

太田 淳

奈良先端科学技術大学院大学 物質創成科学研究・教授

## バイオメディカルフォトニック LSI の創成

### § 1. 研究実施体制

#### (1) 太田グループ (研究機関別)

① 研究代表者: 太田 淳 (奈良先端科学技術大学院大学物質創成科学研究科, 教授)

#### ② 研究項目

・バイオメディカルフォトニック LSI (bmp-LSI) システムの開発

(a) バイオメディカルフォトニック LSI の高機能化

高分解能化 ( $\sim 10\mu\text{m}$ ), 2 波長検出機能集積化, 高感度化, 刺激電極の集積化とポテンシャル検出回路集積化

(b) 超小型バイオメディカルフォトニック LSI とその分散システムの開発

チップの小型化と分散配置を可能とするパッケージング技術の開発

#### (2) 塩坂グループ (研究機関別)

① 主たる共同研究者: 塩坂 貞夫 (奈良先端科学技術大学院大学バイオサイエンス研究科, 教授)

#### ② 研究項目

・バイオメディカルフォトニック LSI の分子イメージングへの応用

(a) バイオメディカルフォトニック LSI の生体動作検証

パーキンソン病・てんかんでの神経伝達機構および神経回路の異常・伝達障害に対応するデバイスとして使用可能か検証するため, ドーパミンなど伝達物質, 神経可塑性プロテアーゼ, 神経活動などを生体内および細胞・スライスにて安定的にモニターする技術を開発する

(b) バイオメディカルフォトニック LSI の完全埋植による記憶形成メカニズムの解明

低侵襲でありながら時間連続的・2 次元的に脳内情報を取得できるバイオメディカルフォトニック LSI の利点をいかし, モデル動物の海馬・扁桃体に完全埋植して動物行動を有線にて測定し, 学習が海馬・扁桃体に蓄えられる過程を追跡する

(3) 加藤グループ(研究機関別)

① 主たる共同研究者:加藤 天美 (近畿大学医学部、教授)

② 研究項目

・機能的脳疾患医療応用の検討

(a) ヒト病理組織における神経回路応答-BMP-LSI 応用のための基礎研究

(b) ブレイン-コンピュータ・インターフェイスへの展望

- ヒト運動関連野の皮質脳波解析

- ヒト言語関連野の皮質脳波解析

(4) 岩田グループ(研究機関別)

① 主たる共同研究者:岩田 幸一 (日本大学歯学部、教授)

② 研究項目

・齧歯類痛覚神経回路の解析

・サル痛覚神経回路の解析

## § 2. 研究実施内容

(文中に番号がある場合は(3-1)に対応する)

### A. 太田グループ

#### (a) bmp-LSI の高機能化

bmp-LSI の高機能化は、昨年次ではほぼ開発は終了しているが引き続き一層の高分解能化と励起光均一化を狙った。まず高分解能化ではライトガイドアレイ方式作製プロセスの見直しにより歩留まり向上を図った。また励起光均一化に関しては、励起光源をフリップチップボンディングにするなど実装方式の見直しと励起光カットフィルター塗布方式の見直し、センサ側への漏れ光の抑制などにより、均一な励起実現を歩留まり良く実現できる作製プロセスを確立した。更に Optogenetics との融合を目指したセンサの開発も開始した[A-1]。

#### (b) 超小型バイオメディカルフォトニック LSI とその分散システムの開発

分散配置に適した小型 bmp-LSI の試作を行い、更にデイジーチェーン方式 bmp-LSI を考案しその基本動作実証に成功した[A-2]。またこのデイジーチェーン方式 bmp-LSI を用いてラット脳表への分散配置を行い、電位感受性色素による神経細胞応答を確認することにも成功した。加藤チームとの共同により脳内埋植型センサ埋植をヒト献体脳を用いて実施した[A-3]。自由行動マウスへの埋植では、これまでの塩坂グループとの埋植実験の結果を詳細に分析し、更に低侵襲な bmp-LSI を開発した。また今年度より開始する岩田グループとのサルを用いた実験として、まず岩田グループとの打合せによりセンサデバイスの仕様をほぼ確定した。またサル埋植の予備実験と

