脳機能賦活に起因するマウス皮質組織血流のレーザー計測

草野 将史¹, 中山 遙¹, 正本 和人^{2,3}, 菅野 巖³, 岡田 英史¹

¹慶應義塾大学 理工学部 (〒223-8522 神奈川県横浜市港北区日吉3-14-1)

²電気情報通信大学 先端領域教育研究センター (〒182-8585 東京都調布市調布ヶ丘1-5-1)

³放射線医学総合研究所 分子イメージング研究センター (〒263-8555 千葉県稲毛区穴川4-9-1)

Laser Measurements of Blood Flow in Cortical Tissue of Mice Caused by Brain Activation

Masashi KUSANO,¹ Haruka NAKAYAMA,¹ Kazuto MASAMOTO,^{2,3} Iwao KANNO,³ and Eiji OKADA¹

¹Department of Electronics and Electrical Engineering, Keio University,
3-14-1 Hiyoshi, Kohoku-ku, Yokohama, Kanagawa 223-8522

²Center for Frontier Science and Technology, The University of Electro-Communications, 1-5-1 Chofugaoka, Chofu, Tokyo 182-8585

³Molecular Imaging Center, National Institute of Radiological Sciences, 4-9-1 Anagawa, Inage, Chiba 263-8555

(Received January 29, 2012)

We measured the cerebral blood flow (CBF) of mice by laser speckle flowgraphy (LSFG) and laser Doppler flowmetry (LDF). In LSFG, two parameters that indicate CBF, mean blur rate (MBR) and the reciprocal of correlation time (CT), are calculated from speckle patterns. MBR is calculated from 2×2 pixels in successive three frames, but CT is calculated from 7×7 pixels in one frame. The CBF change is caused by the brain activation evoked by whisker stimulation, and the MBR and CT time courses measured by LSFG were compared with the time course by LDF to validate the temporal resolution of LSFG. Both MBR and CT time courses were highly correlated with the LDF results. The spatial resolution of the MBR map is higher than that of the CT map and MBR is less influenced by the noise.

Key Words: Cerebral blood flow, Laser speckle flowgraphy, Laser Doppler flowmetry

1. はじめに

脳で生じる神経活動は、運動、感覚、言語などの機能に対応して局在しており、脳が活動している部位を測定することは脳科学の研究を行う上で重要な課題となっている。非侵襲的に脳活動を計測する技術には、脳波、脳磁図といった脳神経活動と直接関係する信号を検出するものと、近赤外光イメージング法や機能的磁気共鳴イメージング法などの脳神経活動に誘発された組織血流量を捉えるものがある。脳神経活動による血流変化のメカニズムには解明されていない点も多く、小動物を用いた基礎研究が行われている¹⁾。光学的手法による非接触計測技術は、神経血管カップリングに関する研究に大きく貢献している。例えば、神経活動の計測は、膜電位感受性色素を用いた光学計測法が開発されたことにより、電極を刺入せずに脳活動の空間的な分布を計測することが可能になった²⁾。また、血流についてはレーザードップラー法による点測定が行われていたが³⁾、近年は、スキャン型のレーザードップラー血流計⁴⁾やレーザー-speckle法によって空間的な血流分布計測が行われるようになってきている^{5,6)}。とくに、レーザー-speckle法は、レーザー光源と撮像素子で測定系が構成できるため、小動物の脳機能計測への応用が進んでいる。

レーザーを用いた組織血流計測に共通の問題点として、流速評価値が組織散乱に依存する係数を含むため、絶対流速値の測定ができず相対速度しか求められないということがある。また、測定の妥当性に対しても対象組織毎に検証を行うことが望ましい。このことから、レーザー-speckle法による脳血流の計測値を、従来からの測定例が多いレーザードップラー法で測定した結果と比較することで、その妥当性を検証する研究が行われている⁷⁾。レーザー-speckle法には、複数の流速評価値が存在し、測定対象の散乱特性などとの関係が異なっている。そのため、妥当性の検証についても流速評価値毎に行う必要がある。

