

# 脳と光と遺伝子と—脳灌流モデル

超分子分光研究分野 野村保友, 田村 守

超分子分光分野では「脳と光と遺伝子と」というテーマで遺伝子や細胞レベルから個体まで生体が営む多彩な機能を光学技術を武器にして分子生物学的手法を組み合わせ、脳などの生体組織にターゲットを絞って、脳機能発現の分子的基盤を明らかにするために研究している。その目的に対して 3 つの大きな研究課題がある。(1) 脳の高次機能に注目した光 CT、(2) 脳に代表される生体組織での核酸の単一分子検出と相関分光法の開発、(3) 脳組織の酸素代謝と遺伝子発現。

## 1 はじめに

3 つの研究課題の内容を要約すると、(1) の研究はヒトの高次脳機能の解析を目指した研究で、多チャンネルの近赤外生体分光装置を用いて種々の精神活動の機能の局在及びそれらの相互関係を明らかにすることである。(2) の蛍光相関分光法はフェムトリットル以下の微小領域で一個から数個の分子を検出し、その動的挙動を追うことができる。このことを利用して DNA の一分子検出が可能なので、脳神経系において各種刺激に対する特定遺伝子の誘導を生きたままの単一細胞内で追跡したいというものである。(3) では当研究室が開発した生体組織中の酸素濃度を連続的に追跡できる無侵襲近赤外生体分光法を用いて、組織中の酸素濃度を測定しながら特定の遺伝子の誘導を明らかにすることを目指している。本稿では(3)の研究の中で、最近確立した脳灌流モデルについて記述する。

脳組織は頭蓋骨に守られ、その構造が破壊されると直ちに機能を失う。従って、脳機能を解明する上で、生きたまま組織の破壊を伴わない研究手段が必須である。近赤外領域の光は生体組織を比較的良好に透過する。またこの領域で特徴的な吸収スペクトルをもつ内在色素は酸素代謝に関与したヘモグロビン、ミオグロビンやチトクロームオキシダーゼに限られる。血液の代わりにヘモグロビンを含まない白い人工血液を用いると、ミオグロビンを元来含まない脳組織ではチトクロームオ

キシダーゼの吸収だけが残るため、その光学測定に適したサンプルになる。脳の正常な機能はほぼ全面的にミトコンドリアでの酸化的リン酸化で生成した ATP に依存しており、脳機能と酸素代謝は不可分の関係にある。しかし酸素濃度を厳密に制御して脳機能を評価した研究は非常に少ない。灌流技術はさまざまな臓器、特に心臓や肝臓へうまく応用されている。一方、哺乳類の脳機能の循環系に対する依存性が知られているにもかかわらず、循環系から独立させた灌流脳の研究は他の灌流臓器に比べて著しく遅れている。灌流脳モデルの作製は古くから試みられ、脳波及び代謝系の応答など多くの問題が指摘されてきた。我々は灌流前の全身管理、低体温、バイパスカニューレーションなどの工夫によってそれらを改善した。本稿ではこのモデルの詳細と研究例を示す。この実験モデルによって高度に分化した脳の組織構築を破壊することなく、循環系を独立させたインタクトな脳組織に対して外部より各種条件を制御できるようになった。このラット灌流脳モデルは哺乳類の脳の多彩な機能の分子的基盤を生化学的に解析するための優れた実験モデルである。

