

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 2 日現在

機関番号：34419

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24700411

研究課題名(和文)人工視覚を目指した双方向光情報伝達デバイスによる脳機能解析

研究課題名(英文)Functional brain optical analysis by implantable neural interface device for artificial vision.

研究代表者

小林 琢磨 (KOBAYASHI, Takuma)

近畿大学・東洋医学研究所・助教

研究者番号：80582288

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円、(間接経費) 1,020,000円

研究成果の概要(和文)：従来の脳刺激型人工視覚の課題克服を目指し、光入力と光刺激機能を集積化した脳内埋植型半導体デバイスによって光で神経細胞とコミュニケーションする双方向光情報伝達技術を実際に動物脳内において試験運用し、以下を達成した。

- 1) 複数イメージセンサの同時駆動により動物脳内の知覚領域および連合野における神経活動を可視化した。
- 2) 光感受性を付与した神経系細胞に対し局所光刺激を行い、同時に神経活動をCa²⁺イメージングする光双方向情報伝達が可能な脳内埋植型デバイスを試作し、実際に細胞との随意的な光コミュニケーションに成功した。

研究成果の概要(英文)：A novel methodology for optical communication with neural cells in the brain by using the implantable neural interface device which based on CMOS technology was newly estimated. Such technology is expected to play an important role towards the resolution of issues that a conventional artificial vision device of the brain stimulation type has.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：脳神経科学・融合基盤脳科学

キーワード：CMOSイメージセンサ 蛍光イメージング 電位感受性色素 Ca²⁺イメージング 人工視覚 電気生理 optogenetics 脳機能解析

1. 研究開始当初の背景

視覚を回復するための手段の一つに人工視覚デバイスがある。視覚伝達経路の途中で電気刺激を与えることで視覚を人工的に知覚させる人工視覚デバイスは、これまで国内外を問わず様々な型のデバイスが開発され、臨床試験によりその有効性が実証されている。これら多様なデバイスの中でも、より広範な疾患に対応可能な脳（視覚野）刺激型のデバイスは1968年に報告され、現在も幾つかのグループにより研究が進められている。しかしながら、従来の脳刺激型人工視覚には侵襲性、刺激空間分解能や刺激電極素材等に課題がある。また、刺激の機能的な評価が難しいという問題がある。本研究では、これらの課題の克服を目指して光入力と光刺激機能を集積化した脳内埋植型半導体デバイスによって光で神経細胞とコミュニケーションする“双方向光情報伝達技術”に基づく人工視覚デバイスを提案し、実際に当該デバイスを試作して動物脳内において試験運用する。

2. 研究の目的

従来の脳刺激型人工視覚において、平面型多点電極アレイによる刺激方法は脳組織を損傷せず大脳皮質に貼り付けて使用できるが、電荷注入量と電極サイズがトレードオフとなり刺激の空間分解能が低い。また針状電極を多数もつ剣山型電極による刺激方法は刺激の空間分解能が高いが、刺入で脳組織を損傷するというジレンマがある。またいずれも金属電極を露出して用いるため短時間でデバイスが機能不全となり、患者は定期的にデバイス交換の手術を受ける必要がある。このため電極以外の刺激手段の開発が求められている。また一方で、従来の人工視覚デバイスには刺激の機能的な評価が難しいという問題がある。本来個々人で異なる脳の形態、視覚野の機能コラム構造などの差異に応じて視覚を再現するため、視覚野への刺激パターンをオーダーメイドで設定しなければならない。このため、まず患者の視覚情報処理パターンをマッピングする必要があるが、患者は眼からの光刺激に応じない。そこで、電気生理、fMRIなどで解明されつつあるパターンで患者の視覚野全体をダイレクトに刺激し、これに応じた神経回路の情報伝達パターンをプロファイリングし、インタビューとともに刺激パターンを比較、補正する必要がある。このようなプロファイリングのためには光によって非破壊的に、かつ自由行動下で計測できる技術の使用が好ましい。

