

研究題目	脳スライスを用いた聴覚皮質における信号処理ネットワークの光学的計測	報告書作成者	窪田道典
研究従事者	窪田道典		
研究目的	<p>大脳皮質には機能局在があり、聴覚野、視覚野、体性感覚野などの部位に分かれていて、それぞれの感覚情報の処理を行っている。また、それぞれの感覚野には、それぞれ特徴的な機能的構造が存在する。例えば、視覚野における、方向選択性コラム構造や眼球優位コラム構造、あるいは体性感覚野における、ヒゲに対応するパレル構造などである。聴覚野にも機能的構造があり、聴覚受容器（蝸牛）の特徴を反映した、音の高低を決定する周波数を表す構造が存在する。即ち、大脳皮質聴覚野の個々のニューロンは、最適周波数（応答閾値最小の周波数）を持ち、同様の最適周波数を持つニューロンは規則的な集団を成している。この構造は、等周波数帯と呼ばれ、帯状の構造をしているのが特徴である。この等周波数帯の方向は種によって異なるが、いままで調べられた哺乳動物には、全て存在していることが分かっている。しかし、この機能的構造が、音の情報処理にどのように関与しているのか分かっていないし、等周波数帯内のニューロン間の相互作用も分かっていない。</p> <p>これまでは、主に、微小電極法によってニューロンの性質を調べる研究がなされてきた。この方法は、個々のニューロンの性質を詳しく調べるのには適しているけれども、多数のニューロンから同時に記録することが困難であるという欠点を持っている。そのため、大脳皮質における情報処理、即ち、ネットワークとしての信号処理を解明する方法としては、適していない面がある。膜電位感受性色素を用いた光学的計測法は、微小電極法の欠点を補う計測法として、近年、盛んに行なわれるようになったものであり、多チャンネルから同時に神経活動を測定できるという利点を持っているので、ニューロン集団の活動を時空間的に調べるのに適している。実際、この方法は、大脳皮質聴覚野にも用いられ、電極法では分からなかったダイナミックな活動を捕らえることに成功した。しかし、生きたままの動物を用いた時には、測定された大脳皮質の活動が、皮質それ自体の性質をどこまで表わしているのか、あるいは皮質下からの入力の影響がどの程度なのかということは分からない。そこで、本研究では、大脳皮質聴覚野から切り出したスライス標本に対して、光学的計測法を適用し、多チャンネルの高速高空間分解能を持つ光センサーによる計測を行い、等周波数帯内の信号伝達様式や相互作用を明らかにすることを目的とする。</p>		

研究内容

光学的計測法に用いた装置は、空間的解像度においても、時間的分解能においても優れている HR Deltaron 1700 (富士写真フィルム製) を使用した。この装置は、128 × 128 個のイメージセンサーから成り、0.6 ms の時間分解能を持つ。この装置においては、まず、参照イメージと呼ばれるデータを一つのフレームメモリーに貯える。それから、0.6 ms 毎に得られるイメージデータと参照データとの差分を取り、これを 400 倍、あるいは 1000 倍したデータを別のフレームメモリーに貯えるという操作を行う。この操作によって、階調数 16 bit 以上に相当する分解能を持つようになる。このような高階調数が必要なのは、膜電位感受性色素による信号の大きさが、0.1% 以下と小さいためである。この差分イメージデータは、光によるショットノイズなどを減少させるために 16 回加算平均する。このようにして得られた差分イメージデータを、さらに参照イメージデータで割算することによって、イメージデータは吸光度あるいは、蛍光の比の変化として表される。この装置を倒立型顕微鏡に取り付け、150W のハロゲンランプを照射光源とし、干渉フィルター (700 ± 30 nm) を通して標本に照射した。照射時間はシャッターによって制御し、できるだけ退色や photodynamic damage を防いだ。

