

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 6 月 6 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22510124

研究課題名（和文）生きたマウス脳の長期精密計測を可能にするマイクロインターフェイスデバイスの開発

研究課題名（英文）Development of microinterface devices for long-term observation of mouse brain

研究代表者

一木 隆範（ICHIKI TAKANORI）

東京大学・大学院工学系研究科・准教授

研究者番号：20277362

研究成果の概要（和文）：2光子励起顕微鏡法(2PLMS)は脳機能を細胞レベルで研究するための強力な手法であるが、生きたままの動物の脳を長期計測するためのツール・手法の欠落が課題であった。そこで、本研究では、生きたマウスの脳の長期・精密計測を可能にする動物個体埋め込み型インターフェイスデバイスを開発した。この成果は、2PLMSを軸とする *in vivo* 脳研究の技術的制限を克服する新たなツール・手法を提供し、脳神経細胞の機能のより深い理解に貢献すると期待される。

研究成果の概要（英文）：The observation of neural cells in the intact brain of a living animal is one of the most significant challenges in neuroscience. Two-photon laser scanning microscopy (2PLSM) enables the cellular imaging of brain tissue up to a depth of several hundred micrometers and the stimulation of a single synapse of neurons by the photolytic release of caged glutamate, and is thus a powerful tool in neuroscience. However, in the case of observing the intact brain of a living animal, one should drill a hole in the skull and remove the dura to observe deep inside the brain tissue and introduce caged glutamate. Thus, bacterial infection and the loss of brain fluid prevent long-term observation over several weeks. Therefore, we have developed an implantable microscale brain interface device for controlling the concentration of chemicals and enabling the long-term observation of cells in the tissues of living animals by applying microfluidic device technology.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2012 年度	900,000	270,000	1,170,000
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：ナノ・マイクロ科学・マイクロ・ナノデバイス

キーワード：マイクロバイオシステム

1. 研究開始当初の背景

近年、超短パルス赤外レーザー励起を用いた 2PLMS の進歩により、脳組織中の神経細胞を直接見る手段が登場し、脳機能研究の強力な手法として期待されている (Helmchen, F., et al. Nat. Methods 2,932-940 2005)。現

在、2PLMS を用いた研究により記憶と神経細胞スパインの形態変化の関連性が示唆されるなど (Tanaka, J., et al., Science 319, 1683-1687 2008)、神経細胞の精密計測でもたらされる形態学的、分子生物学的知見により、脳機能を理解する新たな時代を迎えつつ

ある。現在、摘出脳を用いた研究(in vitro 研究)が世界中で精力的に進められているが、今後、脳機能を更に解明するためには、生きたマウスの脳を用いた研究(in vivo 研究)が不可欠である。しかし、生きたマウスの脳の精密計測は、顕微鏡観察用の開頭手術部位の炎症の問題や、脳組織中の試薬濃度調整の問題、電氣的計測の併用の問題などから困難を極める。2光子励起顕微鏡法による生きたマウス脳内の神経細胞を長期的に精密計測する方法が開発されれば、脳神経科学の未踏領域に大きく踏み込む重要な進展に繋がることが期待された。

2. 研究の目的

2光子励起顕微鏡法(2PLMS)は脳機能研究の最前線で活躍する強力な手法であり、現在、分子生物学や遺伝子工学の諸技術も動員し、脳組織片(in vitro)を計測対象とする研究競争が世界中で行なわれている。今後、神経細胞機能のより深い理解のため、生きたマウス脳(in vivo)の長期・精密計測が必要とされているが、これを可能にするツール・手法の欠落が大きな障壁である。そこで、本研究では2PLMSを軸とするin vivo脳研究の技術的制限の大幅な拡張を可能にする、動物個体への埋め込み型インターフェイスデバイスを開発し、世界初の「in vivo マウス脳神経細胞の長期精密計測」の実現を目指した(図1参考)。

