

学 位 論 文 題 名

Activity-related optical signals in rat somatosensory  
cortex : dynamic changes in hemoglobin  
concentration and oxygenation

(Rat 大脳皮質体性感覚野における神経活動関連光シグナルについて：  
神経活動に伴う局所ヘモグロビン濃度と酸素化状態の動的変化)

学位論文内容の要旨

【背景と目的】1986年、Grinvaldらは、大脳皮質を電位感受性色素で染色し、神経の電氣的活動を光学的にイメージングする試みの中で、実際の神経活動より数十倍もの時間スケールで、神経活動が生じた同じ場所に、光学的特性の変化が起きることを見出し、内因性光シグナルとして大脳皮質の機能的マッピングに利用できる可能性を報告した。以後、この方法は、自由な時空間分解能で、同じ個体に長期にわたり繰り返し実験を行える為、視覚野をはじめとする大脳皮質の機能的構築、さらには、学習、経験、疾病により形成、発展、再構築化するカラム構造について有用な情報を提供している。この内因性光シグナルの起源は、一般に、神経活動に伴う 1) 細胞の腫脹や血液量の増加に関与する光散乱の変化 2) cytochromes、NADH の酸化還元状態に関与する吸光、蛍光の変化 3) hemoglobin (Hb)の局所濃度や酸素化状態の変化に基づく吸光の変化、であると考えられている。しかし、実際、生体で観測される光シグナルの時空間特性や波長依存性は、研究者により相違があり、マッピングされた光シグナルが本質的に何を意味しているか様々な議論がある。1996年、Malonekらは、catの視覚野において、刺激後早期の内因性光シグナルは、組織の光散乱の変化と、deoxyhemoglobin (deoxyHb)の増大に基づくもので(initial deoxygenation)、後期の血流変化に基づく光シグナルに比して、神経活動の領域を正確に反映することを示した。この報告は、神経活動により酸素消費が増大することを示唆する事実として、酸素代謝(好氣的解糖)の、神経活動時エネルギー供給への関わりという観点からも注目されている。ここで、本論文は、ratの体性感覚野において、神経活動に伴う局所Hb濃度と酸素化状態の動的変化、特に initial deoxygenationの有無について、CCD imagingとmicrospectrophotometryを用いて明らかにし、さらにlaser-Doppler flowmetryにより計測された血流反応との関連から、内因性光シグナルの起源を刺激開始からの時間軸に沿って解釈することを試みたものである。

【方法】雄Wistar rat 25匹を用いて、麻酔人工呼吸器管理下に、脳表の血管構造が透見できるまで左頭頂骨を薄く削り、thinned skull windowを作製した。Band pass filter (577, 586, 605, 760, 805 nmの5 filters)を内蔵した顕微鏡stageにratをのせ、右下肢の末梢神経を皮下に刺入した針電極にて、3.6-4.0 mA、500  $\mu$ sのpulseで5 Hz、2秒間刺激し、下肢の体性感覚野を賦活した。

(1) 冷却 CCD カメラにて、各 filter を通した脳表の画像を、500 ms 毎に刺激開始前後で連続取得し、各 pixel 毎に

$$\Delta \text{absorbance}(t) = \log\{I_{\lambda}^0/I_{\lambda}^s(t)\} - \log\{I_{\lambda}^0/I_{\lambda}^r\} = \log\{I_{\lambda}^r/I_{\lambda}^s(t)\}$$

---  $I_{\lambda}^0$ ; 波長  $\lambda$  における照射光強度、 $I_{\lambda}^r$ ; 刺激直前の反射光強度、 $I_{\lambda}^s(t)$ ; 刺激開始  $t$  秒後の反射光強度--- で演算した吸光度変化の画像を作成、神経活動に伴う光シグナルを検出した。さらに、顕微鏡倍率を上下させて、微小解剖学的にシグナルがどこで観察されるのかを検討した。

(3) 光シグナルの検出部位で、刺激開始後の相対的な皮質血流変化を laser-Doppler flowmetry により計測した (8 匹 44 回試行)。(4) また、同部位において、径 400  $\mu\text{m}$  の領域の白色反射光 (500-850 nm) を、顕微鏡接眼レンズ部に装着した光ファイバーにて分光器に導き、光シグナルの波長依存性と時間的変化を観測した。(5) さらに、得られた光シグナルの吸光度変化スペクトルを、Beer-Lambert 則に基づいた次式から、最小 2 乗法で多成分解析し (8 匹 74 回試行)、刺激開始後の局所 Hb 濃度と酸素化状態の時間的変化を明らかにした。

$$\Delta \text{absorbance}(t) = L_{\lambda} (\epsilon_{\lambda}^{\text{oxyHb}} \Delta[\text{oxyHb}(t)] + \epsilon_{\lambda}^{\text{deoxyHb}} \Delta[\text{deoxyHb}(t)] + \epsilon_{\lambda}^{\text{water}} \Delta[\text{water}(t)]) + \Delta K(t)$$

