiro, Hiroshi Ashida, and Shunichi Sato, “Diffuse light reflectance signals as potential indicators of loss of viability in brain tissue due to hypoxia: charge-coupled-device-based imaging and fiber-based measurement,” *Journal of Biomedical Optics*, Volume 18, 015003, 13 pages (2013).
2. Shunichi Sato, Satoko Kawauchi, Wataru Okuda, Izumi Nishidate, Hiroshi Nawashiro, and Gentaro Tsumatori, “Real-time optical diagnosis of the rat brain exposed to a laser-induced shock wave: observation of spreading depolarization, vasoconstriction and hypoxemia-oligemia,” *PLoS ONE*, Volume 9, Issue 1, e82891, 15 pages (2014).
3. Satoko Kawauchi, Izumi Nishidate, Hiroshi Nawashiro, and Shunichi Sato, “Near-infrared diffuse reflectance signals for monitoring spreading depolarizations and progression of the lesion in a male rat focal cerebral ischemia model,” *Journal of Neuroscience Research*, Volume 96, Issue 5, 875-888 (2017).
4. Satoko Kawauchi, Wataru Okuda, Hiroshi Nawashiro, Shunichi Sato, and Izumi Nishidate, “Multispectral imaging of cortical vascular and hemodynamic responses to a shock wave: observation of spreading depolarization and oxygen supply-demand mismatch,” *Journal of Biomedical Optics*, (Under review).

口頭発表（国際学会）

1. Satoko Kawauchi, Shunichi Sato, Izumi Nishidate, Satoru Takeuchi, Hiroshi Nawashiro, Hiroshi Ashida, “Real-time optical diagnosis of rat brain locally exposed to a shock wave,” *JSAP-OSA Joint Symposia 2012 (The 73rd JSAP Autumn Meeting 2012)*, Matsuyama, 2012.09
2. Satoko Kawauchi, Hideaki Iwazaki, Taiichiro Ida, Tomoya Hosaka, Yasushi Kawaguchi, Hiroshi Nawashiro, Shunichi Sato, “Real-time photoacoustic imaging of rat deep brain: hemodynamic responses to hypoxia,” *SPIE Photonics West 2013 Biomedical Optics*, San Francisco, 2013.02
3. Satoko Kawauchi, Shunichi Sato, Izumi Nishidate, Hiroshi Nawashiro, Hiroshi Ashida, “Generation of spreading depolarization and prolonged hypoxia in rat brain exposed to a laser-induced shock wave,” *SPIE Photonics West 2013 Biomedical Optics*, San Francisco, 2013.02
4. Satoko Kawauchi, Izumi Nishidate, Hiroshi Nawashiro, Shunichi Sato, “Diffuse-reflectance imaging of peri-infarct depolarization in a rat middle cerebral artery occlusion model,” *JSAP-OSA Joint Symposia 2013 (The 74th JSAP Autumn Meeting 2013)*, Kyotanabe, 2013.09
5. Satoko Kawauchi, Izumi Nishidate, Hiroshi Nawashiro, Shunichi Sato, “Near-infrared diffuse reflectance imaging of infarct core and peri-infarct depolarization in a rat middle cerebral artery

- occlusion model,” SPIE Photonics West 2013 Biomedical Optics, San Francisco, 2014.02
6. Satoko Kawauchi, Izumi Nishidate, Hiroshi Nawashiro, Shunichi Sato, “Simultaneous imaging of near-infrared diffuse reflectance and blood flow for a rat stroke model: pathophysiology analysis using light scattering signals,” SPIE Photonics West 2015 Biomedical Optics, San Francisco, 2015.02
 7. Satoko Kawauchi, Izumi Nishidate, Hiroshi Nawashiro, Shunichi Sato, “Combined imaging of near-infrared diffuse reflectance and cerebral blood flow for a rat stroke model: progression monitoring and differentiation of the lesion,” The 5th Asian and Pacific-Rim Symposium on Biophotonics (APBP'15), Yokohama, 2015.04
 8. Satoko Kawauchi, Izumi Nishidate, Hiroshi Nawashiro, Shunichi Sato, “Spatiotemporal characteristics of spreading depolarization, hypoxemia and vasoconstriction caused by a laser-induced shock wave in the rat brain,” SPIE Photonics West 2016 Biomedical Optics, San Francisco, 2016.02
 9. Satoko Kawauchi, Shunichi Sato, Izumi Nishidate, “Modification of pressure characteristics of laser-induced shock waves for blast-induced traumatic brain injury research,” Japan-US Forum on Blast Injury 2016 (JUFBI 2016), Tokyo, 2016.06
 10. Shunichi Sato, Satoko Kawauchi, Sakamaki Michiyo, Izumi Nishidate, Hiroshi Nawashiro, Gentaro Tsumatori, Motoyuki Jitsu, Miyai Kosuke, Yoshitaro Matsushita, Yasuo Mukai, “Laser-induced shock waves as a flexible tool for blast injury research: Study on mild blast-induced traumatic brain injury,” Japan-US Forum on Blast Injury 2016 (JUFBI 2016), Tokyo, 2016.06
 11. Shunichi Sato, Satoko Kawauchi, Izumi Nishidate, Hiroshi Nawashiro, “Diffuse reflectance spectroscopy for monitoring pathophysiology of stroke and traumatic brain injury,” Japan-Taiwan Medical Spectroscopy International Symposium, Awajishima, 2016.12
 12. Satoko Kawauchi, Michiyo Sakamaki, Chinami Onuma, Yukari Komuta, Izumi Nishidate, Kenichi Kaida, Hitoshi Tsuda, Shunichi Sato, “Assessment of oxidative stress on the rat brain exposed to a laser-induced shock wave,” Japan-US Forum on Blast Injury 2017 (JUFBI 2017), Tokyo, 2017.04
 13. Shunichi Sato, Satoko Kawauchi, Izumi Nishidate, “Characteristics, usefulness and limitations of laser-induced shock wave for blast injury research” Japan-US Forum on Blast Injury 2017 (JUFBI 2017), Tokyo, 2017.04
 14. Keiichiro Yoshida, Takuya Osawa, Satoko Kawauchi, Hiroshi Nawashiro, Izumi Nishidate, Shunichi Sato, “Effects of laser-induced shock wave impact to the brain and/or lungs in rats,” Japan-US Forum on Blast Injury 2017 (JUFBI 2017), Tokyo, 2017.04
 15. Satoko Kawauchi, Michiyo Sakamaki, Yukari Komuta, Chinami Onuma, Izumi Nishidate, Hitoshi Tsuda, Kenichi Kaida, Shunichi Sato, “Cortical spreading depolarization, pressure

