実験技術

光で脳を制御する！？

大阪バイオサイエンス研究所神経科学部門
現在の所属：* 関西医科大学解剖学第1講座
片岡洋祐

1. はじめに

脳はいかにして膨大な量の情報を処理しているのか？ 脳が喜びや苦しみを感じるとはどういうことなのか？ 個々の神経機能から意識の奥深いところへと今日の科学は迫りつつある。ヒトや動物の脳のはたらきを体に傷をつけることなくのぞき見することができる非侵襲的脳機能イメージング法の開発もこれに大きく貢献してきた。とりわけPET(陽電子放射断層撮影法)やfMRI(機能的磁気共鳴画像法)は脳内での神経活動に伴う代謝ダイナミクスを2次元あるいは3次元的に描出することを可能にし、近年ますます注目されている。ところが一方、実際の我々の脳の中では各機能領域の間に神経ネットワークがはり巡らされ、情報処理がさまざまな領域で同時に進行しているため、これらのイメージング技術は関係領域を一挙に描出してくれるものの、イメージングのみでは各微小領域の役割や機能的つながりを詳細に理解することは難しいといった一面がある。まして臨床医学においてはイメージング技術は病気の診断には威力を発揮するが、治療技術としては使えない。そこで、脳内の各領域の神経活動や領域間の神経ネットワークを1つ1つ体外から可逆的に活性化したり抑制する技術の開発が必要となってくるのだ。

では、脳機能を体外から可逆的に制御するにはどんな方法が考えられるだろう。古くから脳機能の研究のためにさまざまな薬物が開発され、脳局所に直接注入する実験が多く行われてきた。しかし、投与した薬物が脳組織の中で広がるのに時間がかかるため、薬物の作

用領域や作用開始時間がはっきりしないといった問題がある。また、薬物を脳内の目的領域へ直接投与するわけだから臨床治療技術としては生体への侵襲が大きい。近年、体外からの磁気刺激で脳表面の神経を刺激する方法が開発された¹⁾。しかし、磁気刺激法では刺激範囲を細かく選択することができず²⁾、研究によく利用されるげっ歯類などの小さな脳への使用は難しい。しかも、その対象領域は脳表面に限られる。では、光はどうか？ 光なら生体のある程度透過するから、脳組織をできるだけ傷つけずに目的組織まで到達させることができる。しかも、照射領域を絞ったり広げたり、あるいは任意の形に設定することも容易であろう。しかし、はたして光照射で神経機能を可逆的に制御することなど可能なのか？

2. 光酸化法による神経伝達抑制

1つのアイデアとして、光エネルギーを神経組織へ効率よく作用させる媒体の利用が考えられる。例えば光増感色素がそれだ。我々の身の回りにあるいくつかの色素は特定の波長の光を吸収すると大量の活性酸素種(おもに一重項酸素)を生成する³⁾。こういった一群の色素を光増感色素とよぶ。生成された一重項酸素は化学的に大変不安定で、短時間のうちに周囲組織の脂質やタンパク質と反応し、これらを酸化してしまう(光酸化反応、図1a)。通常、我々の生体では、さまざまな生理機構が巧妙にはたらいて組織のレドックス(酸化還元)状態を調節し、生体内分子を正常に機能させている。もし中枢神経組織を急激に酸化して膜脂質やタンパク質などの機能分子のはたらきを修飾すれば、結果として神経伝達機能を修飾あるいは低下させることができるのではないのか？

事実、この光酸化による神経伝達抑制現象をラット海馬スライス標本を用いて確認することができる。微小タングステン電極でスライス標本中の神経線維を刺激し、さらに微小ガラス電極をその近傍へ刺入して刺激した神経線維の電氣的興奮やシナプス後電位を細胞外記録する。そして、暗の中に細胞外液に光増感色素を添加するわけであるが、このとき光増感色素の選択が実験成功へのポイントとなる。重要なことは、暗条件下と明条件下での励起効率の差が極端に大きいもの、つまり暗の中ではほとんど組織酸化を引き起こさず、ひと

