

機能的光コヒーレンストモグラフィーによる 脳機能計測

ラジャゴパラン ウママヘスワリ・谷藤 学

Functional Optical Coherence Tomography for Imaging Brain Functions

Uma Maheswari RAJAGOPALAN and Manabu TANIFUJI

There are studies of brain function by mapping the distribution of functional clusters of neurons and that of the neural activity patterns elicited by sensory stimulus. Imaging brain functions is one such promising approach. In this paper, we give (1) a brief review of one such imaging technique, optical intrinsic signal imaging and (2) introduce the impact of this technique in the role of understanding the problem of object representation in the visual system. In our group, we succeeded in expanding this basically 2D functional imaging technique to 3D. In the second part of this paper, we describe about the 3D functional imaging technique, i.e., functional optical coherence tomography (fOCT).

Key words: functional brain imaging, optical intrinsic signal imaging, functional optical coherence tomography, light scattering, visual cortex

1. 脳のカラム構造

脳には神経細胞が約 10^{10} 個あるが、一つひとつの細胞がまったく異なる役割を担っているわけではない。隣接する神経細胞の反応の仕方は一般によく類似していて、反応性の特に類似した細胞が小集団をつくっている。例えば、大脳表面をシート状に覆っている大脳皮質では、似た反応性をもつ 10^4 – 10^5 個の細胞がカラムとよばれる小集団を形成している。カラムは、多くの場合、脳表面に沿って直径 500 μm 、厚さ方向に高さ約 2 mm の柱状構造をしている¹⁾。このようなカラムの空間的な配列から、脳機能を考える手がかりが得られる。

2. 脳活動による神経組織の光特性変化と内因性信号のイメージング

機能の空間構造を実験的にとらえる方法（機能イメージング法）は近年めざましく進歩した。そのひとつが、光を使った内因性信号のイメージング法（OISI: optical intrinsic

signal imaging）である（図 1）^{2,3)}。内因性信号とは神経細胞の活動に伴って引き起こされる組織の光特性の変化のことで、おもに 3 つの成分がある。第 1 は、毛細血管に含まれるヘモグロビンの酸化還元に伴う光吸収変化である。血液中のヘモグロビンは、酸化ヘモグロビンとして酸素を神経組織に運び、酸素を放出して還元ヘモグロビンに変化する。神経細胞が活動すると酸素を活動前と比べてより多く消費するので、活動神経組織の還元ヘモグロビンの濃度が他の部位に比べて高くなる⁴⁾。酸化ヘモグロビンと還元ヘモグロビンの吸収が大きく異なる波長（例えば 605 nm）を選べば、この変化を光の吸収変化としてとらえることができる。第 2 の成分は、神経組織の血液量の変化である⁵⁾。神経活動が起こると、その部位に対する血液の流入が増加する。還元ヘモグロビンと酸化ヘモグロビンの等吸収点に当たる波長で得られる活動依存性の吸収変化は、この成分をおもに反映していると考えられる。第 3 の成分は、組織の構造変化による光散乱の変化である⁶⁾。神経細胞の

