

〔研究〕

モルモット単離脳標本への光計測法の適用

Optical Imaging Technique Applied to the Isolated Guinea Pig Brain Preparation

高 島 一 郎 佐 藤 孝 明 梶 原 利 一 飯 島 敏 夫
I. TAKASHIMA T. SATO R. KAJIWARA T. IJIMA

Cortical neuronal architecture and connectivity can be analyzed with high-resolution optical imaging after staining the *in vitro* isolated guinea pig brain preparation by circulating the voltage-sensitive dye RH-795 via the arterial system. To establish this new technique, electrical field potentials evoked in the piriform and entorhinal cortices by lateral olfactory tract stimulation were correlated to the optical signal. The depth analysis of the optical response was performed by evaluating the contribution of the mono- and poly-synaptic components of the signal generated in different layers after applying a pair-pulse stimulation protocol. The tangential propagation of neuronal activity in olfactory cortices was evaluated by gathering several 4.2x4.2 mm images recorded from adjacent cortical areas. The real-time optical imaging technique applied to the isolated guinea pig brain can be successfully utilized to study the integrative properties of cortical neurons ensembles.

§ 1 はじめに

従来、光計測では *in vivo* (脳を生体中に置いたままの) 脳標本、ならびに *in vitro* 脳スライス標本を用いて研究が進められてきた (本報掲載の付随研究報告 “ 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 ” 参照)。 *In vivo* 系では生理的な自然刺激、例えば光や音などを与えたときの神経活動を記録できるメリットはあるが、大脳皮質表層での神経活動しか記録できないことや、計測可能な皮質対象領域が自ずと制限されるという問題がある。一方、スライス系では脳から任意のスライスを切り出し、標本に含まれる神経回路を詳細に調べることができる反面、切り出した時点でスライス厚 (~数百マイクロン) を超える神経ネットワークの3次元構造は保存されていない憾みがあった。

単離脳標本では、動物 (ここではモルモット) から全脳を摘出して実験用チャンバに移し、血管系を介して人工血液を灌流することで、全脳があたかも生体中にあるかのように生理活性を保持したままの

状態にある。 *In vivo* 系のように生理刺激は与えられないものの、3次元神経回路が保持され、露出された脳表面の任意の領域を観測することが可能であり、 *in vivo*, *in vitro* 両系の利点を備えている。特に、嗅内皮質 (entorhinal cortex)、嗅周囲皮質 (perirhinal cortex) といった領域は、脳の腹側部に位置することから *in vivo* 系でのアプローチは極めて困難であるが、単離脳標本では全脳を回転させることができるので容易にアクセス可能である。(嗅内皮質 / 嗅周囲皮質は、脳の短期記憶に重要な役割を果たしていると考えられる海馬と、長期記憶の座と考えられる大脳連合野を結ぶ皮質であり、記憶・学習機構において極めて重要なポジションを占めると考えられ注目されている。) また、単離脳標本では血管系から薬剤を灌流することも容易であり、薬理実験にも適している。我々はイタリア国立神経科学研究所 (Istituto Nazionale Neurologico, Italy) との共同研究において、膜電位感受性色素を単離脳標本の動脈系から灌流して全脳を染色、光計測を行う手法を確立した¹⁾。本稿ではその実験プロトコルの詳細と実験結果について報告する。

KEYWORDS : Optical imaging, Voltage-sensitive dye, Isolated guinea pig brain, Piriform cortex, Entorhinal cortex

§ 2 実験方法

2.1 単離脳標本

標本作成手順は以下の通りである²⁾。(1) モルモット (オス, 200 g) に, ペントバルビタール (20 mg/kg) を腹腔投与して麻酔を行う。(2) 開胸して上行大動脈から生理食塩水 (10°C) を脳灌流し, 血液と置換すると同時に低体温とする。(3) 血管系を傷つけないように全脳を摘出してチャンバに移す。チャンバ内液の温度は 15°C に維持する。(4) Fig.1 (A) に示すように, 片側の椎骨動脈にカニユーレを挿入し, 対側の椎骨動脈, 内頸動脈, 下垂体動脈をシルク糸で縛る。(5) 蠕動ポンプを用い, カニユーレーションを行った椎骨動脈から人工脳灌流液の灌流を開始する。(6) チャンバ内液の温度を 90 分以上かけてゆっくりと 27 - 30 °C まで上昇させる。液温制御は, チャンバに取り付けたペルチエ・デバイスを用いて行った。

人工脳灌流液の組成は, NaCl 126mM, KCl 2.3mM, NaHCO₃ 26mM, MgSO₄ 1.3mM, CaCl₂ 2.4mM, KH₂PO₄ 1.2 mM, glucose 15mM, HEPES 5mM, 3% dextran 70,000 であり, 95% O₂ - 5% CO₂ でバブリングを行いながら pH 7.3 に調整した。脳灌流の流速は 5.5 - 6.0 ml/min である。そして光計測を行う前には, 膜電位感受性色素 (RH - 795, 1.0 mg/ 20 ml - 灌流液) を脳灌流して標本の染色を行った。染色の状態を確認するため, 実

験終了後, 単離脳の冠状断標本に励起光を照射し, 色素からの蛍光を撮影したものが Fig.1 (B) である。蛍光は可視赤色であり, 本手法により脳全体が一様に染色されていることが確認された。*In vivo* 標本では脳表から色素を与えるだけなので, 脳深部まで染色することは困難であったから, 単離脳は染色においても有利な標本であると言える。