して、電位感受性色素を用いた脳表への埋植実験を行った。

## B. 塩坂グループ

23 年次研究計画の(a)および(b)についてそれぞれ個別に結果を以下に示すこととする。

### (a) バイオメディカルフォトニック LSI の生体動作検証

パーキンソン病・てんかんでの神経伝達機構および神経回路の異常・伝達障害に対応するデバイスとして使用するためドーパミン神経を i) GFP の発現神経細胞としてモニターする技術、ii) 感度よく GFP の蛍光を検出するセンサーの開発、および iii) GFP 発現トランスジェニック動物を用いたセンサーの検証をおこなった。

#### i) ウイルス感染による GFP 発現神経細胞の検出

この方法論については22年度からの継続検討事項として、GFP 遺伝子を組み込んだシンドビスウイルスを神経細胞に感染発現させ、これを脳内に注入して局所的に GFP を発現させることにより行った。これを bmp-LSI センサーで検出することを試みた。その結果、脳に埋植したセンサーによって GFP タンパク質を安定的に検出することに成功した。

#### ii) 感度よく GFP の蛍光を検出するセンサーの開発

i)に示したように開発を進めてきたセンサーを使い、GFP 発現細胞の測定を安定的に行うことができた。前年度からの問題点であった生体組織に対するダメージをセンサーの小型化や生体に優しいセンサーコーティング剤の開発等によって大きく前進し、きわめて小さなダメージに押さえることができた。

#### iii) TH-GFP マウスの線条体 GFP 検出

i)および ii)に記載のように GFP の測定にはすでに成功し、さらに安定して測定する状況となってきた。合成系の変化を、線条体ドーパミン神経系特異的なプロモーターに GFP 遺伝子を組み込みこの蛍光タンパク質を安定して発現する遺伝子改変マウス(TH-GFP マウス)を導入して、神経回路の切断などパーキンソン病のモデルと考えられている系においてセンサーの有効性を検証した。その結果、GFP の測定については GFP を持たない野生型マウスと比較して、線条体の位置において高いシグナル値が得られ、in vivo において GFP タンパク質の蛍光を検出することにはじめて成功し、GFP を発現する黒質細胞の破壊により、GFP の蛍光が減少する過程を検出することにも成功した。この成果は22年度に予備的な結果としてえられていたが、23年度ではそれをさらに検証を深め、論文としてまとめこれを投稿中である。

#### iv) 電位差感受性色素を用いた神経細胞活動の測定

電位差感受性色素を培養細胞に適用することによって神経活動をセンサーにて測定することはすでに22年度に成功している。23年度は脳スライスと、さらに一步進めて in vivo においてこれを適応し、センサーによる同色素の検出に成功した。

### (b) バイオメディカルフォトニック LSI の完全埋植による記憶形成メカニズムの解明

#### i) 有線にて記録しながら自由行動状態で記録する基本技術の開発

小型化センサーの検証に手間取ったためにこの計画はあまり進んでいない。24 年度にはこの計画を推し進め、さらに一步進んだ検証、たとえば慢性電極を埋めた自由行動マウスによる長期増強誘導と同時測定するなど、によって記憶形成メカニズムの解明のための新しい実験系として提案していきたい。

GFP の測定、電位差感受性色素の測定等を通して自由行動の基本技術を確立した。センサーサイズについては当初目標を達成できた。解像度、および感度などまだ十分とはいえないが、自由行動下での生体分子測定のための基本技術を確立し、生体内動作検証の項目については目標がほぼ達成されたと考えている。

### C. 加藤グループ

てんかんや脳腫瘍、パーキンソン病などの脳疾患[C-1,2,3,5,6 ]における機能的障害の病態は充分解明されていない。バイオメディカルフォトニクス LSI(BMP-LSI)は極めて斬新な神経機能計測手段であり、これらの疾患に対して、従来にはない病態の解明が期待される。