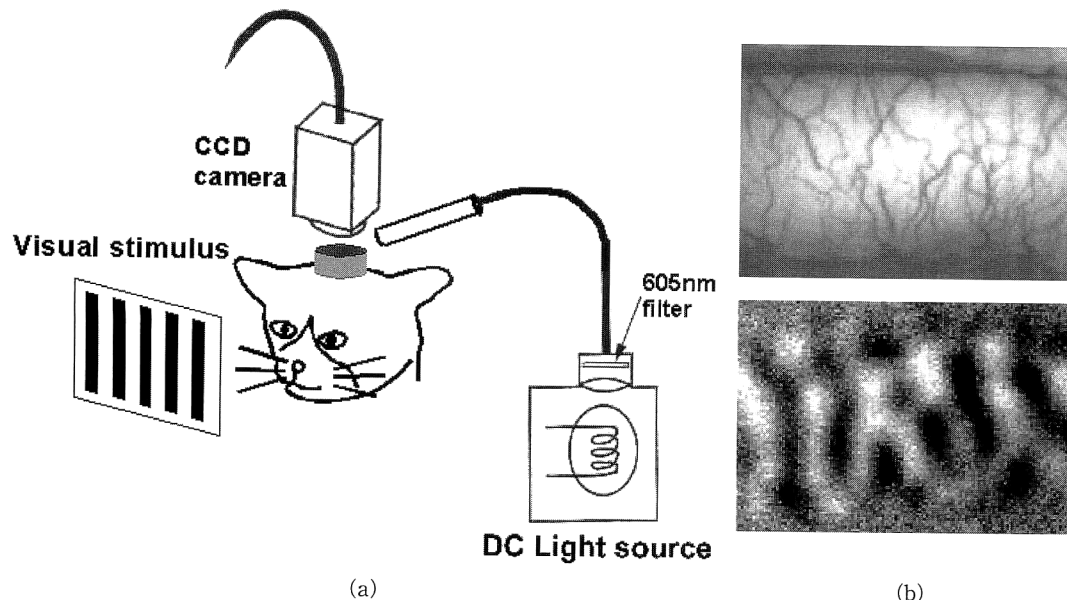


図1 内因性信号のイメージング。露出した脳表面を光(605 nm)で照明し、反射光による脳表面の映像を CCD カメラでとらえる (a)。神経活動を引き起こすような刺激を外部から与えたときに起こる映像の明るさの変化から、神経活動の空間パターンを得ることができる。例えば、特定の視覚刺激(さまざまな角度の格子パターン)に対して応答するカラムの空間パターンは、動物の眼前にその刺激を呈示したときに起こる脳表面の明るさの変化から得られる (b)。上図が露出した脳表面の映像で、下図がカラムパターンを差分画像(45°とそれと直交する角度の格子パターンの刺激を与えているときの映像の差)として示したもの。暗い部分は45°の方位をもった格子に反応するカラムを示している(大脳皮質の第一次視覚野)。

活動によって起こる細胞外のイオン濃度変化は、周辺のグリア細胞に浸透圧に依存した一過性の体積変化を引き起こす。また、血液量の変化に伴って毛細血管も拡張する。これらの構造変化は、検出可能な光散乱強度変化を引き起こす。

内因性信号のイメージングにおいて一般的に用いられているのは、図1(a)に示すように、周辺から照明された脳表面の映像の明るさの変化を CCD カメラによってイメージングする方法である。一般に、この記録法では、内因性信号の起源によらず、神経活動部位からの反射光は減少する。内因性信号による反射光の減少と微小電極によって記録した神経細胞の電気活動を比較すると、その間にはよい相関がある⁷⁾。図1に、内因性信号によって得られたカラム構造の典型的な例を示した(図1(b))。

3. カラム構造のイメージングから脳機能を探る

脳機能を考えるうえで、機能構造のイメージングからどのような手がかりが得られるか、高次視覚連合野(TE野)からのイメージングを例に示そう⁷⁾。霊長類の大脳皮質には、視覚情報処理に関して2つの経路がある。目にする物体像が視野のどこにあるかに関する情報を処理する経路(‘where pathway’)と、その物体が何であるかに関する情報を処理する経路(‘what pathway’)である⁸⁾。TE野は後

者の最終段にあつて、私たちが物体像を知覚できるのは、目に映った物体像に対応した神経活動がTE野に起こるからである。図2に示すのは、物体像をサルの眼前に呈示したときに、TE野に起こる神経活動のパターンを示している⁷⁾。複雑な物体像(刺激1)を見せると、カラムに相当する直径約0.5 mmの多数のスポットが散在して出現する(赤の輪郭線で示す活動スポット)。複雑な物体像で出現するスポットの分布パターンと、もとの物体像を系統的に単純化した視覚刺激により出現するスポットの分布パターンを比較した。その結果を図2aに示す。図では、もとの物体像からいくつかの図形特徴を除いた単純化刺激は、もとの刺激が活性化させたスポットの一部のスポットのみを活動させた。この結果は、個々のスポットが物体のイメージそのものではなく、そこに含まれる図形特徴を表現しており、物体像全体はそれらの組み合わせで表現されていることを示している。

一方、図2bの例では、単純化刺激3によって、もとの刺激にないスポットCが出現した。これは図2aの結果と一見矛盾するようであるが、それぞれのスポットに電極を刺入して神経細胞の性質を調べた結果、以下のような仕組みがあることがわかった。スポットA、BおよびDの細胞は、それぞれ「消火器の取っ手のように中心から複数の突起が突き出した形」、「ホースのように湾曲した線分」、「長

