

科学技術振興事業団共同研究促進事業

「脳活動に伴う二次信号の計測とその発生機序に関する研究」 研究成果概要

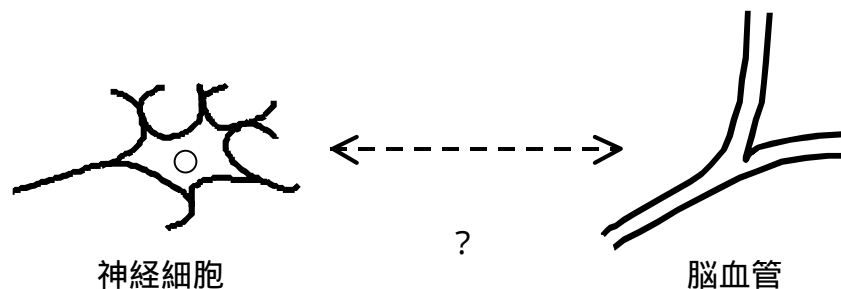
1. 共同研究の背景と目的

脳はその重量が体重の2%を占めるに過ぎない臓器であるがそこで使用する血液量は心臓から全身へ送り出される血流量の15%に達し、消費する酸素にいたっては全身消費量の20%に達している。さらに、酸素の需給バランスの立場で観察すると脳酸素消費量に対して脳への酸素供給量はその2.5倍から3倍に達している非常に贅沢に酸素が供給されている臓器といえる。このように贅沢に酸素が供給されている脳が安静時からいったん活動をはじめると、活動した領域に対応する部分の血流が局所的かつ選択的に瞬時に増加する。この現象は脳の機能局在の位置を同定する脳機能マッピングの立場からは血流量の変化が頑強な信号として都合がよく、それゆえ PET や fMRI を用いて神経科学や神経心理学領域で広く使われている。脳活動に伴う血流増加の現象は1890年代に Roy と Sherrington がすでに報告しており広く知られている。ところがその血流調節の生理学的なメカニズムにはまだ解明されていない。さらに、1986年に Fox と Raichle により、酸素増加率よりはるかに多くの血流が供給されているという血流増加率と酸素代謝増加率の乖離現象が報告されて以来、その過剰な酸素供給を生理学的に説明するための多数の研究が行われてきた。このような研究意欲への高まりとともに、最近の医療画像技術の急速な進歩と呼応してその研究が一気にブレイクした。特に、短半減期の放射能を使用する核医学的な方法は脳の断層撮影を非侵襲的にかつ定量的に測定することを可能にしてきた。その頂点に立つ PET では酸素 15 という半減期 2 分の放射能で標識した水を用いた脳血流量測定法による脳機能局在を測定できる脳賦活測定法が 1980 年代から積極的に進められてきた。さらに、MRI を用いた方法も急速に発展している。1990 年に米国 Bell 研究所の Ogawa らが報告した血液酸素化レベル指標 (blood oxygenation level-dependent; BOLD) 法という新しい測定原理に基づいた方法が利用できるようになり、さらに、高速な EPI 撮影法が臨床装置に設置されるに及んで、放射線被曝の危険のない安全な方法として fMRI 脳賦活測定法が急速に普及して脳機能マッピングが広い裾野を持つ脳機能解析の研究道具として定着してきた。

神経細胞はシナプスを経て入ってきた信号で興奮し、膜電位の活動として次の神

神経細胞へシナプスを介して信号を伝達していく。脳機能を理解する基本的な手法はこれらの神経細胞の興奮する様子あるいはそれに伴うエネルギー代謝や血流の変化を、外部から直接的あるいは間接的な信号として計測することである。このとき、電気的な活動を直接的に測定する一次信号と、代謝や血流の増加を間接的に測定する二次信号がある。人を対象とした測定では脳に傷を付けない非侵襲的な方法が必須であり、一次信号としては脳波や脳磁図として、二次信号としてはPETやMRIなどが用いられる。後者の主に脳血流変化を測定する二次信号は脳活動を頑強に反映し、全脳を同時に測定可能で脳機能の解明に不可欠な方法になっている。しかし、現在広範に使用され脳科学に不可欠になっているにもかかわらず、神経活動に連動して発生する二次信号の生理学的な機序はまだ十分に解明されていない。本共同研究は、このような背景のもとで現実の二次信号の計測を介してその生成される機序を解明するために立ち上げられた。

