

1 . 研究課題名 :

ヒト一次視覚野における過酸素血下での BOLD 信号応答

2 . 研究機関 :

秋田県立脳血管研究センター

3 . 研究者名と所属 :

柏倉健一 ( 科学技術振興事業団秋田研究室 )

4 , 研究協力者名と所属 :

柏倉明美 ( 科学技術振興事業団秋田研究室 )

Xiaojing Zhang ( 科学技術振興事業団秋田研究室 )

Jeff Kershaw ( 科学技術振興事業団秋田研究室 )

菅野巖 ( 秋田県立脳血管研究センター )

5 . 研究期間 :

1998 年 2000 年

6 . 要約

酸素が神経活動 hemodynamics のカップリング関係に關与している可能性を検討した。hyperoxia 及び normoxia 下で脳賦活時の BOLD 信号応答を比較したところ、hyperoxia 時に信号変化率及び賦活面積が増加した。また、ダイナミック測定でタイムコースが早まる結果となった。これにより、過剰酸素が化学的介在物質に作用し、結果として神経活動 hemodynamics 間のカップリング関係に影響を与えた可能性が示唆された。

7 . 研究目的

正常なヒト及び動物における局所脳血流量及び代謝の変化は局所脳神経活動の変化を反映していると考えられている[1]。しかし、現在も神経活動量の増大に伴う脳血流量の増加に関する機序の詳細は解明されていない。特に、両者を結びつけていると推測されている介在物質については、多くが候補に挙がっているものの、未だに特定されていない。酸素はこれら多くの介在物質候補の1つと考えられており[2]、本章ではこれを確認するため、血中酸素濃度が神経活動 脳血流量のカップリング関係に与える効果について検討し、さらに、酸素の介在機序を明らかにすることを目的とする。

これまでも酸素負荷を用いた報告はいくつかあるが、ほとんどが正常組織と腫瘍とを区別するための造影剤効果について検討が行われていた[3、4]。一方、安静時に hyperoxia で T2\*強調信号が上昇することは Berthezene が報告しているものの[5]、脳賦活時に血中酸素濃度が brain hemodynamics に与える影響について検討した報告はほとんどない[6-8]。

本章では、視覚刺激時のヒト一次視覚野における hemodynamic 応答に対して血中酸素濃度が与える影響について検討するため、hyperoxia 及び normoxia 下で BOLD 信号応答及び賦活領域の比較を行った。測定は BOLD 信号を用い、ブロック・パラダイム（パラダイム I）及び事象関連パラダイム（パラダイム II）を用いて行った。パラダイム I では 15 秒刺激 15 秒コントロールを 1 周期として用い、パラダイム II では 2 秒刺激 18 秒コントロールを 1 周期とした。

## 8 . 材料と方法

### 1) 対象

パラダイム I（ブロック・パラダイム）は 21~39 歳の正常ボランティア 13 人を用いた。一方、パラダイム II（事象関連パラダイム）は 21~24 歳の正常ボランティア 8 人を用いた。なお、パラダイム I と II の被験者は重複していない。各被験者には検査の目的及び内容を十分に説明した上で同意書を得た。本検査については秋田県立脳血管研究センター倫理委員会の承認を得た。

### 2) 収集条件

頭部用標準コイルを装着した臨床用 1.5TMRI 装置を用い、シングル・ショット EPI で撮像を行った。撮影条件は、パラダイム I が TR = 3 sec、TE = 66 msec、フリップ角 = 90°、マトリクス・サイズ = 128 × 128、FOV = 230 mm × 230 mm、鳥距溝に平行に 5 mm 厚、スライス間隙 1 mm、5 スライスとした（第 1 章参照）。また、パラダイム II は、TR = 2 sec、TE = 60 msec、フリップ角 = 70°、マトリクス・サイズ = 64 × 64、FOV = 260 mm × 260 mm、AC-PC ラインに平行に 5 mm 厚、ギャップ 1 mm 厚で 16 スライス撮影し、全脳をカバーした（第 2 章参照）。

### 3) 実験パラダイム

被験者にはヘッドコイル上に固定した鏡を通し、MRI の天板足方に設置したスクリーン全面に投影したチェッカーボード中心に設置した固視点を注視するよう求めた。また、コントロール時も同位置の固視点を注視するよう求めた。撮影中の頭部の動きを押さえるために頭部固定パッドとテープを使用した。スキャン時の騒音を低減させるためヘッドホーンを使用した。刺激の視認性を上げるため検査室の照明とガントリ内の照明を消し、暗黒とした。さらに、各シリーズ終了時に検査室に入り、被験者の状態及び事前の指示が守られているかどうか確認を行った。

パラダイム I に関しては、最初に 2 フレームのダミー撮影を行った後、5 フレーム安静（15 秒）、5 フレーム刺激（15 秒）のブロック・パラダイムを 9 周期繰り返した。撮像断面は、鳥距溝を含んだ断面を中心に上下 2 スライスずつ、計 5 スライスとした。視覚刺激は、Power Macintosh 8500/180 上の MacStim2.5.7 で制御した。RGB 信号でカラー液晶プロジェクターに送り、被験者の足方、天板可動部足端に設置した透過

型スクリーン上に投影した。刺激として 8 Hz の矩形白黒チェッカーボード(視野角 =  $13.7^\circ \times 18.9^\circ$ 、各マトリクス・サイズ =  $2.5^\circ \times 2.5^\circ$ )を用いた。各被験者に対して 5 回のトライアルを行った(図 1)。

パラダイム II に関しては、鳥距溝に平行に 5 スライス of 撮像を行った。2 秒刺激 18 秒コントロールの組み合わせを 1 周期とし、これを 10 周期繰り返した。撮影後、最初の 1 周期(10 フレーム)はスピン飽和効果を除くために破棄した。視覚刺激パターンの作成とコントロールは Visual Basic 5.0 で作成した自家製ソフトウェアを Gateway GP6-400C 上で動作させ行った。被験者足部に設置した半透明スクリーンにカラー液晶プロジェクターを用いて刺激パターン(視野角 =  $13.7^\circ \times 18.9^\circ$ 、各マトリクス・サイズ =  $2.5^\circ \times 2.5^\circ$ )を投影した。パターン中心には固視点を設けた。PC コンピュータと MRI スキャナーは光ケーブルで接続し、各々の刺激開始と fMRI データ収集とを同期させた(第 2 章参照)。各被験者に対して 5 回のトライアルを行った(図 1)。

トライアル 1: 室内空気吸入時の視覚刺激。

トライアル 2: 安静時撮影(ただし 20 フレームから 90 フレームまでは酸素負荷)。

トライアル 3: 酸素負荷時の視覚刺激。

トライアル 4: 酸素負荷時の視覚刺激。

トライアル 5: 室内空気吸入時の視覚刺激。

パラダイム I と II のトライアル内容は同一である。また、トライアル 3 と 4、1 と 5 は同じパラダイムの繰り返しである。全トライアルを通して解放マスクを被験者に装着していたが、100%酸素負荷(15 l/min)はトライアル 2 の 20 フレーム以降、トライアル 4 終了時まで行った。トライアル 2 は安静時における BOLD 信号強度の違いを normoxia と hyperoxia で比較するために行った。呼気二酸化炭素分圧(mmHg)及び酸素飽和度は検査時間中連続モニターした(共立メディカル、オムニトラック、東京)。

#### 4) データ解析

##### パラダイム I

収集した画像データはワークステーション(Ultra1 Creator 3D、サン・マイクロシステムズ、東京)に転送後、STIMULATE [9] で解析を行った。解析に先立ち、ムービー・モードで頭部の動きを確認し、動きのあるデータ(0.15 ピクセル以上)は除外した。なお、動き及び生理学的変動に関する補正は行っていない。解析には hemodynamic 遅延を 6 秒に設定した“box-car”参照関数を用い、cross-correlation 法[10]で行った。有意水準を相関係数 0.3 以上として統計解析を行い、賦活領域を得た。ノイズ成分を減少させるため、2 個以下の連続したピクセル群はホワイト・ノイ

