

平成 30 年 5 月 31 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2017

課題番号：25282130

研究課題名(和文) 移植用途を目指した神経組織刺入型カーボンナノチューブバンドル電極の開発と評価

研究課題名(英文) Development and evaluation of neural-tissue-penetrating carbon-nanotube-bundle electrodes towards implant applications

研究代表者

林田 祐樹 (Hayashida, Yuki)

大阪大学・工学研究科 准教授

研究者番号：10381005

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,600,000円

研究成果の概要(和文)：先行開発したカーボンナノチューブバンドル(CNTb)神経電極を、移植用途を目指して改良開発し、その性能をin-vivo脳組織を用いた生理学実験等により評価・検証した。その結果、in-vivo齧歯動物の脳皮質内への刺入および微小電気刺激に使用可能な機械的強度・形状・電気化学特性を併せ持つCNTb電極の作製に成功した。さらに、in-vivo脳活動のミリ秒分解能イメージングによって、我々のCNTb電極を介した微小電気刺激で人為的に神経興奮を誘発できることを実証した。世界的前例のないこれらの成果は、次世代の超多チャンネル刺激による神経補綴の可能性を大きく広げると考える。

研究成果の概要(英文)：We modified and improved our previously developed carbon-nanotube-bundle neural electrodes towards the implant application, and evaluated their performances in brain tissues by means of physiological experiments in vivo, and of others. As a result, we succeeded in fabricating CNTb electrodes having mechanical strength, shape, and electrochemical properties usable for insertion into, and the microstimulation in, the cerebral cortex of rodents in vivo. Furthermore, by millisecond resolution in-vivo imaging of the cortical activity, we demonstrated that the microstimulation through our CNTb electrodes can artificially induce neural excitations. We believe these unprecedented results will greatly expand the potential of neural prostheses with next-generation multi-channel stimulation.

研究分野：医用生体工学

キーワード：生物・生体工学 ナノ材料 脳・神経 神経電極 神経刺激 神経補綴 神経工学 神経生理学

1. 研究開始当初の背景

難治性の神経機能障害に対する人工内耳、脳深部刺激、人工網膜などの神経補綴や、筋ジストロフィー、筋萎縮性側索硬化症など重度四肢運動機能障害に対するブレイン-マシンインターフェイス(以下BMI)の研究開発が国内を含め世界各地で盛んに行われている。両者ともに、体の外に電極やセンサー等を置く非侵襲的方法と、体内に電極等を設置する侵襲的方法とがある。前者には当然ながら外科手術に伴う問題は生じないが、経頭蓋の電/磁気刺激、脳電/磁図、近赤外分光計測などでは、その時空間的な分解能が比較的低く、例えば感覚系のような情報量の多い神経機能の補綴/代行を求めるのは原理的に困難であると考えられる。これに対し後者では、神経組織と電極との直接的なインターフェイスであるため、将来的には、神経活動の計測と、刺激によるその制御を双方向に行うことができ、さらに後述の問題が克服されれば、これを少数細胞群単位の高い空間分解能で実現できる可能性がある。

通常、神経組織における電気的な刺激・計測の時空間分解能は、電極と組織との間のインピーダンスに大きく左右されるため、組織表面に設置する電極に比べ、組織内部へ電極を刺入することによって、その飛躍的な向上が期待される。過去に行われたヒト脳視覚皮質に対する微小電気刺激の臨床試験でも、脳表から1~2mmの深さに刺入した電極先端から通電刺激を行うことで、光覚の誘発に必要な刺激の閾電流量を、脳表刺激の時と比べて2桁程度低減できることが示めされている。すなわち、組織刺入型電極では、刺激電流の空間的拡散による損失が表面電極と比べて桁違いに少なく、結果的に空間分解能を高くできると考えられる。

