

【トピックス】

生体二光子顕微鏡による脳内微小循環径路の三次元追跡

正本 和人<sup>1,2</sup>                      川口 拓之<sup>2</sup>                      菅野 巖<sup>2</sup>

<sup>1</sup>電気通信大学先端領域教育研究センター

<sup>2</sup>放射線医学総合研究所分子イメージング研究センター

1. はじめに

本稿では、マウス大脳皮質における実質微小血管ネットワーク構造の可視化手法について概説し、さらに得られた構造画像の3次元解析法について紹介する。二光子顕微鏡によって取得した立体構造画像を基に脳実質内の微小血管が動脈から静脈までどのような径路で連結しているのか、その径路長と空間分布について定量化したので紹介したい。

2. 実験方法

1) 実験動物の準備

実験にはオスのC57BL/6マウス(8週齢)を用いた。イソフルレン麻酔下で頭皮を切除し、体性感覚野を覆う左頭骨(径3.5 mm)を除去し、カバーガラスによってclosed cranial windowを作製した[1]。さらに開頭部位の周辺頭骨に顕微鏡ステージに固定するための自家製のアルミ製治具を装着した[2]。手術後、麻酔から覚醒したマウスを水と餌を自由に摂取可能な通常の飼育ケージで約一週間経過観察した後、二光子顕微鏡による観察実験を行った。

2) 脳微小血管構造の可視化

マウスはイソフルレン麻酔下で顕微鏡ステージに固定した。体温を維持し、血圧と心拍を非観血式自動血圧測定装置(BP-98A, ソフトロン)によってモニターした。顕微鏡観察の直前にsulforhodamine 101 (8 mM in saline, MP Biomedicals)を投与(8 ml/kg, i.p.)し、血しょう成分を蛍光標識した。大脳皮質における血管構造の可視化には二光子顕微鏡(TCS-SP5MP, Leica Microsystems)を用いた[3]。励起波長は900 nmで610/75 nmのバンドパスフィルタによって蛍光を検出した。XY平面における画像サイズ1024 x 1024 ピクセル、ピクセルサイズ0.45 μm/pixelの条件で、大脳皮質の深さ方向(z方向)に5 μm間隔で深さ800 μmから表層まで撮像した。得られた画像は画像解析ソフト(Volococity, Improvision, PerkinElmer)によって3次元再構成し、血管径、血管長、及び分岐の位置と数を計測した。

3) 血液循環径路の探索

脳表において広視野で撮像した血

管画像と比較し、各分岐血管と親血管との連結を基に動脈及び静脈の識別を行った。動脈血管は主に中大脳動脈(Middle cerebral artery)に連結し、静脈血管は上矢状静脈洞(Superior sagittal sinus)に至る。次に、それぞれ深さ方向に連続する画像から実質に連絡する細動脈(終末細動脈)及び細静脈を同定し、一つの体積画像において脳表と連絡する細動脈・細静脈それぞれn個に識別番号を与えた(細動脈:A1, A2...An, 細静脈:V1, V2...Vn)。脳表動脈から分岐し実質に垂直に連絡する終末細動脈において、そこから実質内で分岐する血管の径と分岐点の脳表からの深さを計測した。さらに各分岐点から静脈方向へ血管を追跡し、脳表に連絡する細静脈に至るまでの径路を探索した。分岐点において複数の径路が存在する場合は最も短い距離の径路を選択した。同様の作業を終末細動脈から実質内で分岐した各微小血管に対して行い、径路が同定可能であった分岐血管に対して径路長と分岐数を求めた。径路探索中に画像範囲から飛び出した血管は、解析対象から除外した。

3. 結果及び考察

1) 微小血管ネットワーク構造の可視化

図1にマウス大脳皮質において取得した微小血管の二光子顕微鏡画像の一例を示す。表層から深さ800 μmまで任意の深さで取得したXY平面画像を示す。表層から概ね深さ600 μmまでは画像のコントラストも良く、毛細血管の連結など鮮明な血管の形態画像が得られた。本結果から血管の検出が可能な最大深度は約800 μmであり、600 μmより深部においては血管径の定量的な計測が困難であることがわかる。図1において画像の中央付近に2本の細動脈と1本の細静脈が深さ方向に垂直に走行している。皮質表面から垂直に連絡する細動脈にはほ