ズと見なし、解析より除外した。得られた賦活領域はオリジナルの T2\*強調画像に重ね合わせ、賦活画像とした。この後、一次視覚野に矩形関心領域を設定した。この関心領域は全トライアルを通して同一とし、関心領域中の全賦活ピクセルの平均タイムコースと賦活ピクセル数を得た。平均タイムコースより、各トライアルの信号変化率を求めた。さらに、被験者間で加算平均した後、同一パラダイムごとに分類し、paired t-test により検定を行った。

## パラダイム II

収集したデータは SPM99b を用いて解析を行った。パッケージ中に含まれる事象関連 fMRI 解析ツールとフーリエ級数(5 harmonics)法を用いた[11] (第2章参照)。解析はピクセル単位で行ったが、0.001 未満の p 値を示したピクセルを賦活領域と見なした。前処理として頭部の動き補正及びガウス関数を用いたスムージングを行った。空間的標準化は行わなかった。賦活画像は原画像 (T2\*強調画像) の上に賦活領域を重ね合わせることで作成した。関心領域は一次視覚野中の各々のトライアルで最大 Z 値を示したピクセルに対して設定した。被験者ごとにタイム・ロック信号強度曲線を求め、この後、被験者間で加算平均し、BOLD 信号応答曲線を得た。ピーク時間 (刺激開始より応答曲線がピークに達するまでの時間)、ピーク値 (1 フレーム目の信号強度を 1 とし、応答曲線のピークにおける信号強度を基準化した値)、さらに、賦活ピクセル数を酸素負荷効果の指標として用いた。paired t-test を用いて各指標の統計的な違いを検定した。

## 9 . 結果

図 2 はパラダイム I における normoxia 及び hyperoxia 下での典型的な賦活画像を示す。賦活は主として V1 及び V5 領域にみられた。hyperoxia で信号変化率と賦活ピクセル数の両方とも増加していることがわかる。

図 3 はパラダイム I におけるトライアル 2 の結果を示している。図 3-A は安静時の平均 BOLD 信号強度は normoxia ( $526 \pm 41$ ) に比べ hyperoxia ( $537 \pm 39$ ) で有意に増加したことを示す ( $p < 0.0001$ ,  $n = 12$ )。また、図 3-B は呼気二酸化酸素分圧が酸素負荷の前後で有意に変化したことを示す ( $p < 0.0001$ ,  $n = 11$ )。平均呼気二酸化炭素分圧は normoxia が  $41.6 \pm 2.7$  mmHg、hyperoxia が  $38.6 \pm 2.9$  mmHg であった。これらの値は 1~20 フレーム (normoxia) 及び 40~90 フレーム (hyperoxia) の平均によって求めた。

図 4 はパラダイム I における平均信号強度及び賦活ピクセル数を示す。図 4-A は平均信号強度が normoxia ( $5.4 \pm 0.9$ ) に比べ hyperoxia ( $5.7 \pm 0.9$ ) で有意に上昇したことを示す ( $p < 0.05$ ,  $n = 13$ )。また、図 4-B は平均賦活ピクセル数が normoxia ( $168 \pm 58$ ) に比べ hyperoxia ( $187 \pm 73$ ) で有意に上昇したことを示す ( $p < 0.05$ ,  $n = 13$ )。

図 5 はパラダイム II におけるトライアル 2 の結果を示す。図 5-A は一次視覚野における安静時の BOLD 信号強度を示す。hyperoxia における信号強度は  $529 \pm 21$  となり、normoxia の  $523 \pm 23$  と比べ有意に大きかった ( $p < 0.001$ ,  $n = 8$ )。図 5-B は呼気二酸化炭素分圧を酸素吸入前と後で比較したものである。平均呼気二酸化炭素分圧 (mmHg) は normoxia で  $41.4 \pm 2.9$  となり、hyperoxia の  $38.7 \pm 3.2$  と比べ有意に大きかった ( $p < 0.001$ ,  $n = 8$ )。これらの値は 0~20 フレーム (normoxia)、40~100 フレーム (hyperoxia) の加算平均によって求めた。

図 6 はパラダイム II における hyperoxia 及び normoxia における平均 BOLD 信号応答曲線を示した ( $n=8$ )。平均値で見た場合、hyperoxia の最大信号変化率は normoxia と比べ、約 13% 増加した。さらに、ピーク時間はおよそ 0.2 秒早くなった。

図 7-A はパラダイム II における normoxia 及び hyperoxia におけるピーク値を被験者ごとに比較したものである。全被験者の平均ピーク値で比較したところ normoxia ( $6.9 \pm 1.9\%$ ) に比べ、hyperoxia ( $7.8 \pm 1.7\%$ ) で高値を示した。図 7-B は normoxia 及び hyperoxia でピーク時間を比較したものである。平均ピーク時間は、normoxia ( $5.3 \pm 0.5$  秒) に比べ、hyperoxia ( $5.1 \pm 0.4$  秒) で早くなった。

図 8 はパラダイム II における典型的な賦活画像を示したものである。賦活領域は主として一次視覚野に見られた。賦活ピクセル数は normoxia に比べ hyperoxia で高い値を示した。

図 9 はパラダイム II における各被験者 ( $n=8$ ) ごとの賦活ピクセル数を hyperoxia 及び normoxia で比較したものである。平均値で比較した場合、賦活ピクセル数は normoxia ( $10 \pm 77$  pixels) に比べ、hyperoxia ( $133 \pm 79$  pixels) で 21% の増加を示した ( $n=8$ )。

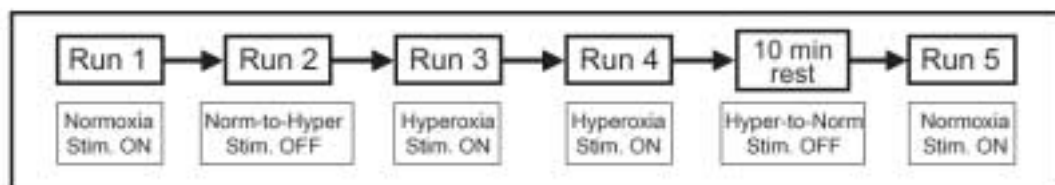


図 1：実験パラダイム

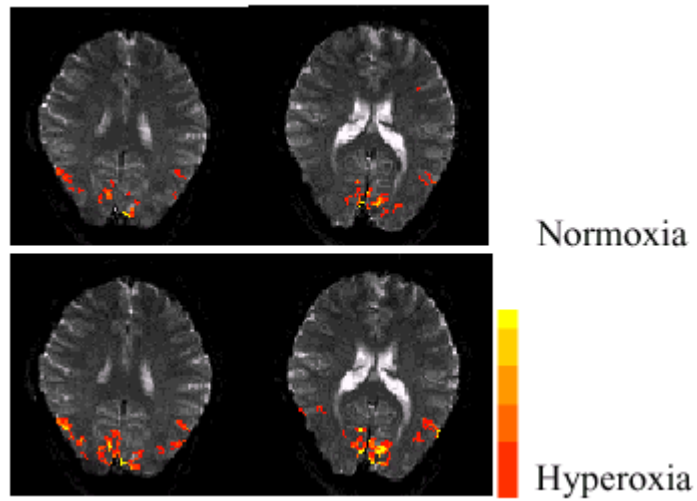


図 2 : 賦活画像例

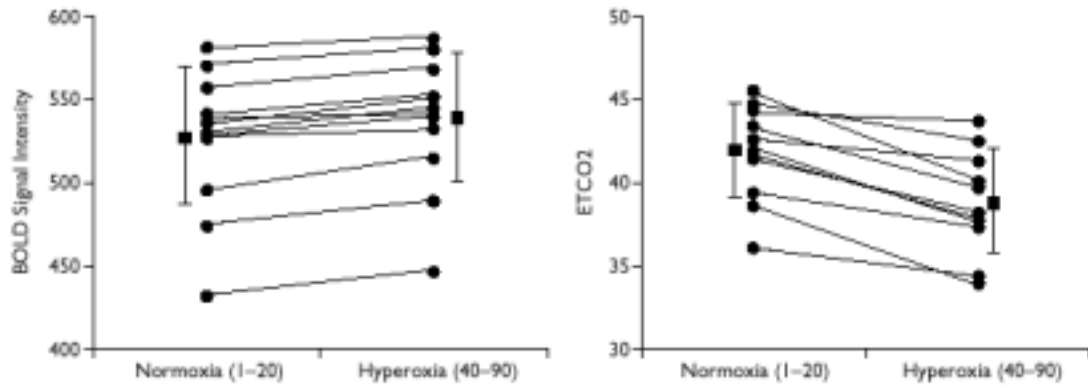


図 3 : 安静時の BOLD 信号強度 (A)、呼気二酸化酸素分圧 (B)(n=13)

