

【第92回生涯教育講座】

光学的膜電位測定法の“生きたままの”
脳への応用はま
濱のり
徳 ゆき
行ひろ
廣 た
田 あき
秋 ひこ
彦

キーワード：光学的膜電位測定法，単一掃引記録，光ファイバー照明，
心拍動ノイズ，体性感覚野

はじめに

人間は何かを感じ、考え、そして行動する。これらが脳の働きによるものであることに疑問を挟む余地はないだろう。しかし、この脳というシステムを構成している素子であるニューロンは均一なものではなく、素子間の接続も多様である。ニューロンの活動を捉える手法として、一般的には個々のニューロンの電氣的活動を測定する方法が用いられてきている。しかし得られる情報は点であり、同時に記録できる点の数も限定される。そのため、非常に小さく数も少ない窓を通して巨大なシステムを覗くことになり、システム全体の理解に辿り着くのは極めて困難である。このような状況に対し、少し荒削りであっても、システム全体の振る舞いを捉えようとする動きが生じるのは至極当然のことであり、様々な光学的方法、fMRI, PET, SQUID, 多チャンネル脳波などの脳機能イメージング法が開発されてきているが、いずれもまだ研究室レベルの測定法である。我々はそのひとつである膜電位感受性色素を用いた光学的

膜電位測定システムの開発・改良を行っている。本稿ではこの測定法を紹介すると共に、“生きたままの”脳への応用に向けた開発・改良の過程で生じた諸問題とその解決法について述べる。

光学的膜電位測定法

我々が用いている光学的膜電位測定法は、膜電位感受性色素と呼ばれる、膜電位の変化に応じて吸光や蛍光強度が変化する色素を用いてニューロンを生体染色し、その電氣的活動を光学信号として記録する手法である¹⁾。光学顕微鏡などを用いて拡大実像を作成し実像面に受光素子を設置することにより、その部位の神経活動が記録でき、設置する受光素子の数を増やす事で容易に同時記録部位を増やす事ができる。我々は現在受光器として1020エレメントのフォトダイオードアレイを用いて1020の部位から同時記録している²⁾。この手法は色素で生体染色しなければならないため、脳機能イメージング法の中では侵襲的ではあるものの、膜電位変化を直接記録出来る方法であり、非常に高い時間・空間分解能が得られることを特徴としている。しかし、この手法を用いて“生きたままの”脳からニューロン活動を記録するには、まだ種々の未解決の問題が残されている。

Noriyuki HAMA et al.

島根大学医学部生理学講座神経・筋肉生理学
連絡先：〒693-8501 出雲市塩冶町89-1

膜電位測定法でのノイズとその対策

光学的膜電位測定装置で記録される光学シグナルにはニューロン活動に由来するシグナルだけでなく、測定装置由来のノイズや心拍動や呼吸などの生体活動に由来するアーティファクトが含まれる。これらのノイズによりニューロン活動由来のシグナルが大きく歪められるため、光学的膜電位測定法では、ノイズを如何に減らすか、が極めて重要な課題となっている。以下本稿では、最近我々が大幅に改善することに成功したノイズ対策に絞って記すこととする。

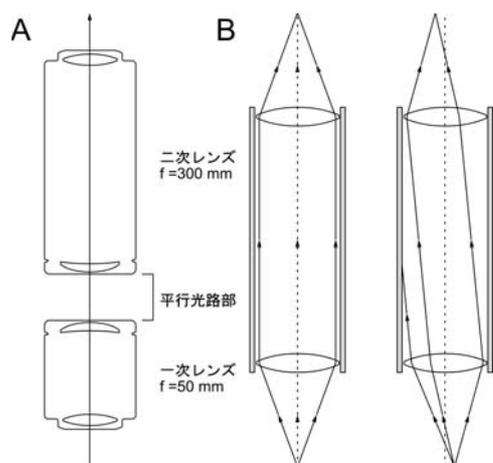
1. 測定装置由来のノイズ

我々が行っている光学的膜電位測定法は、上述したように、動物の脳を膜電位感受性色素で生体染色し、この色素の蛍光強度が膜電位に応じて変化することを利用した測定法である。半透明な組織を対象とする場合は色素の吸光変化を用いることが出来るが、“生きたままの”脳のように不透明な組織を用いる場合は吸光変化を用いるのに比較してかなり小さい蛍光変化を測定することになる。このような測定では、光強度を電気シグナルに変換する際に発生するショットノイズが問題となる。ショットノイズとは受光素子における光電流の発生が確率過程であるために生じるノイズのことで、取り除くことが出来ない。市販の測定装置をそのまま用いた実験では、複数回の試行を加算処理する事でショットノイズを改善する手法が用いられている。しかしながら、加算処理を行うためには、刺激に対する応答のように試行毎のニューロン活動が同一であると見なしうる実験系でなければならず、適用範囲が大きく制約される。さらにそのような実験系であっても、応答が試行