神経組織刺入型の電極には、従来から金属製が用いられてきた。特に白金やチタンなどある種のレアメタル素材は、体内移植に不可欠な生体親和性と電気伝導性を併せ持つため、現在も人工内耳や脳深部刺激など臨床用の刺激電極表面に広く使用されている。一般的に、金属素材と電解質溶液との界面では、電圧印加や電流通電に伴う水の電気分解や種々の酸化還元反応が起こる可能性があるため、生体組織のダメージを最小限に抑えるうえでは、電極のサイズをある程度大きくして表面積を広げ、刺激時の電圧降下と注入電荷密度をできる限り低くする必要がある。実効表面積の広い多孔質構造の窒化チタンを表面にコートした電極も心臓ペースメーカー等に使用されているが、それでも現状では、臨床用刺激電極のサイズは比較的大きく(直径数mm~約0.1mm)、従って空間分解能をそれ以上高く出来ないといった克服困難な問題がある。

以上の背景から申請者らは、金属に代わる電極用材料の候補として良導電性や化学的安定性などの特徴を持つカーボンナノチュ

ーブ(以下CNT)に注目し、これを用いた神経用途の電極の開発を独自に行いながら、その可能性を検討してきた(平成22-24年度科学研究費補助金若手(B)22700472)。それまでの研究では、1)針状のCNTバンドル構造体(先端径数十nm~10µm、長さ1µm~2mm)を、支持材となる金属線の先端部に配向泳動法によって電着形成し、これにシリコーンエラストマーによる薄膜被覆を施して必要箇所の電氣的絶縁を行い、機械的に柔軟な種々のサイズのCNTバンドル電極を作製した。そして、2)先端径数十~数百nmの同電極の先端部を、急性単離した哺乳類網膜神経細胞の内部へ刺入し、数時間にわたり細胞形態及び膜コンダクタンス特性を変歪なく維持したまま、この電極を介した細胞内通電刺激によって細胞の活動電位発火応答を誘発できること、及び、3)先端径1~5µmの同電極を、哺乳類脳切片試料の内部へ刺入し、数時間にわたって電極及び周辺組織の変性を引き起こすことなく、細胞外通電によって近傍細胞群の興奮応答を誘発可能なことなどをin-vitro/situ生理学実験により示した。さらに、4)同電極の界面インピーダンスが、同じ幾何表面積を持つプラチナ製電極と比べて、10分の1程度であることが明らかとなった。これらより、我々の開発したCNTバンドル電極が、数ミクロン以下の細さと柔軟性、神経細胞/組織へ刺入可能な機械強度、細胞/組織に対する親和性、刺激通電可能な電気化学特性を持つことが分った。従って今後、これらの有用性がin-vivoの神経組織においても立証されれば、非常に微細かつ柔軟な組織刺入型の移植用神経電極を実現するうえでの突破口となる。

2. 研究の目的

我々が先に提案したCNTバンドル電極を改良し、移植用途に見合う神経組織刺入型のCNTバンドル電極を開発すること。そして、その有用性をin-vivo神経組織を用いた生理学実験等により評価・検証することである。

3. 研究の方法

(1)我々が持つCNTバンドル電極の作製技術を向上させ、数百ミクロン以上の長さでミクロンオーダーの先端径をもつ電極の安定した作製を可能にする。

(2)in-vivo神経組織への刺入に耐える機械的強度および刺激通電が可能な電気化学特性の両方を満足するよう、電極の改良・作製・評価/測定を繰り返す。

(3)上記(1)および(2)を経て、その組織刺入型電極としての性能を、in-vivo哺乳動物脳組織を用いた生理学実験等により検証する。

4. 研究成果

(1)電極の作製収率を向上させるため、高倍率デジタル顕微鏡を新規に導入し、CNT

のバンドル形成，シリコンエラストマーによる被覆膜形成，電極の先端加工の各過程をリアルタイムで観察可能とし，各々の条件パラメータの調整を容易にした。上記において重要と考えられた低湿環境をつくるため，顕微鏡やコンピュータ等を設置した防振台の周囲を覆う簡易式の除湿クリーンベンチを設計・製作した。以上により，0.2-0.3 mm長のCNTバンドル部を持つものについては，後述の各種実験に用いる電極サンプル（図1a）を安定して作製できるようになった。

