

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

博士学位論文

春田 牧人

2014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 研究背景.....	1
1.1.1 自由行動中の動物における脳機能計測技術.....	1
1.1.2 脳機能イメージング.....	5
1.2 研究の目的.....	7
1.3 本論文の構成.....	9
第2章 超小型 CMOS イメージングデバイス.....	10
2.1 超小型埋植用 CMOS イメージングデバイス.....	10
2.2 CMOS イメージングデバイスの構成.....	11
2.3 CMOS イメージセンサ.....	13
2.3.1 CMOS イメージセンサの仕様.....	13
2.3.2 CMOS イメージセンサの性能.....	14
2.4 フレキシブル基板の設計.....	17
2.5 超小型埋植用 CMOS イメージングデバイスの実装.....	18
2.6 自由行動実験用中継基板の設計.....	20
2.7 CMOS イメージングシステム.....	22
2.8 まとめと考察.....	22
第3章 内因性シグナルイメージング.....	24
3.1 内因性シグナルによる脳機能解明.....	24
3.1.1 内因性シグナルイメージング.....	24
3.1.2 CMOS イメージングデバイスによる内因性シグナル計測.....	26
3.2 内因性シグナルイメージング実験.....	27
3.2.1 実験動物と手術.....	28
3.2.2 感覚刺激装置.....	29
3.2.3 イメージングシステム.....	32
3.2.4 内因性シグナルの解析.....	32
3.3 感覚応答の観察.....	33
3.3.1 ヒゲ刺激に応答する内因性シグナル.....	33
3.3.2 内因性シグナルと電気生理記録の比較.....	40
3.3.3 ヒゲ刺激時と後脚刺激時の応答の比較.....	39
3.4 まとめと考察.....	42
第4章.....	44
4.1.1 脳表の血流.....	44
4.1.2 CMOS イメージングデバイスによる脳表の血流計測.....	44

4.2 CMOS イメージングデバイスによる血流計測実験.....	45
4.2.1 実験動物と手術.....	45
4.2.2 血流計測用光源.....	47
4.2.3 血流計測実験.....	48
4.2.4 血流計測の計測精度の向上.....	52
4.3 脳表の血流計測.....	53
4.3.1 麻酔下における脳表の血流計測.....	53
4.3.2 自由行動下における血流計測.....	55
4.4 行動実験中の脳表における血流計測実験.....	58
4.4.1 歩行型行動実験装置.....	58
4.4.2 行動実験中の脳表における血流計測.....	60
4.5 まとめと考察.....	62
第5章 広範囲イメージングデバイス.....	64
5.1 広範囲脳機能イメージング.....	64
5.2 六角形 CMOS イメージングデバイス.....	65
5.2.1 六角形 CMOS イメージングデバイスの仕様.....	65
5.2.2 六角形 CMOS イメージングデバイスの実装.....	67
5.3 脳表のマルチイメージング.....	68
5.3.1 実験動物と手術.....	68
5.3.2 脳表に埋植した蛍光ビーズの観察.....	68
5.3.3 生体脳表におけるマルチイメージング.....	68
5.4 まとめと考察.....	69
第6章 大型動物用イメージングデバイス.....	71
6.1 大型動物の脳機能計測用脳機能計測デバイスの開発.....	71
6.2 大型動物用イメージングデバイスの開発.....	72
6.2.1 大型動物用イメージングデバイス.....	73
6.2.2 大型動物用イメージングデバイスに搭載する CMOS イメージセンサ.....	74
6.2.3 大型動物用 CMOS イメージングデバイスの制御・計測システム.....	76
6.2.4 大型動物埋植用中継基板.....	76
6.2.5 デバイス埋植実験の準備.....	79
6.3 ニホンザルを用いた脳機能計測の実験系.....	80
6.3.1 実験動物と手術.....	80
6.3.2 埋植手術後の経過.....	82
6.3.3 埋植したデバイスの計測不能の原因.....	84
6.4 デバイス埋植されたサルによる行動実験.....	85
6.4.1 ニホンザルによる行動実験.....	85

6.4.2 行動実験に伴う脳機能計測.....	86
6.5 まとめと考察.....	88
第7章 結論.....	91
7.1 本研究の成果.....	91
7.2 今後の展望.....	92
参考文献.....	94
研究発表目録.....	101
謝辞.....	104

第 1 章 序論

1.1 研究背景

1.1.1 自由行動中の動物における脳機能計測技術

現在、筋萎縮性側索硬化症(Amyotrophic lateral sclerosis, ALS)[1]や脊椎損傷による神経機能障害の治療を目的とした研究に注目が集まっている[2][3]。ALS、脊椎損傷は、神経情報伝達を担う神経軸索等の経路が変性・損傷することで運動機能や感覚機能を失われてしまう。しかし、これらの疾患は脳機能が正常に保たれているため、神経情報の伝達経路を回復することで治療が可能であると考えられている。ALS は進行性で、徐々に運動機能を失う疾患である。運動機能を制御する運動神経が徐々に変性し、運動を起こす筋肉への情報伝達が遮断される。現在、ALS 治療の戦略として、失われた神経細胞を再生し元に戻すことで運動機能を回復することが期待されており[4]、ES 細胞や IPS 細胞[5]を利用した研究も注目されている。しかしながら、再生医療は大きな期待が持たれているが、機能的に未解明な点も多い。臨床医療に用いるには副作用や組織構築に関する研究を行う必要がある。

再生医療とは別の治療戦略として、損傷した神経伝達経路を補う人工的な神経伝達経路やロボット義手等により運動機能を回復する技術の開発にも期待が持たれている。代表的なものにブレインマシンインターフェイス(Brain-machine interface, BMI)がある。BMI の例を図 1.1 に示す[2]。運動を制御する脳機能を計測し、特定の脳活動が観察された時にロボットアームが種々の活動に対応した動きを行う。また、図 1.2 に示す様に、ALS や脊椎損傷治療に利用可能な BMI として、脳活動のパターンを計測し、筋肉に設置した電気刺激デバイスにより筋運動を誘発する研究も行われている[3]。しかし、現在行われている BMI の多くが練習によって機械等を制御できる脳活動を起こさせる必要がある。つまり、機械に合わせて脳活動を制御する必要があり、被験者にとっては負担が大きいとされている。この問題を解決させるためには、脳機能計測を技術向上させ、実際の行動を制御している脳活動を詳細に解明していく必要がある。



図 1.1 ブレインマシンインターフェイス [2]

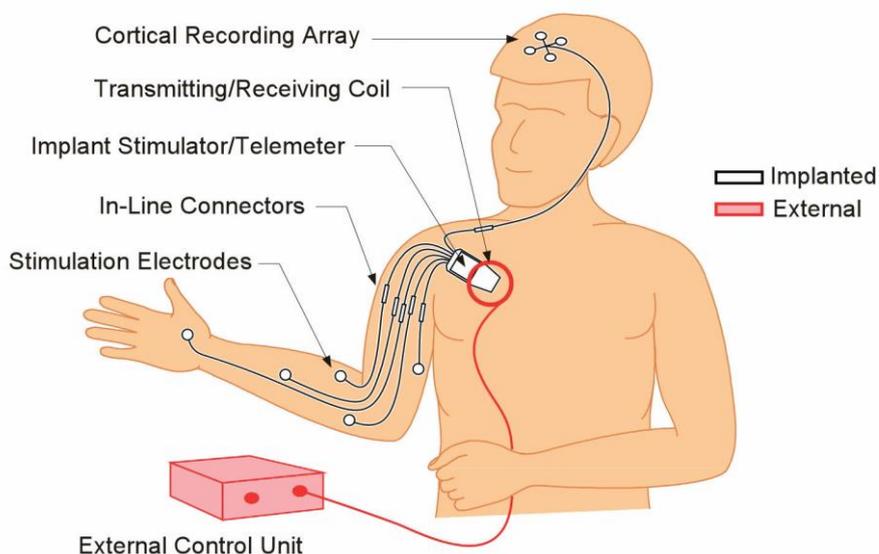


図 1.2 脳の筋運動制御を可能にする埋植型 BMI デバイス [3]

行動中の脳機能を解明するためには、自由行動下にある動物を用いて脳活動を計測することが重要となる。また、麻酔下にある動物と覚醒下にある動物では、神経活動が異なっていることが、近年の研究によって示唆されている[6][7]。覚醒下における脳活動は、麻酔下と比較すると抑制されている。この神経活動の抑制により、動物の脳の高度な機能を実現できていると考えられている。図 1.3 に麻酔下と覚醒下の脳活動の比較について示す[6]。しかし、今までの脳機能研究の多くが、麻酔下にある動物の脳機能計測によって行われていた。これは覚醒下における動物の脳機能計測が困難であることが一因である。一般的な脳機能計測実験では電気生理装置や顕微鏡を用いる。これら装置は実験動物に対して相対的に大きく、素早く動く動物に追従して装置を動かすことは難しい。

解決策として、覚醒下の動物の頭部を固定してしまうことで、脳機能計測を可能にしている研究が行われている[8][9]。この場合、顕微鏡を利用できるため、覚醒下における高精度な脳機能計測が実現している。図 1.4 は、2光子顕微鏡と行動実験装置を組み合わせた脳機能計測技術を示す[9]。しかし、この技術では、動物の行動に制限が出来てしまう。そのため、様々な動物の行動時の脳機能計測を可能にする装置が求められており、その実現には生体内に埋植可能な寸法の脳機能計測装置が必要である。

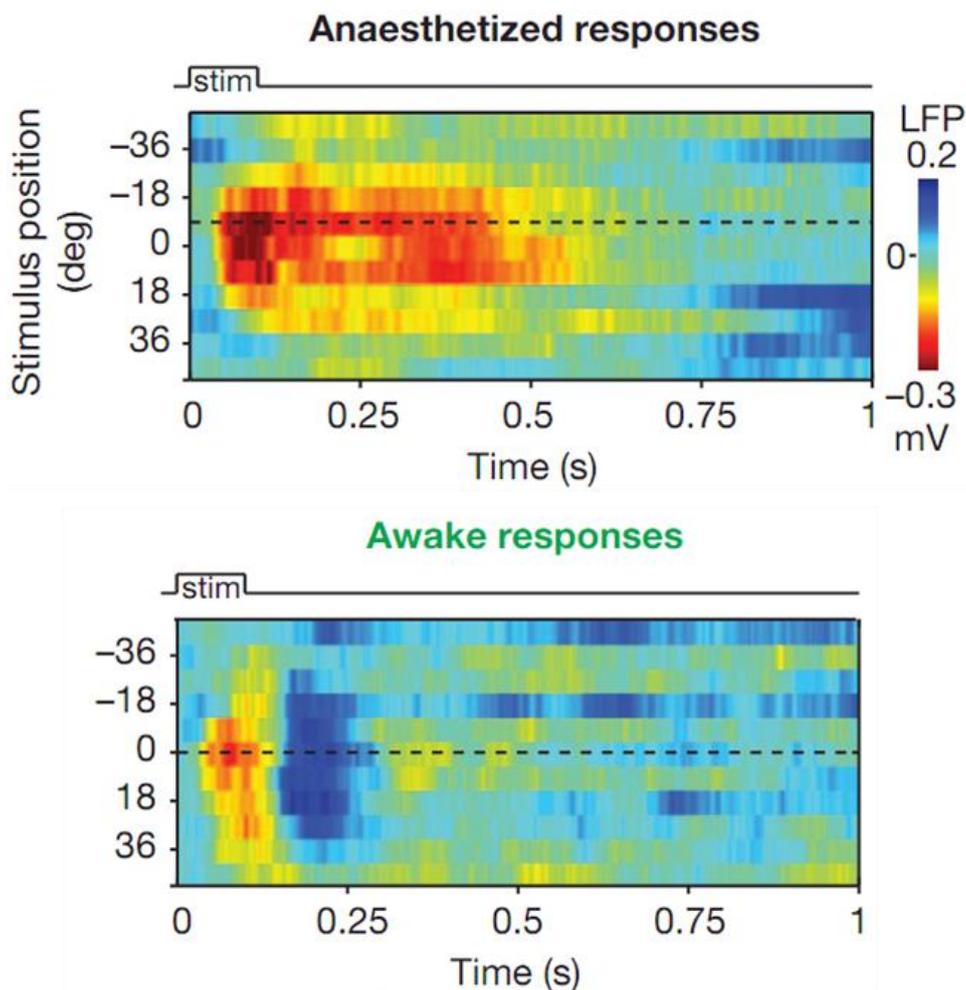


図 1.3 麻酔下と覚醒下における脳活動の比較[6]

自由行動下における脳機能計測を実現するために、様々な小型脳機能計測用デバイスの開発が行われている。小型のマルチ電極を使ったデバイスの研究では、動物の脳表に刺激型マルチプローブデバイスを設置して、脳刺激に誘発される筋運動の観察を行っている。図 1.5 に埋植可能なマルチプローブデバイスの例を示す[10]。また、光学的イメージング手法においても、行動下で観察するための技術が開発されている。顕微鏡と光ファイバーを用いることで、自由行

動下の脳機能計測が可能となった[7]。図 1.6 に光ファイバーを用いた行動実験用脳機能イメージングデバイスを示す[7]。さらに、超小型顕微鏡を動物の頭部に設置することにより、高解像度の脳機能イメージングを可能にする手法も開発されている[11]。これらの手法によって、自由行動実験中の脳機能計測が可能となり、行動を制御する脳活動の解明が試みられている。