毎にばらつきを示す可能性も考慮する必要がある。

色素の蛍光変化を用いた光学的膜電位測定におけるシグナル・ショットノイズ比 (S/N_{SHOT} 比) は蛍光強度のルートに比例することが知られており³⁾、明るい蛍光像が得られれば S/N_{SHOT} 比は改善することになる。そこで我々は、より明るい像を得るため光学系の見直しをおこなった。明るい蛍光像を得るには、まず、励起光強度を大きくすることが考えられる。しかし、励起光強度のゆらぎは光学シグナルのノイズとなる為、単に明るいだけではだめで、光強度の時間的なゆらぎが発光強度の0.01%未満という超高安定性が同時に求められる。したがって、キセノンやメタルハライドといったアーク発光系の光源は非常に明るい光源であるが、光強度の安定性が悪いため使えない。現在超高安定性の仕様を満たす光源で最も明るい光源は、直流安定化電源の定電流モードで点灯させたハロゲンランプとされており、我々も励起光光源として300 W のハロゲンランプを用いている。

“生きたままの”脳からの測定で用いられる光学系の拡大率は、通常10倍程度までである。このような拡大率の小さい像を作製する場合、タンデムレンズ光学系を用いるのが最も有効であるとされており⁴⁾、多くの光学的膜電位測定システムの光学系に採用されている。我々のシステムでは、一眼レフカメラ用の口径が大きくF値の小さい、焦点距離が50 mm と 300 mm の明るいレンズを用いて6倍の像を作製している (図1 A)。蛍光強度変化を測定する光学的膜電位測定システムでは、通常、タンデムレンズ光学系の2群のレンズ間にできる平行光路部分にダイクロイックミラーを挿入し、励起光を照射する方法が用いられている。しかし、平行光路部分の距離が長くなると像



(A) タンデムレンズ光学系の模式図。我々は一
眼レフカメラ用のレンズを2つ向かい合わせに
接続してタンデムレンズを構成している。この
光学系では、一次レンズの焦点面にある標本の
拡大実像が二次レンズの焦点面に形成される。

(B) 平行光路部での光。標本の光軸上にある点
(左図)、光軸上に無い点(右図)から出た光は
ともに、レンズ間の平行光路部では平行光にな
るが、後者の平行光は光軸とは平行ではないた
め光の一部が二次レンズへ入射出来ない。平行
光路部が長いと、光軸から離れるほど二次レン
ズへ入射出来ない光の量が顕著に増え、光軸か
ら離れた部分の実像の明るさが大幅に低下する。