（2）作製した電極の機械的強度/柔軟性について，脳組織の硬度を模擬した人工脳脊髄液（aCSF）アガロースゲル（0.5-1%-w/v）内への刺入試験により評価した。その結果，長さ0.2-0.6 mm，先端径3-20 μm のCNTバンドル電極については，神経組織内への繰り返し刺入に耐える十分な強度を持つことが示唆された。比較的高速の刺入では，CNTバンドル部が著しく可塑変形する場合もあったが，刺入速度を20-30 $\mu\text{m}/\text{sec}$ 程度とすることで，数十回の繰り返し刺入後も電極の顕著な形状変化は認められなかった（図1b-g）。また電極を刺入した状態で，その長軸と直交する方向へ繰り返しズレ負荷を与えた場合でも，CNTバンドル部は弾性変形し，顕著な可塑的变化は観測されなかった（図1h-k）。

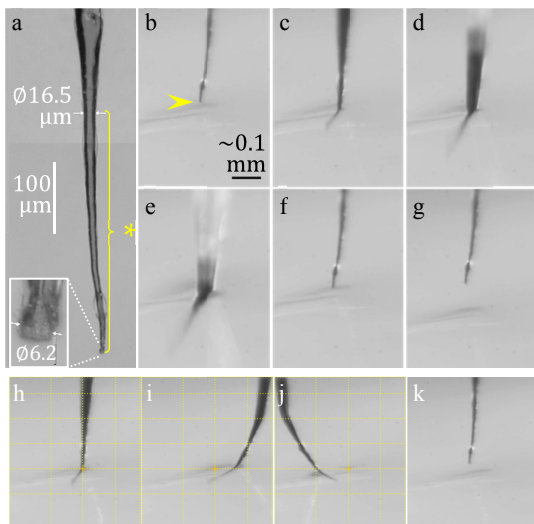


図1) 作製したCNTバンドル電極の機械的強度/柔軟性試験。a: 試験に用いた電極サンプルの1例。図中*の部分はCNTバンドル部(長さ約333 μm)。b-e: 電極の先端(矢頭)をaCSFアガロースゲル(下部，半透明)へ刺入していく様子の顕微鏡写真。刺入fは電極をゲルから引き上げた直後。G: 上記b-fのような刺入を30回繰り返し行った後。h-j: 上記gの後で電極先端を再びゲル内に刺入し，その状態で上部の電極シャフト部を水平に平行移動する様子。k: 上記i-jのような平行ずれ負荷を左右往復14回与えた後。注)b, f, g, kあるいはc, hは同一写真ではない。

（3）作製電極の電気化学的特性の測定にあたり，その計測機器を不慮の故障に伴って新

規購入し，測定系を再構築した。上記（2）と同様の形状を持つ作製電極について，aCSF中での電気化学測定の結果は以下の通りであった：サイクリックボルタムメトリにより推定された電位窓は-1.8~+1.4 Vであり，同じ系で推定した白金電極よりも2倍以上広がった。インピーダンス分光による1 kHzでのインピーダンス値は7-20 $\text{M}\Omega\text{-}\mu\text{m}^2$ であり，同じ系で測定した白金電極よりも1桁以上低く，酸化イリジウム電極と同程度であった。脳内微小電気刺激として用いる電荷平衡パルス電流(パルス幅0.2 msec/phase)を通電した時の界面電位応答から推定した電荷注入能は10-70 mC/cm^2 であり，白金電極よりも1桁程度以上高く，酸化イリジウム電極に匹敵するものであった。上記の測定値が，aCSF中での長時間浸漬によって，さらに数倍以上向上することを見出した。

（4）in-vivoのマウスにおいて，頭蓋切開および硬膜の穿孔または部分切開を施した後，作製電極の先端を脳表から垂直深さ0.2-0.3 mmの脳皮質内部へ刺入することに成功した。刺入時に出血は認められず，また後述（5）の数時間に渡る生理学実験後も，電極に顕著な損傷等は認められなかった（図2）。機械的柔軟性を残しつつもin-vivo脳皮質深部への安定した刺入を実現するには，CNTバンドル部の外側にマルトース被覆による可逆的硬化処理を施すこと，あるいは，CNTバンドル部の長軸中心にミクロンオーダー直径のタングステン線あるいは炭素線を内芯として用いることが有効であり，これらの場合，上記（3）の電気化学的特性も維持されることが分かった。

