

157. 脳内化学プロセスのリアルタイム計測技術の開発

山本 慎也

Key words: ドーパミン, オプティカルレコーディング,
リアルタイム計測, ラット

*産業技術総合研究所
ヒューマンライフテクノロジー研究部門

緒言

脳は無数の神経細胞が互いの信号を伝達しあうことによって、複雑な情報処理を実現している。各々の神経細胞が電気的に発火すると、軸索を伝わり次の神経細胞に向けて、電気的に信号を伝達する。そして、電気的に伝えられた信号は、シナプスを介して次の神経細胞に化学的に信号を伝達することになる。このように、脳の情報処理は、電気のプロセスと化学のプロセスの繰り返しによって実現している(図1)。脳の情報処理を神経回路レベルで解明するためには、リアルタイムにこれらの信号を計測することが望まれる。これまでの神経科学の研究の歴史の中で、電気のプロセスに関しては、多くの研究がなされてきた。一方、化学のプロセスに関しては、それほど多くの研究がなされてきたとは言いがたい。その理由として、化学のプロセスをリアルタイムに計測する技術が確立されていないことがあげられる。

一方、近年、様々な神経伝達物質による化学のプロセスの重要性が強調されつつある。特に、ドーパミンは現在の神経科学の中で最も注目されている分子のひとつである。ドーパミンを放出する神経細胞(ドーパミンニューロン)は、報酬に関連する情報をコードし、報酬が連関する感覚入力に対して発火して神経細胞の感覚応答を強化する¹⁾。さらに、感覚刺激に誘導される行動を、短期的²⁾あるいは長期的^{3,4)}に変化させることが示唆されている⁵⁾。このようなドーパミンニューロンの活動パターンは、げっ歯類および霊長類の研究で明らかになりつつあるが、受け手側の神経細胞にリアルタイムにどのようにドーパミンが放出されているのかは、必ずしも明らかとは言えない。本研究課題では、ドーパミンによる化学伝達をリアルタイムに計測する新しい手法の開発を行った。

方法および結果

1. ドーパミン計測の原理と実験プロトコール

ドーパミンはドーパミンニューロンとその投射先のニューロン間のシナプスにおいて放出される。そのため、ドーパミンの放出量を計測するためには、細胞外に漏出するドーパミンを検出する必要がある(図1)。我々は、ドーパミンのリアルタイム検出のため、蛍光色素を作製した(論文準備中)。この色素分子は、それ自体は蛍光を発しないが、ドーパミンと反応することによって蛍光を発する。この蛍光色素を脳内に浸透させることによって、拡散の原理でシナプス間隙およびその近傍に到達した分子がドーパミンと反応することが期待できる。ドーパミンと蛍光分子の反応が起こり、蛍光が発せられれば、その蛍光はオプティカルレコーディングの手法を用いて計測することができる。我々は、上記の原理に基づき、ドーパミン放出のリアルタイム計測のシステム構築を行った。

腹側被蓋野(ventral tegmental area: VTA)のドーパミンニューロンは、前頭前皮質(Prefrontal cortex: PFC)に投射していることが、解剖学的に知られている⁶⁾。また、腹側被蓋野の電気刺激により、前頭前皮質にドーパミンが放出されることが、ボルタメトリー法を用いた研究によって明らかにされている⁷⁾。これらの先行研究から、計測原理の検証実験として、腹側被蓋野を電気刺激し前頭前皮質におけるドーパミン量の計測を行った。

*現所属：産業技術総合研究所 人間情報研究部門

2. 電気刺激による腹側被蓋野の同定

腹側被蓋野の電気刺激により、前頭前皮質に電気的活動が観察されることが知られている⁸⁹⁾。これは、ドーパミンニューロンが co-release するグルタミン酸によるものと考えられているが、本研究ではこれを用いて、電気刺激のターゲットである腹側被蓋野の位置を同定した。刺激電極は冠状面内を鉛直方向に進め、前頭前皮質に設置したボール電極で計測した局所フィールド電位 (local field potential: LFP) が最も大きく観察された場所を刺激位置とした。図2に電気刺激 (電流サイズ $150\ \mu\text{A}$, 持続時間 $300\ \mu\text{s}$) によって誘発された局所フィールド電位 (図2A) と、実験後にマーキングした電極位置 (図2B) の例を示した。

