

平成 21年 5月 27日現在

研究種目：若手研究（スタートアップ）

研究期間：2007～2008

課題番号：19800065

研究課題名（和文） 脳微小血管3次元ネットワークによる脳血流空間制御機構に関する基礎研究

研究課題名（英文） Spatial coordination of cerebral blood flow distribution with three-dimensional microvascular networks.

研究代表者

正本 和人（MASAMOTO KAZUTO）

電気通信大学・先端領域教育研究センター・特任助教

研究者番号：60455384

研究成果の概要：生体内レーザー蛍光顕微鏡法を用いてイソフルラン麻酔下のラット体性感覚野における微小血管構造画像を可視化した。観察領域に対応する前肢に電気パルス刺激後、大脳皮質体性感覚野動脈ネットワークにおいて顕著な血管内腔の拡張が観察され、終末細動脈と脳表動脈レベルで血管内腔変化のタイムコースに顕著な違いが見られた。また脳表動脈応答は脳活動依存的に反応領域が変化したのに対し、終末細動脈の拡張反応は一定領域に局在していた。これら動脈ネットワーク間の時空間連携は、Gap junction uncoupler の投与によって影響を受けたことから、脳血流空間制御に対する脳血管細胞間 Gap junction の関与が強く示唆された。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,360,000	0	1,360,000
2008年度	1,350,000	405,000	1,755,000
総計	2,710,000	405,000	3,115,000

研究分野：生体医用工学

科研費の分科・細目：神経科学一般

キーワード：脳微小循環、組織酸素輸送、生体内イメージング、脳機能イメージング

1. 研究開始当初の背景

局所エネルギー需要に応じた脳血流空間制御機構の解明においては、神経-血管両者の空間的ネットワーク構造を理解することが重要である。大脳皮質感覚野においては、多数の神経細胞群から成る円柱状のカラム構造と呼ばれる機能ユニットが知られている。ある程度規則正しく配列する神経細胞の機能ユニットとは対照的に、脳血管ネットワーク構造はランダムである。血管サイズの違いから、大きく二群に分けられる。ミリオーダーの比較的大い血管から成る脳皮質表層血管群と直径が数マイクロ～数十マイクロメートルサイズの複雑な微小血管網で構成さ

れる皮質内血管群である。我々はこれまで、ラット脳血管に蛍光色素を混入した樹脂を封入し、共焦点レーザー走査型顕微鏡を用いて皮質内血管群の解剖学的特徴抽出を行ってきた。その結果、皮質内血管群には皮質表層からの深さに応じて血管密度、長さ、分岐の配向が異なるなどの特徴があることを明らかにしている。しかしながら、これらの従来研究は動物の死後摘出した脳を用いたため、生きた状態での神経機能ユニットとの対応関係は調べられていない。

血流分配を決めるのは組織との物質交換が活発な毛細血管よりも上流にある動脈であることが一般的には知られている。特に脳

組織の場合、最も末梢で制御可能な終末細動脈は神経機能カラムサイズにほぼ一致する間隔、約 0.3–0.6 mm に一本の割合で皮質内に分布しているという報告がある。このことは終末細動脈が、皮質内血流分配の空間領域を決める最小機能ユニットである可能性を示唆している。しかし最近の高磁場MRIによる知見では、脳血流分配の空間制御が終末細動脈より下流毛細血管レベルで調節されていることが示唆されている。したがって本研究課題では、脳実質内に分布する終末細動脈と毛細血管ネットワークに着目し、脳活動に対する脳血管反応の時空間応答について明らかにする。

2. 研究の目的

神経科学分野を中心に、中枢神経系における神経細胞・グリア細胞の情報伝達機構に関してはこれまで数多くの知見が得られているが、血管細胞による脳血流制御機構に関しては必ずしもよく調べられてはいない。その理由の一つには、主要な役割を担う脳微小血管がその構造的特徴により脳皮質表層下に存在するため、光散乱の大きな脳組織では皮質表層から直接顕微鏡観察できないという実験系の制約がある。そこで本研究では、生体透過性の高い近赤外光を励起光に利用した多光子励起蛍光顕微鏡を用いて、脳組織実質内の微小血管を *in vivo* 計測し、脳微小血管による脳血流制御機構の解明を目指す。

