

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24年 6月 1日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究（A）

研究期間：2008～2011

課題番号：20240023

研究課題名（和文） マルチスケールな時空間ニューロダイナミクスの計測と制御

研究課題名（英文） Measurement and control for multiscale-spatiotemporal neurodynamics

研究代表者

郷原 一寿（GOHARA KAZUTOSHI）

北海道大学・大学院工学研究院・教授

研究者番号：40153746

研究成果の概要（和文）：

時間的には約10桁、空間的には約3桁に渡る極めて広いマルチスケールな時空間ニューロダイナミクスの計測と制御を行うことを目標に、多電極アレイ上で神経細胞を長期に渡って培養し、インパルスの信号検出およびネットワークの形成過程の観察を行う実験手法を構築し、得られたデータの解析を行うこと目的とした。その結果、多電極アレイ上で、ほぼ安定して数ヶ月以上の長期に渡る神経細胞培養の手法を確立した。また、培養したニューラルネットワークから、長期間連続して、インパルスが計測できるシステムを構築し、さらに、免疫蛍光染色によって、数ヶ月に渡ってネットワークの成長過程を、ニューロンの主要構成要素の変化として計測できる手法を確立した。ニューラルネットワークの基本問題に取り組むためのウェットな実験的研究基盤を独自に構築することが一つの大きな目標であったが、本研究で目的とした実験系の構築は達成され、さらにそれを適用し、重要な結果が得られた。本研究によって構築されたシステムおよび方法に対して、さらに改良を加えることで、時空間ニューロダイナミクスの基本的理解・解明と応用への展開が期待できる。

研究成果の概要（英文）：

This project has challenged to measurement and control of multi-scale spatiotemporal neuronal dynamics, three-figure spatially and ten-figure temporally. The aim of the project is as follows; long term culture on multi-electrode array, detection of impulses, observation of way of growing neuronal networks, and analysis of obtained data. As a result, we established long term primary neuronal dissociative cell culture on multi-electrode arrays. Moreover, immunocytochemistry of some proteins was also established for main parts of neuron during several month. The main subject of construction of experimental systems to attack basic problems in neuroscience was achieved. Using constructed system, we obtained important issues of the related field. One of the results is a minimum density of surviving neurons that caused synchronized bursts. Further development of the present works is expected to execute the future fruitful studies on spatiotemporal neuronal dynamics.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	12,300,000	3,690,000	15,990,000
2009年度	15,800,000	4,740,000	20,540,000
2010年度	5,300,000	1,590,000	6,890,000
2011年度	5,300,000	1,590,000	6,890,000
2012年度	0	0	0
総計	38,700,000	11,610,000	50,310,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：感性情報学・ソフトコンピューティング ニューラルネットワーク

キーワード：ニューラルネットワーク，ダイナミクス，培養神経細胞，マルチスケール

1. 研究開始当初の背景

脳の情報処理は、空間的に広がりのあるニューロンのネットワーク中を、電気信号のインパルスが行き交う、時間と空間の極めて広いマルチスケールで生じる時空間ダイナミクスによって生じている。ばらばらの単体ニューロンが、知覚・運動・記憶・学習を通して、互いに結合しながらネットワークを構築し発達・成長する過程で、個々のニューロンのインパルスがどのようにネットワーク中を伝わっているのかは、脳情報処理の解明・応用を目指す多くの研究者に共通した極めて本質的かつ重要な問題であるにも関わらず、ほとんど解明されていない。

2. 研究の目的

背景に記述した問題に取り組む研究基盤を構築するために、時間的には約10桁、空間的には約3桁に渡る極めて広いマルチスケールな時空間ニューロダイナミクスの計測と制御を行うことを目標に、多電極アレイ上で神経細胞を長期に渡って培養し、インパルスの信号検出およびネットワークの形成過程の観察を行う実験手法を構築し、得られたデータの解析を行うこと目的とした。

