

脳・神経活動の実時間計測

松本 元*・市川 道教・飯島 敏夫

脳の電気的活動は、脳内に電極を刺入することで高感度に実時間計測することはできるが、計測位置は電極1本につき1箇所であり、しかも $10\text{ }\mu\text{m}$ より細い神經細胞への電極刺入はきわめて困難であり、また神經細胞へ刺入した電極を数時間にわたってこの刺入の状態を維持し続けるということもきわめて難しい。電極を用いた脳の電気活動計測は高感度であり、神經細胞の状態を電気的に制御しながら細胞の性質に関する詳しい情報について計測できるなどの利点は脳研究にとって大いに有用である。しかし、さらに脳の電気的活動を実時間に広域にわたって高空間解像度に計測することができたら、というのは脳研究者の夢である。

この方向へ向けて、脳活動の光計測法の原理が1970年代より米国の神經科学者を中心に、イカの神經興奮の分子機構の解明をめざす研究の中から生み出されたのである。この解明研究では、神經興奮（活動電位の発生）が細胞膜の形態変化を伴う、という仮説を光学計測によって実験検証することを試みたのである。しかしこの膜変化に伴って生じる偏光強度や光散乱強度の変化量は $10^{-5}\sim10^{-6}$ ときわめて小さく、繰り返し加算平均することが必要で、膜変化の物性的原因について定量的議論が難しかった。そこで、膜を蛍光色素や吸光色素で染色し、神經興奮に伴う光変化の大きさを增幅することがなされた¹⁾。しかし、外部から色素で膜を着色するという新たな外因を導入したため複雑な要素を加えることになり、膜変化の物性に関する解釈は明白でないこととな

り、当初の研究目的は必ずしも果たされてはいない。現在も脳の形態変化と神經興奮との相関にかかる分子機構については、膜の微小な機械的变化や微量で高時間分解の熱発生などの計測²⁾、さらには神經膜近くの分子構造の形態的研究^{3,4)}によって研究が進められている。しかしこれらの研究がもととなって、神經細胞の電気的活動を光計測する原理が確立したのである⁵⁻⁷⁾。それは、蛍光、吸光色素の中で、神經細胞の電気的活動の時間経過と光変化の時間経過がきわめてよく一致させるものがあること（このような色素を膜電位感受性色素と呼ぶ）を発見したからである。図1はイカ巨大軸索の活動電位を軸索内に電極を刺入しての膜電位記録と、軸索外を膜電位感受性色素で染色して蛍光強度変化の時間記録を同時に行ったときの例である。両者の時間経過がきわめてよく一致することがわかる。しかし、光変化量が定常光の 10^{-3} 程度と小さく、両者の信号対雑音比に大きな隔たりがあることにもすぐ気がつくことである。

1. 脳活動の光計測の原理

脳や神經細胞を電圧感受性色素で染色する。この色素がどのような分子機構を通して膜電位を光信号に変換するのか、についての詳細は明らかではない。最も一般的な説明としては、色素がモノマーの状態から膜電位変化によってダイマーの状態に変換され、その結果膜に付着している色素の配向が変化するので、蛍光や吸光度に変化が生じる、というものである⁸⁾。膜電位変化と光変化の大きさの間には直線的な関係があり、両者の時間経過の間もよく一致するものがある。活動電位の時間経過を光変化として忠実に計測するためには、色素は少なくとも $100\text{ }\mu\text{s}$ の早さで膜電位変化に光変化が追隨するもの

電子技術総合研究所（〒305 つくば市梅園 1-1-4）

* 現在：理化学研究所国際フロンティア研究システム
（〒351-01 和光市広沢 2-1）

E-mail: gen@postman.riken.go.jp

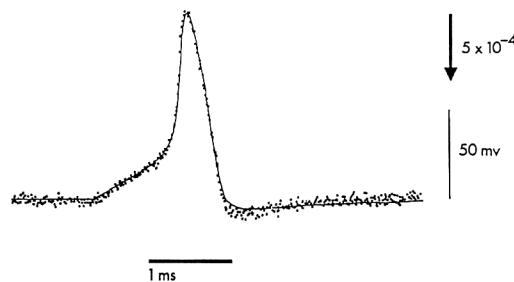
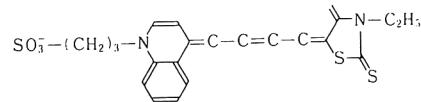


