

研究題名	聴覚中枢活動の光学的測定法	報告書作成者	橋本 享
研究従事者	橋本 享		
研究目的	<p>膜電位感受性色素を用いて、聴覚中枢の電気的活動を可視画像化し、聴覚中枢の機能的構造を解明することを目的とした。従来の電気生理学的手法は、単一ニューロン活動の観測を対象としており、大脳の高級機能のごとく多数のニューロンの関与する活動の観察・記録は不得手で、本研究はこの隘路に突破口を開こうとしたものである。</p> <p>膜電位感受性蛍光色素溶液により実験動物(モルモット)の大脳皮質聴覚領を染色し、励起光の照射により発生する蛍光発光の空間分布パターンを落射蛍光実体顕微鏡と冷却CCDカメラで記録する。聴覚刺激を与え、それに対応して発生する中枢電気活動の空間分布を、蛍光発光の空間パターンとしてとらえることができる。蛍光発光は極めて微弱であるので、画像の積算や加算平均、背景パターンの減算などの画像処理が必要となる。これをビデオ・フレーム・メモリを備えたイメージ・プロセッサにより行なうが、音刺激と応答画像の収録を同期させるための実験制御用のハードウェア、ソフトウェアを開発した。音響パラメータと中枢活動の局在との対応関係を明らかにするために、あらかじめデジタル記録した実験動物の種固有の音声および音響パラメータを任意に制御することができる合成音声を刺激音に用いた。種固有の音声のデジタル収録はトランジェント・メモリ(Autnics製: Auto Digitizer S210)をパソコン制御(PC9801)して行い、バイナリ・ファイルとして整理して、鳴き声のレパートリとして用意した。レパートリの中から任意の音声の再生は、選択したバイナリ・ファイルをパソコン制御の下にトランジェント・メモリに逆に転送し、トランジェント・メモリにおいてD/A変換し、アナログ出力を得て、これを刺激音源とした。このシステムを用いて、実験動物の右側の耳にコンカル・ホーンを介してイヤ・スピーカ(ソニー製: MDR-152)から刺激音を与えて、実験動物の種固有の鳴き声に対する左側の聴覚中枢の活動を可視画像化した。また聴覚中枢の周波数局在の全体像を可視画像化して、鳴き声に対する応答パターンと対比して音声認識のプロセスにおける周波数スペクトル分析の有様を調べた。</p> <p>本研究で取り上げた膜電位感受性色素による細胞活動の光学的記録法は、優れた性質の色素(応答時間: <math>20\mu\text{s}</math>以下、感度: <math>10^{-3}</math>-<math>10^{-4}</math>)がポテンシャル・プローブとして実用化されたことにより、神経細胞個々の細胞膜電位変化を光学的に計測できるようになった。各細胞に微小電極を刺入することなく同時に多数の細胞の細胞膜電位を記録することができる。中枢電気活動は非常に多数の細胞の同時的な活動にその本質があるので、それらの同時記録はポテンシャル・プローブの適用が有用な分野である。膜電位の光学的記録法としてよく知られているのは、光学ディテクタにフォト・ダイオード・アレイを用いる方法であるが、ディテクタの数に制約のあることから空間分解能が十分でない。ビデオ・カメラをディテクタに選んだところが本研究の特色で、画素数が数十万とフォト・ダイオード・アレイに比べて格段に多数のディテクタを備えているという特徴から、十分な分解能が期待できる。ビデオ・カメラは、フレーム・レートをより時間分解能に制約があるが、この難点は、膜電位感受性蛍光色素を用い、励</p>		

