

平成 30 年 6 月 22 日現在

機関番号：13904

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2014～2017

課題番号：26709024

研究課題名(和文) 脳内深部の神経細胞内電位を多点で計測するナノエレクトロニクス

研究課題名(英文) Nanoelectronics for multisite intracellular recording in brain tissue in vivo

研究代表者

河野 剛士 (Kawano, Takeshi)

豊橋技術科学大学・工学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：70452216

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 18,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、既存の細胞内電極では実現不可能であった生体組織深部における細胞内電位計測を可能とする長さが100マイクロ以上のナノプローブ電極アレイデバイスを開発することを目的とした。ナノプローブ電極は、選択的vapor-liquid-solid(VLS)結晶成長によるシリコンマイクロプローブの先端部をナノスケールに先鋭化することで製作する。本研究では、提案するナノプローブ電極の機械的特性の解析、ナノプローブアレイの集積化プロセスの確立、製作したデバイスの電気的特性を評価すると共に、マウス筋細胞およびマウス大脳皮質を用いた電気生理実験をとおして提案するデバイスによる細胞内電位計測を実証した。

研究成果の概要(英文)：In this research, it is aimed to develop a nanoscale needle device with the needle length of more than 100 μm , which length enables intracellular electrical measurement and DNA introduction into cell for thick biological tissues including brain slice and brain in vivo. In order to realize the $> 100\text{-}\mu\text{m}$ -long nanoneedle devices, we have proposed the nanoscale-tipped silicon microneedle device by sharpening the tip portion of the silicon microneedle, which can be vertically assembled on a silicon substrate by gold-catalyzed selective vapor-liquid-solid (VLS) crystal growth of silicon. The fabrication process is based on the silicon growth and subsequent micro/nanofabrication processes. We explored the mechanical and electrical characteristics of the proposed nanoelectrode, and demonstrated the intracellular recording capabilities using mouse's muscle cells ex vivo and mouse's brain tissue in vivo.

研究分野：電子デバイス・電子機器

キーワード：ナノデバイス 細胞内電極 細胞内計測 シリコン MOSFET センシングデバイス

1. 研究開始当初の背景

神経回路・細胞研究を基にした生体機能解明、新規治療開発の観点において、脳等の組織深部における細胞内計測技術が重要である。通常の神経電極は、直径 10 μm 以上の電極を細胞の“外”に配置し、細胞の“漏れ電位”である 100 μV 以下の微小な電位を測定していた。一方で、500 nm 以下の細胞内電極を実現することで、10 mV 以上の電位で細胞内の詳細な情報が読み取れる。更に、前段に繋がっている細胞が伝達する信号の種類を、細胞内電位に含まれる興奮性シナプス後電位 (EPSP)、抑制性シナプス後電位 (IPSP) を計測することで解析できる。このように細胞外測定では不可能であった詳細な細胞情報の計測を細胞内法で実現できる。

集積回路 (IC) 技術は、細胞サイズを下回るナノスケールの加工が可能となったが、これらは全て半導体技術の延長である“平面的製造 (プレーナ) 技術”であり、3 次元構造を持つ生体組織へのデバイス応用は構造的に“ミスマッチ”であった。MEMS 技術による 3 次元デバイスの製作が提案できるが、その微細化は数十 μm 程度に留まっている。近年、Si ナノワイヤ、 SiO_2 ナノチューブ、ナノワイヤアレイを用いた細胞内刺入技術が報告されている。しかし、これらもプレーナ技術の延長のため、プローブ長が数 μm に留まり組織に刺入するには短い。更に多電極化も困難であり、これまで脳等の組織深部の細胞内多点計測に至っていない。

本研究では、脳・神経科学、更には医療応用での貢献が期待できる、脳等の生体組織内深部の各種細胞の“細胞レベル”での計測を可能とするナノエレクトロニクス技術を提案する。生体組織や脳深部の細胞内多点計測はこれまでに無く、その測定技術開発の学術的意味は大きい。