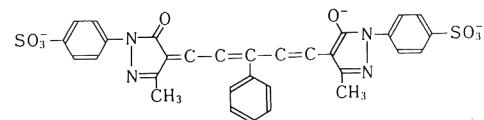
図1 ヤリイカ巨大軸索の活動電位の時間経過を軸索内外に電位電極を刺入して記録した場合（実線）と吸光度変化の光計測によって計測した場合（ドット）の両者の比較をしたもの。同時記録によって両者の比較をした。右の2つの縦棒は電極と光計測の大きさの尺度をそれぞれ細線・太線で示す（W. N. Ross, et al.: J. Membrane Biol., 33 (1977) 141-183より引用）。

でなくてはならない。また、色素としては、細胞膜に付着してその性質を変えたり毒性を示すことが極力小さく、水溶性であることが望ましく、かつ電位変化に伴う光変化の大きさがなるべく大きいことが必要とされる。膜電位変化を光変化として計測する原理の発見以来、色素の開発研究は地道に続けられ、多くの種類の色素がアッセイされた結果、現在脳・神経細胞の光計測に用いられる代表的色素は図2にみられるようなものである。これらの色素を用いたとき、100 mVの膜電位変化（活動電位の大きさに相当）に対する光変化は、神経細胞に定常的に照射される光の0.1%程度である。将来、この光変化量のさらに大きな膜電位感受性色素が研究開発されれば、光計測法はさらに脳・神経細胞の活動計測の強力な手法となるだろう。光計測法のさらなる発展が脳・神経細胞の研究の飛躍的発展に結びついていることを考えると、色素開発の占める重要性の比重はきわめて大きい。

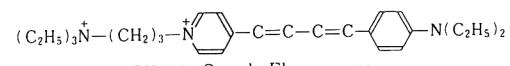
脳・神経細胞の活動が光信号に変換されるとフォトダイオードで受光し電流電圧変換され、その変化分を交流結合増幅器（増幅度300～1000倍）で増幅することにより、オシロスコープ上で神経活動の時間経過を可視化して計測することができる⁸⁾。したがって、受光装置は、0.1%程度の光変化をS/Nよく捉るために高いダイナミックレンジと低雑音型であること、さらに早い神経活動がミリ秒の時間オーダーであることからサブミリ秒の時間計測できることが必須となってくる。特に後者の要請は、脳・神経活動を多点にわたって光計測し、空間の広い領域からの活動状況をイメージング（画像的に可視化）しようとする場合、高速の（例えば毎秒



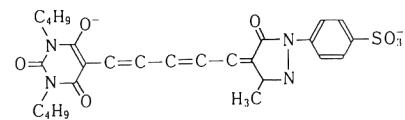
XVII. Merocyanine, Absorption, Birefringence



RH155. Oxonol, Absorption



RH 414, Styryl, Fluorescence



XXV. Oxonol, Fluorescence, Absorption

図2 脳・神経細胞の活動の光計測に用いられる代表的膜電位感受性色素。メロシアニン系、オクサンノール系、スチリル系の有機化合物で、それぞれAbsorption, Fluorescenceと表示してあるのは吸光強度変化用、蛍光強度変化用として用いるのに適していることを示す。吸光強度変化用としてはRH 155、蛍光強度変化用としてはRH 414などを用いることが多い。

2000フレーム程度のスピードの）画像撮影・処理を必要とする。これらの用件を満たすため、脳・神経細胞の活動の多点光計測システムとして当初開発されたものは、多数（124～496個）のフォトダイオードをアレイ状に配置した受光素子で、それぞれ独立に光電変換し、それを独立に電流電圧変換して増幅する、という方式が採択され（図3）、脳・神経研究に用いられてきた⁸⁾。この方式では、各チャネルからの光信号をS/Nよく計測することはできるが、空間解像度を高め1000チャネルを超えて並列計測しようとするときに困難が伴う。その理由は次の2点に要約できる：(1) フォトダイオードからの出力を独立に並列に取り出す方法（図3a）では、チャネル数の増大とともに信号引き出し線の占める面積が受光面の面積に比して増大し、開口率の減少となり、S/N比が低下する。この困難の解消には、例えば出力をフォトダイオードの背面から取り出すなどの、フォトダイオードアレイシステムに抜本的変更を必要とする。(2) 並列出力方式では、チャネル数の増加とともに各出力に独立に接続する増幅器の数が増加する。このことは、技術的・コスト的な限界を招き、実際に1000チャネルを超える並列出力方式は無理となろう。例えば、1000チャネル化を提案した場合、1000個の低