## 2 実験

### 2.1 プレパレーション

図 1 に示したようにあらかじめ頸動脈管以外の血管を結紮した後で、左右の総頸動脈にバイパ

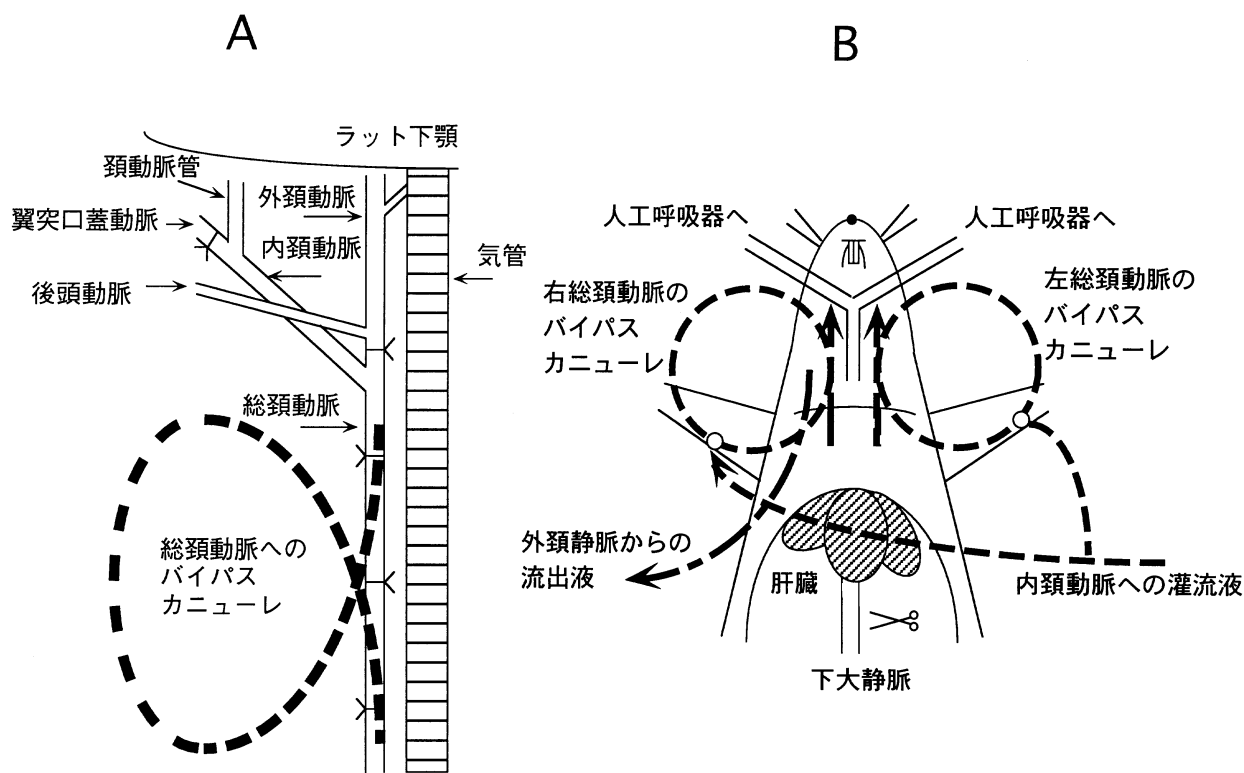


図1 プレパレーションの模式図 A 右側頸動脈処理 下顎から胸までの部分を腹側から見た様子。点線はバイパスルート、Y印は結紮あるいはカニユーレ固定場所を示す。左頸動脈も同様に処理する。B 灌流直前のラット。

スカニュレーションを行い、脳への血流が途絶えないようにする。流出口を確保してから、灌流圧に注意しながら灌流を開始する。このようにたれ流しの開放灌流を始めると血液が灌流されないために数分で拍動を停止する。流出口にカニュレーションすると脳を灌流した液を集めることができる。ポイントはプレパレーション中の出血を極力減らし、生理食塩水を輸液するなどして血圧を維持することとヘパリンなどの抗凝固剤は必要最小限にとどめるである。灌流用の人工血液フルオロカーボン（ミドリ十字）は2ミクロンのフィルターで濾過し、95%酸素+5%二酸化炭素の混合ガスでバブリングした好気用灌流液と95%窒素+5%二酸化炭素の嫌気用灌流液の2種類を用意し必要に応じて混合する[6]。

## 2.2 光学測定

好気嫌気差スペクトルはファイバー型の分光光度計（大塚電子 MCPD2000）を用いて好気灌流時のスペクトルをベースラインとして嫌気灌流時

のスペクトルを記録した。吸光度差の経時変化はフィルター型四波長分光光度計（ユニソク）を用いて測定した。

## 2.3 脳波測定

露出した頭蓋骨の頭頂部にくぼみを作り、脳波計（日電三栄 11A92）を用いて銀ボール電極からバイポーラで記録した。実験装置は図2のように配置した。

## 3 結果と考察

### 3.1 灌流脳の評価

図3は灌流脳の好気嫌気差スペクトルである。散乱系で測定しているので短波長側ではスペクトルが平坦化しているが、550 nm のチトクローム *c* のピーク、564 nm のチトクローム *b* の肩、605 nm のチトクロームオキシダーゼの酸化還元中心の一つ heme *a*+*a*<sub>3</sub> のピークが現れ、ミトコンド