2. 研究の目的

脳・神経科学、更には医療応用での貢献が期待できる、脳の神経細胞やその他生体組織内深部の各種細胞の“細胞レベル”での計測を可能とするナノエレクトロニクス技術を提案した。通常の神経計測用の電極は、その電極サイズが 10 μm 以上であり、この電極を細胞の“外”に配置し、100 μV 以下の微小な電位を測定していた。一方で、500 nm 以下のナノスケールの電極を実現することで、電極を細胞内に刺入でき、10 mV 以上の電圧で細胞内の詳細な情報が読み取れる。これは、前段に繋がっている細胞の情報の計測も可能とする。提案するデバイスは、組織深部の細胞内刺入を可能とする先端直径 10 nm~50 nm、長さ数百 μm 以上の 3 次元ナノプローブアレイを基盤技術としたもので、このナノプローブに高感度な細胞電位計測機能を集積回路技術により搭載させる。これまでに国内外において半導体エレクトロニクスを脳深部の神経細胞内に多点で刺入した例はない。提案す

る細胞内計測技術はこれまでにない全く新しい細胞計測技術として脳・神経科学、医療分野での貢献が期待できる。

3. 研究の方法

提案するデバイスの実現に向け、1) ナノプローブの機械的特性評価、2) ナノプローブ集積化プロセスの確立、3) プローブの電気的特性、4) 電気生理実験、5) IC・MEMS システム集積化の各実験項目に取り組むことで本研究を推進する。

4. 研究成果

ナノプローブの機械的特性

先ず 100 μm 以上の長さを持つナノスケール先鋭化マイクロプローブが生体に刺入することができるのかについて有限要素法解析を用いて定量的に評価を行った。提案するナノスケール先鋭化マイクロプローブは従来報告されているナノワイヤなどの円柱形状とは異なり、円錐形状にすることによって高剛性化を図った。円柱形状 (先端直径 500 nm、電極長さ 150 μm) 及び円錐形状 (先端直径 500 nm、末端直径 10 μm 、電極長さ 150 μm) のシリコンニードルにおいて比較を行ったところ、提案する円錐形状は 4.09 N/m の剛性を持ち、円柱形状の 5.2×10^{-4} N/m よりも約 7500 倍の剛性を示し、また、脳組織への刺入に必要な剛性よりも高い剛性を示した (図 1)。

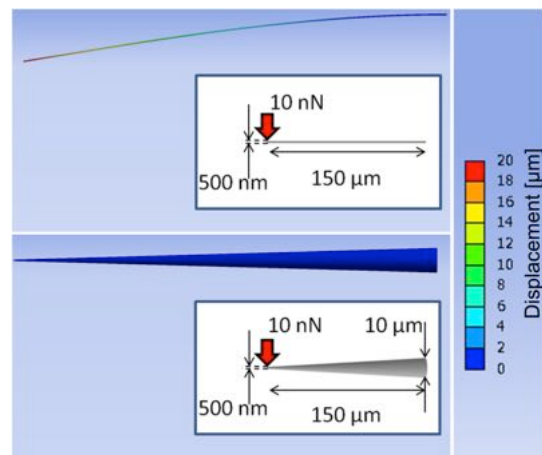


図 1. 円柱形状および円錐形状の Si ニードルにおける剛性シミュレーションの比較。

ナノプローブ集積化プロセスの確立

多点同時計測を実現するためには電極間を電氣的に分離する必要があった。我々のグループでは細胞外電位計測用のマイクロスケール電極を提案してきたが、それらは科学気相成長法 (CVD) による SiO_2 の成膜により電氣的に分離を行っていた。しかしながら、この手法を用いるとナノスケールの先端形状を維持できないという問題があった。そこで Silicon on Insulator (SOI) 基板上にニードルを形成する方法を提案した。結果として、SOI 基板上に 42.8% の歩留まりでニードルを形成することができた。これらの結果を元にデバ