本研究では、レーザー-speckle法による脳血流計測において、流速評価値としてMean Blur Rate (MBR) 値^{8,9)}を用いることの妥当性を検証することを目的として、同一個体のマウスの体性感覚野における神経活動による脳血流変化を、レーザー-speckle法とレーザードップラー法によって計測する。レーザー-speckle法による計測では、MBR値に加えて、先行研究においてレーザードップラー法との相関を比較することで妥当性が示されている相関時間に基づく流速評価値⁵⁻⁷⁾による解析も行い、MBR値と比較、検討する。

2. レーザースペックル法による血流測定の実理

2.1 レーザースペックル法

生体組織などの粗面にレーザーを照射すると、結像面に粗面からの散乱光がランダムな位相で干渉することによる斑点模様(スペックルパターン)が観測される。組織内の血流によって散乱体である血球が移動すると、干渉の条件が変化するためスペックルパターンも変化する。スペックルパターンを画像として記録し、スペックルパターンの変化を解析することで、組織内血流の空間分布を計測することが可能となる。とくに近年は、露光時間内にスペックルパターンが変化することで生じるぶれによるスペックルパターンのコントラスト低下を解析し、血流を求める方法が主として用いられるようになってきている。

2.2 スペックル法の流速評価値

血流速を V 、スペックルパターンの輝度の平均値を $\langle I \rangle$ 、輝度値の空間的な変化の標準偏差を σ とすると、血流速とスペックルパターンのコントラストとの間には以下の関係が成立している⁵⁻⁹⁾。

$$V = A \left(\frac{\langle I \rangle}{\sigma} \right)^2 \quad (1)$$

ここで、 A は撮像時の露光時間、画素サイズ、スペックルサイズ、対象組織の散乱特性などに依存する係数であるが、生体組織のような多重散乱系において係数 A を求めることは困難である。そのため、レーザースペックル法では、スペックルパターンから流速を求めるいくつかの手法が提案されている。本研究では、これまでに提案されているスペックルパターンから求める流速評価値として、網膜血流や皮膚血流の計測に利用されているMBR値と、小動物の脳血流計測に関する先行研究がある相関時間を利用したCT値を用いることとした。

MBR値は、対象領域の画素値の平均を分子、偏差を分母とする評価値であり^{8,9)}、本研究では、連続する3フレームの画像の 2×2 画素の領域を対象領域とし、時空間的に隣接している画素値の和の総和を分子、差の絶対値の総和を分母としてMBR値のマップを作成した。

CT値は、個々のスペックルの輝度の時間変化に対する相関時間 τ_c が流速と逆比例の関係にあることを用いた評価値である。スペックルのコントラストと相関時間の関係は、撮像素子の露光時間を T とすると、次式で与えられる⁵⁻⁷⁾。

$$\left(\frac{\sigma_s}{\langle I \rangle} \right)^2 = \frac{\tau_c}{2T} \left\{ 1 - \exp \left(-2T / \tau_c \right) \right\} \quad (2)$$

本研究では、式(2)の関係を示すルックアップテーブルを作成し、1フレームの 7×7 画素の領域を対象領域として求めた画素値の平均値 $\langle I \rangle$ と標準偏差 σ_s から、ルックアップテーブルを用いて相関時間 τ_c を求め、その逆数をCT値とした。血流速とCT値の間にも、対象組織の散乱に依存する係数が存在するため、絶対的な血流速を得る

ことができない。つまり、スペックル法によって求められるのは、MBR値、CT値とも相対的な血流速であり、このことはレーザードップラー法で求めた血流速についても同様である。

3. 実験方法

3.1 計測対象およびシステム

本研究におけるマウスの脳血流計測は、放射線医学総合研究所の研究倫理審査委員会の承認のもとに実施された。C57BL/6Jマウス($n=4$)の体性感覚野周辺の頭蓋骨を麻酔下において除去し、ガラスのクラニアルウインドウを装着することで、脳の皮質組織を直接観測できるようにした。脳血流計測は、マウスが回復した後に覚醒下で行った。クラニアルウインドウ部分を定位固定装置に取り付け、実体顕微鏡下で体性感覚野を中心とする皮質組織を観測した。マウスは覚醒しているため運動を行うこともあるが、浮遊したボールの上にマウスを載せた状態で測定を行うことで、固定された頭部に負荷がかからないようになっている¹⁰⁾。

