

〔研究〕

CCD を用いたリアルタイム神経活動イメージングシステム High-Speed CCD Imaging System for Monitoring Neural Activity

高 島 一 郎 梶 原 利 一 飯 島 敏 夫
I. TAKASHIMA R. KAJIWARA T. IIJIMA

We have designed and constructed a high-speed CCD imaging system for optically detecting neural activity from preparations stained externally with a voltage-sensitive dye, and have used this system to image evoked and epileptiform neural activity in the rat somatosensory cortex. The imaging system uses a commercially available 1/3-inch CCD chip, and it can continuously capture images for more than 8 seconds, at 1000 frames/sec, with spatial resolution of 128 x 62 pixels. The spatial/temporal resolution of the CCD sensor is variable by changing the geometry of on-chip binning pixels, which can be controlled by a PC/AT computer. Dye bleaching correction was not necessary for long-term imaging of epileptiform neural events, since the sensitivity of the CCD sensor was increased by combining the signal from adjacent pixels.

§ 1 はじめに

脳の働きを理解しようとする時、個々の神経細胞が行っている情報処理を解析することだけでは不十分であり、神経細胞群が構成するネットワークにおける情報処理、すなわち、情報を担う信号が神経回路を介してどのように伝播・変換されていくかを解析することが大きな手がかりになると考えられる。

膜電位感受性色素を用いた神経活動の光学的多点同時計測法（以下、光計測）では、脳のどこに、いつ、どれくらいの大きさの、神経興奮あるいは抑制が起こったかという現象がリアルタイムにイメージングされる。光計測により、複雑な神経回路における情報処理様式をまさに“見る”ことができるのである。膜電位感受性色素は、染色した神経組織の膜電位が神経活動に応じて変化する時、その吸光度や蛍光強度が比例的に変化するという特徴を持っている。膜電位感受性色素をケミカルプローブとして利用し、その光量変化を2次元撮像素子で捕らえるというのが光計測の原理であるが、実際に計測システムを構築するとなると克服すべき技術的課題が多い。まず、神経活動という高速な電気現象をトレースす

るために1ミリ秒の時間解像度が必要であること、そして、神経活動に伴う光量変化は高々0.5%と僅かであるため非常に高いS/Nが要求されることが挙げられる。近年の光計測による脳神経研究は、より高い時間解像度、より高い空間解像度、より高いS/Nを有する計測システムを開発し続けることによって牽引されてきたと言える。

初期の光計測システムはGrinvaldら¹⁾、Salzbergら²⁾、Cohenら³⁾によって10x10あるいは12x12のフォトダイオードアレイとして構成され、これを用いて多くの成果が報告された⁴⁻¹⁰⁾。その後、飯島ら¹¹⁾による16x16アレイ、中島ら¹²⁾による22x22アレイ、Falkら¹³⁾による24x24アレイ、広田ら¹⁴⁾による34x34アレイと、より高い空間解像度、S/Nを持つシステムを用いた研究が報告された。これら、フォトダイオードアレイは各ピクセルが並列読み出しされることから時間解像度には優れるものの、空間解像度を上げるには本質的に限界があった。一方、高い空間解像度を持つCCDカメラを光計測に利用しようというアイデアもあったが、CCDは各ピクセルをシリアルに読み出す方式であることから時間解像度が不十分であり、神経活動のダイナミクスを捉えるには至らな

KEYWORDS : Optical imaging, CCD (Charge Coupled Device), Voltage-sensitive dye, Epileptiform discharge, Somatosensory cortex

かった。CCDカメラでは神経活動そのものを見ることはできなかったが、神経活動変化時の組織の代謝上昇に起因する内因性光シグナル(数秒のタイムコースをとる)をモニターするツールとしては広く普及し現在に至っている¹⁵⁻¹⁶⁾。

しかしその後、いくつかの研究グループが CCDを用いた高速カメラを開発し、fura-2 蛍光イメージングや膜電位感受性色素を用いた計測に成功している¹⁷⁻²¹⁾。彼らは、CCDチップ内で複数の画素をまとめ、空間解像度を犠牲にしながら読み出し画素数を減らすという手法を採用し高速イメージングを実現した。例えば Lasser-Ross ら¹⁷⁾ は科学グレードの冷却式 CCDを用い、18x18 画素で 100フレーム/秒、あるいは、50x50 画素で 40 フレーム/秒のスペックを実現した。さらに最近になって、Potter ら²²⁾ はサブ領域選択イメージング方式を提案した。これは 64x64 画素アレイの CCDチップの画像から、ユーザが関心領域の画素を任意に選択、そして、選択画素のみを読み出すという方式である。フレームレートは選択された画素数に依存し、1000 画素では 500 フレーム/秒と報告されている。これらの光計測システムは CCDを用いたシステムという点で評価されるべきものではあったが、そのいずれもが、ミリ秒の時間分解能で広範な脳領域を観測するツールとしては決して十分な性能ではなかった。

電総研においても早くから光計測手法を取り入れた脳研究を進めてきた。当所では 1991 年に MOS型スイッチング素子を集積したイメージングセンサーを採用し、128x128 画素で 0.6 ミリ秒/フレームのイメージングが可能な光計測システムを完成させた²³⁻²⁴⁾。これはフォトダイオードアレイ並みの時間分解能と、CCD クラスの空間解像度を持つ世界で唯一の画期的なシステムであった。我々は、旧来の装置では決して見ることができなかった神経現象を確実に捉えられるツールを自身で開発し、以来、脳神経科学分野における光計測研究のリーダーとして多くの研究成果を残してきた²⁵⁻²⁷⁾。しかし近年、MOS型センサーを用いたこのシステムにも改良されるべき問題点が露呈してきた。まず、多くの実験条件下では光シグナルの S/N を上げるため、トライアル・アベレーシングが必要なことである。電気刺激によって誘発される神経活動のように、制御可能で比較的再現性のよい

現象を解析するだけならアベレーシング手法に問題はない。しかしそれでは、自発活動のように、いつ起こるか予測できない単発の現象を捕らえることは不可能である。また、十分な画像メモリが実装されていないこと、センサーの内部構造上、2 秒間以上の連続撮像が困難なこと、色素の退色によって絶対光量値がダイナミックレンジを超えてしまう(ドリフト)こと等により、てんかん様神経興奮やオシレーションといったような神経活動を長時間(～数秒)にわたって記録することができなかった。さらに、まだまだ空間解像度不足であり、神経活動のダイナミックマップを構成する際には、別に CCDカメラを用いて形態画像を取っておき、後に合成する必要があった、等々の問題点が挙げられる。

そこで、我々はもう一度 CCD撮像素子を見直し、単発の神経活動を数秒間にわたって記録することを目標に、新しい CCD光計測システムを設計、完成させた²⁸⁾。MOS 型センサーシステムとの比較では、時間分解能においては若干劣るものの、その高い空間解像度と安定性は目標スペックを十分に満足するものであった。本報告ではまず、この新しい CCDイメージングシステムの構成を述べた後、ラットの脳を用いて行ったシステム評価実験の結果を報告する。

§2 イメージングシステムの構成

イメージングシステムはカメラモジュールとプロセッサユニットから構成される(Fig.1)。カメラモジュールは 5x5x9 cm, 225 g と軽量コンパクトであり、Cマウントアダプタで顕微鏡に取り付けられる。また、プロセッサユニットは PC/AT コンピュータに装着された 16 ビット ISA インターフェースカードを介して制御される。インターフェースカードもシステムの一環として新たに開発したものである。カメラモジュールとプロセッサユニットは同軸 3 線、単芯 8 線から成るケーブルで接続され、最大 2 m まで延長可能である。S/N 向上のため、システムには低リップル安定化直流電源が使用される。