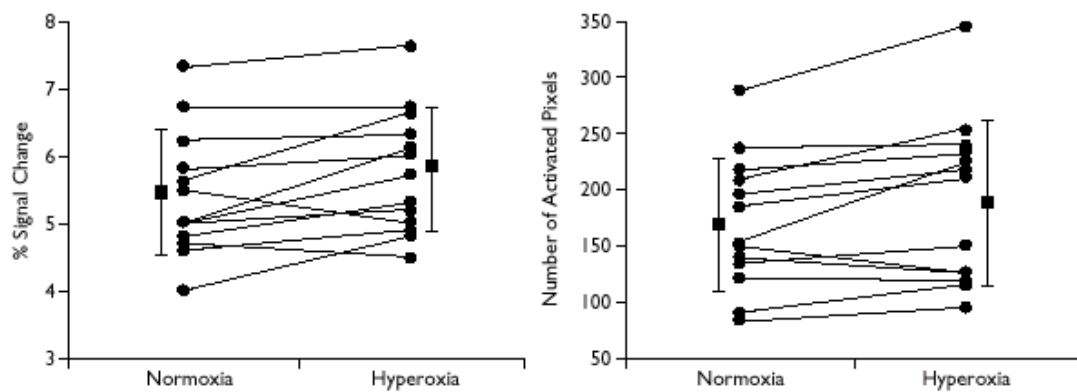


図 4 : 安静時の平均信号強度 (A) 及び賦活ピクセル数 (B)(n=13)

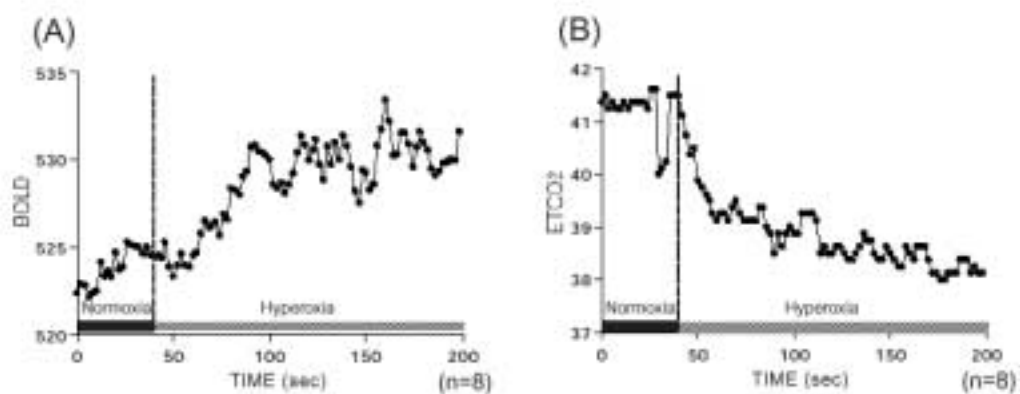


図 5：安静時の平均 BOLD 信号強度 (A)、呼気二酸化酸素分圧 (B) (n=8)

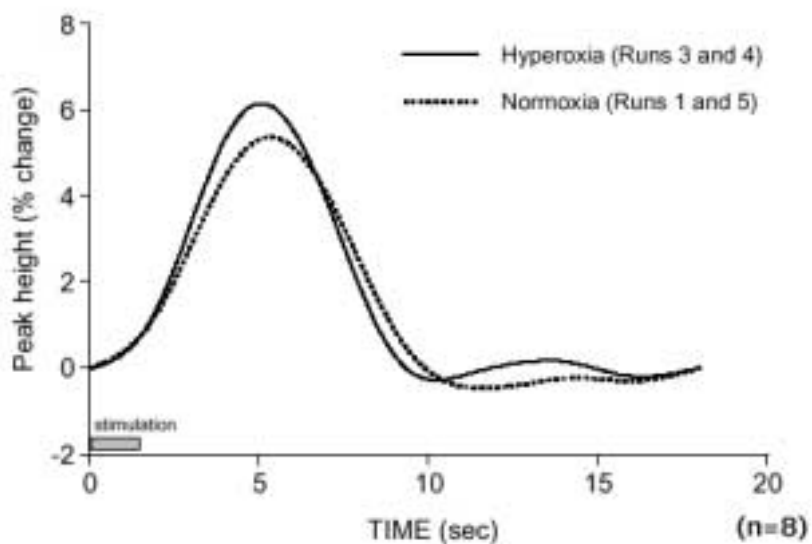


図 6：事象関連パラダイムにおける BOLD 信号応答曲線 (n=8)

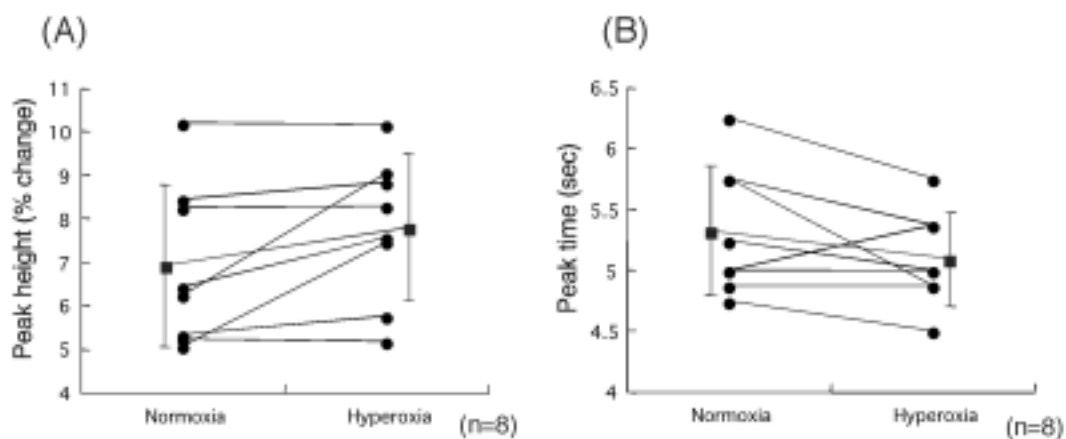


図 7 : 事象関連応答におけるピーク値 (A)、ピーク時間 (B) の変化 (n=8)