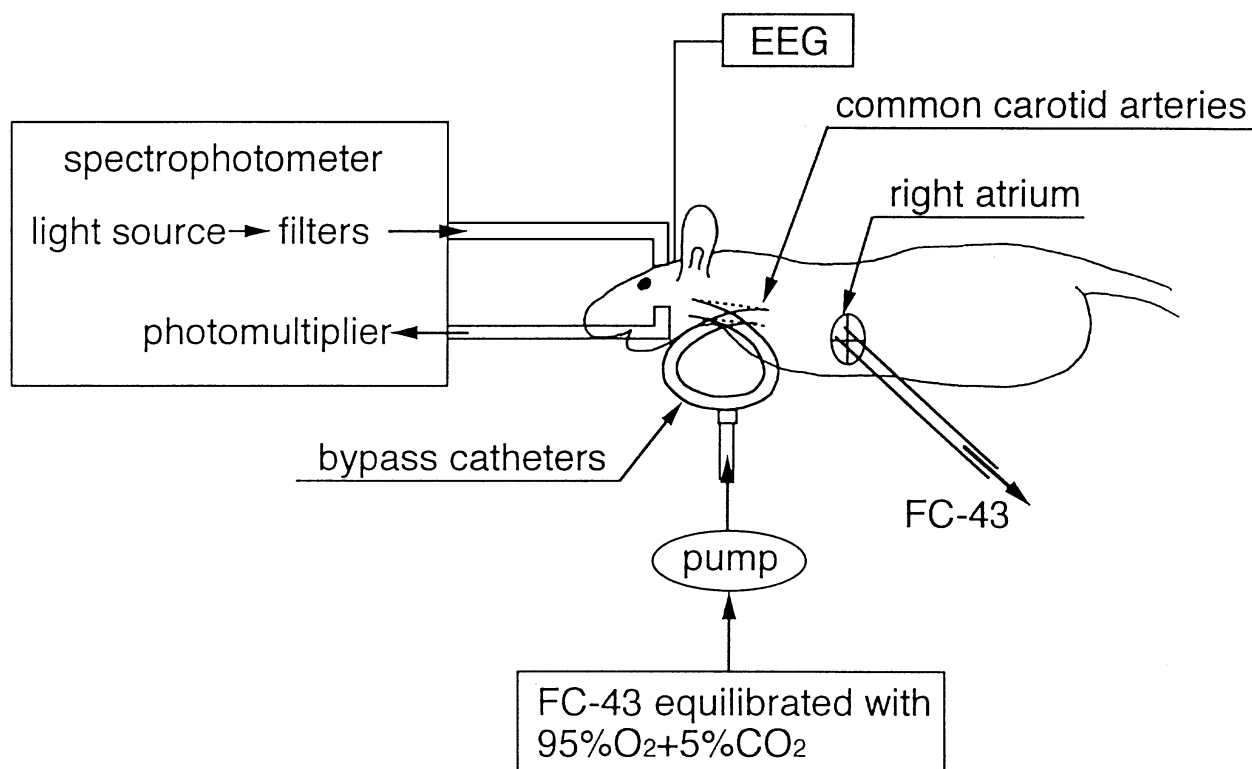


図2 ラット灌流脳実験の模式図 心臓が停止したラット脳ではポンプによって灌流液が人工的に循環した。灌流脳の神経活動は脳波によってモニターし、ファイバー型の分光光度計によってチトクロームオキシダーゼの酸化還元状態を連続的に測定した。

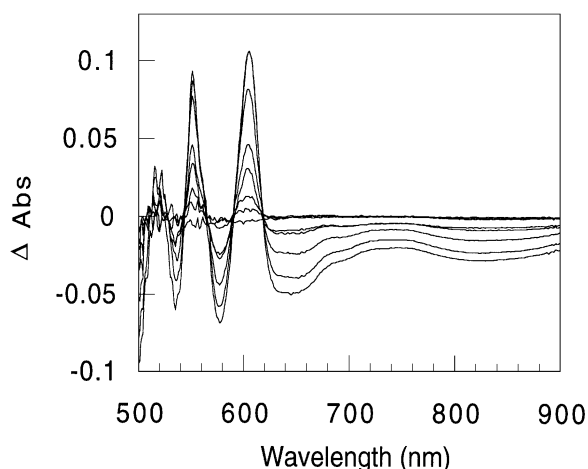


図3 灌流脳の500-900 nmの好気嫌気差スペクトル  
チトクロームの特徴的な吸収スペクトルが現れた。

リア懸濁液の差スペクトルとよく似ている。チトクロームオキシダーゼのもう一つの酸化還元中心であるCuAに由来する830 nmのブロードなバンドがある。この場合好気状態をベースラインにしているので、酸化型の吸収ピークは逆向きに出る。このように可視領域はもちろん近赤外領域に