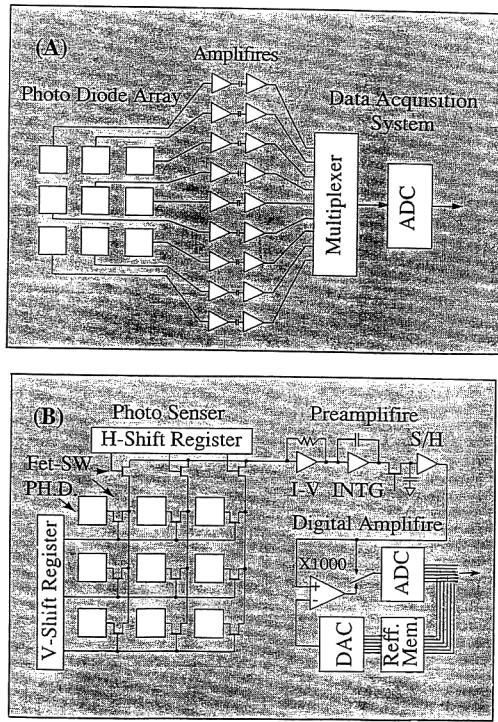


図3 (A) フォトダイオードアレイによって多チャネル光計測するときのシステム構成概念。この方式では1000チャネルを超えるには諸種の困難がある(本文参照)。(B) MOSイメージセンサーを用いて、1000チャネルを超える多点から実時間光イメージングシステムを構成したときの概念図。

雑音増幅器のコスト高、およびその増幅器の故障率などを考慮したときの管理技術の技術的障壁などが実際上の開発の困難となる。

2. 高空間解像度型光計測イメージングシステム

脳・神経細胞の電気的活動を高空間解像度に光計測しイメージングするために、計測システムに課せられる要件は次の4点に要約できる：(1) 0.1%の光強度変化を検出できるため、S/Nが70 dB以上であること。(2) 1 msの脳・神経活動を時間解像できるよう、画像速度(フレームレート)は0.5 ms程度(1秒間に2000フレーム程度)であること。(3) 画像撮影するために空間解像度は50本以上であること、すなわち100×100画素以上であること。(4) 試料に照射する光強度が脳・神経細胞に害を与えない程度のもので撮影が行え、かつカメラが実験室で容易に使えるために受光面の大きさが例えればビデオカメラ程度であること。

これらの要件を満たす光計測イメージングシステムと

して筆者らが開発したものは、受光部にMOSイメージセンサーを用い、増幅器として時間多重化した2次元情報の時間変化分を増幅するものを開発し、画像の高速取得・記憶の機構と動画表示等からなる⁹⁾。MOSイメージセンサーは半導体基板上にならべたフォトダイオードの各々にスイッチング用MOS-FETトランジスターを集積したセンサーである(図3b)。MOSトランジスターは、フォトダイオードが光照射によって蓄積した電荷を出力するタイミングをコントロールするためのもので、シフトレジスターで走査され電荷が外部出力される。すなわち、各画素に照射された光量が電荷として蓄積されたものが、MOSトランジスターのスイッチングによって、電流として時間軸に多重化され読み出される。筆者らのMOSイメージセンサーは画素数16,384(すなわち、128×128)、各フォトダイオードの大きさ70×70 μm(受光面の大きさ9.6×9.6 mm)である。画素面積が70×70 μmと大きいのは、各画素に蓄積できる電荷量を10⁷個以上の電子数にするためである。これによって、光の量子性に起因するショットノイズを−70 dB以下に抑えるようにしている。読み出し用のクロックレートは取り扱い電荷量が大きいことから、4 MHzとした。このクロックレートで、フレームレートを進めるために直重方向を水平ラインごとに8分割し、8ライン並列に読み出すことでフレームレートを速めた。ここでは4 MHzのクロックで、フレームレートが0.58 msである。また、スマート対策と低雜音化のために、TSL方式を採用している。

