

太田 淳

奈良先端科学技術大学院大学 物質創成科学研究・教授

バイオメディカルフォトニック LSI の創成

§1. 研究実施の概要

本研究は、フォトニクス技術と Si-LSI (大規模集積回路) 技術を融合することで、バイオ技術、医療技術への適用を可能とする新しいバイオメディカルフォトニックデバイスの創成を目的とし、① バイオメディカルフォトニック LSI (bmp-LSI) システムの開発、② 分子イメージングへの応用、③ 機能的脳疾患医療応用の検討、の 3 つの研究課題に取り組んでいる。今年度①および②では、マウス脳内埋植に適した bmp-LSI の小型・省配線化及び長期埋植安定性について研究を進め、1 か月以上の長期埋植を可能とし、かつ配線数を 4 本とし自由行動下での測定を可能とするデバイス開発に成功した。また開発したデバイスによる記憶形成メカニズム解明を目指し自由行動マウスの実験を継続している。③については、手術で得られた生きたヒト脳スライス標本において、点電極システムを用い、脳内のネットワークを構成する細胞をリアルタイムで観察しながら細胞を電気刺激し電気活動を測定する技術を開発した。今後は、バイオ側、医学側での bmp-LSI の応用展開をより深く行っていく。

§ 2. 研究実施体制

(1) 「太田」グループ

① 研究分担グループ長: 太田 淳 (奈良先端科学技術大学院大学物質創成科学研究科、教授)

② 研究項目

・バイオメディカルフォトニック LSI システムの開発

(a) バイオメディカルフォトニック LSI の高機能化

高分解能化 (~10 μ m), 2 波長検出機能集積化, 高感度化, 刺激電極の集積化とポテンシャル検出回路集積化.

(b) 超小型バイオメディカルフォトニック LSI とその分散システムの開発

チップの小型化と分散配置を可能とするパッケージング技術の開発.

(2)「塩坂」グループ

① 研究分担グループ長:塩坂 貞夫 (奈良先端科学技術大学院大学バイオサイエンス研究科、教授)

② 研究項目

・バイオメディカルフォトニック LSI の分子イメージングへの応用

(a)バイオメディカルフォトニック LSI の生体動作検証

パーキンソン病・てんかんでの神経伝達機構および神経回路の異常・伝達障害に対応するデバイスとして使用可能か検証するため、ドーパミンなど伝達物質、神経可塑性プロテアーゼ、神経活動などを生体内および細胞・スライスにて安定的にモニターする技術を開発する。

(b) バイオメディカルフォトニック LSI の完全埋植による記憶形成メカニズムの解明

低侵襲でありながら時間連続的・2 次元的に脳内情報を取得できるバイオメディカルフォトニック LSI の利点をいかし、モデル動物の海馬・扁桃体に完全埋植して動物行動を有線にて測定し、学習が海馬・扁桃体に蓄えられる過程を追跡する。

(3)「加藤」グループ

① 研究分担グループ長:加藤 天美 (近畿大学医学部、教授)

② 研究項目

・機能的脳疾患医療応用の検討

(a) ヒト病理組織における神経回路応答-BMP-LSI 応用のための基礎研究

(b) ブレイン-コンピュータ・インターフェイスへの展望

- ヒト運動関連野の皮質脳波解析

- ヒト言語関連野の皮質脳波解析

§3. 研究実施内容

(文中に番号がある場合は(4-1)に対応する)

太田グループ

(a) バイオメディカルフォトニック LSI (bmp-LSI)の高機能化

bmp-LSI は脳内埋植によるダメージを低減するためできるだけ薄くする必要があり, そのためレンズ等の光学系を実装していない. 今後の適用範囲を広げるためには分解能向上は有効である. デバイス厚さを薄く保ったまま分解能を向上する方法としてライトガイドアレイ構造の導入を実施した¹⁾.