---  $L_{\lambda}$ ; 波長  $\lambda$  における光路長、 $\epsilon_{\lambda}$ ; 波長  $\lambda$  における各成分の分子吸光係数、 $\Delta[X(t)]$ ; 各成分の刺激開始後  $t$  秒後の濃度変化、 $\Delta K(t)$ ; 散乱による誤差成分を波長非依存性成分として近似---

(6) なお、全ての統計学的処理は、paired two-tailed Student's  $t$ -test で行った。

【結果・考察】 (1) 右下肢刺激に伴う左大脳皮質体性感覚野光シグナルは、bregma より 2-3 mm 側方、1-2 mm 尾側を中心に検出され、下肢の体性感覚誘発電位のうち cortical component (潜時: 13-18 ms) が最も強く観察される領域に一致した。(2) その賦活皮質の血流は、刺激開始 1.5 秒後より増加しはじめ、3.5 秒後に最大 (26.7 $\pm$ 9.7% の増加) となり、10 秒後までに、刺激前のレベルに戻った。(3) 光シグナルの時空間反応特性は、波長により 2 つのパターンに大別された。すなわち、577 nm (oxyHb 優位波長)、586、805 nm (oxy-, deoxyHb の等吸収点で total Hb を反映) では、皮質血流の時間的変化とほぼ一致した一相性の吸光度増大を示し、微小解剖学的にも、毛細血管床と細動脈で並行して吸光度が増大していた。一方、605、760 nm (deoxyHb 優位波長) では、二相性の変化 (初期相で増大、後期相で減少) を示し、微小解剖学的には 1.0-1.5 秒後より、毛細血管床、次いで細静脈の吸光度が増大し、細動脈は、1.5-2.0 秒後より、遅れて吸光度増大、3.5 秒後には、毛細血管床、細静脈は、吸光度が大きく減少するのに対して、細動脈の吸光度は上昇したままであった。(4) 光シグナルの観察された領域からの反射光の吸光度変化スペクトルも、500-588 nm 及び 780-850 nm は、一相性の吸光度増大、592-770 nm では、同様な二相性の変化を示し、吸光度は、deoxyHb に優位な波長で、より早期に増大した。(5) この吸光度変化スペクトルを多成分解析すると、oxyHb 成分は、1.5 秒後より増加、4 秒後に peak を示す一相性の変化であったが、deoxyHb 成分は、1.0 秒後より増加 ( $p=0.016$  at 1.0 s,  $p=0.00038$  at 1.5 s) して、2.5 秒以後大きく減少、4.5 秒後に陰性の peak を示した。(6) 結局、下肢の電氣的刺激に対して、rat の体性感覚野においても、initial deoxygenation が観察され、hyperoxygenation が後続した。後者は、神経活動に伴う血流応答が、組織の酸素消費を上回り過剰に起こることを示す現象と考えられるが、前者は、神経活動開始初期の酸素代謝亢進に血流応答が遅れることを反映するのか、開始初期に生じた代謝産物 (lactate,  $\text{PCO}_2$ ) による Hb の酸素親和性における Bohr 効果を反映するのか、今後の研究が必要である。

【結論】 本研究により、刺激開始早期の内因性光シグナルの成分として、deoxyHb の増加が、後期の成分として oxyHb の増加あるいは deoxyHb の減少が重要と考えられた。結局、神経活動に伴う

光シグナルは、瞬間瞬間に変化する神経活動に合わせて、脳組織の代謝と血流が再調整される際に生ずる組織の光学的特性の変化と考えられた。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 阿 部 弘  
副 査 教 授 宮 坂 和 男  
副 査 教 授 田 村 守  
副 査 教 授 田 代 邦 雄

学 位 論 文 題 名

## Activity-related optical signals in rat somatosensory cortex : dynamic changes in hemoglobin concentration and oxygenation

(Rat 大脳皮質体性感覚野における神経活動関連光シグナルについて：  
神経活動に伴う局所ヘモグロビン濃度と酸素化状態の動的変化)

