

# 多ニューロン画像法

## ～脳回路システムの機能的画像化～

東京大学大学院 薬学系研究科 生命薬学専攻 薬品作用学教室  
佐々木拓哉、木村梨絵、高橋直矢、長谷川彩子、宇佐美篤

### 1. はじめに

#### 従来の脳研究 ～適切な実験手法の必要性～

光、音、臭い、味、触覚—外部環境からの入力情報が、脳回路によって解析・処理されることはもはや疑いない事実だが、その詳細なメカニズムは不明な部分が多い。

脳は個性ある多彩なニューロンの集合体である。このようなニューロンたちが巨大かつ緻密なネットワークを形成し、相互作用することによって脳機能は実現される。しかし、神経科学分野において多くの研究が行われてきたにも関わらず、その実態については未だ解明されていない部分が多い。従来の神経科学研究が真に重要な脳機能の本質に迫れなかった理由は、適切な実験手法の欠如に因るところが大きい。実際に、これまでの研究がとってきた実験アプローチを見直してみると、ニューロンの挙動を個別に解析するか（パッチクランプ記録法など）、わずか単シナプス伝達の解析にとどまっているものがほとんどである。一般にシステムでは、素子が集団となって予想を越えた非線形挙動が現れる。従来の実験的戦略は、個々の細胞と神経ネットワークをそれぞれ独立した存在として掌握する還元的アプローチであるため、両者の結びつきを詳細に迫るのが難しい。

他方で、多ニューロンの総体活動を記録する実験手法としては、脳波計測や機能的磁気共鳴画像法(fMRI)などが主流となっているが、これらの手法の空間解像度は非常に低く（最高でもミリメートル単位の空間解像度）、ニューロン個々の挙動を知り得るには程遠い（ニューロン1つの大きさはおよそ 0.02 ミリメートルである）。“総体”としてのニューロンのマクロな特性を明らかにするためには、一つ一つの細胞の個性を損なうことなく、神経機能ネットワークの挙動を一斉に記録できる新規の手法が必須である（図 1）。

#### 本画像法による新しい脳研究の可能性

我々の研究グループが開発した「多ニューロン画像法」は、従来の研究の課題を打破し、脳研究に大きな飛躍をもたらす新技術になると確信している[1-4]。本画像法では、細胞のスパイク活動（活動電位）に伴って起こる細胞内カルシウム濃度の変動を蛍光変化として検出し、活動しているニューロンが夜空に舞うホタルのようにピカピカと光るような画像が記録できる（図 2）。これは、**単一細胞レベルの解像度を保持したまま、数百個の細胞活動の時空パターンを構築することができる世界で唯一の記録技術**であり（図 4）、個々の細胞活動と個体行動の両エンドポイントを橋渡しすることが期待できる最良の方法であるといえる（図 3）。

さらに本画像法は、システム病理学や中枢神経薬理学への応用も可能である。例えば、てんか

ん患者脳において、てんかん様神経発射がどこでどのように生まれ、脳の中を伝播していくかを詳細に追跡できる。実際に我々は、てんかん発作の発生源と深い関わりがあると考えられる歯状回（海馬体の構成部位の1つ）に本画像法を適用し、てんかん様の同期発火を観察することに成功している（図4）。こうした新たな側面からの研究アプローチは、**従来明らかでなかった病理学・薬理学上の謎を解き明かし、病気の原因解明や治療法の確立に貢献できる**と期待される。

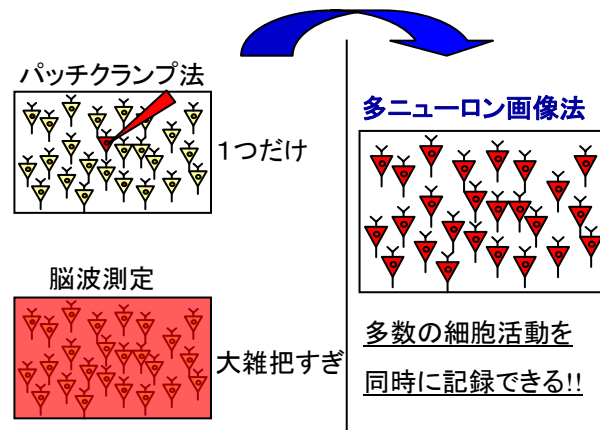


図1 従来までの実験手法と本画像法の比較

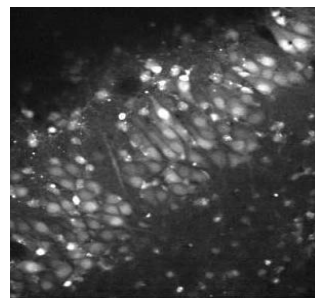


図2 実際に得られる細胞像

それぞれの白く丸い部分がニューロンまたはグリア細胞である。  
 実際の画像法では、これらの細胞がピカピカと光るような画像が取得できる。  
 (添付した CD-R のファイルをご覧ください)