イスの製作を行った。

図2にナノプローブ神経電極の製作プロセスを示す。先ず SOI 基板上に、700°C、の VLS 結晶成長により Si プロブを集積化し、この Si プロブ先端をフッ硝酸を用いたウエットエッチングによりナノスケール化を行った。その後、電極材料をスパッタ法により成膜し、Si プロブ-電極パッド間の配線を形成した。プローブ側壁は生体適合性の高いパリレンCを成膜することでプローブ間の絶縁を確保し、O₂アッシャーを用いることによりプローブ先端電極部の開口を行った。提案する集積化プロセスにより電極長さ 140 μm から 400 μm のナノスケール先鋭化マイクロプローブアレイ電極を製作した (図2)。

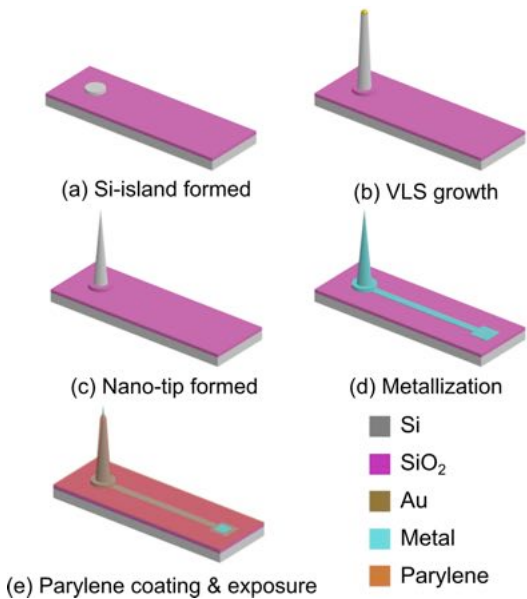


図2. デバイスの製作プロセス. (a) Si アイランドの形成, (b) VLS 結晶成長による Si マイクロニードルの形成, (c) 先端部の先鋭化, (d) 電極および配線の形成, (e) パリレンの成膜および先端部とボンディングパッドの形成.

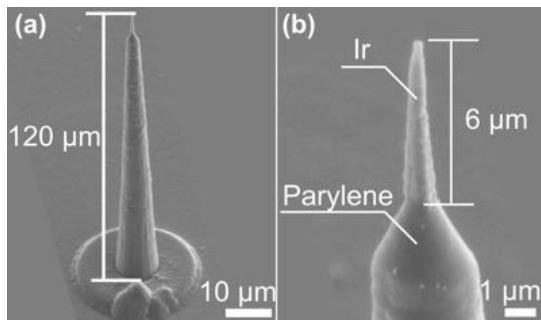


図3. 製作したデバイスのSEM像. (a) ナノプローブ全体図. (b) ナノプローブ先端部.

ナノプローブの電気的特性

生体計測可能性を調べるために、製作したナノスケール先鋭化マイクロプローブアレイ電極の電気的特性の評価を行った。電極インピーダンスは 1 Hz ~ 10 kHz において 895 MΩ ~ 305 kΩ、1 kHz において 2.3 MΩ であり、従来用いられているガラス管電極と同等

な値を示した。また、入力信号に対してどれだけの出力が得られるか電圧の入出力比を計測した結果、細胞内計測時は、1 Hz ~ 10 kHz において 85% ~ 37% となった。また、計測システムのノイズ計測を行った結果 1 Hz ~ 10 kHz において 5 mV/Hz^{1/2} ~ 15 nV/Hz^{1/2} を示した。これらの結果より、信号の減衰及びシステムノイズを考量しても細胞内電位が計測できるという結果を示した (図4)。