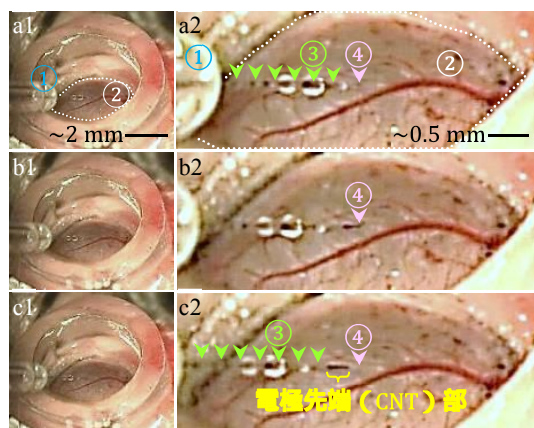


図2) 作製したCNTバンドル電極のin-vivoマウス脳皮質への刺入試験。a1: 作製電極が脳皮質内部へ刺入し，約4時間の生理学実験の後にマウス頭上斜めから撮影した写真。はタングステン製の電極シャフト部を支えるガラス管先端。はマウス脳表(白点線枠内)。写真内のリング状の構造は頭蓋上に設置したチャンバ。a2: 左の写真における脳表部の拡大。の矢頭に沿って電極シャフト部がある。の矢頭は脳表における電極の刺入口。b1-2: 電極先端を脳皮質内から引き出している途中。c1-2: 電極先端を脳皮質内から引き出した後，電極先端にCNTバンドル部が確認できる。

(5) in-vivo マウスまたはラットの脳皮質内へ刺入した電極を介して(上記(4)参照), 電荷平衡パルス電流(上記(3)参照)による通電刺激を与え, これに対する神経応答を膜電位感受性色素(VSD)イメージングにより計測した。電流振幅 5-20 $\mu\text{A}/\text{phase}$ で電極先端近傍に神経興奮応答が誘発されるのが観測された。また, その応答の空間的広がり, および応答中心位置におけるピーク振幅は, 電流振幅の増大に伴って大きくなることが確認された(図3)。これは, 酸化イリジウム製の刺激電極を用いた場合の実験と同様の結果であった。

CNT を基質もしくは表面の素材とした針状電極を用いて in-vivo 脳皮質内へ電流刺激を与え, さらにこれに対する時空間的な神経応答をイメージングによって捉えた実験は, 世界的に一切前例がなく, 我々の研究成果がその最初となった。この成果は, CNT バンドル電極の脳移植用途としての有用性を示すものであり, 次世代の超多チャンネル微小刺激による脳型神経補綴の実現可能性を大きく広げるマイルストーンになったと考える。