本分担研究では、その医療応用を目指すべく、てんかんや脳腫瘍など脳神経外科手術患者において、治療のため病理組織が得られたり、頭蓋内電極を挿入した患者を対象に、下記の研究を行った。なお、これらの研究は患者に新たな侵襲を加えるものではなく、近畿大学医学部倫理委員会の承認と、患者との間のインフォームドコンセントを得ている。

#### (a) ヒト病理組織における神経回路応答-BMP-LSI 応用のための基礎研究

ヒトへの BMP-LSI の応用は高度に組織化された神経ネットワークを解析する革新的な技術を開発するため、脳内の神経細胞やグリアの形態を観察すると同時に神経活動の測定と光刺激により神経活動を制御できるシステムを目指している。その予備的検討として、ヒト脳スライス標本において、点電極システム(MED システム、64ch、アルファメドサイエンス製)を用い、脳内のネットワークを構成する細胞をリアルタイムで観察しながら細胞を電機刺激し電気活動を測定する技術を開発した。

#### (b) ブレイン-コンピュータ・インターフェイスへの展望

BMP-LSI は、ブレイン-コンピュータ インターフェイス(BCI)への応用は好適である。その予備実験として、脳神経外科患者の脳皮質信号から、ヒトの言語形成の企図が解読できるか試みた。

##### - ヒト言語関連野の皮質脳波解析

治療のため脳表電極を設置された1人の脳神経外科患者の協力を得て、単語黙読時の皮質電気活動を計測し、その単語の推定を行った。その結果、これら、運動や言語の企図解読の研究において、比較的同期的な電気活動を行う広い範囲の皮質領域と、脳機能判別性能が高い狭い皮質領域の存在が明らかになった。ヒトの複雑な高次脳機能がいかに発現するかは不明な点が多く、本研究によってこれを解き明かす革新的な成果が得られると考えられた。

##### - ヒト言語関連野の fMRI 解析 単語から文レベルへ

BCI に使用する脳波として、どの部位に電極を留置すれば、最も効率の良い信号を得られるかという点について考察するため、単語レベルと文レベルの課題を用いて fMRI を撮像した。その結果、音韻認知からの語想起と不完全文からの語想起において、賦活部位は異なっていた。音韻の認

知と文理解で異なる領域が関与していると考えられた。文レベルの課題を遂行する場合には、右半球の言語野対応部位も賦活すると考えられた。BMI において、文レベルの理解・発話処理過程の信号を計測するためには、ブローカ野、ウェルニッケ野以外の言語野関連部位にも電極を留置する必要性が示唆された。それに対し、単語レベルであればブローカ野に局限した電極留置でよい可能性が示唆された。

#### - ヒト脳深部電極への BMP-LSI 応用の検討

BMP-LSI の光照射と受光を利用して脳手術時の電極定置場所を探る手段として活用するという新たな試みをパーキンソン病における脳深部刺激[C-3]をモデルに施行した。解剖体の脳に BMP-LSI を先端に装着した電極を挿入し、安定したデータ採集が可能かどうか検討している[C-4]。

### D. 岩田グループ

#### ・齧歯類痛覚神経回路の解析

痛みによる不快情動については特に大脳皮質前帯状回の役割が大きいと言われる。この領域と他の大脳皮質領域との相互作用を本 LSI によって解析可能かどうかを検証する。

#### ・サル痛覚神経回路の解析

上記齧歯類での基礎実験を経て、より高度な大脳をもつサルにより痛覚、不快および情動がどのようにして大脳皮質で情報処理されているかを本 LSI によって解析可能かどうかを検証する。

本研究では、温度刺激強度変化弁別課題を訓練したサルの大脳皮質における神経活動を、光学的手法を用いて導出し解析することを目的にしていることから、本研究プロジェクトを成功に導くためには、サルの訓練が非常に重要なウェイトを占める。通常、我々の研究室では訓練が完結するのに約6ヶ月から10ヶ月の期間を要する。図1にモンキーチェアに座った状態のサルの模式図(図1A)およびサルに与えた課題(図1B)を示している。