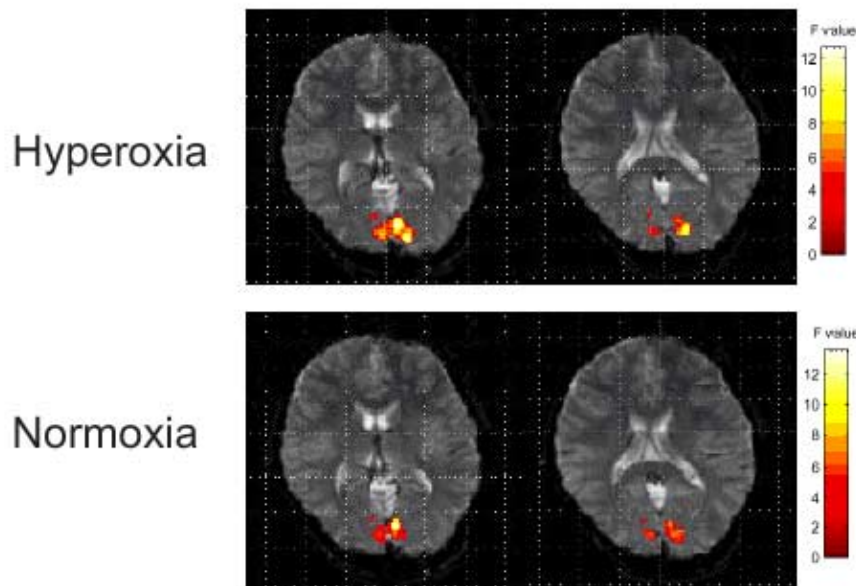


図 8 : 事象関連パラダイムにおける賦活画像例

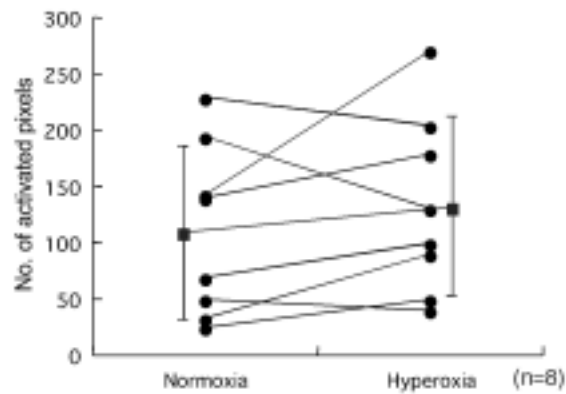


図 9 : 事象関連パラダイムにおける賦活ピクセル数 (n=8)

## 10. 考察

本章で我々は、安静時に hyperoxia が BOLD 信号強度を増加させたこと、ブロック・パラダイムにおいて脳賦活時の平均信号強度と平均賦活ピクセル数が hyperoxia 下で増大したこと、事象関連パラダイムにおいて脳賦活時の平均ピーク値と平均賦活ピクセル数が hyperoxia 下で増加したこと、事象関連パラダイムにお



いて脳賦活時のピーク時間が normoxia に比べ hyperoxia で短縮したことを示した。

### 安静時酸素負荷による BOLD 信号上昇の原因

Berthezene らは安静時において hyperoxia が FLASH シーケンスで撮像した T2\* 強調画像の信号強度を約 3 % 増大させたことを報告している[5]。また、このとき T1 強調画像の信号強度は変わらなかったとする。Kwong らは BOLD 信号強度の上昇が CSF 起因の T1 信号変化によるものか、あるいは T2\* 強調画像の信号変化によるものかを検討した[12]。T1 の影響を排除したシーケンスを用いて実験を行った結果、酸素負荷時の BOLD 信号強度の上昇は脳組織における T2\* 信号に起因することを確認した。Kennan らは造影剤を用いたラット実験で脳血液量と磁化率効果を hyperoxia 及び hypoxia 下で求め、hyperoxia は組織中の局所酸素化状態を作り出していることを示した[13]。

しかし、もしヘモグロビンが酸素飽和状態になったとしたら、血漿中の溶存酸素は増加するはずである。これが BOLD 信号に対し付加的な信号上昇をもたらしている可能性がある。Berkowitz らは呼気中の酸素濃度を变化させウサギの硝子液中の溶存酸素量を変化させた[14]。硝子液中には血液は含まれないため、この結果は脳血流量、脳血液量、ヘモグロビン含有酸素量に左右されることはない。報告によればコントラストの変化は動脈血中酸素分圧 200 mmHg ( 50 % 酸素吸入とほぼ同程度 ) において組織含有酸素分圧と関連していたとする。一方、動脈血中酸素分圧が 350mm 以上 ( 100 % 酸素吸入にほぼ相当 ) になると酸素の血漿中への溶存が始まったとする。我々の実験は動脈採血を行っていないが、解放マスクで 100 % 酸素負荷を行ったときに動脈血中酸素分圧が 350 mmHg 以上になることは考えにくい。加えて我々の測定した動脈血中酸素分圧は 96~98 % といずれも飽和状態に達していなかった。従って、安静状態における酸素負荷によるコントラストの上昇は血漿中の溶存酸素によるものとは考えにくく、むしろ酸化ヘモグロビン量の増加 ( これは単位体積中の還元ヘモグロビンの減少を意味する ) によるものと考えられる。

### 賦活時 BOLD 信号上昇の理由 ( パラダイム I )

分離された赤血球では R2 と R2\* の緩和率は還元ヘモグロビン量に比例することが知られている[15]。しかし、インビボ測定に関して hemodynamic 応答と BOLD 信号応答との関係は未だに解明されていない。賦活時の生理学的パラメータと BOLD 信号変化との関係についての一般的な説明は次のようなものである[16]。神経活動の増大は対応する領域の脳血流量の増加を引き起こすが、この時の酸素摂取率の増加は相対的に小さい。結果として毛細血管及び静脈における還元ヘモグロビン濃度は相対的に低下する。これが T2\* 及び T2 緩和時間の延長を招き、従って T2\* 及び T2 強調画像における信号強度の上昇をもたらす。

同一被験者の各トライアル間では物理的状況 ( マシン状況、収集条件、チューニング等 ) 及び被験者のポジショニング ( 頭部の位置、スライス位置、血管の走行、分

布等)はほぼ同じと考えられる。従って、賦活時の BOLD 信号変化に影響を与える可能性があるパラメータは脳血流量、脳血液量、脳酸素代謝量等の生理学的な指標と考えられる。Kanno らは PET 実験でフリッカー刺激を用いて脳血流量の測定を行ったところ、ヒト一次視覚野における局所脳血流量は normoxia で 15 %の増加、hyperoxia で 25 %の増加を示したとする[6]。Mandeville らはラット前脚を電気刺激し、造影剤を用いて脳血液量を測定したところ 24 %の増加を示したとする[17]。Hoge らはヒト一次視覚野に対し段階的視覚刺激を行ったところ脳血流量と脳酸素代謝量との比はほぼ 2:1 であったと報告している[18]。各々の数値に関しては議論のあるところと思われるが、少なくとも、脳賦活時に、脳血流量の増加率が normoxia に比べて hyperoxia で大きく、かつ、脳血流量が増加するとき脳血液量及び脳酸素代謝量も増加する、と考えられる。しかし、脳血液量及び脳酸素代謝量の増加は BOLD 信号の減少を招くことから、hyperoxia 下での BOLD 信号増加は脳血流量が脳血液量及び脳酸素代謝量を上回る増加を示した結果と考えられる。

#### 事象関連パラダイムにおけるピーク値

事象関連パラダイムの結果、安静時に hyperoxia が BOLD 信号強度を増強し、視覚刺激に対するピーク値が normoxia に比べ、hyperoxia で増加することが観察されたが、これは前述のブロック・パラダイムを用いた観察と一致する[19]。

ところが、ブロック・パラダイム (normoxia = 5.4 %、hyperoxia = 5.7 %) と事象関連パラダイム (normoxia = 6.9 %、hyperoxia = 7.8 %) の間には、信号変化率 (ピーク値) 及び信号変化率 (ピーク値) の相対増加率に違いがある。違いが生じた理由として、次の 2 つの可能性が考えられる。一つは刺激開始時の神経活動の一時的な増加 (neuronal “bursting”) [20]である。我々は、事象関連 BOLD 応答は neuronal bursting の大きさに強く左右されることを第 4 章で観察した[21]。一方、ブロック・パラダイムによる信号変化率は 20 秒間の BOLD 信号応答の平均値より算出した値であり、主として steady-state 状態を反映している。BOLD 信号応答は刺激開始直後に一過性のピークを示すことから、事象関連パラダイムにおけるピーク値はこれを反映したのと考えられる。第二の可能性は、関心領域の選択方法の違いである。ブロック・パラダイムのタイムコースは一次視覚野中の全賦活ピクセルの平均信号強度曲線であるのに対して、事象関連パラダイムのタイムコースは一次視覚野中の最大 Z 値を示したピクセルの信号強度曲線である。このことは、ブロック・パラダイムにおける賦活ピクセルが事象関連パラダイムにおける賦活ピクセルよりも有意差の小さいピクセルを多く含んでいることを意味する。この結果、信号変化率も低下した可能性がある。

