

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 6 日現在

機関番号：82611

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K01275

研究課題名(和文) 柔らかい有機電極を用いる脳機能改善法の開発

研究課題名(英文) Development of organic fiber electrodes for improving brain functions

研究代表者

渡邊 恵 (Watanabe, Satoshi)

国立研究開発法人国立精神・神経医療研究センター・神経研究所 微細構造研究部・流動研究員

研究者番号：80302610

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：脳活動を長期間にわたって低侵襲で安定して測定したり、脳を適切に刺激する技術は、疾患の診断や生体機能補完などに重要である。ポリエチレンジオキシチオフェン(PEDOT)をベースとする導電性有機電極は生体親和性が高いが、従来は電気的特性が不十分であった。PEDOTにp-トルエンスルホン酸をドーピングして作成した電極では、電気的特性が大きく改善された。この電極を用いて、脳活動の測定や、脳の局所刺激による神経の活性化が可能になった。

研究成果の概要(英文)：Long-term recording of brain activity and stimulation are required for diagnosis of diseases and restoration of body functions through brain-machine interface. Poly(3,4-ethylenedioxythiophene) (PEDOT) based organic electrodes have high biocompatibility, but their electrical characteristics have been mostly insufficient for application to the brain. We fabricated an improved fiber electrode using PEDOT doped with p-toluene sulfonate (PEDOT-pTS). Using this electrode, we succeeded in recording neural activity or locally stimulating neurons to induce synaptic transmission.

研究分野：神経生理学

キーワード：導電性高分子 電気生理学 シナプス伝達 脳波 瞬目反射

1. 研究開始当初の背景

脳活動を長期間にわたって低侵襲で安定して測定することは、脳疾患の診断や、生体-機械インターフェースを介した生体機能補完などにおいて重要な技術である。また脳を適切に刺激することにより、疾患等による脳機能の低下を改善することができると考えられる。脳の活動測定や刺激には通常、金属やシリコン製の電極が用いられている。しかしこれらの電極は固く、生体組織にダメージを与えやすいため、長期間の安定した使用には困難がある。

ポリエチレンジオキシチオフェン (PEDOT) などの導電性有機材料をベースとする電極は柔軟性を持ち、生体親和性が高いことから、生体への応用が期待されている。しかし金属電極等と比べると抵抗が高いことから、用途が筋電位などの比較的大きな生体電気信号の計測に限られてきた。脳活動の測定や脳の刺激に用いるためには、さらなる改良が必要である。

2. 研究の目的

PEDOT をベースとした繊維状有機電極を改良し、脳活動の測定や脳の刺激に使用できるものを作成する。PEDOT は添加するドーパントや重合反応の条件によって性質が変わることが知られているので、これらを最適化する。作成した電極の電気的特性を解析し、従来の電極と比較して評価する。

次にこの電極を用いて、実際に脳活動の測定や、脳の刺激が可能かどうかを検討する。そのために、実験操作の容易なニワトリ胚を用いる。さらに加齢や脳疾患による脳機能障害やその改善について調べるために、古典的条件付けである瞬目反射条件付けをマウスを用いて行う。脳活動の解析等を目標とするため、頭部を固定しながら条件付けを行える実験系を確立する。

3. 研究の方法

PEDOT をドーパントである p-トルエンスルホン酸 (pTS) とともにシルク系 (直径 100 ~ 400 μm) に含浸させ、加熱により重合させて線維電極 (PEDOT:pTS 電極) を作成した。この電極の電気的特性を、電気化学アナライザーを用いて測定した。電極作成時の反応温度や、添加剤の効果についても検討した。また PEDOT:pTS 電極を布状素材上に数本並べた電極アレイを作成した。さらに比較のために、従来から用いられている、ドーパントとしてポリスチレンスルホン酸 (PSS) を用いた電極 (PEDOT:PSS 電極) も作成した。

これらの電極をニワトリ胚の脳硬膜上に設置し、電気活動を記録した。また刺激用の電極も設置し、これを通して通電刺激を行ったときの刺激誘発電位の測定を行った。

さらに頭部固定下でのマウスの瞬目反射

条件付けの実験系を作成した。マウスを条件付け装置への固定に慣れさせた後、条件付けを行った。条件付けは、音刺激 (条件刺激、300 ms) の直後に目に短時間 (30 ms) 空気を吹きかけて (無条件刺激) 行い、これを 1 日 100 回、10 日間繰り返した。その後 3 日間、条件刺激のみを与えて消去を行った。学習の指標となる条件反応は、高速ビデオカメラを用いて瞼の動きを撮影して検出した。

