研究論文

Analogue FPAA と組込用 MCU を用いた完全無拘束 動物実験のための多点ニューロン同時 計測システムの開発*¹

—Neuroscope 1—

山本 純*², 高橋 宗良*², 塚田 稔*³, 安西祐一郎*²

慶應義塾大学理工学部情報工学科*², 玉川大学工学部情報通信工学科*³

A New Multi-Unit Acquisition System for Free-Moving Animal Using Field Programmable Analog Array and on Chip MCU —Neuroscope 1—

Jun Yamamoto,*² Mune-yoshi Takahashi,*² Minoru Tsukada*³ and Yuichiro Anzai*²

Department of Computer Science, Faculty of Science and Technology, Keio University*²

Department of Information and Communication Engineering,

Faculty of Engineering, Tamagawa University*³

We designed a new multi-unit acquisition system for free-moving animal which breaks through the constraint of conventional multi-unit recording systems. To release those animals from thick electronic wires while experiments, the IrDA infrared data communication, field programmable analog array-MPAA 020 and 16 bit micro processor-H 8 were used for the design. We summarized the related works for multi-unit recording techniques and pointed out the defects of those old techniques. Then the design of the system were introduced. In the result of the paper, we checked the fidelity of recorded neural activity and the reliability of the data transmission.

1. はじめに

ヒトをはじめとする動物は外界の情報を各種の感覚器によって獲得し、その状況に応じて記憶や判断を行い、運動という形で外界に働きかける。その記憶や判断を行っている脳のニューロン活動を捉え、そのメカニズムを解明する試みが多くの研究者によって行われている。その方法は微小電極を挿入して電気的に計測する手法から、特殊な化学物質を用いてニューロンを染色しその活動を光学的に計測する手法、ひいては放射性同位体や核磁気共鳴を利用した CT や MRI に代表されるようなニューロンに無侵襲な手法まで様々なアプローチがある。

歴史的にみれば、神経信号の伝達が電気的に行われていることに着目して微小電極を脳内に挿入し電気的に記録する手法は古く、単一電極によるニューロン活動の記録および解析が行われてきた。しかし、最近では脳を構成するニューロンの数と比較すると、単一電極による計測では解析に必要な情報量が不充分であるとの考えから、複数の微小電極を高密度に挿入して一度に数百以上のニューロン活動を捉え、相応の解析手法を用いる試みが盛んに行われている。

脳のいかなる領域を研究対象にしても、それを構成しているニューロン群のネットワークは複雑に結合しているため、多点でニューロン活動を計測し解析を行うことが必要となる。特に学習や神経の可塑性のメカニズムの解明には、短時間のデータ計測で終える急性の実験ではなく、計測のためのデバイスを長期にわたって実験動物に装着しニューロン群の応答様式や構造の変化を長期的に計測することが必要であると考え

*¹ 1998 年 9 月 14 日受付, 11 月 16 日受理

*² 〒 223-8522 神奈川県横浜市港北区日吉 3-14-1

*³ 〒 194-8610 東京都町田市玉川学園 6-1-1

る。

これまでに様々な多点記録法を用いた研究が報告されている。本研究では最初に従来の慢性的なデバイスを用いた小動物用の慢性学習実験における問題点である「実験動物の電氣的配線群による拘束」を指摘する。次に実験動物の完全に無拘束な多点記録システムを提案し、実際の動物に装着してシステムのデータ収集に関する忠実度や信頼性を検証する。

2. ニューロン活動の多点同時記録

微小電極を用いた初期の頃の多点記録は1956年にVerzeanoが、2本の電極を用いて猫の大脳皮質からニューロン活動を記録することに成功している¹⁾。「多点同時記録」の手法により、それまでの「単一電極記録」では得られなかった、新しい知見が数多く報告されている。この「多点同時記録」の手法は、覚醒状態で自由に動き回る動物からの記録が特に難しく、各国の研究者がこれに挑んでいる。

