昆虫の脳神経活動のイメージング

井濃内 順・藍 浩之*

脳・神経系の機能を明らかにするためには、個々の神経細胞レベルで行われる情報処理メカニズムの研究とともに、多数の個性の異なる神経細胞が一体となって動作し、遂行される情報処理のメカニズムの解明が重要である。近年、このような素子としての個々の神経細胞の活動とシステムとしての神経回路の活動の計測を可能にする光学的計測法が注目されている。

ここでは、光学的計測法の実験のプロトコールについて、現在われわれが行っている雄ワモンゴキブリ脳の嗅覚神経系回路における神経活動を光学的に計測する実験方法を紹介しながら、概説する。

1. はじめに

中枢神経系は多くの神経細胞から構成されている。その機能的素子としての個々の神経細胞の形態、神経結合やその生理学的性質については、主にガラス微小電極による細胞内記録法や、パッチクランプ法などの電気生理学的測定法を用いて、詳細に解析がなされてきた。しかし、中枢神経系を構成する個々の神経細胞の性質は、けっして均一的なものではなく、各々が個性を持っており、これらが巧みに組み合わせられることにより新たに神経回路としての性質が形成されと考えられる。すなわち、中枢神経系の機能を解析する場合、1つの神経細胞の働きを全てにあてはめて、単純にその集合である神経回路の働きとして解析することができない。したがって、中枢神経系の機能を明らかにするためには、個々の神経細胞の働きと、さらに個性の異なる神経細胞が協調したシステムの働き(神経回路の特性)の両方を統合的に理解する必要がある。

微小電極やパッチ電極による測定では、1つの神

経細胞の活動電位はもちろんのこと、静止膜電位や逆転電位などを直接的に計測することができるが、非常に小さな細胞や神経突起などの微小な部位からこれらを計測することは難しい。また、複数の電極を同時に用いて、多数の神経細胞や神経組織の活動を多点同時に測定することや、1つの神経細胞の細胞体、および神経突起などの異なる部位から同時に膜電位を記録することが困難である。これに対し、膜電位に感受性のある色素(膜電位感受性色素)を用いた光学的計測法は、多数の神経細胞の膜電位の同時計測や、1つの神経細胞の多くの部位での膜電位測定ができるという利点がある。近年、神経回路における広がりをもった神経活動の空間・時間的な動態を捉え、神経回路を伝わる興奮の様子を実際に見ることのできる光学的計測法が注目されている。

本稿では、このような光学的計測法について概説し、さらにこの手法を昆虫の脳神経系に適用して実際に神経活動を計測する方法を紹介する。

2. 膜電位感受性色素を用いた光学的計測法

1) 測定原理

膜電位感受性色素を用いた光学的計測法は、細胞の膜電位変化に応じて蛍光や吸収強度を変化させる膜電位感受性色素で神経細胞を染色し、細胞膜に取り込ませ、その色素の光学的(蛍光や吸収)変化として、神経活動を捉える方法である。膜電位感受性色素を用いた光学的計測法はこれまで種々の動物で試みられているが、膜電位感受性色素がどのようなメカニズムで膜電位を光学的変化に変換するのかについては、不明な点が多い。現在、膜電位に依存した細胞膜中での色素分子の配向や分布の変化、色素分子にかかる電場の変化による分子内の電荷の分布状

*Jun INOUCHI and Hiroyuki AI, 農林水産省蚕糸・昆虫農業技術研究所生体情報部神経生理研究室
(〒305 茨城県つくば市大わし1-2)

態の変化などによって光学的変化が起こると考えられている⁸⁾。

そして、①光学的変化と膜電位変化の時間経過と形状がほぼ同じであること、②光学的変化の大きさと膜電位変化の大きさととの間に、近似的に直線関係が成り立つことが知られている^{2, 3, 10)}。