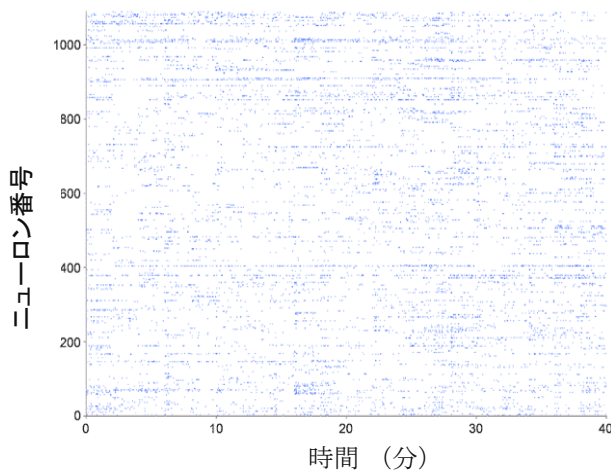


図3 構築した細胞活動の時空パターン  
横軸に時間(分)、縦軸に任意のニューロンの番号をとり、ニューロンが活動した時間(すなわち光った瞬間)をプロットした。

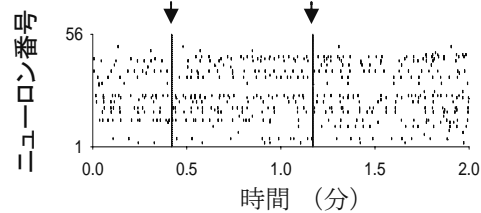


図4 歯状回におけるてんかん様同期発火  
海馬スライス標本にピクロトキシン(てんかん誘発薬)を投与すると、自発的なてんかん様の同期発火が観察される。

## 2. 研究開発技術

本研究で開発した多ニューロン画像法は、少なくとも以下の4つの点で過去の研究技術を凌駕している。各項目について、開発過程・方法と共にその特徴を記述する。

### ①安定した画像化技術の確立

生物学的実験を行うにあたって、最も初歩的かつ実験者が注意しなくてはならないことは、「観察中の標本の安定性」である。本研究では、観察標本への障害を最小限に抑え、安定した画像を取得するために必要な蛍光指示薬の探索と、その負荷条件の検討から研究を開始した。

数多くの検討を重ねた結果、いくつかの候補の中から、最も的確なカルシウム蛍光指示薬として Oregon Green BAPTA 1-AM (Invitrogen)を見出した。さらに、指示薬を脳細胞に負荷するために最適な温度・時間および添加する界面活性剤(Pluronic F-127 (Invitrogen), Cremphor EL (Sigma))の濃度などの基礎的な実験条件を検討した。現在確立した実験条件下では、**90%以上の負荷効率で脳細胞に指示薬を導入することが可能となっている(図2)。**

カルシウム指示薬の細胞内への負荷、およびそれに続く共焦点レーザーの照射によって、標本に異常な活動が誘発されないことを確認するため、パッチクランプ法によりニューロンのスパイク活動パターンを詳細に確認した。その結果、スパイク活動が発生する時間間隔分布および平均の発生率は、いずれも両者の間に有意な差が観察されなかった(図5)。このことから、本実験では、標本にとってマイルドかつ極力ダメージが少ない条件で、安定した画像化が実現されていると判断できる。