3. 研究の方法

多電極アレイを用いて、次の4つについて研究を行った。

- (1) 神経細胞長期培養システムの構築
- (2) 時間ダイナミクス計測システムの構築
- (3) 空間ダイナミクス計測システムの構築
- (4) 時空間ダイナミクスの制御

以下に、各項目に対応して概略を記述する。

(1) ウェットな培養系は、個体から細胞を採取する時点でのバラツキが大きい。よって、同一個体から採取された複数の培養細胞に対して同一の現象が起きていることを保証することが必要となる。また、初期分散密度などの異なる培養条件下でも再現性のある実験データを取得することが重要になる。そこで神経細胞を安定して数ヶ月の長期に渡って培養を可能とするシステムの構築を行った。

(2) 多電極アレイ測定系を最大8個並列化し、64極の電極から電気信号を長期に渡って計測可能とするシステムを、ハード・ソフト両面から検討し、数ヶ月間の連続測定が可能な並列システムを構築した。

- (3) 共焦点レーザー顕微鏡を導入し、免疫蛍

光染色による、培養ニューラルネットワークの3次元計測に関する実験を進めた。また、光学顕微鏡の分解能を補完するために、SEM（走査電子顕微鏡）を用いてさらに高分解能画像を取得する方法について検討した。

(4) 時間ダイナミクスの制御として、多電極アレイ測定系を最大8個並列化し、外部入力による制御を試みた。また、空間ダイナミクスの制御として、VUVリソグラフィによって、有機シラン層を微細加工し、ニューロンのネットワークを特定な配置に制御する、パターンニング方法について研究を行った。

4. 研究成果

多電極アレイ上で、ほぼ安定して数ヶ月以上の長期に渡る培養の手法を確立した。また、培養したニューラルネットワークから、長期間連続して、インパルスが計測できるシステムを構築し、さらに、免疫蛍光染色によって、数ヶ月に渡ってネットワークの成長過程を、ニューロンの主要構成要素の変化として計測できる手法を確立した。また、時空間ダイナミクスの制御として、外部入力による制御およびパターンニングによるネットワークの空間制御に方法について重要な知見を得た。

ニューロンの同期発火は認知・記憶・学習等の高次脳機能に強く関わっていることが示唆されている。実験データの解析によって、同期バーストの発生に必要な最低限の初期密度がある事を明らかにした。研究成果の一部は、多電極アレイに関する最大規模の国際会議 MEA Meeting 2010 において発表され、数多くある候補の中から論文の蛍光染色イメージの一つが“the most impressive image”として Proceeding の表紙に採択された。また、同期バーストに必要なネットワークの最小サイズに関する論文としてまとめられ (Neuroscience 171, 50-61, 2010.)、論文の中の蛍光染色イメージの一つが、Neuroscience 誌の表紙を飾った。

ニューラルネットワークの基本問題に取り組むための実験的研究基盤を独自に構築することが一つの大きな目標であったが、本研究で目的とした実験系の構築はほぼ達成され、さらにそれを適用し、重要な結果が得られてきている。今後は、本研究によって構築されたシステムおよび方法に対して、さらに改良を加えることで、時空間ニューロダイナミクスの基本的理解・解明と応用への展開が期待できる。

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 24 件)

