

# 膜電位光学計測法による昆虫 匂い情報処理系の研究

岡田 公太郎

第 1 章 序論	4
1.1 本研究の背景と目的	5
1.2 本研究の概要と意義	7
第 2 章 膜電位イメージング手法の確立	8
2.1 膜電位イメージングの原理	9
2.2 実験材料	13
2.2.1 昆虫の嗅覚系 1 次中枢	13
2.2.2 計測に用いた昆虫	18
2.3 膜電位イメージングのための基礎的研究	22
2.3.1 励起光の光源	22
2.3.2 膜電位感受性色素の選択	23
2.3.3 光学フィルタ	25
2.3.4 光学系	26
2.3.5 受光デバイス	27
2.3.6 膜電位感受性色素の濃度	31
2.3.7 膜電位感受性色素の毒性の評価	32
2.3.8 内因性信号の評価	35
2.3.9 電気刺激によるアーチファクトの評価	38
2.4 膜電位イメージングシステム	43
2.4.1 計測装置	43
2.4.2 刺激装置	48
2.4.3 信号処理	50
2.5 膜電位イメージング手法の評価	61
第 3 章 膜電位イメージングの昆虫神経系への適用	66

3.1	匂い刺激により励起される触角葉振動応答の研究 .....	67
3.1.1	触角葉での匂い刺激に対する膜電位応答 .....	67
3.1.2	匂いに励起される振動応答の存在 .....	67
3.2	カイコガ触角葉におけるセロトニン	
	神経活動修飾効果の可視化 .....	73
3.2.1	触角葉におけるセロトニンの効果 .....	73
3.2.2	実験方法および前提条件の確認 .....	73
3.2.3	セロトニンの触角葉における薬理効果 .....	76
3.2.4	セロトニンによる神経応答持続時間と 応答領域の局在性 .....	78
第4章	結論 .....	82
参考文献	.....	85
発表文献	.....	93
謝辞	.....	99

# 第 1 章

## 序論



## 1.1 本研究の背景と目的

### (1) 背景

生体の神経系の活動を直接観察する手法の一つに膜電位感受性色素による神経膜電位イメージングがある。膜電位イメージングは 1968 年に LB. Cohen らと、I. Tasaki, A. Watanabe らが独立に膜電位感受性色素の蛍光変化が膜電位変化を反映していることを報告して以来 [1, 2], 脊椎・無脊椎動物の神経系に適用されている [3 - 17].

方法は、計測対象神経を膜電位感受性色素により染色し、それに励起光を照射することで、膜電位感受性色素を励起し、発する蛍光を受光デバイスで受光することで行われる。膜電位感受性色素は 2 種類に大別され、それぞれ **Fast response dye** と **Slow response dye** と呼ばれる。**Fast response dye** では膜電位の変化に対する蛍光変化の時定数は  $5\text{--}3\ \mu\text{s}$  程度であることが実測されており、神経応答速度（ミリ秒）から考えて十分な即応性を持つ。一方 **Slow response dye** は応答の時定数は  $1\text{ s}$  程度と遅いが、 $1\ \text{mV}$  の膜電位の変化に対し 1% 程度の大きな蛍光変化を示す。

本論文では神経膜電位応答の直接イメージングを目指すため、**Fast response dye** のみを用いる。以後、膜電位感受性色素とは **Fast response dye** を示すものとする。

膜電位の変化に対する膜電位感受性色素の蛍光変化量は小さく、 $100\ \text{mV}$  の膜電位変化に対し膜電位感受性色素の蛍光強度は 0.1% 程度変化するに過ぎない。さらに、膜電位はミリ秒のオーダーで変化する現象であるため、ミリ秒で高速撮影する必要がある。微弱な蛍光をミリ秒オーダーで記録し、そこから蛍光強度の  $1/1000$  程度の信号を抽出するのが膜電位感受性色素によるイメージングであり、イメージングがノイズとの戦いといわれる由縁である。

昆虫の匂い処理一次中枢である触角葉は脊椎動物の嗅球に相当する器官である。両者とも糸球体構造を持ち、また、嗅受容細胞、局所所在神経、上位中枢への出力神経より構成されている。これらを元に両者の匂い情報処理の基本ロジックの共通性が示唆されている[18]。しかし、昆虫の触角葉は脊椎動物の嗅球に比べはるかに小規模なシステムであり、たとえば糸球体の数ではラット約 3,000 に対しカイコガ 57 個程度である[19]。さらに昆虫触角葉では細胞内記録法による *in vivo* での単一細胞の匂いに対する応答の膨大な報告がある[20 - 57]。小規模な系であり、かつ膨大な細胞内電位記録があることから、昆虫の触角葉は系の把握のためのモデルとして有効である。

嗅球および、触角葉で匂い刺激時に神経活動として、膜電位の振動現象が報告されている[58 - 70]。膜電位の振動現象は、(1) 上位脳の匂い情報処理の前処理、(2) セルアッセンブルコーディングによるもの、(3) 匂いのファインチューニングに使用されている、等の仮説、示唆が報告されている。また、振動という特徴的な応答は神経ネットワークの構成を考える上で大き

な助けとなりうる。振動の生成メカニズム（生成回路）を明確化することは、系全体の機能を考える上での大きな手がかりを与える。現在までの嗅球および触角葉の振動現象の報告は電極による生理学実験的手法によるものであり、振動の空間的な情報は得られていない。神経ネットワークの振動系は多くの神経ネットワークの研究者によりよく研究されている。しかし、電気生理学的手法、組織学的手法では神経応答の時空間的応答の把握が難しいため、高速かつ高空間分解能での膜電位のイメージングに大きな期待が寄せられている。

## (2)目的

昆虫の嗅覚系 1 次中枢は脊椎動物の嗅覚系 1 次中枢と構造上の共通性が見られることより [18], 昆虫, 脊椎動物を問わず, 共通の匂い処理原理で機能していると考えられている。昆虫の嗅覚系システムは脊椎動物の嗅覚系に比べ非常に少ない神経により構成されており, 嗅覚系の機能を研究するには適した材料であると考えられる。しかしながら本研究以前に昆虫の神経系に対し膜電位感受性色素を用いた膜電位イメージングの報告はない。膜電位イメージングの成功の鍵は受光デバイスの 1 ピクセルが受光する膜電位感受性色素の膜電位に依存する蛍光の強度をいかに大きくするかにかかっている。脊椎動物での膜電位イメージングの場合, 通常 1 ピクセルがカバーする神経組織に含まれる神経の個数は 1000 個以上 [17] となるようにシステムを設定する。これにより, 1 ピクセルの膜電位感受性色素の蛍光は 1000 個以上の神経信号の合算値となるため, 神経活動信号は大きな値を容易にとりうる。一方, 膜電位イメージングが広く適用されている他の動物として, アメフラシなどの軟体動物がある。軟体動物の神経系の場合, 細胞体の体積が大きく (アメフラシの R2 細胞では細胞体の直径が約 2mm), 受光デバイスの 1 ピクセルがカバーする領域が 1 細胞より小さい。このため, 神経細胞に結合している膜電位感受性色素のみの蛍光を受光可能である (昆虫, 脊椎動物のイメージングにおいては神経細胞を保持する骨格細胞 (グリア細胞) も膜電位感受性色素で染色されるため, 受光デバイスの 1 ピクセルの受光する蛍光は神経細胞由来の蛍光と神経活動によって変化しないグリア細胞由来の蛍光の合成となる)。このような状況下で得られる信号は神経活動由来の成分のみであるため, 計測にとって有利である [15,16]。昆虫の神経系は組織の大きさ, 神経の大きさともに脊椎動物と軟体動物の中間に位置する。すなわち嗅覚系 1 次中枢の触角葉で膜電位イメージングを行う場合, 標準的なシステムでは受光デバイスの 1 ピクセルが含む神経の個数が数十個であると推定される。このため, 脊椎動物でのイメージングのように多数の神経の同期した活動を 1 ピクセルで得ることにより生じる信号強度の加算による増大効果は少なく, また, 受光デバイスの 1 ピクセルが受光する膜電位感受性色素の蛍光はグリア細胞由来の蛍光を含むため軟体動物に比べ信号雑音比が低い。

本研究の目的は中枢神経系での匂い情報処理機能の解明に適している昆虫神経系で時空間的

に神経活動を記録する手法である膜電位イメージングを成功させることである。

## **1.2 本研究の概要と意義**

本論文は以下の項目に付き成果として報告する。

### **(1) 膜電位イメージング法の手法の確立**

膜電位イメージング法は神経活動を可視化し、時空間的に神経の電氣的活動を観察することを可能とする手法である。本手法は脊椎動物、軟体動物で広く応用されている。

しかしながら、昆虫の神経系での電位感受性色素を用いた膜電位イメージングの報告は今までになく、本研究が最初の成功報告例となった[71 - 73]。脊椎動物では記録視野に対し神経密度が高いため、また軟体動物では神経細胞自体が大きいことから神経に結合した膜電位感受性色素分子からのみの蛍光を受光できる領域が大きいことにより、脊椎、軟体動物いずれも膜電位イメージングには有利な計測対象であると考えられる。しかしながら昆虫においては、神経細胞の記録視野に対して神経密度が脊椎動物に比較して小さく、また軟体動物に比較して神経細胞の大きさも小さいことから、膜電位イメージングには不利な対象である。

このような実験対象を用い膜電位イメージングを始めて成功させた手法を報告する。

### **(2) 膜電位イメージングによる昆虫神経系の解明**

確立した膜電位イメージング手法を用い、昆虫の神経系のうち、主に匂い処理一次中枢である触角葉の刺激に対する応答の計測結果、ならびに解析結果を示す。

具体的には触角を匂い刺激するとき触角葉で発生する振動応答の可視化、および生体アミンの1種であるセロトニンの触角神経に及ぼす信号修飾効果の可視化を示す。

本研究の意義は、神経応答を時空間的に高分解能で記録できる非常に強力手法である膜電位イメージング法を昆虫神経系において適用可能であることを明らかにしたことである。手法の有効性を示す例として、匂い刺激時に触角葉で発生する膜電位の振動現象を時空間的に評価した結果を示した。また、触角葉内に存在することが確認されている生体アミンであるセロトニンは行動学的知見より匂いの濃度に対する行動発現の閾値を変化させることが知られている。このセロトニンの触角葉における時空間的な効果を膜電位イメージングにより明らかにした。

## 第 2 章

# 膜電位イメージング手法の確立

## 2.1 膜電位イメージングの原理

膜電位感受性色素の電位感受性の発生原理は現在の所確定はしていない。しかし、現在、最も確からしいと考えられているモデルを紹介する [74]。

膜電位感受性色素は神経の脂質二重膜上に色素の疎水基を進入させた状態で結合する。この際膜電位感受性色素分子は2種類の状態をとる。第1の状態は2つの膜電位感受性色素分子が互いに結合した状態（ダイマ）を形成しているものであり、第2の状態は膜電位感受性色素分子が単独で存在している状態（モノマ）である。モノマ、ダイマは平衡状態を形成する。膜電位の変化により、平衡がモノマの方向へ移行するとともに分子に構造変化が発生する。このことにより、膜電位感受性色素分子の量子収率が変化し、結果として蛍光強度が変化すると考えられる（図 2.1-1）。

膜電位感受性色素の相対蛍光変化量（神経が活動していない状態での膜電位感受性色素の蛍光強度に対する、神経活動による膜電位感受性色素の蛍光変化量の割合）は膜電位変化に比例する（図 2.1-2）。そのため、膜電位感受性色素の蛍光を時系列データとして計測することで、膜電位の時間変化を観察することが可能である。

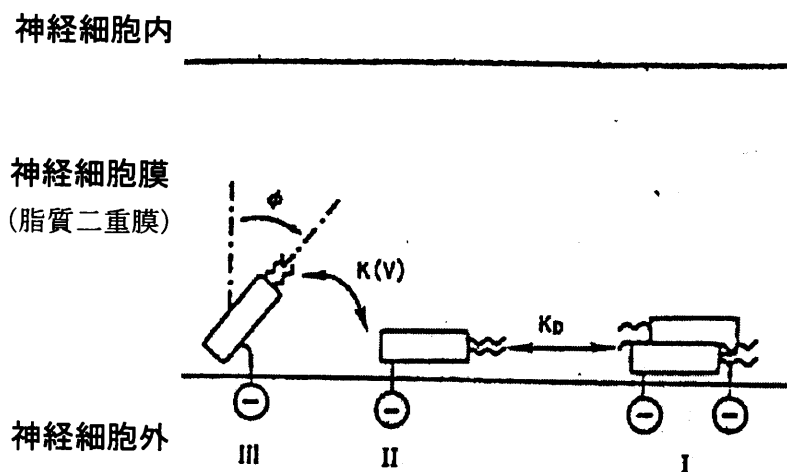


図 2.1-1 膜電位感受性色素の電位依存蛍光変化原理

膜電位感受性色素分子は神経が活動していない状態ではダイマの状態 (I) とモノマの状態 (II) を取り、両者はある解離速度定数  $K_d$  で平衡に達している。神経活動が発生し、膜電位の変化が発生すると状態 I から状態 II に平衡が移動し、かつ状態 II の分子はその分子構造を変化させる（状態 III）。これにより、膜電位感受性色素の量子効率が変化し、蛍光強度が変化する。参考文献[74]より引用。

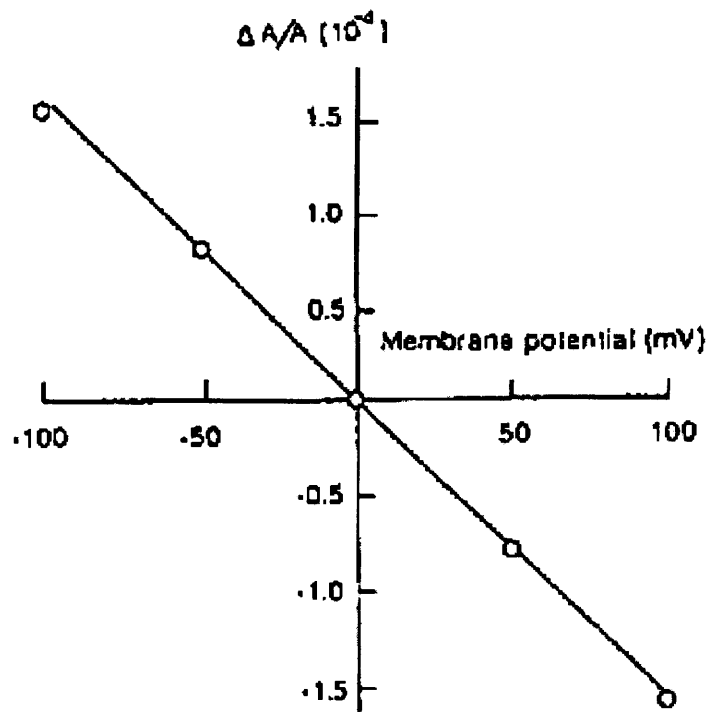


図 2.1-2 神経膜電位・膜電位感受性色素相対蛍光変化量 ( $\Delta A/A$ ) の関係

膜電位に対し膜電位感受性色素の相対蛍光変化量は神経活動の発生する膜電位変化領域 ( $-100 \text{ mV}$  から  $+100 \text{ mV}$ ) で線形である。膜電位感受性色素開発段階で  $-100 \text{ mV}$  から  $+100 \text{ mV}$  の範囲で相対蛍光変化量が非線形を示すものは膜電位感受性色素として不適とみなされ採用されないことより、現在使用されている全ての膜電位感受性色素は膜電位に対する相対蛍光変化量の線形性が保障されている。参考文献[75]から引用。

計測にあたっては膜電位感受性色素の蛍光強度の変化を高感度、高速記録可能な受光デバイスで受光することで、神経細胞の膜電位の変化を時空間的に測定する (図 2.1-3)。

膜電位感受性色素の蛍光変化量は神経活動がない状態での蛍光強度 ( $F_0$ ) に対し、神経活動により  $1-0.1\%$  程度変化する。(図 2.1-4)。

ノイズ源として、ショットノイズが主である場合、信号ノイズ比は受光デバイスが受光する蛍光強度の  $1/2$  乗の比例する。このことより、ノイズの低減化のため明るい光学系 (対物レンズの開口径数、光学フィルタの透過率) を用いることが重要である。また、受光デバイスの得る光量は同開口径数の対物レンズの場合、倍率の逆  $2$  乗に比例するため、一定の信号ノイズ比を得る

ためには倍率に上限が存在する。

生体の膜電位感受性色素の染色は、色素により異なる効果限界濃度が存在する。効果限界濃度以下では膜電位感受性色素の蛍光強度は組織単位面積当たりのバインドしている膜電位感受性色素濃度に比例するが、限界濃度を超過すると膜電位感受性色素濃度を高濃度にしても、蛍光強度の増加はあまり望めない。さらに、生体に対する膜電位感受性色素の毒性の問題があり、計測対象に対し毒性の評価を行った上で総合的に膜電位感受性色素の適用濃度を決定する必要がある。

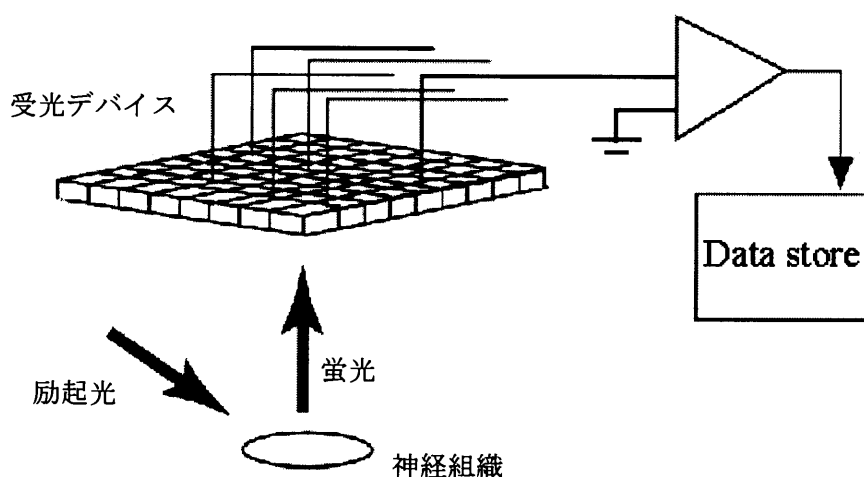


図 2.1-3 膜電位イメージングの計測システム概略図

信号ノイズ比を高める方法として、励起光強度を高める方法がある。蛍光強度は励起光強度に比例するため、使用する膜電位感受性色素を効率よく励起できる波長での強力な光源を用いることは効果的である。しかし、膜電位感受性色素の信号は 1.0-0.1% 程度の変化であるため、光源の安定性はこれより一桁以上高いものが必要である。励起光が計測に与える問題点は (1) 計測対象組織のフォトダメージ (2) 膜電位感受性色素の強退色 (3) 生理食塩水の熱対流による計測対象組織の動き (4) 組織の熱上昇による膜電位感受性色素の量子収率の変化が挙げられる。これらを考慮したうえでの使用光源の選択が必要となる。