多点同時記録の実験で、ラットに慢性電極を長期にわたり挿入したMcNaughtonらの研究では、tetrodeと呼ばれる4連の微小電極を12本挿入して、時間と振幅による細胞の分離により、最大148個の細胞から同時に記録した²⁾。さらにWilsonらはラットの海馬CA1領域に特定の場所にのみ選択的に反応を示す「場所ニューロン (place cell)」が存在することを始めて明らかにした³⁾。また、櫻井の研究では、ラットの海馬CA1やCA3領域にタスクの条件、および作業記憶・参照記憶に密接に関連する細胞群が存在することが5組の慢性微小電極を脳内に挿入し、長期にわたって記録することで明らかとなった^{4,5)}。

このように微小電極を複数本挿入し同時に多くのニューロン活動を捉えることで、これまでになく新しい知見が得られているのであるが、いずれの研究においても実験動物は頭蓋骨に固定された電極から天井へ伸びる多数の信号ケーブルで拘束されており、完全に無拘束ではないことが問題点として挙げられる。そのために動物に行わせることのできる実験内容が相当に限られ、今後の「多点同時記録法」による研究が進展する上で大きな制約となる。そこで本研究ではこの制約を解消するために複数のニューロン活動を実験動物上で増幅・デジタル化し高速な赤外線通信を用いて完全に無拘束の状態での多点同時計測を行うシステムを開発した。

一般の電子回路に比べ、生体のニューロン活動のように微小な電気信号で動作しているシステムの計測を行う際には、多くの注意点が挙げられる。神経ネット

ワークに流れる電流のオーダとしては数十pA～数百pAで、神経が発火するときに生じるスパイクの大きさは数百 μ V～数十mVであることが実験的に知られている。そのような微小信号を電氣的に増幅する際には、入力インピーダンスが大きく、外来ノイズの除去比の大きな差動増幅器 (オペアンプ) を用いる。また信号源と増幅器を接続する際、信号線のインピーダンスのマッチングが正確に取られた伝送路でなければ、理想的には計測対象の信号源に限りなく近いところで増幅処理を行うことが望ましい。また、オペアンプの特徴として外部に付加する抵抗や容量の位置関係や大きさにより、増幅器をはじめ、各種フィルタ (LPF: low pass filter, HPF: high pass filter, BPF: band pass filter, BEF: band elimination filter等) に代表されるような積分器、微分器を構成することが可能であることは良く知られている。

小動物の多ニューロン記録を行う場合、信号源である脳付近でマルチチャネルの増幅を行うことを考えると、従来の複数チャネル入り表面実装用のオペアンプを必要な回路数個ならべるだけで面積的制約により不可能となる。そこで本研究ではFPGA: field programmable gate arrayのアナログ回路版に相当するFPAA: field programmable analog arrayを応用した。機能が柔軟にプログラム変更可能な20個のオペアンプを内蔵した低消費電力のLSI (Motorola社製MPAA 020) を用い、携帯電子機器用に開発された16bitワンチップマイコン (日立製作所社製HD 64 F 3048) および、国際的に標準化された高速赤外線通信プロトコル (IrDA) のLSIを多層基板上に凝集し、無線化多点同時記録システムを構築した。

3. IR 多点同時計測システム— Neuroscope 1 の設計

従来の慢性電極を長期的に脳内に挿入して行う動物学習実験では、ニューロン活動記録用の多芯シールドケーブルが実験動物の頭部より伸びて、外部のラックに設置された生体信号用アンプに接続されるのが通例である。これは動物が脳定位固定装置などに固定され麻酔を施された状態で計測する急性の計測実験ではあまり問題とはならない。しかし覚醒下で動物に自由な空間を移動させて行うような慢性電極による学習実験では、実験動物に多大なストレスを与えるだけでなく十分な行動範囲を与えることが困難となる。その結果として動物に与えることのできる作業課題の種類が限定されるという問題点が挙げられる。

