

博士学位論文審査要旨

2018年2月14日

論文題目: A Study on the Development and Utilization of a Micro-Endoscopic System for Functional Assessment of Neural Circuits in Deep Brain Regions

(脳深部における脳神経回路機能評価のための顕微内視鏡の開発利用に関する研究)

学位申請者: 八代 英敬

審査委員:

主査: 生命医科学研究科 教授 太田 哲男

副査: 生命医科学研究科 教授 飛龍 志津子

副査: 生命医科学研究科 准教授 小林 耕太

要 旨:

光学計測によって複数の脳神経細胞を同時に記録することは脳神経ネットワークの解明には不可欠である。しかし、従来の蛍光顕微鏡では脳深部での生体計測を行うことが困難であり、多光子励起顕微鏡でも脳表から1 mm程度の深さまでの計測が限度であった。近年では、多光子励起顕微鏡と光ファイバー束や屈折率分布型レンズを組み合わせることで内視鏡のように脳内に挿入することで脳深部での光学計測を行うことが可能になってきている。しかし、光学計測の時間分解能は限られているため、これらの手法では聴覚応答のような数ミリ秒の間に起こる神経活動のつながりを記録することが困難であった。そこで、我々のグループは光学計測の時間分解能の低さを補うために、光学計測と同時に電気活動記録を可能にする顕微内視鏡を開発した。本研究では顕微内視鏡を使った聴覚応答の計測方法の確立を目指し、マウス・コウモリを被験体とした実験を行いながら、実験手法の改善を行った。

第2章では顕微内視鏡の構造についての詳細について述べた。レーザースキャナと光ファイバー束を組み合わせた蛍光顕微鏡で計測した生体内画像と脳切片を作成して蛍光顕微鏡で計測した生体外画像を比較した結果、顕微内視鏡での画像は最低限の空間分解能があること、また、細胞体を識別することが十分に可能であることを示した。

第3章では顕微内視鏡を用いて聴覚応答を光学的・電気生理学的に計測するために、マウス下丘からの神経活動を顕微内視鏡で計測した。その結果、マウス下丘の周波数再現構造に即したカルシウム蛍光変化を計測することが出来、顕微内視鏡の有用性を示した。

第4章ではコウモリを被験体とした光学計測方法を確立するためにカルシウムイメージングを行った。マウスで確立した実験手順をコウモリに応用した結果、コウモリにおいてもマウス同様にカルシウムイメージングが可能であることを示した。

第5章では顕微内視鏡の光学計測の時間分解能の向上を試み、時間解像度を上げることに成功している。この高速スキャン方法を用いて、コウモリの光学計測及び電気生理計測を行い、カルシウム応答のより詳細な時間変化を確認している。

第6章では高速スキャンを用いてコウモリ下丘における擬以パルス・エコー音に対する聴覚応答を光学的・電気生理学的に記録した。この結果より、カルシウム応答単体ではエコーロケーション時における応答を空間的に記録することは困難であることが示された。

このように本論文では、光学計測と電気生理学的計測を同時に行うことが可能な顕微内視鏡の開発利用についての研究を行い、新たな顕微内視鏡を使った手法は、従来では計測が困難であった脳深部での計測が可能であることを示した。また、光学計測の時間分解能を向上させることで同時計測した電気生理学的応答との比較を可能にした。しかし、カルシウムイメージングではコウモリのエコーロケーション時における脳神経活動を計測することが困難であるということが判明した。このように脳神経回路の解明は困難であったが、本顕微内視鏡は脳神経科学の分野において一定の有用性があり、将来的に脳神経ネットワークの解明につながることを期待されることを示した。

よって、本論文は、博士（工学）（同志社大学）の学位論文として十分な価値を有するものと認められる。

総合試験結果の要旨

2018年2月14日

論文題目： A Study on the Development and Utilization of a Micro-Endoscopic System for Functional Assessment of Neural Circuits in Deep Brain Regions

(脳深部における脳神経回路機能評価のための顕微内視鏡の開発利用に関する研究)

学位申請者： 八代 英敬

審査委員：

主査： 生命医科学研究科 教授 太田 哲男

副査： 生命医科学研究科 教授 飛龍 志津子

副査： 生命医科学研究科 准教授 小林 耕太

要 旨：

本論文提出者は、2009年4月生命医科学部入学の後、2013年4月本学大学院生命医科学研究科博士課程（前期課程）に進学、さらに2015年4月より博士課程（後期課程）に在学しており、同時に日本学術振興会特別研究員に選ばれている。各年度において優れた研究成果を挙げ、英語の語学試験に合格し十分な能力を有すると認定されている。また、「生物情報学深論」「プロジェクト特別演習B」の2科目4単位を修得しており、これまでの特殊研究を履修している。

