

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 30 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592244

研究課題名(和文) 局所脳機能への麻酔作用の画像解析とその動画ライブラリーの構築

研究課題名(英文) Optical image analysis of anesthetic action on regional brain function and preparation of the video library of neuronal activities

研究代表者

藤原 直士 (FUJIWARA, Naoshi)

新潟大学・医歯学系・教授

研究者番号：70181419

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円、(間接経費) 1,260,000円

研究成果の概要(和文)：大脳各部位および海馬の灌流切片を用い、高速画像解析法により脳局所の興奮伝搬の広がりや神経シグナル伝搬に対する灌流条件や麻酔薬の作用を画像解析した。また、その領域のGABAA受容体サブユニットの構成や分布を組織学的に検索し、麻酔ターゲット分子の存在と脳局所の機能抑制の空間的特性との関係を示唆した。さらに、研究で得られた局所脳機能の動画データを整理し、ウェブで閲覧できるライブラリーを構築し、以下のウェブサイトで公開している。URL: <http://www.neuro-animation.jp/>

研究成果の概要(英文)：Optical imaging of neuronal functions, e.g., membrane excitation and intracellular calcium changes, in slices of the mouse cerebral cortex and hippocampus was performed using an imaging system equipped with a high-speed camera. The imaging applied to the characterization of neuronal functions under various conditions. Responses of the membrane excitation and intracellular calcium changes to stimulation were sensitively changed under various conditions of perfused solutions, particularly by temperature. Anesthetic actions of anesthetics on regional brain functions were referred to the location of the GABAA receptors. Different effect of anesthetics on the cortex and hippocampus may relate to the differences in localization of the GABAA receptor subtypes.

The video images of neuronal functions obtained in this research project were collected and edited to produce a video library. The video images are up-loaded on the following website. URL: <http://www.neuro-animation.jp/>

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・麻酔・蘇生学

キーワード：神経活動画像解析 膜電位画像 カルシウム画像 大脳皮質 海馬 脳スライス

1. 研究開始当初の背景

これまでの小動物の脳組織切片標本を用いた膜電位画像や細胞内カルシウム画像による観察から、大脳皮質と海馬はともに GABA_A 受容体の分布密度が高いのに、GABA_A 受容体を介して作用する麻酔薬サイアミラルの効果に差異があることを見出し、脳の部位によって GABA_A 受容体のサイアミラルに対する感受性が異なることが示唆され、その機構解明とともに種々の麻酔薬では脳の各部位の局所機能にどのように差異があるのか解明が必要である。また、同時に、神経活動の画像による計測精度や脳スライスの灌流条件の正確な制御が必要となると考えられる。

2. 研究の目的

高性能の神経活動画像解析装置を用いて、マウス脳切片における膜電位画像および細胞内カルシウム画像などについて、精度の高い神経機能画像を得る。そのための脳切片灌流装置、灌流条件についての詳細な検討を行い、画像による神経活動解析の精度を高めることが必要である。

精度の高い神経機能画像から、大脳皮質、海馬のシグナル伝搬の方向、広がり、興奮強度の時間変化などの神経活動に関する詳細な情報を収集する。これら局所神経活動に対する GABA_A 受容体作用薬や拮抗薬、麻酔薬の作用について可視化し、画像情報として蓄積する。

マウス大脳皮質、海馬における GABA_A 受容体各種サブタイプの分布を蛍光抗体法により組織検索し、大脳皮質の各層、海馬の各領域での GABA_A 受容体各種サブタイプの分布の差異について詳しく調べる。また、大脳皮質、海馬の細部における GABA_A 受容体各種サブタイプの構成とそれらの存在について分析する。これら、の検索から得られる大脳皮質、海馬における局所神経活動と GABA_A 受容体サブタイプの構成と分布を対比し、脳局所機能への麻酔薬の作用の特性を明らかにする。

上記の研究過程で得られる局所脳神経活動の動画データを集積し、脳局所機能への麻酔作用を含め、大脳皮質や海馬における神経活動に関する動画ライブラリーを構築する。この脳神経活動の動画ライブラリーを関連する研究を進めている研究者のみならず、学生や一般の人々にもウェブでの情報提供を行う。

3. 研究の方法

1) C57BL/6 系マウスの脳切片を蛍光性膜電位感受性色素 (Di-4-ANEPPS) あるいは蛍光性細胞内カルシウム指示薬 (Rhod-2) で染色し、脳切片灌流システムを作製する。タンデム型蛍光顕微鏡に高速 CCD カメラを付帯した神経機能画像装置を用いて、微小電極による電気刺激に対する神経興奮によって生ずる蛍光変化をミリ秒間隔の連続画像として計測し、

