

## テクニカルノート

## in vivo 胎仔脳における光学的イメージング法の適用

坂田義行, 松重武志, 遠藤 久, 富士岡隆, 中村彰治

山口大学医学部高次統御系・生理学第二講座 宇部市南小串1-1-1 (〒755-8505)

Key words : in vivo 光学的測定法, イメージング, 胎仔上丘, 膜電位, 細胞内Cl<sup>-</sup>動態

## はじめに

近年, 脳の機能解析を行うための有用な方法の一つとして, 光学的イメージング法が開発された。これは, 各種蛍光プローブを用いて, 膜電位変化や細胞内イオン動態がリアルタイムで可視化できる利点がある。そのため, この方法は脳の発達や神経回路, 神経細胞の傷害などの研究に広く応用されている。現在, 私たちはこの方法を用いて, 胎仔脳機能の研究を進めている。これまでの発達脳の研究は主にスライス標本や培養細胞を用いたin vitroの実験系で行われてきた。このようなin vitroの実験系では, 脳機能の研究に対して大きな制約がある。私たちは胎仔が母体と臍帯でつながった状態で, 脳機能の研究ができる実験モデルをすでに開発している<sup>1,2)</sup>。この実験モデルを用いることによって, in vivoの状態での胎仔脳の光学的イメージングが可能になった。

今回, 私たちは1) 膜電位光学的イメージング法と2) 細胞内Cl<sup>-</sup>光学的イメージング法について紹介する。

## 1. 膜電位光学的イメージング法

私たちが膜電位光学的イメージングを行うこととなった発端は, 胎仔上丘におけるwhole cell recording (パッチクランプ法) の実験に遡る<sup>3)</sup>。この実験において, 神経細胞の活動電位とともにシナプス様電位を観察した (図1)。すなわち, 胎仔脳において, すでに出生前に神経細胞の自発活動電位やシナプス

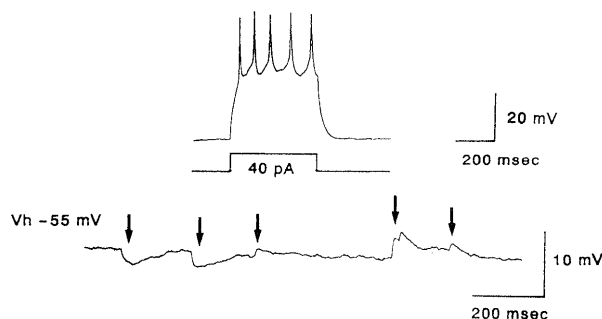


図1 胎仔上丘神経細胞におけるin vivoホールセル記録

上図はステップ電流パルスによって引き起こされた活動電位を示す。下図は同一神経細胞の興奮性シナプス様後電位と抑制性シナプス様後電位 (矢印) を示す。

伝達が存在する可能性が示唆された。しかし, これまでの実験では, 胎仔上丘では自発活動は発現しないと言われていた<sup>4)</sup>。そこで, 胎仔脳における神経活動ならびにシナプス伝達をさらに詳細に調べるために, 膜電位光学的イメージング法を適用することになった。

膜電位光学的イメージング法は, Cohen (1986) やGrinvald (1986) によって最初に開発された<sup>7,8)</sup>。微小ガラス電極による細胞内電位の記録法に比較して, 膜電位感受性色素を用いたイメージング法でははるかに容易に細胞内電位変化を記録することができる。また, イメージング法では, 多くの神経細胞の電気活動や伝搬の様子が同時に観察できる。さらに, 最近のエレクトロニクス技術の発展により, 多素子フォトダイオードアレイを用いたイメージングシステムが格段に改良されてきた。このシステムは光学系と画像解析装置を一体化している。膜電位変化を時間的, 空間的にリアルタイムで視覚化するこ