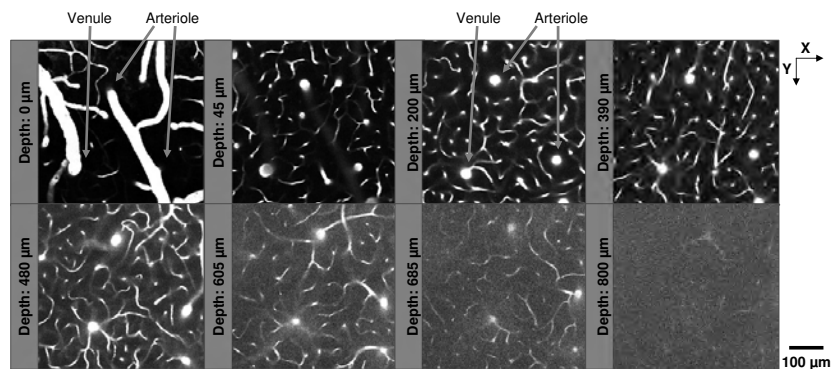


図1 二光子顕微鏡による微小血管形態画像の取得例(マウス大脳皮質深さ0~800μm)

とんど分岐がみられず、血管周囲は毛細血管の少ない領域があった。一方、皮質に垂直に連絡する細静脈には多くの毛細血管が連絡するという特徴的な形態が確認された。さらに取得した二光子顕微鏡画像のXY平面 (図2A) 及びXZ平面 (図2B) への投影画像の一例を示す。深さ方向 (Z方向) の血管分布や微小血管間の連結部位などが高解像度で捉えられている様子がわかる。

## 2) 実質内血液循環経路の定量化

終末細動脈から細静脈に至る実質内の血液循環経路の探索を行った結果を図3に示す。図3 (左) に対象血管の

脳表における分布パターン例を示す。0.5 mm角の画像中に実質内に垂直に連絡する3本の細動脈 (A1~A3: 内径12~26  $\mu\text{m}$ ) 及び9本の細静脈 (V1~V9: 内径5.7~36  $\mu\text{m}$ ) が観察された。図中には脳表から実質内に潜る部位における血管断面の内径と対応する血管番号を示した。さらに3本の細動脈の実質内で観察された分岐パターンを図3 (右) に示す。脳表での血管内径が比較的大きい細動脈A1及び A2では表層付近での分岐は観察されず、それぞれ深さ382  $\mu\text{m}$ 及び 493  $\mu\text{m}$ で最初に分岐が確認された。一方、脳表での血管径が12  $\mu\text{m}$ と比較的小さい細動脈A3では、表層下40  $\mu\text{m}$ から500  $\mu\text{m}$ まで計