distribution and oxidative stress in a rat brain exposed to a laser-induced shock wave,” 2017 Fourth Asian Conference on Defense Technology (ACDT), Tokyo, 2017.11-12

16. Satoko Kawauchi, Michiyo Sakamaki, Chinami Onuma, Yukari Komuta, Izumi Nishidate, Kenichi Kaida, Hitoshi Tsuda, Shunichi Sato, “Investigation of oxidative stress in the rat brain exposed to a laser-induced shock wave,” The 6th International Symposium on Energetic Materials and their Application (ISEM), Sendai, 2017.11
17. Satoko Kawauchi, Michiyo Sakamaki, Chinami Onuma, Yukari Komuta, Izumi Nishidate, Kenichi Kaida, Hitoshi Tsuda, Shunichi Sato, “Optical monitoring of acute physiological changes in a rat mild blast-induced traumatic brain injury model and its correlation with histopathological outcomes,” SPIE Photonics West 2018 Biomedical Optics, San Francisco, 2018.01-02

口頭発表（国内学会）

1. 川内聡子, 西舘泉, 苗代弘, 佐藤俊一, “脳組織バイアビリティーの指標としての拡散反射光の時空間変化” レーザー学会 第 437 回研究会（ニューロフォトニクス）, 東京, 2012.12
2. 川内聡子, “脳組織の生命活動指標としての拡散反射光による診断” PST-net 招待講演会, 東京, 2013.02
3. 川内聡子, 西舘泉, 苗代弘, 佐藤俊一, “拡散反射光による脳組織バイアビリティー診断: 拡延性脱分極の光計測とその意義” 計測自動制御学会ライフエンジニアリング部門シンポジウム, 横浜, 2013.09
4. 川内聡子, 西舘泉, 苗代弘, 佐藤俊一, “ラット局所脳梗塞モデルにおける梗塞巣および梗塞周辺脱分極の近赤外拡散反射光イメージング” 第 34 回日本レーザー医学会総会, 東京, 2013.11
5. 奥田航, 川内聡子, 芦田廣, 佐藤俊一, 西舘泉, “衝撃波曝露ラット脳における拡延性脱分極と持続性低酸素の光学的時空間的特性評価” 日本光学会年次学術講演会 Optics&Photonics Japan 2013, 奈良, 2013.11
6. 川内聡子, 西舘泉, 苗代弘, 佐藤俊一, “脳組織バイアビリティーの近赤外光イメージング: 拡延性脱分極可視化の有用性” レーザー学会第 452 回研究会「ニューロフォトニクス」, 東京, 2013.11
7. 川内聡子, 西舘泉, 苗代弘, 佐藤俊一, “ラット脳梗塞モデルにおける組織バイアビリティー診断のための近赤外拡散反射光イメージング” 第 11 回医用分光学研究会, 坂井, 2013.12
8. 奥田航, 川内聡子, 竹村俊哉, 苗代弘, 佐藤俊一, 西舘泉, “衝撃波曝露ラット脳のマルチスペクトルイメージングによるリアルタイム診断” 第 26 回日本脳循環代謝学会, 岡山, 2014.11

