

研究報告書

「光・電気マイクロチップによる高分解能ニューラルインターフェースとニューロ-LSI 融合 BMI の開発」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 22 年 10 月～平成 26 年 3 月

研究者: 徳田 崇

1. 研究のねらい

本研究は、CMOS (complementary metal oxide semiconductor) 集積回路技術をベースに、高分解能で光と電気によって神経細胞を刺激・計測するニューラルインターフェースデバイスを開発し、新しい神経ネットワーク解析/BMI 技術を実現することを目指す。

イメージセンサ機能をもつマイクロチップ上にマイクロ光源アレイを実現し、光感受性チャネルタンパク質を利用した局所光刺激と、光や電気による神経活動計測技術を統合する。*in vitro* (生体から取り出した試料で) および *in vivo* (生体内・生きたままで) での機能を実証するとともに、実現した技術の実用化を目指す。また、開発したマイクロチップをプラットフォームとし、チップ上に培養した神経細胞システムの活動をマイクロチップに搭載した『ニューロ-LSI 融合システム』の基礎検討にもとりくむ。

本研究のデバイス開発が成功すれば、従来 MEMS ミラーなどを自由空間で用いなければ実現できなかった外部光源による局所光刺激と、顕微鏡を必要としたイメージングを、厚さ 1mm 以下のマイクロチップをコアとする超小型デバイスで行うことが可能となる。*in vivo* においては、本マイクロチップをワイヤレス技術と組み合わせることで、完全埋め込み型も実現可能であり、新しい BMI プラットフォームとして期待できる。

2. 研究成果

(1) 概要

本研究では、CMOS イメージセンサをベースとして独自機能を実現した CMOS 集積回路センサチップとマイクロ光源アレイを集積化した、光・電気神経インターフェースデバイスを開発した。このデバイスは、チャネルロドプシン(ChR2 等)を発現させた神経システムに接触させて利用するものであり、*in vitro* および *in vivo* の用途に応じた形のデバイスを作製した。

実現した光・電気神経インターフェースデバイスの機能のうち特に重要な光刺激機能を中心に、*in vitro* および *in vivo* での機能実証を行った。*in vitro* では、ChR2 を発現させた Neuro-2a に対して、*in vivo* ではマウス脳皮質に対して光刺激実験を行った。光刺激によるターゲット神経系の反応は、電気生理的な計測によって確認した。また、マウス心筋系培養細胞を、ネットワークをもった細胞システムのモデルとして光刺激によるネットワーク活動の制御についても検討を行った。

光・電気神経インターフェースデバイスをワイヤレス駆動するためのシステムの基礎検討を行い、プロトタイプデバイスを試作した。プロトタイプデバイスは、実験動物の体外においてボタン電池で駆動するものであり、光刺激のための青色発光ダイオードの駆動と、CMOS センサに集積化したイメージセンサアレイによる発光強度のモニタリング機能を実現した。今後、デ

デザインの最適化によってデータレートを向上し、さらなる小型化と生体適合性パッケージングによって、完全埋め込み型・自由行動実験に対応することができる。

(2) 詳細

研究項目①:ニューラルインターフェースチップの開発=局所光刺激の実現

光と電気で脳神経を刺激・計測するためのマイクロデバイスを、CMOS 集積回路技術をベースとして開発した。CMOS 集積回路は、プロセッサやメモリを実現するために用いられており、Si チップ上に微小な(ゲート長=電子の走行長が数十 nm~数百 nm という)トランジスタを多数集積し、高度な信号処理を行うことができる。また、Si は可視光を吸収してキャリア(電子や正孔)が発生するため、光を計測することが可能である。

本研究では、CMOS イメージセンサ技術をベースとして、イメージセンサの画素アレイ上に多数の電極を形成し、これを利用した電氣的計測や刺激機能を実現する。ただし、Si ではオプトジェネティクスに利用可能な発光デバイスを実現することは困難であるため、本研究では、すでに実現されている GaInN 系高効率発光ダイオード(LED)アレイを電気計測・刺激機能搭載イメージセンサに集積化することで、光・電気両方を用いた神経刺激・計測デバイスを実現した。

