

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 5月31日現在

機関番号：82401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2011～2012

課題番号：23860071

研究課題名（和文） 超安定な神経活動計測に向けた脳振動追従型3次元マニピュレータシステムの開発

研究課題名（英文） Development of a micromanipulator tracking brain micromotion in 3D for ultrastable intracellular recording.

研究代表者

太田 桂輔 (OTA KEISUKE)

独立行政法人理化学研究所・行動神経生理学研究チーム・基礎科学特別研究員

研究者番号：40610382

研究成果の概要（和文）：

生体内で脳は振動しているにも関わらず、神経細胞の膜電位応答を記録する電極は実験台に固定されている。脳内の情報処理を解き明かすためには膜電位応答の記録が必須であるが、このような測定系では行動中の動物から長期間の安定した神経活動記録を行うことはできない。そこで本研究では脳振動追従型3次元マイクロマニピュレータシステムを開発することで、行動中の動物から2つの神経細胞の膜電位応答を同時に長時間安定して記録することを目指す。

研究成果の概要（英文）：

Animal brains swags in vivo. On the other hand, the intracellular recording electrode is fastened on to a base in the experiment. The intracellular recording is necessary for elucidating the information processing in the brain, but the current intracellular recording system does not realize a long-term stable recording in behaving animals. To solve this problem, I will develop a micromanipulator tracking brain micromotion in 3D and aim to simultaneously record the membrane potentials from two neurons in behaving animals.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2012年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,500,000	750,000	3,250,000

研究分野：工学

科研費の分科・細目：機械工学・機械力学・制御

キーワード：細胞内記録 行動神経生理学 脳振動計測 追従制御 高速画像処理

1. 研究開始当初の背景

神経細胞間の情報伝達機構を解明するためには、神経細胞の膜電位(細胞内外の電位差)が閾値を超えたときに発生する急激な膜電位上昇(活動電位)だけではなく、閾値下の膜電位変化(シナプス後電位)を測定しなければならない。なぜならば、シナプス後電位には活動電位を誘発させた他細胞からの入力に関する情報が含まれているためである(図1)。そして、同時に2つの神経細胞の膜電位応答(活動電位とシナプス後電位)を記録することで初めて、神経細胞間の情報伝達を明らかにできる。(※一般に膜電位応答とは

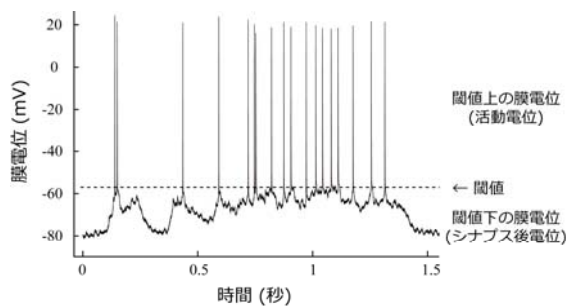


図1 膜電位応答とは活動電位とシナプス後電位を含む活動電位とシナプス後電位の両者を含めた神経細胞の電気応答を示す。)

膜電位応答を測定する手法として、微小電極法とパッチクランプ法が存在する。どちらの手法もわずかな振動で細胞から電極が外れてしまうという欠点を持つ。これは大きさおよそ数 10~30 μm の神経細胞に太さ数十 nm が刺入する(微小電極法)または数 μm のガラス電極を密着させる(パッチクランプ法)ことにより記録が成立していることを考えれば容易に想像できる。従って、行動中の動物から膜電位応答を記録することは行動に伴う振動の影響により不可能であると考えられていた。

近年、この問題を解決するべく頭蓋骨と記録電極を歯科用セメントで固める(Epsztein et al. *Science* 2010, Long et al. *Nature* 2010)、空気で浮いたボール上に動物を走行させる