9. 川内聡子, 佐藤俊一, 西舘泉, 苗代弘, 竹村俊哉, “ラット脳梗塞モデルを用いた近赤外拡散反射光と脳血流の同時イメージング:光散乱信号の有用性” 第 35 回日本レーザー医学会総会, 東京, 2014.11
10. 川内聡子, 西舘泉, 苗代弘, 佐藤俊一, “脳梗塞の光学的病態イメージング” レーザー学会第 467 回研究会「ニューロフォトニクス」, 札幌, 2014.11
11. 川内聡子, 西舘泉, 苗代弘, 佐藤俊一, “拡散反射光イメージングによる脳梗塞の病態観察:可視と近赤外の比較” 第 13 回医用分光学研究会, 東京, 2015.12
12. 川内聡子, 西舘泉, 苗代弘, 佐藤俊一, “拡散反射光イメージングによるラット脳梗塞モデルのリアルタイム病態観察:可視光と近赤外光の比較” 第 37 回日本レーザー医学会総会, 旭川, 2016.10
13. 川内聡子, “中枢神経疾患と拡張性脱分極:病態との関わりと光イメージングの有用性” レーザー学会第 498 回研究会「ニューロフォトニクス」, 東京, 2016.11
14. 川内聡子, “拡散反射分光法によるラット中枢神経の病態リアルタイム観察” 第 21 回酸素ダイナミクス研究会, 東京, 2017.09
15. 川内聡子, 坂牧道代, 小牟田縁, 大沼千波, 西舘泉, 津田均, 海田賢一, 佐藤俊一, “レーザー誘起衝撃波を用いたラット頭部外傷モデル:酸化ストレスの評価” レーザー学会第 510 回研究会「ニューロフォトニクス」, 札幌, 2017.10
16. 川内聡子, 西舘泉, 苗代弘, 佐藤俊一, “拡散反射分光法を用いたラット中枢神経組織のリアルタイム病態観察” 第 15 回医用分光学研究会, 筑波, 2017.11

その他

1. 川内聡子, “脳組織バイアビリティーの光学的モニタリング” レーザー研究, 第 40 巻第 4 号, 236-240 (2012).
2. Satoko Kawauchi, Hideaki Iwazaki, Taiichiro Ida, Tomoya Hosaka, Yasushi Kawaguchi, Hiroshi Nawashiro, and Shunichi Sato, “Real-time photoacoustic imaging of rat deep brain: hemodynamic responses to hypoxia,” Proceedings of SPIE 8581, 85811R, 6 pages (2013).
3. 川内聡子, 西舘泉, 苗代弘, 佐藤俊一, “脳組織バイアビリティーの近赤外光イメージング:拡張性脱分極可視化の有用性” レーザー学会第 452 回研究会報告 (ニューロフォトニクス), 19-23 (2013).
4. 川内聡子, 西舘泉, 苗代弘, 佐藤俊一, “ラット脳梗塞モデルにおける梗塞巣および梗塞周辺脱分極の近赤外拡散反射光イメージング,” 日本レーザー医学会誌, 第 35 巻第 2 号, 125-131 (2014).
5. Satoko Kawauchi, Izumi Nishidate, Hiroshi Nawashiro, and Shunichi Sato, “Near-infrared diffuse reflectance imaging of infarct core and peri-infarct depolarization in a rat middle cerebral artery occlusion model,” Proceedings of SPIE, Volume 8928, 89280K, 6 pages (2014).
6. 川内聡子, 坂牧道代, 小牟田縁, 大沼千波, 西舘泉, 津田均, 海田賢一, 佐藤俊一, “レ

レーザー誘起衝撃波を用いたラット頭部外傷モデル:酸化ストレスの評価”レーザー学会第510回研究会報告 (ニューロフォトニクス), 11-15 (2017).

謝辞

本研究を行うにあたり、主指導教員として多大なご指導、ご助言をいただいた東京農工大学大学院生物システム応用科学府 西舘泉准教授に心から深く感謝の意を表します。

防衛医科大学校防衛医学研究センター生体情報・治療システム研究部門の佐藤俊一教授には、研究に関するご指導のみならず、常日頃より研究に対する心構えを教えていただき、心から感謝申し上げます。

東京農工大学の奥田航氏には、本研究の遂行にあたり多大なご協力、助言をいただき感謝申し上げます。

また同研究部門の角井泰之助教にも日頃から大変お世話になり、深くお礼申し上げます。同研究部門で研究補助をしてくださった大倉津矢子氏、坂牧道代氏、猪瀬比奈子氏、村松佑里子氏、幸野明美氏には、研究の多くの局面でサポートいただき感謝申し上げます。