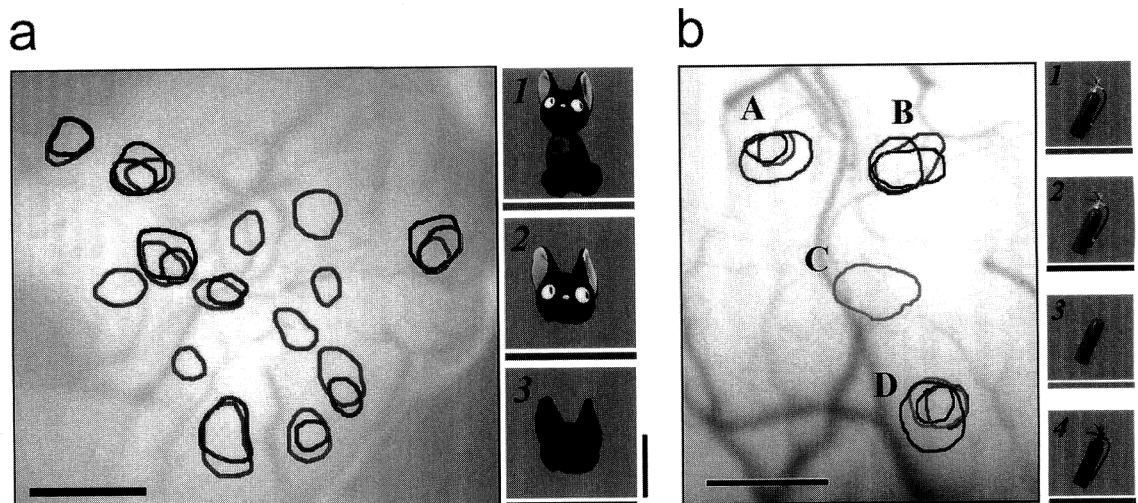


図2 視覚連合野 TE 野の神経活動の空間パターン。a, b のそれぞれについて用いた視覚刺激が右側に示されている。それぞれの視覚刺激によって活動を示したスポットは、それぞれの視覚刺激に付した下線と同じ色の輪郭線で示してある。輪郭線は内因性信号のピークから2分の1のレベルで引き、脳表面の映像に重ね書きしてある(文献8)より引用。(カラー図表参照)

方形や楕円のように長く伸びた形」に対して最も強く応答する。これに対して、スポット C は長方形には応答するが、丸みを帯びた楕円には応答しなかった。これは、細長い形によって活動を上昇させる入力(興奮性入力)と、丸い形によって活動を抑制する入力(抑制性入力)の両方をスポット C が受けているからであった。消火器の「胴体」が呈示されたときだけに活動がみられるのは、オリジナルの消火器が(おそらく脇についたホースの存在によって)全体に丸みを帯びていたからである。これらの結果から、複雑な物体像は複数の図形特徴カラムの組み合わせで表現されていることが示された。さらに、カラムの組み合わせには、視覚刺激によって活動する図形特徴カラムの足し合わせだけでなく、神経細胞の相互作用によって活動しないカラムも含めた組み合わせが用いられていることがわかった。図2bの例では、スポット C が活動を示さないことから、消火器が全体として丸みを帯びていることが表現されていると考えることができる。このように見かけ上活動していないカラムも組み合わせに含めて考えることによって、可能な組み合わせの数が飛躍的に増大する。感覚情報の脳内表現は、内因性信号のイメージングによってはじめて明らかになる。

4. 脳表面二次元イメージングから三次元イメージングへ—機能的 OCT への拡張—

内因性信号のイメージング法は、このように情報の脳内表現を研究する有力な手段を提供するが、計測された反射光強度が深さ方面で積分されているため、特定の深さから

の情報を分離するのは不可能である。先に述べたようにカラムの中の細胞は似た反応をするが、その反応性はまったく同一ではない¹⁾。例えば、第一次視覚野は6つの層からなり、層によってその特性は少しずつ異なっている。1層には神経細胞が少なく、2~3層の神経細胞は特定の傾きの格子パターンに反応するが、4層の細胞の格子の傾きに対する選択性は他の層に比べてそれほど強くない。内因性信号のイメージングでは、これらの層からの平均された情報しか得られない。さらに、可視光を使うため、光が届く深さが数百 μm に制限される。

筆者らは、従来の内因性信号のイメージングの欠点の解決策として機能的な光コヒーレンス・トモグラフィ技術(functional OCT)を提案し、神経活動に伴う OCT 信号変化を検出することに成功した^{9,10)}。