図 1 に、本研究の光・電気神経インターフェースデバイスの概念を、図 2 にデバイスの例を示す。CMOS チップ部は複数回の改良により、安定した機能を実現した。デバイス構造のタイプによって、光刺激・イメージングに特化したものと、光と電気両方を利用することができるものがある。

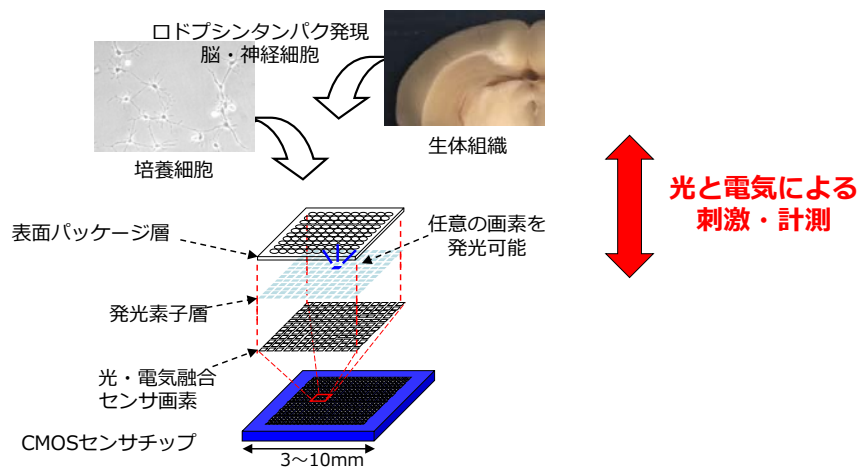


図 1: 光・電気神経インターフェースデバイスの概要

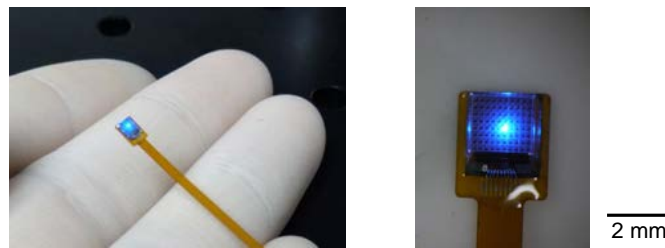


図 2: 実現した光・電気神経インターフェースデバイスの例

研究項目②: 培養細胞を用いた *in vitro* 機能実証

in vitro 実験用パッケージングを施したデバイスの表面に、ChR2 を導入した Neuro-2a 細胞を培養して、光刺激機能を実証した。図 3(a)に、*in vitro* 機能実証用のデバイスパッケージを示す。この細胞に対して光刺激を行い、その反応をパッチクランプ法によって測定した。図 3(b)に計測例を示す。細胞への ChR2 の導入が不完全であるため強い光を要するが、光刺激による膜電流の変化を確認することができた。デバイスの防水性・機能維持についても、数週間におよぶ細胞培養と実験に耐えることを確認した。