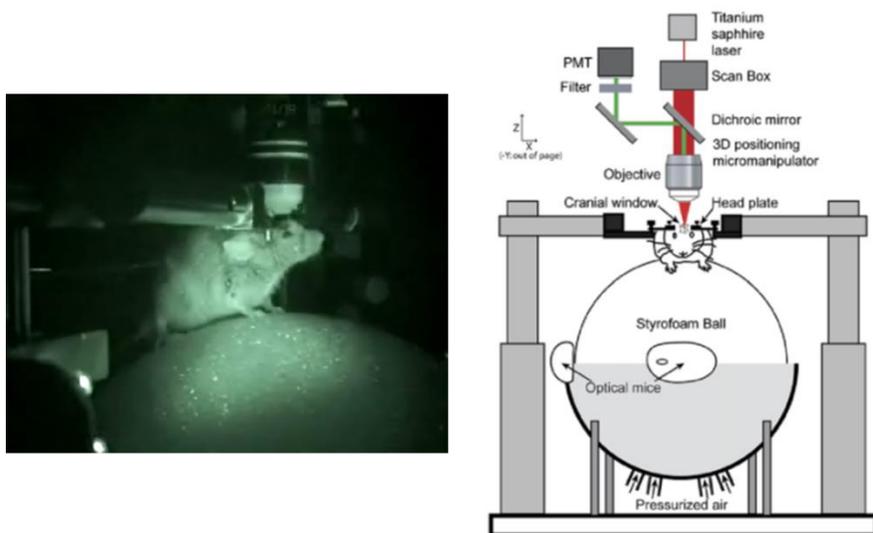


図 1.4 顕微鏡を用いた覚醒下における脳機能イメージング[9]

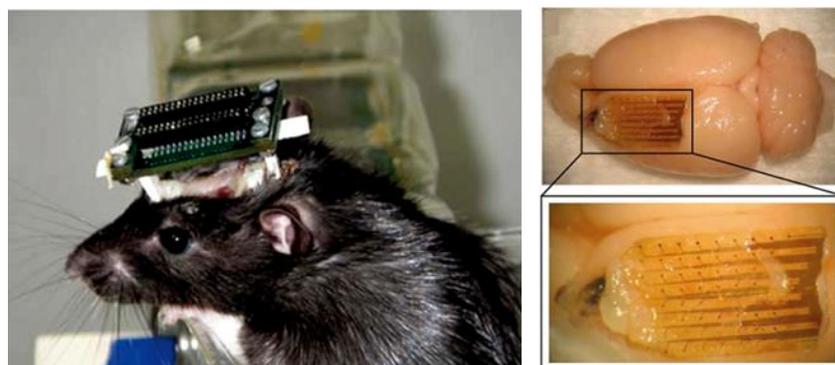


図 1.5 埋植用マルチプローブデバイス[10]

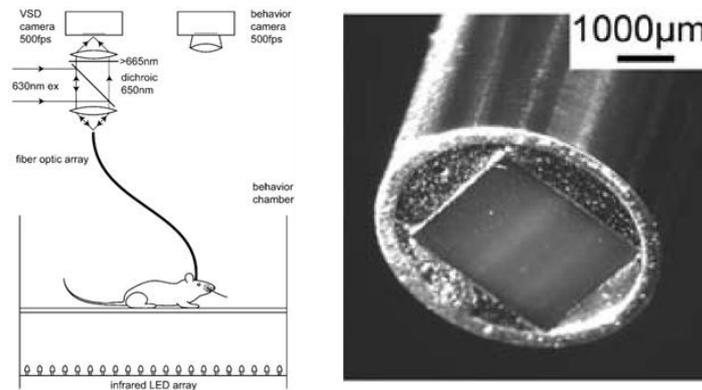


図 1.6 光ファイバーを用いた自由行動中の脳機能イメージング[7]

1.1.2 脳機能イメージング

脳神経科学の発展に伴い、脳機能の局在や神経細胞によって構成される神経ネットワークが明確になりつつある。神経細胞の活動は制御している機能によって異なるネットワークを構成して行われていることが分かってきた。近年の研究により、複数の神経細胞が機能別にクラスターを形成していることが知られている[9]。図 1.7 は 神経細胞が機能別に構成するクラスターを示す[9]。このような複数の神経細胞の活動を計測することで、高度な脳機能解明が可能になる。複数の神経活動を観察する手法として、複数の電気プローブを利用したミシガン電極[12]やユタ電極[13], [14]を用いたマルチニューロンレコーディング法が開発されている。さらに、高解像度かつ広視野の脳機能計測を目的として、脳機能イメージングが開発されている。光学的に計測することで、複数の神経細胞の活動を同時に計測できる。

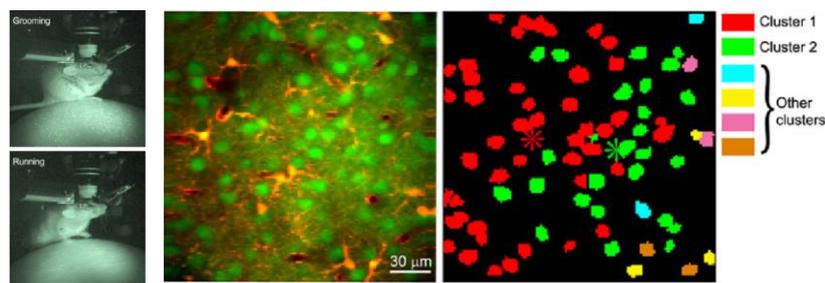


図 1.7 機能別にクラスターを構成する神経細胞[9]

脳機能イメージングとは、神経活動に依存して変化する物質の濃度や物質自体の変化を光学的に観察する方法である。代表的なイメージング方法として、神経細胞の電位変化を利用した電位感受性色素(Voltage sensitive dye, VSD)イメージング法と、カルシウムイオン濃度に反応して蛍光強度が変化するカル

シウムイメージング法の2つがある。電位感受性色素を使ったVSDイメージングは神経細胞の電位変化に依存して蛍光強度が変化する色素を使用する。図1.8はVSDイメージングによりラットの大脳皮質一次感覚野と運動野の相関を観察したものである[15]。VSDは応答が速いことから、神経細胞による高速な電気的変化を計測できる。また、カルシウムイメージングでは、神経細胞のシグナル伝達時に取り込まれる Ca^{2+} の濃度変化を観察する。図1.9はカルシウムイメージングにより複数の神経細胞の活動を同時に観察した様子を示す[16]。この手法では、高空間分解能を得ることができ、細胞単位での神経活動を観察することができる。

また、生体に特別な処理を施さずに生体情報を観察できる方法として内因性シグナルイメージングがある。これは、生体内の代謝系で生産又は分解される物質[17]や血液を利用することで、神経活動を観察する手法である。この手法の最大の利点は、生体から常時供給されるため長時間の連続したイメージングが可能な点である。また、染色液や遺伝子組み換え等の作業が必要ないので、生体への負担も少なく、機能的核磁気共鳴(Functional magnetic resonance imaging, fMRI)[18]や近赤外線分光法(Near infrared spectroscopy, NIRS) [19]の様にヒトへの応用も行われている。

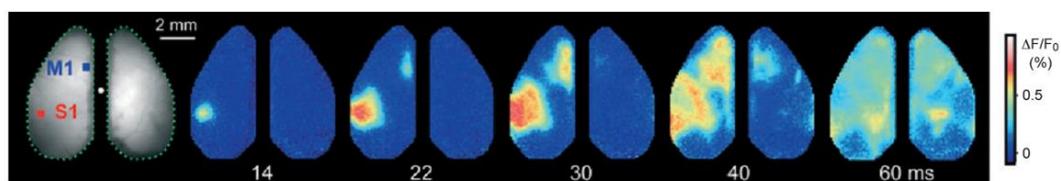


図 1.8 VSD イメージング[15]

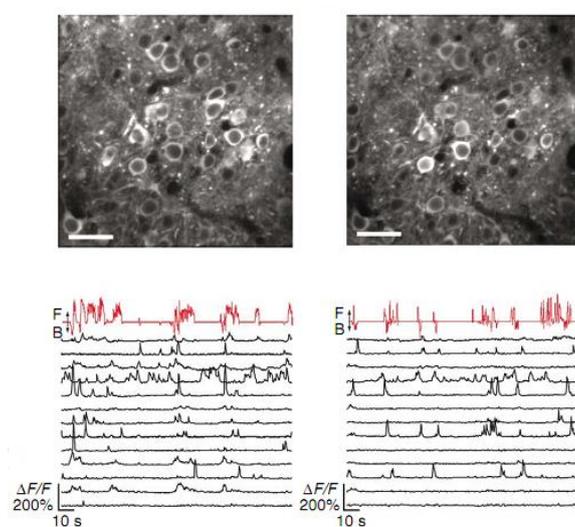


図 1.9 カルシウムイメージング[16]

1.2 研究の目的

本研究では、小型動物による自由行動実験下において脳機能を長期的に観察可能なイメージングデバイスの開発を目的とする。小型動物の行動を抑制せずに、かつ長期的に観察するためには、動物の頭部へ完全に埋植できるほどの超小型デバイスであることが必要とされる。また、神経ネットワークを観察するためには、光学的イメージングが可能なデバイスが必要となる。当研究室で開発を行っている脳機能計測 CMOS イメージングデバイスは、生体内に埋植することを目的としている[20]–[23]。このデバイスを利用することで自由行動下での脳機能イメージングを実現することが可能となる。

本研究の CMOS イメージングデバイスでは、デジタルカメラ等に使用されている CMOS イメージセンサのアーキテクチャに基づきセンサを生体埋植に適するよう専用に設計することで、超小型のイメージングデバイスを実現可能としている。当研究室では図 1.10 に示す頭部にデバイスを埋植した状態で動物の脳機能計測を行っている[24]。この研究では、図 1.11 に示すような脳刺入型デバイスを開発し、脳深部の脳機能計測にも成功している[25]。

本研究においては、脳表における脳機能計測を目的としたデバイスの開発を行った。光学イメージングに必要な部品を搭載した超小型イメージングデバイスを試作し、これを用いた脳機能観察が可能であることを実証する。さらに、自由行動下、または行動実験中にある動物に小型脳機能イメージングデバイスを使用して、実験中の脳機能観察が可能なデバイスであることを実証する。

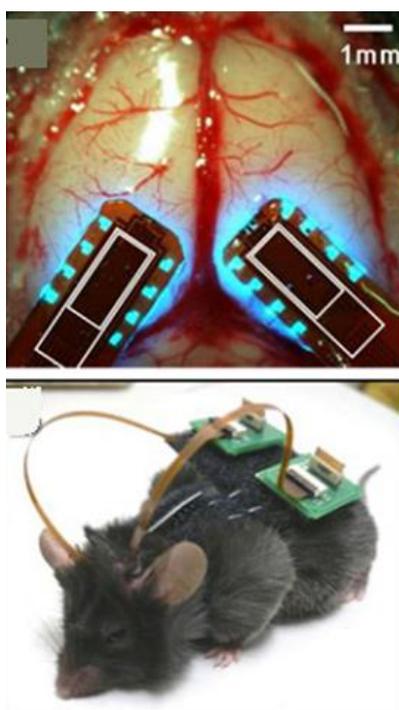


図 1.10 CMOS イメージングデバイスを用いた脳表脳機能計測[24]

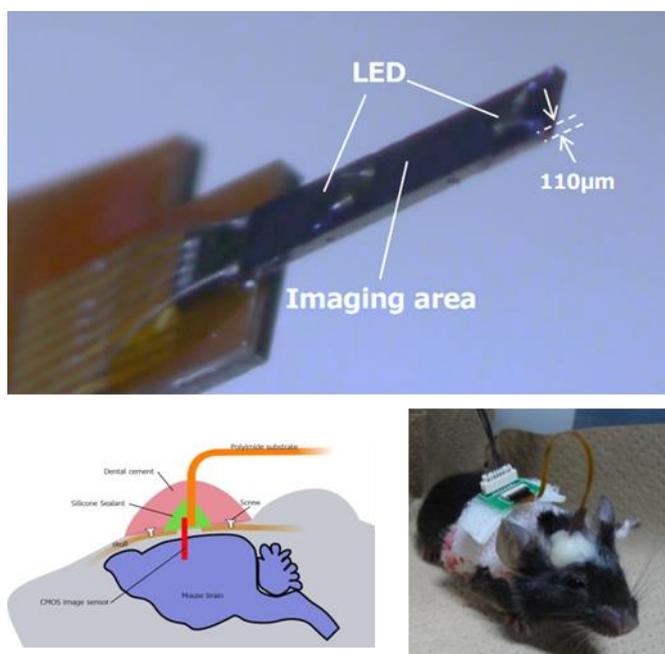


図 1.11 脳刺入型 CMOS イメージングデバイスによる脳深部脳機能計測[25]

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、自由行動下における小型動物の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の仕様について述べる。また生体頭部への埋植を可能にするために行った基板の設計や実装方法について示す。

第 3 章では、麻酔下における脳の内因性シグナルイメージングについて述べる。デバイスを埋植した動物において長時間の安定した脳機能計測を実現するために、血流変化を利用した計測方法を試みた。指標としてヘモグロビンの吸光度を利用した。吸光度の輝度変化によって内因性シグナルの観察が可能になる。本研究では大脳皮質一次感覚野における感覚応答をデバイスで観察し、その結果について示す。

