

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 25 日現在

機関番号：82609

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2008～2011

課題番号：20390249

研究課題名（和文） 脳活動と脳循環代謝システムの連動、その局所原理と全体像の解明

研究課題名（英文） Neuro-Vascular-Metabolic Coupling, Understanding of their Physiological Basis and Whole Picture

研究代表者

根本 正史（NEMOTO MASAHIITO）

財団法人東京都医学総合研究所・認知症・高次脳機能研究分野・研究員

研究者番号：80370980

研究成果の概要（和文）：本研究は、脳活動とそれを支える脳循環代謝システムの連動について、げっ歯類を用いて、その局所原理と全体像を、異なる時空間スケールで統合的に理解することを目的とした。①微視的時空間スケール：二光子顕微鏡を用いて、sulforhodamine 101 を腹腔内に投与、大脳皮質の蛍光観察を行った。投与後の観察時間を調節することで、脳局所微小循環と、神経活動-微小循環の連動に重要な役割を果たすグリア細胞の両者を描出することが可能であった。②巨視的時空間スケール：急性/慢性の頭蓋窓を作製し、神経活動と微小循環の活動を計測・描出した。その結果、両者の連動は、皮質プロセスに依存して多様なパターンを示していた。この多様で非線形的な関係の統合的理解には、局所電場電位の時間スペクトル構造の解析と高周波数成分(ガンマ周波数帯域)の適用が有効であった。

研究成果の概要（英文）：

The purpose of this study was to understand the physiological basis and whole picture of neuro-vascular-metabolic coupling from a microscopic and macroscopic point of view using rodent models. ①Microscopic scale. Using two-photon microscopy and intraperitoneal injection of sulforhodamine 101, both cortical microvasculature and astroglia could be imaged with the lapse of time. ②Macroscopic scale. Using acute/chronic cranial window techniques, neural-hemodynamic relationships were examined. The results indicate the relationships vary depending on cortical processing patterns. However, the analysis of temporal/spectral structure of local field potentials (LFPs) and application of the high-frequency (gamma frequency band) LFP components were effective ways to manage the diversity or nonlinearity inherent in neural-hemodynamic relationships.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	5,400,000	1,620,000	7,020,000
2009年度	2,700,000	810,000	3,510,000
2010年度	4,100,000	1,230,000	5,330,000
2011年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
総計	13,800,000	4,140,000	17,940,000

研究分野：医師薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学

キーワード：二光子顕微鏡・光学的測定・内因性光学信号・神経機能画像学・神経活動・神経血管カップリング・脳微小循環

1. 研究開始当初の背景

現在、脳の活動状態を計測する技術は、大きく二つのカテゴリーに分類される。一つは、脳の情報処理を直接支える、細胞小器官から個々の細胞、同一機能の細胞集団、脳組織全体に至るまで様々な階層レベルの電気的活動を電磁場の変化として捉える実時間計測法であり、もう一つは、これらの電気的活動と密接に関連して発動させられる脳の物質代謝と血液循環の変化を捉える方法である。後者は、機能的MRI (fMRI)、機能的近赤外分光法 (fNIRS) に代表されるように、ヒトの脳活動を非侵襲的に定量化し、その機能的局在をイメージ化する計測技術として、近年めざましく進歩した。これらの計測技術は、認知、神経科学、教育、発達心理学などの研究分野から、うつ病、心的外傷後ストレス障害 (PTSD) などの精神・神経疾患の診断、高齢者の脳機能障害や脳卒中後の機能回復の評価、脳外科手術の為の機能野の同定、電気・磁気による脳刺激療法のモニタリング、Brain-Computer-Interface (BCI) の為の脳の出力情報の読み取りに至るまで、幅広く応用され始めている。両者の計測法は、様々な階層レベルで発現する脳活動を捉えるのに、時空間の解像度、侵襲性からみて、相補的である。しかし、ここで留意すべきことは、脳の物質代謝と血液循環の変化を脳機能の指標として用いる場合、神経活動と代謝、循環のカップリング (Neuro-Vascular-Metabolic Coupling: 神経の活動量に比例して、その領域の代謝と循環が増える) という生理学的現象が、前提として不可欠であるということである。ところが、このカップリング機構は未だ解明されず、その関係性に関して、様々なアンカップリングと非線形性が指摘されている (Nielsen, Lauritzen, 2001; Devor et al., 2003; Fukuda et al., 2006; Nagaoka et al., 2006; Roc et al., 2006)。