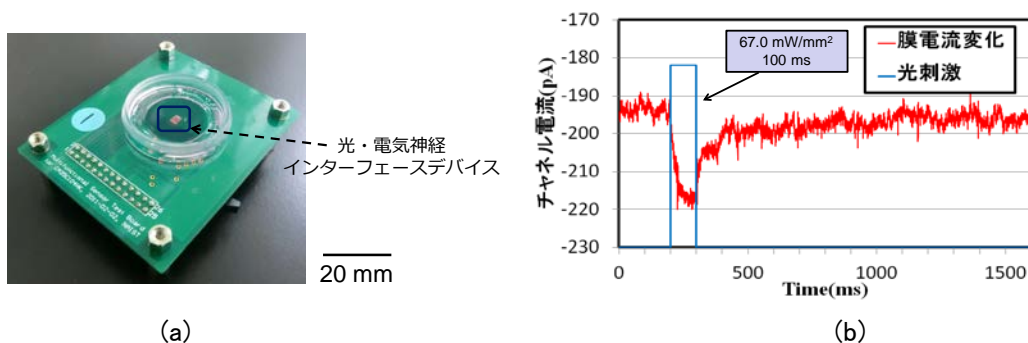


図 3: *in vitro* 実験用デバイスと培養細胞の光刺激実験の結果

研究項目③: ニューロ-LSI 結合系の検討

本研究で実現したデバイスは、刺激と計測の機能を両方備えており、デバイスで計測した細胞活動を、別の細胞への刺激に影響を与えるような系を実現するのに適している。これについての検討を行うため、現時点のデバイス機能で反応を確認することができ、光刺激により制御可能な系として、心筋細胞ネットワークを用いた試行を行った。培養したマウス心筋系培養細胞(P19CL6)のネットワークをデバイス上に配置して、ネットワーク上の心筋細胞群同志の同期や連携を人為的に制御する実験を行った。ChR2-mCherry を導入した心筋細胞は、光刺激によって拍動リズムへの干渉が可能であり、光刺激による収縮の発生および、強い光による拍動の停止を得ることができる。

研究項目④: 動物実験による *in vivo* 機能実証

試作したデバイスの、*in vivo* での機能実証を行った。*in vivo* すなわち生体埋め込み用途には、図 2 に示したデバイスパッケージングを用いた。デバイスはポリイミドフレキシブル基板上に実装されており、実験動物の脳などに接触・刺入して運用することができる。ChR2 が脳の神経細胞全般に発現する遺伝子改変マウスを準備した。ChR2 発現マウスを麻酔下で開頭し、大脳皮質一時視覚野上に本デバイスを配置し、光刺激実験を行った。光刺激への反応とみられる神経活動を観察することができた。

研究項目⑤: ニューラルインターフェースデバイスのワイヤレス化の検討

本研究で実現した光・電気ニューラルインターフェースデバイスをワイヤレス駆動するための駆動システムの試作・検討を行った。電池駆動式のプロトタイプを試作し、LED をリモート駆動するとともに光計測データをワイヤレス送信できることを確認し、基本機能を実現した。

3. 今後の展開

今後も、本研究で得られた技術をさらに発展させることで、脳科学や神経科学に利用可能な高機能・小型神経インターフェースプラットフォームの実現にとりくむ。特に、ユーザとなる脳科学・神経科学分野の研究グループでの利用を行いながらの機能拡張および性能の改善が最重要課題である。すでに、本研究で実現したデバイスを、複数の脳科学・神経科学研究者に提供し、実際の研究における有効性と課題について検討を開始している。

4. 評価

(1) 自己評価

本研究では、当初目的とした光・電気神経インターフェース技術について、最重要と考えていた光刺激機能の実現と、*in vitro* および *in vivo* に対応したデバイスの機能実現・機能実証を行った。そのほかの研究項目ごとの目標達成においても、概ね想定した研究を実施することができたが、さらに実験回数を確保し、実験バリエーションを網羅することができればよかった。

エレクトロニクス分野とバイオサイエンス分野にまたがる研究であり、初めて取り組む内容(遺伝子操作等)も多かったため、計画進捗が前後する部分あった。その中で、さきがけアドバイザーからの助言や研究者との交流により、多くの意見と示唆を得たことは本研究の進捗に大変役に立った。さきがけ研究者と本研究に関連した共同研究を開始しており、研究終了後の展開に向けても恩恵にあずかった。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

本研究では BMI に不可欠の高分解能ニューラルインターフェースとして、CMOS イメージセンサをベースとして、独自機能を実現した CMOS 集積回路センサチップとマイクロ光源アレイを集積化し、光・電気神経インターフェースデバイスを開発した。研究の進捗は良好であり、BMI の基礎となる脳活動研究に必須の刺激・記録装置として重要な貢献をなすとともに、侵襲型 BMI に必須なインターフェースとして、その実用化が期待される。当初、研究者が提案した課題はほぼ完遂されたと考えられる。

