

## 研 究 報 告 書

### 「単一ニューロン分解能の神経活動記録・制御技術の開発と応用」

研究期間：平成 20 年 10 月～平成 24 年 3 月

研 究 者：林 勇一郎

#### 1. 研究のねらい

脳内では多数の神経細胞が複雑な時空間パターンで活動しており、そのパターンが特定の知覚や運動を引き起こすと考えられている。知覚や運動に伴う神経活動パターンの測定はこれまで広く行われてきたが、逆に特定の神経活動パターンを人為的に発生させれば特定の生理現象を引き起こせるか？という問いに答えることは技術的に困難であった。本研究では、脳内の複数の神経細胞の活動パターンを人工的に発生させる技術を開発し、これを応用して神経活動の時空間パターンの役割を調べることを目標とした。

#### 2. 研究成果

チャネルロドプシン2のような光感受性イオンチャネルを神経細胞に発現させると、光刺激によりミリ秒単位の精密な神経活動制御が可能になることが知られている。しかし一般的な光刺激法では刺激の空間分解能が低く、多数の神経細胞を同時に活動させることしかできない。脳内で実際に起こる神経活動の時空間パターンを模した活動を人工的に引き起こすには、より空間解像度の高い光刺激法が必要である。そこで本研究では光ファイバーバンドルと金属電極を組み合わせたプローブを開発し、これを脳に埋め込んで光刺激と神経活動記録を行う方法を検討した。

本研究で用いた光ファイバーバンドルは直径  $1.9\mu\text{m}$  の光ファイバーを  $3.4\mu\text{m}$  間隔で多数束ねたものである。レーザー光を集光して 1 本 1 本の光ファイバーに導くことで、数  $\mu\text{m}$  の空間分解能で光刺激を行うことができる。さらに、金属電極を光ファイバーバンドルの傍に配置し、光刺激により生じた神経活動を記録できるようにした(図1)。実際に製作したプローブは 3 本の光ファイバーバンドルと 10 本の金属電極を束ねたもので、直径約  $400\mu\text{m}$  である。チャネルロドプシン2を大脳皮質Ⅱ/Ⅲ層の投射細胞に発現させたマウスの大脳皮質に本プローブを挿入して光刺激を行うと、光刺激により生じた神経活動が電極から記録できた。各電極により捉えられた神経活動を分析すると、光刺激の場所により異なる活動が発生していることが確かめられた(図2)。

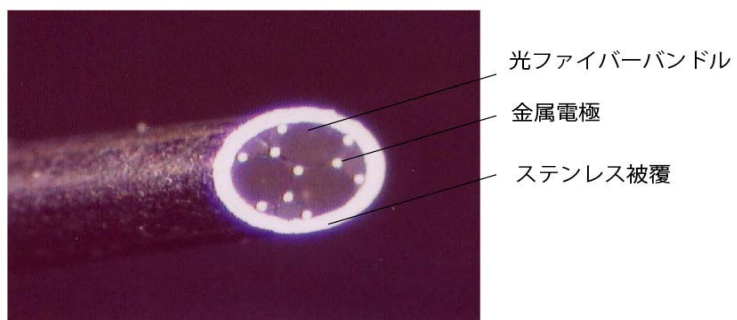


図1：試作プローブの構造

直径  $125\mu\text{m}$  の光ファイバーバンドル 3 本と直径  $13\mu\text{m}$  の金属電極 10 本がステンレス管に収められている。プローブ先端は  $45^\circ$  にカットされている。

次に、大脳皮質第V層の投射細胞にチャンネルロドプシン2を発現するトランスジェニックマウスを用い、一次運動野に内視鏡を刺入して光刺激を行った。刺激強度を調節すると、ヒゲ1本だけの動きを選択的に誘起できた(図3)。このことから空間的に限局された刺激が行われていることがわかった。

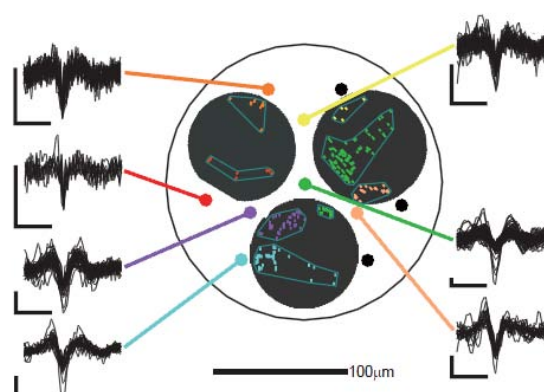


図2：光刺激により発生した神経活動の記録

3本の光ファイバーバンドルの様々な場所を光刺激して発生した電気活動を電極により記録した。活動が発生した光刺激点を各色のドットで示し各電極により記録された波形を左右に表示している。

