

バイオイメーシング

小山内 実

大阪大学大学院工学研究科
電気電子情報工学専攻

概要: 医学・生物学の研究が進み、生体の様々な事象が解明されてきている。しかしこれまでの生物学は、主に時空間的に静止した静的情報からデータを得ていた。しかしながら生体では、タンパク質や種々の機能物質が動的に変化しており、このような情報を生きた生体からの確に捉えることが医学・生物学の次のステップであると考えられる。そこで我々は、生体、特に脳における神経細胞活動をイメージングによりセンシング、画像化し、神経活動の時空間特性の解析を行った。このような研究により、医学・生物学の発展のみならず、電子デバイスの新たなニーズ開拓及び今後のイメージングデバイスの開発指標を提供することが可能となる。

研究成果

<in vitro イメージングシステムの確立>

従来の神経活動の計測にはガラス管微小電極を用いた電気生理学的な手法が用いられてきた。この方法は単一あるいは少数の細胞からの信号しか計測できないため、応答の時間特性を解析するには最適であるが、細胞応答の空間特性に関する解析には適さない。こうした空間特性の計測には、光学的な手法による画像計測が効果的である。細胞内カルシウム濃度は、活動電位により上昇することが知られており、膜電位変化の良い指標であると共に、細胞内の生化学的な状態を示す良い指標でもある。そこで、神経活動の時空間特性を計測・解析するための、カルシウムイメージングシステムを確立した(図1)[1]。本システムは高速冷却 CCD と高速波長切り替え装置により構成されており、従来のイメージングシステムと比べ高速かつ高感度な計測が可能である。また、カルシウムイメージングを行うためには、細胞内にカルシウム感受性蛍光色素を負荷する必要があるが、スライス標本のように厚みのある組織に、細胞の状態を保ちつつ、均一に効率よく色素を導入することは難しく、これまで成功している研究者の数は多くない。我々は、独自の方法を考案し、細胞の状態を維持したまま効率よく色素を負荷することを可能にした。これらのシステムと方法を用いることにより、高速イメージングだけでなく[2 など]、これまでほとんど報告の無い長時間(最大約4時間)のイメージングも可能になった[1][3][4]。

<in vivo イメージングシステムの確立>

上述の in vitro イメージングシステムは神経回路における情報伝達機構を精査するために必要なものであるが、脳における情報処理機構を明らかにするためには、生体の入出力を保った in vivo 実験が不可欠である。そこで、我々は細胞の膜電位を直接蛍光変化として取り出すことができる、膜電位感受性色素を用いた in vivo 実験のシステムを構築した(図2)[1][5][6]。細胞の膜電位はミリ秒オーダーの変化をするので、カルシウムイメージングに比べ、高速に画像を取得する必要がある。そこで、本システムは、CMOS イメージセンサを用いて高速化を図っている。また、in vivo 実験では、心拍により体動が生じることによりイメージングデータにノイズが混入するため、心電図を計測しその信号をメインのトリガーとし、心拍によるノイズを軽減している。

<大脳皮質視覚野における情報伝播の時空間特性>

大脳皮質視覚野は、古くから研究が行われている脳の領野の一つである。視覚野に関する研究は脳内での視覚情報処理機構を解明するための基礎研究だけでなく、現在その実現が期待されている視覚障害者の視覚を補綴するための視覚代行システムの開発のために重要な位置づけにある。

この視覚野において、我々はまず、視覚野スライス標本に対して、図1に示した in vitro イメージングシステムを用いて、刺激に対する視覚野信号伝播の時空間特性の計測・解析を行った。図3に大脳皮質視覚野スライスの4層に電流刺激を与えた

際の信号伝播の時空間変化を示す。前述のイメージングシステムを確立したことにより、従来のカルシウムイメージング法に比べ、高時空間分解の画像を取得することができ、視覚野における信号伝播の時空間特性が明らかになった[2 など]。

脳の情報処理機構の解明のみならず、視覚代行システムの実現のためには、in vivo 実験により、視覚入力を与えた際の脳活動と、人為的な電気刺激を与えた際の脳活動を比較検討する必要がある。そこで我々は、マウス的大脑皮質視覚野に膜電位感受性色素を取り込ませ、図2に示した in vivo イメージングシステムを用いて、視覚刺激に対する

脳活動の時空間特性を膜電位イメージングにより計測・解析した(図 4)。スポット光を左眼に照射したところ、右脳の一次視覚野を中心として二次視覚野にまで応答が広がった。光刺激を提示する位置を変化させることにより応答領域がレチノトピーに従って変化した [1][6]。この結果は、従前から行われている電気生理学的な計測結果より予測されたレチノトピー構造を反映しており、膜電位イメージングによる脳活動計測が、視覚野の応答計測に対して有用であることが明らかとなった。現在、人為的な電気刺激との応答の比較などを行い、視覚野における情報処理機構を精査している。