Photo-Dynamic Manipulation of the Brain

Yosky KATAOKA

Department of Neuroscience, Osaka Bioscience Institute

*Present address: Department of Anatomy and Cell Science, Kansai Medical University

たび光を照射すると急激に組織を酸化するものを選択することである。ここでは光増感色素としてローズベンガルを用いた。暗中に $3\ \mu\text{M}$ のローズベンガルを細胞外液と一緒に10分間灌流し、その後、細胞外液中から余分なローズベンガルを5分間洗い流す。そして、いよいよ光照射。スリットを自作すればスライス組織上に好みの照射領域を設定できる。照射用の光源は使用する光増感色素の吸収波長を含むものであればよい。ローズベンガルの吸収波長は $580\ \text{nm}$ 付近にあるため、顕微鏡のハロゲン光源を用いてもよい。図1bは顕微鏡光源（赤外波長はカットされたハロゲン光）を用いて照射出力 $50\ \text{mW}/\text{cm}^2$ （脳スライス上での強度）で20秒あるいは30秒間照射した場合の興奮性シナプス伝達効率の変化を示したものである。光照射時間によく相関してシナプス伝達が抑制され、さらに照射後数十分かけて徐々に回復することがわかる。もちろん強すぎる組織酸化は細胞死を誘導する。実験対象や目的に応じて光増感色素の濃度、光照射強度および照射時間を適

図1 光酸化法の概略と興奮性シナプス伝達抑制効果

(a) 光を吸収して3重項励起状態となった光増感色素から酸素分子にエネルギー移転が起こって一重項酸素分子が生成される。生成された一重項酸素分子は周辺分子と反応して組織を酸化する。酸化された神経組織ではシナプス伝達が抑制される。(b) ラット海馬スライス標本から記録した興奮性シナプス後電位を光酸化前を基準に相対値としてプロットした(20秒照射5検体および30秒照射7検体のそれぞれの平均値と標準偏差)。(文献4より、一部修正)

切に設定することがポイントである。ここで興味深いのは、光酸化強度をある範囲で設定すれば、神経の軸索伝達機能（活動電位の伝播）にはほとんど影響を与えず、シナプス伝達機能のみを選択的に抑制できることである。この事実はシナプス伝達機能が組織酸化に対してとりわけ脆弱であることを示しているのかもしれない。

さて、次にこの光酸化技術を自由行動下の動物の脳に応用してみよう。ハロセン麻酔下のスナネズミの脳内、特に行動制御にかかわっている線条体（右側背側線条体）へ $1\ \text{mM}$ のローズベンガルを $1\ \mu\text{l}$ 、細いガラス

図2 自由行動下のスナネズミ右側背側線条体への光酸化実験の概略と行動変化

(a) 光ファイバー挿入用ソケットを頭蓋骨に装着し、 $1.4\ \text{mm}$ 径の光ファイバーを用いて自由行動下のスナネズミ脳内光増感色素投与部位を硬膜の外から光照射した。(b) 光酸化前後におけるフィールド内($80\ \text{cm} \times 80\ \text{cm}$)でのスナネズミの1分間の行動軌跡(ニューロサイエンス社製ビデオイメージモーションアナライザーを使用して記録・解析した)。黒丸が動物行動のスタート地点で白丸が1分後の位置。(文献4より、一部修正)

