

マウス脳微小透析法の温故知新 ～ 神経伝達物質の濃度変化を1分ごとに観測し、ベイズ統計モデリングから単一マウスの時系列データ解析が可能に～

名古屋大学大学院医学系研究科・高等研究院の財津 桂 准教授、川上 大輔 大学院生、国立研究開発法人 産業技術総合研究所 地質情報研究部門の井口 亮 主任研究員らの研究グループは、マウス脳微小透析法（脳マイクロダイアリシス法）¹と探針エレクトロスプレーイオン化タンデム質量分析（PESI/MS/MS）²を組み合わせ、自由行動下マウスの神経伝達物質³の濃度変化を1分ごとに観測可能な技術を開発しました。また、単一マウスの時系列データ⁴にベイズ統計モデリングによる状態空間モデル⁵を適用し、1匹のマウスから神経伝達物質の挙動を解析できることを明らかにしました。

研究グループが2016年に開発したPESI/MS/MSは、前処理操作が不要で、必要試料量を数µLまで減らすことが可能です。一方、脳内神経伝達物質の古典的回収法であるマイクロダイアリシス法は、脳内に埋め込んだ透析膜に灌流液（臓器の洗浄などに使用される液体）を低流速で流し、一定時間ごとに灌流液を回収して神経伝達物質の濃度変化を観察する手法です。今回、研究グループはマイクロダイアリシス法にPESI/MS/MSを組み合わせ、1分ごとに回収した灌流液を分析することで、神経伝達物質であるグルタミン酸とγ-アミノ酪酸（GABA）の脳内濃度変化を1分ごとに観測できる技術を開発しました。本技術の実用性を評価するため、カリウムイオン誘導脱分極⁶の前後でマウス線条体⁷のグルタミン酸およびGABAの挙動を観察しました。単一マウスから得られた時系列データに対して、ベイズ統計モデリングを用いた状態空間モデルを適用した結果、従来の統計解析手法を用いずに、たった1匹のマウスからでも脳内神経伝達物質の挙動を解析できることが明らかとなりました。

今後、本手法をアルツハイマー病モデルマウスやパーキンソン病モデルマウスなどに適用すれば、各病態における脳内神経伝達物質の挙動をより詳細に解析することができ、新たな病態機序の解明や治療薬の応答性評価などに繋がることが強く期待されます。

本研究成果は名古屋大学研究強化促進事業 若手新分野創成研究ユニット・フロンティア（in vivo リアルタイム・オミクス研究室、代表研究者：財津 桂）および国立研究開発法人 産業技術総合研究所の共同研究に基づくものであり、令和3年6月30日付で国際分析化学誌「Talanta」オンライン版に掲載されました。

なお、本研究は日本学術振興会 科学研究費補助金 基盤研究（S）「新生児脳におけるニューロン新生とその病態：先端分析技術による統合的理解」（代表研究者：澤本和延）および基盤研究（B）「リアルタイム質量分析による生体マウス脳の時空間メタボローム解析法の開発と実証評価」（代表研究者：財津桂）の支援を受けて実施しました。

ポイント

- 古典的手法であるマイクロダイアリス法に、探針エレクトロスプレーイオン化タンデム質量分析とベイズ統計モデリングを組み合わせることで、有用性の高い技術に昇華させることに成功した。
- 本手法を用いると、マウス脳内の神経伝達物質（グルタミン酸と GABA）の濃度変化を 1 分ごとに観測でき、従来よりも 10 倍以上詳細に脳内での濃度変化を観察できる。
- 従来、マイクロダイアリス法では複数匹のマウスの結果を平均化して統計処理していたが、本手法の開発によって、1 匹のマウスからでも脳内神経伝達物質の挙動を解析できる。
- 今回開発した手法を脳病態モデルマウスに応用すれば、従来法では捉えることの出来なかった病態メカニズムの解明などにつながる。

1. 背景

神経伝達物質は神経細胞間の情報伝達を担っており、興奮性のグルタミン酸や抑制性の γ -アミノ酪酸(GABA)が代表例として知られています。脳内では興奮と抑制神経伝達を巧みに調節することで、記憶・学習などの高次脳機能を維持しており、グルタミン酸や GABA などの神経伝達物質の挙動を観察することは脳病態の解明においても重要です。