3. 研究の方法

励起光に生体透過性の高い近赤外光を利用する多光子励起蛍光顕微鏡法を用いてラット体性感覚野の血管構造を可視化した。次に脳活動に対する血管運動を評価し、大脳皮質終末細動脈と表層動脈ネットワークの血管反応性を比較した。血管形態評価には Qdot-655 PEG (Invitrogen) でラベリングした血漿の厚さを計測し、血管内径を評価した。一方、血流の評価には、FITC で蛍光ラベルした赤血球を用いた。さらに、測定領域に対応する前肢に電気刺激を与えて脳賦活実験を行い、脳賦活部位における血管内形態、血流の動的特性を明らかにした。さらに脳賦活部位と周辺部位での変化量を比較し、血管機能変化と血流変化の空間関係を調べた。

実験には脳循環代謝研究に広く用いられている SD ラット (250–350 g) 体性感覚モデルを使用した。脳微小循環観察は侵襲を伴うため、実験動物の苦痛軽減にガス麻酔 (イソフルレン) を用いた。麻酔下の動物は人工呼吸器を装着し、血圧・体温・心拍をモニターし、生理状態を維持した。適宜、動脈血ガスを採取し呼吸パラメータを調節した。脳微小血管観察用に、頭蓋の一部 (3 mm x 3 mm) を薄く削り硬膜を維持した。

脳実質内微小血管の機能・形態及び血流計測には、多光子励起レーザー走査型蛍光顕微鏡 (TCS-SP5, Leica) を用いた。多光子励起顕微鏡法は、励起光に生体透過性の高い近赤外光 (900 nm) を使用するため、従来の蛍光顕微鏡法では不可能であった脳実質内に存在する蛍光プローブを観察可能にする。本顕微鏡システムは、1 秒間に最大 16000 ラインの高速撮影が可能であり、512 x 64 ピクセルのフレームサイズにおいて毎秒 250 フレーム画像を取得した。蛍光波長に鋭いピークを有する量子ドット (QDot, Invitrogen) を血しょう成分の蛍光プローブとして大腿静脈より投与した。本研究では、一般的に血しょうの蛍光標識に用いられている FITC-dextran (Fluorescein isothiocyanate, emission peak at 520 nm) と長波長領域に蛍光ピークを有する QDot (655 nm) を大腿静脈より血漿に連続投与 (0.3 ml/h) し、大脳皮質における血管構造の深さ方向空間分解能を比較した。その結果、蛍光量子ドットは、FITC-dextran に比べて大脳皮質下深さ方向で約 2 倍の深さ (0.6 – 0.8 mm) で蛍光観察が可能であった。脳実質血管内の血流計測には、FITC で標識した蛍光赤血球を用いた。

4. 研究成果

(1) 測定領域に対応する前肢への電気パルス刺激後、体性感覚野動脈ネットワークにおいて顕著な血管内腔の拡張が観察された。一方、静脈側の内腔変化は観察されなかった (図 1、2)。

(2) 大脳皮質終末細動脈と脳表動脈レベルで血管内腔変化のタイムコースに顕著な違いが見られた。血管反応の立ち上がり時間は、皮質内終末細動脈では脳賦活後 0.8 秒であったのに対し、脳表動脈では脳賦活後 1.1 秒であった (図 3)。

(3) 脳表動脈応答は脳活動依存的に反応領域が変化したのに対し、終末細動脈の拡張反応は一定の領域に局在していた。

(4) 脳活動に対するこれら動脈血管ネットワーク間の時空間連携は、Gap junction uncoupler によって影響を受けた。このことから、脳血流空間制御に対する脳血管細胞間 Gap junction の関与が強く示唆された。

以上、本研究成果は、脳実質内終末細動脈と脳表動脈間の時空間連携のメカニズムを説明するシグナル経路の一つを新たに明らかにしており、脳神経活動に対する脳血管反応調節機構を理解する上で重要な知見を得ることができた。今後さらに、脳血管細胞間 Gap junction の生理学的役割について調べていく必要がある。

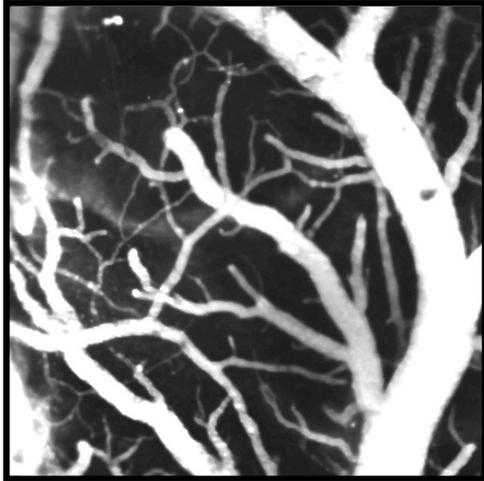


図1. 大脳皮質表層における脳血管画像 (FOV: 1.8 mm x 1.8 mm) (ピクセル強度は Qdot 655 で標識した血しょう成分を示す)

