

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 8 日現在

機関番号：15201

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25560434

研究課題名(和文) 光学測定用振動ノイズの出ない機械刺激装置および光学測定視野内刺激用透明電極の開発

研究課題名(英文) Development of two apparatuses used in the optical measurement: oscillation free mechanical stimulator and transparent electrode for electrical stimulation

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：電気生理学用実験装置の内、光学的測定実験と併用できない、機械刺激装置と電気刺激用透明電極を光学測定用の装置として開発した。前者はソレノイドにネオジム磁石を組み込むことで、可動部を待機時刺激時とも位置精度を損なうことなく、無接触で制御可能となり、動作時に生じる光学測定に影響を及ぼす振動を取り除いた。後者は既に開発済みの電位記録用の透明電極で透明導電体として用いたガリウム添加酸化亜鉛(GZO)膜上に亜鉛とニオブを添加した二酸化チタン(NTO)膜を重ね、続いてアーニリング処理することで、導電膜の電気抵抗を減らし、GZO膜では電流を流すと膜が発熱し、電極が破損してしまう問題点を克服することが出来た。

研究成果の概要(英文)：We have developed two apparatuses. One is mechanical stimulator and the other is transparent electrode for electrical stimulation. These are commercially available for electrophysiological experiments, but neither of them can be applied to the experiment using optical technique. The problem of the former is physical oscillations it produces. By introducing a pair of neodymium magnets we succeeded in reducing the oscillations without spoiling high precision in the position. Concerning the latter, we had already developed a transparent electrode for electrical recording which can be used in the recording area during optical measurement. However, when applied to stimulation, the transparent conductive film made of Ga doped ZnO (GZO) is broken due to the heat caused by the stimulus current. We solved this problem by reducing the electrical resistance of the conductive part. The GZO film was covered with the film made of Nb doped TiO₂ (NTO) (NTO), followed by annealing process.

研究分野：生体シグナルの光学的測定、神経生理学

キーワード：膜電位の光学測定 振動ノイズ 機械刺激装置 無振動 透明電極 低抵抗透明導電体 電気刺激

1. 研究開始当初の背景

代表者(廣田)は、1978年から膜電位の光学的測定システムの開発と改良に取り組んできている。近年、ラットの脳を測定対象とした蛍光測光による膜電位多部位同時測定システムがほぼ完成した。この独自に構築したシステムでは、時間分解能1 msecで最大1020ヶ所の部位から、一般的に電気生理学で用いる手法により解析可能な低ノイズレベルの光学シグナルを加算処理すること無く、長時間連続記録することが出来る(文献)。既に、データをリアルタイムにハードディスク(HD)に書き込む技術は確立しており(文献)、連続記録は2TBのHD使用時100万秒(11日強)まで可能で、事実上連続記録時間の上限は無い。また自動的にファイルを1分単位に分割して記録する仕様にしてある為、測定中に別のコンピュータへ書き込みが完了したデータファイルをftpで解析用のパソコンに転送することが可能で、測定数分後には、まだ連続測定中であるにもかかわらず、解析結果を見ることが出来る。以上のような、市販装置を遙かに凌ぐ高性能の測定システムを用い、ラットの感覚運動野を測定対象とした研究を進める内に、微小電極を用いた実験での使用を前提として市販されている装置の一部が光学的測定には使うことは出来ず、研究の更なる遂行の障害になることが判明した。

<引用文献>

Hama N., Ito S., Hirota A. An improved multiple-site optical membrane potential-recording system to obtain high-quality single sweep signals in intact rat cerebral cortex. *Journal of Neuroscience Method* **194**: 73-80. 2010.

Hirota A. and Ito, S. A long-time, high spatiotemporal resolution optical recording system for membrane potential activity via real-time writing to the hard disk. *The Journal of Physiological Sciences* **56**(3): 263-266. 2006.