また慢性電極実験では、実験対象となる脳の領野

(例えば過去の実験例では海馬 CA 1 領域や聴覚や視覚などの感覚野あるいは運動野など)のニューロン群の探索から実験を開始する。その際、実際の計測においては作成する電極のインピーダンスの個体差や挿入位置に起因すると考えられる感度の不均一が発生する。そのためにアンプの利得は一定に固定されているが不便で、波形をモニタリングしながら適当な値に設定を行う必要がある。例えば 16 本の電極を用いて計測を行う場合、製作する電極のインピーダンスは電極先端の研磨精度によって大きいときには数倍その値が異なる場合があり、不可避な現象である。そのような電極を用いた場合、増幅器の利得が固定であると信号源を同一条件で計測しても、計測結果が異なるといった状況が発生し得る。多点記録のように電極間での計測結果を比較し相互相関を取るようなデータ処理を行う場合には、上記のような電極-増幅器を含めたシステムの不均一性は大きな問題である。そこで多点記録を行う前に、波形発生器で発生させた信号源を同一の測定条件にして各チャンネル間の利得調整を行う必要がある。また、他方で心拍などのニューロン活動とは関係のない電位変化も計測データに載ってくる可能性もある。その際には LPF や HPF などのアナログフィルタのカットオフ周波数のパラメータ調整を行い、不必要なノイズの低減を行う必要性も出てくる。

上記のように従来の微小電極を用いた計測実験では、計測機器の多くのパラメータをシステム毎に変更する必要があるが、従来の実験セットの実験効率をさらに改善することが可能であると考えた。そこで本研究では、慢性のマルチチャンネル電極を用いた動物の学習実験計測システムのうち、ソフトウェア的に設定変更可能なデバイスを用いてオンボードでニューロンの信号を増幅しフィルタリングを行い、A/D 変換器を用いてデジタル情報に変換し、その結果のニューロン活

動状況を高速な赤外線通信で外部に転送可能な計測デバイス、Neuroscope 1 の開発を行った。

3.1 プログラマブル・アナログ・ゲートアレイの応用

Neuroscope 1 では、ソフトウェア的に内部機能の設定が変更可能なアナログ・ゲートアレイ、Motorola MPAA 020 の柔軟性に着目し応用した。

Motorola MPAA 020 は、CMOS 構造のオペアンプ(差動増幅器)をコアのプログラマブル素子として使い、 5×4 に並んだ 20 個のコア・セルを集積している。デバイスの設定は、SRAM 構造の結線情報を保持するメモリに対し、電源投入時に書きこむことで瞬時に設定することが可能であり、作動中も何度でも変更が可能である。

プログラマブル・アナログ・ゲートアレイの内部設計は、専用の開発ツールを用いて行う。結線情報は視覚的に配置することができ、アンプの利得やフィルタの周波数の設定はツール内で簡単に行うことができる。また、ツール画面上の回路情報は迅速にロジックデバイスの結線情報にコンパイルでき、すぐに変更内容をデバイスに反映させることができる。このアナログ・ゲートアレイの詳細を Table 1 にまとめた。

Neuroscope 1 では、このデバイスを主に増幅器およびフィルタとして用いている。

3.2 組込用 16 bit MCU と IrDA 赤外線通信

Neuroscope 1 のコントローラとして HITACHI 社製 16 bit H 8/300 H をコアにもつ H 8/3048 MCU (micro controller unit) を用いた。このチップは、増幅されたニューロンの活動電位の A/D 変換、データ処理、高速赤外線通信の他に、MPAA 020 のコンフィギュレーションも行う。また高速赤外線通信プロトコルとして国際標準規格で統一されている IrDA プロトコルを採用した。現在、IrDA 規格は最高 4

Table 1 MPAA 020 performance specifications.

