

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 4 月 20 日現在

機関番号：15201

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2009～2011

課題番号：21650095

研究課題名（和文） 脳の光学的測定領域内からの脳波同時計測や電気刺激を目的とした
曲面状透明電極の開発研究課題名（英文） Development of transparent electrode with curved surface for
simultaneous detection of the electrocorticogram from inside of the optical recording
area and/or for giving electro-stimulations to the area

研究代表者

廣田 秋彦 (HIROTA AKIHIKO)

島根大学・医学部・教授

研究者番号：50156717

研究成果の概要（和文）：膜電位の光学測定中に、測定領域内から表面脳波を記録することが出来る透明電極を開発した。成体ラット大脳の曲率にフィットしたガラス製平凹レンズの曲面にガリウム添加酸化亜鉛の透明導電膜を付着させ、電極部分以外を二酸化ケイ素膜で絶縁した構造を有する。これを、光学的に膜電位を測定するシステムに導入することにより、光学記録に混入してくる心拍動に伴うアーティファクトを、劇的に減少させることに成功した。

研究成果の概要（英文）：We have developed a transparent electrode for detecting electrocorticogram simultaneously from optical recording area. We have designed shape of the contact face of the electrode base to a comparable curvature to fit the surface of the adult rat cerebral cortex, and finally we used a glass plano-concave lens for an electrode base. Ga doped ZnO film, a transparent conductor, was deposited on the curved surface and covered with SiO₂ film except some dots. As a result, some halls on the curved surface were remained as the only exposed conductor, and they eventually served as independent electrodes. Using this electrode, we succeeded in decreasing the artifact originated heartbeat pulse on the optical signals.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,100,000	0	1,100,000
2010年度	1,100,000	0	1,100,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,000,000	240,000	3,240,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：神経科学、神経・筋肉生理学

キーワード：透明電極、膜電位の光学測定、ガリウム添加酸化亜鉛、曲面形状、ラット、
感覚運動野、単一掃引記録、自発性活動

1. 研究開始当初の背景

膜電位感受性色素を用いた膜電位の光学的測定法は、脳表面の電位を、高空間・時間分解能で非常に多数の部位から同時に記録出来る画期的方法である。研究代表者（廣田）は30年前から測定システムの開発に携わり、

1020チャンネルシステムを自作改良し、市販の同様な装置を凌ぐ性能の光学測定システムを構築してきた。しかし、脳を対象にしてこのシステムを用いた時は、光学シグナルに心拍動に由来する大きなアーティファクトが重畳してくることは避けられず、これを取

り除くためには、脳に電気活動が出現していない時のアーティファクトのみの光学シグナル波形が必要であるとわかった。自発興奮も見られる為、脳表面の光学測定領域内から電極を用いて光学シグナルと同時に表面脳波を記録することが望まれたが、光学測定に影響することなく表面脳波を記録する為には、透明な電極を開発する必要があった。

2. 研究の目的

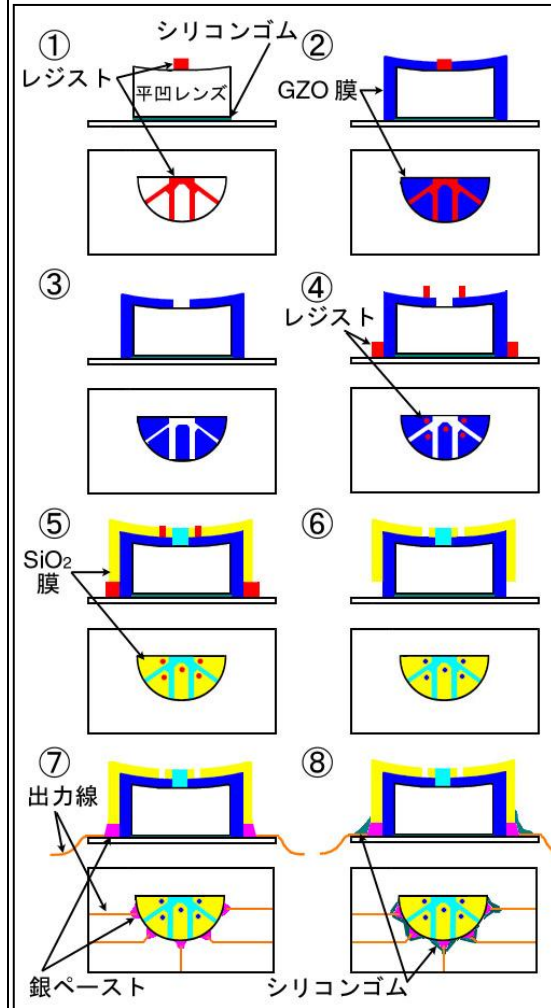
この研究は、光学的測定領域内から、光学測定と同時に電気的活動の記録を可能とする、透明な電極を開発することを目的とする。