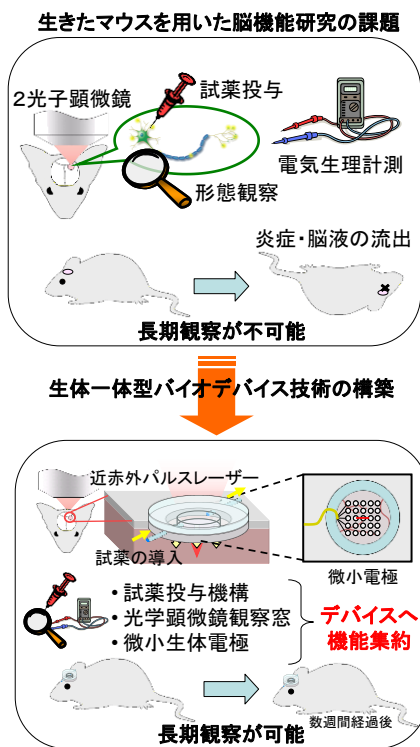


図1 本研究のねらい

3. 研究の方法

マイクロ流体デバイス技術によりマイクロ流体制御ユニットを集積化した埋め込みデバイスを開発し、生きたマウス脳への単一シナプス光刺激法の適用を実現する (I)。埋め込み型デバイスに搭載可能な要素デバイス技術の開発を行う。具体的には、光計測と電気生理学的計測のためのフレキシブルマイクロ透明電極ユニットやマイクロバルブ等の流体制御素子を開発する (II)。上述の成果をもとに機能集積化した脳計測インターフェイスデバイスを試作し、「in vivo マウス脳神経細胞の長期精密計測」を実現する (III)。最後に本研究課題を総括し、動物埋め込み型インターフェイスデバイスに関する設計や諸要素技術についてまとめ、知見を一般化・体系化する (IV)

4. 研究成果

(1) 埋め込みインターフェイスデバイス

① デバイスの設計

デバイスには、動物個体への負荷を軽減するための微小化と生体適合性、2光子顕微鏡を用いた高分解能観察を行うための光学特性と脳の拍動の抑制、実験試薬の脳組織への投与・除去、細菌感染の回避が求められる。本研究で開発したデバイス($\phi=2.7$ mm, $t=400$ μm)の概要を図1に示した。チューブから試薬の導入・排出を行い、試薬をデバイス底面から大脳皮質へ拡散により導入する。デバイス上側の天板ガラス部分を近赤外レーザーが透過し、脳組織中の神経細胞を2光子顕微鏡により観察する。本研究で実施した動物実験は、東京大学の動物実験実施規則を遵守して行った。

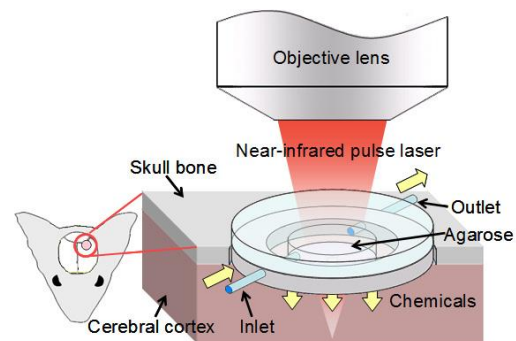


図2 マイクロブレインインターフェイスデバイスの概要

② デバイスの作製

デバイスの作製方法を図3-aに示した。まず、ガラス上にSU-8 100を用いてマイクロ流路パターンを形成し、モールドを作製した。作製したモールドに polydimethylsiloxane (PDMS)を塗布し、ソフトリソグラフィーに

より流路パターンを PDMS に転写した。次に、流路パターンが転写された PDMS シートを、内径 2.64mm の金属筒を装着したドリルを用いて切り抜き、円盤状の PDMS とし、外径 2.11 mm の金属筒で内側を切り抜き、流路パターンが転写された PDMS リング(外径 2.7 mm、内径 2.0 mm、厚さ 300 μm)を作製した。そして、PDMS リングとガラス円盤(直径 2.7 mm、厚さ 150 μm)を接着し、テフロンチューブ(外径 200 μm)をマイクロ流路部分に挿入し接合した。最後に、デバイス内部に脳の拍動を抑えるためのアガロース(直径 1.2 mm、厚さ 300 μm)を設置した。完成したデバイスの写真を図 3-b に示した。