MOSイメージセンサーからの出力の中で、筆者らが必要とするのは信号の変化分である。これを高分解能に検出する高速ADCを自作した。すなわち、0.1%以下の歪みなくディジタル量に変換するには少なくとも16ビットのADC(変換速度4 MHz)が必要であるが、この中に含まれる信号成分はたかだか6ビットで背景光成分が10ビットを占めることから、特殊なADCを自作した。まず、脳・神経細胞の活動がないなどを基準状態とし、このときの画像の映像信号をAD変換しメモリーに貯蔵し、これを参照画像とする。次に活動状態からの光画像を得たとき、メモリーからDACを通し参照画像を再現し、これら2つの信号を差動増幅する。この結果、脳・神経細胞からの光変化分の画像を各画素ごとに増幅することができる(図3)。しかしADCとDACの変換誤差が同時に増幅されるので、実際の回路では1回の操作での差動増幅の大きさを16倍程度とし、これを3段直列に用いて参照画像との差分増幅を3回繰り

り返し、全体で1000倍の増幅度を得た。こうして、0.1%の変化の画像信号に対し、7ビット以上の分解能で250μsの変換時間で処理が行えることが可能となった。

さらに、画像取り込みとその後の処理を高速に行うため、MOSイメージセンサーからの8ライン並列出力の各々に対し、それぞれにAD回路に続き1024枚の画像バッファーメモリー（各4メガバイト）を置き高速画像転送・記憶ができるようにした。各メモリーにはS/Nが不十分な場合、データ転送と同時に平均加算を行えるよう、オンメモリー加算回路を備えた。この8分割した画像データは最後に1枚の映像に再構成し、再構成映像データをビデオ信号（NTSC規格）に変換しモニターに表示するとともに、VTR録画やディジタル信号としてコンピューターに転送し、その後の情報処理や表示の加工を行うことができる。このようにして、画像のバッファーメモリーが1024枚の容量であるので、1秒間に1800枚の画像データを約0.6秒間連続的に取り込むことができ、これをビデオ速度で再生することにより高速画像データを可視化することができる。実際には、S/Nをさらに改善するため、後処理としてスムージング回路や2次元空間フィルター回路もハードウェア化して設備している¹⁰⁾。

3. 脳・神経細胞の電気的活動の光計測イメージング

本光計測法によって脳・神経細胞の広い領域にわたってその活動状況を実時間にイメージングできる。脳・神経細胞の活動のイメージングの手法については、近年FMRI（機能的磁気共鳴装置、functional magnetic resonance instrument）、PET（positron emission tomography）あるいは2DG（2-dioxy-D-glucose）法など強力な方法もあるが、本光計測イメージングが脳・神経細胞の生理研究にとって電気生理学に比肩し得る「光生理学」とも呼ぶべき学問分野を生理学と形態学を統合する形で形成されつつあるのは、次の理由である：(1) 光計測の特徴はまず実時間活動の計測であり、興奮性であれ抑制性であれ、活動のダイナミックスを実時間計測し得る、ということである。光計測が見ているものは、あくまでも脳・神経細胞の実時間の電気的活動である。このため、電極を用いた電気生理学ときわめて整合性がよく、脳・神経細胞が行う情報処理・記憶の電気的活動表現を広領域に、いわば生に観察することになり、その活動表現の実時間ダイナミックスをじかに追跡することができる。これに対し、FMRI、PETおよび2DG法

のいずれも電気的活動の余効をいわば計測することになるので、活動に関与する脳の領野をマッピングすることに対する無侵襲計測法として威力を発揮する。さらにこれらの方法では、活動が興奮的か抑制的かのどちらの表現を通して現れているのかは、直接判定できない。(2) 光計測のもうひとつの特徴はきわめて高い空間的分解能である。脳や神経細胞の局所的部位の活動について電気生理学的手法では計測の難しい局所活動を容易に多点から計測することを可能にする。例えば、単一の神経細胞の細胞体、軸索、樹状突起の各局所部位から同時に膜電位変化を計測することは微小電極を用いてもきわめて難しいが、光計測では可能である。また、神経細胞の集団としての活動を脳の各局所部位から同時に多点に光計測することで、脳の神経構築についての詳しい知見を得ることができ、この結果を脳の形態学的研究と比較検討することで脳の解剖学的研究手法として大いに役立つ。さらに、これらの神経構築の活動のダイナミックスも同時に計測できるので、神経回路の生理学研究にも大いに威力を発揮できるのである。