4. 研究成果

(1) PEDOT:pTS 電極の作成と評価

PEDOT:pTS 電極は 2 ~ 20 $\text{k} \Omega/\text{cm}$ 程度の抵抗を示した。反応液に多価アルコールを添加したり、反応温度や時間を最適化することにより、抵抗をさらに半分程度まで下げることが可能であった。一方、従来の PEDOT:PSS 電極の抵抗は数 $\text{k} \Omega/\text{cm}$ であった。このように、PEDOT をベースとした線維電極の電気特性を大幅に改善することができた。電極の電解質界面でのインピーダンスを解析すると、PEDOT:PSS 電極は抵抗と容量からなる等価回路を示したのに対し、PEDOT:pTS 電極は Warburg インピーダンスの特性を示したことから、PEDOT:pTS 電極では電極内でのイオン拡散が導電性に重要な役割を果たしていると考えられた。

次に、脳への埋め込みへの応用に向けて、電極の絶縁コーティング法を検討した。はじめにポリジメチルシロキサンなどの絶縁物質の塗布を行ったが、電極の柔軟性を損なわない厚さでは完全な絶縁を実現するのは困難であった。そこで次にパリレンの蒸着を試みたところ、約 2 μm 厚のコーティングによって、電極の特性を変えずに、ほぼ完全な絶縁を実現することができた。

(2) 脳活動の測定と学習評価系の確立

PEDOT:pTS 電極を用いて、実際に脳活動を測定できるかどうか検討した。PEDOT:pTS 電極をニワトリ胚の脳硬膜上に設置して測定を行った。その結果、ニワトリ胚の脳において、周波数約 60 Hz で、振幅が 10 μV 程度の自発性のガンマ帯域活動が測定された (図)。このガンマ帯域活動は、目に対する光刺激によっても誘発された。さらに PEDOT:pTS 電極を用いて作成した電極アレイを用いて、多点同時測定を行ったところ、ガンマ帯域活動が異なる脳部位の間で強く同期していることが明らかになった。ガンマ帯域活動は孵化の 4 日前頃から出現し、徐々に頻度と振幅が増加していった。このような活動は、ニワトリの認知機能の早い発達と関連している可能性が考えられる。一方、PEDOT:PSS 電極ではこのような活動は測定されなかった。本研究で作成した PEDOT:pTS 電極を用いることにより、有機線維電極が脳に適用可能になったと考えられる。

次に PEDOT:pTS 電極を用いて、脳の刺激が可能かどうか検討した。脳表面に刺激用と記録用の各 1 対の PEDOT:pTS 電極を設置し、刺激電極に通電して、誘発される電位を記録電極から測定した。その結果、比較的大い電極（直径 400 μm ）を用いた場合には、通電によりシナプス電位を誘発することが可能であった（図）。しかし細い電極（直径 100 μm ）を用いた場合は、シナプス電位は誘発されなかった。従って脳の刺激に応用するためには、さらなる抵抗の低減が望ましいと考えられた。この電極の体積抵抗率は 2~6 cm 程度で、PEDOT:pTS 単体の抵抗率より 3 桁程度高いことから、基材の形状や PEDOT:pTS のコーティング法の検討などによってさらに改善できる余地があると考えられる。

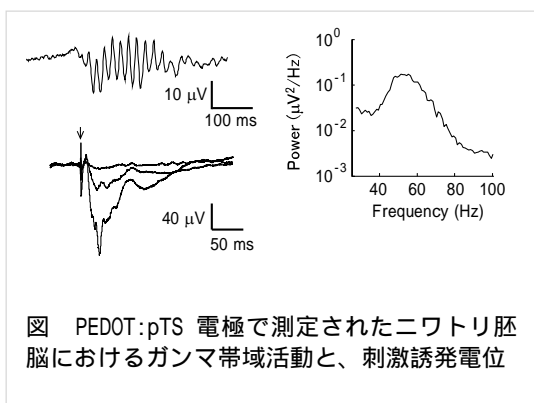


図 PEDOT:pTS 電極で測定されたニワトリ胚脳におけるガンマ帯域活動と、刺激誘発電位

さらにマウスの瞬目反射条件付けを行った。脳への電極のアプローチを容易にするため、頭部を固定した状態で条件付けができるシステムを開発した。音を条件刺激とし、瞼への空気の吹きつけを無条件刺激とする条件付けを 10 日間繰り返し、条件反応は瞼のビデオ画像を用いて検出した。その結果、条件付け群では条件付けの開始直後から、条件付け期間を通して条件反応の増加がみられた。また消去期間には速やかな消去がみられた。条件刺激と無条件刺激の間隔をランダムにした偽条件付け群では、条件反応の増加はみられなかった。さらに、神経損傷からの回復を促進する作用が知られている chondroitinase ABC を小脳深部核に注入してから条件付けを行ったところ、対照群に比べて条件反応の有意な増加がみられた。小脳スライスを用いる解析の結果、これは小脳深部核におけるシナプス前終末からの GABA の放出の増強によることが示唆された。

5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕(計 4 件)