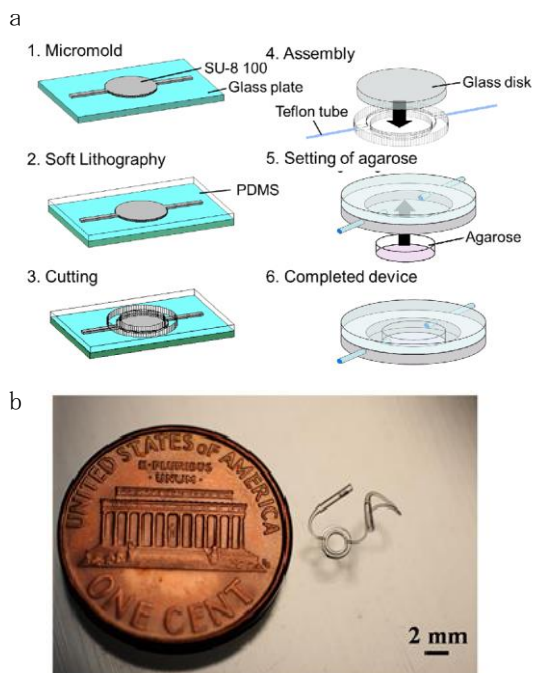


図 3 (a)デバイスの作製手順 (b)デバイス写真

(2) デバイスを埋設したマウス脳組織中の神経細胞のイメージング

作製したデバイスをマウス頭部に埋設し、脳組織中の神経細胞を 2 光子顕微鏡により観察した。デバイスの埋設手術の手順を以下に示す。まず、EYFP(enhanced yellow fluorescent protein)発現トランスジェニックマウスを、ケタミン-キシラジン混合液を腹腔内投与することにより麻酔した。次に、1 次視覚野直上の頭蓋骨に直径 2.7 mm の穴をドリルで設置し、頭蓋骨と硬膜を除去した。そして、オートクレーブで滅菌したデバイスを頭蓋骨の穴に装着し、デンタルセメントでデバイスを固定した。2 光子顕微鏡による観察時には、麻酔を施したマウスを顕微鏡直下の脳位固定装置乗せ、デバイスを固定した。デバイスを埋設したマウス脳内の神経細胞を 2 光子顕微鏡により観察した結果を図 4

に示した。デバイスにより観察部位の脳の拍動が 1 μm 以下に抑えられたことで、脳の拍動による画像のブレが生じず、サブ μm レベルの高分解能観察が可能となった。

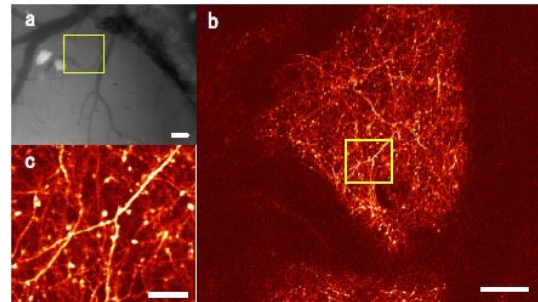


図 4 デバイス下の神経細胞の 2 光子顕微鏡画像 (a)デバイス下の脳の明視野画像, (b)a の黄色枠内の 2 光子顕微鏡画像, (c)b の黄色枠内の拡大図, スケールバー:(a)100 μm , (b)50 μm , (c)10 μm

(3) マウス脳組織中の試薬濃度コントロール

デバイスを用いて大脳皮質へ定量的に実験試薬を投与するためには、大脳皮質内の試薬の拡散現象を把握する必要がある。そこで、脳組織中の蛍光試薬の拡散移動を 2 光子顕微鏡により 3 次的に測定し、デバイス・大脳皮質モデルを用いた流体数値シミュレーションと比較して大脳皮質内の試薬拡散現象を解析した。図 5 にデバイス及び大脳皮質中の試薬濃度の経時変化の計算例を示す。

