

●聴覚野神経活動の内因性酸化還元蛍光によるイメージング

新潟大学・脳研究所・システム脳生理学分野 菱田 竜一・工藤 雅治・渋谷 克栄

1. はじめに

脳機能を解析する上で、神経活動のイメージングは重要なテクノロジーである。従来から知られている方法には、血流を捉えるMRI・PET、膜電位感受性色素やカルシウム指示色素で染色する方法、代謝活動を吸光度の変化として捉えるintrinsic signal法などがあるが、今回われわれが開発した方法では、細胞の酸素代謝を緑色の自家蛍光の変化として捉えてイメージングする。神経活動により自家蛍光が変化すること自体は既に知られていたが、この蛍光変化を利用して神経活動をイメージングすることにはじめて成功した。また、この緑色の自家蛍光はフラビン蛍光に由来すること、この方法が他の方法にない長所を持つことを明らかにした。本稿では、フラビン蛍光を用いたラット大脳スライスの神経活動のイメージングについて簡単に述べることにする。

2. 脳スライスの神経活動と自家蛍光

図1は、ラット大脳聴覚野から調整したスライスを使った実験例である。青色の励起光によってスライスから発せられるの緑色の自家蛍光（フラビン蛍光）をCCDカメラで撮影した。スライスに電気刺激を加えると、刺激部位近傍のフラビン蛍光が強くなった。この蛍光強度の変化をレシオ・イメージングしたのが図1A、経時の変化をプロットしたのが図1Bである。この時の蛍光強度の変化はピーク時には30%と大きく変化したので、信号変化率が0.1%程度（最大でも1%程）であるintrinsic signal法とは異なり、幾つかの試行を平均加算することなく鮮明なイメージング画像が得ることができた。また、この蛍光強度の変化は刺激の発数・強度に応じて増減し、単発で微弱な刺激（100 μ A程度）でも測定できるが、多い発数で強い刺激の方がより大きく変化した。つ

まり、神経活動の強弱により蛍光強度の変化が影響を受けることがわかった。

3. 自家蛍光の波長特性

上記のように緑色の自家蛍光（フラビン蛍光）は神経活動に応じて蛍光強度が変化した。緑色の光で励起した時に組織が発する赤色の自家蛍光ではこのような現象は見られなかった。この波長特性を利用すると、フラビン蛍光と他の色素との2重のイメージングが可能である。実際、カルシウム指示色素Rhod-2で染色したスライスで、フラビン蛍光によるイメージングとRhod-2の赤色蛍光によるイメージングを行った。両者は、時間経過の点で大きく異なっており、Rhod-2の信号は刺激終了時にピークに達するのに対し、フラビン蛍光では刺激終了から1秒ほど遅れてピークに達した。しかしながら、ピーク時での信号の空間的な分布は両者ほぼ同じであった。

4. 自家蛍光の由来

上述した緑色の自家蛍光の多くは、ミトコンドリア電子伝達系のフラビンに由来する（図2A）。フラビンは、ビタミンB2から合成されるヌクレオチドで、酸化型と還元型との2タイプがある。酸化型フラビンは450nm付近の光で励起されて550nm付近（緑色）の蛍光を発するが、還元型フラビンは450nm付近の光では励起されず、緑色の蛍光を発することはない。この酸化・還元によるフラビン蛍光の変化をイメージングに利用している。詳しく述べると、神経活動が活発になると、細胞内にカルシウムイオンが流入し、このカルシウムイオンによりミトコンドリアの活性が高くなる。電子伝達系の活性が上がり、還元型フラビンが酸化されて酸化型フラビンになり、緑色の蛍光が増加することになる、というのがイメージ