このデバイスは、チャンネルロドプシン(ChR2 等)を発現させた神経システムに接触させて利用するものである。実現した光・電気神経インターフェースデバイスの機能のうち特に重要な光刺激機能を中心に生物材料を用いた検証を行った。光・電気神経インターフェースデバイスを体外ボタン電池でワイヤレス駆動するプロトタイプでは、光刺激のための青色発光ダイオードの駆動と、CMOS センサに集積化したイメージセンサアレイによる発光強度のモニタリング機能を実現した。基本的機能は実現されおり、さらなる小型化と生体適合性パッケージングによって、完全埋め込み型・自由行動実験に対応できる。

5. 主な研究成果リスト

(1)論文(原著論文)発表

1. Y. Sawadsaringkarn, T. Miyatani, T. Noda, K. Sasagawa, T. Tokuda, and J. Ohta, "A CMOS optoelectronic neural interface device based on an image sensor with on-chip light stimulation and extracellular neural signal recording for optogenetics," *ITE Transactions on Media Technology and Applications*, 1(2) pp. 184–189 (2013)
2. T. Tokuda, S. Nakajima, Y. Maezawa, T. Noda, K. Sasagawa, Y. Ishikawa, S. Shiosaka, and J. Ohta, "An *in vitro* demonstration of CMOS-based optoelectronic neural interface device for optogenetics," *Proceedings of 35th Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society*, pp. 799–802 (2013).
3. T. Tokuda, H. Kimura, T. Miyatani, Y. Maezawa, T. Kobayashi, T. Noda, K. Sasagawa and J. Ohta, "CMOS on-chip bio-imaging sensor with integrated micro light source array for optogenetics," *Electron. Lett.* 48, pp. 312–314 (2012)
4. A. Nakajima, H. Kimura, Y. Sawadsaringkarn, Y. Maezawa, T. Kobayashi, T. Noda, K. Sasagawa, T. Tokuda, Y. Ishikawa, S. Shiosaka, and J. Ohta, "CMOS image sensor integrated with micro-LED and multielectrode arrays for the patterned photostimulation and multichannel recording of neuronal tissue," *Optics Express*, Vol. 20(6), pp. 6097–6108 (2012).
5. T. Tokuda, T. Noda, K. Sasagawa and J. Ohta, "Optical and Electric Multifunctional CMOS Image Sensors for On-Chip Biosensing Applications," *MDPI.com Materials* 4(1), pp. 84–102 (2011).

(2)特許出願

研究期間累積件数:2件

1.

発明者: 徳田 崇、太田 淳
発明の名称: 脳内情報計測装置
出願人: 奈良先端科学技術大学院大学
出願日: 2009/9/25(研究申請に先立って関係概念を申請したもの)
出願番号: 特願 2010-531721, 特許第 5224482 号(2013/03/22 登録)

2.

発明者: 徳田 崇、太田 淳、笹川 清隆、野田 俊彦
発明の名称: 脳機能計測装置及び計測方法
出願人: 奈良先端科学技術大学院大学
出願日: 2012/10/17
出願番号: 特願 2012-229419

(3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

国際会議招待講演

1. [キーノート] T. Tokuda "Microelectronics-based Implantable Devices for Bio-Medical Applications", *IEEE Asia-Pacific Conference on Postgraduate Research in Microelectronics*

- (PrimeAsia 2012), 2012/12/6, Hyderabad, India. [Link]
2. T. Tokuda, T. Noda, K. Sasagawa, and J. Ohta, "Bio-Implantable CMOS Neural Interface Device with Integrated Micro LED," CMOS Emerging Technologies workshop 2013, 2013/7/18, Whistler, Canada.
 3. T. Tokuda, T. Noda, K. Sasagawa, and J. Ohta, "Optoelectronics Devices for Biomedical Applications," The 10th Conference of Lasers and Electro-Optics Pacific Rim (CLEO-PR 2013), 2013/07/02, Kyoto, Japan.
 4. [チュートリアル] T. Tokuda, "Design of CMOS image sensor and related surface-sensing sensors with standard CMOS technology," The 26th International Conference on Microelectronic Test Structures (ICMTS2013), 2013/03/25, Osaka University Nakanoshima Center, Japan

