

## 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 26 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(A)

研究期間：2010～2012

課題番号：22240044

研究課題名（和文） マウス深部脳活動の経頭蓋光学イメージング

研究課題名（英文） Transcranial optical imaging of neural activity in deep brain structures in mice

研究代表者

澁木 克栄 (SHIBUKI KATSUEI)

新潟大学・脳研究所・教授

研究者番号：40146163

研究成果の概要（和文）：

我々は組織浸透性の高い近赤外領域のマクロ共焦点光学系を用い、マウス深部脳活動のイメージング法を開発した。一般に共焦点光学系は、小さなピンホールを通過する光しか検出しないため、光情報の一部しか利用しない。そこでピンホール径を拡大し、光検出能力を強化した。さらに近赤外蛍光色素で標識した赤血球をマウスに投与し、脳表から約 2.5 ミリ度の深さの外側膝状体の視覚応答を、活動依存的な血流変化として可視化することに成功した。

研究成果の概要（英文）：

We developed a new optical method for imaging neural activity in deep brain structures in mice. We used a macroconfocal microscope in a near-infrared range. Generally, a confocal microscope uses only a part of light passing through a tiny pinhole. Therefore, the diameter of a pinhole was expanded, and sensitivity of our macroconfocal microscope was strengthened. We labeled red blood cells (RBC) with NIR815, a near-infrared fluorescent probe, and applied the fluorescent RBCs to mice. In these mice, activity-dependent hemodynamic responses elicited by visual stimuli were successfully imaged in the lateral geniculate body, which located approximately 2.5 mm deep from the cortical surface.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	24,900,000	7,470,000	32,370,000
2011 年度	7,400,000	2,220,000	9,620,000
2012 年度	7,400,000	2,220,000	9,620,000
総計	39,700,000	11,910,000	51,610,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：脳神経科学・融合基盤脳科学

キーワード：脳機能イメージング、マクロ共焦点顕微鏡、近赤外光、活動依存的な血流変化

### 1. 研究開始当初の背景

近赤外光は組織浸透性が高く、ヒトの脳活

動を厚さ 1 cm もの頭皮・頭蓋骨を介して記録可能である。マウスは頭皮を取り除くと、

頭蓋骨は透明であり、経頭蓋イメージングが可能である。また全脳の厚みは高々5 mm程度に過ぎない。従って、近赤外光を用いればマウス深部脳機能の非侵襲的光学イメージングは理論的に十分可能であると思われる。しかし、現実にはそのような方法はまだ開発されていない。

非侵襲的に脳深部の画像を得る方法として二光子励起と共焦点光学系の二種類がある。二光子励起を起こすためには近赤外パルスレーザーを一点に集光させる必要があり、脳深部では集光が困難になるため、脳表から1 mm程度が到達深度の限界である。集光精度が低下すると二光子励起に必要な励起光強度が得られないため、1 mmという限界を超えることは非常に困難である。

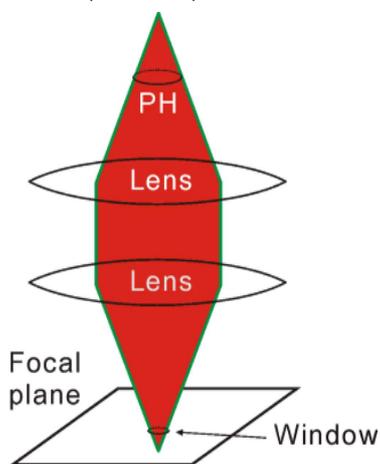
一方、通常の共焦点光学系は0.1 mm程度の到達深度で使用されているが、焦点深度の大きなマクロレンズと組み合わせた共焦点光学系では二光子顕微鏡と同程度の到達深度が可視光領域で得られている。組織浸透性の高い近赤外光を用い、この波長領域でマクロ共焦点光学系を用いれば、二光子顕微鏡の到達深度を凌駕すると期待される。しかし、我々の研究を開始する時点では、そのような既存のイメージング法は存在しなかった。

## 2. 研究の目的

本研究は、組織浸透性の高い、800 nm付近の近赤外光波長領域におけるマクロ共焦点光学系を用い、マウス深部脳機能の経頭蓋イメージング法を開発することを目指した。このため、既存のマクロ共焦点光学系を改良し、深部脳活動解析に特化したシステムを構築し、実際に脳深部の神経活動がイメージとして捉えられるかどうかを検証した。

