

自由行動下マウスの脳神経活動計測に
向けた蛍光計測用埋植型
CMOS イメージングデバイスの
高感度化に関する研究

須永 圭紀

2017 年 3 月

奈良先端科学技術大学院大学
物質創成科学研究科

目次

第 1 章 序論	1
1.1 本研究の背景	1
1.2 本研究の目的	6
1.3 本論文の構成	7
第 2 章 埋植型 CMOS イメージングデバイスを用いた神経活動計測システム ..	8
2.1 はじめに	8
2.2 埋植型イメージングデバイスの基本構成	10
2.3 これまでの埋植型 CMOS イメージングデバイス	12
2.3.1 脳表計測用イメージングデバイス	12
2.3.2 脳深部計測用イメージングデバイス	15
2.4 COMS イメージセンサ	17
2.5 イメージングデバイスの実装方法	20
2.6 イメージングシステム	23
2.7 中継基板	24
2.8 考察とまとめ	26
第 3 章 埋植型イメージングデバイス用フィルタの高性能化	28
3.1 はじめに	28
3.2 蛍光顕微鏡と埋植型イメージングデバイスの蛍光光学系の比較	29
3.2.1 蛍光顕微鏡の蛍光光学系の構成	29
3.2.2 埋植型イメージングデバイスの蛍光光学系	30
3.3 埋植型イメージングデバイスに適した光学系への改良	33
3.3.1 緑色蛍光観察用吸収フィルタの作製	33
3.3.2 自家蛍光の評価	35
3.3.3 励起フィルタの導入	36
3.3.4 励起フィルタ搭載イメージングデバイスの実装	38
3.3.5 生体模擬環境下における性能評価	40
3.3.6 <i>in vitro</i> 実験による性能評価	43
3.4 考察とまとめ	44
第 4 章 埋植型イメージングデバイスの構造最適化	46
4.1 はじめに	46
4.2 黒色遮光フィルタの開発と実装	47
4.2.1 黒色遮光フィルタの開発	47
4.2.2 脳表計測用イメージングデバイスへの遮光フィルタの実装	48
4.2.3 脳深部計測用イメージングデバイスへの遮光フィルタの実装	50

4.3	励起光除去性能評価.....	53
4.4	高感度イメージセンサの設計.....	55
4.5	考察とまとめ.....	56
第 5 章	動物実験による埋植型 CMOS イメージングデバイスの性能実証.....	59
5.1	はじめに.....	59
5.2	フラビン蛋白蛍光イメージング.....	60
5.3	蛍光顕微鏡によるフラビン蛍光イメージング実験.....	61
5.3.1	実験動物と手術.....	62
5.3.2	視覚刺激表示とイメージングデバイスの連動システム.....	63
5.3.3	フラビン蛍光反応の解析.....	65
5.4	埋植型イメージングデバイスによるフラビン蛋白蛍光イメージング実験 66	
5.5	GCaMP イメージング実験.....	70
5.5.1	GCaMP イメージング.....	70
5.5.2	実験動物と手術.....	70
5.5.3	視覚刺激表示とイメージングデバイスの連動システム.....	71
5.5.4	GCaMP イメージング実験の解析.....	72
5.6	埋植型イメージングデバイスによる GCaMP イメージング実験.....	72
5.7	行動下 GCaMP 蛍光イメージング実験.....	75
5.8	考察とまとめ.....	77
第 6 章	結論.....	79
6.1	本研究の成果.....	79
6.2	今後の展望.....	81
発表目録	83
謝辞	92
参考文献	94

第 1 章 序論

1.1 本研究の背景

科学の発展が進んだことにより，1 世紀前に比べると人類の医療は爆発的に進歩している．特に，X 線レントゲン，CT，MRI，NIRS といった画像診断装置の出現は，様々な疾患の原因の解明や早期診断を可能とする大きな足掛かりとなった [1-2]．軽度の疾患から重度の疾患まで，原因や治療方法が次々と解明されたことにより，人類はどんどん健康で長生きすることができるようになってきている．しかしながら，目覚ましい医療の発展を果たした現在においても，未だ難病と呼ばれる病気や治療方法の少ない疾患は数多く存在している [3]．これらに対する方策を発見すべく，世界中で研究が進められている [4-5]．そんな中，がんを含む様々な疾患の観察や治療が非常に困難である部位が脳である．脳は人体の中でも非常に重要で繊細な部位であるため，手足や胴体の大部分と異なり，治療や診断方法はもちろんメカニズムの解明の手法すら他の部位に比べ圧倒的に制限されている．それゆえに，脳疾患系の，特に神経疾患系の病の原因や治療法の確立は非常に困難な状況である．

脳機能のメカニズムの解明や，原因の解明されていない神経疾患系の治療法の発見のためには，脳の一部における神経活動だけでなく複数の部位における神経活動を同時に観察し，脳のネットワークを明らかにすることが重要と考えられる．MRI や超音波診断装置といった非侵襲の計測方法では，神経細胞の活動を観察するためには時間・空間分解能的に困難であることから，脳内にある程度侵襲する手法が必要となる．そのため脳神経活動そのものを計測する手法として，神経科学分野においてはかつてより神経細胞の活動電位を計測する電気生理学的手法が用いられてきた [6-9]．ミシガン電極といった多点計測を可能とする電極が開発され，複数神経細胞の同時計測が実現されるようになったが，本手法では複数神経細胞の同時計測は可能であっても細胞と細胞の関係性を明らかにするのは困難である．これに対し，遺伝子導入技術や化学試薬を用いることにより多数の細胞を同時に観察できる蛍光イメージング手法は，神経細胞同士のネットワークを観察するための非常に有効な手法と考えられる．

上記の理由から蛍光イメージングは，脳機能解明のための最も強力なツールの一つとして用いられている．この技術は，細胞や分子の応答を特異的に観察可能にする．神経科学の分野においては，実験と神経細胞の働きの関わりを実証する方法として，実験後のマウス脳を摘出し脳スライスを作成後，神経細胞の様子を観察する *in vitro* 手法が用いられてきた．神経細胞の活動計測を行う場合の蛍光

イメージングには、蛍光顕微鏡を用いるのが一般的である。蛍光顕微鏡は1光子顕微鏡と2光子顕微鏡が代表的である。どちらも装置が大きなサイズになってしまうものの、レンズやダイクロックミラー、干渉フィルタといった様々な光学素子が搭載されているため高い励起光除去性能を持ち、高感度で蛍光イメージングを行うことが可能である。また、使用する対物レンズの性能に合わせた、高い空間分解能を持つことも特徴の一つとして挙げられる。脳スライスといった動かないターゲットを対象とする場合、蛍光顕微鏡は非常に強力なツールであり電気生理学手法と合わせて数々の生理現象が解明されてきた。本手法により明らかになった事象は多々あるものの、やはり生きた生物から得られる情報とは少なからず異なる点があるはずであると、*in vivo* 環境下で神経活動を観察可能な手法が求められてきた。しかし、蛍光顕微鏡を用いて生きた動物をターゲットとする場合、測定時の制限が多く存在する。

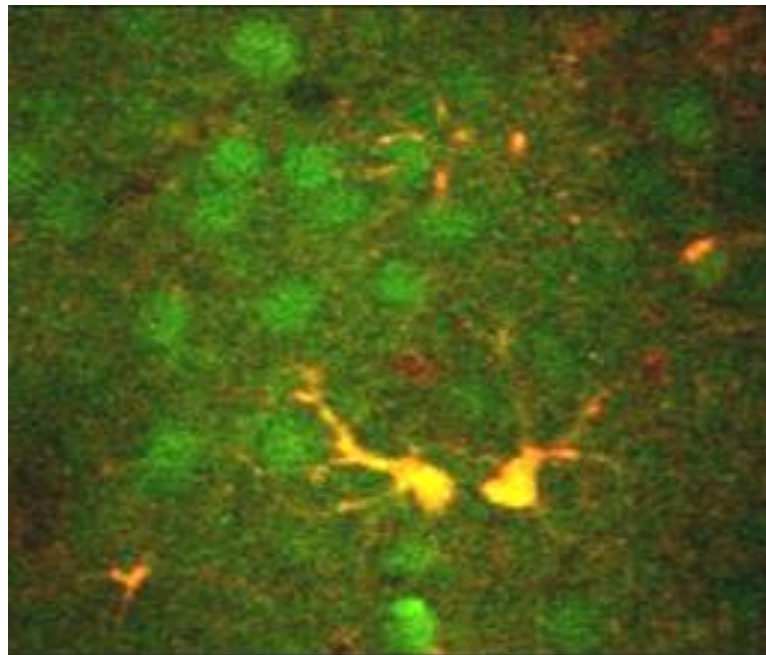


図 1-1 蛍光イメージング例



図 1-2 蛍光顕微鏡

その解決すべき課題の一つとして、蛍光顕微鏡下に動物を拘束しなくてはならないことが挙げられる[10-11]. 動物を拘束した状態での計測は、動物にストレスなどの影響を与えてしまうと考えられるうえ、実験内容も制限されてしまう[12-13]. 例えば、記憶・学習機能を解明するために、迷路を攻略させたりなどの行動実験が盛んに行われているが、このような実験を行うことは蛍光顕微鏡を用いた一般的な手法では困難である. 動物が動ける状況で蛍光イメージングを行う手法として、マウスの下に回転するボールを設置することで、疑似的に歩くことができる手法が報告されている[11]. しかし、この方法では、疑似的に歩行可能とはいえ頭部を固定されており、先ほど挙げたような行動実験を行うことができない.

このような問題を解決するため様々なイメージング手法が研究されている。例えば顕微鏡とマウス脳の間を光ファイバーでつなぐ方法[11]や、マウスの頭に搭載可能な超小型蛍光顕微鏡を用いたイメージング手法などが研究されている[14]。特に蛍光顕微鏡自体を小型化し、マウスの頭部に搭載することで行動中マウスに対する蛍光イメージングを実現することができる手法は高精度の蛍光イメージングが可能である。しかし、デバイスの重量が約 1.9g とマウスにとっては少々重くマウスの行動が制限されそうなことや、レンズやファイバーといった光学素子が脳を大きく侵襲してしまうことは解決すべき課題と言える。加えて、デバイスのサイズ、重量の観点から二か所以上の同時イメージングが困難であり、またデバイスの構成上マウス脳の水平方向のイメージングしか通常行うことができない。脳の一部における神経活動だけでなく複数の部位における神経活動を同時に観察し、脳のネットワークを明らかにするためには、小型かつ軽量で脳の複数部位を同時に観察することができるようなイメージング手法の開発が求められている。

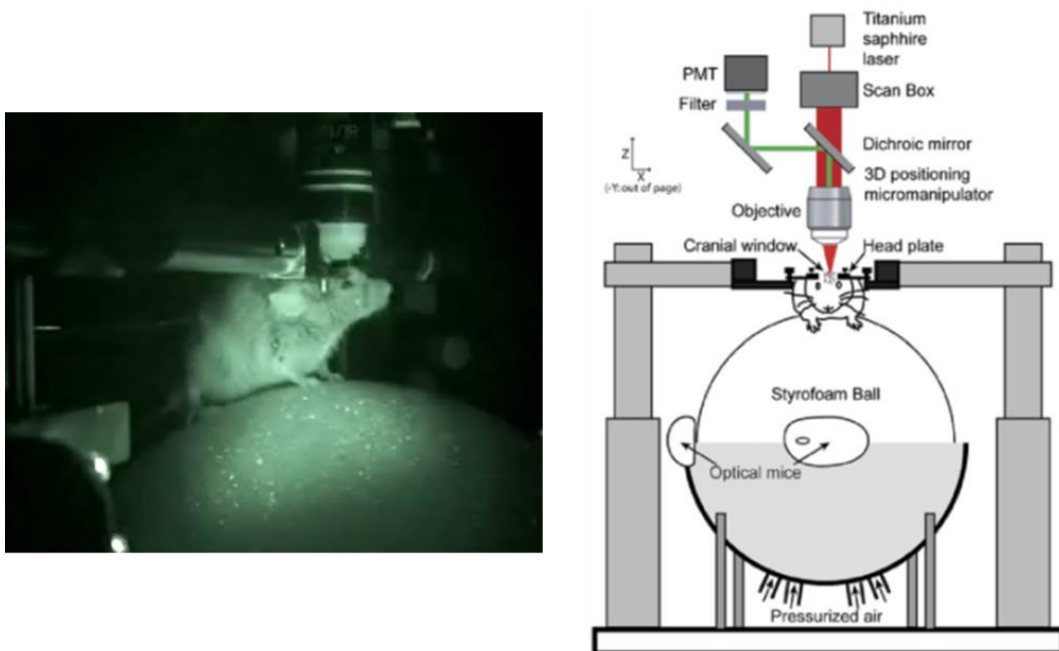


図 1-3 顕微鏡を用いた覚醒下における脳機能イメージング[13]

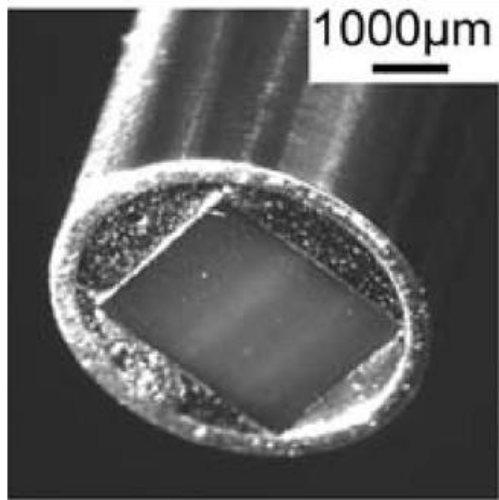
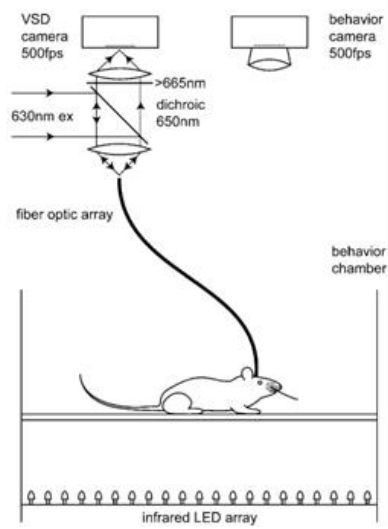


図 1.4 光ファイバーを用いた自由行動下の脳機能イメージング[11]



図 1.5 小型顕微鏡を用いた自由行動下の脳機能イメージング[14]

1.2 本研究の目的

本研究では、マウスやラットといった小動物の自由行動下脳神経活動計測を可能とする、埋植型イメージングデバイスの開発を行う。特に、遺伝子改変技術や蛍光指示薬と組み合わせることで可能となる、蛍光イメージングに適した埋植型イメージングデバイスの開発を目的とする。脳表を観察するための広範囲観察用イメージングデバイスと、脳深部を観察するための刺入型イメージングデバイスのそれぞれの開発を行う。

本研究で開発する埋植型イメージングデバイスは、小動物の脳内に埋植可能なほど小型かつ軽量であることが求められる。さらに、蛍光イメージングを行うためには最低でも撮像素子、蛍光を発現させるための励起光源、励起光を除去し蛍光のみを観察するためのフィルタを搭載することが必要となる。そこで本研究では、小動物の脳神経活動イメージングのためにセンサチップの設計から励起光源となる小型 LED やフィルタの実装、システム構築までフルカスタマイズで開発を行った。

まず撮像素子にはデジタルカメラや携帯電話のカメラによく使用される CMOS イメージセンサを、観察する脳の部位や測定ターゲットに合わせて専用設計することで小型化を実現した。

また、蛍光イメージングにおいては蛍光と励起光を高い除去比で分別することが必須となる。埋植型デバイスにおいては小型化が求められるため、本研究では神経活動計測において有用性の高い緑色蛍光計測を中心に、埋植型デバイスに適した蛍光光学系を確立し、蛍光計測の高感度化を目指した。

さらに、開発した埋植型イメージングデバイスを用いて生体模擬環境や *in vitro* 及び *in vivo* 条件下において蛍光イメージング実験を行い、実際にマウス脳における脳神経活動に伴う蛍光イメージングが可能であることを実証する。

1.3 本論文の構成

以下に本論文の構成を示す。

第2章では、まず、埋植型イメージングの原理および手法について説明し、一般的な蛍光顕微鏡を用いた蛍光イメージングの特徴について解説する。さらに、これまでに提案された埋植型イメージングデバイスの概要を説明し、解決すべき課題を明確にする。

第3章では、GFPといった緑色蛍光の観察を目的とし、励起光と蛍光を高精度に識別を可能とする高性能吸収フィルタを開発し、各フィルタの作製・実装方法と特性評価結果を報告する。本章で説明する開発したGFP計測用の高性能フィルタ搭載埋植型イメージングデバイスは、2つの吸収フィルタを搭載している。1つ目は、励起光を除去し蛍光を透過させる蛍光フィルタ、2つ目は励起光源であるLEDの不要波長成分を除去するための励起フィルタであり、この2つのフィルタを組み合わせることでGFP蛍光の観察を達成している。

第4章では、埋植型イメージングデバイスにおける高感度蛍光検出に向けて、埋植型イメージングデバイスの構造最適化について説明する。埋植型イメージングデバイスは小型であるため、限られた空間に最適な光学系を構築することを試みた。本章では特に、考案した側面遮光フィルタの導入及び側面遮光フィルタの特性評価結果、高感度イメージンセンサの設計報告する。

第5章では、第3章から第4章で提示したデバイスを用いて実際に神経活動計測が可能か *in vivo* 蛍光イメージング実験を行ったデバイス性能実証について報告する。動物実験を行うための全体の実験系について提示した後、各実験における蛍光イメージング結果を解説する。

最後に、第6章では、各章の総括を行い、残された課題について議論し、今後の展開について述べる。

本研究における動物実験は、奈良先端科学技術大学院大学及び生理学研究所の動物実験等の実施に関する規程に準拠して行った。

第 2 章 埋植型 CMOS イメージングデバイスを用いた神経活動計測システム

2.1 はじめに

本研究で開発する埋植型イメージングデバイスは、マウスやラットといった小動物の自由行動下における脳神経活動計測の実現を目指している。マウスやラットは取り扱いや飼育が容易であること、繁殖の期間が短いこと、様々な病気や疾患のモデル動物が既に多く存在することから、脳神経科学の分野では一般的に実験に用いられている。前述したとおり、神経活動に伴う蛍光イメージングは蛍光顕微鏡を用いて拘束下で行うのが一般的であり、マウスやラットに対する自由行動下計測を行うことは困難である。

この問題に対し、マウスの頭部に直接搭載可能な超小型顕微鏡が開発されている[14]。このようなデバイスを用いることにより、行動実験下マウスに対し脳神経活動に伴う蛍光イメージングにも成功しているが、重量が約 1.9 g である。本研究では、ラットよりも小さなマウスを中心に動物実験を行うことを想定しており、成体でおよそ 20~30g のマウスに対して使用することを考えると、体重に対し約 1/10~1/15 の重量のデバイスでは十分に小型・軽量化できているとは言い難い。

そこで所属研究室ではマウス脳に直接埋植可能な超小型 CMOS イメージングデバイスの開発に取り組んできた[15-19]。埋植型イメージングデバイスを搭載したマウスの様子を図 2-1 に示す。本手法を用いることで、多少マウス脳を侵襲するものの、自由行動下でも蛍光イメージングを行うことが可能となる。2 部位同時イメージングや垂直面方向のイメージングを行うことも可能である。実際に、これまでに開発した埋植型 CMOS イメージングデバイスにより、マウスの海馬における蛍光イメージングやラットの脳表における血流応答のイメージングを達成している[20-23]。

本研究は、高感度蛍光イメージングを可能とする脳表を観察するための広範囲観察用イメージングデバイスと、脳深部を観察するための刺入型イメージングデバイスのそれぞれの開発を行うことを目的とする。この目的を達成するための課題を以下にまとめる。

- マウスの脳に埋植可能なサイズであること
- マウスの行動に影響を与えない重量であること
- 脳内埋植後，生体に対し無害であること
- できる限り低侵襲であること
- 蛍光反応を高感度で検出できること

これらの課題を解決すべく，CMOS イメージセンサの設計，デバイス実装方法の確立，イメージングシステムの開発を行った．

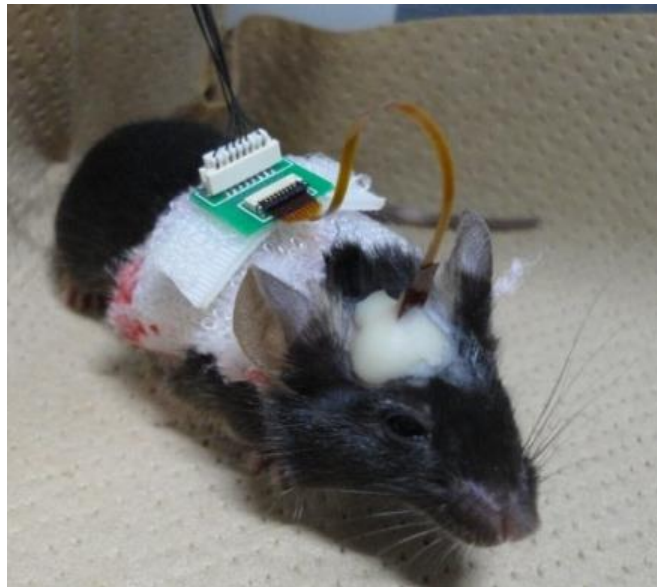


図 2.1 埋植型イメージングデバイスによる自由行動下の脳機能イメージング

2.2 埋植型イメージングデバイスの基本構成

本研究で開発する埋植型 CMOS イメージングデバイスは、マウス脳に埋植可能なサイズであり、また脳に対する侵襲性も低いことが求められる。これに対し、所属研究室では CMOS イメージセンサを基盤とした、超小型埋植型イメージングデバイスの開発に取り組んできた。ここでは、本デバイスの基本構成について説明する。

埋植型イメージングデバイスには、イメージングを行うための撮像素子、蛍光を発現させるための励起光源、励起光を除去し蛍光のみを観察するためのフィルタが最低限必要となる。図 2.2 に埋植型イメージングデバイスの基本構成を示す。

まず、撮像素子には脳表計測用、脳深部計測用といったように、測定部位に合わせ専用設計した小型 CMOS イメージセンサを用いている[24-25]。様々な種類のセンサを自分たち自身で設計することで、用途に応じた使い分けが可能となる。続いて、励起光源には微小 LED チップを採用している。観察したい蛍光反応に合わせた波長を持つ LED を選択し、イメージセンサ周辺に配置することでイメージセンサ撮像領域周辺の蛍光を発現させることが可能である。蛍光反応を観察するためには、この LED から発せられる励起光を除去し、蛍光のみを透過させる蛍光フィルタが必要となる。埋植型イメージングデバイスにおいては、蛍光フィルタを CMOS イメージセンサの撮像面上に直接搭載する手法を採用している。これらの素子を、ポリイミドを主材料とするフレキシブル基板上に実装することで、埋植型イメージングデバイスを用いて蛍光イメージングを行うことが可能となる。さらに、生体適合性及び防水性を向上させるため、約 5 μm 厚のパリレン膜のコーティングを施している。これにより *in vivo* 及び *in vitro* 環境下でも問題なく実験を行うことが可能である。

一般的なデジタルカメラや蛍光顕微鏡では、レンズ等の光学素子を用いて撮像領域上に結像された画像を取得している[26]。しかし、埋植型イメージングデバイスにはレンズといった光学系は搭載していない。これは、光学素子を搭載しないことでデバイスサイズの増大を防ぎ、デバイスの重量及び脳内埋植時の侵襲性の増大を防ぐためである。レンズを搭載していないため、埋植型イメージングデバイスはコンタクトイメージング手法である。コンタクトイメージング手法は撮像面に近いほど空間分解能が高く、撮像面から離れるほど空間分解能が落ちてしまう手法である。本研究室で開発してきた埋植型イメージングデバイスでは、およそ 200 μm 離れた位置までの光検出が可能である。レンズを搭載しないことによる空間分解能のデメリットはあるものの、埋植型イメージングデバイス単体の重量はわずか 0.02g と成体マウスのおよそ 1/1000~1/1500 の重量であり、マウス脳

に埋植可能かつ行動を抑制しない重量という条件を満たしたデバイスを実現している。

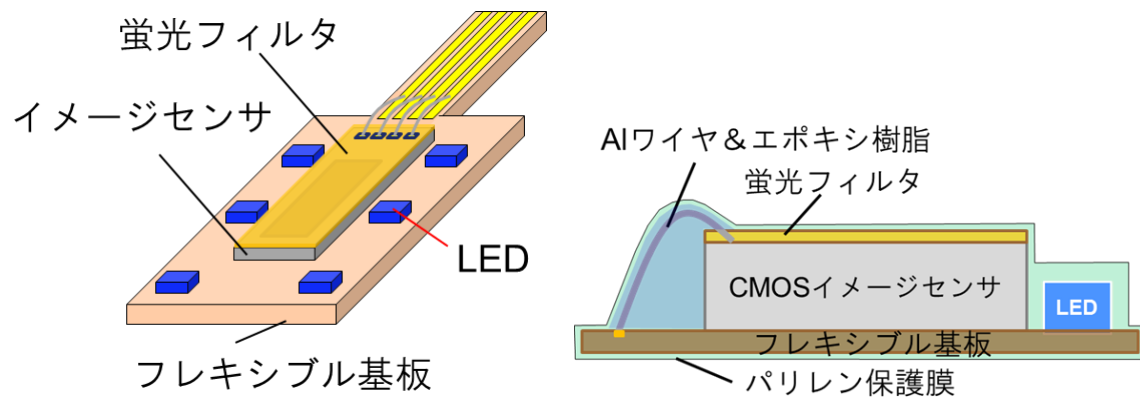


図 2.2 埋植型イメージングデバイスの基本構成

2.3 これまでの埋植型 CMOS イメージングデバイス

2.2 に記した通り，CMOS イメージセンサチップに励起光源と蛍光フィルタを統合することにより，単一デバイスでマウス脳に対し蛍光イメージングを行うことが可能となる．これまでに所属研究室では，測定ターゲットや測定部位に合わせて，様々なタイプのイメージングデバイスを開発してきた．開発してきたデバイスは，主に2種類のサイズに分類される．脳表の広範囲を観察するための脳表計測用イメージングデバイスと，脳深部を観察するための針のような形状のイメージングデバイスである．ここでは本研究に用いたイメージセンサを例に挙げ，脳表計測用イメージングデバイスと脳深部計測用イメージングデバイスについて，それぞれ説明する．

2.3.1 脳表計測用イメージングデバイス

大脳皮質の広範囲を同時に観察することは，高次脳機能を調べるうえで非常に有用である．例えば，大脳皮質に存在する視覚野においては，左右のどちらの目から光情報を得たかにより，脳の反応する部位が微妙にずれることなどが知られている[27]．大脳皮質には他にも感覚野，運動野，聴覚野などが存在しており，これらの部位を同時に観察しながら様々な条件下で実験を行うことで，これまでに多くの脳機能が解明されてきた．このように，大脳皮質の脳機能計測をするにあたり，広い領域を同時に観察可能なことは大きな利点となる．

上記の理由から大脳皮質における脳機能イメージングを行う場合，埋植型イメージングデバイスにおいても撮像領域を広くとることが効果的だと考えられる．そこで本研究においては脳表計測用のイメージセンサとして， $1\text{ mm} \times 2.7\text{ mm} \times 0.15\text{ mm}$ のサイズのイメージセンサを採用した．本イメージセンサの詳細は後述するが，撮像領域が $0.9\text{ mm} \times 2.01\text{ mm}$ とセンサの大半部の面積を占めており，重量も 0.05 g 以下と非常に小型かつ軽量のイメージセンサとなっている．このイメージセンサと励起光源となる小型チップLED($320\mu\text{ m} \times 280\mu\text{ m} \times 90\mu\text{ m}$)をフレキシブル基板上に搭載した．広範囲の撮像領域でも問題なく十分な励起光強度を得るために，6つまたは9つのチップLEDを搭載しており，広い撮像領域においても十分な励起光強度を得ることができるようになっている．脳表計測用広範囲イメージング用デバイスは，大脳皮質における反応を観察することが主な目的であり，大脳皮質にイメージセンサ撮像領域を密着させた状態でイメージングを行う．イメージングを行うために，骨を除去する必要はあるものの，脳組織に密着するようにデバイスを設置するだけなので，デバイスのサイズが少々大きくて