2.1 カメラモジュール

撮像デバイスには、民生機器用の 1/3-インチ CCD チップ(MN3716MAE, Panasonic)を採用した。こ

ステムのグローバルクロックとして使用されている。

CCD チップ内で光電変換により生じた電荷は、チップ内の垂直 / 水平シフトレジスタを順次転送されてシリアルに読み出される。FPGA 内のタイミングジェネレータはこの電荷転送に必要なタイミングパルスシーケンスを生成する。我々はビデオレート (30 フレーム / 秒) を超える高速撮像を実現するために 2 つの戦略を取った。まず、垂直 / 水平シフトレジスタの駆動クロック周波数をそれぞれ、1 MHz, 48 MHz までクロックアップした。いずれもチップのデータシートに書かれたスペックを大きく超える値ではあったが、CCD が支障なく動作することを確認した。次に Lasser-Ross ら¹⁷⁾ が採用したのと同じアイデアで、CCD チップ内で複数の画素を加算し、空間解像度の犠牲を最小限としながら読み出し画素数を減らす方式 (以下、ピクセルビニングと呼ぶ) を採用した。タイミングジェネレータからの駆動パルスシーケンスセットにより、ピクセルビニングが実現される。

カメラモジュールがプロセッサユニットから受信するコマンドは、Mode コマンドと Frame-rate コマンドである。Mode コマンドによりイメージングモードの変更が可能である。Table 1 には実装した 6 種のイメージングモード - がまとめてある。各イメージングモードの違いはピクセルビニングのフォーマットである。モード から に従って CCD 内でより多くの画素が加算され、結果、空間解像度は悪くなるが、

フレームレートは上がっている。例えば、イメージングモード では、256x62 画素が 1000 フレーム / 秒で読み出される。イメージングモードは Mode コマンド受信時、ダイナミックに変更される。全てのイメージングモードにおいて水平方向には 2 画素加算され、また、水平シフトレジスタの駆動クロックは 48 MHz であるから、CCD チップからの画素読み出し速度は常に 24 MHz である。

CCD 駆動回路には多くの DC レベル電圧の供給が必要であり (例えば、基板電圧、P-well 電圧、出力アンプドレイン供給電圧、出力ゲートバイアス電圧など)、それら個々の参照電圧は固定値とするより、各イメージングモードに応じて微調することで信号の S/N が上がることが期待された。そこでトリム DAC デバイスを使用し、Mode コマンドを受信するたび、個々の DC レベルを最適値に調整している。

イメージングモードが選択されれば、最速のフレームレート (最小フレーム間隔 T_{min}) は Table 1 のように決定される。ユーザーは T_{min} 以上のフレーム間隔であればフレームレートを任意に変更可能である。Frame-rate コマンドは、各イメージングモードにおいてフレーム間隔を 25 μ s ステップで設定するために使用する。光計測を行う場合、常に最速フレームレートでイメージを取り込めれば理想的であるが、実際の実験ではやむなくフレームレートを落とさねばならない状況があり得る。例えば、標本の染色状態がベストではなく、色素からの絶対光量が不足気味の場合である。照射光量を上げればよいが、光源の安

Table1 Specifications of implemented imaging modes

Imaging mode	On-chip binning format	CCD readout pixels after on-chip binning	Minimum frame interval T_{min} (insec)	Spatial resolution after on-memory binning	Dynamic range of one pixel (bit)	Number of storable frames
I	2 x 2	256 x 246	3.20	256 x 246	8	2131
II	2 x 4	256 x 123	1.80	128 x 123	13	4262
III	2 x 6	256 x 82	1.25	128 x 82	13	6393
IV	2 x 8	256 x 62	1.00	128 x 62	13	8496
V	2 x 10	256 x 50	0.85	120 x 50	13	10405
VI	2 x 12	256 x 41	0.75	120 x 41	13	12787

定度が悪くなる，あるいは強度の光により色素の生体組織への毒性が増すといった問題が発生し，このような場合にはフレームレートを落とした光計測が行われる。

2.2 プロセッサユニット

プロセッサユニットはアナログ信号処理ブロック，A/D コンバータ，フレームメモリ，FPGA デバイス × 2 から構成される。各々の FPGA は FPGA インターフェースを介して協調動作している。FPGA のハードウェアロジックは，光計測用ソフトウェアが起動した際，PC からダウンロードされる。

カメラモジュールからプロセッサユニットには，24 MHz クロック，フレーム同期信号，CCD 出力信号が入力される。FPGA デバイスはカメラモジュールから送られた 24 MHz クロックに同期して動作している。クランプパルスジェネレータは，フレーム同期信号からオプティカル・ブラックが読み出されるタイミングを算出し，クランプパルスを実アナログ信号処理ブロックに供給している。そのアナログ信号処理ブロックに入力された CCD 出力信号は，低域通過フィルタリング，暗レベルにクランプされた後，低ノイズアンプで増幅され，高速 A/D コンバータに送り込まれる。増幅器ゲインは可変となっている。A/D コンバータ (AD9042, Analog Devices) は，12 ビットトラック & ホールドで 41 MHz でのサンプリングが可能であるが，ここでは 24 MHz で動作させている。

デジタル化された CCD 出力信号は，FPGA を介してフレームメモリに書き込まれる。フレームメモリは DRAM モジュールで構成し，容量 128 MB を実装した。フレームメモリは 36 ビット/ワードで，リード/ライト処理が行われる。デジタルデータのフレームメモリへの書き込みは FPGA 内 DSP が担当するが，イメージングモード とイメージングモード - ではデータの処理方法が異なっている。DSP はイメージングモード - が選択された場合，Table 1 に示すように CCD から読み出した画素を 2 画素毎にデジタル加算し，水平方向画素数を 256 から 128 に減らしてからメモリライトする。A/D コンバータ出力は 12 ビットであるが，DSP でのデジタル加算により各画素のダイナミックレンジは 13 ビットとなる。そして 36 ビットデータバスの上位 18 ビット，下位 18 ビット

にそれぞれ奇数，偶数番目の画素データを割り当てワンライトシーケンスでメモリに書き込む。一方，イメージングモード が選択された場合，DSP ブロックは 12 ビット A/D コンバータ出力の MSB 8 ビットを取り (LSB 4 ビットは捨てる)，連続する 4 画素データを 32 ビットに積み重ねてワンライトシーケンスでメモリに書き込む。この場合，各画素のダイナミックレンジは 8 ビットしかないが，水平方向画素数は 256 のままである。表 1 には，各イメージングモードにおいて，フレームメモリに記録される画像の空間解像度 (画素数) と，そのイメージングモードでメモリを全て消費する記録を行った場合，何フレームの記録が可能かをまとめている。実際の実験では，イメージングモード - は高速で神経活動を記録するために，イメージングモード は標本のファインな形態画像を撮るために使用する。DRAM にはリフレッシュ操作が必要であるが，メモリ・リフレッシュ回路はもう一方の FPGA 内に持たせている。イメージ読み出し中は，水平ブランキング期間に，メモリ・リフレッシュが行われるよう設計されている。

システムにはイメージデータ用の高速 A/D コンバータとは別に，4 チャンネル A/D コンバータが実装されている。これは光計測中に細胞外電極を用いて記録した電場電位や心電計出力波形などをフレームレートでサンプリングし，イメージデータと一緒に保存する目的で使用される。DI/O コントローラは外部トリガのモニタリング，さらにイメージキャプチャに同期したシャッター制御を行っている。

PC インターフェース部は，PC より種々のシステムコマンドを受信する。上述の Mode コマンドと Frame-rate コマンドはそのままカメラモジュールに転送される。その他，Parameter コマンドでは，光計測に必要なパラメータ (記録フレーム数，トリガモード，トライアル・アベレージの回数，トライアル間隔，フレームメモリの先頭アドレス等々) を設定する。DSP 回路は Average コマンドを受信時，メモリデータのアベレージング処理を，Filter コマンドでは 1D/2D フィルタリング処理，Differential コマンドでは光量差分演算を行う。イメージングモード - では 13 ビット/画素でデータが取り込まれているが，フレームメモリでは 1 画素に 18 ビットが割り当

てられている。従って、最大 $32 (= 2^{(18-13)})$ 回のリアル・アベレーシングが可能である。その他、Load/Save コマンドではフレームメモリ - PC 間でデータのダウンロード/アップロードが実行される。

2.3 ソフトウェア

計測用ソフトウェアはウィンドウベースの MDI/GUI 環境 (Microsoft Visual C++ 5.0) で、実験中のオペレーションが容易に行えることを主眼に開発した。表示画面の一例を Fig.2 に示す。ソフトウェアから