さらに信号ノイズ比を高くするための方法として、ノイズ特性がホワイトノイズと見なすことができる場合は、信号を加算平均すること、1 フレームの露光時間を長大化することが考えられる。この時信号ノイズ比は加算平均回数の  $1/2$  乗に比例し、露光時間に対しても  $1/2$  乗に比例する。測定にあたっては、測定対象の応答時間特性、定常性等を考慮し、これらの方法を検討

する必要がある。

著者はこれらの条件を検討した結果、膜電位感受性色素 **RH414** に対し、対物レンズ **20 倍**、開口数 **0.75**、励起フィルタ **535±25 nm**、蛍光フィルタ **615 nm** ハイパス、直流ドライブメタルハライドランプ **750 W**（光量安定性 **0.008%**）、受光デバイス空間分解能 **128x128** ピクセルの観測系を開発し、本研究では主にこれを使用した。

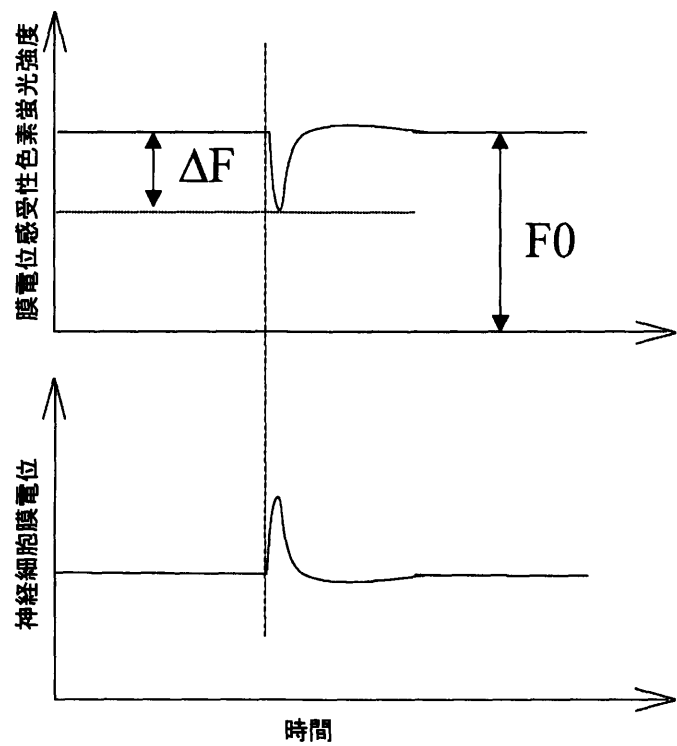


図 2.1-4 膜電位感受性色素の膜電位変化に対する蛍光変化

膜電位感受性色素の蛍光変化量は神経細胞の活動電位変化に比例する。活動電位の変化に対する膜電位感受性色素の蛍光強度変化の遅れ時間は **5・3 μs** であることが実測により確かめられている。蛍光強度の変化量  $\Delta F/F_0$  は **1/100** から **1/1000** の値である。



## 2.2 実験材料

### 2.2.1 昆虫の嗅覚系 1 次中枢

昆虫の嗅覚系 1 次中枢である触角葉の構造および構成神経を示以下に示す。触角葉は昆虫の脳の中央に座し、左右に 1 対存在する (図 2.2.1-1)。触角葉は触角からの触角神経束 (Antennal nerve, AN) が入力する。

触角葉は中大脳の大部分を占め、グリア細胞で縁取られた卵形の糸球体とよばれる多数のニューロピル(neuropile)からなる (図 2.2.1-1)。ちょうどブドウの房のような構造である。触角葉の中心部は、比較的太い神経線維からなり、糸球体構造はない。糸球体では触角からの入力神経と、局所介在神経、および出力神経がシナプスを形成する (図 2.2.1-2)。糸球体の数に関しては、各触角葉にカイコガで約 56、タバコスズメガ約 66、アゲハチョウ約 60、ショウジョウバエ約 43、ミツバチ約 166 が報告されている。個々の糸球体はその空間位置、サイズから多くは同定可能である。一般の昆虫では触角葉においてこのような共通した構造をもつものの、バッタでは約 1000 もの小さな糸球体から構成され、個々の糸球体を同定することはできず、異なった構造的特徴をもつ (図 2.2.1-3)。

性フェロモンを配偶行動の重要なコミュニケーション物質として利用する鱗翅目昆虫などでは、雄のみに大糸球体 (macroglomerular complex, MGC) といわれる巨大な糸球体をもつ。大糸球体は通常触角葉の最も背側領域に 1 つ存在し、顕著な性的二形性を示す (図 2.2.1-4)。大糸球体に対し、通常の糸球体を常糸球体(ordinary glomerulus, G)という。雄カイコガの場合、常糸球体の直径は約 50 $\mu$ m であるのに対し、大糸球体の直径は約 150 $\mu$ m である。大糸球体は複数のニューロピルからなるコンパートメント構造の集合体である (図 2.2.1-4)。性フェロモンは通常複数成分からなるが、それぞれのコンパートメントが性フェロモンの構成成分の信号処理に対応すると考えられている。カイコガやタバコスズメガでは大糸球体は cumulus, toroid, horseshoe と呼ばれる 3 つのコンパートメントから構成される。タバコスズメガでは、性フェロモンの主成分に応答する嗅受容細胞は toroid に、副成分に応答する嗅受容細胞は cumulus に投射する。また、最近雌のタバコスズメガにおいて、雌特有の糸球体も存在し、ある特有のにおい物質 (宿主植物のにおい成分) に応答する嗅受容細胞の軸索が投射することが報告されている。

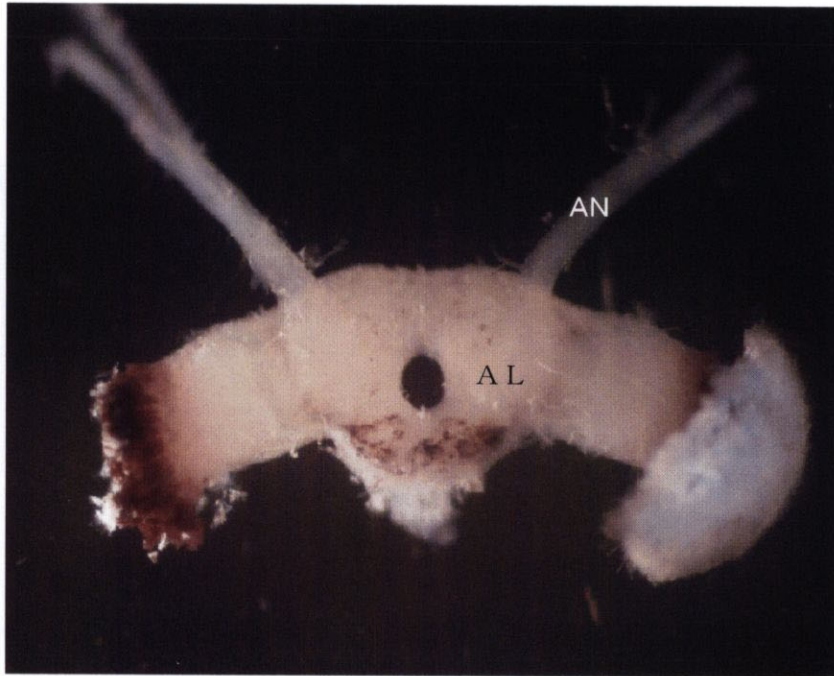
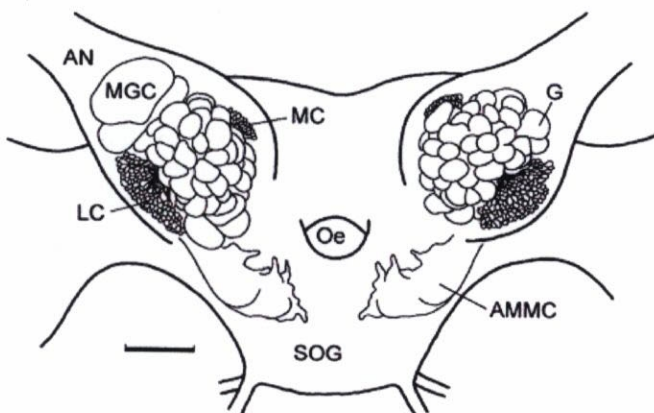
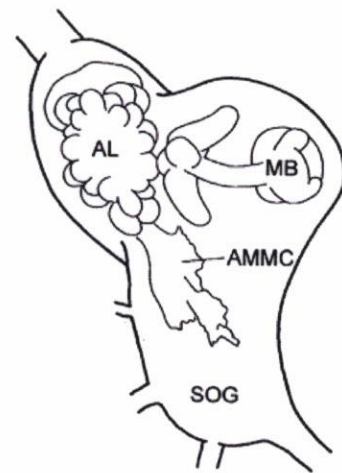
**A****B****C**

図 2.2.1-1 昆虫の脳（カイコガ）の概観および触角葉の構造.

カイコガの脳(A)および触角葉(AL)の正面(B), 側面(C)の模式図. MGC 大糸球体, AMMC 機械感覚運動中枢, AN 触角神経, G 常糸球体, LC, MC 触角葉神経の細胞体群, MB キノコ体, Oe 食道, SOG 食道下神経節. スケールバー: 200 $\mu$ m. B, C は参考文献[76]より引用.

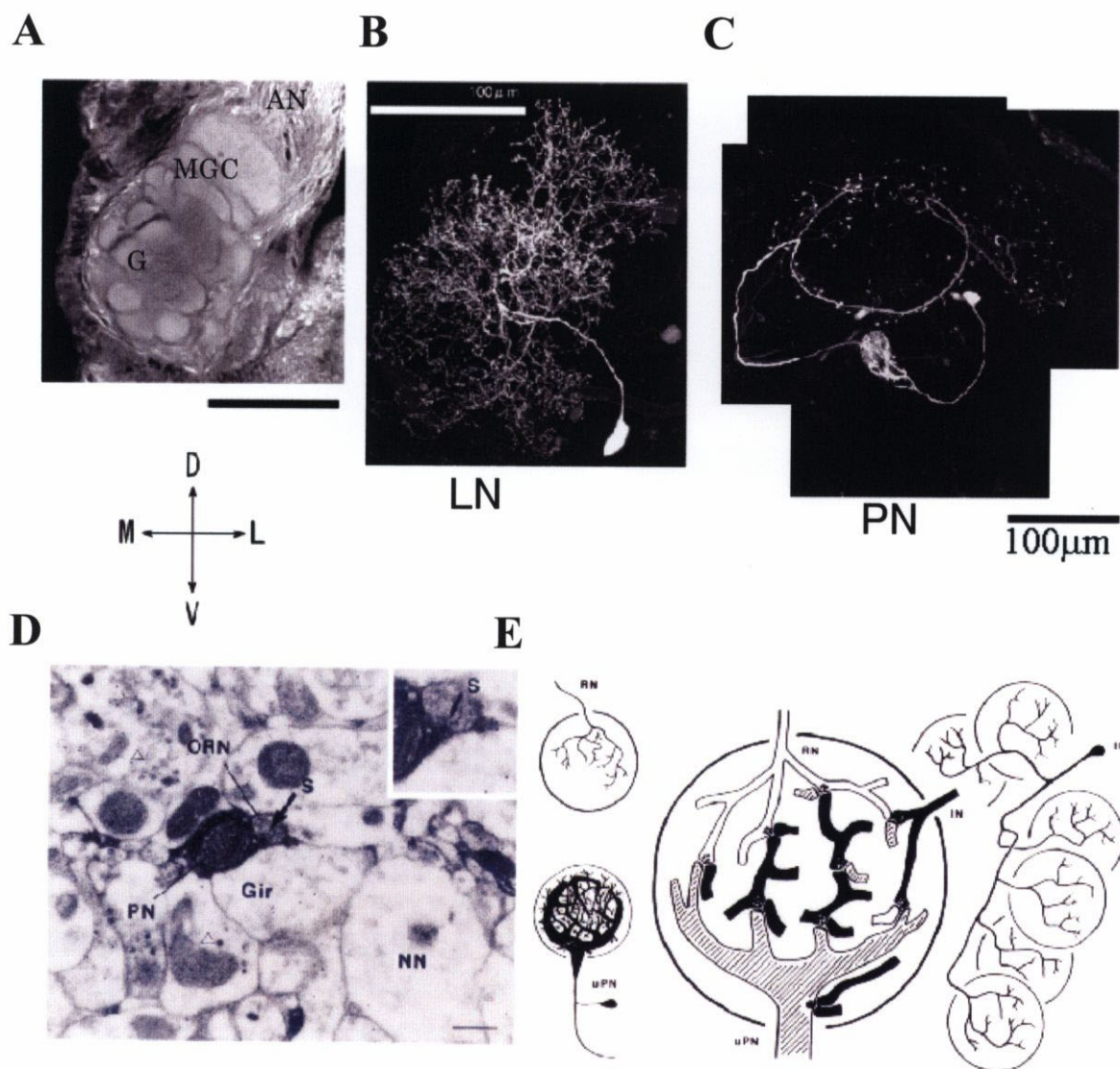


図 2.2.1-2 触角葉構成神経およびその結合様式

A:カイコガ触角葉共焦点顕微鏡画像. D 背側, L 側方, M 中心側, V 胸側. B:カイコガ触角葉局所介在神経 (LN). C:カイコガ常系球体出力神経 (PN). D:ゴキブリ糸球体免疫電子顕微鏡標本. E:糸球体シナプスコネクション模式図. Gir:GABA 免疫反応性神経 (局所介在神経), NN:非免疫反応性神経, ORN:嗅受容細胞, PN:出力神経, s:シナプス. D, E は文献[77]より引用.

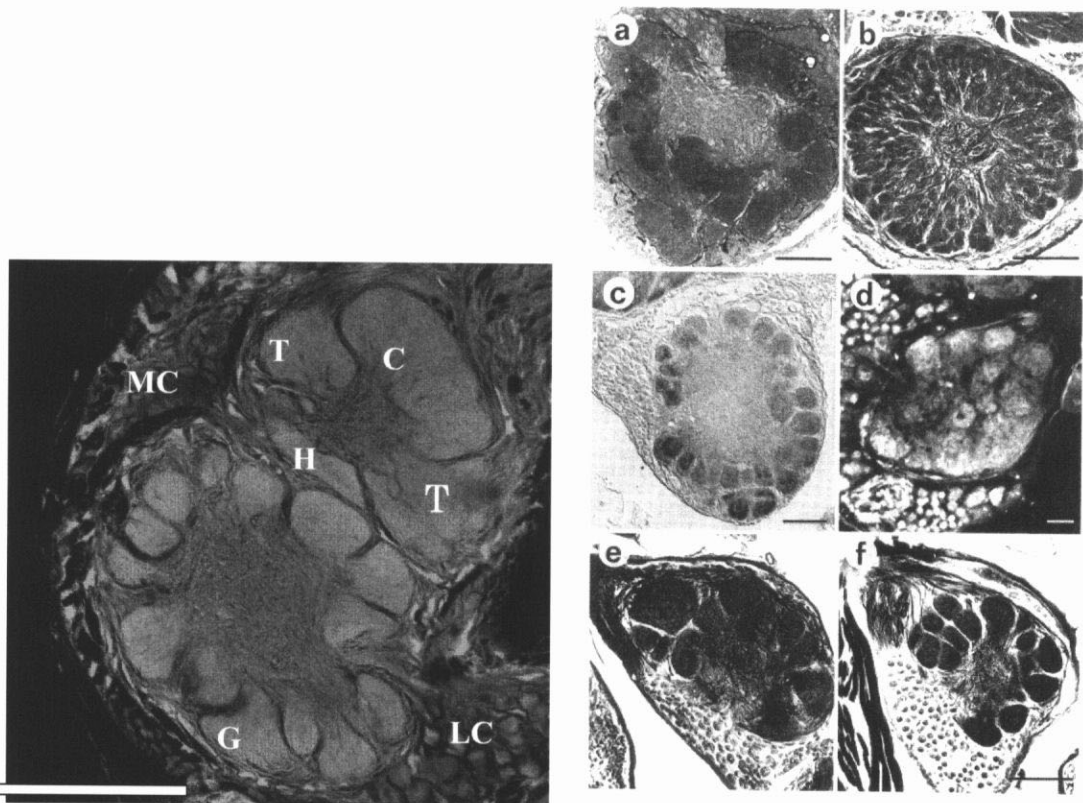


図 2.2.1-3 糸球体の構造. (左) 雄カイコガの触角葉は1つの大糸球体(MGC)と多数の常糸球体(Gs)からなる. 大糸球体は cumulus(C), toroid(T), horseshoe(H)の3つのコンパートメントから構成される. スケールバー: 100 $\mu$ m. (右) 各種昆虫の触角葉 a: ゴキブリ (*Leucophaea maderae*), b: バッタ (*Schistocerca gregaria*), c: ミツバチ (*Apis mellifera*), d: ショウジョウバエ (*Drosophila melanogaster*), e: ヤガ (*spodoptera littoralis*)雄, f: 同雌, スケールバー : 100 $\mu$ m (a, b, c, e, f), 10 $\mu$ m (d). 参考文献[78]より引用.

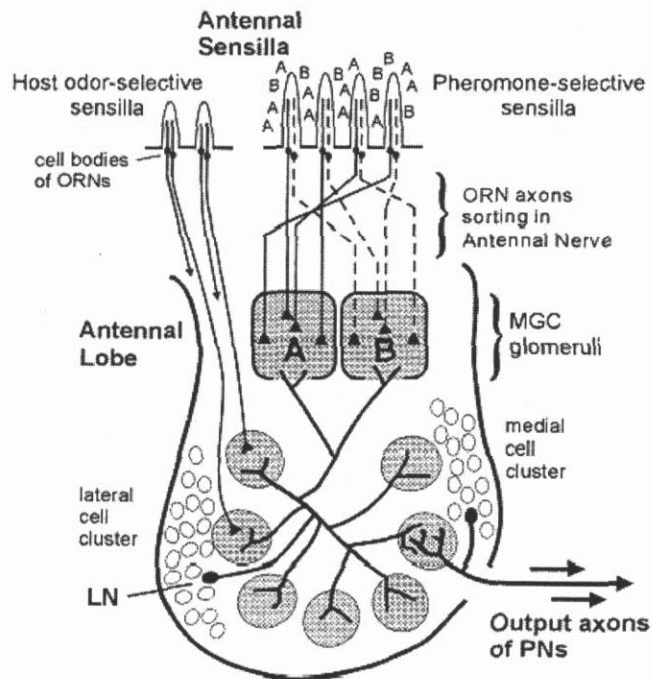


図 2.2.1-4 嗅受容細胞の触角葉への投射様式. 宿主植物などの一般臭を受容する嗅受容細胞の軸索は、常系球体に投射する. 性フェロモンを受容する嗅受容細胞は、大系球体に投射し、性フェロモンの構成成分(この図では、A, B)によって投射する大系球体のコンポーネント (A, B) が異なる. 各系球体内では、嗅受容細胞、局所介在神経 (LN)、出力神経 (PNs) がさまざまなシナプス結合を構成する. 文献[78]より引用.