2) 膜電位感受性色素

光学的計測用には多くの色素がスクリーニングされ、一般に膜電位感受性色素(Voltage-sensitive dye)と呼ばれている。膜電位感受性色素には、膜電位変化に対する高い時間応答特性を持つ fast-response dye(merocyanine 系, oxonol 系, styryl

系)とゆっくりとした応答を示す slow-response dye(cyanine 系, 一部の oxonol 系)がある。神経細胞の電気活動を捉えるのには、fast-response dye が用いられる。図 1 に、最近よく用いられる膜電位感受性色素を挙げておく。これらの色素は Molecular Probes 社(USA)、日本感光色素研究所(岡山)から入手できる。

色素としてどれが、適当であるかは試料によって異なる。実験を始めるときに、いくつかの色素について、応答の大きさ、色素応答が膜電位を忠実に反映しているか、色素の毒性⁹⁾、退色²⁾ などについて検討し、最適なものを選ぶようにする⁵⁾。

Voltage-sensitive dyes Fast dyes

RH155, Oxonol, Absorption

RH237, Styryl, Fluorescence

RH414, Styryl, Fluorescence

RH795, Styryl, Fluorescence

図 1 代表的な膜電位感受性色素

図2 光学的計測システムの例 HR Deltaron1700(富士フィルム)を中心とするシステムである。蛍光顕微鏡(左側)の下に、膜電位感受性色素で脳を染色したワモンゴキブリを置く。脳神経活動の動画イメージはビデオモニター(右側)に、その解析結果はPCモニター(中央)に表示される。

3) 染色の仕方

色素は生理的塩溶液、dimethylsulphoxide (DMSO)、エタノールなどに溶かした濃縮液を分注し、これを冷凍庫に保存し、使用直前に生理的塩溶液で希釈して用いる。脳スライス標本などの神経組織や培養神経細胞を染色する場合には、染色上問題ないが、動物種を問わず丸ごとの脳の場合には、結合組織、皮膜など余分な組織を取り除き色素に染まりやすくしてやる必要がある。染色方法としては、色素を溶かした生理的塩溶液中に標本を浸した後、余分な色素を洗い流す。濃度や染色時間は試料や色素によって異なり(0.1~数mg/ml, 数分~数時間)、個々の試料で検討しなければならない。染色中は、色素の退色を避けるために遮光するようにする。

3. 光学的計測システム

計測装置としては、光学顕微鏡を中心とした光照射系と光検出系から成るシステム(図2)が用いられ

る。光が透過する標本では吸光シグナルとして測定し、動物種を問わず丸ごとの動物の脳などのように光が透過しないものでは蛍光シグナルを測定する方法が用いられる。

1) 光学系

一般論としては、検出器に到達する光ができるだけ明るく、光自身のノイズができるだけ小さいことが、もっとも重要な条件となる。そこで、光学計測用の顕微鏡では、①光源をタングステン-ハロゲン光源に置き換える、②光路を切り替える場合、TVカメラあるいは35mmカメラ用のポートに100%の光がいくようにするなどの改造が必要となる場合がある。基本的に、それぞれの光学的計測の対象となる摘出標本、スライス標本、丸ごとの動物の脳皮質などの観察に適し、これらの条件を満たす落射蛍光あるいは透過型光学顕微鏡(正立顕微鏡、倒立顕微鏡、実体顕微鏡)を準備する。特に補足すべき重要な点について、以下に挙げておく。

図3 光学的計測に用いる光学系 落射蛍光計測の場合を示している。

①光源

光源には、一般的にタングステンハロゲンランプ(150W～300W)がよく用いられている。光量が多いほど得られる像は明るくなるが、あまり強い光の照射は色素の退色を早めたり、試料の活性に影響を与えるので注意が必要である。また、光源は直流安定化電源で点灯するのが、最も安定で雑音が少ない。