ことで行動に伴う振動を減少させる(Harvey et al. *Nature* 2009)など、行動中の動物から神経細胞の膜電位応答を記録する様々な試みが行われている。しかしながら、行動中の動物から神経細胞の膜電位応答を長時間に渡り記録することを達成し、2細胞の膜電位を同時記録した研究は存在しない。

2. 研究の目的

行動中の動物から細胞内記録法により長時間(およそ2時間以上)の安定した膜電位応答の計測を達成し、同時に2つの神経細胞から細胞内記録を行うことを目的とする。

3. 研究の方法

先行研究の測定手法の問題点は頭蓋骨の振動と同期して記録電極が動くように設計されていることである。動物の脳は頭蓋骨の中に満たされた脳脊髄液に浮かんでおり、動物の行動に伴う脳の振動は頭蓋骨の振動よりも大きいと考えられる。従って、頭蓋骨の振動と同期させるように記録電極を動かしても安定した膜電位応答記録はできるとは限らない。

この考えに基づき、実際に研究代表者はレーザ変位計を用いて脳の振動と頭蓋骨の振動をそれぞれ計測した。頭蓋骨の振動と比べて、脳自体の振動が大きいことが明らかになった(図2)。この結果より、行動中の動物から安定した膜電位応答を計測するためには、(頭蓋骨ではなく)脳と記録電極先端の位置

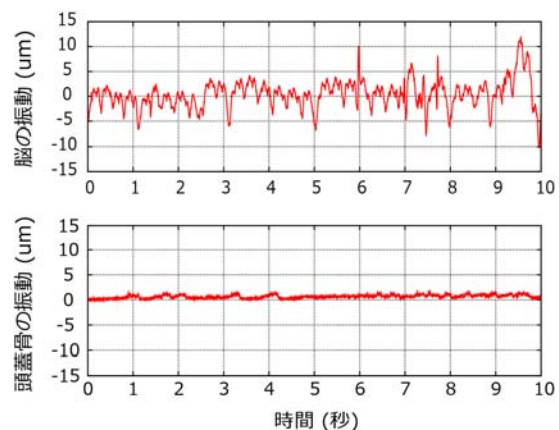


図2 脳の振動と頭蓋骨の振動の比較

関係が長時間に渡り一定に保たなければな

らないことが示唆される。脳髄液中に浮かんだ脳を固定し脳の振動を抑えるのは生体への侵襲度が高いため、脳振動を測定しその動きを3次元で追従するように記録電極を動かす脳振動追従型3次元マイクロマニピュレータシステムを構築する。

本システムでは、生きている動物の脳振動を3次元で計測し、計測した脳振動を追従するように記録電極の位置を3次元でリアルタイム補正するシステムを構築する。

本研究目的の実現可能性を上げるためにパッチクランプ法ではなく微小電極法を採用する。パッチクランプ法では細胞付近で陰圧をかけ細胞膜を吸い込むことで記録電極と細胞膜を密着させる(ギガシール形成)。ギガシール形成に失敗したときは記録電極先端に脳内の組織が付着してしまっているため、記録電極を取り換えなければならない。2つの神経細胞から膜電位応答を記録する場合、記録電極の取り換えに伴う振動により既に膜電位を記録している1つ目の神経細胞から記録電極が外れてしまうことがある。一方、微小電極法では高電流を記録電極にかけることで先端部分の汚れを除去しながら記録電極を脳内に進めていく。たとえ神経細胞への電極の刺入に失敗したとしても、高電流をかけて電極先端の汚れを除去することで同一の電極で新たな神経細胞への刺入を試みることができる。従って、1つの電極で複数の神経細胞を狙うことができるため記録電極を取り換える回数は減る。微小電極法の方がパッチクランプ法に比べて2細胞同時記録の成功率が高いと考えられる。