23年度は本プロジェクトの最初の年であることから、温度刺激強度変化を弁別できるようにサルを訓練することを目的とした。現在までに2頭のサルにおいて温度刺激弁別課題を訓練し、両方ともに脳活動記録ができる状態に至っている。

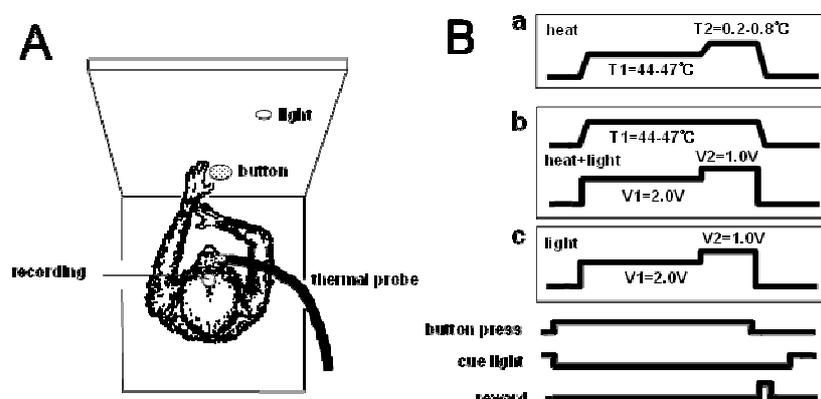


図1: 図1A はモンキチャーに座っているサルと前面に設置されたパネルの位置関係を示した模式図である。図1B は上段から熱刺激、光刺激+熱刺激および光刺激の時間経過を示している。また、最下段にはボタン押しと報酬との時間関係を示している。

### § 3. 成果発表等

#### (3-1) 原著論文発表

##### ●論文詳細情報

A-1 A. Nakajima, H. Kimura, Y. Sawadsaringkarn, Y. Maezawa, T. Kobayashi, T. Noda, K. Sasagawa, T. Tokuda, Y. Ishikawa, S. Shiosaka, J. Ohta, "CMOS image sensor integrated with micro-LED and multielectrode arrays for the patterned photostimulation and multichannel recording of neuronal tissue," *Optic Express*, 20 (6), 6097-6108, 2012.

A-2 J. Ohta, A. Tagawa, T. Kobayashi, T. Noda, K. Sasagawa, T. Tokuda, "Implantable Distributed Biomedical Photonic Devices," *Sensors & Materials*, **23**(7), 369-458, 2011.

A-3 野田 俊彦, Pan Yi-Li, 田川 礼人, 小林 琢磨, 笹川 清隆, 徳田 崇, 畠中 由美子, 中野 直樹, 加藤 天美, 塩坂 貞夫, 太田 淳, 脳深部刺激手術用 in situ イメージングプローブの開発, *電気学会論文誌E*, 131 (12), 427-428, 2011. (DOI:10.1541/ieejsmas.131.427)

A-4 A. Nakajima, T. Noda, K. Sasagawa, T. Tokuda, Y. Ishikawa, S. Shiosaka, J. Ohta, "Planar Multielectrode Array Coupled Complementary Metal Oxide Semiconductor Image Sensor for In vitro Electrophysiology," *Jpn. J. Appl. Phys.* **50** (4), 04DL04-1-6, 2011. (DOI: 10.1143/JJAP.50.04DL04)

A-5 J. Ohta, T. Kobayashi, T. Noda, K. Sasagawa, T. Tokuda, "CMOS Imaging Devices for Biomedical Applications (Invited)," *IEICE Trans. Commun.* E94-B (9), 2454-2460, 2011. (DOI: 10.1587/transcom.E94.B.2454)

B-1. Ishikawa, Y., H. Tamura, et al. (2011). "Diversity of Neuropsin (Kallikrein 8)-dependent Synaptic Associativity in the Hippocampal Pyramidal Neuron." *Journal of Physiology [London]* 589(14): 3559-3573. (doi:10.1113/jphysiol.2011.206169)