管（先端径約50 μm ）を用いてゆっくりと注入する。ローズベンガル投与用のガラス管刺入に際して、頭蓋骨に小さな穴（直径1～2 mm）を開ける必要があるが、その上に光ファイバー装着用のプラスチックソケットを固定し、動物が動き回っても脳表面からの照射光が色素注入部位に安定して照射されるよう準備しておく（図2 a）。薄暗い部屋で動物を十分麻酔から覚まし、実験を開始する。光ファイバーをソケットに挿入し、動物行動をビデオ装置で録画しながらハロゲン光（赤外波長は含まない）を脳の外から照射した。脳深部では照射光がかなり減弱するため、脳表面上での照射出力を120 mW/cm²とスライス実験に比べて少し強めに設定した。そのときの動物行動の変化を図2 bに示す。光酸化によって背側線条体の神経伝達を中程度に抑制すると、動物は酸化側へのみ回転するようになる。その後、さらに酸化程度を増すと、動物の自発運動量が減少し、ついには自発運動が消失する。この行動変化も脳スライス実験で観察した神経伝達抑制と同様に可逆的であり、数時間から1晩のうちに完全に回復する。こうした実験をととして、脳内のさまざまな領域がどういったはたらきを担当しているのかを明らかにしていくことができる。

以上、生体組織への光作用を光増感色素を用いて増幅すれば、脳内の神経活動をある程度制御できることを述べた。詳細は文献4を参考にいただきたい。今後、本法はさまざまな光増感色素の選択・開発により、さらに特異的な神経活動制御が可能となることが予想され、将来的にもその応用に大きな広がりをもつものと思われる。しかし、光増感色素の投与は組織に侵襲を与えることでもあり、神経疾患の治療など、臨床医学への応用は難しい。はたして光照射だけで脳機能を制御することは不可能なのか？

3. レーザー照射法による神経伝達抑制

近年、医療の現場では「レーザー治療」などといった言葉が聞かれる。もちろん対象は脳ではなく、皮膚や筋肉などの末梢組織であるし、また、その言葉にはレーザー光のもつ大きなエネルギーを利用して生体組織を焼き切ってしまうような行為も含まれている。ただ、その一部に「レーザーで痛みをコントロールする」といった意味合いの治療も実際に存在するのだ。もちろん光増感色素を用いずに、いや、これが意外と効果があるらしい。当初、組織温度の上昇のせいであるとか、血流改善のせいだとか、その効果についての見解はまちまちであった。ところが最近になって末梢神経活動にレーザー光が直接影響しているのではという報告もされ

始めている⁵⁾。我々がめざすものは、生体へのダメージをできる限り抑えた可逆的な脳機能コントロールである。はたして可能か？ レーザー光を用いて挑戦してみた。

まずは手始めに光酸化実験同様、ラット海馬スライス標本から電気刺激で誘発される興奮性シナプス後電位を記録した。そして、神経刺激部位と記録部位を含む領域に組織透過性のよい波長830 nmの近赤外レーザー光を組織温度への影響の少ない低出力で照射してみた。すると、組織上での出力が0.1 W/cm²を過ぎたあたりから、光酸化ほど鋭敏ではないにしても神経伝達を抑制する効果が観察されはじめたのだ。1～4.8 W/cm²の出力範囲では照射開始後数分したあたりから一過性の神経興奮度の上昇の後、抑制効果が現れ、照射開始10分程度で抑制効果が最大となった。また、照射を止めると徐々に神経伝達は回復した。次に麻酔下のげっ歯類脳内大脳皮質や海馬を対象に、頭蓋骨に開けた小さな穴を通して脳の外からレーザーを照射してみたところ、やはり同様の神経伝達抑制効果が確認された（図3）

なぜ、レーザー光が神経伝達を抑制したのか？ 今のところ明確な答えはない。しかし、現在さまざまな方向から、そのメカニズムに迫りつつある。まず、組織温度への影響はどうか？ 中枢神経伝達速度が組織温度に鋭敏に影響を受ける点に注目し、本レーザー照射による組織温度上昇程度を見積もってみた。その結果、こ

図3 近赤外レーザー照射によるスナネズミ大脳皮質神経活動抑制効果

麻酔下（ウレタン1.0～1.2 g/kg体重）スナネズミ大脳皮質（一次聴覚野）における自発神経活動を記録し、硬膜の外から記録部位をレーザー照射した。レーザーによる神経活動抑制に先んじて、照射開始1分前後に一過性の活動増強がみられた。