2. 研究の目的

この挑戦的萌芽研究では、上述したように微小電極を用いた電気生理学での実験で使用することを前提として市販されている装置で、そのままでは光学的に用いることが出来ない装置の中から、機械刺激装置と

電気刺激用電極を、改良では無く、実験動物に対する機能はそのまま変えること無く、設計思想を異にする**光学測定で用いる為の装置**として新たに開発することにより、研究の障害を取り除き、更なる遂行が出来るようにすることを目的とするものである。この装置は、我々の行っている膜電位感受性色素を用いた手法以外の膜電位の光学測定にも使用出来るのはもちろん、細胞内Ca²⁺イオン濃度測定などの精密な光学測定にも視野において開発を進めた。

3. 研究の方法

(1) 機械刺激装置

機械刺激装置の駆動部に市販品と同様にソレノイドを用いるが、市販品をそのまま用いたのでは刺激時に、ストッパーへの衝突により大きな振動が発生することが避けられなかった。ゴム等で衝突音を和らげた消音タイプ仕様の製品も市販されているが、少なくとも購入した代表的な製品はいずれも、我々の使用目的を満たす、測定への影響が無視出来るレベルまで振動が押さえられた製品では無かった。また、実験に要求される刺激針の位置の再現性の誤差100 μmの精度を確保する必要があるが、位置精度と消音の仕様は相反する傾向が強く見られた。駆動範囲が数mm以上は確保され、かつ、通常の電気生理学を用いた動物実験に用いるのと同様かそれ以上の機能、特に位置の再現性の精度を有する機械刺激装置を開発する方法として、ソレノイドを独自に改良し、精密な光学測定に影響のあるレベルの振動が発生せず、かつ、高い位置精度を有した機械刺激装置の心臓部とする方針で開発を進めた。

(2) 電気刺激用透明電極

成体ラットの脳表面から光学的測定を行っている最中に、その記録範囲に複数の記録用電極を設置して用いる手法は、すでに、2009-2012年に課題番号21650095の挑戦的萌芽研究として開発済みである。その概略は、まず、電極は、電極本体のみならずそれにつながる導線も全て透明である必要があり、それらの基板(以下電極基板と呼ぶ)として、成体ラット脳を球体に近似して、その曲率半径にほぼ一致する曲面を有する平凹レンズを用いた。ただし、中央の一番薄い部分の厚さが少なくとも3 mm程度ないとラット脳には設置出来ないが、そのような規格の製品は市販されていないことが判明し、凹面鏡として市販されている製品の鏡面メッキを溶かし、平凹レンズとして用いることにした。本研究では、杉藤(株)から、鏡面メッキする前の半製品を入手出来ることがわかり、それを用いた。我々が光学的膜電位測定の測定対象としている感覚運動野と呼ばれる部分は、脳の正

中線に近い部位にあり、正中部の頭蓋骨をその直下を走る太い血管を傷つけずに除去することは事実上不可能であるため、平凹レンズを半切して用いた。記録用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基板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。

しかし、この記録用電極に電流を流し、刺激用電極として用いるにはGZO膜の電気抵抗が高すぎる為、脳組織の電気刺激に必要な1mA未満のわずかな刺激電流を流しただけで発熱し、GZO膜自体や二酸化珪素膜にクラックが生じ、電極が壊れてしまうことが判明していた。今回の研究では、様々な方法で電極抵抗を下げ、電極が壊れないのはもちろんのこと、電極の発熱により脳を温熱刺激することもないよう、連携研究者山田が透明導電体としてGZOに変わる新材料を導入した試作品を作成し、実際に動物実験に使えるかを我々が動物実験で確かめる方法を用いた。

4. 研究成果

(1) 機械刺激装置

ソレノイドを無振動で動作させる改良法として、図1.a.に示したように、バネを用いて動作させる方法を種々試みたが、刺激時に、駆動部がストッパーにぶつかる時に生じる振動を、位置精度を損なうことなく減じるのは、極めて困難であることが判明した。方法の項で述べたように、ストップ