本共同研究の目的は、脳活動に伴う脳血流量、脳酸素代謝量、その他の生化学的、生理学的指標の変化など、二次信号の時間的、空間的变化を人におけるマクロ的なスケールで測定できるfMRIの情報と、動物を用いたミクロ的なスケールで測定できる光計測法やLDFなどの情報を統合することで、脳活動とそれに伴う二次信号との解剖学的かつ経時的な関係を明らかにすることである。さらに、生理学的あるいは生化学的な環境を揺動したときの变化を定量的に計測できる核医学やfMRI、LDFなどの情報を通して、脳活動に伴う二次信号を引き起こす機序、すなわち、下図に示すように神経細胞と脳血管を連絡する未知なる仕組みを解明することである。



2. 共同研究成果の概要

本共同研究は発足時点ではそれまでの研究実績に基づいて、通産省工業技術院電子技術総合研究所（電総研）グループが光計測法に基づく内因性光信号の計測、理化学研究所（理研）グループが視覚野の神経学的機能構築の解明、秋田県立脳血管研究セ

ンター（秋田脳研）グループが核医学的手法による脳循環代謝調節機序の解明という役割で二次信号の発生機序を解明する計画でスタートした。しかし、発足の初年度に電総研と理研がそれぞれ超高磁場 MRI の導入、また、秋田脳研グループが MRI 装置の導入および光計測システムやレーザードプラー血流計測（LDF）の導入という新しい事態に遭遇したため、新しい研究環境に合うように研究方法を再編成し、電総研グループと理化学研究所グループはいずれも fMRI と光計測法をその研究手段として進め、秋田脳研は核医学的方法に加えて新しい研究手段を用いて微小循環に基づいた研究を進めることになった。このような測定手法の変更はあったものの、二次信号の計測という立場では、かえってそれぞれのグループが独立に複数の二次信号測定の手段を持つことが出来るようになり、本共同研究にとって重要な計測の立場から信号の計測法の自由度を保つ観点で非常に効果的な研究グループの構成が可能になった。二次信号の計測法としては fMRI は人に対応する方法として、光計測、LDF およびベータカメラが動物での研究方法として、それぞれの方法を活かした二次信号の生理学的な解明を目指して研究を進めることができた。以下、測定モダリティごとにそれぞれの研究成果の概要をまとめる。

2 - 1 . 機能的磁気共鳴画像 (fMRI)法

MRI は当初プロトンの T1 や T2 を画像化することによる形態情報を得る方法として普及してきたが、1990 年米国 Bell 研究所の Ogawa らが脳活動に連動して過剰に血流が供給され血液中の酸化ヘモグロビン濃度の上昇と呼応して常磁性体の還元ヘモグロビンの濃度が薄まり T2* 値が上昇し、血液酸化レベル依存度（blood oxygenation level dependence: BOLD）信号として初めて報告して以来、脳活動の変化を示す方法としてにわかに注目を集めた。しかし、BOLD 信号の生理学的な意味付けがまだ詳しく解明されていないため、本共同研究はその生理学的な意味を解明することを目的にした。さらに二次信号の生理学的なメカニズムの解明と同時に、超高磁場 MRI 測定システムでは BOLD 信号の分解能の限界を目指した高解像力測定法の開発と、より信頼性の高いマッピング知見を得るためのデータ解析法の開発も目指した。

理研グループでは静磁場強度がわが国で最大の静磁場強度の 4 テスラ MRI を導入し、それによるサブミリの空間分解能での fMRI 脳活動イメージングを試みた。第一次視覚野では、左目あるいは右目から強い入力を受ける神経細胞がそれぞれ固まって存在し、周期的に交互に並んだ帯状の領域（眼優位性コラムと呼ばれる）を構成することが知られている。眼優位性コラムは fMRI の空間分解能の限界を調べるために理想的なモデル系である。4 テスラの静磁場の MRI 装置を用いて、分割 EPI 法（画像構成法の一つ）により健常な被験者の第一次視覚野の眼優位性コラムの画像化を試み