3. 研究の方法

大脳表面の広範囲に複数の電極を設置するためには、電極基板が成体ラット脳によくフィットする曲面を有する必要がある。成体ラット脳は球体に近似可能であり、その曲率半径にはほぼ一致する曲面を有する市販の平凹レンズの規格は20 mmなので、電極のベースにこの市販品を用いようとした。しかし、透明電極は平板ガラスを介して頭蓋骨に固定する必要があり、その状態で脳の表面を覆う硬膜に透明電極が届く為には、中央の一番薄い部分の厚さが少なくとも3 mm程度無くてはならないのに対し、光学レンズをそのように厚くするメリットは光学的にも強度的にも無く、この基準に合致する市販品は無かった。一方、凹面鏡として市販されている製品には、中央部分の厚さが3 mmのものが判明した。ガラスの形状は平凹レンズであるため、我々はこの製品を購入し、鏡面のアルミメッキを除去し、対面の平面を鏡面研磨することにより、必要とする厚さを満たす平凹レンズにすることが出来た。

一方、我々が光学的膜電位測定の測定対象としている運動感覚野と呼ばれる部分は、脳の正中線に近い部位である。正中部には太い血管が走っているため、この部分の頭蓋骨を除去することは事実上不可能である。正中部の頭蓋骨を除去すること無く正中部近傍の広い部位を透明電極のベースである平凹レンズで覆うため、我々は直径10 mmの平凹レンズを半切して使うことにした。透明電極の基本的な構造は、このガラス製の平凹レンズの電極のベースにスパッターにより透明導電体であるガリウム添加酸化亜鉛(GZO)の薄膜を付着させ、電極部分以外を二酸化珪素膜で絶縁して作製するものであるが、一つの電極ベースに複数個の独立した電極を作る目的で、図1に示したようにレジストにより予めGZO膜を複数個の島に分け、それぞれの島に1ヶ所、二酸化珪素被膜に穴をあけることにより、複数個の独立した電極を有する透明電極集合体を作製することに成功した。レジストには、手書きのプリント基板を作製する

のを目的に市販されている、太さ0.3 mmの



レジストペンを用いた。

図1. 5個の独立した電極を有する透明電極集合体製造法の概略。

- ① 支持用のガラス板に電極のベースである平凹レンズを、透明絶縁体であるシリコンゴムで貼り付け、レジストで線を引く。
- ② 透明導電体であるガリウム添加酸化亜鉛(GZO)膜をスパッターで形成する。
- ③ レジストを有機溶剤で溶かして除去すると、GZO膜は独立した5つの島に分かれ、相互間の導通は無い状態になる。
- ④ 曲面部のGZO膜上で完成時に電極部になる部分にレジストで点を打つと共に、側面下方の出力線取り付け部位になる部分にもレジストを塗る。
- ⑤ GZO膜のレジストの無い部分を覆うように、透明な絶縁体である二酸化珪素(SiO_2)膜をスパッターで形成する。
- ⑥ レジストを有機溶剤で除去すると、曲面部で5ヶ所 GZO膜が露出した部分が出来、この部分が電極として働く。
- ⑦ 側面に銀ペーストで出力線を取り付ける。

⑧銀ペーストや近傍の露出した GZO 膜をシリコンゴムで覆って絶縁し、完成。

最後に、完成した透明電極の出力を外部回路につなぐ必要があるが、この導出部分の作製が当初の予想よりはるかに難しかった。最終的には、GZO 膜に良く親和する銀ペーストを試行錯誤で見だし、これを用いて、極細のエナメル線と GZO 膜を接着し、熱処理により固着させることにより、安定して膜電位シグナルを電極外部に導出することが出来るようになった。