論文の主たる内容は、Neuroscience Research に公表（2017年）している。さらに、多くの国際会議に加えて国内学会にも積極的に参加し、高い評価を得ている。

2018年1月13日午後1時より約1時間30分にわたり提出論文に関する学術講演会（博士論文公聴会）が開催され、種々の質疑討論がなされたが、提出者の説明により十分な理解が得られた。

さらに講演会終了後、審査委員により論文内容ならびにこれらに関連する諸問題について口頭試問を実施した結果、本論文提出者は研究者として十分な学力を有することが認められた。

よって、総合試験の結果は合格であると認める。

博士學位論文要旨

論文題目：A Study on the Development and Utilization of a Micro-Endoscopic System for Functional Assessment of Neural Circuits in Deep Brain Regions
(脳深部における脳神経回路機能評価のための顕微内視鏡の開発利用に関する研究)

氏 名： 八代 英敬

要 旨：

光学計測によって複数の脳神経細胞を同時に記録することは脳神経ネットワークの解明には不可欠である。しかし、従来の蛍光顕微鏡では脳深部での生体計測を行うことが困難であり、多光子励起顕微鏡でも脳表から 1 mm 程度の深さまでの計測が限度であった。近年では、多光子励起顕微鏡と光ファイバー束や屈折率分布型レンズを組み合わせることで内視鏡のように脳内に挿入することで脳深部での光学計測を行うことが可能になってきている。しかし、光学計測の時間分解能は限られているため、これらの手法では聴覚応答のような数ミリ秒の間に起こる神経活動のつながりを記録することが困難であった。そこで、我々のグループは光学計測の時間分解能の低さを補うために、光学計測と同時に電気活動記録を可能にする顕微内視鏡を開発した。本研究では顕微内視鏡を使った聴覚応答の計測方法の確立を目指し、マウス・コウモリを被験体とした実験を行いながら、実験手法の改善を行った。

第 2 章では顕微内視鏡の構造についての詳細について述べた。顕微内視鏡はレーザースキャナと光ファイバー束を組み合わせた蛍光顕微鏡であり、光ファイバー束の一端を脳内に挿入し、反対側の端面をスキャンすることで脳深部のイメージングを可能にしている。光ファイバー束は直径が 215 μm で、3,000 本の光ファイバーが束になったものと直径が 300 μm で 6000 本の光ファイバーが束になったものを使用した。脳内に挿入する端面は侵襲性を低減するために円錐型に研磨した。顕微内視鏡を用いた光学計測はカルシウム感受性蛍光色素を注入したマウスを被験体として行った。顕微内視鏡で計測した生体内画像と脳切片を作成して蛍光顕微鏡で計測した生体外画像を比較した結果、顕微内視鏡での画像は最低限の空間分解能があることが示せた。また、ファイバー先端部を円錐型に加工しているため、取得する内視鏡画像での空間的な歪みを確認した。細胞体に蛍光タンパクが遺伝子改変マウスを被験体として計測深度を 50 μm ずつ変化させて計測を行った。その結果、円錐状の面に対して近くにいる細胞に関しては空間的な関係性を保持できている一方で、反対側の面にある細胞との関係については保持されていなかったが、それぞれの細胞体を識別することが十分に可能であることを示した。

第 3 章では顕微内視鏡を用いて聴覚応答を光学的・電気生理学的に計測するために、マウス下丘からの神経活動を顕微内視鏡で計測した。内視鏡部である光ファイバー束先端を金コートと絶縁コートを行うことで電極として使用できるように加工し、光学計測と同時に電気生理学計測を行えるようにした。マウス下丘において、白色雑音 (WN 音) と周波数定常音 (CF 音) に対する聴覚応答を計測し、それぞれの音刺激に対する電気生理学的応答 (局所フィールド電位、マルチユニット神経活動電位) とカルシウム蛍光変化の音圧依存変化を比較した。カルシウム蛍光変化では、蛍光変化の強い部位が点在して確認され、細胞体が染色されていた訳ではないので細胞体であるとは断定できないが、それらの大きさは下丘ニューロンの大きさに対応した大きさだった。また、計測深度を変化させて、カルシウム応答の周波数依存性を確認した。その結果、マウス下丘で報告されている脳表付近は低周波の音刺激に特異的に応答し、脳深部になるにつれてより高周波の音刺激に特異的に応答するという下丘の周波数再現構造に即したカルシウム蛍光変