た。第一次視覚野が比較的平らに広がった鳥矩溝の上壁に平行になるようにスライスを設定し、使用する視覚刺激で刺激される第一次視覚野の範囲を予め別の実験により定め、この範囲で左目刺激と右目刺激で信号の大きさが一貫して変化する画素の分布を調べた。左目優位の画素と右目優位の画素は約 1 ミリの間隔で交互に並んだ帯状の領域に固まって存在した。帯の方向と間隔は、片目を治療目的で摘出した患者の死後脳をチトクローム酸化酵素に対する組織化学的方法で染色することによって調べられた眼優位性コラムのデータ(Horton et al., 1990)とよく一致した。また、同じ被験者のほぼ同じスライス部位について別の日に行った fMRI 実験において、よく重複する眼優位性コラムのパターンが再現された。これらの結果は、高静磁場 fMRI を使って人間の脳機能を 1 ミリ以下の高空間分解能で研究できることを示した。

電総研グループは静磁場強度 3 テスラの MRI 装置を導入して、認知課題等における解析法を開発した。fMRI を用いた認知心理実験では、ある認知過程を含む実験条件の測定と、それを含まないコントロール条件の測定を比べ、BOLD 信号が増加する領域をその認知過程が関与する部位と定義される。一方、しばしば、信号が減少する領域に同時に観測される deactivation については言及されることは少ない。この deactivation 現象を解明するため、課題内容(記憶、運動)、認知材料(言語、図形)、刺激の感覚モダリティ(視覚、聴覚)を様々に変えた課題を行った結果、運動課題を除く全ての記憶関連課題で、正中矢状断の広範な範囲で共通した deactivation パターンが観測された。これらの領域は少なくとも記憶課題に共通する役割を演じることが示唆された。さらに、fMRI 信号の信号系列の解析法を研究した。fMRI のデータ収集法としては約 30 秒毎に刺激の ON と OFF を繰り返すブロック収集(BLOCK-BOLD)法がこれまで使われていた。これに対して、MRI 装置のデータ収集能力の向上に伴い、数秒間刺激を一定時間間隔(数 10 - 60 秒)ごとに繰り返す事象関連 BOLD 収集(ER-BOLD)を開発した。これは刺激に対する血行動態の応答特性を測定するのに適した方法である。

秋田脳研グループは一般臨床に普及している 1.5 テスラ MRI 装置を用いて、主に脳賦活時の脳賦活強度と BOLD 信号との定量的な関係を中心に研究した。脳神経活動と脳血行動態との関係を明瞭にすることを目的とした。最初に、脳神経活動と BOLD 信号応答との関係について検討した。脳活動を直接反映する一次信号と連動する血流代謝情報の二次信号との定量的な関係を検討するため、異なるコントロール・パターンを用いたところ、VEP 上にこれと対応する変化が観察された。さらに、この VEP の神経活動量と BOLD 信号応答量とは良好に相関した。一方、刺激頻度、空間周波数、刺激時間を変化させた時に対応する BOLD 信号応答特性を検討したとこ

る、視覚神経系に特有な性質を見いだすことができた。すなわち、刺激頻度、空間周波数は異なる視覚伝達系を刺激し、この組み合わせにより、異なる BOLD 応答特性を生じることがわかった。また、刺激に対する視覚神経細胞の非線形的応答特性が BOLD 信号応答の非線形性を生じる原因であることがわかった。以上より、BOLD 信号応答は神経活動ときわめて強い相関関係を持つことが示された。次に、血行動態を示す各パラメータの相互関係を検討した。この結果、BOLD 信号応答と血流信号応答はほぼ同等の応答特性を持つことが確認された。また、連続刺激時の BOLD 信号応答を測定したところ、5 分程度の刺激期間中、脳酸素代謝量、脳血液量が変化しないことがわかった。さらに、動脈血中 CO₂ 分圧(PaCO₂)上昇時の血流量増加に占める赤血球濃度増加の割合は小さく、赤血球速度の影響が強いことがわかった。最後に、神経活動と血行動態のカップリング関係に酸素が関与している可能性を検討した結果、酸素が化学的介在物質に作用して神経活動と血行動態間のカップリング関係に影響を与える可能性が示唆された。

以上のように fMRI による研究では、fMRI が人における脳活動をミリ以下の精度で詳細に測定できる方法であることを検証した。また、BOLD 信号が脳活動によってはネガティブな信号を示すこと、さらに BOLD 信号と脳活動とは密接な定量的な関係があることを明確に示した。fMRI による BOLD 信号が脳活動を示す情報であることを証明すると同時に人における脳機能計測法の強力な道具であることを証明した。

