

ニューロン活動の光学的イメージング解析による 循環・呼吸中枢の機能構築に関する研究

Optical analysis of functional organization of the cardiovascular and respiratory centers

研究代表者 東京医科歯科大学医学部生理学第二講座 講師 佐藤容子

Assistant Professor, Department of Physiology, Tokyo Medical and Dental University
School of Medicine, Yoko MOMOSE-SATO

The multiple-site optical recording/imaging techniques were employed to assess the functional organization of the cardiovascular and respiratory centers. Brainstem preparations were dissected from E13-16 rat embryos, and stained with a voltage-sensitive merocyanine-rhodanine dye (NK2761). The neural activity in response to vagal stimulus was recorded simultaneously from many sites using a 128- or 1020-element photodiode array measuring system. Analyzing the dynamic spatial distribution of the optical signals, we have been able to trace the embryogenesis of the functional organization of the vagus nerve-related nuclei. Subsequently, using an intrinsic optical imaging technique, we examined neural responses in the adult rat brainstem together with measurements of blood pressure. Blood pressure fell with vagal stimulation, and the degree of the fall was constant under the same condition of stimulation. However, even to repeated applications of the same vagal stimulus, considerable variations have often been observed in the size/extent, configuration, and orientation of the intrinsic optical response area between trials.

1. 研究目的

心血管系や呼吸の神経性調節に関与する中枢機構のコアシステムやおおまかな神経回路は、解剖学および生理学的研究によって近似的なプロフィールが得られているが、神経回路の詳細やダイナミックな作動様式については、多くの研究がなされているにもかかわらず、まだ統一的な描像が得られるまでに至っていない。これは、循環/呼吸中枢の機能的構成が単純な一体描像で把握しきれものではなく、高度にシステム化されたダイナミックな複雑系であることを意味している。このような循環/呼吸中枢機能の解析には、従来の解剖学的/組織形態学的な位置の同定や、単一細胞からの電気生理学的記録に頼る実験手技だけでは不可能であり、必然的に新しい実験手技、方法論を導入したダイナミックなアプローチが必要である。本研究では、ニューロン電位活動の光学的多チャンネル計測/イメージング法を導入して、循環、呼吸の

神経性調節の中枢機構について「自律分散システム」という視点から新しいconceptを打ち出すことを目的としている。

2. 研究経過

2.1. 方法

2.1.1. 標本

実験動物としてはラットを用い、embryoおよびadultにおける延髄ニューロン活動の機能マッピングを行った。embryoに関しては末梢神経系を付けたまま摘出した脳幹標本を用い、adultに関しては主としてin vivo標本を用いて、総合的な解析を行った。in vivo標本では、大腿動脈にカテーテルを挿入し、血圧の変化を同時にモニターした。

2.1.2. 測定系 (光学的計測)

in vitro標本に対しては、脳幹スライス標本を膜電位感受性色素 (NK2761) で染色し、12×12あるいは34×34素子マトリックス型フォ

トダイオードアレイを用いて、ニューロン電位活動を光学的シグナルとして多領域から同時記録した。in vivoの標本に対しては、麻酔下に第四脳室を開頭し、内因性光学変化の画像化システム (IMAGER 2001) を用いて、脳神経活動にともなう内因性の光学的変化を画像イメージとして捉えた。

2.2. 結果および考察

2.2.1. ラット胚延髄におけるニューロン電位活動の光学的イメージング

図1Aは、胎生15日目のラット胚脳幹スライス標本を膜電位感受性色素で染色し、迷走神経の刺激によって延髄部に誘発されたニューロン応答を、1020素子フォトダイオードアレイを用いて吸光シグナルとして記録したものである。ニューロン応答は刺激した側の延髄背側の領域 (領域I、領域II) に誘発された。蛍光トレーザーDiIをもちいた形態観察との比較から、これらのニューロン応答領域は、孤束核 (領域I) および迷走神経背側運動核 (領域II) に対応していることが明らかとなった。