以上の要求にこたえるには、① 電極以外の手段で、② 機能コラム単位以上の空間分解能によって、③ 脳を傷つけず、④ 同一脳における刺激と測定を同時に、⑤ 少なく

とも1次視覚野全体で行うことができる人工視覚デバイスが必要である。そこで本研究においては、① 光を用いて、② CMOS技術でマイクロ LSI チップを作製し、③ MEMS 技術で平面型に実装し、④ 発光、光検出半導体素子を併せ持ち、⑤ デバイスをつなぎ合わせて使用することで複雑な曲面でも適用可能な人工視覚デバイスのための基盤技術を開発することを目指す。

これまで申請者は科研費スタートアップ「人工視覚への応用を目指した光による双方向情報伝達技術の創成」の研究代表者として、申請者グループの独自技術により発光、光検出半導体素子を併装し、脳内に低侵襲的に埋植可能な薄く小型の LSI デバイスを試作した。このデバイスを用いて、神経細胞の活動を蛍光指示薬で光学的に計測し、逆に光感受性遺伝子を発現する神経細胞を光刺激するという、光によって神経細胞と「会話」できる“双方向光情報伝達技術”の開発に成功しつつある。今回この技術をさらに発展させ、特に実用的であることを重視し、試作した双方向光情報伝達デバイスを動物脳内で実際に運用できることを動物の行動実験を通して実証することを目指した。

3. 研究の方法

[平成24年度]

(1) 脳機能光計測技術の確立

光計測に使用する脳内埋植型デバイスは、photodiode がアレイ状に設計された CMOS イメージセンサを持ち、励起用の LED ベアチップと吸収フィルタが MEMS 技術により実装されているため蛍光イメージングが可能である。これまでに、このデバイスを用いて神経活動の膜電位変化を、蛍光指示薬の蛍光強度変化として光学的に測定することに成功し、マウス生体脳視覚野における神経活動パターンの記録を試みつつある。しかしながら、現状の光計測システムには感度、時空間分解能に課題がある。そこでこれらの課題を以下の具体的な工夫により解決を試みる。感度に関して、新しく開発されつつある蛍光変化率のより高い蛍光指示薬と、その蛍光特性に合わせて新規デバイスを実装して試作することで解決する。また S/N の向上とダイナミックレンジ拡大を、on-chip ADC 回路を設計してイメージセンサに搭載し、中継基板にオペアンプを搭載して新しい制御ボードを設計することで実現する。時間分解能に関して、これまでリアルタイムで計測結果を表示することを重視してセンサ撮像速度を人間が知覚可能な 40 Hz より少し早い~60 fps としていたが、自発的な個々の神経細胞の活動電位変化を計測するためにはさらに高速で撮像する必要がある。そこで注目領域の画素を選択できるように制御ソフトを改変し、読み出し領域を指定する信号を送受信するため

センサのLSI回路と基板回路を改変することで高速撮像を実現する。

高速化により十分な感度が得られなくなった場合、photodiodeのサイズを大きく設計するなど検討する。空間分解能に関して、当研究室において開発されつつあるライトガイドアレイを搭載することで高解像度化を実現する。以上のようにデバイスを運用しながら、随時当研究室で開発される新技術を利用しながらシステムを改良し、高機能化を達成する。デバイスの運用と評価に関して、新しく作製したデバイスや制御システムを効果的に評価するために、まず培養神経細胞を用い、次に実際にマウス脳内で光計測を行うことで評価する。また、電気生理実験、生化学的、組織学的解析を行うことで多面的、総合的に解析して評価する。以上のようにして視覚野の神経活動パターンをデコードするための脳機能光計測技術を確立する。

[平成 25 年度]