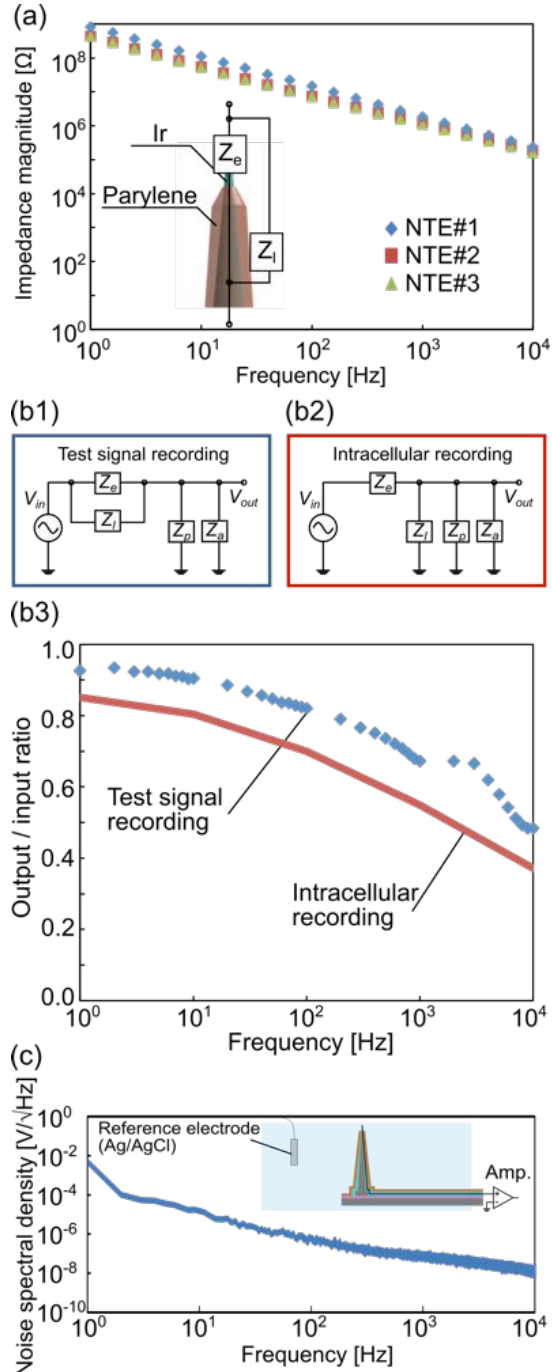


図4. デバイスの電気的特性. (a) デバイスインピーダンス, (b) 入出力比計測; テスト信号計測時 (b1) および細胞内電位計測時の等価回路(b2), 電圧入出力比の周波数特性 (青線: テスト信号計測時, 赤線: 細胞内計測時) (b3). (c) 雑音計測.

電気生理実験

製作した 200 μm 長のナノプローブ電極アレイを用いて、マウスの筋細胞（前脛骨筋）からの *in vitro* 細胞内電位計測を試みた。細胞内に電極を刺入する前後において約 19 mV ~ 35 mV の電圧降下を確認できた。この結果より今回製作したナノスケール先鋭化マイクロプローブアレイ電極デバイスがマウスの筋細胞内に刺入され、且つこのナノプローブ電極を介して細胞内の静止膜電位が計測できることを示した（図 5）。