も比較的少ないダメージで広範囲イメージングが可能である．図 2-3, 2-4 に脳表計測用埋植型イメージングデバイスの写真とマウスに搭載した様子を示す．

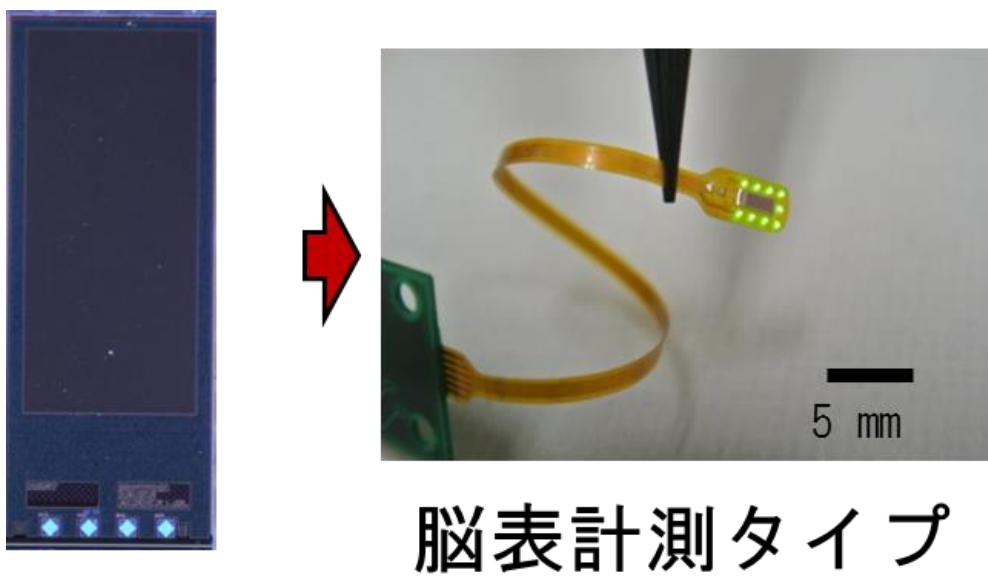


図 2-3 脳表計測用埋植型イメージングデバイス

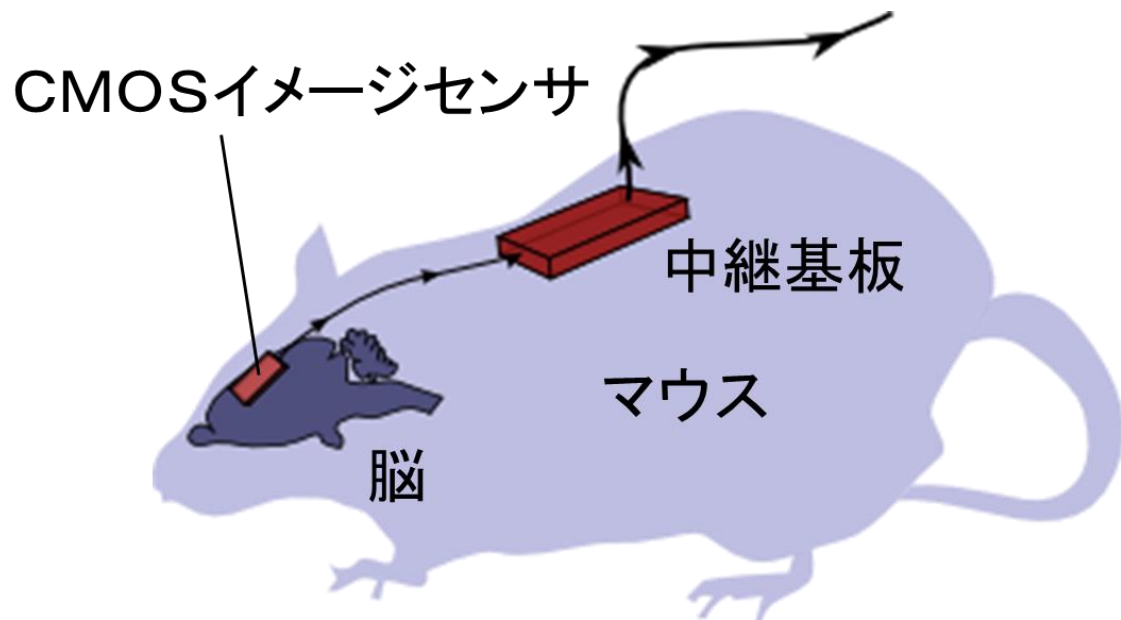


図 2-4 脳表計測用埋植型イメージングデバイスの埋植イメージ

2.3.2 脳深部計測用イメージングデバイス

脳の記憶・学習メカニズムは、成長や感情など、様々な要因に応じて変化する。例えば、強い感情に伴う出来事は記憶に残りやすいことが知られている。このため、脳の記憶・学習メカニズム解明のためには、長期記憶を司る大脳皮質、短期記憶を司る海馬、感情を司る扁桃体など、脳深部を含む複数の器官を同時に観察することが重要であると言える。脳神経科学研究では、マウス等実験動物の脳神経活動の計測が行われてきたが、従来のイメージング手法による脳深部の神経活動計測は侵襲性が高く、特に複数部位のリアルタイムイメージングを行うことは困難である。そこで低侵襲に特化した脳深部計測専用のイメージングデバイス開発し、自由行動下マウスの脳深部複数部位同時イメージングを可能とするデバイスを実現すれば、感情に伴う記憶・学習機能解明に向けた強力なツールになると考えられる。

上記のような理由と脳深部観察用イメージングデバイスは、脳に直接刺入して用いるためデバイスであるため、体積をなるべく小さくすることが求められる。そこで、脳表計測用のイメージセンサと異なり、最低限必要な撮像領域だけを確保した超小型イメージセンサを採用している。ターゲットとなる部位によるが、どのチップサイズは約 $0.5\text{ mm} \times 3\text{ mm} \times 0.15\text{ mm}$ であり、撮像領域は $0.3\text{ mm} \times 0.9\text{ mm}$ 程である。可能な限りデバイスサイズを小型に留めるために、励起光源となる LED は 1 または 2 つだけ搭載という最小限の構成となっている。脳深部計測用埋植型イメージングデバイスの外観を、図 2-5 にそれぞれ示す。

図 2-6 に示すように、脳深部計測用イメージングデバイスは、電気生理に用いる電極のように脳内に刺入するため、骨の一部を除去する必要はあるものの、脳表計測用イメージングデバイスを用いる手法に比べると圧倒的に手術範囲が狭く、最小限の侵襲で脳深部計測を行うことが可能である。

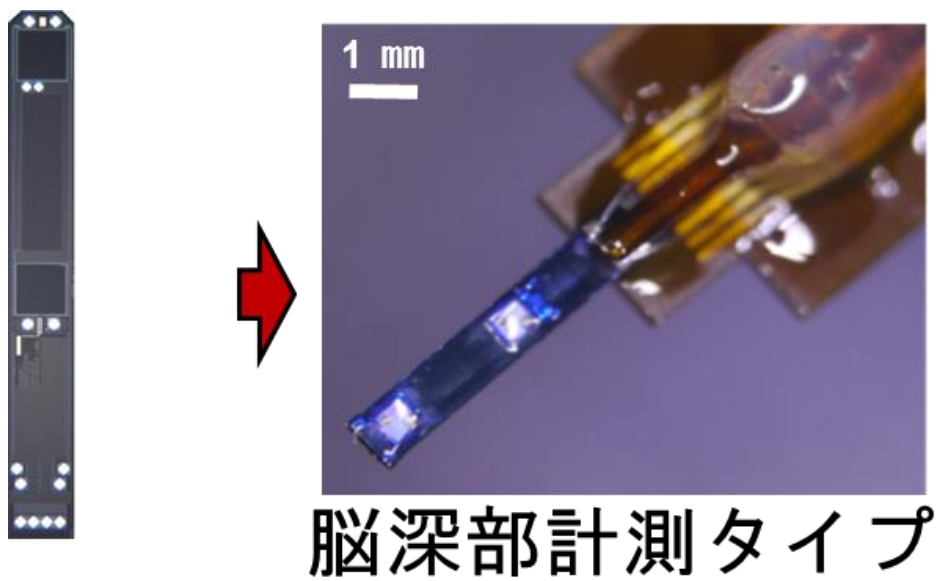


図 2-5 脳深部計測用埋植型イメージングデバイス

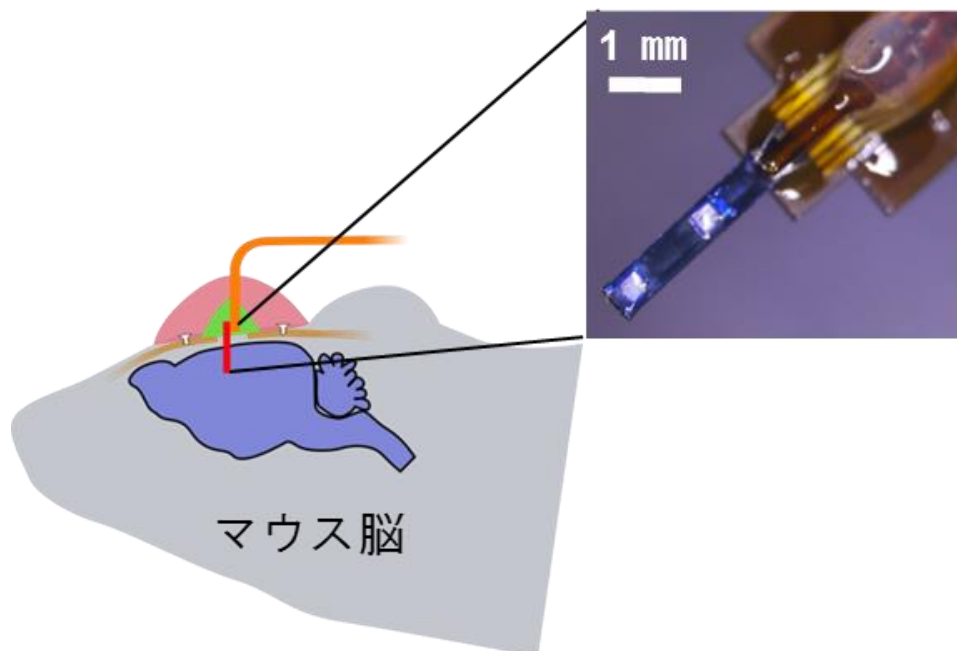


図 2-6 脳深部計測用埋植型イメージングデバイスの埋植イメージ

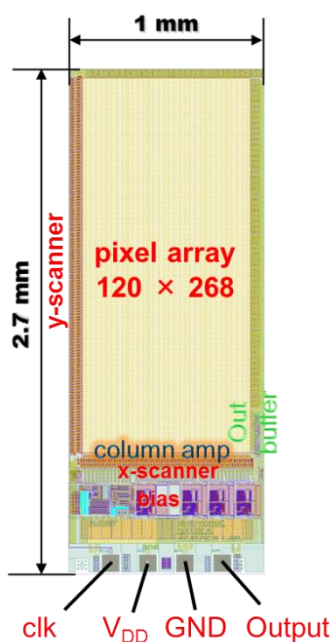
2.4 COMS イメージセンサ

本研究で用いた CMOS イメージセンサは主に AMS (Austriamicrosystems) 社 (オーストリア) の $0.35\ \mu\text{m}$ 2-poly 4-metal の標準 CMOS プロセスを用いて設計されたものである。埋植型イメージングデバイスに用いる CMOS イメージセンサは小型化が求められるため、一般的なデジタルカメラなどに搭載されているイメージセンサとは異なり最低限の回路のみで構成されている。脳表計測用と脳深部計測用のそれぞれのイメージセンサのレイアウトと主要な部分であるピクセルアレイ、カラムアンプ、X スキャナ、Y スキャナ、アウトバッファの部位を図 2-7、2-8 に示す。

脳表計測用、脳深部計測用どちらのセンサも $3.3\ \text{V}$ の単一電源で駆動し、回路構成はほぼ同一であり基本的には画素数の差がそのままサイズの差に表れている。また、センサ駆動のために配線数を増やしてしまうと、自由行動計測時にマウスの行動を制限してしまう原因となり得るため、CLK 信号、VDD、GND、出力信号の 4 配線のみで駆動可能な使用となっている。本プロセスでは nwell/psub 型フォトダイオードを用いた 3 トランジスタ型 APS (Active Pixel Sensor) 方式画素回路を採用しており、画素サイズは $7.5\ \mu\text{m}$ 角、開口率は 44% となっている。

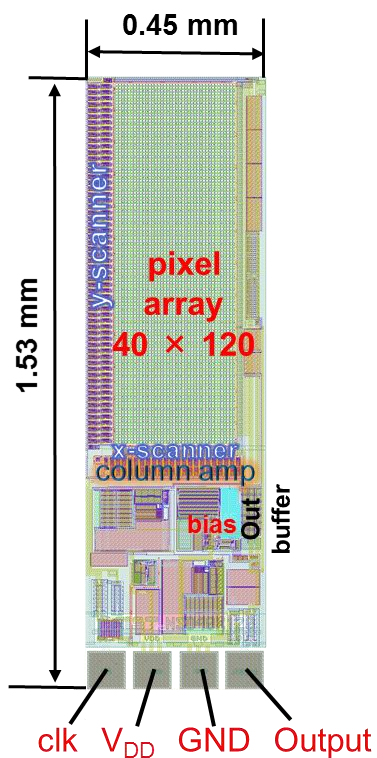
本研究では上記で紹介した過去に開発されたイメージセンサを元に、後述する改良を加えた新規イメージセンサの設計と、埋植型イメージングデバイスの開発に取り組んだ。

また、図 2-9 にセンサのブロックダイアグラムを示す。



テクノロジー	0.35 μm 2P4M 標準 CMOS プロセス
駆動電圧	3.3 V
チップサイズ	1.0 mm \times 2.7 mm
画素サイズ	7.5 μm \times 7.5 μm
画素数	120 \times 268
開口率	44%
画素タイプ	3-Transistor APS
フォトダイオード	n-well/p-sub

図 2-7 脳表計測用イメージンセンサレイアウトと諸元



テクノロジー	0.35 μm 2P4M 標準 CMOS プロセス
駆動電圧	3.3 V
チップサイズ	0.45 mm \times 1.53 mm
画素サイズ	7.5 μm \times 7.5 μm
画素数	40 \times 120
開口率	44%
画素タイプ	3-Transistor APS
フォトダイオード	n-well/p-sub

図 2-8 脳深部計測用イメージンセンサレイアウトと諸元

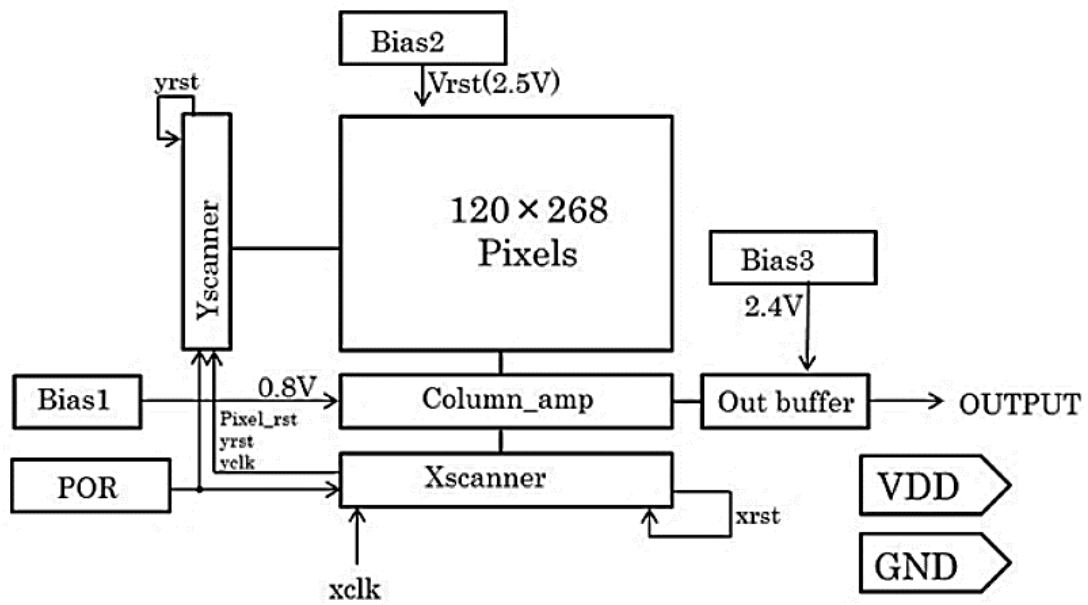


図 2.9 イメージンセンサのブロックダイアグラム

2.5 イメージングデバイスの実装方法

埋植型イメージングデバイスを作製するにあたり，フレキシブル基板上に CMOS イメージセンサチップ，小型チップ LED，蛍光フィルタといった素子の実装を行う必要がある．ここでは，それぞれの実装方法について説明する．

本研究では主に脳表計測用と脳深部計測用の 2 種類のイメージングデバイスの開発に取り組んでいるが，その実装方法は基本的に共通である．実装方法の主な工程は下記の通りである．

1. LED をフレキシブル基板上へ実装
2. 蛍光フィルタを CMOS イメージセンサ上へ実装
3. フィルタ搭載後の CMOS イメージセンサをフレキシブル基板上へ実装
4. ブラックレジストを用いた CMOS イメージセンサ側面の遮光処理
5. パリレン膜のコーティング

まず，フレキシブル基板上へ LED の実装を行う．脳表計測用デバイスには 6 つまたは 9 つの LED を，脳深部計測用デバイスへは 1 つまたは 2 つの LED を実装する．LED の実装方法は，ウェッジボンダーを用いたワイヤボンディングによる方法と，フリップチップボンダーと異方性導電ペーストを用いるフリップチップボンディングの 2 種類の方法を採用している．

ワイヤボンディングによる実装方法は比較的短時間で実装を終えることができる．しかし，複数の LED を直列に接続するため，1 か所の断線で全ての LED が点灯しなくなってしまう可能性があることや，LED の個数が増えると駆動するための電圧が大きくなっていく．一方フリップチップボンディングによる実装方法はワイヤボンディングに比べ実装にかかる時間が長くかかるが，LED を並列に接続する LED の数が増えても駆動に必要な電圧は変わらない．また，全ての LED が点灯しなくなってしまうリスクは少ないが，LED によって多少輝度のばらつきが生じる場合がある．以上の理由から，2 種類の実装方法を実験内容に合わせて選択している．

続いて，蛍光フィルタの実装方法について説明する．蛍光イメージングを行うためには，LED から発される励起光をカットし，蛍光のみを透過するフィルタが必要となる．埋植型イメージングデバイスにおいては，CMOS イメージセンサの撮像面上に蛍光フィルタを実装する方法を採用している．蛍光フィルタは，カラーレジストまたは吸収色素と樹脂を溶媒に溶かした溶液をスピコートすることで作製される．この蛍光フィルタの仕上がりは，埋植型イメージングデバイスに

おける蛍光イメージングの精度に直結する要素となる。本研究では蛍光イメージングの高感度化に向け、蛍光フィルタの新規作製に取り組んだので、蛍光フィルタの新規実装方法を含め、詳細を第3章に後述する。

蛍光フィルタを実装後、CMOSイメージセンサをフレキシブル基板上へと実装する。エポキシ樹脂を用いてCMOSイメージセンサをフレキシブル基板に接着後、ウェッジボンダーを用いてワイヤボンディングを行い接続した。ワイヤー接続後、再びエポキシ樹脂を用いてワイヤー及び接着部周辺を補強した。本工程はLEDをワイヤボンディングで接続した場合、同様の処理を行っている。

以上の工程を行った後、センサ側面にブラックレジストを用いた遮光処理を施す。側面の遮光処理を行うのは、励起光源であるLEDとイメージセンサが密接しており、LED付近の撮像領域が飽和しやすいためである。この側面からの遮光漏れも蛍光イメージングを行う上での重要な要因となるため、本研究で改善を試みている。詳細は第4章に後述する。

最後に、パリレン膜をコーティングして完成となる。埋植型イメージングデバイスはマウスの脳内に直接デバイスを埋植するため、デバイスに生体適合性及び防水性を付加することが重要となる。これらの課題に対し、我々は薄膜でも防水性を持つ無色透明なポリマーであるパリレン C (SPECIALITY COATING SYSTEMS 社) をデバイスにコーティングする手法を採用している。パリレンは生体適合材料として米国薬局方 (United States Pharmacopeia: USP) の分類IVに認定されており、埋め込み型医療機器として心臓ペースメーカー等に既に利用されている。パリレン C の屈折率が 1.639 であるのに対し、蛍光フィルタに使用されている母材 NOA63 の屈折率は 1.56 であり光の屈折の影響も微弱である。とためイメージングを行うのにも支障をきたさない。本研究では約 5 μ m 厚のパリレン膜をコーティングしている。

以上の工程により、埋植型イメージングデバイスの完成となる。完成したデバイスの写真を図 2-10 に示す。

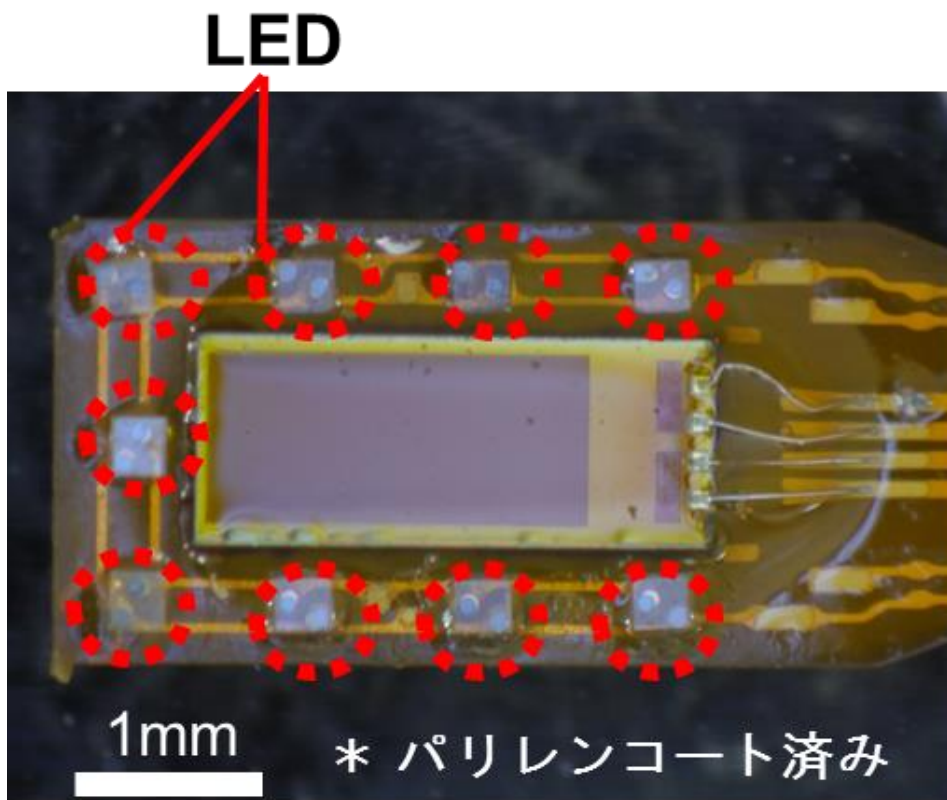


図 2-10 蛍光計測用デバイス完成写真

2.6 イメージングシステム

埋植型 CMOS イメージングデバイスを用いて脳神経活動に伴う蛍光イメージングを行うためには、デバイスだけでなくソフトウェアや制御回路を含めた実験系が必要となる。図 2-11 に埋植型 CMOS イメージングを用いた蛍光イメージングシステム全体の構造を示す。本研究手法では、埋植型 CMOS イメージングデバイスのイメージセンサや LED の実装された部分のみマウス脳内に埋植される。コネクタ部を含むそれ以外のフレキシブル基板はマウスの体外に露出させ、中継基板に接続後、CMOS イメージングデバイス用制御基板と LED 電源に接続される。イメージングデバイスの駆動制御と出力信号の画像化は PC 上の専用プログラムで操作する仕様となっている。中継基板について、次項目にて詳細を説明する。

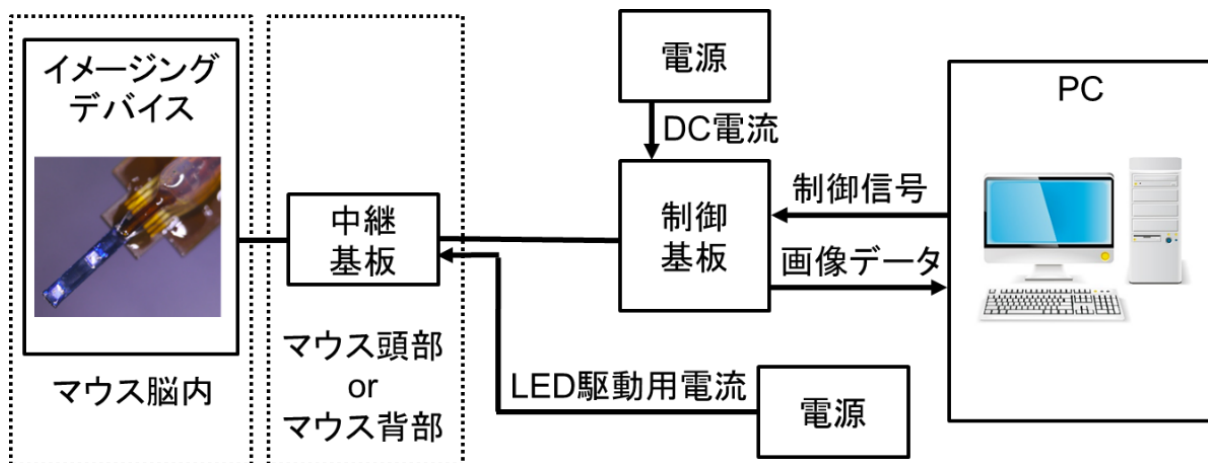


図 2-11 埋植型イメージングデバイスのシステム

2.7 中継基板

埋植型イメージングデバイスとへの信号の入出力と電源供給は、イメージセンサと LED を合わせて 6 本の配線からなっており、フレキシブル基板から制御回路へと有線で接続する必要がある。本研究では、イメージングデバイスと制御ボードの間にマウスの頭や背中に搭載できるサイズの 2 種類の中継基板を使い分けている。軽量であることを重視した端子変換コネクタのみの中継基板と、精度向上を重視しいくつかの素子を搭載した中継基板である。図 2-12, 2-13 に中継基板の写真と回路構成を示す。

軽量タイプの中継基板は、端子変換コネクタしか搭載していないためサイズ・重量が小さくマウスの頭部に固定可能であり、ほとんど行動を抑制しないメリットがある。一方、本研究で用いた CMOS イメージセンサはチップ面積を増大させないため AD コンバータを搭載しておらず、出力信号はアナログ信号である。有線でアナログ信号を伝達させる場合、自由行動下計測においては特にノイズが信号に乗りやすいと考えられ、なるべくチップと近い距離内で対処することが求められる。精度向上を重視した中継基板には、イメージセンサに入力するクロック信号用のデジタルバッファ回路、出力信号用のユニティ・ゲイン・バッファ回路、電源ラインの安定化のためのノイズフィルタが搭載されている。基板サイズが多少大きくマウスの頭部に固定するのは困難なため、マウスの背中に搭載しての使用となる。この際、マウスに基板を搭載させるためのハーネスを着用させるため、軽量タイプの基板に比べると大掛かりな様相となる。

本研究で行われた動物実験のうち麻酔下実験と自由行動実験において、上記 2 種類の中継基板を使い分け実験を行った。

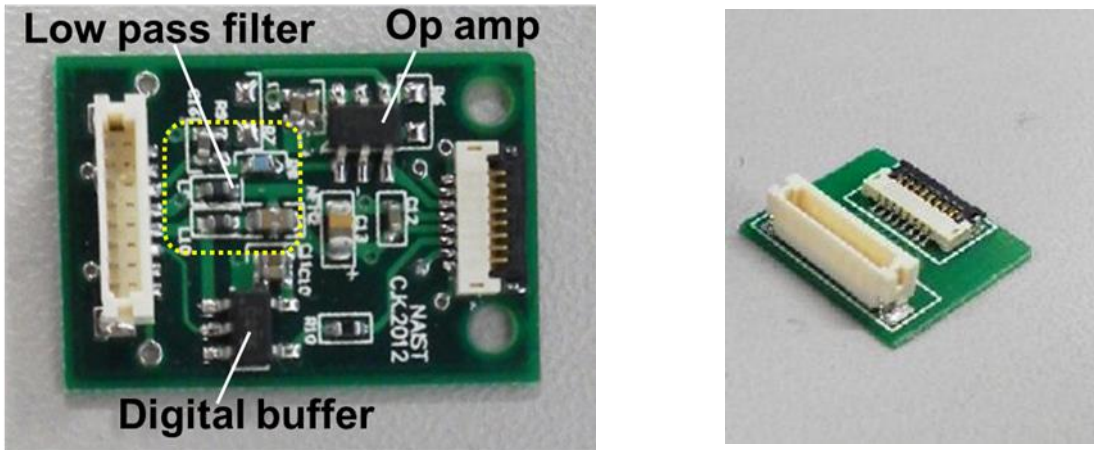


図 2-12 中継基板 (左：精度重視タイプ 右：軽量重視タイプ)

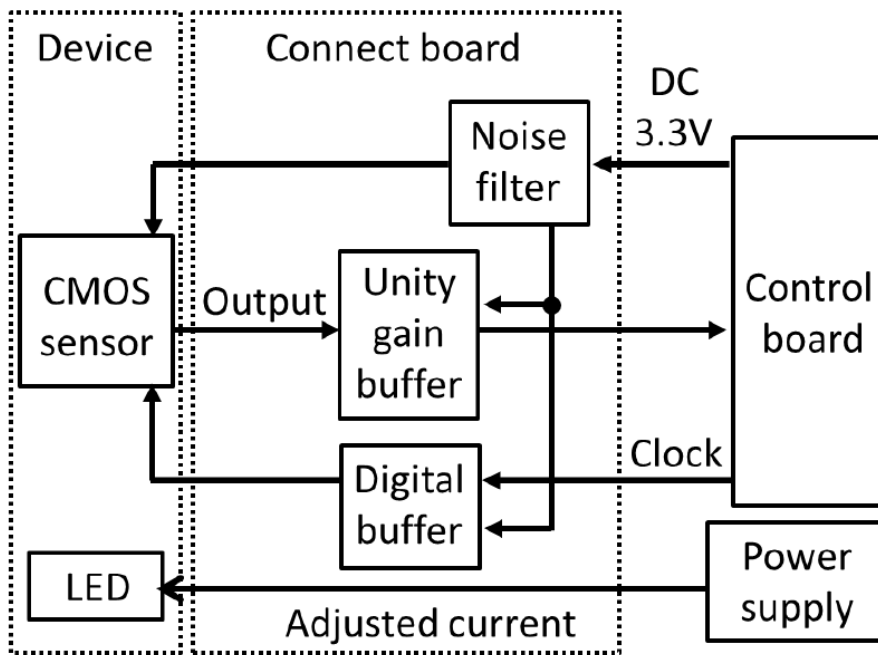


図 2-13 中継基板の回路構成

2.8 考察とまとめ

本研究では、蛍光計測を目的としたマウス脳内に埋植可能なイメージングデバイスを開発することを目的としている。脳機能イメージングに用いられる蛍光色素や内因性シグナルの輝度変化は変化率が 0.01-5%程度の物が多く、これらを観察するためには対象の輝度を計測できる感度、S/N 比と輝度付近での線形性が求められる。本論文で後述する、埋植型イメージングデバイスの性能評価実証で観察したフラビン蛋白蛍光に関しては、8 fps 程度のフレームレートがあれば十分であるため、時間分解能は開発した埋植型イメージングデバイスの仕様で十分観察可能である。また、同様に後述する実験で観察した GCaMP 蛍光についてもフラビン蛋白蛍光と同程度の反応速度であるため[28]、こちらも開発した埋植型イメージングデバイスの性能で十分観察可能であることが予想された。