第 4 章では、自由行動下における小型動物の脳表の血流計測について述べる。本研究で開発するデバイスの目的である自由行動下における脳機能計測を実現するために、デバイスを頭部に埋植した動物の脳表の血流計測を覚醒下で行った。本章では自由行動下及び行動実験中におけるイメージングの評価結果について示す。

第 5 章では、広範囲脳機能イメージングを実現する方法として、複数個の小型デバイスを利用したマルチイメージングシステムについて述べる。脳表へデバイスの稠密な多面配置を目的として、六角形型 CMOS イメージングデバイスを考案し、設計と試作を行った。本デバイスの仕様と実装方法についても述べる。

第 6 章では、大型動物の脳機能計測を行うためのデバイス開発について述べる。大型動物の脳機能計測には広範囲の観察視野が求められる。そこで、2 台のデバイスを用いたデュアルイメージングシステムを開発した。本章ではニホンザルを用いた覚醒下における脳機能計測を行い、その評価結果について述べる。

最後に、第 7 章では、各章の成果を総括し、その課題について議論する。さらに、今後の展望について述べる。

第2章 超小型 CMOS イメージングデバイス

2.1 超小型埋植用 CMOS イメージングデバイス

本研究で用いる超小型埋植用イメージングデバイスは、ラットやマウス等の小型動物の自由行動下における脳機能計測を目的としている。ラットやマウス等の小型動物は、取扱いや繁殖が容易である上に、遺伝子組み換えによって目的に応じたモデル動物を用意できることから脳機能計測では、一般的にこれら小型動物が用いられる。自由行動下にある小型動物の脳機能計測には、実験動物として用いられるラットやマウスよりも計測用デバイスが小型であることが求められる。本研究で用いた成体マウスの体重は約 20 g、成体ラットの体重は約 200 g であり、これら動物の頭部に搭載するには重量を体重よりも十分に低くする必要がある。このような自由行動下における脳機能計測を目的としたデバイスとして、図 2.1 に示すようなマウスの頭部に設置可能な超小型顕微鏡が開発されている[11]。このデバイスは、顕微鏡の光学系を小型化することで、重量 1.9 g を実現している。また、行動実験中のマウスの脳機能計測にも成功している。しかし、このデバイスの重量は成体マウスの体重と比較すると 1/10 もあり、十分な小型化ができていないとは言えない。自由行動下の脳機能計測デバイスには、動物の行動を抑制しないサイズであることが求められる。

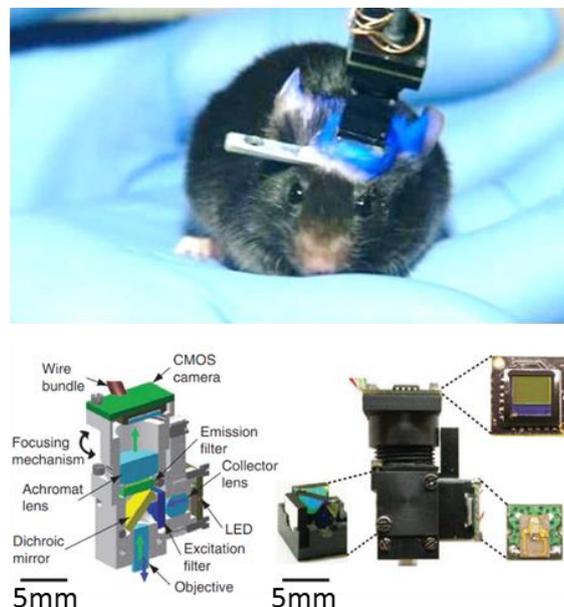


図 2.1 超小型顕微鏡デバイス[11]

本研究は、マウスやラットといった小型動物の頭部に完全に埋植できるサイズの脳機能計測デバイスを開発し、自由行動下での脳機能イメージングの実現を目的とする。この目的を達成するために次の仕様のデバイスを開発する。①生体埋植時に脳を含む生体組織に無害である。②小型動物の頭部に完全に埋植可能な小型デバイスである。③動物の行動に影響を与えない重量を実現する。これら 3 つの仕様を満たす CMOS イメージングデバイスを開発するために、CMOS イメージセンサの開発、実装方法の開発、イメージングシステムの開発を行った。

2.2 CMOS イメージングデバイスの構成

図 2.2 に超小型埋植用 CMOS イメージングデバイスによる脳機能計測実験のイメージを示す。本デバイスは小型動物の脳表における脳機能計測を目的として作製し、脳表にデバイスを直接設置するコンタクトイメージングにより脳表の計測を行った。デバイスには、デジタルカメラ等にも利用されている CMOS イメージセンサ方式を採用した独自設計のセンサを搭載した。イメージセンサは内部に規則的に配列された多数の微細なフォトダイオードが光強度を検知することで機能する[26]。カメラではレンズ等の光学系を用いて撮像面上に結像することで画像を取得しているが、コンタクトイメージングはレンズを用いず、デバイスの接触面近傍の撮像を行う。対物レンズ等の光学系が不要となることから、寸法及び重量の低減が可能になる[27]。

本研究で開発したデバイスの構成と仕様について図 2.3 と表 2.1 に示す。本デバイスは生体埋植を目的とし、フレキシブルなポリイミド基板上に CMOS イメージセンサと LED を搭載した。デバイスの全長は 66 mm で、センサ搭載部の寸法は 4.3 mm × 2.3 mm × 0.35 mm である。センサ搭載部に対して全長が長いのは、成体埋植時に配線部を頭部から露出させるためである。露出させた配線部の長さには余裕を持たせることで、自由行動実験時に動物が動いてもセンサ部は動かないため、計測に影響を与えない。本デバイスは輝度変化の計測を行うため、光源として小型 LED(280 μm × 300 μm)を利用した。デバイス外部からの光源を用いないことで、自由行動実験時の光源の安定化を実現した。また、CMOS イメージセンサを中心にして、9 個 LED が周囲に配置した。複数個の LED を均等に配置することで、LED 光源からの照射光の均一性を高めた。また、超小型埋植用 CMOS イメージングデバイスは生体適合性の向上と防水処理を目的にパレンコーティングを施した。実装後のデバイス単体の重量はわずか 0.02 g で、この重量は成体マウスの 1/1,000、成体ラットの 1/10,000 である。

本研究では、実験動物の頭部に完全に埋植可能なサイズの超小型デバイスを実現した。

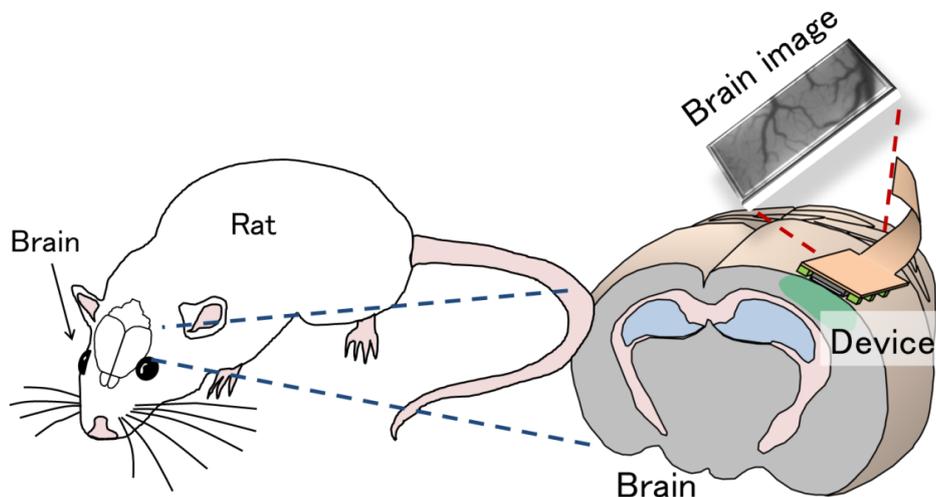


図 2.2 超小型埋植用 CMOS イメージングデバイスによる脳機能計測

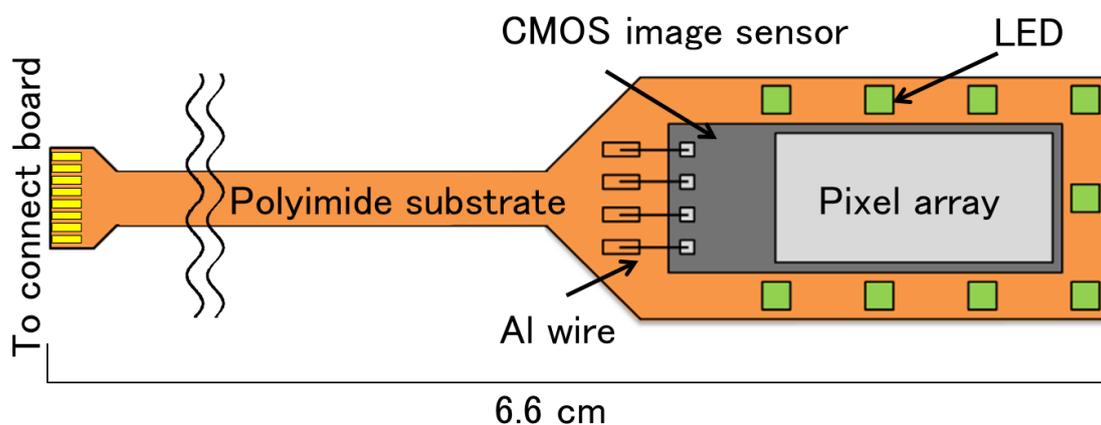


図 2.3 超小型埋植用 CMOS イメージングデバイス

表 2.1 超小型埋植用 CMOS イメージングデバイスの仕様

Device size (Drive part)	4.3 mm × 2.3 mm × 0.35 mm
Weight	0.02 g
Total length	66 mm
Substrate	Polyimide flexible substrate
Waterproof	Parylene film
Light source	Green LED ($\lambda = 535 \text{ nm}$) × 9

2.3 CMOS イメージセンサ

2.3.1 CMOS イメージセンサの仕様

CMOS イメージセンサ作製には AMS(Austriamicrosystems)社 (オーストリア) の $0.35\ \mu\text{m}$ 2-poly 4-metal の標準 CMOS プロセスを用いた。本研究で用いた CMOS イメージセンサは当研究室で過去に開発されたセンサを元に設計されている[27]。CMOS イメージセンサの形状は $1.0\ \text{mm} \times 2.7\ \text{mm}$ の長方形状である。CMOS イメージセンサは主に、画素アレイ、カラムアンプ、X スキャナ、Y スキャナ、出力バッファで構成されている。センサレイアウトは図 2.4 に示す。図 2.5 と表 2.2 には、センサのブロックダイアグラムと仕様を示す。各回路はすべて、 $3.3\ \text{V}$ の単一電源で駆動する。また、省配線化により、4 配線駆動を実現している。画素は nwell/psub 型フォトダイオードを用いて素子数が少なく微細化に有利な 3 トランジスタ型 APS(Active Pixel Sensor)方式画素回路を用いた。画素サイズは $7.5\ \mu\text{m}$ 角とした[28]。

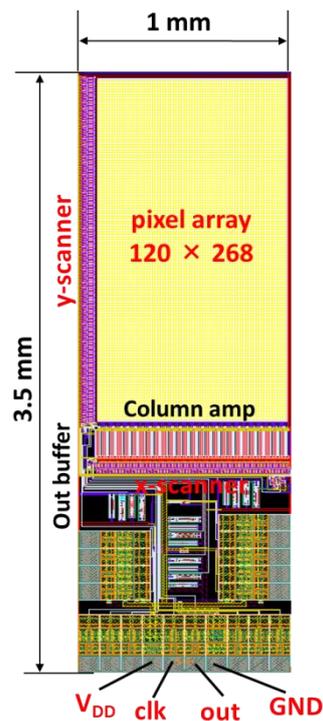


図 2.4 CMOS イメージセンサのレイアウト

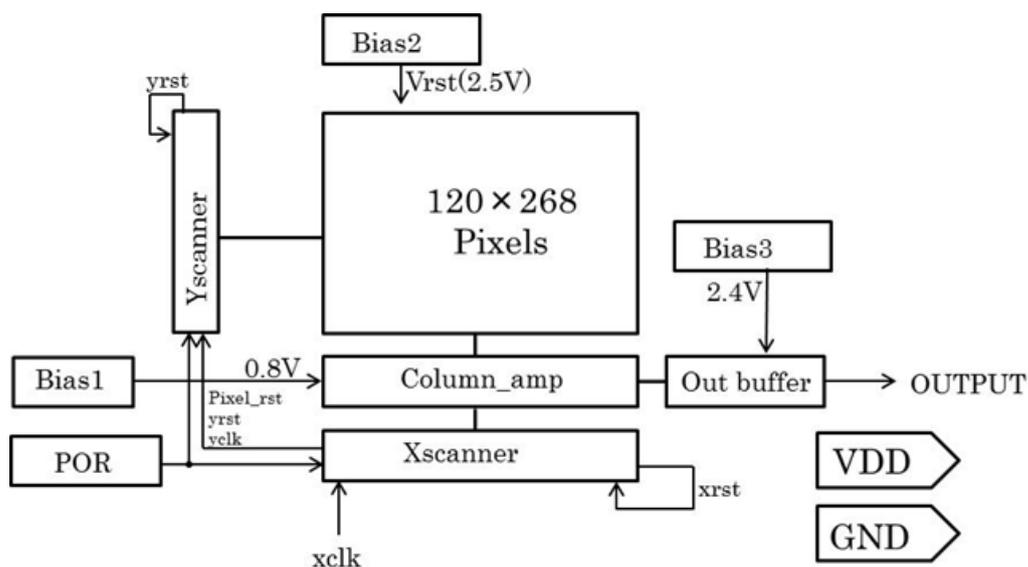


図 2.5 CMOS イメージセンサのブロックダイアグラム

表 2.2 CMOS イメージセンサの仕様

Technology	0.35- μm 2-poly 4-metal standard CMOS Process
Operating voltage	3.3 V
Chip size	1048.6 μm \times 2700 μm
Pixel Array size	900 μm \times 1920 μm
Pixel type	3-transistor Active Pixel Sensor
Photodiode	Nwell - Psub
Pixel size	7.5 μm \times 7.5 μm
Pixel count	33768
Fill factor	44%

