

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 4 月 8 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26560464

研究課題名(和文) 測光機能を持つパッチ電極を用いた深部脳組織神経活動の電流および蛍光測光解析

研究課題名(英文) Simultaneous recording of electrical activity and fluorescence signal from deep brain tissues by the photometric patch electrode

研究代表者

大森 治紀(OHMORI, Harunori)

京都大学・学内共同利用施設等・教授

研究者番号：30126015

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：測光電極法は多光子顕微鏡解析が不可能な脳の深部での神経活動を光応答そして電気応答として同時に記録し解析する実験手法である。本研究では下丘および大脳聴皮質の電気活動およびCa応答特性を比較した。聴皮質では持続時間の長いCa応答が記録できた。下丘では電場電流Ca応答共に一過性であった。以上の結果は、聴覚神経回路は上行するにつれて、聴覚刺激に対応したより大きなCa応答を生ずる事で神経回路の可塑的变化を伴う複雑な情報処理を可能にすると考えられる。本法の応用で最も困難な点は指示色素を神経細胞に充填する過程であり今後の改良が必要である。特に遺伝学的に脳の部位特異的に発現させた蛍光蛋白への応用は重要である。

研究成果の概要(英文)：Photometric patch electrode (PME) has been invented to measure optical response and electrical response of neurons simultaneously in a deep brain tissue. We applied PME to the inferior colliculus (IC) and auditory cortex of the chick to understand the difference of auditory information processing depending on the level of ascending pathway of information transmission. We found that Ca response was transient in IC while it was prolonged in the auditory cortex. This indicates that the auditory cortex is more plastic than the lower level nuclei, and processes the information in order to adapt the brain function to the continuous change of input signals. The most difficult step of experiment was to get a stable labeling of neurons. In the future experiments it is ideal to combine PME recording technology with genetic fluorescence indicator proteins that are expressed in specific brain locations in order to understand the brain function in detail.

研究分野：神経生理学

キーワード：測光電極 パッチ電極 聴覚神経回路

1. 研究開始当初の背景

神経活動の光学計測法の発展は著しく、脳表面あるいは脳切片標本を対象として同時・多点の神経活動の記録・解析も盛んに行われている。しかし、多光子顕微鏡を用いても、脳実質の1mm程度以上の深部にわたり展開している神経細胞への応用には光拡散による限界がある。この状況を克服し脳より深部の組織で神経活動の電気記録と同時に細胞内情報伝達物質活性を光学情報として記録し解析する事は、脳機能の具体的な解明には不可欠である。神経活動の電気記録と指示薬の光励起および測光を脳の深部で実現する目的で開発したのが測光電極であり、動物個体脳での機能検証が待たれていた。

2. 研究の目的

測光電極法は蛍光分子標識された神経細胞を脳の深部で同定し、電気活動の記録と同時に光計測する事を可能にする新しいパッチ電極計測システムである。これまでに神経電気活動記録とCa測光を1本のパッチ電極で同時に行う実験法として確立した。今回の研究では、個体脳での神経情報の統合処理過程を阻害剤の局所投与による薬理学手法および神経活動の電気生理学記録そして光学的な記録手法を総合して解析する。特に、研究代表者が豊富な経験を持ち、かつ神経回路構成が確立している聴覚神経核の情報処理過程の脳領域特異性の解明にこの方法を応用する。一連の実験を進める過程で、動物個体に応用する実験手技としての測光電極法の問題点を整理解決し、脳の高次システム解析において、有効でありかつ一般的に広く応用する事の出来る実験手技として確立する事を目的とする。

3. 研究の方法

測光電極を脳深部の聴覚神経核活動の記録と解析に応用した。特に下丘および大脳皮質

における聴覚情報の特性の差異を電気活動および細胞内Ca応答として同時に記録し比較検討した。実験には膜電位感受性色素および細胞内Ca感受性色素を用いたが、結果として明確な結論が出たのはCa感受性色素(OGB1-AM)であったので、Ca感受性色素の実験を報告する。