触角葉を構成する神経細胞は、(1)入力神経である嗅受容細胞、(2)触角葉のみで分枝する局所介在神経、(3)触角葉から脳他領域への出力神経、および(4)前大脳からの触角葉への遠心性神経である(図 2.2.1-2). 嗅受容細胞の数は1万から10万(ショウジョウバエ、約1200; カイコガ、約4万; タバコスズメガ、約30万; ミツバチ、6万5千)である. これに対し局所介在神経の数は300から750(タバコスズメガ、約360; ミツバチ、約750), 出力神経の数は200から1000(タバコスズメガ、約900; ミツバチ、約1000)である. 各神経細胞の数の比から、嗅受容神経によって伝達されるにおい情報は触角葉で収斂され、におい情報は増幅されと考えられる. 事実、出力神経のにおい応答の閾値は嗅受容細胞よりも低いことが知られている.

### 2.2.2 計測に用いた昆虫

膜電位イメージングの実験対象として、微小電極を用いた細胞内記録法による触角葉匂い情報処理の膨大な先行研究のある事を理由に鱗翅目昆虫、特にエビガラスズメ、カイコガを選択した。これらの昆虫では性フェロモン処理系に関する研究が盛んに行われている。また、一般臭に対する触角葉の情報処理を調査するための対象として、マルハナバチを使用した。

#### ・エビガラスズメ

エビガラスズメ（図 2.2.2-1）は低温麻酔（4 度）後、頭部外骨格、複眼、筋肉を除去した。その後、触角葉の気管および神経鞘を鋭利なピンセットを用い除去した。膜電位感受性色素 RH414（Molecular Probe 社製、T-1111, アメリカ）を生理食塩水（NaCl 117 mM, KCl 15 mM, CaCl<sub>2</sub> 4 mM, MgCl<sub>2</sub> 1.8 mM, NaHCO<sub>3</sub> 8.0 mM, pH 7.5）に溶解し、3 mg/ml の濃度に調整した染色液中に脳を室温、1 時間放置することで染色した。染色後、膜電位感受性色素を十分に生理食塩水で洗浄し、実体顕微鏡下にセットした。

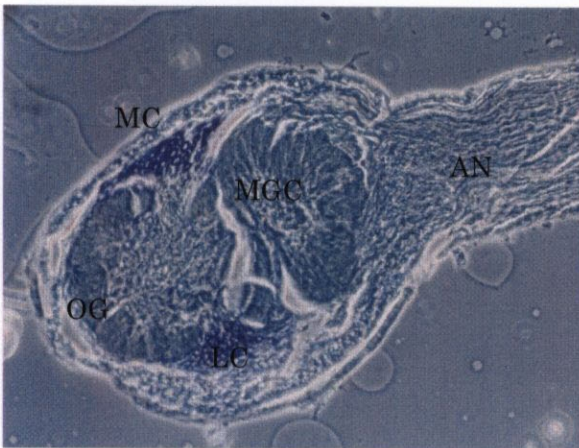
エビガラスズメを用いた実験は実体顕微鏡での測定系の評価のための実験であり、実体顕微鏡の対物レンズは十分な長さの焦点距離をもつことから、測定は脳を摘出せず、体に脳をつけたまま（頭部の解剖により脳を露出したのみの状態）での計測をおこなった。脳を摘出する測定法に比較して、本方法ではより自然に近い状態で昆虫神経系の神経活動が観察可能であると考えられる。



A



B



C

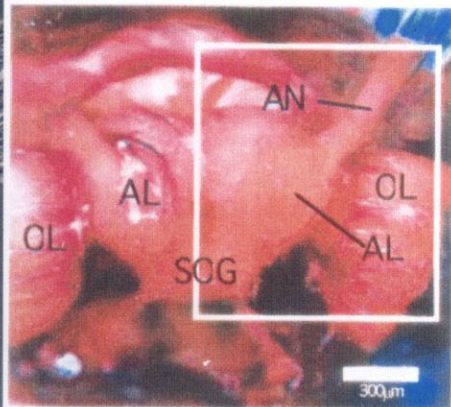


図 2.2.2-1 エビガラスズメ

A: エビガラスズメ成虫. B: 触角葉スライス画像. C: 膜電位感受性色素 RH414 により赤色に染色された脳. 白線四角が測定視野. AL; 触角葉, AN; 触角神経, LC; 側部神経細胞群, MC; 中心神経細胞群, MGC; 大糸球体, OG; 常糸球体, OL; 視葉, SOG; 食道下神経節.

・マルハナバチ

材料としてマルハナバチの働き蜂(図 2.2.2-2)を使用した。温度 4 度で 1 時間マルハナバチを低温麻酔し、触角、複眼を残し脳を摘出した。摘出した脳の触角葉部の神経鞘を鋭利なピンセットで取り去った後、色素の染色効率を向上させるため、マルハナバチ用生理食塩水に溶解させた 1%プロテアーゼ (Sigma社製, type XIV, Bacterial, アメリカ) で 4 分間室温で放置した。使用したマルハナバチ用生理食塩水の組成は, NaCl 130 mM, KCl 6 mM, CaCl<sub>2</sub> 5 mM, MgCl<sub>2</sub> 4 mM, pH 6.7 であった。

インキュベート後、プロテアーゼを生理食塩水で完全に洗浄し、その後膜電位感受性色素 RH414 3 mg/ml を脳に滴下し、温度 4 度で 15 から 30 分間放置することで神経組織を染色した。



図 2.2.2-2 マルハナバチ



・カイコガ

実験に使用したカイコガは、京ヤ株式会社より卵の状態で購入したものを飼育した。計測には羽化後 1 日から数日の雄カイコガ（図 2.2.2-3）を用いた。カイコガの頭部を切断し、頭部外骨格、複眼、筋肉を除去した。その後、触角葉の気管および神経鞘を鋭利なピンセットを用い除去した。膜電位感受性色素RH414 をカイコガ用生理食塩水 (NaCl 140 mM, KCl 5 mM, CaCl<sub>2</sub> 7 mM, MgCl<sub>2</sub> 1 mM, NaHCO<sub>3</sub> 4 mM, TES 5 mM, trehalose 5 mM, sucrose 100 mM, pH 7.5) に溶解し、3 mg/ml の濃度に調整した染色液中に脳を室温、5 分間放置することで染色した。染色後、生理食塩水により十分に洗浄し、細胞膜に付着しなかった色素を洗い流した。

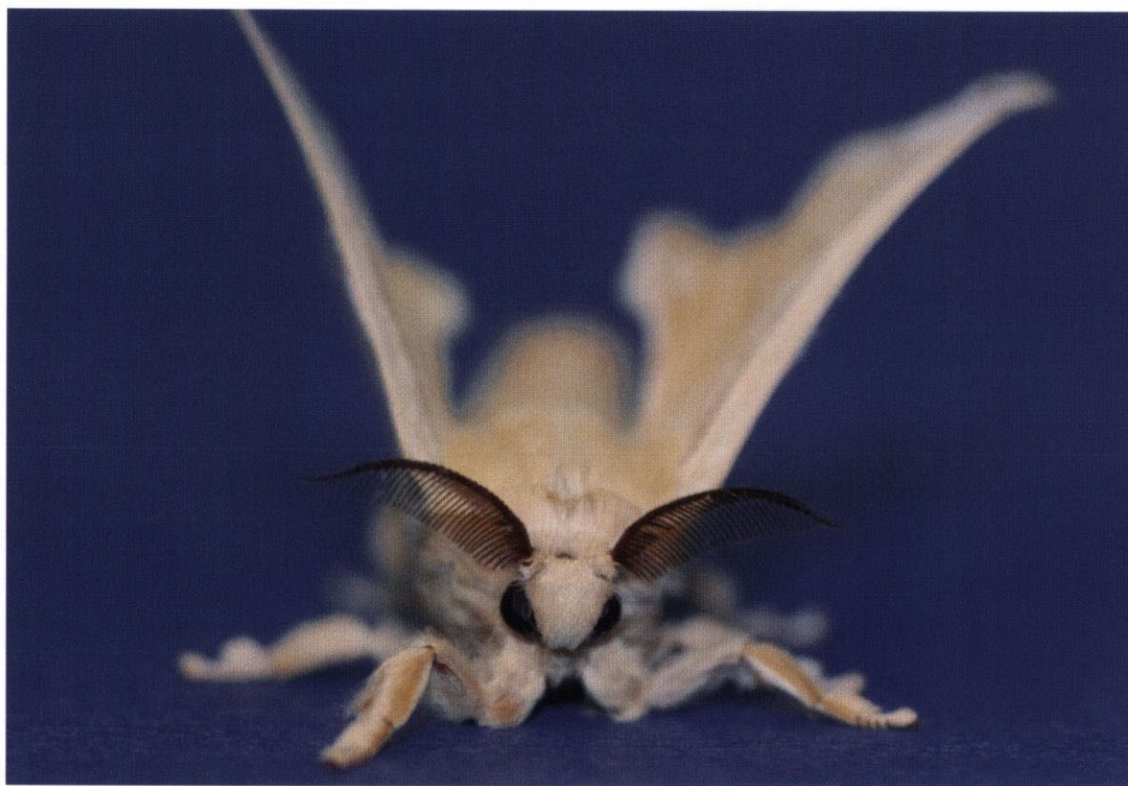


図 2.2.2-3 雄カイコガ

## 2.3 膜電位イメージングのための基礎的研究

昆虫神経系に対し膜電位イメージングを可能とする実験装置の構築，およびイメージングに最適な実験パラメタ（膜電位感受性色素の選択，濃度，染色時間等）の調査結果を示す．

### 2.3.1 励起光の光源

一般に蛍光色素の蛍光強度  $F$  は蛍光色素が飽和濃度以下の濃度において次式(式 2.3.1-1)で表せる．

$$F = \Phi \cdot \varepsilon \cdot n \cdot I_{ex} \quad (2.3.1-1)$$

ここで

$\Phi$  は蛍光色素の量子収率であり， $\varepsilon$  は分子吸光率， $n$  は単位面積あたりの蛍光色素の分子数， $I_{ex}$  は蛍光色素を励起する励起光の強度である．膜電位感受性色素では  $\Phi$  は(式 2.3.1-2)で表せる．

$$\Phi = \varepsilon' V \quad (2.3.1-2)$$

ここで  $V$  は神経の膜電位， $\varepsilon'$  は比例定数である．以上から，膜電位感受性色素の蛍光強度は励起光強度に比例する．

脊椎動物および軟体動物の膜電位イメージングシステムの光源はハロゲンランプを直流安定化電源で駆動する方法が一般的である．昆虫神経系を計測対象とした膜電位イメージングシステムの構築にあたり，一般的に用いられる出力 300 W のハロゲンランプを直流安定化電源で駆動し，エビガラスズメの触角葉で触角神経電気刺激時の触角葉の神経応答の記録を試みたが，いかなる応答も記録できなかった．そこで，膜電位感受性色素の蛍光強度は励起光強度に比例する（式 2.3.1-1）ことから，励起光用光源として以下の条件を満たす励起光システムを清原光学株式会社とともに開発した．

- ① 膜電位感受性色素の励起波長帯である可視光波長域で高出力であり，
- ② 出力光強度のふら付きが 0.01% 以下である

上記①の条件を満たすものは高輝度放電管（HIDL）である．レーザ光は①出力波長が単波長

であり、膜電位感受性色素の最適励起波長と一致しない。②照射面にモアレ干渉像が発生するため測定面に均一に励起光を照射できない。③出力安定性が2%程度であり膜電位感受性色素の膜電位に対する蛍光変化量が1-0.1%であることから励起用光源として適さない。HIDL中、水銀ランプは出力波長が不連続の輝線スペクトルであり、膜電位感受性色素の最適励起光波長と水銀の輝線波長が一致しないため膜電位感受性色素の励起用光源としては適さない。キセノンランプとメタルハライドランプは直流安定化電源を使用することで条件①、②をクリアするが、発光効率においてキセノンランプが約40 lm/Wであるのに対し、メタルハライドランプが約60 lm/Wであるためメタルハライドランプを採用した。図2.3.1-1にメタルハライドランプの出力波長スペクトルを示す。波長436, 546, 578 nmに水銀の輝線スペクトルが見られ、その他の可視光領域(380-750 nm)において連続した出力を持っている。

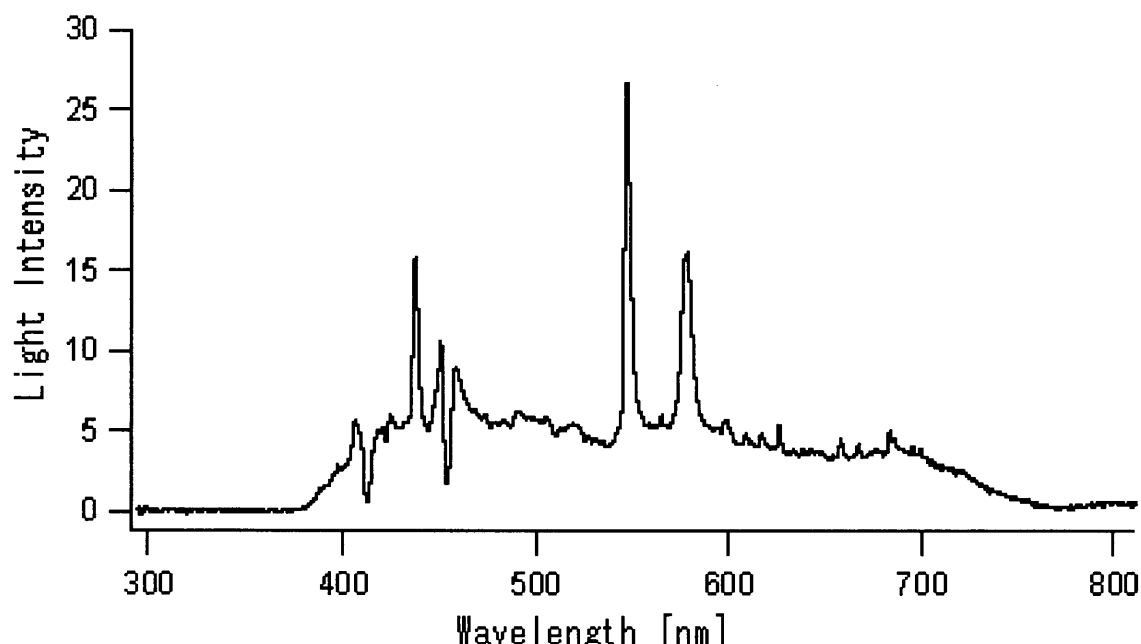


図 2.3.1-1 メタルハライドランプ出力光波長スペクトル

波長436, 546, 578 nmに水銀の輝線が見られる。可視光領域において、輝線スペクトル以外の領域で連続的な出力波長特性を示す。

### 2.3.2 膜電位感受性色素の選択

図2.3.2-1に現在使用されている代表的な膜電位感受性色素を示す。高信号雑音比を実現するため、単位励起光強度に対する蛍光強度が大きいもの、すなわち量子収率の大きいものから順次

昆虫の脳を用いスクリーニングを行った。評価項目は脳の染色性である（表 2.3.2-1）。染色性の評価は各色素を 3mg/ml の濃度で生理食塩水に溶解させたものを用い、1 時間室温で染色後、生理食塩水で洗浄し、染色状態を比較した。その結果、RH414 および RH795 について良い染色結果が得られた。量子収率を比較すると RH414 が RH795 より大きいいため、膜電位感受性色素として RH414（図 2.3.2-2）を選択した。

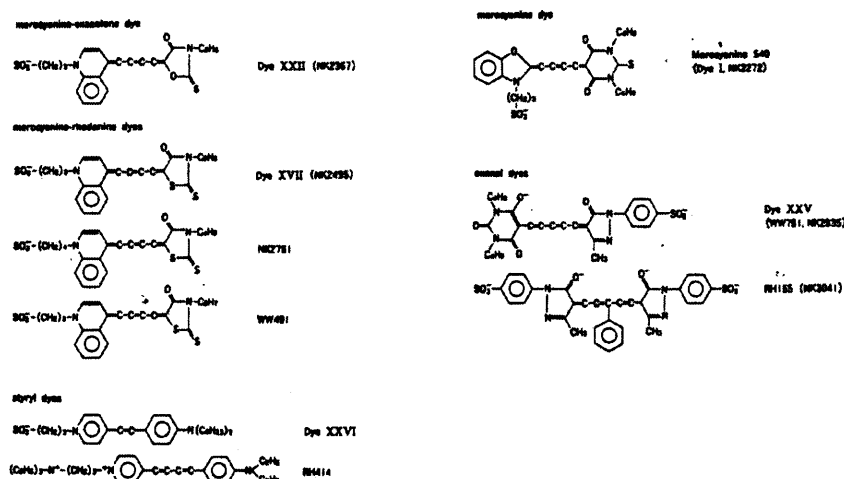


図 2.3.2-1 代表的な膜電位感受性色素の構造式

表 2.3.2-1 膜電位感受性色素の昆虫脳組織染色性スクリーニング結果

膜電位感受性色素	量子収率 [cm <sup>-1</sup> mol <sup>-1</sup> ]	染色状態	使用昆虫
RH414	55,000	◎	エビガラスズメ, ワモンゴキブリ
RH795	33,000	◎	エビガラスズメ, ワモンゴキブリ
Di-4-ANNEPS	39,000	△	エビガラスズメ, ワモンゴキブリ
Di-8-ANNEPS	35,000	×	エビガラスズメ, ワモンゴキブリ

◎：良好，△：良，×：染色されない

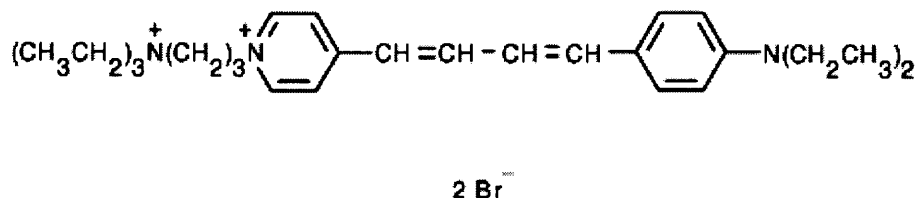


図 2.3.2-2 膜電位感受性色素 RH414 構造式

### 2.3.3 光学フィルタ

高信号雑音比で膜電位感受性色素の蛍光変化を記録するためには、使用する膜電位感受性色素に対し適切な波長特性を持つ励起光フィルタおよび蛍光フィルタを設定する必要がある。

膜電位感受性色素の最適励起波長域は色素が付着する神経細胞の種類の違いにより数十 nm の範囲で変化することが知られている。そこで、以下に示すように昆虫の脳に付加した膜電位感受性色素の吸光波長特性を実測した（図 2.3.3-1）。脳神経に結合した膜電位感受性色素が吸光を示す波長域は膜電位感受性色素が励起されるのに適切な波長域であるからである。