イメージングシステムにシステムコマンドを送り、ハードウェアの制御が行われる。また、光計測データの獲得、処理、表示、蓄積、解析、印刷と一通りのツール群を装備している。サードパーティ・ソフトウェアへのリンクも考慮し、データを標準フォーマットでエクスポートする機能も準備した。さらに、PC にハードウェアが接続されていない状態ではメインメモリにフレームメモリ領域をアロケートし、スタンドアロン PC でも光データの解析が行えるよう設計されている。

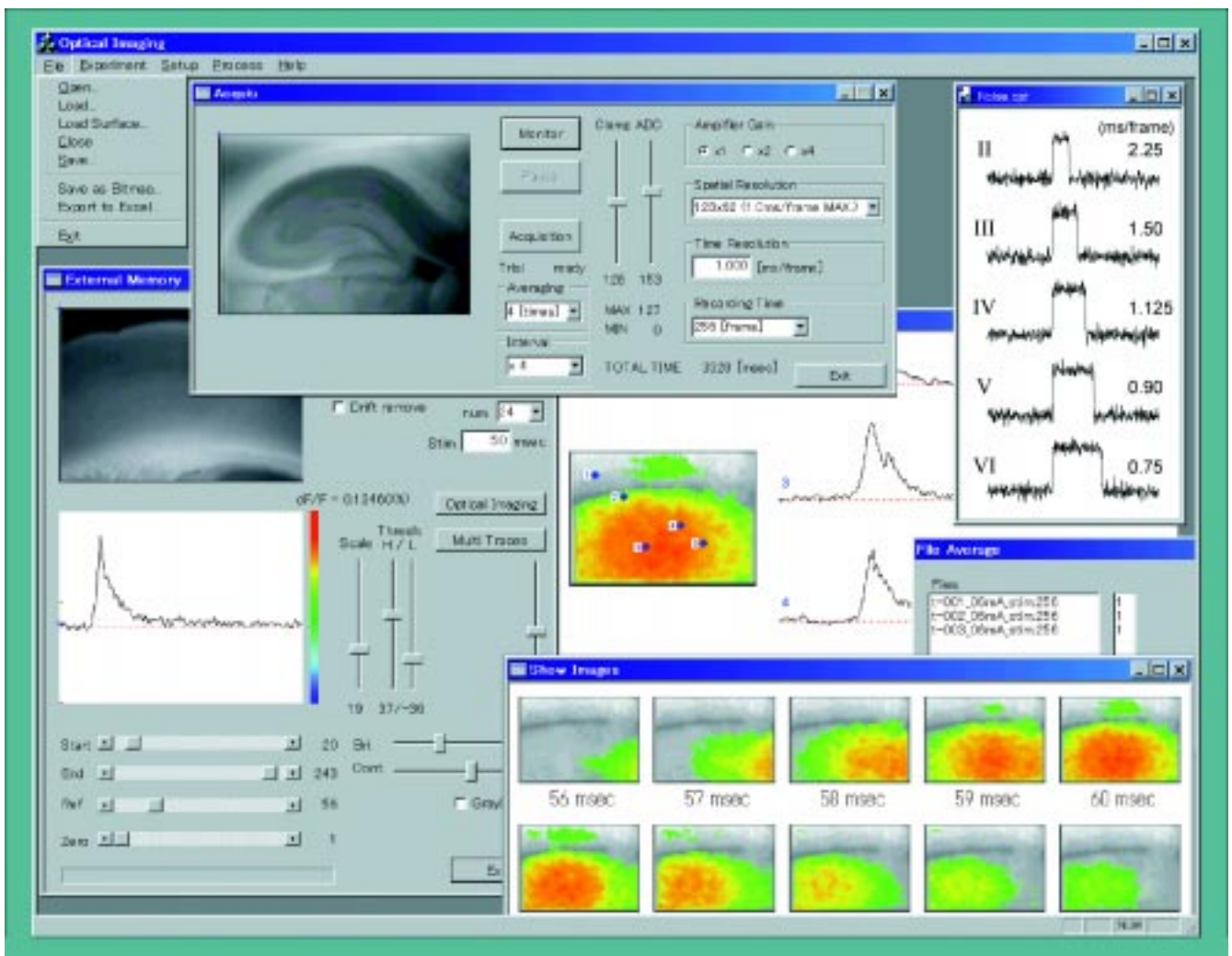


Fig.2 A software package developed for the optical imaging. The acquisition window (upper middle) shows the current settings of the imaging system. The image of the preparation is redrawn every 1 second in the monitor-mode, which enables easy positioning of electrodes. In the analysis window (lower left) and the signal window (center), the time course of the optical signal is traced when a pixel is specified by mouse clicking. Using the color code adjusted in the analysis window, the image window (lower right) displays a sequence of images at even intervals between the start and the end frames. File averaging is processed in the extreme right window. The upper right window shows the optical signals recorded in different imaging modes, and the result is discussed in the section 3.9.

§ 3 イメージングシステムの評価実験

新しいイメージングシステムを光計測に使用し、システムの評価実験を行った。実験にはラットを使用し、*in vivo*（脳を生体中に置いたままの）標本、*in vitro* スライス標本の両方で評価を行った。以下、大脳皮質体性感覚野において電気刺激により誘発された神経興奮、ならびに、薬剤投与によって誘導された、てんかん様自発性神経活動のイメージング結果が示される。

大脳皮質体性感覚野には触覚、痛覚、温覚といった皮膚感覚情報が投射される。ラットの場合には特に、ほおヒゲからの投射域が大きな割合を占めるとともに、視床からの求心繊維が終わる皮質、層には、ウイスキーバレルと呼ばれる神経細胞の集合を形態的に観察することができる。個々のバレルは1本のほおヒゲからの感覚情報を処理している機能カラムと考えられ、皮質カラムの機能構造解析、感覚情報統合処理解析を行うモデルとして最適の実験系である。

3.1 *In vivo* 標本

ウイスター系ラット（オス、250 g）に硫酸アトロピン（0.5 mg/kg）を腹腔投与、さらにケタミン（80 mg/kg）、ザイラジン（8.8 mg/kg）を用いて麻酔を行った。気管開口、頭蓋にステンレスネジをインプラントした後、頭部をヘッドホルダーに固定、大脳皮質体性感覚野上に約 5x5 mm の開頭術を行った。また、開頭部周囲にはデンタルセメントを用いてシーリング・チャンバを作った。開頭部では脳硬膜を切除、大脳皮質を露出した後、膜電位感受性色素（RH-795, 0.6 mg/ml, Molecular Probes）で約 1 時間染色を行った。染色後は色素を洗い流し、人工脳脊髄液 ACSF（artificial cerebro-spinal fluid）を満たした。ACSF の組成は、NaCl 125mM, KCl 5mM, CaCl₂ 2mM, MgSO₄ 1.25mM, NaH₂PO₄ 1.25mM, NaHCO₃ 22mM, glucose 10mM である。ラットは骨格筋弛緩剤 臭化パンクロニウム（3.0 mg/kg）を投与後、人工呼吸器に繋がれた。光計測中は吸入麻酔薬 ハロセイン（1.0% in O₂）にて麻酔の維持/制御を行い、また、保温パッドを用いて動物の体温管理を行った。

3.2 *In vitro* 標本

ウイスター系ラット（オス、250 g）をエーテル麻酔後、断頭、脳を摘出し氷状 ACSF に浸した。大脳皮質体性感覚野を含むブロックをトリミングし、マイクロスライサーを用いて 400 μm 厚の斜冠状断スライス（正中矢状断面より 50-60° anterior arc）を作成、95% O₂ - 5% CO₂ でバブリングを行いながら 30°C の ACSF で 1 時間以上インキュベーションを行った。その後スライスを記録用チャンバに移し、膜電位感受性色素（RH-795, 0.5 mg/ml）で 3-4 分間染色、10 分以上 ACSF で洗い流してから計測を始めた。

3.3 電気刺激

標本への電気刺激は、双極性微小電極（直径 25 μm, チップ間隔 115 μm）を用いて行った。*In vivo* 実験では、脳表に 40-50° の角度で刺激電極を刺入し、電極先端を大脳皮質 層の深層部に置いた。*In vitro* 実験では、大脳皮質 層と白質の境界、あるいは、視床皮質投射繊維を刺激した。刺激強度はいずれの場合も 100-200 μA, 200 μs であった。