5. fOCT の光学系

図3に実験系を示す。単一モード光ファイバーを利用したマツハ・ツェンダー型干渉計である。低コヒーレント光源(AFC, Canada)の中心波長(λ_0)は1.31 μm 、半値幅($\Delta\lambda$)は50 nm である。空気中でのコヒーレンス長は34 μm となり、本システムの深さ分解能はこれによって決まる。光源からの光を19:1のカプラーで参照光と物体光の2つの光路に分ける。これらの光は音響光学素子(AOM1, AOM2)により、光周波数がそれぞれ116 MHz と 116.25 MHz だけシフトされる。偏光コントローラー(PC1-PC2)は、音響光学素子に入射する光の偏光状態を調整するために用いられる。参照ミラー(M)はモーターステージに固

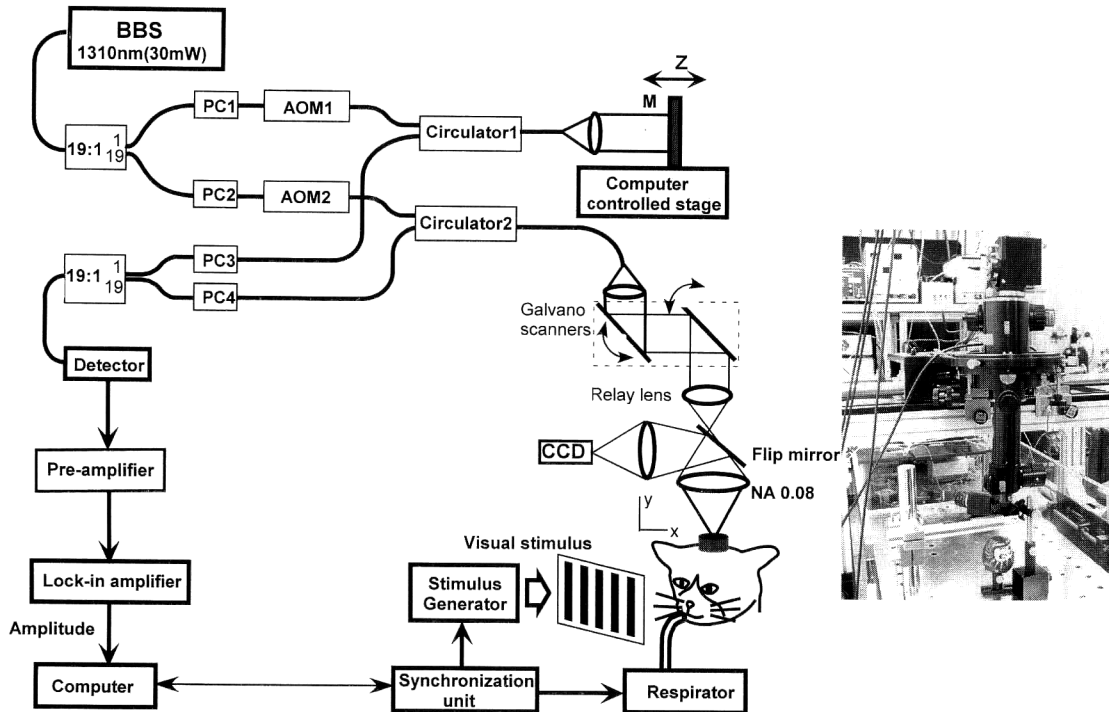


図3 ネコの第一視野からの機能 OCT 信号計測用マッハ・ツェンダーヘテロダイン干渉計の実験系とプローブ部分の写真。ここで、BBS：広帯域光源 broad band source, AOM：音響光学変調器 acousto optic modulator, PC：偏光コントローラー polarization controller, M：ミラー mirror, O：対物レンズ objective lens である。

定されており、移動を計算機により制御する。移動速度は 2 mm/s である。

光検出器 (detector) により、ビート周波数 (250 kHz) の干渉信号を検出する。干渉信号は、物体光と参照光の光路差がコヒーレンス長内のときにのみ得られる。したがって、参照ミラーを移動させ参照面までの光路長を変えることにより、物体内部の任意の位置からの反射光を干渉信号として検出することができる。参照光と物体光はそれぞれ、参照ミラーと大脳皮質を照明するのに用いる。大脳皮質の照明に用いるプローブユニットには、ビームを脳表面に対して平行に走査するため、ガルバノミラーが用いられている。対物レンズは NA 0.08 であり、ビーム直径は 19 μm である。脳表面と参照ミラーからの反射光を再び 19:1 のカプラーにより再結合させる。偏光コントローラー (PC3-PC4) は、干渉ビート信号出力を最大に調整するのに用いられる。250 kHz にロックされた信号が、ロックインアンプによりヘテロダイン検波を行う。得られた振幅信号は、12 ビット A/D 変換器を通して計算機に取り込まれる。X 軸ガルバノミラーと参照ミラーを走査しながら脳内部からの反射率の x - z の分布を測定する。画像の走査範囲は 1.5 mm \times 1 mm で 150 \times 100 pixels である。本システムの帯域幅は 100 dB である。動物側のプローブユニット (inset 部分) には CCD カメラが設置されており、照射ビ