光計測イメージングのもつこれらの特徴が実際どのように用いられその威力を発揮しているかを、ラット海馬に適用した場合について、2つの例によって筆者らのグループの結果を紹介する。海馬は脳の学習器官としてもよく知られ、各種感覚器を通して脳に入力するマルチモーダルな情報を選択・統合し、短期記憶から長期記憶へ変換する場である、と考えられている¹¹⁾。海馬は両側の脳の奥にあって側頭葉内側にあり、ラット脳では大脑

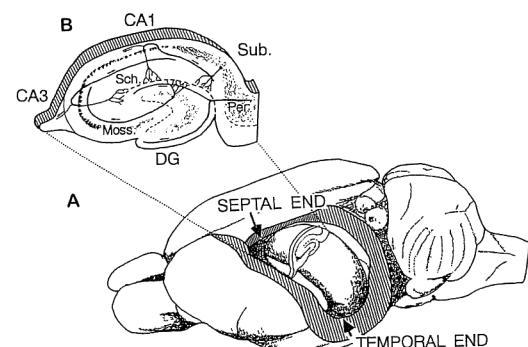


図4 ラット、モルモットなど齧歯類の脳と海馬。（右下図）左側より嗅球、大脳、小脳、脳幹が配置され、大脳皮質の内側奥深くにカチューナツ状の海馬が存在する。（左上図）海馬の中隔端（septal end）から側頭端（temporal end）を結ぶ軸に直交する面で、海馬のスライス切片を作成したもの。CA 1, CA 2: アンモン角、DG: 齒状回、MOSS: 苔状線維、Sch.: シャーファー側葉、Sub: 海馬台。