## 3. 研究の方法

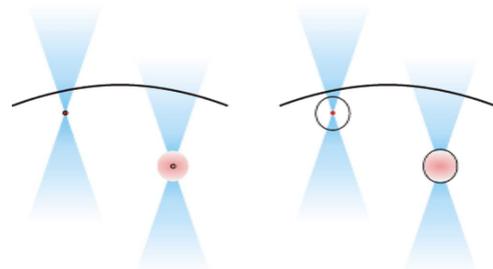
共焦点顕微鏡は、図のようにピンホール(PH)を通過する光のみを感知する特性を有する。このPHを焦点面に逆に投射したものが観測窓(Window)である。この観測窓の直径は、通常



1  $\mu\text{m}$  以下であり、イメージングの空間分解能を規定する。観測窓から発する光はPHを通過できるので、その面積が

PHを通過する光量を決める。即ち、PHを小さくすれば、空間分解能が細くなるが、PHを通過する光量が激減し、逆にPHを拡大すれば、空間分解能が犠牲になるものの、PHを通過する光量が激増し、微弱な光を効率よく捉えることが出来るようになる。我々は市販のマクロ共焦点顕微鏡(ニコン、AZ-C1)のPHを拡大し、感度を大幅に向上させた。

深部の脳機能イメージングが困難な最大の理由は、光が脳組織によって散乱し、広がってしまうことにある。PH径が一定の場合(図左)、拡散した脳深部からの光のごく一部しか捉えることができない。しかし、PHを拡大すれば(図右)、拡散した光でも効率よく捉えることが出来る。従って、PH径の拡大は深部脳活動のイメージングにおいて非常に重要なポイントである。



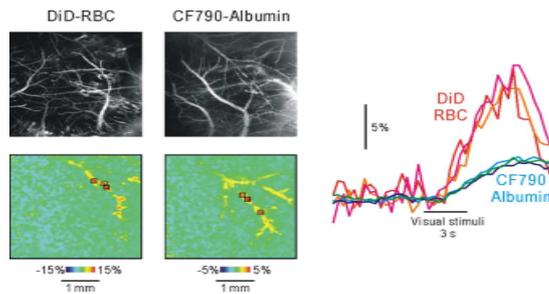
深部からの光を効率良く捉えることが出来たととしても、それによってどのように脳活動を捉えるかという点が問題である。我々は既にfMRIなどで広く用いられている活動依存的な脳血流変化を、脳活動のメルクマールとして捉え、可視化する方法を用いることとした。

通常血流応答を光学的に観察するためには、ヘモグロビンに由来する吸光変化を捉える方法が良く用いられる。しかし共焦点顕微鏡で血流変化を捉えるためには、血液を蛍光で標識する必要がある。血液には、大別して血漿と赤血球の2種類のコンパートメントが含まれる。我々は、血漿成分を標識するため、633 nmで励起されるAlexa Fluoro 633、又は785 nmで励起されるCF790で血漿タンパクのアルブミンを標識し、マウスに静脈内投与した。また赤血球を標識するため、633 nmで励起される脂溶性のDiI、もしくは785 nmで励起される脂溶性のNIR815で赤血球膜を予め標識し、標識された赤血球をマウスに静脈内投与した。

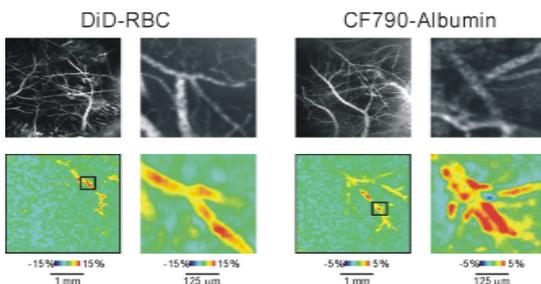
測定対象脳部位としては一次視覚野(脳表)及び外側膝状体(深さ2.5 mm)を選び、移動する縞模様をウレタンで麻酔したマウス眼前に提示した時のこれらの脳部位の活動が、血流変化として捉えられるかどうかを検証した。また、脳組織に対する外科的侵襲を少なくするため、開頭せずに薄くした頭蓋骨を介した経頭蓋イメージングを行った。