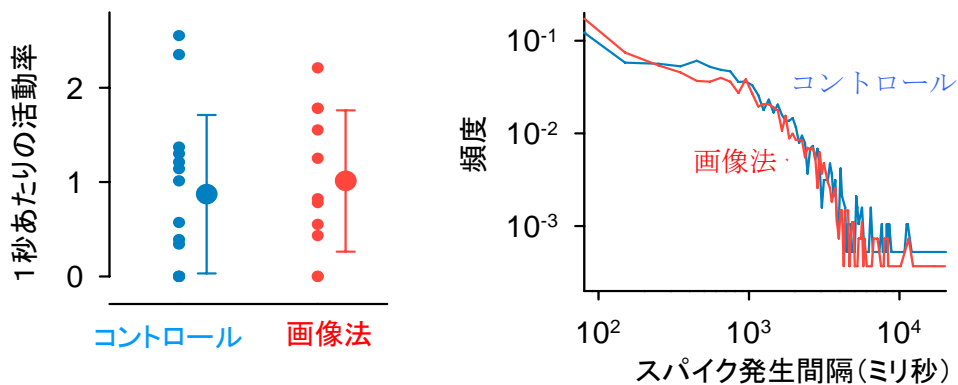


図5 通常の細胞（コントロール）と画像法を適用している際の細胞の活動パターンの比較  
細胞の活動率（左）および活動時間間隔（右）の両者において有意な差は観察されない。標本に障害を与えることなく、安定した画像化が行えていることがわかる。

さらに驚くべきことは、シナプス前終末にも、効率よく蛍光指示薬が負荷されたことである。当初は予期していなかった結果であるが、この発見によってシナプス前細胞（入力系）からの総入力量とシナプス後細胞（出力系）の発火パターンを分離モニターでき、入出力相関をも追及することが可能になった（詳細は3③の項を参照）。

## ②画像取得速度の飛躍的向上 ～世界最速の脳画像化技術～

これまでの脳科学で言うところの画像法とは、脳の活動を撮影するとは言っても、空間・時間分解能が非常に低いものであった。1枚の画像取得に要する時間は1秒程度であり、映画のようにスムーズに脳の活動を観察しているというよりは、写真を素早く撮ってコマ送り再生しているという方が正確であったといえる。脳の活動は数ミリ秒単位という非常に短時間で起こる現象であるから、この時間分解能では、当然その実態を正確に記録することはできない。

そこで、我々は画像法を真の意味で脳科学に有用な実験技術にすべく、およそ2年にわたって画像法に改良を重ね、従来までとは比べものにならないほど高品質の画像法を開発することに成功した。より高感度な画像法を実現するために、用いる実験機器の検討を行った。現在、最良の画像が得られる機器として、16倍の対物レンズ(NA 0.8, Nikon, CFI75LWD16xW)、ニポウ板共焦点ヘッド(Yokokawa, CSU22)、電子増感 CCD カメラ(Andor, iXon DV885)のセットを用いている。この組み合わせは驚くほど相性がよく、ほとんど光学的なノイズが混入することなく、最大で1000 Hz（1秒間に1000枚の画像）の画像取得速度を実現するに至った[5]。私たちの生活の日常における、映画やテレビの再生速度（ビデオレート）が25~40 Hz程度であることから、本画像法が実現した取得速度がいかに高速であるかが容易に想像できる。この高品質な画像法の確立によって、脳の中で起こる数ミリ秒単位の細胞活動も正確に追跡でき、現在「**脳研究において最も有効な画像法**」を確立できたと自負している。

### ③細胞種の分類 ～細胞の個性を重視した画像法～

脳には、ニューロンとグリア細胞の2種類の脳細胞が存在している。さらにニューロンは、興奮性ニューロンおよび抑制性インターニューロンに大別される。本研究の実験条件下では、これらすべての細胞種にカルシウム蛍光指示薬を負荷し、可視化することができる。しかし、蛍光指示薬を負荷するだけでは、すべての細胞が同一の蛍光波長領域をもつため、細胞種を光学的に分類することが難しい。しかし、脳の細胞が個性に富んだ独自の性質をもつことを考慮すると、細胞種を分類しながら画像化を展開することは非常に重要である。

そこで我々は、多様な染色法を駆使することにより、本画像法において細胞種を確実に区別できる技術の開発に取り組んだ。初めに、ニューロンとグリア細胞を分類するため、グリア細胞にのみ選択的に取り込まれ、蛍光指示薬として用いられる **Sulforhodamine101 (Invitrogen)** に着目した。本物質を適切な濃度でカルシウム蛍光指示薬と混合することにより、本来の画像化とは異なった波長領域において、グリア細胞の蛍光像のみを選択的に識別できる光学的技術を開発した。

さらにニューロンにおいて、興奮性ニューロンと抑制性インターニューロンを区別するために、免疫組織化学染色法を利用した。抑制性インターニューロンは脳内の抑制性伝達物質の一つである **GABA ( $\gamma$ -アミノ酪酸)** を含むため、この物質に対する抗体を用いた蛍光免疫組織染色を行うことにより、同細胞種を選択的に識別することができる。