実験動物はヒヨコであり、下丘は脳表面から6~8mmの深部、そして大脳皮質(Field-L)はほ乳類とは異なり脳表面ではなく3~4mmの深部に位置する。これらの脳領域にOGB1-AMを事前に注入し、OGB1の細胞内取り込みを保障する為に1ないし2時間後に、測光電極を刺入した。OGB1-AMの注入及び測光電極の刺入は聴覚応答を手がかりとして、脳定位的に行った。

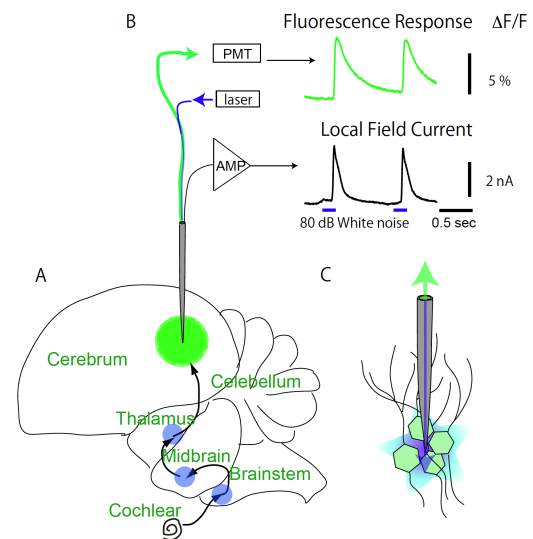


図1 測光電極を用いた神経電気活動およびCa蛍光の同時計測

A, トリの上行性の聴覚神経核を示す。図は大脳皮質(Field-L)にOGB1を充填し測光電極を刺入している。B, 光電子増倍管およびパッチ電極による光応答および電気応答の同時計測。80dBの白色雑音による聴覚刺激に対する応答。上(緑)がCa蛍光、下(黒)が電場電流。C, 測光電極による神経細胞へのレーザー光照射および蛍光記録のイメージ図。

測光電極はガラス電極であり光導体として機能する。488nm レーザーにより OGB1 を励起し発生した 530nm 前後の蛍光を捉え干渉フィルターを用いて選別して記録した。深度および蛍光強度を手がかりとして OGB1 の注入部位を脳組織の深部で同定し、同時に聴覚応答を捉えることで、下丘あるいは聴皮質の電気記録と蛍光測光を同時に行った。必用に応じて GABA 受容体阻害剤あるいはグルタミン酸受容体阻害剤を測光電極を通して局所投与した。

#### 4. 研究成果

本研究では聴覚刺激に応ずるトリの神経活動を上行性の複数の神経核で記録し応答特性を比較した。音情報が脳幹神経核から下丘-視床内側膝状体を経て聴皮質に伝播される過程で、聴覚の様々な情報が抽出処理されることで我々の聴感覚は成り立つ。蝸牛神経核、下丘 (IC) そして聴皮質(Field-L)に Ca 指示薬である OGB1 を充填することで、神経電気活動に対応する細胞内 Ca 応答を測光電極を用いて記録解析した(図1)。聴覚刺激に対する OGB1 による細胞内 Ca 濃度変化は、大きさおよび時間経過が神経核により異なった。聴皮質 Field-L では電場電流の持続を超えた持続の長い Ca 応答が記録できた。聴皮質では大脳皮質でしばしば観察される緩電流が観察され、それらは Ca 応答と高い相関を示した。Ca 応答は AP5 局所投与による NMDA 受容体の阻害で消失した。聴皮質でも両耳間耳間差および音圧差への神経応答は見られたが下丘あるいは脳幹の神経核における正確さには及ばなかった。下丘では電場電流 Ca 応答共に、音刺激時間長とほぼ同一の時間経過をもった一過性の現象であった。下丘では両耳間耳間差および音圧差に応答する顕著な聴覚神経活動が観察され、かつ単一神経応答は DNQX の局所投与による AMPA 受容体の阻害で消失したが、AP5 による NMDA 受容体の阻害では Ca 応答・電場電流応答共に変化は極めて小さかった。従って、下丘は主としてハード的な神経回路機構として末梢の時間情