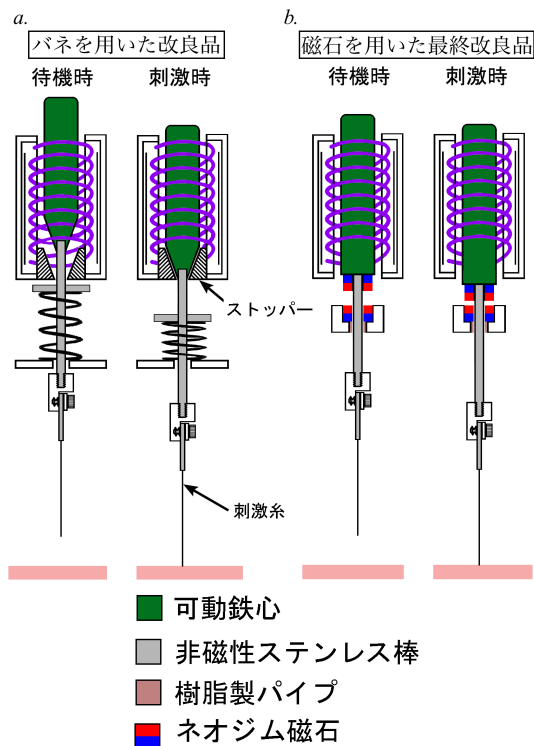


図1. ソレノイドの振動を減じる改良

一部にゴムが設置してある静音型の市販品は、ゴムに塑性的な変化が生じて位置が変動してしまう問題がある上、振動の除去も不完全であることが判明している。そこで、刺激時の位置精度を損なわず、衝突を回避する方法として、バネの代わりに、ドーナツ形状のネオジム磁石を同じ極が向き合うように設置する方法を試みることにした。その結果、磁石の反発力が可動部の位置に対してかなり急激に増加する為、刺激時の可動部の位置を決める、電磁石が鉄心を吸引する力と磁石の反発力が釣り合う点の精度が極めて高く、図1b.に示したように、ストッパー無しで動作させても、ストッパーの位置で金属同士が直接ぶつかる、静音型では無く位置精度の良いタイプのソレノイドと同等の精度が得られることが判明した。一方、可動部に設置するネオジム磁石の外径を、電磁石で吸引される可動鉄心の外径より1mm小さく、ソレノイドの電磁石を形成する鉄製の筒の中に自由に入り出出来る仕様にした時、可動部がネオジム磁石の吸引力でバネを用いることなく引き上げられることがわかった。引き上げる力は、可動部のネオジム磁石の上側と鉄製の筒の吸引力であり、ネオジム磁石の下側(上側と反対極)が筒に近づくとき鉄製の筒の磁性は弱まるため、電磁石に電流を流していない時の可動部の復元位置の精度も、バネを用いた時と同等かそれ以上に高いことを見いだした。

