

## 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25年 6月19日現在

機関番号：82502

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010年度～2012年度

課題番号：22700441

研究課題名(和文) マウス体性感覚野における脳微小循環調節機構と光脳機能イメージングとの関連性の解析

研究課題名(英文) Relation between optical intrinsic signal imaging on regulation of microcirculation on mice somatosensory cortex

研究代表者

川口 拓之(KAWAGUCHI HIROSHI)

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・研究員

研究者番号：60510394

研究成果の概要(和文)：

小動物の脳を対象としてマイクロレベルの血流ダイナミクスや血管構造を顕微鏡で捉えることで、脳組織中の血流調整メカニズムがヒト光脳機能イメージング法に及ぼす影響について考察した。脳血流調整メカニズムは筋肉を有する動脈の拡張のみでは説明できず、現行の顕微鏡の能力では評価が困難な毛細血管や静脈の受動的な拡張や局所の血液量の増減をコントロールするための血流分配機構の存在がヒト光脳機能イメージングに影響していることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：

The present study investigated the contributions of the regulation system of micro-level hemodynamics and vasculature on diffuse optical imaging by using multi photon laser scanning microscopy and the development of the software that evaluate the microcirculation. The results indicates that the change in diameter of arterioles is much smaller than that of change in intensity of diffuse optical signal, which suggest the passive change in diameters of capillary and vein, and hematocrit might affect the change in intensity of diffuse optical signal.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
2012年度	500,000	150,000	650,000
総計	2,300,000	690,000	2,990,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：脳神経科学・融合脳機能計測科学

キーワード：生物・生体工学、脳微小循環、生体医用光学、脳血流

### 1. 研究開始当初の背景

NIRS(Near infra-red spectroscopy)はヒトを対象とした非侵襲な脳血行動態計測法であり、脳科学、発達生理学、精神疾患診断、リハビリテーションの評価などに応用されている。申請者はNIRSをイメージング技術に発展させた光脳機能トポグラフィの研究開発に従事していた。NIRSでは頭皮に装着したファイバプローブから生体透過性の高

い近赤外光を照射し、その反射光の強度を計測することで脳の機能を測る装置である。脳の血行動態に従って光が吸収される割合が変化するため、それを反射光量の変化として捉えることができる。NIRSは装置が小型で拘束性が低いため診断室やベッドサイドにも設置可能であるという特長を有しており、臨床現場での応用に長けた技術であるが、まだ発展途上であり、技術的な改善の余地を

残している。なかでも、計測される信号が脳神経活動に伴った血行動態を反映していることは確実であるものの、その信号が有している生理学的な意味を考察することは困難である。この原因は、NIRS で計測される空間的にマクロな信号とミクロな脳微小循環での生理との関連が直接的に結びつけられていないためである。NIRS で計測される検出光強度の変化は血管の拡張・収縮やヘマトクリットの増減などの複数のパラメータに依存しており、どのパラメータがどの程度変化すると結果として反射光量がどの程度変化するのかは明らかになっていない。

一方、ミクロな微小循環の計測法として共焦点レーザー顕微鏡や多光子励起蛍光顕微鏡が開発され、小動物の脳微小循環を *in vivo* で計測することができるようになり、目覚ましい成果が報告されている。たとえば、1本の毛細血管内を流れる1つの赤血球の速度を計測することや、サブマイクロオーダーの空間分解能で3次元画像の撮像が可能となっている。また、血行動態のみだけでなく、脳活動時における細胞の形状変化も捉えられるという報告もある。このような研究のなかでも、神経細胞発火時のエネルギー代謝とそのときの血管反応との関連性(ニューロバスキュラーカップリング)を解明することに多くの研究者が精力的に取り組んでいる。ニューロバスキュラーカップリングのようなミクロなレベルでの生理現象の関連を解明することは重要な課題であるが、このようなサブマイクロオーダーの計測で得られたミクロな生理現象の知見を社会に還元するためには、ヒトを対象とした計測が可能であるマクロな血行動態信号との関連を明確にすることが不可欠である。しかし、NIRS 信号が捉えている空間は数立方 cm であることから、ミクロな計測で蓄積した知見と直接関連づけることは現状では困難である。

## 2. 研究の目的

本研究では NIRS と同じ原理で小動物の血行動態変化の計測に用いられる OISI (Optical Intrinsic Signal Imaging) で得られる信号と共焦点レーザー顕微鏡と多光子励起蛍光顕微鏡で計測した毛細血管レベルの空間分解能で捉えた脳微小循環ネットワーク構造や脳活動に伴う赤血球の流れや個数の変化、血管の膨張収縮との関連を明らかにすることを目的とする。この研究の成果は NIRS が捉えている信号の病理学、生理学的な意味を解釈する上で重要な礎になると期待される。