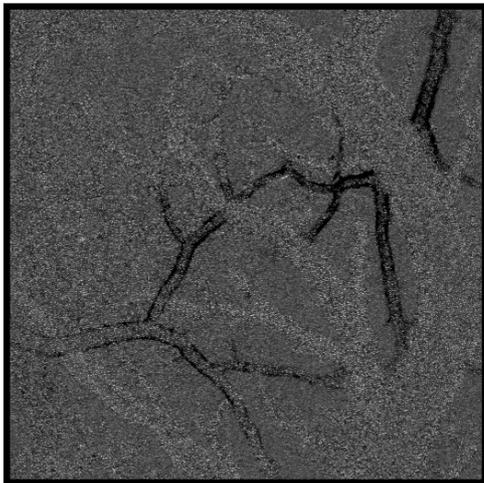


図2. 脳賦活時の脳表層血管差分画像。安静時の画像から脳賦活時の画像を差分した。脳賦活によって、動脈ネットワークのみが拡張し、血管外周のピクセル強度が低下した。

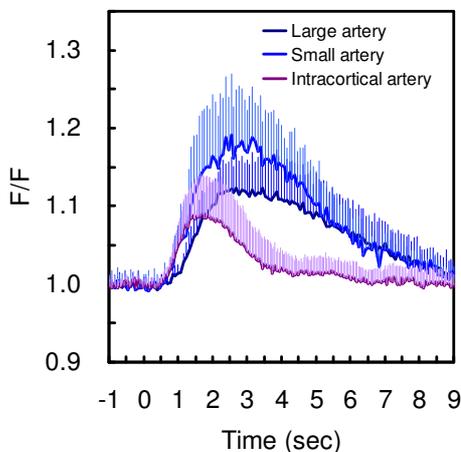


図3. 脳活動による脳血管反応

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計3件)

- ① Masamoto K, Obata T, Kanno I, Intracortical Microcirculatory Change Induced by Anesthesia in Rat Somatosensory Cortex, Adv Exp Med Biol, (in press), 査読有
- ② 正本和人, 小島隆行, 菅野巖, 神経血管カップリング: 分子メカニズムの解明に向けて、電気学会 光・量子デバイス研究会資料、OQD 08、33-38、(2008)、査読無
- ③ Park SH, Masamoto K, Hendrich K, Kanno I, Kim SG, Imaging Brain Vasculature with BOLD Microscopy: MR Detection Limits Determined by In Vivo Two-Photon Microscopy, Magnetic Resonance in Medicine, 59(4), 855-865, (2008), 査読有

[学会発表] (計6件)

- ① Masamoto K, Obata T, Kanno I, Dynamics of intracortical and cortical surface vessels responding to local neural activity in anesthetized rat somatosensory cortex, The 11th meeting of Hirosaki International Forum of Medical Science, 2009年3月27-28, Communication Center of Hirosaki University School of Medicine (青森)
- ② 正本和人, 脳活動と脳内酸素及び血流ダイナミクス、第10回光脳機能イメージング研究会(招待講演)、2008年12月13日、大阪国際交流センター、(大阪)
- ③ 正本和人, 田桑弘之, Rumiana Bakalova, 松浦哲也, 小島隆行, 菅野巖, 二光子励起蛍光顕微鏡法によるラット大脳皮質微小循環計測、第20回日本脳循環代謝学会総会、2008年11月6日、東京ドームホテル (東京)
- ④ 正本和人, 小島隆行, 菅野巖, 脳賦活時の神経-血管カップリング研究、第9回脳神経核医学研究会(招待講演)、2008年10月24日、幕張メッセ国際会議場(千葉)
- ⑤ 正本和人, 小島隆行, 菅野巖, 神経血管カップリング: 分子メカニズムの解明に向けて、電気学会 光・量子デバイス研究会、2008年2月8日、慶応義塾大学日吉キャンパス (神奈川)
- ⑥ Masamoto K, Obata T, Kanno I, Vascular dimension, blood plasma speed, and arteriovenous transit time in anesthetized rat cortex, Society for Neuroscience, 2007年11月3日, San Diego, USA

6. 研究組織

(1) 研究代表者

正本 和人 (MASAMOTO KAZUTO)
電気通信大学・先端領域教育研究センター・
特任助教
研究者番号：60455384

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

小島 隆行 (OBATA TAKAYUKI)
放射線医学総合研究所・分子イメージング研
究センター・チームリーダー
研究者番号：00285107

菅野 巖 (KANN0 IWAO)
放射線医学総合研究所・分子イメージング研
究センター・センター長
研究者番号：10360356