2.2 電気刺激, 細胞外誘導記録

実験では標本の外側嗅索 (LOT) に電気刺激を行った。刺激電極には, 双極性微小電極 (直径 25 μm, チップ間隔 115 μm) を使用, 刺激強度は 20 - 200 μA, 100 μs であった。

また, 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 0.9% NaCl, 入力抵抗は 5 - 10 M とした。

2.3 光学系と光計測システム

光学系は, 本彙報掲載の付随研究報告 “ 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 ” に示したものと同一である。但し, 顕微鏡倍率を ×2 で使用した。また, 実験では MOS 型センサー光計測システムを使用し, その空間解像度は 64x64 画素, 観測領域は 4.2x4.2 mm であった。

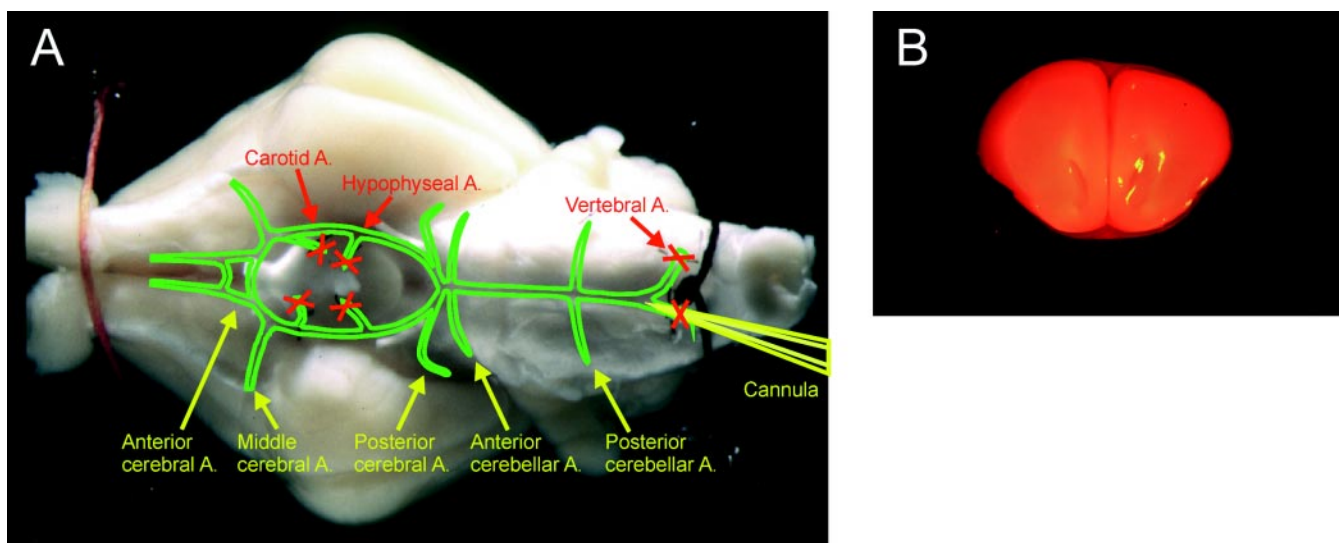


Fig.1 (A) Isolated guinea pig brain preparation *in vitro*.
(B) Section of the brain arterially perfused with the voltage-sensitive dye RH-795.

§ 3 光計測実験結果

ニオイ情報は、嗅受容細胞から出る嗅神経線維によりまず嗅球に入力される。次に嗅球内の僧帽細胞からの出力繊維が外側嗅索を形成し梨状皮質へ伝えられる。さらに梨状皮質の出力が大脳皮質へ投射される。この嗅球から大脳皮質に至る嗅覚中枢経路において、ニオイ刺激に対する神経細胞の応答を調べた研究³⁾によれば、高次中枢に進むに従い、単一細胞の応答するニオイの種類が減少し、ニオイの質の分析が完成することが知られている。しかしながら、視覚や聴覚と比較すれば、今日までに得られている知見は極めて少ないと言える。また、嗅覚系の末梢に近いところでの研究に比べ、嗅中枢、特に嗅球から先での詳細な解析は皆無に等しい。

以下では、膜電位感受性色素で染色した単離脳標本を用い、外側嗅索 (LOT) に電気刺激を行い、梨状皮質ならびに嗅内皮質において記録した神経活動の光計測結果について報告する。

3.1 梨状皮質 - 嗅内皮質 神経興奮伝播

電気生理学的な研究によれば、外側嗅索の刺激により、梨状皮質、嗅結節、嗅内皮質に神経活動が引き起こされることが知られている⁴⁻⁷⁾。Fig.2 は、梨状皮質から嗅内皮質までカメラの視野を動かしながら、外側嗅索刺激後の神経興奮伝播の様子を追いかけた結果である。8つのカメラ位置で行った光計測結果を結合して表示している。予測されたように、刺激後、まず嗅結節、梨状皮質の前部に神経興奮が現われ、少し遅れて梨状皮質後部に広がった後、梨状皮質外側を嗅脳溝に沿うように興奮が伝播し、約 40 ms 後には嗅内皮質外側まで達している。

3.2 細胞外誘導記録と光シグナルの比較

Fig.3 (A) には標本と刺激電極の位置、前梨状皮質をカバーする光計測領域 (破線) が示されている。Fig.3 (A) に示した位置 (E) で記録した誘発電位と、その近傍の1画素 (1-3) で検出した光シグナルを Fig.3 (B)