1. T. Uchida, S. Suzuki, Y. Hirano, D. Ito, M. Nagayama, K. Gohara: Xenon-induced inhibition of synchronized bursts in a rat cortical neuronal network, *Neuroscience*, in press.
doi:10.1016/j.neuroscience.2012.03.063
2. T. Uchida, M. Nagayama, T. Taira, K. Shimizu, M. Sakai, K. Gohara: Optimal temperature range for low-temperature preservation of dissociated neonatal rat cardiomyocytes, *Cryobiology*, 63(3), 279-284, 2011.
doi:10.1016/j.cryobiol.2011.09.141
3. M. Yamaguchi, K. Ikeda, M. Suzuki, A. Kiyohara, S. Kudoh, K. Shimizu, T. Taira, D. Ito, T. Uchida, and K. Gohara: Cell patterning using a template of microstructured organosilane layer fabricated by vacuum ultraviolet light lithography, *Langmuir*, 27 (20), 12521-12532, 2011.
doi: 10.1021/la202904g
4. T. Uchida, T. Shiga, M. Nagayama, K. Gohara: Observation of Sintering of Clathrate Hydrates, *Energies*, 3(12), 1960-1971, 2010.
doi:10.3390/en3121960
5. H. Shioya, Y. Maehara, and K. Gohara: Spherical shell structure of distribution of images reconstructed by diffractive imaging, *J. Opt. Soc. Am. A*, 27(5), pp.1214-1218, 2010.
doi:10.1364/JOSAA.27.001214
6. D. Ito, H. Tamate, M. Nagayama, T. Uchida, S. Kudoh, and K. Gohara: Minimum neuron density for synchronized bursts in a rat cortical culture on multi-electrode arrays, *Neuroscience*, 171(1), 50-61, 2010.
doi:10.1016/j.neuroscience.2010.08.038
7. Y. Miyamae, M. Komuro, A. Murata, K. Aono, K. Nishikata, A. Kanazawa, Y. Fujito, T. Komatsu, D. Ito, T. Abe, M. Nagayama, T. Uchida, K. Gohara, J. Murakami, R. Kawai, D. Hatakeyama, K. Lukowiak, and E. Ito: Contrary Effects of Octopamine Receptor Ligands on Behavioral and Neuronal Changes in Locomotion of *Lymnaea*, *Biol. Bull.*, 218, 6-14, 2010.
8. K. Kawahara, K. Gohara, Y. Maehara, T. Dobashi, and O. Kamimura: Beam-divergence deconvolution for diffractive imaging, *Phys. Rev. B*, 81(8), 081404.1-081404.4(R), 2010.
doi:10.1103/PhysRevB.81.081404
9. M. Nagayama, K. Shimizu, T. Taira, T. Uchida, K. Gohara: Shrinking and Development of Lipid Droplets in Adipocytes during Catecholamine-induced Lipolysis, *FEBS Lett.*, 584(1), 86-92, 2010.
doi:10.1016/j.febslet.2009.10.088
10. K. Miyamura, M. Nagayama, K. Gohara, T. Taira, K. Shimizu, M. Sakai, T. Uchida: Evaluation of viability of cryopreserved rat cardiac myocytes and effects of dimethyl sulfoxide concentration on cryopreservation, *Cryobiology*, 2009, 59(3), 375-375, 2009.
doi:10.1016/j.cryobiol.2009.10.033
11. M. Nomura, D. Ito, H. Tamate, K. Gohara and T. Aoyagi: Estimation of functional connectivity that causes burst-like population activities, *FORMA*, 24, pp.11-16, 2009.
12. H. Shioya and K. Gohara: Maximum entropy method for diffractive imaging, *J. Opt. Soc. Am. A*, 25(11), pp.2846-2850, 2008.
doi:10.1364/JOSAA.25.002846
13. J. Nishikawa and K. Gohara: Automata on Fractal Sets Observed in Hybrid Dynamical Systems, *International Journal of Bifurcation and Chaos*, 18(12), 3665-3678, 2008.
doi:10.1142/S0218127408022639
14. J. Nishikawa and K. Gohara: Anomaly of fractal dimensions observed in stochastically switched systems, *Physical Review E*, 77, 036210.1- 8, 2008.
doi:10.1103/PhysRevE.77.036210

[学会発表] (計 34 件)

1. D. Ito, Network confluence in long-term culture of rat cortical neurons, *Neuroscience 2011*, Society for Neuroscience, 2011.11.15, Walter E. Washington Convention Center, Washington, DC (USA).
2. D. Ito, Long-term measurement of network dynamics in a rat neuronal culture using multi-electrode arrays and immunofluorescence imaging, 日本神経回路学会第 21 回全国大会,

