

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年06月07日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2012

課題番号：22700472

研究課題名（和文）

神経用途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 Carbon-nanotube-bundle electrodes for neural interface

研究代表者

林田 祐樹 (YUKI HAYASHIDA)

大阪大学・大学院工学研究科・准教授

研究者番号：10381005

研究成果の概要（和文）：ナノ/マイクロメートルサイズの先端径を持つ柔軟針状電極を、カーボンナノチューブ（CNT）のバンドル集合体により作製し、それらの神経電極としての実用性を、生体神経細胞・脳組織を試料とした生理学実験等により評価した。その結果、我々の開発したCNTバンドル電極が、細胞刺入型および脳刺入型の刺激/記録電極として有用であることが実証された。これらの電極は、世界的に前例がなく、神経インターフェイスに新しい可能性を与えるものとする。

研究成果の概要（英文）：Flexible, needle-shaped electrodes with the tip diameters of nano/micro-meter sizes were fabricated by assembling the bundles of carbon nanotubes (CNT), and their capabilities as neural electrodes were evaluated in physiological experiments with preparations of biological neurons and brain tissues. The experimental results demonstrated that the CNT-bundle electrodes we developed are useful as neuron-penetrating intracellular and brain-penetrating extracellular, stimulating/recording electrodes. These electrodes are unprecedented in the world, and may offer a new possibility for neural interface.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
2012年度	500,000	150,000	650,000
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：人間医工学，医用生体工学・生体材料学

キーワード：生体材料，生物・生体工学，ナノチューブ，神経工学，神経用途電極，神経補綴，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，脳深部電気刺激，人工網膜などの神経補綴，あるいは脳性麻痺，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-コンピュータインターフェイス（BCI）等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，体の中へ電極等を埋め込む侵襲的

法とがある。前者には外科手術等の問題は無いが、刺激・計測の空間的・時間的分解能が低く、情報量の多い高次の神経機能代行を求めるのは難しい。これに対し後者は、神経組織と電極との直接的なインターフェイスとなり、将来的には、小数あるいは単一細胞レベルの分解能で電気刺激や計測を行える可能性がある。

体内埋設用に金属電極が用いられ、その有用性が動物実験で実証されてから50年余りが経過している。しかし今でも、神経補綴やBCI開発において、神経組織と電極との接触面には最終的に何らかの金属素材が用いられている。ある種の金属電極は体内埋め込みに不可欠な生体適合性を併せ持つことが可能だが、電気刺激のためには液界面インピーダンスを下げる必要があり、その結果電極径が大きくなる（現状、臨床実用レベルで数十ミクロン～数ミリメートル）といった克服困難な問題がある。一方、基礎研究分野における神経試料を使った電気生理学実験には、ガラス電極（導電媒質は電解質溶液と銀塩化銀固体）が多用され、申請者らも長年にわたってそれらを用いてきた。ガラス電極は、体内への埋め込みには当然使用できないが、その形状整形の容易さから様々な用途に合う柔軟な加工が可能であり、先端径も数百nm程度まで先鋭化できる。従ってもし両者の長所を併せ持つ電極素材と、それを用いた自由度の高い電極形状の作製技術があれば、神経補綴やBCI等の臨床医工学分野のみならず、神経/筋生理学などの基礎研究分野においても、神経電極に一つの新しい方向性が与えられると考えられる。

近年、生体親和性、機械的強度、良導電性といった特徴を併せ持つカーボンナノチューブ（CNT）が注目され、細胞プローブへの応用が提案された。しかしそのほとんどで、1. 電気的計測・刺激の用途ではない、2. 単一細胞レベルの分解能を持つサイズではない、3. 体内埋め込み用途ではないなど、その使用性は限定されている。しかも多くが作製に特殊な装置を必要としており電極の仕様変更は容易でないと考えられる。これらに対し、従来の埋め込み用金属電極の表面にCNTをコートすることで、神経活動の計測性能と電気刺激の効率を向上させられる事が報告された。同じ頃、申請者らも同様の考えで金属電極表面へのCNTコート技術をすでに確立させていた。また、走査型プローブ顕微鏡探針用に開発されたカーボンナノプローブの作製工程を参考に、直径百nm以下の針状CNTバンドルを金属線先端に形成することにも成功していた。さらに我々は、このCNTバンドル針を、実験動物試料より取り出した単一神経細胞の細胞内へ顕微鏡直下で刺入し、数時間以上に渡り、刺入した