(2) 脳機能光制御技術の確立

光感受性遺伝子として、単純な光ゲートイオンチャネルであるクラミドモナスのチャネルロドプシン (ChR2)、古細菌のハロロドプシンを神経細胞に発現させ、刺激光を照射すると神経活動を誘起、阻害することができる。現在、このような光によって神経細胞を活化・不活化させる optogenetics のためのデバイスを作製しつつある。LSI チップ上に配置したマイクロ LED アレイにより刺激光の照射パターンを随意的に制御することが可能である。このデバイスを用いて、光感受性遺伝子を発現する培養神経細胞を光刺激し、

(1) で確立する光計測技術と電気生理実験により検証し、刺激光パターンの位置・強度・回数・時間などのパラメータを調律することで適切な光刺激が可能かどうか評価する。次に同様の方法により、マウス視覚野においてデバイスの評価する。なお、広範かつ高効率に神経細胞へ遺伝子導入するためにはアデノウイルスを用いる。また実験の効率を考え、トランスジェニックマウスを使用する。領野特異的な遺伝子導入が難しい場合、光感受性遺伝子のプロモーターを改変し、さらに in utero 電気穿孔法による遺伝子導入を行うことで解決する。以上のようにして視覚野を光で刺激する脳機能光制御技術を確立する。

(3) 疑似脳活動を検証するための、双方向光情報伝達デバイスによる動物の行動制御と解析

これまでの研究で、既存技術では困難な、自由行動下で動物の左右視覚野を同時に光計測するデュアルイメージングシステムを構築した。使用する極小デバイスは軽く、厚さ約 250 μm の薄膜形状であり、小型カメラというより光検出フィルムのような形状となっている。このため頭骨と脳表との間、脳溝

にすべりこませて使用することが可能である他、脳内に低侵襲的に刺入して深部を観察することが可能である。このため動物への負担が少なく、自由行動下で計測が可能であることから、より自然な脳活動を計測できるということに本システムの最大のアドバンテージがある。また顕微鏡など従来技術ではある平面の観察しかできないが、本デバイスの形状は自由に設計変更可能であり、複数のデバイスをつなぎ合わせて使用することで複雑な形態の脳組織であっても万遍なく適用でき、広い領域を同時に計測することが可能である (1)、(2) で確立する双方向光情報伝達デバイスを用いて、疑似視覚情報をマウスが認知しているかどうか行動実験により評価することで脳刺激型人工視覚を実現する。

4. 研究成果

試作したデバイスは運用過程で常に改良を必要とし、実用性を高めるために繰り返し試作を繰り返さざるを得ない。都度条件検討を行うために地味で忍耐を要する作業であるが、責務を果たすべく執念を持って確実に前進させた。

平成 24 年度には、S/N の向上とダイナミックレンジ拡大のため、14-bit オペアンプを搭載した中継基板を新たに設計、開発したので、これを適用した。また平成 25 年度には LSI チップ上で培養した細胞に光感受性遺伝子である ChR2 (チャネルロドプシン) を導入して光刺激し、同時に Ca イメージングによりその活性の計測を試みた。これまでのイメージセンサでは薬物 (high-K) や電気刺激で人為的に evoked した神経活動しか検出することができなかったが、試作デバイスの改良により眼からの光刺激に応答した視覚野の生理的な神経活動を計測することが可能となっており、また硬膜上からも測定することが可能となった (Kobayashi et al., 2012)。試行錯誤の蓄積により研究実施者のデバイス実装過程における基本的なプロセス技術が向上し、生体脳へのセンサ適用術式の技法が向上したことも一助となった。イメージセンサの感度、および時空間分解能には一層の向上が好ましいが、自由行動下の生体脳において半導体イメージセンサで神経の生理活動を光計測するという脳機能光測定技術を確立することができたと考えられる。