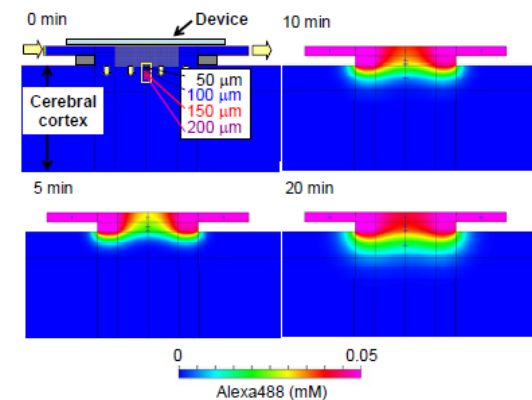


図 5 脳組織中への試薬拡散の流体数値シミュレーション。試薬導入後 0 min, 5 min, 10 min, 20 min

シミュレーション算出値は実測値を良く再現することができ、実験による試薬拡散の時間変化の計測結果と合すると Alexa488 の大脳皮質内有効拡散係数 $D^* \sim 1.0 \times 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$ が算出できた。この値は、生きたラットの脳内の試薬拡散係数に関する先行研究からの予測値 $D^* = 0.925 \times 10^{-10} - 1.172 \times 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$ (rat cortex) と良く一致した。以上から、シミュレーションにより大脳皮質内の試薬濃度経時変化を予測するとともに、デバイスの送液機構を用いて導入と排出の流量

を制御することにより生きたマウス脳組織中の試薬濃度がコントロール可能になった。

(4) フレキシブル透明電極の開発

神経細胞のシナプス結合部位であるスパインの形成や消失といった形態学的情報と、スパイク数の増加や減少といった電気生理学的情報を複合的に取得することは、記憶や学習といった脳機能の解明に重要である。そこで、光学計測と電気生理学計測の同時計測に不可欠な「フレキシブルで透明な微小電極アレイ」を形成する技術を開発した。従来の電極アレイデバイスは、電極の物理的な刺入により脳組織の炎症反応が不可避であった。生きたマウスの脳を用いた最先端の神経科学研究では、脳組織の炎症は致命的な弊害となる。そこで、脳組織の炎症を極力誘発せず、2光子顕微鏡の分解能を劣化させない電極を目指し、生体適合性と光透過性を有するポリマー材料である poly(3,4-ethylenedioxythiophene)poly(styrenesulfonate) (PEDOT-PSS, H. C. Starck Co., Ltd) と非晶質フッ素ポリマー(Cytop™, Asahi glass Co., Ltd)で構成されたフレキシブルで透明な電極フィルムを開発した。電極材料の PEDOT-PSS の光透過性は、黄色蛍光タンパク質の蛍光波長 530 nm で 65%(at t= 500 nm)である。電極形状は、200 μm×200 μm で作製した。誘導結合型プラズマによる非晶質フッ素ポリマーの μm オーダーでの微細加工技術や表面処理技術を用い、基板上へのポリマーの成膜と加工を繰り返した後、最終的にポリマーの多層構造を基板から剥離することで、フレキシブルで透明な微小電極アレイフィルムを形成した(図 6)。

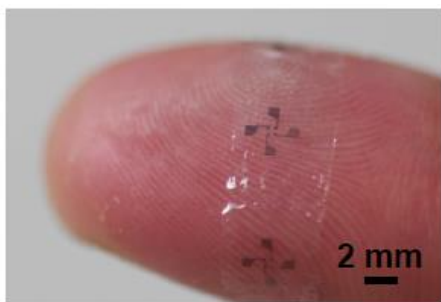


図6 PEDOT-PSS とCytop™ を用いたフレキシブル透明微小電極アレイフィルム

(5) マウス脳中の神経細胞の長期経過観察

従来、神経科学の分野では計測のためにマウスに開頭手術を施すことでさえも脳組織の炎症等の悪影響をもたらす恐れが議論されてきた。脳で炎症が起こると神経細胞のスパインが不安定となり、適切な解析データが得られなくなる。従来の手術法では、デバイスの埋設により脳組織の炎症が誘発されて

いた。しかし、デバイス埋設時の脳組織への機械的刺激を極力低減した手術法の開発により、マウスの脳組織の炎症反応(血管新生や免疫担当細胞であるグリア細胞の活性化など)を回避可能であることが確認された。