2.3.2 CMOS イメージセンサの性能

CMOS イメージングデバイスによって定量的な輝度変化を観察する目的のため、当研究室では CMOS イメージセンサの計測輝度に対する出力電圧の線形性の向上が行われた[28]。過去に開発されたセンサのレイアウトおよびトランジスタサイズを改良し、出力電圧の線形性の向上に成功している。図 2.6 に開発した CMOS イメージセンサと過去に開発されたセンサの出力電圧の線形性を比較した結果を示す。本デバイスに搭載したセンサの画素が線形性を持つ領域における出力信号のダイナミックレンジは 38 dB であり、従来センサに搭載した画素の 20 dB に対して、線形性を持つ領域のレンジの拡大に成功した。画素出力の

線形性領域の拡大により、輝度計測範囲を拡大させ、従来画素では正確に計測できなかったシグナル検出が可能となった。この線形性の向上は低輝度状態での感度向上にも貢献している。脳機能イメージングでは、計測に用いられる蛍光色素や内因性シグナルの輝度変化が小さいため、感度と SN 比も重要となる。本計測結果によると、低輝度側における線形性と画素感度の向上が見られ、本デバイスは脳機能イメージングに求められる仕様を達成している。

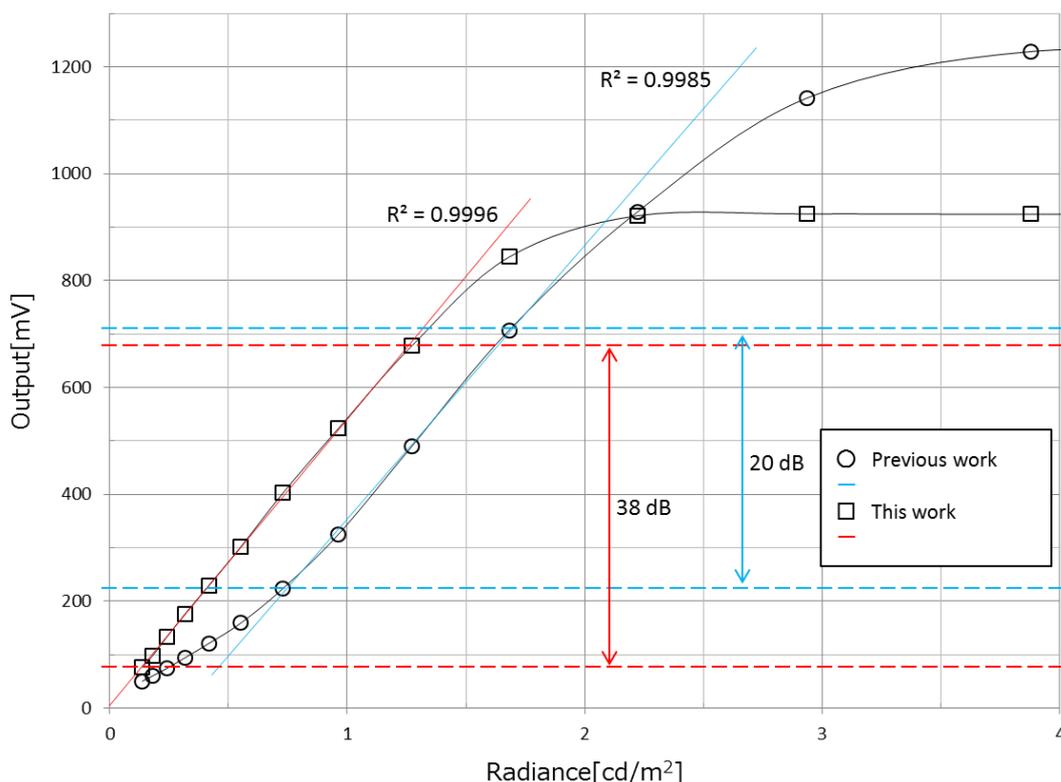


図 2.6 CMOS イメージセンサの出力電圧の線形性

図 2.7 に開発したセンサと過去のセンサによる取得画像の比較を示す。新たに開発したセンサは、画素ピッチ、画素回路は共通であるが、画素レイアウトが変更されている。同一条件で被写体を観察する実験を行い、取得画像を比較した。今回開発した CMOS イメージセンサでは出力電圧の線形性領域が向上しているため、取得画像のコントラストが安定している。過去のセンサは線形領域が狭く、コントラストが不安定であったが、本センサでは固定パターンノイズの減少が確認できた。図 2.7 に示す過去のセンサによる撮像結果では、縦筋状の固定パターンノイズが見られるが、本センサではノイズの現象が確認できた。過去のセンサが示す固定パターンノイズの標準偏差が 2.5% に対して、本センサでは 0.57% まで低減したことが確認できた[28]。

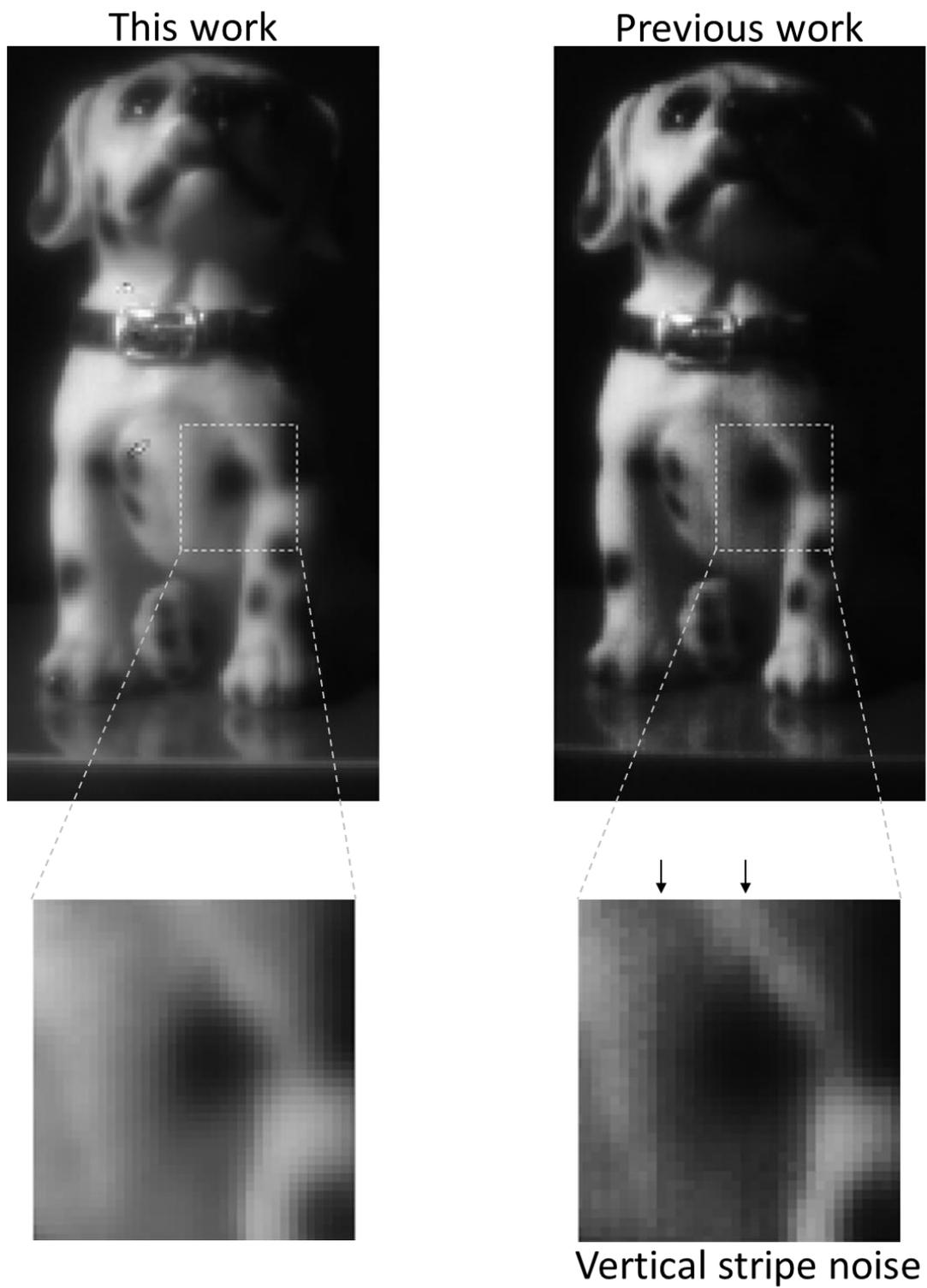


図 2.7 CMOS イメージセンサの取得画像の比較

2.4 フレキシブル基板の設計

本研究の CMOS イメージングデバイスはポリイミド製のフレキシブル基板上に実装することによって、デバイスによる脳及び組織への侵襲性の軽減を行った。ポリイミド製のフレキシブル基板は携帯電話や PC モニター等の可動部の配線に用いられており、屈曲性に優れているため省スペース内での使用に適している。また、屈曲に対する耐久性にも優れていることが知られている。本研究では、埋植用 CMOS イメージングデバイス専用の設計を行うことで、CMOS イメージングデバイスの小型化を行った。

フレキシブル基板は設計後、太洋工業株式会社に依頼して製造を行なった。製造された基板の外形を図 2.8 に示す。本研究の基板は開発した CMOS イメージングセンサの寸法(1.0 mm × 2.7 mm)に合わせた設計を行なった。デバイスの小形化と耐久性向上のために LED のフリップチップボンディングによる実装を採用する。そのため、LED 搭載部も LED(280 μm × 300 μm)に合わせた専用設計にした。フレキシブル基板のコネクタ部は、実験時以外は取り外すため、コネクタへの抜き差しが頻繁に行われる。そのため、耐久性向上を目的として、電解金メッキされた電極を用いた。これにより、実験中の断線は改善された。実際に、自由行動実験中にも不具合は見られなかった。開発したフレキシブル基板の写真を図 2.9 に示す。