3.4 細胞外誘導記録

光計測と同時に細胞外誘導記録を行った。ガラス電極内液は 0.5 M NaCl, 入力抵抗は 2-8 M とした。記録した細胞外電場電位は増幅した後、プロセッサユニットに送られ、光計測データの一部として保存した。

3.5 光学系

光計測を行うための光学系は自作のタンデム型顕微鏡であり、その構造は Ratzlaff²⁹⁾ のものとほぼ同じである。カスタム製 f = 50 mm, F/1.2 レンズを第 1 及び第 2 対物に使用し顕微鏡倍率は × 1 である。CCD イメージセンサは 1/3 インチサイズであるから、本光学系により約 4.7x3.5 mm の領域がイメージングされる。膜電位感受性色素 RH-795 の最大励起波長、蛍光波長はそれぞれ 530 nm, 712 nm である。安定化電源を用いたハロゲン光源からの光は 535 nm (± 20 nm) の帯域通過フィルタを通して後、ダイクロイックミラー（580 nm で 50% 透過）で反射、標本に照射される。また、標本からの蛍光はダイクロイックミラーを透過して後、長波長域通過フィルター（600nm で

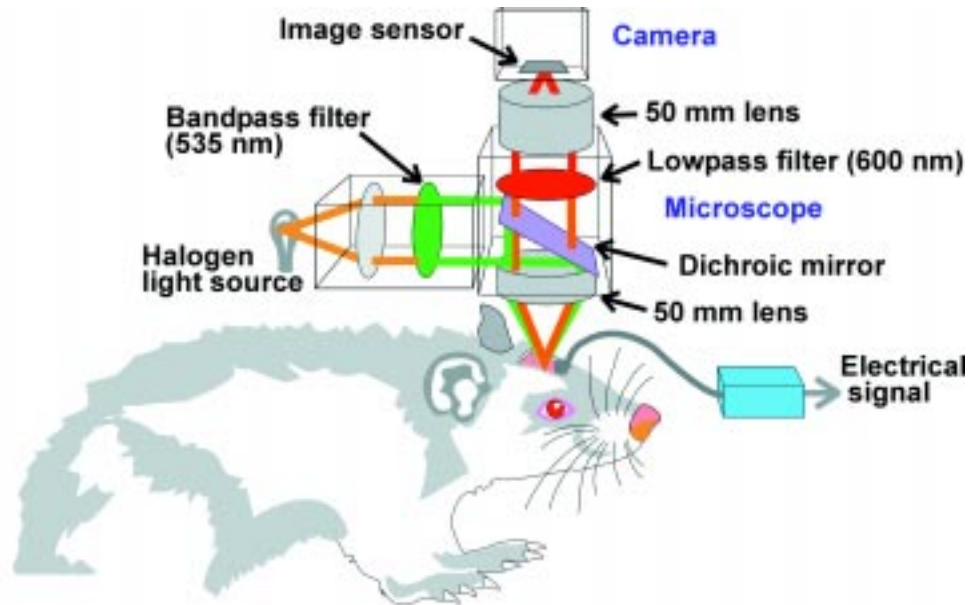


Fig.3 Optical apparatus and *in vivo* experimental setup.

50 % 透過)を通して CCD で受光される。光学系ならびに *in vivo* 実験のセットアップを Fig.3 に示す。

3.6 組織

In vivo 実験終了後、動物はペントバルビタールの過量投与にて安楽死させた。光計測を行った体性感覚野皮質を取り出し、4% パラホルムアルデヒドで一晩、固定を行った。その後、脳表面に平行な 80 μm の切片を作成、シトクロム酸化酵素反応 (CO) 染色³⁰⁾ を行い、皮質層に観察されるウイスキーパレル構造を複数枚の切片から再構築した。

In vitro 実験終了後、スライスに 4% パラホルムアルデヒドで 2 時間、室温固定を行った。その後、70 μm の凍結切片を作成、CO 染色 / ニッスル染色を行い、皮質層境界を確認した。

3.7 体性感覚野 *in vivo* 光計測

Fig.4 は電気刺激によって誘発された、体性感覚野における神経活動の光計測結果を示している。Fig.4 (A) に示すように、観測領域はパレルフィールドの背内側部をカバーしている。Fig.4 (B) は光計測と同時に行った細胞外誘導記録と、記録電極近傍の 1 画素における光シグナル (光量変化) トレースが非常によく一致していることを示している。ピククリン投与前

後の比較も行われている (ピククリンは抑制性神経伝達物質 GABA のリセプターをブロックする)。通常 *in vivo* 実験では、動物の心拍による脳表の上下動が大きなアーティファクト・ノイズとなり、心拍に同期したデータ取り込みと、刺激 / 無刺激データの差分演算が必要である。しかしながら、ここでは 8 回のトライアル・アベージングにより心拍由来ノイズは消失した。光量変化はコントロール時には約 0.25 %、ピククリン投与後は約 2 倍に大きくなっている。また、神経活動のイメージング結果を Fig.4 (C), (D) に示す。ここで脳表の形態画像は Table 1 のイメージングモード (256x246 画素) を用いて撮像、その上にイメージングモード (128x62 画素) を用いて高速撮像した神経活動を、擬似カラー表示によりマッピングしている。大脳皮質 7 層深層の電気刺激により、最初は 2~3 個の皮質カラムの神経細胞が応答している。その後、コントロール時には神経興奮が近傍の皮質カラムへ伝播するだけなのに対し、ピククリン投与後は全パレル皮質に興奮応答が広がっている。これは、感覚入力に対し皮質の抑制系神経回路が、その応答をシャープにチューニングしていることを示唆している。ここでは脳の電気刺激に対する応答を示したが、ラットのほおヒゲに曲げ刺激を与えた場合にも同様の結果を得ている³¹⁻³²⁾。