東京農工大学の沢拓也氏、合志祐美子氏、稲葉将来氏、Roma Rani Sarker 氏には、日々の研究を支えていただき、心から感謝申し上げます。

最後に、大学院後期博士過程への進学を理解し、絶え間ない支援と協力をいただいた家族に深く感謝いたします。

参考文献

1. 浅野孝雄, 脳虚血の病態学 (中外医学社, 2003).
2. 森寿, 真鍋俊也, 渡辺雅彦, 岡野栄之, 宮川剛, 脳神経外科イラストレイテッド (羊土社, 2000)
3. D. L. Nelson and M. M. Cox, "Oxidative phosphorylation and photophosphorylation," in *Lehninger Principles of Biochemistry*, D. L. Nelson and M. M. Cox, eds. (Worth Publishers, 2000), pp. 659–673.
4. J. P. Dreier, "The role of spreading depression, spreading depolarization and spreading ischemia in neurological disease," *Nat. Med.* 17(4), 439-447 (2011).
5. C. Ayata, M. and Lauritzen, "Spreading depression, spreading depolarizations, and the cerebral vasculature," *Physiol. Rev.* 95(3),953-993 (2015).
6. A. A. P. Leão, "Spreading depression of activity in cerebral cortex," *J. Neurophysiol.* 7, 359-390 (1944).
7. C. Dohmen, O. W. Sakowitz, M. Fabricius, B. Bosche, T. Reithmeier, R. I. Ernestus, G. Brinker, J. P. Dreier, J. Woitzik, A. J. Strong, and R. Graf, Co-Operative Study of Brain Injury, "Spreading depolarizations occur in human ischemic stroke with high incidence," *Ann. Neurol.* 63, 720-728 (2008).
8. J. P. Dreier, J. Woitzik, M. Fabricius, R. Bhatia, S. Major, C. Drenckhahn, T. N. Lehmann, A. Sarrafzadeh, L. Willumsen, J. A. Hartings, O. W. Sakowitz, J. H. Seemann, A. Thieme, M. Lauritzen, and A. J. Strong, "Delayed ischaemic neurological deficits after subarachnoid haemorrhage are associated with clusters of spreading depolarizations," *Brain* 129, 3224 (2006).
9. M. Fabricius, S. Fuhr, R. Bhatia, M. Boutelle, P. Hashemi, A. J. Strong, and M. Lauritzen, "Cortical spreading depression and peri-infarct depolarization in acutely injured human cerebral cortex," *Brain* 129, 778 (2006).
10. A. J. Hansen, "Effect of anoxia on ion distribution in the brain," *Physiol. Rev.* 65(1), 101-148 (1985).
11. R. D. Andrew and B. A. MacVicar, "Imaging cell volume changes and neuronal excitation in the hippocampal slice," *Neuroscience.* 62(2), 371-383 (1994).
12. S. Bahar, D. Fayuk, G. G. Somjen, P. G. Aitken and D. A. Turner, "Mitochondrial and intrinsic optical signals imaged during hypoxia and spreading depression in rat hippocampal slices," *J. Neurophysiol.* 84(1), 311-324 (2000).
13. R. D. Andrew, C. R. Jarvis, and A. S. Obeidat, "Potential sources of intrinsic optical signals imaged in live brain slices," *Methods* 18(2),185-196 (1999).
14. P. van der Zee, "Measurement and modelling of the optical properties of human tissue in the near infrared," Ph.D. thesis (University College London), 266–269 (1992).

15. C. Ayata, "Spreading depression and neurovascular coupling," *Stroke* 44, S87-89 (2013).
16. A. N. Nielsen, M. Fabricius, and M. Lauritzen, "Scanning laser-Doppler flowmetry of rat cerebral circulation during cortical spreading depression," *J. Vasc. Res.* 37(6), 513-522 (2000).
17. C. Zhou, G. Yu, D. Furuya, J. Greenberg, A. Yodh, and T. Durduran, "Diffuse optical correlation tomography of cerebral blood flow during cortical spreading depression in rat brain," *Optics Express* 14, 1125-1144 (2006).
18. 厚生労働省, 平成 29 年 (2017) 人口動態統計月報年計 (概数) の概況
<https://www.mhlw.go.jp/toukei/saikin/hw/jinkou/geppo/nengai17/dl/h7.pdf>
19. K. A. Hossmann, "Viability thresholds and the penumbra of focal ischemia," *Ann. Neurol.* 36(4), 557-565 (1994).
20. "Tissue plasminogen activator for acute ischemic stroke. The National Institute of Neurological Disorders and Stroke rt-PA Stroke Study Group," *N. Engl. J. Med.* 333(24), 1581-1587 (1995).
21. N. Wahlgren et al., "Thrombolysis with alteplase 3-4.5 h after acute ischaemic stroke (SITS-ISTR): an observational study," *Lancet* 372(9646), 1303-1309 (2008).
22. U. Dirnagl and M. Endres, "Found in translation: preclinical stroke research predicts human pathophysiology, clinical phenotypes, and therapeutic outcomes," *Stroke* 45(5), 1510-1518 (2014).
23. G. G. Somjen, "Mechanisms of spreading depression and hypoxic spreading depression-like depolarization," *Physiol. Rev.* 81(3), 1065-1096 (2001).
24. M. Balestrino, "Pathophysiology of anoxic depolarization: new findings and a working hypothesis," *J. Neurosci. Methods* 59(1), 99-103 (1995).
25. K. A. Hossmann, "Periinfarct depolarizations," *Cerebrovasc. Brain Metab. Rev.* 8(3), 195-208 (1996).
26. J. Astrup, B. K. Siesjö, and L. Symon L, "Thresholds in cerebral ischemia - the ischemic penumbra," *Stroke* 12, 723-725 (1981).
27. U. Dirnagl, C. Iadecola, and M. A. Moskowitz, "Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view," *Trends Neurosci.* 22, 391-397 (1999).
28. R. M. Dijkhuizen, J. P. Beekwilder, H. B. van der Worp, J. W. Berkelbach van der Sprenkel, K. A. Tulleken, and K. Nicolay, "Correlation between tissue depolarizations and damage in focal ischemic rat brain," *Brain Res.* 840, 194-205 (1999).
29. J. A. Hartings, M. L. Rolli, X. C. Lu, and F. C. Tortella, "Delayed secondary phase of peri-infarct depolarizations after focal cerebral ischemia: relation to infarct growth and neuroprotection," *J. Neurosci.* 23, 11602-11610 (2003).
30. G. Mies, T. Iijima, and K. A. Hossmann, "Correlation between periinfarct DC shifts and ischaemic neuronal damage in rat," *Neuroreport* 4, 709-711 (1993).
31. 窪田愷, 頭部外傷を究める (永井書店, 2002).