②光学フィルター

蛍光測定には、励起用フィルターと蛍光選択用のフィルターが必要である。吸光測定には測定波長を選択するバンドパスフィルターが必要となる。これらのフィルターは、十分な光量を得るため透過率が高いものを選ぶ。

③対物レンズ

倍率が同じであれば開口係数の大きな、できるだけ明るいレンズを選択する。

④顕微鏡

使用する色素が吸光と蛍光強度のどちらを測定するかによって、透過光用、または落射蛍光用(図3)の光学系を組む。光量の損失につながるミラーや全反射プリズムなどの光路中の要素は可能な限り取り除く。また、光路には電磁シャッターを光源とコンデンサーレンズの間に組み込み、データを取るときや試料にピン点を合わせるとき以外には、試料に照射光が当たらないようにし、試料の保護と色素の無用な退色を防ぐようにする。

2) 光検出器

電気活動を多数の領域から同時に記録できる、16×16素子のフォトダイオードアレイを受光素子とするカメラをもつ計測システム(浜松ホトニクス)や128×128素子のフォトダイオードアレイを受光素子とするカメラをもつ計測システム(富士フイルム)が入

手可能である。これらの光検出器は0.1%以下の光量変化を検出することが可能である。カメラは、顕微鏡にCマウントを用いて取り付ける。

3) データ(画像)の取得と解析

これらの光学的計測システムには、さらに画像を取り込むコンピュータの他、画像の取り込み、電気刺激のタイミング、シャッターの開閉をコントロールするための電気刺激装置などが必要である。測定の開始は電気刺激装置からのトリガーにより行う。タイミングとしては、画像を取り始める少し前に、シャッターを開き、画像を取得中に電気刺激を与える。そして、全てのデータを取得した後、シャッターを閉じるようにする。得られた画像は、光学的計測システムのプログラムを用いて、ビデオディスプレイでリアルタイムあるいはスローモーションで表示し、解析することができる。また、個々の受光素子

で得られたデータ信号の時間変化を波形として表示し、解析することも可能である。

4) その他の注意点

光学的計測においては、光学系と試料の振動によるノイズが問題となる。つまり、記録中における試料の振動によるカメラのフォトダイオードアレイの各素子に対するズレは光量変化を生じ、記録に影響する。そこで、光学系への床からの振動を除くために防震台を用いた方がよい。また、シャッターの開閉など振動原因になるものは、試料からできるだけ離すようにする。記録中の溶液の灌流による水面の揺れもノイズの原因になるので、水浸レンズやカバーガラスなどで水面を覆うなどの工夫が必要である。さらに、電源のノイズ、外来電磁波、外来光などの環境由来のノイズに対しても、適切に対応することが必要である。

図4 光学的計測の一般的なプロトコール

図5 光学的および電気生理学的計測結果の比較 A: ワモンゴキブリ中脳からの光学的応答。B: ガラス微小電極で記録した触角神経の電気刺激に対する細胞外誘発電位。矢: 脱分極性応答 矢じり: 過分極性応答。光学的応答は8回の加算平均で記録したものである。誘発電位では、脱分極性応答とこれに続く過分極性応答が、電気刺激(100 μ s)のアーチファクト(下向き)に重なって記録されている。

4. 昆虫の丸ごとの脳からの記録

図4に光学計測法の一般的なプロトコールを示してある。さらに、著者らが行っている具体的実験例を挙げて、昆虫の脳神経活動を光学的に記録するためのプロトコールを以下に示しておく。ワモンゴキブリ(*Periplaneta americana*)の全体標本を用いて行う *in vivo* の脳神経活動の測定の例である。

1) ワモンゴキブリの頭部クチクラを部分的に開けて、脳と触角神経を露出し、鞘皮を除き、これに蛍光色素(RH414あるいはRH795)を溶かした生理的塩溶液(数mg/ml)を滴下して、約1時間染色する。染色後、生理的塩溶液で洗浄し余分な色素を除く。