2011. 12. 16, 沖縄科学技術大学院大学 (沖縄)
3. D. Ito, Network confluence in a rat neuronal culture, 第34回日本神経科学大会, 2011. 9. 15, パシフィコ横浜 (神奈川県)
 4. D. Ito, 多電極アレイと免疫蛍光イメージングによる培養神経回路網の長期時空間ダイナミクス計測, 第49回日本生物物理学学会年会, 2011. 9. 18, 兵庫県立大学姫路書写キャンパス (兵庫県)
 5. D. Ito, Spatiotemporal measurement of cultured neuronal networks using multi-electrode arrays and immunofluorescence imaging, 第26回生体・生理工学シンポジウム, 2011. 9. 22, 立命館大学びわこくさつキャンパス (滋賀県)
 6. 伊東大輔, 同期バーストが生じるニューラルネットワークの最小サイズ, 2010年度日本生物物理学学会北海道支部例会, 2011. 3. 8, 北大理 (札幌)
 7. K. Ikeda, Neuronal cell patterning on commercial multielectrode arrays, PACIFICHEM 2010, 2010. 12. 15, Honolulu, Hawaii, Hawaii Convention Centre (USA)
 8. 永山昌史, 脂肪分解刺激によって脂肪滴収縮と同時に起こる脂肪滴生成: 遊離脂肪酸の再取り込み, 第31回日本肥満学会, 2010. 10. 1, 前橋テルサ (前橋)
 9. D. Ito, Immunofluorescence investigation for the distribution of excitatory and inhibitory synapses in the development of cultured neural networks, 日本生物物理学学会第48回年会, 2010. 9. 21, 東北大川内キャンパス (仙台)
 10. 池田光二, 神経細胞接着性に及ぼす表面組成の影響, 日本化学会北海道支部2010年夏季研究発表会, 2010. 7. 24, 函館高専 (函館)
 11. M. Nomura, Simple model of a neuronal network reproducing synchronous bursts, 7th International Meeting of Substrate-Integrated Micro Electrode Arrays, 2010. 7. 1, Friedrich-List-Halle, Reutlingen (Germany)
 12. D. Ito, Long-term measurement of excitatory and inhibitory synapse densities with electrical activity during development of cultured cortical neurons, 7th International Meeting of Substrate-Integrated Micro Electrode Arrays, 2010. 6. 30, Friedrich-List-Halle, Reutlingen (Germany)
 13. Masafumi Nagayama, Simultaneous Shrinking and Development of Lipid Droplets in Adipocytes Stimulated with Catecholamine, 第62回日本細胞生物学会大会, 2010. 5. 21, 大阪国際会議場 (大阪)
 14. 小松拓美, ラット大脳皮質分散培養系における興奮・抑制シナプスおよび電気的活動の長期測定, 2009年度日本生物物理学学会北海道支部例会, 2010. 3. 8, 北大理 (札幌)
 15. M. Nagayama, Catecholamine-induced apparent fragmentation of lipid droplets in adipocytes, 49th Annual meeting of ASCB, 2009. 12. 5, San Diego, San Diego Convention Center (U.S.A.)
 16. T. Komatsu, Immunofluorescence imaging and electrical activity during long-term development of cultured neuronal networks, 日本生物物理学学会47回年会, 2009. 10. 30, アステイ徳島 (徳島)
 17. D. Ito, Spatial analysis of cultured cortical networks exhibiting synchronized bursts on multi-electrode arrays, NEUROSCIENCE 2009, 2009. 10. 19, McCormic Place (Chicago, USA)
 18. D. Ito, How many neurons do we need to record synchronized bursts in dissociated culture on multi-electrode arrays?, 第32回日本神経科学大会, 2009. 9. 18, 名古屋国際会議場 (名古屋)
 19. M. Nomura, Estimated connections that capture population burst-like activities, 第32回日本神経科学大会, 2009. 9. 16, 名古屋国際会議場 (名古屋)
 20. 山口宗宏, 真空紫外光エッチングによる有機シラン層パターンニングを用いた細胞配列, 2009年秋季 第70回応用物理学会学術講演会, 2009. 9. 8, 富山大 (富山)
 21. 池田光二, 種々の表面における神経細胞接着性の検討, 2009年秋季 第70回応用物理学会学術講演会, 2009. 9. 8, 富山大 (富山)
 22. 山口宗宏, 細胞接着物質のパターン形成と初代培養細胞のパターンニング, 日本化学会北海道支部夏季研究発表会, 2009. 7. 11, 苫小牧工専 (苫小牧)
 23. 山口宗宏, VUVエッチングによるパターン化有機シラン層を鋳型とした細胞配列, 日本化学会第89春季年会, 2009. 3. 29, 日大理工船橋 (千葉)
 24. 野村真樹, 神経活動データを基にした