ままの状態では細胞を上下左右方向へ移動できることを示した。これは、作製したCNTバンドル針が細胞膜および細胞内環境と高い親和性を持つことを示すものであった。このCNTバンドル針の作製は、CNT自体の直接成長を伴わないため、特殊な装置を必要としない。作製工程に経験的操作を伴うものの、数十ナノ～10マイクロメートルの直径の様々なCNTバンドル針が形成可能なこと、またCNTバンドル表面にシリコンエラストマー等を塗布することで必要箇所の絶縁被覆が可能なが確認された。したがって、作製の精度と再現性を確保できれば、このCNTバンドル針を神経電極として適用できる可能性が示唆される。

2. 研究の目的

難治性の神経機能障害に対する神経補綴やブレインコンピュータインターフェイス等において、将来、体内埋設電極により、少数細胞レベルの高空間分解能で神経活動の制御（刺激・計測）を行うには、従来の金属電極のような生体親和性、良導電性と共に、極微細な先端形状をもつ電極の開発が望まれる。本研究の目的は、優れた物理化学特性を併せ持つCNTをバンドル構造体とした新規電極を開発し、その神経用途としての実用性を生理学実験等により評価することである。

3. 研究の方法

(1) これまでの我々のCNTバンドル形成技術を改良するとともに、電極被覆剤となるシリコンエラストマーを顕微塗布するための装置を構築することにより、電極作製の精度と再現性を向上させる。先端部以外が絶縁被覆されたCNTバンドルの作製とその電気的特性の計測を繰り返し行いながら、所望の形状と電気的特性および機械的に必要十分な強度を有する電極を作製できるよう技術・装置を改良開発する。

(2) 上記(1)を経て、ナノメートルサイズおよびマイクロメートルサイズの先端径を持つCNTバンドル電極を作製する。それらの有用性を直接的に検証するため、ラットおよびマウスの神経細胞・脳組織の急性試料を用いたin-vitro/situ電気生理学実験を行う。ナノメートル先端径の電極については、単離神経細胞におけるパッチクランプ計測技術を用いて主に電気生理学的手法による検証を行う。マイクロメートル先端径の電極については、摘出脳組織切片における光学的神経活動イメージング技術を用いて、組織への適用可能性を検証する。特に、単なる記録電極としてだけでなく、通電可能な刺激電極としての有用性に重点をおいて検討し、必要に応じて、上記(1)の作製技術・装置の改良

を行う。

4. 研究成果

(1) CNTバンドル構造体(先端径数十 nm ~10 μm)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、その先端部以外にシリコンエラストマーによる薄膜絶縁被覆を施して、種々のサイズの電極を作製した。電極作製の技術改良と装置構築を行い、作製過程における各種パラメータを調整することにより、所望の形状を持つCNTバンドルを形成することが、ある程度可能となった。これにより、先端径 300 nm 以下、長さ 10~50 μm の針状CNTバンドル部を持つものについては(図1参照)、通常の細胞内刺入に用いるガラス微小電極に匹敵する電気的インピーダンスと微細先端形状とを併せ持つ電極を作製することに成功した。

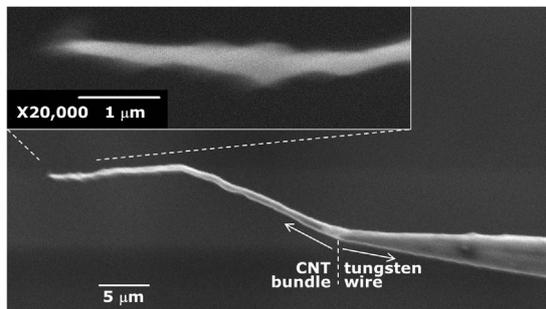


図1)細胞内刺入用CNTバンドル電極の走査型顕微鏡写真。支持材となるタングステン線先端に針状のCNTバンドル構造体を配向電着し、その表面をシリコンエラストマーにより被覆している。