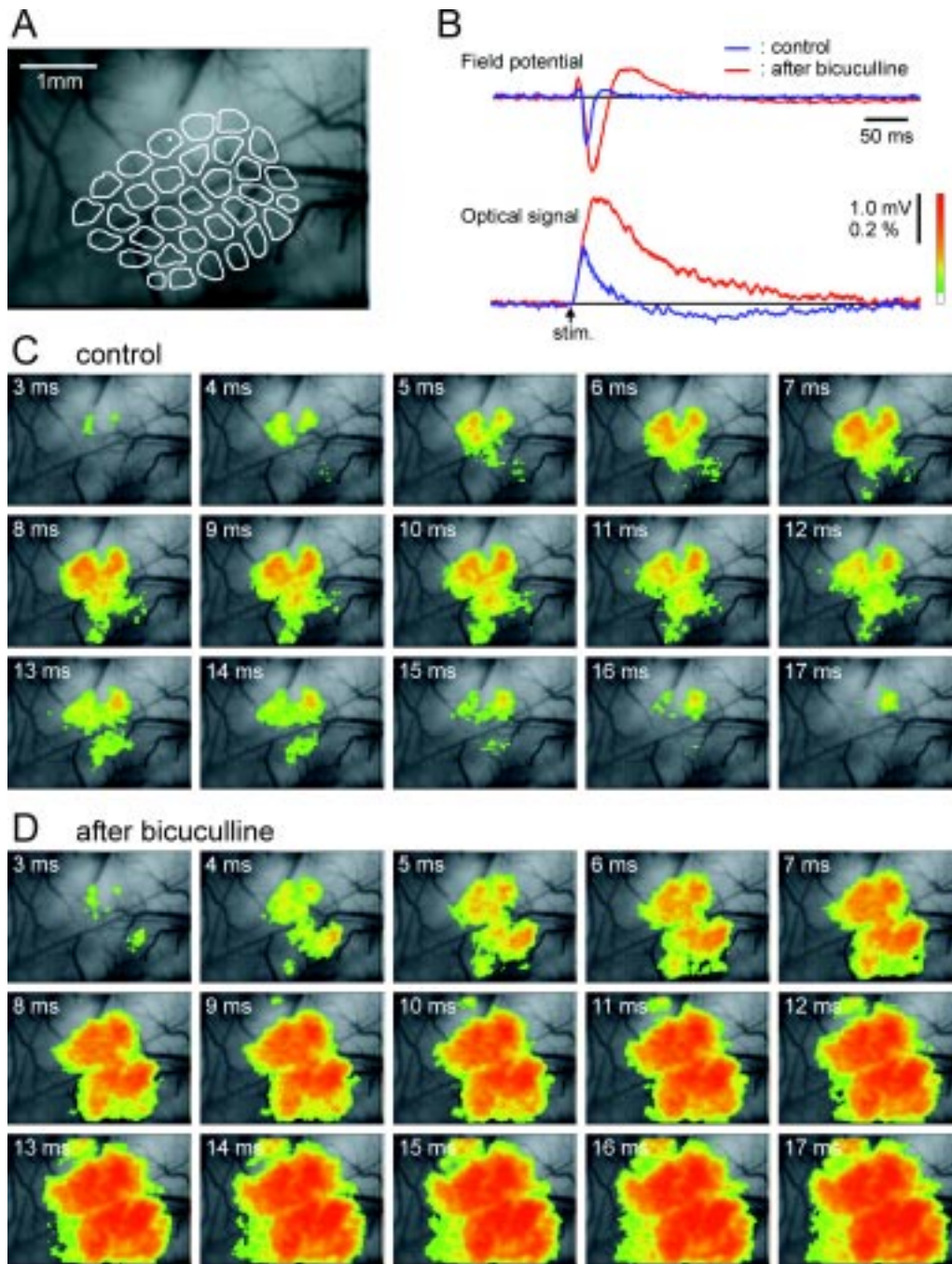


Fig.4 *In vivo* optical imaging of evoked neural activity in the barrel cortex before and after the addition of bicuculline to the cortical surface.

A: the surface image of the recorded cortical area (4.7 x 3.5 mm). The anatomical whisker barrel map identified after the experiment is superimposed (left, anterior; top, medial). The stimulating electrode was placed outside of the view and penetrated obliquely into lower layer VI below the recorded cortical area. Optical imaging was done with spatial resolution of 128 x 62 pixels, and a small rectangle in the figure is the area (approximately 37 x 56 μm) covered by a single pixel.

B: optical signals (lower traces) detected by a pixel (indicated as the rectangle in A), and the field potentials (upper traces) obtained from the same site simultaneously. The optical recordings were done before (blue traces) and after (red traces) an application of bicuculline (100 mM), which was dropped over the exposed cortical surface and then washed away 5 minutes later. The optical signals were acquired for 512 ms at the rate of 1.0 ms/frame. Stimuli were given at 5-second intervals, and eight trials were averaged.

C: real-time imaging of neural activity before bicuculline. Neural activity was encoded in pseudocolor (the color code bar in B) and superimposed on the surface image. A fraction of each optical signal, the amplitude of which was below the threshold (background noise) level, was not color coded. The threshold level was determined to be above the fluctuation of the optical signals before the stimulation. The time after stimulation is indicated in each image.

D: real-time imaging of the spread of neural activity after bicuculline.

Fig.5は、体性感覚野で観測したてんかん様自発性神経活動の光計測結果である。観測領域をFig.5(A)に示す。てんかん様自発性神経活動はビククリンの投与により引き起こした。Fig.5(B)は細胞外誘導記録と光シグナルとのよい相関を示している。約8秒のワンショット光計測期間中、大きく4度の自発発火現象が記録された。光シグナルにはベース部分に周期的な振幅の変動が見られるが、これは心拍由来のアーティファクト・ノイズである。神経活動に伴う光量変化が約0.5%なのに対し、アーティファクト成分は約0.04%である。8秒間の記録では、色素退色によるドリフトは現われなかった。Fig.5(B)の下線部分をFig.5(C)に拡大表示している。そして、Fig.5(C)の下線

期間におけるイメージング結果をFig.5(D)に示している。最初の神経発火フォーカス部位はバレルフィールド内側であり、神経興奮はそこから血管を横切って吻側に広がるとともに、徐々にバレルフィールド全域に拡大している。この最初の興奮伝播は自発的に終わり、引き続いて今度はバレルフィールドで始まった神経興奮が、直前の興奮伝播をあたかも引き返すように逆方向に広がっている。

3.8 体性感覚野 *in vitro* 光計測

Fig.6は、体性感覚野スライス標本を用いた神経活動の光計測結果である。Fig.6(A)に示すように、スライスにはいくつかのウィスカー・パレルが含まれてい

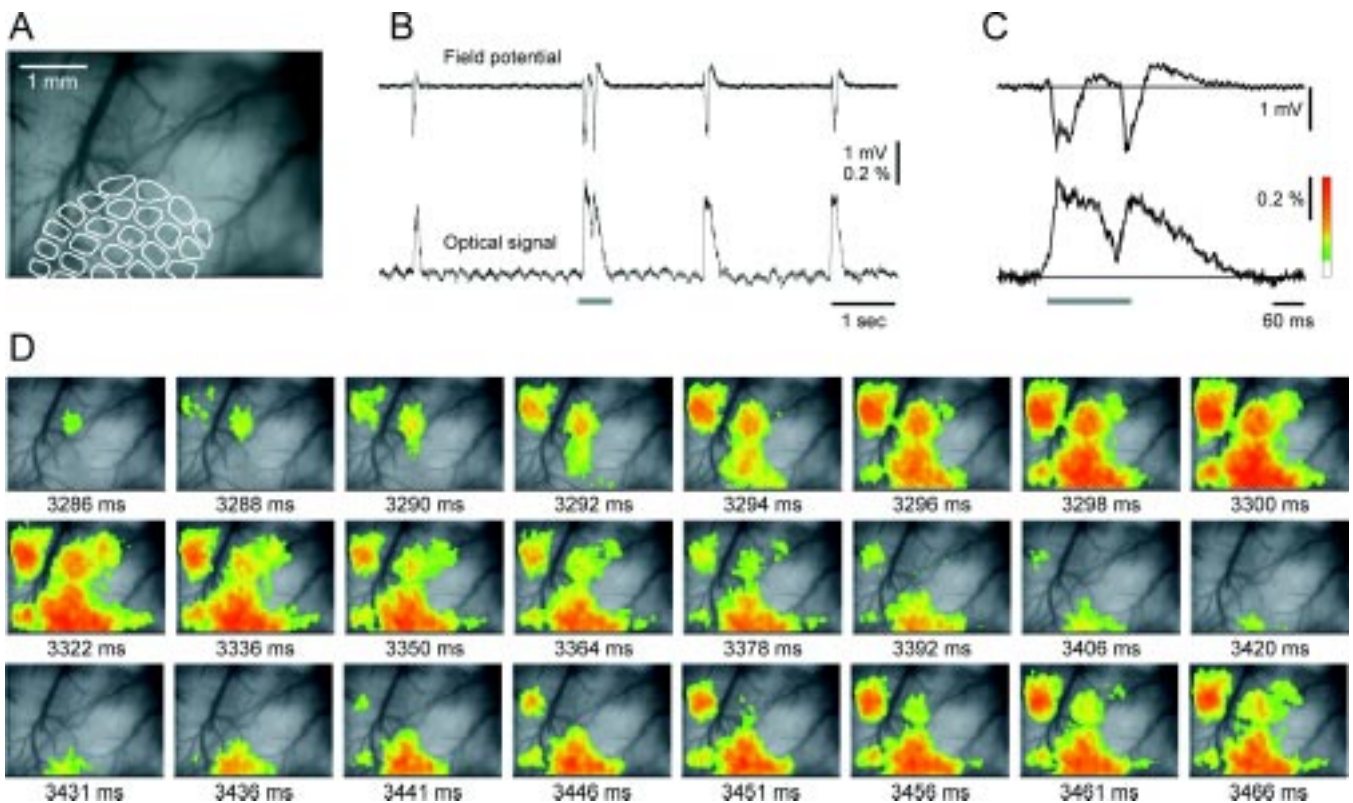


Fig.5 *In vivo* optical imaging of epileptiform discharges recorded in the somatosensory cortex. Epileptic events were recorded after dropping bicuculline (500 μ M) over the exposed cortex.

A: the surface image of the recorded cortical area. The outlines of whisker barrels are superimposed (left, anterior; top, medial).