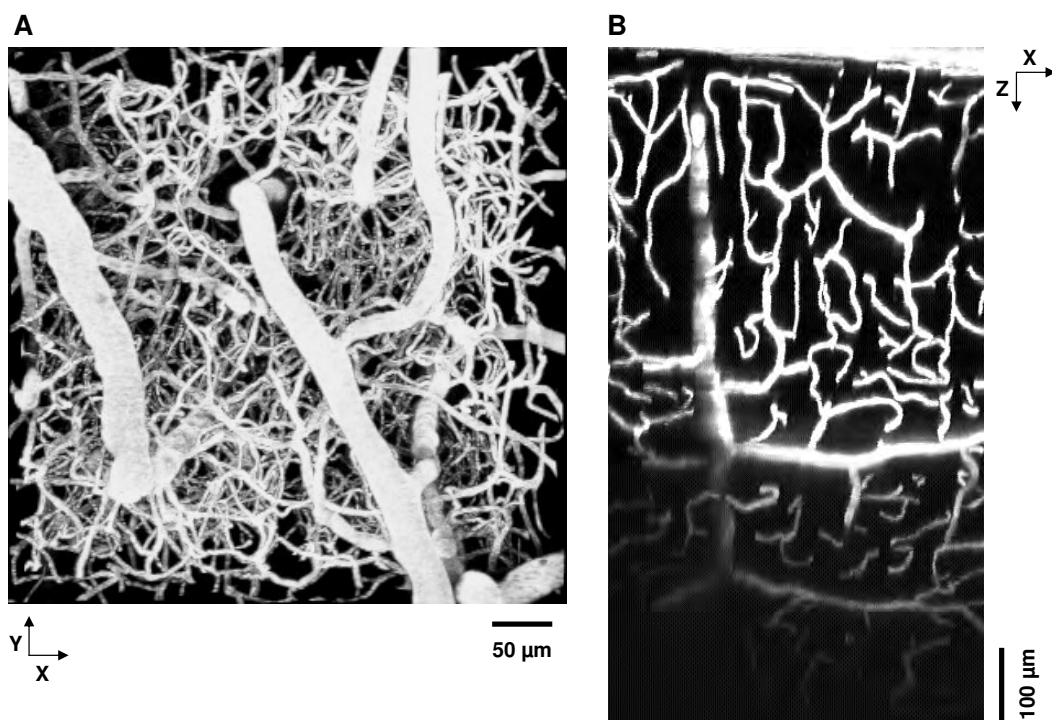


図2 大脳皮質微小血管ネットワークのXY平面 (A) 及びXZ平面 (B) への投影画像例 (A, Bは別個体画像。XZ投影画像はステップサイズ1  $\mu\text{m}$ によって取得)

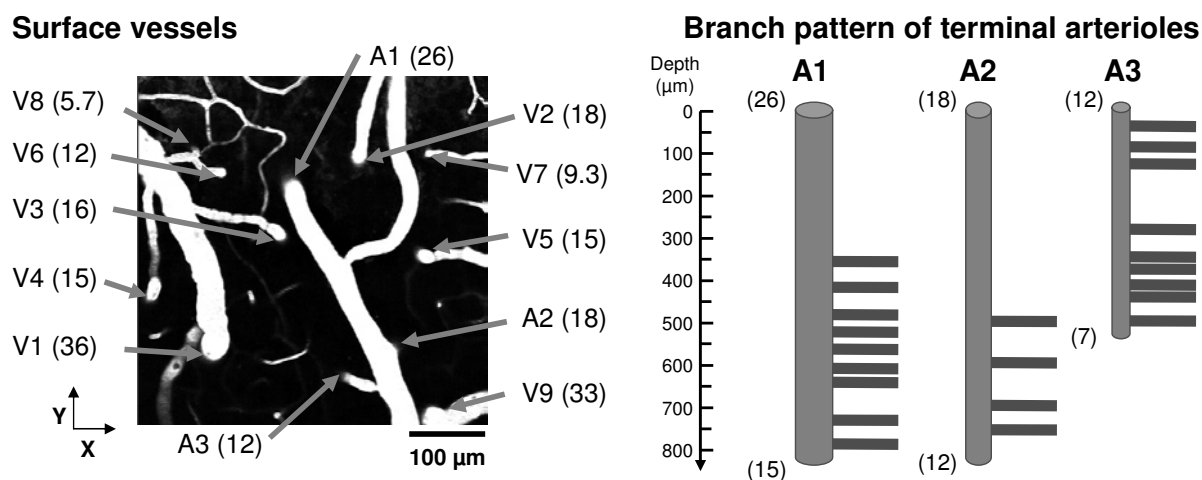


図3 大脳皮質における血管分布パターン

左図：脳表から実質に連絡する細動脈 (A) 及び細静脈 (V) の分布と実質内への連絡部位での血管径 (括弧内)