ームの脳表面上での位置がわかるようにした。

6. 生物学実験操作手順

実験では、麻酔下のネコの第一次視野から記録を行った。視覚刺激をネコの眼前に呈示することによって、視野の神経活動を引き起こした。刺激セットはコントロール (刺激なし)、横 (0°) および、縦 (90°)、 45° 、 135° 方向の格子パターンからなり、これらの視覚刺激をランダムに呈示した。それぞれの部位で、呈示される格子パターンがその部位の細胞群の最適刺激角度と一致するときに、その部位の光学的信号に変化が現れる。

実験は、5つの視覚刺激からなる刺激セットを全部で 40 回繰り返した。1つの試行は 8 秒間からなり、その間にガルバノと参照ミラーを 16 回走査し、OCT 画像を記録する。視覚刺激は記録 (試行) 開始の 2 秒後から始まり、2 秒間呈示される。試行と試行の間隔は 5 秒である。したがって、1つの刺激に対して 640 回 (40 \times 16) の走査が行われる。すべてのデータ取り込みは呼吸と心拍に同期させて行った。

7. fOCT 実験と結果

参照ミラーを走査することによって深さ方向の反射強度分布と、それに加えて、ガルバノミラーにより脳表面上の

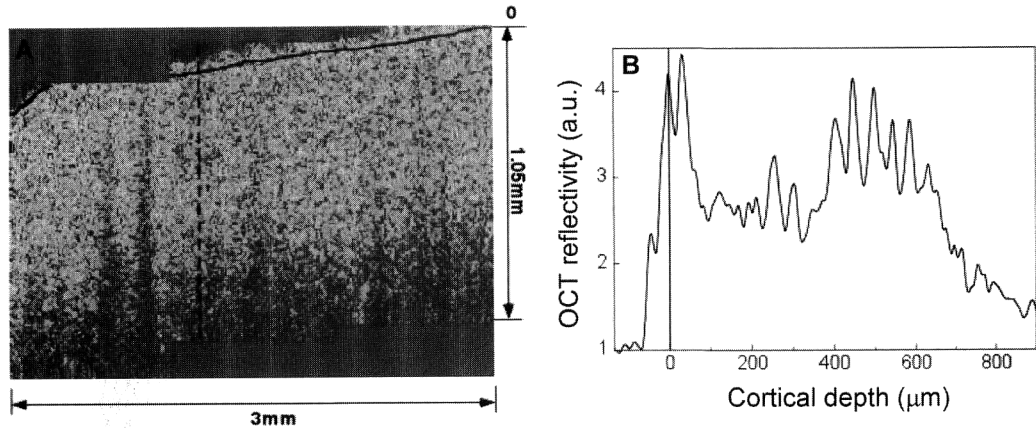


図4 OCTで得られた $x-d$ 反射率分布 (A) と、黒波線部での反射率の深さ分布 (B)。(カラー口絵参照)