レーザースペックル法による計測では、皮質組織を波長780 nmの半導体レーザーで照射し、実体顕微鏡に取り付けたCCDカメラ(400×400画素、30フレーム/秒)に結像させることで、皮質組織からの散乱光によるスペックルパターンを連続的に取得した。レーザー光は斜め方向から入射し、さらに偏光板を用いることで、クラニアルウインドウのガラス表面からの鏡面反射が測定に影響を及ぼさないようにした。スペックル画像から、流速評価値であるMBR値およびCT値を算出した。MBRの算出は、連続する3フレームの画像の 2×2 画素の領域を対象に行った。CT値は、1フレームの画像の 7×7 画素の領域を対象に算出した。

レーザードップラー法による計測は、レーザードップラー血流計(FLO-C1, オメガウェア)によって行った。レーザードップラー血流計の使用波長は780 nm、プローブは直径1 mmのニードルタイプのものを使用した。プローブ位置は、レーザースペックル法による測定で最も大きな血流変化が観測された部位が測定領域の中心になるように決定した。測定領域のクラニアルウインドウ上にプローブを設置してレーザーを照射・検出し、ガラス表面からの鏡面反射光が信号に与える影響が最小になる角度で固定した。

3.2 計測手順

マウスの右側のヒゲにパルス状の空気刺激(69 kPa)を与えることで体性感覚野を賦活させ、それに伴う血流速の変化をレーザースペックル法によって計測した。測定開始時は刺激を与えずに安静時の血流を5秒間測定し、その後2秒間あるいは20秒間の刺激を与えた。刺激パルスの周波数は、2, 5, 10 Hzとし、各周波数について15セットの測定を行った。レーザースペックル法による計測の後、同一個体のマウスを対象に同一の刺激条件に対する脳血流変化をレーザードップラー法によって計測し

Fig. 1 Calculations of cerebral flow map by laser speckle flowgraphy. (a) mean blur rate (MBR). (b) speckle contrast (SC).

た。クラニアルウインドウ上に装着したプローブの位置は、レーザースペックル法による計測で最も大きな血流変化が観測された部位が測定領域の中央になるように設定した。

4. 結果と考察

4.1 スペックル法による脳血流マップ

Fig. 2 (a) は、クラニアルウインドウを介してハロゲンランプ照明で観測したマウス皮質組織の画像を示している。円形のクラニアルウインドウの開口部分に皮質組織と表面の微小血管が観察されている。Fig. 2 (b) は、レーザーを照射したときの同一部位の画像である。組織全体にスペックルパターンが生じ、微小血管の位置などは不明瞭になっている。刺激開始前のベースライン計測時のスペックルパターンから流速評価値であるMBR値とCT値の分布を求めた脳血流マップをFig. 2 (c1), (c2) にそれぞれ示す。いずれの脳血流マップにおいても、Fig. 2 (a) の血管領域に対応する部位で速い血流が観測されていることが分かる。MBR値が 2×2 画素の領域を対象に算出しているのに対して、CT値は 7×7 画素の領域を対象としているため、CT値で求めた脳血流マップの方が空間分解能は低くなる。そのため、CT値による脳血流マップの血管領域の方が広がって観測されている。ラットのヒゲに周波数10 Hzの空気圧刺激を与え、最も大きな血流変化が観測された時刻とベースライン計測時の脳血流マップの差分を求め、ベースライン計測時の値で正規化した結果をFig. 2(d1), (d2) に示す。ヒゲ刺激によって、血流が増加した領域が白く表示されており、画像右側の破線で囲われた領域を中心に血流の増加がみられることから、この領域がヒゲに対応した体性感覚野であると考えられる。Fig. 2 (a) のハロゲンランプ照明で観測した画像では、毛細血管レベルの細い血管はコントラストが低く観測できていない。一方、スペックル法では、毛細血管レベルの血管内を移動する血球も干渉条件の変化に寄与することになる。しかし、細い血管内の血流は太い血管に比べて遅いため、Fig. 2 (c1),

Fig. 2 Cerebral blood flow measurements by laser speckle flowgraphy. (a) Cortical tissue of a mouse observed through a cranial window. (b) Raw speckle image. (c1) Distribution of MBR values calculated from raw speckle images. (c2) Distribution of speckle contrast values calculated from a raw speckle image. (d1) Distribution of the change in MBR values from the baseline. (d2) Distribution of the change in SC values from the baseline. The scale bar in each figure indicates 1 mm.

