

実験技術

内因性信号の光学的イメージング

理化学研究所脳科学総合研究センター
脳統合機能研究チーム
福田光洋, 谷藤 学

1. はじめに

脳には機能を同じくする細胞の集まりによって形成される構造（機能構造）がよくみられる。例えば、網膜からの視覚入力を受ける大脳皮質第一次視覚野の細胞は、右眼に呈示された視覚刺激に応答するものと、左眼に呈示された視覚刺激に応答するものとが、皮質上に交互に分かれて存在し眼優位性コラムと呼ばれる機能構造をつくっている（図1）。内因性信号の光学的イメージングは機能構造を調べるのに有効な方法である。この方法は脳表面にあてた光の反射光強度が神経活動に伴って変化することを利用しており、ビデオカメラでこれを捉えることにより神経細胞の活動を光の吸収増大として刺激ごとに画像化できる。内因性信号と呼ばれるのは、信号が生体に内在する物質に起因するためである。神経活動を直接見ているわけではないという弱点はあるが、電極を刺すことによって得られる情報をはるかに上回る情報が比較的簡単に得られる。しかし、(1) 動物の外科手術法の習得に時間がかかるこ

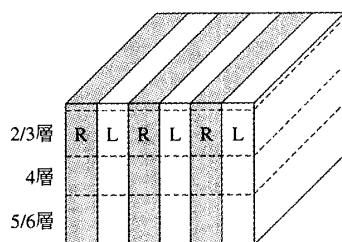


図1 サル第一次視覚野の眼優位性コラムの模式図
Rは右眼、Lは左眼に呈示された視覚刺激によく応答する領域。

と、(2) 微小な内因性信号を計測するための市販の測定装置が高価なことなどがあって、微小電極法に比べて脳研究者の間で利用されていない。本稿では動物の脳表面から内因性信号を記録するための方法論について述べる。

2. 内因性信号の起源

内因性信号の起源は、神経活動の増大によって起こる酸素消費に伴う局所的な血液量変化、ヘモグロビンの酸素化・脱酸素化、組織の光学特性の変化などによると考えられている^{1), 2)}。例えば、脳表面からの内因性信号の記録によく用いられる600～630 nmの波長の光では脱酸素化したヘモグロビン（還元ヘモグロビン）による光吸収が主である（図2）ので、神経活動の増大により代謝活動が上昇すると酸素消費が増え、還元ヘモグロビンが増加した結果、光吸収が増大するという説明は納得しやすい。ただし、この波長では酸素化したヘモグロビン（酸化ヘモグロビン）による光吸収もゼロではないので、光の吸収増大が活動部位における血液量（酸化ヘモグロビンと還元ヘモグロビンの総量）の増大によって生じるという説明も成り立つ。実際、酸化ヘモグロビンと還元ヘモグロビンの等吸収点である569 nmでは、脳表面を走る血管のアーチファクトは増えるが、600～630 nmより強い内因性信号が記録できる。また、神経活動に伴って毛細血管の拡張やグリア細胞の体積変化などの構造変化が起これと考えられており、内因性信号の起源の1つにはこのような構造変化によると考えられる光散乱強度変化もある。

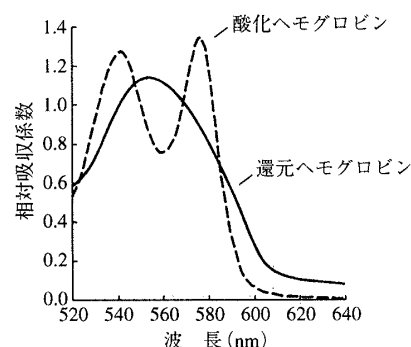


図2 酸化・還元ヘモグロビンの吸収スペクトル
吸収係数は等吸収点（569 nm）に対して基準化してある。

Optical Imaging of Intrinsic Signal in the Brain

Mitsuhiro Fukuda and Manabu Tanifuji

Lab. Integrative Neural Systems, Brain Science Institute, RIKEN

3. 外科手術

手術法は信号が得られるかどうかの決定的な要因である。特に脳表面に機械的刺激を与えないことが重要である。以下①～④にアカゲザルを例に手術手順をまとめた(図3)。

- ①頭骨を露出し、薄く平らにした骨の上に歯科用セメントでチャンバーを固定する。

チャンバーを固定したら頭蓋内圧を下げる。脳と頭骨の間に隙間ができ、骨の下硬膜やその下の脳を損傷することなく②の作業ができる。頭蓋内圧を下げるには、

- 1) 頭の位置を胴体に対して高くする(動物をうつ伏せに寝かせて頭部を引き上げる)。
- 2) 過換気にする(終末呼気二酸化炭素濃度を3.5～4.0%に保つ)。
- 3) 麻酔を深くする(濃度1～2%のイソフルランの吸入で心拍数を100～120拍/分まで下げる。麻酔の深さは脳波で確認する)。