#### 4. 研究成果

4種類の蛍光プローブを投与したマウスで一次視覚野の血流変化を解析したところ、基本的にはいずれも細動脈からの蛍光信号の増強がみられた。図左はDiDで標識した赤血球、図中はCF790で標識したアルブミンを投与した例である。いずれもほぼ同様の時間経過を持って視覚刺激に反応するが(図右)大きく異なるのはその振幅である。標識赤血球を投与した場合は、蛍光変化率が15%程度、標識アルブミンを投与した場合は5%程度と約3倍もの開きが観察された。

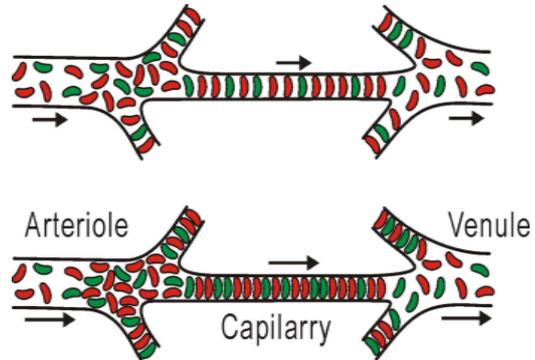


その原因は、信号増強を示す細動脈を拡大してみることで明らかとなった。即ち標識アルブミンを投与した場合は(図右)、蛍光信号の増強は細動脈壁に沿って両側性に見られたことから、主要な信号増強メカニズムは細動脈の拡張であると思われる。これに対して、標識赤血球を投与した場合は(図左)、蛍光信号の増強は細動脈壁だけでなく、細動脈の中心部からも観察された。即ち血液の蛍光強度自体が上昇したことを示している。血液の蛍光強度が上がることは即ち血液中の赤血球密度(ヘマトクリット)が活動依存的に増大し、この変化が標識赤血球を用いたときのみ効率よく検出できたと結論される。



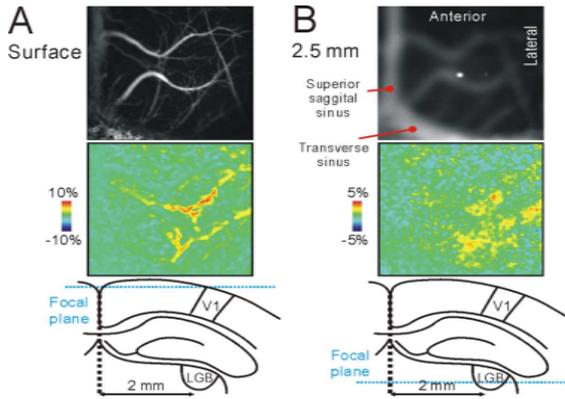
このような活動依存的ヘマトクリット変化は、血行動態を考えると、良く説明できる。即ち、赤血球の直径は毛細血管の直径と同程度であるので、赤血球が毛細血管を流れるときに摩擦抵抗を受け、血漿よりも流速が遅くなる。しかし、赤血球の流量と血漿の流量は、循環系のどの面でも常に一定のバランスを保たねばならない。赤血球の流速の低下を代償するためには、毛細血管とその上流の細動脈領域でヘマトクリットが高くなる必要性

がある(図上)。脳活動が高まったとき、血流速度はさらに高まり、赤血球が毛細血管から受ける摩擦抵抗はより大きくなるので、結果的に細動脈から毛細血管領域にかけてヘマトクリットの上昇はより著しくなると考えられる(図下)。

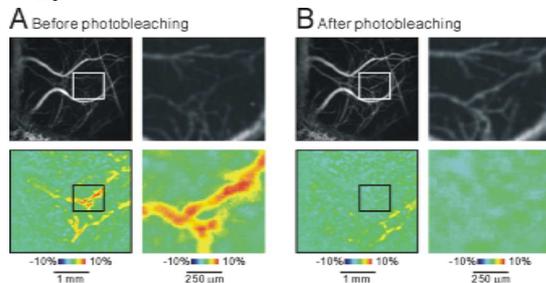


以上の結果から、活動依存的な血流応答を効率よく捉えるためには、蛍光色素で標識したアルブミンを用いるより、蛍光色素で標識した赤血球を用いた方が、より敏感に血流変化を捉えやすいことが判った。また、組織浸透性を考えると、可視光(633 nm)で励起されるDiDを用いるより、近赤外光(785 nm)で励起されるNIR815で標識された赤血球を用いる方が、深部脳機能を可視化する上において効率が良いことが判った。