B: an optical signal (lower trace) detected by a pixel (small rectangle in A), and the field potential (upper trace) obtained from the same site simultaneously. Images of 128 x 62 pixels were acquired for 8192 ms at 1.0 ms/frame. The striking periodic noise of the optical signal was due to the heartbeat.

C: magnified traces underlined in B.

D: real-time imaging of the spread of epileptiform activity during the period presented in C. The pseudocolor bar in C was used to encode epileptiform activity, and the threshold level was chosen to be above the level of the heartbeat noise. The elapsed time since the beginning of image acquisition is shown below each image. Note that the frames are not selected at regular intervals.

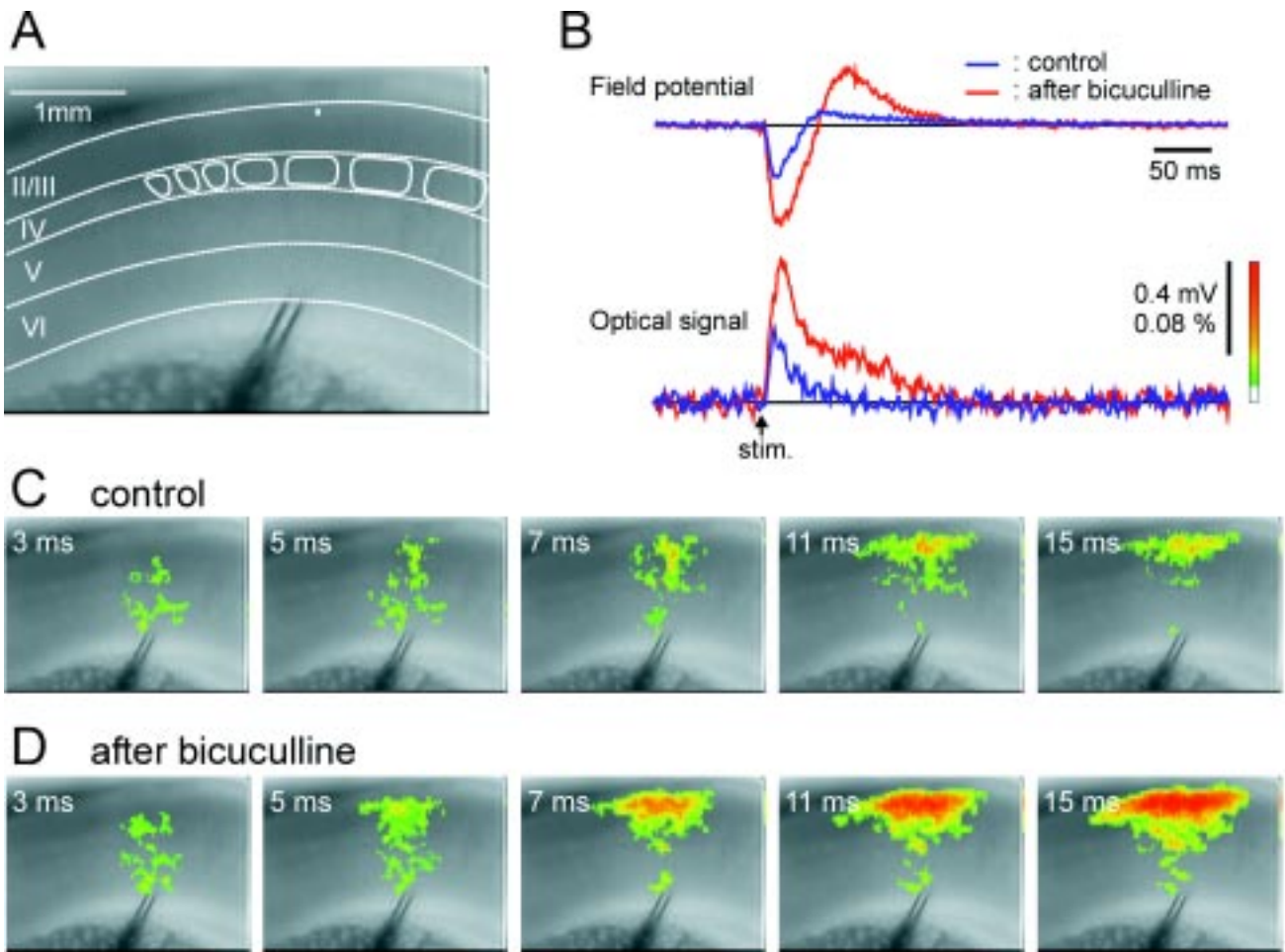


Fig.6 *In vitro* optical imaging of evoked neural activity before and after the addition of bicuculline.
 A: the image of the slice preparation. The outlines of whisker barrels in layer IV and laminar boundaries identified histologically after the experiment, are superimposed. The slice was stimulated at the layer VI-white matter border, and optical signals were acquired for 512 ms at 1.0 ms/image before and after 10 μ M bicuculline.
 B: optical signals (lower traces) recorded by a pixel indicated in A (small rectangle) and the field potentials (upper traces) obtained from the same site simultaneously. Stimuli were given at 5-second intervals, and eight trials were averaged.
 C: real-time imaging of neural activity before bicuculline.
 D: after bicuculline. The color code bar used for imaging is shown in B. The time after stimulation is indicated in each image.

る。Fig.4 (A) で真上から見た脳を、今度は縦にスライスして真横から見たことになる。大脳皮質 / 層での細胞外誘導記録と、光シグナル波形との比較を図 6 (B) に示す。ビククリン投与後、光シグナルの振幅は約 2 倍になっている。Fig.6 (C), (D) は、神経活動のイメージング結果である。電気刺激の直後、視床皮質求心繊維が投射するところの、大脳皮質 層ならびに・層深層に神経興奮が見られる。その後、神経興奮は大脳皮質 / 層を水平方向に伝播し、その興奮伝播はビククリン投与によって増強している。大脳皮質 / 層には非常に密な皮質 - 皮質間結合がある

ことが知られており、本結果ではそれら大脳皮質 / 層の水平神経回路での神経興奮伝播の様子がイメージングされている。

Fig.7 は同じく体性感覚野スライス標本を用い、ワンショット長時間記録を行った結果である。フレームレートを 2 ms に落とし、約 16 秒間の光計測を行った。計測中、視床皮質投射繊維を 3 回刺激し、第 2、第 3 刺激の間に高濃度のビククリンを上流から流した。Fig.7 (A) に示すように、第 1、第 2 刺激に対して神経応答は観測されなかったが、ビククリン投与後の第 3 刺激に対しては神経興奮応答が観測された。この時