大脳皮質において、神経活動が生ずると、その領域の光学特性が自然に変化する。近年、この現象を利用して、大脳皮質の機能的マッピングが光学的にも行われ得るようになったが、その起源については、いまだ議論のあるところである。本研究は、この神経活動に関連した光シグナル(光学特性の変化)の起源について、局所ヘモグロビン(Hb)濃度と酸素化状態の動的変化の観点から、皮質血流変化と対応させて明らかにすることを目的とした。方法は、Wistar rat を用い、麻酔人工呼吸下に、頭頂骨を薄く削り thinned skull window を作製。Band pass filter を内蔵した顕微鏡 stage に rat をのせ、右下肢末梢神経を、3-4mA で 5Hz、2 秒間電氣的に刺激、大脳皮質体性感覚野を賦活した。冷却 CCD カメラにて、刺激前後の脳表面像を取り込み、吸光度変化を示す演算画像を作成、神経活動に伴う光シグナルを検出した。また、各種 band pass filter を用いて、光シグナルの経時的変化とその波長依存性を観察、微小解剖学的にもシグナルの起源を同定した。次いで、シグナル検出部位で、刺激開始後の相対的な皮質血流変化を laser-Doppler flowmetry により計測。さらに、その部位の径 400 $\mu$ m の領域の白色反射光(500-850nm)を、光ファイバーにて分光器に導き、神経活動に伴う吸光度変化スペクトルを得た。これを、Beer-Lambert 則に基づき、oxyHb-deoxyHb-water-baseline の 4 成分の和として、最小 2 乗法による多成分解析を行い、各成分の時間的変化を明らかにした。その結果、右下肢刺激に伴う左体性感覚野の光シグナルは、bregma より 2-3mm 側方、1-2mm 尾側を中心に検出され(右体性感覚野にも小さいが検出)、電気生理学的所見と一致した。その賦活皮質の血流は、刺激開始 1.5 秒後より増加しはじめ、3.5 秒後に最大(26.7 $\pm$ 9.7%の増加)となり、10 秒後には、刺激前のレベル近くに戻った。一方、光シグナルの時空間反応特性は、波長により 2 つのパターンに大別された。すなわち、577nm(oxyHb 優位波長)、586 及び 805nm(oxy-, deoxyHb の等吸収点で total Hb を反映)では、皮質血流の時間的変化とほぼ一致した一相性の吸光度増大を示し、微小解剖学的にも、毛細血管床と細動脈は並行して吸光度が増大した。一方、605、760nm(deoxyHb 優位波長)では、二相性の変化(初期相で増大、

後期相で減少)を示し、微小解剖学的には 1.0-1.5 秒後より、毛細血管床、次いで細静脈の吸光度が増大し、細動脈は、1.5-2.0 秒後より遅れて吸光度増大、3.5 秒後には、毛細血管床、細静脈は、吸光度が大きく減少するのに対して、細動脈の吸光度は上昇したままであった。同領域からの反射吸光度スペクトルも、500-588nm 及び 780-850nm は一相性の吸光度増大、592-770nm では、同様な二相性の変化を示し、吸光度は、deoxyHb 優位波長で、より早期に増大した。このスペクトルを多成分解析すると、oxyHb 成分は、1.5 秒後より増加、4 秒後に peak を示し、deoxyHb 成分は、1.0 秒後より有意に増加、2.5 秒以後大きく減少、4.5 秒後に陰性の peak を示した。結局、rat 大脳皮質体性感覚野において、刺激開始後早期の光シグナル成分として deoxyHb の増加(initial deoxygenation)が、後期成分として過剰な血流増加に関与する oxyHb の増加或いは deoxyHb の減少(hyperoxygenation)が観測され、神経活動に伴う光シグナルは、瞬間瞬間に変化する神経活動に合わせて、脳局所の代謝と血流が再調整される際に生ずる組織光学特性の変化と考えられた。

公開発表において、宮坂和男教授より、oxyHb 或いは deoxyHb に sensitive な各々の画像における、artery-vein-capillary bed のそれぞれに由来するシグナルの起源について、optical imaging におけるノイズの問題(特に対象の動きに基づくノイズ)について、さらに、こうした光学的手法の臨床応用(出生後早期の皮質機能構築過程の観察)について質問があった。次いで、田村守教授より、神経活動に伴う初期シグナルと後期シグナルの相対的大きさについて、また、両シグナルへの光散乱の影響について質問があった。最後に、阿部弘教授より、片側刺激に対して、同側体性感覚野でも小さなシグナルが観察されたことの生物学的意義について、また、刺激強度の同側反応への影響について質問があった。いずれの質問に対しても、申請者は、自らの研究に基づく経験や過去の論文の結果を引用し、豊富な知識に基づいて明確に回答した。なお、その後、副査の田代邦雄教授の参加された 2 回目の口頭発表において、田代邦雄教授より、光シグナルへの末梢神経の刺激条件と麻酔の影響性について、fMRI との関係性について、今後の臨床応用(ベットサイドでの神経機能モニタリングの可能性)に関する質問があり、申請者は、明解に回答した。

本研究により、Rat 大脳皮質体性感覚野における神経活動-関連光シグナルの起源が明らかにされ、神経活動初期のヘモグロビンの initial deoxygenation が証明された。今後さらに、こうした光学的手法を用いて、大脳皮質の機能的構築が明らかにされていくと期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、また、研究者として誠実かつ熱心であり、申請者が博士(医学)の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。