マウス脳内の神経伝達物質の挙動を観察する古典的な手法として、脳内に微小透析膜を外科的に埋め込み、神経伝達物質を回収する微小透析法（マイクロダイアリス法）が知られています。マイクロダイアリス法では脳内に埋め込んだ微小透析膜の内側に入ってきた神経伝達物質を、外部から灌流液かんりゅうえきを数 μ L/min の低流速で流し込んで回収します。回収した灌流液内の神経伝達物質の測定には、従来、液体クロマトグラフィーや液体クロマトグラフィー質量分析⁸などが用いられてきましたが、測定に必要な試料量を確保するために、15~20 分間、灌流液を集めておく必要がありました。つまり、上記の分析手法を用いると、脳内の神経伝達物質の挙動を 15~20 分間隔でしか観察できないという制約に繋がっていました。また、質量分析を行うためには灌流液の脱塩処理に時間を要し、操作が煩雑はんざつになるという問題点もありました。

一方、これまでにマイクロダイアリス法を用いて脳内の神経伝達物質の挙動を統計的に解析するためには、複数匹のマウスを用いて実験を行い、それらのマウスの各観測時点における神経伝達物質の濃度を平均化して、時点間のデータについて統計解析（有意差検定）⁹を行うことが一般的でした。しかし本来、単一のマウスからマイクロダイアリス法で得られた神経伝達物質の濃度変化は「時系列データ」であり、前後のデータ間には自己相関¹⁰がみられます。よって、複数のマウスから得られた時系列データを平均化してしまうと、各マウスの時系列データの傾向が打ち消されてしまうため、より適切な解析手法を構築する必要がありました。

2. 研究成果

財津准教授らの研究グループは 2016 年に探針エレクトロスプレーイオン化タンデム質量分析 (PESI/MS/MS) (図 1)を開発し、これまでに脳微小領域の直接分析や、微量試料の分析を達成してきました。(K. Zaitsumi* et al., Analytical Chemistry 2016; Y. Hayashi, K. Zaitsumi* et al., Analytica Chimica Acta 2017; K. Zaitsumi* et al. Analytical Chemistry 2018; K. Zaitsumi* et al. Analytical Chemistry 2020; K. Hisatsune, K. Zaitsumi* et al. ACS Omega 2020.) 本手法は極細針を対象成分のサンプリングとイオン化に用いるため、前処理が不要で、わずか数 μ L の試料量

でも分析が可能です。

そこで、マイクロダイアリシス法で得られた灌流液を PESI/MS/MS で分析できるか検討しました。灌流液に用いる人工脳脊髄液 (aCSF) にグルタミン酸および GABA を添加し、PESI/MS/MS で分析を行いました。条件検討の結果、図 2 に示すような操作フローに従って、定量分析法を構築しました (図2)。

1 検体当たりの分析時間は僅か 30 秒であり、検量線はグルタミン酸、GABA のいずれも良好な直線性を示しました。また、日内および日間における定量精度・再現性が高いことも示されました。特に、本手法では aCSF を、たった 3 μ L 使用するだけでグルタミン酸と GABA の濃度を迅速に測定できます。これはマイクロダイアリシスの灌流液の流速を仮に 3 μ L/min に設定した場合、1 分ごとに灌流液を回収するだけでよく、脳内のグルタミン酸と GABA の濃度変化を 1 分ごとに観測できるということを意味します。