カイコガの脳を取り出し、無染色の状態で脳自身が持つ吸光特性を分光器（PMA-11, 浜松ホトニクス株式会社）を使用し透過光観察にて計測した。その後同一の脳に対し膜電位感受性色素 RH414 を 3 mg/ml の濃度で 5 分間染色し、余分な膜電位感受性色素を洗浄した後、染色された脳の吸光特性を計測した。各波長での吸光率 **absorptivity** は膜電位感受性色素染色前の脳の各波長での透過光強度に対する膜電位感受性色素染色後の脳の各波長での透過光強度の比率で表した。

その結果、カイコガ脳に結合した膜電位感受性色素の吸光波長域は 430 nm から 625 nm であり、また 625 nm から 800 nm に蛍光の発生が認められた。

この結果と後述する内因性信号の評価結果（2.3.8 参照）より、膜電位感受性色素に対する効果的な励起および蛍光フィルタとして、励起波長用フィルタ 535±25 nm, ダイクロイックミラ 590 FT, 蛍光フィルタ 615 nm ハイパスフィルタを用いた。

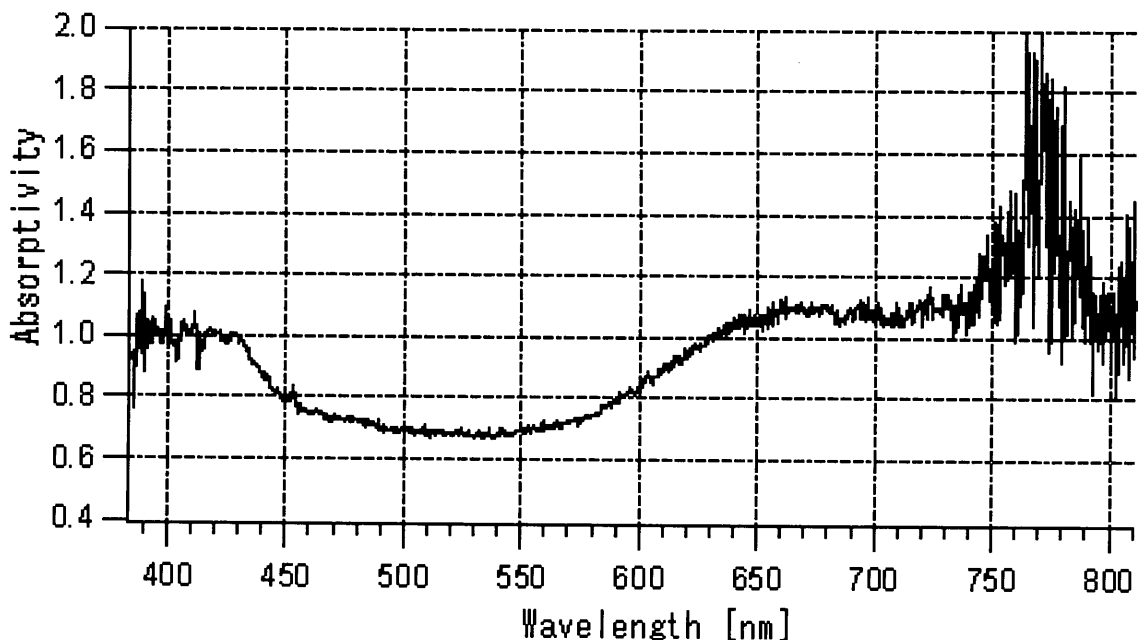


図 2.3.3-1 膜電位感受性色素が結合した脳の透過率-波長曲線

#### 2.3.4 光学系

膜電位イメージングには膜電位感受性色素の蛍光をより多く受光するため、明るい光学系が必要となる。レンズの性能（集光能力、分解能）を示す一般的に使用されるパラメタとして、開口数（Numerical Aperture, N.A.）がある。開口数の定義を式 2.3.4-1 に示す。

$$N.A. = N \cdot \sin(\phi_{\max} / 2) \quad (2.3.4-1)$$

ここで  $N$  は測定物とレンズ間を満たす媒質の屈折率、 $\phi_{\max}$  は焦点にある点光源から発生する光がレンズの有効径を通過するときの円錐形光束の最大角である（図 2.3.4-1）。

観察対象である昆虫の触角葉は小面から見ると卵形をしており、長径約 300 – 800  $\mu\text{m}$  である。後述する受光デバイスの受光面が一辺約 9 mm の正方形であることから使用する対物レンズは 10 倍または 20 倍の倍率が触角葉全体をカバーするのに適している。10 倍および 20 倍の倍率をもつ対物レンズを調査した結果、現行で最も高い開口数を持つレンズは生物顕微鏡ではカールツワイス社性のものであり、開口数 0.45（10 倍）、0.75（20 倍）であった。このため、光学系としてこれらの対物レンズを採用した。

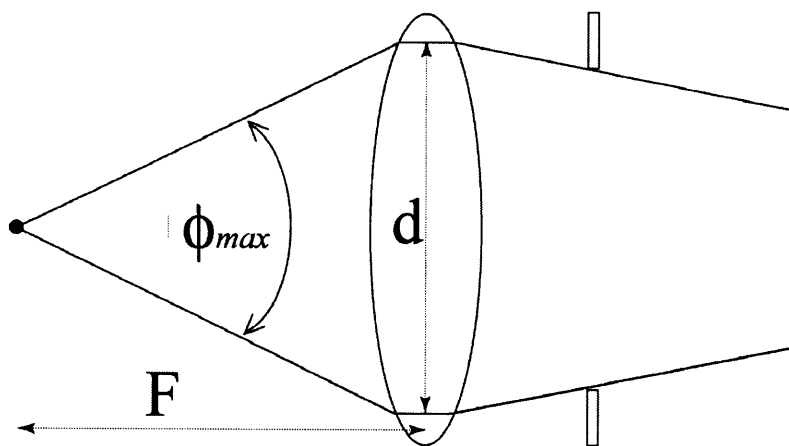


図 2.3.4-1 レンズ開口数

レンズの開口数は焦点・レンズ間の媒質の屈折率と焦点から発生した光がレンズ有効径 ( $d$ )、焦点距離 ( $F$ ) により決定される角  $\phi_{max}$  の  $1/2$  の正弦関数の積で与えられる。開口数が多いレンズほど集光能力が高く、明るいレンズであるといえる。

### 2.3.5 受光デバイス

膜電位感受性色素を使用した膜電位イメージングにおいて計測する膜電位感受性色素の蛍光強度の範囲は光子数で  $10^7$ - $10^{12}$  / $\text{cm}^2 \cdot \text{s}$  である。この蛍光強度が神経活動により 0.1% 程度変化する。この変化を記録するためには受光デバイスの受光強度のレンジが  $10^7$ - $10^{12}$  / $\text{cm}^2 \cdot \text{s}$  の領域をカバーしており、かつデータ分解能が 0.01% 以上のものが必要である。データ分解能が 0.01% を実現するためにはデバイスの 1 ピクセルの出力するアナログデータを A/D 変換する際、14 bit 以上のデータ長が必要である。

さらに、神経活動はミリ秒の現象であることから時間分解能はサブミリ秒 (記録周波数 1 kHz 以上) であることが望ましい。膜電位イメージング用デバイスとして CCD カメラ等イメージングデバイスのイメージ記録周波数を高くする上で最も問題となる点が 14 bit 以上のデータ長を 1 kHz 以上で A/D 変換する A/D 変換速度である。

イメージング機器として富士写真フイルム社製 HR Deltaron 1700 を利用した。この受光デバイスは受光強度のダイナミックレンジが光子  $10^7$ - $10^{12}$  / $\text{cm}^2 \cdot \text{s}$  の領域に対応しており、 $128 \times 128$  ピクセルの空間分解能、最大時間分解能 0.6 ms/frame (1 フレームのサンプリング周波

数；1.7 kHz）を有する．本機器は信号処理部に 8 bit 差分法を使用することで，8 bit データ長の処理系であるにもかかわらず最大 18 bit 相当のデータ長の処理を行うことを可能としている（図 2.3.5-1）．イメージングデバイスの記録レートを高くする上でボトルネックとなる A/D 変換機構は 8 bit の変換機を使用するため，高速処理が可能である．

このイメージング機器の出力は膜電位感受性色素蛍光変化とリファレンスデータの差分 ( $\Delta F$ ) であるため，後処理により相対蛍光変化量 ( $\Delta F/F$ ) を求める必要がある（2.4.3 参照）．

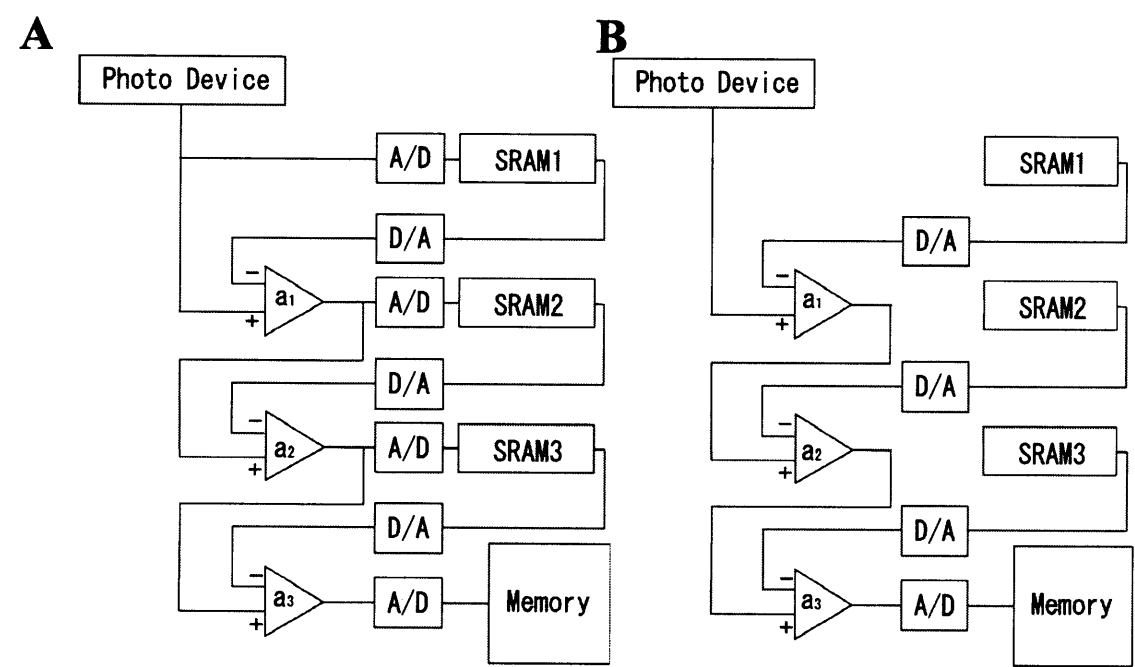


図 2.3.5-1 8bit 差分法を用いたイメージングデバイス処理回路

8 bit 差分法による計測は神経活動による膜電位感受性色素の蛍光変化を計測する直前に神経活動のない状態での膜電位感受性色素蛍光強度をリファレンスデータとして記録し，続いて刺激等を与えることで発生する神経活動による膜電位感受性色素の蛍光強度変化を測定することで行われる．A: リファレンスデータの取得時の回路．神経活動がない状態での蛍光強度を 8 bit SRAM1-3 に増幅後の差分データとして記録する．B: 神経活動による膜電位感受性色素の蛍光強度変化記録時の回路．SRAM1-3 に記録したリファレンスデータを減算しながら差分データのみを出力する．得られる出力データは Photo Device が受光した光量とリファレンスデータの差分であり，メモリに記録される．



次に本イメージングデバイスを含む、計測系全体のノイズ評価を行った。図 2.3.5-2 に計測系のノイズ評価を行った結果を示す。図 2.3.5-2 (A) はシステム光源を用い受光デバイス全域を一定輝度で照射したときの光量ノイズ曲線である。受光デバイス単体の曲線（図 A の点線）はほぼ直線である。比較のためにイメージインテンシファイア（International 社製，VS54-1845，アメリカ）を受光デバイスに組み合わせた結果，光量ノイズ曲線は直線にならず，イメージインテンシファイアが膜電位感受性色素の光強度範囲でショットノイズ以外のノイズを含んでいることを示した。このため，イメージインテンシファイアを受光デバイスに組み込むことを見合わせた。

図 2.3.5-2 (B) は，受光デバイスの全ピクセルが均一に，かつショットノイズレベルの出力を行っているか評価した結果である。

受光デバイス中心に最大輝度の照明光が照射するよう絞りにより調整し，さらに同心円状に中心から外部に向かって輝度が滑らかに低下するように受光デバイスの受光面上の輝度の分布を調整した。

図中の各色の点は受光デバイスの各画素（全体で 16384 点）の受光する照明光の輝度に対するノイズレベルを示す。図中の点の色の違いは，ランプ装置の ND フィルタにより受光面へ照射する照明光の輝度レベルを変えた時の測定結果を表す。縦軸は雑音の 1 標準偏差の値であり，横軸は 1 画素が受光した照明光強度の平方根である。各色の点は相似形を示しており，かつ各色の点で光量に対しノイズレベルはほぼ  $1/2$  乗に比例している（図の赤直線）。この結果は，測定系の雑音の主な成分がショットノイズであることを示している。光量がデバイス出力値で 25 以下の点は光量不足でデバイスの計測レンジ以下の領域であるため，直線からずれが見られる。また，矢印部分は受光デバイスのエッジ部分にあたり，この領域の画素の出力の信用度は低いことが判明した。

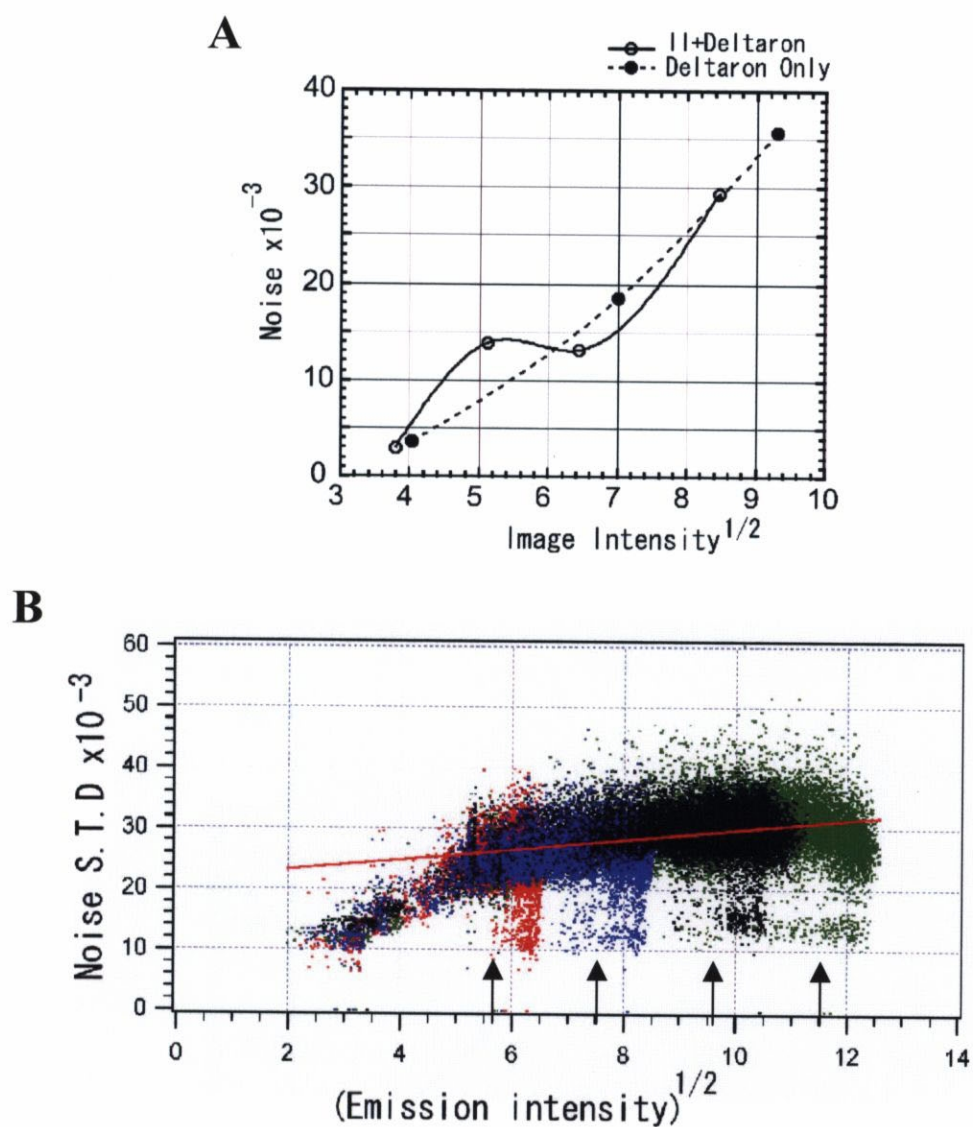


図 2.3.5-2 システムノイズ評価結果

A: 受光デバイスの単一ピクセルでの入射光強度-ノイズ曲線. 実線がイメージングデバイスとイメージインテンシファイアを組み合わせたもの. 実線はイメージングデバイス単体での出力.

B: イメージングデバイスの各ピクセルの出力の均一性の評価. 一部のピクセル (矢印) で不正な出力を行なうピクセルが存在する.