(c2) の血流マップでは、細い血管中の血流は明瞭には観測されていない。一方、血流変化を求めたFig. 2(d1), (d2) では、Fig. 2 (a) において血管が観測されていない領域においても血流の増加が認められ、ヒゲ刺激によって生じた毛細血管レベルの細い血管における血流変化がスペックル法によって捉えられていることが分かる。

4.2 脳活動による脳血流変化

マウスの脳活動に伴う脳血流変化をレーザースペックル法で測定する場合における時間分解能の妥当性を検証するため、レーザースペックル法とレーザードップラー法で測定した脳血流の時間変化波形を比較した。レーザースペックル法ではFig. 2 (d1), (d2) に破線で示したような、最も大きな血流変化が観測された位置を中心とした 80×80 画素の正方領域におけるMBR値またはCT値の平均を、その時刻における血流変化値とした。レーザードップラー血流計のプローブの影響によって、レーザースペックル法とレーザードップラー法による脳血流測定を同時に行うことができない。そこで、4頭のマウ

スに対して行った脳血流計測の結果を加算平均した結果を比較することとした。Fig. 3(a), (b1), (b2)は、ヒゲに周波数2~10 Hzの空気圧刺激を2秒間与えたときの脳血流の時間変化を、レーザードップラー法、MBR値とCT値を用いたレーザースペckル法で計測した結果を

Fig. 3 Temporal change in blood flow in the cortical tissue of a mouse evoked by whisker stimulation measured by (a) LDF and LSFG ((b1) MBR and (b2) SC). The duration of the stimulation is 2 s.

それぞれ示している。レーザースペckル法、レーザードップラー法のいずれも絶対量として血流速を求めることはできないため、それぞれの流速評価値は、ベースライン計測時の値と10 Hzの空気圧刺激を行ったときの最大値で正規化してある。いずれの流速評価値も、刺激開始(時刻0)直後に血流が増加し、刺激終了後にベースラインに戻っている。また、ヒゲに与える空気圧の周波数を高くすることで、脳血流変化のピーク値が大きくなることに関しても同一の傾向が見られる。スペckル法によって求めた2つの流速評価値を比較すると、3フレームの2×2画素から求めたMBR値は、1フレームの7×7画素から求めたCT値に比べて計算に用いる総画素数は少ないが、ノイズの少ない血流速波形が得られていることが分かる。Fig. 3 (a)に示したレーザードップラー法による脳血流変化に対して、レーザースペckル法によって計測したMBR値(Fig. 3 (b1))とCT値(Fig. 3 (b2))の変化の相関を求めた結果をFig. 4 (a), (b)にそれぞれ示す。空気圧刺激の周波数が2, 5, 10 Hzのときの血流速波形の相関係数は、MBR値が0.89, 0.92, 0.96, CT値が0.85, 0.93, 0.96となった。レーザースペckル法で求めた脳

Fig. 4 Correlation of change in blood flow measured by LDF and LSFG ((a) MBR and (b) SC). The duration of the stimulation is 2 s.

血流変化は、MBR値、CT値のいずれを用いた場合でもレーザードップラー法で計測した結果と高い相関が認められる。

空気圧の周波数10 Hzでヒゲ刺激を20秒間行ったときの血流変化をレーザースペckル法とレーザードップラー法で計測した結果をFig. 5に示す。刺激開始直後は、2秒間の刺激を行った場合とほぼ同様に脳血流が増加している。刺激が継続した場合、刺激開始後約3秒過ぎから脳血流が一旦減小し、刺激後約8秒過ぎから再び増大する傾向が見られた。この傾向は、レーザードップラー法、レーザースペckル法のいずれの計測結果でも観測された。また、2 Hz、5 Hzの空気圧刺激をした場合も、時間変化の傾向は同一で、血流変化の大きさが刺激周波数とともに増大した。ヒゲ刺激を20秒間行ったときの血流変化をレーザードップラー法で計測した結果とレーザースペckル法で計測したMBR値の変化の相関を求めた結果をFig. 6に示す。空気圧刺激の周波数が2, 5, 10 Hzのときの相関係数は0.95, 0.96, 0.98で、レーザ-

Fig. 5 Temporal change in blood flow in the cortical tissue of a mouse evoked by whisker stimulation measured by LDF and LSFG. The duration of the stimulation is 20 s.