2 - 2 . 光計測法による動物脳表賦活計測

光計測法は光が透過できる密封形のチェンバーを脳表に作り、そこへ可視光を照射し、その反射光を定量的画像として連続して計測して酸化ヘモグロビン(HbO)と還元ヘモグロビン(HbR)の変化を推定する方法である。1980 年代に初めて観察され脳活動に伴う信号として内因性信号と呼ばれるようになった。内因性信号を利用した光計測法は動物を対象とした大脳皮質の機能を時間的に連続した二次元画像として可視化する有用な方法の一つである。

秋田脳研グループは頭蓋内圧を保持したまま LDF や脳波など同時に複数の電極を挿入可能な密封式開窓法を備え、かつ、頭蓋内圧を正常に維持した状態で脳局所の神経活動と血流を同時に計測可能な閉鎖開窓法光計測システムを開発した。神経活動は電気的信号、血流に関する信号は、Laser-Doppler flowmetry (LDF)や光計測によりもたらされる。これらの計測を同時に行うべく、Arieri ら (1995)のチャンバーを基に、Kawamura ら (1990)の漏斗法を導入した閉鎖開窓法を開発した。同法に用いら

れるチャンバーは、脳浮腫防止のための調圧機構を有し、Oリングを挟んでカバーガラスにより封入される。カバーガラスは、X-Y-Z マニピュレーターを有するフレームに固定され、フレームがマニピュレーターに固定された電極やプローブとともに移動することによって計測部位を選択することができる。カバーガラスは中心を避けた位置に穴があり、穴はゴムキャップで塞がれている。電極とプローブは、ゴムキャップを斜めに通過して固定されるため光計測の同時計測が可能となった。チャンバー内圧は、開頭手術から計測に至るまで4ミリ水銀柱(mmHg)に管理され、生理的条件下の閉鎖空間で多種の同時計測が可能となった。これまで1本の電極を挿入できる密封式開窓法は開発されていたが2電極まで挿入できる開窓法システムは本共同研究で初めて実現した方法である。これにより光計測の他に電気信号やLDFなどの信号を同時に測定可能であり、本研究の目的を果たすには重要な機構である。酸化ヘモグロビン(HbO)と還元ヘモグロビン(HbR)の割合の変化は特定波長の可視光(570nm、605nm)に対する反射光変化をCCDカメラで高速(フレーム間隔100ms)にかつ高分解能(約50 μ m)で測定できるようにしてきた。ラットのヒゲ刺激時のWhisker Barrel Cortexにおける570nmの反射光は0.5秒で低下し1.8秒で最低値になり約5秒で基線に戻った。同時計測のLDFにおける血流量はこれと対称形に変化した。570nmがHbOとHbRに等しい吸収係数を示し脳血液量を反映するとされており、脳血流の変化と脳血液量の変化が同時に進行していることを示唆する。605nmの反射光は初期に低下し1.5秒から反転上昇し4秒でピークに達した。605nmはHbRでより大きな吸収を示すと云われており、血流増加の以前に酸素消費が活発になりHbRが増加するという考えを支持する結果が得られている。

理所グループはネコを用いて光計測で計測される内因性信号の生理学的、方法論的な意味を研究した。MalonekとGrinvald(1996)が内因性信号の分光学的解析により、この信号が神経活動によって誘発される組織中の還元ヘモグロビンの増大を主に反映していることを示唆した。しかし、この計測法では満足のいく空間情報を得ることが原理的に困難であったため、内因性信号の各々の成分が示す機能構造までは明らかでなかった。また、内因性信号は個体による変動が大きいことが知られているが、この点の十分な検討もなされていない。そこで、複数の動物から内因性信号の各成分が示す時間変化ばかりでなく空間パターンとしての機能構造も明らかにすることにより内因性信号の起源を調べた。ここで本研究では、内因性信号の起源を明らかにするために内因性信号を異なる3つの波長で同時記録し、それらを分光学的に各成分に分解した。その結果、1)還元ヘモグロビンと光散乱強度変化ばかりでなく、血液量変化もまた機能構造をよく反映すること、2)内因性信号における光散乱強度変化の占める割合がかなり大きいことが明らかになった。