### 2.3.6 膜電位感受性色素の濃度

膜電位感受性色素の濃度は脊椎動物の脳、および軟体動物の神経系に対しては 0.1 mg/ml 程度の濃度で使用される[10,11,13,15,16]。昆虫の神経系に対し同様の濃度を使用し計測した結果神経活動に伴う膜電位感受性色素の蛍光強度変化は記録できなかった。そのため、膜電位感受性色素により染色された神経細胞の蛍光強度が飽和する膜電位感受性色素の濃度付近で計測を試みるため、神経細胞の膜電位感受性色素の蛍光強度が飽和するような膜電位感受性色素の濃度を計測した。

計測には材料としてエビガラスズメおよびカイコガの脳を用いた。これらの昆虫の脳を摘出し、正中線上で脳を 2 分し、膜電位感受性色素 RH414 で脳を 15 分（カイコガ）または 1 時間（エビガラスズメ）染色し、膜電位感受性色素を洗浄後、蛍光強度を測定した。膜電位感受性色素の濃度を 1-5 mg/ml の範囲で変えることで飽和染色濃度を求めた（図 2.3.6-1）。

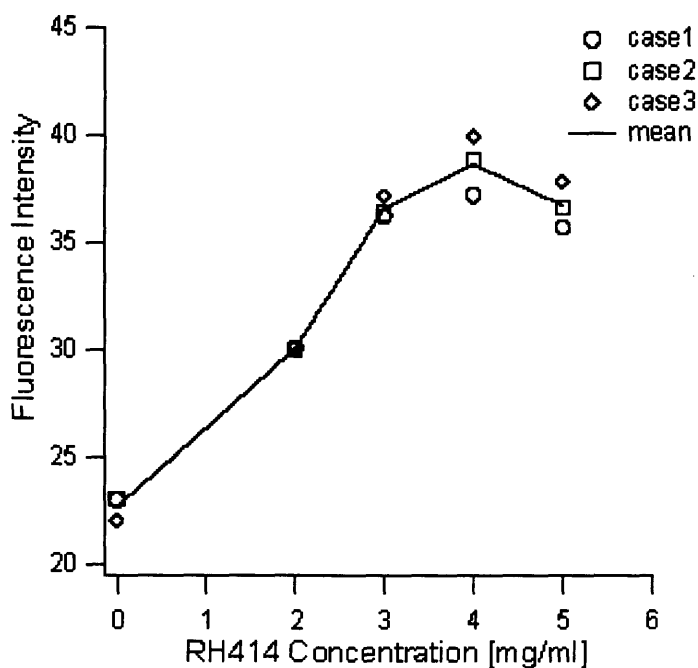


図 2.3.6-1 RH414 濃度-蛍光強度曲線

膜電位感受性色素の濃度を 1-5 mg/ml の範囲で変化させたときのカイコガ脳の蛍光強度の変化。膜電位感受性色素の濃度 4 mg/ml で飽和している。

膜電位感受性色素 RH414 はカイコガ、エビガラスズメとも低濃度ではほぼ濃度と蛍光強度は

線形であったが、濃度 3 mg/ml で変曲点を迎え 4 mg/ml で最大蛍光強度を示した。2.3.7 で示す色素の神経細胞に対する毒性の評価結果とあわせて考慮し、膜電位感受性色素 RH414 の濃度は最大蛍光強度が得られる濃度の近傍である 3 mg/ml が最適であると結論した。

### 2.3.7 膜電位感受性色素の毒性の評価

膜電位感受性色素として流通している色素は一般的に神経に対し低毒性である。これは膜電位感受性色素開発段階で毒性が高いものは除外されるためである。しかし、昆虫の神経系を膜電位感受性色素で染色する際の濃度が脊椎動物、軟体動物で通常使用される濃度の約 10 倍の濃度であるため、膜電位感受性色素の毒性の評価を実際に昆虫の生きている脳を使用し評価した。

これまでの考察により得られた昆虫神経系での膜電位イメージングに対する最適な実験条件を満たした計測系を構築した（具体的には 2.4 節参照）。その結果カイコガ、エビガラスズメ、ワモンゴキブリに対して、触角神経を電気刺激した際に触角葉で膜電位感受性色素の蛍光強度変化を記録することに成功した（図 2.3.7-1）。膜電位感受性色素の毒性の評価はカイコガ脳を膜電位感受性色素 RH414（濃度：3 mg/ml）で染色し、膜電位感受性色素の染色時間を変えて触角神経を電気刺激した際の触角葉で得られる膜電位感受性色素の蛍光変化を比較することで行った。

図 2.3.7-1 に膜電位感受性色素の脳染色時間を 5 分（図 2.3.7-1A）、10 分（図 2.3.7-1B）、20 分（図 2.3.7-1C）の条件で染色した各ケースでの触角神経を電気刺激した際の雄カイコガの大糸球体領域での膜電位感受性色素の相対蛍光変化量（ $\Delta F/F$ ）の 5 分ごとの時間変化を示す。

最も膜電位感受性色素の神経に与えたダメージが少ないと考えられる膜電位感受性色素を 5 分間染色したケースでは時間経過とともに相似形で応答が減少した。それに対し 10 分間染色したケースでは膜電位感受性色素の蛍光変化の最大値を取る時間が時間経過とともに遅れる現象が観察された。さらに、20 分染色したケースでは波形が 5 分間、10 分間の膜電位感受性色素染色のケースと大きく異なっていた。

膜電位感受性色素の毒性により一定の確率で神経がダメージを受け応答しなくなると考えると活動可能な神経の数  $N(t)$  の時間変化は式 2.3.7-1 に従う。

$$N(t) = N0 \cdot \exp(-\lambda t) \quad (2.3.7-1)$$

ここで  $N0$  は染色終了直後に活動可能であった神経細胞の数、 $\lambda$  は単位時間に不活性化する神経細胞の割合である。

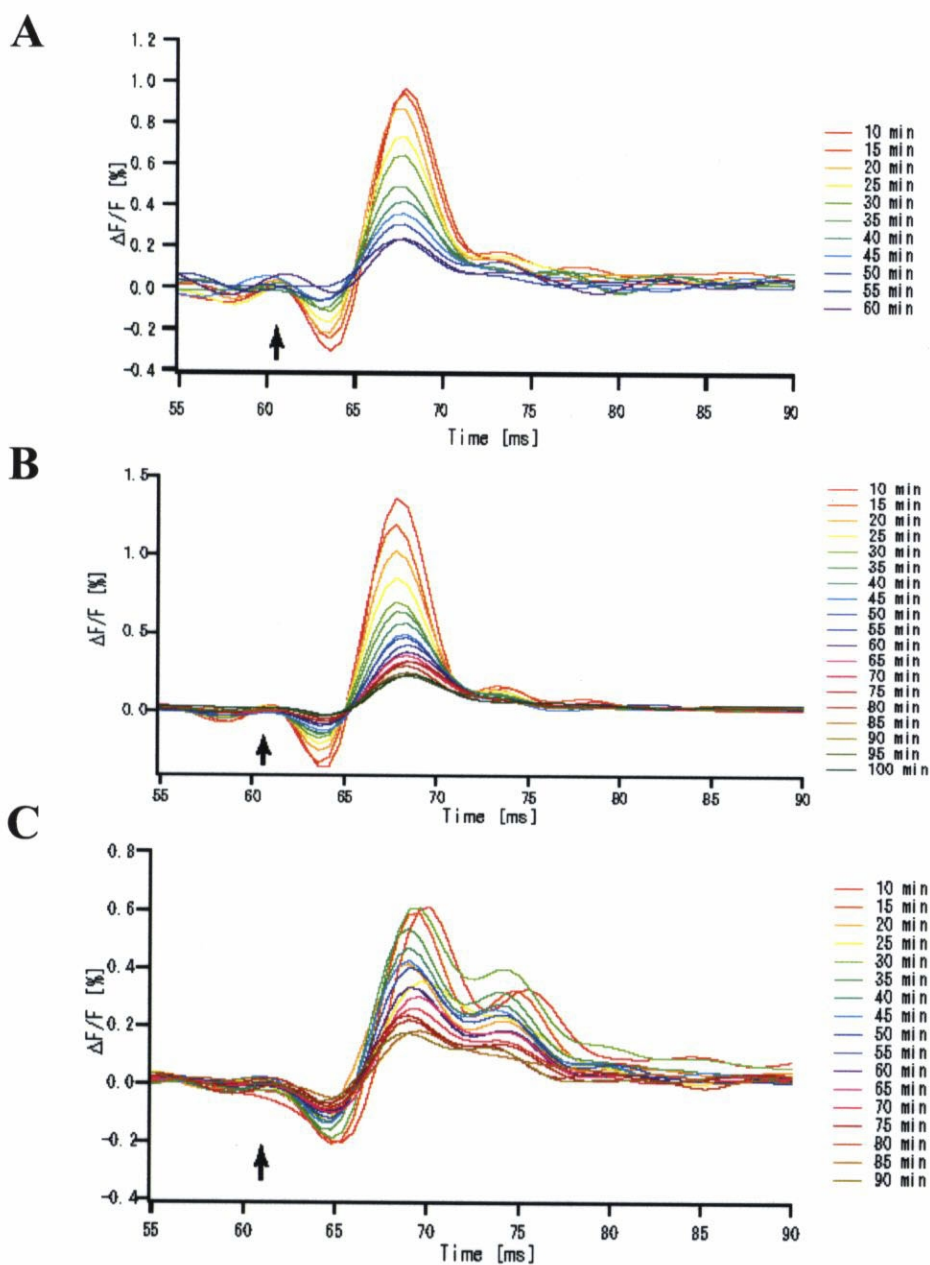


図 2.3.7-1 膜電位感受性色素染色時間による  
膜電位感受性色素の蛍光変化の時間変化の比較

A: 膜電位感受性色素で 5 分間カイコガ脳を染色した条件での触角神経電気刺激による触角葉 MGC の相対蛍光強度変化, B: 膜電位感受性色素で 10 分間カイコガ脳を染色した条件での触角神経電気刺激による触角葉 MGC の相対蛍光強度変化, C: 膜電位感受性色素で 20 分間カイコガ脳を染色した条件での触角神経電気刺激による触角葉 MGC の相対蛍光強度変化,

図 2.3.7-1 の膜電位感受性色素染色時間の異なる各ケースの波形の最大値を時間ごとにプロットすると、5 分間染色、10 分間染色のケースで式 2.3.7-1 に従うことがわかる図 (2.3.7-2)。ただし膜電位感受性色素の蛍光変化が 50%に減衰するまで 5 分間染色ケースでは膜電位感受性色素洗浄後約 40 分間であり、10 分間洗浄ケースでは 30 分であることより、5 分間の染色のケースがより良好な結果が長時間得られると考えられた。20 分間の膜電位感受性色素染色を行ったケースでは応答強度の時間変化は式 2.3.7-1 に従わなかった。これは波形も変形していることを考えると膜電位感受性色素の毒性の影響が大きいと推論された。以上のことより、膜電位感受性色素の毒性を評価した結果は 5 分間の膜電位感受性色素の染色が色素の毒性に対し良好であるといえた。

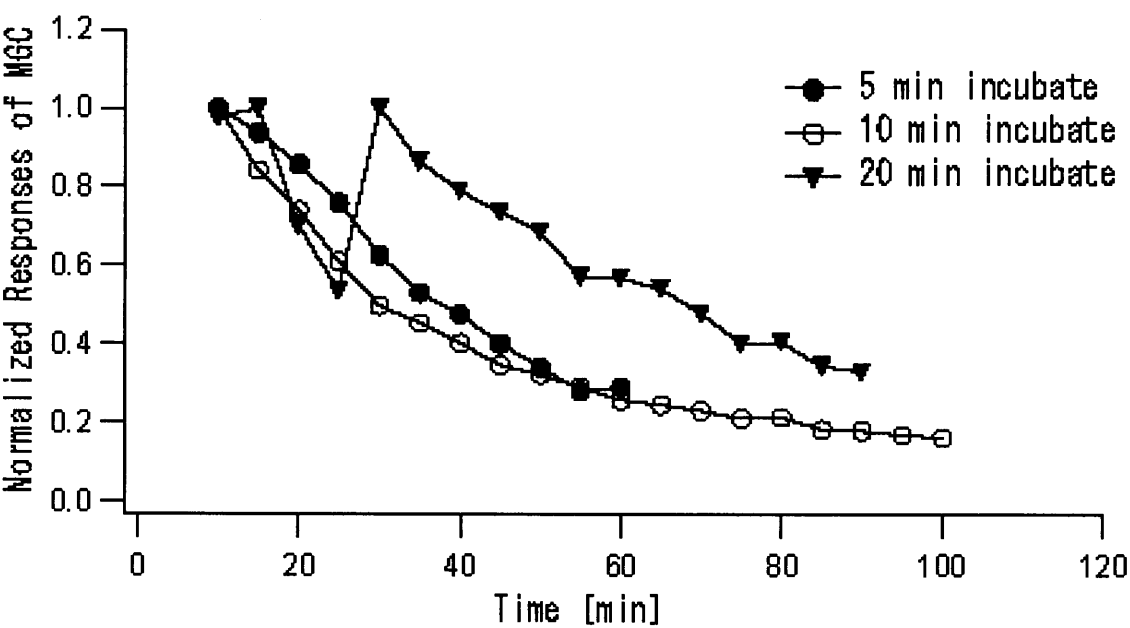


図 2.3.7-2 カイコガ触角神経電気刺激時の触角葉 MGC での  
膜電位感受性色素蛍光強度変化

膜電位感受性色素による脳の染色時間を 5, 10, 15 分間とした各ケースの MGC での最大応答の時間変化。比較のため異なる染色時間で脳を染色した各ケース毎に最大応答で規格化した。

### 2.3.8 内因性信号の評価

膜電位イメージングにおいて考慮しなければならない事柄に、内因性信号 (intrinsic signal) の膜電位感受性色素の蛍光変化に対する影響がある。内因性信号の代表的な原因は、①神経活動に伴う神経細胞の光の透過率、屈折率、副屈折率の変化、②神経活動による脂肪の代謝による神経組織の光透過率の変化等が挙げられる[79]。また、脊椎動物では神経活動による酸素消費のための脳血中ヘモグロビン量の変化による光学変化が代表的である。この内因性信号を積極的に用いて昆虫においても内因性信号によるイメージングが行われている[80]。しかし、内因性信号によるイメージングは膜電位感受性色素によるイメージングとは異なり、神経膜電位が直接信号に反映しているものではない。そのため、①神経活動に対する信号の時定数が数百ミリ秒以上と大きく、②一般的に得られる信号から興奮性応答、抑制性応答の区別が不能である点で膜電位感受性色素によるイメージングと比べ短所を持つ。しかしながら信号強度は通常数%から数十%であり、膜電位感受性色素より 2 桁以上大きい。

神経膜電位を記録する際、膜電位の直接の反映である膜電位感受性色素の蛍光変化に内因性信号が含まれるか否かを評価する必要がある。そのため、昆虫の脳の無染色状態での吸光スペクトルを計測した (図 2.3.8-1)。その結果 400-450 nm の波長の光に対し大きな吸光を示す領域があり、また、460-570 nm にわずかであるが吸光を示す領域が確認された。これはこれらの波長域を最適な励起光とする物質が脳内に存在することを意味する。波長 600-750 nm において、これらの物質が励起された結果発生する蛍光 (自家蛍光) と考えられる透過光強度の増大領域が観察された。

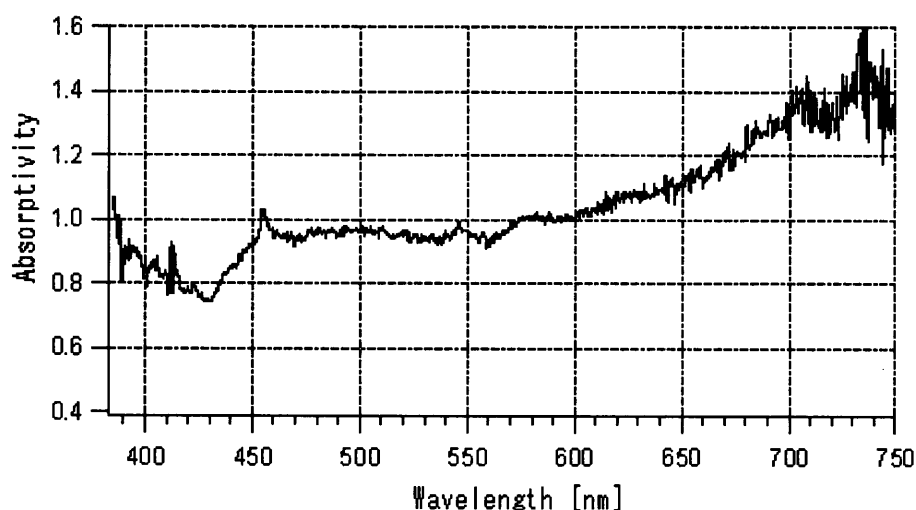


図 2.3.8-1 カイコガ脳の吸光スペクトル

脳内に存在する自家蛍光を発生する物質が神経活動に依存し変化するか、すなわち内因性信号源と成りうるか、実際に膜電位感受性色素によるイメージング用に構築されたイメージングシステムで内因性信号が観察されるか否かを確認した（図 2.3.8-2）。

確認の手法は次の通りである。

- ① 生きている状態で雄カイコガの脳を摘出し、触角神経を電気刺激し、膜電位感受性色素による膜電位イメージングと同じ光学系を使用して触角葉の自家蛍光の蛍光変化を計測した。
- ② 刺激用電極を保持したまま、前記①で使用した同じ脳に膜電位感受性色素を滴下することで染色し、その後灌流により膜電位感受性色素を洗浄し、①と同様に蛍光変化を測定した。

その結果、膜電位感受性色素の蛍光変化が確認できた脳に対し、自家蛍光による蛍光強度変化は観察されなかった。図 2.3.8-2 に触角神経を電気刺激した場合の触角葉の同一領域（大糸球体領域中の  $10 \times 10$  ピクセルの領域、面積= $70 \times 70 \mu\text{m}^2$ ）から記録した自家蛍光および膜電位感受性色素の蛍光強度と刺激前の蛍光強度に対する蛍光強度変化率である相対蛍光変化量 ( $\Delta F/F$ ) を示す。同領域での自家蛍光の蛍光強度はデバイス出力値で  $0.1 \pm 0.7$  (SD.) であり、膜電位感受性色素で染色したものの蛍光強度 ( $19.1 \pm 1.9\text{SD.}$ ) に比べ約 1/20 程度の大きさしかない。図 2.3.8-2B ではこの理由により自家蛍光 (No stain 赤線) の相対蛍光変化量のノイズレベルが高くなっている。

以上より、構築した光学系が使用する波長域では内因性信号は観察されず、膜電位感受性色素を使用した場合得られる蛍光変化は膜電位感受性色素による成分のみであると結論付けた。計測に使用したデバイスは 8bit 整数処理系（図 2.3.5-1）である。蛍光強度および相対蛍光変化量をこのデバイスの出力より算出する方法は「2.4.3 信号処理」において後述する。