報、両耳間差分情報を保った聴覚情報を正確に処理し統合することで新たな聴覚情報を形成し、より上位の神経核に伝達する場所であること。一方聴覚皮質は緩電流で示されるような外部環境の変化に対応する神経情報が常に入力し、そうした神経情報に対応して聴覚情報を処理する高い可塑性を持って機能する脳領域である事が示唆される。Ca イオンを初めとする情報伝達物質が聴皮質の可塑的な働き的一端を担っていると考えられた。なお、脳幹の蝸牛神経核では Ca 応答は極小であった。入力する神経活動が高い周波数帯域にも及ぶことから、高濃度では細胞毒性を持つ細胞内 Ca イオン濃度の上昇はむしろ代謝調節型グルタミン酸受容体の作用で積極的に抑制されていると考えられる。

以上の結果から、聴覚情報は上行するにつれて複雑な情報処理を受ける事が示唆された。こうした情報処理の過程には、対応する Ca イオン濃度の変化があり、可塑的なシナプス機能および神経回路機能を細胞内情報として Ca イオンが担っていると考えられる。なお本法の応用で最も困難な点は指示色素を神経細胞に充填する過程であり、神経細胞の標識に遺伝学的な手法を応用する事を含めて今後の改良が必要である。特に遺伝学的に脳の部位特異的に発現させた蛍光蛋白を測光電極法と組み合わせて応用する事は、Ca イオンだけでなく様々な情報伝達分子の動態を神経活動と同時に記録解析する手法として極めて重要であり、今後の研究展開を計りたい。

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 3 件)

Ohmori H (2014). Neuronal specializations for the processing of interaural difference cues in the chick. *Frontiers in Neural Circuits*. 8 article 47:1-8.

Review

doi: 10.3389/fncir.2014.00047

Kuba H, Adachi R, and Ohmori H (2014).  
Activity-dependent and -independent  
development of the axon initial segment.  
Journal of Neuroscience 34(9):3443-3453.  
doi: 10.1523/JNEUROSCI.4357-13.2014.

Hirai Y, Nishino E, and Ohmori H (2015).  
Simultaneous recording of fluorescence  
and electrical signals by photometric  
patch electrode in deep brain regions in  
vivo.  
Journal of Neurophysiology 113: 3930-42.  
doi: 10.1152/jn.00005.2015.

〔学会発表〕(計 3 件)

大森治紀 聴こえる事のメカニズムー有毛  
細胞から大脳皮質。萩原生長記念レクチャー  
第 9 1 回日本生理学会大会、鹿児島、2014  
年 3 月 16~18 日。

大森治紀 どこから音が聴こえるかー音源  
定位のメカニズムー教育講演  
第 37 回日本神経科学大会、横浜、2014 年  
9 月 11~13 日

大森治紀 MR Burger  
聴覚時間情報の符号化における神経機構の  
特異性。第 92 会日本生理学会大会、大会企  
画シンポジウム、神戸 2015 年 3 月 2 1~2 3  
日

〔図書〕(計 1 件)

大森治紀 (2014) 聴覚 232-253、  
標準生理学第8版。小沢瀨司、福田  
康一郎監修。本間研一ほか 編集。

〔産業財産権〕  
出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕なし

## 6 . 研究組織

(1)研究代表者  
大森治紀 (OHMORI, Harunori)  
京都大学健康長寿社会の総合医療開発ユニ  
ット 特任教授  
研究者番号: 30126015

(2)研究分担者  
平井康治 (HIRAI, Yasuharu)  
京都大学健康長寿社会の総合医療開発ユニ  
ット 特定助教  
研究者番号: 30648431

中島則行 (NAKASHIMA, Noriyuki)  
久留米大学医学部 助教  
研究者番号: 80625468

(3)連携研究者  
なし