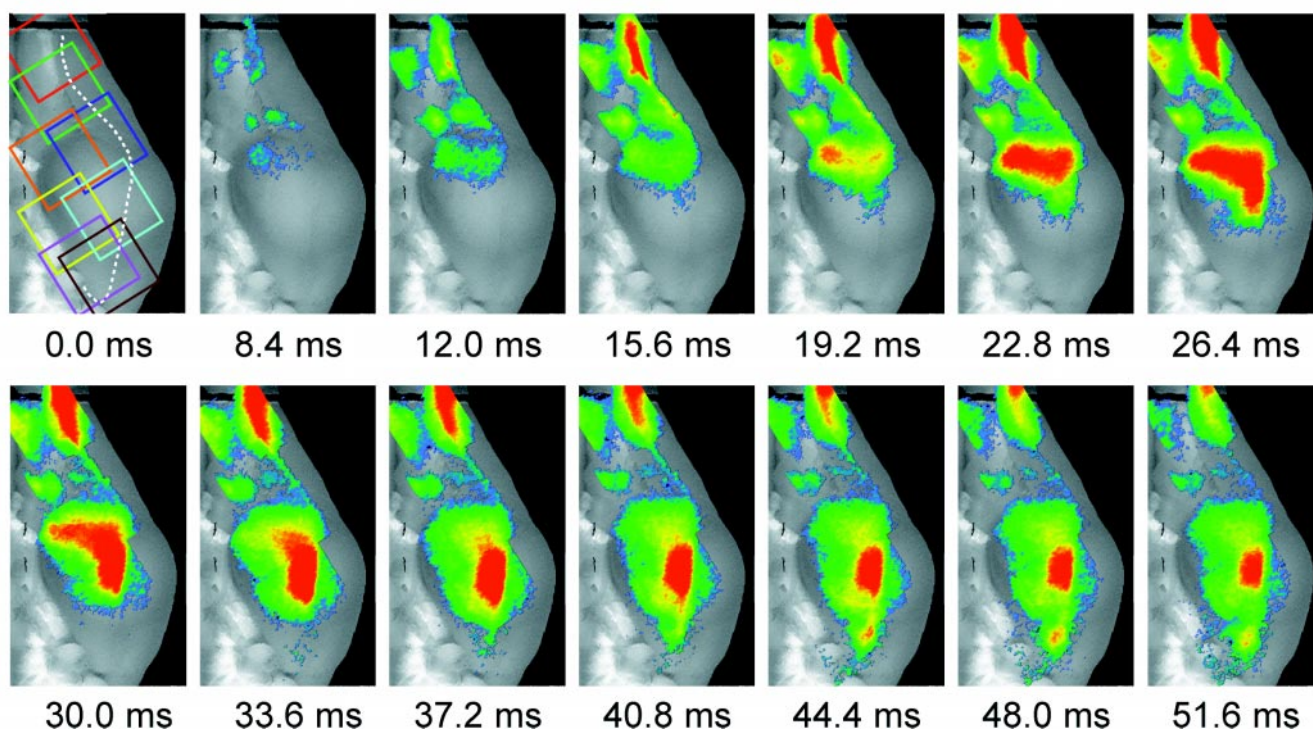


Fig.2 Neuronal activity propagation in the piriform cortex and entorhinal cortex following LOT stimulation. On the upper left, the eight different 4.2 x 4.2 mm squares from which optical recording were performed at different sequential times were superimposed to a CCD camera-derived image of the ventral view of the brain. The camera was moved to the next field after the acquisition of the optical signal. The same LOT stimulation intensity was applied to record from an adjacent cortical area. The propagation pattern was reconstructed by gathering off-line the individual recordings of each of the 8 sessions. Delays from the LOT stimulus are indicated.