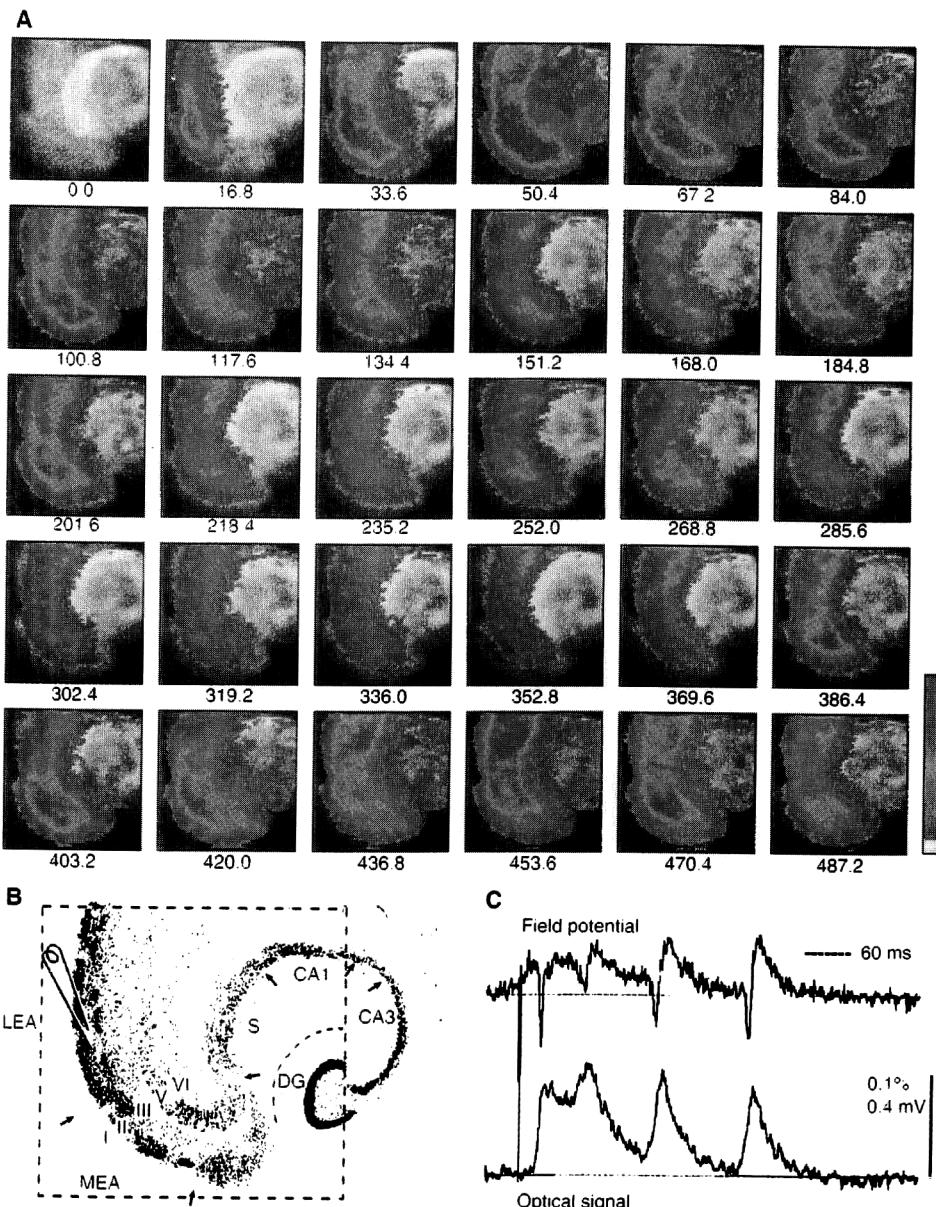
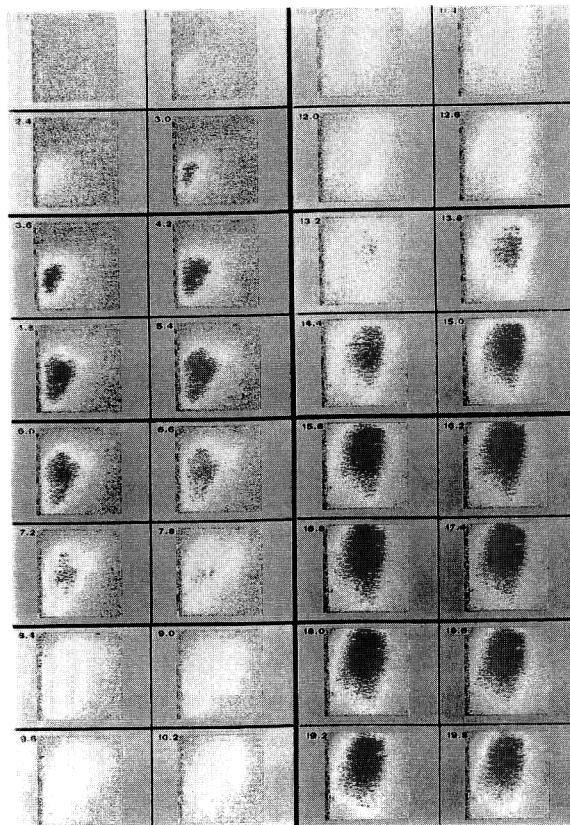


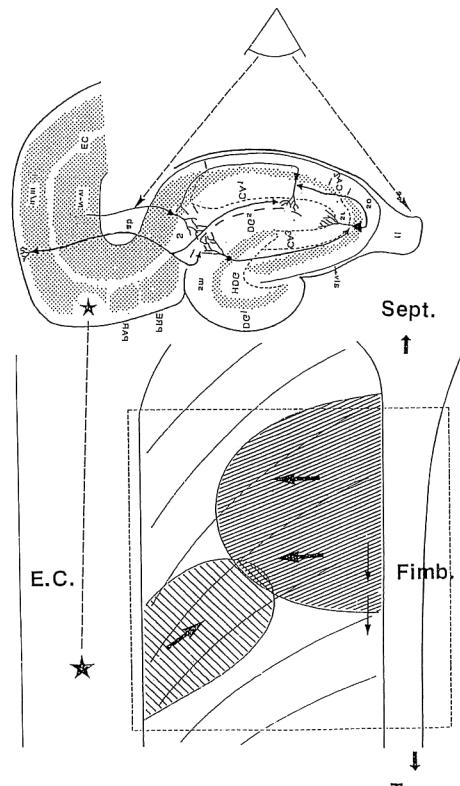
図5 ラット海馬嗅内野を含むスライス切片の光計測イメージング。刺激電極を嗅内野表層のIIおよびIII層に刺入し、これによって興奮を誘起した。(A) 嗅内野を電極刺激したとき(記録の0.0)からスライス切片への活動の様子を示す光イメージングデータ。記録データの下の数字は刺激時の時間を0.0 msとし、この後この数字の時間(単位ms)を経たときにおけるスライス切片の電気活動の光イメージングデータ。暖色系色素の色で興奮の大きさの尺度を示す(右下参照)。(B) 海馬-嗅内野スライス切片の神経回路の構造スケッチと光イメージングの領域(破線の四角で示す領域)の関係。DG:歯状回、LEA:嗅内野外側部、MEA:嗅内野内側部、S:海馬台。(C) 電極によるフィールド電位(上側の記録)と光計測による記録(下側の記録)を嗅内野内側部(MEA)で同時記録したもの。