などの方法が有効である。

- ②骨をチャンバーの内径に沿って歯科用ドリルで取り除く。

骨を円形状にくり抜くのはドリルの回転による熱、衝撃が計測面(チャンバー中央部の硬膜下の脳)に直接伝わるのを避けるためである。骨を取り除いたら、チャンバー内を生理食塩水で洗浄して削りカスを除去する。生理食塩水はチャンバー内壁面につけ、硬膜に直接かけるのは極力さける。硬膜や骨からの出血があれば適宜止血する。頭蓋内圧が十分に下がっていれば③の作業に進む。これは硬膜の上下運動(図中矢印)が認められるかどうかで確認できる。動きが鈍ければ、高張液(グリセオール注200 ml, 中外製薬株式会社, 5 ml/kgを30分間で静脈内投与)を血管内に投与してさらに脳内圧を下げる。脳ヘルニアが起こるので十分な動きがないまま③の作業へ進んではならない。

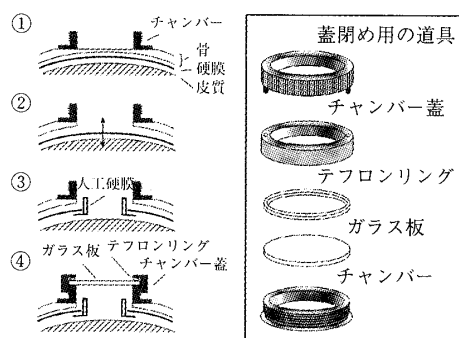


図3 外科手術の手順と光学計測用チャンバー

- ③硬膜を外側の層より順番に剥離する。

この作業中、硬膜上から脳表面を押さないように気をつける。硬膜の剥離には針付きシリンジ(ツベルクリン用1 ml, 26G×1/2" (0.45×13 mm), テルモ)が使いやすい。硬膜は層構造になっており上層には血管の走行がある。全層を一度に切除すると上層からの出血が脳表面に及ぶので、それを避けるために層ごとに止血しながら剥離する。血管を含まない層に達したら、どこからも出血がないことを再確認し、脳表面を露出する。硬膜切除後、硬膜と脳表面の間に人工硬膜を入れる。これにより硬膜や骨の断端からの再生組織が測定部位へ進入するのを遅らせることができる³⁾。

- ④チャンバー内を滅菌したシリコンオイル(信越シリコン, KF-96-1,000CS)で充填し蓋をする。

ガラス板、テフロンリングの順番に重ねるのは、蓋を閉めたときにチャンバー内圧に変化が起きないようにするためである。脳表面を露出してからチャンバーを密閉するまでの時間は短いほどよい。空気に脳表面がさらされていると脳表面の血管が拡張し、測定時に大きなアーチファクトとなるからである。

4. 計測システム

4.1 ハードウェア

図4に我々の計測システムを模式的に示した。露出した脳表面を610 nm前後の波長の光で照らして、その反射光をCCDカメラで記録する。記録は動物の吸気に同期させて開始し、10ビットのビデオA/D変換ボード(Pulsar, Matrox)を介してコンピューターに映像を取り込む。刺激によって誘発される内因性信号は、刺激呈示前の平均画像で刺激後の各画像を除算して得られる。内因性信号は背景光の1/1,000と小さいので、その記録には信号対雑音(S/N)比が1,000倍(60 dB)程度のビデオカメラと明るいレンズ、低雑音の安定した光源を使用する必要がある。我々は、S/N比が56 dBのCCDカメラ(teli CS8310B, 768×493画素, 東京電子工業)と焦点を無限遠に合わせた2つの50 mmカメラレンズ(Nikon, F=1.2)を向かい合わせに接合したもの(タンデムレンズ光学系)をレンズとして使用している。これにより低倍で明るい、被写界深度の浅い、長作動距離のレンズが安価に実現できる⁴⁾。光源には直流安定化電源につないだタングステン・ハロゲンランプを使用した。