一方、埋植型イメージングデバイスで観察が困難な対象として、電位感受性色素 (VSD : Voltage Sensitive Dye) といった蛍光色素を用いる手法がある[29-31]。例えば VSD の輝度変化率は 0.5%未満なうえ、求められる時間分解能が 10 ms 以下とフラビン蛋白蛍光や GCaMP に比べる厳しい条件であり、観察するためには高い時間分解能が必要となる。高い時間分解能を実現しても、1 フレームあたり露光時間が短く得られる光量が少量となってしまいうため、少ない光量でも観察できる感度と低ノイズ特性が必要となる。上記の理由から VSD を観察しようとする場合、イメージセンサの感度向上と低ノイズ特性を実現できるような改良が必須である。

埋植型イメージングデバイスによる脳機能イメージング手法では、生体埋植によるデバイスへの影響が懸念される。本研究室ではこれまでに長期間にわたる計測が可能であるか評価を行うため、実際にパリレン膜をコーティングした埋植型イメージングデバイスをマウスに埋め込み、長期埋植実験を行っている。この結果、3 か月後にもイメージングデバイスが駆動可能であることが確認され、またイメージセンサと同サイズの Si ダミーセンサを搭載したデバイスを埋め込んだマウスが 6 か月間生存可能であることが確認された。またイメージングデバイスを埋植することによるイメージングへの影響については、脳表計測用、脳深部計測用のデバイスの違いによって異なる結果が得られている。

脳表計測用イメージングデバイスではイメージングデバイスの面積分である約 4.5mm × 2.5mm の頭蓋骨を除去する必要がある。このため脳表計測用イメージングデバイスを用いる場合、実験動物の硬膜や血管が損傷しやすく、出血や結合組織の生成による影響を受けやすい。結合組織の形成は生体が持つ治癒機能の一つであり、結合組織で構成された組織が損傷すると、残存する細胞が増殖し損傷

された組織の治癒へと向かう。実際に過去にニホンザルの脳表へデバイスを埋植した実験では、術後 9 日後までは脳表の血管を撮像できていたものの、術後 14 日以降はデバイスの周囲に結合組織が形成され、血管の撮像ができなくなったという結果が得られている。

一方、脳深部計測用イメージングデバイスは細長い形状のデバイスを垂直に刺入する手法である。そのため直径 1mm 程度の円状に頭蓋骨を除去するだけで良く、頭蓋骨除去による血管や硬膜への損傷は脳表計測用デバイスに比べて圧倒的に少なく済む。本手法ではむしろデバイスを脳深部に刺入することによる出血や脳組織への損傷が懸念されるが、これまでの実験で測定部位が深ければ深いほどイメージングへの影響が少ないことが分かっている。これは、脳深部は脳表に比べて圧倒的に血管が少なく、埋植したイメージセンサ付近で血管損傷がほとんど生じないことが理由であると考えられる。デバイスを刺入する際に生じた出血や損傷した組織の一部は脳深部まで引きずり込んでしまっているようであるが、これはデバイス埋植後 3~4 日で影響が見られなくなるという結果が得られている。

これらの結果から、埋植型イメージングデバイスを生体埋植することによる影響を抑えるためには、血管と硬膜の損傷を抑え結合組織の形成を防ぐことが重要であると考えられる。

また、埋植型イメージングデバイスでは LED を励起光源として利用しているため、LED 点灯時の発熱の問題が存在する。蛍光イメージングでは励起光の強度を上げることで、蛍光をより明るく発現させイメージング感度を上げることが可能である。しかし、LED は出力を上げるに連れて発する熱量も大きくなるため、出力の上げ過ぎは脳組織への損傷の原因となりうる。また蛍光褪色の促進にも繋がってしまうため、LED の出力を上げてイメージング性能を向上させる手法はあまり有効ではないと考えられる。この問題を解決するためには、いかにイメージセンサの画素の感度や励起光除去性能を向上させることが重要となる。本研究では励起光除去性能の向上と高感度イメージセンサの設計に取り組んだので、第 3 章及び第 4 章で説明する。

第3章 埋植型イメージングデバイス用フィルタの高性能化

3.1 はじめに

序論でも述べた通り，蛍光イメージング技術は細胞や分子の応答を特異的に観察可能とするため，脳機能解明のための最も強力なツールの一つである．特に近年では，GFP トランスジェニックマウスを用いることにより，蛍光指示薬なしで脳神経活動に伴う蛍光反応を観察することが可能となっている．蛍光指示薬を何度も注入する必要がなく，マウスに対し低侵襲で測定を行うことが可能なため，長期的な測定を行うことが容易となる．これらの理由から，GFP をはじめとした蛍光イメージング技術は，脳機能イメージングといった生体イメージングにおいてますます重要な技術となってきた。

しかし，一般的な蛍光顕微鏡を用いて蛍光イメージング手法では，*in vivo* 実験において実験動物を拘束しなくてはならないことが課題である．この課題を解決するため，本研究では自由行動下計測を可能とする，埋植型 CMOS イメージングデバイスによる蛍光イメージング手法の確立に取り組んだ．本章では，埋植型イメージングデバイスを用いた蛍光イメージングの高感度化へ向けた，埋植型イメージングデバイスに適した高性能フィルタを搭載した新規デバイスの開発と評価について記す．

3.2 蛍光顕微鏡と埋植型イメージングデバイスの蛍光光学系の比較

3.2.1 蛍光顕微鏡の蛍光光学系の構成

序論で少し触れた通り、蛍光顕微鏡にはシンプルな1光子励起手法の蛍光顕微鏡と、2光子励起や3光子励起といった多光子蛍光顕微鏡という種類がある。どちらも装置が大きなサイズになってしまうものの、レンズやダイクロックミラー、干渉フィルタといった様々な光学素子が搭載されているため高い励起光除去性能を持ち、高感度で蛍光イメージングを行うことが可能である。本研究で開発する埋植型イメージングデバイスは1光子励起手法であるため、ここでは1光子励起手法の蛍光顕微鏡の光学系について説明する。図3-1に一般的な蛍光顕微鏡の光学系の構成を示す。

蛍光観察を行うためには、励起光源と励起光と蛍光をいかに高い精度で分別することができるかが1つの重要な要素となる。一般的な蛍光観察実験に用いられる蛍光顕微鏡では、高い波長選択性を有する干渉フィルタやダイクロックミラーといった光学素子を用いることで、非常に高い励起光除去性能を実現し高感度蛍光計測を可能としている。

干渉フィルタは、薄膜の界面で生じる反射光の干渉現象を利用し、特定の波長帯域のみを透過させることができるフィルタである。蛍光顕微鏡においては、主に蛍光物質の励起に必要な波長帯域のみを透過させる励起フィルタ、励起光の漏れ光などを除去し測定対象から発せられた蛍光のみを透過させる蛍光フィルタに使用されている。

ダイクロックミラーは特定の波長帯域のみ透過させ、それ以外の波長は反射させるという性質を持ち、励起光と蛍光を分離するために用いられている。図3-1中に示す通り、入射光に対し 45° の角度で配置することで、励起フィルタを透過した光はダイクロックミラーにより反射され測定対象方向へ導かれる仕組みとなっている。

またここでは詳細な説明は省くが、蛍光イメージングにおいてはイメージングに使用するカメラの性能も当然ながら非常に重要な要素である。蛍光顕微鏡と大型な高性能のカメラと組み合わせることで、より高精度な蛍光計測が可能となる。

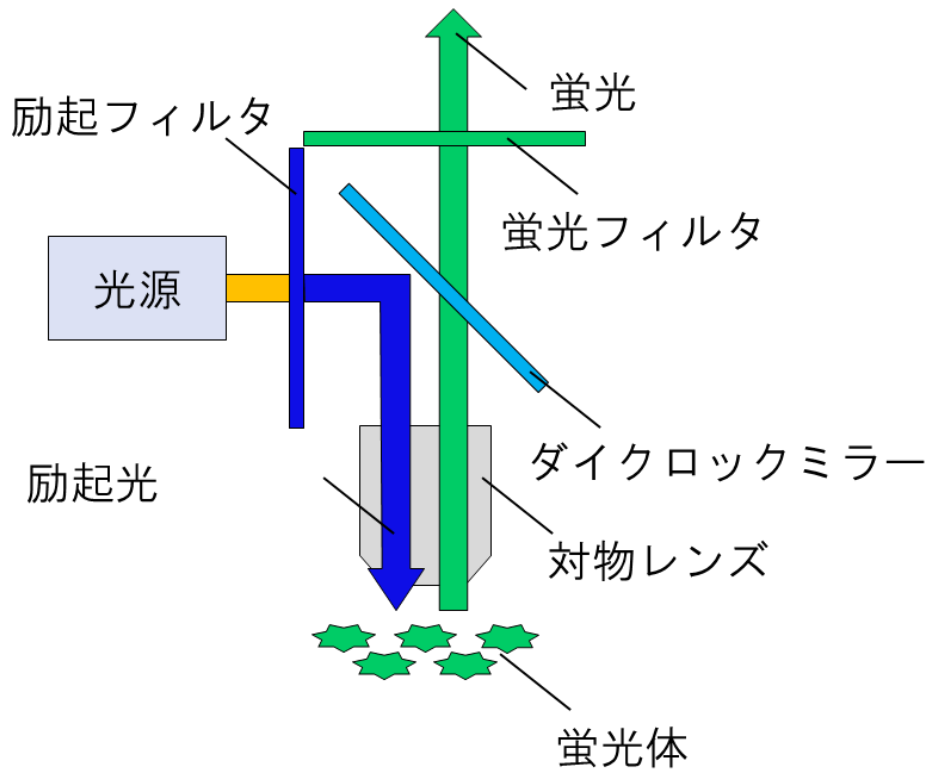


図 3-1 蛍光顕微鏡の光学系

3.2.2 埋植型イメージングデバイスの蛍光光学系

続いて、埋植型イメージングデバイスの光学系について説明する。3.2.1 に記載した通り、蛍光観察を行うためには励起光源と蛍光とを高精度で分別することが重要であり、蛍光顕微鏡では干渉フィルタやダイクロックミラーを用いることで、実現している。一方、埋植型イメージングデバイスは侵襲性の観点から可能な限り小型化することが求められるため、蛍光顕微鏡のように多種の光学素子を搭載することは困難である。そのため、これまで開発してきた埋植型イメージングデバイスの蛍光光学系は、励起光源となる LED、LED の光を除去し蛍光のみを観察するための蛍光フィルタ、CMOS イメージセンサのみで構成されていた。図 3-2 に埋植型イメージングデバイスの光学系を示す。

通常の蛍光顕微鏡で使用される優れた波長選択性を持つ干渉フィルタであるが、干渉フィルタは透過波長特性に角度依存性があるため、埋植型イメージングデバイスには適していない。これは、生体内では LED から照射される励起光が脳組織内で散乱され、様々な角度で画素領域に照射され励起光除去性能が著しく低下するためである。図 3-3 に干渉フィルタの角度依存性を表した図を示す。図 3-3 に示す通り、干渉フィルタは垂直な直射光に対しては非常に優れた波長選択性を示すが、例えば斜め

45° からの直射光に対しては透過波長帯域が大幅にずれ、励起光の大部分を透過させてしまう。この理由から、埋植型イメージングデバイスの蛍光フィルタには、吸収色素を用いて作製した吸収フィルタを採用している。吸収フィルタの角度依存性を示した図を図 3-3 に示す。図に示す通り、吸収フィルタは角度依存性を持たないため、埋植型イメージングデバイスには干渉フィルタよりも吸収フィルタが適していると言える。

しかし、吸収フィルタのみでは蛍光顕微鏡と比較してやはり蛍光光学系が不十分であり、微弱な蛍光反応の検出が困難であった。そこで本研究では、自由行動中マウス脳における蛍光反応の検出感度向上を目指し、埋植型イメージングデバイスに適した蛍光光学系について検討を行った。特に、GFP といった生体計測において有用な緑色蛍光反応を観察するのに適した埋植型 CMOS イメージングデバイスの開発に取り組んだ。

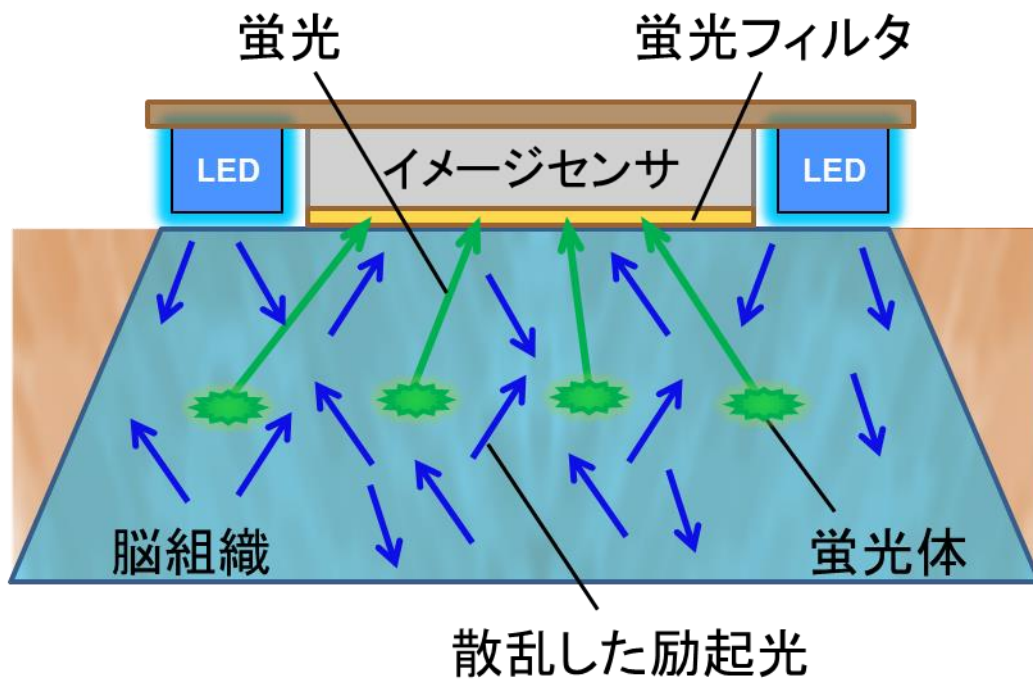


図 3-2 埋植型イメージングデバイスの光学系

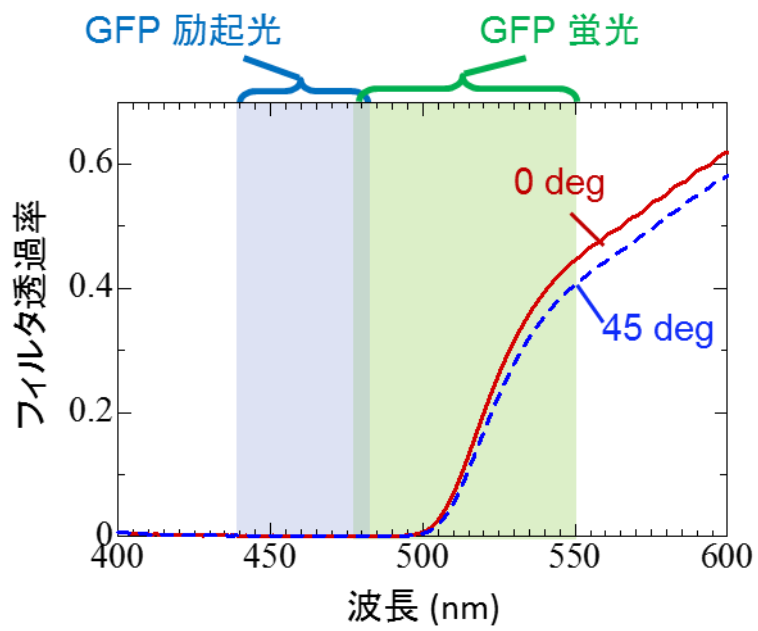
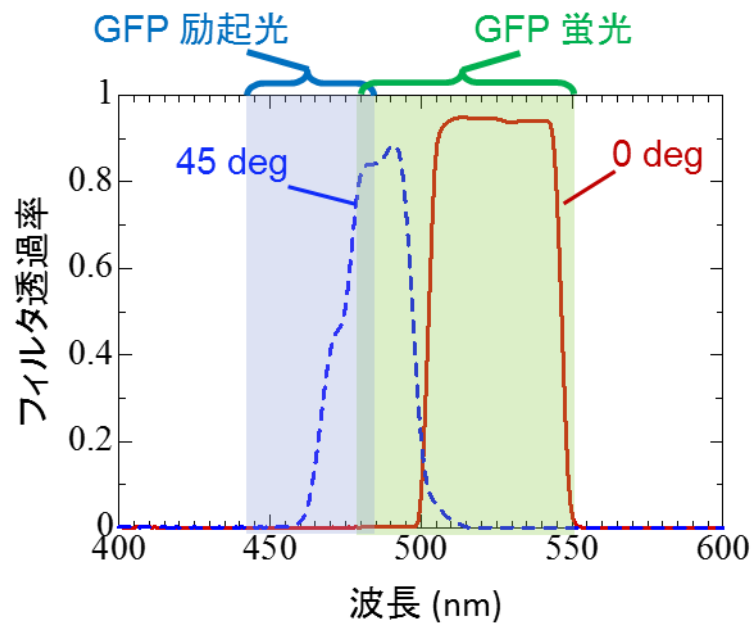


図 3-3 角度依存性評価 (上：干渉フィルタ 下：吸収フィルタ)

3.3 埋植型イメージングデバイスに適した光学系への改良

3.3.1 緑色蛍光観察用吸収フィルタの作製

3.2 に記した通り，埋植型イメージングデバイスの励起光の除去性能は，干渉フィルタを有する蛍光顕微鏡に比べ劣っており，GFP のような微弱な蛍光反応を観察することは困難であった．そこで本研究では，まず散乱光にも対応できるように，入射角に透過スペクトルが依存しない，吸収フィルタの開発に取り組んだ．GFP イメージング用の角度依存性のないフィルタを実現するため，黄色吸収色素を溶媒に溶かし，接着用の樹脂と混合した溶液を画素領域上にスピコートすることで吸収フィルタを形成した．本研究においてはまず，GFP 蛍光観察に適した黄色吸収色素の選択を行った．GFP の吸収スペクトルの中心波長は 488nm，蛍光スペクトルの中心波長は 509nm であることから，使用する吸収色素は 500nm 付近でシャープな立ち上がり特性を持つ色素が好ましい．いくつか候補となる色素を試した結果，本研究では蛍光フィルタの吸収色素として VALYFAST YELLOW 3150 (オリエント化学工業社)を採用した．VALYFAST YELLOW 3150 は，ケトン系の溶媒に対し溶解性が高く，500nm 付近において比較的シャープな立ち上りを示すことから採用した．樹脂の選択については，次項目に記す．

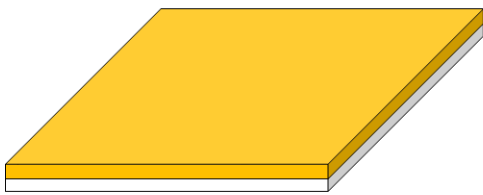
本研究で開発している埋植型イメージングデバイスを用いた蛍光イメージング手法は，レンズを用いず観察対象にデバイスを密着させるコンタクトイメージング手法である．これは，先述した通り埋植による侵襲性を低減するためである．蛍光フィルタを厚く作製してしまうと励起光除去比率は向上するものの，レンズを搭載していないため空間分解能が低下してしまう．そこで本研究では蛍光フィルタの厚みを，空間分解能を十分に保つことができるレベルの約 10 μm 厚とすることを狙いフィルタの作製を行った．

埋植型イメージングデバイスに搭載する蛍光フィルタは，平坦かつ均一な厚みのフィルタであることが求められる．開発当初は，黄色の吸収色素と樹脂を溶媒に溶かした液体をイメージセンサ上に直接スピコートし，約 10 μm に薄く平坦に引き延ばし硬化させる手法で作製した．しかし，チップサイズが非常に小さいため，画素領域上もエッジビードの影響を受けやすいという問題が見られた．また熱硬化処理の際に溶媒の一部が蒸発し，フィルタ形状が表面張力によりかまぼこ状になってしまうといった問題も見られ，平坦かつ均一な厚みの蛍光フィルタを形成することが課題となっていた．

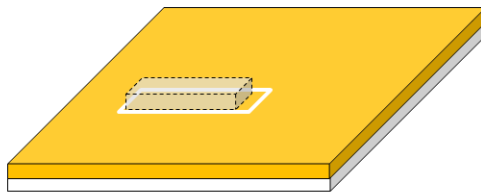
これらの課題を解決するためには，一度イメージセンサ上以外に平坦かつ均一な厚みのフィルタを作製してからイメージセンサ上に実装する方法が有効である

と考えられる．そこで本研究では新たにカバーガラス上に形成したシリコーン樹脂に1度蛍光フィルタをスピコートする手法を考案した．カバーガラスサイズのシリコーン樹脂上にフィルタをスピコートし熱硬化処理を行うことで，カバーガラス外周部には厚みにむらができるが，中央部には均一な厚みのフィルタが形成される．熱収縮の問題もフィルタの中央の平坦な部分から必要なサイズのフィルタをレーザーでカットし，イメージセンサに搭載することで，平坦かつ均一な厚みのフィルタ実装が可能となった．図 3-4 に蛍光フィルタの実装工程を示す．

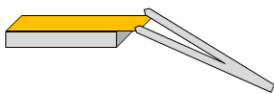
①シリコーンの上に，フィルタをスピコートし，バイクする．



②レーザーでフィルタをカット．



③フィルタをセンサ上に置く．余った部分が気になる場合，レーザーでカットする．



④真空引きしながらバイクし完成．



図 3-4 蛍光フィルタ実装手順

3.3.2 自家蛍光の評価

蛍光イメージングを行う場合、デバイスや光学系の材料に含まれる自家蛍光に注意する必要がある。微弱蛍光を観察しようとする場合に観察対象以外の物質が強い自家蛍光を発している、肝心の観察対象の蛍光観察が困難になってしまうためである。埋植型イメージングデバイスでは画素領域上に直接蛍光フィルタを搭載するため、蛍光フィルタが観察対象と同じ波長の自家蛍光を発してしまうのは大きな問題となる。そこで本研究では、蛍光フィルタに用いる樹脂について、従来使用していたエポキシ系樹脂と、新たな候補としてアクリル系樹脂について自家蛍光の評価実験を行い、埋植型デバイスに適した樹脂の選定を行った。

従来使用していたエポキシ系樹脂である SU-8 3000 (日本化薬)は比較的強く緑色の自家蛍光を発している様子が見られた。そこで本研究では SU-8 に代わる樹脂の候補としてアクリル系樹脂である NOA63 (NORLAND 社)と SU-8 を石英ガラス状にコーティングし、それぞれに中心波長 473nm の青色レーザーを照射した際の自家蛍光の強度の測定を行った。図 3-5、3-6 にそれぞれの自家蛍光の様子と強度測定結果のグラフを示す。

測定結果の写真から、エポキシ系樹脂よりもアクリル系樹脂の方が明らかに自家蛍光の強度が小さいことが見て取れる。また、測定結果のグラフからも、レーザー光の除去は完全ではないものの、NOA63 は SU-8 に対して約 1/7~1/9 の自家蛍光強度であることが見て取れる。

本実験結果より、本研究における蛍光フィルタにはアクリル系樹脂を採用することとした。

自家蛍光の低減

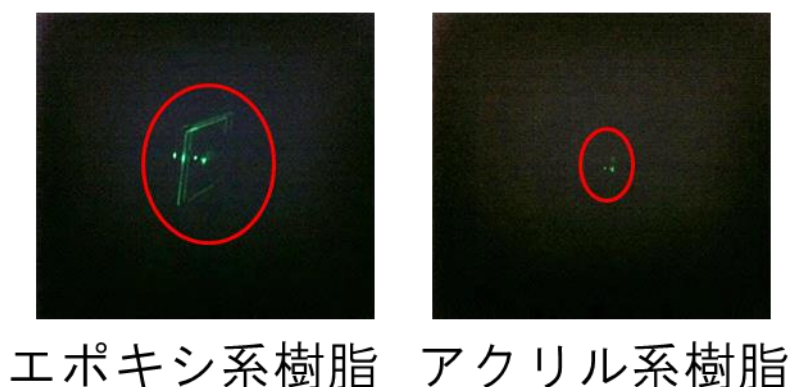


図 3-5 樹脂の自家蛍光評価

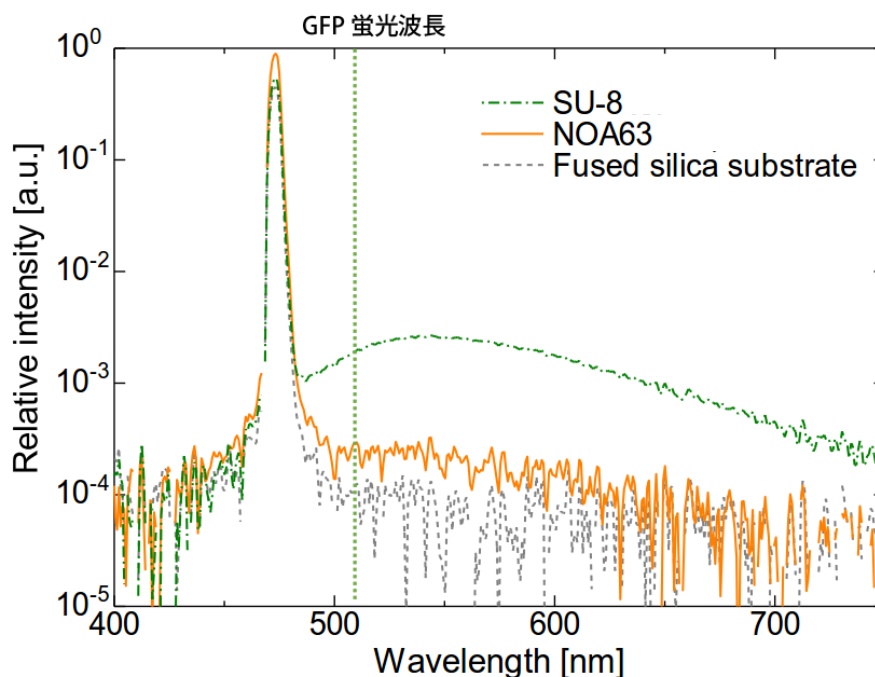


図 3-6 樹脂の自家蛍光評価

3.3.3 励起フィルタの導入

埋植型イメージングデバイスでは小型化するため、GFP イメージング用の励起光源にはチップ型の青色 LED (中心波長 470 nm) を使用している。本研究で用いている青色 LED は発光スペクトルが広く、ターゲットとしている GFP 蛍光のピーク波長(510 nm) 付近における LED の光強度が中心波長のピーク出力の 2% 以上ある。従来の埋植型イメージングデバイスにおいては、蛍光顕微鏡で用いられているような励起フィルタを搭載していなかったため、この励起光漏れが GFP 蛍光の検出の大きな妨げとなっていた。そこで本研究では、励起光源である LED の不要波長成分を減少させるため、青色 LED チップ表面上への励起フィルタの形成に取り組んだ。

本研究では、励起フィルタには青レジスト (SB-3000L, FUJIFILM ELECTRONIC MATERIALS 社) を使用し、スピコートを繰り返すことで形成した。励起フィルタではフィルタを厚くするほど不要波長成分の除去性能は向上するが、同時に主要波長成分も減少させてしまい、高い励起光強度を得ることが困難となる。本研究では GFP 観察にも用いられる市販の干渉フィルタと同程度の励起光透過率 10^{-5} という性能を、

蛍光フィルタと励起フィルタを組み合わせることで達成することを目標とし、性能達成に最低限必要な約 9 μm 厚の励起フィルタを形成することとした。

蛍光フィルタの透過率、青色 LED、励起フィルタ搭載青色 LED のスペクトル特性と GFP 蛍光の中心波長を図 3-7 に示す。LED のスペクトル測定は、LED のピーク出力強度が等しくなるように供給する電流値を設定し、測定を行った。図に示す通り、LED 表面に励起フィルタを形成したことにより、中心波長のピーク出力を 1 とした時 GFP 中心波長の 510 nm 付近の相対励起光強度が 1.4×10^{-4} から 2.2×10^{-2} まで減少していることが見て取れる。この結果から、励起フィルタを搭載することが画素領域への励起光漏れを減少させるのに有効であることを実証した。また、励起フィルタと蛍光フィルタを組み合わせることで、目標としていた励起光透過率 10^{-5} を達成した。

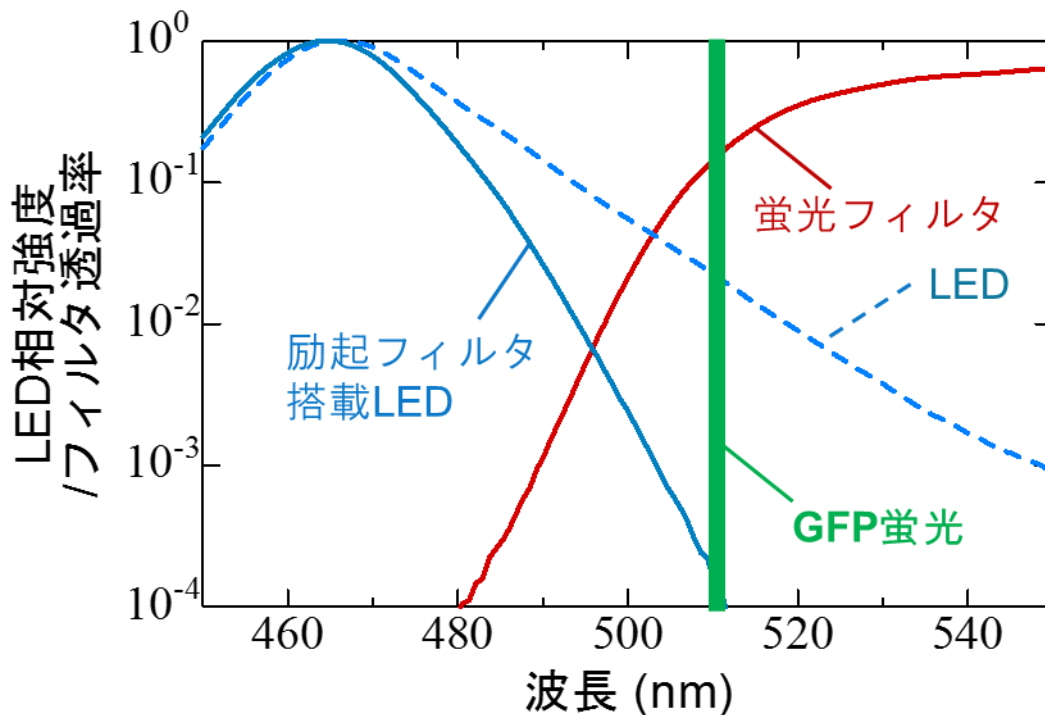


図 3-7 スペクトル特性

3.3.4 励起フィルタ搭載イメージングデバイスの実装

3.3.1～3.3.3 に記した蛍光フィルタ、励起フィルタの実装方法について説明する。これらを搭載したイメージングデバイスの実装工程を図 3-8 に示す。

まず、フレキシブル基板上へ LED の実装を行う。本イメージングデバイスにおいて LED は LED 上に励起フィルタを形成する必要があるため、フリップチップボンダーと異方性導電ペーストを用いるフリップチップボンディングの方法を採用している。LED を実装後、LED 上に励起フィルタを実装する。後にイメージセンサを設置する部分をカプトンテープで覆い、青レジストをスピニングコートすることにより励起フィルタを実装する。励起フィルタ実装後、カプトンテープを剥がし、蛍光フィルタ付イメージセンサを実装する。蛍光フィルタの実装方法については 3.3.1 に既に記載しているなのでここでは詳細を省く。