皮質を取り除くとカシューナッツ状の形として存在するのがみえる(図4 A)。海馬の長軸に直交する面でスライス切断を作成すると3段の興奮性シナプスから構成される特徴的な神経回路網がみえる(図4 B)。すなわち、

嗅内野から投射される貫通枝(パーフォラントパス)が歯状回(dentate gyrus)の顆粒細胞と第1段のシナプス結合を形成し、顆粒細胞の出力の苔状線維がCA3錐体細胞と第2段のシナプスを形成し、さらにCA3錐体細



(A)



(B)

図6 ラット脳 *in vivo* 海馬から光イメージング記録。(A) 嗅内野外側部に電極刺激したとき(このときを0 ms), CA1領野を光イメージングカメラで計測したときの各時間(記録の数字は刺激後の記録時間; 単位 ms)での活動記録データ。(B) 実験配置の模式図。上図は海馬-嗅内野の断面と光イメージングカメラとの関係を示す。電極刺激位置(*印)は嗅内野外側部にある。下図は光イメージングの記録領野を海馬表面から四角で囲んだ破線で示す。*印は電極刺激位置。(A)のデータからわかるように、活動は嗅内野(EC)側のCA1領野に3.0 ms現れ、中隔端(Sept.)側に向かった後、この活動は8 msで一時消える。その後、12.6 msに再び海馬妥(フィンブリア, Fimb.)側の中隔端(Sep.)側から活動が忽然と現れ、嗅内野に向かうことをスケッチで示した。

胞の出力のシャーファー側枝がCA1錐体細胞と第3段のシナプスを形成する。CA1錐体細胞の出力は海馬台(subiculum)を介して再び嗅内野へもどるという閉回路を形成する。光計測法をラット脳の嗅内野-海馬を含むスライス切片試料に適用し、嗅内野の外側表層部を電気刺激したとき(図5B)，この試料全体の電気的活動の空間・時間パターンの様相を計測した結果が図5Aである¹¹⁾。この結果から、嗅内野の表層部と深層部を巡回活動する様子と、この間海馬の活動も誘起される様子が観測され、この現象が何回か自励的に繰り返されることがみられた。このことは嗅内野-海馬に反響回路が存在することが明確に示されたこと、それが嗅内野-海馬の脳機能に対する役割としての短期記憶から長期記憶へ

の情報転換機構に関連している可能性を示唆しているものと解釈された¹¹⁾。このような脳活動の空間・時間パターンのダイナミックスが観測できるという光計測の特徴を生かした脳研究により、脳の解明研究は飛躍的に進むものと期待される。

光計測法を *in vivo* 脳に適用して海馬の表層部から活動を計測した例を図6に掲げる。ここでは、ラット脳の大脳皮質の一部をサクションパイペットを用いて削除して海馬の表層が露呈するように準備した後、膜電位感受性色素(蛍光色素)を人工脊髄液に溶かして注入・染色した後、ラット頭蓋に透明な窓をつけて光計測した。*In vivo* 脳では麻酔下にあってもラットの心拍や呼吸に伴う脳の振動が計測を難しくする。さらに、より自然な

