

主論文の要旨

**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**

PESI/MS/MSを用いたマウス脳細胞外神経伝達物質の
迅速定量法とRとStanを用いた状態空間モデルの
時系列データへの適用

名古屋大学大学院医学系研究科 総合医学専攻
社会生命科学講座 法医・生命倫理学分野

(指導：石井 晃 教授)

川上 大輔

【緒言】

神経細胞間の情報伝達は神経伝達物質を介して行われており、興奮性の神経伝達物質であるグルタミン酸(L-Glu)や抑制性の神経伝達物質である γ -アミノ酪酸(GABA)が神経伝達物質の代表例として知られている。マウス脳内の神経伝達物質の挙動を観察する方法として、細胞外の神経伝達物質をマイクロダイアリシス法で回収し、質量分析により測定する方法が用いられている。しかし、一般に質量分析を行うためには煩雑な前処理操作が必要である。また、質量分析を行うための必要試料量を得るためには15~20分間、マイクロダイアリシスで得られる試料をプールする必要があるため、結果として神経伝達物質の変化を15~20分毎にしか観察できないという制約に繋がっていた。一方で、過去の研究報告では、複数のマウスから得られたL-GluやGABAの濃度の平均値を用いて統計解析が行われていた。しかし、マイクロダイアリシスなどで得られる時系列データは、前後のデータ間に自己相関がみられることが特徴であり、複数のマウスから得られたデータを平均化してしまうと、各マウスの傾向が打ち消され、各マウスの時系列データを正しく評価できていないことになる。

そこで本研究では、煩雑な前処理操作を行う必要がなく、微量で分析が可能な探針エレクトロスプレーイオン化タンデム質量分析計(PESI/MS/MS)を用いたL-GluおよびGABAの定量分析法を新たに開発した。さらに、本手法の実用性を評価するために、高濃度カリウムイオン(High-K⁺)誘導脱分極時のマウス線条体中L-GluおよびGABAの変化を観察し、得られた時系列データに対してベイズ統計モデリングによる状態空間モデルを適用した。

【方法】

分析条件の検討

L-GluおよびGABAの定量には、島津製作所製 探針エレクトロスプレーイオン化タンデム質量分析計(PESI/MS/MS)を用いた。L-GluおよびGABAを人工脳脊髄液(aCSF液)に添加し、検量線用試料および低濃度、中濃度および高濃度の精度管理試料を作製した。試料3 μ Lに内部標準物質および5%ギ酸を含む50%エタノール溶液12 μ Lを混合し、全量15 μ Lを専用のサンプルプレートに移し、表1の分析条件を用いて、0.5分間測定を行った(図1)。

実用性の評価

マウス脳内におけるL-GluおよびGABAの変化を観察するために、ICRマウスの線条体にマイクロダイアリシスプローブを留置し、一晩の回復期間後、自由行動下で高濃度カリウムに調製したaCSF液を3 μ L/minで灌流し、脱分極誘導時のL-GluおよびGABAの濃度変化を異なる条件(実験①:5分毎で150分間観察(n=2)、実験②:1分毎で30分間観察(n=3))で観察した。得られた時系列データについて、RおよびStanを用いて状態空間モデルを適用し、時系列データの解析を行った。定常状態(実験①では最初の30分(データポイントとしては6点)、実験②では最初の10分(データポイントとしては10

点))から平滑化トレンドモデルの状態方程式(式1)を用いて、95%信用区間(95%CI)を算出し、95%CIを逸脱する濃度値を顕著な変化と定義した。なお、95%CIは図中に青色の帯として示した。

$$\mu_{\text{pred}}(t+i) = \text{Normal} [2 * \mu_{\text{pred}}(t+i-1) - \mu_{\text{pred}}(t+i-2), \sigma] \text{ (式 1)}$$

【結果と考察】

分析法の検討

本分析法のバリデーションを実施した。検量線を作成し、日内変動および日間変動の再現性評価を行った。その結果、表2に示すように検量線の直線性はL-GluおよびGABAとも $R^2 > 0.999$ の良好な直線性を示した。また、精度(Precision)はL-Gluが1.7~5.4%、GABAが2.1~5.7%、真度(Accuracy)はL-Gluが0.4~7.5%、GABAが0.1~4.8%であり、本分析法は高い定量性が担保されていることが示された。

実用性の評価

5分ごとにマイクロダイアリシスの灌流液を採取した実験①においては、図2に示すように2匹のマウスともHigh-K⁺液に灌流液を切り替えた直後にL-Gluの濃度が上昇し、その後L-Gluの濃度が減少する傾向が観察された。また、L-Gluの濃度の上昇より少し遅れてGABAの濃度が上昇する傾向も観察された。2匹のマウスともL-Gluは35分の時点で、GABAは45分から95分の時点まで95%CIより高値を示した。#1のマウスのL-Gluは、65分から105分の時点まで95%CIより低値を示した(図2a-1)が、#2のマウスのL-Gluは、95%CIより低値を示さなかった(図2b-1)。5分ごとの時間分解能では、微細な変化の観察が難しいと思われることから、より詳細に挙動を観察するため、1分毎に灌流液の採取を行う実験②を実施した。

1分ごとにマイクロダイアリシスの灌流液を回収し、L-GluおよびGABAの挙動を観察した結果、図3に示すように3匹のマウスともL-Gluは11分から13分の時点まで95%CIより高値を示し、18分から30分の時点まで95%CIより低値を示した。GABAは、3匹のマウスとも15分から30分の時点まで95%CIより高値を示した。この結果より、時間分解能を高くすることで線状体における神経伝達物質のダイナミクスを、より詳細に観察できることが示された。

【結語】

本手法を用いることで、煩雑な前処理操作を行うことなく、自由行動下のマウス脳内神経伝達物質の挙動を1分ごとに観察することができた。また、得られた時系列データに状態空間モデルを適用することで、1匹のマウスの結果から、脳内神経伝達物質の挙動を解析することが可能となった。本手法を各種神経変性疾患の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に繋がることが期待できる。