脳内埋植型半導体イメージセンサによる蛍光脳機能解析技術を用い、複数のイメージセンサを同時駆動して生体脳に適用することで、より広い脳領域で同時に神経活動を計測するためのイメージングシステムを試作した。この試作したイメージングシステムを用いてラット脳内知覚領域および連合野における神経活動を電位感受性色素により可視化することに成功した (Kobayashi et al., 2014)。本手法は、数十の神経細胞を対象とした従来の微小電極を用いた電気生理学的

計測より多く、数万の神経細胞を対象として光計測することを可能にする。また従来型の顕微鏡による光計測においては、動物頭部を厳密に固定し平面的に対物レンズによって観察することになるが、本手法を用いれば、埋植したセンサが動物の脳とともに稼働するため動物の行動に起因するノイズは生じず、複数センサの分散運用により多面的な視野が得ることができ、かつセンサはウェアラブルであるために対象動物は自由に行動することができる。本イメージングシステムは離れた脳領域間での差時的な神経活動を計測でき、これまで明らかな有機的な脳領域間連絡に加えて、新たに大規模な生理的な連絡、活動の伝播過程を明らかにするための有効なツールになるだろう。

さらに平成 25 年度は、optogenetics 手法により光感受性を付与した神経系細胞に対して局所光刺激を行い、同時に genetical な Ca²⁺イメージングを行うことを可能とする埋植型デバイスを試作した。そして実際にこれを用いて細胞との随意的な光双方向情報伝達に成功した（論文投稿中）。本研究により光で脳と会話するための基礎技術は確立された。次に実施の動物の行動試験による検証実験は期間内に完了しなかったが、当該方法論を用いることにより、疑似視覚を脳に人為的に与えることは不可能ではないだろう。周囲環境の変化により本研究の継続は困難であったが、本技術が応用され、将来人工視覚などの知覚補綴技術として利用されることを期待しているし、それは十分可能であると考えている。脳刺激型人工視覚デバイスとして視覚障害者の一助となることを願っている。

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 2 件）

① Takuma Kobayashi, Hiroyuki Masuda, Chikara Kitsumoto, Makito Haruta, Mayumi Motoyama, Yasumi Ohta, Toshihiko Noda, Kiyotaka Sasagawa, Takashi Tokuda, Sadao Shiosaka, Jun Ohta, "Functional brain fluorescence plurimetry in rat by implantable concatenated CMOS imaging system," *Biosensors and Bioelectronics* 53, 2014, pp. 31-36, 査読有 (2013 年 9 月) DOI:10.1016/j.bios.2013.09.033

② Takuma Kobayashi, Mayumi Motoyama, Hiroyuki Masuda, Yasumi Ohta, Makito Haruta, Toshihiko Noda, Kiyotaka Sasagawa, Takashi Tokuda, Hideki Tamura, Yasuyuki Ishikawa, Sadao Shiosaka, Jun Ohta, "Novel implantable imaging system for enabling simultaneous multiplanar and multipoint

analysis for fluorescence potentiometry in the visual cortex," *Biosensors and Bioelectronics* 38(1), 2012, pp.321-330, 査読有 (2012 年 7 月)

DOI:10.1016/j.bios.2012.06.035

〔学会発表〕（計 21 件）

① Jun Ohta, Chikara Kitsumoto, Toshihiko Noda, Kiyotaka Sasagawa, Takashi Tokuda, Mayumi Motoyama, Yasumi Ohta, Takuma Kobayashi, Yasuaki Ishikawa, Sadao Shiosaka, "A Micro Imaging Device for Measuring Neural Activities in the Mouse Deep Brain with Minimal Invasiveness," *Biomedical Circuits and Systems Conference*, 2012 年 11 月 29 日, Sheraton Hsinchu Hotel, TAIWAN

② Makito Haruta, Takuma Kobayashi, Chikara Kitsumoto, Toshihiko Noda, Kiyotaka Sasagawa, Takashi Tokuda, Jun Ohta, "An implantable CMOS-based device with hexagonal shape for wide-area brain functional imaging," *NEUROSCIENCE 2012*, 2012 年 10 月 14 日, New Orleans, USA