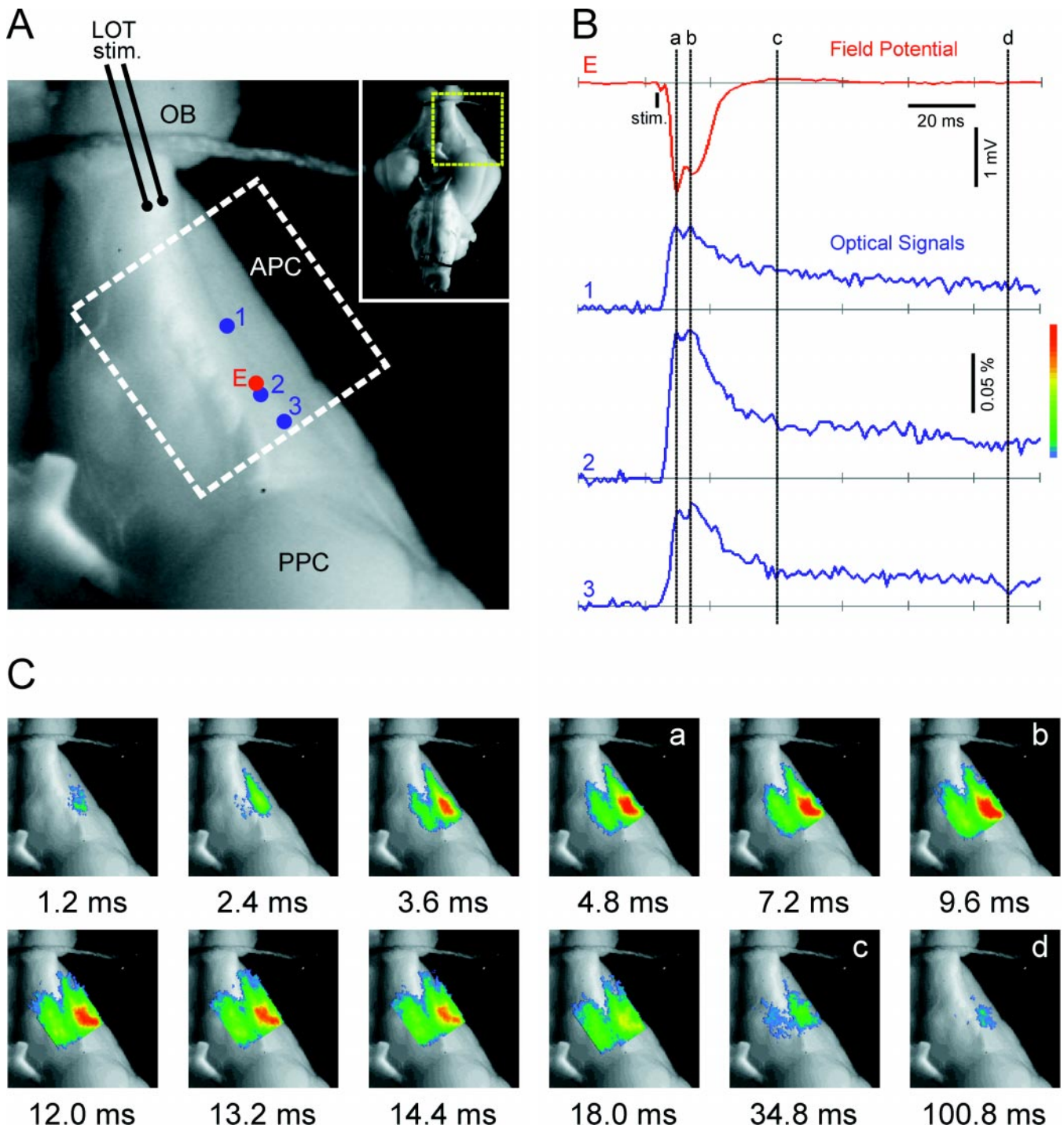


Fig.3 Correlation between field potentials and optical signals evoked by LOT stimulation in the piriform cortex. (A) The area enclosed by the broken square line represents the camera field superimposed to the enlargement of the ventral view of the isolated guinea pig brain, as it appears during the experimental session (inset on the right); OB, olfactory bulb; APC, anterior piriform cortex; PPC, posterior piriform cortex; LOT, lateral olfactory tract. Stimulating electrode (Stim) positioned on the LOT. Field potentials were recorded from E. (B) Correlation between the LOT-evoked field response (E) and the voltage-dependent optical signals recorded from the pixels located in 1, 2 and 3. The vertical lines mark the time point corresponding to the mono-synaptic (a), the poly-synaptic (b) peaks and the late components of the responses (c and d). (C) Spatio-temporal pattern of optical changes in the piriform cortex represented by pseudo-color image using color code calibration shown in B. Delays from LOT stimulus are indicated below each panel. The distribution pattern corresponding to times a, b, c and d are marked.

で比較している。刺激直後、細胞外誘導記録波形には陰性波ピークが2つ観測され、光シグナルにも対応するタイミングで2つのピークが記録されている。Fig.3 (C) は神経活動のマッピング結果を示す。Fig.3 (B) の時刻 (a - d) に対応するイメージには a - d が記されている。

Fig.4 (A) は、梨状皮質の神経細胞ネットワークモデルとして現在までに知られているものである⁸⁾。外側嗅索 (LOT) の軸索終末は a 層に終わり、その多くは層錐体細胞 (SP) の樹状突起とシナプス結合している。また、層 SP 細胞は神経軸索側枝を b 層に反回させ、b 層にはこれら連合線維群終末が終わり、層錐体細胞 (DP) の樹状突起とシナプス結合している。従って、Fig.3 (B) で細胞外誘導記録波形ならびに光シグナルに記録された2つのピークは、第1のピーク：層 SP 細胞が LOT からの入力を a 層で受けて生ずる単シナプス (Mono-synaptic) 応答、第2のピーク：層 DP 細胞が連合線維群入力を b 層で受けて生ずる多シナプス (Poly-synaptic) 応答、をそれぞれ反映していると解釈される。

3.3 単シナプス応答と多シナプス応答の分離

外側嗅索刺激時に記録した単シナプス応答、多シナプス応答は、それぞれ、梨状皮質 a 層 (0 - 200 μm)、b 層 (200 - 450 μm) における神経活動である。以下では、ペアリング刺激パラダイムを用いて、この単シナプス応答と多シナプス応答の分離を試みている。

Fig.4 (A) に示すように、梨状皮質 層 SP 細胞の出力は、抑制性インターニューロンを介して 層 DP 細胞を抑制することが知られている。従って、外側嗅索に刺激間隔 30 - 40 ms 間隔でペアリング刺激を与えると、第2の刺激に対する多シナプス応答はブロックされる。Fig.4 (B) は、外側嗅索に刺激間隔 30 ms で連続刺激を与えた場合の細胞外誘導記録であるが、第2の刺激に対して多シナプス応答は消失し、単シナプス応答のみが観測されている⁹⁻¹¹⁾。