4. 研究成果

本研究課題の初年では、機器開発に当たり以下の研究を実施した。

(1) 追従する脳振動周波数の同定

頭蓋骨を固定したマウスを走行させ、マウスの脳振動をレーザ変位計により計測した。レ

ーザで振動・変位を測定する場合、対象物が照射したレーザを反射しなければならない。しかしながら、脳にレーザを照射しても反射することなく光は全て脳の中に拡散してしまう。そこで、極小の金属金具(0.5mm×0.5mm×2mm)を製作し、効率的に光を反射するシートを金属金具に接着させ、それを脳に挿入した。金属金具に接着した反射シートにレーザを当てることで、脳の振動を測定できることを確認した。計測したデータを解析し、レーザ変位計により計測した脳振動を4 μ m以内の誤差で追従するためには、記録電極先端がおよそ300 Hzで動かなければならないことが明らかになった。

(2) 3次元マニピュレータの開発

まず、(1)の結果に基づきxyz方向にそれぞれ40 μ mずつ動くピエゾステージを用意した。ピエゾステージに取り付けるマニピュレータは50 g以下でなければならぬため、成茂科学器械研究所の協力のもとに既存のマニピュレータ(Narishige MHW-4)を軽量化した。軽量化したマニピュレータの動作確認をし、従来通りに細胞内記録が行えることを確認した。固定冶具も含めて重量を50 g以下に抑え、ピエゾステージにマニピュレータを固定する機構を整えた。

(3) 3次元マニピュレータの追従制度評価

軽量化したマニピュレータをピエゾステージに固定し、そのピエゾステージを(1)で計測した脳振動通りに動かした。つまり、ピエゾステージに取り付けたマニピュレータ、マニピュレータ先端の電極先端が脳振動を追従するように動いたときの挙動を評価した。このときにマニピュレータに取り付けた記録電極先端や固定部位の動きをレーザ変位計で計測した(図3)。図3から、疑似脳振動で稼働したピエゾステージ部分から記録電極先端に向かうに従って、振動が大きくなっていることがわかる。疑似的な脳振動に対して記録電極先端は4 μ m以下に収まって動くことが明らかになった。

本研究課題の2年目は、初年度で得た結果に応じて脳振動の計測方法を変更した。当初の研究計画では、レーザ変位計またはレーザド

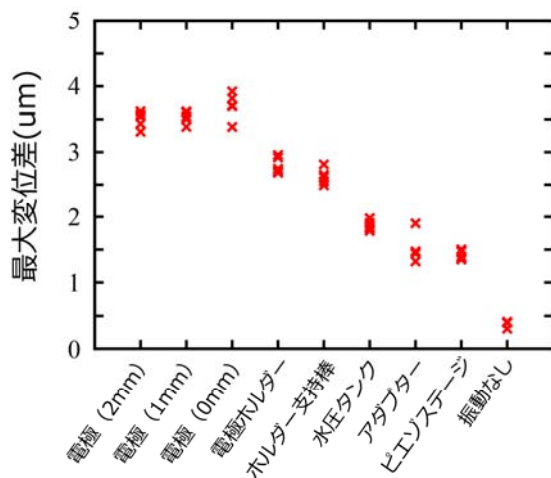


図3 ピエソステージに固定した軽量マニピュレータの振動検査結果
 ップラ振動計を用いて脳振動を計測する予定でいた。しかし、この方法では長時間の脳振動計測に不向きであることが明らかになった。レーザ変位計は受光エラーが生じ易く、一度受光エラーが生じててしまえば計測復帰までに時間がかかってしまう。また、レーザドップラ振動計ではオフセット成分の重量により速度の直流成分を長時間正確に計測できないという理由による。そこで、高速ビジョンシステムによる脳振動計測システムの確立に着手した。システム構築のために必要な予備実験、機器の選定、固定治具の製作は既に完了した。

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0件)

[学会発表] (計0件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

太田 桂輔 (OTA KEISUKE)

独立行政法人理化学研究所・行動神経生理学
 研究チーム・基礎科学特別研究員

研究者番号：40610382