③ Takashi Tokuda, Tomoaki Miyatani, Yasuyo Maezawa, Takuma Kobayashi, Toshihiko Noda, Kiyotaka Sasagawa, Jun Ohta, "CMOS-based on-chip bio-image sensor with integrated micro LED array for optogenetics," *NEUROSCIENCE 2012*, 2012 年 10 月 14 日, New Orleans, USA

④ Takashi Tokuda, Tomoaki Miyatani, Yosmongkol Sawadsaringkarn, Takuma Kobayashi, Toshihiko Noda, Kiyotaka Sasagawa, Jun Ohta, "A CMOS on-chip Image Sensor with Integrated LED Array for Optogenetics," *2012 International Conference on Solid State Devices and Materials(SSDM2012)*, 2012 年 09 月 26 日, Kyoto, JAPAN

⑤ Makito Haruta, Takuma Kobayashi, Chikara Kitsumoto, Toshihiko Noda, Kiyotaka Sasagawa, Takashi Tokuda, Jun Ohta, "A CMOS-based implantable imaging device for wide-area brain functional imaging," *2012 International Conference on Solid State Devices and Materials(SSDM2012)*, 2012 年 09 月 25 日, Kyoto, JAPAN

⑥ 徳田 崇, 宮谷 友彰, Yosmongkol Sawadsaringkarn, 前澤 安代, 小林 琢磨, 野田 俊彦, 笹川 清隆, 太田 淳, "in vitro および in vivo オプトジェネティクス向け光刺激・イメージングデバイス," 日本

神経科学大会, 2012年09月21日, 名古屋国際会議場

⑦ Takuma Kobayashi, Makito Haruta, Chikara Kitsumoto, Mayumi Motoyama, Yasumi Ohta, Toshihiko Noda, Kiyotaka Sasagawa, Takashi Tokuda, Yasuyuki Ishikawa, Sadao Shiosaka, Jun Ohta, “脳内埋植型センサによる、げっ歯類の視覚野、体性感覚野の広範囲脳機能蛍光イメージング,” 日本神経科学大会, 2012年09月21日, 名古屋国際会議場

⑧ 宮谷 友彰, Yosmongkol Sawadsaringkarn, 小林 琢磨, 野田 俊彦, 笹川 清隆, 徳田 崇, 太田 淳, “オプトジェネティクス応用に向けたマイクロLEDアレイ搭載CMOS神経インターフェースデバイス,” 応用物理学学会学術講演会, 2012年09月12日, 愛媛大学

⑨ 春田 牧人, 小林 琢磨, 橋本 力, 野田 俊彦, 笹川 清隆, 徳田 崇, 太田 淳, “生体内脳機能イメージング用CMOS広域計測デバイス,” 応用物理学学会学術講演会, 2012年09月12日, 愛媛大学

⑩ 徳田 崇, 小林 琢磨, 野田 俊彦, 笹川 清隆, 太田 淳, “CMOS集積回路技術による生体埋め込みデバイス,” 応用物理学学会学術講演会, 2012年09月11日, 愛媛大学

⑪ Takashi Tokuda, Tomoaki Miyatani, Yasuyo Maezawa, Takuma Kobayashi, Toshihiko Noda, Kiyotaka Sasagawa, Jun Ohta, “A CMOS-Based On-Chip Neural Interface Device Equipped with Integrated LED Array for Optogenetics,” Annual International IEEE EMBS Conference, 2012年08月31日, San Diego, USA

⑫ Kiyotaka Sasagawa, Shogo Yokota, Takashi Matsuda, Peter Davis, Bing Zhang, Keren Li, Takuma Kobayashi, Toshihiko Noda, Takashi Tokuda, Jun Ohta, “Baseband Signal Transmission Experiment for Intra-Brain Communication with Implantable Image Sensor,” Annual International IEEE EMBS Conference, 2012年08月31日, San Diego, USA