エポキシ樹脂を用いて CMOS イメージセンサをフレキシブル基板上に接着後、ウェッジボンダーを用いてワイヤボンディングを行い接続し、再びエポキシ樹脂を用いてワイヤー及び接着部周辺を補強した。

完成した GFP 蛍光検出用イメージングデバイスの写真を図 3-9 に示す。LED 表面に励起フィルタ、イメージセンサの画素領域上に蛍光フィルタが形成されている。また、イメージングデバイスに防水性および生体適合性を与えるため、デバイス全体にパリレンコーティングを施した。

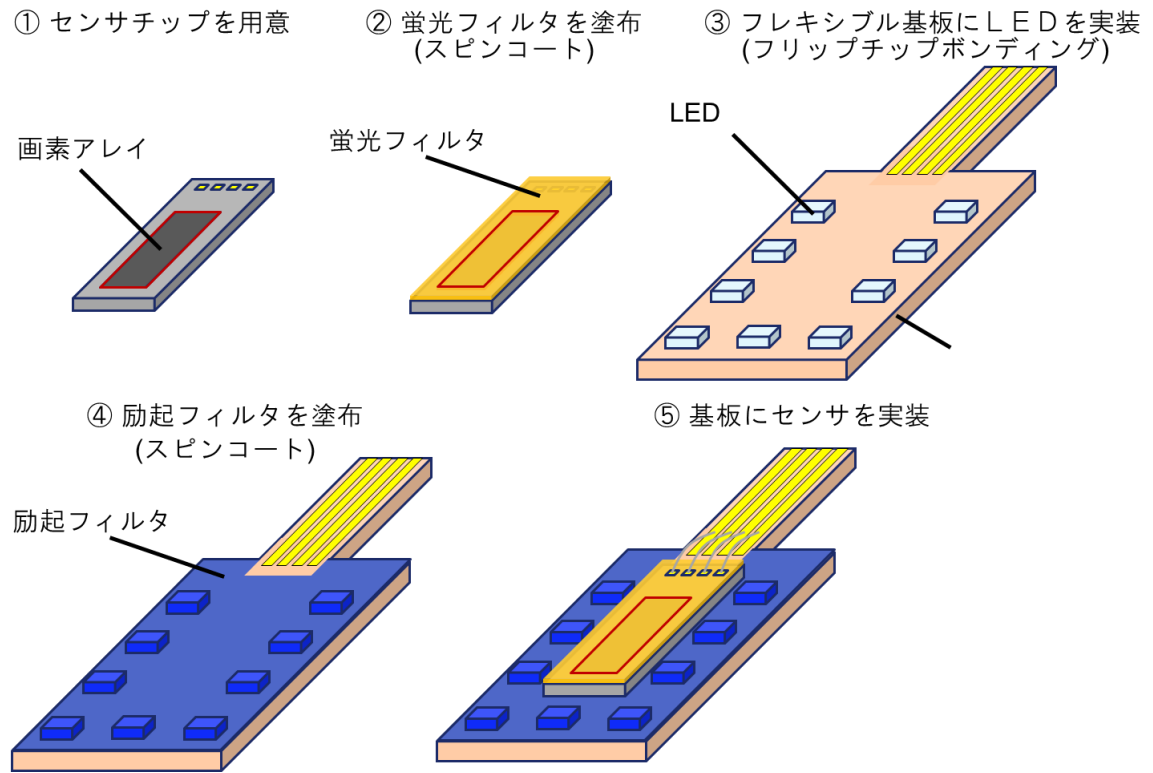


図 3-8 緑色蛍光検出用デバイスの実装工程

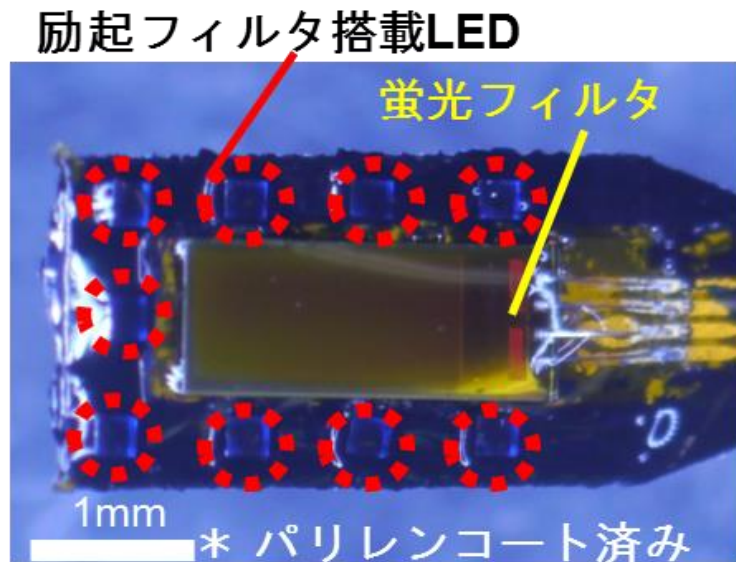


図 3-9 デバイス完成写真

3.3.5 生体模擬環境下における性能評価

開発した GFP 蛍光検出用イメージングデバイスと従来のイメージングデバイスの蛍光検出性能を比較するため、生体模擬環境下で評価実験を行った。特に、励起フィルタを搭載したことによる蛍光検出限界の向上について調べる実験を行った。

本実験では励起フィルタと蛍光フィルタを搭載したデバイスと、蛍光フィルタのみしか搭載していないデバイスを用いて、比較実験を行った。測定対象として GFP に近いスペクトル特性を持つ緑色蛍光色素 FITC-I (Fluorescein-4-isothiocyanate) を用いた。FITC-I を濁度標準液に段階希釈し、1 nM ~10 μ M の濃度の FITC-I 溶液を用意し、開発した埋植型イメージングデバイスの測定限界を調べた。実際の脳内で起こる励起光や蛍光の散乱に近い環境を作るため、溶媒には濁度標準液を用いた。また、励起光漏れによる背景光の光強度を調べるため、濁度標準液と生理食塩水の混合液を用意した。実験は、LED を点灯した状態でそれぞれのデバイスを用意した濁度標準液と生理食塩水の混合液と 1 nM ~10 μ M FITC-I 溶液に浸漬させ、検出される光強度を測定した。本実験では、イメージセンサ撮像領域上の 5 点の光強度の平均を取得し、比較評価を行った。図 3-10 に実験の様子を、図 3-11 にそれぞれのデバイスから得られた FITC-I の検量線を示す。

高濃度溶液領域では FITC-I の濃度にはほぼ従う検出値が得られており、どちらのイメージングデバイスでもほとんど違いが見られず、少なくとも 1 μ M の蛍光検出が可能であることが見て取れる。一方、低濃度溶液では検出値に励起光漏れに依存する明らかな差が生じた。まず、励起フィルタの有無により、背景光の光強度が異なることが見て取れる。この結果から励起フィルタを搭載することで、励起光漏れを低減することが実証された。また撮像領域の 5 点の光強度平均を比較すると、励起光漏れが従来のデバイスと比較し 60%程低減されるという結果が得られた。この励起光漏れを低減することができたことにより、蛍光フィルタのみを搭載したデバイスでは検出することが困難であった 10 nM の FITC-I 溶液においても、生理食塩水との混合溶液と比較して明確な輝度差の検出に成功した。この結果から、励起フィルタを搭載することで、より微弱な蛍光検出が可能であることを実証した。

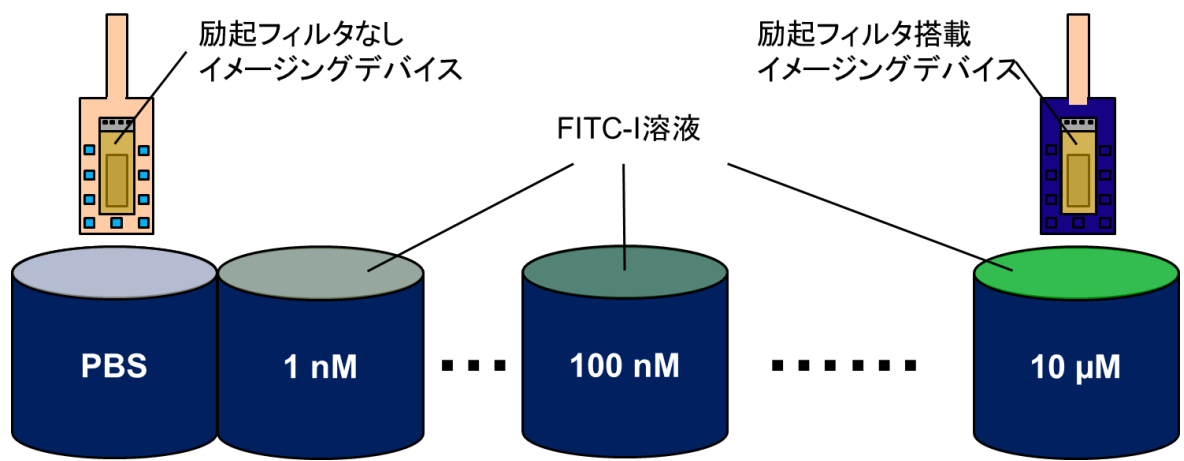
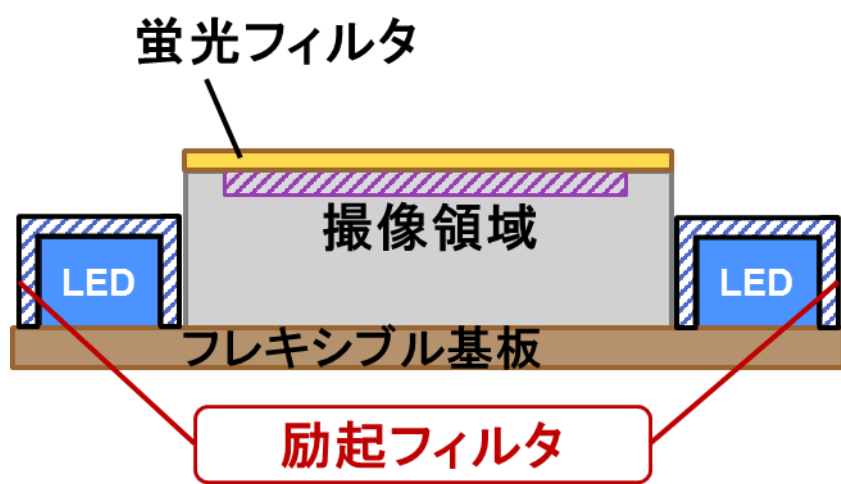


図 3-10 FITC-I 検量実験

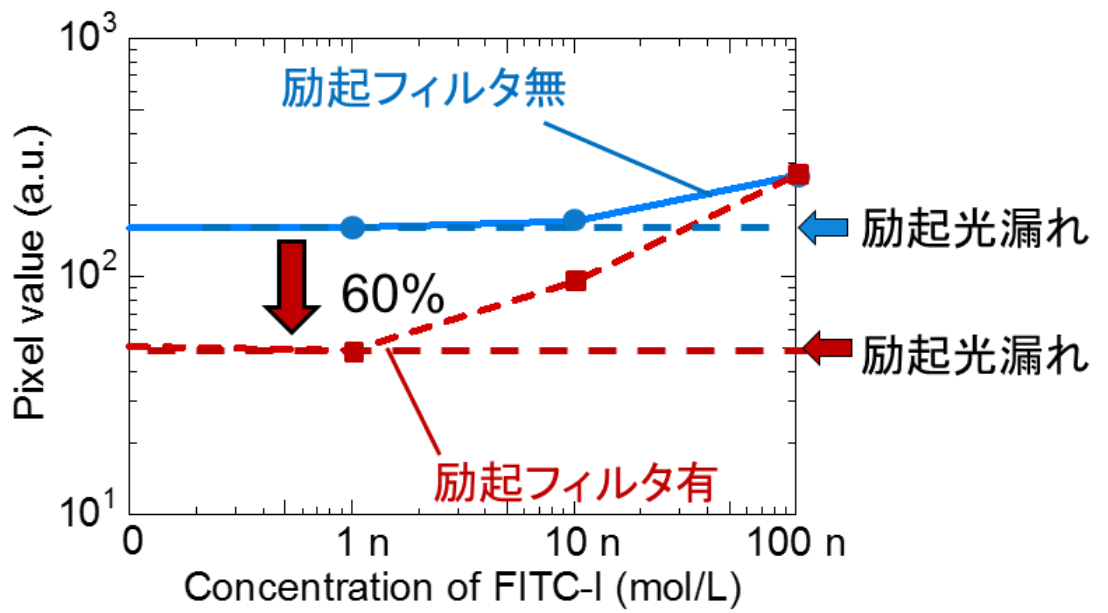
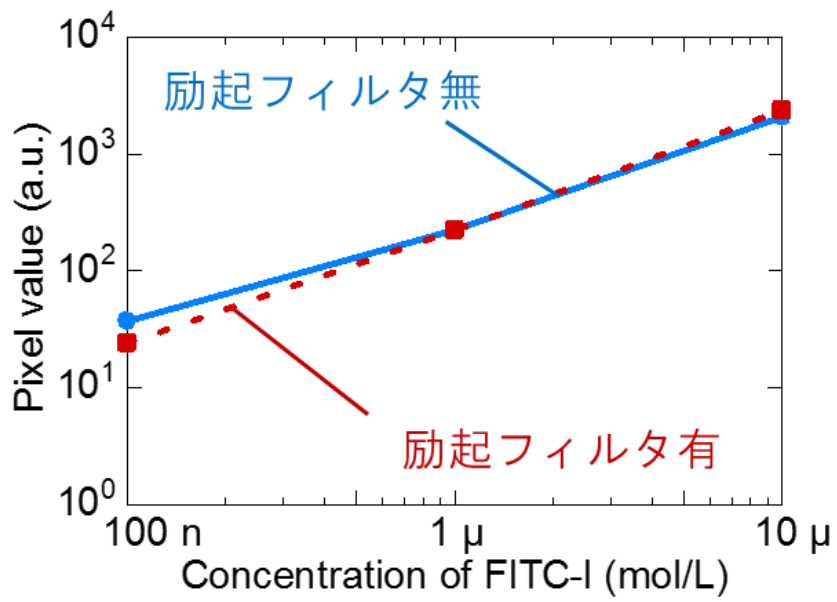


図 3-11 FITC-I 検量結果

3.3.6 *in vitro* 実験による性能評価

本研究では行動下マウスの *in vivo* GFP 蛍光イメージングを行うことを目標としているが、実際に *in vivo* 実験を行う前にまずは *in vitro* 環境下で性能評価を行うことが重要である。そこで本研究では作製したデバイスを用いて GFP 蛍光を検出可能か検証するため、GFP が発現している細胞を含むマウス脳スライスを用いて蛍光イメージング実験を行った。

本実験では、脳に含まれる海馬全体が観察可能になるよう埋植型イメージングデバイス上に脳スライスを固定し、撮像実験を行った。実験中に脳スライスが乾いてしまわないように、脳スライスの撮像部分以外は生理食塩水に浸し、常に脳スライスが十分な水分を保てる環境とした。また、本実験は蛍光顕微鏡下で行い、GFP 発現細胞の位置とイメージングデバイスの位置を同時に観察することで、GFP 発現細胞を観察できているか検証した。本実験を行った結果、励起光漏れによる影響を多少受けているものの、脳スライスに含まれる GFP 発現細胞の一部を検出することに成功した。実験の様子と取得画像を図 3-12 に示す。この結果から、開発した GFP 蛍光観察用埋植型イメージングデバイスを用いることで、当研究室の従来の埋植型イメージングデバイスでは検出することができなかった GFP 蛍光検出が可能であることが実証された。また、本デバイスを用いて行った、マウス脳大脳皮質視覚野における視覚刺激反応に伴うフラビン蛋白蛍光の強度変化の計測実験について、第 5 章で詳細を説明する。

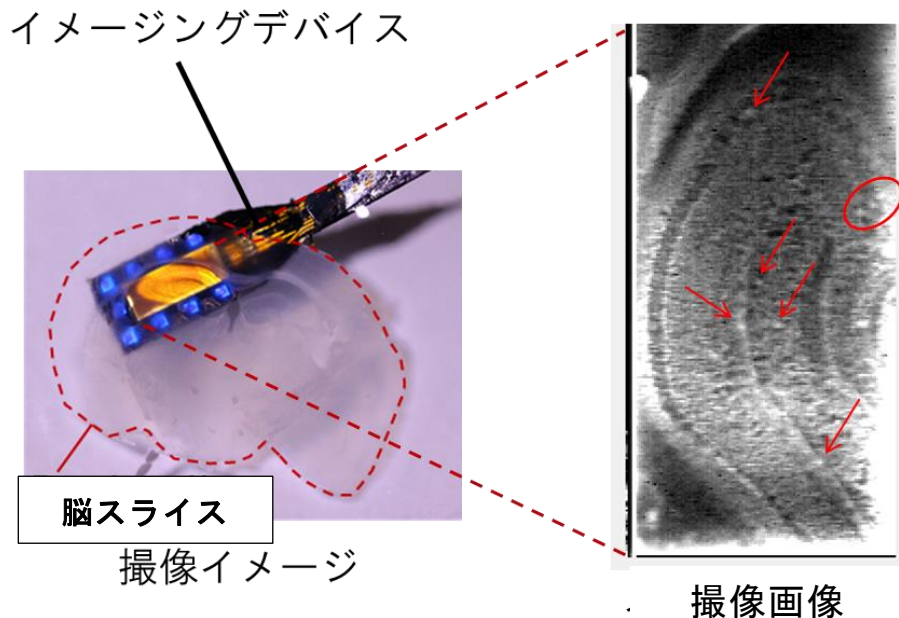


図 3-12 マウス脳スライス撮像実験

3.4 考察とまとめ

本研究では自由行動下計測を可能とする、緑色蛍光検出用埋植型 CMOS イメージングデバイスの開発を目的とした。特に、埋植型イメージングデバイスに適したフィルタ開発、実装方法の確立に取り組んだ。

緑色蛍光イメージング用の角度依存性のないフィルタを実現するため、黄色吸収色素を溶媒に溶かし、接着用の樹脂と混合した溶液を薄く伸ばしたシリコーン樹脂上に 1 度蛍光フィルタをスピコートする手法を考案した。シリコーン樹脂上に形成されたフィルタの中央の平坦な部分から必要なサイズのフィルタをレーザーでカットし、イメージセンサに搭載することで、平坦かつ均一な厚みのフィルタ実装が可能となった。

また、LED 表面に励起フィルタを形成したことにより、LED のピーク出力を 1 とした時 GFP 中心波長の 510 nm 付近の LED の相対強度を 1.4×10^{-4} から 2.2×10^{-2} まで減少させることに成功した。この結果から、励起フィルタを搭載したことにより画素領域への励起光漏れが減少させることが可能であることを実証した。本研究で開発した励起フィルタと蛍光フィルタを組み合わせることで、目標としていた励起光透過率 10^{-5} を達成した。

開発した緑色蛍光検出用イメージングデバイスの蛍光検出性能を比較するため、生体模擬環境下及び *in vitro* 環境下で評価実験を行った。励起フィルタの搭載により励起光漏れが 60% 程低減され、10 nM の FITC-I 溶液においても標準液に対して明確な輝度差の検出に成功した。さらに GFP が発現している細胞を含むマウス脳スライスを用いて蛍光イメージング実験を行ったところ、励起光漏れによる影響を多少受けているものの、GFP が発現した細胞の検出に成功した。これらの実験結果から、励起フィルタを搭載することで、より微弱な蛍光検出が可能であることを実証した。

しかしながら、蛍光フィルタと励起フィルタの組み合わせによる励起光除去性能では、微弱蛍光反応の検出を想定すると、決して十分とは言えないレベルである。

ここで、FITC-I の検量実験において 60% 程度の励起光漏れの低減という結果が得られたことについて、考察をまとめる。本実験で生じた励起光漏れの差は励起フィルタの搭載の有無に由来するものである。しかし 3.3.3 で示した通り、励起フィルタを LED 表面に形成したことにより、GFP 中心波長の 510 nm 付近の相対励起光強度を 1.4×10^{-4} から 2.2×10^{-2} までおよそ 2 桁減少させることができている。この数値から、励起フィルタを搭載することで少なくとも従来の励起光漏れの 90% 以上を除去できるような成果が期待されるが、実際では 60% 程度と大きな差が生じている。この差

が生まれた理由として、蛍光フィルタを搭載していないイメージセンサ側面や裏面からの入射が考えられる。これまで開発してきた埋植型イメージングデバイスでは、イメージセンサ表面に蛍光フィルタを搭載しているのみで、イメージセンサ側面や裏面への遮光対策がほとんど施されていなかった。特に、イメージセンサと励起光源である LED は密接して配置されているため、遮光対策の施されていなかった側面からの励起光の入射が大きく影響してしまっていると考えられる。これは、撮像領域の LED の近傍に励起光漏れが顕著に観察されていることから推察される。

また 3.3.6 において、GFP 発現細胞の一部を検出することに成功しているが、蛍光顕微鏡に比べると検出できた細胞はごくわずかであった。励起光強度を上げることで蛍光強度を上げ検出しやすくしたいところであるが、側面からの励起光漏れの影響が大きくなり困難であった。励起光のイメージセンサ側面からの入射は、微弱蛍光検出の妨げとなっているだけでなく撮像領域縮小の原因にもなっており、改善に向けたさらなるアプローチが必要であると考えられる。

第4章 埋植型イメージングデバイスの構造最適化

4.1 はじめに

これまでの開発してきた埋植型イメージングデバイスを用いて、マウス脳の海馬におけるプロテアーゼ活性に蛍光変化の計測[20]や、大脳皮質視覚野におけるフラビン蛋白蛍光の計測などに成功している[21]。埋植型イメージングデバイスに適した蛍光フィルタ、励起フィルタを導入することで、従来よりも励起光除去性能も改善されてきているものの、微弱蛍光の検出を目的とした場合を考えるとさらに改良を加える必要がある。

先述した通り、微弱な蛍光反応の観察を行う場合には励起光漏れをできる限り除去することが求められる。しかし、3章の終わりに少し触れた通り、埋植型イメージングデバイスは小型化するためLEDとイメージセンサが近接して配置されておりLED付近の撮像領域が漏れ光の影響により飽和しやすく、撮像領域が狭くなってしまうことが課題となっている。例えば第5章で後述する本来広範囲の脳機能イメージングが可能なのがフラビンイメージングの特性も、LED付近の撮像領域が飽和してしまい活かしていない結果となっている。そこで本章では上記の課題解決を目指し、埋植型イメージングデバイスに適した遮光構造を検討し、新たに遮光フィルタを作製した。また、開発した遮光フィルタを脳表計測用、脳深部計測用デバイスにそれぞれを新たに搭載できるような実装方法の確立に取り組んだのでこれを報告する。そして、開発した遮光フィルタを導入した埋植型イメージングデバイスを用いてそれぞれ性能評価実験と *in vivo* 実験を行い、性能の向上を実証したのでこれを報告する。

4.2 黒色遮光フィルタの開発と実装

4.2.1 黒色遮光フィルタの開発

埋植型イメージングデバイスにおいて LED 近傍が飽和しやすいのは、厚み 125 μm または 150 μm イメージセンサと厚み 90 μm の LED が近接して配置されているうえ、これまでイメージセンサ側面には蛍光フィルタのある表面と異なりほとんど遮光対策を施していなかったことが原因だと考えられる。これまでの埋植型イメージングデバイスでは、側面には市販のブラックレジストを微量付着させるだけであった。しかしこれでは十分な遮光ができておらず、またブラックレジストの付着具合ばらつきが出やすいことから、より遮光性能が高い遮光フィルタの作製とばらつきの出にくい実装方法の確立が求められる。

そこで本研究では蛍光フィルタと同様に、吸収色素を用いて遮光フィルタを作製することを検討した。イメージセンサ側面に導入する遮光フィルタは、測定ターゲットの蛍光、吸光スペクトルに関わらず、どのような波長に対しても高い吸収特性を持つことが重要と考えられる。また、イメージセンサ表面に搭載する蛍光フィルタと密着させることができるのが好ましい。本研究では黒色吸収色素 (VALYFAST BLACK 2620, オリエンタル化学) とアクリル系樹脂 (NOA63, NORLAND 社) を溶媒に溶かした混合溶液 (以下、遮光フィルタ原液と呼ぶ) を用いることで、遮光フィルタを作製することとした。

カバーガラス状に遮光フィルタ原液をスピコートし作製した約 10 μm 厚の遮光フィルタの透過スペクトル特性を図 4-1 に示す。蛍光イメージングにおいてよく用いられる 400nm~600nm の波長帯域における透過率は 0.1% 以下であり、イメージセンサと LED 間の距離は 20 μm 以上あることから、十分な遮光性能が期待される結果だと考えられる。続いて、この黒色吸収色素を主成分とする遮光フィルタを脳表計測用、脳深部計測用イメージングデバイスのイメージセンサと LED の間に形成する実装方法の確立を試みたので、これについて報告する。

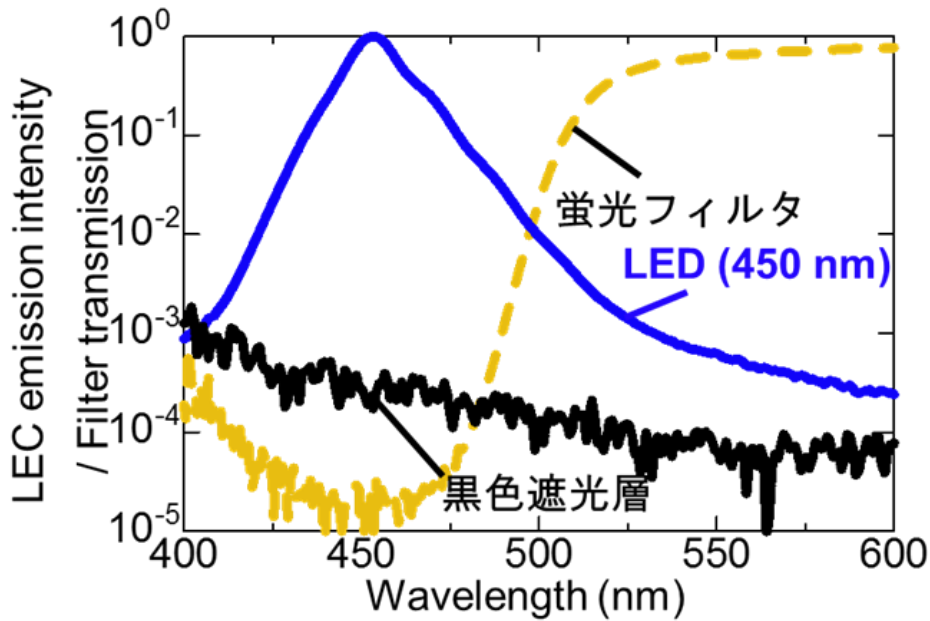


図 4-1 スペクトラル特性

4.2.2 脳表計測用イメージングデバイスへの遮光フィルタの実装

ここでは、脳表計測用イメージングデバイスへの遮光フィルタの実装方法について説明する。脳表計測用イメージングデバイスは図 4-2 に示すように、フレキシブル基板上にイメージセンサとその周囲を LED が取り囲むように設置されているが、比較的空白となっているスペースが広い。そこで、イメージセンサと LED が搭載されている以外のフレキシブル基板上の全てのスペースに遮光フィルタ原液を流し込み、硬化させ遮光フィルタを実装する手法を考案した。遮光フィルタ原液はややとろみのある液体であるため、イメージセンサと LED 間の僅かなスペースにも自然に充填させることが可能である。遮光フィルタ原液を LED と同じ高さになるまで流し込み、LED の表面だけ覆われていない状態で加熱及び UV 硬化処理を行うことで、イメージセンサと LED 間に遮光フィルタが形成される。またフレキシブル基板全体に LED と同じ高さまで一様に遮光フィルタを実装するため、ばらつきが生じにくい実装方法と考えられる。本実装方法を行うにあたっては、LED をフリップチップボンディングにて実装するのが有効である。遮光フィルタ原液が LED 表面に付着、もしくは表面全てを覆ってしまうと十分な強度の励起光を得ることが困難となる。しかし、フリップチップボンディングによる LED の実装であれば LED の発光面が底部、サファイア基板が上面となるため、LED 表面の硬化した遮光フィルタをレーザーで除去することが可能となる。

実際に作製した遮光フィルタ付埋植型イメージングデバイスの実装順序について簡単に説明する。まず、イメージセンサ及びLEDをフレキシブル基板上に実装する。続いて遮光フィルタ原液をフレキシブル基板の上に流し込み、プレベイクを行う。この工程により、遮光フィルタの高さが均一化され、LEDの高さと同じ高さの遮光フィルタが形成される。続いてイメージセンサよりも40 μm ほど大きくカットした蛍光フィルタをイメージセンサ上に配置し、真空状態でさらにベイクを行う。真空状態とするのは、蛍光フィルタとイメージセンサ表面・遮光フィルタを密着させるためである。また、蛍光フィルタと遮光フィルタには同じ樹脂を使用しているため、本工程での両フィルタの密着を容易にしていると考えられる。最後にワイヤボンディングにてイメージセンサとフレキシブル基板を接続し、エポキシ樹脂で補強後パリレン膜をコーティングして完成となる。実際に作製した遮光フィルタ付イメージングデバイスの写真を図4-3に示す。また、本デバイスを用いて行った励起光除去性能評価実験について、4.3.3で、動物実験について第5章で説明する。