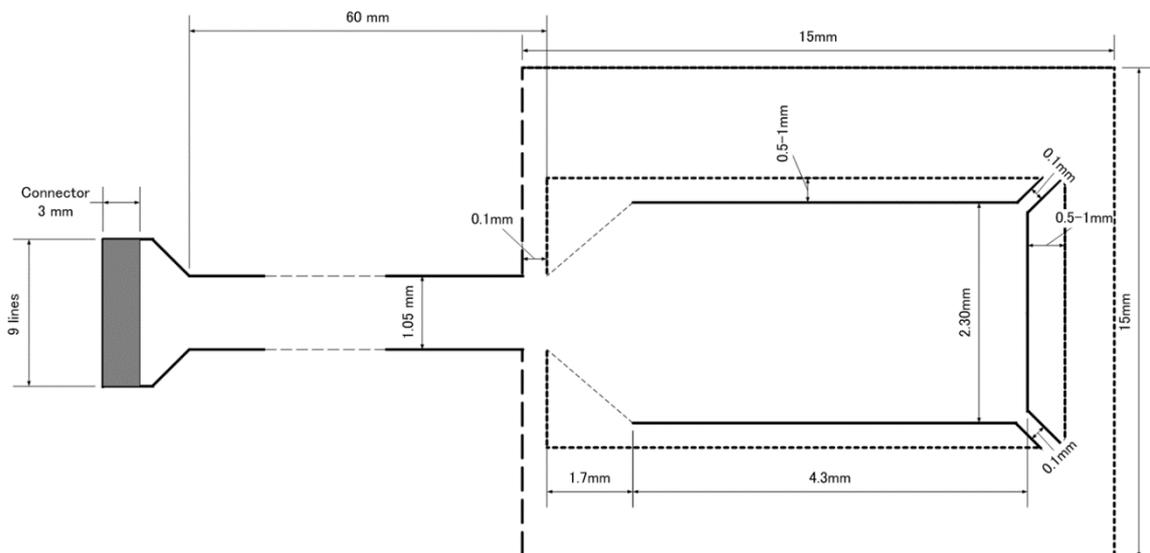


図 2.8 フレキシブル基板の外形

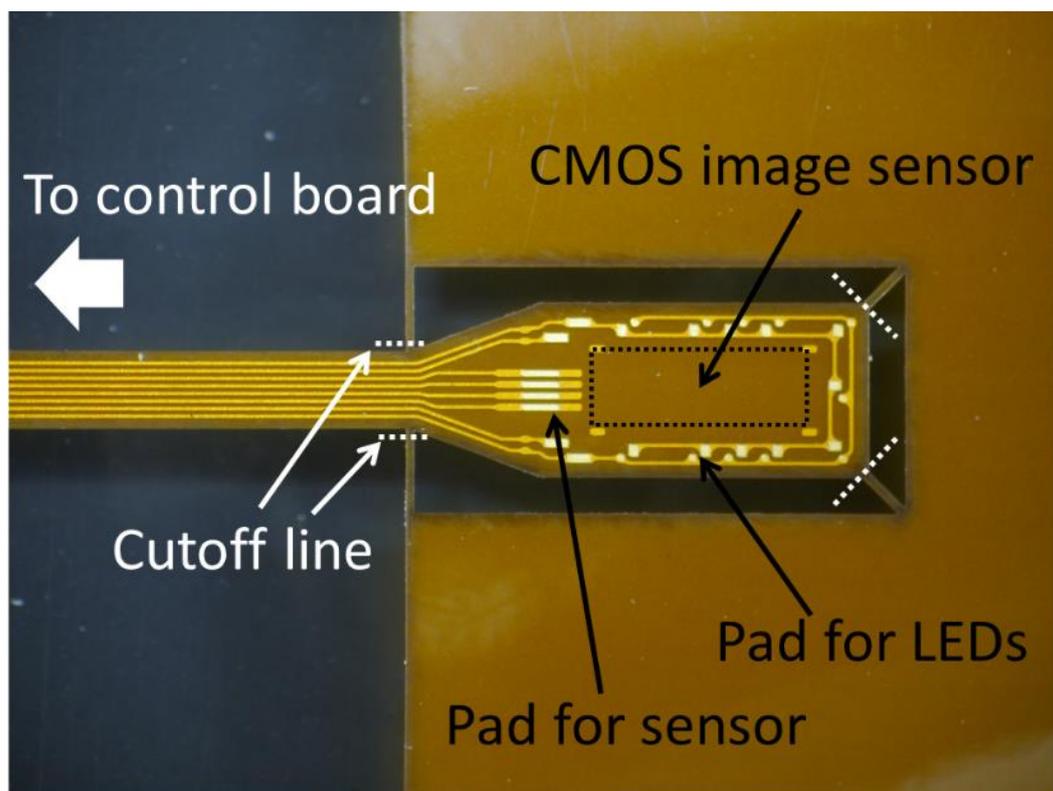


図 2.9 超小型埋植用 CMOS イメージングデバイスのフレキシブル基板

2.5 超小型埋植用 CMOS イメージングデバイスの実装

超小型埋植用 CMOS イメージングデバイスの実装方法について図 2.10 に示す。フレキシブル基板をフリップチップボンダーに設置し、LED のフリップチップボンディングを行う。フリップチップボンディングの接着剤として、異方導電性ペーストを利用し、LED の圧着方向に対してのみ導通するようにした。センサ周辺に LED を配置しているため、センサ側面部からの入射光が入る。そのため、取得画像では画素アレイの外側の画素が飽和状態になり、取得画像を損ねてしまう。この問題を低減するために、ブラックレジストを用いて側面の遮光処理を行った。遮光処理したセンサをフレキシブル基板の上にエポキシ樹脂を用いて接着後、アルミ線のワイヤボンディングによって基板と接続した。部品の実装後は、エポキシ樹脂によって配線部や LED 実装部を補強した。実装完了後、生体適合性と防水性向上のために、生体適合材料であるパリレン膜をコーティングした。パリレン膜の膜厚は $2\ \mu\text{m}$ である。図 2.11 に完成した超小型埋植用 CMOS イメージングデバイスの顕微鏡写真を示す。

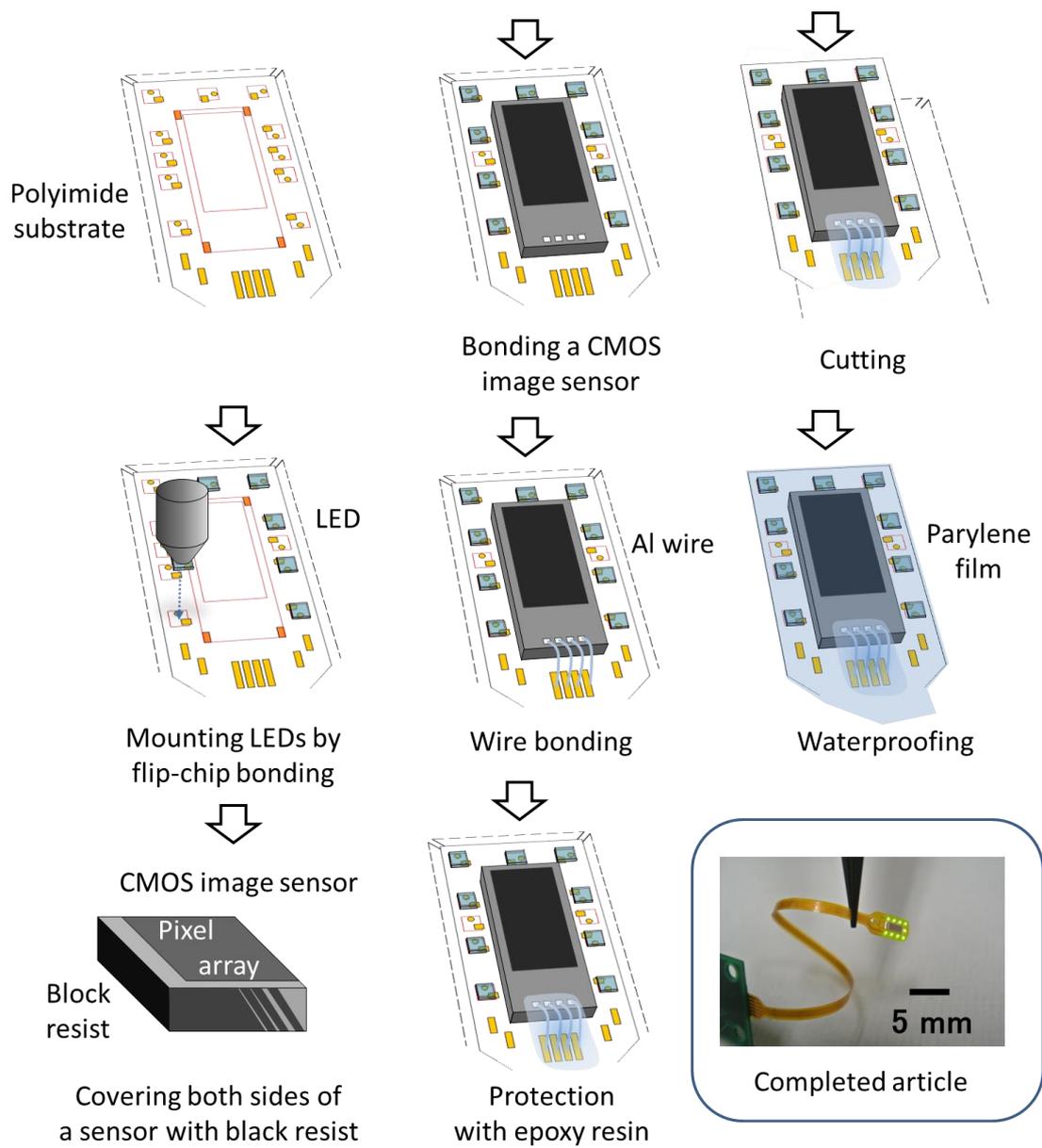


図 2.10 超小型埋植用 CMOS イメージングデバイスの実装

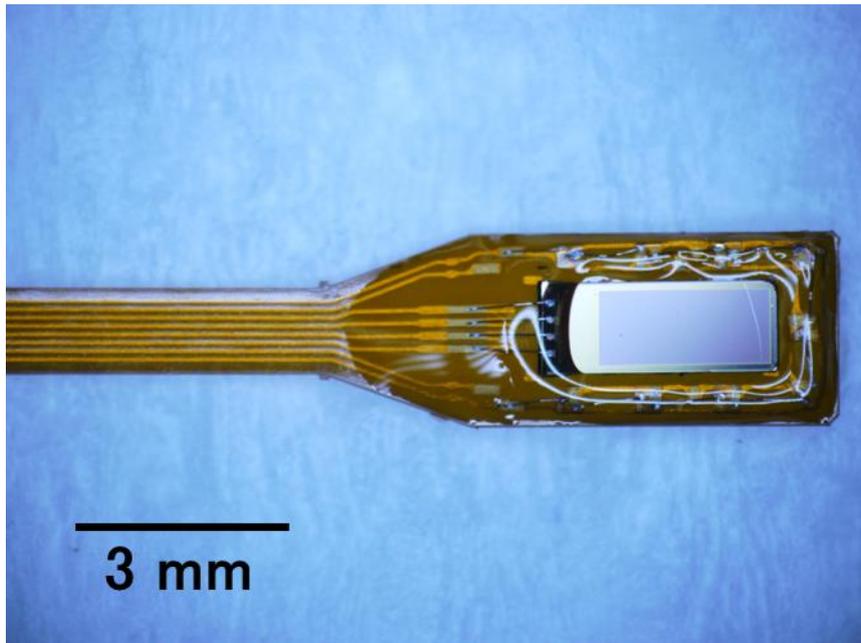


図 2.11 超小型埋植用 CMOS イメージングデバイス

2.6 自由行動実験用中継基板の設計

本研究で用いる生体内埋植 CMOS イメージングデバイスは、信号の入出力及び電源供給を行うために 4 本の配線が必要である。自由行動下で用いる場合に配線の動きによるノイズが信号に乗りやすい。この問題を解決するために、配線とデバイス間に挿入する中継基板を開発した。図 2.12 に中継基板の回路構成を示す。中継基板には、入力側にデジタルバッファ回路、出力側にユニティ・ゲイン・バッファ回路を搭載している。また、電源ラインの安定化のために、ノイズフィルタ回路を搭載した。

作製した中継基板を図 2.13 に示す。中継基板には主に、オペアンプとデジタルバッファが搭載されている。中継基板は CMOS センサを搭載したフレキシブル基板とコネクタで接続される。自由行動実験においては、中継基板をラットやマウスの背中に載せ、配線用のワイヤの張力をデバイスが直接受けることがないようにした。本研究では、設計した小型の中継基板を麻酔下の実験および自由行動実験にて使用した。

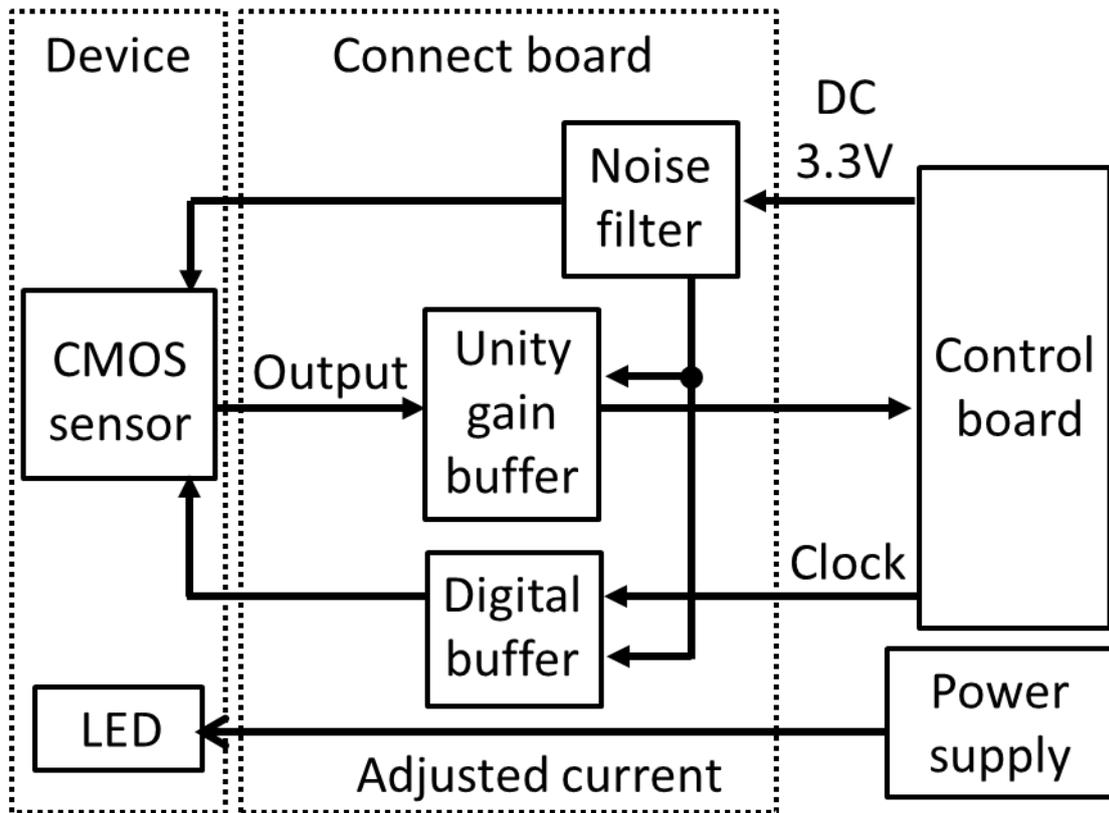


図 2.12 中継基板の回路構成

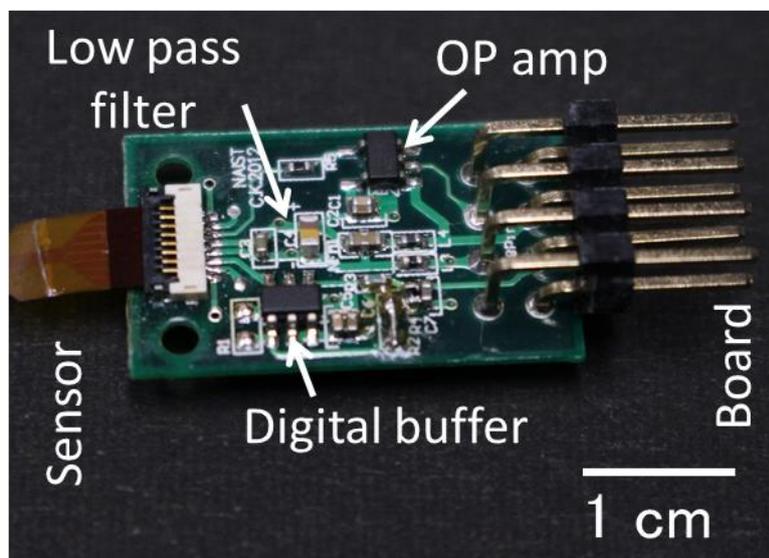


図 2.13 超小型埋植用 CMOS イメージングデバイスの中継基板

2.7 CMOS イメージングシステム

超小型埋植用 CMOS イメージングデバイスによる脳機能計測を行うためのシステムの構築を行った。図 2.14 に構築した CMOS イメージングシステムを示す。CMOS イメージングデバイスは、中継基板に接続された後に 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。またイメージングデバイスの制御と出力信号の計測は PC で行った。