平成13年6月26日受理

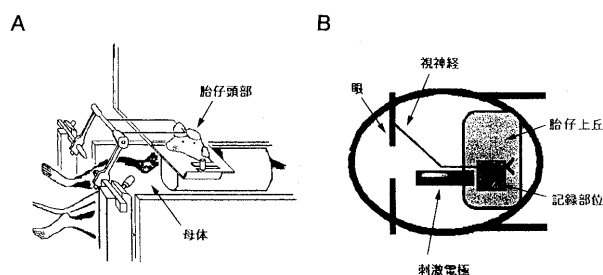


図2 母体ラットと臍帯でつながった胎仔の模式図  
A) 胎仔の固定方法を示す。  
B) 胎仔上丘と双極型刺激電極の挿入部位を示す。

とによって神経ネットワークやシナプス伝達を容易に解析できるようになった。

### 1) in vivo 胎仔-母体標本の作製

妊娠ラット (Sprague-Dawley (SD) rat, 3ヵ月令) をウレタン麻酔 (1.2-1.4 g/kg, 腹腔内投与) する。母体ラットを仰臥位にして, 帝王切開を行う。臍帯が母体とつながった状態で胎仔を子宮より取り出す。胎仔を保温用の円筒形カプセルに入れる。このカプセルは脳定位固定装置 (SR-6, 成茂) のマニプレーターに装着されたステンレス板の下部に接着テープで固定する。さらに胎仔の頭部はこのステンレス板とU字型のステンレス線の間で固定し, 歯科用セメントで補強する (図2 A)。胎仔の体動を止めるため筋弛緩剤 (ガラミン, 0.01 mg/g, 腹腔内投与) を投与する。実体顕微鏡下で, 胎仔の頭皮と頭蓋骨を切開し, 上丘を露出する。上丘の吻側部に電気刺激用電極を植え込む (横行静脈洞の後方, 1 mm; 正中より外側, 1-2 mm; 表面からの深さ, 0.5 - 1.0 mm) (図2 B)。膜電位感受性蛍光色素 (RH795, Molecular Probes) 溶液 (0.2%) を上丘表面に滴下する。蛍光色素を細胞内に1時間ロードする。蛍光色素の操作は常に暗室で行う。母体の直腸温はサーミスタプローブによって継続的に測定する。母体の体温は保温マットを用いて36~37℃に維持する。臍帯の露出部は乾燥しないように暖かい生理食塩水で湿らせた脱脂綿で覆う。