Definable parameter	Spec.
Fclk	1 MHz
Max signal BW	200 kHz
Signal/Noise	60 dB
Cross talk rejection	over 50 dB
Programmable cells	20
Analog I/O's	13
DC offset	less than 10 mV
External drive	100 pF, 1 K load
Internal voltage ref.'s	Band gap 8 bit DAC
Max. power dissipation	200 mw 10 mw/cell
OpAmp gain bandwidth slew rate	over 100 dB 5 MHz 10 V/ μ s

Mbps の転送レートまでサポートしている。本システムでは IrDA 1.1 をサポートしておりニューロン活動電位の 10 bit の A/D 変換データ 16 ch 分をまとめて、約 1 ms 以下の時間分解能で連続送信できるだけのボーレートを確保している。また、IrDA 1.1 規格での通信範囲は直線距離で約 1 m だが、本システムでは送受信モジュール（Telefunken 社製 TFDS 6000）の周辺回路の工夫により約 2.5 m の通信距離を実現した。

3.3 Neuroscope 1 のシステム設計

本研究のシステムは以下のような手順で使用するよう設計した。まず実験内容に応じて実験者の手元でアナログ・ゲートアレイのコンフィギュレーション情報を作成する。その情報をシステム起動時に PC の IrDA ポートから実験動物に装着された Neuroscope 1 へ送信する。Neuroscope 1 上の H 8/3048 MCU では受信したゲートアレイ情報に基づきデバイスの設定を行う。設定終了後の H 8/3048 MCU はニューロン活動電位を繰り返し高速に A/D 変換しバッファリングを行う。その計測データは赤外線通信デバイスを通じてホスト PC に送信される構成になっている。それを受信したホスト PC ではデータのストレージを行うとともに画面へのリアルタイム出力を行う。本システ

ムのブロック図を Fig. 1 に、詳細を Table 2 にそれぞれ示した。

実験動物の計測部位に慢性的に固定された微小電極から得られたニューロンの活動電位は、プリアンプを通してアナログ・ゲートアレイに入力され、そこで適当なゲインとフィルタリングのアナログ信号処理を行う。その後、H 8/3048 内部 A/D および外部に付加した A/D 変換器でデジタル情報に変換され、変換時刻のタイムスタンプを刻印したデータをシリアル通信ポートより出力する。そのデータは IrDA プロトコル変換 LSI で変換され、データが赤外線のパルス列となって動物からニューロンの活動状況が得られる仕組みとなっている。この一連の動作を行う回路は Fig. 2 に示すような直径 55 mm、重量 20 g の 4 層基板に収めた。このシステムの電力供給は 3 V のリチウム電池（CR 2025, 20 mm ϕ $\times$ 2.4 mm, 1.5 g）を 2 個直列接続し 6 V とした。この電池は基板の裏面に両面テープで固定した。このクラスの電源セルを用いたときの計測チャンネル、サンプリング周波数、システムの持続時間の関係を Table 3 に示した。

4. データの忠実度と信頼性

Neuroscope 1 のデータ変換の忠実度とその信頼性

Fig. 1 The block diagram of the Neuroscope 1.

Table 2 Neuroscope 1 design specifications.

Definable parameter	Spec.
Maximum analog input	16 ch
Input impedance	over 500 M Ω
Maximum amp. gain	2000
A/D sampling rate	250 kHz max.
IrDA transfer rate	4 Mbps max.
Size	56 mm ϕ $\times$ 8 mm approx.
Weight	20 g
Supply voltage	6.0 V

Fig. 2 Top and bottom view of the Neuroscope 1.

Table 3 Neuroscope 1 performance specifications.

CHs	Sampling freq.	System duration
2 ch	250 kHz	15 hours
4 ch	200 kHz	12 hours
8 ch	100 kHz	8 hours
16 ch	50 kHz	5 hours

Fig. 3 Test samples for checking the system.