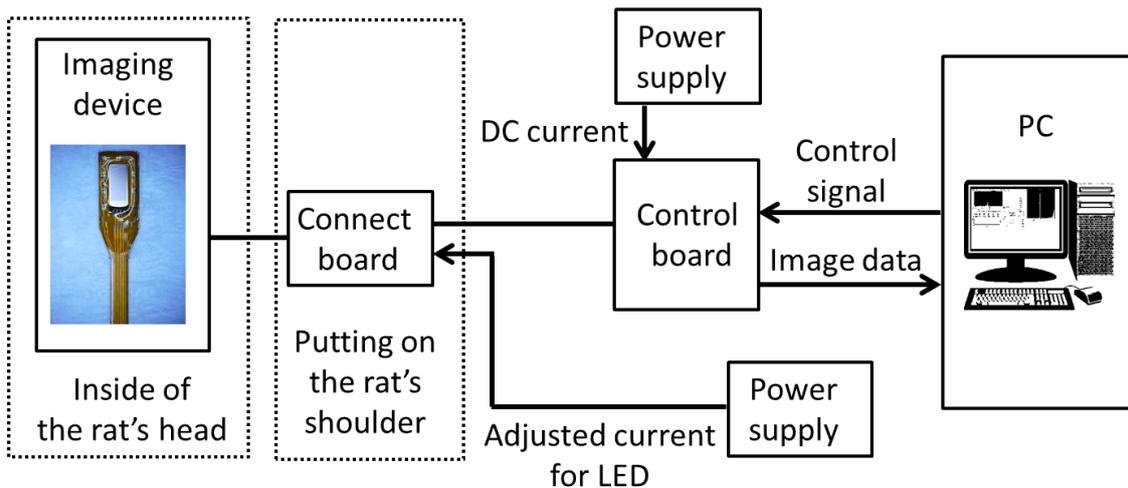


図 2.14 CMOS イメージングデバイスによる脳機能計測システム

2.8 まとめと考察

本章では、超小型埋植用 CMOS イメージングデバイスの開発を行った。開発したデバイスの重量は 0.02 g であり、ラットやマウス等の小型動物の頭部への埋植を可能にした。また、開発したデバイスによる自由行動実験中の脳機能計測を行うために、イメージングシステムの開発も行った。イメージングデバイスの駆動の安定化のために、小型動物の体に搭載可能な小型中継基板を開発した。中継基板を利用したことにより、自由行動下にある動物でも安定した脳機能計測が可能となる。

本デバイスは輝度変化の計測を目的としている。脳機能イメージングに用いられる蛍光色素もしくは内因性シグナルの輝度変化は変化率が 0.01-5%を示すものが多く、広いダイナミックレンジは必要とされていない。対象の輝度を計測できる感度と SN 比、輝度付近での線形性が求められる。本論文で観察した血流による内因性シグナルに関しては、輝度変化率が 5%未満で時間分解能が 1 s 程度であり、デバイスの仕様としては十分である。また、蛍光イメージングを用いる場合、OGB-1 とよばれる色素を用いた Ca^{2+} イメージングでは、輝度変化

率 3%未満で時間分解能は 100 ms 程度[29]であり、本デバイスの性能で十分観察可能である。しかし、電位感受性色素 (VSD) とよばれる蛍光色素は、輝度変化率は 0.5%未満、求められる時間分解能は 10 ms 以下である[7]。神経細胞による活動は 1ms レベルの速い活動を行っている。このような活動を観察するためには、観察方法の時間分解能が必要とされる。しかし、時間分解能の向上のためには、デバイスのフレームレートの向上が求められ、つまり、画素当たりの得られる光量が低下する。そのため、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される。また、本デバイスでは LED 光源を利用しており、LED による熱の問題が存在する。吸光や蛍光を用いたイメージングでは照射される光の強度を上げることで、イメージング感度をあげることは可能である。しかし、光強度の増大によって、LED の発熱が組織への損傷を与える。また、蛍光の場合は蛍光退色の促進に繋がり、実験時間が制限される。この問題を解決するために画素感度向上は必要である。

顕微鏡等を利用した脳機能イメージングでは、感度を向上させるためにビニングと呼ばれる処理を行う。ビニングとは感度向上のための画像処理技術の一つで、複数の画素を仮想的に一つの画素とみなすことで、1画素当たりの受光面積を増加させる技術である。現在用いているセンサでは、ビニング処理は実装されていない。また、本デバイスはコンタクトイメージングを用いるため、ビニングを行うことは空間分解能の低下になる。脳活動の領域レベルでの計測においては有効な手段となり得るが、神経細胞レベルでの計測には不向きとなる。感度上昇のための画像処理に関しては、計測状況に適した方法を用いていく必要があると考えられる。

第3章 内因性シグナルイメージング

3.1 内因性シグナルによる脳機能解明

3.1.1 内因性シグナルイメージング

生体活動に伴う代謝機能を利用する光学的計測法として内因性シグナルイメージングがある。内因性シグナルの計測対象として、組織内の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[17]が用いられる。血流は脳活動と密接に関係していることが知られており、磁気共鳴機能画像法 (fMRI) [18]や近赤外線分光法 (NIRS) [19]による脳機能観察が行われている。脳機能は複数の神経細胞によって構成されており、神経細胞は活動する時に酸素や栄養をエネルギー源として消費する。血管は消費した酸素と栄養を細胞に補給する役割を担っている。そのため、脳内には図 3.1 に示す様に血管が張り巡らされている[30][31]。神経細胞周辺には毛細血管が通っており、毛細血管から酸素や栄養が補給されている。神経細胞周辺の毛細血管は、アストロサイトや介在ニューロンと呼ばれるグリア細胞によって流量が制御されている[32][33]。図 3.2 に血管と周辺細胞の関係について示す[32]。神経活動に伴い、神経細胞からの信号がアストロサイトに伝わり、アストロサイト自身と介在ニューロンの働きにより、血管の収縮が制御されている。この血管の収縮作用により血流量は調節される。

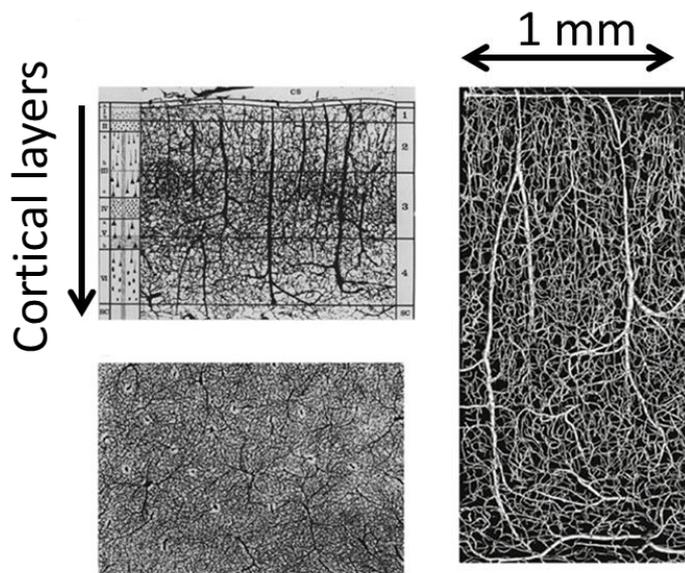


図 3.1 脳内に張り巡らされる血管[30][31]

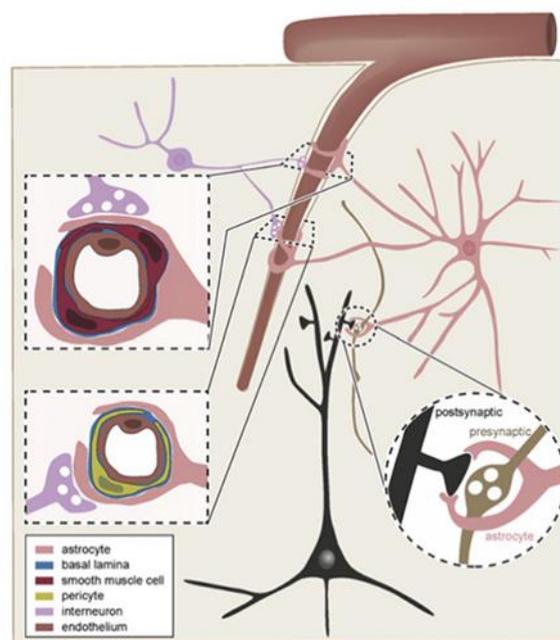


図 3.2 神経細胞周辺のグリア細胞による血流制御[32]

脳研究では、血流変化を利用することで脳機能計測が可能であるため、内因性シグナル計測が多く用いられている。図 3.3 では、神経活動によって引き起こされる脳内の血流変化を計測した研究を示す。この研究では、血中のヘモグロビンの吸光度特性を利用することで、脳血流の計測が可能になる。ヘモグロビンは波長 550 nm 付近に強い吸光を示すため、この波長付近を光源として利用して輝度変化を観察することにより血流量の観察が可能となる[34][35]。血流量の増加により、ヘモグロビンによる吸光量が増加し、観察される輝度が低下する。つまり、特定の領域の脳活動が活発化すると、その領域の血流量は局所的に増加するため、計測される輝度は低下する。この変化を光学的に観察することで、内因性シグナルイメージングが可能となる。

また、fMRI や NIRS といった脳機能観察に代表される手法は、消費される酸素量を血中ヘモグロビンの酸化還元変化を通じて観察している。図 3.4 に示す NIRS による脳機能計測においても、ヘモグロビンの吸光度特性を利用している[19][34]。血液中のヘモグロビンは、近赤外線領域で酸化型ヘモグロビンと還元型ヘモグロビンの吸光度に違いがあることが知られている。この特性を利用することで、神経活動によって消費される血液中の酸素量を光学的に計測することが可能となる。

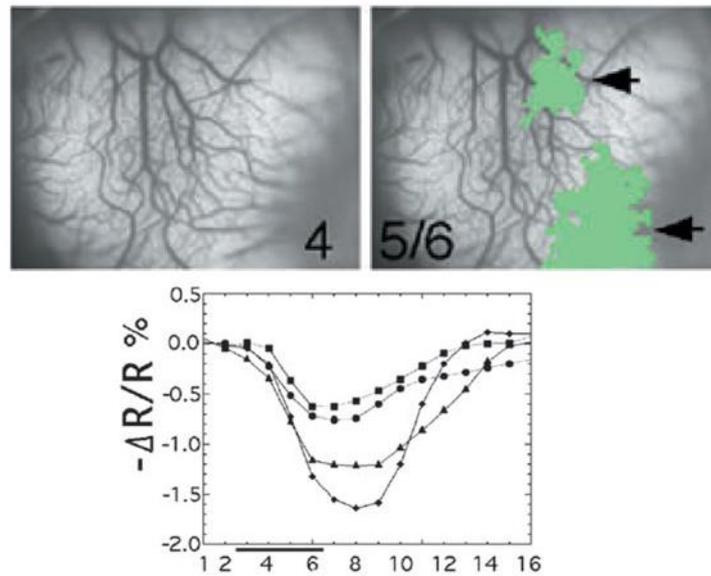


図 3.3 血流変化を利用した脳機能計測[35]

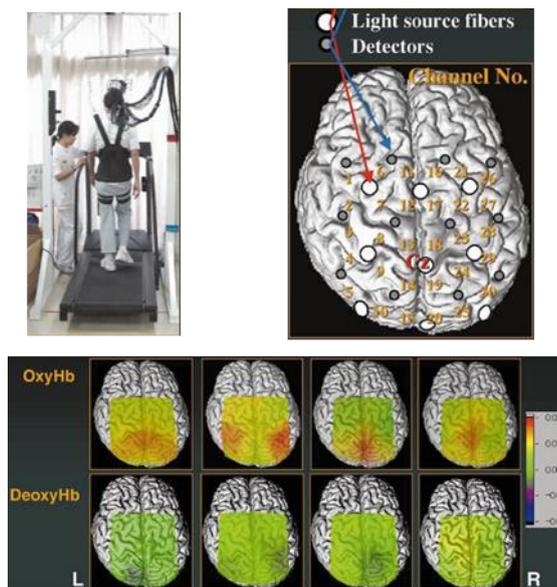


図 3.4 近赤外分光法による脳機能計測実験[19]