1. Moritoshi Hirono, Satoshi Watanabe, Fuyuki Karube, Fumino Fujiyama, Shigenori

Kawahara, Soichi Nagao, Yuchio Yanagawa, Hiroaki Misonou, Perineuronal nets in the deep cerebellar nuclei regulate GABAergic transmission and delay eyeblink conditioning. *J. Neurosci.* in press (2018) (査読有)

2. Satoshi Watanabe, Hideyuki Takahashi, Keiichi Torimitsu, Electroconductive polymer-coated silk fiber electrodes for neural recording and stimulation in vivo. *Jpn. J. Appl. Phys.* 56: 037001 (2017) (査読有)

3. Satoshi Watanabe, Moritoshi Hirono, Phase-dependent modulation of oscillatory phase and synchrony by long-lasting depolarizing inputs in central neurons. *eNeuro* 3: e0066-16.2016 (2016) (査読有)

4. Satoshi Watanabe, Fumihito Takanashi, Kouhei Ishida, Suguru Kobayashi, Yoshiichiro Kitamura, Yuuta Hamasaki, Minoru Saito, Nitric oxide-mediated modulation of central network dynamics during olfactory perception. *PLoS One* 10: e0136846 (2015) (査読有)

〔学会発表〕(計 10 件)

1. Moritoshi Hirono, Satoshi Watanabe, Shigenori Kawahara, Soichi Nagao, Yuchio Yanagawa, Hiroaki Misonou, Perineuronal nets of deep cerebellar nuclear neurons modulate GABAergic transmission and regulate eyeblink conditioning, The 40th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society, 2017. 7. 20-23, Chiba.

2. Moritoshi Hirono, Satoshi Watanabe, Shigenori Kawahara, Soichi Nagao, Yuchio Yanagawa, Hiroaki Misonou, Perineuronal nets in the deep cerebellar nuclei regulate GABAergic synaptic transmission and delay eyeblink conditioning, The 94th Annual Meeting of the Physiological Society of Japan, 2017. 3. 28-30, Hamamatsu.

3. Satoshi Watanabe, Moritoshi Hirono, Phase-dependent modulation of neural oscillations by synaptic inputs, The 54th Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan, 2016. 11. 25-27, Tsukuba.

4. Keiichi Torimitsu, Yusuke Takizawa, Hideyuki Takahashi, Satoshi Watanabe, Tatsuma Sonobe, Conductive silk electrode for intra/extra bioelectrical measurement,

The 38th Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology, 2016. 8. 17-20, Orlando, FL, USA.

5. Satoshi Watanabe, Moritoshi Hirono, Phase-dependent effects of synaptic inputs on neural oscillations, The 39th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society, 2016. 7. 20-22, Yokohama.

6. Moritoshi Hirono, Satoshi Watanabe, Shigenori Kawahara, Soichi Nagao, Yuchio Yanagawa, Hiroaki Misonou, Perineuronal nets regulate GABAergic synaptic transmission in the deep cerebellar nuclei, The 93rd Annual Meeting of the Physiological Society of Japan, 2016. 3. 22-24, Sapporo.

7. 瀧澤 勇介, 園部 達真, 高橋 秀幸, 渡辺 恵, 鳥光 慶一 導電性シルク電極を用いた生体活動電位計測 第76回応用物理学会秋季学術講演会, 2015. 9. 13-16, 名古屋.

8. Satoshi Watanabe, Hideyuki Takahashi, Keiichi Torimitsu, Multi-site recording of brain activity using flexible organic electrodes. The 53rd Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan, 2015. 9. 13-15, Kanazawa.

9. Yusuke Takizawa, Tatsuma Sonobe, Hideyuki Takahashi, Satoshi Watanabe, Matsuhiko Nishizawa, Keiichi Torimitsu, Fabrication of flexible silk electrode for real-time bioelectrical monitoring, The 38th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society, 2015. 7. 28-31, Kobe.

10. Keiichi Torimitsu, Tatsuma Sonobe, Yusuke Takizawa, Hideyuki Takahashi, Satoshi Watanabe, Developmental chick neuronal activity measurement using silk flexible electrode. The 1st Congress of the European Academy of Neurology, 2015. 6. 20-23, Berlin, Germany.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

渡邊 恵 (WATANABE, Satoshi)
国立研究開発法人国立精神・神経医療研究センター・神経研究所 微細構造研究部・流動研究員
研究者番号 : 80302610

(2) 連携研究者

鳥光 慶一 (TORIMITSU, Keiichi)
東北大学・大学院工学研究科・教授

研究者番号 : 00393728

川原 茂敬 (KAWAHARA, Shigenori)
富山大学・大学院理工学研究部(工学)・教授

研究者番号 : 10204752

廣野 守俊 (HIRONO, Moritoshi)
同志社大学・研究開発推進機構・准教授
研究者番号 : 30318836