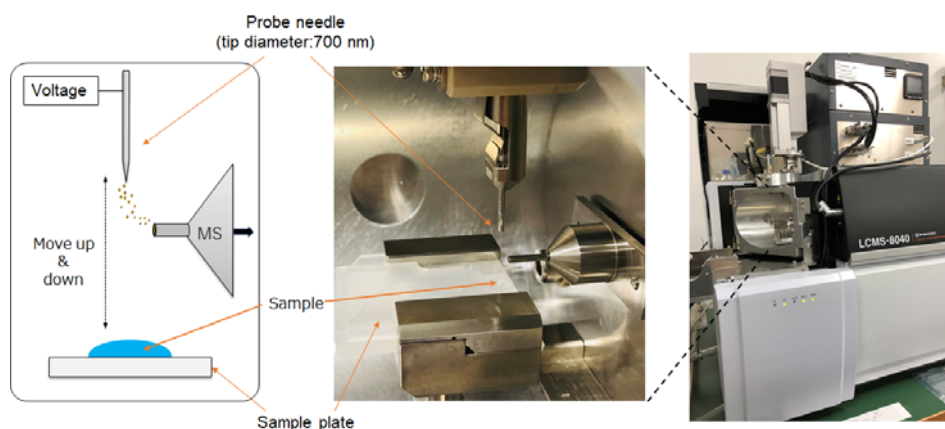


図1 PESI/MS/MS の外観

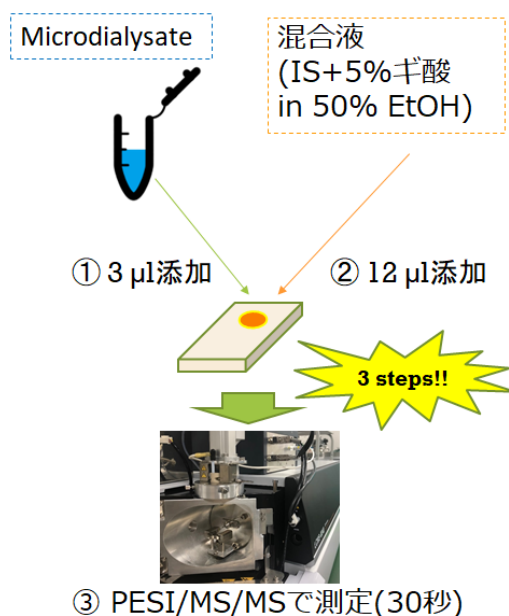


図2 定量分析の操作フロー IS: 内部標準物質.

次に、本分析法の実用性を評価しました。マウスの線条体に外科手術によりマイクロダイアリス法の微小透析膜が付いたプローブを留置し、自由行動下で一定時間 aCSF 液を灌流させた後、高濃度カリウムイオンを含む灌流液(High-K⁺液)を灌流させることで、脱分極^oを誘導した際のグルタミン酸と GABA の濃度変化を観察しました。ここでは灌流液の流速を 3 μ L/min とし、5 分毎あるいは 1 分毎に灌流液を回収し、測定を行いました。図 3 および図 4 に結果を示します。

図 3 および図 4 に示すように、5 分ごとに採取したデータ、1 分ごとに採取したデータのいずれにおいても、High-K⁺液に灌流液を切り替えた直後にグルタミン酸の濃度が上昇し、その後、濃度が減少する傾向が観察されました。また、グルタミン酸濃度の上昇よりも少し遅れて GABA の濃度が上昇する傾向も観察されました。

そこで、これらの時系列データをマウスごとに解析するために、ベイズ統計モデリングによる状態空間モデルを応用しました。ここでは、aCSF 液を灌流した際の定常状態の濃度(図 3 では 0-25 分、図 4 では 0-9 分の値)を用いて状態空間モデルより 95%信用区間を算出しました。この 95%信用区間は図 3 および図 4 に青色の帯でそれぞれ示しています。

図 3 に示す 5 分ごとの時系列データでは、High-K⁺液の灌流による脱分極の結果、グルタミン酸および GABA は 95%信用区間よりも高値を示すことが示されました。しかし、図 3a-1 に示すように、1 匹のマウスではグルタミン酸は 65 分の時点で 95%信用区間より低値を示したのに対し、図 3b-1 に示す別のもう 1 匹のマウスでは、95%信用区間より低値を示しませんでした。

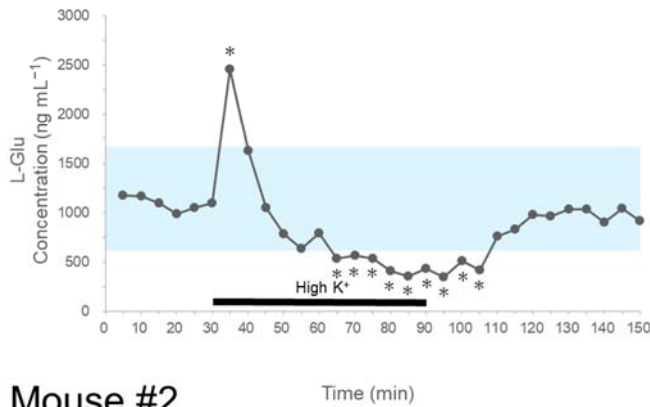
一方、図 4a-1 および図 4b-1 に示す 1 分ごとの時系列データでは、2 匹のマウスにおいて、グルタミン酸は脱分極によって 95%信用区間よりも高値を示したのち、この信用区間よりも低値まで下がる事が確認できました。この結果、1 分ごとに採取したデータの方が、より詳細に脳内の神経伝達物質の挙動を観察できていることが示されました。