3.1.2 CMOS イメージングデバイスによる内因性シグナル計測

本章では、超小型埋植用 CMOS イメージングデバイスを用いた脳機能計測を行った。動物の頭部に完全に埋植可能なデバイスを用いることで、非麻酔の動物による行動実験を容易にし、高度な脳機能解明に貢献することが期待できる。過去の非麻酔の実験により、これまでに麻酔下で観察されてきた脳活動が実際に行われている脳活動と異なることは既に他の文献でも示されている[6][7]。そ

の報告の中で、非麻酔では脳機能が抑制されていることが示されており、複雑な運動制御には活性化と抑制の 2 つの機能が必要であることが推測される。歩行のように複数の筋を制御しながら行う行動にも、活性と抑制の機能が働きながら行動制御が行われていると考えられるため、実際の行動時に行われている脳内の神経細胞による情報伝達を観察する技術が必要となる。本実験で利用する超小型埋植用 CMOS イメージングデバイスは、第 2 章で開発したデバイスを使用した。フレキシブルなポリイミド基板上に CMOS イメージセンサと 9 個の波長 535 nm の LED 光源を搭載し、パリレンコーティングにより防水処理と生体適合性の向上が行われている。本章では血液中のヘモグロビンの吸光度特性を利用した脳機能イメージングを行うために、ヘモグロビンが強い吸光を持つ波長 535 nm の光源を利用した。

本章は、血流を利用した内因性シグナルイメージング実験に使用する実験動物と実験装置について述べた後に、実際に行った感覚刺激に応答する大脳皮質一時感覚野における内因性シグナルイメージングの結果を示す。また、計測した内因性シグナルの結果と電気生理実験を比較することで、計測結果が神経活動由来の内因性シグナルであることを確認した。

3.2 内因性シグナルイメージング実験

超小型埋植用 CMOS イメージングデバイスを用いて、ラットの大脳皮質一次体性感覚野における内因性シグナルイメージングを行なった。哺乳動物の大脳皮質には体部位に対応した活動領域が存在していることが知られている。感覚野における体部位局在はラットにおいても報告されている[36]。図 3.5 にラット大脳皮質一次感覚野における機能局在を示す[37]。一次感覚野における体部位局在では感覚情報の使用頻度が高い領域の占める面積が広い。ラットのヒゲの領域は感覚野の大部分を占めており、バレル構造とよばれる一本一本のヒゲに対応した領域が構成されている[38]。大脳皮質一次感覚野においてラットのヒゲの受容野を観察した。本実験では、超小型埋植用 CMOS イメージングデバイスを用い、ラットのヒゲを刺激した時のヒゲ受容野で応答する内因性シグナルを観察した。

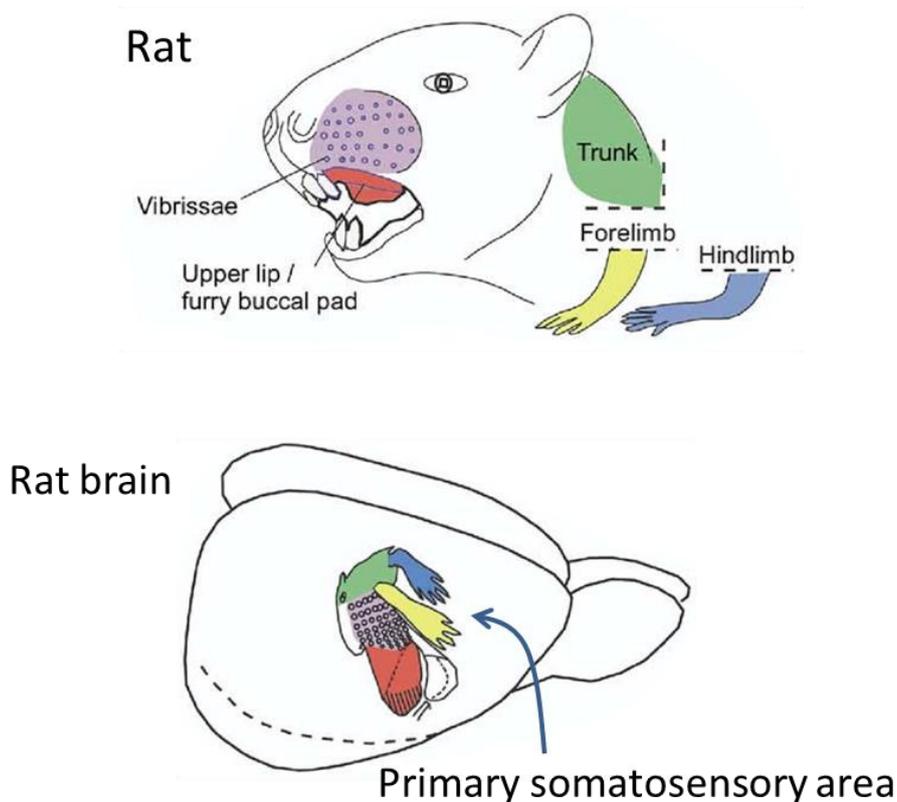


図 3.5 ラット大脳皮質一次感覚野の機能局在[37]

3.2.1 実験動物と手術

本研究では、実験動物として SDrat（オス、7 週齢、体重 $200 \pm 10\text{g}$ 、Japan SLC, Inc.）を用いた。動物実験は奈良先端科学技術大学院大学の動物実験に関する規定に基づいて行なった。手術開始前に、麻酔として 10%ウレタン（カルバミン酸メチルを生理食塩水で希釈）を投与量 1g/kg となるように腹腔投与した。図 3.6 にラットの手術手順を示す。まず、麻酔したラットを Stereotaxic instrument (Narishige) にイヤバーを用いて頭部を固定した。麻酔後のラットの体温を良好に保つために、温度調整ができるホットプレートにより腹部の保温を行なった。本実験では大脳皮質一次体性感覚野のヒゲ受容野における脳機能計測を目的としているため、先述したラットの脳地図を参考にして開頭部位を決定した。計測部位の中心は、ブレグマと呼ばれる頭蓋骨の矢状縫合と冠状縫合との交点を基準に Posterior(後方向)に 1 mm 、正中線から Lateral(横方向)に 5 mm の場所とした。頭皮を切開して露出させた頭蓋骨から、計測部位を中心とした 8 mm 角の頭蓋骨を除去した。頭蓋骨除去後に、露出した脳表に超小型埋植用 CMOS イメージングデバイスを設置した。脳表に設置したデバイスの写真を図 3.6 に示す。

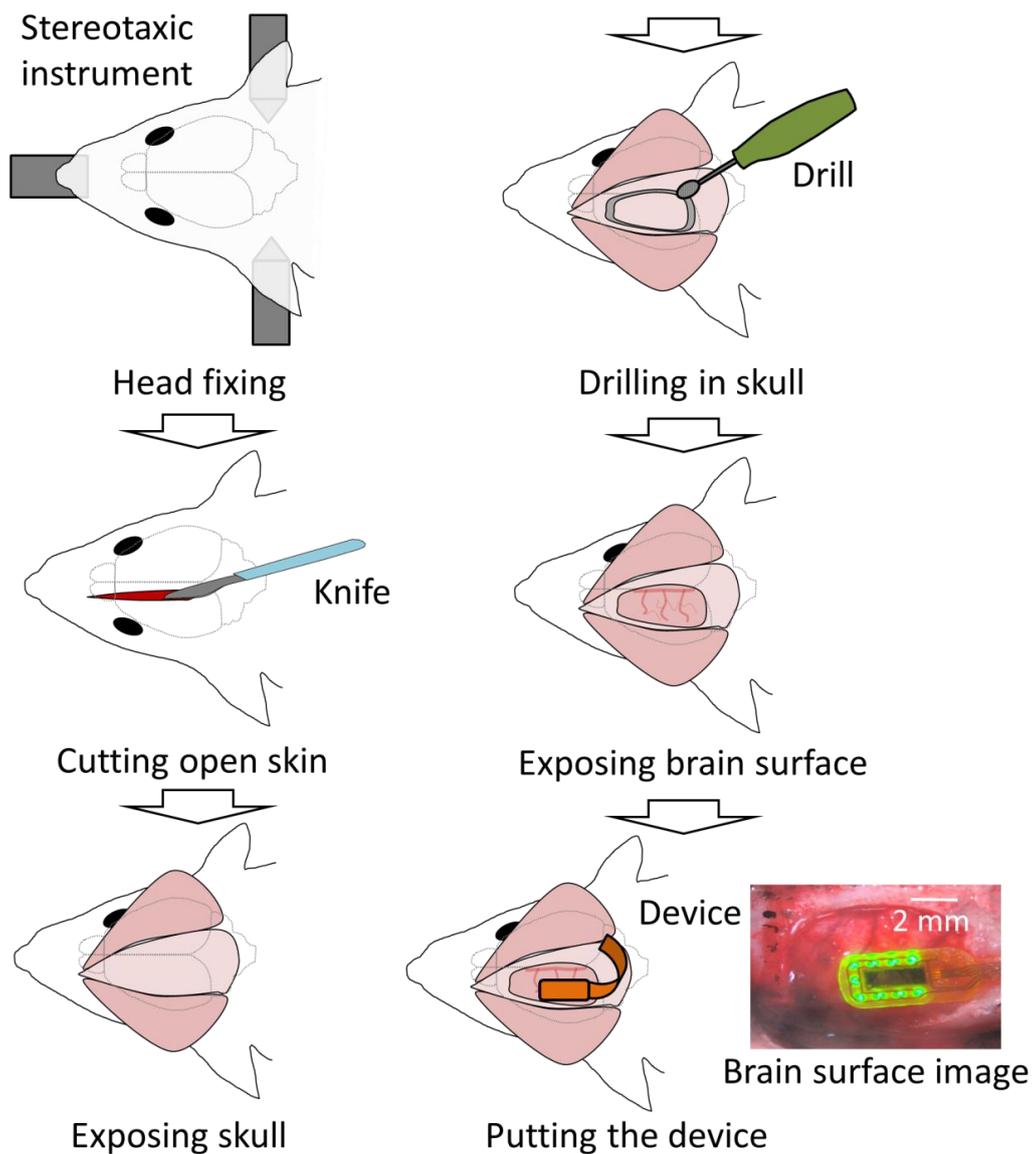


図 3.6 麻酔下における内因性シグナルイメージング実験のラットの手術

3.2.2 感覚刺激装置

本研究では、ラットに対して定期的に感覚刺激を与える装置を開発した。図 3.7 に刺激実験のイメージ図を示す。麻酔したラットのヒゲに対して接触刺激を与えることで、感覚刺激に対する感覚野における脳機能計測を行った。ヒゲ刺激装置には、同様の実験を繰り返す機能とイメージングシステムと同期する機能が求められる。イメージングシステムとは別にヒゲ刺激装置制御システムを作製し、制御プログラムによる刺激装置の制御とイメージングシステムとの同期を行った。装置のブロック図を図 3.8 に示す。

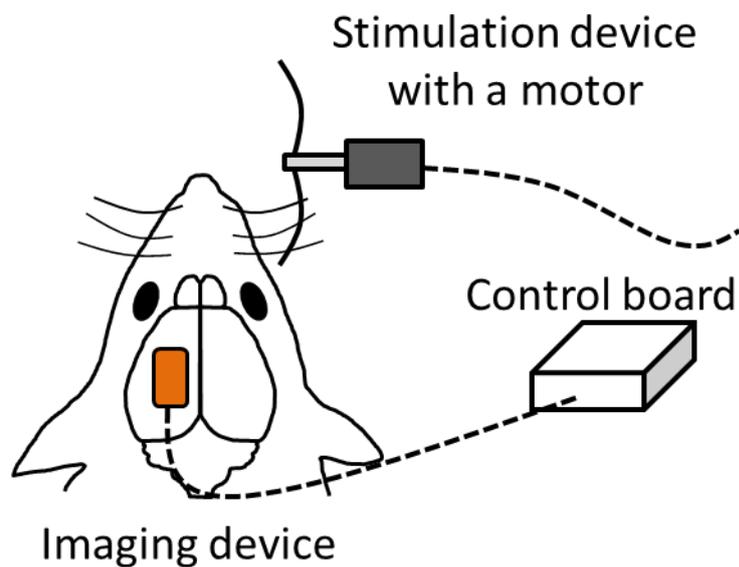


図 3.7 ヒゲへの感覚刺激装置

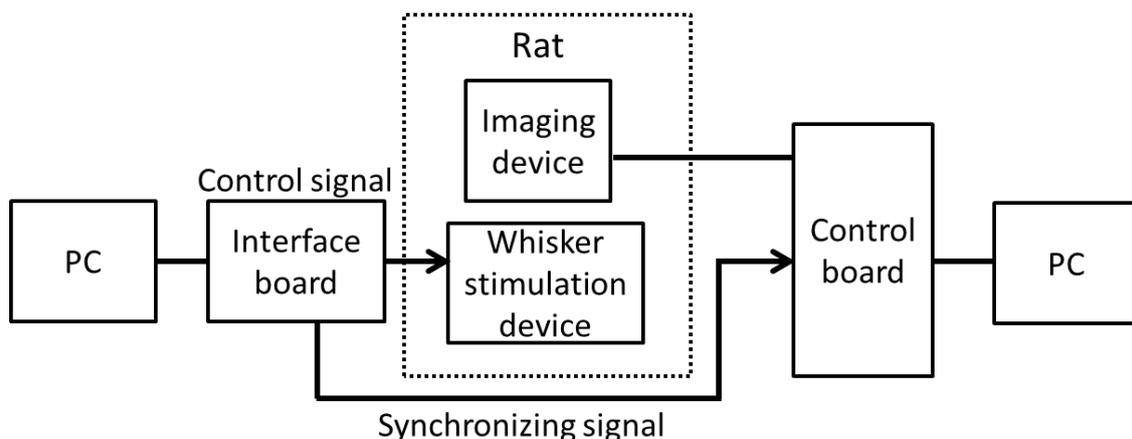


図 3.8 感覚刺激実験における装置構成

ヒゲ刺激装置はブラシレス DC ギアモーター(日本電産コパル電子、電源電圧 6V、310 rpm)を使用した。ヒゲの刺激部はポリプロピレン製のプロペラを使用し、モーターを回転させることで刺激を与えた。作製したヒゲ刺激装置を図 3.9 に示す。ヒゲ刺激装置をプロペラがラットのヒゲだけに接触するように固定台を用いて設置した。ヒゲ刺激装置は制御プログラム(Labview)によって管理した。装置の制御は図 3.10 の制御シーケンスに従って行った。約 5 Hz のヒゲ刺激を 5 秒間行い、各試行間に 2~3 分間のランダムな時間間隔を開けて繰り返し行った。なお、各試行間に 2~3 分間の間隔を空けているのは、刺激によって誘発