今後、これらの脳機能計測法を、脳科学の発展と臨床的応用へと正しく役立てる為には、生体分子や細胞、微小循環レベルで、神経活動のどのような要素が、如何なる血管反応物質を介して、どのように脳循環反応をトリガーし制御するのか、その局所原理を明らかにすると共に、マクロの視点から、脳活動の基礎状態が変動することを前提にした現実的な計測において、また、興奮と抑制のバランス、カラムなど機能領野間での相互作用が変化すると予想される脳の可塑的变化の過程で、神経活動と脳循環反応が、どこまで正確にカップリングするのか、その全体像を明らかにする必要がある。

2. 研究の目的

本研究は、脳活動とそれを支える脳循環代謝システムの連動について、その局所原理と全体像を、異なる時空間スケールから統合的に解明することを目的とする。具体的には、(1) **Microscopic Study**: 微視的時空間スケールで、神経活動、循環、代謝の変化をイメージングし、そのカップリング機構を直接支える生体分子や細胞レベルの挙動を解明する研究 (2) **Macroscopic Study**: 巨視的時空間スケールで、一個体において、脳活動の基礎状態が変動し、脳の可塑的变化が生じていく過程において、賦活時の情報処理がどのように変化するのか、電気生理学的信号と脳循環代謝由来の信号の両者を経時的に同時観測し、動的カップリングの姿を明らかにする研究の異なる階層レベルでの研究を並行して実施し、相補的に統合することで、脳循環代謝の変化から脳機能を推測する技術に必要な信号解釈の生理学的基盤、病態学的基盤を提供することを目的とする。

3. 研究の方法

げっ歯類を用い、以下の技術開発①、③と、研究②、④、⑤を実施する。

(1) Microscopic Study:

① 大脳皮質賦活領域に観察用の頭蓋窓を作製し、2光子顕微鏡を用い、単一細胞レベルの解像度を保持したまま、多数の神経細胞、グリア細胞の活動を蛍光指示薬で、微小循環の反応をプラズマや赤血球に負荷した蛍光指示薬で、生理的状态のまま同時に描出する。② 神経細胞の自発的同期的活動と微小循環の変動の関係を解明する。受容野、および受容野と隣接した非受容野を刺激し、微小電極で計測された単一ユニット、マルチユニット (MUA)、局所電場電位 (LFP) と、画像データとの時空間の定量的関係性を解明する。薬理学的操作で、カップリングに関わる神経活動の要素と血管反応仲介物質を同定する。神経活動の抑制と微小循環反応の定量的関係性を明らかにする。

(2) Macroscopic Study:

③ 慢性観察用の頭蓋窓、頭部固定具、複数の慢性電極を埋め込み、一頭体の脳の可塑的变化の過程において、覚醒下で、電気生理学的信号と脳循環代謝に由来する信号を同時に取得する。④ はじめに、麻酔下、傾眠下、覚醒下、注意下の行動様式を観察、対応するベースラインの神経活動、脳循環代謝の変動を計測する。次いで、それぞれの状態下における機能賦活時の反応とそれらの関係性を明らかにし、脳活動の基礎状態への依存性を

検討する。また、脳循環代謝の変動は、シナプス活動を反映する LFP のうち、ガンマ帯域の活動と深く関係するという周波数依存性を主張する報告(Mukamel et al., 2005; Niessing et al., 2005; Privman et al., 2007; Viswanathan and Freeman, 2007)があり、我々の先行実験からも、ガンマ帯域の LFP と MUA, 脳循環の3者が強く相関することが予想されるので、これを各々の状態下で検証する。⑤ 最終的に、可塑的過程のモデルとして、前肢あるいは後肢における体性感覚の識別タスクを課し、標的刺激で報酬を与えて学習させる。学習前、中、後で、識別タスク中の神経活動の変化、脳循環代謝の変化、行動学的な変化を観察し、脳機能の可塑的变化のメカニズムを、相補的、複眼的に明らかにし、大きな時空間スケールでの両信号の連動の姿を分析する。

4. 研究成果

(1) Microscopic Study:

二光子顕微鏡を用いて、脳局所微小循環と、神経活動-微小循環の連動に重要な役割を果たすグリア細胞の両者を描出する技術開発を行った。A. Cranial Window を作製した isoflurane 麻酔下マウスに、sulforhodamine 101 (SR101: $8 \mu\text{L/g}$ 体重)を腹腔内に投与。B. 投与後約 5 分で血漿中に移行した SR101 の蛍光が脳実質の微小血管内に出現、約 20-30 分後にピークに達して、投与後 10~80 分、脳実質内微小血管の3次元立体構造を良好に描出した。C. その後、SR101 による微小血管の蛍光強度は急速に減弱しはじめ、180 分後にグリア細胞の蛍光強度と等しくなり、300~480 分では良好なグリア細胞の描出が得られた。D. このように、SR101 の腹腔内投与と投与後の観測最適時間を調整することで、微小血管とグリア細胞の両者の描出が可能となった。E. この手法は、時間において、長期間何度も繰り返し行える為、低酸素暴露や、脳虚血モデルにおける微小循環系の変化と脳実質の細胞の反応の経時的な描出に有用であった(分担研究者正本ら、論文#1 図 1)。

(2) Macroscopic Study:

麻酔下での Neuro-Vascular Coupling の研究。成熟雄 Sprague-Dawley ラットを研究対象とした。 α -chloralose 麻酔下に、後肢の片側または両側を電気刺激、体性感覚野 (SI) において、電気生理学的信号(局所電場電位, LFP<100 Hz; 多ユニット活動, MUA>300 Hz)と、皮質血液循環に関連する光学的内因性信号を同時測定、各信号間の相関分析を行った。結果は、片側刺激においても、神経活動と皮質血液量の変化に関連する光学信号(CBV_{OIS})は、両側 SI で観察された。

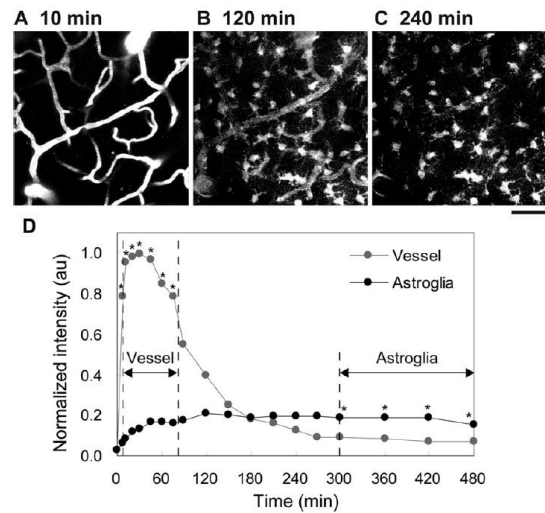


図 1

同側刺激による CBV_{OIS} の強度は、反対側刺激の約 30%であり、その中心は正中-尾側に変位していた。信号間の相関分析では、LFP-MUA と LFP-CBV_{OIS} の関係において、反対側反応と同側反応とは、異なる線形スケール因子であることがわかった。両側刺激において刺激間隔を変化させると、LFP, MUA, CBV_{OIS} は、全て 40 ms の間隔で後続する強く抑制されたが、CBV_{OIS} は、LFP より MUA で線形的に相関した(図 2)。しかし、LFP から高周波数成分のみ(>30 Hz)を抽出すると、LFP-MUA と LFP-CBV_{OIS} の関係性において、反対側反応と同側反応とは、類似した線形スケール因子となり、両側刺激に対する総反応を考えた場合でも、LFP の高周波数成分と MUA と皮質循環反応とが、互いに線形的に相関することになった(図 3)。これらの結果は、異なるパターンの皮質プロセスに依存した、LFP と MUA と皮質血液循環の関係性における多様性を示す。また、LFP の高周波数成分、特にガンマ周波数帯域の LFP が、LFP, MUA, 皮質血液循環との関係に内在する非線形性-多様性を調整するカギとなることを証明した(代表研究者根本ら、主論文#3)。