⑬ 橋本 力, 小林 琢磨, 野田 俊彦, 笹川 清隆, 徳田 崇, 元山 真由美, 太田 安美, 石川 保幸, 塩坂 貞夫, 太田 淳, “刺入型 in vivo 脳神経活動計測用 CMOS イメージングデバイスの開発,” 映像情報メディア学会年次大会, 2012年08月30日, 広島市立大学

⑭ 笹川 清隆, 横田 昇吾, 松田 隆志, デイビス ピーター, 張 兵, 李 可人, 小林

琢磨, 野田 俊彦, 徳田 崇, 太田 淳, “脳内無線送信を目指したイメージセンサ信号のベースバンド伝送,” 電子情報通信学会技術研究報告 (IEICE Technical Report), 2012年07月27日, 山形大学 米沢キャンパス

⑮ 笹川 清隆, 横田 昇吾, 松田 隆志, デイビス ピーター, 張 兵, 李 可人, 小林 琢磨, 野田 俊彦, 徳田 崇, 太田 淳, “脳内無線送信を目指したイメージセンサ信号のベースバンド伝送,” 情報センシング研究会・集積回路研究会, 2012年07月27日, 山形大学 米沢キャンパス

⑯ Takuma Kobayashi, Mayumi Motoyama, Hiroyuki Masuda, Yasumi Ohta, Makito Haruta, Toshihiko Noda, Kiyotaka Sasagawa, Takashi Tokuda, Hideki Tamura, Yasuyuki Ishikawa, Sadao Shiosaka, Jun Ohta, “Fluorescence potentiometry using an implantable multiple imaging system to visualize the neural activities in both visual hemispheres of freely-moving mouse,” FENS (Federation of European Neuroscience Societies) Forum 2012, 2012年07月16日, Centre Convencions Internacional Barcelona (CCIB), Barcelona, SPAIN

⑰ Kiyotaka Sasagawa, Makito Haruta, Chikara Kitsumoto, Takuma Kobayashi, Toshihiko Noda, Takashi Tokuda, Jun Ohta, “An Implantable CMOS Sensor Device for Multi-Area Fluorescence Imaging of A Rat Brain,” Neural Interface Conference, 2012年06月18日, Salt Palace Convention Center, Salt Lake City, USA

⑱ Takashi Tokuda, Tomoaki Miyatani, Yasuyo Maezawa, Takuma Kobayashi, Toshihiko Noda, Kiyotaka Sasagawa, Jun Ohta, “CMOS-based Optoelectronic Neural Interface Device for Optogenetics,” Neural Interface Conference, 2012年06月18日, Salt Palace Convention Center, Salt Lake City, USA

⑲ 橋本 力, 増田 博之, 小林 琢磨, 野田 俊彦, 笹川 清隆, 徳田 崇, 太田 淳, “ラット脳内複数領域計測用 CMOS イメージングデバイス,” 情報センシング研究会, 2012年05月28日, 埼玉大学東京ステーションカレッジ

⑳ Makito Haruta, Takuma Kobayashi, Chikara Kitsumoto, Toshihiko Noda, Kiyotaka Sasagawa, Takashi Tokuda, Jun Ohta, “Development of a CMOS-based implantable device for wide-area brain

functional imaging,” International Meeting for Future of Electron Devices, Kansai (IMFEDK 2012), 2012年05月10日, Kansai University, JAPAN

② Kiyotaka Sasagawa, Keisuke Ando, Hitoshi Matsuoka, Takuma Kobayashi, Toshihiko Noda, Takashi Tokuda, Ohta Jun, “On-chip metal wire grid polarizer for CMOS image sensor based on 65-nm technology,” Conference on Lasers and Electro-Optics (CLEO 2012), 2012年05月07日, San Jose Convention Center, USA

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小林 琢磨 (KOBAYASHI, Takuma)
近畿大学・東洋医学研究所・助教
研究者番号：80582288