を検証するために予備計測実験として、①波形発生器で生成した信号の測定実験を行いノイズや歪みを調べた。次に実際の②生体ラット海馬 CA1 領域のコンプレックススパイクの測定実験を行った。

4.1 サイン波・矩形波の記録実験

予備記録実験①では、波形発生器で滑らかな関数と

してのサイン波および急峻な立ち上がり・立ち下りを持つ矩形波をそれぞれ 1V_{p-p} の大きさで発生させリファレンス信号とした。そのリファレンス信号を金属皮膜抵抗器で正確に 1000 : 1 に分圧し Neuroscope 1 に入力させて計測した。Neuroscope 1 では FPAA のゲインを 1000 倍に設定し、高周波ノイズ除去として

LPFのカットオフ周波数を1kHzに設定した。増幅されたアナログ信号をA/D変換器でサンプリングし115.2 kbpsのボーレートでPCに転送した結果をFig. 3に示した。

計測結果が示すように、いずれの波形も目立つノイズや波形の歪みは認められないことがわかる。また、これは16chすべての出力端子を観測しても同様の結果が得られた。計測時には、Neuroscope 1と宿主側赤外線ポートの間を1対1に配置し約2.0mの距離を置いて計測した。計測時の赤外線通信デバイスの方向をそれぞれ $\pm 15^\circ$ 任意に変化させてもデータ欠損などの障害は認められなかった。

4.2 ラット海馬CA1ニューロン活動の記録実験

予備実験①でNeuroscope 1システムの基本性能が測定されたので、実際のラットの頭部に本システムを装着し、過去の慢性学習実験で観測されている海馬CA1領域のコンプレックススパイクを観測した。こ

の実験にあたってはFig. 4およびFig. 5に示すような防音シールドボックスに赤外線ポートを配置して行った。実験を行った防音シールド箱の大きさは、 $W:1.2\text{m} \times H:1.4\text{m} \times D:1.2\text{m}$ のもので、宿主PC側のIrDA赤外線ポートを複数チャンネル配置した。

通常の電子機器（ノートPC、各種PDAやデジタルカメラ等）に搭載されるIrDAポートは、通信先の機器と1対1の向き合わせで行い、ポートの向きによっては通信が不安定になる場合がある。本システムの場合、動物が動きまわることによって通信が不安定になっては実験データが欠損して不都合である。そこで本システムでは送受信部を多対多のOR接続にして一斉に送受信を行うように工夫した。実際の回路では送受信ポート（一体成形部品）の入力をワイヤードOR接続の形態で接続し、いずれかのポートにデータが飛び込めば通信が可能となるように設計した。設計した赤外線ポートは複数のサテライト赤外線通信モジュール

Fig. 4 IR communication port configuration.

Fig. 5 A practical application of the Neuroscope 1. (A) During recovery from the anesthetic state. (B1-2) During an experiment—Free exploration in shield box.

Fig. 6 Multi unit neural complex spikes recorded by the Neuroscope 1.

ルが増設可能で、箱の天井・側壁に約 50 cm の間隔で設置すると、ラットがどの方向を向いたときでも通信が途絶えないように設計されている。これにより行った実験では電池の寿命に伴う電圧降下時を除くと、データの欠損レートは約 0.02% であった。

In vivo の計測実験では Fig. 5 に示すような脳内に複数の電極を高密度で挿入できる Hyperdrive (David KOPF 社製) を用いた。この Hyperdrive は、McNaughton らが開発したものを製品化したもので、オリジナルのキットには Headstage Amp (Neuralynx 社製) と呼ばれる有線接続の増幅基板が付属している。今回の実験では、正味マイクロドライブの部分だけを流用した。Hyperdrive の重量および Neuroscope 1 の重量はそれぞれ 20 g で、駆動用の 3 V リチウム電池 (CR 2025, 1.5 g) 2 個分と合わせて合計で約 45 g となった。システム全体の大きさは W: 60 mm × D: 55 mm × H: 65 mm (突起部含) であり、Fig. 5 に示すような 600 g のオスのラットに装着した。Neuroscope 1 と Hyperdrive は高密度ピッチのコネクタで接続され、この複合ユニットと頭蓋骨はデンタルセメントで固定した。次にこの部位に太さ 25 μm の双極電極 (電極間ギャップ約 50 μm) を 8 本挿入した。