デバイスを埋設したマウスの脳組織中の単一神経細胞の経過観察を行った例を図 7 にしめす。1 ヶ月以上の長期にわたり神経細胞の微小構造の観察に成功し、デバイスの送液機能を利用した脳組織への試薬投与が可能な状態での *in vivo* 長期観察を実現した。以上の結果は、動物個体の行動と関連付けた精神疾患の治療法開発につながる可能性のある成果であるといえる。

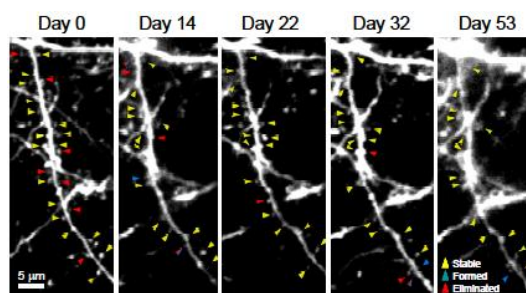


図 7 神経細胞樹状突起の長期 *in vivo* 経過観察

5. まとめ

2光子顕微鏡や試薬灌流システム及び細胞外電位記録計などの外部計測装置との間で、光、物質、電流などの出し入れを可能にするインターフェイスとしての小型集積化システムの実現を目指し、埋め込み型インターフェイスデバイスの開発を行った。生きたマウス脳組織中の神経細胞の高分解能イメージングと脳組織中の試薬濃度コントロールが可能なデバイスや、生体適合性と光透過性を有すポリマーで構成されたフレキシブルで透明な電極フィルムの形成プロセスを開発した。そして、デバイス埋設による生きたマウス脳組織への影響がないことを確認し、形態学的・分子生物学的手法を用いる最先端の神経科学研究への本手法の適用が可能であることを示した。生体への埋め込み型デバイスを2光子励起顕微鏡法に融合し、従来不可能であった動物個体の長期的な精密計測を実現する本技術は、脳神経科学の未踏領域に大きく踏み込む重要な進展に繋がることが期待される。

[雑誌論文] (計 2 件)

- ① H. Takehara, C.Y Jiang, K.Uto, M. Ebara, T. Aoyagi and T. Ichiki, "Novel microfluidic valve technology based on shape memory effect of poly(ϵ -caprolactone)", *Appl. Phys. Express*, 6, 037201(2013). doi: 10.7567/APEX.6.037201
- ② 竹原 宏明, 長岡 陽, 野口 潤, 赤木 貴

則, 河西 春郎, 一木 隆範「動物個体への埋め込み型マイクロブレインインターフェイスデバイスの開発」, 電気学会研究会資料 BMS, バイオ・マイクロシステム研究会 29-34 (2011).
<http://ci.nii.ac.jp/naid/10027975444>

〔学会発表〕 (計 27 件)