図1

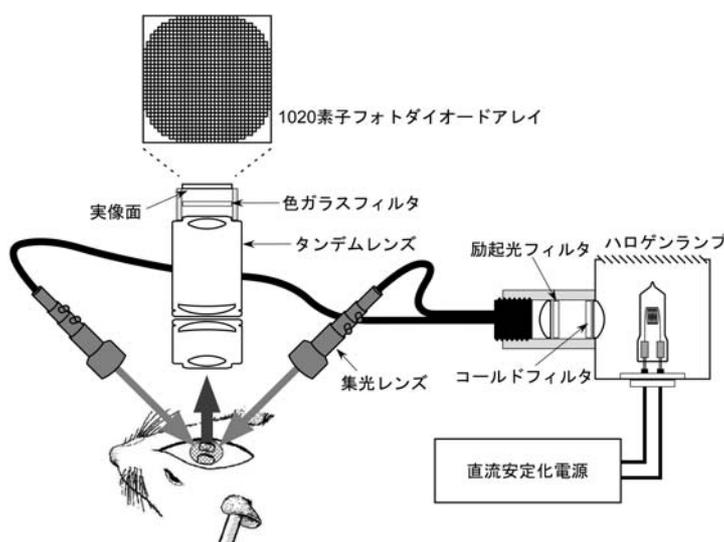


図2

光ファイバーによる励起光照明を用いた光学的膜電位測定装置の光学系の模式図。
直流安定化電源を用いてハロゲンランプを駆動し、コールドフィルタ(赤外光除去
フィルタ)、励起光フィルタ(所定の波長帯の光だけを透過させるフィルタ)を通
過させ励起光とする。これを光ファイバーへ導入し、集光レンズを用いて標本の所
定の部位に励起光を集中させる。予め膜電位感受性色素で生体染色しておいた大
脳皮質の拡大蛍光像をタンデムレンズで作成し、実像面に置いた1020素子フォト
ダイオードアレイで蛍光変化を測定することで、大脳皮質上の1020の部位の膜電
位変化を同時に測定することが出来る。色ガラスフィルタは励起光が直接受光器
に入るのを防止している。光ファイバーが2分岐し2方向から照射しているよう
に描いてあるが、実際には光ファイバーは5分岐しており、5方向から標本を照
射している。

の周辺部が暗くなることが知られている(図1
B)。実際に平行光路部分の距離を4 mm から 80
mm に変えて測定した結果、拡大像周辺部の光
量が大きく減少することが確認された。我々は、

色素が発する蛍光の向きや大きさが励起光の入射
する向きに依存しないことに着目し、ダイクロ
イックミラーを使わず、ファイバー照明を用いて
励起光を斜めに照射する方法を導入した(図2)。

その結果、平行光路部分の距離が非常に短くて済むようになり、像の明るさが増大し、シグナル・ノイズ比 (S/N 比) が向上した。

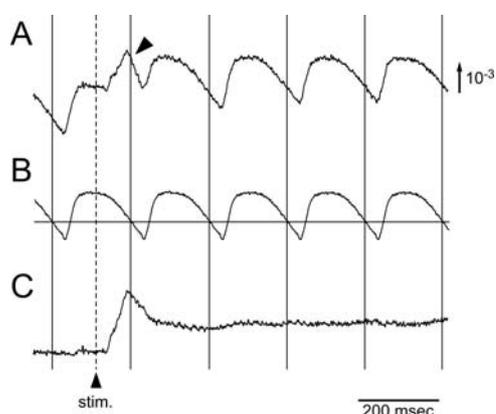
我々の測定装置ではフォトダイオードエレメントを34行34列の正方形に並べ、その内のほぼ内接円内にある1020個を測定に用いるフォトダイオードアレイを受光器として用いている (図2)。一方、市販の測定装置では数万から十萬画素のカメラを装備したものが販売されている。画素数は多ければ多いほど良いような気がするが、そう単純な話ではない。画素数を増加させることによるデメリットの主なものとして、以下のことが挙げられる。まず、実像をより細かく切り刻むことになるので、1画素当たりの光量が低下する。また、受光素子上で信号導出用配線に必要な面積が増加するので、受光素子中の光を受容する部分の面積の比率 (素子の開口率という) が低下する。これらの結果、 S/N_{SHOT} 比が低下する。さらに、信号線を切り替える方式ではスイッチングノイズが発生し、S/N 比がいっそう低下する。一方、単位時間に得られるデータ量が増大するので、時間分解能や連続記録時間などの制約、解析時間の増大などの問題も生じる。測定装置の画素数はメリットとこれらのデメリットを総合的に判断して

決定する必要がある。ニューロン活動の測定には時間分解能 1 ms が必要であると考えた場合、我々が採用している1020という画素数は、加算処理なしで定量解析可能なデータが得られる S/N 比を維持出来る光量をそれぞれの画素が確保すると共に、リアルタイムにハードディスクに書き込む事で実質的に連続記録時間の上限の無いシステムを構成するのに最適な数であると考えている。

2. 生体活動由来のノイズ

“生きたままの” 脳からの測定におけるノイズ対策として次に重要なのは、生体活動由来のアーティファクトの除去である。ここでは我々が開発した心拍動に由来するアーティファクトの除去方法について述べる。