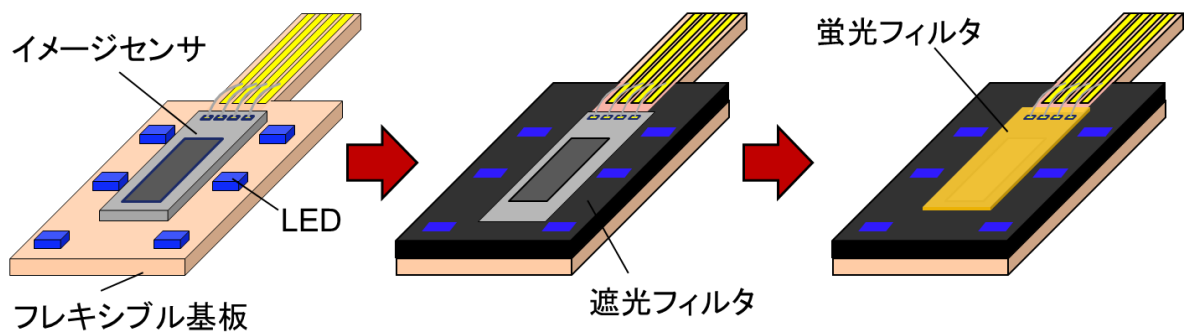


図 4-2 遮光フィルタ実装のコンセプト

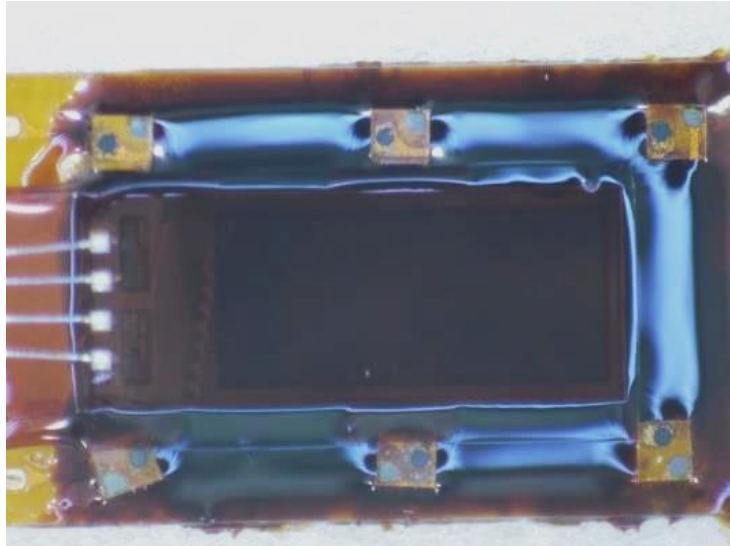


図 4-3 デバイス完成写真

4.2.3 脳深部計測用イメージングデバイスへの遮光フィルタの実装

続いて、脳深部計測用イメージングデバイスへの遮光フィルタの実装方法について説明する。脳深部計測用イメージングデバイスは図 4-4 に示すように、イメージセンサと LED 及び AI 配線がフレキシブル基板のほとんどを全てのスペースを占めているため、脳表計測用イメージングデバイスのように遮光フィルタ原液を流し込む手法でフィルタを実装するのが非常に困難であった。そこで、遮光フィルタをフレキシブル基板上ではなく、イメージセンサチップ自体に直接実装できる方法が求められた。



図 4-4 脳深部計測用イメージングデバイス

本研究で作製した遮光フィルタは、先述した通り吸収色素以外の溶媒とアクリル系樹脂は蛍光フィルタと同じ材料を同じ混合比で作製している。蛍光フィルタが簡単にレーザーでカットできるのと同様に遮光フィルタも加工できることが確認できたため、蛍光フィルタと遮光フィルタをまとめてイメージセンサチップ自体に実装可能な実装方法を考案した。以下、考案した実装工程の手順を説明する。

第一に、遮光フィルタ原液を薄くアルミ製のカップに薄く引き伸ばし、イメージセンサチップを遮光フィルタ原液上に配置する。この際、イメージセンサチップ側面に遮光フィルタ原液を少量付着させておく。この状態において 100℃でベイクを行うと遮光フィルタ原液が重力に従い平坦化する。イメージセンサ側面は遮光フィルタ原液に埋まり、表面張力によりセンサ表面と遮光フィルタの表面が同じ高さとなる。ここで、イメージセンサよりも少し大きめにカットした蛍光フィルタをイメージセンサ上に配置し、真空引きをしつつ 120℃でさらにベイクを行う。ベイク完了後イメージセンサから 30um 離れた外周を、レーザー加工機を用いて切り出すことで、蛍光フィルタと遮光フィルタが実装されたイメージセンサチップを得ることが可能となる。実装工程を図 4-5 に、実際に作製した脳深部計測用イメージングデバイスを図 4-6 に示す。

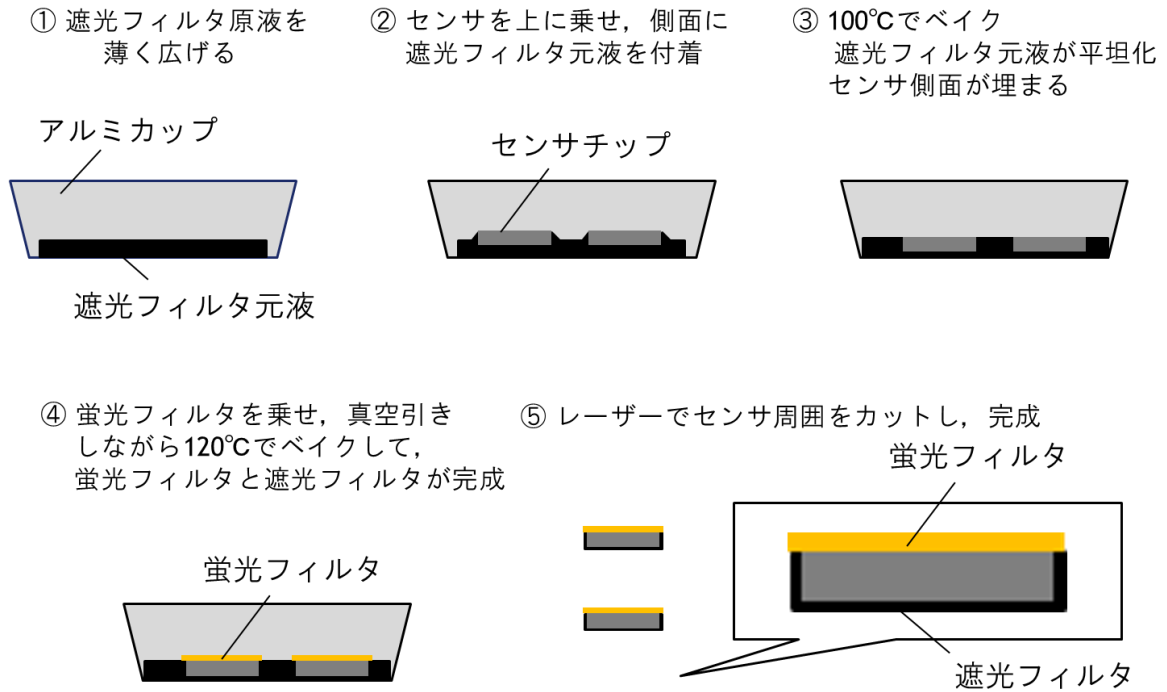


図 4-5 遮光フィルタ実装工程

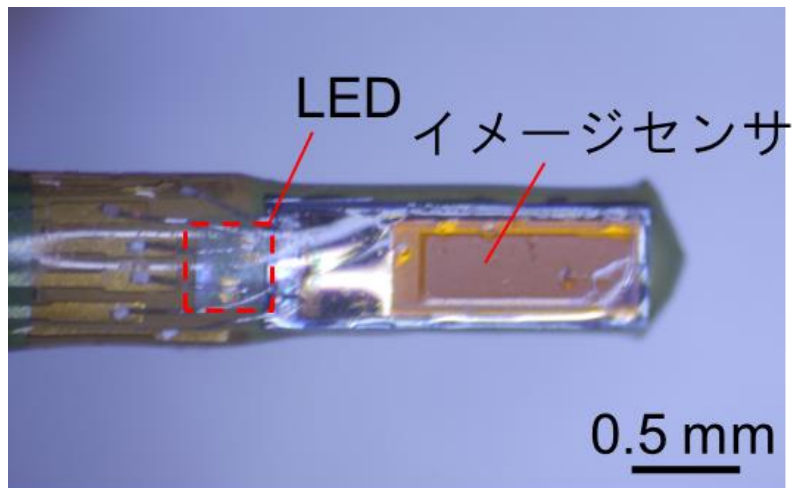


図 4-6 デバイス完成写真

4.3 励起光除去性能評価

本研究で開発した遮光フィルタ付埋植型イメージングデバイスの励起光除去性能の評価実験を行ったので、ここで実験内容と結果を説明する。なお、脳表計測用・脳深部計測用イメージングデバイスの両方のデバイスに対し評価実験を行った。

遮光フィルタの搭載は、励起光漏れの総量と撮像領域の減少を抑えることが目的である。そこで本実験では、遮光層の有無のみが異なる埋植型イメージングデバイスを用いて、励起光漏れの比較評価実験を行った。LEDを点灯した状態でそれぞれのデバイスを生理食塩水中に浸漬させ、検出される光強度を測定した。生理食塩水中で実験を行ったのは、励起光漏れのみを検出する環境で光強度計測を行うためである。図 4-7 に、それぞれのデバイスを用いて取得した画像を示す。脳表計測用・脳深部計測用イメージングデバイスのどちらのデバイスにおいても、撮像領域内の 5 点の光強度を計測し平均を比較したところ、励起光漏れを従来の 10% 以下にまで低減することに成功した。本実験結果から、遮光フィルタを導入することで、従来のデバイスよりも圧倒的に励起光除去性能を向上でき、イメージングに使用可能な撮像領域を広げることができることを実証した。また、励起光除去性能が向上したことにより、より微弱な蛍光反応の計測が可能になることが期待される。

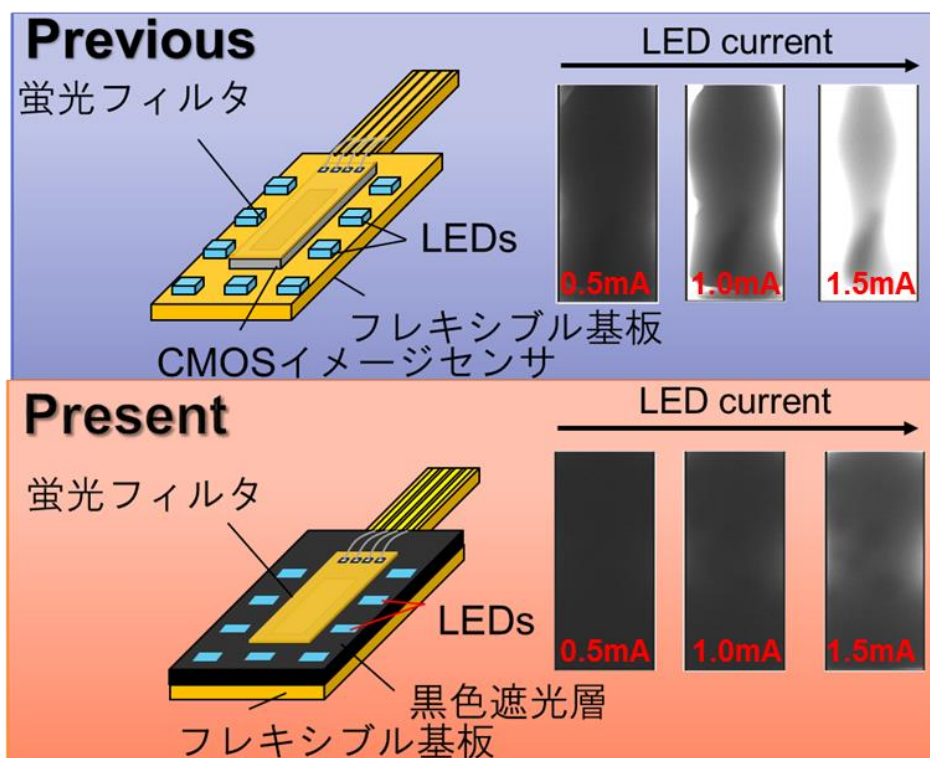
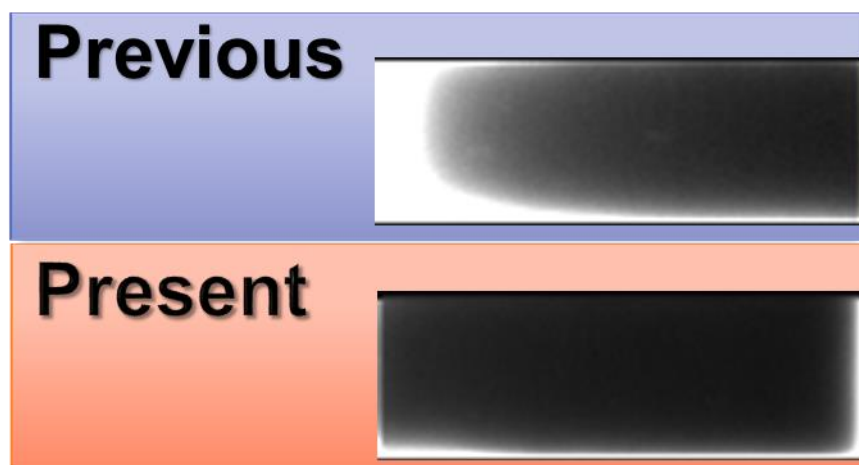


図 4-7 励起光除去性能評価 (脳表タイプ)



取得画像例

図 4-7 励起光除去性能評価 (脳深部タイプ)

4.4 高感度イメージセンサの設計

本研究で使用している CMOS イメージセンサは、nwell/psub 型フォトダイオードを用いた 3 トランジスタ型 APS 方式画素回路を用いており、画素サイズ $7.5\ \mu\text{m}$ 角、開口率 44% の画素を搭載したイメージセンサを採用している。この画素を搭載したイメージセンサを用いて、これまでに神経活動に伴う血流応答計測や GFP を発現した細胞の検出など、様々な神経活動計測に成功している。しかし微弱な光反応の観察を目的とし、かつ空間分解能がそれ程求められない測定対象であるならば、空間分解能をある程度犠牲にして光検出感度を高感度化した方が有効な場合もある。例えば、本研究で行った蛍光イメージング実験の測定対象であるフラビン蛋白の蛍光は非常に微弱である。しかし、フラビン蛋白の蛍光反応は個々の神経細胞レベルではなく、脳の一領域がまとめて反応するため、個々の細胞を観察可能なレベルの空間分解能は求められない。

そこで、本研究では上記で紹介した過去に開発されたイメージセンサを元に、微弱な光反応検出用のイメージセンサを新たに設計した。画素サイズを従来の 4 倍とすることで、光検出感度の向上を目指した。新たに設計したイメージセンサの画素と従来の画素の比較を、詳細を図 4-8 に示す。これにより、従来よりもフォトダイオード面積が約 5.4 倍となり、高感度計測が可能になることが期待される。

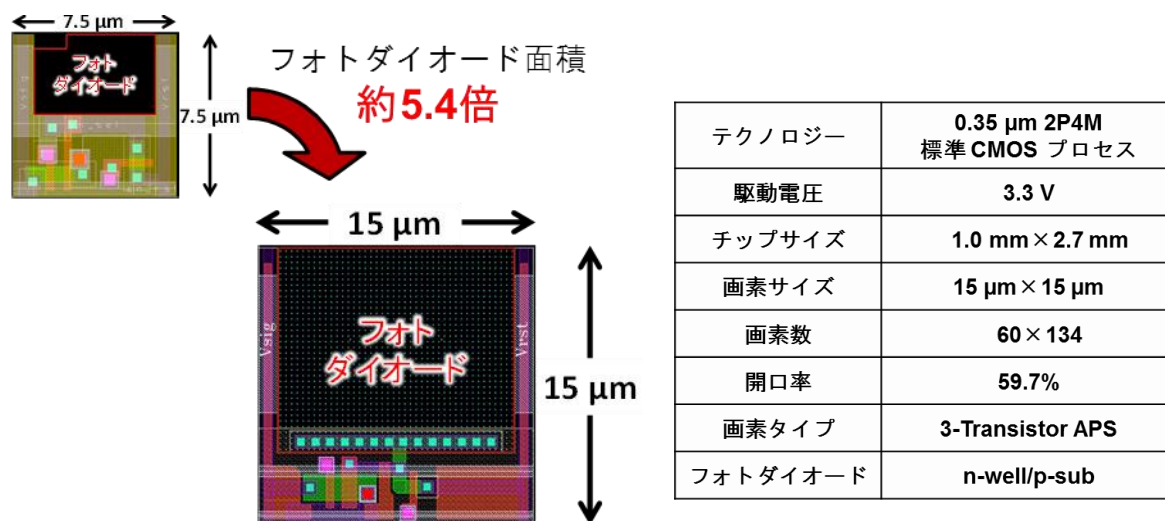


図 4-8 イメージセンサ写真と諸元

4.5 考察とまとめ

本研究では GFP 蛍光を観察するのに適した埋植型イメージングデバイスの開発を行ってきた。しかし、微弱な蛍光を観察するためにはさらに蛍光光学系の改善を行い、励起光除去性能を向上させることが必要となる。

従来の埋植型イメージングデバイスは、イメージセンサ側面への遮光対策が弱く、側面からの励起光の入射が課題となっていた。特に、励起光源である LED 付近の撮像領域が飽和してしまいやすく、本来広範囲の脳機能イメージングが可能な特性を活かせていないことの解決が求められた。そこで、励起光漏れによる撮像領域の減少を抑えることを狙い、黒色吸収色素を主成分とする遮光フィルタをイメージセンサと LED の間に形成することを考案し、遮光フィルタの作製と実装方法の確立に取り組んだ。遮光フィルタの有無のみが異なるデバイスを用いて励起光漏れの比較評価実験を行ったところ、励起光漏れを従来の 10%以下にまで低減することに成功した。遮光フィルタの最適な実装プロセスを確立するまでは、イメージセンサの外周の一部に蛍光フィルタが密着せず、励起光がその隙間を抜けてしまうといった問題が見られた。しかし実装プロセス確立後にはこの問題も解決され、遮光フィルタを埋植型イメージングデバイスに導入した結果、撮像領域全体を用いた広範囲イメージングを実現した。

遮光フィルタの実装工程において、現在はアルミカップを用いていたが、今後シリコン樹脂製の専用の治具を作製し利用する方法を検討している。シリコン樹脂にイメージセンサと遮光フィルタ分の体積を持つポケットを作製した治具を用いる実装工程を図 4-9 に示し、実装方法を簡単に説明する。

治具に作製された各ポケットにイメージセンサとイメージセンサのサイズに合わせた遮光フィルタ原液を注入し、100℃でベイクを行う。この工程によりイメージセンサ表面と遮光フィルタ表面が水平となる。この水平となる原因について、イメージセンサが遮光フィルタ原液よりもわずかに軽く、表面張力が働いているものと考えている。イメージセンサ表面に遮光フィルタが付着してしまった場合もアセトン洗浄を行うのみで良いため、遮光フィルタの実装は比較的容易に行えると考えられる。続いて、カバーガラスにスピンコートして作製した蛍光フィルタをイメージセンサの撮像面側を密着させ、真空中にて 120℃でベイクを行う。最後に、イメージセンサの外周に沿って蛍光フィルタをレーザー加工機で切り出し、完成となる。

本手法を用いるメリットは、効率よく多数のイメージセンサに蛍光フィルタと遮光フィルタを実装できる点にある。先述した専用の治具を用いない方法では、蛍光フィルタ+遮光フィルタの 100 μm 以上をレーザー加工で切り出すため、加工

時間が長くかかってしまう点が問題である。一方、専用の治具を用いる手法では、蛍光フィルタ分約 10 μ m 厚の加工のみで済むため、加工時間を大幅に短縮することが期待される。また、イメージセンササイズにカットした蛍光フィルタをイメージセンサに手作業で配置する工程も省略可能であり、歩留まりの向上も期待される。

以上の理由から、今後遮光フィルタをイメージセンサに実装する場合には、専用の治具を作製し実装を行う手法が有効だと考えられる。

続いて、第3章に記載した FITC-I の検量実験及びマウス脳スライスを用いた *in vitro* 実験についてここでもう一度考察する。まず FITC-I の検量実験において、本実験では励起フィルタを導入したことにより、少なくとも従来よりも励起光漏れを 90%以上カットできることが見込まれていたが、実際には約 60%のカットと十分な励起光除去性能が得られていなかった。この結果からイメージセンサ側面から励起光が入射して可能性に考えが至り、本研究で励起フィルタを導入するという改良を行うきっかけとなった。このきっかけから上記に記した通り、遮光フィルタを導入することで励起光漏れを従来よりも 10%以下まで低減できたという成果を得ることができた。しかしこの結果は、遮光フィルタを搭載していなかった FITC-I の検量実験時は、イメージセンサ側面からの励起光が入射してしまっていたことを示唆している。励起フィルタを搭載し LED の波長を制限したことで、蛍光フィルタを透過する励起光漏れは減少させることができていたものの、イメージセンサ側面から蛍光フィルタを通さず励起光が入射してしまったことが、励起光除去性能が期待されるよりも低い結果になったものと考えられる。本研究で遮光フィルタの実装方法を確立することができたため、遮光フィルタ、励起フィルタ、蛍光フィルタを組み合わせたデバイスを作製し、再度評価実験を行うことで励起フィルタの有用性を改めて実証する予定である。

また、マウス脳スライスを用いた *in vitro* 実験について、本実験においても遮光フィルタをさらに組み合わせることで、より GFP 発現細胞の検出感度が向上されることが期待される。遮光フィルタを導入することにより励起光漏れが低減されるため、励起光強度を本実験時よりも強めることができ、蛍光強度の高まった GFP 発現細胞を観察することが可能となるからである。第5章で説明する動物実験において、GFP と非常に近いスペクトル特性を持つ GCaMP 蛍光を遮光フィルタ搭載デバイスで十分に観察できていることから、励起フィルタ、遮光フィルタ、蛍光フィルタを組み合わせる手法は非常に有効であると考えられる。

① センサチップサイズ + 遮光層分のスペースを開けた治具を用意



② センササイズに合わせた遮光フィルタの原液を注ぐ



③ センサチップを浮かべて、バイク



④ あらかじめ用意しておいた蛍光フィルタにセンサ表面を密着させる



⑤ フィルタをバイク後レーザーでセンサ部分のフィルタをカット



③ 治具からチップを外し、完成



図 4-9 治具を用いた実装工程

第 5 章 動物実験による埋植型 CMOS イメージングデバイスの性能実証

5.1 はじめに

本研究では、マウスの頭部に埋植可能な小型イメージングデバイスを用いることで、自由行動下マウスの脳神経活動計測を実現可能なデバイス及びシステムの開発を目指している。脳神経科学の分野で行われてきた麻酔下、覚醒下の動物実験の結果から、麻酔下と覚醒下では脳活動が異なる場合があることが示されている[12-13]。このような研究成果から考えても、行動下における脳神経細胞の活動を観察する技術は非常に重要である。本章では、本研究で開発した埋植型 CMOS イメージングデバイスを用いた行動下における脳神経活動計測の実現へ向け、動物実験を行った。 *in vivo* 環境下で蛍光イメージングが可能か性能を実証すべく取り組んだ動物実験の中で、特に第 3 章で開発したデバイスを用いて行ったフラビン蛋白蛍光イメージングと、第 4 章で開発したデバイスを用いて行った GCaMP イメージングについて報告する。

本研究の動物実験で使用した埋植型 CMOS イメージングデバイスは、第 3 章で説明した緑色蛍光観察用励起フィルタ付イメージングデバイスと遮光フィルタ付イメージングデバイスである。第 3 章、第 4 章で記した通り、フレキシブル基板上に CMOS イメージセンサと青色 LED、蛍光フィルタ、励起フィルタもしくは遮光フィルタを搭載し、防水性と生体適合性の向上のためパリレン膜をコーティングしている。本研究で行った動物実験の測定対象はどちらも緑色蛍光を発するフラビン蛋白蛍光と GCaMP であるため、中心波長 470nm の青色 LED を励起光源とし、500nm 付近に立ち上がりを持つ蛍光フィルタを採用している。

本章ではまず、フラビン蛋白を用いた蛍光イメージング手法についてそれぞれ説明する。続いて実験で使用する実験動物と実験装置といったシステムについて説明した後に、実際に行った視覚刺激に伴う大脳皮質視覚野におけるフラビン蛋白蛍光イメージングの結果を報告する。

さらに、GCaMP を用いた蛍光イメージング手法について説明し、フラビン蛋白蛍光の実験と同様に実験で使用する実験動物と実験装置といったシステムについて説明する。最後に視覚刺激に伴う大脳皮質視覚野における GCaMP イメージングの結果を報告する。

5.2 フラビン蛋白蛍光イメージング

脳神経活動を観察する光学イメージング手法の一つに、内因性シグナルイメージングがある[32-34]。内因性シグナルの計測対象には、血流変化や細胞のエネルギー代謝によって変化するフラビン蛋白の蛍光変化が挙げられる。蛍光イメージング手法は脳神経活動計測の有力な手法であるが、長期にわたり蛍光イメージングを行う場合、蛍光指示薬を用いる実験は複数回指示薬を追加する必要があるため、実験動物への負荷が大きい[35-36]。GFP といった遺伝子を導入したトランスジェニックマウスを用いる場合、蛍光指示薬を投与などは必要ないがマウスの系統維持に労力や費用がかかるため、脳が本来持っている内因性シグナルであるフラビン蛋白を利用した蛍光イメージングは非常に有用性が高い。

フラビン蛋白は、自家蛍光を持って脳活動を反映する性質を持つ。ここで、神経活動に伴うフラビン蛋白蛍光の反応メカニズムについて説明する。神経細胞が興奮すると、細胞内の Ca^{2+} の濃度が上昇しミトコンドリアの活性が高まる。ミトコンドリアの酸素代謝が高まると、電子伝達系のフラビン蛋白が酸化型に変化し、酸化型のフラビン蛋白は青色の励起光を照射すると緑色の自家蛍光を発する性質を持つ。よって参加型のフラビン蛋白の緑色自家蛍光を観察することで、副次的に脳神経活動を可視化することが可能となる仕組みである。フラビン蛋白蛍光のメカニズムについて、図 5-1 に示す。このフラビン蛋白を用いた蛍光イメージング技術を自由行動下の動物に対して適用することで、行動と脳神経活動を関連づけることが可能となる。

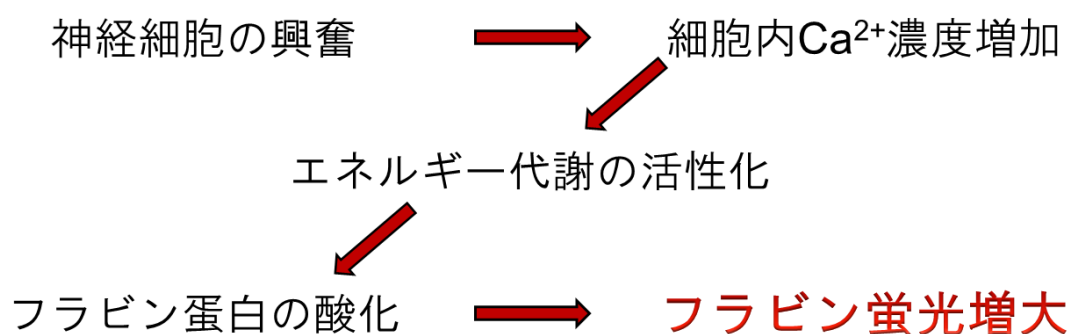


図 5-1 フラビン蛋白蛍光の発現メカニズム

5.3 蛍光顕微鏡によるフラビン蛍光イメージング実験

本項では蛍光顕微鏡を用いた一般的なフラビン蛋白イメージング実験について説明する。本研究では埋植型イメージングデバイスを用いて視覚刺激に伴うフラビン蛋白の蛍光強度変化の測定実験を行った。そこで、ここでは蛍光顕微鏡を用いた視覚刺激に伴うフラビン蛋白蛍光イメージングの実験系について説明する。

本実験は、マウス前方に設置したモニターから出力される視覚刺激前後において、大脳皮質視野で視覚刺激に伴うフラビン蛋白の蛍光強度変化を観察する実験である。実験系の様子を図 5-2 に示す。図に示すように、本実験ではマウスが蛍光顕微鏡下に拘束され、マウスから一定の距離に視覚刺激用のモニターが設置されている。一定間隔ごとに視覚刺激をモニターから出力し、視覚刺激前後の蛍光強度の計測を行い、これを 10~20 試行ほど繰り返し加算平均処理を行う。これは、フラビン蛋白の蛍光変化量が非常に微弱であるため、心拍ノイズ等のノイズを除去するためである。図 5-3 に代表的な蛍光顕微鏡を用いて取得した視覚刺激に伴うフラビン蛍光強度変化のグラフを示す。グラフに見て取れるように、フラビン蛍光の強度変化には褪色反応と視覚刺激に伴う蛍光量の増大反応が見られる。

