

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成24年5月25日現在

機関番号：17601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2011

課題番号：23650178

研究課題名（和文） 光受容イオンチャネルを発現した神経細胞を探索可能にする多電極独立微動装置の開発

研究課題名（英文） Development of independently-movable multi-wire array for exploring the specific neuron expressed photo sensitive ion channel by examining the light stimulation.

研究代表者

國武 孝人 (KUNITAKE TAKATO)

宮崎大学・医学部・助教

研究者番号：20234461

研究成果の概要（和文）：

近年、脳内の特定の神経細胞において、遺伝子工学的手法により光の照射により興奮性が変化する特性を発現させることが可能である。自由行動下動物において光の照射を断続的に行いながら遠隔操作により複数の電極を独立して移動させ、この特定の神経細胞を探索するシステムを構築している。これにより脳機能解明のために目的の神経細胞やそれに連絡を持つ細胞を選択して、自由行動中の当該神経細胞の活動の全貌を明らかにすることが期待できる。

研究成果の概要（英文）：

To elucidate the brain function, it might be important to know the specific neuron's activity during physiological condition on freely moving animals. We have developed the independently-movable multi-wire array system that enable us to explore the neuron expressed the specific photo sensitive ion channel induced by genetically engineering method, by examining the intermittent photostimulation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・環境生理学（含体力医学・栄養生理学）

キーワード：単一神経活動、光受容イオンチャネル、自由行動下動物

1. 研究開始当初の背景

ニューロン（神経細胞）は基本的には安静の状態であり、外部からの入力および内部の変動により、瞬間的な電圧変動を起こす。それが活動電位であり興奮もしくは発火とも表現される。ニューロンのネットワークにおいては、それぞれのニューロンが興奮する前後において活動電位をお互いにやり取りしながら、両者間の連携を保ちながら脳機能を実現しているはずである。

1970-80年代には、金属微小電極を脳内に刺入するとその先端近傍に存在するニューロンからの細胞外活動電位がノイズに埋も

れながらもそれより少し大きなサイズで記録できるようになった。時に複数の神経細胞からと思われる波形の異なるものが混在して観察された。その波形を形で分類することで単一の神経細胞から発生したものと見なす考え方が広まった。これを単一神経活動もしくはシングルユニットと呼ばれるようになった。ところが折角、苦勞して記録した単一神経活動も、記録したニューロンの素性を示す情報に乏しく、明確に興奮（発火）パターンを記録しているにも関わらず導かれる結果はグレーだと揶揄されることが多かった。また記録効率の低さと相まって

多くの研究者は脳スライス標本を用いて、個別のニューロン特性を電気生理学的あるいは分子生物学的な手法などと合わせて用いるようになったのが現状であると思われる。

近年われわれが独自に開発した電極ワイヤを用いることで、自由行動中の動物において神経細胞の細胞外活動電位（発火）をこれまでの10倍の振幅で観察することが可能となった。その発火様式を基に脳機能を解明するためには、当該の神経細胞を特定する情報が重要であるが、その興奮（発火）パターンを除いてはほぼ皆無である。

最近、単細胞緑藻類の光に対して反応を起こす細胞の中に特殊なタンパク質が同定されて、その遺伝情報を遺伝子工学的な技術で意図的に動物の神経細胞などに導入することが可能となった。またその導入方法を工夫することで、特定の神経細胞にのみ発現させる技術が確立されてきた。

これを細胞外活動電位の記録と組み合わせることで用いることが出来れば、記録している細胞が目的の細胞であるか否かを判断することができる。これは細胞の素性を確認するうえで重要な情報となる。一部では既に光ファイバーの側面にワイヤ電極を貼り付けたものでアプローチが始められている。しかしながら、複数の電極を独立して微調整を行い、探索可能なものは存在しない。

2. 研究の目的

脳内の神経細胞は放出する伝達物質や受容する伝達物質により区別することが可能である。また神経細胞がどこに情報を送るのか、どこから受け取るのかは解剖学的に解明されている。脳機能解明においてはその機能を担う神経細胞の種類が特定されているものがある。しかしながらその特定された神経細胞を選択的に記録することはこれまで不可能に近かった。一部は例外的に特徴的な発火様式を示すものがある。一例を挙げるとある特定のホルモンを産生し分泌する神経細胞は、約30-60秒の興奮期、と約30-60秒の休止期を交互に繰り返している。このような神経細胞であればその発火様式より他の細胞と区別することが可能であるが、まれな例である。そのため発火パターンのみで全ての種類の神経細胞を特定することは難しい。一方では神経細胞の活動パターンは麻酔に影響されることも知られている。例えば、腎臓を支配する交感神経活動は、麻酔中は呼吸と同期したものが主体的であるが、覚醒した後の自由行動

中は、心拍に同期したものが主体的となる。もし解剖学的に連絡が明確にされた、そして放出する伝達物質も限定された特定の神経細胞を探索して自由に選び出し、その発火様式を麻酔薬の影響を受けない自由行動下ですべて記録することが可能となれば脳機能解明に大きく寄与すると信じる。そこで遺伝子工学的な手法を用いて、目的とするグループの神経細胞にのみ、チャンネルロドプシンなどの光に応答してイオンの出し入れを制御するチャンネルを細胞膜にあらかじめ発現させておき、電極ワイヤを移動させながら光ファイバによる照射を断続的に行い、それに応答する神経細胞を探索し選択して記録することが可能なシステムを確立したい。そのためには光ファイバの先端の深さを変える機構も必要となるが、それは電極ワイヤを出し入れする機構を確立した後に追加するようにしたい。