研究内容

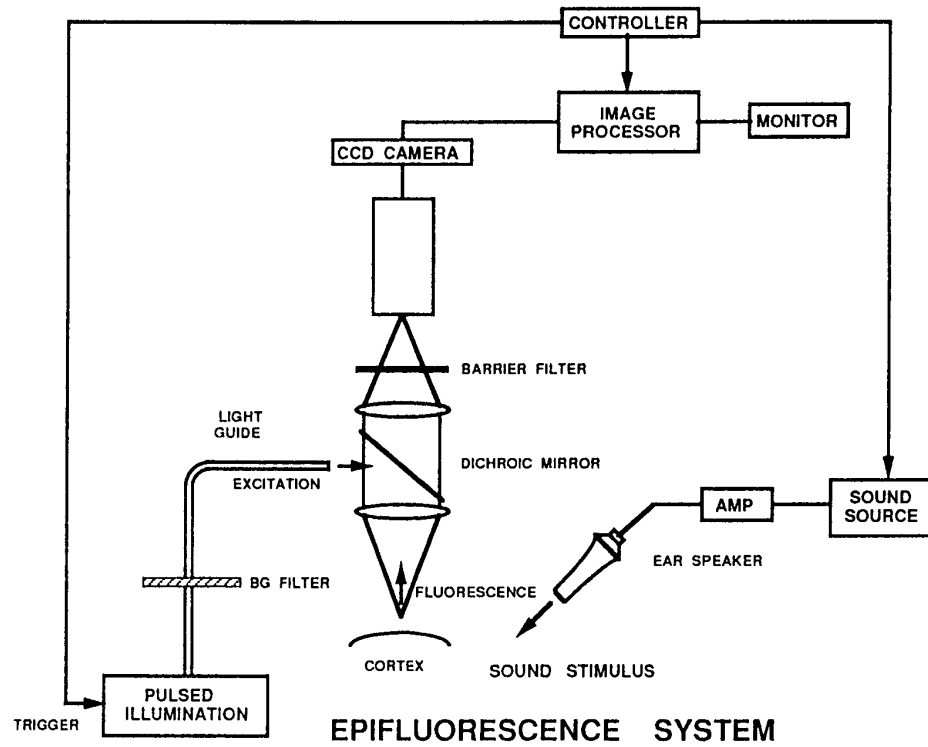
起光を フレームレート に同期してパルス状に照射し、蛍光発光の瞬時パターン の収録を図ることにより解決した。画像観測の時間分解能を改善するために、現用の実験システムは説明図 1 に示したように、Xe 放電管のパルス発光を励起光に用いて膜電位感受性蛍光色素をパルス励起し、冷却 CCD カメラを光学的測定 のディテクタに採用した。冷却 CCD カメラは、冷却による熱雑音の減少によって S/N の改善が期待できること および両者の組合せによって、サンプリグ・ミクロスコープ による超高速現象の観測と同様の原理で、中枢電気活動の空間パターンを時間的にサンプリングすることができる。しかし当初の実験システムでは、ビデオ・カメラに高感度の ニュービコン TV カメラ を用い、励起光にはハロゲンランプを使い、電子シャッタにより照射を時間制御したので時間分解能は 10 ms に留まった。

本研究のために試作した落射蛍光測定システム の中心は、落射蛍光実体顕微鏡(Hi-Land社製)で、ハロゲンランプまたは Xe 放電管より得た光を、干渉フィルタ経由で波長選択(500~560 nm)してから、ライト・ガイドを通じてダイクロイック・ミラー(580 nm)に導き、聴覚領を落射照明し、細胞膜に取り込まれた蛍光色素を励起する。励起により発生した蛍光発光はダイクロイック・ミラー(580 nm)を通過・直進し、バリア・フィルタにより選択された長波長(610 nm~)成分がビデオ・カメラ(ニュービコン WV-1900: 松下通信機製 または 冷却 CCD カメラ C4880: 浜松フォトニクス製)の受光面に結像する。蛍光画像の撮像と画像処理、励起光の照射及び音刺激の同期をとることができるように、落射蛍光実体顕微鏡の制御システムは構成されている。

中枢活動の可視画像化には、応答画像の S/N の点から、多数のニューロンの同期的活動の存在が前提条件となっているが、背景画像の揺らぎに起因する雑音が応答画像の観測を妨げている。落射蛍光実体顕微鏡の視野内の皮質表面は、呼吸運動や心拍動に伴い周期的に動いている。これが背景画像の揺らぎの原因で、この上に微弱な応答画像が重畳しているわけである。音刺激の有無に対応した 2 枚の画像の差分を取ると、応答画像だけが現れてくるといのが中枢活動の可視画像化の原理であるが、画像減算の残渣が応答画像の S/N を著しく悪化させている。背景画像の揺らぎに起因する画像減算の残渣を減らすために皮質表面の動きの周期性を利用した。画像収録を心拍動に同期させる、すなわち蛍光色素のパルス励起を心電図に同期して心拍動の一定位相で行うと、見かけの静止画像が得られる。心拍動に由来して周期的に揺らいでいる聴覚領表面をストロボスコープ的に観測すると、見掛けじよう静止しているように見える画像が得られ、皮質表面の動きの影響は相殺され、差分画像には現れてこない。この方法により画像減算の残渣は -20dB 程度軽減される。図のシステムで用いた イメージ・プロセッサ(浜松フォトニクス製: C4880 コントロールユニット, IQ-D100 フレーム・グラバ)は 14-bit の A/D 変換分解能を備え、 $2 \times 10^{-4}$  の微弱信号を検出することができる。総画素数: 1,024x1,024 の各画素に対して 16-bit のデジタル出力が得られる。画像処理能力は積算・平均加算および 2 枚の画像の相互減算に当たる差分画像の集積を行うことができる。これらの画像処理はフレーム・グラバを経由して接続されたパソコン (Apple 製: Macintosh II 系) によって、C4880 コントロールソフトウェアの制御の下に行われた。収録された画像は 2MB のファイルとして光磁気ディスクに保存し、オフラインでのデータ処理に備えた。オフラインでの画像処理は IPLab Spectrum (Signal Analytics 社製) により行った。