ライトガイド構造は画素上部に設けた Si 貫通孔であり, 画素に入射する光の入射角を制限し, 像のぼけを抑制する. 図 2 にライトガイドアレイ搭載センサの構造図と写真を示す. 基本構造は CMOS イメージセンサ, CYTOP(透明フッ素系樹脂), 干渉フィルタ, ライトガイドアレイで構成されている. 干渉フィルタは蛍光イメージング時の励起光を除去する目的で搭載している. ライトガイドアレイをセンサ上に搭載することで画素出力信号値の半値幅が減少している.

神経活動のより多面的な計測のためには光信号と電気信号の2つの信号を取得するマルチモーダルセンシングが有効である. 蛍光物質を介した光計測(イメージング)は, 空間分解能が高く, 物質の選定により様々な脳神経活動を観察が可能である一方, 電気信号計測は神経を伝搬する信号を直接観察することが可能である. これらの計測手法は相補的である. 今回このようなマルチモーダルセンシングを可能とするシヤンク形状 bmp-LSI の開発を行った^{2), 3)}.

開発した脳内埋め込みマルチモーダル bmp-LSI を図 4 に示す. マウス脳内への埋植を想定し, 幅 650 μm 長さ約 4mm の寸法としている. 画素数は 13852 である. 蛍光イメージングでは, 蛍光物質に励起光を照射し, 蛍光の身を透過するフィルタを通した後, イメージセンサで検出する. センサ上には LED を搭載可能とし, フォトダイオードアレイによるイメージセンサ機能を有している. 蛍光と励起光の分離は, カラーレジストによるフィルタ層を用いた. また, チップ上の一部はチップ配線層を利用して電極としている. 電極領域での光・電気信号を実現するため, 電極は開口部が配置されている.

脳ファントムを用い光・電気信号の同時計測実験を行った. 蛍光イメージングには蛍光ビーズを用い, 同時に画素上の電極を用いた電気信号計測を行い電極付画素アレイでのイメージング, および, 電極を介した信号計測に成功した. 図 5 に測定系と測定結果を示す. 電気信号上のノイズ低減が今後の課題である.

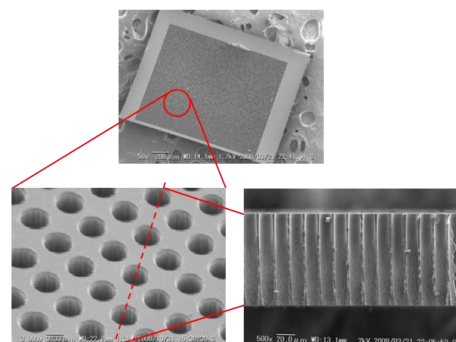


図 1: ライトガイドアレイ SEM 写真

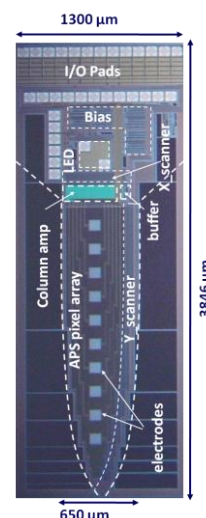


図 4: マルチモーダル bmp-LSI

bmp-LSI チップは脳内への埋め込んだ状態で動作可能とするため、約 $5\mu\text{m}$ 厚のパリレン樹脂によって包埋されている。脳深部でのイメージング機能を検証するため、CMOS チップを麻醉下マウスの海馬に挿入した。CMOS チップを動作させ、イメージングを行いながら脳深部へ挿入することに成功。チップを挿入後もマウスは正常に行動することを確認した。