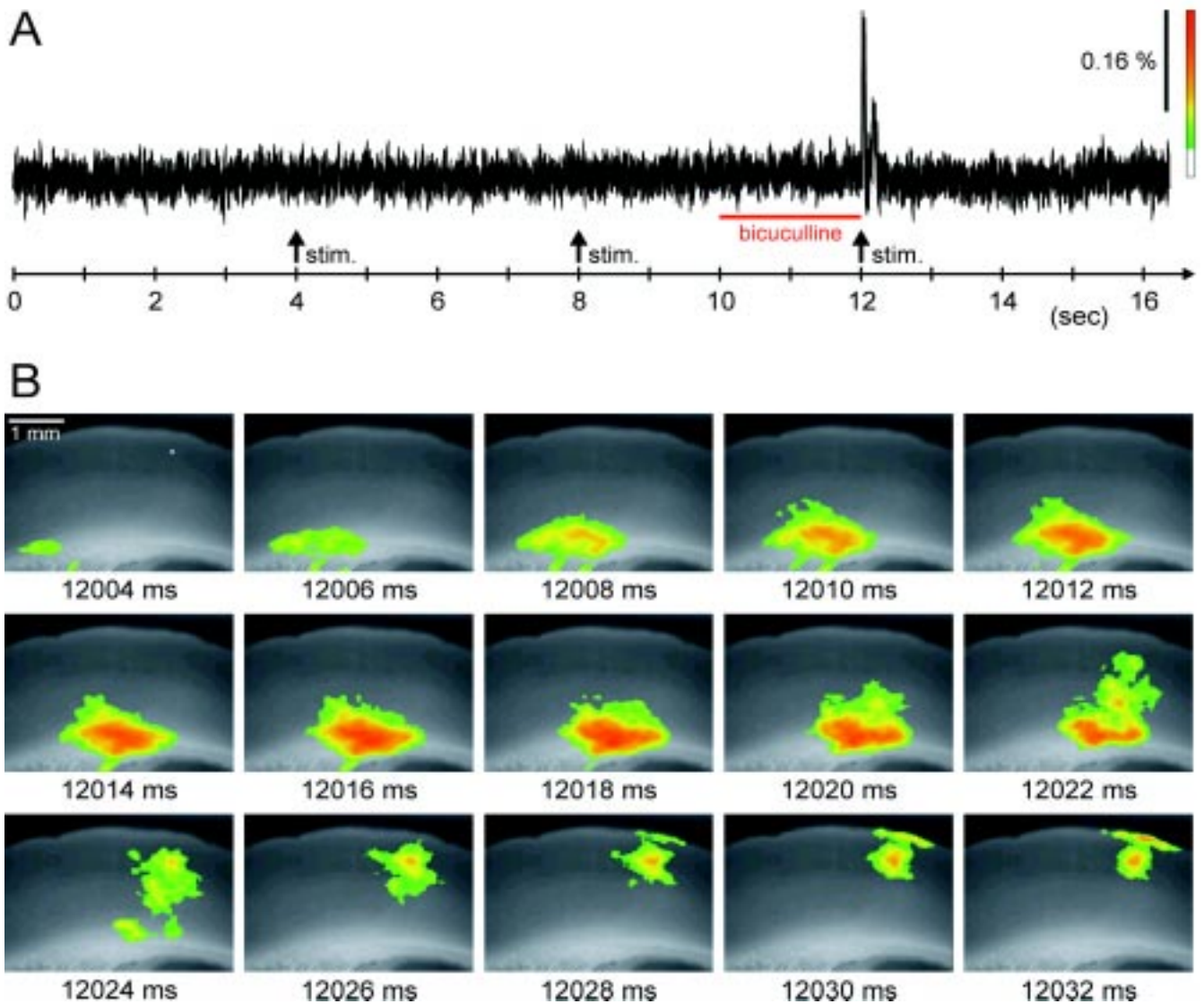


Fig.7 An example of long-term monitoring of neural activity. The somatosensory cortical slice was placed in the imaging chamber and submerged in flowing ACSF (2.0 ml/min, 25°C). Images of 128 x 62 pixels were acquired for a period of 16384 ms at the rate of 2.0 ms/image. Thalamocortical afferent fibers were stimulated at 4, 8 and 12 sec since the beginning of image acquisition, and four drops (10 μ l/drop) of high concentrated bicuculline (10 mM) were added to the upper stream of the flowing ACSF between 10 and 12 sec. The stimulating electrode was outside of the view.

A: an optical signal recorded by a single pixel (small rectangle in the first frame in B).

B: real-time imaging of neural activity in response to the third stimulation. The elapsed recording time is shown

の神経興奮伝播パターンを Fig.7 (B) に示す。16 秒を超える長時間記録にも関わらず、色素退色によるドリフトは観測されなかった。

3.9 S/Nの考察

我々のシステムでは、民生用の CCD チップをオーバースペックの高周波クロックで動作させている。当初、デバイスの寿命が短いのではないかという不

安もあったが、耐性は高く安定しており、長期間の使用に全く問題はない。システムを構築する際、CCD チップのスクリーニングを行った。製造ロットの関係が特性には多少のバラツキがあり、性能のよいものを選んで使用している。

CCD カメラにはいくつかのノイズ源が存在する。ショットノイズ、暗電流ノイズ、KTC ノイズ、増幅器ノイズなどである。この中でもショットノイズは光

子の統計的ゆらぎに起因するものであり，光計測においては最も支配的なノイズとなる。我々のシステムの場合，計算によると CCDチップ内ビニング処理後，1ピクセルあたり約 75,000 の電子が蓄積されることになる。ショットノイズ成分はこの電子数の平方根と考えてよいから，その割合は約 0.365 % となる。ショットノイズはポアソン分布に従って発生し，画素間で独立な確率現象とみなせるため，N画素を集めることでノイズは $1/\sqrt{N}$ に減らすことができる³³⁾。イメージングモード - では，隣接 2 ピクセルのデジタル加算を行っているため，結果，ショットノイズ成分は 0.26 % 程度と見積もることができる。しかしながら，ワンショット光計測を行うには，まだノイズレベルが大きい。そこで，FPGA 内の DSP 回路ではデジタル信号処理（隣接ピクセルを使った 3D フィルタリング）により，時空間解像度を多少犠牲にして S/N を向上させている。

Fig.2 右上のウィンドウには，LED 発光輝度を 100 ms 間ステップ状に変化させた際，各イメージングモードで記録した光シグナルを比較している。各イメージングモードにおいて S/N の差異は見られない。これは，各イメージングモードでのフレームレートを，各モードにおけるビニング数に逆比例するように選んだためであり，この結果からも光計測においてはショットノイズが最も支配的なノイズであることがわかる。各イメージングモードにおいて S/N は変わらないため，イメージングモードの選択は時間解像度と空間解像度のトレードオフである。ユーザーが個々の実験で最適なモードを選べばよい。

§ 4 むすび

本稿では，CCD を用いて新たに開発した光計測システムの概要と，その評価実験の結果を報告した。新しいシステムは多くの特徴を持ち，神経興奮現象解析のための新しいイメージングツールとして大いに期待される。特筆すべきは，(1) 神経活動をトレースするに十分な時間解像度と，脳標本の形態を観察するに十分な空間解像度の両方を実現したこと，(2) アベレーシング処理不要で，単発の神経興奮を捉えることができる S/N を実現したこと，(3) 数十秒という長時間イメージングを可能にしたこと，である。

現在は本システム開発で培った CCD 高速撮像技術を用い，総画素数が 2664x1681，撮像面が約 30x19 mm という超大型 CCD デバイス（松下電器産業（株）との共同研究による）を用いた光計測システムを構築，評価実験を始めている。撮像面が大きなセンサを用いることで，より広い脳領域を同時に観測可能となる。今後，無麻酔，行動下サルでの光計測に次期システムを導入し，随意運動中の運動関連分野における神経活動を一網打尽に捉える計画である。

謝 辞

リアルタイム神経活動イメージングシステムの設計，開発にあたっては，前電子技術総合研究所，現理化学研究所の市川道教博士のご指導とご援助を頂きました。ここに謝意を表します。CCD の高速読み出し技術に関しては，松下電器産業（株）の菰淵寛仁博士からの有益なご助言，ソフトウェア開発に関しては，科学技術振興事業団の篠田真由美氏にご協力頂きました。

また，研究全般にわたりご支援頂きました山根茂超分子部長，守谷哲郎大阪ライフエレクトロニクス研究センター長，ご協力頂いた脳機能イメージングラボ，脳の記憶・学習ラボの皆様にご感謝致します。

参考文献

- 1) Grinvald, A., Cohen, L.B., Leshner, S. and Boyle, M.B.: Simultaneous optical monitoring of activity of many neurons in invertebrate ganglia using a 124-element photodiode array, *J. Neurophysiol.*, 45 (1981) 829-840.
- 2) Salzberg, B.M., Obaid, A.L., Senseman, D.M. and Gainer, H.: Optical recording of action potentials from vertebrate nerve terminals using potentiometric probes provides evidence for sodium and calcium components, *Nature*, 306 (1983) 36-40.
- 3) Cohen, L.B. and Leshner, S.: Optical monitoring of membrane potential: methods of multisite optical measurement. In P. DeWeer and B.M. Salzberg (Eds.), *Optical Methods in Cell Physiology*, John Wiley & Sons, New York (1986) 71-99.
- 4) Orbach, H.S. and Cohen, L.B.: Optical monitoring of