4.2 装置の性能

この装置の性能はLED(発光ダイオード)の点灯によってつくった0.1%の光量変化を検出できるかどうかで確かめられる¹⁾(図5)。図には示さないが、同じ試行を

内因性信号の光学的イメージング

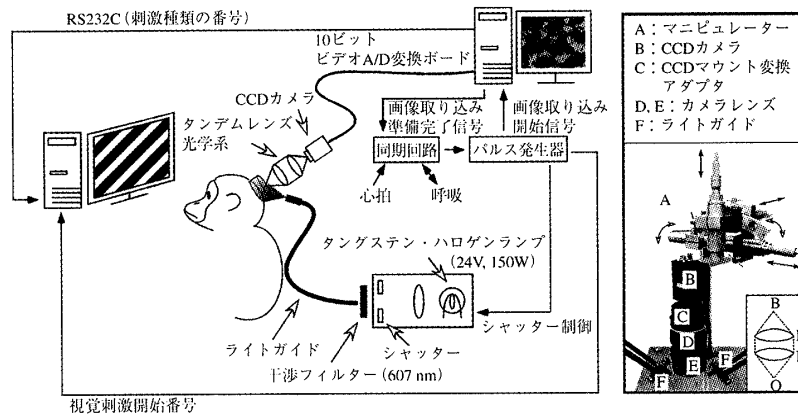


図4 計測システムと光学系

露出した脳表面に波長607 nmの光を照射し、その反射光をタンデムレンズにつけたCCDカメラで記録する。
タンデムレンズ光学系（右図）：レンズEの焦点面にある物体Oは無遠慮に投影され、レンズDの焦点面Bに像を結ぶ。

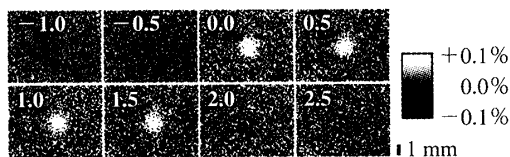


図5 0.1%の光量変化の検出テスト

数字はLED点灯開始からの経過時間（秒）。LEDは2秒間の点灯。

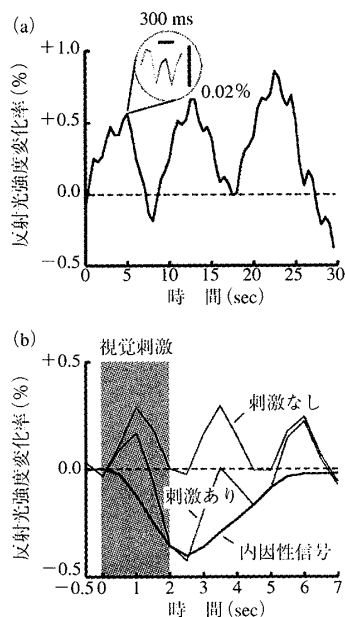


図6 生体由来の雑音

ネコ第一次視覚野から610 nm前後の波長で記録。(a) 刺激なし。(b) 内因性信号：(刺激あり) - (刺激なし)。

10回繰り返し、全試行を加算平均すれば0.01%の光量変化も検出できた。

4.3 生体由来の雑音

LED光の検出テストでは、カメラ雑音や光のもつ雑

音だけが問題になる。生体由来の雑音はこれらの雑音よりはるかに大きい。図6aに脳表面から記録した反射光強度変化率の時間変化を示した。変化をわかりやすくするために画像ごとに全ピクセル（太さ50 μm の血管を含むピクセルを除く）の計測値の加算平均を示してある。この図で約10秒に1回の周期をもつ振幅約0.5%の波が内因性信号の計測における主要な生理的雑音となる⁵⁾。このゆっくりとした大きな波にトゲのように見えてるのが、呼吸に由来する雑音である。この雑音は、記録を呼吸に同期させて行い、データ解析時に刺激ありとなしとの間で差をとることで除くことができる（図6b）。心臓の拍動に由来する雑音（図6aの円内）は内因性信号のような遅い反応の測定ではあまり問題にならない。

5. 内因性信号の記録

5.1 記録をはじめる前に

まず図7aのように焦点が計測領域の全面に結ぶようにカメラ位置をあわせる。これは機能構造を正確に可視化するための必須条件である。次に焦点位置を脳表面から下に300～800 μm 動かす（図7b）。これにより脳表面の血管に生じる反応を最小限に抑え、脳組織からの信号を最大に検出することができる¹⁾。計測に用いる波長610 nm前後の光にすると図7cのような映像になる。

5.2 刺激に非選択的な応答

図7cの脳表面から内因性信号を記録した結果を図8に示した。内因性信号は麻酔したサル右眼視野全域に格子縞を呈示して誘発した。刺激呈示後、脳表面全体が刺激前に比べて暗くなっているのがわかる。このように視覚野では刺激パターンに依存しない広域の吸収変化が脳表面に起こることが知られている。このような刺激に非選択的な応答は、(1)局所的な神経活動（活動電位）が広範囲の血液供給を誘発するため⁶⁾、あ



図7 サル第一次視覚野の脳表面の血管像

(a) 焦点位置は脳表面で波長は540 nm, (b) 焦点位置は脳表面から700 μ m下, (c) bと同じ焦点位置で波長は607 nm.