- ① H. Takehara, A. Nagaoka, J. Noguchi, T. Akagi, H. Kasai and T. Ichiki, “Implantable microfluidic interface devices with drug perfusion function through hydrogel membrane”, 16th Int. Conf. on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (Micro-TAS2012), pp. 189-191, Okinawa, Japan (October 2012)
- ② H. Takehara, K. Uto, M. Ebara, T. Aoyagi and T. Ichiki, “Shape-memory polymer microvalves”, The 16th Int. Conf. on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (Micro-TAS2012), pp. 1846-1848, Okinawa, Japan (October 2012)
- ③ M. Kojima, H. Takehara, T. Akagi, H. Shiono and T. Ichiki, “Flexible phosphorescent oxygen microsensor array devices for non-invasive monitoring of cellular oxygen metabolism during cultivation”, The 16th Int. Conf. on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (Micro-TAS2012), pp. 404-406, Okinawa, Japan (October 2012)
- ④ H. Takehara, A. Nagaoka, J. Noguchi, T. Akagi, T. Sakai, U. Chung, H. Kasai and T. Ichiki, “Tetra-PEG Gel/PDMS Hybrid Microfluidic Devices for In Vivo Analysis of Neural Cells”, 9th Int. Gel Symposium (Gelsympo2012), Tsukuba, Japan (October 2012)
- ⑤ H. Takehara, K. Uto, M. Ebara, T. Aoyagi and T. Ichiki, “Shape-memory polymer microvalves and its application to a field-programmable valve array”, 2012 Int. Conf. on Solid State Devices and Materials (SSDM2012), pp1103-1104, Kyoto, Japan, (September 2012)
- ⑥ 竹原 宏明, 蔣 晨陽, 宇都 甲一郎, 荏原 充宏, 青柳 隆夫, 一木 隆範, 「形状記憶ポリマーマイクロ流体バルブの開発」, 2012 年秋季 第 73 回応用物理学会 学術講演会, 松山, (9 月 2012 年)
- ⑦ 竹原宏明, 長岡陽, 野口潤, 赤木貴則, 酒井崇匡, 鄭雄一, 河西春郎, 一木隆範, 「Tetra-PEG gel/PDMS ハイブリッドマイクロ流路からの試薬拡散」, 2012 年春季 第 59 回応用物理学関係連合講演会, 東京, (3 月 2012 年)
- ⑧ 小島麻里, 竹原宏明, 赤木貴則, 一木隆
範, 「フレキシブルセンサデバイスを用いた乳がん細胞の酸素消費量評価」, 2012 年春季第 59 回応用物理学関係連合講演会, 東京, (3 月 2012 年)
- ⑨ H. Takehara, A. Nagaoka, J. Noguchi, T. Akagi, T. Sakai, U. Chung, H. Kasai and T. Ichiki, “Hydrogel reactive microbonding method for the use of Tetra-PEG gel as a structural material for microfluidic devices”, The 15th Int. Conf. Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (Micro-TAS2011), pp. 449-451, Seattle USA (October 2011)
- ⑩ M. Kojima, H. Takehara, T. Akagi, H. Shiono and T. Ichiki, “Attachable/detachable oxygen sensor microarray sheet for in situ measurement of cultivated cell’s oxygen consumption”, The 15th Int. Conf. Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (Micro-TAS2011), pp. 1798-1800, Seattle, Washington, USA (October 2011)
- ⑪ H. Takehara, A. Nagaoka, J. Noguchi, T. Akagi, H. Kasai and T. Ichiki, “Brain interface device with permeable hydrogel membrane for in vivo analysis of neural cells, 2011 Int. Conf. Solid State Devices and Materials (SSDM2011), pp. 1101-1102, Aichi, Japan (September 2011)
- ⑫ M. Kojima, H. Takehara, T. Akagi, H. Shiono and T. Ichiki, Oxygen sensor microarray sheet for in situ sensing of oxygen consumption of cultivated cell, 2011 Int. Conf. Solid State Devices and Materials (SSDM2011), pp1105-1106, Nagoya, Aichi, Japan (September 2011)
- ⑬ H. Takehara, A. Nagaoka, J. Noguchi, T. Akagi, H. Kasai and T. Ichiki, “Implantable microfluidic devices for neuroscience”, 6th Biyani’s Int. Conf.-2011 (BICON-11), Jaipur, India, (September 2011)
- ⑭ 竹原宏明, 長岡陽, 野口潤, 赤木貴則, 酒井崇匡, 鄭雄一, 河西春郎, 一木隆範, 「Tetra-PEG gel/PDMS ハイブリッドマイクロ流体デバイスの作製」, 第 21 回日本 MRS 学術シンポジウム, 神奈川, (12 月 2011 年)
- ⑮ M. Kojima, H. Takehara, T. Akagi, H. Shiono and T. Ichiki, “Development and evaluation of oxygen sensor microarray sheet for in situ sensing of oxygen consumption of cultivated cells”, 第 21 回日本 MRS 学術シンポジウム, 神奈川, (12 月 2011 年)
- ⑯ 竹原宏明, 長岡陽, 野口潤, 赤木貴則, 酒井崇匡, 鄭雄一, 河西春郎, 一木隆
範, 「ハイドロゲルリアクティブマイク