Fig. 5 のように設置した空間で、ラット海馬体 CA 1 領域の計測実験を行った。その時のニューロンスパイクの計測結果を Fig. 6 に示した。計測部位は左側海馬 CA 1 領域である。

全 8 ch のうちニューロン活動が記録されたチャンネルのサンプリングデータを 3 例挙げた。この時の Neuroscope 1 の設定は、ゲイン 1500 倍で HPF のカットオフ周波数を 300 Hz とした。この結果のスパイク形状は有線を用いた通常の慢性電極実験で得られるスパイク列と同等の結果であることがわかる。実験終

了後は検体の脳を取りだし、電極到達位置の確認のため海馬スライス標本を作成した。

5. 考 察

知覚・記憶・判断・学習・注意などの脳のメカニズムを探る場合、ニューロンの発火という現象を意味のある情報と捉えて計測するのが、微小電極を用いた電気生理実験である。その際、単一電極もしくはニューロンの大きさに比べて大きな電極でニューロンの活動を捉えても、あまり意味のある結果を得ることはできない。複雑に結合したニューロン群のような活動を捉えるには、数〜数十マイクロメートルの電極を高密度に多数挿入し計測する必要があると多くの研究者が認識している。また、脳の高次機能に関するメカニズムの計測には麻酔下ではなく覚醒状態でしかも無拘束の動物にストレスを与えることなく計測するのが望ましいと考える。

そのような観点に立って現在の多点同時計測を考えると、前述のような「実験動物の拘束」という問題点が浮上した。そこで集積度の高いプログラマブルなアナログデバイスとシグナルプロセッサ、および高速赤外線通信を組み合わせることで新たな計測デバイスを設計し、完全に動物を無拘束にした状態での多点同時計測の可能性を検討した。前述の計測実験の結果が示すように、予備実験①の計測波形がリファレンスの波形と多少の電氣的ノイズが重畳されているのは不可避免であると考えても、実用に十分耐える結果であることが確認された。また、実際の生体にも本システムを装着した実験結果②では通常の慢性電極実験で得られるニューロンの複合スパイクが観測され、本システムの妥当性が検証された。

今後この Neuroscope 1 を含むシステムを用いて慢性電極による学習実験を行う予定であるが、その実験パラダイムとしてこれまで困難とされた複雑迷路のナビゲーションタスクにおける海馬体ニューロンの可塑性変化に関する実験や複数個体が共存する空間での多点同時計測といった、空間的に制約を受けるタスクを動物に行わせることが可能となる。また、ラットやモルモットのような動物だけでなく、サルやネコの学習実験にも本システムの応用が可能なのは明らかである。今後は任意の大きさに刺激が加えられるような電気刺激系も本システムに組み込む予定である。

謝 辞 本研究を遂行するに当たり文部省重点領域研究「高次脳機能のシステムの理解」(40051875) および「可塑性神経回路の情報処理」(05267104) の援

助を受けた。

参 考 文 献

- 1) Verzeano, M. (1956) : Activity of cerebral neurons in the transition from wakefulness to sleep, *Science*, Vol. 124, pp. 366-367
- 2) McNaughton, B. L., O'Keefe, J. and Barnes, C. A. (1983) : The stereotrode: A new technique for simultaneous isolation of several single units in the central nervous system from multiple unit records, *Journal of Neuroscience Methods*, Vol. 8, pp. 387-391
- 3) Wilson, M. A. and McNaughton, B. L. (1993) : Dynamics of the hippocampal ensemble code for space, *Science*, Vol. 261, pp. 1055-1058
- 4) Sakurai, Y. (1996) : Population coding by cell assemblies—what it really is in the brain, *Neuroscience Research*, Vol. 26, pp. 1-16
- 5) Sakurai, Y. (1996) : Hippocampal and neocortical cell assemblies encode memory processes of different types of stimuli in the rat, *Journal of Neuroscience*, Vol. 16, pp. 2809-2819