電総研グループは脳の神経活動ならびに代謝活動をリアルタイムで高速イメージングするための高速光計測法システムの開発とその応用研究を行った。共同研究期間中、以下の仕様を有する光計測装置を完成させた。1) CCD撮像素子を使用(1/3インチサイズの市販品 および 1.2インチサイズのカスタム品)、2) ショットノイズ S/N が 68dB 以上、3) 毎秒 300~1300 フレームの撮像レート、4) 1インチサイズ撮像素子面に均一光量(>95%)を確保する光学系、5) ウィンドウズベース GUI の計測ソフトウェア、を満足する光計測装置を開発した。開発した計測装置を用いて、(A)膜電位感受性色素由来の外因性光シグナル(一次信号)、(B)組織の酸素消費/局所血液量変化由来の内因性光シグナル(二次信号)の両方を高解像度、高感度、高 S/N で記録できることを示した。さらに、同一動物個体標本から一次信号による神経活動マップと二次信号による代謝活動マップを記録し、両者を定量的に比較解析する手法の確立を行った。本方法で記録し得る脳活動信号は、神経興奮そのもの(膜電位変化や膜電流変化)に由来する一次信号と、神経活動変化に連動した神経組織の代謝変動に由来する二次信号である。二次信号は fMRI や PET により非侵襲的に脳の広域空間から同時計測できる点で脳の活動部位の推定に有用であるが、一次信号との関係(例えば、時間経過、空間的広がり)は未だ明らかでない。高速光計測法では、撮像デバイスにより脳表面からのわずかな光量変化を捉えることで、一次信号と二次信号の両方を検出し、イメージングすることができる。しかしながら従来はこの一次信号と二次信号はその応答時間、測定光波長の違いから、異なる光計測システムを用いて別々に記録され、その直接の比較は困難であった。新しい光計測装置は、同一個体標本から、一次信号による神経活動マップと二次信号による代謝活動マップが同時に測定でき、両者を同一な時間軸と座標軸上で定量的に解析が可能であるため神経活動と脳血管の関係を計測するための強力な手法になると考える。

以上、光計測法の研究では、動物の脳表面で数 10 ミクロンの分解能で数 100 ミリ秒の速さで脳活動を計測できる方法であることを確認したが、その信号源は酸化ヘモグロビンや還元ヘモグロビンを直接表すわけではなく散乱線成分が大きく反映していることを示した。また、今回電総研グループが開発した神経活動を直接反映する一次信号と間接情報である二次信号を一度に測定可能な超高感度超高速光計測法は今後の二次信号の機序を理解するための強力な武器になる。

2 3 . レーサードブラー血流計測法 (LDF) を用いた微小循環的研究

機能的に高度に分化した脳では、局所的な神経細胞群が興奮と抑制を繰り返しながら密接に連絡している。神経細胞が蓄えることのできるエネルギー量は極めて僅かで

あるため、局所的な機能変化に追従できる微小循環調節機構は、脳機能の恒常性を維持する上で非常に重要である。しかし、その機序については不明な点が多く残されている。解明されるべき問題として、賦活時の微小循環調節に関与している血管部位はどこなのか、その血管部位はどのように調節され、どのような目的で血流は変化するのか、などを挙げるができる。レーザードプラー血流計 (Laser Doppler Flowmetry; LDF)と電気生理学的手法の同時測定は、これらの問題を解決するための有力な手段になる。

秋田脳研グループでは、毛細血管中を運動する赤血球によるドプラー反射を利用して深さ 0.5 ミリの約 1 ミリ領域の脳血流を実時間で測定できる LDF を使用しラットの体性感覚野における賦活刺激と血流変化の関係を測定した。下肢への微小電極刺激に対する局所脳血流の変化を PaCO₂ レベルや PaO₂ レベルを上昇させた時の LDF 信号の大きさと刺激開始から立ち上がりまでの遅延時間の変化として測定した。その結果、1) 体性感覚野賦活時の血流増加量 (賦活血流量) は誘発電位の発現頻度にほぼ相関し、賦活血流の立ち上がりは神経活動の大きさに関係なく刺激開始後約 0.5 秒である、2) 血中二酸化炭素分圧の変化によって安静時血流量 (ベースライン血流量) が変化した場合、賦活血流量はベースライン血流量に比例する、3) 高酸素分圧下では正常酸素分圧時と比較し賦活血流量が過剰に供給され、その立ち上がりが約 150 ミリ秒早くなる、4) 高酸素分圧時の賦活血流の過剰供給の一端に一酸化窒素 (NO) が関与している、5) 二酸化炭素分圧の違いによりもたらされる血流変化は赤血球濃度よりも赤血球速度の変化がより大きく関与するが、賦活時における両者の関与はほぼ同じである、ことが明らかとなった。また、組織への過剰な酸素供給、あるいは脳組織の高酸素分圧は賦活血流量の調節機構に何らかの影響を与えるが、それは NO 活性の上昇によってもたらされる可能性が考えられる。