ラットを Nembutal (50 mg/kg) で麻酔した後、断頭し、脳を取り出し、氷で冷やした Krebs-Ringer 液に浸けた。それから聴覚皮質の脳スライス標本 (厚さ 400 μm) を、スライサーによって前額断に切り出し、インターフェイス型のチェンバーに移した。スライス標本を、1 時間以上このチェンバーで incubate (33°C) した後、吸光型の電位感受性色素である RH482 (NK3630) で染色した (0.1 mg/ml, 15 分)。その後、染色したスライス標本を記録チェンバーに移し、30°C に温めた Krebs-Ringer 液で灌流した。記録チェンバーを、倒立顕微鏡のステージ上に置き、4 倍の対物レンズ (開口数 0.2) を用い、記録した。刺激には、タングステン電極を用い、これを白質と皮質第 6 層の境界、あるいは第 2・3 層に置き電気刺激を行った (0.5-1.5 mA, 0.1 ms)。記録されたイメージデータには、3 × 3 ピクセルの空間フィルターをかけ、時間的にも移動平均を行い、装置に起因するノイズなどを減少させた。記録とその後の処理には、パーソナルコンピュータ (Power Macintosh 8500) を用い、データは、一旦ハードディスクに落とした後、光磁気ディスクに保存した。説明書の図 1 に、脳スライス標本を用いた、電位感受性色素による光学的計測法のための実験装置の概略図を示す。

研究概要報告書

(/)

<p>研究のポイント</p>	<p>生体での大脳皮質聴覚野における光学的計測法によると、純音刺激による興奮活動の領域が、時間と共に等周波数帯に沿って、移動することが明らかにされた。しかし、皮質聴覚野で見られるこの興奮活動の移動は、皮質下から投射する入力を持つ性質なのか、あるいは聴覚皮質それ自体の持つ性質なのかは、分かっていない。また、生きたままの動物では、皮質表面に沿った方向での応答は観察できるものの、皮質に直角な方向（深さ方向）での応答を観察することは困難である。しかし、スライス標本では、このような実験は比較的容易である。ここにスライス標本の有用性があるものと考えられる。スライス標本における大脳皮質聴覚野では、興奮活動は、水平方向（層に沿った方向）に時間と共に大きく広がった。とくに、第2・3層における興奮活動が顕著であった。従って、入力空間的な変化がなくても、聴覚皮質においては、興奮活動が時間と共に空間的に移動することが分かった。また、皮質聴覚野における興奮活動の水平方向の拡がり、皮質視覚野において報告されている水平方向の拡がりの約2倍も大きい。この違いは、視覚系と比較して、聴覚系では、時間的に変化する音情報を、素早く処理しなければならないという、情報処理の違いからきているのかもしれない。</p>
<p>研究結果</p>	<p>白質と第6層の境界を刺激すると、まず、興奮活動は、脳表面に向かって上行し第2・3層に達する。第2・3層に達すると、そこで、大きく興奮の程度を増し、さらに水平方向（層に沿った方向）にその興奮活動が時間とともに拡がるのが観察された。この水平方向の拡がり、2 mm 程になり、水平方向における興奮活動の伝播速度は、約 0.2 m/s であった。この値は、通常の液中（γ-アミノ酪酸による抑制系をブロックするピククリンなどの薬品を加えていない灌流液中）で観測される、皮質内の軸索の伝導速度と同じである。説明書の図2に、この興奮活動の光学的計測法による測定結果を示す。さらに、第2・3層の刺激によっても、この層における興奮活動は水平方向に大きく広がった。この時、第5・6層には、弱い興奮しか観測されなかった。大脳皮質内における水平方向の興奮伝播には、第2・3層と第5・6層との相互作用が必要であるという報告がある。しかし、上記の結果はこの報告とは異なり、大脳皮質聴覚野においては、水平方向の興奮伝播は、第2・3層と第5・6層とでは、独立に行なわれ得ることを示すものである。</p>
<p>今後の課題</p>	<p>今回の研究では、ラットの等周波数帯の構造は、腹背側方向に沿うものと考えて行なってきた。この知見は、これまでに行なわれてきた、微小電極法を用いた聴覚皮質の研究に基づいているので、間違いないものと考えられる。しかし、その微細構造は、個々のラット毎に異なっている可能性がある。そのため、ここで用いたスライス標本では、等周波数帯の微細構造が、実際にどうなっているのかは、分からない。この問題を解決するためには、生きたままの動物を使って、あらかじめ皮質聴覚野の等周波数帯の微細構造を決める必要があるだろう。そのため、色素を使わずに脳の活動を見ることができる、内因性信号の光学的計測などを行ない、等周波数帯の微細構造を決めてからスライス標本を作成することが必要となるだろう。</p>