B-2. Shiosaka, S. and Y. Ishikawa (2011). "Neuropsin-a possible early phase synaptic mediator." *J. Chem. Neuroanat.* 42: 24-29. ( DOI: 10.1016/j.jchemneu.2011.05.014)

B-3. Attwood, B. K., J. M. Bourgognon, et al. (2011). "Neuropsin cleaves EphB2 in the amygdala to control anxiety." *Nature* 473(7347): 372-5. (doi:10.1038/nature09938)

C-1. Okuda T, Yoshioka H, Kato A: Fluorescence-guided surgery for glioblastoma

multiforme using high-dose fluorescein sodium with excitation and barrier filters. *J Clin Neurosci*, 2012 in press

C-2. Iwatani Y, Kagitani-Shimono K, Tominaga K, Okinaga T, Mohri I, Kishima H, Kato A, Sanefuji W, Yamamoto T, Tatsumi A, Murata E, Taniike M, Nagai T, Ozono K: Long-term developmental outcome in patients with West syndrome after epilepsy surgery. *Brain Dev*, 2012 in press DOI:10.1016/j.braindev.2012.01.008

C-3. Nakano N, Tanada M, Watanabe A, Kato A: Computed Three-Dimensional Atlas of Subthalamic Nucleus and Its Adjacent Structures for Deep Brain Stimulation in Parkinson's Disease. *ISRN Neurology*, Volume 2012 (2012), Article ID 592678, 13 pages DOI:10.5402/2012/592678, 2012

C-4. 中野 直樹, 加藤 天美, 野田 俊彦, 太田 淳, 徳田 崇, 塩坂 貞夫, 畠中 由美子 脳深部構造のイメージングの試み, *機能的脳神経外科 別冊*, 131 pp.427-428 2011

C-5. 岩谷祥子, 下野九理子, 東純史, 池田妙, 木村志保子, 富永康仁, 沖永剛志, 貴島晴彦, 加藤天美, 永井利三郎, 大藪恵一: 難治性スパズムに対し左大脳半球機能的離断術が有効であった症候性 West 症候群の 1 例. *大阪てんかん研究会雑誌*, 22 1-8, 2011

C-6. Hashimoto N, Rabo CS, Okita Y, Kinoshita M, Kagawa N, Fujimoto Y, Morii E, Kishima H, Maruno M, Kato A, Yoshimine T: Slower growth of skull base meningiomas compared with non-skull base meningiomas based on volumetric and biological studies. *J Neurosurg*, epub ahead ,2011 DOI: 10.3171/2011.11.JNS11999

C-7 Nakanishi K, Uchiyama T, Nakano N, Fukawa N, Yamada K, Yabuuchi T, Iwakura N, Kato A: Spinal syringomyelia following subarachnoid hemorrhage. *J Clin NeuroSci*, 19: 594-597, 2012 DOI:10.1016/j.jocn.2011.07.035

C-8 Nakanishi K, Nakano N, Uchiyama T, Kato A: Hemiparesis caused by cervical spontaneous spinal epidural hematoma; Report of 3 cases. *Adv Orthop*. 2011; 2011: 516382 2011 DOI:10.4061/2011/516382

C-9 Sanada Y, Fujinaka T, Yoshimine T, Kato A: Optimal Reconstruction with Hydroxyapatite Cement for Bony defect after Frontotemporal Craniotomy. *J Clin Neurosci*, 18 280-282, 2011 DOI:10.1016/j.jocn.2010.03.045

C-10 Taniguchi M, Kato A, Taki T, Tsuzuki T, Yoshimine T, Kohmura E:  
Microsurgical Maneuvers under Side-Viewing Endoscope in the Treatment of Skull  
Base Lesions. Skull Base, 21 115-122 ,2011 DOI:10.1055/s-0031-1275248

**(3-2) 知財出願**

① 平成 23 年度特許出願件数(国内 0 件)

② CREST 研究期間累積件数(国内 1 件)