また、図 3 および図 4 に示したいずれのマウスにおいても、High-K⁺液を灌流している間、GABA の濃度は 95%信用区間よりも高値を示し続けました。従って、本手法を用いることで線条体におけるグルタミン酸と GABA の取り込み機構の差異を詳細に観察できることも示されました。

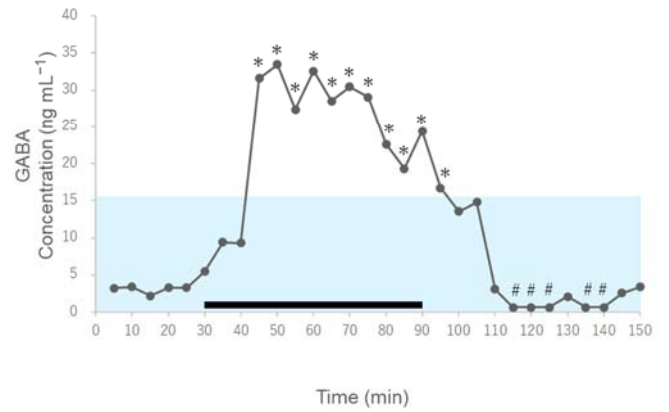
以上の結果、本研究では自由行動下のマウス脳内神経伝達物質の挙動をわずか 1 分ごとに観察する手法の開発に成功しました。また、マイクロダイアリス法から得られた時系列データにベイズ統計モデリングによる状態空間モデルを初めて適用し、その実用性を示すことにも成功しました。

Mouse #1

(a-1)

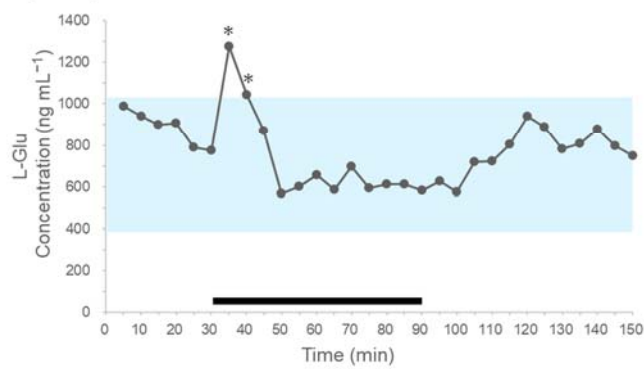


(a-2)



Mouse #2

(b-1)



(b-2)

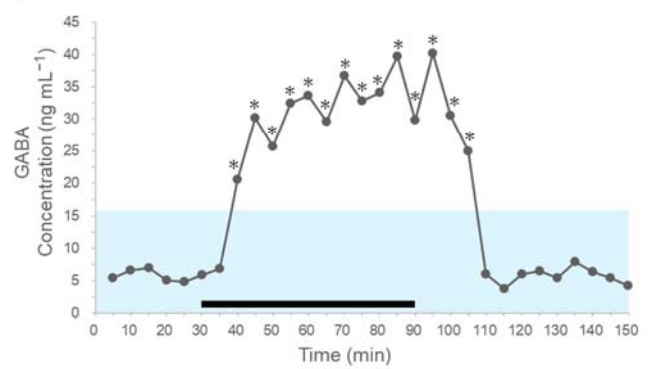
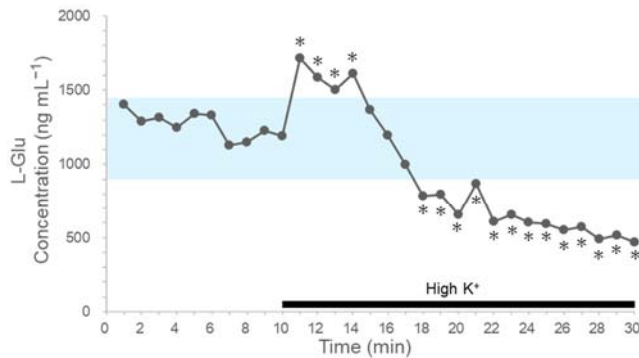


図3 マウス線条体の L-Glu と GABA の 5 分ごとの変化.