### 2) 膜電位光学的イメージングシステム

胎仔上丘の膜電位変化は光学的イメージングシステム (ARGUS-50/PDA, 浜松ホトニクス) によって測定した。顕微鏡は耐震台の上に設置する。光源

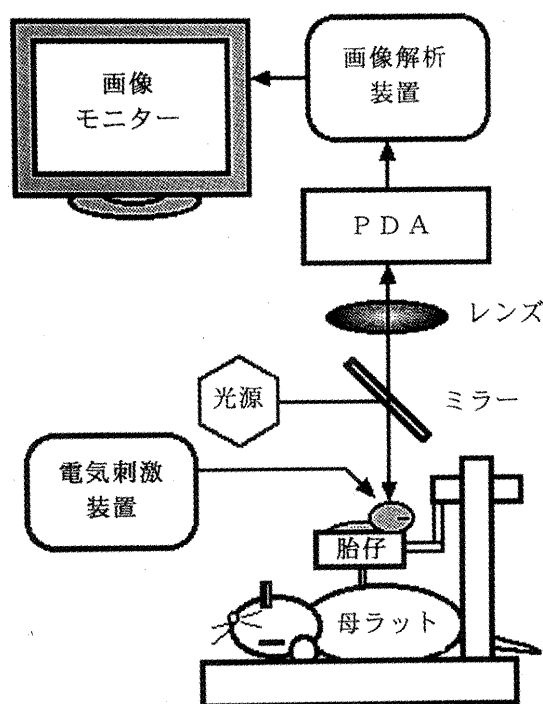


図3 in vivo 光学的イメージングシステムの模式図

はタンゲステン-ハロゲンランプ (100 W) を使用する。励起光 (波長, 510-550 nm) はダイクロイックミラーを通して, 胎仔上丘表面に照射する。蛍光 (波長, 610 nm) はフォトダイオードによって検出する。蛍光の検出器は, フォトダイオードを2次元に配列したフォトダイオードアレイ (PDA) で構成されている。このシステムは最小0.5 msの時間分解能をもつ。フォトダイオードアレイからの画像信号はA/Dコンバーターを介して画像処理装置に転送される。

胎仔-母体標本は正立顕微鏡の対物レンズ (倍率4) 下にセットする (図3)。上丘表面の焦点はまず接眼レンズから見て合わせる。次に光路をCCDカメラに切り替え, 画像モニターを見ながら上丘表面に焦点を合わせる。光路をフォトダイオードアレイの方に切り替える。電気刺激装置はアイソレーターを介して上丘の刺激電極に接続する。また刺激装置のトリガー信号によって, 光路シャッターの開閉と画像データの取り込み開始のタイミングを設定する。電気刺激前100 msから刺激後500 msの間の蛍光強度変化を0.5 ms間隔で測定し, 16回加算平均を行った。画像信号のイメージングは画像解析ソフトにより行う。図4は胎仔上丘の電気刺激による興奮反応のイメージングを示す。

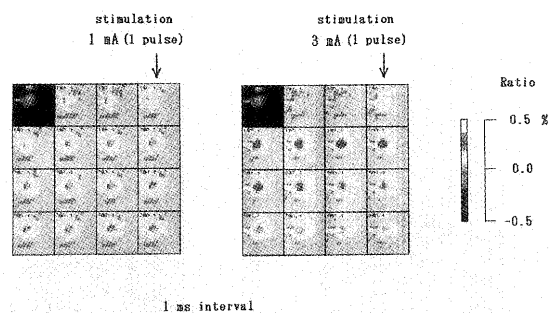


図4 胎仔上丘の電気刺激による興奮反応のイメージング

左図は1 mA (1パルス)で電気刺激(矢印)したときの興奮反応を示す。右図は3 mA (1パルス)で刺激したときのより大きな興奮反応を示す。蛍光強度比が-0.5~0.5%の範囲を各色調で示す。緑色は神経細胞の静止状態、赤色は興奮を示す。1つの画像の左側は上丘吻側、右側が尾側を、上部は内側、下部は外側を示す。画像は左から右へ、上から下へ継時的に並ぶ。

## 2. 細胞内Cl<sup>-</sup>光学的イメージング法

神経伝達物質であるγ-アミノ酪酸(GABA)はGABA<sub>A</sub>受容体に結合し、Cl<sup>-</sup>チャンネルを開口させることはよく知られている。成熟脳においては、GABAは抑制性作用を示す。しかし、発達脳においては、GABAは興奮性作用を示す。これらの発達脳の研究の多くは脳スライス標本を用いたin vitroの系でなされている。しかし、脳スライスは作製時にすでに低酸素や細胞損傷の影響を受けているので、その影響でGABAの効果が変化している可能性がある。そこで、私たちはGABAが発達脳において興奮性か抑制性かを調べるために、in vivo胎仔脳を用いて、細胞内Cl<sup>-</sup>濃度([Cl<sup>-</sup>]<sub>i</sub>)動態のイメージングを行った。

Cl<sup>-</sup>感受性蛍光色素として6-methoxy-N-ethylquinolinium iodide (MEQ, Molecular Probes)を使用した。MEQはそのままでは細胞膜を透過しない。MEQは還元することによって、高い膜透過性を示すことが知られている<sup>9)</sup>。さらに、還元型MEQを実際に、脳スライスの神経細胞にロードすることによって、[Cl<sup>-</sup>]<sub>i</sub>動態を測定することが可能になった<sup>10,11)</sup>。最近では、神経回路の発達過程でのCl<sup>-</sup>トランスポーターの研究にも応用されている<sup>12)</sup>。