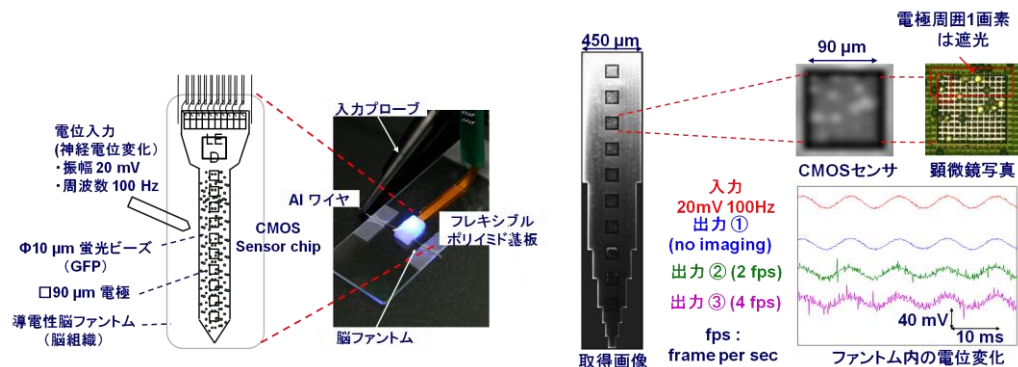


図 5: マルチモーダル bmp-LSI による光・電気同時測定. 右図: 測定系, 左図: 測定

1. 超小型 bmp-LSI の開発

(a)の省配線型 bmp-LSI のアーキテクチャをもとに更に小型化を進め、 0.5mm 角程度の超小型チップの試作およびその基本動作実証に成功した。またこのチップを複数個実装した分散型システムの試作にも成功した。

2. 分散システムの開発

(a)で開発した bmp-LSI を 2 セット用いて左右脳の視覚野での活動を計測するシステムの構築を進めている。まず bmp-LSI で電位感受性色素 (VSD) による細胞活動計測が可能かどうかを検討し、bmp-LSI チップ上で細胞培養を行い VSD からの蛍光観察を行い、定量的な評価が可能であることを実証した⁴⁾。次にマウスの左右脳視覚野の神経活動をモニターするために bmp-LSI システムを試作した。2 個の bmp-LSI がマウス視覚野に設置した。この実験では神経細胞を電位感受性色素で染色することで、神経細胞活動を蛍光強度として記録することが可能である。そのためチップ上には蛍光励起用の LED を搭載している。現在本システムをマウス脳内へ埋植を行い自由行動を可能としている。

塩坂グループ

(a) バイオメディカルフォトニック LSI の生体動作検証

パーキンソン病・てんかんでの神経伝達機構および神経回路の異常・伝達障害に対応するデバイスとして使用可能か検証するためドーパミンなどの伝達物質、神経可塑性プロテアーゼ、神経活動などを生体内および細胞・スライスにて安定的にモニターする技術を開発する。

i) ウイルス感染による GFP 発現神経細胞の検出

シンドビスウイルスは神経細胞に感染し大量に外来遺伝子を急性発現させることが可能である。そこでまずこれに GFP 遺伝子を組み込み、脳内に注入して局所的に GFP を発現させ、これを bmp-LSI センサーで検出することを試みた。その結果、脳に埋植したセンサーによって GFP タンパク質を安定的に検出することに成功した。一方、細胞単位での解像度には現センサーでは到達

しておらずさらなる開発が必要である。

ii) 感度よく GFP の蛍光を検出するセンサーの開発

i)に示したように今年度は昨年度に引き続き開発を進めてきたセンサーを使い、GFP 発現細胞の測定法について大きく進捗した。すなわち(1)脳スライスや *in vivo* での測定が可能になり、(2)センサーの耐用時間を飛躍的に延ばし埋植1週間でもセンサー素子としては安定的に動作することを確認した。ただ、生体組織に対するダメージは依然として大きく生体反応を安定的に検出するためには照射光毒性を弱めるための波長の選択とそれに伴う長波長蛍光タンパク質の選択、より微弱な照射光によっても検出できる感度の向上、およびセンサーの小型化や生体に優しいセンサーコーティング剤の開発等が考えられた。