我々はNIR815で標識された赤血球をマウスに静脈内投与し、一次視覚野(脳表、V1)と外側膝状体(深さ2.5 mm、LGB)領域から視覚刺激(移動する縞をマウスの眼前に提示)に対する脳活動変化を捉える実験を行った。予め解剖学的な脳局在をアトラスと比較対照するためマウスの正中線、並びに大脳皮質の後縁に存在する静脈洞(Superior sagittal sinus、Transverse sinus)を可視化し、その位置から脳部位を同定した。まず焦点面を脳表においてイメージングを行った場合は、一次視覚野(V1)に相当する部位に血管応答を観察した(次ページ図A)。また、焦点面を脳表から2.5 mmの深さに設定した場合も、外側膝状体(LGB)に相当する部位に信号増強を認めたが(次ページ図B)、脳表と異なり、個々の血管の存在は同定できなかった。外側膝状体の位置は水平面に投影するとほぼ一次視覚野と同じ場所に来る。従って2.5 mmの深さで何らかの蛍光シグナルの増強を記録したとしても、それが本当に外側膝状体の応答に相当するものではなく、単に脳表の血管応答がぼやけたものを深さ2.5 mmで光学的に捉えただけではないかという疑問が生じる。この疑問に答えるためには、脳表の血管応答のみを選択的に抑圧し、そのとき外側膝状体に相当する深さで、蛍光変化が残存することを証明しなければならない。



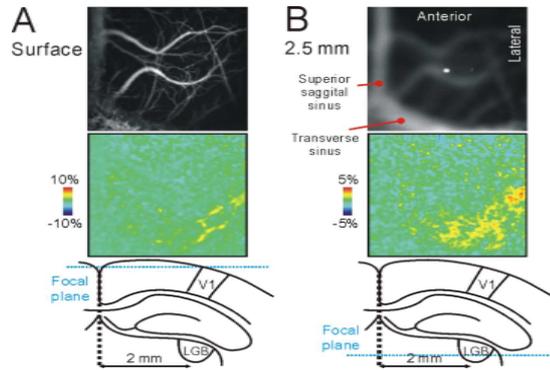
我々は脳表の血管応答のみを選択的に抑圧するため、半導体レーザーに由来する青い光（波長 475 nm）を脳表面に照射し、その後、脳深部で記録した血管応答が残存するかどうかを検証した。我々の以前の研究で血管応答は、青い波長の強い光を照射すると抑圧されることが判っている (Kubota et al., 2008)。その理由は青い光は酸素代謝に必要なフラビン蛋白の退色を引き起こすことで酸素代謝を抑え、その結果、常に一定の張力を保つために収縮し続けている細動脈が拡張してしまい、この状態で神経活動が生じても、それ以上の拡張が生じないためと考えられる。実際に半導体レーザー由来の青い光を一次視覚野の表面に照射すると、照射前（図 A）と比較して照射後（図 B）では細動脈が拡張すると同時に血管応答がほぼ消失していた。



さらに照射後に脳表（次図 A）並びに深さ 2.5 mm（次図 B）から血流応答を記録してみると、脳表の血流応答が大きく阻害されているにもかかわらず、深さ 2.5 mm で記録した血流応答の多くが残存していた。このことから、深さ 2.5 mm で記録した血流応答は、一次視覚野の血流応答を反映したものではなく、外側膝状体における活動依存的な血流変化を捉えたものと結論される。青い光は、近赤外光と比較すると、組織浸透性が悪いため、脳表の血管応答のみが選択的に阻害されたと思われる。

以上の結果から、マクロ共焦点顕微鏡のピンホールを拡大して光検出感度を上昇さ

せ、組織浸透性に優れた適切な近赤外蛍光プローブを使用すると、深部脳活動を実際に捉えることが可能であることが実証された。



### （本研究の意義と今後の展開）

本研究では深部脳活動のイメージング法の可能性を実証するため、比較的性質がよく判っている一次視覚野と外側膝状体の活動に焦点を当てた。しかし、現状ではそれ以外の数多くの部位においてマウス深部脳活動が詳しく解析されているとは言えない状態にある。例えば内側前頭前野や海馬、大脳基底核、中継核以外の視床などがそれに当たる。今後本イメージング法の性質をより詳しく検証し、一つの実験法として確立していくことによって、これらの脳部位の解析に実際に応用可能な方法となっていくと期待される。

