

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 16 日現在

機関番号：14603

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2014～2015

課題番号：26882027

研究課題名(和文) 小型動物の自由行動実験に使用する埋植用小型脳機能計測・刺激双方向光デバイスの開発

研究課題名(英文) An implantable neural bidirectional device for behavior experiments of small animals

研究代表者

春田 牧人(Haruta, Makito)

奈良先端科学技術大学院大学・物質創成科学研究科・博士研究員

研究者番号：40733663

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：小型実験動物の頭部に埋植可能な小型脳機能計測・刺激双方向光デバイスを開発し、行動実験中の脳活動計測とオプトジェネティクス技術による脳活動光制御を目指した研究を行い、以下の成果を得た。(1)成体マウスの体重の1/100である重量0.2 gの小型デバイスを開発した。(2)デバイスに搭載された脳機能計測機能を使用し大脳皮質一次体性感覚野における脳活動計測に成功した。(3)デバイスに搭載された多点光刺激機能を使用しチャンネルロドプシン2を発現した遺伝子組み換えマウスにおいて光刺激による神経活動の制御に成功した。

研究成果の概要(英文)：We have developed an implantable neural bidirectional device for understanding brain functions in behavior experiments of small animals. This device has two functions which are optically detecting and controlling brain activities. In this study, we achieved the following results; (1) The device weights about 0.2 g which is much lighter than the weight of an adult mouse. (2) The device detected brain activities in the smart somatosensory cortex when the frontal limb was stimulated. (3) The device controlled brain activities using multi optical stimulations in a brain of channelrhodopsin2-NestinCre transgenic mice.

研究分野：脳計測学

キーワード：CMOSイメージセンサ 脳機能イメージング 脳血流計測 オプトジェネティクス 生体埋植デバイス
多点光刺激

1. 研究開始当初の背景

難病性の神経疾患の筋萎縮性側索硬化症 (ALS) や脊椎損傷などでは、脳からの情報伝達を行う神経組織が損傷することにより、体の運動制御機能や感覚機能が損なわれる。申請者はこれら脳機能障害の治療と回復に貢献することを目指し、失われた機能の代替となる義手や神経伝達システム等の人工機能の開発と実現を目的とする。

運動機能や感覚機能の再生には、動物の行動時に行われている高次脳機能の解明が必要とされる。また、麻酔された動物と覚醒している動物では、脳機能活性が異なることが既に知られているため、行動に関わる脳機能解明には覚醒下における機能計測が重要である。しかし、現在の主流となっている脳機能解明に関する研究手法では、麻酔や拘束といった動物が行動を制限された環境で行われている。これは脳機能の計測装置である顕微鏡や電気生理装置が実験動物よりも大型であることが理由である。まず、動物の行動を制御せずに脳機能計測が可能なデバイスの開発が重要である。

光ファイバーや超小型の顕微鏡を使った脳機能イメージング手法が開発され、自由行動下における体性感覚野の観察や神経細胞の機能解明などの画期的な成果が報告されている[1,2]。しかし、現在報告されている脳機能観測用のデバイスは、小型動物の頭部のサイズに比べると大きいため動物への負担も大きく行動に制限をあたえてしまい、本来の行動に伴った脳機能観察を行うことが困難である。そのため、動物の行動に影響を与えない脳機能観測用デバイスの開発が脳機能の研究において重要な課題である。

[1] K.K. Ghosh, L.D. Burns, E.D. Cocker, A. Nimmerjahn, Y. Ziv, A. El Gamal, and M.J. Schnitzer, *Nat. Methods* 8, 871 (2011). [2] I. Ferezou, S. Bolea, and C.C.H. Petersen, *Neuron* 50, 617 (2006).