- ロボンディング法を用いたハイドロゲル透過膜を有するマイクロ流路の開発」、2011年年秋季第72回応用物理学会学術講演会、山形、(9月2011年)
- ⑰ 小島麻里、竹原宏明、赤木貴則、塩野博文、一木隆範、「培養細胞の酸素消費量測定マイクロアレイシートの開発」、2011年年秋季第72回応用物理学会学術講演会、山形(9月2011年)
- ⑱ 竹原宏明、長岡陽、野口潤、赤木貴則、河西春郎、一木隆範、「動物個体への埋め込み型マイクロブレインインターフェイスデバイスの開発」、電気学会バイオ・マイクロシステム研究会、愛知、(5月2011年)
- ⑲ 竹原宏明、長岡陽、野口潤、赤木貴則、河西春郎、一木隆範、「ハイドロゲル透過膜を有するマイクロブレインインターフェイスデバイスの開発」、2011年春季第58回応用物理学関係連合講演会、神奈川、(3月2011年)
- ⑳ 小島麻里、竹原宏明、赤木貴則、一木隆範、「In situ 細胞代謝測定のためのマイクロウェルアレイシートの作製」、2011年春季第58回応用物理学関係連合講演会、神奈川、(3月2011年)
- 21 H Takehara, A. Nagaoka, J. Noguchi, T. Akagi, H. Kasai, and T. Ichiki, "Microfluidic interface devices for in vivo analysis of neural cells using 2-photon laser scanning microscopy", The 14th Int. Conf. on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (Micro-TAS2010), pp. 2111-2113, Groningen, Netherlands (October 2010)
- 22 H Takehara, A. Nagaoka, J. Noguchi, T. Akagi, H. Kasai, and T. Ichiki, "Flexible and transparent microelectrode arrays made from poly-(3,4-ethylen-dioxythiophene) poly(styrenesulfonate) and an amorphous perfluoropolymer for electrophysiological measurement", The 6th Int. Symp. Organic Molecular Electronics (ISOME2010), pp. 110-111, Chiba, Japan (June 2010)
- 23 竹原宏明、長岡陽、野口潤、赤木貴則、河西春郎、一木隆範、「脳組織への局所試薬投与のためのマイクロ流体インターフェイスデバイス」、20th MRS-J 学術講演会、神奈川、(12月2010年)
- 24 M. Kojima, H. Takehara, T. Akagi, H. Shiono and T. Ichiki, "Microwell array devices integrated with optical oxygen sensor for in situ sensing of oxygen metabolism of cultivated cells", 第20回日本 MRS 学術シンポジウム、神奈川、(12月2010年)
- 25 竹原宏明、一木隆範、「バイオデバイス

の薬物輸送解析」、PUCA-ESI User's Forum Japan 2010, 東京、(11月2010年)

- 26 竹原宏明、長岡陽、野口潤、赤木貴則、河西春郎、一木隆範、「生きたマウスを用いた神経細胞研究のためのマイクロブレインインターフェイスデバイスの開発とその展望」、2010年秋季第71回応用物理学会学術講演会、長崎、(9月2010年)
- 27 小島麻里、竹原宏明、赤木貴則、一木隆範、「培養細胞の酸素代謝 in situ センシングデバイスの開発」、2010年秋季第71回応用物理学会学術講演会、長崎、(9月2010年)

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計2件)

名称:バルブ、マイクロ流体デバイス、及びバルブシート、並びに、バルブシートの製造方法、及びマイクロ流体デバイスの製造方法
 発明者:一木隆範、竹原宏明、塩野博文
 権利者:東京大学、株式会社ニコン
 種類:特許
 番号:特願2012-91089
 出願年月日:2012年4月12日
 国内外の別:国内

名称:バルブ、マイクロ流体デバイス、及びバルブシート、並びに、バルブシートの製造方法、及びマイクロ流体デバイスの製造方法
 発明者:一木隆範、竹原宏明、塩野博文
 権利者:東京大学、株式会社ニコン
 種類:特許
 番号:特願PCT/JP2013/05745
 出願年月日:2013年3月15日
 国内外の別:国外

○取得状況(計0件)

〔その他〕特になし

6. 研究組織

(1)研究代表者 一木 隆範
 (ICHIKI TAKANORI)
 東京大学・大学院工学系研究科・准教授
 研究者番号:20277362

(2)研究分担者
 なし

(3)連携研究者
 なし