本研究では、視覚刺激に伴うフラビン蛍光の強度変化を、蛍光顕微鏡の代わりに埋植型イメージングデバイスを用いて測定が可能であることを実証すべく、実験を行った。

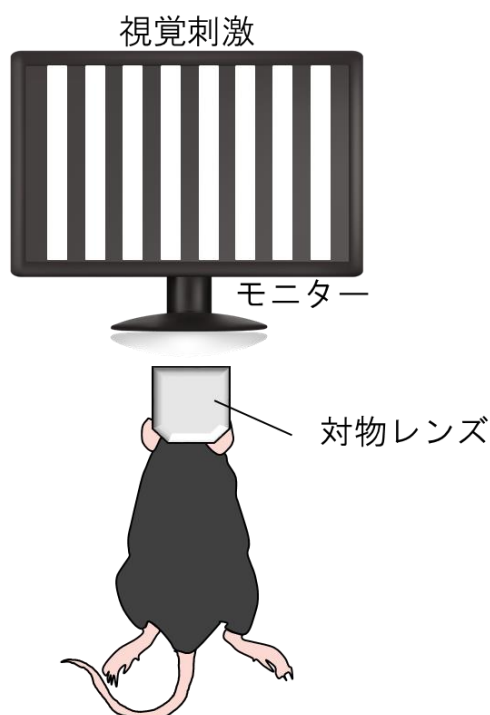


図 5-2 視覚刺激に伴うフラビン蛋白蛍光イメージング実験例

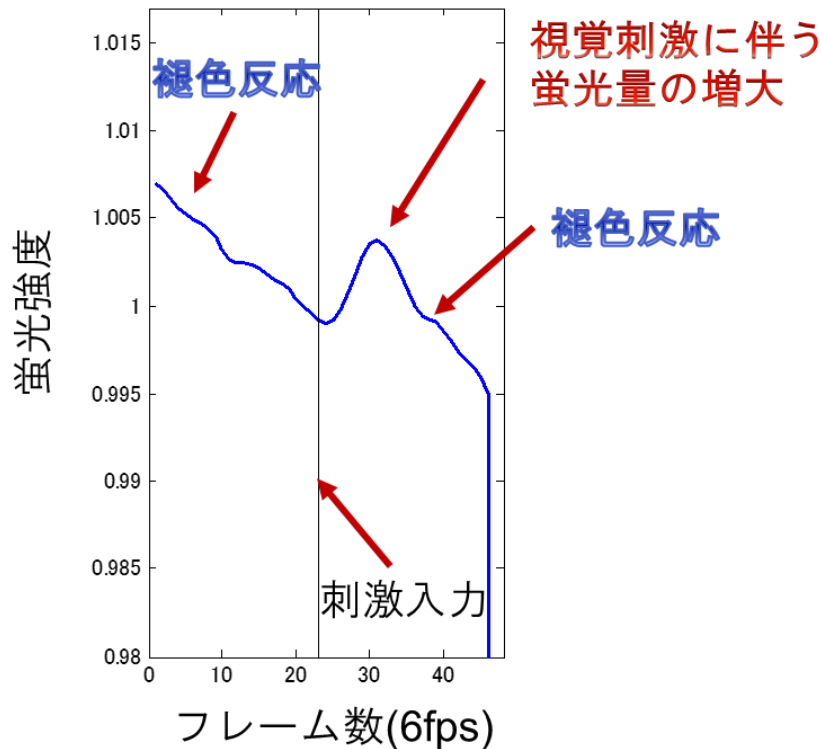


図 5-3 視覚刺激に伴うフラビン蛋白蛍光の反応例

5.3.1 実験動物と手術

本研究で行った動物実験は、奈良先端科学技術大学院大学及び生理学研究所の動物実験に関する規定に基づいて行なった。本実験では、手術開始前に麻酔として 10%ウレタン及びクロロプロチキセンを腹腔投与した。まず、麻酔したマウスを Stereotaxic instrument (Narishige) にイヤバーを用いて頭部を固定した。麻酔後のマウスの体温を良好に保つため、ホットプレートをマウスの下に設置した。本実験では大脳皮質視覚野のフラビン蛍光イメージングを目的としているため、従来の研究で明らかになっているマウスの脳地図に従い、開頭部位を決定した。大脳皮質視覚野は、本研究で開発した脳表用埋植型イメージングデバイスの撮像領域の半分程で収まるサイズである。そこで頭皮を切開して頭蓋骨露出させ、太い血管を避けたうえ、視覚野が撮像領域に収まるよう頭蓋骨の一部を除去した。頭蓋骨除去後に、露出した脳表に埋植型イメージングデバイスを設置した。

5.3.2 視覚刺激表示とイメージングデバイスの連動システム

本実験では、マウスに対して定期的に視覚刺激を与える必要がある。先に少し記した通り、視覚刺激はマウス前方のモニターより表示される仕様となっている。視覚刺激の表示は MATLAB により PC で制御することが可能である。埋植型イメージングデバイスを用いて本実験を行うためには、MATLAB の視覚刺激表示プログラムをイメージングプログラムへのトリガー信号入力と LED の点灯・消灯と連動させる必要があった。そこで、本研究ではパルスステイミュレーターとアナログ IC チップを組み合わせた、視覚刺激表示システムとイメージングデバイスの連動システムを開発した。図 5-4 に連動システムのイメージ図を示す。連動システムの仕組みについて、簡単に説明する。

まず、フラビン蛋白蛍光イメージング実験では実験終了後に加算平均処理を行うため、埋植型イメージングデバイスのイメージングシステムに視覚刺激のタイミングを記憶させる必要がある。そこで、視覚刺激の表示と同時に MATLAB からトリガー信号をパルスステイミュレーターに出力し、埋植型イメージングデバイスの制御回路にスイッチ信号を入力するシステムを考案した。続いて、LED の点灯・消灯について説明する。フラビン蛋白蛍光は非常に微弱であり、長時間励起光を照射しているとすぐに蛍光褪色してしまうため、視覚刺激の前後のみ点灯し、それ以外は消灯しているという設定が求められる。そこで、LED の制御に関しても MATLAB のプログラムからトリガー信号を出力しアナログスイッチ IC と組み合わせることで、視覚刺激表示の 8 秒前から 5 秒後の 13 秒間のみ LED を点灯させるように設定した。

本実験では、イメージングデバイスの制御ボードと LED を点灯するため電源は、それぞれ異なる定電圧源へと接続した。また 2 章で紹介したオペアンプとデジタルバッファを搭載した中継基板を用いて、制御ボードへと接続した。麻酔下実験においては中継基板をマウスに搭載する必要がないため、性能を重視したためである。なお、フラビン蛋白蛍光イメージングは 8fps 程で行われることが多いことから、本実験では埋植型イメージングデバイスの設定上都合の良い 8.3fps で蛍光イメージング実験に取り組んだ。

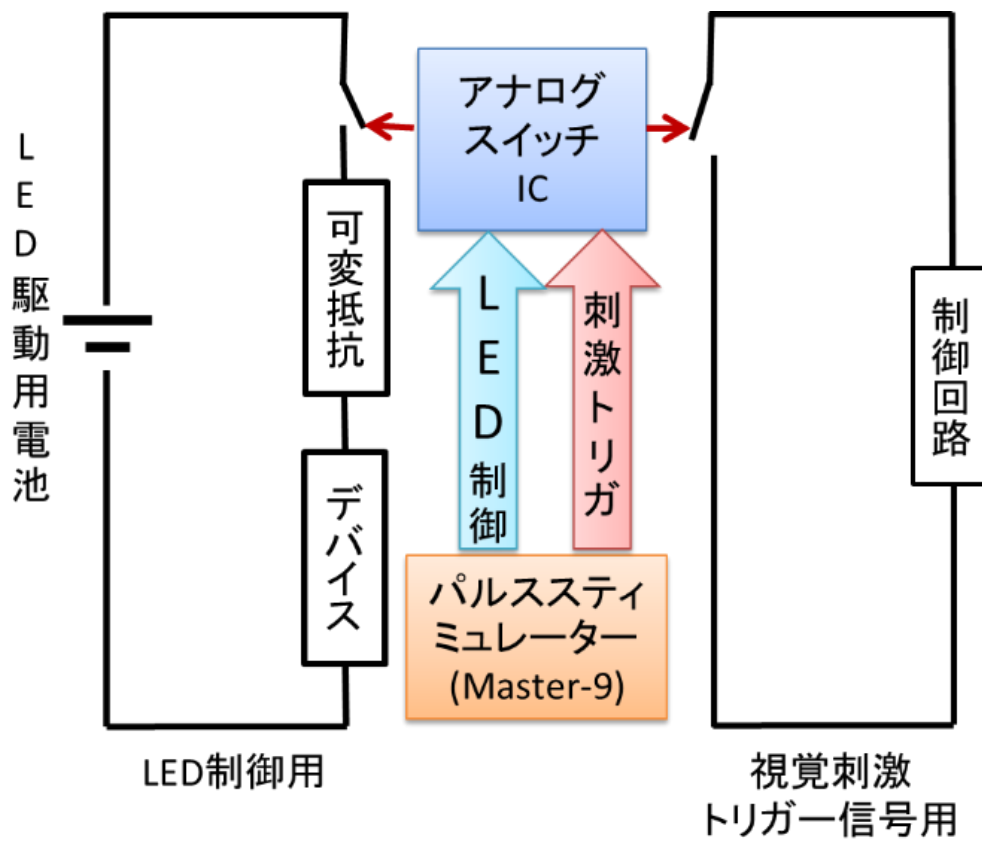


図 5-4 視覚刺激表示システムとイメージングデバイスの連動システム

5.3.3 フラビン蛍光反応の解析

埋植型イメージングデバイスを用いて取得したフラビン蛍光イメージングの結果は、専用の解析プログラム (Visual C++) により解析した。取得した 25 試行分のデータを加算平均処理し、心拍ノイズ等のノイズ成分を除去した。加算平均処理は、視覚刺激開始時を基準とし刺激前 40 フレーム、刺激後 160 フレームの合計 201 フレームを加算平均処理した。なおこのフレーム数はフラビン蛋白蛍光イメージングで重要となる刺激前後のデータ量としては十分である。加算平均処理によって得られた結果は、蛍光顕微鏡で用いられるのと同じ MATLAB の解析プログラムを用いて輝度変化の解析を行った。このプログラムを用いることにより、各フレームの輝度変化率を擬似カラー化して表示することが可能である。

なお、蛍光顕微鏡を用いたフラビン蛍光イメージングでは、感度を向上させるためにビニング処理を用いることが多い。ビニング処理とは複数の画素をまとめて一つの画素とみなすことで、微弱な光反応を検出しやすくする技術である。埋植型イメージングデバイスには、ビニング処理機能を搭載していないが、空間分解能よりも光検出感度が優先されることもあると考え、第 4 章に記した高感度 CMOS イメージセンサを設計した。空間分解能が求められる神経細胞レベルのイメージングには不向きであるが、フラビン蛍光イメージングといった領域レベルでのイメージングにおいては有効と考えられ、今後の結果が期待される。

5.4 埋植型イメージングデバイスによるフラビン蛋白蛍光イ

メージング実験

フラビン蛋白蛍光イメージングは、蛍光指示薬や遺伝子導入をすることなく脳の活動の様子を観察することが可能である。本研究の第3章で開発した蛍光フィルタ・励起フィルタ搭載埋植型イメージングデバイスの性能評価を含め、*in vivo* フラビン蛋白蛍光イメージングを行ったので、実験内容と結果をまとめる。

本実験では、本研究で開発し3章で説明した励起フィルタ・蛍光フィルタ搭載埋植型イメージングデバイスを用いて、視覚刺激に伴うフラビン蛋白蛍光イメージング実験を行った。埋植型イメージングデバイスを直接右脳の視覚野に設置し、マウスの左目に対する視覚刺激入力に伴う蛍光量変化を計測した。視覚刺激には神経科学の分野で良く使用される白黒の格子状の画像を表示し、視覚野の神経細胞活性化させる手法を採用した。本実験では右眼の前方に障害物を設置することにより、左眼だけに視覚刺激が入力されるような条件とした。また、埋植型イメージングデバイスに対する視覚刺激表示画面からの光の影響を回避するため、帽子状に加工した黒色金属でマウスの頭部を覆い、遮光できるようにした。本実験の実験系のイメージ及びマウス周辺の写真を図 5-5 に示す。また、視覚刺激に伴う蛍光イメージングの1試行のフローチャートを図 5-6 に示す。本実験では、視覚刺激前後の蛍光変化を測定した。できるだけフラビン蛋白の蛍光の退色を避けるため、先述した通りと連動させることで、LEDは視覚刺激の前後の短時間だけ点灯されるように設定した。試行と試行の間には、褪色してしまったフラビン蛋白の自家蛍光が回復する時間を待つために、1分間の休憩を取ることとした。LEDの点灯・消灯のスイッチ制御と同様に、イメージングプログラムへのトリガー信号入力も視覚刺激プログラムと連動システムによって制御した。25回の試行を行った後、得られたデータを用いて加算平均処理を行った。

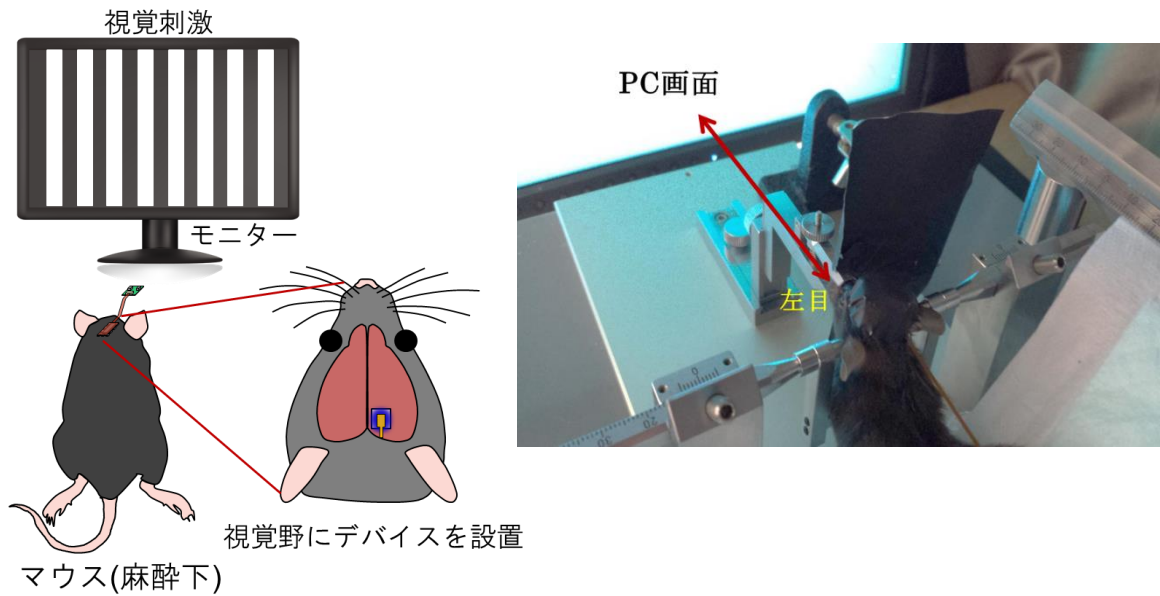


図 5-5 埋植型イメージングデバイスによるフラビン蛋白蛍光イメージング

- イメージング実験の流れ**
1. 励起光(LED) 点灯
 2. インターバル8秒
 3. 視覚刺激2秒
 4. インターバル3秒
 5. 励起光(LED) 消灯
 6. インターバル60秒

図 5-6 フラビン蛋白蛍光イメージングの1試行のチャートフロー

25 試行分の加算平均処理を行った結果を図 5-7, 5-8 に示す. 図 5-7, 5-8 から見て取れる通り, 視覚刺激後に蛍光強度の増加反応が観察された. この反応は, 先行研究で報告されている蛍光顕微鏡を用いて得られるフラビン蛋白蛍光イメージングの結果とほぼ一致しており[37], また視覚刺激を入力しなかった場合, この増加反応は観察できなかった. よって, 本実験で観察された蛍光強度の増加反応は視覚刺激の反応に伴う蛍光反応だと考えられる. 以上の結果から, 励起光漏れの影響を強く受けてしまっているものの, 第 3 章で開発した励起フィルタ・蛍光フィルタ搭載埋植型イメージングデバイスを用いて, マウス脳視覚野における視覚刺激に伴う蛍光変化の観察が可能であることを実証した. 開発した埋植型イメージングデバイスは 1%程度の蛍光強度変化が検出可能な性能を有することが実証された. これらの結果から今後埋植型イメージングデバイスを用いることで, 自由行動下マウスにおいても視覚刺激に伴うフラビン蛋白の蛍光イメージングができるようになることが期待される. 本実験に関する考察は, 本章末にまとめる. 現在, 埋植型イメージングデバイスを用いた神経活動に伴うフラビン蛋白蛍光イメージングを実現すべく自由行動下実験の実験系の確立に取り組んでおり, この詳細も本章末で説明する.

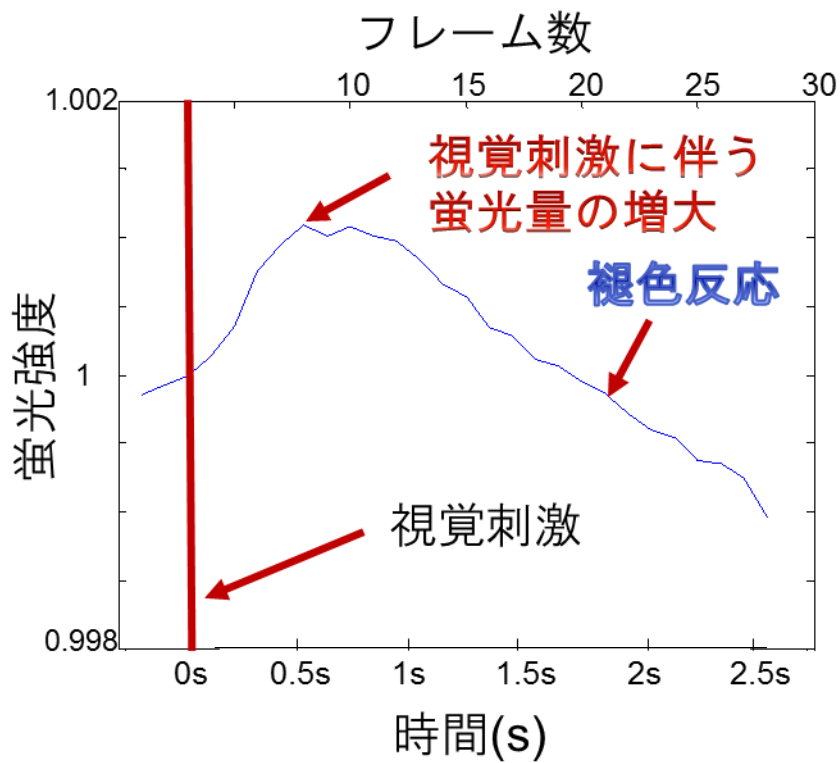


図 5-7 埋植型イメージングデバイスによるフラビン蛋白蛍光計測結果

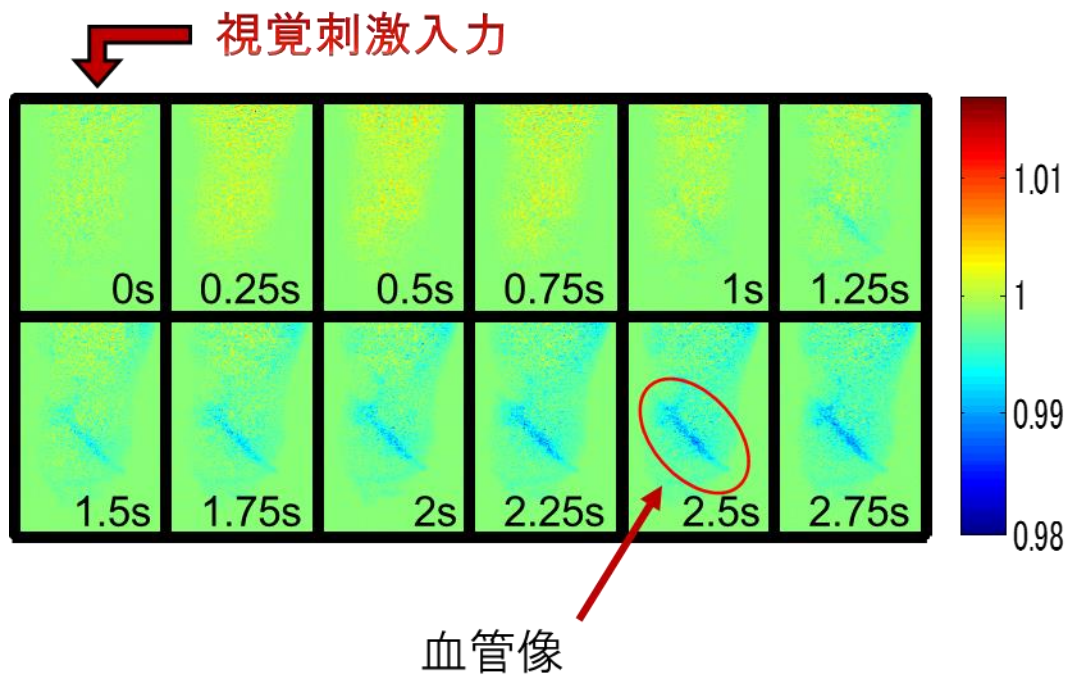


図 5-8 埋植型イメージングデバイスによるフラビン蛋白蛍光計測結果

5.5 GCaMP イメージング実験

5.5.1 GCaMP イメージング

GCaMP とは GFP 蛍光の強度変化を観察することで、細胞内のカルシウムイオン濃度の変動を追うことができる蛍光カルシウムイオンプローブの 1 種である [38]. GCaMP は EGFP と非常によく似たスペクトル特性を持っており、励起波長の極大 489nm, 蛍光波長の極大は 509nm である. カルシウムがない状態でも微弱的な蛍光を発しており、カルシウムの有無により蛍光強度は最大で何十倍もの蛍光強度変化を示す. GCaMP が開発される以前にもカルシウムイオン濃度変化を追うことができる同種のバイオセンサーは開発されていたものの、GCaMP は他の約 30 倍もカルシウムイオンに対する感受性が高く、従来のバイオセンサーでは観察できなかった現象の観察をも可能としている. 例えば、培養したマウスの筋肉細胞において GCaMP を用いてカルシウムイオンの濃度の変化を観察したところ、顕微鏡を通して肉眼でも細胞内のカルシウムイオンの濃度が上昇する様子をリアルタイムに観察することに成功したという報告がある. このように、GCaMP 蛍光イメージングは神経活動計測において非常に重要な役割を担っていると言える. さらに、近年では GCaMP をさらに改良した GCaMP3, GCaMP6, GCaMP8 といった新しいシリーズが開発されていることから、GCaMP 系統の蛍光反応を自由行動下で観察可能なイメージングデバイスの開発は非常に有用であると考えられる.

5.5.2 実験動物と手術

本実験における埋植型イメージングデバイスの埋植手術は、基本的には頭蓋骨を除去して脳表を露出させる過程までフラビン蛋白蛍光イメージング実験と同様である. ただし、本実験で用いた麻酔はイソフルランであり、吸入マスクを用いて常時麻酔を吸入している状態で手術及びイメージング実験を行った. 脳表を露出させた後、埋植型イメージングデバイスを大脳皮質視覚野領域に設置し、麻酔から覚醒後に行動下実験を行うことを見越しデバイスの固定を行った. デバイスの固定は歯科用セメントを用いてデバイスのフレキシブル基板部分を頭蓋骨に固定した. さらに、埋植型イメージングデバイスに外部からの光が入ることがないように、歯科用セメントが硬化後セメント表面に黒色の色素を塗り付けることで、外部光の遮光を試みた. 以上の手術に、マウスの頭皮を接着した. 図 5-9 に手術後の写真を示す. これらの処置を行っても、マウスの覚醒後の様子を見る限りデバイスを設置したことによる行動制限や生体への影響は観察されなかった.

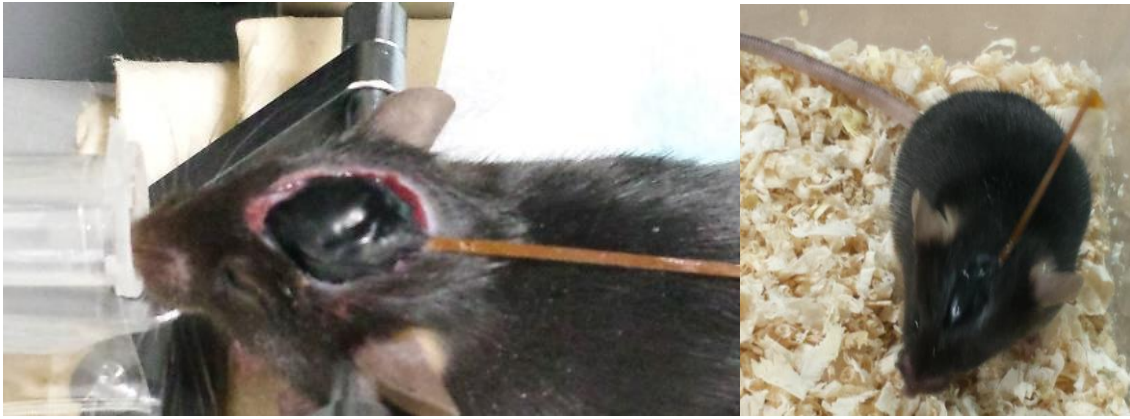


図 5-9 イメージングデバイスの埋植後

5.5.3 視覚刺激表示とイメージングデバイスの連動システム

本実験では、フラビン蛋白蛍光イメージングと同様に、マウスに対して定期的に視覚刺激を与える必要がある。フラビン蛋白蛍光イメージング実験では、LEDの制御に関しても MATLAB のプログラムからトリガー信号を出力しスイッチとすることで、視覚刺激表示の 8 秒前から 5 秒後の 13 秒間のみ LED を点灯させるように設定していたが、本実験では連動させず常時点灯している状態とした。本実験で用いる GCaMP はフラビン蛋白蛍光と異なり、蛍光褪色の影響を考えなくて良いためである。よって MATLAB の視覚刺激表示時にトリガー信号をイメージングデバイスの制御回路へ入力する部分のみを連動させるだけでよく、これについてはフラビン蛋白蛍光イメージングのために開発した連動システムをそのまま流用した。以上に記した LED を常時点灯しておくという条件以外は、全てフラビン蛋白蛍光イメージング実験と同様のセットアップとした。

5.5.4 GCaMP イメージング実験の解析

解析についてもフラビン蛍光イメージングと同様に、専用の解析プログラム (Visual C++)により解析した。取得した 10~20 試行分のデータを加算平均処理し、心拍ノイズ等のノイズ成分を除去した。加算平均処理は、視覚刺激開始時を基準とし刺激前 40 フレーム、刺激後 160 フレームの合計 201 フレームを加算平均処理した。GCaMP イメージングで得られた蛍光変化反応はフラビン蛋白蛍光に比べ変化率が大きかったため、リアルタイムイメージングで十分に解釈可能なデータを取得することができた。

5.6 埋植型イメージングデバイスによる GCaMP イメージング実験

GCaMP イメージングは、遺伝子改変やウイルスインジェクションを用いてマウスに GCaMP を導入することで、様々な脳の部位を特異的に観察することが可能である。本研究の第 4 章で開発した遮光フィルタ搭載埋植型イメージングデバイスの性能評価を含め、*in vivo* 条件下における GCaMP イメージング実験を行ったので、実験内容と結果を以下にまとめる。

本実験では、本研究で開発し 4 章で説明した遮光フィルタ搭載埋植型イメージングデバイスを用いて、視覚刺激に伴う GCaMP イメージング実験を行った。埋植型イメージングデバイスを直接左脳の視覚野に設置し、マウスの右目に対する視覚刺激入力に伴う蛍光の変化を計測した。視覚刺激にはフラビン蛋白蛍光イメージング実験と同様に、白黒の格子状の画像を表示し、視覚野の神経細胞活性化させる手法を採用した。本実験ではマウスの右眼の正面に視覚刺激表示モニターを設置し、右目のみに視覚刺激が入力されるような条件とした。また、埋植型イメージングデバイスに対する視覚刺激表示画面からの光の影響を回避するため、本実験では埋植型イメージングデバイスを固定した歯科用セメントを黒く塗ったうえで頭皮を閉じ、遮光できるようにした。これは、麻酔下実験後に行動下実験を行うことを見越しての処置である。

本実験においても、視覚刺激前後の蛍光変化を測定した。フラビン蛋白の蛍光と異なり、GCaMP では褪色反応があまり見られないため、本実験では LED を実験中常時点灯しているように設定した。蛍光が回復する時間を待つ必要もないため、試行と試行の間は 4 秒とし実験を行った。本実験では LED は常時点灯しているが、イメージングプログラムへのトリガー信号入力は視覚刺激プログラムと連

動システムによって制御した。20回の試行を行った後、得られたデータを用いて加算平均処理を行った。

本実験では GCaMP が撮像領域左中央付近に特に強く発現しており、その周囲 5 点を注目画素と設定した。GCaMP が発現している部位周辺に設定した 5 つの注目画素のリアルタイムデータと、20 試行分の加算平均処理を行い得られた蛍光強度変化の取得画像を図 5-10(a), (b)にそれぞれ示す。図 5-10 から見て取れる通り、視覚刺激後に蛍光強度の増加反応が観察された。この反応は、先行研究で報告されている蛍光顕微鏡を用いて得られる結果とほぼ一致しており [39]、また視覚刺激を入力しなかった場合、この増加反応は観察できなかった。よって、本実験で観察された蛍光強度の増加反応は視覚刺激の反応に伴う蛍光反応だと考えられる。以上の結果から、本研究で開発した埋植型イメージングデバイスを用いて、マウス視覚野における視覚刺激に伴う GCaMP 蛍光変化のリアルタイムイメージングが可能であることを実証した。さらに、これまでの課題であった LED 近傍領域の励起光漏れの影響も十分に低減できており、従来よりも広範囲にわたるイメージングが可能となっていることが見て取れる。図また、本実験では加算平均処理を行わずとも、十分に反応していることが分かるくらいの蛍光強度変化を取得できていた。この結果から、自由行動下マウスに対する実験において多少行動由来のノイズが増えても、視覚刺激に伴う GCaMP 蛍光イメージングができると期待される。本実験に関する考察は、本章末にまとめる。続いて、行動下マウスに対する GCaMP 蛍光イメージング実験に取り組みについて説明する。