以上の改良を施したソレノイドの導入により、動物実験用の機械刺激装置に求められる、刺激の距離、速度、刺激強度の再現

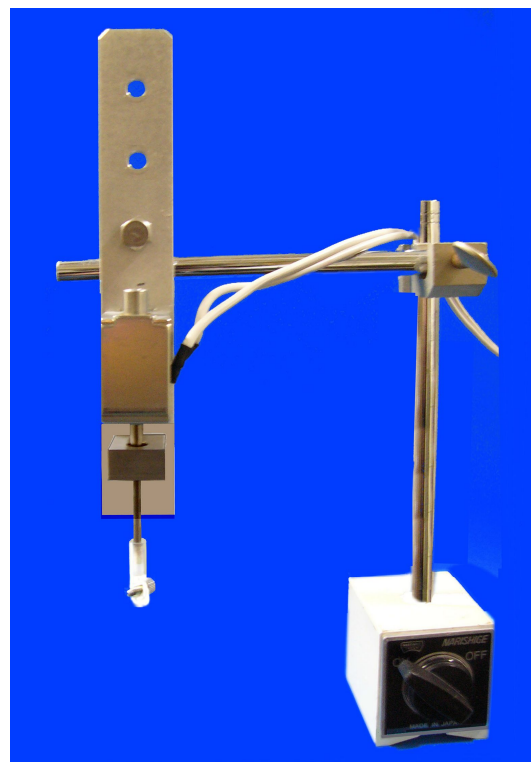


図2. 試作した無振動機械刺激装置

性の全てで高い精度を失うことなく、可動方向に機械的接触を全く伴う事無く機械刺激することを可能とするものであり、聴取可能な駆動音を一切生じさせない機械刺激装置を試作することに成功した(図2)

(2) 電気刺激用透明電極

最終的にほぼ完成した透明電極の基本的な製造方法の概略は、方法の項で述べたガラス製の平凹レンズの電極基板をアセトン中で超音波洗浄を行い、その後、アニール装置で、減圧大気(0.3 Pa 以下)で 500 の熱処理を加えた後、以下のプロトコールに従って透明電極を作成した(図3 参照)。

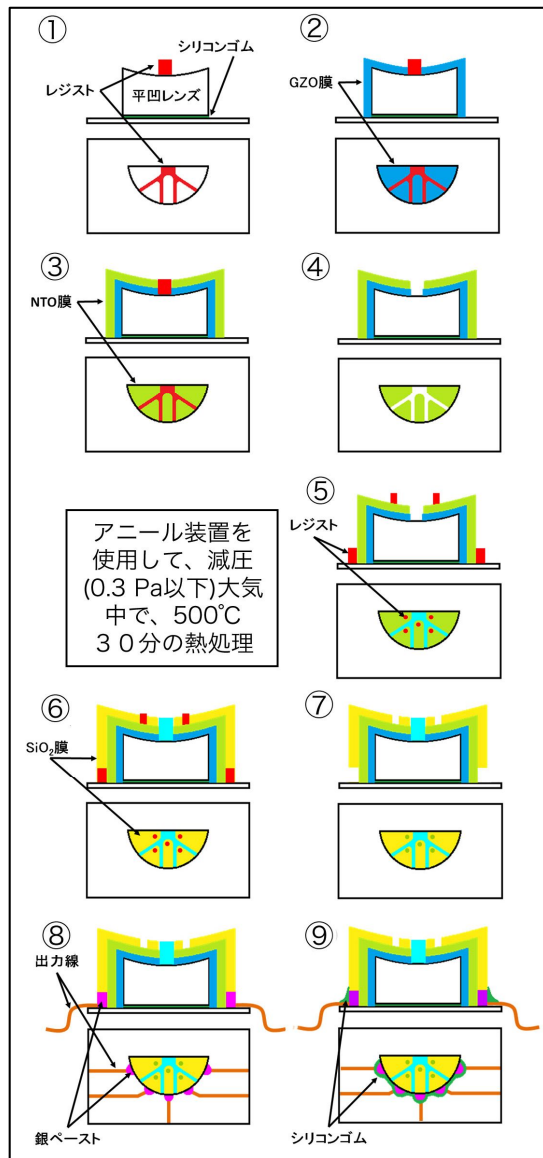


図3 . 5個の独立した電極を有する、電流刺激が可能な透明電極集集体製造法。

電極基板を、透明絶縁体であるシリコンゴムでガラス板に貼り、レジストで線を引く。

Ar gas 中でスパッターにより基板の凸面に透明導電体であるガリウム添加酸化

亜鉛(GZO)膜を形成する。

GZO 膜に重ねて、同じく Ar gas 中でスパッターにより Nb 添加酸化チタン(NTO)膜を形成する。

レジストを有機溶剤で溶かして除去すると、透明導電体膜は独立した5つの島に分かれ、相互間の導通は無い状態になる。ここで、GZO 層の特性向上及び NTO 層に導通を持たせるため、アニール装置を用いて、0.3 Pa 以下の減圧大気中で 500 、30 分熱処理(アニーリング)を行う。