以上の結果は、賦活血流量が代謝によって消費された酸素やそれ以外の物質の要求量に対して独立であることを示唆し、神経活動を反映する賦活血流量の変化は、単に神経活動に比例した血管反応を示していると考えられる。微小循環の調節血管としては、抵抗血管 (細動脈) に加え毛細血管の積極的な関与を示すデータが得られ、血流の二重調節機構の存在が示唆された。

2 - 4 . ベータカメラを使用した核医学的な研究

これまで述べた fMRI、LDF や光計測は脳賦活時と安静時の差分情報に基づく方法であり脳循環代謝の変化量を定量的に測定できる方法でない。これに対し放射性トレーサを使用する核医学的方法は基本的にトレーサ量を計測することにより脳循環代

謝の定量的関係を容易に測定できる方法である。

秋田脳研グループではこれを実現するためにベータカメラを導入して酸素 15 の放射能を直接測定し脳血流量と脳酸素消費量を直接測定する方法の開発を試みた。ベータカメラはプラスチックシンチレータに光ファイバーを介して位置弁別光電子増倍管を接続して酸素 15 から放射される陽電子線を直接計測し、酸素 15 放射能のダイナミック変化を測定する装置である。ただし、ベータカメラは断層撮影法ではないため単位体積あたりのトレーサ量を定量できない致命的な欠点を有する方法であるが、その反面、サンプリング時間か秒単位に計測可能で時間変化を元に生理学的パラメータを推定できる。実験は酸素 15 で標識した水および酸化ヘモグロビンを内頸動脈より数秒間で注入した時のラット脳表からの信号を計測した。しかし、この結果はこれまでの文献に基づく予測と異なり、両者の放射能のクリアランスが異なる結果を示したためにその理由の解明に時間を割き、本来の計画した酸素代謝の直接計測法に到る前に本共同研究期間が終了した。

本研究では予想した目的が果たせなかった反面、賦活脳血流のメカニズムを考察するのに重要となる脳内酸素濃度を測定する方法へ発展する可能性があり、この課題は秋田脳研の研究課題として引き継がれることになる。

3 . 共同研究事業のまとめ

5 年間の共同研究で脳活動に伴う二次信号の計測を通して脳血流が神経活動から時間的に 0.5 秒ほど遅れて立ち上がり空間的に 0.5 ミリ程度の広がり而变化してることなど、脳神経と脳血管との基本的な関係を明らかにすることが出来た。理研グループは 4 テスラ MRI 装置で人の眼優位性コラムを再現性よく描出し人でも fMRI の 1 ミリ以下の高分解能が得られることを実証し、さらに光計測信号では散乱線成分が大きく反映することを示した。電総研グループは一次信号と二次信号を同時に計測可能な超高速 (0.001 秒/フレーム) で超高感度 (S/N>68dB) な光計測システムを開発し微小循環動態の解析に有用であることを示した。秋田脳研グループは複数の電極挿入が可能な密封式開窓法光計測法を開発し脳賦活と内因性信号の関係の時空間関係を 0.1 秒と 50 ミクロンの精度で示し、LDF の研究で脳賦活に伴う脳血流が代謝栄養物質の需要と独立に決定されていることを示し、さらに fMRI の研究では BOLD (=脳血流量) と神経活動との定量的関係を明確に示した。

これらは脳がその活動に応じた領域に選択的に脳血流を供給する巧妙なシステム

があることを示唆している。これまでよくわからなかった脳賦活に連動した二次信号の時間的变化と空間的な広がりがそれぞれ1秒以下と1ミリ以下の精度で明らかになり、脳循環の根本的な調節因子である二酸化炭素や酸素濃度を揺らした生理学的揺動により神経と血管を連結する機構の概要が明らかになった。今回の共同研究は脳活動に伴う二次信号発生機序の一部を解明したに過ぎず、得られた研究成果は神経細胞から脳神経活動にいたるメディエータを探る今後の研究へ引き継がれてゆくことになる。さらに、ここで得られた研究成果は循環生理学的知識の集積にとどまらず、脳の高次機能の解明という21世紀に向けた自然科学の最重要なテーマのひとつを理解する上で有用なモデルに成ると考える。

科学技術振興事業団
秋田地区共同研究推進委員長
菅野巖