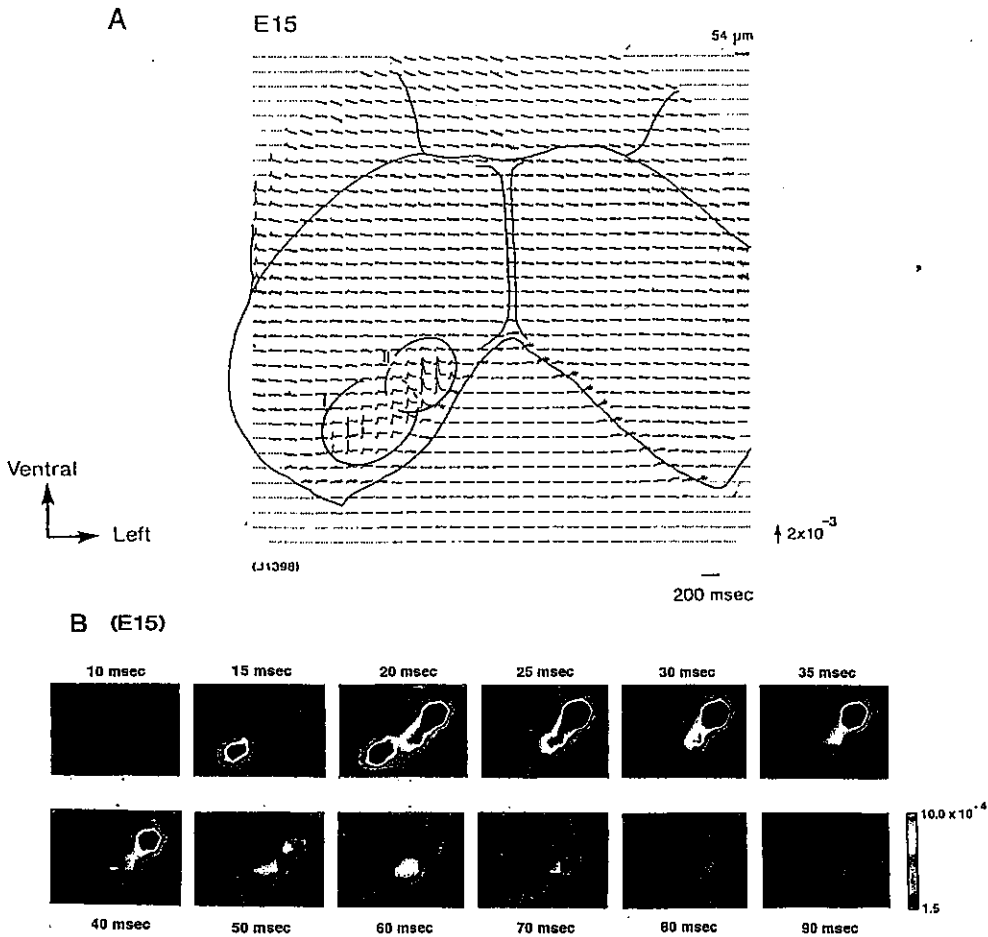


図1. ラット胚の脳幹スライス標本で、迷走神経を吸引電極で刺激したときに延髄に誘発された光学的シグナルのイメージング

胎生15日以降のラット胚で、刺激によって誘発される光学的シグナルは、速いスパイク状の成分とそれに続く時間経過の遅い成分の2つの相により構成されるが、速いスパイク状の成分は活動電位由来のシグナル、これに続く時間経過の遅いシグナルは、1) 連続刺激で次第に減衰し(シナプス疲労に対応)、2) 細胞外液からのCa²⁺の除去、Mn²⁺やCd²⁺の添加によって抑制あるいは消滅することから、孤束核におけるシナプス後電位に対応していることが結論された。このシナプス後電位は、キヌレン酸(kynurenic acid)で特異的に抑制され、さらに、APVによりその後期相(later phase)が、CNQXによりその初期相(early phase)が、それぞれ特異的に抑制された。このことから、このシナプス後電位は、グルタミン酸を伝達物質とする興奮性シナプス後電位(EPSP)であり、その初期相(early phase)はnon-NMDA型、後期相(later phase)はNMDA型の受容体機能に対応していることが示された。

図1Bは、胎生15日目のラット胚脳幹スライス標本で、迷走神経刺激により延髄に誘発されたニューロン活動を疑似カラー表示で示したものである。この疑似カラーマップで、迷走神経刺激により延髄に誘発されたニューロン応答は、まず孤束核に発現し次第に広がっていくこと、背側運動核における逆行性の活動電位は孤束核における順行性の活動電位よりやや遅れて発現することが示された。

これらの脳幹スライス標本において、延髄内におけるニューロン応答のマッピング/イメージングのパターンは、標本間では多少の違いが見られるものの、同一標本での繰り返し刺激では、十分な刺激間隔を置いた場合にはほぼ一定の応答パターンを示すことが明らかとなった。この結果は、embryoのin vitro標本では、一定の入力に対する延髄内での応答パターンには、大きなtrial-to-trial variationsが見られないこと

を示していると考えられる。

2.2.2. adultのラット延髄におけるニューロン活動の光学的イメージング

adultラットのin vivo標本において、605 nmの準単色光を脳幹表面に照射し、迷走神経刺激(20 Hz/1 sec)により誘発されたニューロン活動パターンを、内因性光学シグナルとして記録した。シグナルの大きさは、迷走神経刺激によって増加(反射光の減少)し、刺激開始後約1.5秒でそのピークに達した。照射光波長605 ± 5 nm以外にも、630 nm、730 nm、750 nm、850 nmの準単色光で迷走神経応答の画像化に成功したが、内因性光学シグナルの大きさは、605 nmの準単色光を用いた場合が最も大きかつ