化を計測することが出来た。先述のように、本章での研究で顕微内視鏡の有用性を示した。

第4章ではコウモリを被験体とした光学計測方法を確立するためにカルシウムイメージングを行った。マウスで確立した実験手順をコウモリに応用して顕微内視鏡での光学計測実験を行った。**Short-tailed fruit bat** を被験体として計測を行い、WN 音と周波数変調音 (FM 音) に対する聴覚応答の蛍光変化を記録した。音刺激の種類によって音圧依存変化が異なっており、WN 音に対する応答は 60 dB が最大である一方で、FM 音に対する応答は 90 dB が最大であった。また、コウモリでもマウスと同様にニューロンのサイズに対応する蛍光変化の強い部位が点在しており、それぞれの音刺激に対するカルシウム応答の音圧依存変化を調べた。結果、視野全体での平均値の音圧依存変化と、各部位での音圧依存変化の概形は同じであるが、場所毎に応答が強い音圧が異なることがわかった。この研究により、コウモリにおいてもマウス同様にカルシウムイメージングが可能であることを示した。

第5章では顕微内視鏡の光学計測の時間分解能の向上を試みた。顕微内視鏡はレーザースキャン型の顕微鏡を使っており、1つの画像をスキャンするために 53 ms かかっていた。そこで、スキャンする範囲を制限することでスキャンにかかる時間の短縮を図った。結果として、スキャン部分を1ライン分にすることで 7,550 lines/sec にまで時間解像度を上げることが出来た。この高速スキャン方法を用いて、2種のコウモリ (**big brown bat**, **short-tailed fruit bat**) を被験体として光学計測及び電気生理計測を行った。WN 音、二種類の FM 音、そして CF 音を音刺激として使用し、音刺激の音圧と時間長を変化させてカルシウム応答を記録した。その結果、音刺激の長さを変化させることで、カルシウム変化の最大値までの潜時が音刺激の長さに対応して変わることがわかった。また、音刺激の長さを一定にして音圧レベルを変化させると、ピーク潜時はほとんど変化がなく、カルシウム応答の立ち上がりが変化することがわかった。このように、高速スキャンによってカルシウム応答のより詳細な時間変化が確認できた。さらに、高速スキャンでは空間分解能を犠牲にして、時間分解能を向上させているが、高速スキャンで記録したカルシウム応答でも、1スキャンライン上内でも空間的なカルシウム応答の違いが見られた。また、これらのカルシウム応答を同時記録した電気生理学的応答 (LFP、MUA) と比較した。ピーク潜時は **electrical activities** とカルシウム応答では大きく異なった (> 60 ms)。しかし、これらの相関関係を調べると LFP と MUA、そして LFP と $\Delta F/F$ にそれぞれ正の相関が見られた。そのため、**electrical activities** とカルシウム応答は単純比較が出来ないものの、同時記録によってこれらの関係性を解明することができると期待される。以上のように、光学応答と電気生理学的応答を組み合わせることによって脳神経ネットワークの解明につなげられると考える。

第6章では高速スキャンを用いてコウモリ下丘における擬似パルス・エコー音に対する聴覚応答を光学的・電気生理学的に記録した。**Big brown bat** を被験体として計測を行い、コウモリがエコーロケーション時に使用する FM 音を模擬したパルス音とパルス音を減衰させたエコー音を音刺激として使用した。パルス音とエコー音の時間差・エコー音の数を変化させ、聴覚応答の蛍光変化と電気生理学的応答を記録した。LFP、MUA ではパルス・エコー音にそれぞれ対応した応答が確認できた。一方で、カルシウム応答はエコー数が増えるにつれて応答が大きくなったが、それぞれの音に対して分離した応答は見られなかった。そこで、パルス・エコー音の時間間隔を 5 - 100 ms まで 5 ms ずつ延ばしていき、時間差がどれだけあればカルシウム応答が分離されるかを確認した。その結果、時間間隔がおおよそ 70 ms 以上であればカルシウム応答は分離されるが、時間間隔がそれより短い場合は分離されていないことが確認された。この結果より、カルシウム応答単体ではエコーロケーション時における応答を空間的に記録することは困難である可能性が示された。

第7章では、これまでの研究を総括し、今後の展望について述べた。本論文では、光学計測と電気生理学的計測を同時に行うことが可能な顕微内視鏡の開発利用についての研究を行ってきた。我々の顕微内視鏡を使った手法は、従来では計測が困難であった脳深部での計測を可能にし

た。また、光学計測の時間分解能を向上させることで同時計測した電気生理学的応答との比較を可能にした。しかし、コウモリを使った実験ではこれらの応答は時間スケールが大きく異なっており、カルシウムイメージングではコウモリのエコーロケーション時における脳神経活動を計測することが困難であるということが判明した。しかし、本研究での脳神経回路の解明は困難であったが、我々の顕微内視鏡は脳神経科学の分野において一定の有用性があることを示せた。今後、カルシウム応答ではなくウィルスを使った蛍光タンパクの導入や、電位依存性蛍光色素等を使った研究が必要であるが、将来的に脳神経ネットワークの解明につながると考えられる。