32. Traumatic brain injury, MAYO CLINIC
<https://www.mayoclinic.org/diseases-conditions/traumatic-brain-injury/symptoms-causes/syc-20378557>
33. J. Mez, D. H. Daneshvar, P. T. Kiernan, B. Abdolmohammadi, V. E. Alvarez, B. R. Huber, M. L. Alosco, T. M. Solomon, C. J. Nowinski, L. McHale, K. A. Cormier, C. A. Kubilus, B. M. Martin, L. Murphy, C. M. Baugh, P. H. Montenegro, C. E. Chaisson, Y. Tripodis, N. W. Kowall, J. Weuve, M. D. McClean, R. C. Cantu, L. E. Goldstein, D. I. Katz, R. A. Stern, T. D. Stein, and A. C. McKee, "Clinicopathological evaluation of chronic traumatic encephalopathy in players of American Football," *JAMA* 318, 360-370 (2017).
34. B. I. Omalu, S. T. DeKosky, R. L. Minster, M. I. Kamboh, R. L. Hamilton, and C. H. Wecht, "Chronic traumatic encephalopathy in a National Football League player," *Neurosurgery* 57, 128-34 (2005).
35. Y. Bogdanova, and M. Verfaellie, "Cognitive sequelae of blast-induced traumatic brain injury: recovery and rehabilitation," *Neuropsychol. Rev.* 22(1), 4-20 (2012).
36. C. W. Hoge, D. McGurk, J. L. Thomas, A. L. Cox, C. C. Engel, and C. A. Castro, "Mild traumatic brain injury in U.S. Soldiers returning from Iraq," *N. Engl. J. Med.* 358(5), 453-463 (2008).
37. J. V. Rosenfeld, A. C. McFarlane, P. Bragge, R. A. Armonda, J. B. Grimes, and G. S. Ling, "Blast-related traumatic brain injury," *Lancet Neurol.* 12(9), 882-893 (2013).
38. S. B. Shively, and D. P. Perl, "Traumatic brain injury, shell shock, and posttraumatic stress disorder in the military--past, present, and future," *J. Head Trauma Rehabil.* 27(3), 234-239 (2012).
39. DoD Worldwide Numbers for TBI, Defense and Veterans Brain Injury Center
<https://dvbic.dcoe.mil/dod-worldwide-numbers-tbi>
40. I. Cernak, and L. J. Noble-Haeusslein, "Traumatic brain injury: an overview of pathobiology with emphasis on military populations," *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 30(2), 255-266 (2010).
41. I. Cernak I, D. G. Stein, G. A. Elder, S. Ahlers, K. Curley, R. G. DePalma, J. Duda, M. Ikonovic, G. L. Iverson, F. Kobeissy, V. E. Koliatsos, M. J. Leggieri Jr, A. M. Pacifico, D. H. Smith, R. Swanson, F. J. Thompson, and F. C. Tortella, "Preclinical modelling of militarily relevant traumatic brain injuries: Challenges and recommendations for future directions," *Brain Inj.* 31(9), 1168-1176 (2017).
42. S. Sato, S. Kawauchi, W. Okuda, I. Nishidate, H. Nawashiro, and G. Tsumatori, "Real-time optical diagnosis of the rat brain exposed to a laser-induced shock wave: observation of spreading depolarization, vasoconstriction and hypoxemia-oligemia," *PLoS One* 9(1), e82891 (2014).
43. 電気学会 次世代バイオメディカル・レーザ応用技術調査専門委員会, バイオメディカ

44. Optical absorption of hemoglobin, Oregon Medical Laser Center
<http://omlc.org/spectra/hemoglobin>
45. P. van der Zee, M. Essenpreis, and D. T. Delpy, "Optical properties of brain tissue," Proc. SPIE 1888, 454-465 (1993).
46. G. J. del Zoppo, "Stroke and neurovascular protection," N. Engl. J. Med. 354, 553-555 (2006).
47. S. Kawauchi, S. Sato, H. Ooigawa, H. Nawashiro, M. Ishihara and M. Kikuchi, "Simultaneous measurement of changes in light absorption due to the reduction of cytochrome c oxidase and light scattering in rat brains during loss of tissue viability," Appl. Opt. 47(22), 4164-4176 (2008).
48. S. Kawauchi, S. Sato, H. Ooigawa, H. Nawashiro, M. Ishihara and M. Kikuchi, "Light scattering change precedes loss of cerebral adenosine triphosphate in a rat global ischemic brain model," Neurosci. Lett. 459(3), 152-156 (2009).
49. S. Kawauchi, S. Sato, Y. Uozumi, H. Nawashiro, M. Ishihara and M. Kikuchi, " Light-scattering signal may indicate critical time zone to rescue brain tissue after hypoxia," J. Biomed. Opt. 16(2), 027002 (8 pages) (2011).
50. D. C. Wharton and A. Tzagoloff, "Studies on the electron transfer system LVII. The near infrared absorption band of cytochrome oxidase," J. Biol. Chem. 239, 2036-2041 (1964).
51. I. Nishidate, Y. Aizu and H. Mishina, "Estimation of melanin and hemoglobin in skin tissue using multiple regression analysis aided by Monte Carlo simulation," J. Biomed. Opt. 9(4), 700-710 (2004).
52. S. Kawauchi, I. Nishidate, Y. Uozumi, H. Nawashiro, H. Ashida, and S. Sato, "Diffuse light reflectance signals as potential indicators of loss of viability in brain tissue due to hypoxia: charge-coupled-device-based imaging and fiber-based measurement," J. Biomed. Opt. 18(1), 15003 (2013).
53. J. R. Mourant, J. P. Freyer, A. H. Hielscher, A. A. Eick, D. Shen and T. M. Johnson, "Mechanisms of light scattering from biological cells relevant to noninvasive optical-tissue diagnostics," Appl. Opt. 37(16), 3586-3593 (1998).
54. V. Tuchin, Tissue Optics: Light Scattering Methods and Instruments for Medical Diagnosis, 2nd ed., SPIE Press, Bellingham (2007).
55. L. Wang, S. L. Jacques and L. Zheng, "MCML--Monte Carlo modeling of light transport in multi-layered tissues," Comput. Methods Programs Biomed. 47(2), 131-146 (1995).
56. S. A. Prahl, Tabulated molar extinction coefficient for hemoglobin in water, see
<http://omlc.ogi.edu/spectra/hemoglobin/summary.html>(1999)
57. M. Firbank, M. Hiraoka, M. Essenpreis and D. T. Delpy, "Measurement of the optical properties of the skull in the wavelength range 650-950 nm," Phys. Med. Biol. 38(4), 503-510 (1993).