図3 Aはラットの左側大脳皮質体性感覚野を膜電位感受性色素 RH 414で染色した標本を用い、右後肢に電気刺激を与えた時に記録された生データの一例である。我々の装置を用いた測定では、加算処理することなくこのように S/N 比の高い光学シグナルが記録出来る。光学シグナルは大きな周期的変動を示しているが、この周期的変動は同時に記録した心電図より得られる心拍動のタイミングと同期しており、心拍動由来のアーティ



心拍動由来のアーティファクト (ノイズ) の除去法。ラット大脳皮質体性感覚野から記録した光学シグナルの生データ (A) には心拍動由来の大きなアーティファクトが重畳しているが、アーティファクト波形 (B) を推定し、これを減算する事で心拍動由来のアーティファクトを除去した波形 (C) が得られる。破線は後肢に電気刺激を与えたタイミング、実線は同時に記録した心電図より得られたR波の立ち上がりのタイミングを表す。右上の矢印は、蛍光の変化分が背景光強度の0.1% (10^{-3}) に相当する大きさを示す。

図3

ファクトである事がわかる。この大きな周期的変動に重畳し、点線で示した刺激に続いてわずかに上向きのシグナルが生じている (図3 A, 矢頭)。このわずかな変化がニューロン活動由来の光学シグナルである。Orbach ら⁵⁾は心拍動由来のアーティファクトは拍動毎に同じ波形であると考え、刺激を行わず得られた記録を減算する事でニューロン活動由来のシグナルを得ることに成功している。その後人工呼吸下で心拍1周期分のアーティファクト波形をつなぐ事でより長い記録 (数秒程度) でもアーティファクトを除去できる事が示された⁶⁾。これらの実験では記録時に呼吸を止めているため、連続記録時間は数秒が限度である。より長時間の連続記録を行うためには呼吸を止めず、自由に呼吸させた状態で記録を行う必要がある。しかし、自由に呼吸させた状態では心拍動間隔が呼吸に同期して変動する、呼吸性変動と呼ばれる現象がみられる (図4)。心拍動間隔が変動した時、アーティファクトが同じ波形であることは保証されないため、心拍1周期分のアーティファクト波形をつなぐだけのこれまでの手法でアーティファクトを十分除去できるとは考え難く、自由に呼吸し心拍動間隔が変動する状態で、心拍動に由来するアーティファクト波形を推定することが必要となった。そこでまず、心拍動間隔とアーティファクト波形の関係を比較した (図5)。その結果、心拍動間隔が異なるとアーティファクト波形も異なるが、同時に記録した心電図上のR波の立ち上がりのタイミング (図5, 実線) を中心に、前後半周期 (図5, 鎖線) の区間ではほとんど違いが見られない事が明らかになった。この知見をもとに新しいアーティファクト除去法を開発し、自由に呼吸し心拍動間隔が変動する状態でも、心拍動由来のアーティファクトを除去する事が可能

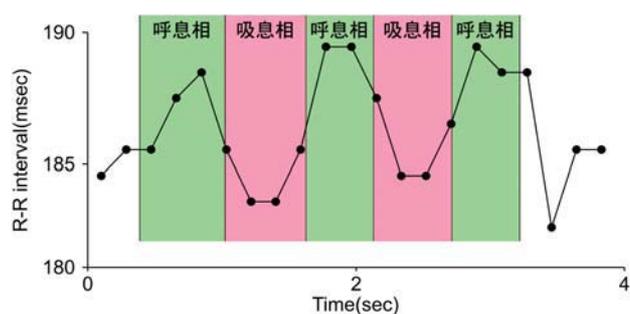


図4

心拍動間隔の呼吸による変動。縦軸は心電図のR波から次のR波までの心拍動間隔を示す。心拍動間隔が呼息相 (薄緑色背景部分) では長く、吸息相 (ピンク色背景部分) では短くなっている。