2) 落射型蛍光顕微鏡の対物レンズの下に染色した脳が位置するようにワモンゴキブリを固定台に固定し、中脳の露出部位に焦点を合わせる。

3) 触角神経に吸引電極を取り付ける。

(細胞外誘発電位を同時に記録するためのガラス微小電極を中脳に置く。)

4) 対物レンズで拡大した実像をつくり、この実像面上に128 $\times$ 128素子のダイオードアレイをもつ高速カメラ(時間分解能: 0.6ms)を置く。

5) 励起用フィルター、ダイクロイックミラーを通して脳に励起光を照射し、脳からの蛍光を蛍光選択用フィルターを介してカメラで受ける。まず、電気刺激装置を用いてシャッターを開き、光を照射した状態で背景となる画面を取り込む。次に、触角神経に脱分極方向の矩形波電流刺激を与えて同期活動電位を誘起する。背景画面との差分画像を増幅し、0.6msごとにフレームメモリに取り込む。(電極で誘発電位を記録し、電気的応答を確認する。)

6) コンピュータ処理により、各素子で得られた応答蛍光シグナルを観察し、解析する。光学的に捉えた膜電位変化の大きさは蛍光量の変化分(ΔF)と

図6 電気刺激による中大脳の光学的応答 A: 測定した脳部位を示す図。外枠の正方形が128×128素子から成るフォトダイオードアレイに相当する。AN, 測触角神経 DC, 中大脳 OL, 視葉 PC, 前大脳 B: 刺激直後の中大脳における脱分極性の応答(白く見える部分)。C: Bから5.4ms後の中大脳における過分極性の応答(黒く見える部分)。A, B, Cの外枠の正方形の一辺はともに約1.5mmである。

静止状態での蛍光強度(F)との比($\Delta F/F$)で表示される。得られたシグナルが小さくノイズが目立つ場合、同じ測定を繰り返し各データを加算したり、1回の測定中に隣接する時間ごとのデータを加算することによりS/N比を向上させる。(光学的手法により得られたデータと電極による誘発電位との比較検討を行う。)

7) 各素子ごとに得られた応答蛍光シグナルをコンピュータ処理によりビデオ信号に変換して、256階調の画像として出力し光学的応答の時空間パターンを動画再生(スローモーション)で解析する。

図5は、ワモンゴキブリの中大脳より得られた光学的応答の例である。触角神経への電気刺激によって中大脳に電気的応答が引き起こされる。この電気的活動を光学的応答(A)と微小電極により直接膜電位の変化として細胞外誘発電位(B)を記録した例である。脱分極性の応答と(A)と(B)との比較から、誘発電位の変化と光学的応答がよく一致することがわかる。触角上の嗅受容細胞は中大脳の糸球体(球形の神経叢)のなかで、2次神経細胞である出力神経細胞および中大脳内局所介在神経細胞とシナプスを形成している。出力神経細胞は多くの嗅受容細胞からの入力を受け取るとともに局所介在神経細胞による情報処理を受ける¹⁾。ここで記録された光学的応答は、糸球体においてシナプス結合をするこれらの神経細胞の膜電位変化が加算されたものであると

考えられる。

図6は、電気刺激を触角神経に加えたときの中大脳の応答を128×128素子のカメラで捉えたものである。刺激直後に、まず中大脳には脱分極性の応答(B)が現れ、これに続いて過分極性の応答(C)が現れることがわかる。

5. 光学的計測法の利点と問題点

光学的計測法は、従来の電気生理学的手法や形態学的手法では解析することが難しい神経回路レベルでの情報処理メカニズムを解析できる新しいアプローチである。この計測法の利点をまとめると、①電極を刺入できないような神経細胞、さらにはその局所的なシナプス部位や樹状突起などからも電気活動を記録することが可能であること、②多数の神経領域や神経細胞から電気活動を同時に記録できること、③神経細胞の形態的構築がよくわからない組織から、電気的活動を検出することができること、などが挙げられる。