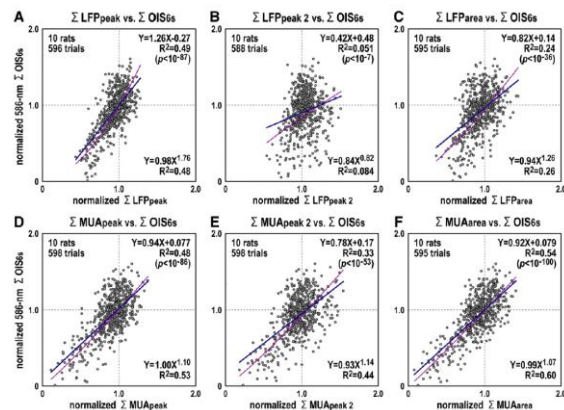


図 2

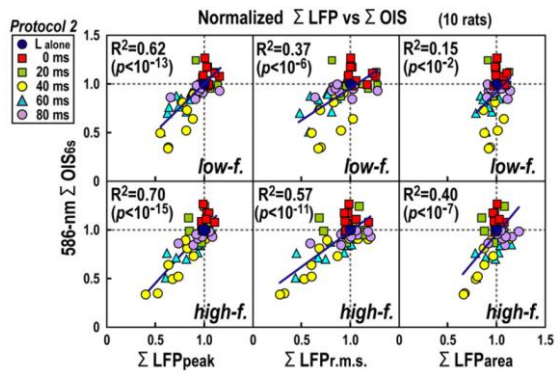


図 3

また、覚醒下での Neuro-Vascular Coupling の研究として、田桑、分担研究者正本らは成熟雄マウスを用いて、Isoflurane 麻酔下に Cranial Window を作製。覚醒させ、数日後より、発泡スチロールのボール上で、昼夜の locomotion の程度、頬ひげを揺らした時の Barrel Cortex での血流変化を検出した。この手法は、学習前後や障害前後の脳活動の可塑的变化を明らかにする為には有用である (田桑, 分担研究者正本ら, 主論文#6)

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 15 件)

1. Masamoto K, Tomita Y, Toriumi H, Aoki I, Unekawa M, Takuwa H, Itoh Y, Suzuki N, Kanno I (2012) Repeated longitudinal in vivo imaging of neuro-glio-vascular unit at the peripheral boundary of ischemia in mouse cerebral cortex. *Neuroscience* 査読有 Epub ahead of print (DOI:10.1016/j.neuroscience.2012.03.034)
2. Masamoto K, Kanno I (2012) Anesthesia and the quantitative evaluation of neurovascular coupling. *J Cereb Blood Flow Metab* 査読有 Epub ahead of print (DOI:10.1038/jcbfm.2012.50)
3. Nemoto M, Hoshi Y, Sato C, Iguchi Y, Hashimoto I, Kohno E, Hirano T, Terakawa S (2012) Diversity of neural-hemodynamic relationships associated with differences in cortical processing during bilateral somatosensory activation in rats. 査読有 *NeuroImage* 59(4):3325-3338 (DOI:10.1016/j.neuroimage.2011.11.067)
4. 根本正史 (2011) 脳と心の動きをみる—科学技術の最前線—査読無 東洋学術

研究 50(1): 193-219 (http://www.totetu.org/index.php?id=521&author_en=nemoto%20masahito&author=%E6%A0%B9%E6%9C%AC%E6%AD%A3%E5%8F%B2)

5. Hoshi Y, Huang J, Kohri S, Iguchi Y, Naya M, Okamoto T, Ono S (2011) Recognition of human emotions from cerebral blood flow changes in the frontal region: a study with event-related near-infrared spectroscopy. 査読有 *J Neuroimaging* 21(2): e94-101
6. Takuwa H, Autio J, Nakayama H, Matsuura T, Obata T, Okada E, Masamoto K, Kanno I (2011) Reproducibility and variance of a stimulation-induced hemodynamic response in barrel cortex of awake behaving mice. 査読有 *Brain Res* 1369: 103-111
7. Hoshi Y (2011) Review articles: Towards the next generation of near-infrared spectroscopy. *Phil Trans R Soc A* 査読無 369 (1955): 4425-4439
8. Autio JA, Kershaw J, Shibata S, Obata T, Kanno I, Aoki I (2011) High b-value diffusion-weighted fMRI in a rat forepaw electrostimulation model at 7 T. 査読有 *NeuroImage* 57(1): 140-148
9. Kida I, Iguchi Y, Hoshi Y (2011) Blood oxygenation level-dependent functional magnetic resonance imaging of bilateral but asymmetrical responses to gustatory stimulation in the rat insular cortex. 査読有 *NeuroImage* 56(3): 1520-1525
10. Masamoto K, Obata T, Kanno I (2010) Intracortical microcirculatory change induced by anesthesia in rat somatosensory cortex. 査読有 *Adv Exp Med Biol* 662: 57-61

[学会発表] (計 18 件)