<p>研究内容</p>	<p>説明図2に鳴き声に対する応答を示す。各図は図の左右に示された音刺激、刺激開始後の経過時間に対する蛍光発光パターンの差分画像である。中間の2枚の画像に用いた音刺激は調波構造を持った鳴き声で、ソナグラムによると GC21 は 13.5kHz, GPCAL1 は15kHz と、最上段の正弦波純音 トーン・バースト(16kHz)に近い周波数成分を含んでいる。中央左上部に、3枚の画像に共通してみられる暗い領域は蛍光発光の減少を示し、そのすぐ下に帯状に見られる明るい領域の存在は、神経活動が下から上へすなわち聴覚領表面を外側から内側へ移っていくことを示している。最下段は音刺激のない条件で上の3枚と同様の差分演算を行ったもので、画像減算の残渣、すなわち背景画像の揺らぎに起因する誤差である。最下段の図との比較という見方で、他の3枚の図を見ると、刺激開始後の経過時間 18ms と 15ms に現れる蛍光発光パターンの差分画像に聴覚領の応答の空間分布が画像化されている。T=15~18msは聴覚領の誘発応答の潜時に対応し、微小電極により聴覚領から単一ニューロン活動を記録すると、最初の神経インパルスが観察される時間帯であるので、画像化された神経活動はこの神経インパルスの空間分布を画像化しているであろう。</p> <p>実験動物の種固有の音声に対応して中枢電気活動が複数の島状の領域に集中することが観察されたが、鳴き声の各レパートリに対応してそれぞれ、種固有でかつ個体間にも共通の応答パターンを確立するにはまだ至っていない。</p> <p>種固有の応答パターンの存在を示し、刺激応答関係を確立することができれば、これは音声認識機構の所在を可視画像化したことになり、鳴き声を媒介とする音声通信の中枢機構とニューロ・コンピューテーションの全貌が明らかになる。今後はこの方向に研究を進め、音声音語の原型として鳴き声に対する聴覚情報処理のメカニズムを明らかにすることができれば、話し言葉の認識機構の解明に本研究の成果が貢献することができるものと考えている。</p>
-------------	--

説明図 1 聴覚中枢電気活動の光学的測定システム



(注： フローチャート図，ブロック図，構成図，写真，データ表，グラフ等 研究内容の補足説明に御使用下さい)

様式-10

### TEMPORAL SHIFT OF RESPONSIVE REGION DIFFERENTIAL IMAGE

EX: 500 \* 30 nm  
FL: R 610  
RH: 795 : 1 mg/ml

#### REFERENCE

16 KHz  
50 dB SPL  
T = 15 msec

#### TONE BURST

16 KHz  
50 dB SPL  
T = 18 msec



#### ANIMAL CALL

GC 21  
46 dB SPL  
T = 18 msec



GC 21  
46 dB SPL  
T = 15 msec

GPCAL1  
46 dB SPL  
T = 18 msec

ANT

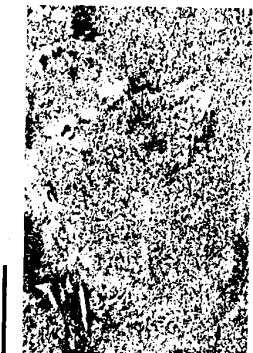


GPCAL1  
46 dB SPL  
T = 15 msec

POST

LAT

#### RESIDUAL NOISE



N = 16  
1 mm

説明図 2. 鳴き声に対する応答

上段：刺激音：16kHz のトーン・バースト (持続時間：50ms, 音圧：50dB SPL)  
 刺激開始後 18ms と 15ms における蛍光発光バターンの変化 (差分画像)  
 2段：刺激音：鳴き声 (調波構造のあるもの(GC 21), 音圧：46dB SPL)  
 刺激開始後 18ms と 15ms における蛍光発光バターンの変化 (差分画像)  
 3段：刺激音：鳴き声 (調波構造のあるもの(GPCAL 1), 音圧：46dB SPL)  
 刺激開始後 18ms と 15ms における蛍光発光バターンの変化 (差分画像)  
 下段：画像減算の残差 (無刺激時における背景画像の揺らぎ)  
 ANT: 吻側, POST: 尾側, MED: 内側, LAT: 外側 (聴覚領表面において)

N11-98