### 1) Cl<sup>-</sup>感受性蛍光色素の調整

100%N<sub>2</sub>ガスで脱酸素化した蒸留水(0.1ml)を

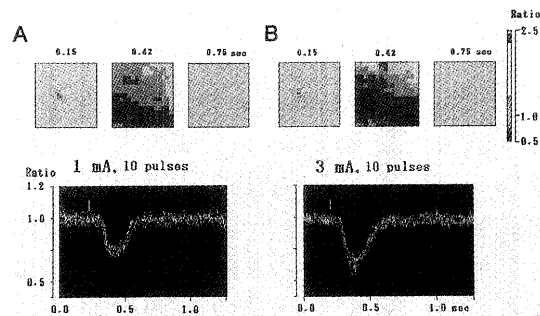


図5 胎仔上丘の電気刺激による細胞内Cl<sup>-</sup>の動態

A) 上図: 1 mA, 10パルスの電気刺激時の各時間の[Cl<sup>-</sup>]<sub>i</sub>のイメージング

下図: 蛍光強度比の継時の変化。電気刺激により[Cl<sup>-</sup>]<sub>i</sub>の増加を示す。

B) 上図: 3 mA, 10パルスの電気刺激時の各時間の[Cl<sup>-</sup>]<sub>i</sub>のイメージング

下図: 蛍光強度比の継時の変化。3 mAの刺激は、1 mAに比較してより短い潜時でより大きな反応を誘発する。

ガラス試験管内に入れ、MEQ (5 mg) を溶かす。これに12%NaBH<sub>4</sub> (120 mg/ml) を50 ml加えて、30分間反応させ、MEQ (淡黄透明色) を還元する。この還元型MEQにジエチルエーテルを加え、ボルテックスミキサーでよく攪拌する。分離した有機層をピペットで吸う(水を吸わないこと)。この有機物(還元型MEQ)にMgSO<sub>4</sub>の結晶(10 mg)を加え(5分間)、余分の水分を吸収する(気泡が発生したときはやりなおす)。加温と100%N<sub>2</sub>ガスにより完全に乾燥させる。100%N<sub>2</sub>ガスで脱酸素化した生理食塩水を加えて溶解する。この還元型MEQは細胞膜を通過することができる。細胞内で酸化型MEQとなる。この酸化型MEQの光学特性は、蛍光波長450 nmで最大値を示すベル型蛍光強度曲線である。酸化型MEQが細胞内でCl<sup>-</sup>と結合すると蛍光強度が減少する。すなわち、[Cl<sup>-</sup>]<sub>i</sub>が増加すると蛍光強度が減少し、逆に、[Cl<sup>-</sup>]<sub>i</sub>が低下すると蛍光強度は高くなる。

### 2) 細胞内Cl<sup>-</sup>光学的イメージングシステム

胎仔上丘の[Cl<sup>-</sup>]<sub>i</sub>は光学的イメージングシステム(ARGUS/HiSCA, 浜松ホトニクス)によって測定した。このシステムの構成は前述の膜電位光学的イメージングシステムと殆ど同じである。光源はキセノンランプ(75 W, 115 V)を用いる。励起波長(340 nm)の光を対物レンズ(倍率10)を通して胎仔上丘に照射する。同時に外側から光ファイバーを

介して照射する。蛍光 (420-480nm) は冷却型高速CCDカメラ (最小測定時間, 2 ms) によって検出する。冷却型高速CCDカメラからの画像信号は画像処理装置に転送される。

