

## 平成 17 年度 研究リソース開発 成果報告書

平成 18 年 3 月 3 日提出

ふりがな	こじま ひろし	所属・職	玉川大学・知能情報システム学科・教授
開発代表者名	小島 比呂志		
開発課題名	高速多点 un-caging 刺激システム開発及び神経回路機能解析への応用		
<p><b>開発経過及び成果</b> (開発目標に対する成果を計画書に記載した内容に対応させて記載すること)</p> <p><b>「開発経過及び成果」</b></p> <p>(1) 一個の神経細胞の樹状突起や局所的なスケールの神経回路網を高速で多点刺激するための実験機器の必要性が、実験及び理論の両方面から求められていた。平成 17 年度にこの目的で、紫外レーザー (351nm, 364nm) を光学系によって数ミクロンの直径にまで絞り、ガルバノによるスキャナーで二次元的に標本面で振らせ、in vitro 標本上で un-caging することが可能な装置を開発した (本研究申請者及び Dr. Shoham と Carl-Zeiss 社の共同開発)。平成 18 年 2 月に性能テストを行い以下の仕様を達成した。①ガルバノミラーを用いての速い多点の紫外レーザーによる uncaging が可能。②uncaging できるスポット径は、3 μm 以下、スパインレベルでの刺激が可能。③刺激する 2 点間の時間間隔は、1m 秒以下 (10–40 μm の距離)。④刺激できる点の数は、100 点ほどでソフト上でコントロールできる。⑤ピエゾで対物レンズを上下することにより、深さ方向に 200 ミクロンの距離の 2 点間も刺激できる。これによって、神経細胞の多点を 1–2m 秒の時間間隔でスパインレベルのシナプス刺激が可能になる。現在電気生理計測用の機器と本器を組み合わせることで実際のスライス標本からの記録を試みている。さらに、赤外レーザー (2-photon) を利用して多点高速で un-caging できるようにメインスキャナーを制御するプログラムを新しく導入した。この際利用した赤外レーザーは、ChameleonXR (Coherent 社製、米国) である。この場合は、un-caging 中イメージング用のスキャナーを用いるため、レーザー刺激と同時に画像取得ができないが、uncaging 直後から画像を取得することが可能である。</p> <p>(2) 上記の実験を行うにあたり、より効率のよい caged 化合物を用いるための予備実験を行った。具体的には、小さい領域 (直径 1 μm 以下) に存在する caged 化合物 (caged-glutamat など) を効率よく刺激するために、Gamma-CNB-caged glutamate 400 μM とを同濃度、還流により同一スライス標本に与えた。この刺激に対する応答をラット新皮質の一個の神経細胞からパッチクランプ法によるカレントクランプ電圧記録及び local field potential 記録を行い、UV レーザーの照射時間やレーザーパワーを変化させて神経細胞の電氣的活動を記録した。この予備実験の結果、同濃度の場合 MNI-caged glutamate の方が Gamma-CNB-caged glutamate に比較してより効率的に神経細胞の刺激可能であることが定量的に明らかになった。従って、現在市販されている caged glutamate としては、MNI-caged glutamate が、我々の実験に有効であることが示唆された。</p> <p>(3) 平成 17 年 10 月に米国 Center for Devices and Radiological Health から Dr. Ilev が来日し、システムのデザイン及び物理的な専門知識と技術の提供を受けた。このとき、博士の研究室において平成 18 年 8 月にレーザー刺激と電気生理学組み合わせ、基礎的なシステムの性能向上に関する共同実験を行う合意に達した。この準備のため研究代表者は、平成 17 年 11 月に米国の彼の研究室を訪問し、詳細な打ち合わせと今後の計画を話し合った。</p>			

この装置の完成により、従来まで電気刺激では困難であった神経細胞樹状突起とその単シナプスレベルの種々の時空間パターンでの活性化が可能になる。それらの活性化による電気信号や光信号（細胞内カルシウム変化や電位感受性色素による電位変化に伴う）の変化を計測することで、極めて正確か定量的に神経細胞や回路網の機能を調べることができる。

この装置を利用して本格的な生理実験を行うための準備を現在急ピッチで進めており、平成 18 年度にその成果が期待できる。

この新しいシステムに関しての学会やシンポジウムでの発表は以下である。

学会・シンポジウム発表

1. 2006 年 3 月 31 日 第 38 回日本生理学会（前橋市）ランチョンセミナー 「多点高速光刺激、スペクトル分析、高速イメージングを可能とする Zeiss のイノベーション」小島比呂志
2. 2006 年 3 月 29 日 第 38 回日本生理学会（前橋市）口頭発表 小島比呂志 「海馬 CA1 での連合性 LTP のイメージング解析」
3. 2006 年 2 月 21 日 統合脳支援班研究リソース委員会主催「脳機能解析新技術研究会」（仙台市）口頭発表 小島比呂志 「多点高速神経刺激システム開発とその神経機能解析への応用」