4. 研究成果

この透明電極を現有の手作りの光学的膜電位測定システムに導入した。この測定システムは、受光器に 1020 素子のフォトダイオードを用い、1020 ヶ所の部位の膜電位を光学的に時間分解能 1 msec で数分単位の長時間、連続して同時測定出来る装置である。このシステムに透明電極を併用することによって、膜電位を連続測定している光学測定領域内の 1 点から、表面脳波を光学的測定と同時記録することが可能になり、大脳皮質に電気活動が無い時間帯を確実に見つけ出すことが出来るようになった。大脳皮質に電気活動が見られない時の光学シグナルを、心拍動のみによるアーティファクト波形と見なせると仮定することにより、自発活動が頻発して起こる、感覚運動野などの光学シグナルからも、光学シグナルに大きく重畳してくる心拍動のアーティファクトを新たに開発したソフトウェアを用いて大部分除去することに成功した。ソフトウェアの動作原理の詳細は、雑誌論文①に記載した。このソフトウェアの特長は、人工呼吸機も用いず、自然に呼吸させた状態でも心拍動に由来するアーティファクトを除去できることである。自然に呼吸させた状態では、心拍動の周期が呼吸性変動により変化するため、それに対応したアルゴリズムが必要となる。透明電極を用いることによって、この心拍動の周期が変化する環境下においても、心拍動由来のアーティファクトの除去処理をほぼ自動化することに成功し、オフライン処理ではあるものの、極めて短時間に光学シグナルの膜電位に依存した成分の抽出が可能となった。その結果、実験中に膜電位依存性のシグナルを解析し、動物が活着している間に、測定結果を見ながら次の実験条件を決めることが可能となった。

次に、透明電極とは直接関係無いことであるが、電極のベースに平凹レンズを用いることによって得られた光学測定におけるピンぼけに起因した光学シグナルの劣化の防止効果に関する成果を述べる。平凹レンズの導入を決めた時点である程度の改善効果は期待していたものの、実際に光学系に平凹レン

ズを導入して得られた効果は、当初の予想を遙かに上回るものであった。ピンぼけに起因した光学シグナルの劣化というのは、脳表面が球体状の曲面であるのに対し、一般の光学的生体機能測定では、光学系もフォトダイオードや CCD カメラ等の受光器も平面を想定した仕様になっている為、脳のような曲面からの測定では、ある場所にフォーカスを合わせた時、別の場所がピンぼけとなってしまう、その部分の測定精度が劣化する現象のことである。特に光学的膜電位測定のように、ノイズの大部分がショット雑音である高精度なシステムの場合、光学系によって作られる実像が明るい程 SN 比が良くなることがわかっていて、このため、大口径の明るいレンズを絞り開放して用いることになり、その結果、光学系の焦点深度が小さくなることは不可避である。図 2. に示したように、脳表面の曲率にあった平凹レンズを光学系に導入することにより、シャープに映る像をつくる、ピントが合った範囲をより広くすることが可能になり、脳表面のより広い範囲から、質の良い光学シグナルを得ることが出来るようになった。

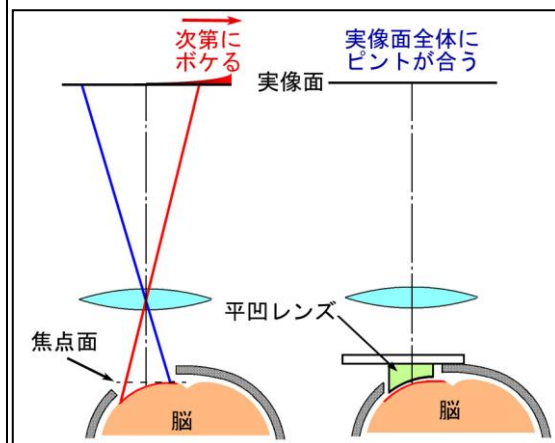


図 2. 光学系に平凹レンズを挿入することによる、ピンぼけに起因した光学シグナル劣化の防止効果

一方、開発開始当初に予定した、透明電極を電気刺激に用いることも可能とする改良は、現在の仕様ではリード線の部分の抵抗値が高い為、刺激電流を流すとリード線部分の想定以上に発熱することが判明した。この結果、二酸化珪素膜にヒビが入り、絶縁の機能が失われてしまう、また、電極部分の GZO の絶対量が足りず、通常電気刺激に用いられる、 μA オーダーの電流を 0.5 秒間流す条件でも百回程度で GZO 膜そのものが溶出して無くなってしまふことが判明した。したがって、リード線部分の透明導電体膜の抵抗値を少なくとも 1 桁小さくするなどの改良が必須である。しかし、どのようにして抵抗値の低減化が実現出来るかについては、スパッター

の時間や透明導電体自体の見直しなどについて引き続いて検討を進めている段階で、有効な対策はまだ見いだされていない。

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)