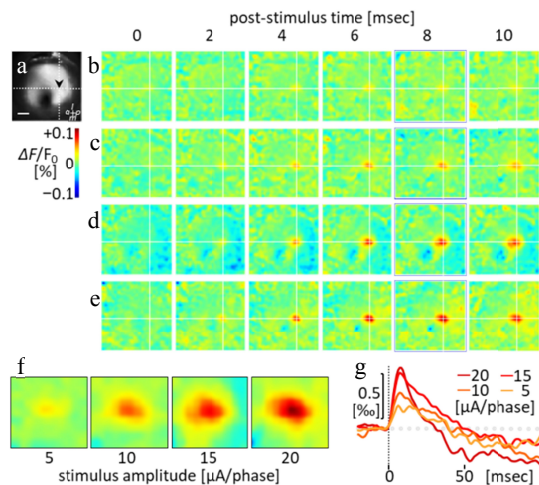


図3)作製したCNTバンドル電極を介したin-vivoマウス脳皮質内への微小電気刺激に対する神経応答のVSDイメージング実験。a:脳表のVSD蛍光画像。矢頭は刺激電極先端の推定位置。左下のスケールバーは1mm。b~e:電荷平衡パルス電流刺激に対するVSD蛍光強度変化比($\Delta F/F_0$)の疑似カラータイムラプス画像。各画像は64回試行についての加算平均結果。 $\Delta F/F_0$ の上昇は,細胞集団における細胞膜の脱分極応答に対応。刺激のパルス幅は0.2msec/phase,電流振幅は5(b),10(c),15(d),20(e) $\mu\text{A}/\text{phase}$ 。f:刺激後8msecにおける空間的神経応答分布の比較。b~eの青枠の画像を拡大して並べたもの。g:刺激電極先端近傍における時間的神経応答波形の比較。

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3件)

S. Miyamoto, N. Suematsu, Y. Umehira, Y.

Hayashida, T. Yagi, “Age-related changes in the spatiotemporal responses to electrical stimulation in the visual cortex of rats with progressive vision loss”, Scientific Reports, 査読有, 7, 2017, article #14165.

doi:10.1038/s41598-017-14303-1

Y. Hayashida, Y. Kudo, R. Ishida, H. Okuno, T. Yagi, “Retinal circuit emulator with spatio-temporal spike outputs at milliseconds resolution in response to visual events”, IEEE Transactions on Biomedical Circuits and Systems, 査読有, 11(3), 2017, 597-611.

DOI: 10.1109/TBCAS.2017.2662659

亀田成司, 林田祐樹, 田中宏喜, 八木哲也, “高インピーダンス神経電極用多チャンネル電流刺激チップの開発”, 計測自動制御学会論文集, 査読有, 50(8), 2014, 594-601.

DOI: 10.9746/sicetr.50.594

〔学会発表〕(計59件)

Y. Hayashida, Y. Sakata, Y. Tanaka, T. Nomoto, T. Yagi, “Optical-electrical modulation of cortical neuronal activities in the perfused tissue slice”, The 7th International Multidisciplinary Conference on Optofluidics 2017, 招待講演, Singapore, Jul 25-28, 2017.

Y. Hayashida, “Wireless Device System for Multi-Channel Intra-Cortical Microstimulations ~Evaluation with Animal Studies in Vivo”, 39th Annual International conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society (EMBC2017), 招待講演, Jeju, Korea, Jul 11-15, 2017.

T. Nomoto, Y. Tanaka, Y. Hayashida, T. Yagi, “Imaging of population spikes induced by repetitive stimulus pulses in mouse cerebral slices in vitro”, 39th Annual International conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society (EMBC2017), 査読有, Jeju, Korea, Jul 11-15, 2017.

DOI: 10.1109/EMBC.2017.8037022

Y. Hayashida, Y. Sakata, Y. Tanaka, T. Nomoto, T. Yagi, “Local inhibition of microstimulation-induced neural excitations by near-infrared laser irradiation in mouse cerebral slices in vitro”, 8th International IEEE EMBS Conference on Neural Engineering, 査読有, Shanghai, China, May 25-28, 2017.

DOI: 10.1109/NER.2017.8008339

T. Sugiura, A. U. Khan, J. Yu, Y. Takeuchi, S. Kameda, T. Kamata, Y. Hayashida, T. Yagi, M. Imai, “A Programmable Controller for Spatio-temporal Pattern Stimulation of Cortical Visual Prosthesis”, 2016 IEEE Biomedical Circuits and Systems Confer-