胎仔-母体標本を正立顕微鏡下にセットする。還元型MEQを上丘表面に滴下 (~10  $\mu$ l) し, 90分間ロードする。画像取り込み時間は2msとした。画像取り込みの200ms後, 上丘の電気刺激 (1-3mA, 10連パルス) を行う。刺激後, 1秒間記録する。画像取り込み時間や刺激のタイミングは実験の目的に応じて設定する。図5は胎仔上丘の電気刺激による[Cl<sup>-</sup>]<sub>i</sub>の時間的, 空間的变化を示す。胎仔上丘の[Cl<sup>-</sup>]<sub>i</sub>は電気刺激によって増加するので, Cl<sup>-</sup>は細胞外から細胞内に流入することが示唆された。さらに, この反応はGABA<sub>A</sub>受容体の拮抗剤によって阻害された。このことは, GABAは胎仔脳においても抑制性であることを示している。したがって, これまでのin vitroの結果と私たちの結果は異なる可能性を示しており, この点について, さらに検討していく必要がある。

#### おわりに

in vivo胎仔脳の機能的研究はこれまでほとんど行われていない。光学的イメージング法はこのようなin vivoの研究においても, 非常に有用であることがわかった。最近では, 細胞内各種イオンのプローブのみならず, 細胞内シグナル伝達物質をリアルタイムで可視化できるプローブが開発されてきている。今後, in vivo光学的イメージング法は生体分子の局在やダイナミクス, 生理機能をリアルタイムで研究するために重要な手段となると考える。

#### 参考文献

- 1) Nakamura S, Sakaguchi T. Development and plasticity of the locus coeruleus : a review of recent physiological and pharmacological experimentation. *Prog Neurobiol* 1990 ; **34** : 505-526.
- 2) Nakamura S, Arakawa S, Nishiike S. Long-lasting change in the excitability of fetal neurons following activation of dam's hypothalamus in rats. *Am J Physiol* 1995 ; **269** : R236-R244.
- 3) Sakaguchi T, Nakamura S. Some in vivo electrophysiological properties of locus coeruleus neurons in fetal rats. *Exp Brain Res* 1987 ; **68** : 122-130.
- 4) Sakata Y, Fujioka T, Chowdhury GMI, Nakamura S. In vivo electrical activity of brainstem neurons in fetal rats during asphyxia. *Brain Res* 2000 ; **871** : 271-280.
- 5) Sakata Y, Fujioka T, Nakamura S. In vivo whole-cell recording from neurons of the superior colliculus in fetal rats. *Dev Brain Res* 1998 ; **108** : 255-262.
- 6) Molotchnikoff S, Itaya SK. Functional development of the neonatal rat retinotectal pathway. *Dev Brain Res* 1993 ; **72** : 300-304.
- 7) Cohen LB, Leshner S. Optical monitoring of membrane potential : methods of multisite optical measurement. In: De Weer P, Salzberg BM, eds. *Optical Methods in Cell Physiology*. Wiley, New York, 1986, p. 71-99.
- 8) Grinvald A, Lieke E, Frostig RD, Gilbert CD, Wiesel TN. Functional architecture of cortex revealed by optical imaging of intrinsic signals. *Nature* 1986 ; **342** : 361-364.
- 9) Biwersi J, Verkman AS. Cell-permeable fluorescent indicator for cytosolic chloride. *Biochemistry* 1991 ; **30** : 7879-7883.
- 10) Inglefield JR, Schwartz-Bloom RD. Confocal imaging of intracellular chloride in living brain slices : measurement of GABA<sub>A</sub> receptor activity. *J Neurosci Meth* 1997 ; **75** : 127-135.
- 11) Schwartz RD, Yu X. Optical imaging of intracellular chloride in living brain slices. *J Neurosci Meth* 1995 ; **62** : 185-192.
- 12) Fukuda A, Muramatsu K, Okabe A, Shimano Y, Hida H, Fujimoto I, Nishino H. Changes in intracellular Ca<sup>2+</sup> induced by GABA<sub>A</sub> receptor activation and reduction in Cl<sup>-</sup> gradient in neonatal rat neocortex. *J Neurophysiol* 1998 ; **79** : 439-446.