国際会議発表

1. T. Tokuda, S. Nakajima, Y. Maezawa, T. Noda, K. Sasagawa, and J. Ohta, "Device packaging of CMOS-based optoelectronic neural interface device for *in vitro* and *in vivo* optogenetics," The 6th International IEEE EMBS Neural Engineering Conference (NER2013), FrDT8.3, 2013/11/8, San Diego, CA, USA.
2. T. Tokuda, S. Nakajima, Y. Maezawa, T. Noda, K. Sasagawa, Y. Ishikawa, S. Shiosaka, and J. Ohta, "An *in vitro* demonstration of CMOS-based optoelectronic neural interface device for optogenetics," 35th Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society (EMBC2013), ThB13.14, 2013/07/04, Osaka, Japan.
3. T. Tokuda, T. Miyatani, Y. Sawadsaringkarn, T. Kobayashi, T. Noda, K. Sasagawa and J. Ohta, "A CMOS on-chip Image Sensor with Integrated LED Array for Optogenetics," 2012 International Conference on Solid State Devices and Materials (SSDM2012), PS-11-13, 2012/09/26, Kyoto, Japan.
4. T. Tokuda, T. Miyatani, Y. Maezawa, T. Kobayashi, T. Noda, K. Sasagawa, and J. Ohta, "A CMOS-Based On-Chip Neural Interface Device Equipped with Integrated LED Array for Optogenetics," Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society (EMBC2012), FrC16.6, 2012/8/31, San Diego, USA
5. T. Tokuda, T. Miyatani, Y. Maezawa, T. Kobayashi, T. Noda, K. Sasagawa, and J. Ohta, "CMOS-based on-chip bio-image sensor with integrated micro LED array for optogenetics," Neuroscience 2012 (SfN2012), 207.04/DDD28, 2012/10/14, New Orleans, USA
6. T. Tokuda, T. Miyatani, Y. Maezawa, T. Kobayashi, T. Noda, K. Sasagawa, and J. Ohta, "CMOS-based Optoelectronic Neural Interface Device for Optogenetics," Neural Interface Conference, H-1, 2012/6/18, Salt Lake City, USA
7. Y. Sawadsaringkarn, H. Kimura, Y. Maezawa, Arata Nakajima, T. Kobayashi, K. Sasagawa, T. Noda, T. Tokuda, J. Ohta, "A CMOS On-Chip Neural Interface Device with an Integrated Light Source for Optogenetics," (poster), The Asia-Pacific Interdisciplinary Research Conference 2011 (AP-IRC 2011), 18PP-8, 2011/11/18, Toyohashi, Japan.

8. A. Nakajima, T. Kobayashi, T. Noda, K. Sasagawa, T. Tokuda, Y. Ishikawa, S. Shiosaka, J. Ohta, "A novel CMOS image sensor with on-chip micro LED array for spatiotemporally controlled light stimulation and on-chip imaging of a neuronal tissue," 2011 International Conference on Solid State Devices and Materials (SSDM2011), GH-2-5, 2011/09/28, Nagoya, Japan
9. T. Tokuda, H. Kimura, Y. Sawadsaringkarn, Y. Maezawa, T. Kobayashi, T. Noda, K. Sasagawa, J. Ohta, "CMOS-based on-chip intelligent neural stimulation / imaging device with an integrated micro light emitter array for optogenetics," (poster), Neuroscience2011 (SfN2011), YY27 306.16, 2011/11/13, Washington DC, USA

書籍・解説記事

1. 徳田 崇, 太田 淳, "オプトジェネティクス向け CMOS イメージセンサ," "オプトジェネティクス—光工学と遺伝学による行動制御技術の最前線—" NTS 刊, 第 3 編 3 章 第 2 節, pp. 269-281 (2013).
2. 徳田 崇, 太田 淳, 知っておきたいキーワード"オプトジェネティクス," 映像情報メディア学会誌 66(10) pp. 842-645 (2012).