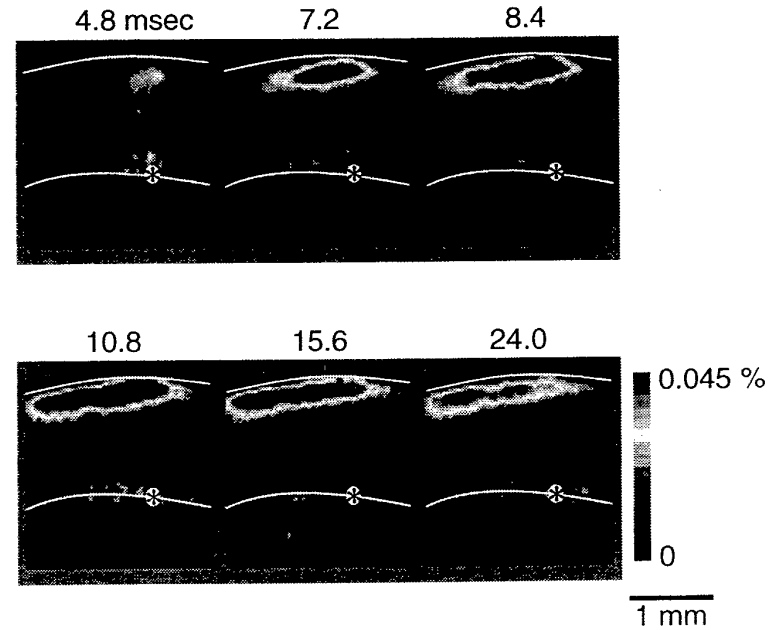
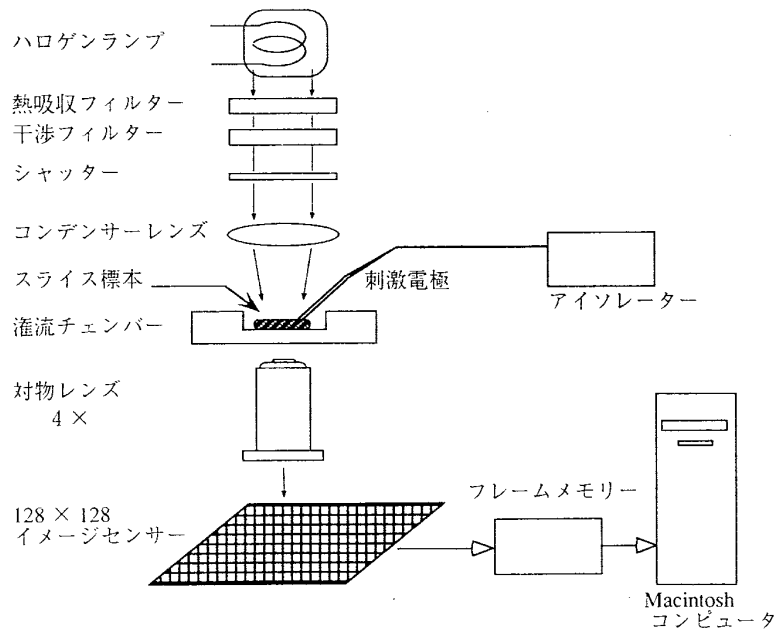


図1. スライス標本を用いた電位感受性色素による光学的計測法の概略図。

ハロゲンランプからの光を干渉フィルター(700 ± 30 nm)を通し、電位感受性色素(RH482)で染色したスライス標本に照射する。この色素によって電位変化は吸光度の変化に変換され、この吸光度変化を128×128のイメージセンサーで測定する。このようにして得られたイメージデータは、一旦フレームメモリーに格納されてから、コンピュータのハードディスクに落とされ、最終的には光磁気ディスクに貯えられる。

図2. 光学的計測法による大脳皮質聴覚野スライス標本における白質と第6層の境界の電気刺激による興奮活動。

上の数字は、刺激後の時間を示し、アスタリスクは、刺激部位を示す。上の線は、脳表面、下の線は、白質と第6層との境界を示す。興奮は、第2・3層に達した後、この層に沿って時間と共に、大きく拡がるのが分かる。