- activity from many areas of the in vitro and in vivo salamander olfactory bulb: a new method for studying functional organization in the vertebrate central nervous system, *J. Neurosci.*, 3 (1983) 2251-2262.
- 5) Grinvald, A., Anglister, L., Freeman, J.A., Hildesheim, R. and Manker, A.: Real-time optical imaging of naturally evoked electrical activity in intact frog brain, *Nature*, 308 (1984) 848-850.
 - 6) Orbach, H.S., Cohen, L.B. and Grinvald, A.: Optical mapping of electrical activity in rat somatosensory and visual cortex, *J. Neurosci.*, 5 (1985) 1886-1895.
 - 7) Kauer, J.S., Senseman, D.M. and Cohen, L.B.: Odor-elicited activity monitored simultaneously from 124 regions of the salamander olfactory bulb using a voltage-sensitive dye, *Brain Res.*, 418 (1987) 255-261.
 - 8) London, J.A., Cohen, L.B. and Wu, J.Y.: Optical recordings of the cortical response to whisker stimulation before and after the addition of an epileptogenic agent, *J. Neurosci.*, 9 (1989) 2182-2190.
 - 9) Cinelli, A.R. and Salzberg, B.M.: Multiple site optical recording of transmembrane voltage (MSORTV), single-unit recordings, and evoked field potentials from the olfactory bulb of skate (*Raja erinacea*), *J. Neurophysiol.*, 64 (1990) 1767-1790.
 - 10) Cinelli, A.R. and Salzberg, B.M.: Dendritic origin of late events in optical recordings from salamander olfactory bulb, *J. Neurophysiol.*, 68 (1992) 786-806.
 - 11) Iijima, T., Matsumoto, G. and Kidokoro, Y.: Synaptic activation of rat adrenal medulla examined with a large photodiode array in combination with a voltage-sensitive dye, *Neuroscience*, 51 (1992) 211-219.
 - 12) Nakashima, M., Yamada, S., Shiono, S., Maeda, M. and Satoh, F.: 448-detector optical recording system: development and application to *Aplysia* gill-withdrawal reflex, *IEEE Trans. Biomed. Eng.*, 39 (1992) 26-36.
 - 13) Falk, C.X., Wu, J.Y., Cohen, L.B. and Tang, A.C.: Nonuniform expression of habituation in the activity of distinct classes of neurons in the *Aplysia* abdominal ganglion, *J. Neurosci.*, 13 (1993) 4072-4081.
 - 14) Hirota, A., Sato, K., Momose-Sato, Y., Sakai, T. and Kamino, K.: A new simultaneous 1020-site optical recording system for monitoring neural activity using voltage-sensitive dyes, *J. Neurosci. Methods*, 56 (1995) 187-194.
 - 15) Frostig, R.D., Lieke, E.E., Ts'o, D.Y. and Grinvald, A.: Cortical functional architecture and local coupling between neuronal activity and the microcirculation revealed by in vivo high-resolution optical imaging of intrinsic signals, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87 (1990) 6082-6086.
 - 16) Ts'o, D.Y., Frostig, R.D., Lieke, E.E. and Grinvald, A.: Functional organization of primate visual cortex revealed by high resolution optical imaging, *Science*, 249 (1990) 417-420.
 - 17) Lasser-Ross, N., Miyakawa, H., Lev-Ram, V., Young, S.R. and Ross, W.N.: High time resolution fluorescence imaging with a CCD camera, *J. Neurosci. Methods*, 36 (1991) 253-261.
 - 18) Cabo, C., Pertsov, A.M., Baxter, W.T., Davidenko, J.M., Gray, R.A. and Jalife, J.: Wave-front curvature as a cause of slow conduction and block in isolated cardiac muscle, *Circ. Res.*, 75 (1994) 1014-1028.
 - 19) Kleinfeld, D., Delaney, K.R., Fee, M.S., Flores, J.A., Tank, D.W. and Gelperin, A.: Dynamics of propagating waves in the olfactory network of a terrestrial mollusk: an electrical and optical study, *J. Neurophysiol.*, 72 (1994) 1402-1419.
 - 20) Gogan, P., Schmiedel-Jakob, I., Chitti, Y. and Tyc-Dumont, S.: Fluorescence imaging of local membrane electric fields during the excitation of single neurons in culture, *Biophys. J.*, 69 (1995) 299-310.
 - 21) Kogan, A., Ross, W.N., Zecevic, D. and Lasser-Ross, N.: Optical recording from cerebellar Purkinje cells using intracellularly injected voltage-sensitive dyes, *Brain Res.*, 700 (1995) 235-239.
 - 22) Potter, S.M., Mart, A. and Pine, J.: High-speed CCD movie camera with random pixel selection for neurobiology research, *Proc. SPIE.*, 2869 (1997) 243-253.
 - 23) 電総研ニュース 500号, リアルタイム神経活動イメージングシステム - 超高速・超高 S/N 撮影装置 - (1991)
 - 24) Ichikawa, M., Iijima, T. and Matsumoto, G.: Real-time optical recording of neural activities in the brain. In T.

- Ono, L.R. Squire, M.E. Raichle, D.I. Perrett and M. Fukuda (Eds.), Brain mechanisms of perception and memory, Oxford UP, New York (1993) 638-648.
- 25) Barish, M.E., Ichikawa, M., Tominaga, T., Matsumoto, G. and Iijima, T.: Enhanced fast synaptic transmission and a delayed depolarization induced by transient potassium current blockade in rat hippocampal slice as studied by optical recording, *J. Neurosci.*, 16 (1996) 5672-5687.
- 26) Iijima, T., Witter, M.P., Ichikawa, M., Tominaga, T., Kajiwara, R. and Matsumoto, G.: Entorhinal-hippocampal interactions revealed by real-time imaging, *Science*, 272 (1996) 1176-1179.
- 27) Kajiwara, R., Sand, O., Kidokoro, Y., Barish, M.E. and Iijima, T.: Functional organization of chromaffin cells and cholinergic synaptic transmission in rat adrenal medulla, *Jpn. J. Physiol.*, 47 (1997) 449-464.
- 28) Takashima, I., Ichikawa, M. and Iijima, T.: High-speed CCD imaging system for monitoring neural activity in vivo and in vitro, using a voltage-sensitive dye, *J. Neurosci. Methods*, 91 (1999) 147-159.
- 29) Ratzlaff, E.H. and Grinvald, A.: A tandem-lens epifluorescence microscope: hundred-fold brightness advantage for wide-field imaging, *J. Neurosci. Methods*, 36 (1991) 127-137.
- 30) Wong-Riley, M.: Changes in the visual system of monocularly sutured or enucleated cats demonstrable with cytochrome oxidase histochemistry, *Brain Res.*, 171 (1979) 11-28.
- 31) Takashima, I. and Iijima, T.: Analysis of the functional architecture of whisker barrel field of the rat SI cortex with optical recordings; Importance of inhibitory neural system for the discrimination of each whisker, *Soc. Neurosci. Abstr.* 57 (1994) 7.
- 32) Takashima, I. and Iijima, T.: Optical imaging of integrated neural activities in rat barrel cortex in response to multi-whisker stimulation, *Soc. Neurosci. Abstr.* 53 (1995) 10.
- 33) Davenport, W.B. and Root, W.L.: An introduction to the theory of random signals and noise, McGraw-Hill, New York (1958) 112-144.

(1999.10.4 受付)

著者紹介



高 島 一 郎

Ichiro TAKASHIMA

超分子部 脳機能イメージングラボ, 脳シグナル解析ラボ, 脳の記憶・学習ラボ, ニオイ(嗅覚)情報処理ラボ, 脳情報処理工学応用ラボ

E-mail: takashim@etl.go.jp

脳の多点計測, 機能マッピングに関する研究及び感覚情報統合処理メカニズムの研究に従事。



梶 原 利 一

Riichi KAJIWARA

超分子部 脳の記憶・学習ラボ, ニオイ(嗅覚)情報処理ラボ, 脳情報処理工学応用ラボ

E-mail: kajiwara@etl.go.jp

記憶・学習に関わる脳の情報伝達機構の研究に従事。



飯 島 敏 夫

Toshio IIJIMA

超分子部 脳機能イメージングラボ, 脳の記憶・学習ラボ, ニオイ(嗅覚)情報処理ラボ, 脳シグナル解析ラボ, 脳情報処理工学応用ラボ・ラボリーダー

E-mail: ijijima@etl.go.jp

脳神経活動の超高速イメージング法の開発, 記憶・学習機構, 運動指令構築機構等の研究に従事。