も760 nmのデオキシヘモグロビンの吸収ピークがなくヘモグロビンの影響は受けていない。従って605-620 nmの吸光度差でheme  $a+a_3$ が、780-830 nmの吸光度差でCuAの酸化還元挙動がモニターできる。*in vitro*のデータからはheme  $a+a_3$ はミトコンドリアのエネルギー状態に、CuAは細胞内の酸素濃度に依存することが分かっている[2]。図4は自発脳波の温度依存性を示している。30度以下では灌流前と同様の脳波が現れるが、体温と同じ37度では脳波は平坦化した。30度では脳波は5時間以上安定しているが、その後周期の長い徐波が増えてきた。このようにミトコンドリアの酸化還元状態を光学測定するのに適した急性実験モデルである[1]。

### 3.2 チトクロームオキシダーゼの酸化還元挙動のエネルギー依存性

図5は酸化還元挙動のエネルギー依存性を示している。好気灌流時、灌流停止後の早い還元後、遅い還元後、完全還元の四段階で灌流脳を液

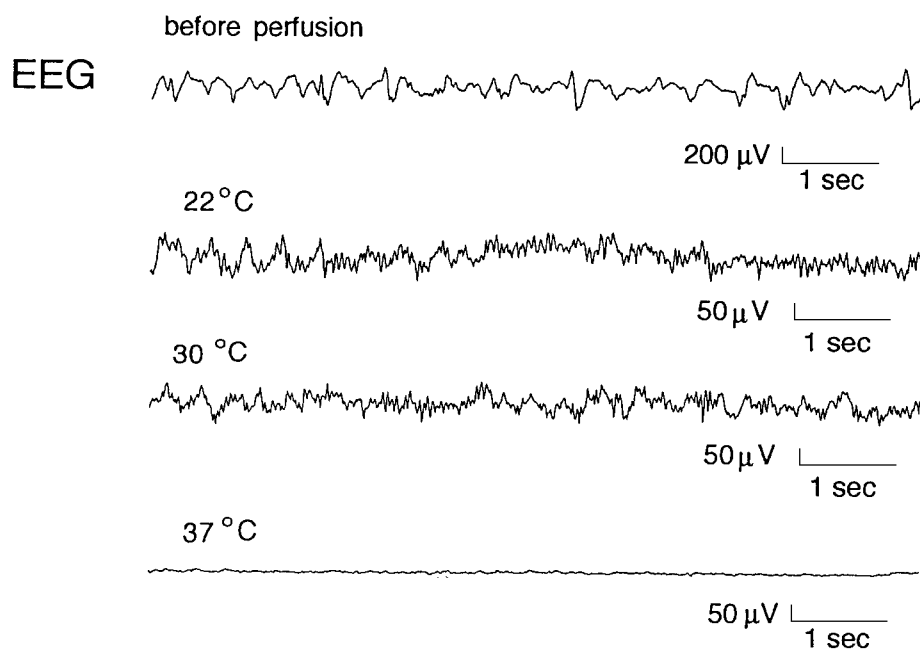
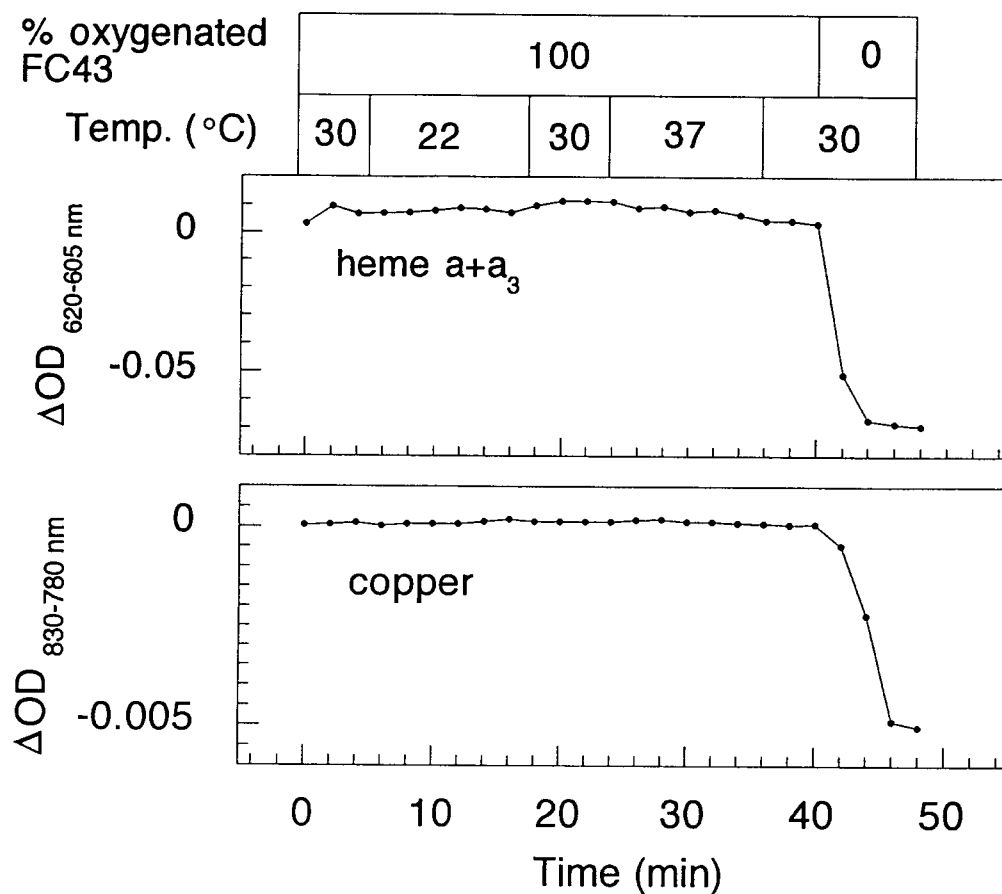