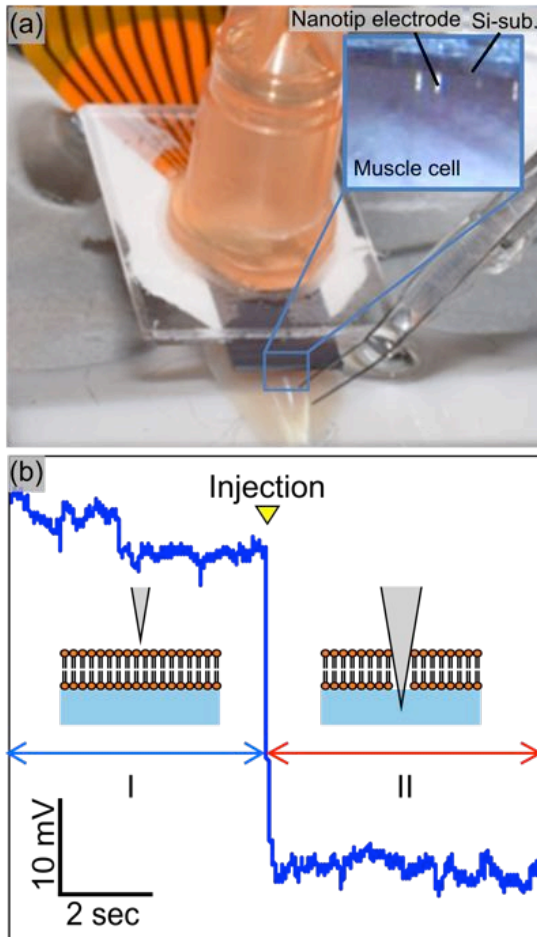


図 5. マウス筋細胞を用いた細胞内電位計測. (a) 細胞内電位計測の様子. マニピュレーターを用いてデバイスを前脛骨筋に押し付け筋細胞内へ NTE を刺入する. (b) 細胞内電位計測結果 (I: 刺入前, II: 刺入後).

次に 200 μm 長のナノスケール先鋭化マイクロプローブ電極アレイを用いてマウスの脳から *in vivo* 細胞外電位多点同時計測を試みた。ヒゲ刺激に対するバレル野（体性感覚野）の応答の計測を行った結果、活動電位は計測できなかったが、局所細胞外電位の同時計測を実現した。さらに 400 μm 長のナノスケール先鋭化マイクロプローブ電極を用いてマウスの脳から *in vivo* 細胞内電位計測を試みた。結果として 52.9 mV ~ 98.2 mV の電圧降下を確認した。活動電位は観測できなかったが、*in vivo* 環境下において細胞内に電極が刺入され、電極を介して静止膜電位が計測できるこ

とを示した（図 6）。

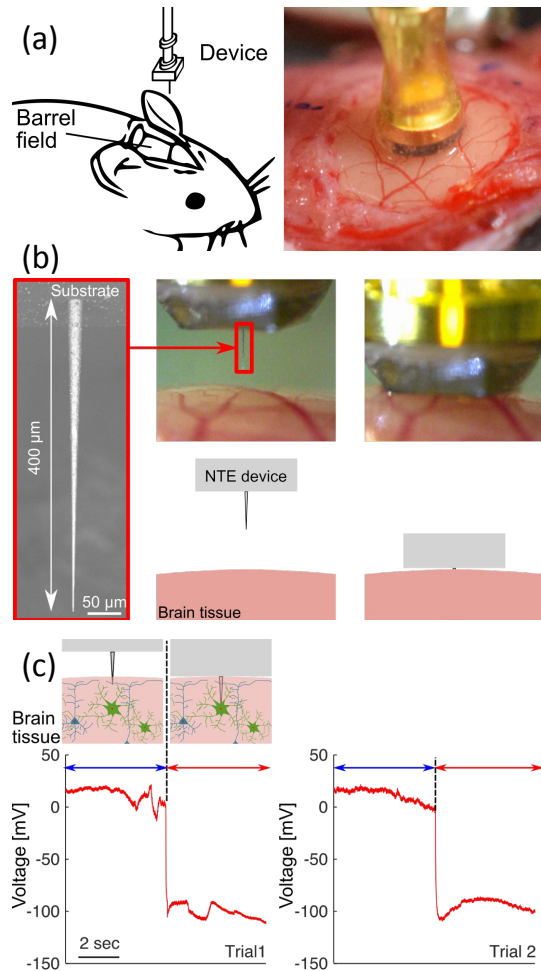


図 6. マウス脳からの *in vivo* 細胞内電位計測. (a) 計測の様子. (b) ナノスケール先鋭化マイクロプローブ電極の SEM 像とその刺入の様子. (c) *in vivo* 細胞内電位計測の測結果.