58. H. J. van Staveren, C. J. M. Moes, J. van Marle, S. A. Prahl and M. J. C. van Gemert, "Light scattering in Intralipid-10% in the wavelength range of 400-1100 nm," *Appl. Opt.* 30(31), 4507-4514 (1991).
59. T. M. Polischuk, C. R. Jarvis and R. D. Andrew, "Intrinsic optical signaling denoting neuronal damage in response to acute excitotoxic insult by domoic acid in the hippocampal slice," *Neurobiol. Dis.* 4(6), 423-437 (1998).
60. T. H. Murphy, P. Li, K. Betts and R. Liu, "Two-photon imaging of stroke onset in vivo reveals that NMDA-receptor independent ischemic depolarization is the major cause of rapid reversible damage to dendrites and spines," *J. Neurosci.* 28(7), 1756-1772 (2008).
61. L. W. Swanson, "VII. Atlas of 73 Transverse Levels," in *Brain Maps: Structure of the Rat Brain* 2nd Revised Edition, L. W. Swanson, Eds., pp. 94-110, Elsevier, Amsterdam (1998).
62. J. S. Dam, C. B. Pedersen, T. Dalgaard, P. E. Fabricius, P. Aruna and S. Andersson-Engels, "Fiber-optic probe for noninvasive real-time determination of tissue optical properties at multiple wavelengths," *Appl. Opt.* 40(7), 1155-1164 (2001).
63. A. A. P. Leão, "Further observations on the spreading depression of activity in the cerebral cortex," *J. Neurophysiol.* 10(6), 409-414 (1947).
64. J. P. Dreier, and C. Reiffurth, "The stroke-migraine depolarization continuum," *Neuron* 86, 902-922 (2015).
65. J. A. Hartings, C. W. Shuttleworth, S. A. Kirov, C. Ayata, J. M. Hinzman, B. Foreman, R. D. Andrew, M. G. Boutelle, K. C. Brennan, A. P. Carlson, M. A. Dahlem, C. Drenckhahn, C. Dohmen, M. Fabricius, E. Farkas, D. Feuerstein, R. Graf, R. Helbok, M. Lauritzen, S. Major, A. I. Oliveira-Ferreira, F. Richter, E. S. Rosenthal, O. W. Sakowitz, R. Sánchez-Porrás, E. Santos, M. Schöll, A. J. Strong, A. Urbach, M. B. Westover, M. K. Winkler, O. W. Witte, J. Woitzik, and J. P. Dreier, "The continuum of spreading depolarizations in acute cortical lesion development: Examining Leão's legacy," *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 37, 1571-1594 (2017).
66. H. K. Shin, A. K. Dunn, P. B. Jones, D. A. Boas, M. A. Moskowitz, and C. Ayata, "Vasoconstrictive neurovascular coupling during focal ischemic depolarizations," *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 26, 1018-1030 (2006).
67. S. Kawauchi, I. Nishidate, H. Nawashiro, S. Sato, "Near-infrared diffuse reflectance signals for monitoring spreading depolarizations and progression of the lesion in a male rat focal cerebral ischemia model," *J. Neurosci. Res.* 96, 875-888 (2017).
68. D. Abookasis, C. C. Lay, M. S. Mathews, M. E. Linskey, R. D. Frostig, and B. J. Tromberg, "Imaging cortical absorption, scattering, and hemodynamic response during ischemic stroke using spatially modulated near-infrared illumination," *J. Biomed. Opt.* 14, 024033 (2009).