### 3. 今後の展開

本手法の利点は、生きている動物の脳において複数の神経細胞の活動を自由に操作できることである。ただし脳組織への侵襲性の点から内視鏡を太くすることができないので、視野が狭い(マウスの場合およそ直径 300–400  $\mu\text{m}$  の範囲内)ことが欠点である。この特性から、大脳皮質のような脳の表層にある大きな部位よりも、脳深部の比較的小さな領域の機能マッピングを行うのに適している。また、研究期間内に行うことができなかったが、感覚刺激に対する神経活動パターンを記録しておき、それを内視鏡による光刺激によって再現することで感覚を再現できるか調べる実験を進めたい。

本研究で進めてきた方法は、神経活動の記録を電極で行うものであったが、内視鏡のみを用いてカルシウムイ

メージングによる神経活動記録も行うことができる。カルシウムイメージングは電極による神経活動記録に比べ時間解像度は悪いが空間解像度は高い。特に最近になってGFPベースのカルシウム感受性色素の改良が進み、in vivo カルシウムイメージングが容易に行えるようになってきた。カルシウム感受性色素と内視鏡の組み合わせは、2光子顕微鏡で観察できないような脳深部において cellular resolution の神経活動イメージングをおこなう有力な方法と思われる。

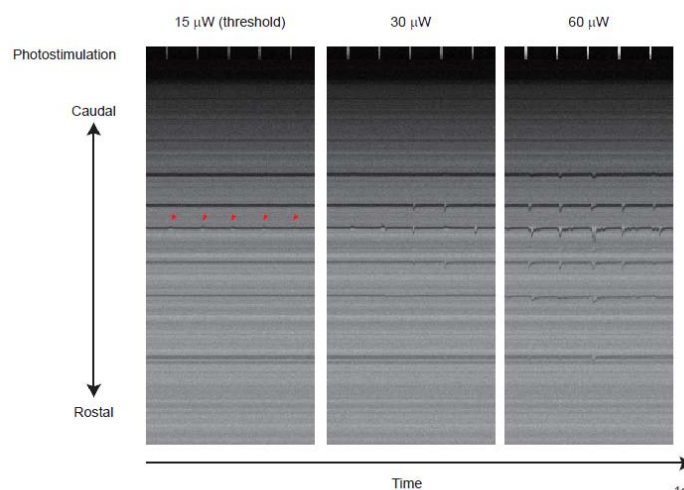


図3：光刺激により誘起されたひげ運動

一次運動野のひげ領域にプローブを挿入し、様々な強度の光刺激を行ってひげ運動を計測した。図の黒い横線はひげの位置の時間変化を示す。ひげが動くと横線に棘が生じる。最も弱い光強度では1本のひげのみが動いている。

### 4. 自己評価

多数の電極を備えた内視鏡を開発し、生きている動物の脳において光刺激により神経活動パターンを発生させ、その活動を電極により記録することに成功した。一方、応用に関しては、時間を多く割けなかったこともあり、現時点でそれほど興味深い結果は得られていない。4で述べたような本手法の特徴を生かせる問題に応用していくことが今後の課題と考えている。

## 5. 研究総括の見解

脳機能を記録することにより、脳機能を明らかにする研究は多いが、運動／知覚の機構を本当に知るためには、これらの記録・観察のみでなく、脳の機能単位群を人為的に制御することが併せて必要である。本研究は、脳内の複数の神経細胞の活動パターンを人工的に発生させる操作技術を開発し、これを応用して神経活動の時空間パターンの役割を明らかにすることを目標とした。このために、多数のニューロン活動を高分解能で制御できるユニークな内視鏡型の光・電気結合電極を開発した。この電極を用いて、単一ニューロン単位の分解能で光刺激を行うことができることを示し、チャンネルロドプシンを発現させた動物の1本の髭を動かすことにも成功した。この内視鏡型電極は、世界的にも先進的な機器開発であり、広い境界型の知識と粘り強い研究により生まれたものである。今後、特に海馬や大脳基底核など脳深部の脳活動の記録／刺激に活用することにより、解読のみでなく制御にも活用されるBMI開発についての基礎的な知見がさらに蓄積されることが期待される。

## 6. 主な研究成果リスト

(1)論文(原著論文)発表  
投稿中

(2)特許出願  
なし

(3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物等)

林勇一郎 内視鏡を用いた神経活動の時空間制御

第34回日本神経科学大会 2011年9月16日 横浜(ポスター)

林勇一郎 光感受性イオンチャンネルと内視鏡による神経活動の時空間制御

第50回日本生体医工学会大会 2011年4月29日 東京(口頭)

林勇一郎 神経活動の時空間制御

第33回日本神経科学大会 2010年9月3日 神戸(ポスター)

林勇一郎 Spatio-temporal control of neural activity using optogenetics

第32回日本分子生物学会年会 2009年12月9日 横浜(口頭)