図4 灌流脳の自発脳波とチトクロームオキシダーゼの酸化還元状態の温度依存性 37度では自発脳波は出ないが、30度では長時間安定していた。

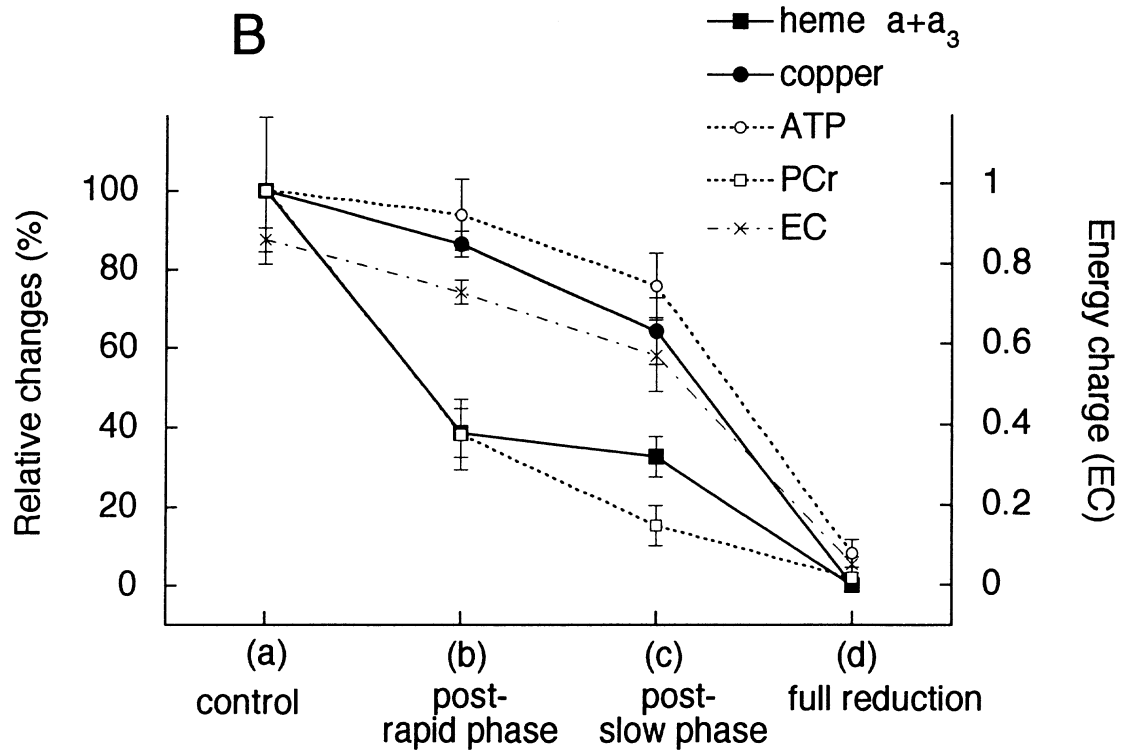