このように多数の染色技術を組み合わせることで、細胞の「個性」に着目した画像化を展開することができる。今後、様々な生理学的知見が得られるものと期待される。

本項における説明図は、都合により非公表。

### ④自動解析アルゴリズムの開発

本研究の最後の仕上げとして、画像解析作業に着目した。従来の画像法が抱えていた問題点は、取り扱うデータが大規模なため、記録して得られた画像から細胞活動の時系列を構築するのに、多大な時間を要していたことである。記録画像を分析してデータベース化するだけでも、非常に手間がかかり、場合によっては数日間を要していた。このような解析作業の効率性の低さは、脳研究における本画像化技術の普及の妨げにすらなっていた。

そこで我々は、この問題を解決するべく、コンピュータによる細胞活動の自動検出法の開発を試みた。ニューロンのスパイク活動と共に起こるカルシウム濃度変化は、特有の時間変動を示すため、このような特徴的な蛍光シグナルをコンピュータに選択的に学習させれば、自動的にニューロン活動を検出できるのではないかというアイデアに基づいたものである。

具体的には、多変量解析法の一つである主成分分析(**Principal component analysis: PCA**)を用いて、多変量データである蛍光時系列成分を少数の次元まで圧縮した。さらに圧縮された数値成分を、学習型アルゴリズムの一つであるサポートベクターマシン(**support vector machine: SVM**)によって、抽出された蛍光変化がスパイク活動を反映した蛍光シグナルであるものか、または単なる光学的なノイズ成分によるものであるかを判別した[6] (図6)。

幾度も計算過程に改良を行った結果、実験者が手作業でスパイク活動を抽出した場合(80%程度の検出率)と比較して、蛍光シグナルの検出率が有意に高い(93%)解析アルゴリズムを

開発するに至った。コンピュータ上で自動的に行うものであるため、従来のように数日間を要していた検出時間も、わずか数秒間にまで短縮することができ、解析効率が飛躍的に向上した。

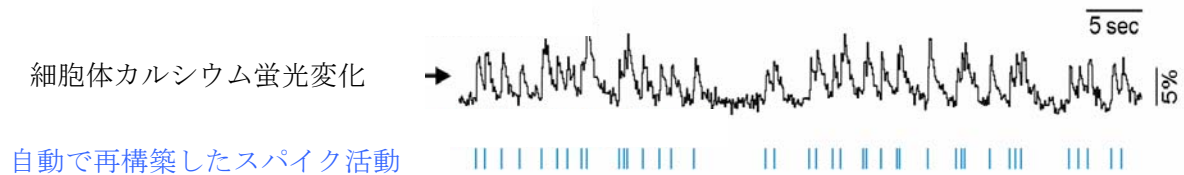


図6 コンピュータによるスパイク活動の自動検出

上の波形が1つの細胞の蛍光トレース。細胞が活動すると、蛍光強度は特徴的な変化をする。この蛍光シグナルを選択的に認識するアルゴリズムを作製した。

### 3. 画像法の効果

#### ①従来にない脳活動の高品質な画像化を実現

現在は1秒間に最大1000フレームという超高速でも数百個の細胞の活動を記録でき、さらに世界でも前例がないほどの高品質のイメージングが同時に実現されている。これは従来の技術と比較すると、約10~100倍の画像取得速度、約4~10倍の標本撮影面積を達成できたことになる。さらに、画像検出感度も従来の技術より飛躍的に向上している。今までは理想の域を越えなかった「**脳活動を単一細胞レベルで可視化する**」ことがようやく現実のものになったといえる（実際のムービーは[同封したCD-R中の添付ファイル](#)でご覧いただけます）。

#### ②画像解析行程の改善 ~

本研究では、画像化技術の開発だけではなく、解析作業の向上も重要な点である。

従来までの解析作業では数日間を要し、かつ人為的なミスが避けられなかったが、新しい解析アルゴリズムを導入することにより、作業は一瞬で終了し、当然ながら人為的なミスも混入しなくなった。

現在、本アルゴリズムを活用して、動画を取得すると同時に解析を行い、データベースとして蓄積することにより、従来までは不可能とされていたリアルタイムでの脳画像化の実現に取り組んでいる。これが現実のものとなれば、個々の細胞の活動パターンの違いから細胞種を瞬時に同定したり、特徴的な挙動を示す細胞をその場で選択的に操作することなどができるようになる。このような新しい実験系の導入は、脳科学における新たな知見を多数もたらすものと期待される。