69. Chen S, Feng Z, Li P, Jacques SL, Zeng S, Luo Q. 2006. In vivo optical reflectance imaging of spreading depression waves in rat brain with and without focal cerebral ischemia. *J Biomed Opt* 11:034002.
70. Dunn AK, Bolay H, Moskowitz MA, Boas DA. 2001. Dynamic imaging of cerebral blood flow using laser speckle. *J Cereb Blood Flow Metab* 21:195-201.
71. Jones PB, Shin HK, Boas DA, Hyman BT, Moskowitz MA, Ayata C, Dunn AK. 2008. Simultaneous multispectral reflectance imaging and laser speckle flowmetry of cerebral blood flow and oxygen metabolism in focal cerebral ischemia. *J Biomed Opt* 13:044007.
72. Nakamura H, Strong AJ, Dohmen C, Sakowitz OW, Vollmar S, Sué M, Kracht L, Hashemi P, Bhatia R, Yoshimine T, Dreier JP, Dunn AK, Graf R. 2010. Spreading depolarizations cycle around and enlarge focal ischaemic brain lesions. *Brain* 133:1994-2006.
73. Heiss WD, Rosner G. 1983. Functional recovery of cortical neurons as related to degree and duration of ischemia. *Ann Neurol* 14:294-301.
74. Memezawa H, Smith ML, Siesjö BK. 1992. Penumbra tissues salvaged by reperfusion following middle cerebral artery occlusion in rats. *Stroke* 23:552-559.
75. Kudo K, Zhao L, Nowak TS Jr. 2016. Peri-infarct depolarizations during focal ischemia in the awake Spontaneously Hypertensive Rat. Minimizing anesthesia confounds in experimental stroke. *Neuroscience* 325:142-152.
76. Higuchi T, Takeda Y, Hashimoto M, Nagano O, Hirakawa M. 2002. Dynamic changes in cortical NADH fluorescence and direct current potential in rat focal ischemia: relationship between propagation of recurrent depolarization and growth of the ischemic core. *J Cereb Blood Flow Metab* 22:71-79.
77. Takeda Y, Zhao L, Jacewicz M, Pulsinelli WA, Nowak TS Jr. 2011. Metabolic and perfusion responses to recurrent peri-infarct depolarization during focal ischemia in the Spontaneously Hypertensive Rat: dominant contribution of sporadic CBF decrements to infarct expansion. *J Cereb Blood Flow Metab* 31:1863-1873.
78. Risher WC, Ard D, Yuan J, Kirov SA. 2010. Recurrent spontaneous spreading depolarizations facilitate acute dendritic injury in the ischemic penumbra. *J Neurosci* 30:9859-9568.
79. Fayuk D, Aitken PG, Somjen GG, Turner DA. 2002. Two different mechanisms underlie reversible, intrinsic optical signals in rat hippocampal slices. *J Neurophysiol* 87: 1924-1937.
80. Aitken PG, Fayuk D, Somjen GG, Turner DA. 1999. Use of intrinsic optical signals to monitor physiological changes in brain tissue slices. *Methods* 18:91-103.
81. Jarvis CR, Lilje L, Vipond GJ, Andrew RD. 1999. Interpretation of intrinsic optical signals and calcein fluorescence during acute excitotoxic insult in the hippocampal slice. *Neuroimage* 10:357-372.

82. A. J. Strong, P. J. Anderson, H. R. Watts, D. J. Virley, A. Lloyd, E. A. Irving, T. Nagafuji, M. Ninomiya, H. Nakamura, A. K. Dunn, and R. Graf, "Peri-infarct depolarizations lead to loss of perfusion in ischaemic gyrencephalic cerebral cortex," *Brain* 130, 995-1008 (2007).
83. T. Kumagai, M. Walberer, H. Nakamura, H. Endepols, M. Sué, S. Vollmar, S. Adib, G. Mies, T. Yoshimine, M. Schroeter, and R. Graf, "Distinct spatiotemporal patterns of spreading depolarizations during early infarct evolution: evidence from real-time imaging," *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 31, 580-592 (2011).
84. J. Woitzik, N. Hecht, A. Pinczolits, N. Sandow, S. Major, M. K. Winkler, S. Weber-Carstens, C. Dohmen, R. Graf, A. J. Strong, J. P. Dreier, and P. Vajkoczy; COSBID study group, "Propagation of cortical spreading depolarization in the human cortex after malignant stroke," *Neurology* 80, 1095-1102 (2013).
85. J. Luckl, C. Zhou, T. Durduran, A. G. Yodh, and J. H. Greenberg, "Characterization of periinfarct flow transients with laser speckle and Doppler after middle cerebral artery occlusion in the rat," *J. Neurosci. Res.* 87, 1219-1229 (2009).
86. Z. Bere, T. P. Obrenovitch, G. Kozák, F. Bari, and E. Farkas, "Imaging reveals the focal area of spreading depolarizations and a variety of hemodynamic responses in a rat microembolic stroke model," *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 34, 1695-1705 (2014).
87. O. U. Scremin, "Cerebral vascular system" In G Paxinos (Ed.), *The rat nervous system* (pp. 1167-1201). Amsterdam:Elsevier (2004).
88. I. Sukhotinsky, E. Dilekoz, M. A. Moskowitz, and C. Ayata, "Hypoxia and hypotension transform the blood flow response to cortical spreading depression from hyperemia into hypoperfusion in the rat," *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 28, 1369-1376 (2008).
89. M. Schueler, W. L. Neuhuber, R. De Col, and K. Messlinger, "Innervation of rat and human dura mater and pericranial tissues in the parieto-temporal region by meningeal afferents," *Headache* 54(6), 996-1009 (2014).
90. C. M. Peppiatt, C. Howarth, P. Mobbs, and D. Attwell, "Bidirectional control of CNS capillary diameter by pericytes," *Nature* 443(7112), 700-704 (2006).
91. N. B. Hamilton, D. Attwell, and C. N. Hall, "Pericyte-mediated regulation of capillary diameter: a component of neurovascular coupling in health and disease," *Front. Neuroenergetics* 2, (2010) [doi: 10.3389/fnene.2010.00005].
92. M. Yemisci, Y. Gursoy-Ozdemir, A. Vural, A. Can, K. Topalkara, and T. Dalkara, "Pericyte contraction induced by oxidative-nitrative stress impairs capillary reflow despite successful opening of an occluded cerebral artery," *Nat. Med.* 15(9), 1031-1037 (2009).
93. S. Chen, Y. Chen, L. Xu, N. Matei, J. Tang, H. Feng, and J. Zhang, "Venous system in acute brain injury: Mechanisms of pathophysiological change and function," *Exp. Neurol.* 272, 4-10 (2015).