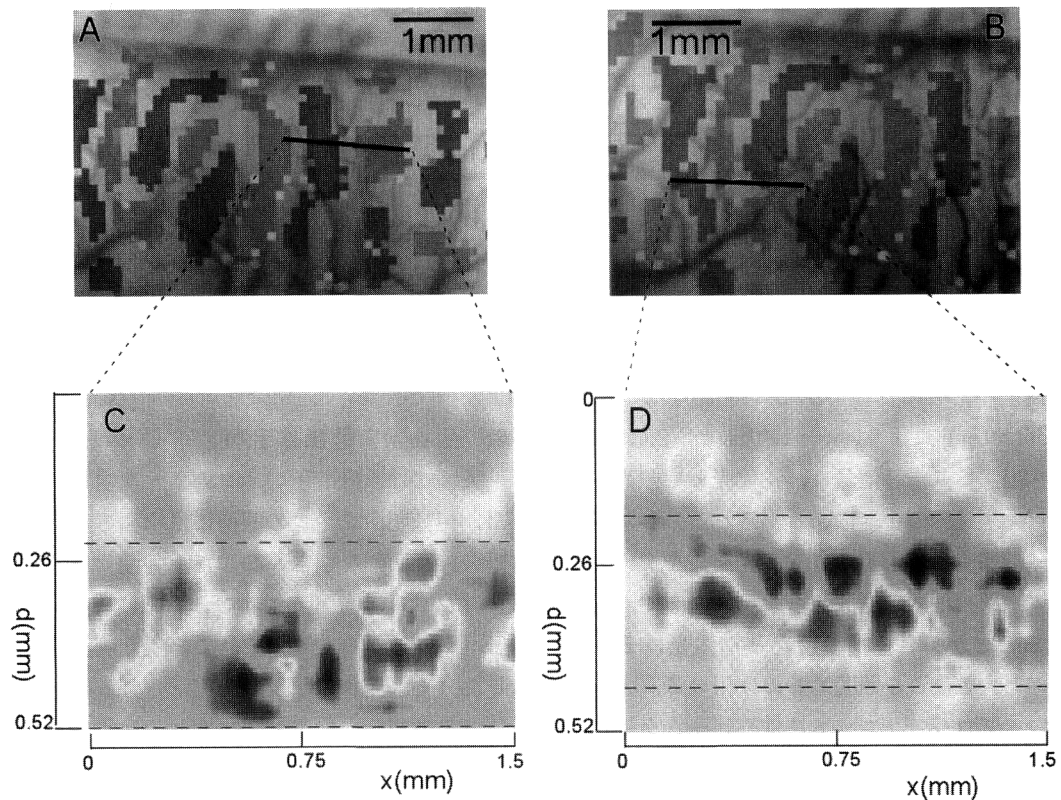


図5 内因性信号と機能OCTの比較. A, Bは内因性信号が像であり, 黒線部で機能OCT ($x-d$) 観測を行った結果をC, Dに示す. 赤と青で示された領域はそれぞれ横縞と縦縞に強く反応する部分である。(カラー口絵参照)

光の照射位置を変えることによって, $x-d$ のOCT反射強度分布を得ることができる(図4A). ここで, d は皮質深さであり, 参照ミラーの移動量を z , 皮質屈折率を n とすると, $d=z/n$ である. ここで $n=1.4$ を仮定した. 反射光強度分布(図4B)をみると, ゆっくりした成分上に多くの小さなピークをもつ変調成分があることがわかる. これらは実際に存在する内部の構造によるもので, 層内の異なる細胞や毛細血管などによる屈折率分布を反映していると思われる.

OCTによる機能イメージングを行う前に, 図1と同様に内因性信号のイメージングを行った. 内因性信号のイメージングから得られた, 脳表面上での方位選択性のカラムパターンを図5A, Bに示す. 赤および青の領域はそれぞれ, 0° (横), 90° (縦)の格子パターンに対して統計的に有意に反応する領域である. 次に, 黒い線で示された部位からOCTによる機能計測を行った.

計測された光反射率について, 刺激前後での $x-d$ 走査結果の比率を格子パターンとコントロール(または刺激なし

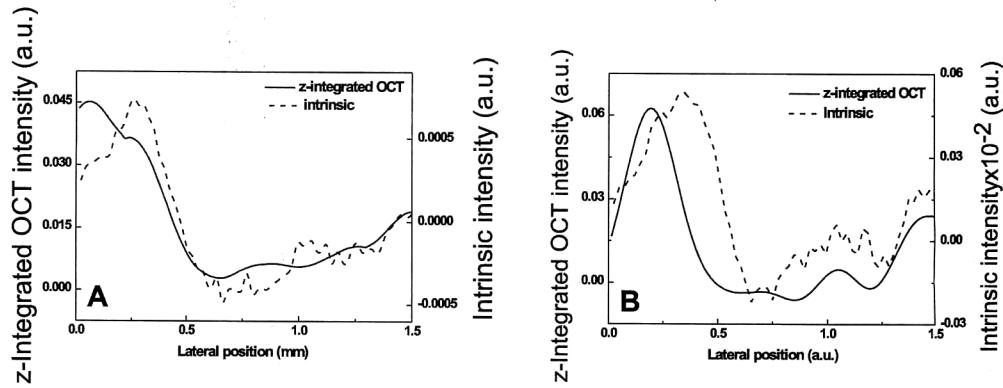


図6 内因性信号(図5 A, B)の黒線部での一次元分布(点線)と機能OCT画像(図5 C, D)の積分により得られた結果(実線)の比較。ここで、積分は深さ方向に分解された反射率を d 方向に積分し一次元の機能信号を計算した。積分範囲は図5 C, D中の黒点線部である。