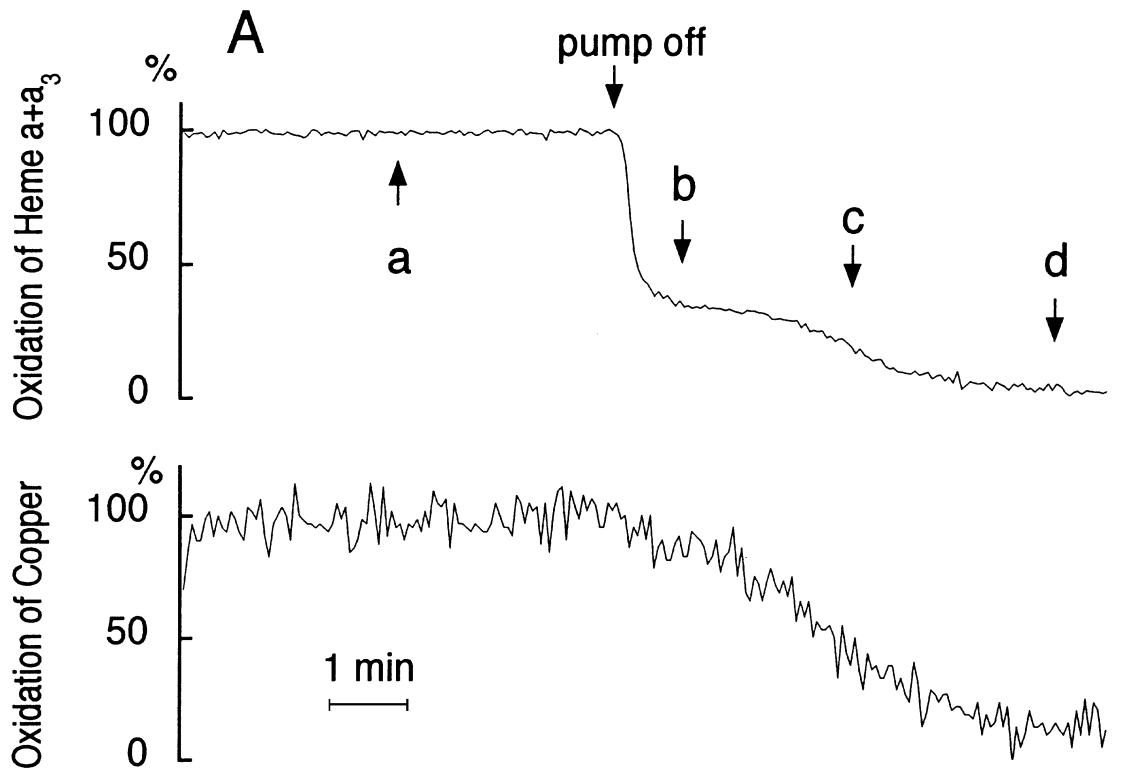
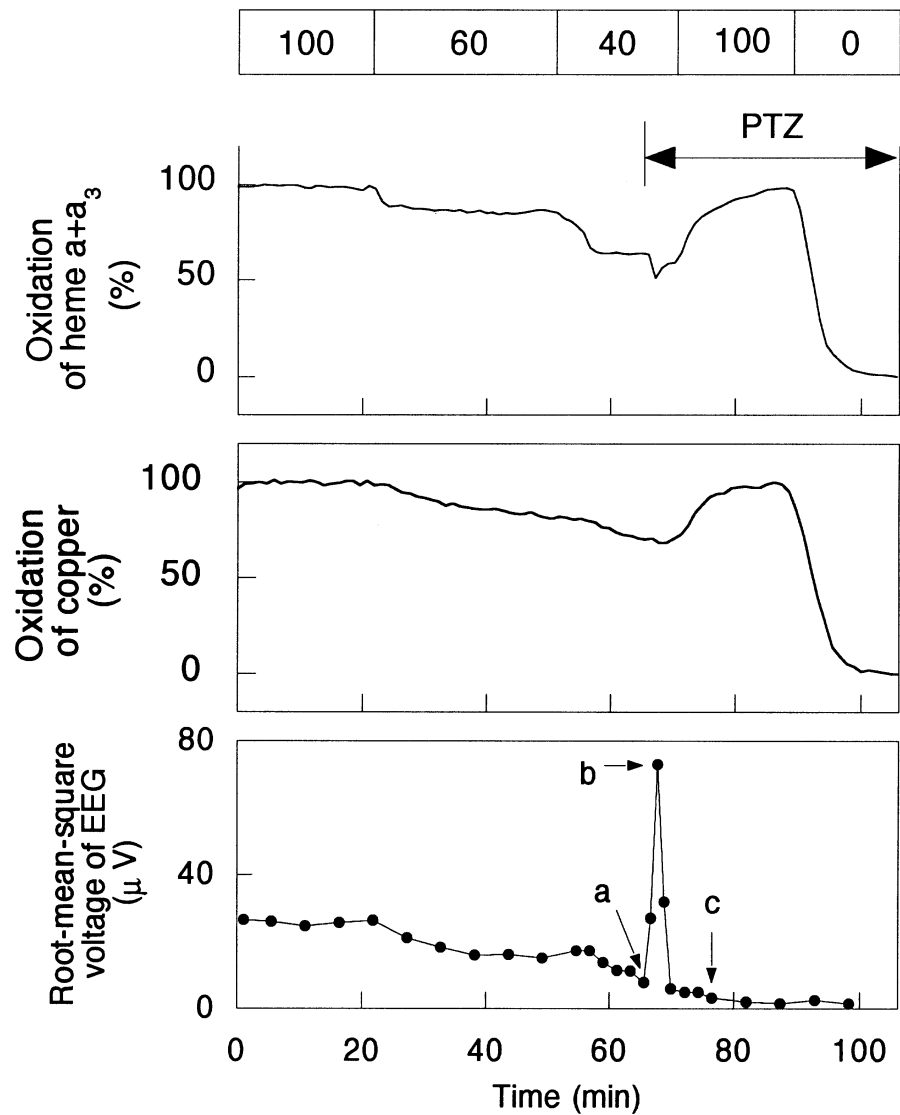