切片における膜電位および細胞内カルシウム変化を動画として記録するシステムを構成した。(図 1)

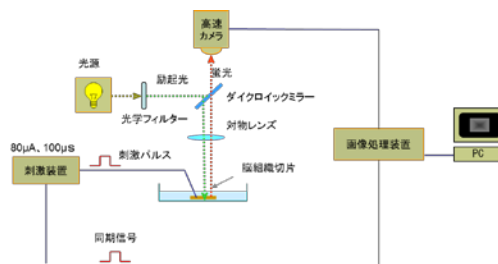


図 1. 神経機能画像計測システムの構成

2) 大脳皮質、海馬について、神経機能画像記録に適切な局所回路ができるだけ保存される切片を作製するため、脳の部位やトスライス方向を確認し、刺激に応答した神経興奮の広がる方向、領域を動画として記録・保存した。そして、位置（視覚野、聴覚野、体性感覚野など）とスライス方向における大脳・皮質での典型的な興奮伝搬画像を示す。また、灌流温度、灌流速度など脳切片の灌流条件による影響を精査した。

3) 神経シグナルの伝達をより広範囲で記録し、さらに画像精度向上を図るとともに、この神経機能画像化技術の向上（標準化）を試みた。この高精度画像解析により、脳各部位における興奮伝搬に対する各種受容体拮抗薬の作用を検索し、GABA_A 受容体の関与を解析した。

4) 海馬、大脳皮質各部位における局所神経活動への麻酔薬サイアミラルの作用と GABA_A 受容体サブタイプの構成における差異を精査し、GABA_A 受容体サブタイプの分布と麻酔作用との関連を調べた。

5) さらに、測定された動画データを整理・編集し、研究者や学生に向けてウェブで動画を提供する神経麻酔の動画ライブラリーを構築する。

4. 研究成果

1) 脳切片灌流標本を用いた神経機能画像
①脳切片の神経活動について、タンデムレンズ型蛍光顕微鏡（ブレインビジョン社）を導入し、切片灌流液を 10 ml/min 以上で灌流することにより、灌流条件を制御しながら広範囲の視野で、時間分解能 1.2 ms の膜電位画像および細胞内カルシウム画像を観察することができた。

②海馬の切片においては、歯状回への刺激により、海馬 CA3、CA2、CA1、さらには Subiculum に達する複数のシナプスを介する興奮伝達

を画像として記録することができた (図 2)。この、興奮伝達は、AMPA/Kainate 受容体拮抗薬の CNQX により抑制された。

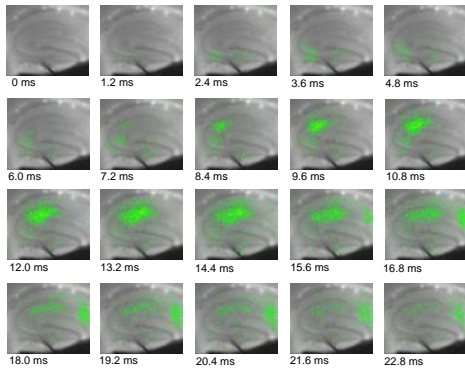


図 2. 海馬における興奮伝搬画像

③海馬切片の灌流液温度を低下することで、刺激後瞬時に伝わる興奮、それに続く広範囲に強く伝わる興奮 (CNQX で抑制)、さらにその後の長く続く興奮という、伝達速度の異なる 3 種類の興奮伝搬過程を観察することができた。(図 3)

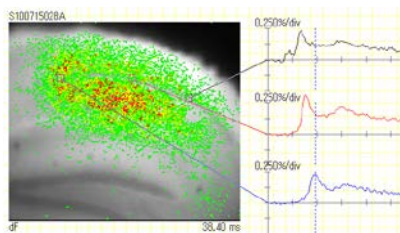


図 3. 低温 (10°C) での海馬切片の興奮伝搬画像。潜時や持続時間の異なる興奮がみられる。

④大脳皮質視覚野および体性感覚野の切片を作製し、それぞれの領域における同じ強度の電気刺激に対する興奮応答を観察したところ、体性感覚野に比較して視覚野では興奮の広がる面積が大きく、また、興奮がより長く持続することが観察された。(図 4)