iii) TH-GFP マウスの線条体 GFP 検出

ii)に記載のように GFP の測定にはすでに成功している。そこで昨年度から予定していたドーパミン合成系の変化を、線条体に発現する GFP の蛍光強度の変化としてとらえることのできる遺伝子改変マウス(TH-GFP マウス)を用いて検討した。その結果、GFP を持たない野生型マウスと比較して、線条体の位置において高いシグナル値が得られ、*in vivo* において GFP タンパク質の蛍光を検出することにはじめて成功した。更に、GFP を発現する黒質細胞の破壊により、GFP の蛍光が減少する過程を検出することにも成功した。

iv) 電位差感受性色素を用いた神経細胞活動の測定

電位差感受性色素を培養細胞に適用することによって神経活動をセンサーにて測定することはすでに昨年度に成功している。今年度は脳スライスと、さらに一歩進めて *in vivo* においてこれを適応し、センサによる同色素の検出に成功した。

(b) バイオメディカルフォトニック LSI の完全埋植による記憶形成メカニズムの解明

低侵襲でありながら時間連続的・2 次元的に脳内情報を取得できるバイオメディカルフォトニック LSI の利点をいかし、モデル動物の海馬・扁桃体に完全埋植して動物行動を有線にて測定し、学習が海馬・扁桃体に蓄えられる過程を追跡する。

i)有線にて記録しながら自由行動状態で記録する基本技術の開発。

GFP の測定、電位差感受性色素の測定等を通して自由行動の基本技術を確立した。センサーサイズ、解像度、および感度などまだ十分とはいえないが、自由行動下での生体分子測定のための基本技術を確立し、生体内動作検証の項目については目標がほぼ達成されたと考えている。今後は(b)LSI の完全埋植による記憶形成メカニズムの解明に注力してゆくこととなる。

加藤グループ

「機能的脳疾患医療応用の検討」では、BMP-LSI の医療応用を目指すべく、てんかん^{8, 14, 15)}や難治性疼痛、脳腫瘍¹¹⁾、脳血管障害⁹⁾など脳神経外科手術患者^{10, 12)}において、治療のため病理組織が得られたり、頭蓋内電極を挿入した患者を対象に、下記の研究を行った。なお、これらの研究は患者に新たな侵襲を加えるものではないが、近畿大学医学部倫理委員会の承認ならびに、施行にあたっては、患者との間に十分なインフォームドコンセントを得ている。

1. ヒト病理組織における神経回路応答-BMP-LSI 応用のための基礎研究

ヒトへの BMP-LSI の応用は高度に組織化された神経ネットワークを解析する革新的な技術を開発するため、脳内の神経細胞やグリアの形態を観察すると同時に神経活動の測定と光刺激により神経活動を制御できるシステムを目指している。その予備的検討として、ヒト脳スライス標本において、点電極システムを用い、脳内のネットワークを構成する細胞をリアルタイムで観察しながら細胞を電機刺激し電気活動を測定する技術を開発した。てんかん^{8, 14, 15}や脳腫瘍⁴)など脳神経外科手術において、治療のため得られた病理組織の一部を 300 μm の切片とし、BMP-LSI 応用の予備実験として、高性能多電極刺激-電位記録システムである「MED システム (64ch、アルファメドサイエンス製)」を用いて脳皮質や海馬における微小神経回路を解析した。電極は 50 μm の大きさで 300 μm ごとにグリッド状に配置されている。その上に生きたヒト脳切片を載せ、各々の電極を刺激して神経ネットワークに対応した部位特異的な誘発電位を刺激電極以外の 63 チャンネル同時に記録した。同時に隣接切片を染色し、解剖構造と重ね合わせて、これをもとに、脳内の微小神経回路や情報伝達を検討した。