Fig.5 (A) にペアリング刺激パラダイムを用いた、単シナプス応答と多シナプス応答の分離方法を示す。トレース a に示すように単一刺激に対しては単シナプス / 多シナプス応答に対応する2つのピークが見られる。トレース b では、第2の刺激に対しては単シナプ

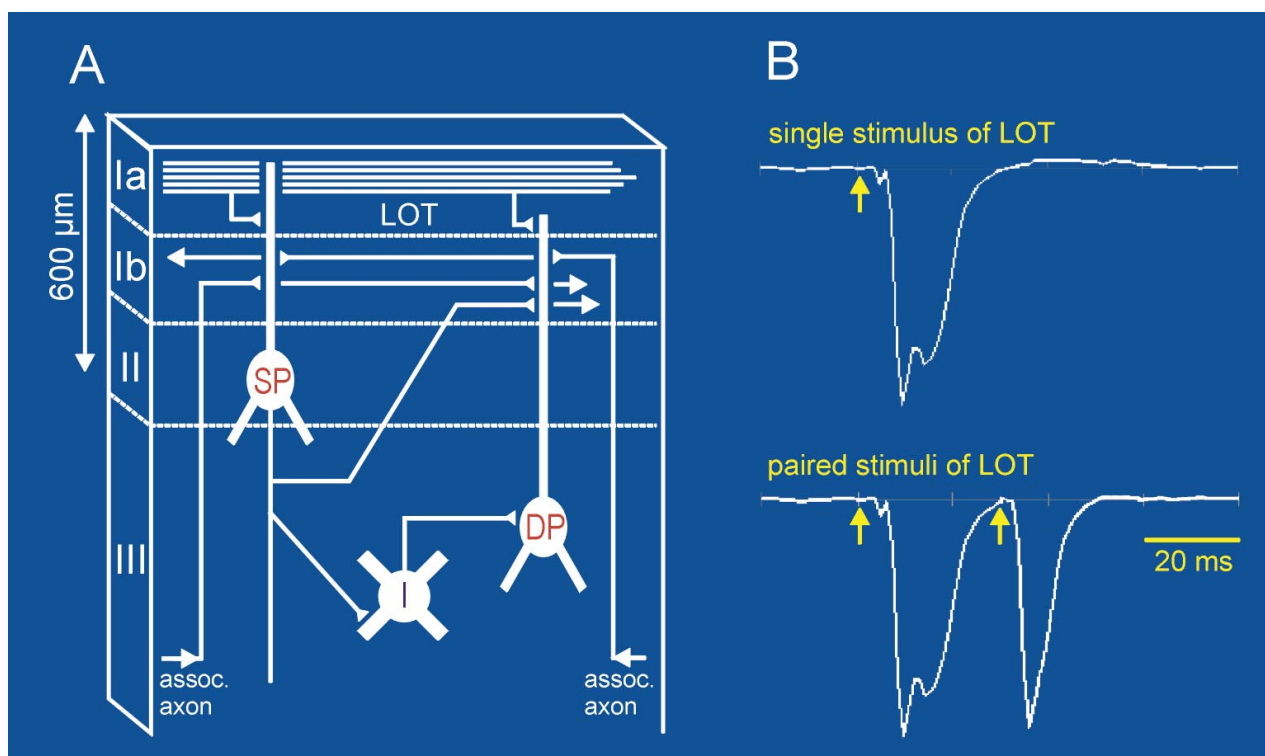


Fig.4 (A) Schematic circuit diagram of the piriform cortex.
(B) Piriform cortex responses to single and paired stimuli of LOT.