(2) 哺乳類網膜組織より急性単離した神経細胞において、ガラス製パッチ電極を用いた穿孔パッチホールセル記録法により細胞内電位計測を行いながら、上記(1)のCNTバンドル電極の先端を細胞内へ刺入するin-vitro生理実験を行った(図2参照)。その結果、①刺入前後で細胞の受動的膜抵抗と膜容量に変化は検出されず、従って刺入後には電極表面と細胞膜との間に極めて安定したギガオームシールが形成されうること;②細胞内CNTバンドル電極と細胞外参照電極との間の電圧印加刺激によって、細胞の活動電位発火が誘発可能なこと;③パッチ電極からの細胞内電流注入により誘発された活動電位と、上記②で誘発された活動電位との間で、その波形に差異が認められないこと;④電極刺入数時間後も細胞形態に顕著な変化は見られず、従って上記③と合せて、電極および通電刺激による細胞内環境への悪影響が、少なくとも観察中に生じる可能性は低いこと、などが分かった。

以上(1)(2)により、我々の独自開発した先端径サブミクロンサイズのCNTバンドル電極が、生体親和性、良導電性と共に、極微細な先端形状をもつ細胞内神経電極として使用可能であると実証された。

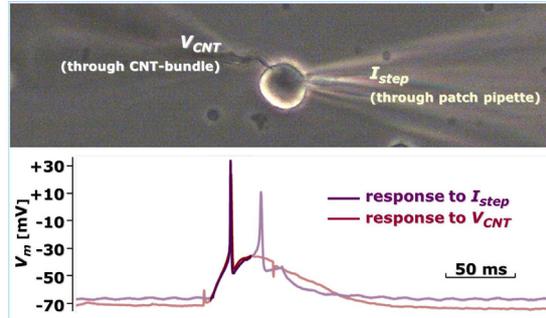


図2) 上段は単離網膜神経細胞を用いたin-vitro実験の様子(位相差顕微鏡写真)。中央は細胞、左はCNTバンドル電極(先端部は細胞内に刺入の状態)、右はパッチ電極。下段は細胞内電位(縦軸)の記録波形。CNT電極を介したステップ状電圧刺激に対する応答(response to V_{CNT})とパッチ電極からのステップ状電流注入に対する応答(response to I_{step})を重ねて表示。

(3) 電極作製の方法・装置等をさらに改良し、先端径1~5 μm 、長さ50~300 μm のCNTバンドル部を持つ電極を作製した。それらを用い、①脳組織の機械的特性と同程度以上(0.5~1%)に調整したアガロースゲル内部への刺入および曲げ試験、②リン酸緩衝生理食塩水中および人工脳脊髄液中におけるサイクリックボルタンメトリ、インピーダンス分光、パルス電流通電に対する界面電位応答測定を行った。その結果、作製したCNTバンドル電極が組織刺入に対する十分な機械的強度・柔軟性を持ち、且つ同じ幾何表面積を持つ白金電極よりも一桁以上高い電荷注入能(低い液界面インピーダンス)を持つ事を見出した。

(4) 哺乳類大脳皮質の組織切片において、上記(3)のCNTバンドル電極を組織内へ刺入するin-situ生理実験を行った(図3参照)。その結果、①近赤外顕微鏡観察では、電極先端を組織内約100 μm の深部へ刺入した時にも電極の顕著な変形は認められず、②通常の細胞外刺激に用いるパルス状電流通電では電極・組織の変性も、少なくとも5時間程度の間には確認されなかった。さらに、③上記②の細胞外電流刺激によって、大脳皮質内に興奮性神経活動を誘発できること;④同程度の先端開口径を持つガ