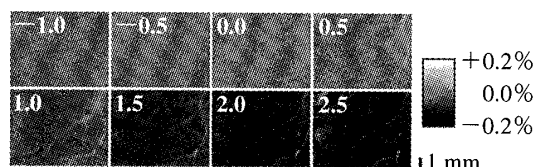


図8 サル第一次視覚野に誘発された内因性信号の時間変化
20試行の加算平均の結果. 数字は刺激呈示開始からの経過時間 (秒). 刺激は2秒間. 607 nmの波長で記録.

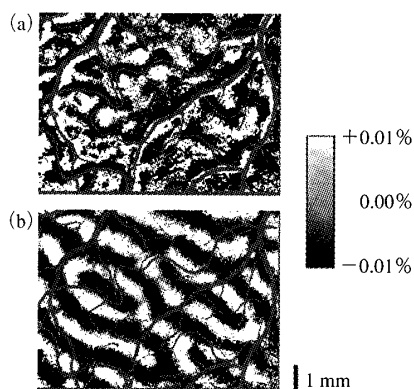


図9 眼優位性コラム

刺激後1秒以降の画像を加算平均し, 脳表面の血管像を重ね書きした. (a) (右眼刺激) - (刺激なし), (b) (右眼刺激) - (左眼刺激). 黒い部分が右眼に呈示した視覚刺激に対する神経活動部位.

るいは, (2) 内因性信号がおもに閾値下のシナプス応答を反映しているため⁷⁾ であると考えられている.

5.3 機能構造

さて, 図8の広域吸収変化から刺激に選択的な構造を得るためには, 機能構造に対応する局所的な吸収変化のみを抽出すればよい. そこで図8の画像から空間パターンの低周波数成分を空間周波数フィルタによって除き, 局所吸収変化を抽出した画像を図9aに示した. 機能構造らしきものが, ところどころに見えるが, 脳表面の血管パターンに邪魔されて判別が難しい. このように「刺激あり」と「刺激なし」の差分画像に空間周波数フィルタをかけても脳表面の血管の反応が強が残ってしまうことがあり, 機能構造がよく見えないことがある. 図で暗くなっているところがはたして機能構

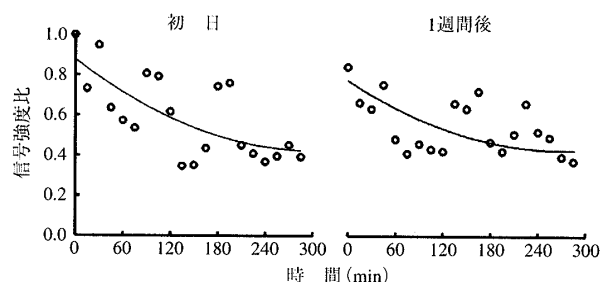


図10 信号強度の経時変化

ネコ第一次視覚野から620 nmの波長で記録. 記録開始時に得られた信号強度で基準化した.

造なのかどうかを判断するには, 微小電極法の助けなくしては難しい. そこで今度は, 「右眼刺激」と「左眼刺激」の差分画像を計算すると, 刺激に非選択的な反応 (脳表面の血管の反応を含む) が互いに消去されて眼優位性コラムがはっきりとみえるようになる (図9b).

5.4 信号強度の経時変化

局所吸収変化の大きさを経時的に調べると, 記録時間の延長とともに信号強度は減衰していく傾向がある (図10). おそらく光照射による血管系の損傷が起こるためであろう. ただし, 日を改めて記録すると信号強度がほぼ元の強さまで回復するようである¹⁾. 1日の測定時間はなるべく短くし, 日をあらためて測定すれば, かなり長期にわたって機能構造のイメージングができることが期待できる. 実際Grinvaldらのグループは6ヵ月間という長期間, 機能構造のイメージングに成功している³⁾.

6. おわりに

脳内因性信号の光学的イメージングは, 微小電極法と併用することで, 今後とも機能構造の解明に中心的な役割を果たしていくと考えられる. 本稿がこの手法を試みようとしている方の何らかの参考になれば幸いである.

文 献

- 1) Bonhoeffer, T. and Grinvald, A. (1996) *Brain Mapping: The Methods* (Toga, A. W. and Mazziotta, J. C., eds.), pp.55-97, Academic, San Diego.
- 2) Malonek, D. and Grinvald, A. (1996) *Science* **272**, 551-554.
- 3) Shtoyerman, E. et al. (2000) *J. Neurosci.* **20**, 8111-8121.
- 4) Ratzlaff, E. H. and Grinvald, A. (1991) *J. Neurosci. Methods* **36**, 127-137.
- 5) Mayhew, J. et al. (1996) *Neuroimage* **4**, 183-193.
- 6) Grinvald, A. et al. (2000) *Nat. Neurosci.* **3**, 105-107.
- 7) Das, A. and Gilbert, C. D. (1995) *Nature* **375**, 780-784.