現在、我々は数ある脳部位の中で、海馬という部位に本画像法を適用している。海馬は大脳辺縁系に属する器官で、記憶・学習に重要な脳部位とされており、脳研究の対象として十分な魅力をもっている。本画像法を用いることにより得られた「海馬の神経ネットワークに関する新たな知見」を以下に述べる。

### ③神経ネットワークの入出力演算様式

本画像法では、ニューロンのスパイク活動（すなわち出力系）のみならず、神経細胞へと投射される入力繊維の活動も同時に記録することができる。これにより、神経回路の演算様式をより詳細に追求することが可能となる。

脳の中を流れる情報を、単一細胞レベルで捉えることができる本画像法の利点を生かせば、I/O（入出力）変換デバイスとしての神経回路の演算様式の詳細を捉えることができる。我々は、神経回路全体に与えた入力のパターンから、どのような演算結果が得られるかをモニターした。その結果、神経回路全体のマクロ応答の大きさは、入力の総和に対して線形的であること、および個々の試行には偶発レベルを超えた不確実性が明らかになった [7-9]。

### ④神経ネットワークの自発活動の特性

脳は、外部の環境から刺激を受けていない時（例えば睡眠中など）でも自発的に活動している。この自発活動は、個々のニューロンの内在的な揺らぎと回路レベルの揺らぎの相互作用の結果として生まれ、外部入力の応答パターンにも強い影響を与える。すなわち、神経回路の情報処理機能を解明する上で、自発活動の特徴を考察することは必須である。

自発活動は、数ミリ秒単位の現象であるため、その詳細を探求するには、従来のような時間解像度の低い画像化技術では不可能である。ここで、我々が開発した多ニューロン $\text{Ca}^{2+}$ 画像法が絶大な効果を発揮する。本画像法を使えば、脳の自発活動パターンを高速で、まるで映画のように撮影することが容易にできる。得られた活動パターンの時系列を分析したところ、神経ネットワークの挙動は数十秒間一つの活動状態にとどまるが、しだいに新しい安定状態を生み出し、内発的に新状態へと移行することがわかった（図7）。この特徴的な動態を、非平衡系熱力学の観点から「**非エルゴード的メタ安定性**」であると考察し、新しいオペレーション様式として示唆した。これは、脳システムが外部とは独立して内発的に可塑性を引き起こし、自己組織化されていく過程を世界で初めて画像化した研究報告である[10, 11]。



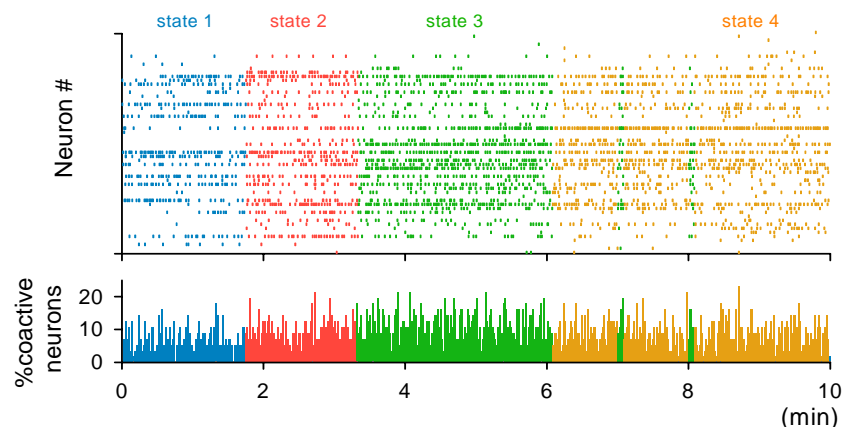


図7 脳の自発的な状態遷移

それぞれの色が神経回路の状態 (state) を表す。神経ネットワークの活動状態は、自発的に次々と新しい状態へ遷移していくことが明らかになった。

複数のニューロンが同時期に活動すること（同期活動）は、神経ネットワークの組織化された構造を反映しているものと考えられる。我々は、有意に同期活動を示した細胞ペアを確率論に基づいて抽出し、このような機能的な結合をもつ細胞ペアをグラフ上に線で結ぶことにより図示した（図8）。その結果、描かれたグラフは複雑に分散しているが、局所的に見るとグループ様の構造が存在しているが明らかになった。グラフ理論に基づき、さらに数理解析を進めた結果、神経回路はスモールワールドネットワークに類似した構造を有していることが示唆された[5]。このようなネットワーク構造は、多数のニューロン間で情報を効率的に伝達し、脳機能を実現するのに重要である性質と考えられる。