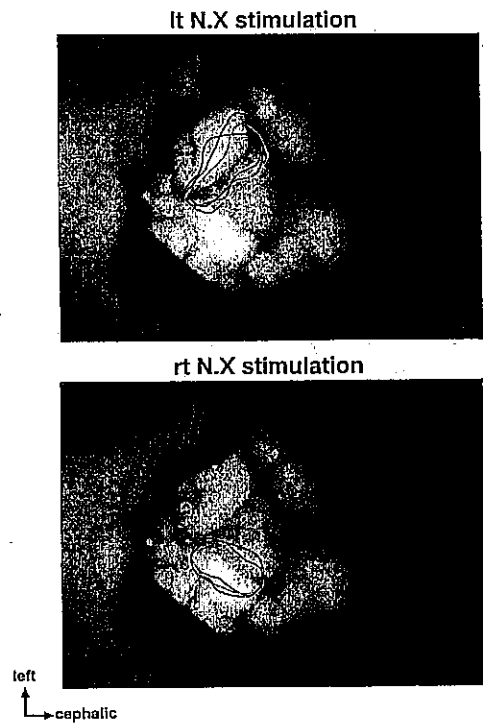


図2. 成体ラットのin vivo標本で、迷走神経刺激により誘発された内因性シグナル応答野のtrial-to-trial variations

た。また準赤外光(850nm)を用いた場合、内因性光学シグナルの大きさの時間経過は、605nmの場合と比較してゆっくりとした変化であった。

迷走神経刺激に対する応答領域は血管の走行とは無関係で、obexに対してほぼ同一の位置に出現した。解剖学的位置との比較から、今回記録された応答は、主に迷走神経の感覚核である孤束核に対応すると考えられた。

複数のratを用いた実験において、応答領域の大きさは一様ではなく、個体差があることが明らかとなった(animal-to-animal variations)。さらに、同一のratで、左あるいは右迷走神経をそれぞれ刺激した結果、一定の条件下での繰り返し刺激に対して、血圧の変動には大きな変化が見られなかったが、延髄内でのニューロン応答パターンには、trial-to-trial variationsが見られることが明らかとなった。

この結果は、求心性入力(迷走神経活動)と遠心性出力(血圧低下)との間に一定の対応関係が成立するにも関わらず、中枢内におけるニューロン活動の時間的/空間的パターンは固定したものではなく、変動することを示しており、このことから、延髄内における自律分散処理システムの存在が強く示唆された。

3. 研究成果

ラット胚および成体ラットの延髄において、循環・呼吸器系の一次求心線維が終止する孤束核を中心に、ニューロン応答パターンの光学的マッピング・イメージングを行い、その時間的・空間的パターンをはじめて明らかにした。

4. 今後の展望と発展

本研究で解析を行ったのは、発生初期の時期と成体についてであったが、今後は両者の間のギャップを埋めるべく、新生ラットについてデータを集積する。また、extrinsic signalと

intrinsic signalの対応関係についても検討を加える。本研究では、主として孤束核領域に重点を置き解析を行ったが、二次応答野・三次応答野に関してもpreliminaryなデータを得ており、今後はこれらを含めた循環・呼吸中枢の全体像についてその機能的構築を明らかにしていきたい。

5. 発表論文リスト

1. Sato, K., Momose-Sato, Y., Arai, Y. & Kamino, K. (1999) Optical mapping of neural responses in the embryonic rat brainstem: early functional organization of vagal nuclei. In "Neural Development", Eds. Uyemura, K., Kawamura, K. and Yazaki, T., Springer-Verlag, Tokyo, pp404-409.
2. Momose-Sato, Y., Sato, K. & Kamino, K. (1999) Optical identification of calcium-dependent action potentials transiently expressed in the embryonic rat brainstem. *Neuroscience* 90: 1293-1310.
3. Momose-Sato, Y., Sato, K. & Kamino, K. (2000) Optical recording of neural activity in the embryonic brainstem. *Progress in Neurobiology*, (印刷中)
4. Yazawa, I., Sato, K., Tanaka, T., Momose-Sato, Y. And Kamino, K. Intrinsic optical imaging of neural responses in *in vivo* rat brainstem evoked by vagus nerve stimulation. (投稿準備中)
5. 佐藤勝重、佐藤容子 (1999) 膜電位の光学的計測。栗原靖之、武内恒成、松田洋一編、ザ・プロトコールシリーズ non-RI分子生物学実験プロトコール - 蛍光ラベリング・化学発光の原理から実際まで - 羊土社、東京、pp178-179.
6. 神野耕太郎、佐藤容子、佐藤勝重、持田啓 (1999) 膜電位感受性色素を用いた計測と解析法。日本生理学雑誌 61: 95-134.
7. 神野耕太郎、佐藤容子、佐藤勝重 (1999) 膜電位活動の光学的計測。日本レーザー医学会誌 20: 391-403.