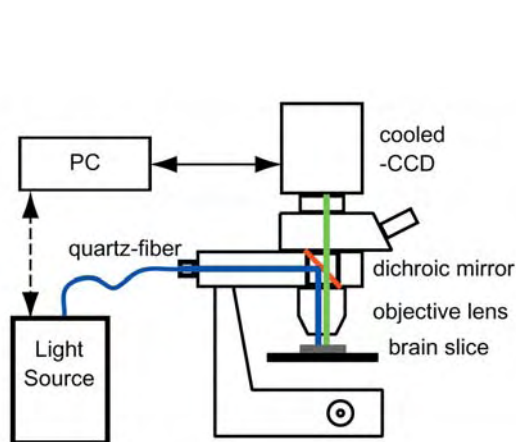


図1. in vitro イメージングシステム
高速冷却 CCD (Cooled-CCD) と高速波長切替装置 (filter changer) が顕微鏡に取り付けられている。

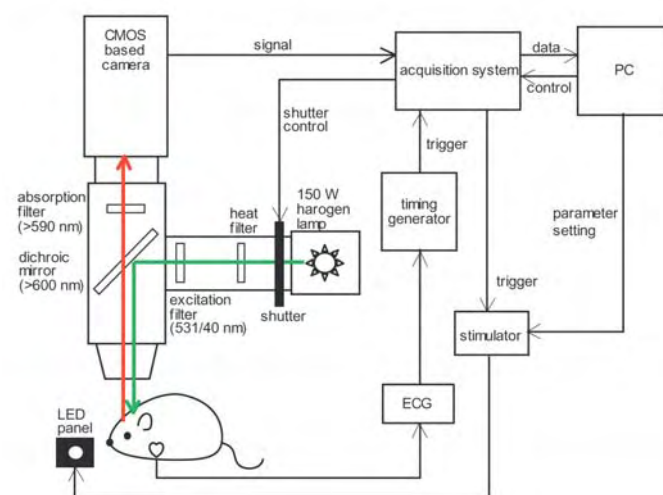


図2. in vivo イメージングシステム
フレームレート 1ms以下で撮像可能な CMOS イメージセンサを使用している。

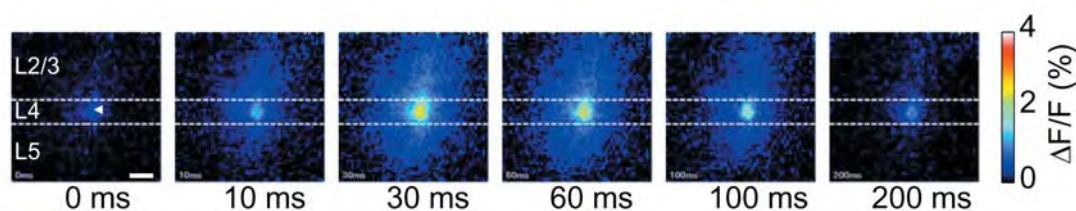


図3. 視覚野スライス標本における信号伝播の時空間特性

左端の図の白三角で示した場所に120 μ A 200 μ s の二相性電流刺激を与えた際の、カルシウム濃度変化の時空間変化を示している。各図の下にある時間は、刺激後の経過時間を示している。右のカラーバーで示したとおり、暖色系の色ほどカルシウム濃度が高いことを示している。スケールバー: 100 μ m。

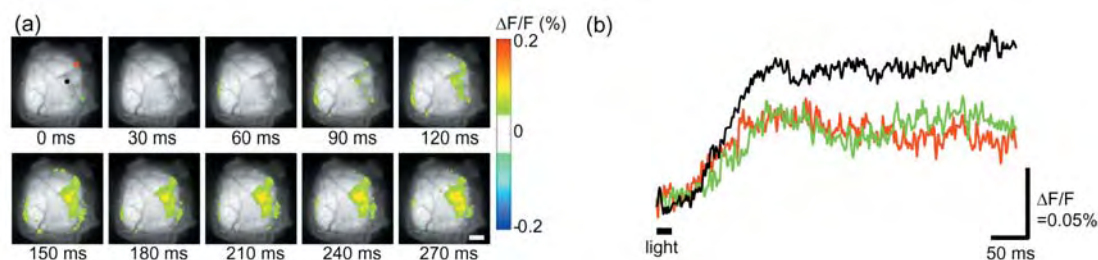


図4. in vivo 膜電位イメージングによる視覚野神経活動の可視化

(a) 時間0msで視覚刺激を与えた際の膜電位変化の時空間特性。各図の下にある時間は刺激開始からの時間を示している。右にあるカラーバーが示すように、暖色系の色は膜電位上昇を示しており、寒色系の色は膜電位減少を示している。スケールバー: 1 mm。(b) 膜電位変化の時間特性。線の色は、(a) 左上端の図中の場所と対応している。下の light と書かれた黒帯の時間に光刺激を与えた。

