

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 5 月 15 日現在

機関番号：36102
研究種目：奨励研究
研究期間：2019
課題番号：19H00332
研究課題名：新規の Fast Intrinsic Optical Signal (FIOS) を用いた脳活動計測法の開発

研究代表者
富永 洋子 (Tominaga, Yoko)
徳島文理大学 神経科学研究所 臨時職員 (研究補助員)

交付決定額 (研究期間全体) (直接経費) : 540,000 円

研究成果の概要：

構築済みの膜電位感受性色素 (VSD) 光計測システムを基に、フィルタ交換等の工夫で、1つのシステムで VSD 計測と高速内因性シグナル (FIOS) 計測を可能とした。さらに本計測システムを用いて、偏光あり、偏光なしの透過光下での単発刺激、高頻度刺激の計測を行い、薬理実験も行った。VSD と比較すると、FIOS はシグナルが小さくノイズの多いデータではあるが、各実験の結果は VSD の結果と近似していた。今後さらに研究を継続し、より効果的な FIOS シグナルを得て、VSD による毒性のない、無染色脳スライス光計測を行いたい。

研究成果の学術的意義や社会的意義

膜電位計測の歴史は長く、最初に発見されたのは 1940 年代の神経興奮に伴う光学的性質の変化である。その後、1970 年に入って膜電位感受性色素の開発がなされ、1990 年代後半から膜電位感受性蛋白 (GEVI) の開発がされている。しかし、当初の神経興奮と光学的性質の変化の物理化学的機構は解明されていない。本研究で測定している FIOS は、膜興奮と直接関連する光学性質の変化で重要である。