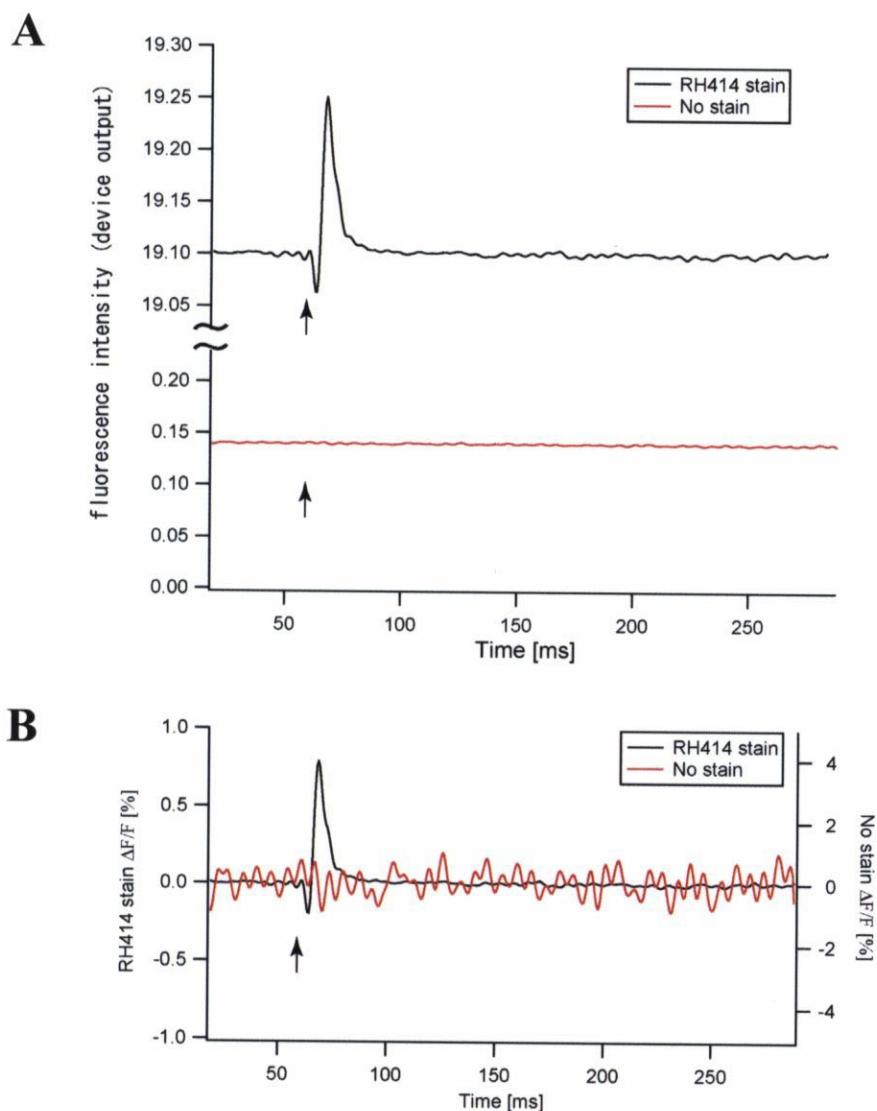


図 2.3.8-2 内因性信号の膜電位感受性色素蛍光変化に対する影響の評価

A: 無染色のカイコガの脳での自家蛍光強度変化を赤で、同一の脳に対して膜電位感受性色素 (RH414)を付加し計測した蛍光強度変化を黒で示す。矢印は刺激タイミングである。B: 無線色の脳および膜電位膜電位感受性色素で染色した脳での相対蛍光変化量( $\Delta F/F$ )。膜電位感受性色素を使用した膜電位イメージング用に構築されたシステムでは内因性信号は観察されなかった。これより膜電位感受性色素の蛍光強度変化は内因性信号を含まないと結論できた。

### 2.3.9 電気刺激によるアーチファクトの評価

神経細胞を電気刺激した際の神経細胞の応答は 2 種類のコンポーネントを含む。1 つは電気刺激、スパイクの発生、シナプス後電位などの神経細胞上に発生した電圧により、電圧源周りに形成される電場を原因とする神経細胞膜の電位変化であり、電気緊張性電位と呼ばれる。2 種類の神経応答は神経細胞膜上のナトリウムチャネルの開口とその後発生するカリウムチャネルの開口による神経スパイクの発生メカニズムによるものである。電気緊張性電位の中で、電気刺激により印加された電圧を原因とする電気緊張性電位を、信号を発生する原因が生体信号ではない点を考慮し電気刺激によるアーチファクトとして生体信号と区別する必要がある。電気刺激電極から一定の距離にある点でのアーチファクトの大きさは刺激強度に比例する。それに対しナトリウムチャネル、カリウムチャネルの開口に伴う神経電位の変化は電気刺激強度に比例せず、スパイク発生閾値以下ではスパイクは発生せず、閾値以上では一定の大きさのスパイクを発生するいわゆる「全か無か」の法則に従う。

以上を考慮し、これまでの考察により触角神経を電気刺激した際得られた触角葉での膜電位感受性色素の蛍光変化がアーチファクトであるか、生体由来のものであるかを切り分ける必要がある。そのため、雄カイコガの脳を用い触角神経にセットした電気刺激用電極の極性の正負を入れ替え、電極付近の触角神経の膜電位感受性色素蛍光変化および触角葉の膜電位感受性色素蛍光変化を計測した（図 2.3.9-1）。刺激にはサクション電極を使用した。サクション電極はガラス管の先端直径を触角神経の直径と同じになるよう加工し、ガラス管内を負圧にすることで触角神経を吸引するもので、ガラス管内に電極となる銀線をセットし、ガラス管外にガラス管内の電極と対の極性用の銀線電極をセットした。以下ガラス管内の電極を刺激電極、ガラス管外に設置した銀線電極をリファレンス電極と便宜上よぶ。

刺激電極の極性を正として刺激した場合（図 2.3.9-1 黒）触角神経、および触角葉での膜電位感受性色素の蛍光変化は蛍光強度増大のみの単相性の変化をしめした。それに対し同一の固体に対し、刺激電極の極性を負に変えて記録した結果、触角神経および触角葉での膜電位感受性色素の蛍光変化は刺激（図 2.3.9-1 矢印）に対し最初に蛍光強度の減少を示し、その後蛍光強度の増大を示す 2 相性の変化を示した。アーチファクトは刺激強度に比例することより、刺激電極が正の場合アーチファクト、神経応答いずれも膜電位感受性色素の蛍光強度を増大する方向に働き、アーチファクトと神経応答を分離することは難しい。これに対し刺激電極の極性を負とした場合アーチファクトは膜電位感受性色素蛍光強度が減少する方向、神経応答は蛍光強度が増大する方向に現れるため、アーチファクトと神経応答を分離するのは容易であると考えら

れる．以上のことより，刺激電極の極性を負とすることで，アーチファクトによる膜電位感受性色素蛍光強度変化と神経膜電位変化によるものを容易に分離することが可能であることが判明した．

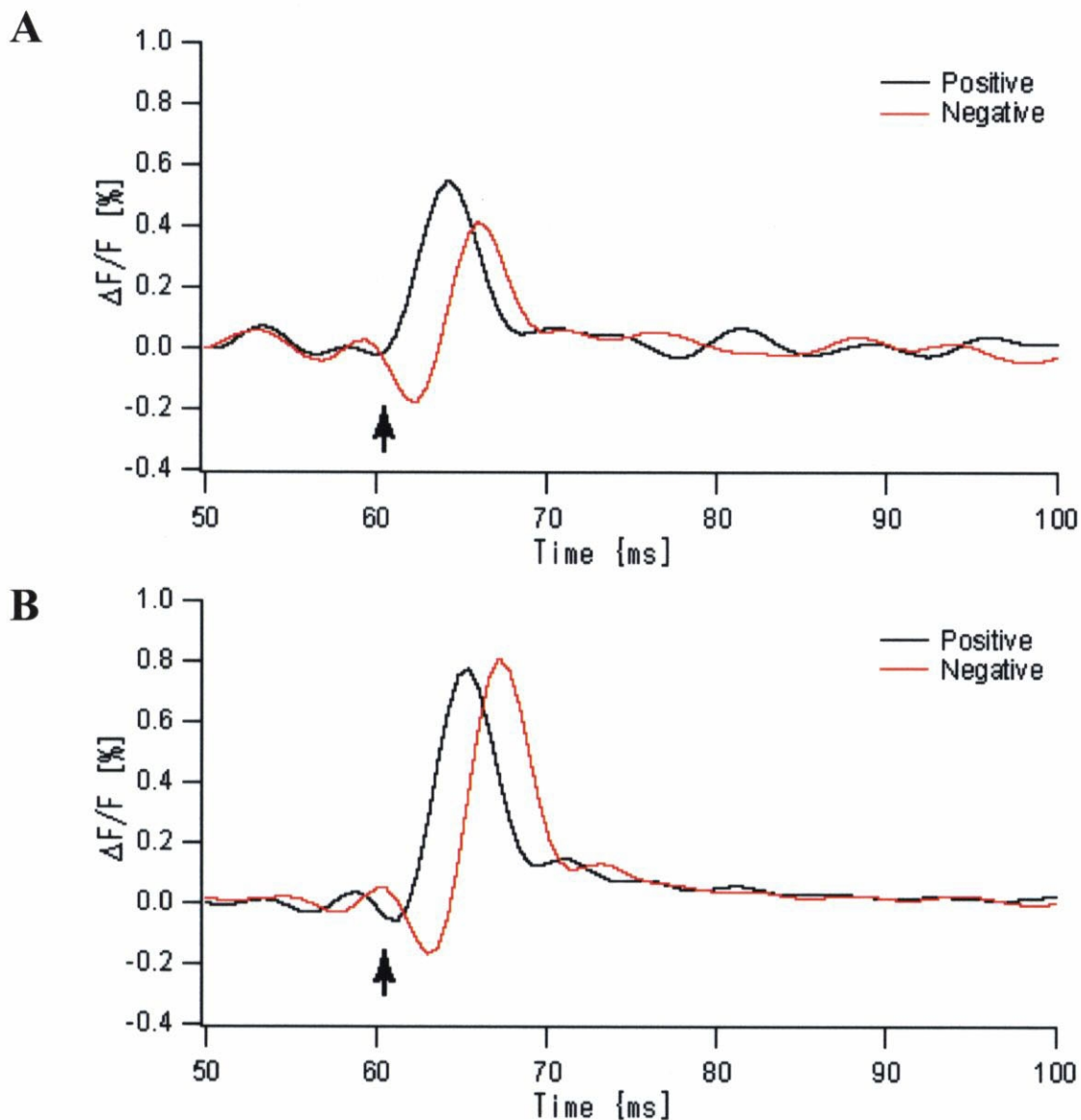


図 2.3.9-1 刺激電極の極性を変えたときの觸角神経と觸角葉の膜電位感受性色素蛍光強度変化  
 A: 刺激電極の極性が正（黒）および負（赤）の時の刺激電極近傍の觸角神経の膜電位感受性色素蛍光変化. B: 刺激電極の極性が正（黒）および負（赤）の時の觸角葉の膜電位感受性色素蛍光変化. 矢印は刺激タイミングを示す. 刺激電極の極性を負にした場合膜電位感受性色素蛍光強度変化は2相性を示し, 刺激のアーチファクトによる蛍光強度変化と神経膜電位変化による蛍光強度変化の分離が容易である.

さらに、刺激電極の極性を負にした状態で触角神経を電気刺激した場合触角神経および触角葉で得られる 2 相性の波形のうち蛍光強度が減少する方向の信号成分が電気刺激のアーチファクトであることを刺激強度と信号強度の関係より確認した。

図 2.3.9-2 に電気刺激時に与える電流の強度を 20 – 160  $\mu\text{A}$  まで 20  $\mu\text{A}$  毎に変化させたときの触角神経の刺激電極近傍の膜電位感受性色素の蛍光強度変化の波形（図 2.3.9-2A）および、刺激直後の蛍光強度が減少を示す部分の最小値と刺激電流の関係（図 2.3.9-2B）を示す。

刺激強度と刺激直後の蛍光強度が減少する部分の最低値の関係はほぼ線形であった。このことより刺激直後に発生する蛍光強度の減少は電気刺激によるアーチファクトであることが確認できた。

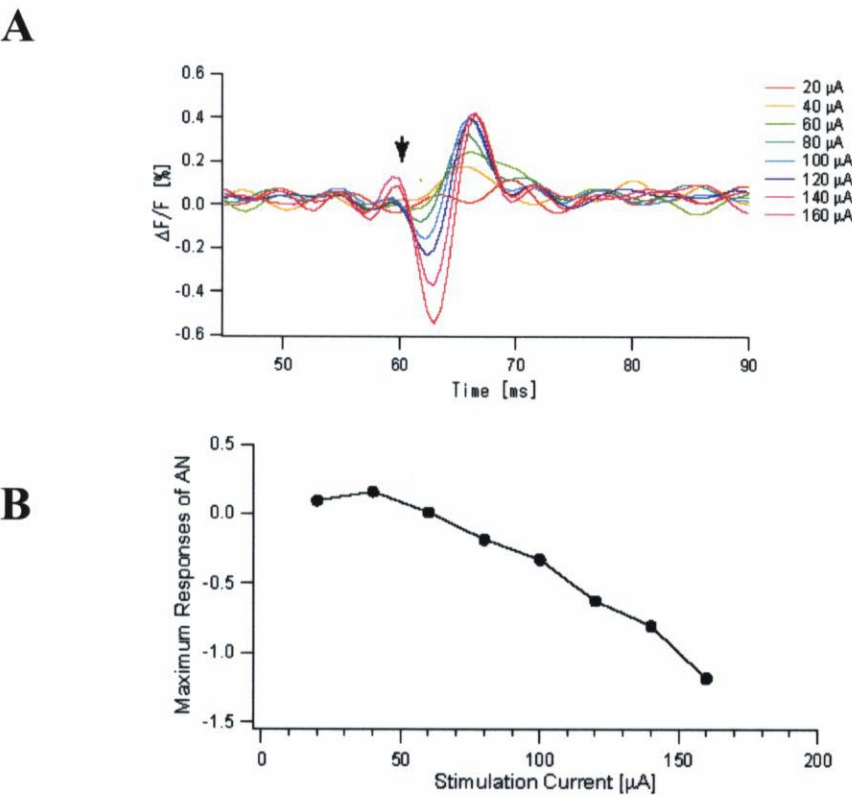


図 2.3.9-2 触角神経の電気刺激強度に対する触角神経応答強度

A:刺激強度を変化させた際の触角神経（刺激電極近傍）の膜電位感受性色素の蛍光変化。刺激直後の負の応答は刺激強度の増大とともに増大した。矢印は刺激タイミング B:刺激直後の負の応答の最小値の刺激強度に対する変化。刺激強度と負の応答の最小値はほぼ線形であった。これよりこの負の応答は電気刺激のアーチファクトを源とする膜電位感受性色素の蛍光変化であると結論できた。

一方刺激電極から離れた触角葉での刺激強度に対する膜電位感受性色素の蛍光変化を図 2.3.9-3 に示す。図 2.3.9-2 と比較すると減少を示す部分の応答が小さく、増大を示す部分が大きくなっている。また、蛍光強度が増大する部分を刺激電流に対して示すと図 2.3.9-3B のようになり、で非線形を示した。刺激強度が 40  $\mu\text{A}$  応答以下では蛍光強度がわずかに増大し、60  $\mu\text{A}$  では急激に応答強度が増大した。また、刺激電流 120  $\mu\text{A}$  で応答は最大値をとりその後刺激強度を増大させても応答強度は減少した。これは①刺激強度に対し応答する閾値が存在する。②最適な刺激強度が存在する。の 2 点で神経膜電位応答の特徴とよく一致した。このことより電気刺激で発生する 2 相性信号のうち波形の正の成分は神経活動を反映したものであると考えられる。

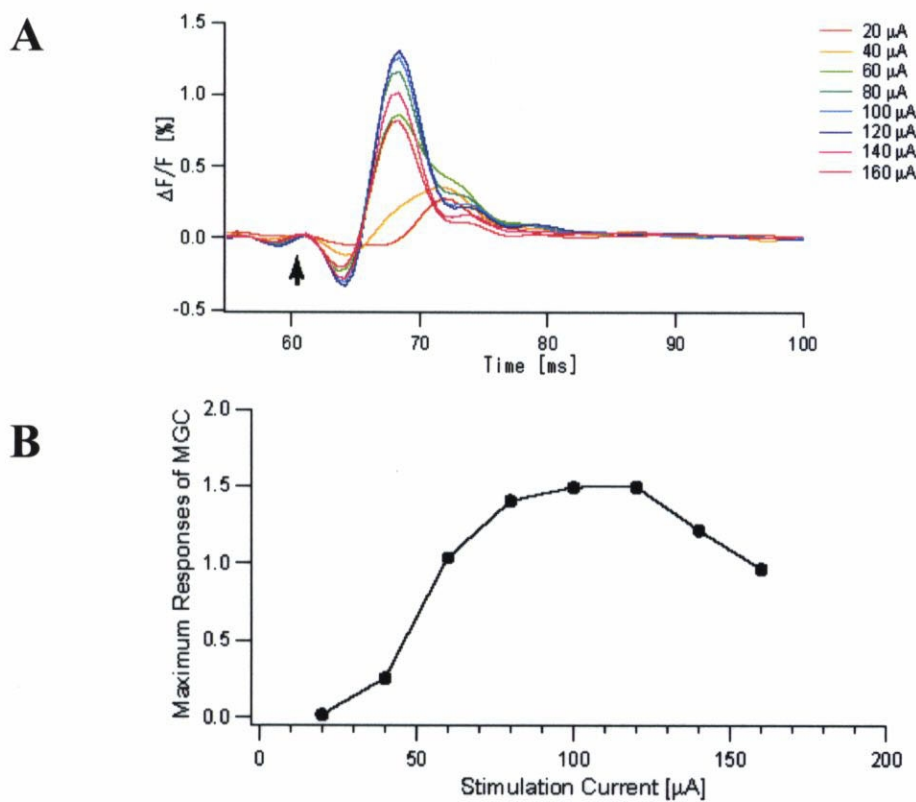


図 2.3.9-3 触角神経の電気刺激強度に対する触角葉応答

A:刺激強度を変化させた際の触角葉の膜電位感受性色素の蛍光変化. 2 相性信号のうち正の応答は刺激強度と非線形の関係を示した。矢印は刺激タイミング B:正の応答の最大値の刺激強度に対する変化。刺激強度が 40–60  $\mu\text{A}$  間で急激な応答強度の増大がみられ、120  $\mu\text{A}$  で応答は最大値を取った。更なる刺激強度の増大に対し応答強度は減少した。これよりこの正の応答は神経膜電位を源とする膜電位感受性色素の蛍光変化であると結論できた。

## 2.4 膜電位イメージングシステム

膜電位感受性色素を用いた膜電位イメージングは著者が報告するまで昆虫において成功例がなかった[71]. ここでは、鱗翅目昆虫のエビガラスズメ (*Agrius convolvuli*), マルハナバチ (*Bombus terrestris*), およびカイコガ (*Bombyx mori*) の触角葉での計測成功例を報告する. また, 目的の一つに実体顕微鏡での計測をあげた. 通常膜電位イメージングに使用される対物レンズの焦点距離は 1mm 以内であり, 測定に当たっては刺激電極の設置が困難になる等の問題のため測定対象の神経組織を摘出する必要がある場合が多い. これに対し対物レンズの焦点距離が長い(55 mm) 実体顕微鏡を使用することで, 計測対象に対する十分な作業スペースが確保できるため, 計測対象となる神経組織を摘出する必要がなく, たとえば体から計測対象神経組織を覆う外皮を除去し, 神経組織を露出するだけで計測できる利点がある. これにより, 神経組織を摘出する場合に比べよりダメージの少ない状態で神経応答を計測可能である. しかしながら, 長焦点レンズを使用する実体顕微鏡は通常の顕微鏡の対物レンズにくらべ, 集光できる光量が小さいという欠点を持つ.

### 2.4.1 計測装置

計測装置は光源, 顕微鏡, 光学フィルタ, 受光デバイスよりなる. 目的別に 2 種類の測定系を構築した. 1 つは顕微鏡に実体顕微鏡を用いることで広い作業領域を計測対象付近に得ることのできる系 (図 2.4.1-1) であり, 2 つめは倒立顕微鏡を用いることで蛍光の作業性よりも受光効率を優先した, より感度の高い系 (図 2.4.1-2) である.