この方法により特定の神経細胞の活動をリアルタイムで長期間安定した記録が可能となり、さらには同種の複数の細胞から活動を同時に記録できる可能性を増大させる。神経細胞の集団の間で情報のやり取りを行い脳機能が実現されていると考えた場合、個別に記録したニューロンの発火様式を数多く分析することよりも、少数でも同時に記録したニューロン間の連関を分析することが重要なはずである。更には、ニューロンタイプを分類した上で異なるグループのニューロン活動を同時に記録することが出来れば、それらグループ間の連関を解明するために重要な情報をもたらすはずである。

3. 研究の方法

これまでもネジを応用して、ナットもしくはスクリューを回転させることで電極先端の深度を変化させるものはあった。それにより短期間の記録は可能となったが、動物の体動などで記録が途絶することが問題であった。そこで我々は独自に電極微動装置を考案して特許を出願した。これにより動物の動きなどで途絶することなく長期間安定した記録を可能とすることが出来た。しかしながらこれら进行操作の際に動物を拘束して行う必要があり、また頭部に突出して固定された状態であり、また電極8本を個別に移動させることは出来ない構造であった。また将来、ヒトでのブレイン・マシン・インターフェースへの応用を想定しても、直接物理的操作が必要な装置は完全皮下埋め込み型に出来ない。一方、埋め込みが可能で遠

隔操作が可能なものとなるとモーターやギアを応用した駆動方法が想定されるが、小動物でも利用可能とするためにはモーターやギアは大きさ、重量において不利である。また、ピエゾ素子などの圧電効果を用いるものは生体内で高電圧を印加する必要から安全上好ましくないと考えた。

そこで物理的な大きさが小さく、軽量の低電圧で制御可能であり、数十マイクロメートル単位で双方向に駆動可能なアクチュエータを選択し、それを用いた駆動する構造を検討した。その結果、ある種の合金であれば低電圧で駆動できる可能性があり、それ自体の変位量は小さいがそれを立体的に正確に配置し制御するなどして、電極ワイヤを駆動する機構を工夫することで目的の性能を実現できる可能性を思いついた。

市販されている3次元プリンターを検討し、一部の企業には試作品を依頼した。しかしながら依頼したチューブ構造はその内径が小さすぎるために内空が塞がってしまった。その結果より、こちらの期待する微細構造を構築する装置を予算の範囲内で入手するのは難しいと判断した。そのためその3次元プリンターに代わるものを構築することにした。基本的には熱可塑性プラスチックであるABS樹脂を用いるものであるが、市販されているものにはない特徴を加えることで目的とする微細構造を構築することが可能となった。

そのためには3次元構造の内部に電極ワイヤをガイドするためのチューブ構造が必要であり、その一部にアクチュエータを正確に保持するための形状も必要となる。

アクチュエータを駆動するための電子回路も必要であり、またそれはアクチュエータと一体化する必要があるために、電子回路用の基板加工装置が使えるかを検討したところ、本来の基板加工に加えて三次元の微細切削加工も同時に行えることが判明したためにこれを購入した。

4. 研究成果

この駆動システムは特許出願を予定しているので詳細は控えたいが、概略のみを説明すると光刺激を可能とするための光ファイバーを中心部に保持できるようにし、最低でも電極8本分の駆動装置を直径30mm、厚さ7mmの円柱状構造の内部に配置できるようにした。これは将来ブレイン・マシン・インターフェースとしてヒトでの応用も視野に入れ、皮下に埋没可能な厚さを想定し

ている。またその駆動装置を制御するのに高電圧を用いることは危険であるので、数ボルトの低電圧で駆動できるものとした。最低でも8本の電極ワイヤを正確に保持し、数十マイクロメートル単位で脳内に刺入することが可能な構造である。それぞれのワイヤとアクチュエータの間の位置関係を正確に保持し、その延長線上に電極ワイヤをガイドするチューブ構造があるハウジングを作成することが重要である。そのために熱可塑性プラスチックを成型する三次元加工装置も独自に考案し開発した（この装置自体も特許出願を予定している）。この装置により作成したABS製のハウジングに電極ワイヤをチューブ構造に挿入するようにして、円柱中心部下面より外部に導出する。その反対側はチューブ構造を出たところにアクチュエータを固定する構造をくぐるようにして配置する。このハウジングの上面から、アクチュエータと制御回路を一体化したものはめ込むようにした。それは基板加工装置を用いて作成し、その外形がハウジングの内部形状よりわずかに小さく作成する。またアクチュエータを固定し保持する形状に作成した。一部の電子回路は同一構造内に配置するようにした。

電極駆動システムとしてはほぼ完成したが、動物を用いた実証実験までには至らなかった。今後、動物実験を行いながら改善していく予定である。その際に脳脊髄液などの侵入による駆動装置の誤動作の有無などに注意しながら改善を行いたい。そして最終的には駆動装置内に脳脊髄液が侵入出来ない構造に変更したい。そうでなければ感染症の温床となる可能性を排除できない。また現在の駆動装置は平板上に構成されているが、将来のヒトにおけるブレイン・マシン・インターフェースとして応用する場合を想定して頭蓋骨表面の曲面にあわせた立体構造に変更したい。

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0件)

〔学会発表〕(計0件)

〔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1件）

名称：電極
発明者：國武 孝人、河南 洋
権利者：国立大学法人宮崎大学
種類：特許
番号：特許第4984102号
取得年月日：2012/05/11
国内外の別：国内

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

國武 孝人 (KUNITAKE TAKATO)
宮崎大学・医学部・助教
研究者番号：20234461

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：