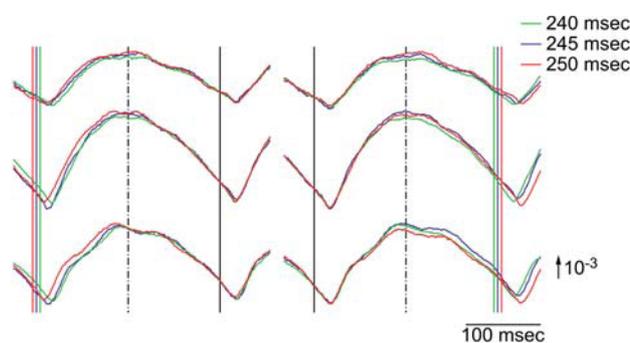


図5

異なる心拍動間隔における心拍動由来のアーティファクト波形。心電図上のR波の立ち上がりのタイミングを心拍動と記す。心拍動間隔240 (緑), 245 (青), 250 (赤) 秒におけるアーティファクト波形を示す。基準となる心拍動 (黒実線) から左図は直前の心拍動、右図は直後の心拍動 (いずれも赤, 青, 緑の実線) までの波形を示す。心拍動の前後半周期 (一点鎖線) までは双方とも、心拍動間隔が異なってもアーティファクト波形はよく一致していた。

となった (図3 B, C)。

測定例

上記のような改良を施した結果、“生きたままの”脳標本から加算処理なしで定量解析可能な記録を得る事が可能となり、膜電位感受性色素を用いた光学的膜電位測定法が適用可能な実験系が大

大きく広がった。我々はこの特性を生かし、ラット大脳皮質の感覚応答に対する種々の薬物の効果や自発活動の解析を行っている。我々の測定システムでの測定例として、大脳皮質感覚野の感覚応答時の活動とそれに対する薬物効果の一例を紹介する。

図6は、後肢に電気刺激を与えた時、ラット大脳皮質体性感覚野領域から光学的に記録した神経活動である。刺激にわずかに遅れ、広い範囲で興奮がほぼ同時に生じていた。時間経過を詳細にみると、刺激してから興奮が生じるまでの時間が場所によってわずかに異なっており、bで最も早く、fが最も遅いことがわかった(図6B)。bが興奮してからそれぞれの部位が興奮するまでの時間差を測定して等時線図を作成すると、bで生じた興奮が周囲に伝播していく様子が見える(図6C)。

この測定装置を用いて薬物効果を定量的に調べることも可能である。一例として、GABA_B受容体のアゴニストであるバクロフェンが感覚応答時の興奮の伝播に与える効果を調べた実験を紹介する(図7)。バクロフェン投与前(図7A, 投与前)、投与15分後(図7A, 15分後)ともに、後肢刺激によって、最初大脳皮質体性感覚野の限られた領域に生じた興奮が周囲に伝導して興奮領域が拡大していたが、バクロフェン投与後は興奮領域の拡大速度が減少していた。等時線図より、大脳皮質の一部が最初に興奮してから15³秒の間に興奮した領域の面積を求めてみると、バクロフェンの投与により、この面積が $3.00 \pm 0.32 \text{ mm}^2$ から $1.78 \pm 0.31 \text{ mm}^2$ へと有意に減少したことが明らかになった(図7B)。