＜大脳基底核線条体における

持続時間の長い自発カルシウム変動＞

大脳基底核線条体は、運動制御、強化学習など様々な脳機能に関与していると言われており、パーキンソン病の原因部位であるとの報告から、急速に脚光を浴びている脳の領野である。我々は、この線条体スライス標本から、従来考えられていた神経活動と比べるとはるかに長い時間スケールの自発細胞内カルシウム濃度変化が多数の細胞で起こっていることを以前報告している[3]。しかし、脳の神経回路中にはニューロンとグリア細胞という大きく分けると二種類の細胞が存在するが、この区別は容易ではない。そこで、グリア細胞にのみ蛍光タンパク質であるGFPが発現している遺伝子組換え動物を用い、グリア細胞を可視化することにより、ニューロンとグリア細胞を区別した(図5上段)。その結果、ニューロン・グリアの双方で長時間持続するカルシウム変動が起こっていることが明らかとなった(図5下段)[4][7]。これは、脳の他の領野では発見されておらず、線条体特異的な現象であることが示唆される。現在この自発カルシウム濃度変化の発生機序、細胞間相互作用に関して研究を進めている。

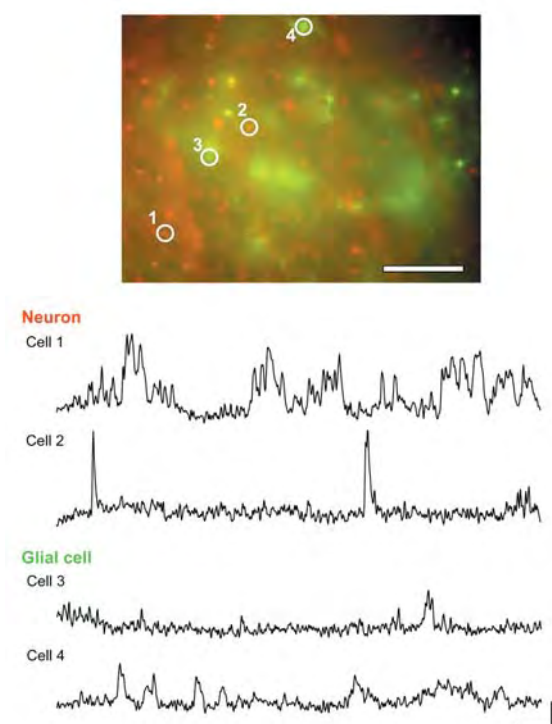


図5. 大脳基底核線条体における自発カルシウム変動

上段: カルシウム感受性色素の蛍光 (赤)と GFPの蛍光 (緑)を重ね合わせて表示した蛍光イメージ。1, 2で示した細胞がニューロンで、2, 3で示した細胞がグリア細胞。スケールバー: 100 μ m

下段: カルシウム濃度変化の時間経過。細胞の番号は上段の図の番号と対応している。スケールバー, $\Delta R = 0.01$, 100 s.

むすび

種々のイメージングデバイスを用いた、イメージングシステムを確立することにより、脳の情報処理機構の解明につながる、イメージングデータを得ることができた。このような研究は、イメージセンサの可能性を開拓すると共に、今後のセンサデバイス開発の一つの方向性を明確にすることができる。また、このような画像化技術は、医学・生物学の発展に寄与するだけでなく、工場のラインなどでの製品監視システムや、製品検査システムなどにも応用可能であると思われる。

参考文献

- [1] Osanai M, Okazaki Y, Shiroma S, Takeno Y, Kaizo H, Yamada N, Tanaka S, Yaguchi Y, Yagi T. "Visualization of brain activity from in vitro to in vivo", SCIS & ISIS 2008: 263-268, 2008.
- [2] Osanai M, Shiroma S, Takeno Y, Uegaki H, Tanaka S, Yagi T. "On the propagation of signals in visual cortex induced by electrical stimulation--Where to stimulate with a cortical implant?", Proceedings of the International Symposium on Biological and Physiological Engineering / The 22nd SICE Symposium on Biological and Physiological Engineering: 153-154, 2008.
- [3] Osanai M, Yamada N, Yagi T. "Long lasting spontaneous calcium transients in the striatal cells", Neurosci. Lett. 402: 81-85, 2006.
- [4] 小山内 実、矢口 雄一、山田 尚宏、大星 文人、八木 哲也. "線条体における自発カルシウム濃度変化", 電気学会論文誌 C, 128: 1050-1057, 2008.
- [5] 小山内 実、榮原 晴子、澤井 元、宋 文杰、八木 哲也. "網膜電気刺激に対する網膜および視覚野応答の光学計測", 電気学会論文誌 C, 127: 1595-1602, 2007.
- [6] 海藏 博之、岡崎 祐香, Tamas Fehervari, 澤井 元, 八木 哲也. "マウス視覚野における光および電気刺激に対する応答の光計測", 電子情報通信学会技術研究報告 107(541): 21-24, 2008.
- [7] Osanai M, Yaguchi Y, Yamada N, Yagi T. "Spontaneous Ca^{2+} transients in neurons and glial cells in the striatum", Program No. 179.14. 2008 Neuroscience Meeting Planner. Washington, DC: Society for Neuroscience, 2008. Online.