右図：終末細動脈の実質内での分岐点と分岐数を表す。括弧内の数値は実質起始部と最深部における終末細動脈の血管径を示す

9つの分岐が確認された。

これらの終末細動脈 (A1~A3) の分岐点から脳表に連絡する細静脈までの経路を追跡した結果を図4に示す。横軸に終末細動脈における実質内での分岐点の深さを示し、縦軸に脳表細動脈から脳表細静脈に至る経路長 (図4A)、及び終末細動脈(A1~A3)の分岐点から脳表に戻る細静脈 (V1~V9) への合流地点までの経路長 (図4B) を示した。脳表細動脈から脳表細静脈に至る経路のうち最も短い経路長は405  $\mu\text{m}$ であった。また経路長は終末細動脈の皮質入り口での内径に依存し、A1, A2, A3それぞれ平均で1295, 1523, 522  $\mu\text{m}$ の経路長で脳表静脈に連絡していることがわかった。また、終末細動脈からの分岐点の深さに依存して血液の循環経路が線形的に長くなる傾向が得られた (図4A)。このとき、最小二乗法によって求めた近似直線の切片は440  $\mu\text{m}$ であった。この切片の値は終末細動脈と細静脈とを連絡する毛細血管領域の平均経路長を示すと考えられる。実際に、実質毛細血管領域における平均の経路長は $390 \pm 120$   $\mu\text{m}$ であり (図4B)、近似直線の切片とよく一致した。またこのときの平均分岐数は $6.8 \pm 1.9$ 回であったことから、実質毛細血管一本の平均長さは約60  $\mu\text{m}$ であると求められた。

#### 4. おわりに

本研究では、マウス大脳皮質における微小血管形態の3次元イメージング及び実質内微小循環経路の定量的評価法について紹介した。二光子顕微鏡イメージングによって取得した微小血管ネットワークの立体構造を基に、脳実質内の終末細動脈から細静脈に至る毛細血管領域の経路長と分岐数を示した。一般的に微小血管の数密度は単位組織体積あたりに血液が組織と接する表面積を表す。一方、本研究で示した経路長は単位血流量あたりに血液が組織と接する時間を反映する。このように血管密度と経路長はいずれも血液と組織との間の物質交換あるいは

物質輸送を決定する重要なパラメーターである。しかし、これまでに脳実質の微小循環領域における経路長を生体内で定量的に評価した報告はなかった。

一方で、加齢に伴い脳血流や脳血管反応性が低下することはPETやMRIを用いた各種イメージング法によって示されている[4-7]。脳血流の低下は脳実質組織に必要な栄養・成長因子やホルモンの輸送を低下させると考えられる。ラットを用いた動物実験では、加齢に伴い脳表動脈の吻合及び脳実質に潜り込む終末細動脈の数が減少し、このことが脳血流低下の主要な要因であることが示唆されている[8]。しかし、加齢に伴う脳実質の毛細血管密度の変化に関しては一定の見解が得られていない[9]。また、脳虚血やアルツハイマー病のモデル動物を使った実験では、脳実質内の毛細血管密度の低下がその後の神経変性と密接に関係することや血管形成の促進による微小循環動態の改善が神経機能の維持回復に有効である可能性などが議論されている[10-13]。本研究で示した脳実質の微小血管ネットワークに関する定量的評価法は、脳微小循環と老化あるいは各種脳神経疾患との因果関係の解明、及びこれら疾患における治療法の確立において極めて有効であると考えられる。今後、PETやMRIなどのマクロで測定された脳血流量と、本研究で示したミクロな微小循環経路や血管密度との対応関係を明らかにし、老化や各種脳神経疾患における脳微小循環動態及び実質組織への物質輸送の3次元空間での全貌を明らかにしていきたい。

#### 謝辞

本研究の遂行においてお世話になりました電気通信大学情報理工学部 山田幸生教授に感謝いたします。また頭部開窓法の作製において、ご指導を頂きました慶應義塾大学医学部 鈴木則宏教授、富田 裕 講師に感謝いたします。本研究の一部は、科学技術振興調整費の支援によって行われました。