2. ブレイン・コンピュータ・インターフェイスへの展望

2-1. ヒト運動関連野の皮質脳波解析

ヒト運動負荷時の脳波から運動企図を推定する研究は国内外に多い。しかし、精度の高い皮質脳波を用いた研究は少ない。本研究では、比較的同期的な電気活動を行う広い範囲の皮質領域と、脳機能判別性能が高い狭い皮質領域 (一次運動野) の存在が明らかになった。また、本研究で達成した $86.6 \pm 5.8\%$ の運動企図推定精度は最高峰に近く、この分野では評価が高い学術誌に成果が掲載されている (Neuroimage, 45: 1099-1106, 2009)。

2-2. ヒト言語関連野の皮質脳波解析

皮質脳波の解析から意思推定を目指す本研究は世界的にもユニークな試みである。本研究では、ヒト運動関連野皮質脳波解析と同様、比較的同期的な電気活動を行う広い範囲の皮質領域と、脳機能判別性能が高い狭い皮質領域の存在が明らかになった。すなわち、言語の形成において機能が異なる言語関連領域 (少なくとも運動性言語領域、舌・口の一次運動野、感覚性言語領域の 3 ヶ所) が共同して働くことが明かとなった¹³⁾。ヒトの複雑な高次脳機能がいかに発現するかは不明な点が多く、本研究によってこれを解き明かす革新的な成果が得られると考える。

これまでの成果により、方法論はおおむね確立した。すでに、機能的脳疾患における微小神経回路の異常が解明されつつあり、さらに、言語のような複雑な脳機能を発現するグローバルな神経ネットワークの解析も進捗している。これらの研究により、ヒトの意志決定メカニズムのような複雑な領域にも手がかりが得られるだろう。さらに、ヒト病理組織における神経回路応答により、脳機能性疾患の病態が明らかにされ、新しい治療法の開発も期待される。

§4. 成果発表等

(4-1) 原著論文発表

●論文詳細情報

1. K. Sasagawa, Masahiro Mitani, T. Sugiyama, T. Noda, T. Tokuda, J. Ohta, "Implantable Image Sensor with Light Guide Array Plate for Bioimaging," *Jpn. J. Appl. Phys.*, **49** 04DL03 (4 pages), 2010. DOI: 10.1143/JJAP.49.04DL03
2. A. Tagawa, M. Mitani, H. Minami, T. Noda, K. Sasagawa, T. Tokuda, J. Ohta, "CMOS-based multimodal sensor for in vivo brain function imaging with a function for simultaneous cell stimulation," *Jpn. J. Appl. Phys.* **49**, 04DL02 (4 pages), 2010. DOI: 10.1143/JJAP.49.04DL02
3. A. Tagawa, M. Mitani, H. Minami, T. Noda, K. Sasagawa, T. Tokuda, J. Ohta, "Multimodal Complementary Metal-Oxide-Semiconductor Sensor Device for Imaging of Fluorescence and Electrical Potential in Deep Brain of Mouse," *Jpn. J. Appl. Phys.*, **49** 01AG02 (5 pages), 2010. DOI: 10.1143/JJAP.49.1AG02
4. T. Kobayashi, A. Tagawa, T. Noda, K. Sasagawa, T. Tokuda, Y. Hatanaka, H. Tamura, Y. Ishikawa, S. Shiosaka, J. Ohta, "Potentiometric Dye Imaging for Pheochromocytoma and Cortical Neurons with a Novel Measurement System Using an Integrated Complementary Metal-Oxide Semiconductor Imaging Device," *Jpn. J. Appl. Phys.*, **49**, 117001 (7 pages), 2010. DOI: 10.1143/JJAP.49.117001
5. S. Shishio, Y. Oguro, T. Noda, K. Sasagawa, T. Tokuda, J. Ohta, "CMOS Imaging Device for Optical Imaging of Biological Activities," *IEEEJ Trans. EIS*, **131** (1), 76-82, 2011. (DOI: 10.1541/ieejtrans.131.76)
6. Attwood B B.J.-M., Patel S, Mucha M, Schiavon E, Skrzypiec A, Young K, Shiosaka S, Korostynski M, Piechota M, Przewocki R, Pawlak R, Neuropeptide cleaves EphB2 in the amygdala to control anxiety. *Nature*, in press, 2011, (DOI: 10.1038/nature09938).
7. Shingaki K., Matsuzaki S., Taniguchi M., Kubo T., Fujiwara T., Kanazawa S., Yamamoto A., Tamura H., Maeda T., Ooi K., Matsumoto K., Shiosaka S., Tohyama M., Molecular mechanism of kallikrein-related peptidase 8/neurokinin-induced hyperkeratosis in inflamed skin. *Br J Dermatol* 163,466-475, 2010, (DOI: 10.1111/j.1365-2133.2010.09864.x)
8. Honda N, Matuoka T, Sawada Y, Nakano N, Suwen L, Higashimoto Y, Fukuda K, Ohgi S, Kato A: Reorganization of sensorimotor function after functional