2. 研究の目的

本研究では自由行動下における脳機能解明を目指し、マウスの様に小さな動物の頭部に埋植可能な小型脳機能計測・刺激双方向光デバイスの開発を目的とする。近年、動物の運動制御や記憶に関わる高次脳機能解明において、動物の自由行動下における安定した脳機能計測手法の確立が必要とされている。現在行われている脳機能研究の多くでは、麻酔や拘束された動物を用い、実験動物よりも大きな顕微鏡等の装置を用いて行われているため行動が制限されている。そのため、現状用いられる手法では、自由行動下における脳機能計測が困難である。本研究では、実験に用いられる小型動物の行動を可能な限り制限しない小型デバイスを開発し、自由行動下における脳機能解明を実現する。研究計画では、脳内の血流内因性シグナルを用いて、自由行動下にある動物の脳内運動制御メカニ

ズム解明を目指した小型デバイスを開発する。さらに自由行動下にある小型動物の脳活動を制御のための埋植型脳機能光刺激用のデバイスを開発する。

3. 研究の方法

本研究計画では、ラットやマウスといった小型動物の自由行動実験下において使用可能な埋植可能な刺激・計測双方向デバイスの開発を行う。急性脳機能計測実験による刺激・計測双方向デバイスの機能評価を行い、さらに慢性的にデバイスを埋植する技術の確立を目指す。そのため、長期埋植が可能なデバイスとして最適化を行い、脳機能計測の評価を行う。次の段階として、マイクロ LED アレイ搭載光刺激デバイスを用いた長期埋植および光刺激実験を行う。この実験には光感受性膜蛋白質を遺伝的に導入されたマウスを用いオプトジェネティクス技術によるデバイスの機能実証を行う。実験の最終段階には、埋植可能な刺激・計測双方向光デバイスの開発を開始する。脳機能計測と光刺激を同時に行える埋植用双方向光デバイスを開発することにより、感覚器からの入力による行動のフィードバック機能を再現し、脳機能メカニズム解明に貢献する。

4. 研究成果

(1) 刺激・計測双方向光デバイスには、脳機能計測機能と神経細胞光刺激機能が搭載されている。本デバイスは CMOS 標準プロセスにより製造された CMOS イメージセンサが搭載される。CMOS プロセスを利用することによって、1 チップ上で 2 種類の異なった機能を使用するデバイスの多機能化を実現した。画像撮影回路では、脳機能計測のための 256 x 256 画素が搭載され、60fps での動画撮影を行う。光刺激回路では、LED 点灯用の回路が搭載され、アレイ上の LED を任意に選択し点灯する。刺激・計測双方向光デバイスは、ポリイミド性のフレキシブル基板上に CMOS イメージセンサと光刺激用 LED アレイ (波長 465nm)、光源用 LED (波長 535nm) を実装する。

(2) 刺激・計測双方向光デバイスの脳表への埋植を行い、生体内での脳機能計測機能と神経細胞光刺激機能の駆動確認を行った。まず、脳機能計測のためのイメージングシステムの駆動を行った。イメージングデバイスの撮像結果においても、画像顕微鏡画像と同様に脳表の血管の様子を観察することに成功した。次に、脳表撮像中の光刺激機能の駆動を行った。本デバイスは計測機能と光刺激機能はそれぞれ独立した回路を使用しているため、個別に制御することが可能である。

(3) 麻酔下にあるラットの右前肢に対して感覚刺激装置による刺激を与え、その時の大脳皮質一次感覚野前肢受容野における輝度変化を観察した。実験では、露出させた脳表にデバイスを脳表に直接設置し、デバイスに

よって脳表のイメージを取得する。デバイスにより血管を観察できており、観察した領域は大脳皮質一次体性感覚野前肢受容野にあたる領域である。実験ではこの場所における脳機能計測実験を行った。

前肢刺激によって得られたヘモダイナミクスの解析結果では2秒から5秒の間に特徴的な輝度変化を計測した。強い輝度変化が観察され、計測領域が前肢受容野であると考えられる。なお、後脚を刺激した時の計測領域の観察結果では、刺激に対する応答は現れなかった。