- 回路網の推定, 日本物理学会第 64 回年次大会, 2009. 3. 28, 立教大学 (東京)
25. M. Yamaguchi, Cell patterning based on the micro-structured organosilane layer fabricated by VUV lithography, 1st Int. Conf. on Multifunctional, Hybrid and Nanomaterials, 2009. 3. 16, Tours, the Vinci Convention Center (France)
26. 鈴木翔太郎, 麻酔性キセノンガスによる神経細胞の電気的活動抑制効果, 平成 20 年度北大細胞生物研究集会, 2009. 3. 10, 北大理 (札幌)
27. 山口宗宏, 真空紫外光エッチングによるパターンニングを用いた神経細胞配列, 2008 年度日本生物物理学会北海道支部例会, 2009. 3. 9, 北海道大学工学研究科 (札幌)
28. 玉手宏基, ニューラルネットワーク時空間ダイナミクスの長期計測, 日本生物物理学会北海道支部例会, 2009. 3. 9, 北海道大学工学部 (札幌)
29. H. Tamate, The system for long-term measurement of neural network dynamics, 日本生物物理学会第 46 回年会, 2008. 12. 5, 福岡国際会議場 (福岡)
30. D. Ito, Immunocytochemistry of neurons in low-density culture on multi-electrode arrays is effective for identification of action-potential pathway, Neuroscience 2008, 2008. 11. 19, Washington DC, International Conference Center (USA)
31. M. Nomura, Estimation of functional connectivity on cultured neuronal networks, Dynamics Days Asia Pacific 5, The 5th International Conference on Nonlinear Science, 2008. 9. 11, Nara Prefectural New Public Hall (Nara, Japan)
32. M. Nomura, Estimation of neuronal functional connectivity of cultured neuronal networks, 第 31 回日本神経科学学会年会, 2008. 7. 11, Tokyo International Forum (Tokyo, Japan)
33. H. Tamate, Analysis of neural-network dynamics using multi-electrode arrays, 第 31 回日本神経科学学会年会, 2008. 7. 10, Tokyo International Forum (Tokyo, Japan)
34. D. Ito, Immunostaining for Identification of Neuronal-Impulse Pathway on Multielectrode Arrays, Proceedings of MEA Meeting 2008, 2008. 7. 9, Friedrich-List-Halle (Reutlingen, Germany)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称 :
 発明者 :
 権利者 :
 種類 :
 番号 :
 出願年月日 :
 国内外の別 :

○取得状況 (計 0 件)

名称 :
 発明者 :
 権利者 :
 種類 :
 番号 :
 取得年月日 :
 国内外の別 :

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

郷原 一寿 (GOHARA Kazutoshi)
 北海道大学・大学院工学研究院・教授
 研究者番号 : 40153746

(2) 研究分担者

内田 努 (UCHIDA Tutom)
 北海道大学・大学院工学研究院・准教授
 研究者番号 : 70356575

永山 昌史 (NAGAYAMA Masafumi)
 北海道大学・大学院工学研究院・助教
 研究者番号 : 70374585

塩谷 浩之 (SHIOYA Hiroyuki)
 室蘭工業大学・工学部・教授
 研究者番号 : 90271642