図5 チトクロームオキシダーゼの酸化還元挙動の高エネルギーリン酸化合物濃度とエネルギーチャージに対する関係 A 矢印で示した部分で灌流脳モデルを液体窒素で凍結した。a; コントロール、b; 早い還元直後、c; 遅い還元直後、d; 完全還元。B 4つの時点での高エネルギーリン酸化合物の相対濃度とエネルギーチャージ。

% oxygenated FC43



EEG traces

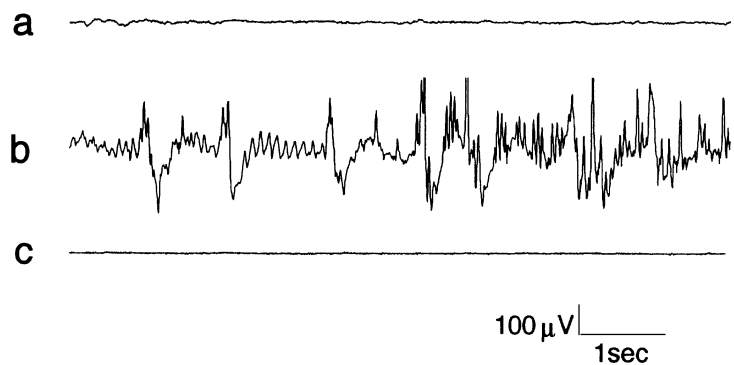


図6 低酸素で自発脳波が消失した後で発作を起こした例 自発脳波が消失したaの時点で発作薬PTZを持続投与した。一過性の興奮bが観察されたが、平坦脳波cになった。その後の急性低酸素でheme a+a<sub>3</sub>とCuAは一相性で還元された。

体窒素で凍結させて液体クロマトグラフィーでアッセイした。PCr が最も早い段階で減少した。ATP は遅い還元まで大きな変化を示さないが、完全還元で消失した。それに合わせて AMP は完全還元で増加した。エネルギーチャージを計算すると、遅い還元まではかなり維持されていた。従来のミトコンドリアの研究と合わせて考えると、この早い相は酸素濃度のみ依存する heme  $a$  の還元を、遅い相から完全還元まではエネルギーに依存した heme  $a_3$  の還元を表していると考えられた[3]。図 6 は嫌気条件で脳波が消失した後で PTZ を加えたときの heme  $a+a_3$  と CuA の酸化還元状態の測定例である。酸素濃度を低下させて 40%酸素化した灌流液を流すと脳波は平坦化し、PTZ を加えると一過性の興奮を示すが、再酸素化しても脳波は回復せずに、heme  $a+a_3$  と CuA の酸化還元状態は図 5 とは対照的に heme  $a+a_3$  も CuA も一相性で還元された。このことから低酸素下で神経活動が抑制されているときに、興奮させたためにミトコンドリアの機能が破綻したことが示唆された[1]。

### 3.3 他の灌流モデルとの比較

脳灌流モデルには、本稿で示したように頭蓋骨に保護された脳へ頸動脈管から人工血液を灌流する灌流脳モデルと、頭蓋骨から取り出して顕微鏡下で椎骨動脈へカニューレションし、フルオロカーボンのような酸素のキャリアを含まない人工脳脊髄液を灌流する摘出灌流脳モデルがある[7]。生化学的研究には血管系を含めて脳の構造を完全に維持した灌流脳モデルが最適である。自発脳波を容易に検出できることと流出液を集めることができるという長所を持つ。一方、摘出灌流脳では灌流液が白濁しないことから脳への電極の挿入場所に制限がなく、電気生理的手法を用いる場合に適している。我々のプレパレーションでフルオロカーボンを含まない人工脳脊髄液により灌流したところ、灌流温度は22度と低いが30分程度自発脳波を記録できた。このモデルでは灌流液が単純な生理的塩類溶液なので流出液の生化学的アッセイを容易に行える。フラビン含有モノオキシゲナーゼはアミンを含む外来の異物を酸化する酵素である。この酵素は肝臓ではよく調べられているが、脳のミクロソームでも活性があることが報告され