曲面部の透明導電体膜上の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。透明導電体膜のレジストが無い部分を覆うように、透明な絶縁体である二酸化珪素(SiO₂)膜をスパッターで形成する。レジストを有機溶剤で除去すると、曲面部上に5ヶ所透明導電体膜が露出した部分が出来、この部分が電極として働く。側面に銀ペーストで出力線を取り付ける。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することで、透明電極が完成する。

しかし、で完成した透明電極の外部回路入出力用部分を、銀ペーストを用いて外部回路につなぐ所で、所定の研究期間が終了してしまっ。記録用の透明電極作成時に用いた銀ペーストをそのまま用いたのではうまく導通が取れないことは判明しており、現状はそれに代わる、NTO 膜に良く親和する銀ペーストを探索する作業の途中の段階にある。従って、当初の計画通り、この透明電極を用いてラットの脳の光学測定を行っている領野内を、電気刺激する動物実験はまだ実施できていない。しかし、透明電極の外部回路の入出力用部分にテストピンを押しつけ、透明電極の凹面部を満たしたリング液との間に、長時間連続して 1 mA の電流を流す実験を行う限り、電極が発熱により壊れることは無いことの確認は取れており、近々、透明電極が完成し、ラット脳を使った実験が行える見通しである。

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2件)

Hama N, Ito S, Hirota A. Optical imaging of the propagation patterns of neural responses in the rat sensory cortex: Comparison under two different anesthetic conditions. Neuroscience 査読有 264 巻 2015 年 126-133 頁

DOI:10.1016/j.neuroscience.2014.08.059.

Kawai M, Hama N, Ito S, Hirota A.
Improvement of the optical imaging technique for intact rat brain using a plano-concave lens. Journal of Physiological Sciences 査読有 64 巻 2014 年 445-449 頁
DOI:10.1007/s12576-014-0336-5

〔学会発表〕(計 14 件)

Minako Kawai, Noriyuki Hama, Shin-ichi Ito, Akihiko Hirota

Acute changes in the propagating excitation wave pattern on the rat somatosensory cortex.

第 93 回日本生理学会大会

2016 年 03 月 22 日~2016 年 03 月 24 日 札幌コンベンションセンター(札幌市)

河合美菜子, 濱徳行, 伊藤眞一, 廣田秋彦

ラットの尺骨神経挫滅後急性期における感覚野の興奮波伝播パターンの変化

第 76 回日本体力医学会中国・四国地方会

2015 年 11 月 21 日~2015 年 11 月 22 日 高知大学(高知市)

河合美菜子, 濱徳行, 伊藤眞一, 廣田秋彦

ラットの尺骨神経挫滅後急性期における感覚野興奮波伝播パターンの変化

第 67 回日本生理学会中国四国地方会

2015 年 10 月 24 日~2015 年 10 月 25 日 米子コンベンションセンター(米子市)

Noriyuki Hama, Minako Kawai, Shin-ichi Ito, Akihiko Hirota

Effects of excitation wave induced by forelimb stimulation on the propagation pattern of excitation wave induced by hindlimb stimulation in the rat sensorimotor cortex recorded with an optical recording system.

The 45th Annual Meeting of Society for Neuroscience.

2015 年 10 月 17 日~2015 年 10 月 21 日 McCormick Place in Chicago, IL USA

Noriyuki Hama, Minako Kawai, Shin-ichi Ito, Akihiko Hirota

Analysis of the effects of excitation wave induced by forelimb stimulation on the initiation time and the propagation pattern of excitation wave induced by hindlimb stimulation in the rat sensorimotor cortex recorded with an optical

recording system.