## 3. 研究の方法

ミクロな微小循環計測のシミュレーションを行うためのモデル構築を行うための基礎データを共焦点レーザー顕微鏡と多光子励

起顕微鏡を用いて収集する。シミュレーションモデルを構築する上で必要となるのは血管ネットワークの幾何学的構造、生体組織における光学特性値、脳機能賦活時の血流変化の度合いである。このなかで、組織の吸収特性や散乱特性を示す光学特性値は文献を参考に決定する。血管ネットワークの幾何学的構造は多光子励起顕微鏡で実測したデータを用いる。多光子励起顕微鏡では OISI で計測している光の到達深度よりも深い脳表面から 700  $\mu\text{m}$  程度の深さまで測ることができるので、本研究を遂行するのに十分な構造情報を計測できる。また、脳活動の血管反応は毛細血管レベル、小血管レベルの2段階の空間的レベルでの情報を収集する。毛細血管では局所的ではあるが個々の赤血球を識別することができるので、その流速を測定する。一方、小血管では複数の赤血球が流れているため、個々を識別することは難しい。そこで、申請者等が開発した顕微鏡を用いて血管枝ごとに血流の違いを解析することができる手法を用いる[研究業績1]。この手法はボラス投与した蛍光剤の流れをみることから、血管径や血流速を血管枝ごとに推定することができる手法である。OISI 計測は上記の蛍光剤を投与前に計測し、おおよその脳神経活動部位を推定すると共に次年度以降の研究に用いる。また、実験と平行して光伝播シミュレーションの環境を整備する。前年度に蓄積したデータをもとにして、脳微小循環生理および構造を模擬した光伝播解析モデルを構築する。まず、単純に血管ネットワークの幾何構造を忠実にモデリングして光伝播シミュレーションを行い、OISI の計測を仮想空間で実行できるようにする。この結果を実測と比較することで、血流変化がどの程度変化すると OISI の信号がどの程度変化するのかを解析する。

## 4. 研究成果

本研究では小動物のマクロスコピックな血行動態変化の計測に用いられる内因性光イメージングで得られる信号と共焦点レーザー顕微鏡と多光子励起蛍光顕微鏡で計測した毛細血管レベルの空間分解能で捉えた脳微小循環ネットワーク構造や脳活動に伴う赤血球の流れや個数の変化、血管の膨張収縮との関連を実測データに基づいたシミュレーションを行うことで明らかにすることを目的としている。シミュレーションモデルを構築する上で必要となるのは血管ネットワークの幾何学的構造、生体組織における光学特性値、脳機能賦活時の血流変化の度合いである。本年度は主に脳機能賦活時の血流変化の度合いの定量化手法の開発および計測を行った。毛細血管レベルの血流の定量化を

するために時空間の2次元画像から赤血球の速度を自動的に定量化する手法を開発し、多光子励起顕微鏡を用いた *in vivo* 実験においてその有効性を示した。また、脳の表面における血流については血管枝ごとに血管径や血流速に関連するパラメータを推定することができる手法を応用して、ニトロプルシドナトリウム投与下および前肢電気刺激下における血行動態変化を観察した。正常時の血管径を基準に動静脈をそれぞれ3種に分類して解析すると、SNP 投与下においては太さが25から50  $\mu\text{m}$  の動脈、脳賦活時の血流調整は25  $\mu\text{m}$  以下の動脈における血行動態変化が顕著であり刺激に対する血管応答の血管径依存性が示唆された。

多光子励起顕微鏡を用いて脳微小循環ネットワークの3次元形態画像を計測し、それを基に OISI のシミュレーションのためのモデル構築を行う手法を確立し、さらに、構築したモデルにおける光伝播解析を行う環境を整えた。多光子励起顕微鏡を用いて脳微小循環ネットワークの3次元形態画像では血しように蛍光試料を流すことで血管内腔からの信号を捕らえるが、内径が赤血球の大きさよりも小さな毛細血管では血管が途切れてしまうことや特定の試料は血管から脳実質に漏れてしまうことといった問題点があった。この問題は計測パラメータの最適化や適切な蛍光色素を選択することで解決された。また、多光子励起顕微鏡で捉える3次元画像では深部を計測する際に、脳組織による光散乱の影響で SN 比が低下する。この問題にはエッジ保存フィルタのひとつである Non-localmeans (NLM) フィルタを適用することを試みた。NLM フィルタは計算コストが膨大であるため GPGPU 技術による並列演算で高速化した。GPGPU 技術は光伝播シミュレーションモデルの高速化のためにも必須であり、次年度に向けた準備もできたといえる。