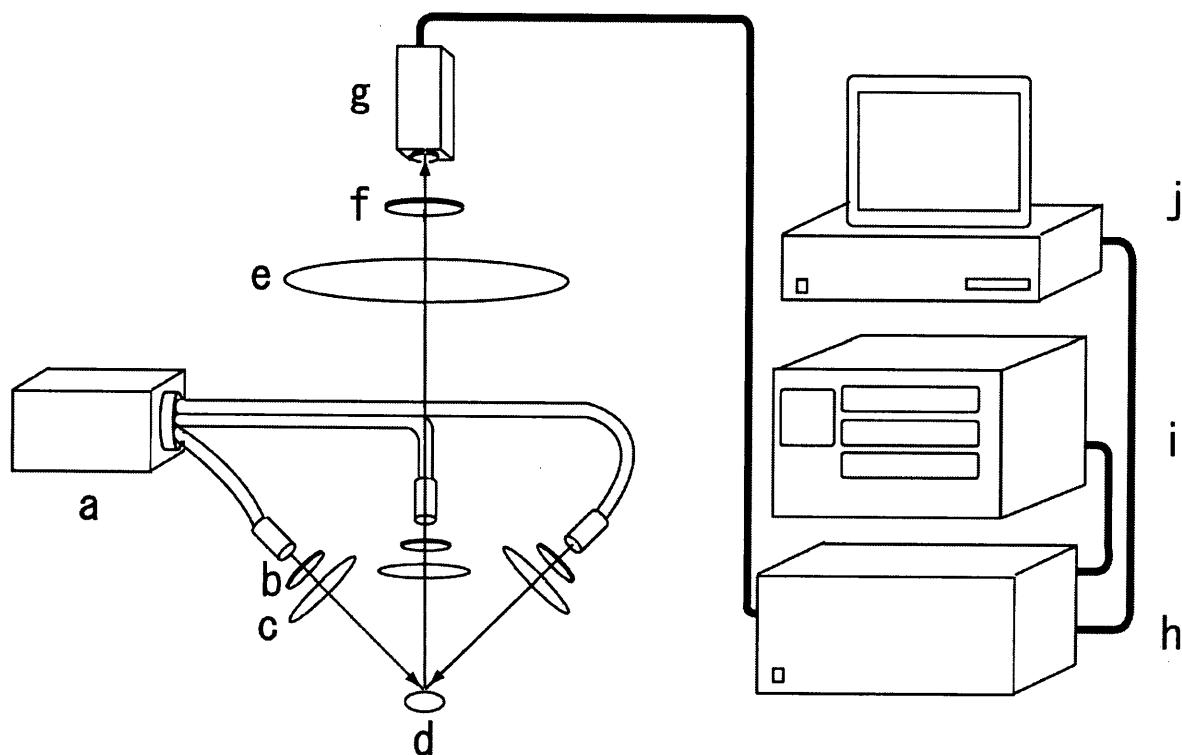


図 2.4.1-1 実体顕微鏡膜電位イメージングシステム

a: 光源, b: 励起フィルタ, c: 集光レンズ, d: 計測対象物, e: 実体顕微鏡対物レンズ, f: 蛍光フィルタ, g: 受光デバイスカメラ部, h: アンプ・カメラ制御ユニット, i: 刺激装置（記録開始のトリガ入力）, j: システム制御・データ記録用コンピュータ.



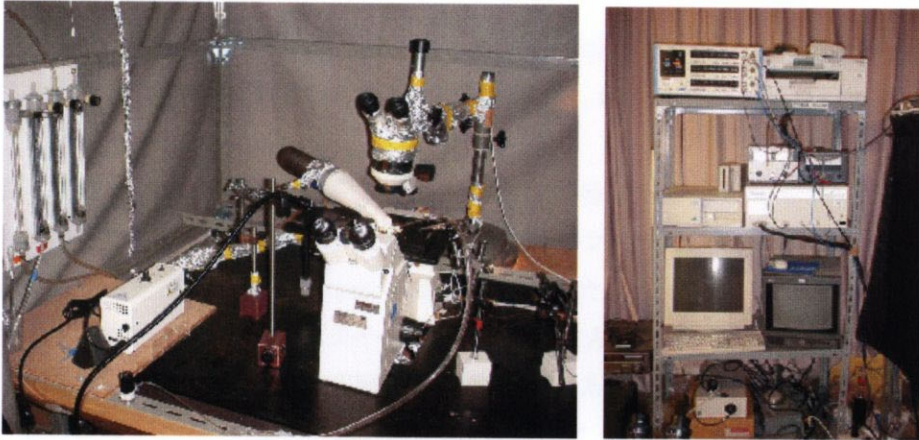
・実体顕微鏡を用いたシステム

信号ノイズ比を高くするために、高輝度放電管であるメタルハライドランプシステム（清原光学株式会社製，**KMH1644**，日本）を用いた。このランプシステムは3台のランプハウスと電源部よりなる。このランプシステムの輝度は最大**62,000 lx**であり，**440 kHz**の交流放電を行う。後述する通り，記録デバイスの記録周波数は約**1.67 kHz**であり，ランプの交流成分の記録に与える影響は無視可能である。光ファイバを用いランプハウスから照明光を導出した。その際，光ファイバ先端に膜電位感受性色素励起フィルタ（通過波長；**520 nm $\pm$ 5 nm**）を設置し，フィルタリング後の励起光を焦点距離**300 mm**のレンズを用いエビガラスズメの脳に直接照射した。これは，通常と同軸落射照明を用いる場合に使用するダイクロイックミラでの光強度の損失を防ぐためである。すなわち，ダイクロイックミラは励起光の反射率，蛍光の透過率が約**90%**であり，励起，蛍光フィルタの該当波長の透過率は**80%**程度である。本システムの場合，光路上には励起フィルタと蛍光フィルタしかないため，**36%**の光量がロスされることになる。これに対し同軸照明の場合，光は励起フィルタ，ダイクロイックミラ（反射），計測対象，ダイクロイックミラ（透過），蛍光フィルタの順に通過することになる。この場合は**48%**の光量損失が見込まれる。3台のランプハウスは**120度**毎の等間隔に設置し，照明時に照明対象物に影ができることを防止した。蛍光フィルタ（透過波長域；**600 nm**以上）は計測デバイスカメラ部直前に設置した。また，励起光による膜電位感受性色素の退色，神経組織の光ダメージを最小に抑えるため，光源部にシャッタを用い，計測中のみ神経組織を照明するよう調整した。

顕微鏡は実体顕微鏡（ライカ社製，**M10**，ドイツ）を用いた。計測時の倍率は**10倍**で行った。

受光デバイス（富士写真フイルム製，**HR Deltaron 1700**，日本）を使用し，膜電位感受性色素の蛍光強度を時空間的に記録することで膜電位イメージングを行う。受光デバイスのカメラユニットに供給する直流電流の整流系がノイズを含むため，外部より，高安定化電源（菊水社製，**PDM35-3**，日本，高砂社製，**GM08-10**，日本）によりカメラ部分の電源を供給するよう改良した。本計測デバイスの受光部は**128 x 128**ピクセルの**MOS型**イメージセンサにより構成されており，**16,382**個所からの同時記録が可能である。光学系の倍率は**10倍**を使用したため，1ピクセルが覆う脳の面積は**7 x 7  $\mu\text{m}^2$** である。また，神経応答の計測は**0.6 ms/frame**の時間分解能で行った。さらに，信号ノイズ比を大きくするため，**32回**の記録を加算平均した。

**A**



**B**

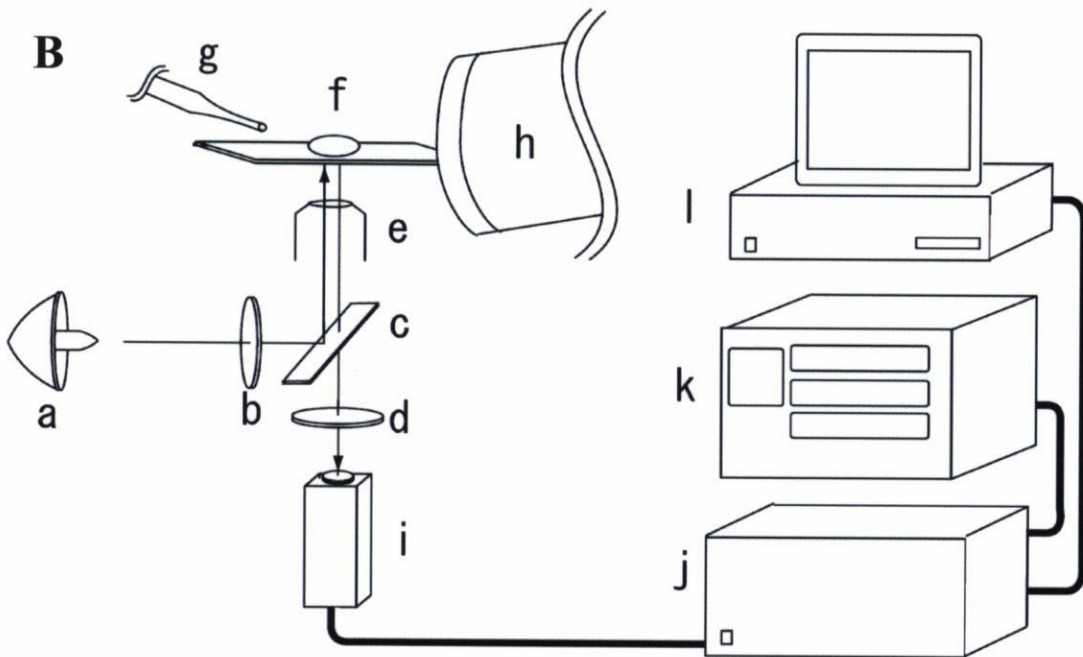


図 2.4.1-2 倒立顕微鏡膜電位イメージングシステム

A: システム概観, B: システム構成図. a: 光源, b: 励起フィルタ, c: ダイクロイックミラ, d: 蛍光フィルタ, e: 対物レンズ, f: 計測対象物, g: 匂い刺激用ピペット, h: 排気装置, i: 受光デバイスカメラ部, j: アンプ・カメラ制御ユニット, k: 刺激装置 (記録開始のトリガ入力), l: システム制御・データ記録用コンピュータ.

・倒立顕微鏡を用いたシステム

光源として前述の高周波交流メタルハライド放電管を改良し，高安定化電源を用いたメタルハライド直流放電管（清原光学株式会社製，MBH-250D, KMH250D，日本）を使用した．出力は 750W である．

照明方法としては倒立顕微鏡の構造上，外部から直接励起光を照射することが，不可能なため，同軸落射法を用いた．使用したフィルタ特性は励起フィルタ  $535 \pm 25 \text{ nm}$ ，ダイクロイックミラ 590 FT，蛍光フィルタ 615 nm ハイパスを用いた．

また，使用した顕微鏡システムはカールツワイス社製 Axiovert100（ドイツ），対物レンズは 10 倍および 20 倍を使用した．本顕微鏡は倒立顕微鏡であり，対物レンズの焦点距離は実体顕微鏡に比べはるかに小さく（10 倍；2.8 mm, 20 倍；0.61 mm）作業性は悪いが，測定物からの蛍光を広い範囲にわたり受光できるため光学系として明るく（開口数 10 倍;0.45, 20 倍;0.75），膜電位の測定には有利である．

膜電位の測定のレートは 2.4 ms/frame で行った．また，嗅受容器の応答特性は複数回連続的に刺激することで変化する可能性がある．応答を複数回記録し加算平均することは，信号雑音比を改善できる長所はあるが，これらの触角葉への繰り返し入力信号のため計測結果が歪む可能性がある．このため，本システムの高信号雑音比の長所を生かして，加算平均化は行わず 1 度の掃記で応答を記録した．

## 2.4.2 刺激装置

### ・電気刺激

内径 1 mm のガラス管 (WPI 社製, TW-100-4, アメリカ) を使用し微小電極作成器で作成したガラス電極の先端を触角神経の直径と同じになるよう折ることにより, サクション用電極を作成した. 電極中に銀線 ( $\phi: 0.3\text{mm}$ ) を挿入し, また, 電極の外側にも同径の銀線を撒きつけ, 両者の間に電機刺激装置 (日本光電工業社製, SEN-7203, 日本) にて, 電圧をかけることで触角神経を刺激した. 刺激周波数は 1 Hz,  $500\ \mu\text{s}$  の間 1 mA を負荷した. 使用した電機刺激装置は 3 チャンネルの出力を持っており, チャンネル 1 をアイソレータ (日本光電工業社製, SS-202J, 日本) に接続し, 刺激チャンネルとした. チャンネル 2 を受光デバイスのトリガ信号用に用い, またチャンネル 3 は光源のシャッタ用に用いてこの刺激装置が計測機器の計測時の起動タイミングを制御するように系を構成した.

### ・匂い刺激

パフ刺激により匂い刺激を行った.  $10 \times 20\ \text{mm}^2$  のろ紙に匂い物質を滴下し, 先端内径 1 mm のパスツールピペット (井内盛栄堂社製, 9250101, 日本) 内に挿入した. 3 本の空気洗瓶にそれぞれ綿, 活性炭, 水を見だし, エアコンプレッサ (井内盛栄堂社製, NUP-1, 日本) からの空気をそれらに通過させた. これら洗瓶の機能は, 綿がエアコンプレッサの脈動のためのバッファ, 活性炭が空気の浄化, 水が空気の加湿をそれぞれ目的としている. これら洗瓶を通過して得られた清浄加湿空気を前記の匂い物質を含んだろ紙を装着したパスツールピペットへ通過させ匂い刺激とした (図 2.4.2-1). 刺激タイミングはソレノイドバルブの開閉により制御した. ソレノイドバルブは電気刺激装置によりコントロールした. 電気刺激装置は, 光源のシャッタの開閉制御, 記録装置のトリガ, 刺激タイミングを一定のシーケンスに従い制御する. 刺激持続時間は 1 秒とした. パフ刺激時の圧力により神経組織が動くのを避けるため, 流速は刺激による動きが発生しない値に設定した. 具体的にはパスツールピペット先端での流速は  $0.5\ \text{m/sec}$  (流量  $0.37\ \text{ml/s}$ ) とした.

刺激としてパスツールピペットから放出された匂い分子は測定対象の昆虫の触角を通過後, 排気装置により速やかに外部へ排出されるよう, 排気装置をセットした.

匂い物質として isoamyl acetate (和光社製, 3-Methylbutyl acetate, 日本), citral (東京化成工業社製, 3,7-Dimethyl-2,6-octadienal, 日本), octanol (東京化成工業社製, 1-Octanol, 日本), hexanol (東京化成工業社製, 1-Hexanol, 日本) を使用した. ろ紙に滴下する各匂い物質の量として 1, 4, 10, 40 50  $\mu\text{l}$  を実験で使用した.

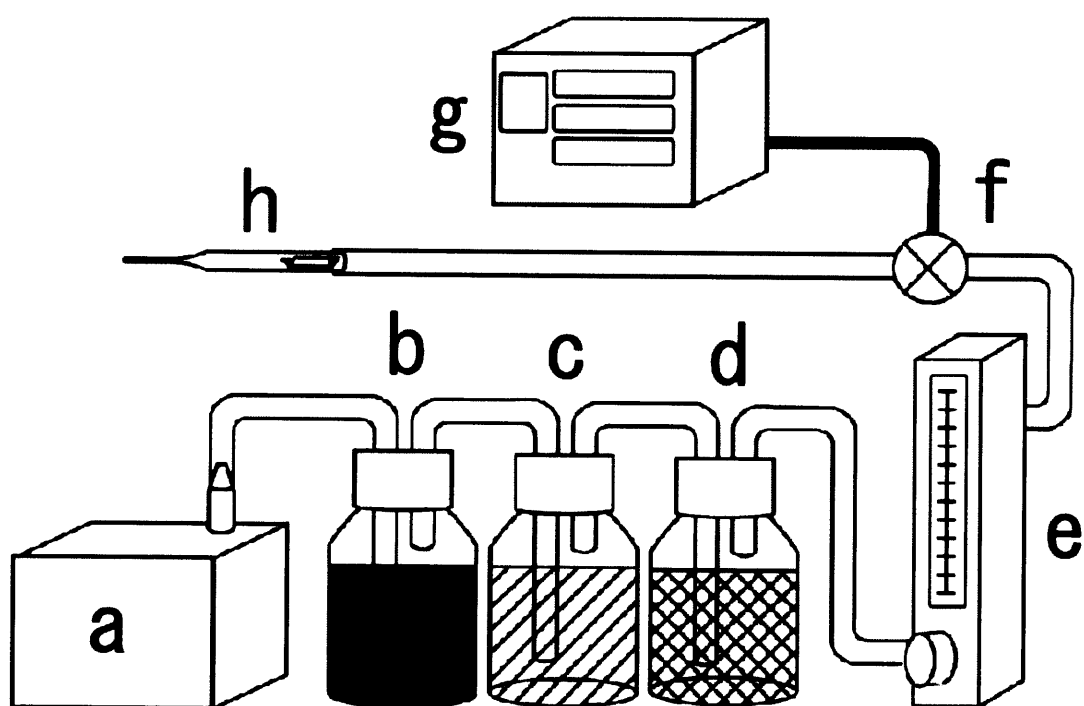


図 2.4.2-1 匂い刺激装置

a : エアコンプレッサ, b : 綿, c : 活性炭, d : 水, e : 流量計, f : ソレノイドバルブ, g : 電気刺激装置, h : 匂い物質をしみ込ませたろ紙を内包したパスツールピペット.