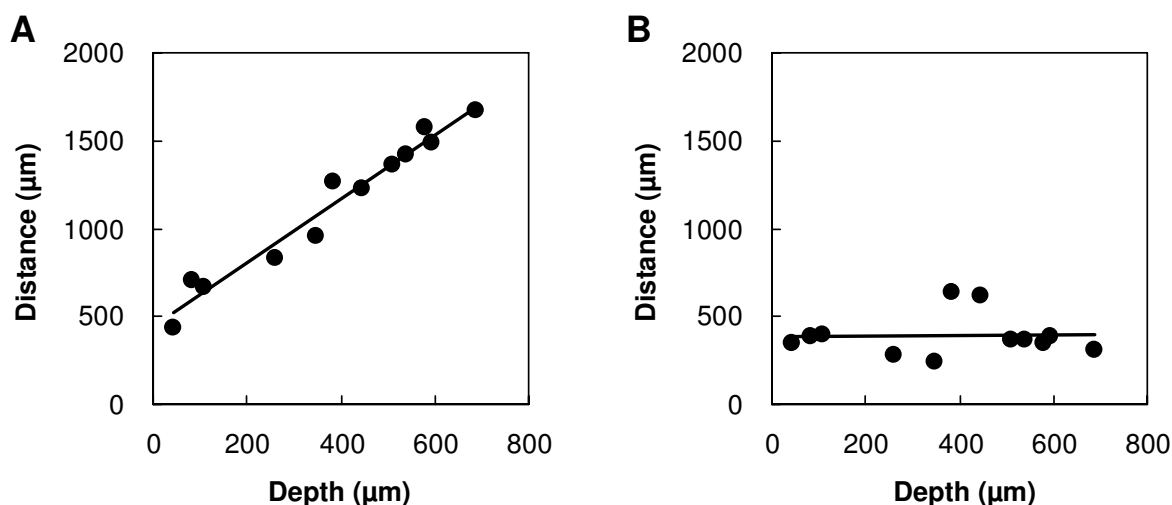


図4 終末細動脈の分岐深さ (X軸) と動静脈間の経路長との関係 (A)。実質内における終末細動脈分岐点から脳表に連絡する細静脈との合流地点までの経路長 (B)。

## 引用文献

1. Tomita Y, Kubis N, Calando Y, Tran Dinh A, Méric P, Seylaz J and Pinard E. Long-term in vivo investigation of mouse cerebral microcirculation by fluorescence confocal microscopy in the area of focal ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 25:858-867, 2005.
2. Takuwa H, Autio J, Nakayama H, Matsuura T, Obata T, Okada E, Masamoto K and Kanno I. Reproducibility and variance of a stimulation-induced hemodynamic response in barrel cortex of awake behaving mice. *Brain Res* 1369:103-111, 2011.
3. Masamoto K, Obata T and Kanno I. Intracortical microcirculatory change induced by anesthesia in rat somatosensory cortex. *Adv Exp Med Biol* 662:57-62, 2010.
4. Melamed E, Lavy S, Bentin S, Cooper G and Rinot Y. Reduction in regional cerebral blood flow during normal aging in man. *Stroke* 11:31-35, 1980.
5. Martin AJ, Friston KJ, Colebatch JG and Frackowiak RS. Decreases in regional cerebral blood flow with normal aging. *J Cereb Blood Flow Metab* 11:684-689, 1991.
6. Ito H, Kanno I, Ibaraki M and Hatazawa J. Effect of aging on cerebral vascular response to Paco<sub>2</sub> changes in humans as measured by positron emission tomography. *J Cereb Blood Flow Metab* 22:997-1003, 2002.
7. Ances BM, Liang CL, Leontiev O, Perthen JE, Fleisher AS, Lansing AE and Buxton RB. Effects of aging on cerebral blood flow, oxygen metabolism, and blood oxygenation level dependent responses to visual stimulation. *Hum Brain Mapp* 30:1120-1132, 2009.
8. Sonntag WE, Lynch CD, Cooney PT and Hutchins PM. Decreases in cerebral microvasculature with age are associated with the decline in growth hormone and insulin-like growth factor 1. *Endocrinology* 138:3515-3520, 1997.
9. Riddle DR, Sonntag WE and Lichtenwalner RJ. Microvascular plasticity in aging. *Ageing Res Rev* 2:149-168, 2003.
10. Whitaker VR, Cui L, Miller S, Yu SP and Wei L. Whisker stimulation enhances angiogenesis in the barrel cortex following focal ischemia in mice. *J Cereb Blood Flow Metab* 27:57-68, 2007.
11. Meyer EP, Ulmann-Schuler A, Staufenbiel M and Krucker T. Altered morphology and 3D architecture of brain vasculature in a mouse model for Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:3587-3592, 2008.
12. Iadecola C, Park L and Capone C. Threats to the mind: aging, amyloid, and hypertension. *Stroke* 40:S40-44, 2009.
13. Navaratna D, Guo S, Arai K and Lo EH. Mechanisms and targets for angiogenic therapy after stroke. *Cell Adh Migr* 3:216-223, 2009.