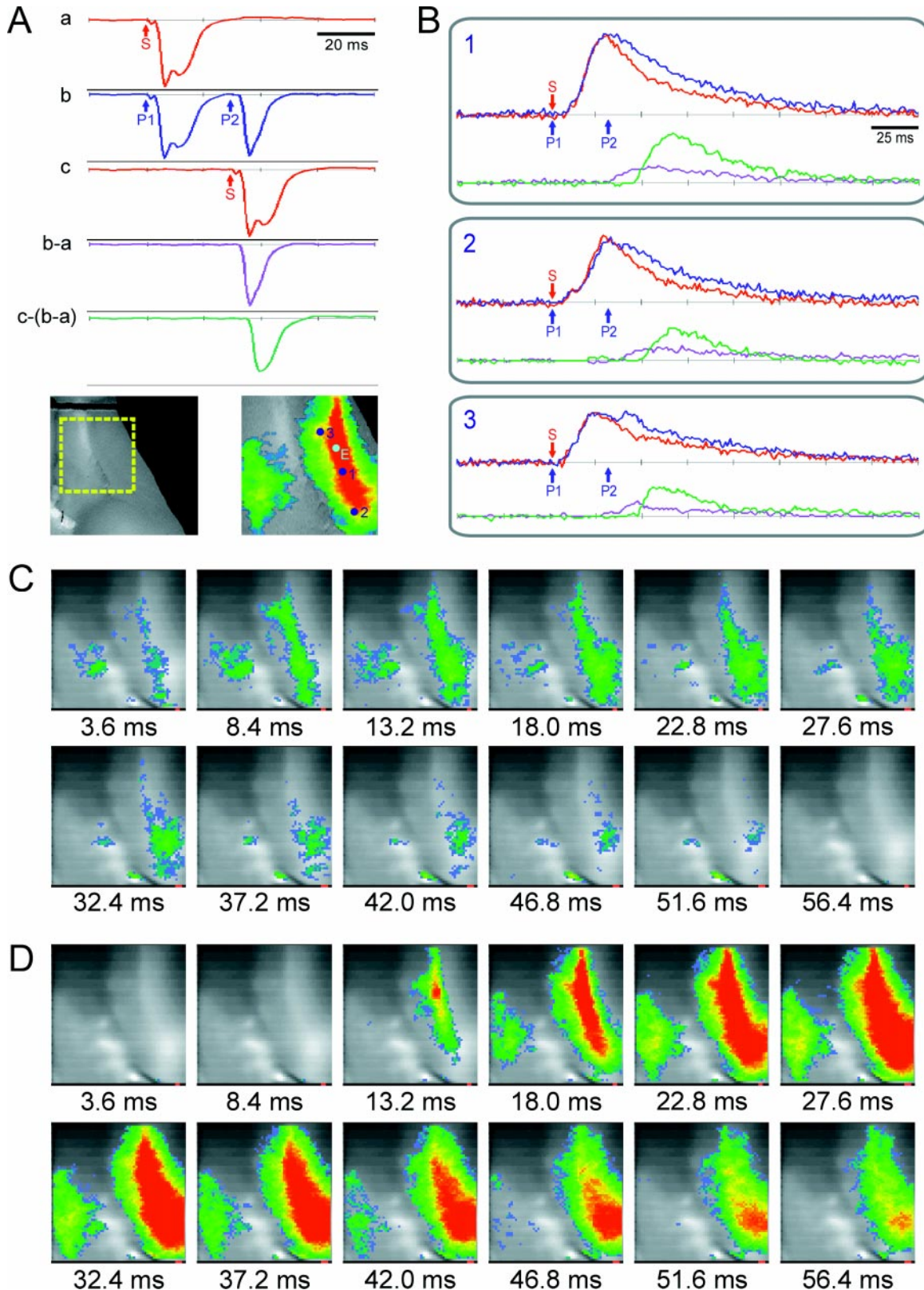


Fig.5 Isolation of mono- and poly-synaptic LOT-evoked responses in the piriform cortex. (A) Paired-pulse paradigm utilized to isolate the synaptic components of the LOT responses. Single stimulation: S. Conditioning and conditioned pairing stimuli: P1 and P2. The lower right panel in A shows the location of the electrophysiological (E) and the optical recording sites illustrated in B. (B) For each panel the superimposed upper traces represent the optical signals evoked by single (red) and paired (blue) stimulation. The lower traces show the isolated mono- (purple, b-a) and poly-synaptic (green, c-(b-a)) responses. The spatio-temporal propagation pattern of isolated mono-synaptic and poly-synaptic optical signals obtained according to this procedures are illustrated in C and D, respectively.

ス応答だけである。そこでトレース b からトレース a を引き算すれば、単シナプス応答のみが得られる (トレース b - a)。次に、トレース a を連続刺激時の刺激間隔だけ時間シフト (トレース c) し、これから分離された単シナプス応答 (トレース b - a) を引き算すれば、今度は多シナプス応答のみが得られる (トレース c - (b - a))。Fig.5 (A) に示した方法を光シグナルに適用した結果が Fig.5 (B) である。単一刺激時に記録した光シグナルが赤、ペアリング刺激時に記録した光シグナルが青のトレースで示されている。光シグナルは、Fig.5 (A) 下図に示す画素 (1-3) で記録したものである。Fig.5 (B) の光シグナルには、Fig.3 (B) の光シグナルほど明確な 2 つのピークが見られないが、これは刺激強度を小さく抑えたためである。そして、光シグナルの演算処理により分離した単シナプス応答、多シナプス応答がそれぞれ、紫、緑のトレースで示されている。分離された光シグナルを用い、単シナプス応答 (梨状皮質 a 層での神経活動)、多シナプス応答 (b 層での神経活動) をそれぞれ個別にイメージングした結果が Fig.5 (C), (D) である。単シナプス応答の応答中心は、嗅結節および外側嗅索に近い梨状皮質内側に局限しているのに対し、多シナプス応答は梨状皮質全域に広く分布するとともに、その応答中心は外側嗅索より離れた梨状皮質外側にあると言える。

§ 4 考 察

- 光計測により脳深部での神経活動は検出できるか? -

実験結果から、単離脳標本を用いた場合、脳表から ~450 μm 深さまでの神経活動は検出可能であることが分かった。光計測でどこまで脳深部の神経活動を記録できるかという問いに答えるためには、(1) 脳深部の染色程度、(2) 脳組織での励起光 / 蛍光の吸収・散乱、(3) 光学系の被写界深度と焦点面 に関して考察を行う必要がある。

(1) 脳深部の染色 : *in vivo* 標本では脳表から色素を与えるため、脳深部まで一様に染色することは難しい。経験的に通常の 90 - 120 分の染色では、皮質全層約 1 mm 深さまで染色されるが、当然、脳表に近いほど染色程度は高く深部ほど染まりは悪い。一方、単

離脳標本では、Fig.1 (B) に示したように全脳が一様に染色されている。

(2) 脳組織での光の吸収・散乱 : 微小ガラス電極の先端に微量の Nile Red (RH - 795 とほぼ同じ励起 / 蛍光波長を持つが、より強い蛍光量の色素) を詰め、*in vivo*、単離脳標本に徐々に挿入し脳深部からの蛍光強度をプロットした結果が Fig.6 である。脳表での光量が正規化している。空気中でのプロットは光学系のぼけを示す。各標本において光量は指数関数的に減少している。血液特に赤血球は、励起光 (530 nm) 波長域に大きな光吸収帯を持っていることから *in vivo* 標本は赤血球のない単離脳標本に比べ光透過性が悪い。Fig.6 から、単離脳標本を用いれば 1000 μm 深さからの蛍光も検出可能であるが、光散乱の影響を考えれば、600 - 700 μm より深部から検出した光シグナルが正しくその場所での神経活動を反映しているかどうかという解釈については慎重に判断する必要がある。