- hemispherectomy studied using near-infrared spectroscopy: a case report. *Pediatric Neurosurgery* 46:313-317 2010(DOI: 10.1159/000321595)
9. Sanada Y, Iwaisako K, Kamiyama H, Yoshimine T, Kato A: Bonnet Bypass to Proximal Trunk of Middle Cerebral Artery with a Radial Artery Interposition Graft: Technical Note. *Minim Invas Neurosurg* 53: 203-206, 2010 (DOI: 10.1055/s-0030-1263109)
 10. Okuda T, Kataoka K, Kato A. Training in endoscopic endonasal transsphenoidal surgery using a skull model and eggs. *Acta Neurochir (Wien)*. 152:1801-1804, 2010 (DOI: 10.1007/s00701-010-0728-0)
 11. Okuda T, Kataoka K, Yabuuchi T, Yugami H, Kato A. Fluorescence-guided surgery of metastatic brain tumors using fluorescein sodium. *J Clin Neurosci*.17:118-121, 2010 (DOI: 10.1016/j.jocn.2009.06.033)
 12. 池田純起, 柴田智広, 露口尚弘, 中野直樹, 原嘉信, 岡田理恵子, 池田和司, 加藤天美: ヒト皮質脳波からの黙読母音の判別に関する研究. 電子情報通信学会技術研究報告. NC, ニューロコンピューティング 110: 45-50, 2010-07-20
 13. 大塚頌子, 赤松直樹, 加藤天美, 木下真幸, 久保田英幹, 小西徹, 笹川睦男: 日本におけるてんかんの実態 日本のてんかん患者数の推定. てんかん研究. 27: 408-411, 2010
 14. 大塚頌子, 赤松直樹, 加藤天美, 木下真幸, 久保田英幹, 小西徹, 笹川睦男: 日本におけるてんかんの実態キャリアオーバー患者の問題. てんかん研究. 27: 402-407, 2010
 15. S. Shishido, K. Kagawa, K. Sasagawa, T. Tokuda, J. Ohta, "A low-voltage CMOS image sensor using a pulse-width-modulation scheme for biomedical applications," *Jpn. J. Appl. Phys.*, **48** (4), 04C193-1-5, 2009. DOI: 10.1143/JJAP.48.04C193
 16. A. Tagawa, A. Higuchi, T. Sugiyama, K. Sasagawa, T. Tokuda, H. Tamura, Y. Hatanaka, S. Shiosaka, J. Ohta, "Development of Complementary Metal Oxide Semiconductor Imaging Devices for Detecting Green Fluorescent Protein in the Deep Brain of a Freely Moving Mouse," *Jpn. J. Appl. Phys.*, **48** (4), 04C195-1-5, 2009. DOI: 10.1143/JJAP.48.04C195

(4-4) 知財出願

- ① 平成22年度特許出願件数(国内 1 件)
- ② CREST 研究期間累積件数(国内 1 件)