2.4.3 信号処理

信号処理は受光デバイスにより得られた 16384 画素からの時系列蛍光強度データに対し、計測終了後オフラインで一括して行った。これらの処理に使用したソフトウェアは全て筆者が開発した。使用言語は C であり、Dos/V コンピュータ上で処理を行った。

- ・イメージングデバイスの出力値の再計算

使用したイメージングデバイスは高速な信号処理を行うために 8 bit 差分法を採用している (図 2.3.5-1)。

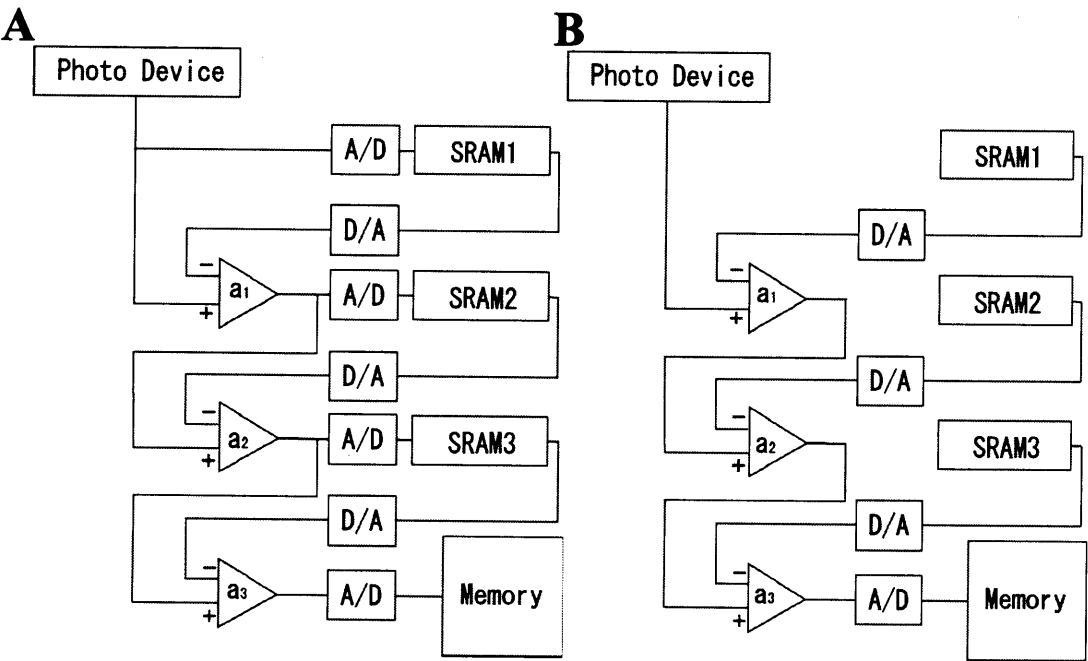


図 2.3.5-1 8bit 差分法を用いたイメージングデバイス処理回路 (再記)

8 bit 差分法による計測は神経活動による膜電位感受性色素の蛍光変化を計測する直前に神経活動のない状態での膜電位感受性色素蛍光強度をリファレンスデータとして記録し、続いて刺激等を与えることで発生する神経活動による膜電位感受性色素の蛍光強度変化を測定することで行われる。A:リファレンスデータの取得時の回路。神経活動がない状態での蛍光強度を 8 bit SRAM1-3 に増幅後の差分データとして記録する。B:神経活動による膜電位感受性色素の蛍光強度変化記録時の回路。SRAM1-3 に記録したリファレンスデータを減算しながら差分データのみを出力する。得られる出力データは Photo Device が受光した光量とリファレンスデータの差分であり、メモリに記録される。(2.3.5 参照)。

このイメージングデバイスは神経活動のない状態での蛍光強度と神経活動による蛍光強度の差 ( $\Delta F$ ) を出力する。しかし、 $\Delta F$  は後述する蛍光色素の蛍光強度を示す式 (2.4.3-2) より単位面積あたりの蛍光色素の分子数に比例することが分かる。このため、脳が膜電位感受性色素で均一に染色されない場合（一般的に均一に染色されない）、脳において同じ強度の神経応答が発生しても領域により異なる大きさの  $\Delta F$  値を計測してしまうことになる。これを回避するため後述の相対蛍光変化量  $\Delta F/F$  を使用する。

相対蛍光変化量  $\Delta F/F$  を求めるにあたり、イメージングデバイスの出力値  $\Delta F$  および SRAM1 ~ 3 の値  $s1$ ,  $s2$ ,  $s3$  を使用し、次式により蛍光強度  $F(t)$  を計算した。

$$F(t) = s1 + \frac{s2}{a1} + \frac{s3}{a1 \cdot a2} + \frac{\Delta F}{a1 \cdot a2 \cdot a3} \quad (2.4.3-1)$$

ここで  $a1$ ,  $a2$ ,  $a3$  は図 2.3.5-1 に示す増幅器の増幅率である。

$F(t)$  の計算は計算 bit 長による打ち切り誤差を避けるため、16bit 浮動小数点演算を行った。

・膜電位感受性色素の組織染色ムラによる信号への影響の補正

受光デバイスの出力より、各ピクセル独立に相対蛍光変化量  $\Delta F/F$  を次式より求めた。

$$\Delta F / F = \frac{F(t) - F_0}{F_0} \quad (2.4.3-2)$$

ここで、 $F(t)$  は計測期間中の蛍光強度、 $F_0$  は刺激前 16 フレームの蛍光強度加算平均値である。この操作を受光デバイスの各画素の出力に対し独立に行うことにより、膜電位感受性色素の脳の場所による染色ムラが計測結果に及ぼす影響を補正した。

一般に蛍光色素の蛍光強度  $F$  は

$$F \propto \Phi \epsilon n I_{ex} \quad (2.4.3-3)$$

で表現される。ここで  $\Phi$  は量子収率、 $\epsilon$  は分子吸光効率、 $n$  は単位面積あたりの蛍光色素分子数、 $I_{ex}$  は励起光強度である。膜電位感受性色素は、膜電位の変化により量子収率  $\Phi$  の値が変化

することで蛍光強度の変化を引き起こすと考えられている。色素開発段階でのスクリーニングで、通常の神経膜電位の変化領域である $-100\text{ mV}$ から $+100\text{ mV}$ の範囲で、 $\Phi$ の値が膜電位に線形である色素のみ選別される。すなわち膜電位感受性色素の場合、量子収率 $\Phi$ は膜電位 $V$ に比例する。このことと式 (2.4.3-2), (2.4.3-3) より、相対蛍光変化量 $\Delta F/F$ は膜電位の変化量に比例する。

#### ・周波数フィルタリング

膜電位イメージングで得られた信号が含む周波数は最大周波数が  $1700 - 400\text{ Hz}$  (データ記録周波数) であり、最小周波数がデータ計測時間の逆数 ( $3-0.2\text{ Hz}$ , 記録装置のメモリ容量による制限) の範囲にある。また計測中の蛍光色素の退色による蛍光強度の減衰が含まれている。退色は一般に指数関数的に減衰する。退色による低周波補正および実験目的に合わせて、得られた信号に対し 128 個のインパルスレスポンスからなる **FIR** フィルタを適用した[81,82]。図 2.4.3-1 に今回解析に使用したフィルタのインパルスレスポンス列、振幅を示す。**FIR** フィルタは直線位相特性を持つフィルタであり、フィルタ後の信号に位相歪は生じず、信号の時間シフトが生じるのみである。



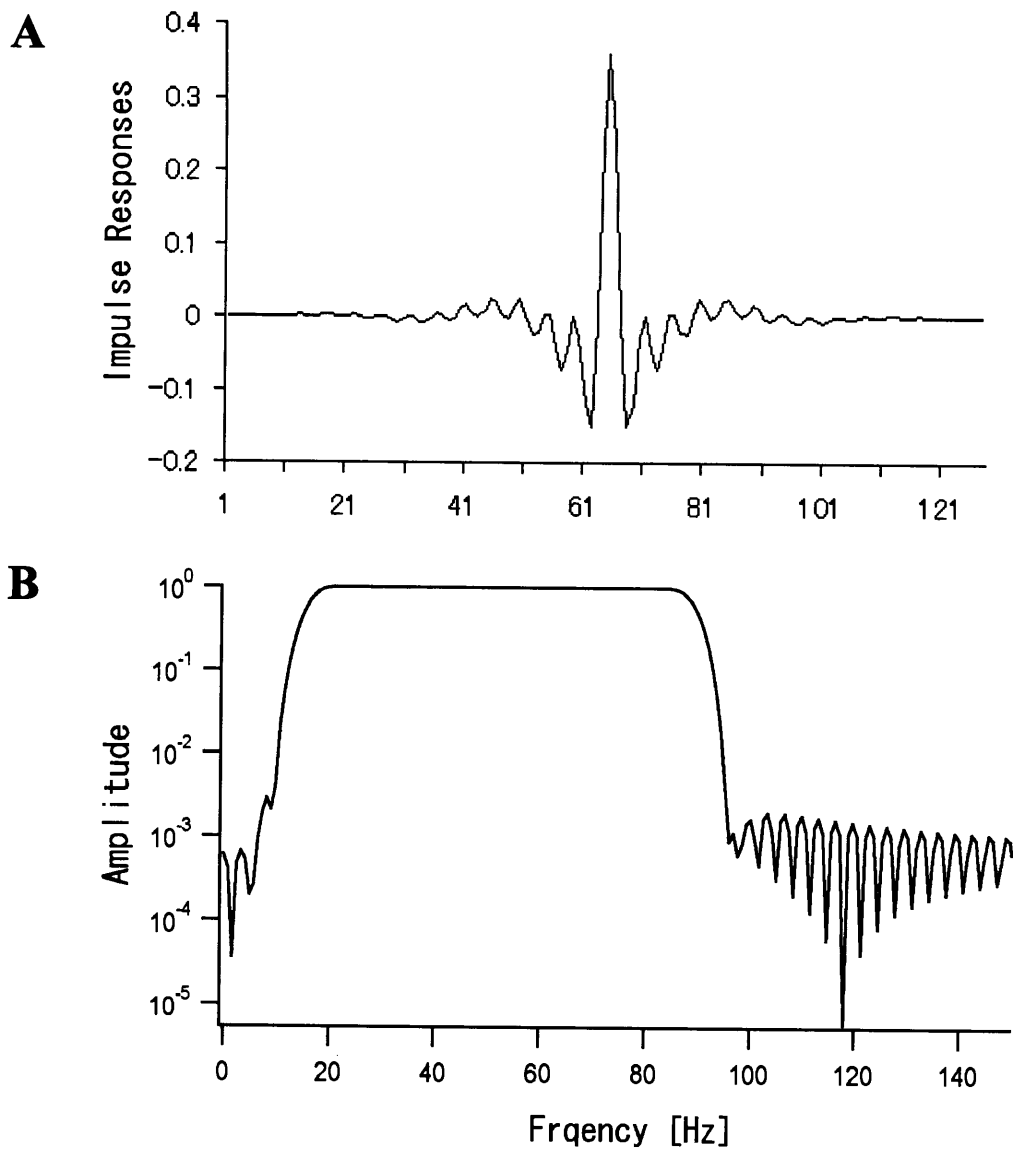


図 2.4.3-1 FIR フィルタ特性

**A:** FIR フィルタインパクトレスポンス列, **B:** フィルタ振幅特性. **FIR** フィルタは直線位相特性を持ち, 位相歪は生じない.

### ・周波数解析

測定系のノイズがショットノイズまで追い込まれていれば、得られるノイズは理想的には白色ノイズとなる[74]。従って、記録された蛍光強度の変化は膜電位によるものとショットノイズによる白色ノイズの合成信号となる。信号ノイズ比が低いために時間軸で応答を表現しても信号とノイズの判別が明確でない場合においても、周波数軸で応答を見た場合、バックグラウンドノイズがホワイトであれば、パワ密度がバックグラウンドより高い周期信号を見出すことができる。

周波数解析法としては最大エントロピ法を用いた。最大エントロピ法は、FFT(Fast Fourier Transform)に比較し、以下の利点を持つ。

- ① データの切り出した区間を全データとするため、切り出し区間データの最初と最後の値の不連続性によるスペクトル誤差がない。
- ② スペクトルが連続関数として得られるため、スペクトルの周波数分解能がデータ長に依存しない。

最大エントロピ法は1967年ボルグにより発表され[83 - 86]、地震波の解析等、1970年代から広く利用されてきた。

最大エントロピ法は、ある時間の信号が、それ以前の信号とインパルスレスポンスの畳み込み積分に白色ノイズが加わったもので表現できると仮定する。すなわち信号  $x(n)$ ,  $(n=0,1,2,\dots,N-1)$  に対し、次式を考える。

$$x(n) + \sum_{k=1}^p a_k \cdot x(n-k) = e(n) \quad (2.4.3-3)$$

$a_k$ は自己回帰係数、 $p$ はモデルの次数、 $e(n)$ は残差である。

式 2.4.3-3 の $e(n)$ を最小にするよう $a_k$ を決定すると、残差は白色ノイズであることを示すことができる。最大エントロピ法はこの性質を利用する。

まず始めに、残差が白色ノイズになることを示す。

今  $e(n)e(n-k)$ の期待値を  $E[e(n)e(n-k)]$ とする。式 2.4.3-3 で表せるモデルでは  $e(n)$ と  $x(n-k)$ ,  $k \geq 1$ は無相関（最大エントロピ原理）であるので、この性質を用い、

$k \geq 1$ の場合

$$\begin{aligned} & E[e(n)e(n-k)] \\ &= E\left[e(n)\left\{x(n-k) + \sum_{l=1}^p a_l x(n-k-l)\right\}\right] \\ &= E[e(n)x(n-k)] + \sum_{l=1}^p a_l E[e(n)x(n-k-l)] \\ &= 0 \end{aligned}$$

$k = 0$ の場合

$$\begin{aligned} & E[e(n)e(n)] \\ &= E[e^2(n)] \\ &= R_{xx}(0) + 2 \sum_{k=1}^p a_k R_{xx}(k) + \sum_{k=1}^p \sum_{l=1}^p a_k a_l R_{xx}(k-l) \end{aligned}$$

ここで、 $E[e^2(n)]$ を最小にするよう $a_k$ を求めるのであるから、下記式を上式に適用する.

$$\frac{\partial E[e^2(n)]}{\partial a_k} = 0$$

その結果

$$\sum_{l=1}^p a_l R_{xx}(k-l) = -R_{xx}(k) \quad k=1, 2, 3, \dots, p$$

を得る. よって,

$$\begin{aligned} & E[e^2(n)] \\ &= R_{xx}(0) + 2 \sum_{k=1}^p a_k R_{xx}(k) - \sum_{k=1}^p a_k R_{xx}(k) \\ &= R_{xx}(0) + \sum_{k=1}^p a_k R_{xx}(k) \\ &= \sigma_p^2 \end{aligned}$$

となる。まとめると

$$E[e(n)e(n-k)] = \begin{cases} \sigma_p^2 & (k=0 \text{ の時}) \\ 0 & (k \neq 0 \text{ の時}) \end{cases} \quad (2.4.3-4)$$

となり、平均=0、分散= $\sigma_p^2$ の白色ノイズとなることが示された。  
つぎに、

$$x(n) + \sum_{k=1}^p a_k x(n-k) = e(n) \quad (2.4.3-3 \text{ 再記})$$

であるモデルから  $e(n)$  が白色ノイズであることを利用し、パワースペクトルを求める方法を示す。  
式 2.2-3 を変形し、

$$e(n) - \sum_{k=1}^p a_k x(n-k) = x(n) \quad (2.4.3-5)$$

とする。これを Z 変換すると、

$$E(z) - \sum_{k=1}^p a_k \cdot Z^{-k} X(z) = X(z) \quad (2.4.3-6)$$

であり、 $X(z)$  は

$$X(z) = \frac{1}{1 + \sum_{k=1}^p a_k \cdot Z^{-k}} E(z)$$

となる。上式は、 $e(n)$ を伝達関数  $H(z)$ を持つシステムに入力した場合計測値  $x(n)$  が得られる系だと考えられるので、伝達関数  $H(z)$  は

$$H(z) = \frac{1}{1 + \sum_{k=1}^p a_k \cdot Z^{-k}}$$

であり、 $z = \exp(j2\pi f \Delta t)$ とおくことにより

$$H(e^{j2\pi f \Delta t}) = \frac{1}{1 + \sum_{k=1}^p a_k e^{-j2\pi f \Delta t}} \quad (2.4.3-7)$$

を得る。この伝達関数はフィードバックシステムの形をしており、この点で式 2.4.3-3 で表すモデルを自己回帰モデルとも呼ぶ。

信号のパワスペクトルは伝達関数の絶対値の 2 乗に入力信号のパワスペクトルを乗じたものであり、この場合入力平均=0、分散= $\sigma_p^2$ の白色ノイズであるから、測定信号のパワスペクトル  $X_p$  は下式 2.4.3-8 で示すことができる。

$$X_p(e^{j2\pi f \Delta t}) = \left| \frac{1}{1 + \sum_{k=1}^p a_k e^{-j2\pi f \Delta t}} \right|^2 \sigma_p^2 \Delta t \quad (2.4.3-8)$$

これより、入力信号  $x(n)$  のパワスペクトル  $X_p$  を連続関数として求めることができた。スペクトル関数が連続関数なため、計算機上の計算では出力間隔（パワスペクトル出力周波数分解能）

を自由に設定可能である。これはFFTの周波数分解能が解析時間の逆数で固定であることに比較すると大きな違いである。

次にボルグ法による自己回帰係数 $a_k$ を求める方法を示す。ボルグの方法では、前向き予測誤差 $fe^{(p)}(n)$ 、および後ろ向き予測誤差 $be^{(p)}(n)$ の2つを用い、自己回帰モデルを、

$$fe^{(p)}(n) = x(n) + \sum_{k=1}^p a_k^{(p)} x(n-k) \quad (2.4.3-9)$$

$$be^{(p)}(n) = x(n-p) + \sum_{k=1}^p a_k^{(p)} x(n-p+k) \quad (2.4.3-10)$$

と定義する。ただし、 $n = p, p+1, \dots, N-1$ である。

ここで、反射係数 $c_p$ を用いて式 2.4.3-9, 2.4.3-10 を書き直すと、

$$fe^{(p)}(n) = fe^{(p-1)}(n) + c_p be^{(p-1)}(n-1) \quad (2.4.3-11)$$

$$be^{(p)}(n) = be^{(p-1)}(n-1) + c_p fe^{(p-1)}(n) \quad (2.4.3-12)$$

$$n = p, p+1, \dots, N-1$$

反射係数 $c_p$ は前向き、後ろ向き予測誤差の2乗和平均を最小にするように決定する。すなわち、前向き、後ろ向き予測誤差の2乗和平均は

$$\frac{1}{2(N-p)} \sum_{n=p}^{N-1} \left[ \{fe^{(p)}(n)\}^2 + \{be^{(p)}(n)\}^2 \right] \quad (2.4.3-13)$$

より与えられるので、これを最小にする $c_p$ は

$$c_p = - \frac{2 \sum_{n=p}^{N-1} f e^{(p-1)}(n) \cdot b e^{(p-1)}(n-1)}{\sum_{n=p}^{N-1} \left[ \left\{ f e^{(p-1)}(n) \right\}^2 + \left\{ b e^{(p-1)}(n-1) \right\}^2 \right]} \quad (2.4.3-14)$$

である.

得られた反射係数を用い,  $\mathbf{a}^{(p)}$  を次の漸化式 2.4.3-15 より求める.

$$\begin{cases} c_p = a_p^{(p)} \\ a_k^{(p)} = a_k^{(p-1)} + c_p a_{p-k}^{(p-1)} \end{cases} \quad (2.4.3-15)$$

$$k = 1, 2, \dots, p-1$$

である.

このように自己回帰係数が求まったため次数  $p$  を決定すれば, 式 2.4.3-8 より, スペクトルを求めることが可能となった.

$$X_p(e^{j2\pi f \Delta t}) = \left| \frac{1}{1 + \sum_{k=1}^p a_k e^{-j2\pi f \Delta t}} \right|^2 \sigma_p^2 \Delta t \quad (2.4.3-8 \text{ 再記})$$

最後に使用した次数  $p$  の決定法を示す. いくつかの信号の線形和よりスペクトル関数  $\mathbf{X}(f)$  を推定するか, すなわち, 次数の決定は, 最終予測誤差 **FPE** を用いた. 次数の決定法には決定的な方法がなく, **FPE** は最も良く使用される次数の決定法の 1 つである. **FPE** は次式で定義される.

$$FPE(p) = \frac{N + p + 1}{N - p - 1} \sigma_p^2 \quad (2.4.3-16)$$

$2\sqrt{N} \leq p \leq 3\sqrt{N}$  の範囲でFPEを最小にする p を次数として採用した．FPEは赤池により提案された[87]．