状況にある脳の活動状況を観察するためには、このほかに多くの面で技術開発と試行錯誤を繰り返していく必要がある。図6の例では、嗅内野を電気刺激したとき、海馬表層部の主としてCA1野の活動の様子の光計測イメージングである。最初にまずCA1野に活動が刺激後3 msから現れ8 msまで持続して消える。次に再び12.5 msに活動が現れ20 ms経過しても持続している。最初の活動は嗅内野から貫通枝を介して直接CA1野への入力によるもので、遅れて現れる活動は嗅内野→歯状回→CA1野の海馬回路を一巡してCA1野に到達するものであろう。ここで注目されることは、前者の活動がCA1野に現れて中隔端方向に向かい、後者の活動が刺激部の嗅内野と反対側のCA1野の中隔端側から現れ側頭端側に向かってCA1野の広域に伝搬している、ということである。このことは、海馬の層構造仮説に反する知見であり、海馬の3次元神経回路構造を考えるとき、きわめて重要な発見である、と思われる。

脳・神経活動の実時間計測として光計測イメージング法につき、その原理と実際、および脳活動への適用例につき概説した。光計測法の問題点は電気計測に比べ感度が低く、振動に弱いという点である。さらに高感度化しS/Nを向上させるためには、光計測カメラシステムのみならず光変化効率の高い膜電位感受性色素の開発が本質的に重要である。さらにこの問題の克服によって、また多くの技術的改善によって、無麻酔で行動下の動物に対し慢性的に光計測イメージング法を適用することが可能になるよう努力することが脳科学を大きく前進させる。また、脳の深さの方向の活動の切り出しを光計測でどのように行うかについても技術的検討が進められている。光計測法の技術的飛躍が脳科学の進展に直結していることを考えると、脳科学者が自分自身で技術開発を行うことが、実は脳科学の最も中心的課題であることに気付かされる。“按配8分仕事2分”ということわざの本

質は仕事の中核は按配であるという言葉であるのかもしれない。

文 献

- 1) I. Tasaki, A. Watanabe, R. Sandlin and R. Carney: "Changes in fluorescence and birefringence associated with nerve excitation," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **61** (1968) 833-888.
- 2) I. Tasaki and P. M. Byrne: "Rapid heat production associated with excitation of electric organs of the electric eel," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **197** (1993) 910-915.
- 3) S. Tsukita, S. Tsukita, T. Kobayashi and G. Matsumoto: "Subaxolemmal cytoskeleton in squid giant axon. II. Morphological identification of microtubule- and microfilament-associated domains of axolemma," *J. Cell Biol.*, **102** (1986) 1710-1725.
- 4) 松本 元: 神經興奮の現象と実体、上・下 (1981, 1982, 丸善).
- 5) L. B. Cohen, B. M. Salzberg, H. V. Davila, W. N. Ross, D. Landowne, A. S. Waggoner and C. H. Wang: "Changes in axon fluorescence during activity: Molecular probes of membrane potential," *J. Membrane Biol.*, **19** (1974) 1-36.
- 6) A. Grinvald, R. D. Frostig, E. Lieke and R. Hildesheim: "Optical imaging of neuronal activity," *Physiol. Rev.*, **68** (1988) 1285-1366.
- 7) I. Tasaki and G. Matsumoto: "Optical probes of axonal membrane," *Physiology and Pathology of Axons*, ed. S. G. Waxman (Raven Press, N. Y., 1978) p. 237.
- 8) 飯島敏夫, 松本 元: “海馬神経活動—光学的測定による神経回路可塑性の研究”, 脳とコンピュータ 第3巻 神経細胞が行う情報処理とそのメカニズム, 松本 元, 大津展之共編(培風館, 1991) pp. 185-244.
- 9) M. Ichikawa, T. Iijima and G. Matsumoto: "Real-time optical recording of neuronal activity in the brain," *Brain Mechanisms of Perception and Memory, from Neuron to Behavior*, eds. T. Ono, L. R. Squire, M. E. Raichle, D. I. Perrett and M. Fukuda (Oxford University Press, 1993) pp. 638-648.
- 10) 市川道教, 松本 元, 飯島敏夫: “リアルタイム脳活動イメージングシステム”, センサー技術, **12** (1992) 73-78.
- 11) T. Iijima, M. P. Witter, M. Ichikawa, T. Tominaga, R. Kajiwara and G. Matsumoto: "Entorhinal hippocampal interactions revealed by real-time imaging," *Science*, **272** (1996) 1176-1179.

(1997年6月2日受理)