On-chip エレクトロニクス

高インピーダンス特性のナノ電極用の On-chip 生体信号増幅器の集積化を検討した。本学 5 μm -NMOS テクノロジーにより、*in vivo* 計測用としてバッファアンプ回路 (Source-follower) を集積化した幅 2 mm のデバイスを設計・製作・評価した。加えて細胞外信号ではあるが、高インピーダンス特性のプローブ電極デバイスから数十 μV 程度の局所集合電位を含む神経信号を計測した。

遺伝子導入への応用

またナノスケール先鋭化マイクロプローブのもう一つの応用として生体組織への DNA 導入を提案した。*in vivo* 環境下のマウスの脳（バレル野、体性感覚野）に対して、長さ 200 μm のナノスケール先鋭化マイクロプローブを用いて蛍光マーカータンパク質の発現ベクター (Venus) を導入し、タンパク質を発現させ、透明化を行った脳を、2 光子顕微鏡を用いて観察を行った。結果として脳表から約 200 μm の深さにて蛍光を確認した。ナノスケール先鋭化マイクロプローブを用

いることによって *in vivo* 環境下のマウスの脳に DNA 導入できることを示した。

まとめ

本研究は従来では困難であった生体組織深部の細胞にアクセスし電氣的計測及び DNA の導入を実現した。特に細胞内での電位計測は、これまでの研究においては培養細胞にとどまっていたが、本研究により脳スライス及び *in vivo* での計測が発展することを期待している。

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 14 件)