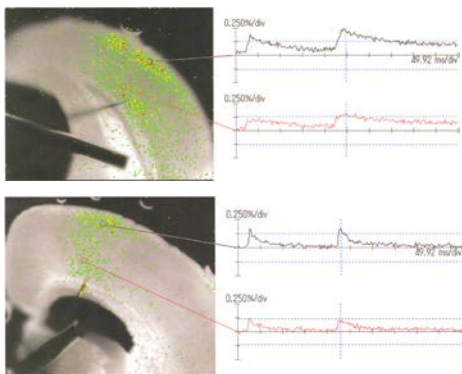


図 4. 冠状切片における刺激に対する応答
上: 視覚野、下: 体性感覚野。経時変化の右のグラフは上が II-III 層、下が V 層の応答。

⑤海馬切片および海馬切片で細胞内カルシウム応答を観察すると、刺激部位近傍と膜電位興奮と対応する部位で細胞内カルシウム上昇が観察された。この細胞内カルシウム変化は興奮に対応して上昇し、興奮が沈静した後も数百ミリ秒以上の間持続していることが観察された。(図 5)

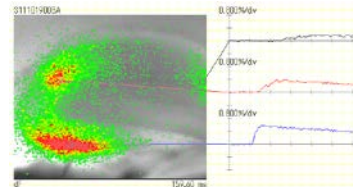


図 5. 海馬の細胞内カルシウム応答

⑥カルシウム AMPA/Kainate 型グルタミン酸受容体拮抗薬 CNQX の存在下では苔状線維刺激に対する CA2 放射層での膜脱分極応答が消失するのに対して、同層の細胞内カルシウム上昇は弱いながらも観察され、シナプス前の細胞内カルシウム応答を捉えている可能性があることが示された。

2) 大脳皮質、海馬の興奮伝搬に対するサイアミラル作用と GABA_A 受容体サブユニット構成

①大脳皮質切片における興奮伝搬は GABA_A 受容体アンタゴニストであるムシモールおよび麻醉薬サイアミラルによって抑制された。(図 6)

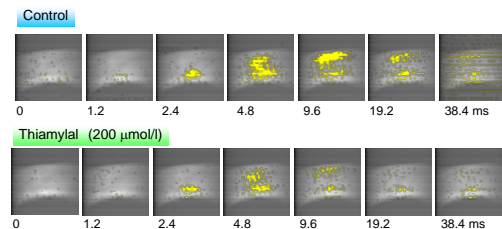


図 6. 大脳皮質の興奮伝搬に対するサイアミラルの作用。抑制が見られる。

②海馬切片における興奮伝搬は GABA_A 受容体アンタゴニストであるムシモールによって抑制されたのに対して、麻醉薬サイアミラルによって抑制されなかった。(図 7)

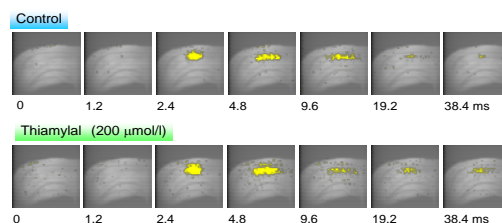


図 7. 海馬の興奮伝搬に対するサイアミラルの作用。抑制が見られない。

③ホルムアルデヒド固定したマウス脳の大脳皮質、海馬薄切標本を用い、蛍光抗体法により GABA_A 受容体サブユニットの分布を検索したところ、大脳皮質では吸入麻酔薬のターゲットサイトである可能性が指摘されるβ2、β3サブユニットがともに高密度で分布していた。(図 8)

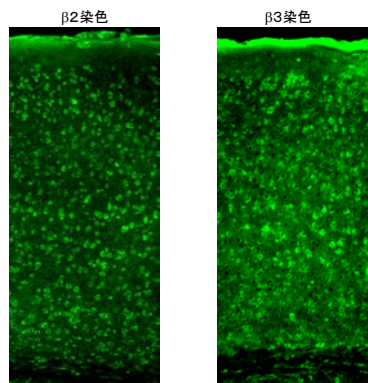


図 8. 大脳皮質における GABA_A 受容体サブユニットの分布。

④一方、海馬、歯状回ではβ2サブユニットが高密度で分布していたのに対し、β3サブユニットの密度は低かった。(図 9)

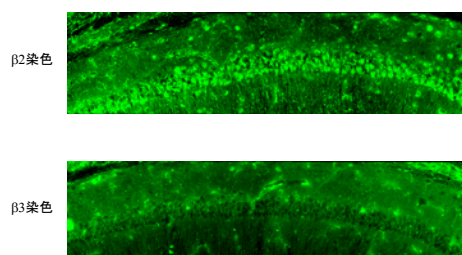


図 9. 海馬における GABA_A 受容体サブユニットの分布。

⑤以上のように、脳切片の局所神経活動に対する麻酔薬の作用を画像で解析し、一方で、一方で脳局所のGABA_A受容体サブユニットの構成や分布を捉えることで、局所脳機能への麻酔作用の有用な研究手法が提供できることを示した。