### ⑤新規薬理スクリーニング系の確立

本画像法は、これまでにない新しい薬物のスクリーニング系にもなりうる。従来の研究において、脳機能に対する薬物の効果の評価する実験手法は、主に電気生理学的実験と行動試験が一般的であった。多ニューロン活動に対する薬物の効果の評価するような実験手法は、まったく存在していないのが現状であった。本実験系では、これまで単一細胞レベルや個体動物レベルで得られていた薬物の効果および副作用が、神経ネットワークレベルでどのように統合されるかを容易に「可視化」することができる。新たな側面からの研究アプローチは、従来まで予想の域を超えなかった病理学・薬理学における疑問点を解消し、新たな知見を多数もたらすものと期待される。



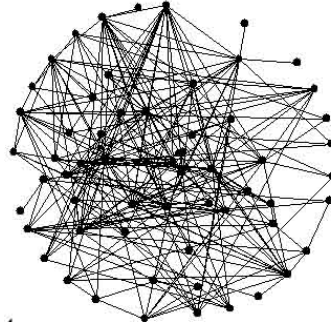
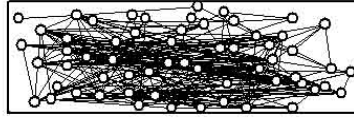


図8 グラフ理論に基づいた神経ネットワーク構造の解析

(上) 有意な同期活動（機能的結合）が観察された細胞ペアを線で結んだ。1つ1つの丸が、細胞の空間的な配置を示す。

(下) 上のグラフを点と線の構造を保ったまま円上に再配置した。グラフ理論に基づき数理解析を行った結果、このグラフはスモールワールド性の構造をもっていることが示唆された。

#### 4. 結論と今後の展開

これまでの脳研究では、ミクロなニューロンの挙動、または、マクロなニューロン集団の挙動のどちらか一方を解析するという限定的な実験アプローチがほとんどであった。しかし、それだけでは脳機能の実態を根底から解明することは不可能である。更なる研究の発展には、過去に得られた多数の断片的な報告例を、統合的に結びつける新しい視点が必要不可欠である。

多ニューロン画像法は、間違いなくこうした課題に答えうる実験手法の1つである。今後は、本画像法によって新しい研究領域が創生され、脳機能の解明が進展していくことを期待したい。

## 参考文献

- [1] 佐々木拓哉、平成 18 年度第 2 回学生表彰 東京大学総長賞受賞
- [2] 佐々木拓哉、第 4 回東京大学発明コンテスト 優秀賞受賞
- [3] 佐々木拓哉、高橋直矢、宇佐美篤、池谷裕二、日本薬学会ビジョン部会誌 2006 年 11 月号
- [4] N. Takahashi, T. Sasaki, A. Usami, Y. Ikegaya, *Neurosci. Res.*, *in press*
- [5] 高橋直矢、佐々木拓哉、松木則夫、池谷裕二、第 80 回日本薬理学会年会 (名古屋) P01-23
- [6] 佐々木拓哉、高橋直矢、松木則夫、池谷裕二、第 80 回日本薬理学会年会 (名古屋) P01-21
- [7] T. Sasaki, R. Kimura, M. Tsukamoto, N. Matsuki, Y. Ikegaya, *J. Physiol.*,574:283-290, (2006)
- [8] T. Sasaki, R. Kimura, N. Matsuki, Y. Ikegaya, The 3rd Takeda Science Fondation Symposium on PharmaScience 'On the Frontiers of Neuro-PharmaSciences' (Tokyo) P-4
- [9] 佐々木拓哉、木村梨絵、柄本昌子、松木則夫、池谷裕二、第 29 回日本神経科学大会 Neuro 2006 (京都) PS1A-C028
- [10] T. Sasaki, N. Matsuki, Y. Ikegaya, *J. Neurosci.*,27:517-528, (2007)
- [11] T. Sasaki, N. Matsuki, Y. Ikegaya, 36th Society for Neuroscience annual meeting (Atlanta) 539.14
- [12] 佐々木拓哉、池谷裕二、松木則夫、第 5 回ファーマ・バイオフィォーラム 「多ニューロン画像法：脳システムにおける新規スクリーニング系」最優秀賞受賞