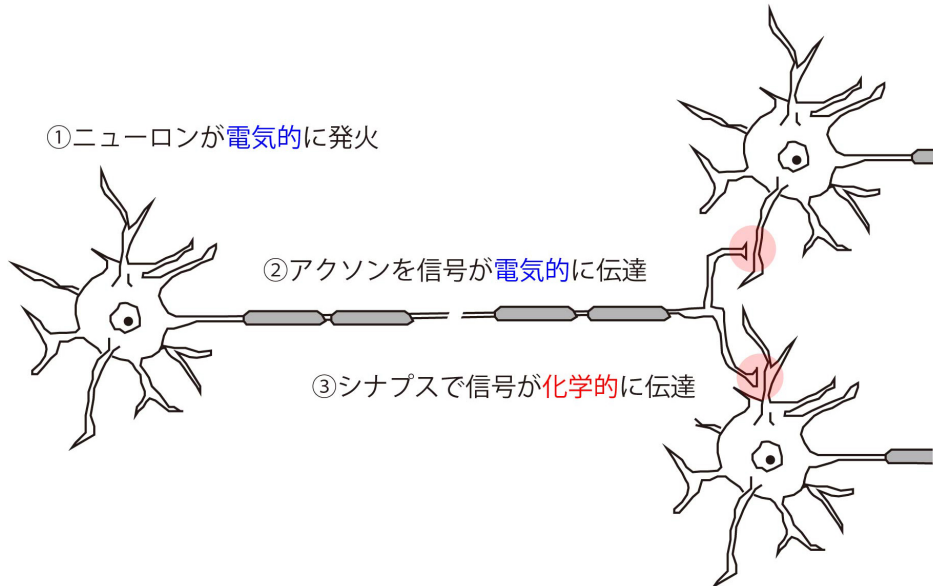


図1. 神経伝達における電気的プロセスと化学的プロセス.

脳の情報処理は、電気的プロセスと化学的プロセスの繰り返しによって実現している。本研究課題の目標は、化学的プロセスをリアルタイムに計測することである。

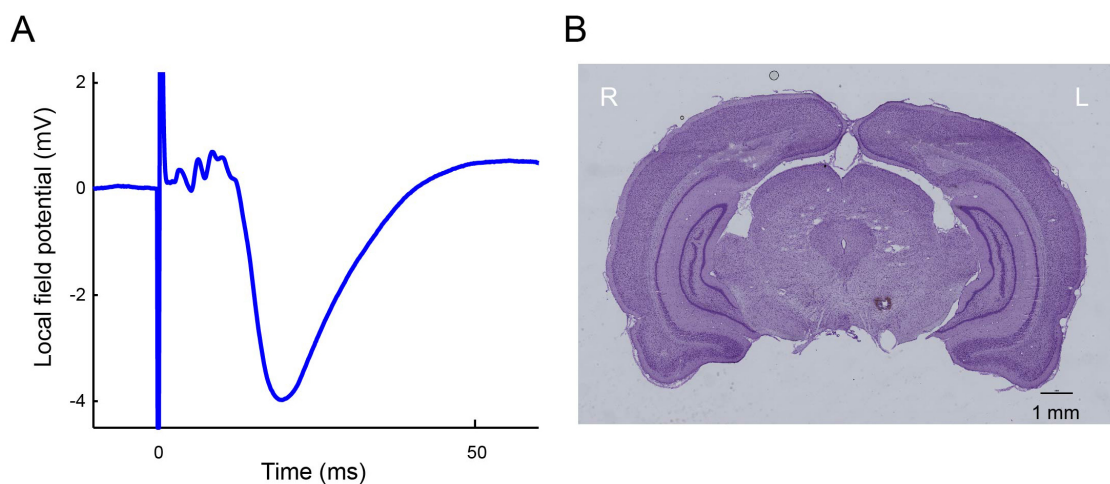


図2. 電気刺激による腹側被蓋野の同定.

A) 腹側被蓋野の電気刺激により誘発された前頭前皮質における局所フィールド電位 (local field potential: LFP) の例。局所フィールド電位を指標に、腹側被蓋野の位置を同定した。刺激のタイミングは 0 ms. (アンプ倍率: 200 倍). B) 実験後にマーキングした電極位置の例。スケールバーは 1 mm.

3. オプティカルレコーディング

前頭前皮質に蛍光色素を浸透させ、腹側被蓋野の電気刺激と同時に、蛍光顕微鏡によって蛍光の計測を行った。計測には高感度 CMOS イメージセンサーを搭載したイメージングシステム (MiCAM02, BrainVision) を用いた。撮像範囲の大きさは 5.76×4.8 mm で、前頭前皮質が中心となるよう、光学系レンズの倍率を調節した。計測は、50 Hz のサンプリングレートで行い、約 20 秒間の計測時間のうち、計測開始から 10 秒後に、電気刺激 (パルス幅: $100 \mu\text{s}$, 刺激頻度: 100 Hz, 刺激時間: 300 ms) を行った。各ピクセル・各時刻の信号強度は、計測開始時の各ピクセルにおける信号強度で規格化して表した ($\Delta F/F$)。

図 3 に結果の一例を示す。撮像範囲内の 3 点の信号強度を、電気刺激開始時刻を時刻 0 とし、時間軸に対してプロットした。ただし、信号のベースラインのドリフトの影響は除去してある (breaching)。各点において、電気刺激後に、信号の増加が観察された。この結果は、腹側被蓋野の電気刺激によって惹起されたドーパミンニューロンの活動増加により、前頭前皮質におけるドーパミン放出が生じたと考えられるものであった。