94. R. Ravin, P. S. Blank, B. Busse, N. Ravin, S. Vira, L. Bezrukov, H. Waters, H. Guerrero-Cazares, A. Quinones-Hinojosa, P. R. Lee, R. D. Fields, S. M. Bezrukov, and J. Zimmerberg, "Blast shockwaves propagate Ca²⁺ activity via purinergic astrocyte networks in human central nervous system cells," *Sci. Rep.* 6, 25713 (2016) [doi: 10.1038/srep25713].
95. R. Ravin, P. S. Blank, A. Steinkamp, S. M. Rappaport, N. Ravin, L. Bezrukov, H. Guerrero-Cazares, A. Quinones-Hinojosa, S. M. Bezrukov, and J. Zimmerberg, "Shear forces during blast, not abrupt changes in pressure alone, generate calcium activity in human brain cells," *PLoS One* 7(6), e39421 (2012) [doi: 10.1371/journal.pone.0039421].
96. J. L. Balligand, O. Feron, and C. Dessy, "eNOS activation by physical forces: from short-term regulation of contraction to chronic remodeling of cardiovascular tissues," *Physiol. Rev.* 89(2), 481-534 (2009).
97. P. S. Brookes, Y. Yoon, J. L. Robotham, M. W. Anders, and S. S. Sheu. "Calcium, ATP, and ROS: a mitochondrial love-hate triangle," *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 287(4), C817-833 (2004).
98. P. Pacher, J. S. Beckman, and L. Liaudet, "Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease," *Physiol. Rev.* 87(1), 315-424 (2007).
99. L. Edvinsson, E. D. Högestätt, R. Uddman, and L. M. Auer, "Cerebral veins: fluorescence histochemistry, electron microscopy, and in vitro reactivity," *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 3(2), 226-230 (1983).
100. C. de Wit, B. Hoepfl, and S. E. Wölfle, "Endothelial mediators and communication through vascular gap junctions," *Biol. Chem.* 387(1), 3-9 (2006).
101. T. Horiuchi, H. H. Dietrich, K. Hongo, and R. G. Dacey Jr, "Mechanism of extracellular K⁺-induced local and conducted responses in cerebral penetrating arterioles," *Stroke* 33(11), 2692-2699 (2002).
102. K. C. Brennan, L. Beltrán-Parrázal, H. E. López-Valdés, J. Theriot, A. W. Toga, and A. C. Charles, "Distinct vascular conduction with cortical spreading depression," *J. Neurophysiol.* 97(6), 4143-4151 (2007).
103. M. J. Cipolla, "The Cerebral Circulation, Second Edition," in *Colloquium Series on Integrated Systems Physiology: From Molecule to Function to Disease*, D. N. Granger, and J. P. Granger, Eds., Morgan & Claypool Life Sciences, San Rafael, CA (2006).
104. P. S. Tsai, J. P. Kaufhold, P. Blinder, B. Friedman, P. J. Drew, H. J. Karten, P. D. Lyden, and D. Kleinfeld, "Correlations of neuronal and microvascular densities in murine cortex revealed by direct counting and colocalization of nuclei and vessels," *J. Neurosci.* 29(46), 14553-14570, 2009.
105. P. Hashemi, R. Bhatia, H. Nakamura, J. P. Dreier, R. Graf, A. J. Strong, and M. G. Boutelle, "Persisting depletion of brain glucose following cortical spreading depression, despite apparent

- hyperaemia: evidence for risk of an adverse effect of Leão's spreading depression," *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 29(1), 166-175 (2009).
106. S. Rehncrona, "Brain acidosis," *Ann. Emerg. Med.* 14(8), 770-776 (1985).
107. G. Marchal, A. R. Young, and J. C. Baron, "Early postischemic hyperperfusion: pathophysiologic insights from positron emission tomography," *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 19(5), 467-82 (1999).
108. A. Nakagawa, G. T. Manley, A. D. Gean, K. Ohtani, R. Armonda, A. Tsukamoto, H. Yamamoto, K. Takayama, and T. Tominaga, "Mechanisms of primary blast-induced traumatic brain injury: insights from shock-wave research," *J. Neurotrauma* 28(6), 1101-1119 (2011).
109. J. P. Dreier, S. Major, B. Foreman, M. K. L. Winkler, E. J. Kang, D. Milakara, C. L. Lemale, V. DiNapoli, J. M. Hinzman, J. Woitzik, N. Andaluz, A. Carlson, and J. A. Hartings, "Terminal spreading depolarization and electrical silence in death of human cerebral cortex," *Ann. Neurol.* 83(2), 295-310 (2018).
110. M. R. Hamblin, "Low-Level Light Therapy: Photobiomodulation," SPIE Press (2018).