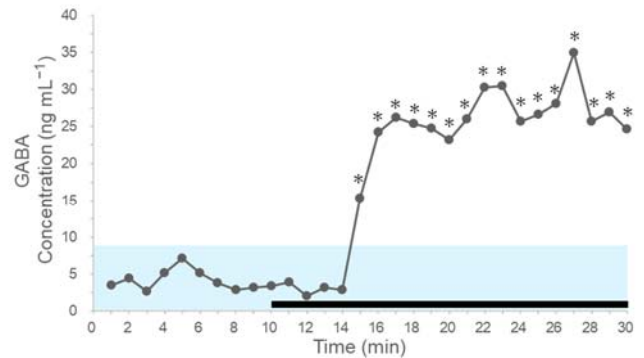
5分毎に灌流液を回収し、グルタミン酸(a-1 および b-1)と GABA(a-2 および b-2)の濃度を測定した結果。図中の黒下線部は High-K⁺液を灌流液として流した時間域を示す。*: 状態空間モデルより算出した 95%信用区間外の値であることを示す。#: 検出下限と定量下限の間の範囲にある値を示す。

Mouse #3

(a-1)

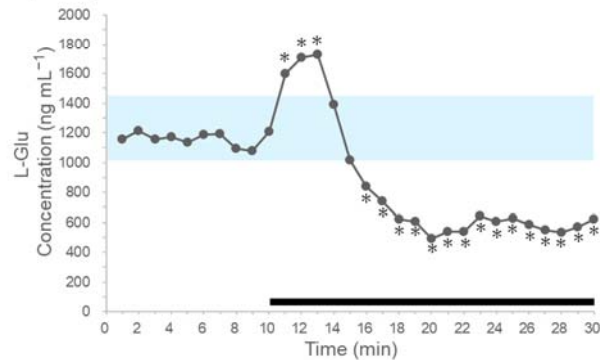


(a-2)



Mouse #4

(b-1)



(b-2)

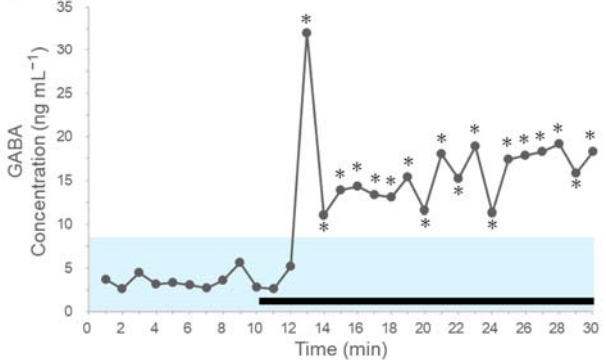


図4 マウス線条体の L-Glu と GABA の 1 分毎の変化.

1分毎に灌流液を回収し、グルタミン酸(a-1 および b-1)と GABA(a-2 および b-2)の濃度を測定した結果。図中の黒下線部は High-K⁺液を灌流液として流した時間域を示す。*: 状態空間モデルより算出した 95%信用区間外の値であることを示す。

3. 今後の展開

本手法をアルツハイマー型認知症やパーキンソン病をはじめとする病態モデルマウスの解析に応用することで、各病態における神経伝達物質の挙動をより詳細に追うことができるようになることが期待されます。特に近年、高い注目を浴びている認知症治療薬の開発における治療効果への応用や薬剤応答性の評価などへの応用が期待されます。

さらに今後、測定対象成分を神経伝達物質以外のものにも拡張することに加え、マイクロダイアリシス法と PESI/MS/MS をオンラインで接続するためのデバイス（現在、特許出願中）を用いることで、脳内生体分子の変化をリアルタイムに測定できる「in vivo リアルタイム脳計測システム」によって、秒単位で脳内分子の変化を観察できる技術の開発を目指します。