#### hyperoxia でピーク時間が早くなる理由

我々は視覚刺激時の事象関連応答におけるピーク時間が normoxia に比べ hyperoxia で短縮されたことを示した。同様な報告はレーザードップラー血流計を用

いたラット実験で共同研究者の松浦らが行っている[8]。彼らは、脳血流量の相対的増加率は hyperoxia が normoxia よりも 6.5 %大きかったこと、刺激時のフィールド電位が normoxia と hyperoxia で変化しなかったにもかかわらず、脳血流量の立ち上がり時間 (rise time) が normoxia に比べ hyperoxia で約 0.15 秒短かった、ことを示した。我々のサンプリング時間 (2 秒) はレーザードップラー血流計(0.03 秒)と比べ粗いため、正確な立ち上がり時間を求めることはできないが、事象関連 BOLD 信号応答のピーク時間が短縮したという我々の結果は、hyperoxia で hemodynamic 応答がより早まるという同一傾向を観察したものと考える。

### hyperoxia が brain hemodynamics に与える可能性のあるメカニズム

脳賦活時に神経活動 hemodynamics 応答のカップリング関係に作用する介在物質 (mediator) について長い間研究が行われている。候補にはプロトン[22]、アデノシン[23]、カリウム[24]、一酸化窒素 (nitric oxide、NO) [25]等が含まれる。また、最近になり神経学的なメカニズムにも関心が集まっている[26]。酸素は直接的な介在作用として血中酸素分圧低下時に脳血流を上昇させる働きをされると考えられている。高血中酸素分圧下で脳血流が上昇するという今回の結果は、むしろ上記介在物質、あるいは神経学的メカニズムに対し間接的な影響を与えたと解釈する方が妥当と思われる。ところが、神経学的なメカニズムに関しては松浦らの報告でフィールド電位が変化しなかった[8]ことから考えても、hyperoxia 時に酸素が脳神経活動に影響を与えたとは考えにくい。従って、過剰酸素が化学的介在物質に対し影響を与えたのではないかと推測される。加えて、hyperoxia がピーク時間をさらに短くしたという観察からは、可能性のある介在物質の特性として hemodynamics に作用するまでの時間がきわめて短いという条件を持つこと必要である。この場合、候補としては、カリウム、NO 等が考えられる。

本章で我々は hyperoxia がヒト一次視覚野において脳賦活時にコントラスト強調効果を持つことを示した。また、この事実は、hyperoxia が神経活動 hemodynamic 応答間のカップリング・メカニズムに間接的に影響を与える物質であることを示唆した。

## 12 . 参考文献

- [1] Raichle ME (1987) The nervous system V: Higher Function of the Brain. Handbook of Physiology, pp643-674, edited by Plum F, Am. Physiol. Soc.
- [2] Villringer A and Dirnagl U (1995) Coupling of brain activity and cerebral blood flow: basis of functional neuroimaging. Cerebrovasc. Brain Metab. Rev. 7, 240-276
- [3] Karczmar GS, River JN, Li J, Vijayakumar S, Goldman Z and Lewis MZ (1994) Effects of hyperoxia on T2\* and resonance frequency weighted magnetic

- resonance images of rodent tumours. *NMR Biomed.* **7**, 3-11
- [4] Kuperman VYu, River JN, Lewis MZ, Lubich LM and Karczmar GS (1995) Changes in T2\*-weighted images during hyperoxia differentiate tumors from normal tissue. *Magn. Reson. Med.* **33**, 318-325
  - [5] Berthezene Y, Tournut P, Turjman F, N'Gbesso R, Falise B and Froment JC (1995) Inhaled oxygen: a brain MR contrast agent? *Am. J. Neuroradiol.* **16**, 2010-2012
  - [6] Kanno I, Fujita H and Hatazawa J. (1996) Enhancement of CBF response for V1 stimuli during hyperoxia: behavior of oxygen in neuronal activation revised. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **17**, abstract p646
  - [7] Kashikura K, Kashikura A, Tamura H, Ardekani BA, Matsuura T, Fujita H and Kanno I (1999) Hyperoxia increases hemodynamic response in human visual cortex. *Neuroimage* **9**, abstract p300
  - [8] Matsuura T, Fujita H, Kashikura K and Kanno I (2000) Modulation of evoked cerebral blood flow under excessive blood supply and hyperoxic conditions. *Jpn. J. Physiol.* **50**, 115-123
  - [9] Strupp JP (1996) Stimulate: A GUI based fMRI analysis software package. *Neuroimage* **3**, abstract p607
  - [10] Bandettini PA, Jesmanowicz A, Wong EC and Hyde JS (1993) Processing strategies for time-course data sets in functional MRI of the human brain. *Magn. Reson. Med.* **30**, 161-173
  - [11] Josephs O, Turner R and Friston KJ (1997) Event-related fMRI. *Hum. Brain Mapp.* **5**, 243-248
  - [12] Kwong KK, Weisskoff RM, Edminster WB, Xiong J, Moore J, Mandeville JB and Rosen BR (1997) Brain MR T2 weighted signal change with oxygen inhalation. *Neuroimage* **5**, abstract p31
  - [13] Kennan RP, Scanley BE and Gore JC (1997) Physiologic basis for BOLD MR signal changes due to hypoxia/hyperoxia: separation of blood volume and magnetic susceptibility effects. *Magn. Reson. Med.* **37**, 953-956
  - [14] Berkowitz BA (1997) Role of dissolved plasma oxygen in hyperoxia-induced contrast. *Magn. Reson. Imaging* **15**, 123-126
  - [15] Brooks RA, Brunetti A, Alger JR and Di Chiro G (1989) On the origin of paramagnetic inhomogeneity effects in blood. *Magn. Reson. Med.* **12**, 241-248
  - [16] Menon RS, Kim S-G, Hu X, Ogawa S and Ugurbil K (1995) Functional MR imaging using the BOLD approach: Field strength and sequence issues. *Diffusion and Perfusion Magnetic Resonance Imaging: Applications to Functional MRI*, pp327-334, edited by Le Bihan D, Raven Press.
  - [17] Mandeville JB, Marota JJ, Kosofsky BE, Keltner JR, Weissleder R, Rosen BR

- and Weisskoff RM (1998) Dynamic functional imaging of relative cerebral blood volume during rat forepaw stimulation. *Magn. Reson. Med.* **39**, 615-624
- [18] Hoge RD, Atkinson J, Gill B, Crelier GR, Marrett S and Pike GB (1999) Linear coupling between cerebral blood flow and oxygen consumption in activated human cortex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 9403-9408
- [19] Kashikura K, Kershaw J, Kashikura A, Matsuura T and Kanno I (2000) Hyperoxia Enhanced Activation-Induced Hemodynamic Response in Human V1: An fMRI study. *Neuroreport* **11**, 903-906
- [20] Bandettini PA and Cox RW. (2000) Event-related fMRI contrast when using constant interstimulus interval: theory and experiment. *Magn. Reson. Med.* **43**, 540-548
- [21] Kashikura K, Yamamoto S, Zhang X, Kershaw J and Kanno I (2000) Comparison of Temporal Characteristics Between Event-Related BOLD Response and Event-Related Potentials to Checkerboard Stimulation in Human V1. *Proc. Intl. Soc. Magn. Reson. Med.* abstract p503
- [22] Chesler M and Kraig RP (1987) Intracellular pH of astrocytes increases rapidly with cortical stimulation. *Am. J. Physiol.* **253**, R666-70
- [23] Dirnagl U, Niwa K, Lindauer U and Villringer A (1994) Coupling of cerebral blood flow to neuronal activation: role of adenosine and nitric oxide. *Am. J. Physiol.* **267**, H296-301
- [24] Paulson OB and Newman EA (1987) Does the release of potassium from astrocyte endfeet regulate cerebral blood flow? *Science* **237**, 896-898
- [25] Akgoren N, Fabricius M and Lauritzen M (1994) Importance of nitric oxide for local increases of blood flow in rat cerebellar cortex during electrical stimulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **91**, 5903-5907
- [26] Lou HC, Edvinsson L, and MacKenzie ET (1987) The concept of coupling blood flow to brain function: revision required? *Ann. Neurol.* **22**, 289-297

### 13 . 研究業績

#### 13-1 . 原著論文 :

- [1] K Kashikura, J Kershaw, A Kashikura, T Matsuura, I Kanno: Hyperoxia-enhanced activation-induced hemodynamic response in human V1: an fMRI study. *Neuroreport*. 2000 Apr 7; 11(5): 903-6.