(4) 遺伝子組み換えマウス(ChR2-Cre)の脳表に対する光刺激実験を行った。デバイスによる光刺激実験を行った。デバイスによって活性化された神経活動を観察するために、選択したLED付近に電位計測用のタングステン電極の先端を設置し、電気生理実験を行った。本実験では3種類の光刺激実験を行った。光刺激機能のみを駆動した時の実験結果では、青の矢印が示す光刺激時のみに特異的な電位変化を記録することに成功した。これは光刺激により励起された神経活動であることを示す。デバイスのイメージング機能も同時に動作させた時の結果においても、光刺激時に特異的な電位応答を計測することに成功した。最後にネガティブコントロール実験として野生型マウスを使った実験を行い、光刺激に対する応答は観察されなかった。

本研究では脳機能イメージング機能と多点光刺激機能を組み合わせた埋植用小型脳機能計測・刺激光双方向デバイスを開発し、光計測と光刺激の双方向による脳機能解明手法を実現した。これらの成果は、身体機能の回復や治療を行う医療研究への貢献が期待できる。

なお、本研究における動物実験は奈良先端科学技術大学院大学動物実験の実施に関する規定に従って行った。

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 1件)

“ Intrinsic signal imaging of brain function using a small implantable CMOS imaging device ”, Makito Haruta, Yoshinori Sunaga(他 6名,1番目), Japanese Journal of Applied Physics, 54(4S), 04DL10, 2015. 査読有り

DOI: 10.7567/JJAP.54.04DL10

[学会発表](計 8件)

1) “ An implantable hemodynamic imaging device for revealing relation between a blood flow and brain activity in animal behavior ”, Makito Haruta, Yoshinori Sunaga(他 11名,1番目), Neuroscience2015 予稿集, 732.11, Oct. 21, 2015. Chicago, USA.

2) “ An implantable hemodynamic imaging device for observing the process of recovery from cerebrovascular disease ”, Makito Haruta, Yoshinori Sunaga(他 9名,1番目), Engineering in Medicine and Biology Society 予稿集, FrFPoT2.36, Aug.28, 2015. Milan, Italy.

3) “ An implantable hemodynamic imaging device with a two-color light source for observing two brain phenomena ”, Makito Haruta, Yoshinori Sunaga(他 5名,1番目), 2015 International Symposium for Advanced Materials Research 予稿集, 18, 招待講演, Aug.19, 2015. 南投県魚池郷, 台湾.

4) “ Wireless optical multi-point stimulation device for brain controlling in an awake animal ”, Makito Haruta, Naoya Kamiyama (他 11名,1番目), 第38回日本神経科学大会予稿集, 2P364, Jul.29, 2015. 神戸国際展示場, 兵庫県神戸市.

5) “ 埋め込み可能な小型脳血流イメージングデバイスの開発 ”, 春田牧人, 須永圭紀(他 9名,1番目), 電気学会 E 部門総合研究会予稿集, Jul.3, 2015. 九州大学医学部百年講堂(福岡県福岡市). バイオ・マイクロシステム研究会優秀論文発表賞受賞

6) “ An implantable optogenetics device based on CMOS integrated circuit technology for a freely moving animal ”, Makito Haruta, Naoya Kamiyama (他 8名,1番目), Neuroscience2014 予稿集, 271.08, Nov.16, 2014. Washington, USA.

7) “ A multi-modal implantable CMOS imaging device with two-color light source for intrinsic signal detection in a brain ”, Makito Haruta, Yoshinori Sunaga(他 6名,1番目), International Conference on Solid State Devices and Materials 予稿集, D-7-3, Sep.11, 2014. つくば国際会議場(茨城県つくば市).

8) “ Brain functional imaging with an implantable CMOS imaging device for using in a behavior experiment ”, Makito Haruta, Yoshinori Sunaga (他 8名,1番目), 第37回日本神経科学大会予稿集, P2397, Sep.12, 2014 パシフィコ横浜(神奈川県横浜市).

[図書](計 0件)

[産業財産権]
出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

[その他]

ホームページ等

<http://mswebs.naist.jp/LABs/pdslab/index-j.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

春田 牧人 (HARUTA, Makito)

奈良先端科学技術大学院大学・物質創成科
学研究科・博士研究員

研究者番号：40733663