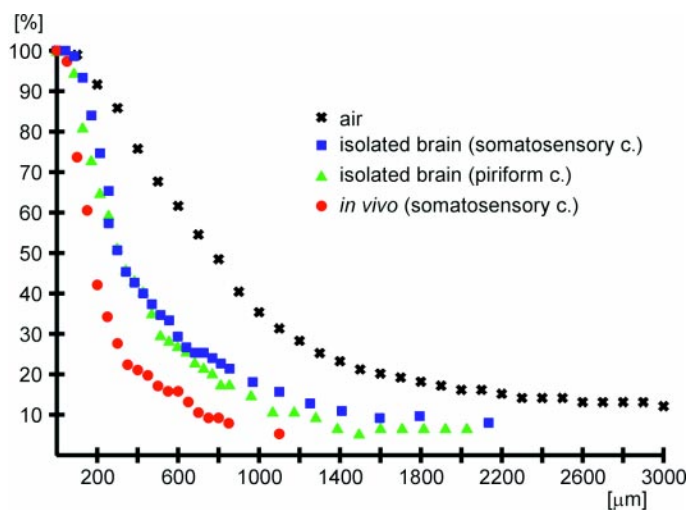


Fig.6 Normalized optical signal intensity at different depths in the cortical tissue measured at the cortical surface when the tip of a pipette loaded with the fluorescent dye Nile Red was lowered in the cortex (100% corresponds to the surface recording). The focal plane of the microscope was maintained at 0 depth during the measurements. Measurement performed in the piriform cortex (triangle) and in the somatosensory cortex (squares) of the isolated brain *in vitro*, in the somatosensory cortex (circles) of guinea pig brain *in vivo* and in the air (crosses) are illustrated. The measurements performed in the air (no tissue penetration) reflect the decrease in recorded light due to the defocusing of the electrode tip by moving it from 0 to 3000 μm from the focal plane.

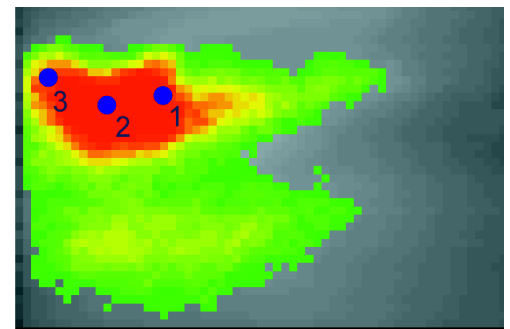
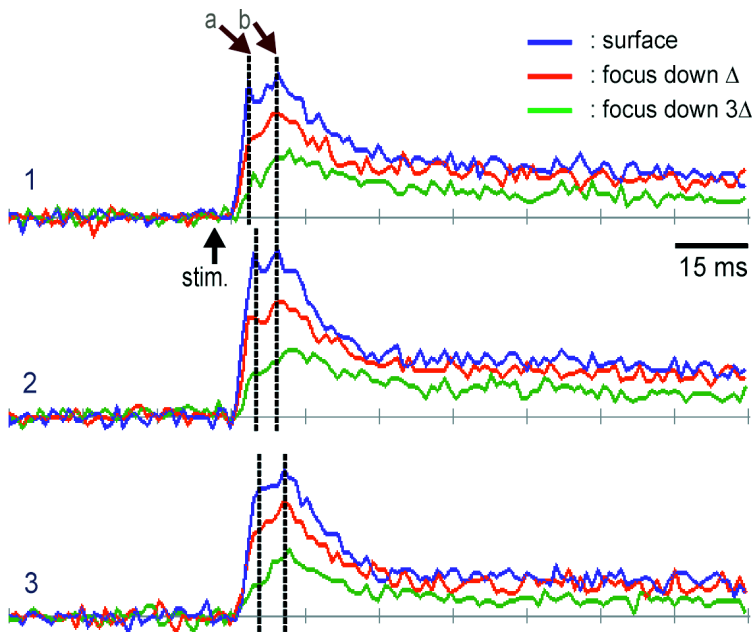
(3) 光学系の被写界深度と焦点面制御：被写界深度は対物レンズにより決まる。Fig 6 に示したように、我々の光学系の被写界深度は適度に深く（半値が 800 μm 程度）、深さ方向にはほぼ脳の全層から光を集めている。Fig 6 のプロットは光学系の焦点面を脳表において記録した結果であった。もし、焦点面を脳表より下げて光計測を行えば、脳表近くからの光シグナルをぼかし、脳深部からの光シグナルをより強調して記録できることが期待される。Fig 7 は光学系の焦点面を脳表から少しずつ下げて行った梨状皮質での光計測結果を示している。光シグナルに見られる2つのピーク値を比較すると、焦点面を下げるに従い、第1ピーク値に対する第2ピーク値が相対的に大きくなっていくことがわかる。つまりこの結果は、焦点面を下げるにより、梨状皮質 a 層より深部の b 層での神経活動に注目した光計測が行えることを示している。また将来的には、被写界深度の浅い光学系を用い、焦点面制御を行うことでオプティカル・セクショニング（任意の深さでの神経活動のみを切り出す）も可能であると考えている。