4. 用語説明

1. 微小透析法（マイクロダイアリシス法）：微小透析膜のついたプローブをマウスの脳内などに外科手術で埋め込み、人工脳脊髄液などを灌流して神経伝達物質などの脳内分子を回収する方法。自由行動下のマウスから脳内分子を回収し、脳内での挙動を観察できることが特長。
2. 探針エレクトロスプレーイオン化タンデム質量分析（PESI/MS/MS）：探針エレクトロスプレーイオン化法（Probe Electrospray Ionization）は、2007年に山梨大学の平岡賢三教授が開発したイオン化法であり、先端直径 700 nm の微細針を用いて試料の採取とイオン化を行うことが可能である。タンデム質量分析（MS/MS）は、質量分析計の質量分離部に「四重極型」と呼ばれる質量分離部を直列に 3 つ接続した装置で行う分析手法を指す。MS/MS により二段階の質量分離が可能となるため、イオン化した対象成分の特異的な検出が可能である。PESI と化合物の同定能力の高いタンデム質量分析（MS/MS）を組み合わせることで、前処理操作を行うことなく、臓器内の対象成分を直接検出することが可能である。2016年に財津准教授らの研究グループが PESI/MS/MS を用いた代謝物分析法を世界で初めて報告した。
3. 神経伝達物質：神経細胞の軸索末端から放出され、標的とする細胞の興奮や抑制を伝達する化学物質のこと。興奮性の神経伝達物質としてグルタミン酸、抑制性の神経伝達物質として GABA が有名である。
4. 時系列データ：一定時間ごとに得られた測定値を時間的な順序に沿って並べたデータを指す。相互の測定値間に統計的な依存関係が認められることが多いため、一般的に取り扱うデータとは異なり、時間軸に沿って並んだ順番を考慮したデータ解析が必要である。
5. ベイズ統計モデリングによる状態空間モデル：ベイズ統計学に基づいてモデリングを行う手法のうち、時系列データに状態方程式と観測方程式を適用し、将来のある時点における観測値とその変動幅を予測するモデルを指す。
6. 脱分極：細胞膜内外の電位差（膜電位）が、細胞内にナトリウムイオンなどが流入することによってプラスの方向に変化すること。
7. 線条体：大脳基底核の主要な構成要素の 1 つであり、運動機能等への関与が知られている。大脳皮質からはグルタミン酸が放出されて線条体を興奮させることが知られており、線条体の 90% を占めるとされる投射ニューロンである medium spiny neuron は GABA を伝達物質とする抑制性ニューロンであり、直接路と間接路にわかれるとされる。
8. 液体クロマトグラフィー・液体クロマトグラフィー質量分析：物質の分離・分析手法の 1 つであり、移動相に液体を使用し、分離カラムを用いて対象成分を分離する手法を液体クロマトグラフィーと呼ぶ。この液体クロマトグラフィーに質量分析を接続した手法を液体クロマトグラフィー質量分析と呼ぶ。
9. 統計的解析（有意差検定）：2 群あるいはそれ以上の多群のデータ間に差異があるかを統計学的に検定すること。母集団の分布が正規分布に従うと仮定して実施するパラメトリック検定の中で、2 群間の検定に汎用される手法として t 検定などが知られる。検定を繰り返すことによって生じる「検定の多重性の問題」なども知られており、有意差検定を繰り返して行う際には注意が必要となる。
10. 自己相関：自己共分散を正規化したもので、時系列データにおいて生じる観測点間の相関性および類似性を指す。

5. 発表雑誌

掲雑誌名 : Talanta

論文タイトル : Rapid quantification of extracellular neurotransmitters in mouse brain by PESI/MS/MS and longitudinal data analysis using the R and Stan-based Bayesian state-space model

著者 : Daisuke Kawakami ^{a,b}, Mitsuki Tsuchiya ^a, Tasuku Murata ^b, Akira Iguchi ^c, Kei Zaito ^{a,d,*}

所属 : ^a Department of Legal Medicine & Bioethics, Nagoya University Graduate School of Medicine, 65 Tsurumai-cho, Showa-ku, Nagoya, 466-8550, Japan

^b Shimadzu Corporation, 1, Nishinokyo-Kuwabaracho Nakagyo-ku, Kyoto, 604-8511, Japan

^c Geological Survey of Japan, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST), Tsukuba, Ibaraki, 305-8567, Japan

^d In Vivo Real-time Omics Laboratory, Institute for Advanced Research, Nagoya University, Furo-cho, Chikusa-ku, Nagoya, 464-8601, Japan

DOI : <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2021.122620>

English ver.

https://www.med.nagoya-u.ac.jp/medical_E/research/pdf/Tala_210630en.pdf