O - 37

マウス脳海馬に見られる時空間神経活動パターンのレーザー共焦点イメージング Laser confocal calcium imaging of spatiotemporal activity patterns of mouse hippocampal slices

○河村 賢¹, 濵﨑 雄太², 小松崎 良将³, 斎藤 稔² *Ken Kawamura¹, Yuuta Hamasaki², Yoshimasa Komatsuzaki³, Minoru Saito²

Abstract: Recently, laser confocal calcium imaging, which enables us to access brain function with single-neuron resolution, has been developed. In the present study, we observed spatiotemporal activity patterns in the CA1 region of mouse hippocampal slices by laser confocal calcium imaging and evaluate the coherency of the neural activity patterns. As a result, the neural activities under the existence of bicuculline, which are often used to induce the epilepsy-like state, became more coherent than the control condition.

1. はじめに

海馬は大脳辺緑系の一部であり、記憶や空間学習に関わる器官である.近年ではアルツハイマー型認知症にお ける最初の病変部位として知られており、最も研究の進んでいる脳部位である. 海馬内には、歯状回(dentate gyrus; DG) とアンモン角領域 (cornuammonis; CA) があり,アンモン角領域は CA1, CA2, CA3 と 3 つに分類さ れる (Fig.1). 本研究では、マウス海馬スライスの CA1 領域における時空間神経活動パターンをレーザー共焦点 イメージング手法にて記録した、これまで脳機能を調べる方法としてよく用いられてきたのは、微小電極を使用 した細胞内または細胞外記録法によって、ニューロンの活動時に発生する活動電位を測定するというものだった. このような電気生理学的手法は,電気的応答を数十ミリ秒間の短い間の波形として捉え,直接記録することがで きるが、ごく限られた少数のニューロンの活動しか記録することができなかった。しかし、脳機能は多数のニュ ーロンが織りなす巨大なネットワークによって行われる.よって、個々のニューロンの機能を調べ単純に足し算 するだけではネットワークを捉えることができないため、多数のニューロンの活動を同時に記録することが必要 となってくる.











1: 日大理工・学部・物理 2: 日大文理・教員 3: 日大理工・教員・物理

本実験で用いたレーザー共焦点イメージング手法は、電気生理学的手法ではできなかった多数のニューロンの 活動を同時に記録することができる手法である. 活動電位が発生すると, 電位感受性カルシウムチャネルが活性 化され、これによって生じる細胞内のカルシウムイオン濃度の変化を指標として、ニューロンが活動しているも のとして捉えることができる.ニューロンの活動を観察するには高速イメージングが必須となるため、本実験で はニポウディスク型の共焦点顕微鏡を用いた. 共焦点顕微鏡は, 焦点面と共役の位置にある小さい穴を通る光だ けを捉えることにより、非焦点面からの光を除くことができるため、高い空間分解能が得られる。また、レーザ ーを使うことでより鮮明な像を得ることができる(Fig.2).

2. 実験方法

実験には1週齢オスのマウスを用い,摘出した脳から海馬を取り出した後,厚さ 350 µm にスライスし,代謝 回復した後,海馬スライスを Oregon Green 488 BAPTA-1 AM で 60 分間染色した. Oregon Green は励起波長 494 nm, 蛍光波長 523 nm のカルシウム感受性蛍光色素で、作製した試料は常に混合ガス(5% CO2+95% O2)でバブリ ングした人工脳脊髄液(artificial cerebrospinal fluid; ACSF)に浸しておいた. 海馬スライスは測定開始 15 分前か ら, ACSF (control) あるいは 50 μM bicuculline ACSF 溶液でインキュベーションした. 顕微鏡ステージ上に移し た後も同様の溶液を灌流し, 測定時も灌流系に同様の溶液を流した. 光源には Ar レーザー (532-BS-A04; Melles Griot) を用い,ニポウ式共焦点ユニット (CSU-10; 横河), EM-CCD カメラ (iXonX3; Andor), 解析ソフトウェ ア (Solis: Andor) によって CA1 領域の蛍光画像を 100 ms 間隔で 9000 回取得した.

3. 結果

Figure 3,4 に示すように、レーザー共焦点イメージングを用いることによって、従来は測定できなかった細胞 レベルでの自発活動を測定することができた. 蛍光画像は 10 秒毎に撮影したものを左から右に順に並べた. 蛍 光画像中の赤丸で示した細胞に ROI (region of interest)を設定した.それぞれの ROI においてカルシウム信号の ピークの時刻に点を置き、ラスタープロットを作成した。Control (Fig.3) と比較して bicuculline を投与した場合 は、多数の神経細胞の同期活動が見られた(Fig.4). bicuculline は GABA 受容体の阻害剤であり、てんかん様状 態を引き起こすことが知られている.本結果において、神経活動の同期性が増したのはそれと一致する.





Lower figure: Raster plot obtained from calcium signals

Figure 4. Spatiotemporal activity pattern (bicuculline) Upper figure: Fluorescent images

Lower figure: Raster plot obtained from calcium signals