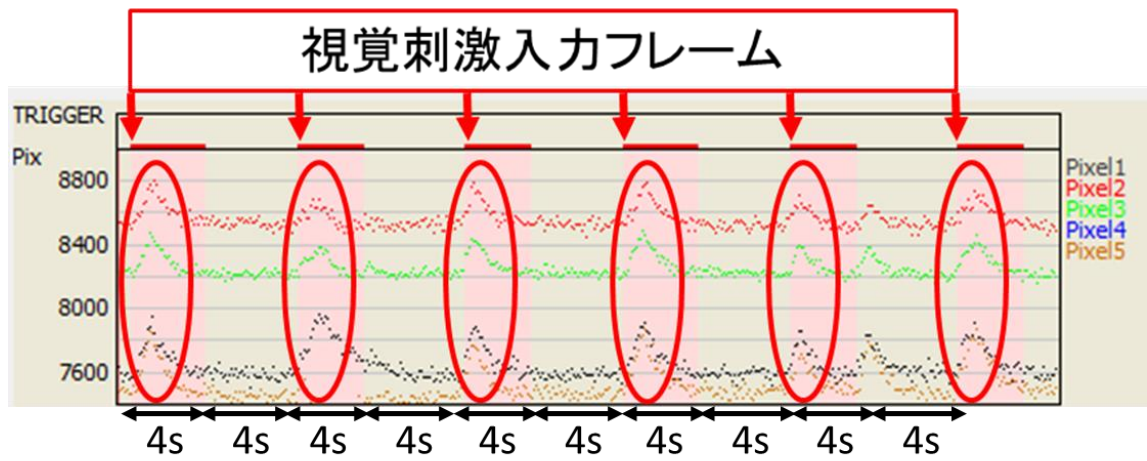


図 5-10(a) GCaMP 蛍光強度変化のリアルタイムデータ

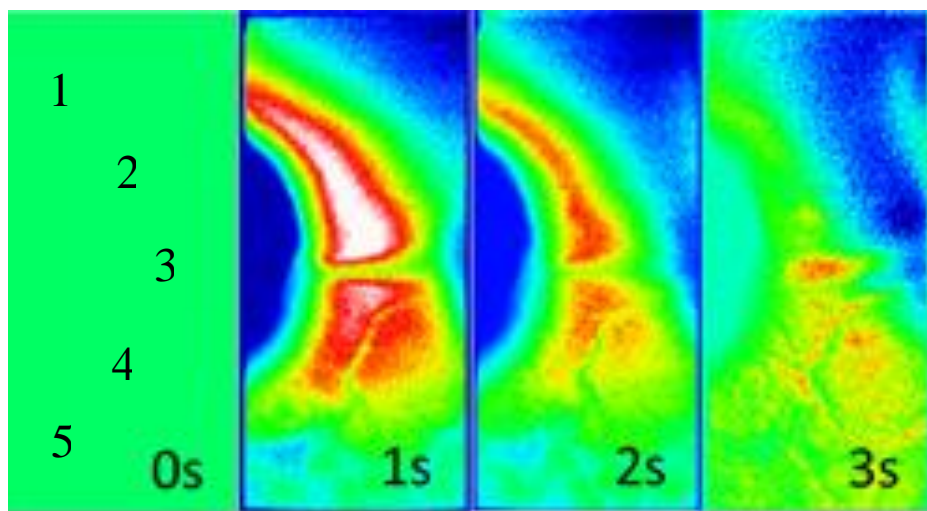


図 5-10(b) GCaMP 蛍光強度変化の取得画像

5.7 行動下 GCaMP 蛍光イメージング実験

ここでは、トレッドミルを用いた行動下 GCaMP 蛍光イメージング実験を行ったので実験内容について説明する。埋植型イメージングデバイスをマウスに埋植後、イソフルラン麻酔の吸入を止め、完全に覚醒させてからトレッドミルを用いた行動下における GCaMP 蛍光イメージング実験を行った。本実験はトレッドミルの前方に視覚刺激表示用のモニターを設置し、マウスがトレッドミル前方を歩行中に視覚刺激を表示し、刺激に伴う GCaMP 蛍光強度変化の計測を達成することが目的である。

麻酔から覚醒するまでの間は中継基板や制御基板には接続せず、埋植型イメージングデバイスのみをマウスに埋め込んだ状態で放置し、回復を待った。本実験で用いたイソフルラン麻酔は吸入を止めると短時間で覚醒させることができる麻酔である。しかし、イソフルランの吸入時間が長いほどやはり覚醒しにくくなることが知られているため、本実験では完全に麻酔から覚醒させるため、念のため術後3時間以上経過してから実験を行った。

本実験では、マウスに埋植したイメージングデバイスを端子変換コネクタだけを搭載した軽量タイプの中継基板にデバイスと制御基板を接続し、中継基板も浮かせた状態にすることで、マウスに対し負担をかけることなく行動できるようなセットアップとした。セットアップ後のマウスの様子を図 5-11 に示す。

本実験結果であるが、マウスの脳に発現している GCaMP 蛍光の検出には成功したものの、麻酔下で得られたような視覚刺激に伴う蛍光強度変化の計測データを得ることはできなかった。主な原因として、トレッドミルを自由に歩行するマウスへ一様な視覚刺激を入力するのが困難であることと、行動に由来するノイズが主な問題だと考えている。本実験では行動中のマウスに対しても視覚刺激を入力できるように、トレッドミルを用いることでマウスの行動をある程度制限することを試みた。しかし、刺激の瞬間マウスが後ろを向いてしまったり、立ち上がってしまったりと、一定の条件で刺激入力を行うのが困難であった。脳神経活動には自発発火と呼ばれる流動的に発生する神経活動が存在する。一様な刺激・計測を行える条件で計測を行わないと計測したデータが刺激入力によるものなのか自発発火によるものなのかを区別することが困難である。このため、行動下実験によるデバイス評価を行うためには、一様な刺激入力・計測が可能な実験系を構築することが重量となる。

また、行動由来のノイズについてはマウスがトレッドミルを歩行することに起因するイメージングへの障害はほとんど見られなかったが、中継基板周辺の配線部を手や足でいじられると少々ノイズが見られた。この問題に対しては、イメー

ジニング実験時にマウスの行動も録画し，マウスの行動によるノイズが混入したデータを除去することで解決することが可能だと考えられる．よって今後埋植型イメージングデバイスを用いた行動下イメージングを実現するためには，マウスに対し一定の条件で刺激を入力することが可能な実験系を構築することが最も重要であると考えられる．

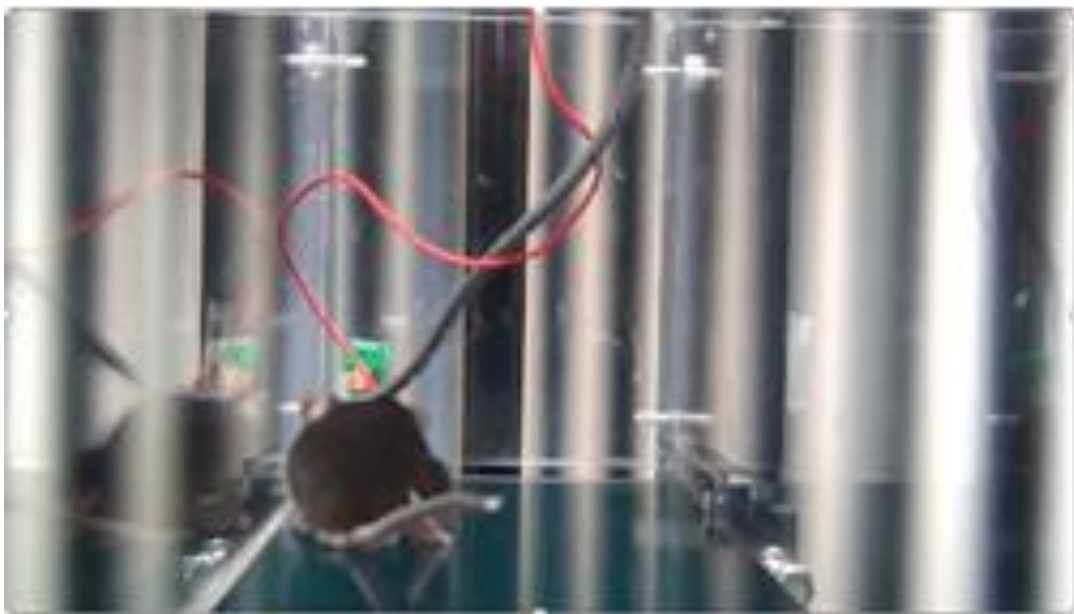


図 5-11 トレッドミルを用いた行動実験

5.8 考察とまとめ

本研究で開発した埋植型 CMOS イメージングデバイスを用いた行動下における脳神経活動計測の実現へ向け、動物実験を行った。 *in vivo* 環境下で蛍光イメージングが可能か性能を実証すべく、フラビン蛋白蛍光イメージングと GCaMP イメージングに取り組んだ。

まず本研究で開発した励起フィルタ・蛍光フィルタ搭載埋植型イメージングデバイスでフラビン蛋白蛍光イメージングが可能であることを実証するため、デバイスを麻酔下のマウス脳視覚野に固定し、視覚刺激に伴うフラビン蛋白の蛍光強度変化反応の観察実験を行った。マウス前方に設置したモニターから出力される視覚刺激前後の蛍光強度を測定したところ、視覚刺激に伴うフラビン蛋白の蛍光強度の増大反応の観察に成功した。この反応は、先行研究で報告されている蛍光顕微鏡を用いて得られる結果とほぼ一致しており、また視覚刺激を入力しなかった場合この増加反応は観察できなかった。よって、本実験で観察された蛍光強度の増加反応は視覚刺激の反応に伴う蛍光反応だと考えられる。以上の結果から、本研究で開発した埋植型イメージングデバイスを用いることで、これまでの埋植型イメージングデバイスでは観察することができなかった 1%程度のフラビン蛋白蛍光強度変化の観察が可能であることを実証した。

先行研究からフラビン蛋白蛍光の変化量はおよそ 1%程度であることが知られているが、図 5-7 の縦軸に注目すると埋植型イメージングデバイスを用いて計測した視覚刺激に伴う蛍光量の増大反応は 0.1%前後の変化率であることが見て取れる。この変化率の差は背景光強度の差、及び背景光の処理プログラムの差が理由であると考えられる。本実験結果は埋植型イメージングデバイスから得られた測定結果を、蛍光顕微鏡に搭載された CCD カメラ用の解析プログラムに適用して得られた結果である。埋植型イメージングデバイスを用いた計測では背景光強度、すなわち励起光漏れ強度が蛍光顕微鏡よりも大きいため、フラビン蛋白蛍光の占める割合が小さくなり、蛍光強度変化量も見かけ上小さくなってしまっていると考えられる。よって、今後は背景光をバックグラウンドとして処理し、蛍光強度変化量だけを解析するためのプログラムを構築する必要がある。

また、本研究結果は開発した埋植型イメージングデバイスを用いてフラビン蛋白蛍光の反応を最低限観察可能であることを実証した結果である。しかし、蛍光強度変化自体を観察することはできているものの、図 5-8 から見て取れる通り LED 近傍の撮像領域は励起光漏れの影響により飽和してしまっており、全くイメージングを行うことができていない。本実験結果もまた、第 4 章で説明した遮光フィルタを導入する考えに至ったきっかけの一つである。本実験では、遮光フィ

ルタを搭載していない励起フィルタ・蛍光フィルタ搭載デバイスで蛍光強度変化を観察することができることから、遮光フィルタを導入することで撮像領域全体を使った広範囲イメージングが可能になると考えられる。撮像領域全体を使った広範囲イメージングが可能になれば、神経科学の分野で重要視されるフラビン蛍光反応の生じる位置や大きさについても議論できるようになることが期待される。

続いて、本研究で開発を進めてきた遮光フィルタ搭載埋植型イメージングデバイスの性能評価を含め、*in vivo* 条件下における GCaMP イメージング実験を行った。本実験では、遮光フィルタ搭載埋植型イメージングデバイスを用いて、視覚刺激に伴う GCaMP イメージング実験を行った。本実験においても、視覚刺激に伴う蛍光強度変化の反応が検出に成功し、本研究で開発した埋植型イメージングデバイスを用いて、GCaMP 蛍光のリアルタイムイメージングが可能であることを実証した。さらに、これまでの課題であった LED 近傍領域の励起光漏れの影響も十分に低減できており、従来よりも広範囲にわたるイメージングが可能となった。リアルタイムイメージングが可能な蛍光検出性能を達成できていることから、行動下計測を実現することができれば行動に伴う神経活動計測用のデバイスとして、神経科学の分野における非常に強力なツールとなることが期待される。

最後に、トレッドミルの前方に視覚刺激表示用のモニターを設置し、マウスがトレッドミル前方に来た際に視覚刺激を表示し、刺激に伴う GCaMP 蛍光の強度変化の計測実験を行った。本実験ではマウスの行動をうまく制御できず、マウスに対し一様な視覚刺激を与えることが困難であった。麻酔下実験で得られた GCaMP の蛍光反応強度は加算平均処理を行わずとも、十分に反応していることが分かるくらいの蛍光強度変化を取得できていたことから、視覚刺激を一様に与えることができる実験系を確立することができれば、自由行動下における GCaMP イメージングの実現に大きく近づくと考えられる。マウスの視覚応答を計測するための先行研究において、マウスにプリズムゴーグルを装着する手法が報告されている。そこで、埋植型イメージングデバイスに使用しているような LED チップを搭載したゴーグルを作製しマウスの眼前に装着することで、任意のタイミングでマウスに光刺激を与えることができるような実験系が有効であると考えられる。最終的には神経科学の分野で行われている様々な行動実験に適用できるようにすることが求められるが、まずは上記のような実験系を構築し、行動下における GCaMP 蛍光イメージングが可能であることを実証することが必要だと考えられる。

第6章 結論

6.1 本研究の成果

本研究では、自由行動下マウスの脳神経活動計測に向けた埋植型CMOSイメージングデバイスの開発を目指し、蛍光計測の高感度化を主な目標として研究を行った。本研究では蛍光イメージングに適したCMOSイメージセンサの設計、光学系の改良、実装方法の改良に取り組んだ。特に、CMOSイメージングデバイスの励起光除去性能を向上させるフィルタの開発と実装方法の確立に注力し、従来よりも高感度蛍光計測を可能とする埋植型イメージングデバイスの開発を達成した。また開発したイメージングデバイスを生体模擬環境下及び*in vitro*, *in vivo*環境下において性能評価実験を行った。*in vivo*環境下における動物実験では、実際にマウス脳大脳皮質における視覚刺激に伴うフラビン蛋白の蛍光強度変化反応と、GCaMP蛍光の強度変化反応の計測が可能であることを実証した。本研究の成果により、フラビン蛋白蛍光の1%程度の蛍光強度変化を検出可能とし、また視覚刺激に伴うGCaMP蛍光強度変化反応をリアルタイムでイメージング可能とするレベルまで、蛍光計測用埋植型CMOSイメージングデバイスの高感度化を実現した。

本研究で行った実験によって得た具体的な成果を以下にまとめる。

・ 蛍光計測用埋植型イメージングデバイスの開発

マウスやラットといった小動物の頭部に埋植可能なサイズの、蛍光計測用超小型CMOSイメージングデバイスを開発した。デバイスの重量は0.02gであり、成体マウスの1/1,000の重量を実現している。励起光源であるチップLEDの不要波長成分を除去する励起フィルタを導入し、蛍光フィルタと組み合わせることでGFP観察に求められる励起光除去性能 10^{-5} を達成した。またマウス脳スライスにおけるGFP発現細胞を観察可能であることを実証した。続いてイメージセンサ側面から入射する励起光を除去するための遮光フィルタを新たに作製、導入した。これにより励起光漏れを従来の10%以下に低減し、イメージセンサの撮像領域全体を用いた広範囲イメージングを実現した。

・ フラビン蛋白蛍光イメージング実験によるデバイスの性能実証

本研究で開発した励起フィルタ・蛍光フィルタ搭載埋植型イメージングデバイスの性能実証として、マウス脳におけるフラビン蛋白蛍光イメージング実験を行った。デバイスを麻酔下のマウス脳視覚野に固定し、視覚刺激に伴うフラビン蛋白の蛍光強度変化反応を観察した。マウス前方に設置したモニターから出力される視覚刺激前後の蛍光強度を測定したところ、視覚刺激に伴うフラビン蛋白の蛍光強度変化の観察に成功した。この結果から、励起フィルタ・蛍光フィルタ搭載埋植型イメージングデバイスを用いることで、1%程度のフラビン蛋白蛍光の強度変化を計測可能であることを実証した。

・ GCaMP蛍光イメージング実験によるデバイスの性能実証

本研究で開発した遮光フィルタ搭載埋植型イメージングデバイスの性能実証として、視覚刺激に伴う*in vivo* GCaMP蛍光イメージング実験を行った。遮光フィルタ搭載埋植型イメージングデバイスを直接マウス脳視覚野に固定し、マウスへの視覚刺激入力前後の蛍光強度を計測し、視覚刺激に伴うGCaMP蛍光変化の観察が可能であることを実証した。また、これまでの課題であったLED近傍領域の励起光漏れの影響も十分に低減できており、従来よりも広範囲にわたるイメージングが可能となっていることを実証した。さらに、本実験では加算平均処理を行わずとも、リアルタイムイメージングで十分に蛍光強度変化を観察可能であるレベルの蛍光検出性能を達成した。

・ トレッドミルを用いた自由行動下における蛍光イメージング実験

本研究で開発した遮光フィルタ搭載埋植型イメージングデバイスを用いて、トレッドミルを用いた行動下マウスにおけるGCaMP蛍光イメージング実験を行った。本実験ではトレッドミルの前方に視覚刺激表示用のモニターを設置し、マウスがトレッドミル前方に来た際に視覚刺激を表示し、刺激に伴うGCaMP蛍光の強度変化の計測を試みた。結果、マウスの脳に発現しているGCaMP蛍光の検出には成功したものの、一様な視覚刺激を入力することが困難であり、視覚刺激に伴う蛍光強度変化の計測データを得ることはできなかった。マウスがトレッドミルを歩行することに起因するイメージングへの障害はほとんど見られなかったため、今後マウスに対し一定の条件で視覚刺激を入力することが可能な実験系を実現することで、行動下計測が可能になると期待される。

6.2 今後の展望

本研究では、GFPやGCaMP、フラビン蛋白といった神経活動計測に有用な緑色蛍光イメージングに向けた埋植型イメージングデバイスの開発に取り組み、従来よりも蛍光検出感度を向上させた埋植型イメージングデバイスの開発を達成した。特に脳表計測用イメージングデバイスの*in vivo*動物実験による蛍光イメージング性能の実証において、実際に神経科学の分野で行われる実験と同様の実験を行い良好なデータの取得に成功している。一方、本研究では脳深部計測用埋植型イメージングデバイスの開発にも取り組み、蛍光イメージング性能を向上させることに成功しているものの、動物実験による性能実証の実験にあまり取り組めておらず、現時点では十分なデータを取得することができていない。本研究で開発している脳深部計測用埋植型イメージングデバイスは、世界的にもあまり存在しない自由行動下動物に対し、脳深部蛍光イメージングを行うことが可能なデバイスである。よって脳深部計測用埋植型イメージングデバイスを用いて神経活動計測において汎用性の高いGCaMP蛍光の自由行動下計測を実現すれば、神経メカニズムや脳疾患の原因解明に向けた強力なツールとなると考えられる。例えば、埋植型イメージングデバイスが小型、軽量であるというアドバンテージを活かすことで、他のイメージング手法では計測が困難な成長過程の体の小さなマウスの行動下計測や複数部位の同時計測に取り組むことで、未だ解明されていない成長に伴う神経メカニズムや、脳のネットワークの解明への足掛かりとなることが期待される。今後は積極的に脳深部計測用埋植型イメージングデバイスを用いて、本研究で行ったようなマウスの脳神経活動に伴う蛍光イメージング実験を行っていくことが重要だと考えられる。

本論文の5章で説明したフラビン蛋白蛍光イメージング実験は、本研究で開発した励起フィルタを搭載した緑色蛍光計測用埋植型イメージングデバイスを用いて実験を行っている。本実験結果を踏まえ、新たに遮光フィルタ付き埋植型イメージングデバイスを開発したため、フラビン蛋白蛍光イメージングにおいても遮光フィルタを導入することでより精度の高いイメージング結果が得られるようになることが期待される。また、本論文の実験では励起フィルタを搭載した埋植型イメージングデバイスはGFP計測にも使用できるよう、中心波長470nmのLEDを励起光源として使用している。しかし、フラビン蛋白の吸収波長のピークは450nm付近にあるため、搭載するLEDを中心波長450nmのものに変更することで、蛍光フィルタを透過する励起光成分も減り、さらに精度の高い蛍光イメージングができるようになると考えられる。今後は以上に記したように埋植型イメージングデバイスを実装し、再度フラビン蛋白蛍光イメージング実験を行う予定である。

本論文の最後に記載したトレッドミルを用いた行動下における蛍光イメージング実験において、マウスの脳に発現している GCaMP 蛍光の検出には成功した物の、麻酔下で得られたような視覚刺激に伴う蛍光強度変化の計測データを得ることはできていない。麻酔下マウスにおける GCaMP イメージング実験にて得られた蛍光反応の大きさから考えると、配線を噛まれたり引っ張られない限り心拍や歩行によるノイズは問題にならないレベルだと考えられる。無線通信及び無線給電を実現することができれば、完全自由行動下のマウスに対する脳機能計測を可能とする革新的なデバイスとなるが、現時点ではマウスに搭載可能なサイズで画像データの無線通信を実現するのは困難である。現時点ではマウスが触れることができない位置に配線を搭載し、マウスに対し一定の条件で刺激入力を行うことが可能な実験系を確立することが最も重要な課題であると考えられる。そこで、トレッドミルを用いた視覚刺激に伴う蛍光変化の観察実験は最終目的とし、まずはより簡単な実験系で自由行動下 GCaMP 蛍光イメージングが可能であることを実証することを目指す。トレッドミルを用いた行動した実験で分かったことであるが、マウスの行動を思い通りに制限することは困難である。よって、マウスがどのような行動をしていても視覚刺激を与えることができる実験系が求められる。このような条件を満たす方法として、例えば透明な立方体の箱にマウスを入れ、6面全てに視覚刺激用モニターを搭載し 360°どこを向いていても刺激を与えることができるような実験系や、マウスの眼前に LED を搭載したゴーグルを装着させるといった実験系が考えられる。今後は上記のような実験系の準備を行い、改めて行動下における蛍光イメージングが可能であることを実証する実験を行う予定である。

発表目録

【学術論文】

1. **Yoshinori Sunaga**, Hiroshi Yamaura, Makito Haruta, Takahiro Yamaguchi, Mayumi Motoyama, Yasumi Ohta, Hiroaki Takehara, Toshihiko Noda, Kiyotaka Sasagawa, Takashi Tokuda, Yumiko Yoshimura, Jun Ohta, "Implantable imaging device for brain functional imaging system using flavoprotein fluorescence," *Jpn. J. Appl. Phys.*, 55, 3S2, 2016.
2. Makito Haruta, **Yoshinori Sunaga**, Takahiro Yamaguchi, Hironari Takehara, Toshihiko Noda, Kiyotaka Sasagawa, Takashi Tokuda, Jun Ohta, "Intrinsic signal imaging of brain function using a small implantable CMOS imaging device," *Jpn. J. Appl. Phys.*, 54, 4S, 2015.
3. Takahiro Yamaguchi, **Yoshinori Sunaga**, Makito Haruta, Mayumi Motoyama, Yasumi Ohta, Hiroaki Takehara, Toshihiko Noda, Kiyotaka Sasagawa, Takashi Tokuda, Jun Ohta, "Fluorescence imaging under background light with a self-reset CMOS image sensor," *The Journal of Engineering*, Nov. 2015.
4. Makito Haruta, Chikara Kitsumoto, **Yoshinori Sunaga**, Hironari Takehara, Toshihiko Noda, Kiyotaka Sasagawa, Takashi Tokuda, Jun Ohta, "An implantable CMOS device for blood-flow imaging under freely moving experiments of rats," *Jpn. J. Appl. Phys.*, 53,4S, 2014.
5. Takahiro Yamaguchi, Hiroaki Takehara, **Yoshinori Sunaga**, Makito Haruta, Mayumi Motoyama, Yasumi Ohta, Toshihiko Noda, Kiyotaka Sasagawa, Takashi Tokuda, Jun Ohta, "Implantable self-reset CMOS image sensor and its application to hemodynamic response detection in living mouse brain," *Jpn. J. Appl. Phys.*, 55, 4S, 2016
6. Kiyotaka Sasagawa, Takahiro Yamaguchi, Makito Haruta, **Yoshinori Sunaga**, Hironari Takehara, Hiroaki Takehara, Toshihiko Noda, Takashi Tokuda, and Jun Ohta, "An Implantable CMOS Image Sensor with Self-Reset Pixels for Functional Brain Imaging," *IEEE Trans. Electron Dev.*, vol. 63, no. 1, pp. 215-222, Jan. 2016

【国際会議における発表】

1. **Yoshinori Sunaga**, Chikara Kitsumoto, Mayumi Motoyama, Yasumi Ohta, Toshihiko Noda, Kiyotaka Sasagawa, Yasuyuki Ishikawa, Takashi Tokuda, Sadao Shiosaka, Jun Ohta, "Needle Type CMOS Imaging Device for Fluorescence Imaging of Deep Brain Activities," The 10th Conference on Lasers and Electro-Optics Pacific Rim(CLEO-PR 2013), Jul. 2, 2013, Kyoto International Conference Center, Kyoto, Japan.
2. **Yoshinori Sunaga**, Makito Haruta, Hironari Takehara, Mayumi Motoyama, Yasumi Ohta, Toshihiko Noda, Kiyotaka Sasagawa, Takashi Tokuda, Jun Ohta, "Implantable CMOS imaging device with absorption filters for green fluorescence imaging," Photonics West, Feb. 2, 2014, The Moscone Center San Francisco, California, United States.
3. **Yoshinori Sunaga**, Makito Haruta, Takahiro Yamaguchi, Mayumi Motoyama, Yasumi Ohta, Hiroaki Takehara, Toshihiko Noda, Kiyotaka Sasagawa, Takashi Tokuda, Jun Ohta, "An Implantable Green Fluorescence Imaging Device Using Absorption Filters with High Excitation Light Rejection Ratio," Biomedical Circuits and Systems Conference (BioCAS 2014), Oct. 23, 2014, SwissTech Convention Center, Lausanne, Switzerland.
4. **Yoshinori Sunaga**, Makito Haruta, Takahiro Yamaguchi, Mayumi Motoyama, Yasumi Ohta, Toshihiko Noda, Kiyotaka Sasagawa, Takashi Tokuda, Jun Ohta, "Improvement in excitation light rejection performance of an implantable CMOS imaging device for GFP imaging," GNN Joint Symposium on Advanced Materials, November 2014, Korea.
5. **Yoshinori Sunaga**, Hiroshi Yamaura, Makito Haruta, Takahiro Yamaguchi, Mayumi Motoyama, Yasumi Ohta, Hiroaki Takehara, Toshihiko Noda, Kiyotaka Sasagawa, Takashi Tokuda, Yumiko Yoshimura and Jun Ohta, "Implantable Imaging Device for Brain Functional Imaging System using Flavoprotein Fluorescence," *M&BE8*, Jun. 22, 2015, Fnabori Tower hall, Tokyo, Japan
6. **Yoshinori Sunaga**, Hiroshi Yamaura, Makito Haruta, Takahiro Yamaguchi, Mayumi Motoyama, Yasumi Ohta, Hiroaki Takehara, Toshihiko Noda, Kiyotaka Sasagawa, Takashi Tokuda, Yumiko Yoshimura and Jun Ohta, "Improvement of green fluorescence imaging system based on implantable CMOS imaging device for freely moving mice," Neuroscience2015 SfN 45th annual meeting, Oct. 21, 2015, McCormick Place Convention Center, Chicago, USA.
7. **Yoshinori Sunaga**, Makito Haruta, Takahiro Yamaguchi, Yuji Katsuragi, Hiroaki Takehara, Toshihiko Noda, Kiyotaka Sasagawa, Takashi Tokuda and Jun Ohta, "Implantable Micro Imaging Device for Weak Fluorescence Imaging in Feely Moving

Mice,” 10th FENS Forum of Neuroscience, Jul. 5, 2016, Bella Center, Copenhagen, Denmark

8. **Yoshinori Sunaga**, Makito Haruta, Takahiro Yamaguchi, Hiroaki Takehara, Toshihiko Noda, Kiyotaka Sasagawa, Takashi Tokuda and Jun Ohta, “Highly sensitive implantable imaging device for flavoprotein fluorescence imaging,” SfN Annual Meeting 2016, Nov. 13, 2016, San Diego Convention Center, San Diego, USA
9. Makito Haruta, Yoshinori Sunaga, Takahiro Yamaguchi, Toshihiko Noda, Kiyotaka Sasagawa, Takashi Tokuda, Jun Ohta, “An implantable imaging device for observing the recovery process from cerebrovascular disease in small animal brains,”Green 2016, 4, Dec. 23, TaiPei, Taiwan
10. Takahiro Yamaguchi, Yoshinori Sunaga, Makito Haruta, Toshihiko Noda, Kiyotaka Sasagawa, Takashi Tokuda, Jun Ohta, “A packaging method for an implantable brain-machine interface device with a thin film substrate,” International Conference on Bio4Apps, Dec. 14, Griffith University, Australia
11. Kiyotaka Sasagawa, Takahiro Yamaguchi, Makito Haruta, Yoshinori Sunaga, Hironari Takehara, Mayumi Motoyama, Yasumi Ohta, Hiroaki Takehara, Toshihiko Noda, Takashi Tokuda, Jun Ohta, "Image processing technique for an implantable image sensor with self-resetting function," Neuroscience2015 SfN 45th annual meeting, Oct. 18, 2015, McCormick Place Convention Center, Chicago, USA
12. Makito Haruta, Yoshinori Sunaga, Takahiro Yamaguchi, Hironari Takehara. Yasumi Ohta, Mayumi Motoyama, Hiroaki Takehara, Toshihiko Noda, Kiyotaka Sasagawa, Takashi Tokuda, Jun Ohta., "An implantable hemodynamic imaging device for revealing relation between a blood flow and brain activity in animal behavior," Neuroscience2015 SfN 45th annual meeting, Oct. 21, 2015, McCormick Place Convention Center, Chicago, USA
13. Takahiro Yamaguchi, Yoshinori Sunaga, Makito Haruta, Hiroaki Takehara, Toshihiko Noda, Kiyotaka Sasagawa, Takashi Tokuda, Jun Ohta , "Improvement of Power Consumption and SNR of Self-reset Pixels for an Implantable CMOS Image Sensor," 2015 International Conference on Solid State Devices and Materials, Sep. 28, 2015, Sapporo Convention Center
14. Makito Haruta, Yoshinori Sunaga, Takahiro Yamaguchi, Hironari Takehara, Yasumi Ohta, Mayumi Motoyama, Hiroaki Takehara, Toshihiko Noda, Kiyotaka Sasagawa, Takashi Tokuda, and Jun Ohta, "An Implantable Hemodynamic Imaging Device for Observing the Process of Recovery from Cerebrovascular Disease," 37th Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society, Aug. 28, 2015, MiCo, Milano Conference Center