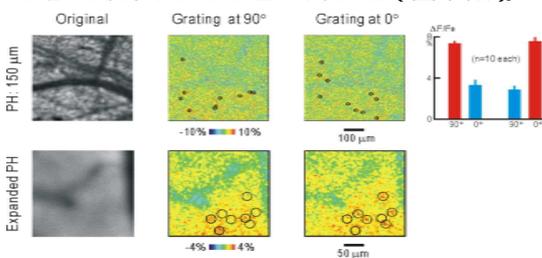
本研究では、活動依存的な血流応答を用い、脳活動を可視化する方法を用いた。しかし、実際に観察しているのは、神経細胞ではなく、その周辺を灌流する血管内の現象である。残念ながら、現時点では神経活動を近赤外領域で直接モニター出来る蛍光プローブ（例えばカルシウム指示薬など）は開発されていない。しかし、そのようなプローブが開発された際には、本法をそのまま神経活動の直接的なイメージング法として援用することが可能である。

深部脳活動の解析は、そのままでも十分価値のある研究であるが、脳表（例えば大脳皮質）の詳細な解析と同時に行うことで、より一層価値が高まる。例えば感覚野は一般に視床から入力を受けるが、高次領野になると、その結合は視床から皮質に向かうだけでなく、皮質から視床へと向かい、双方向性になる。このような双方向性結合がどのような機能を持つのかを理解するためには、視床だけではなく、皮質の活動を同一の動物で記録することが必要である。即ち、深部脳機能イメージングに用いるのと同じ共焦点顕微鏡を用いて、大脳皮質の神経活動を、なるべく単一細胞レベルで記録・解析できることが望ましい。

我々はこれまでミトコンドリアのフラビ

ン蛋白由来の緑色自家蛍光を用いて、大脳皮質活動が可視化できることを見出し、様々な解析を行ってきた。しかし、従来の CCD カメラを用いた脳表面からの画像解析では、単一ニューロンに由来する信号が折り重なって判別できないため、いくら拡大倍率を上げても個々のニューロン像を分離できなかった。しかし、我々の使用しているマクロ共焦点顕微鏡は深さ方向の分解能を持つため、個々のニューロン活動を分離同定できるはずである。

マクロ共焦点顕微鏡で実際にフラビン蛋白蛍光の計測を行うと、例えば一次視覚野では個々のニューロンが持つ方位選択性を検出できるようになった(図上段)。視覚応答に対するフラビン蛋白蛍光応答をみると、粒子状の応答パターンが見える。この粒子の一個一個の応答について方位選択性があることが判った。さらにピンホールの拡大によって空間分解能を落とす代わりに感度を上げた共焦点光学系で実験すると、個々のニューロンに相当すると思われるスポットが、より明確に判別できることが判った(図下段)。



以上述べたように、マクロ共焦点顕微鏡を用いた深部脳機能イメージングは実験的に実施可能であり、今後色々な方法と組み合わせることで、マウスなどの小動物の有力な脳機能解析法として発展していくものと期待される。

## 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 12 件)

Honma Y, Tsukano H, Horie M, Ohshima S, Tohmi M, Kubota Y, Takahashi K, Hishida R, Takahashi S, Shibuki K: Auditory cortical areas activated by slow frequency-modulated sounds in mice. 査読有, PLoS ONE, in press.  
Horie M, Tsukano H, Hishida R, Takebayashi H, Shibuki K. Dual

compartments of the ventral division of the medial geniculate body projecting to the core region of the auditory cortex in C57BL/6 mice. 査読有, Neurosci Res, in press.

Todaka H, Tatsukawa T, Hashikawa T, Yanagawa Y, Shibuki K, Nagao S.

G-protein coupled modulatory actions of motilin on K<sup>+</sup> channels and postsynaptic GABA receptors in mouse medial vestibular nuclear neurons. 査読有, Eur J Neurosci, 7: 339-350, 2013.

Kitaura H, Oishi M, Takei N, Fu Y-J, Hiraishi T, Fukuda M, Takahashi H, Shibuki K, Fujii Y, Kakita A.