こで用いた照射出力範囲であればたかだか1~2 までであると思われ、組織温度上昇による神経伝達抑制効果であるとは考えにくいという結論を得た。次に光酸化効果はどうか？ 生体にも微量ではあるが光増感効果をもった内在性色素が存在する可能性がある。そこで、組織中のタンパク質や糖、脂質を酸化すると形成されるアルデヒドをシッフ試薬を用いて組織化学的に描出し、組織の酸化程度をレーザー照射前後で調べてみた。しかし、前述した光酸化実験と比較して、神経抑制を期待できる程の組織酸化所見は得られなかった。

最近、著者らはパッチクランプ法を用いて海馬培養神経細胞の静止膜電位を観察しながらレーザー照射し、レーザー照射が膜電位を過分極させ、同時に膜抵抗を減少させることを見いだした。これらの事実、レーザー照射が活動電位の発生効率を下げ、さらにシナプス伝達効率をも低下させることによって神経活動を抑制していることを示唆している。しかし、いかなる分子メカニズムを介して神経細胞膜へのレーザー効果が発揮されているのかは、今もって謎のままである。また、電気生理学以外の実験・検討においても、レーザー照射が神経伝達機能のみならず、細胞内ATP/ADP代謝や脳血流など、脳代謝をも制御する可能性が見いだされつつある。今後、てんかんや精神外傷、虚血性神経障害、神経脱落疾患など、さまざまな中枢神経疾患治療へも応用されうもの期待され、生体へのより侵襲の少ない照射法の開発や安全基準を含めた照射ガイドラインの整備も必要となってくるであろう。基礎研究、臨床応用の両面において、ますます興味のふくらむ分野である。

4. まとめ

表1で光酸化法およびレーザー法による神経伝達抑制技術を比較した。これら光エネルギーを用いた脳機能制御技術は培養標本からスライス標本、*in vivo*系まですべてに利用でき、光照射野の設定、光照射強度、照射時間など多くのパラメーターを調節することによ

表1 光酸化法とレーザー法による神経活動抑制の比較

	光酸化法	レーザー法
光照射強度 および時間	1 ~ 120 mW/cm ² 数秒 ~ 数分	1000 ~ 5000 mW/cm ² 数分 ~ 数十分
神経伝達 抑制様式	シナプス伝達効率低下	活動電位発生効率および シナプス伝達効率低下
神経伝達抑制 メカニズム	組織酸化	細胞膜電位過分極 および膜抵抗低下?
組織侵襲性	光増感色素投与および 酸化による組織障害	ない あるいは 少ない

て研究目的に適した利用ができる。今後、光酸化法においては新たな光増感色素の開発が求められる。またレーザー照射法においてはその作用メカニズムの解明と、治療あるいは研究目的に合わせた波長・出力の選択が重要な課題である。

謝 辞

本研究の一部は井上科学振興財団および光科学技術研究振興財団の助成と文部省科学研究費（総合脳）により遂行させていただいた。なお、レーザー照射における神経伝達抑制実験は京都府立医科大学麻酔科学および生理学教室、同志社大学工学部知識工学科との共同研究によって行った。

文 献

- 1) Barker, A. T., Jalinous, R. and Freeston, I. L. (1985) *Lancet* **8437**, 1106-1107.
- 2) Ruohonen, J. and Ilmoniemi, R. J. (1998) *Med. Biol. Eng. Comput.* **36**, 297-301.
- 3) Martin, J. P. and Logsdon, N. (1987) *Arch. Biochem. Biophys.* **256**, 39-49.
- 4) Kataoka, Y., Morii, H., Imamura, K., Cui, Y.L., Kobayashi, M. and Watanabe, Y. (2000) *Eur. J. Neurosci.* **12**, 4417-4423.
- 5) Tsuchiya, K., Kawatani, M., Takeshige, C. and Matsumoto, I. (1994) *Brain Res. Bull.* **34**, 369-374.