#### 13-2 . 総説など : なし

#### 13-3 . 国際学会発表 :

- [1] K. Kashikura, A. Kashikura, X. Zhang, J. Kershaw, I. Kanno: An Event-Related fMRI Study Revealing Hyperoxia Modified Activation-Induced Hemodynamic Response in Human V1. International Society for Magnetic Resonance in Medicine, Eighth Scientific Meeting, Colorado Convention Center, Denver, Colorado, USA, April 1-7, 2000
- [2] K. Kashikura, A. Kashikura, H. Tamura, T. Matsuura, B.A. Ardekani, I. Kanno: Hyperoxia Increases Hemodynamic Response in Human Visual Cortex. 5th International Conference on Functional Mapping of the Human Brain (HBM99), Congress Center Dusseldorf, Germany, June 23-26, 1999
- [3] K. Kashikura, A. Kashikura, H. Tamura, B. A. Ardekani, T. Matsuura, H. Fujita, I. Kanno: Effects of Hyperoxia on Hemodynamic Response in Human V1 Area. Ultrafast Magnetic Resonance Imaging in Medicine, Kyoto, Japan, January 27-29, 1999

13-4 . 国内学会発表 :

- [1] 柏倉健一、柏倉明美、田村元、菅野巖 :「一次視覚野における酸素負荷時の BOLD 信号変化」、日本磁気共鳴医学会第 27 回大会 99 年 9 月 16-18 日、東京

14 . The BOLD signal response to visual stimulation under hyperoxia in human V1

15 . Akita Research Institute of Brain and Blood Vessels

16 . Kenichi Kashikura (JST Akita)

17 . Akemi Kashikura (JST Akita)

Xiaojing Zhang (JST Akita)

Jeff Kershaw (JST Akita)

Iwao Kanno (Akita Research Institute of Brain and Blood Vessels)

18 . 1998-2000

19 . Abstract

To investigate the effect of hyperoxia on the blood oxygenation level-dependent (BOLD) response to visual stimulation of human V1, an event-related functional magnetic resonance imaging (fMRI) technique was applied. An event-related paradigm was performed with 2 seconds of reversing checkerboard stimulation at a frequency of 8 Hz followed by 18 seconds of control scans. Peak height and peak time of the BOLD response curves and the number of activated pixels were compared under normoxic and hyperoxic conditions. It was found that the peak height was larger and the peak time was shorter for hyperoxia than for normoxia. These results suggest that hyperoxia modified the

activation-induced hemodynamic response of human V1.

# Hyperoxia-enhanced activation-induced hemodynamic response in human V1: an fMRI study

Kenichi Kashikura,<sup>CA</sup> Jeff Kershaw, Akemi Kashikura,<sup>1</sup> Tetsuya Matsuura and Iwao Kanno<sup>1</sup>

Akita Laboratory, Japan Science and Technology Corporation (JST), 6-10 Senshu-kubota cho, Akita, 010-0874; <sup>1</sup>Department of Radiology, Akita Research Institute of Brain and Blood Vessels, 6-10 Senshu-kubota cho, Akita, 010-0874, Japan

<sup>CA</sup>Corresponding Author

Received 2 November 1999; accepted 15 January 2000

The effect hyperoxia had on the hemodynamic response to visual stimulation (black and white checkerboard alternating at a frequency of 8 Hz) of human V1 was investigated using a blood oxygenation level-dependent (BOLD) contrast with an fMRI technique. Data were acquired with a 5 on/5 off block paradigm using single-shot gradient-echo echo-planar imaging. Using a two-tailed paired *t*-test ( $p < 0.05$ ,  $n = 13$ ) it was found

that the mean percentage signal change and the mean number of activated pixels was significantly increased for hyperoxia ( $5.7 \pm 0.9$ ,  $187 \pm 73$ , mean  $\pm$  SD) relative to those for normoxia ( $5.4 \pm 0.9$ ,  $168 \pm 58$ ). We believe that these results indicate that hyperoxia enhances the activation-induced hemodynamic response in human V1. *NeuroReport* 11:903–906 © 2000 Lippincott Williams & Wilkins.

**Key words:** Area V1; Blood oxygenation level-dependent (BOLD) contrast; Functional magnetic resonance imaging; Hemodynamic response; Hyperoxia

## INTRODUCTION

Changes in neuronal activity in normal humans and animals are coupled to those of cerebral blood flow and metabolism [1]. However, this relationship is not well understood, and there are still many candidates that may act as mediators and modulators for this activation-dependent coupling mechanism. Oxygen is one of these [2]. Several respiration investigations have already been performed using an oxygen perturbation technique. However, most work examining the hyperoxic condition has focused on the use of oxygen as a contrast-enhancing agent for differentiating tumor from normal tissue [3,4]. Although Berthezene *et al.* have demonstrated that hyperoxia increased the signal intensities of T2\*-weighted images taken during the rest condition [5], there are few publications investigating the relationship between hyperoxia and hemodynamic response during functional imaging, and these are mostly using PET [6].

In this study we aimed to evaluate the effect of hyperoxia on hemodynamic response to the stimulation of human V1 by comparing the activation maps taken under normoxia and hyperoxia. The hemodynamic response was measured using blood oxygenation level-dependent (BOLD) contrast [7] with an fMRI technique.

## MATERIALS AND METHODS

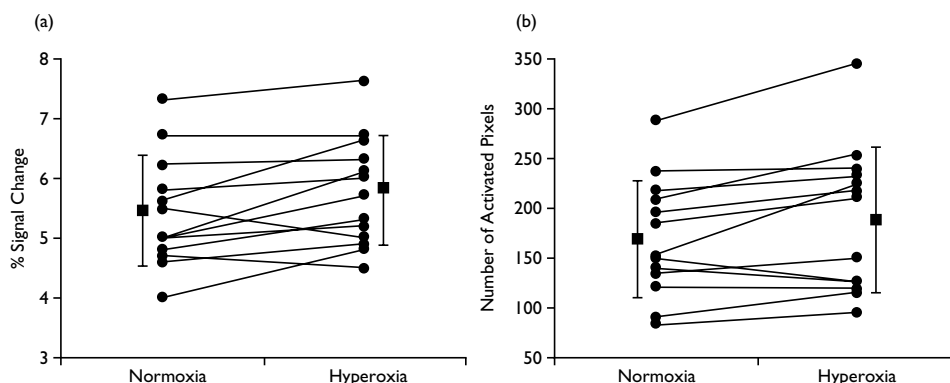
Thirteen healthy volunteers aged 21–39 (26  $\pm$  6 years, mean  $\pm$  s.d.) were studied. Each subject had normal visual

ability. Subjects were paid and gave written informed consent prior to the study as set down by the ethics committee of the Akita Research Institute of Brain and Blood Vessels for human experimentation.