- (1) Yoriko Ando, Hirohito Sawahata, Takeshi Kawano, Kowa Koida and Rika Numano, "Fiber Bundle Endomicroscopy with Multi-illumination for Three-dimensional Reflectance Image Reconstruction," *Journal of Biomedical Optics*, 査読有, Vol. 23, No. 2, 020502, February 2018.
- (2) Yusuke Morikawa, Shota Yamagiwa, Hirohito Sawahata, Rika Numano, Kowa Koida, Makoto Ishida and Takeshi Kawano, "Ultrastretchable Kirigami Bioprobes," *Advanced Healthcare Materials*, 査読有, Vol. 7, No. 3, 1701100, February 2018.
- (3) Yoshihiro Kubota, Shota Yamagiwa, Hirohito Sawahata, Shinnosuke Idogawa, Shuhei Tsuruhara, Rika Numano, Kowa Koida, Makoto Ishida and Takeshi Kawano, "Long Nanoneedle-electrode Devices for Extracellular and Intracellular Recording *in vivo*," *Sensors and Actuators B*, 査読有, Vol. 258, pp. 1287-1294, April 2018.
- (4) Hirohito Sawahata, Shota Yamagiwa, Airi Moriya, Dong Sheng Teo, Hideo Oi, Yoriko Ando, Rika Numano, Makoto Ishida, Kowa Koida and Takeshi Kawano, "Single 5 μm Diameter Needle-electrode Block Modules for Unit Recordings *in vivo*," *Scientific Reports*, 査読有, Vol. 6, 35806, September 2016.
- (5) Yu Miyamoto, Yuma Fujii, Masafumi Yamano, Toru Harigai, Yoshiyuki Suda, Hirofumi Takikawa, Takeshi Kawano, Mamiko Nishiuchi, Hironao Sakaki and Kiminori Kondo, "Preparation of Self-supporting Au Thin Films on Perforated Substrate by Releasing from Water-soluble Sacrificial Layer," *Japanese Journal of Applied Physics*, 査読有, Vol. 55, No. 7S2, 07LE05, June 2016.
- (6) Yoshihiro Kubota, Hideo Oi, Hirohito Sawahata, Akihiro Goryu, Yoriko Ando, Rika Numano, Makoto Ishida and Takeshi Kawano, "Nanoscale-tipped High-aspect-ratio Vertical Microneedle Electrodes for Intracellular Recordings," *Small*, 査読有, Vol. 12, pp. 2846-2853, June 2016.
- (7) Yoriko Ando, Kowa Koida, Hirohito Sawahata, Takashi Sakurai, Mitsuo Natsume, Takeshi Kawano and Rika Numano, "Reflectance Imaging by Fiber Bundle Endoscope: Vertical Reconstruction by Multipositional Illumination," *AIP Conference Proceedings*, 査読有, Vol. 1709, 020009, February 2016.
- (8) M. A. Matin, Akihito Ikedo, Takeshi Kawano, Kazuaki Sawada and Makoto Ishida, "Microscale Temperature Sensing using Novel Reliable Silicon Vertical Microprobe Array: Computation and Experiment," *Microelectronics Reliability*, 査読有, Vol. 55, No. 12, pp. 2689-2697, December 2015.
- (9) Kenji Okabe, Horagodage Prabhath Jeewan, Shota Yamagiwa, Takeshi Kawano, Makoto Ishida and Ippei Akita, "Co-Design Method and Wafer-Level Packaging Technique of Thin-Film Flexible Antenna and Silicon CMOS Rectifier Chips for Wireless-Powered Neural Interface Systems," *Sensors*, 査読有, Vol. 15, No. 12, pp. 31821-31832, December 2015.
- (10) Satoshi Yagi, Shota Yamagiwa, Yoshihiro Kubota, Hirohito Sawahata, Rika Numano, Tatsuya Imashioya, Hideo Oi, Makoto Ishida and Takeshi Kawano, "Dissolvable Base Scaffolds allow Tissue Penetration of High-aspect-ratio Flexible Microneedles," *Advanced Healthcare Materials*, 査読有, Vol. 4, pp. 1949-1955, September 2015.
- (11) Shota Yamagiwa, Makoto Ishida and Takeshi Kawano, "Flexible Parylene-film Optical Waveguide Arrays," *Applied Physics Letters*, 査読有, Vol. 107, 083502, August 2015.
- (12) Shota Yamagiwa, Akifumi Fujishiro, Hirohito Sawahata, Rika Numano, Makoto Ishida and Takeshi Kawano, "Layer-by-layer Assembled Nanorough Iridium-oxide/platinum-black for Low-voltage Microscale Electrode Neurostimulation," *Sensors and Actuators B*, 査読有, Vol. 206, pp. 205-211, January 2015.
- (13) Akifumi Fujishiro, Hidekazu Kaneko, Takahiro Kawashima, Makoto Ishida and Takeshi Kawano, "*In vivo* Neuronal Action Potential Recordings via Three-dimensional Microscale Needle-electrode Arrays," *Scientific Reports*, 査読有, Vol. 4, No. 4868, May 2014.
- (14) Masahiro Sakata, Tomohiko Nakamura, Tomoyuki Matsuo, Akihiro Goryu, Makoto Ishida and Takeshi Kawano, "Vertically

Integrated Metal-clad/Silicon Dioxide-shell Microtube Arrays for High-spatial-resolution Light Stimuli in Saline,” Applied Physics Letters, 査読有, Vol. 104, 164101, April 2014.

〔学会発表〕(国内 21 件, 国際 27 件)