た。*in vitro*ではなく脳のありのままの活性を測定するために、このモデルが用いられた。図 7 は *in vivo* ではじめて測定された脳丸ごとの酵素活性である。肝臓より一桁小さいが脳の *in vitro* のデータの 7 倍以上高い活性であることが分かった[4]。

## 4 今後の展望

### 4.1 分子生物学

いくつかの転写因子は虚血や低酸素などで誘導されることが指摘されているが、その機序については不明点が多く、ヘムタンパクの酸素センサーがリン酸化されることで転写因子の活性化が始まると考えられているが、現在までに明らかになっている酸素センサーは根粒細菌などの単細胞生物の燐酸化酵素だけである。酸素濃度を変化させて、チトクロームオキシダーゼの酸化状態から細胞内の酸素濃度を知ることで、この酸素センサーの酸素に対する親和性を明らかにすることができる。

### 4.2 神経活動の光学測定

膜電位感受性の蛍光色素で染色することによって、脳機能の局在を血液が存在しない状態で神経

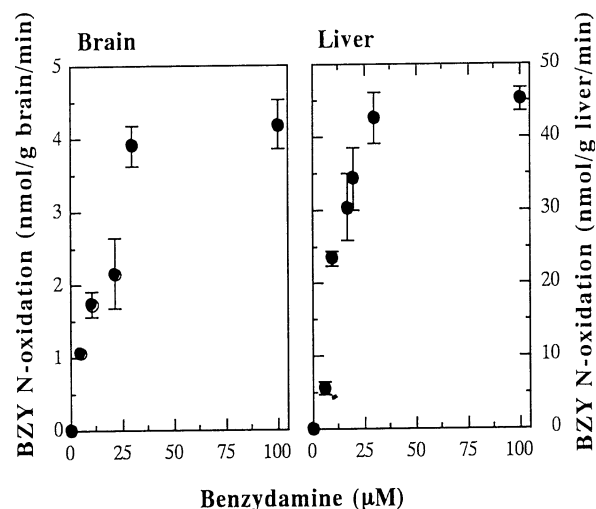


図 7 ラット灌流脳 (A) とラット灌流肝 (B) におけるフラビン含有モノオキシゲナーゼによる Benzylamine の酸化。灌流液の benzylamine 濃度を 5–100 μM の範囲で変えた。データは 5 回の実験の平均±標準偏差を示す。

活動のイメージングが可能であろう [5]。

## 5 まとめ

分光学的研究に適した灌流脳モデルを確立した。バイアビリティを自発脳波で調べると急性実験に十分な時間の間、安定していた。酸素消費速度、自発脳波の波形及び発作時の脳波波形は非灌流ラットのデータとよく一致した。血液ヘモグロ

ビンの影響を受けていないミトコンドリア特有の好気嫌気差スペクトルが得られた。チトクロームオキシダーゼのヘムの酸化還元挙動は細胞内ATP バッファーである PCr と関連しており、一方もう一つの酸化還元中心である CuA は ATP と同様に变化した。このラット灌流脳モデルは哺乳類の脳の多彩な機能の分子的基盤を生化学的に解析するための優れた実験モデルである。

---

### 【参考文献】

- [1] Y. Nomura, A. Matsunaga and M. Tamura, J. Neurosci. Methods, 82, 135 (1998)
- [2] Y. Nomura, F. Fujii, A. Matsunaga, and M. Tamura, Int. J. Neurosci., 94, 205 (1998)
- [3] A. Matsunaga, Y. Nomura, M. Tamura, S. Kuroda, N. Yoshimura, and J. Nishihira, Am. J. Physiol., 275, C1022 (1998)
- [4] A. Kawaji, M. Isobe, Y. Tochino, E. Takabatake, Y. Chikaoka, Y. Nomura, and M. Tamura, Biochim. Biophys. Acta, 1425, 41 (1998)
- [5] M. Nemoto, Y. Nomura, C. Sato, M. Tamura, I. Koyanagi, K. Houkin, and H. Abe, J. Cereb. Blood Flow Metabol. 19, 246 (1999)
- [6] 田村 守, 野村保友「臓器灌流の行い方 生物化学実験のてびき 4. 動物・組織実験法」pp 41-57, 化学同人1996
- [7] M. Muhlethaler, M. de Curtis, K. Walton and R. Llinas, Eur. J. Neurosci., 5, 915 (1993)