ence (BioCAS2016), 査読有, Shanghai, China, Oct 17-19, 2016.
DOI: 10.1109/BioCAS.2016.7833824
Y. Kudo, Y. Hayashida, R. Ishida, H. Okuno, T. Yagi, “A retino-morphic hardware system simulating the graded and action potentials in retinal neuronal layers”, The 23rd International Conference Neural Information Processing (ICONIP2016), 査読有, Kyoto, Japan, Oct 16-21, 2016.
DOI: 10.1007/978-3-319-46672-9_37
Y. Hayashida, “Multi-channel microstimulation system applicable for in-vivo animal experiments on neural prostheses”, 2016 Biomedical Engineering Ecosystem Symposium, 招待講演, Tainan, Taiwan, Oct 05-07, 2016.
Y. Hayashida, “Imaging studies on visual cortical responses to microstimulation in rodents, and prototyping the prosthetic device for animals”, The 6th International Multidisciplinary Conference on Optofluidics 2016, 招待講演(キーノート), Beijing, China, Jul 24-27, 2016.
S. Futami, T.D. Fehervari, T. Yagi, Y. Hayashida, “Inter-hemispheric neural excitations of visual cortices in response to electrical microstimuli in mice in vivo”, 37th Annual International conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society (EMBC2015), 査読有, Milan, Italy, Aug 25-29, 2015.
Y. Hayashida, Y. Umehira, K. Takatani, S. Futami, S. Kameda, T. Kamata, A. U. Khan, Y. Takeuchi, M. Imai, T. Yagi, “Cortical neural excitations in rats in vivo with using a prototype of a wireless multi-channel microstimulation system”, 37th Annual International conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society (EMBC2015), 査読有, Milan, Italy, Aug 25-29, 2015.
DOI: 10.1109/EMBC.2015.7318690
S. Ohtsu, T. Nomura, S. Uno, K. Maeda, Y. Hayashida, T. Yagi, “A large scale simulation of excitation propagation in layer 2/3 of primary and secondary visual cortices of mice”, 37th Annual International conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society (EMBC2015), 査読有, Milan, Italy, Aug 25-29, 2015.
DOI: 10.1109/EMBC.2015.7319260
Y. Hayashida, K. Takeuchi, N. Ishikawa, Y. Okazaki, T.D. Fehervari, H. Tanaka, T. Yagi, “Voltage-sensitive dye imaging of the visual cortices responding to electrical pulses at different intervals in mice in vivo”, 36th Annual International conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society (EMBC2014), 査読有, Chicago,

USA, Aug 26-30, 2014.

DOI: 10.1109/EMBC.2014.6943613

S. Kameda, Y. Hayashida, Y. Tanaka, D. Akita, T. Yagi, “A multichannel current stimulator chip for spatiotemporal pattern stimulation of neural tissues”, 36th Annual International conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society (EMBC2014), 査読有, Chicago, USA, Aug 26-30, 2014.

DOI: 10.1109/EMBC.2014.6944750

Y. Hayashida, T. Kinoshita, T. Motomura, “Interfacing neurons through the patch membrane pierced with single-walled carbon nanotubes”, 35th Annual International conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society (EMBC2013), 査読有, Osaka, Japan, Jul 03-07, 2014.

DOI: 10.1109/EMBC.2013.6610547

S. Kameda, Y. Hayashida, H. Tanaka, D. Akita, A. Iwata, T. Yagi, “A multi-channel current stimulator chip intended for a visual cortical implant”, 35th Annual International conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society (EMBC2013), 査読有, Osaka, Japan, Jul 03-07, 2014.

DOI: 10.11239/jsmbe.51.R-140

6. 研究組織

(1)研究代表者

林田 祐樹 (HAYASHIDA, Yuki)
大阪大学・大学院工学研究科・准教授
研究者番号: 10381005

(2)連携研究者

亀田 成司 (KAMEDA, Seiji)
大阪大学・国際医工情報センター・特任准教授
研究者番号: 80542282
末松 尚史 (SUEMATSU, Naofumi)
大阪大学・大学院工学研究科・准教授
研究者番号: 30779517
八木 哲也 (TETSUYA, Yagi)
大阪大学・大学院工学研究科・教授
研究者番号: 50183976

(3)研究協力者

山川 隆洋 (YAMAKAWA, Takahiro)
飯塚 清太 (HIZUKA, Seita)
坂田 侑弥 (SAKATA, Yuya)
太田 梨羅 (OTA, Rira)
田中 雄太 (TANAKA, Yuta)
梅比良 裕一 (UMEHIRA, Yuichi)
野本 知宏 (NOMOTO, Tomohiro)
菅 祥平 (SUGA, Shohei)