以下主要論文

- (1) Yuto Kita, Hiro Kubo, Hirohito Sawahata, Shota Yamagiwa, Xian Long Angela Leong, Rika Numano, Kowa Koida, Makoto Ishida, Takeshi Kawano, “Single needle electrode-topped amplifier package (STACK) for in vivo applications” IEEE Micro Electro Mechanical Systems (IEEE-MEMS) Conference 2018.
- (2) Shota Yamagiwa, Hirohito Sawahata, Rika Numano, Makoto Ishida, Kowa Koida, Takeshi Kawano, “Dissolvable material-sheathed microneedle-electrode device slid into a narrow gap of the brain” IEEE Micro Electro Mechanical Systems (IEEE-MEMS) Conference 2018.
- (3) Yusuke Morikawa, Shota Yamagiwa, Hirohito Sawahata, Rika Numano, Kowa Koida, Makoto Ishida, Takeshi Kawano, “Stretchable micro-doughnuts Kirigami bioprobe” IEEE Micro Electro Mechanical Systems (IEEE-MEMS) Conference 2018.
- (4) Shota Yamagiwa, Hirohito Sawahata, Rika Numano, Makoto Ishida, Kowa Koida, Takeshi Kawano, “In vivo neuronal recordings using three-dimensional microneedle-electrode assembled on flexible substrate” 19th Solid-State Sensors, Actuators and Microsystems (TRANSDUCERS’17).
- (5) Shota Yamagiwa, Hirohito Sawahata, Hideo Oi, Rika Numano, Makoto Ishida, Kowa Koida, Takeshi Kawano, “Ultra high-aspect-ratio Neuroprobe: 5- μ m-diameter and 400- μ m-length Needle Detects Action Potentials in vivo” IEEE Micro Electro Mechanical Systems (IEEE-MEMS) Conference 2017.
- (6) Yusuke Seki, Shota Yamagiwa, Yusuke Morikawa, Hirohito Sawahata, Rika Numano, Makoto Ishida, Takeshi Kawano, “Hook and Loop Microfastener: Flexible Microelectrodes Tied to a Nerve” IEEE Micro Electro Mechanical Systems (IEEE-MEMS) Conference 2017.
- (7) Yusuke Morikawa, Shota Yamagiwa, Hirohito Sawahata, Makoto Ishida, Takeshi Kawano, “An origami-inspired ultrastretchable bioprobe film device” IEEE Micro Electro Mechanical Systems (IEEE-MEMS) Conference 2016.
- (8) Kentaro Yamaguchi, Masanori Tanaka, Shota Yamagiwa, Hiroto Sawahata, Rika

Numano, Makoto Ishida, Takeshi Kawano, “High-performance microelectrode of PEDOT/Pt-black for low voltage neurostimulation” IEEE Micro Electro Mechanical Systems (IEEE-MEMS) Conference 2016

- (9) Shota Yamagiwa, Makoto Ishida, Kowa Koida, Takeshi Kawano, “Flexible optrode array: Parylene-film waveguide arrays with microelectrodes for optogenetics” 18th Solid-State Sensors, Actuators and Microsystems (TRANSDUCERS’15).
- (10) Kenji Okabe, Ipppei Akita, Shota Yamagiwa, Takeshi Kawano, Makoto Ishida, “A thin film flexible antenna with CMOS rectifier chip for RF-powered implantable neural interfaces” 18th Solid-State Sensors, Actuators and Microsystems (TRANSDUCERS’15).
- (11) Hiroki Makino, Kohei Asai, Masahiro Tanaka, Shota Yamagiwa, Hirohito Sawahata, Ipppei Akita, Makoto Ishida and Takeshi Kawano, “Vertically Aligned Extracellular Microprobe Arrays/(111) Integrated with (100)-Silicon MOSFET Amplifiers” IEEE Micro Electro Mechanical Systems (IEEE-MEMS) Conference 2015.

〔図書〕(計 1 件)

- (1) Shota Yamagiwa, Hirohito Sawahata, Takeshi Kawano, “Implantable Flexible Sensors for Neural Recordings”, in Flexible and Stretchable Medical Devices, Ed. Kuniharu Takei (John Wiley & Sons), 2018, 440

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.int.ee.tut.ac.jp/icg/member/~takekawano>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

河野 剛士 (KAWANO TAKESHI)

豊橋技術科学大学・大学院工学研究科・准教授

研究者番号：70452216

(4) 研究協力者

沼野 利佳 (NUMANO RIKA)

豊橋技術科学大学・大学院工学研究科・准教授

研究者番号：30462716

鯉田 孝和 (KOIDA KOWA)

豊橋技術科学大学・エレクトロニクス先端融合研究所・准教授

情報・知能工学系兼任

研究者番号：10455222