1. Masamoto K, Kawaguchi H, Ito H, Kanno I (2011.7.24) Concurrent dynamic imaging of capillary network RBC and plasma in rodent cerebral cortex. ISOTT 2011 (Washington)
2. Masamoto K, Tomita Y, Takuwa H, Unekawa M, Toriumi H, Itoh Y, Suzuki N, Kanno I (2011.5.27) Longitudinal Imaging of Glio-Vascular Remodeling Induced by Chronic Hypoxia in Mouse Somatosensory

- Cortex. Brain and Brain PET 2011 (Barcelona)
3. Masamoto K, Takuwa H, Obata T, Unekawa M, Toriumi H, Tomita Y, Suzuki N, Kanno I (2010.11.15) Morphological changes of gliovascular networks induced by chronic hypoxia in mouse cerebral cortex, Neuroscience 2010 (San Diego)
 4. Hoshi Y (2010.11.8) Toward the next generation of near-infrared spectroscopy. The Royal Society Theo Murphy International Science Meeting on Making light work: illuminating the future of biomedical optics, The Kavli Royal Society (Buckinghamshire, UK)
 5. Hoshi Y (2010.10.30) Basic Studies on NIRS toward further development of functional optical brain imaging. International Congress of Clinical Neurophysiology ICCN 2010 (Kobe)
 6. Masamoto K (2010.10.18) Two-photon imaging of live animal cerebral arteries. The 1st World Forum on Cerebral Blood Flow Metabolism and Functions (Kyoto)
 7. 根本正史, 星 詳子, 黄田育宏, 井口義信 (2010.9.4) 皮質プロセスに依存する神経活動-脳循環関連の多様性. 第14回酸素ダイナミクス研究会 (東京)
 8. 星 詳子(2010.7.24) NIRS 信号と神経活動. 第13回日本光脳機能マッピング研究会, (東京).
 9. Nemoto M, Hoshi Y, Kida I, Iguchi Y (2010.6.7) Diversity of neural-hemodynamic relationships depending on patterns of cortical processing. HBM 2010 Abstr 1397 (Barcelona)
 10. Nemoto M, Hoshi Y, Iguchi Y (2009.6.30) Diversity of neural-hemodynamic relationships depending on patterns of cortical processing during bilateral somatosensory activation in rats. J Cereb Blood Flow Metab 29 [Suppl]: S193, 929. Brain'09 (Chicago)
 11. Masamoto K, Obata T, Kanno I (2009.6.30) Coordinated response of arterial networks induced by local stimulation in anesthetized rat somatosensory cortex. Brain'09 (Chicago)
 12. Nemoto M, Hoshi Y (2008.7.9) Physiological basis for fNIRS: Fundamental principles on neurovascular coupling. Neurosci Res 61 [Suppl]:WS1D-3-2(Workshop). Neuroscience 2008 (Tokyo)
 13. 根本正史, 星 詳子, 井口義信, 山崎 匡 (2008.7.5) 神経活動に伴う脳血管反応について: シナプス活動, 神経発火と内因性光学信号 (Symposium). 第14回日本脳代謝モニタリング研究会 (東京)
- [図書] (計6件)
1. 正本和人(2009) 微小酸素電極の作製と測定の実際. In: からだと酸素の事典 (編集: 酸素ダイナミクス研究会, 朝倉書店) pp81-87
 2. 星 詳子 (2009) 酸素代謝を利用した脳機能イメージング. In: からだと酸素の事典 (編集: 酸素ダイナミクス研究会編, 朝倉書店) pp438-445
 3. 星 詳子 (2009) 光を用いた脳と心の探究 日兎 113: 1642-1648
 4. Hoshi Y (2008) Near-infrared spectroscopy for studying higher cognition. Neural Correlates of Thinking. (Kraft E, Gulyas B, Poppel E ed) pp.83-93
- [その他]
ホームページ等
<http://www.igakuken.or.jp/kansei/index.html>
6. 研究組織
- (1) 研究代表者
根本 正史 (NEMOTO MASAHITO)
財団法人東京都医学総合研究所・認知症・高次脳機能研究分野・研究員
研究者番号: 80370980
 - (2) 研究分担者
星 詳子 (HOSHI YOKO)
財団法人東京都医学総合研究所・認知症・高次脳機能研究分野・副参事研究員
研究者番号: 50332383
- 正本 和人
電気通信大学・先端領域教育研究センタ

一・特任助教
研究者番号：60455384

小島 隆行 (OBATA TAKAYUKI)
独立行政法人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
(H22→23 連携研究者)

(3)連携研究者
なし