All experiments were carried out on a 1.5T clinical MRI system (Siemens Magnetom Vision, Erlangen, Germany) equipped with a standard head coil. A single-shot gradient-echo echo-planar imaging sequence, sensitive to BOLD contrast, was used for the functional imaging. Acquisition parameters were as follows: TR = 3000 ms, TE = 66 ms, slice thickness = 5 mm, slice gap = 1 mm, 128  $\times$  128 matrix size, field of view = 230  $\times$  230 mm, flip angle = 90°. We acquired 92 frames of five axial slices (460 images) parallel to the calcarine sulcus and discarded the first two frames (10 images) to exclude the spin saturation effect. A 5 on/5 off block-paradigm, starting after five control scans, was utilized.

Subjects were instructed to keep their eyes open and to fix their gaze at a cross in the center of a screen. Their heads were immobilized by foam pads and tape. Headphones were used to reduce scanner noise. Room and gantry lights were extinguished during the studies. A rectangular black and white checkerboard (vertical and horizontal size 7.5  $\times$  10°, each square being 1.25  $\times$  1.25°) alternating at a frequency of 8 Hz was created using MacStim 2.2.7 software (David Darby, West Melbourne, Australia) with a personal computer (Power Macintosh 8500/180). Checkerboard patterns were projected onto a





**Fig. 3.** (a) Percentage signal changes under normoxia and hyperoxia. The mean percent signal change was larger for hyperoxia ( $5.7 \pm 0.9$ ) than for normoxia ( $5.4 \pm 0.9$ ;  $p < 0.05$ ,  $n = 13$ ). (b) Number of activated pixels under normoxia and hyperoxia. The mean number of activated pixels was larger for hyperoxia ( $187 \pm 73$ ) than for normoxia ( $168 \pm 58$ ;  $p < 0.05$ ,  $n = 13$ ).

3b shows that the mean number of activated pixels in the ROI was significantly larger for hyperoxia ( $187 \pm 73$ ) when compared with that for normoxia ( $168 \pm 58$ ;  $p < 0.05$ ,  $n = 13$ ).

## DISCUSSION

In this study, we have demonstrated that hyperoxia increased BOLD signal intensity at rest, and that hyperoxia increased the percentage signal change and the number of activated pixels during visual stimulation.

Berthezene *et al.* [5] reported that hyperoxia at rest increased the signal intensity of T2\*-weighted images by 3% using FLASH sequence, without increasing the signal intensity of T1-weighted images. Kwong *et al.* [9] were also concerned that the elevation of BOLD signal intensity could be influenced by either the changes in T1 due to CSF or T2\*-weighted changes. To test this they obtained BOLD images with the influence of the T1 effect removed, and confirmed that the change of BOLD signal intensity was due to a T2\*-weighted signal change in brain tissue. Kennan *et al.* [10] have separately measured blood volume and magnetic susceptibility effects using contrast agents under hyperoxia and hypoxia in rats. They concluded that, in particular, hyperoxia produces reliable representations of regional oxygenation in tissue. However, once hemoglobin is saturated with oxygen, the dissolved plasma oxygen will increase. This may create an additional mechanism for producing contrast. Berkowitz [11] varied the level of dissolved plasma oxygen by respiration challenges and observed different patterns of contrast in the vitreous of rabbits. Since the vitreous does not contain blood, his observation was independent of any potential confounding factors such as cerebral blood flow (CBF), cerebral blood volume (CBV), and oxygen saturation in hemoglobin. In that report, the contrast changes were consistent with tissue oxygen buffering by hemoglobin at an arterial PO<sub>2</sub> of 200 mmHg (corresponding to breathing 50% O<sub>2</sub>), and dissolved oxygen offloading at arterial PO<sub>2</sub> > 350 mm (corresponding to breathing 100% O<sub>2</sub>). Although we did not perform blood sampling, the arterial PO<sub>2</sub> is unlikely to exceed 350 mmHg while breathing 100% oxygen with an

open inhalation mask. Our O<sub>2</sub> saturation data show that the oxygenation level of hemoglobin in arterial blood was not fully saturated (96–98%) during hyperoxia. Therefore, we conclude that the hyperoxia-enhanced BOLD contrast at rest was not caused by the contrast-enhanced effect from dissolved plasma, but by the increase of oxyhemoglobin concentration (which decreases the amount of deoxyhemoglobin per voxel).

It is known that the relaxation rates of R2 and R2\* are proportional to the deoxyhemoglobin concentration in isolated red blood cells [12]. However, when we consider the physical and physiological parameters affecting the measurement *in vivo*, several questions still remain concerning the relationship between hemodynamic response and BOLD signal changes. The general explanation for the relationship between the physiological parameters and BOLD signal changes during activations is as follows [13]. Increases in neuronal activity lead to an increase in CBF with a slight increase in oxygen extraction. Deoxyhemoglobin concentration in the capillaries and veins decreases as excess CBF increases over oxygen utilization. This results in an increase in the MRI relaxation parameters T2\* and T2, and subsequently there is an increase in the signal intensity of T2\*- and T2-weighted MR images.

In our methodology, the physical parameters (scanner, acquisition sequence, tuning conditions, etc.) and subject positioning (head position, slice selection, vessel orientation and distributions, etc.) were nearly identical for all the experiments performed on a single subject. Therefore, the only possible parameters affecting BOLD signal intensities during activation were physiological conditions, such as CBF, CBV, and cerebral metabolic rate for oxygen (CMRO<sub>2</sub>). Kanno *et al.* have directly shown using flicker stimulation in PET that the CBF increases in human V1 are ~15% and 25% for normoxia and hyperoxia, respectively [6]. Mandeville *et al.* have measured CBV response to the electrical stimulation of rat forepaw using contrast agents and found a 24% increase [14]. Hoge *et al.* recently reported that changes of CMRO<sub>2</sub> were approximately proportional to the CBF changes in a fixed ratio of 1:2 during graded V1 stimulation [15]. Although these values and ratios are still

screen (Resonance Technology, Inc., Van Nuys, USA) using a LCD projector (EPSON ELP-5000, Tokyo, Japan). Subjects saw the screen through a mirror attached to the head coil. For each subject, five sets of data were obtained in the following order. Run 1: Visual stimulation while breathing room air. Run 2: Rest with O<sub>2</sub> inhalation between frames 20 and 90. Run 3: Visual stimulation with O<sub>2</sub> inhalation. Run 4: Visual stimulation with O<sub>2</sub> inhalation. Run 5: Visual stimulation while breathing room air. Runs 4 and 5 were repetitions of runs 3 and 1, respectively. An open inhalation mask was fitted to the subject during each run, but 100% O<sub>2</sub> (15l/min) was only supplied for runs 2, 3, and 4 to create the hyperoxic condition. Run 2 was performed to compare the BOLD signal intensity between normoxia and hyperoxia at rest. End-tidal CO<sub>2</sub> (ETCO<sub>2</sub>; mmHg) and O<sub>2</sub> saturation levels measured at the thumbnail were monitored throughout all studies (Kyoritu Medical, Omni-Trak, Tokyo, Japan).

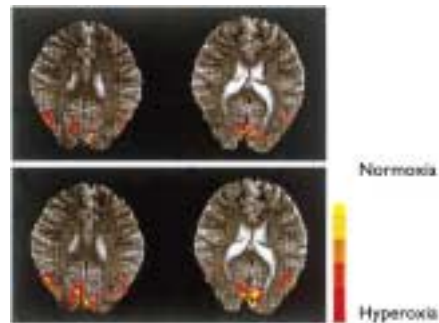
Data were analyzed with the STIMULATE software package (J.P.Strupp, Minneapolis, USA) using its cross-correlation statistic and a box-car reference waveform [8]. Pixels showing correlation coefficients >0.3 were considered to be active. The hemodynamic delay was assumed to be 6 s. The center of mass head motion was examined and data that showed motion of >0.15 pixels were excluded from further analysis. A minimum connected component value of 2 was adopted to reduce the number of isolated pixels. Spatial and temporal smoothing were not applied. Composite images were generated by overlaying the activation maps on the average of the original T2\*-weighted images. A region of interest (ROI) was selected in the V1 area according to the anatomical T2\*-weighted images taken for each subject. This ROI was used in the analysis of each run. The percentage signal changes were calculated as the ratio of the mean difference between signal intensities under the stimulation and rest conditions, and the mean signal intensity of the rest condition. The number of activated pixels in the ROI was also counted. The percentage signal change and the number of activated pixels were averaged and statistically tested by a two-tailed paired *t*-test for the data sets with the same respiration paradigm (runs 1 and 5, and runs 3 and 4).