ラス製電極からの通電刺激により誘発された応答と、上記③で誘発された応答との間で、その時空間パターンが同様であること、などが分かった。

以上(3)(4)により、我々の独自開発した先端径ミクロンサイズのCNTバンドル電極が、通電刺激可能な細胞外神経電極として使用可能であると実証された。

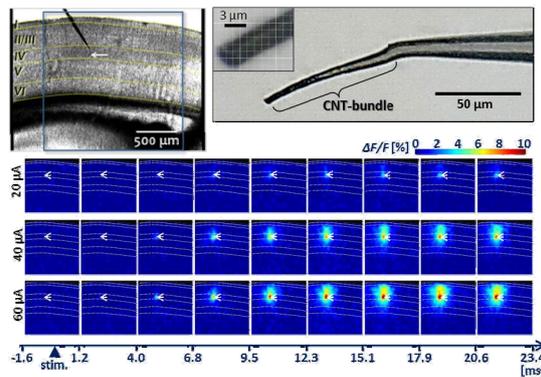


図3) 上段左は大脳皮質組織切片を用いたin-situ実験の様子(近赤外顕微鏡写真)。写真内で上部が脳表側。左上からCNTバンドル電極先端を試料内部へ刺入した状態。白矢印は電極先端位置。青枠はCa²⁺感受性色素によるメーキング領域。上段右写真は、実験に用いた電極(反射型顕微鏡写真)。先端露出部直径は約5μm。下段は細胞内Ca²⁺濃度変化の擬似カラータイムラプス画像。CNTバンドル電極からの電荷平衡電流パルス刺激(パルス振幅20, 40, 60μA)に対する神経細胞群の時空間応答。

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1件)

- ① Y. Hayashida, T. Kinoshita, T. Motomura. Interfacing neurons through the patch membrane pierced with single-walled carbon nanotubes. Conference Proceedings of IEEE Engineering in Medicine and Biology Society, 査読有, (2013), *in press*.

[学会発表] (計8件)

- ① T. Yamakawa, Y. Hayashida, T. Kozuno. A brain-penetrating extracellular electrode made of carbon nanotube bundles. Society for Neuroscience's 42nd annual meeting, 2012.10.14, Ernest N. Morial Convention Center, New Orleans, LA, USA. [Program No.298.06, 2012 Neuroscience Meeting

Planner: Society for Neuroscience, 2012. Online]

- ② Y. Hayashida, T. Yamakawa, S. Harabe, T. Kozuno, N. Murayama. Flexible, needle-shaped neuroelectrodes made of carbon nanotube bundles. The 35th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society, 2012.09.18, 名古屋国際会議場, 愛知県名古屋市. [P1-k19, The JNS Meeting Planner: Japan Neuroscience Society, 2012, Online]

- ③ T. Kozuno, Y. Hayashida, Y. Shimada, T. Yagi. On the dynamics of signal propagation in the mouse primary visual cortical circuit. The 35th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society, 2012.09.18, 名古屋国際会議場, 愛知県名古屋市. [P1-e23, The JNS Meeting Planner: Japan Neuroscience Society, 2012, Online]

- ④ 林田祐樹, 山川隆洋, 小津野将. 細胞外神経刺激のためのカーボンナノチューブバンドル電極. 平成24年電気学会電子・情報システム部門大会, 2012.09.06, 弘前大学文京町キャンパス, 青森県弘前市. [講演論文集 CD, pp.142-144, 2012]

- ⑤ 小津野将, 林田祐樹, 島田義規, 八木哲也. マウス視覚野における時空間信号伝播のイメージングおよび細胞外電位同時計測. 平成24年電気学会電子・情報システム部門大会, 2012.09.05, 弘前大学文京町キャンパス, 青森県弘前市. [講演論文集 CD, pp.1805-1806, 2012]

- ⑥ 山川隆洋, 林田祐樹, 原部翔, 小津野将, 村山伸樹, 奥野弘嗣, 八木哲也. ニードル型カーボンナノチューブバンドル電極の電気的特性. 電子情報通信学会MEとバイオサイバネティクス研究会, 2012.03.16, 玉川大学, 東京都町田市. [電子情報通信学会技術研究報告, vol.111, No. 482, pp.171-174. 2012]

- ⑦ Y. Hayashida, S. Harabe, T. Kinoshita, T. Motomura, N. Murayama. Toward Neuronal Interface with Carbon Nanotubes. 計測自動制御学会第26回生体・生理工学シンポジウム, 2011.09.20, 立命館大学びわこ・くさつキャンパス, 滋賀県草津市. [Proceedings of the 26th Symposium on Biological and Physiological Engineering-CD, pp.303-305. 2011]

⑧Y. Hayashida, S. Harabe, K. Kohira, T. Motomura, N. Murayama. Intracellular electrical stimulation of neurons with penetrating carbon nanotube bundle electrodes. Society for Neuroscience's 40nd annual meeting, 2010.11.17, San Diego Convention Center, San Diego, CA, USA. 【 Program No.817.10, 2010 Neuroscience Meeting Planner: Society for Neuroscience, 2010. Online】

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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