§ 5 むすび

本稿ではモルモット単離脳への光計測法の適用について報告した。これは膜電位感受性色素が血液脳関門を通過し、色素の脳灌流により単離脳を均質に染色して光計測が可能であることを示した最初の報告である。単離脳標本は *in vivo*, *in vitro* スライス標本にない多くの特徴を有するとともに光計測との親和性も高い。

単離脳標本は *in vivo* 標本に比べ光透過性が高いことから、検出した光シグナルには、より脳深部での神経活動が反映されている。実験ではペアリング刺激パラダイムを用いて梨状皮質応答を解析、光シグナルの層分離（シグナル源の分離）に成功している。光計測において光軸深さ方向への解析を試みた例は極めて少なく、本報告は特殊な条件下での結果とは言え、今後の光計測の可能性を大きく広げるものである。

また最近、我々のグループでは、嗅覚受容器の応答が脳に伝えられるような鼻付きの単離全脳標本を



Ratio of peak amplitudes, b/a

	site 1	site 2	site 3
surface	1.04	1.03	1.13
focus down Δ	1.36	1.27	1.33
focus down 3Δ	1.56	1.50	1.79

Fig.7 Contribution of mono- and poly-synaptic responses to the optical signals obtained by lowering the focal plane of the microscope from the cortical surface. Calculated ratios of peak amplitudes (b/a) are summarized in the table.

開発することに成功した¹²⁻¹³⁾。この標本においては電気刺激でなく、ニオイ刺激を嗅覚受容器に与えることが可能であり、実際のニオイ情報が嗅覚系皮質でどのように処理されているかを解明すべく研究が進められている。

謝 辞

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、ご協力頂いたニオイ（嗅覚）情報処理ラボ、脳機能イメージングラボの皆様には感謝致します。

参考文献

1) de Curtis, M., Takashima, I. and Iijima, T.: Optical recording of cortical activity after *in vitro* perfusion of cerebral arteries with a voltage-sensitive dye, *Brain Res.*, 837 (1999) 314-319.

2) Muhlethaler, M., de Curtis, M., Walton, K. and Llinas, R.: The isolated and perfused brain of the guinea-pig *in vitro*, *Eur. J. Neurosci.* 5 (1993) 915-926.

3) Yarita, H., Iino, M., Tanabe, T., Kogure, S. and Takagi S.: A transthalamic olfactory pathway to orbitofrontal cortex in the monkey, *J Neurophysiol.*, 43 (1980) 69-85.

4) Biella, G. and de Curtis, M: Associative potentials in the PC of the *in vitro* isolated guinea-pig brain, *Eur. J. Neurosci.*, 7 (1995) 54-64.

5) Boeijinga, P.H. and van Groen, Th.: Inputs from the olfactory bulb and olfactory cortex to the entorhinal cortex in the cat, *Exp. Brain Res.*, 57 (1984) 40-48.

6) Haberly, L.B.: Summed field potentials evoked in opossum piriform cortex, *J. Neurophysiol.*, 36 (1973) 755-788.

7) Ketchum, K.L. and Haberly, L.B.: Membrane currents evoked by afferent fiber stimulation in the rat piriform cortex I. Current source density analysis, *J. Neurophysiol.*, 69 (1993) 248-260.

8) Satou, M., Mori, K., Tazawa, Y. and Takagi, S.: Interneurons mediating fast postsynaptic inhibition in

piriform cortex of the rabbit, *J. Neurophysiol.*, 50 (1983) 89-101.

9) Biella, G., Panzica, F. and de Curtis, M.: Interactions between associative synaptic potentials in the PC of the *in vitro* isolated guinea-pig brain, *Eur. J. Neurosci.*, 8 (1996) 1350-1357.

10) Litaudon, P. and Cattarelli, M.: Origin of the *in vivo* rat piriform cortex activity recorded with voltage sensitive dye: comparison of the optical signals and the field potentials, *Brain Res.*, 594 (1992) 171-175.

11) Litaudon, P. and Cattarelli, M.: Olfactory bulb repetitive stimulations reveal non-homogeneous distribution of the inhibitory processes in the rat piriform cortex, *Eur. J. Neurosci.*, (1996) 21-29.

12) Sato, T., Takashima, I., Matsukawa, M., Tsukada, K. and Iijima, T.: *In vitro* preparation of isolated whole brain with olfactory epithelium for measurement of olfactory cortex activity, *Soc. Neurosci. Abstr.* 256 (1998) 1.

13) Sato, T., Takashima, I., Kajiwara, R., Tsukada, K. and Iijima, T.: Recordings of odor-induced activities in olfactory cortex in *in vitro* preparation of isolated whole brain with olfactory epithelium, *Soc. Neurosci. Abstr.* (1999) to appear.

(1999.10.4 受付)

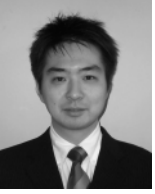
著者紹介



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。



佐 藤 孝 明
 Takaaki SATO
 大阪ライフエレクトロニクス研究センター 嗅覚受容ラボ・ラボリーダー、ニオイ（嗅覚）情報処理ラボ、脳の記憶・学習ラボ
 E-mail : tasato@etl.go.jp
 ニオイ受容の分子メカニズムの研究及び嗅覚における神経情報処理機構の研究に従事。



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 IJIMA

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: ijima@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。