3) 高CO₂灌流による興奮伝搬への影響ー呼吸性アシドーシスモデルとしてー

①CO₂には麻酔作用があることも知られているが、CO₂によるアシドーシスとの関連を含めて、高濃度のCO₂が中枢神経系の活動にどのように影響するかは興味深い課題である。そこで、高CO₂の中枢神経系のシグナル伝達に対する影響を調べるため、大脳皮質灌流切片標本を用いた膜電位画像測定による解析を試みた。

②対象部位として大脳皮質視覚野に着目し、高CO₂の刺激に対する神経興奮の強度や伝搬に及ぼす影響について検討した。高CO₂負荷は、90%O₂-10%CO₂混合ガスを通気した人工脳脊髄液を 20 分間灌流して行った。

③高CO₂ (10%) 灌流液中での刺激に対する蛍光強度変化については、観測した 13 切片のうち 6 切片で刺激への応答が減弱し、蛍光強度の変化に有意な低下がみられた。これらの切片では、高CO₂灌流 20 分後には更に応答が低下し、その後、5%CO₂灌流液に戻すと、高CO₂負荷前に比較して興奮応答は弱まっていたが、回復する傾向が見られた。(図 10)

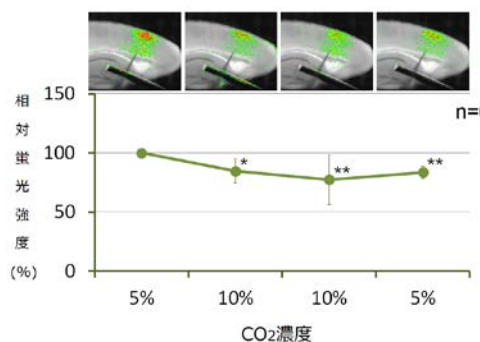


図 10. 高 CO₂ 負荷による興奮伝搬の変化。高 CO₂ 負荷により興奮応答が減弱した。

④CO₂負荷による大脳皮質神経活動の抑制については、低pH灌流実験で刺激による細胞内カルシウム上昇応答の抑制が認められていることから、呼吸性アシドーシス時の神経機能抑制と関連付けることができると考えられた。

4) 神経活動の動画ライブラリー

①脳局所神経シグナル伝達の画像ライブラリーを構築して、研究者や一般の興味ある人々に情報提供を行うため、これまでに本研究室で計測・記録した膜電位画像および細胞内カルシウム画像の動画データを、動画のままで情報を提供するための整理・編集を進めた。これまでに、観察記録した膜電位画像および細胞内カルシウム画像について、脳切片の部位、スライス方向、刺激条件、灌流条件(温度、酸塩基平衡)、使用薬物の種類と濃度、測定条件などによって分類した。

②それらの分類をもとに、神経画像の動画データを動画ファイルとして集積し、データベース化を進めている、これらの動画データを順次ウェブ上で公開するため、ホームページを開設した。

URL: <http://www.neuro-animation.jp/>

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 1件)

Fujiwara N, Sato R, Takenoshita K, Nagayama H, Seo K: Effects of acid-base balance on intracellular calcium changes in response to neuronal excitation in brain slices of mice, Neurosurg Anesthesiol, 査読無, 2011, 22 (4): 457..

〔学会発表〕(計 2件)

1) 菅田英樹, 松田将門, 藤原直士: 脳切片を用いた局所脳機能の画像解析; 低温でのシグナル伝達. 第75回新潟麻醉懇話会・第54回新潟ショックと蘇生・集中治療研究会, 2012年6月2日(新潟市)

2) 松田将門, 菅田英樹, 瀬尾憲司, 藤原直士: バルビタール系麻酔薬の局所脳機能抑制作用とGABA_A受容体 $\beta 2$, $\beta 3$ サブユニットの分布. 第75回新潟麻醉懇話会・第54回新潟ショックと蘇生・集中治療研究会, 2012年6月2日(新潟市)

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

○取得状況(計 0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

本研究による神経活動の動画サイト:
<http://www.neuro-animation.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤原直士 (FUJIWARA, Naoshi)
新潟大学・医歯学系・教授
研究者番号: 70181419

(2) 研究分担者

瀬尾憲司 (SEO, Kenji)
新潟大学・医歯学系・教授
研究者番号: 40242440

(3) 連携研究者

該当なし