## RESULTS

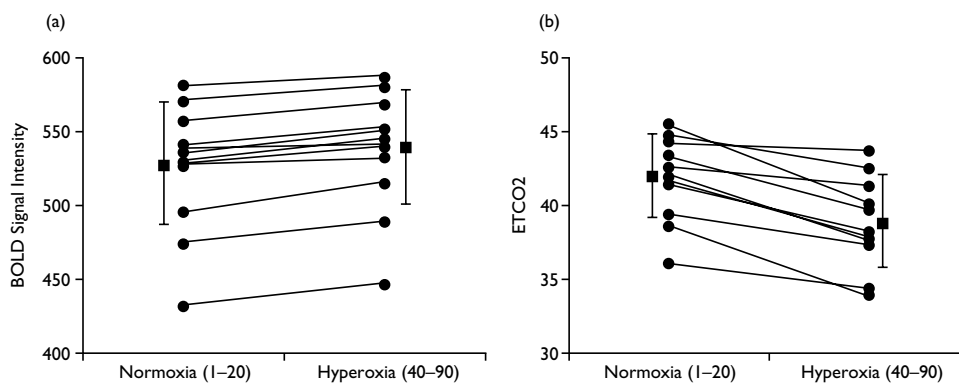
Figure 1 presents a typical activation map for the normoxic and hyperoxic conditions. Activations were mainly detected in the calcarine sulcus (V1) and the posterior regions of the inferior temporal gyrus and sulcus (V5). Both the percentage signal change and the number of activated pixels in V1 were larger under hyperoxia than under normoxia.

Figure 2 shows the results of Run 2. In Fig. 2a, the mean BOLD signal intensity in V1 for hyperoxia at rest ( $537 \pm 39$ ) was significantly larger than that for normoxia ( $526 \pm 41$ ;  $p < 0.0001$ ,  $n = 12$ ). Figure 2b shows the changes of ETCO<sub>2</sub> before and after supplying oxygen. The mean ETCO<sub>2</sub> level for hyperoxia ( $38.6 \pm 2.9$ ) was significantly decreased relative to that for normoxia ( $41.6 \pm 2.7$ ;  $p < 0.0001$ ,  $n = 11$ ). These values were calculated by averaging frames 1–20 (normoxia) and 40–90 (hyperoxia).

Figure 3a shows that the mean percent signal change in the ROI for hyperoxia ( $5.7 \pm 0.9$ ) was significantly larger than that for normoxia ( $5.4 \pm 0.9$ ;  $p < 0.05$ ,  $n = 13$ ). Figure



**Fig. 1.** Representative activation maps under normoxia and hyperoxia during visual stimulation. In the color scale, the yellow represents high percentage signal changes ( $\geq 10\%$ ), and red represents low percentage signal changes ( $\leq 1\%$ ). Activations were mainly observed in areas V1 and V5. Clearly, both the percent signal change and the number of activated pixels in V1 increased under the hyperoxic condition with respect to the normoxic condition.



**Fig. 2.** (a) BOLD signal intensities in V1 at rest. The mean signal intensity for hyperoxia ( $537 \pm 39$ ) was larger than that for normoxia ( $526 \pm 41$ ;  $p < 0.0001$ ,  $n = 12$ ). (b) Changes of end-tidal CO<sub>2</sub> before and after supplying oxygen. The mean end-tidal CO<sub>2</sub> level (mmHg) for hyperoxia ( $38.6 \pm 2.9$ ) was significantly lower than that for normoxia ( $41.6 \pm 2.7$ ;  $p < 0.0001$ ,  $n = 11$ ).

controversial, they suggest that a larger increase of CBF occurs for hyperoxia than for normoxia, and that CBV and CMRO<sub>2</sub> increase as CBF increases. Therefore, we think that the larger change in BOLD signal intensity during visual activation in human V1 under hyperoxia is a result of increases in the hemodynamic parameters.

It is still not clear what precise effect the saturation level of hemoglobin has on the hemodynamics. However, our results indicate that hyperoxia has shown an activation-induced contrast-enhanced effect in the human V1 area. They may further suggest that hyperoxia behaves as a contrast-enhancing agent potentially influencing the activation-dependent coupling mechanism between neuronal firing and hemodynamic response.

### CONCLUSION

We have estimated the effect of hyperoxia on hemodynamic response during functional imaging in human V1 with a fMRI BOLD technique. The mean BOLD signal intensity for hyperoxia at rest ( $537 \pm 39$ ) was larger than that for normoxia ( $526 \pm 41$ ;  $p < 0.0001$ ,  $n = 12$ ). The mean percentage signal intensity change and the mean number of activated pixels during visual stimulation were larger for hyperoxia ( $5.7 \pm 0.9$ ,  $187 \pm 73$ ) than for normoxia ( $5.4 \pm 0.9$ ,  $168 \pm 58$ ; two-tailed paired  $t$ -test,  $p < 0.05$ ,  $n = 13$ ). For the resting condition, the increased oxyhemoglobin concentration, (hence decreased deoxyhemoglobin concentration), increased the BOLD signal intensity. For the case of the activation condition, however, results may be explained by changes in brain hemodynamics indicating

that hyperoxia enhanced the activation-induced hemodynamic response in human V1.

### REFERENCES

1. Raichle ME. The nervous system V: higher function of the brain. In: Plum F, ed. *Handbook of Physiology*. Bethesda: Am Physiol Soc, 1987: 643–674.
2. Villringer A and Dirnagl U. *Cerebrovasc Brain Metab Rev* 7, 240–276 (1995).
3. Karczmar GS, River JN, Li J *et al.* *NMR Biomed* 7, 3–11 (1994).
4. Kuperman VYu, River JN, Lewis MZ *et al.* *Magn Reson Med* 33, 318–325 (1995).
5. Berthezene Y, Tournaud P, Turjman F *et al.* *Am J Neuroradiol* 16, 2010–2012 (1995).
6. Kanno I, Fujita H, Hatazawa J. *J Cerebr Blood Flow Metab* 17, S3 (1996).
7. Ogawa S, Menon RS, Tank DW *et al.* *Biophys J* 64, 803–812 (1993).
8. Bandettini PA, Jesmanowicz A, Wong EC and Hyde JS. *Magn Reson Med* 30, 161–173 (1993).
9. Kwong KK, Weisskoff RM, Edminster WB *et al.* *Neuroimage* 5, s31 (1997).
10. Kennan RP, Scanley BE, Gore JC *et al.* *Magn Reson Med* 37, 953–956 (1997).
11. Berkowitz BA. *Magn Reson Imaging* 15, 123–126 (1997).
12. Brooks RA, Brunetti A, Alger JR and Di Chiro G. *Magn Reson Med* 12, 241–248 (1989).
13. Menon RS, Kim S-G, Hu X *et al.* Functional MR imaging using the BOLD approach. Field strength and sequence issues. In: Le Bihan D, ed. *Diffusion and Perfusion Magnetic Resonance Imaging. Applications to Functional MRI*. New York: Raven Press, 1995: 327–334.
14. Mandeville JB, Marota JJ, Kosofsky BE *et al.* *Magn Reson Med* 39, 615–624 (1998).
15. Hoge RD, Atkinson J, Gill B *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA* 96, 9403–9408 (1999).