Periventricular nodular heterotopia functionally couples with the overlying hippocampus. 査読有, Epilepsia, 53: e127-131, 2012.

Yamashita H, Chen S, Komagata S, Hishida R, Iwasato T, Itohara S, Yagi T, Endo N, Shibata M, Shibuki K:

Restoration of contralateral representation in the mouse somatosensory cortex after crossing nerve transfer. 査読有, PLoS ONE, 7: e35676, 2012.

Hishida R, Watanabe K, Kudoh M, Shibuki K: Transcranial electrical stimulation of cortico-cortical connections in anesthetized mice. 査読有, J Neurosci Meth, 201: 315-321, 2011.

Tsukano H, Hishida R, Shibuki K: Detection of virtual pitch up to 5 kHz by mice. 査読有, Neurosci Res, 71: 140-144, 2011.

Kitaura H, Hiraishi T, Murakami H,

Masuda H, Fukuda M, Oishi M, Ryufuku M, Fu YJ, Takahashi H, Kameyama S, Fujii Y, Shibuki K, Kakita A: Spatiotemporal dynamics of epileptiform propagations: imaging of human brain slices. 査読有, Neuroimage, 58: 50-59, 2011.

Watanabe K, Kamatani D, Hishida R, Shibuki K: Timing-dependent effects of whisker trimming in thalamocortical slices including the mouse barrel cortex. 査読有, Brain Res, 1385: 93-106, 2011.

Komagata S, Chen S, Suzuki A, Yamashita H, Hishida R, Maeda T, Shibata M, Shibuki K: Initial phase of neuropathic pain within a few hours after nerve injury in mice. 査読有, J Neurosci, 31: 4896-4905, 2011.

Komagata S, Tamaki K, Hishida R, Takeshita N, Shibuki K: Nociceptive cortical responses during capsaicin-induced tactile allodynia in mice with spinal dorsal column lesioning. 査読有, Neurosci Res, 69: 348-351, 2011.

Ohshima S, Tsukano H, Kubota Y, Takahashi K, Hishida R, Takahashi S, Shibuki K: Cortical depression in the mouse auditory cortex after sound discrimination learning. 査読有, Neurosci Res, 67: 51-58, 2010.

[学会発表](計7件)

澁木克栄他、Optical imaging of deep brain activity in mice、第36回日本神経科学大会、2013年6月22日、京都市  
澁木克栄他、Macro-confocal imaging of mouse brain activity、第35回日本神経科学大会、2012年9月19日、名古屋市

澁木克栄、フラビン蛋白蛍光によるマウス単一皮質ニューロン活動の経頭蓋イメージング、第14回日本ヒト脳機能マッピング学会シンポジウム、2012年7月5日、札幌市

澁木克栄、Flavoprotein fluorescence imaging of mouse cortical activity at single neuronal level using macro-confocal microscopy、第89回日本生理学会大会シンポジウム、2012年3月31日、松本市

澁木克栄、大脳可塑性のイメージング：末梢神経損傷および交差神経移植後のマウス体性感覚野応答、第38回日本マイクロサージェリー学会学術集会教育講演、2011年11月11日、新潟市

澁木克栄、Flavoprotein fluorescence imaging of cortical mass and single neuronal activities in mice、第34回日本神経科学大会シンポジウム、2011年9月15日、横浜市

澁木克栄他、Imaging of somatosensory cortical responses elicited by neuropathic pain in mice、第33回日本神経科学大会シンポジウム、2010年9月3日、神戸市

[産業財産権]

○出願状況(計1件)

名称：脳活動の光学的画像解析法  
発明者：澁木克栄、塚野浩明  
権利者：国立大学法人新潟大学  
種類：特許  
番号：特願2013-099032号  
出願年月日：2013年5月9日  
国内外の別：国内

[その他]

ホームページ等

<http://www.bri.niigata-u.ac.jp/~physio/>

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

澁木 克栄 (SHIBUKI KATSUEI)  
新潟大学・脳研究所・教授  
研究者番号：40146163

### (2)連携研究者

菱田 竜一 (HISHIDA RYUICHI)  
新潟大学・脳研究所・准教授  
研究者番号：90313551

任海 学 (TOHMI MANABU)  
新潟大学・脳研究所・助教  
研究者番号：10401770