Fig. 6 Correlation of change in blood flow measured by LDF and LSFG (MBR). The duration of the stimulation is 20 s.

スペckル法で求めたMBR値の変化は、レーザードップラー法で測定した脳血流変化と高い相関が認められた。レーザースペckル法で求めたCT値についても、同様の結果が得られた。

空気圧刺激を10 Hzで2秒間行ったときに得られたスペckルパターンから、計算に用いるフレーム数を3~24に変化させて求めたMBR値の時間変化波形をFig. 7に示す。スペckル画像3フレームから求めたMBR値の時間変化にはわずかにノイズが見られるが、8フレームから求めた波形ではノイズは減少している。また、24フレームからMBR値を求めた場合でも、刺激直後に波形の傾きが急峻に変化する部分を除いては平滑化の影響はほとんど見られない。ヒト網膜の血流計測では、8フレーム程度のスペckル画像を用いれば、MBR値によってノイズの影響が少なく血流の経時変化を追跡可能であったと報告されており⁸⁾。マウスの脳血流計測においても、ほぼ同様の結果が得られている。

5. まとめ

レーザースペckル法による脳血流計測の流速評価値としてMean Blur Rate(MBR)値を用いることの妥当性を検証するため、同一個体のマウスの体性感覚野における神経活動による脳血流変化を、レーザースペckル法とレーザードップラー法によって計測した。レーザースペckル法で測定した脳血流変化は、MBR値、CT値のいずれを用いた場合でも、レーザードップラー法による血流結果と高い相関が得られた。1フレームのスペckルパターンの空間分布から算出されるCT値と比較して、複数フレームのスペckルパターンの時空間分布から算出したMBR値は、よりノイズの影響が少ない結果が得られ、複数フレームを用いることが時間分解能に及ぼす影響もみられなかった。これらの結果から、MBR値を用いたスペckル法を小動物の脳血流計測に適用することは妥当かつ有効であると考えられる。

Fig. 7 Influence of number of frames for calculation of cerebral blood flow on the result of the temporal change in the cerebral blood flow.

謝 辞

本研究を実施するにあたり、マウスの脳血流計測に対してご協力いただいた放射線医学総合研究所分子イメージング研究センター田桑 弘之研究員、小嶋 隆行客員研究員、レーザースペックルフローグラフィのシステム構築にあたって多くのご指導を頂いた九州工業大学藤居 仁名誉教授に謝意を表します。

参考文献

- 1) H. Kameyama, K. Masamoto, Y. Imaizumi, T. Omura, T. Katura, A. Maki, and K. Tanishita: *Brain Research* **1244** (2008) 82.
- 2) I. Ferezou, S. Bolea, and C. C. H. Petersen: *Neuron* **50** (2006) 617.
- 3) J. A. Detre, B. M. Ances, K. Takahashi, and J. H. Greenberg: *Brain Research* **796** (1998) 91.
- 4) B. M. Ances, J. H. Greenberg, and J. A. Detre: *NeuroImage* **10** (1999) 716.
- 5) A. K. Dunn, H. Bolay, M. A. Moskowitz, and D. A. Boas: *J. Cerebral Blood Flow and Metabolism* **21** (2001) 195.
- 6) J. D. Briers and S. Webster: *J. Biomed. Opt.* **1** (1996) 174.
- 7) G. Royle, C. Leithner, H. Sellien, J. P. Müller, D. Megow, N. Offenhauser, J. Steinbrink, M. Kohl-Bareis, U. Dirnagl, and U. Lindauer: *Brain Research* **1121** (2006) 95.
- 8) 小西 直樹, 戸簾 由紀子, 恒松 裕朋, 藤居 仁: *光学* **31** (2001) 39.
- 9) N. Konishi, Y. Tokimoto, K. Kohra, and H. Fujii: *Optical Review* **9** (2002) 163.
- 10) H. Takuwa, J. Autio, H. Nakayama, T. Matsuura, T. Obata, E. Okada, K. Masamoto, and I. Kanno: *Brain Research* **1369** (2011) 103.