ただし、光学的計測法にも問題点がないとは言えない。問題点は次のようなものである。①光学的応答や背景光の強度から静止電位を求めたり、シナプス電位を電圧を単位として表すことが難しい。②脳などの標本の深さ方向の解像力が不十分であること。すなわち、得られる光シグナル応答は個々の画素の

カバーする領域に含まれる複数の神経細胞の膜電位変化の総和であるが、この光学的応答の由来を明らかにすることは一般的には困難である。③色素の応答が微弱であり、動物種や細胞によっては測定が困難な場合がある。なお、②の問題については、膜電位感受性色素の細胞内注入により、組織中の単一神経細胞を染色することで解決できる可能性がある⁶⁾。

6. おわりに

本稿では、ここまで膜電位感受性色素による光学的応答の計測について述べてきたが、実は未染色の神経標本においても、神経活動にともなって光の蛍光、散乱、あるいは吸収の変化(内因性の光シグナル)が見られる⁴⁾。最近、Lieke⁷⁾はこの内因性の光シグナル応答をミツバチ中脳から捉えることに成功している。ただし、この内因性の光シグナルは神経の電気的活動に比べて時間経過がかなり遅いので、膜電位感受性色素を用いて神経活動そのものを捉える方法の方がこの点で優れている。膜電位感受性色素を用いる光学的計測法にも、上に述べたようないくつかの問題点があるにしろ、現時点においてこの方法が神経回路を構成する細胞集団の間での神経情報の伝達を直接捉える有力な手段であることは間違いないだろう。

われわれが、昆虫の脳神経活動を光学的に記録したいと考え、実験をスタートさせた当時、国内では昆虫の脳・神経系を対象とした、このような研究はまだ行われていなかった。試行錯誤を繰り返し、最終的に膜電位感受性色素を用いた光学的計測法で昆虫の脳を伝播する神経活動を捉えることに成功した。種々の動物の脳を研究の対象とする多くの研究者は、やはり神経回路を伝わる神経活動を目で見てみたいというのが夢であろう。従来からの電気生理学的手法と組み合わせ、この光学的計測法が導入されるこ

とで、神経回路等における情報処理のメカニズムの解明などが飛躍的に進むことが期待される。

文 献

- 1) Boeckh, J., Dister, P., Ernst, K.D., Hösl, M. & Malun, D.: In "Chemosensory Information Processing" D. Schild (ed.) 39, 201-227, Springer-Verlag, Berlin (1990)
- 2) Chien, C.B. & Pine, J.: *Biophys. J.* 60: 697-711 (1991)
- 3) Delaney, K.R., Gelperin, A., Fee, M.S., Flores, J.A., Gervais, R., Tank, D.W. & Kleinfeld, D.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 669-673 (1994)
- 4) Frostig, R.D., Lieke, E.E., Ts'o, D.Y. & Grinvald, A.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 6082-6086 (1990)
- 5) Grinvald, A., Frostig, R.D. & Lieke, E.E.: *Physiol. Rev.* 68: 1285-1366 (1981)
- 6) Grinvald, A., Salzberg, B.M., Lev-Ram, V. & Hildeshelm, R.: *Biophys. J.* 51: 643-651 (1987)
- 7) Lieke, E.E.: *Europ. J. Neurosci.* 5: 49-55 (1993)
- 8) Loew, L.M., Bonneville, G.W. & Surow, J.: *Biochem.* 17: 4065-4071 (1978)
- 9) Parsons, T.D., Kleinfeld, D., Raccuia-Behling, & Salzberg, B.M.: *Biophys. J.* 56, 213-221 (1989)
- 10) Ross, W.N., Salzberg, B.M., Cohen, L.B., Grinvald, A., Davila, H.V., Waggoner, A.S. & Wang, C.H.: *J. Membr. Biol.* 33: 141-183 (1977)