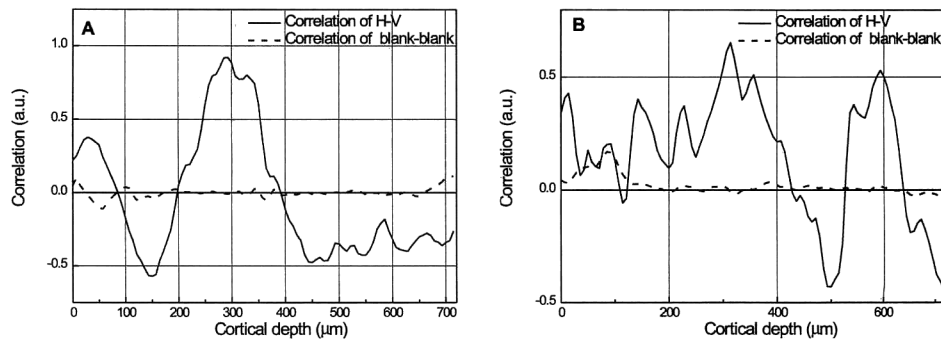


図7 A, Bそれぞれ図5 C, Dの機能OCT $x-d$ 分布から内因性信号の強度プロファイルとの相関を深さの関数として示す(実線)。ここで、比較のために、視覚刺激がないときの機能OCT信号と内因性信号の強度プロファイルとの間で得られた相関も示す(点線)。

のとき)に対して計算する:

$$\gamma_s(x, d, t) = \frac{R_s^{\text{post}}(x, d, t)}{\sum_{\text{prescans}} R_s^{\text{pre}}(x, d, t)} \quad (1)$$

ここでは、時間 t と刺激 s に対して得られる光反射率を $R_s(x, d, t)$ とした。式(1)により、刺激前後で共通の内部構造による信号が除去され、視覚刺激に対する変化だけが抽出される。次に、 $\gamma_s(x, d, t)$ を刺激後1秒から3.5秒について時間平均する。この時間に内因性信号が最大になることが知られている。個々の格子刺激に対する機能OCT信号は時間平均した $\langle \gamma_s(x, d) \rangle$ を使って、次の式によって定義される:

$$\langle \gamma_{\text{diff}}(x, d) \rangle = \langle \gamma_{\text{grating}}(x, d) \rangle - \langle \gamma_{\text{control}}(x, d) \rangle \quad (2)$$

その結果を図5 CとDに示す。 $x-d$ 走査範囲は $1.5 \text{ mm} \times 0.52 \text{ mm}$ である。

赤と青の領域はそれぞれ横縞と縦縞に反応する部位である。まず、図5 C, Dともに、比較的表面に近い、つまり浅い領域にはあまり反応がみられなかった。刺激に選択的な

信号は、 $200 \mu\text{m}$ 以上の深い部位にみられる。これまで、カラムは深さ方向では一様だと考えられてきた。しかし、機能OCTにより深さ方向に機能的なサブ構造がある可能性を、本実験結果は示唆している。深部でみられる刺激選択的な信号は x 軸方向には一様ではなく、 x 軸上の位置によって異なる選択性を示した。この結果の信頼性を調べるために、内因性信号との比較を行った。まず、図5 CとDに示す点線の領域について、深さ方向に分解された反射率を積分した。積分された反射率から x 軸に沿った機能信号を計算した。

図6は、その結果(実線)と内因性信号の空間プロファイル(点線)を x の関数として重ねて表したものである。OCT反射率を積分して得られた機能OCT信号と内因性信号はよく一致した。

このように、OCTの導入により内因性信号のイメージングを三次元に拡張することが原理的に可能になった。しかしまだ、脳機能計測法としてはさまざまな課題がある。

図6では、反射率を深さ方向の限られた部位(図5 C, D

の点線で囲まれた範囲)で積分した。内因性信号との比較のためには、全範囲にわたって積分するべきであろう。しかしながら、全範囲にわたる積分を行った結果は、図6に示したようなよい一致を示さなかった。さらに、図7A, Bはそれぞれ、機能OCT信号と内因性信号空間プロファイルとの相関結果(実線)を深さの関数として示す。図からわかるように、深さによって相関値が一様ではない。相関値は深さにより正または負となっていることがわかる。一方、刺激がないときの機能OCT信号分布と内因性信号空間プロファイルの相関結果(点線)はゼロ付近の値になった。この結果は、機能OCT信号が明らかに視覚刺激により引き起こされることを示す。ここで得られた正と負の相関値と、実際の機能信号の起源となる神経活動に伴う神経組織の構造変化との関係はまだよくわからない。これについて検討するためには、電気生理学実験により、単一の神経細胞または集団の活動電位と直接比較する必要がある。