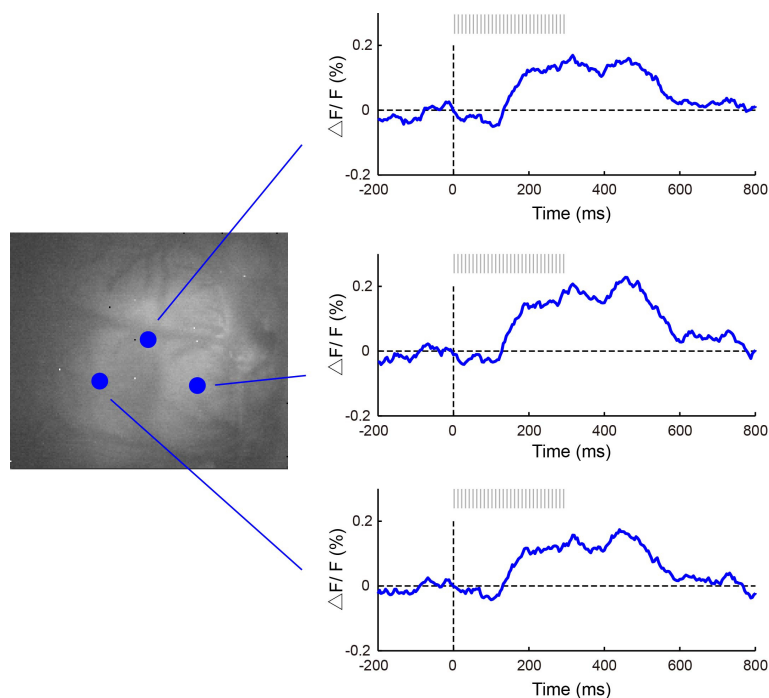


図 3. 前頭前皮質におけるドーパミンのリアルタイム計測。

前頭前皮質における蛍光強度をオプティカルレコーディング法によって計測した。電気刺激のタイミングを時刻 0 とし、大脳皮質上の代表的な 3 点における蛍光強度の変化を、経時的に表示した。刺激直後に、蛍光強度の増加が観察された。なお、解析時に breaching を行い、信号強度の時間的ドリフトによる影響は除去した。

考 察

本研究の結果は、ドーパミン放出をリアルタイムに計測する新しい技術を提供するものである。従来、伝達物質の放出を検出する 2 種類の方法が存在した。一つ目はマイクロダイアリシと呼ばれる方法で、半透膜を用いて脳内に灌流液を流し、逆に浸透圧で神経伝達物質を回収するという方法である。この方法は、物質の同定の精度が良い反面、灌流液を脳内に注入するため侵襲度が高く、リアルタイム性も低い点も弱点であった。二つ目はボルタメトリーと呼ばれる酸化還元電位を用いる方法である。この方法は、リアルタイム性はある程度高いが、類似の酸化還元電位を持つ物質の区別がつかないため、化学同定に限界があった。我々の手法は、物質の同定精度も高く、リアルタイム性もカメラのサンプリングレートまで向上できる。我々の提案する手法は、計測技術として改善すべき問題が存在するものの、空間情報も同時に得られるという従来にはない利点も存在し、今後さらに発展させていきたいと考えている。

共同研究者

本研究の共同研究者は、産業技術総合研究所人間情報研究部門の高島一郎および長坂和明、同研究所健康工学研究部門の鈴木祥夫である。最後に、本研究にご支援を賜りました上原記念生命科学財団に深く感謝いたします。

文 献

- 1) Schultz, W. : Predictive reward signal of dopamine neurons. *J. Neurophysiol.*, **80** : 1-27, 1998.
- 2) Hikosaka, O., Nakamura, K. & Nakahara, H. : Basal ganglia orient eyes to reward. *J. Neurophysiol.*, **95** : 567-584, 2006.
- 3) Yamamoto, S., Kim, H. F. & Hikosaka, O. : Reward value-contingent changes of visual responses in the primate caudate tail associated with a visuomotor skill. *J. Neurosci.*, **33** : 11227-11238, 2013.
- 4) Hikosaka, O., Yamamoto, S., Yasuda, M. & Kim, H. F. : Why skill matters. *Trends Cogn. Sci.*, **17** : 434-441, 2013.
- 5) Hikosaka, O., Kim, H. F., Yasuda, M. & Yamamoto, S. : Basal ganglia circuits for reward value-guided behavior. *Annu. Rev. Neurosci.*, **37** : 289-306, 2014.
- 6) Frankle, W. G., Laruelle, M. & Haber, S. N. : Prefrontal cortical projections to the midbrain in primates: evidence for a sparse connection. *Neuropsychopharmacology*, **31** : 1627-1636, 2006.
- 7) Garris, P. A., Collins, L. B., Jones, S. R. & Wightman, R. M. : Evoked extracellular dopamine *in vivo* in the medial prefrontal cortex. *J. Neurochem.*, **61** : 637-647, 1993.
- 8) Mercuri, N., Calabresi, P., Stanzione, P. & Bernardi, G. : Electrical stimulation of mesencephalic cell groups (A9-A10) produces monosynaptic excitatory potentials in rat frontal cortex. *Brain Res.*, **338** : 192-195, 1985.
- 9) Watanabe, Y., Kajiwara, R. & Takashima, I. : Optical imaging of rat prefrontal neuronal activity evoked by stimulation of the ventral tegmental area. *Neuroreport*, **20** : 875-880, 2009.