研究分野：神経科学、光計測

キーワード：高速内因性シグナル (FIOS)、光計測、神経回路、記憶・学習

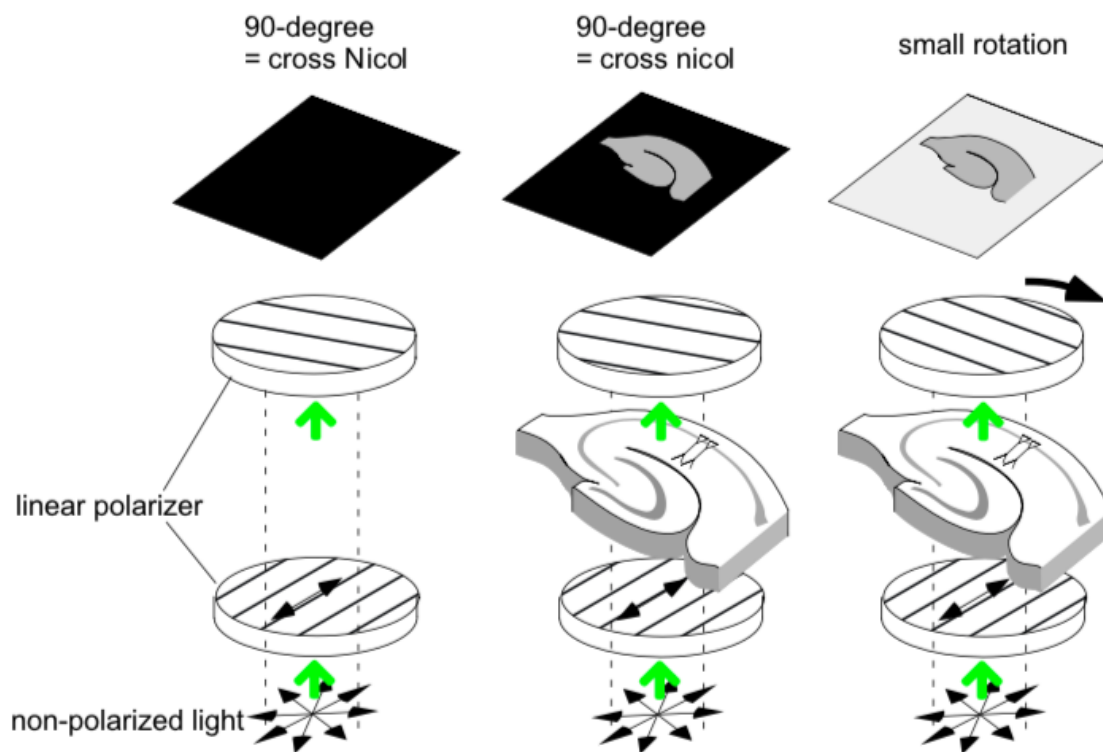
1. 研究の目的

「記憶・学習」など、脳の高次機能の理解には個々の神経活動の動作とともに神経回路としての動作様式の解明が必須である。神経回路活動を計測する手段として膜電位感受性色素 (VSD) を用いた光計測法がある。VSD による光計測は回路全体の神経活動を可視化できるという優れた側面を持つ反面、毒性が全くないというわけではない。蛍光応答のもつ本質的な光毒性、励起光による組織傷害、さらには蛍光色素の負荷そのものによる毒性というマイナス面もある。一方、従来型の無染色内因性シグナル計測は代謝変化を蛍光変換する形で計測を行うため、毒性はないが時間分解能が低く、神経回路活動の計測には適さない。本研究では、無染色非侵襲で神経回路活動を高時間空間分解能で可視化し計測する方法、細胞膜応答を高速内因性シグナル (Fast Intrinsic Optical Signal (FIOS)) で捉える新規の膜電位光計測法の確立を目的とした。

2. 研究成果

本研究にあたり、すでに確立した当研究所の VSD 光計測システムを適用し、FIOS 計測に必要な変更を加えた。研究に使用する標本には 4 週～8 週の近郊系マウスから 350 μ m 厚の脳スライスを用いた。脳スライス標本を長時間安定に保つためのプロトコルは VSD 光計測研究においてすでに確立済みである。VSD 光計測では脳スライスの生理活性を保ちつつ染色液に脳スライスを浸して染色し、同時にスムーズにガス交換なども行うのに最適な保持具の素材としてメンブレンフィルターを用いている。FIOS 計測においては VSD シグナルよりもさらに小さいシグナルを捉える必要があり、少しでもシグナルを大きく捉えるためには入力光強度を大きくする必要があった。保持具として使用しているこのメンブレンフィルターも入力光を遮り入力光強度を

弱めるので、計測部位のメンブレンフィルターを切り出して計測用のウィンドウを作製した。この状態で、スライス標本還流システムにマウントし、偏光素子を介した透過光で計測した。さらにカメラ前にアナライザーに相当する偏光素子を設置しその角度を調節した。このシステムを使うことによって、偏光ありの透過光、偏光なしの透過光下でのFIOSの観察が可能となった。



本FIOS計測システムで、単発刺激、高頻度刺激、薬理学実験を行った。薬理学実験ではAMPA受容体阻害薬(CNQX)、NMDA受容体阻害薬(APV)、GABA_A受容体阻害剤(Gabazine)、電位依存性ナトリウムチャンネル阻害剤(TTX)を用いてVSD計測結果との比較を行った。FIOSではシグナルが小さいためノイズがひびき、VSD計測結果と比較するとシグナルのクリアさにかける部分もあるが、全体としてVSD計測結果と近似しており、とくにGabazineを適用した場合は反応が大きい(シグナルが大きい)ので、VSD結果と非常に近似していることが確認できた。

本研究を基に、今後さらなる継続研究を行うことにより、より効果的なシグナルを得る条件の検討を行いたい。また、現在は手作業でVSD用とFIOS用計測システムの変更を行なっているが、今後は簡便にシステムの切り替え、偏光の調節が可能となるシステムに改良したい。

3. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 1 件)

Tominaga Y, Taketoshi M, Maeda N, *Tominaga T Wide-field single-photon optical recording in brain slices using voltage-sensitive dye, *J. Vis. Exp.* (148), e59692, doi:10.3791/59692 (2019).

[学会発表] (計 2 件)

Y. TOMINAGA, M. KOIKE-TANI, T. TANI, T. TOMINAGA A fast intrinsic optical signal (fios) from unstained hippocampal slice is a novel kind of optical signal: comparison with the voltage-sensitive dye signal. Chicago, *Society for Neuroscience*, 2019 Chicago McCormic Place

富永洋子, 竹歳麻紀子, 富永貴志「マウス海馬長期増強(LTP)の光学測定 Optical evaluation of the long-term potentiation (LTP) of the mouse hippocampal slices.」2019年7月26日 第42回日本神経科学大会 2019年7月24日から28日 新潟朱鷺メッセ

[図書] (計 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

○取得状況（計 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://kp.bunri-u.ac.jp/kph20/index.html>

4. 研究組織

研究協力者

研究協力者氏名：富永 貴志，谷（小池）真紀，谷 知巳，竹歳 麻紀子，前田 直子

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。