機能OCT計測結果が従来の内因性信号計測結果と完全に一致しないことについて、いくつかの理由が考えられる。ひとつは、照明方向と検出方向の違いである。OCT計測では入射光と検出方向が同じであるため、表面反射が避けられない。一方、内因性信号のイメージングでは、光の入射と検出方向が異なるため表面反射が完全に避けられている。また、OCTと内因性信号のイメージングでは、検出している光の散乱角が異なる。実際、内因性信号のイメージングでは神経活動の増加によって散乱強度変化成分が減少するのに対して、機能的OCTでは逆に増加する。さらに、用いている光の波長が異なることも理由として考えられる。内因性信号のイメージングでは、一般に可視光が計測に用いられる。これに対して機能的OCT計測では、吸収による変化を除き、より深部の信号を検出するため、1.3 μm の近赤外光を用いている。この波長の違いが不一致の原因になっているかもしれない。しかし少なくとも、図6に示すような条件下では、内因性信号と機能的OCT信号の空間プロファイルはよく一致した。さらなる検討が必要である。

機能OCTで得られる信号の起源についても検討が必要である。機能的OCTによって検出される信号は散乱強度変化で、神経活動そのものではない。したがって、図5に

示した空間的な信号の局在が神経活動そのものの局在であるか、あるいは、神経活動によって引き起こされる散乱強度変化を引き起こすメカニズムに空間的な局在があることも考えられる。機能的OCTで得られる信号の起源を明らかにすることは、その意味で重要である。

筆者らの機能OCTシステムは、理論上、30 μm までの機能構造を深さ方向に分解できる能力をもっている。分解能は光源のコヒーレンス長で決まるので、より短いコヒーレンス長をもつ光源を使用することにより、さらに分解能の改善が可能である。

筆者らが提案した機能OCT技術は、脳の機能研究の手法において、活動電位記録と内因性信号イメージングとを補足するものである。活動電位記録は一点での測定技術であり、単一の神経細胞を調べるため深さ方面には不連続にしか測定できない。その反面、内因性信号は、多くの細胞集団活動をミクロンレベルで計測できるが、深さでは分離できない。これらの従来技術に対して、本技術では深さ情報を分離可能であり、三次元空間でミクロンレベルの分解能をもつ非常にすぐれた技術である。

文 献

- 1) J. Nicholls, A. R. Martin and B. G. Wallace: *From Neuron to Brain* (Sinauer Associates, Massachusetts, 1992).
- 2) T. Bonhoeffer and A. Grinvald: "Optical imaging based on intrinsic signals," *Brain Mapping: The Methods*, eds. A. W. Toga and J. C. Mazziotta (Academic Press, San Diego, 1996) pp. 55-97.
- 3) 福田光洋, 谷藤 学: 生物物理, **41** (2001) 251-254.
- 4) I. Vanzetta and A. Grinvald: *Science*, **286** (1999) 1555-1558.
- 5) M. Fukuda, R. Uma Maheswari, R. Homma and M. Tanifuji: "Contribution of blood volume changes to optical signals," *International Congress Series 1235 (Brain Activation and CBF Control)* (2002) pp. 165-171.
- 6) K. Holthoff and O. W. Witte: *J. Neurosci.*, **16** (1996) 2740-2749.
- 7) K. Tsunoda, Y. Yamane, M. Nishizaki and M. Tanifuji: *Nat. Neurosci.*, **4** (2001) 832-838.
- 8) L. G. Ungerleider and J. V. Haxby: *Curr. Opin. Neurobiol.*, **4** (1994) 157-165.
- 9) R. Uma Maheswari, H. Takaoka, R. Homma, H. Kadono and M. Tanifuji: *J. Neurosci. Methods*, **124** (2003) 83-92.
- 10) ラジャゴパラン ウママヘスワリ, 谷藤 学: レーザー研究, **30** (2002) 648-655.

(2003年10月15日受理)