多光子励起顕微鏡で得られるデータをもとに OISI のシミュレーションを行い、実測結果とシミュレーション結果を比較することにより OISI への微小循環パラメータの寄与を考察した。多光子励起顕微鏡で得られる3次元血管構造をもとに OISI のシミュレーションを行ったところ、OISI で用いられることが多い500-600nmの波長帯において、血管の部分実効光路長は全光路長の10%程度であることがわかった。一方、血管構造を動脈、毛細管、静脈、に分類するとそれぞれ5.5%, 7.8%, 86.7%であった。実測においては OISI の信号変化は3%前後であり、ひげ刺激時の動脈の拡張率は脳表で15%, 脳内で10%程度であったことから、動脈の拡張のみでは OISI の信号変化よりはるかに小さな信号変化が起こるのみであり、顕微鏡の空間分解能では評価が困難な毛細血管や静脈の受

動的な拡張や局所のヘマトクリットの増減をコントロールするための血流分配機構の存在が示唆された。今後は本研究で構築したソフトウェアやシステムをベースに脳微小循環における血流分配機構の解明を行う。

#### 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2件)

- ① Hiroshi Kawaguchi, Kazuto Masamoto, Hiroshi Ito, Iwao Kanno, "Image-based vessel-by-vessel analysis for red blood cell and plasma dynamics with automatic segmentation", *Microvascular Research*, Volume 84, Issue 2, September 2012, Pages 178 - 187, 査読有, doi: 10.1016/j.mvr.2012.05.001
- ② Joonas Autio, Hiroshi Kawaguchi, Shigeyoshi Saito, Ichio Aoki, Takayuki Obata, Kazuto Masamoto, Iwao Kanno "Spatial Frequency-Based Analysis of Mean Red Blood Cell Speed in Single Microvessels: Investigation of Microvascular Perfusion in Rat Cerebral Cortex", *PLoS ONE*, Volume 6, Issue 8, e24056. 査読有, doi:10.1371/journal.pone.0024056

[学会発表] (計7件)

- ① Hiroshi Kawaguchi, "Comparison between neuromelanin-related MRI signal and dopamine transporter binding measured by PET in humans", XXVIth International Symposium on Cerebral Blood Flow, Metabolism, and Function & The XIth International Conference on Quantification of Brain Function with PET, 2013年05月20日~2013年05月23日, Shanghai, China.
- ② Hiroshi Kawaguchi, "A semi-automated classification of vascular components in mouse somatosensory cortex from 3d multi-photon laser scanning microscopic image", The 9th International Symposium on Functional Neuroreceptor Mapping of the Living Brain, 2012年08月14日~2012年08月17日, Baltimore, USA.
- ③ 川口拓之, "脳微小血管の時空間画像による赤血球速度自動定量法", 第24回日本脳循環代謝学会総会, 2012年11月07日~2012年11月09日, 広島.
- ④ Hiroshi Kawaguchi, "Dependency of Hemodynamic Responses on Vessel

Segments Determined by Vessel-Branch-Based Analysis of Vascular Network in Rat Cortex”, XXIVth International Symposium on Cerebral Blood Flow, Metabolism and Function, 2011年5月26日, Barcelona, Spain.

- ⑤ Hiroshi Kawaguchi, “Dependency of Hemodynamic Responses on Vessel Segments Determined by Vessel-Branch-Based Analysis of Vascular Network in Rat Cortex”, Gordon Research Conference, 2010年8月26日, Andover, USA.
- ⑥ 川口拓之, “Dependency of Hemodynamic Responses on Vessel Segments: Vessel-Branch-Based Analysis of Vascular Network in Rat Cortex”, 第14回酸素ダイナミクス研究会, 2010年9月4日, 東京.
- ⑦ 川口拓之, “SNP および前肢刺激に対する血行動態変化の血管径依存性”, 第22回日本脳循環代謝学会総会, 2010年11月26日, 大阪.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

川口 拓之 (KAWAGUCHI HIROSHI)  
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・研究員  
研究者番号：60510394

### (2) 研究協力者

伊藤 浩 (ITO HIROSHI)  
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・プログラムリーダー  
研究者番号：20360357

田桑 弘之 (TAKUWA HIROYUKI)  
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・研究員  
研究者番号：40508347

菅野 巖 (IWAO KANNO)  
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・主任研究員  
研究者番号：10360356

小畠 隆行 (TAKAYUKI OBATA)  
独立行政法人放射線医学総合研究所・重粒子医科学センター病院・チームリーダー  
研究者番号：00285107

岡田 英史 (EIJI OKADA)  
慶應義塾大学・理工学部・教授  
研究者番号：40221840

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