- ① Noriyuki Hama, Shin-ichi Ito, Akihiko Hirota, An improved multiple-site optical membrane potential-recording system to obtain high-quality single sweep signals in intact rat cerebral cortex. *Journal of Neuroscience Methods*, 査読有 Vol.194, 2010, pp.73-80

[学会発表] (計 10 件)

- ① Noriyuki Hama, Shinichi Ito, Akihiko Hirota, Effect of the stimulus intensity on the spatiotemporal patterns of evoked activity in the rat sensorimotor cortex analyzed using optical recording system. 第89回日本生理学会大会, 2012年3月30日, 松本文化会館 (長野県松本市)
- ② 濱德行, 伊藤眞一, 廣田秋彦, 光学的膜電位測定法を用いて解析したラット大脳皮質運動感覚野における感覚刺激応答の時空間パターンと刺激強度の関係. 第63回日本生理学会中国四国地方会, 2011年10月22日, 広島大学霞キャンパス広仁会館 (広島県広島市)
- ③ 濱德行, 伊藤眞一, 廣田秋彦, 光学的膜電位測定法を用いたラット運動感覚野における自発興奮伝導パターンの解析. 日本動物学会第82回旭川大会, 2011年9月21日, 旭川市大クリスタルホール (北海道旭川市)
- ④ Noriyuki Hama, Shin-ichi Ito, Akihiko Hirota, Relationship between the stimulus intensity and the spatio-temporal patterns of the evoked activity in the rat sensorimotor cortex using improved optical recording system. The 34th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society, 2011年9月16日, パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)
- ⑤ Noriyuki Hama, Shin-ichi Ito and Akihiko Hirota, Comparison of propagating patterns of spontaneous and evoked activity in the rat sensorimotor cortex detected by a multiple-site optical recording system. 第88回日本生理学会大会 (東北関東大震災の為会場開催中止) 2011年3月28日, *Journal of Physiological Sciences* Vol. 61 Suppl. 1 S146 (誌上開催)
- ⑥ 濱 德行, 伊藤眞一, 廣田秋彦, 光学的

膜電位測定法を用いたラット大脳皮質運動感覚野における神経活動の長時間記録. 第62回日本生理学会中国四国地方会, 2010年11月20日, 島根大学出雲キャンパス (島根県出雲市)

- ⑦ Noriyuki Hama, Shin-ichi Ito, Akihiko Hirota, Diversity in the spatio-temporal pattern of spontaneous neural activities in the rat sensorimotor cortex detected with the multiple-site optical recording system with high signal-to-noise ratio. 第33回日本神経科学大会, 2010年9月4日, 神戸コンベンションセンター (兵庫県神戸市)
- ⑧ Noriyuki Hama, Shin-ichi Ito, Akihiko Hirota, Single sweep analysis on the long-duration continuous multiple-site recording of neural activity obtained optically from *in vivo* rat somatosensory cortex stained with a voltage-sensitive dye. 第87回日本生理学会大会, 2010年5月21日, 盛岡市民文化ホール (岩手県盛岡市)
- ⑨ 濱德行, 伊藤眞一, 廣田秋彦, 光学的膜電位長時間連続測定法の *in vivo* ラット運動感覚野への適用と単一掃引記録した神経活動の定量解析. 第61回日本生理学会中国四国地方会, 2009年11月21日, 山口大学医学部小串キャンパス内 霜仁会館 (山口県宇部市)
- ⑩ Noriyuki Hama, Shin-ichi Ito, Akihiko Hirota, Analysis of spontaneous activity in the rat sensorimotor cortex recorded optically with voltage-sensitive dye. 第32回日本神経科学大会, 2009年9月18日, 名古屋国際会議場 (愛知県名古屋市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

廣田 秋彦 (HIROTA AKIHIKO)
島根大学・医学部・教授
研究者番号: 5 0 1 5 6 7 1 7

(2) 研究分担者

伊藤 眞一 (ITO SHIN-ICHI)
島根大学・医学部・准教授
研究者番号: 1 0 1 4 5 2 9 5

榎本 浩一 (ENOMOTO KOH-ICHI)
島根大学・医学部・助教
研究者番号: 7 0 1 1 2 1 2 5

濱 德行 (HAMA NORIYUKI)

島根大学・医学部・助教
研究者番号：60422010

(3) 連携研究者

藤田 恭久 (FUJITA YASUHISA)
島根大学・総合理工学部・教授
研究者番号：10314618