15. Makito Haruta, Yoshinori Sunaga, Hiroaki Takehara, Toshihiko Noda, Kiyotaka Sasagawa, Takashi Tokuda, and Jun Ohta, "An implantable hemodynamic imaging device with a two-color light source for observing two brain phenomena," (invited) 2015 INTERNATIONAL SYMPOSIUM FOR ADVANCED MATERIALS RESEARCH, Aug. 19, 2015, SUN MOON LAKE TEACHERS' HOSTEL
16. Makito Haruta, Yoshinori Sunaga, Takahiro Yamaguchi, Hironari Takehara, Toshihiko Noda, Kiyotaka Sasagawa, Takashi Tokuda, Jun Ohta, "A multi-modal implantable CMOS imaging device with two-color light source for intrinsic signal detection in a brain," International Conference on Solid State Devices and Materials (SSDM), D-7-3, Sep. 11, 2014, Tsukuba International Congress Center
17. Takahiro Yamaguchi, Yoshinori Sunaga, Makito Haruta, Toshihiko Noda, Kiyotaka Sasagawa, Takashi Tokuda, Jun Ohta, "Noise Performance of an Implantable Self-reset CMOS Image Sensor," (poster), The 2014 International Meeting for Future of Electron Devices, Kansai (IMFEDK2014), PC-03, Jun. 19, 2014, Ryukoku University Avanti Kyoto Hall, Kyoto, JAPAN
18. Makito Haruta, Chikara Kitsumoto, Yoshinori Sunaga, Hironari Takehara, Toshihiko Noda, Kiyotaka Sasagawa, Takashi Tokuda, Jun Ohta, "Implantable device for intrinsic signals imaging in cortices of freely moving rats," Neuroscience2013, MMM11 871.15, Nov. 13, 2013, San Diego Convention Center, USA
19. Makito Haruta, Yoshinori Sunaga, Takahiro Yamaguchi, Hironari Takehara, Toshihiko Noda, Kiyotaka Sasagawa, Takashi Tokuda, Jun Ohta, "Development of an Implantable Imaging Device for Observation of Intrinsic Signals in the Brain," International Conference on BioSensors, BioElectronics, BioMedical Devices, BioMEMS/NEMS and Applications 2013 (Bio4Apps 2013) , PM-3, Oct. 30, 2013, Tokyo Medical and Dental University, Japan.
20. Makito Haruta, Chikara Kitsumoto, Yoshinori Sunaga, Hironari Takehara, Toshihiko Noda, Kiyotaka Sasagawa, Takashi Tokuda, Jun Ohta, "Functional brain imaging under freely moving experiments by an implantable CMOS imaging device," Asian Symposium on Advanced Image Sensors and Imaging Systems, Oct. 8, 2013, Shizuoka University, JAPAN
21. Makito Haruta, Chikara Kitsumoto, Yoshinori Sunaga, Hironari Takehara, Toshihiko Noda, Kiyotaka Sasagawa, Takashi Tokuda, Jun Ohta, "An implantable CMOS device for functional brain imaging under freely moving experiments of rat," 2013 International Conference on Solid State Devices and Materials (SSDM), G-1-5, Sep. 25, 2013, Hilton Fukuoka Sea Hawk, JAPAN
22. Jun Ohta, Chikara Kitsumoto, Makito Haruta, Yoshinori Sunaga, Toshihiko Noda,

Kiyotaka Sasagawa, Takashi Tokuda, Mayumi Motoyama, Yasumi Ohta, "A Low-Invasive Micro Imaging Device for Measuring Neural Activities Implanted in the Mouse Deep Brain," 2013 International Image Sensor Workshop (IISW2013) , 7.05, Jun. 14, 2013, Snowbird Ski & Summer Resort, Utah, USA

23. Makito Haruta, Chikara Kitsumoto, Yoshinori Sunaga, Hironari Takehara, Toshihiko Noda, Kiyotaka Sasagawa, Takashi Tokuda, Jun Ohta , "Intrinsic Optical Signal Imaging Based on Blood Flow with a Biomedical Photonic LSI," Seventh International Conference on Molecular Electronics and Bioelectronics (M&BE7), D-O7, Mar. 19, 2013, Fukuoka International Congress Center

【国内学会における発表】

1. 須永 圭紀, 春田 牧人, 山口 貴大, 桂木 優治, 竹原 宏明, 野田 俊彦, 笹川 清隆, 徳田 崇, 太田 淳, “埋植型イメージングデバイスの高画質化に向けた光学系の改善”, LSI とシステムのワークショップ 2016, 38, 2016/5/7 日, 東京大, 生産技術研究所
2. 須永 圭紀, 春田 牧人, 山口 貴大, 桂木 優治, 竹原 宏明, 野田 俊彦, 笹川 清隆, 徳田 崇, 太田 淳, “埋植型デバイスによる広範囲イメージングに向けた励起光除去性能改善,” 応用物理学会春季学術講演会, 20p-W331-5, 2016/3/20, 東工大 大岡山キャンパス.
3. 須永 圭紀, 山浦 洋, 春田 牧人, 山口 貴大, 元山 真由美, 太田 安美, 竹原 宏明, 野田 俊彦, 笹川 清隆, 徳田 崇 吉村 由美子, 太田 淳, “埋植型 CMOS デバイスを用いたフラビン蛋白蛍光イメージング,” 応用物理学会秋季学術講演会, 2015/9/15, 名古屋国際会議場
4. 須永 圭紀, 春田 牧人, 山口 貴大, 元山 真由美, 太田 安美, 竹原 宏明, 野田 俊彦, 笹川 清隆, 徳田 崇, 太田 淳, “脳機能計測に向けた緑色蛍光観察用埋植型 CMOS イメージングデバイスの性能評価,” バイオ・マイクロシステム研究会, BMS-15-005, 2015/3/10, 明治大学 生田キャンパス
5. 須永 圭紀, 春田 牧人, 山口 貴大, 元山 真由美, 太田 安美, 竹原 宏明, 野田 俊彦, 笹川 清隆, 徳田 崇, 太田 淳, “自由行動下脳機能計測に向けた緑色蛍光観察用埋植型イメージングデバイス,” 応用物理学会関西支部 平成 26 年度第 3 回講演会「関西発グリーンエレクトロニクス研究の進展」, 2015/2/27, 奈良先端科学技術大学院大学, 奈良
6. 須永 圭紀, 春田 牧人, 竹原 浩成, 山口 貴大, 元山 真由美, 太田 安美, 野田 俊彦, 笹川 清隆, 徳田 崇, 太田 淳, “生体埋植型 CMOS イメージングデバイスの緑色蛍光検出感度改善,” バイオ・マイクロシステム研究会, BMS-14-5, 2014/3/12, 東京大学 本郷キャンパス
7. 須永 圭紀, 春田 牧人, 山口 貴大, 元山 真由美, 太田 安美, 野田 俊彦, 笹川 清隆, 徳田 崇, 太田 淳, “生体埋植型 CMOS イメージングデバイスに向けた緑色蛍光観察用フィルタの開発,” (ポスター 優秀講演賞), 関西学生研究論文講演会, 2014/3/10, 神戸大学
8. 須永 圭紀, 春田 牧人, 竹原 浩成, 元山 真由美, 太田 安美, 野田 俊彦, 笹川 清隆, 徳田 崇, 太田 淳, “GFP 計測用埋植型 CMOS イメージングデバイスの開発,” (ポスター), 情報フォトニクス研究会秋合宿, 2013/9/23, 研修保養施設倶楽部錦溪, 札幌
9. 須永 圭紀, 春田 牧人, 元山 真由美, 太田 安美, 野田 俊彦, 笹川 清隆, 徳田 崇, 太田 淳, “励起光波長制御による生体埋植型蛍光イメージングデバイ

- スの高感度化," 映像情報メディア学会年次大会, 15-5, 2013/8/30, 工学院大学 新宿キャンパス
10. 須永 圭紀, 橘本 力, 元山 真由美, 太田 安美, 野田 俊彦, 笹川 清隆, 徳田 崇, 石川 保幸, 塩坂 貞夫, 太田 淳, "脳深部神経活動計測のための低侵襲薄型 CMOS イメージングデバイスの開発," 応用物理学会春季講演会, 28a-G17-5, 2013/3/28, 神奈川工科大学
 11. 山口 貴大, 須永 圭紀, 春田 牧人, 竹原 宏明, 野田 俊彦, 笹川 清隆, 徳田 崇, 太田 淳, "生体埋植用イメージングシステムに向けた フレキシブルデバイス", BMS 研究会, BMS-16-038, 2016/8/9, 機械振興会館
 12. 山口 貴大, 須永 圭紀, 春田 牧人, 竹原 宏明, 野田 俊彦, 笹川 清隆, 徳田 崇, 太田 淳, "ブレイン・マシン・インターフェースに向けたフレキシブルデバイス", LSI とシステムのワークショップ 2016, 27, 2016/5/17, 東京大, 生産技術研究所
 13. 桂木 優治, 須永 圭紀, 竹原 宏明, 野田 俊彦, 笹川 清隆, 徳田 崇, 太田 淳, "埋植型デバイスの導入に向けたハイドロゲルの光学特性評価," 応用物理学会春季学術講演会, 20p-W331-5, 2016/3/20, 東工大 大岡山キャンパス
 14. 山口 貴大, 須永 圭紀, 春田 牧人, 元山 真由美, 太田 安美, 竹原 宏明, 野田 俊彦, 笹川 清隆, 徳田 崇, 太田 淳, "埋植用自己リセット型 CMOS イメージセンサによる内因性シグナルの検出," 応用物理学会秋季学術講演会, 2015/9/15, 名古屋国際会議場
 15. 春田 牧人, 須永 圭紀, 山口 貴大, 竹原 浩成 太田 安美, 元山 真由美, 竹原 宏明, 野田 俊彦, 笹川 清隆, 徳田 崇, 太田 淳, "埋め込み可能な小型脳血流イメージングデバイスの開発," E 部門総合研究会, 2015/7/3, 九州大学医学部百年講堂
 16. 山口 貴大, 須永 圭紀, 春田 牧人, 竹原 宏明, 野田 俊彦, 笹川 清隆, 徳田 崇, 太田 淳, "埋植用自己リセット型イメージセンサの低発熱化による SNR 向上," LSI とシステムのワークショップ 2015, 2015/5/11, 北九州国際会議場, 福岡
 17. 山口 貴大, 須永 圭紀, 春田 牧人, 竹原 宏明, 野田 俊彦, 笹川 清隆, 徳田 崇, 太田 淳, "生体埋植用自己リセット型 CMOS イメージセンサ画素の低消費電力化," 応用物理学会春季学術講演会, 11p-D6-2, 2015/3/11, 東海大学 湘南キャンパス
 18. 山口 貴大, 須永 圭紀, 春田 牧人, 竹原 宏明, 野田 俊彦, 笹川 清隆, 徳田 崇, 太田 淳, "明環境下における蛍光タンパク質イメージングを実現する埋植用自己リセット型 CMOS イメージセンサ," 関西学生研究論文講演会, 2015/3/9, 大阪市立大学 杉本キャンパス

19. 春田 牧人, 須永 圭紀, 山口 貴大, 竹原 浩成, 野田 俊彦, 笹川 清隆, 徳田 崇, 太田 淳, "行動実験を目的とした埋植用 CMOS イメージングデバイスによる脳機能イメージング," (ポスター), 日本神経科学大会(Neuroscience2014), P2-397, 2014/9/12, パシフィコ横浜
20. 山口 貴大, 須永 圭紀, 春田 牧人, 竹原 宏明, 野田 俊彦, 笹川 清隆, 徳田 崇, 太田 淳, "自己リセット機能を備えた生体埋植用 CMOS イメージセンサの開発," 映像情報メディア学会年次大会, 20-1, 2014/9/2, 大阪大学 吹田キャンパス
21. 山口 貴大, 須永 圭紀, 春田 牧人, 野田 俊彦, 笹川 清隆, 徳田 崇, 太田 淳, "自己リセット機能を備えた高 SNR 生体埋植型イメージセンサ," 電気学会全国大会, 3-124, 2014/3/18, 愛媛大学 城北キャンパス
22. 春田 牧人, 須永 圭紀, 山口 貴大, 野田 俊彦, 笹川 清隆, 徳田 崇, 太田 淳, "生体埋植 CMOS イメージングデバイスを用いた血流計測による自由行動下脳機能イメージング," 応用物理学会春季学術講演会, 18p-E15-4, 2014/3/18, 青山学院大学相模原キャンパス
23. 春田 牧人, 須永 圭紀, 竹原 浩成, 野田 俊彦, 笹川 清隆, 徳田 崇, 太田 淳, "埋植型 CMOS イメージングデバイスによる脳表の血流計測," (ポスター), 応用物理学会関西支部平成 25 年度第 2 回講演会「関西のグリーン・バイオエレクトロニクス研究の現状と若手からの発信」, P-37, 2013/10/9, ミレニアムホール、奈良先端科学技術大学院大学
24. 春田 牧人, 橋本 力, 竹原 浩成, 須永 圭紀, 野田 俊彦, 笹川 清隆, 徳田 崇, 太田 淳, "脳内内因性光シグナル計測用埋植型 CMOS イメージングデバイス," (ポスター, 優秀ポスター発表賞), 情報センシング研究会, IST2013-26, 2013/5/31, 埼玉大学東京ステーションカレッジ
25. 橋本 力, 春田 牧人, 須永 圭紀, 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, "埋め込み型 CMOS イメージセンサによる *in vivo* 脳深部イメージング," (ポスター), 関西学生研究論文講演会, 2013/3/6, 和歌山大学

【受賞等】

1. **Travel Grant Initiative**, IEEE Biomedical Circuits and Systems Conf. 2014.
(Oral)
2. **Young Scientist Award**, OSA Conf. Lasers and Electro-Optics Pacific Rim 2013.
(Oral)
3. **Best Poster Award**, GNN Joint Symposium on Advanced Materials, 2014.
(Poster)
4. **Outstanding student poster award**, JSAP M&BE8, 2015. (Poster)
5. **NSF fellowship**, the 15th NSF International Summer School on Biocomplexity, Biodesign and Bioinnovation, 2016
6. **優秀論文講演賞**, 日本光学会情報フォトニクス研究会主催関西学生研究論文講演会, 2013. (Oral & Poster)
7. 日本学術振興会特別研究員(DC2) 採択 2015年度より

謝辞

本論文は奈良先端科学技術大学院大学 物質創成科学研究科 光機能素子科学研究室 太田淳教授の熱心なご指導の下にまとめることが出来ました。太田教授には、半導体の基礎理論をはじめ、研究への取り組み方、実験手法、また実験結果に対する考察、学会発表における心構えにいたるまで有益な御指導、御提言を賜り、ここに深く感謝致します。

同研究科 情報機能素子科学研究室 浦岡行治教授には、副指導教官として本研究を遂行する上で有益な御提言や御指導を賜り、ここに深く御礼申し上げます。

同研究科 光情報分子科学研究室 中嶋琢也准教授には、スーパーバイザーとして本研究を遂行する上で有益な御提言や御指導を賜り、ここに深く御礼申し上げます。

光機能素子科学研究室 徳田崇准教授には、研究に対する姿勢をはじめ、幅広い視野から実験結果、考察に対する的確な御指導、御提言を賜りました。ここに深く感謝致します。

同研究室 笹川清隆助教には、研究を遂行する上で直接ご指導を頂き、実験方針に対するアドバイスを頂き、豊富な知識に基づき実験結果、考察に対する有益な御指導、御提言を賜りここに深く感謝致します。

同研究室 野田俊彦助教には、デバイスのプロセス技術をはじめ、豊富な知識に基づく有益な御指導、御提言を賜りました。ここに深く感謝致します。

同研究室 春田牧人特任助教には、動物実験に関する技術指導など多くの御助言と御支援を頂きました。また研究活動だけでなく、学生生活においても有益な御指導、御提言を賜り、本論文の作成におきましても共同実験者として多くの御協力を賜りました。ここに深く感謝致します。

同研究室 福澤亨子秘書、嶋田円氏、松本和美元秘書には、研究費の使用や出張手続きなど、円滑に研究活動を進めるために重要となる部分を支えて頂きました。手間暇のかかる手続きをサポートして頂いたおかげで、研究活動に打ち込むことができました。ここに深く感謝致します。

東京大学大学院工学系研究科 マテリアル工学専攻 一木研究室 竹原宏明助教には、光機能素子科学研究室で特任助教をされておられた間に、生体計測に関する豊富な知識を元に、生体計測へ向けたデバイス開発に関する技術指導など、多くの有益な御指導、御助言を賜りました。ここに深く感謝致します。

生理学研究所 視覚情報処理部門 吉村由美子教授、山浦洋研究員には共同実験者として多くの御協力を賜りました。特に本論文に掲載した蛍光イメージング実験の結果はお二人のご協力により得られた結果であり、ここに深く感謝致します。

同学 バイオサイエンス研究科 細胞構造学研究室 塩坂貞夫教授には、脳神経に関する豊富な知識に基づき、*in vivo* イメージング実験に必要な動物実験について御指導、御提言を賜り、ここに深く感謝致します。

同研究室 研究員 太田安美博士、河原麻美子氏、元研究員 元山真由美氏にはデバイス実装や評価、動物実験に関する技術指導など多くの御助言と御支援を頂きました。本論文に掲載した脳スライスは、この方々から提供して頂いたものです。ここに深く感謝致します。

同研究室研究員竹原浩成博士には、イメージセンサの共同設計者として多くの御助言を賜りました。またプロセス技術に関する豊富な経験・知識からの確なアドバイスや御提言を賜りました。ここに深く感謝致します。

同研究室 修了生 橋本力氏には、実験方法に関わる御指導の他、研究生生活を通じて多くの有益な御指導、御提言を賜りました。ここに深く感謝致します。

この他にも私が光機能素子科学研究室に在籍している間に修了された先輩方、同期、後輩、そして同研究室に現在在籍中の後輩の皆様は研究生生活を送る上での大きな支えでした。ここに深く感謝致します。

チップ試作にあたり、御協力いただいた東京大学大規模集積センター、株式会社凸版テクニカルデザインセンターに心から感謝致します。

研究活動費においては、日本学術振興会特別研究員(DC2)及び、生理学研究所共同利用研究からの御支援を頂戴しました。心から感謝致します。

研究の犠牲となり、研究を助けてくれた実験動物に追悼の意を表すと共に深く感謝致します。

最後に、5年間にわたる研究生生活を支えてくださいました家族に深く感謝致します。

参考文献

- [1] F. Binkofski, G. Buccino, S. Posse, R. J. Seitz, G. Rizzolatti, and H. Freund, “A fronto-parietal circuit for object manipulation in man: evidence from an fMRI-study.,” *Eur. J. Neurosci.*, vol. 11, no. 9, pp. 3276–86, Sep. 1999.
- [2] I. Miyai, H. C. Tanabe, I. Sase, H. Eda, I. Oda, I. Konishi, Y. Tsunazawa, T. Suzuki, T. Yanagida, and K. Kubota, “Cortical mapping of gait in humans: a near-infrared spectroscopic topography study.,” *Neuroimage*, vol. 14, no. 5, pp. 1186–92, Nov. 2001.
- [3] M. F. Bear, B. W. Connors, M.A. Paradiso (加藤 宏司, 後藤 薫, 藤井 聡, 山崎 良彦 監訳), “脳神経科学 -脳の探求- 初版第 2 刷,” 西村書店, 2009, ISBN: 978-4-89013-356-7..
- [4] M. Aoki, “Development of therapy for amyotrophic lateral sclerosis,” vol. 60, no. 2, pp. 125–129, 2011.
- [5] K. Okita, T. Ichisaka, and S. Yamanaka, “Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells.,” *Nature*, vol. 448, no. 7151, pp. 313–7, Jul. 2007.
- [6] K. Molina-Luna, M. M. Buitrago, B. Hertler, M. Schubring, F. Haiss, W. Nisch, J. B. Schulz, and A. R. Luft, “Cortical stimulation mapping using epidurally implanted thin-film microelectrode arrays.,” *J. Neurosci. Methods*, vol. 161, no. 1, pp. 118–25, Mar. 2007.
- [7] R. J. Vetter, J. C. Williams, J. F. Hetke, E. a Nunamaker, and D. R. Kipke, “Chronic neural recording using silicon-substrate microelectrode arrays implanted in cerebral cortex.,” *IEEE Trans. Biomed. Eng.*, vol. 51, no. 6, pp. 896–904, Jun. 2004.
- [8] J. P. Donoghue, “Connecting cortex to machines: recent advances in brain interfaces.,” *Nat. Neurosci.*, vol. 5 Suppl, pp. 1085–8, Nov. 2002.

- [9] P. J. Rousche and R. a Normann, “Chronic recording capability of the Utah Intracortical Electrode Array in cat sensory cortex.,” *J. Neurosci. Methods*, vol. 82, no. 1, pp. 1–15, Jul. 1998.
- [10] B. Haider, M. Häusser, and M. Carandini, “Inhibition dominates sensory responses in the awake cortex.,” *Nature*, vol. 493, no. 7430, pp. 97–100, Jan. 2013.
- [11] I. Ferezou, S. Bolea, and C. C. H. Petersen, “Visualizing the cortical representation of whisker touch: voltage-sensitive dye imaging in freely moving mice.,” *Neuron*, vol. 50, no. 4, pp. 617–29, May 2006.
- [12] D. H. O’Connor, D. Huber, and K. Svoboda, “Reverse engineering the mouse brain.,” *Nature*, vol. 461, no. 7266, pp. 923–9, Oct. 2009.
- [13] D. a Dombeck, M. S. Graziano, and D. W. Tank, “Functional clustering of neurons in motor cortex determined by cellular resolution imaging in awake behaving mice.,” *J. Neurosci.*, vol. 29, no. 44, pp. 13751–60, Nov. 2009.
- [14] K. K. Ghosh, L. D. Burns, E. D. Cocker, A. Nimmerjahn, Y. Ziv, A. El Gamal, and M. J. Schnitzer, “Miniaturized integration of a fluorescence microscope.,” *Nat. Methods*, vol. 8, no. 10, pp. 871–8, Jan. 2011.
- [15] D. C. Ng, T. Tokuda, A. Yamamoto, M. Matsuo, M. Nunoshita, H. Tamura, Y. Ishikawa, S. Shiosaka, and J. Ohta, “A Complementary Metal–Oxide–Semiconductor Image Sensor for On-Chip *in vitro* and *in vivo* Imaging of the Mouse Hippocampus,” *Jpn. J. Appl. Phys.*, vol. 45, no. 4B, pp. 3799–3806, Apr. 2006.
- [16] A. Tagawa, H. Minami, M. Mitani, T. Noda, K. Sasagawa, T. Tokuda, H. Tamura, Y. Hatanaka, Y. Ishikawa, S. Shiosaka, and 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.*, vol. 49, no. 1, p. 01AG02, Jan. 2010.

- [17] T. Kobayashi, A. Tagawa, T. Noda, K. Sasagawa, T. Tokuda, Y. Hatanaka, H. Tamura, Y. Ishikawa, S. Shiosaka, and 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.*, vol. 49, no. 11, p. 117001, Nov. 2010.
- [18] J. Ohta, T. Tokuda, K. Sasagawa, and T. Noda, "Implantable CMOS Biomedical Devices.," *Sensors (Basel)*, vol. 9, no. 11, pp. 9073–93, Jan. 2009.
- [19] T. Kobayashi, M. Motoyama, H. Masuda, Y. Ohta, M. Haruta, T. Noda, K. Sasagawa, T. Tokuda, H. Tamura, Y. Ishikawa, S. Shiosaka, and J. Ohta, "Novel implantable imaging system for enabling simultaneous multiplanar and multipoint analysis for fluorescence potentiometry in the visual cortex.," *Biosens. Bioelectron.*, vol. 38, no. 1, pp. 321–30, 2012.
- [20] 橋本 力, "埋植型脳機能計測 CMOS センサの高画質化・低侵襲化に関する研究," Master's thesis, 奈良先端科学技術大学院大学, 2013.
- [21] 春田 牧人, "自由行動実験における脳機能計測を可能とする超小型埋植用 CMOS イメージングデバイスに関する研究," Doctor's thesis, 奈良先端科学技術大学院大学, 2014.
- [22] Makito Haruta, Yoshinori Sunaga, Takahiro Yamaguchi, Hironari Takehara, Toshihiko Noda, Kiyotaka Sasagawa, Takashi Tokuda, Jun Ohta, "Intrinsic signal imaging of brain function using a small implantable CMOS imaging device," *Jpn. J. Appl. Phys.*, 54, 2015.
- [23] Makito Haruta, Chikara Kitsumoto, **Yoshinori Sunaga**, Hironari Takehara, Toshihiko Noda, Kiyotaka Sasagawa, Takashi Tokuda, Jun Ohta, "An implantable CMOS device for blood-flow imaging under freely moving experiments of rats," *Jpn. J. Appl. Phys.*, 53,4S, 2014.
- [24] 田川 礼人, "脳深部神経活動イメージング洋埋植型高機能 CMOS センサに関する研究," Doctor's thesis, 奈良先端科学技術大学院大学, 2010.

- [25] H. Takehara, K. Miyazawa, K. Sasagawa, T. Noda, T. Tokuda, J. Ohta, S. H. Kim, R. Iino, and H. Noji, “デジタル酵素結合免疫吸着法に向けた高感度蛍光検出用 CMOS イメージセンサの開発.”
- [26] 黒田 隆男, “イメージセンサの本質と基礎 初版第 1 刷,” コロナ社, 2012, ISBN: 978-4-339-00845-6.
- [27] Kohei Yoshitake, Hiroaki Tsukano, Manavu Tohmi, Seiji Komagata, Ryuichi Hishida, Takeshi Yagi, and Katsuei Shibuki, “Visual Map Shifts based on Whisker-Guided Cues in the Young Mouse Visual Cortex.,” *Cell Reports*, Cell Reports, vol. 5, issue. 5, pp. 1365–1374, 2013.
- [28] L. Tian, S. A. Hires, T. Mao, D. Huber, M. E. Chiappe, S. H. Chalasani, L. Petreanu, J. Akerboom, S. a McKinney, E. R. Schreiter, C. I. Bargmann, V. Jayaraman, K. Svoboda, and L. L. Looger, “Imaging neural activity in worms, flies and mice with improved GCaMP calcium indicators.,” *Nat. Methods*, vol. 6, no. 12, pp. 875–81, Dec. 2009.
- [29] R. Aronoff, F. Matyas, C. Mateo, C. Ciron, B. Schneider, and C. C. H. Petersen, “Long-range connectivity of mouse primary somatosensory barrel cortex.,” *Eur. J. Neurosci.*, vol. 31, no. 12, pp. 2221–33, Jun. 2010.
- [30] T. Matsuzawa, “Evolution of the brain and social behavior in chimpanzees.,” *Curr. Opin. Neurobiol.*, vol. 23, no. 3, pp. 443–9, Jun. 2013.
- [31] K. Hatsuno, H. Mukohyama, S. Horiuchi, Y. Iwasaki, N. Yamamoto, K. Akiyoshi, and H. Taniguchi, “Poly(MPC-co-BMA) Coating Reduces the Adhesion of *Candida albicans* to Poly(Methyl Methacrylate) Surfaces,” *Prosthodont. Res. Pract.*, vol. 5, no. 1, pp. 21–25, 2006.
- [32] Oregon Medical Laser Center [<http://omlc.ogi.edu/>].
- [33] H. Ojima, M. Takayanagi, D. Potapov, and R. Homma, “Isorefrequency band-like zones of activation revealed by optical imaging of intrinsic

- signals in the cat primary auditory cortex,” *Cereb. Cortex* , vol. 15, no. 10, pp. 1497–509, Oct. 2005.
- [34] J. E. Hoover, Z. S. Hoffer, and K. D. Alloway, “Projections from primary somatosensory cortex to the neostriatum: the role of somatotopic continuity in corticostriatal convergence,” *J. Neurophysiol.* , vol. 89, no. 3, pp. 1576–87, Mar. 2003.
- [35] H. M. Duvernoy, S. Delon, and J. L. Vannson, “Cortical blood vessels of the human brain.,” *Brain Res. Bull.*, vol. 7, no. 5, pp. 519–79, Dec. 1981.
- [40] E. T. Fonoff, J. F. Pereira, L. V. Camargo, C. S. Dale, R. L. Pagano, G. Ballester, and M. J. Teixeira, “Functional mapping of the motor cortex of the rat using transdural electrical stimulation.,” *Behav. Brain Res.*, vol. 202, no. 1, pp. 138–41, Aug. 2009.
- [36] S. Lee, D. Koh, A. Jo, H. Y. Lim, Y.-J. Jung, C.-K. Kim, Y. Seo, C.-H. Im, B.-M. Kim, and M. Suh, “Depth-dependent cerebral hemodynamic responses following direct cortical electrical stimulation (DCES) revealed by *in vivo* dual-optical imaging techniques.,” *Opt. Express*, vol. 20, no. 7, pp. 6932–43, Mar. 2012.
- [37] Manavu Tohmi, Hiroki Kitaura, Seiji Komagata, Masaharu Kudoh, and Katsuei Shibuki, "Enduring Critical Period Plasticity Visualized by Transcranial Flavoprotein Imaging in Mouse Primary Visual Cortex," *J. Neurosci.* , 26 (45) 11775-11785, 2006
- [38] 中井 淳一, 大倉 正道, “GFPを用いた蛍光カルシウムプローブ G-CaMP の開発,” 比較生理生化学, 19 (2), 2002.
- [39] Tsai-Wen Chen, Trevor J. Wardill, Yi Sun, Stefan R. Pulver, Sabine L. Renninger, Amy Baohan, Eric R. Schreier, Rex A. Kerr, Michael B. Orger, Vivek Jayaraman, Loren L. Looger, Karel Svoboda, and Douglas S. Kim, "Ultrasensitive fluorescent proteins for imaging neuronal activity," *Nature*, 499, 295-300, 2013