第 38 回日本神経科学学会

2015 年 07 月 28 日~2015 年 07 月 31 日 神戸国際会議場・展示場(神戸市)

Noriyuki Hama, Minako Kawai, Shin-ichi Ito, Akihiko Hirota

Effects of forelimb stimulation on the propagating excitatory wave evoked by hindlimb stimulation in the rat sensorimotor cortex recorded with optical recording system

第 92 回日本生理学会大会

2015 年 03 月 21 日~2015 年 03 月 23 日 神戸国際会議場、神戸国際展示場(神戸市)

濱 徳行, 河合 美菜子, 伊藤 眞一, 廣田 秋彦

ラット体性感覚野における前肢刺激の後肢刺激誘発興奮波に対する抑制効果

第 66 回日本生理学会中国四国地方会

2014 年 11 月 1 日~2014 年 11 月 2 日 情報通信交流館 e-とぴあ・かがわ(高松市)

今岡 洋子, 河合 美菜子, 森 大志, 宮田 浩文

女子学生におけるエキセントリック収縮後の骨格筋サテライトセル活性化

第 69 回 日本体力医学会大会

2014 年 09 月 19 日~2014 年 09 月 21 日 長崎大学文教キャンパス(長崎市)

Noriyuki Hama, Minako Kawai, Shin-ichi Ito, Akihiko Hirota

Suppressive effect of forelimb stimulation on the spatio-temporal pattern of hindlimb stimulation-induced neural response in the rat somatosensory cortex.

第 37 回日本神経科学学会

2014 年 09 月 11 日~2014 年 09 月 13 日 パシフィコ横浜(横浜市)

濱 徳行, 河合 美菜子, 伊藤 眞一, 廣田 秋彦

Effect of forelimb stimulation on the hindlimb stimulation-induced propagating excitation in the rat sensorimotor cortex detected by optical recording system.

第 91 回日本生理学会大会

2014 年 03 月 16 日~2014 年 03 月 18 日 鹿児島大学郡元キャンパス(鹿児島市)

Hama N, Ito S, Hirota A

Comparison of the propagation patterns of neural activity in the rat sensorimotor cortex under different anesthetics detected with multiple site optical recording system.

Society for Neuroscience 43rd Annual meeting

2013 年 11 月 09 日~2013 年 11 月 13

日 San Diego, USA

河合 美菜子、濱 徳行、伊藤 眞一、
廣田 秋彦

光学的膜電位測定法を用いたラット感
覚運動野における後肢興奮波伝播パタ
ーンに対する前肢同時刺激の影響の解
析

第 65 回日本生理学会中国四国地方会
2013 年 11 月 02 日 ~ 2013 年 11 月 03
日 川崎医科大学現代医学教育博物館
(倉敷市)

濱 徳行、伊藤 眞一、廣田 秋彦

Effect of anesthetics on the
spatio-temporal pattern of neural
activity in the rat sensory cortex
detected by optical recording system.

日本動物学会大会第 84 回岡山大会
2013 年 09 月 26 日 ~ 2013 年 09 月 28
日 岡山大学津島キャンパス(岡山市)

濱 徳行、伊藤 眞一、廣田 秋彦

Effects of forelimb stimulation on the
spatiotemporal pattern of neural
response evoked by hindlimb
stimulation in the rat sensorimotor
cortex studied with multiple site
optical recording system.

第 36 回日本神経科学学会
2013 年 06 月 20 日 ~ 2013 年 06 月 23
日 国立京都国際会館(京都市)

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：50156717

(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：10145295

(3)研究分担者

濱 徳行 (HAMA, Noriyuki)
島根大学・医学部・助教
研究者番号：60422010

(4)研究分担者

河合 美菜子 (KAWAI, Minako)
島根大学・医学部・助教
研究者番号：60422010

(3)連携研究者

山田 容士 (YAMADA, Yasuji)
島根大学・総合理工学部・教授
研究者番号：10362906