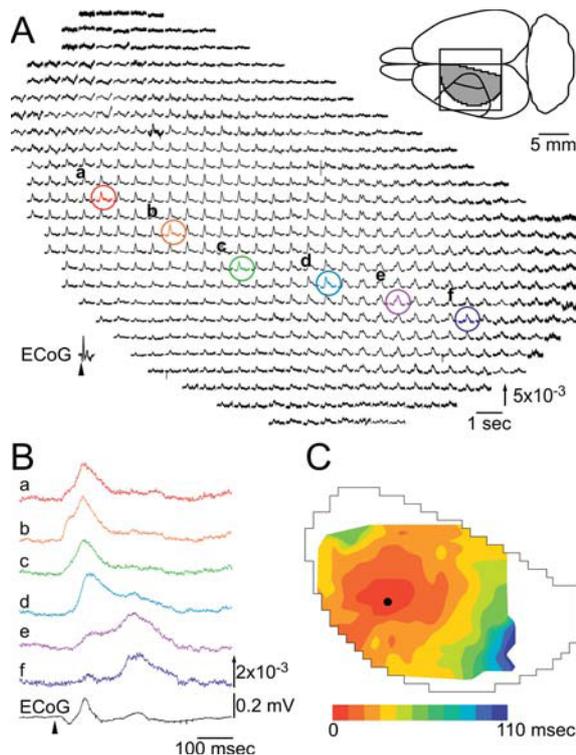


図6

後肢電気刺激に対するラット大脳皮質体性感覚野の応答。光学的記録は心拍動に伴うアーティファクト除去後のものである。電気刺激により、記録している範囲のほぼ全域で興奮が生じていた(A)。ECoGは同時に皮質上から電極を用いて記録した脳波、右上の挿入図はラットの脳の模式図、正方形は受光素子の外枠を示し、Aのデータは灰色の部分から記録したものである。B図はA図でaからfで示した各部位からの記録を拡大表示したもので、記録部位毎に刺激してから興奮が生じるまでの潜時が異なっていたことがはっきり読み取れる。この時間差から作成した等時線図がC図である。黒丸は応答が最も早く生じた部位で、下のバーグラフで示したように、潜時が長くなるほど暖色系から寒色系の色を割り当て、各部位の潜時の違いを示してある。

おわりに

今世紀になって光学的膜電位測定法が多くの研究室に導入されたが、ほとんどの研究室では市販装置をそのまま用いた結果、適用範囲がかなり限定された測定方法であるとの誤った認識が広がっ

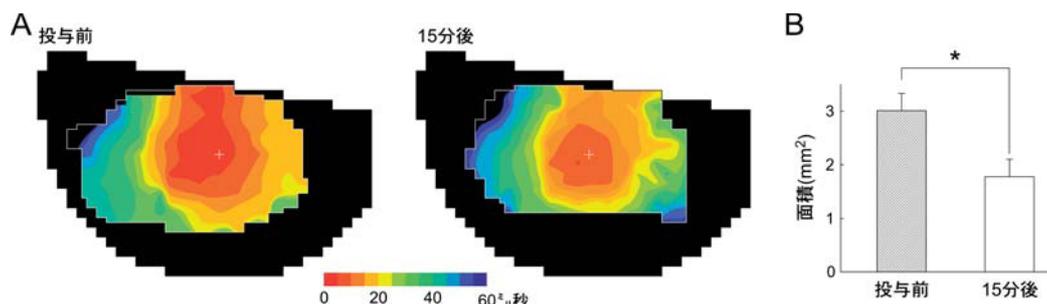


図7

- (A) バクロフェン投与前 (左) と投与15分後 (右) の等時線図。白十字は興奮が最初に生じた部位、色の意味は図6と同じである。
- (B) バクロフェン投与前 (灰色) および投与15分後 (白) に、最初に興奮が生じてから15^分秒の間に興奮した領域の面積。両者を比較すると、バクロフェン投与により有意に減少していた。(* $p < 0.05$; t-test)

ている。これは、この手法が既に完成されたものであり、現在の装置が持つ限界は超える事ができないとの誤った先入観に基づくものであると我々は考えている。光学的膜電位測定法はまだ開発途上の測定法であり、本稿で示したように、さ

らなる改良を重ねる事によって適応範囲は大きく広がり、これまでの手法ではなし得なかった新しい視点から脳科学を発展させる可能性を秘めた測定法であると考えられる。

参 考 文 献

- 1) Cohen LB, Salzberg BM, Davila HV, Ross W, Landowne D, Waggoner AS, Wang CH. Changes in Axon Fluorescence during Activity: Molecular Probes of Membrane Potential. *J Membr Biol* 19: 1-36, 1974
- 2) Hirota A, Ito S: A long-time, high spatiotemporal resolution optical recording system for membrane potential activity via real-time writing to the hard disk. *J Physiol Sci* 56: 263-266, 2006
- 3) Momose-Sato Y, Sato K, Sakai T, Hirota A, Matsutani K, Kamino K: Evaluation of optimal voltage-sensitive dyes for optical monitoring of embryonic neural activity. *J Membr Biol* 144: 167-176, 1995
- 4) Ratzlaff EH, A. Grinvald A: A tandem-lens epifluorescence microscope: hundred-fold brightness advantage for wide-field imaging. *J Neurosci Methods* 36: 127-137, 1991
- 5) Orbach HS, Cohen LB, Grinvald A: Optical mapping of electrical activity in rat somatosensory and visual cortex. *J Neurosci* 5: 1886-1895, 1985
- 6) Lippert MT, Takagaki K, Xu W, Huang X, Wu JY: Methods for voltage-sensitive dye imaging of rat cortical activity with high signal-to-noise ratio. *J Neurophysiol* 98: 502-512, 2007