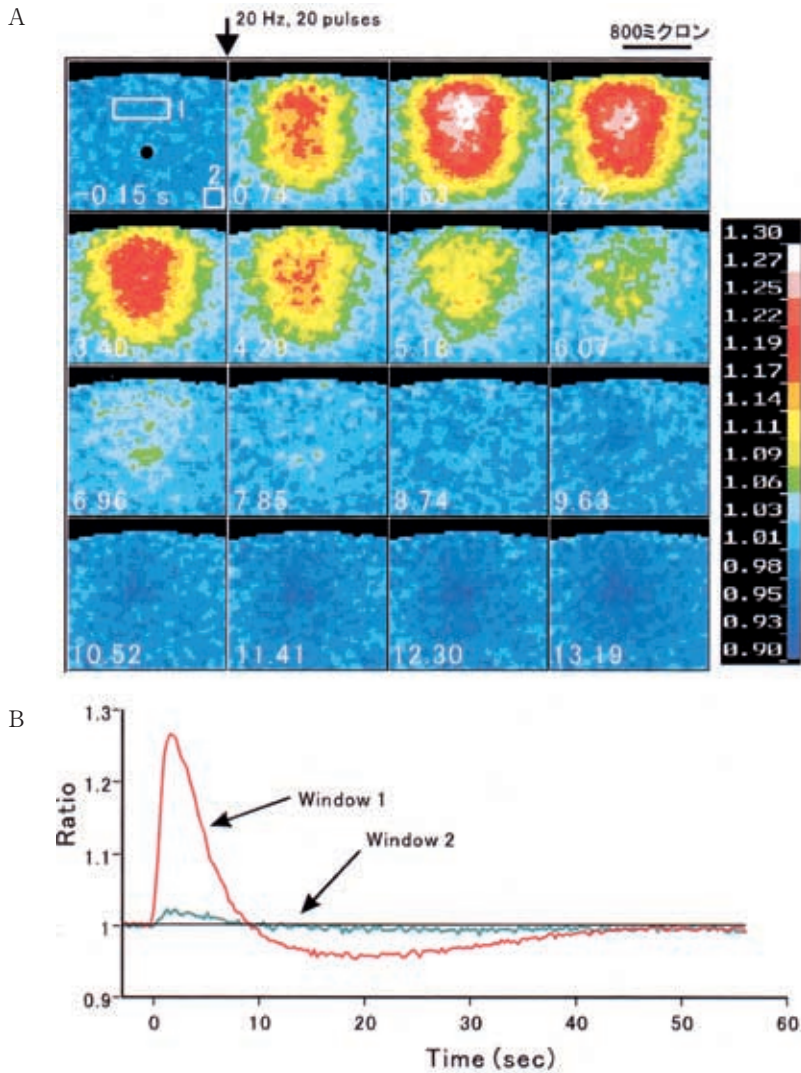


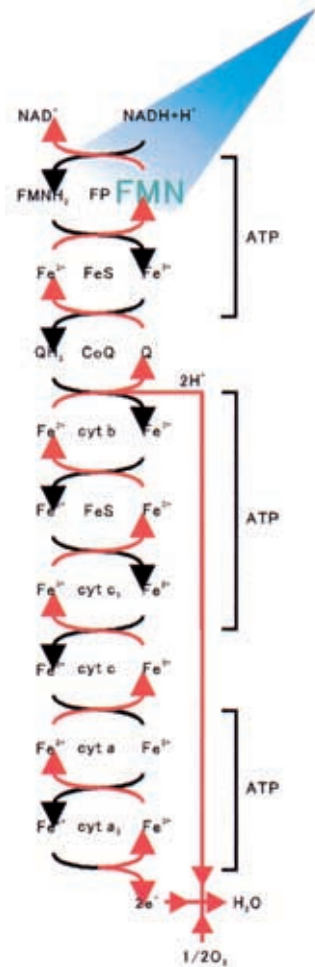
図1. ラット大脳聴覚野スライスの自家蛍光変化
 (A) 緑色自家蛍光の強度変化. 0秒時に20Hz20発300 μ Aの電気刺激をV層に加えた(黒丸). 光学系はニコン倒立顕微鏡(TE300)と附属のフィルターセット(B-1E)を, CCDカメラおよび画像解析ソフトは浜松ホトニクスのAugus-Hiscaシステムを使用した. (B) Aに記入した2つのウィンドウ内の蛍光強度の経時的变化.

ングのメカニズムである(図2B).

以上のメカニズムは, スライスをを用いた薬理学的実験により確認できた. 培養液にテトロドトキシンを加えたり, カルシウムイオンを除いた培養

液を灌流すると, スライスに電気刺激を加えても緑色の自家蛍光はほとんど変化しなかった. 培養液からグルコースや酸素を除いたり, フラビンの阻害剤であるジフェニレンヨードニウム(DPI)

A



B



を培養液に加えるても同様の結果であった。これらの結果は、神経の活動・細胞内へのカルシウムイオンの流入・エネルギー代謝・酸素代謝およびフラビンの活性が、緑色自家蛍光の変化に必要であることを示している。

5. 将来の展望

このフラビン蛍光を用いたイメージングの方法では、膜電位感受性色素やカルシウム指示色素を用いる方法と異なり、染色を必要としない。このため、色素そのものの毒性や染色という操作によってスライスの生理活性を低下させることがない。また、時間が経つにつれて色素が細胞から抜けて退色することがないので、長時間にわたる測定が可能である。実験例をあげると、Rhod-2で染色したスライスは無染色のスライスに比べて生理活性が低かった。また、Rhod-2の信号は1時間後には元の7割ほど、4時間後には3分の1にまで減少したが、フラビン蛍光の信号は4時間後でもほぼ同じであったという結果を得ている。このようなメリットは、例えば神経活動の可塑的変化のイメージングの際に大きな意味を持つと思われる。可塑的変化にはデリケートな細胞メカニズムを要し、変化を捉えるには長時間にわたる測定が必要だからである。今後この方面での応用が期待される。

また、この方法は動物個体を用いた *in vivo* 実験や脳外科手術中のヒト脳機能モニタリングにおいても有効であろうとわれわれは考えており、現在研究を進めている。

最後になりますが、このような発表の機会を与えて下さった若手の会関係者の皆様に感謝いたします。

図2. ミトコンドリア電子伝達系とフラビン蛍光

(A) 電子伝達系のカスケード。酸化型フラビン (FMN) と還元型フラビン (FMNH₂) とが互いに変換する。(B) フラビン蛍光を用いたイメージングのメカニズム。