された脳活動を鎮静させるための時間である。実験では、ヒゲ刺激の試行は 10 回繰り返して行った。本実験では、ヒゲ刺激時の脳機能計測を行うために、ヒゲ刺激開始の 2 秒前から計測を開始し、刺激終了後 10 秒後まで計測を続けた。

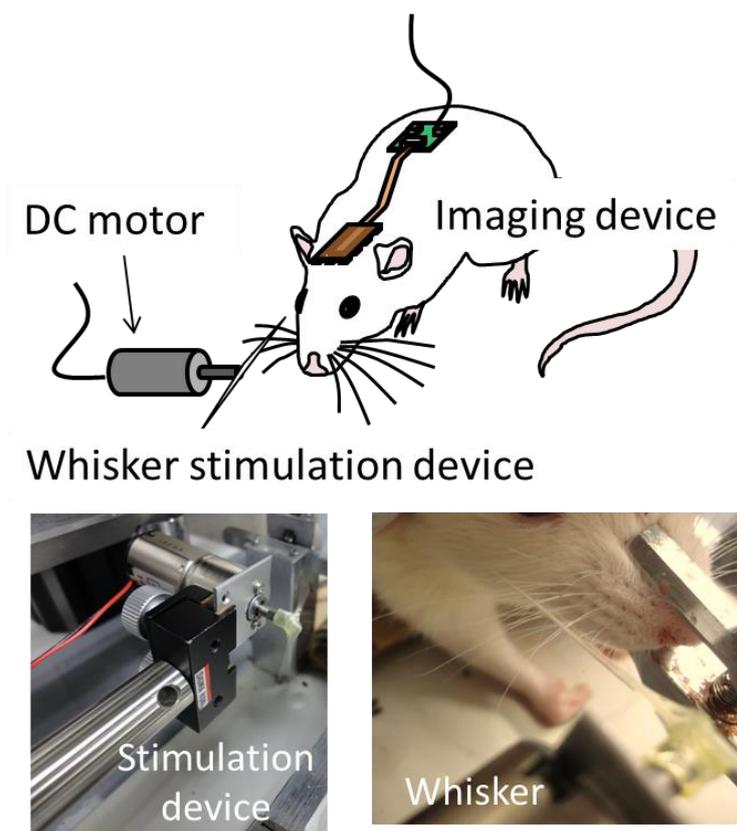


図 3.9 ヒゲ刺激装置

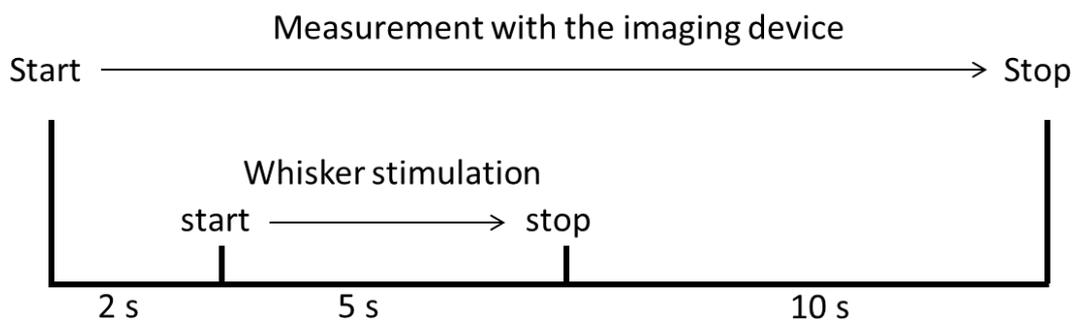


図 3.10 感覚刺激実験シーケンス

3.2.3 イメージングシステム

CMOS イメージングデバイス

超小型埋植用 CMOS イメージングデバイスの光源には緑色 LED (Epistar、 $\lambda=535$ nm、サイズ) を使用し、血液中のヘモグロビンの流量変化による内因性シグナルイメージングを行った。

麻酔下における内因性シグナルイメージング実験で使用したイメージングシステムを図 3.11 に示す。LED を点灯するための電流はポリイミド基板上の配線から供給される。センサの入出力はポリイミド基板上の配線から、オペアンプとデジタルバッファを搭載した中継基板を中継し、制御基板と接続した。制御基板の信号は A/D 変換された後に PC に搭載されたインターフェースカードを介して PC に取得され、制御プログラム(VisualC++)にて信号処理・制御される。本実験では、フレームレート 58 Hz での撮像を行った。

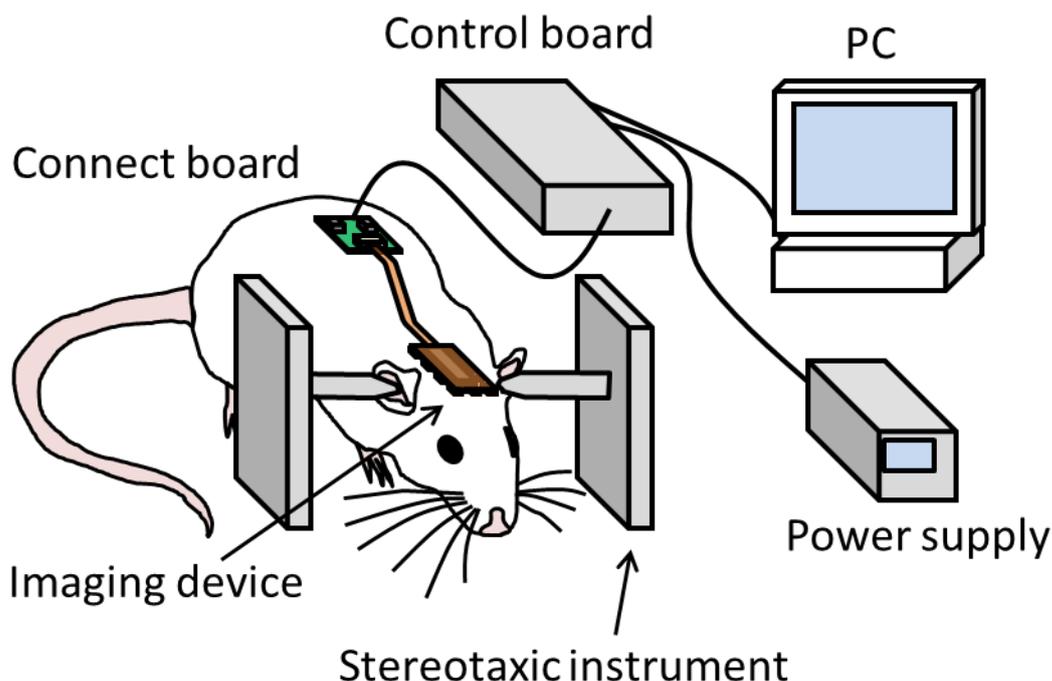


図 3.11 超小型埋植用 CMOS イメージングデバイスの脳機能計測システム

3.2.4 内因性シグナルの解析

脳機能計測システムで取得した内因性シグナルの結果は、解析プログラム (Visual C++) で解析した。取得した 10 試行分のデータを加算平均することにより、心拍ノイズ等のノイズ成分を低減した。加算平均では、ヒゲへの刺激開始時を基準として、刺激前 500 フレーム、刺激後 1500 フレームの合計 2001 フレームを加算平均した。加算平均によって得られた結果から、輝度変化の解析

を行った。

輝度変化を示す画像および動画の作成のために、MATLAB を用いた解析プログラムを作成した。このプログラムは、各フレームの輝度変化率を擬似カラー化して表示する。基準画像からの閾値を設定することで、閾値以上の変化を計測した領域のみの表示が可能である。また、脳表イメージを背景とすることで、脳表における内因性シグナルの発生領域を明確に示すことができる。

3.3 感覚応答の観察

超小型埋植用 CMOS イメージングデバイスを用いて、脳内の血流変化に伴う内因性シグナルイメージングを行なった。実験動物には麻酔したラットを用いた。

3.3.1 ヒゲ刺激に反応する内因性シグナル

麻酔下にあるラットの右側のヒゲに対して感覚刺激装置による刺激を与え、その時の大脳皮質一次感覚野ヒゲ受容野における輝度変化を観察した。刺激実験は図 3.10 に示すシーケンスに従った。図 3.12 にヒゲ刺激によって得られた内因性シグナルの解析結果を示す。画像中の黒い線は脳表の血管である。図 3.12 の左の画像は刺激開始 2 秒前の内因性シグナルを示している。右の画像は、刺激後シグナル強度が最大を示した時の内因性シグナルである。輝度変化率が高い場所から順に黄色、橙、赤のグラデーションで表示した。計測された内因性シグナルの結果から、計測領域の右下の領域で強い応答が発生したことが確認できた。場所による内因性シグナル強度の比較を行うために、図 3.12 上に示した 3 個の計測点における輝度変化率を計測した。計測点における輝度変化率を図 3.13 に示す。計測点 3 において、特に強い輝度変化を計測した。計測点 3 では、刺激開始から 4 秒後に最大変化率-1.5%が得られた。

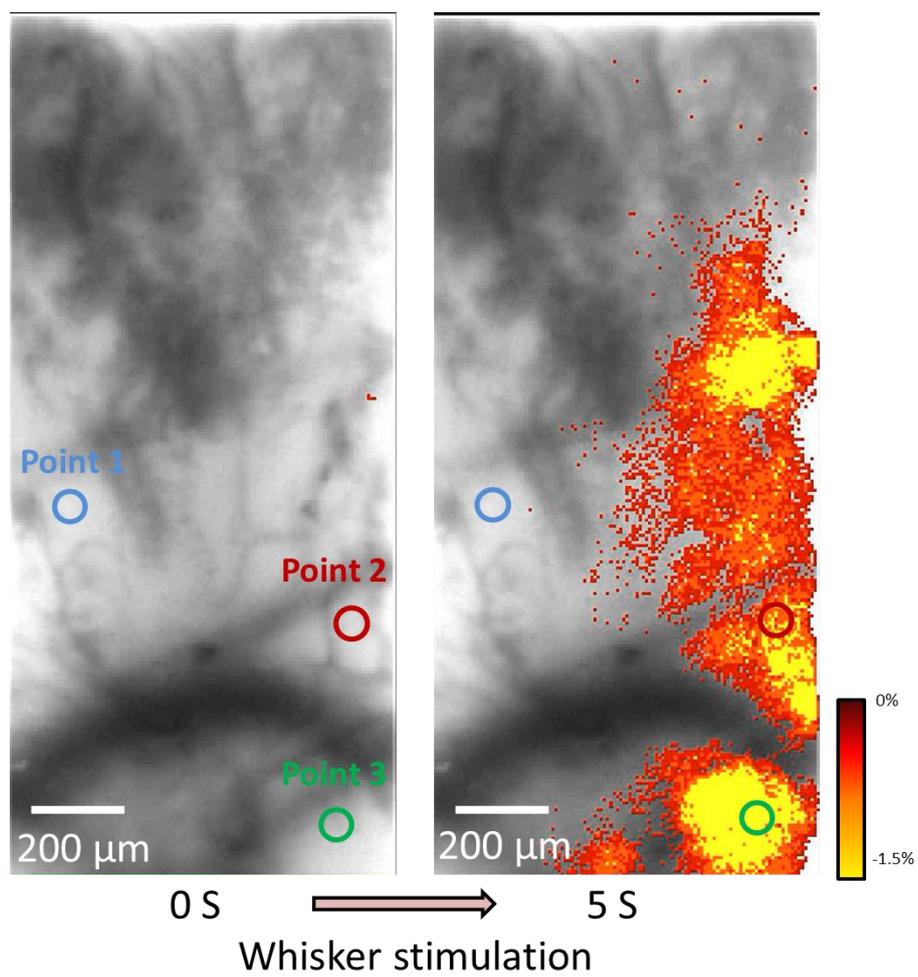


図 3.12 ヒゲ刺激に対する内因性シグナル応答

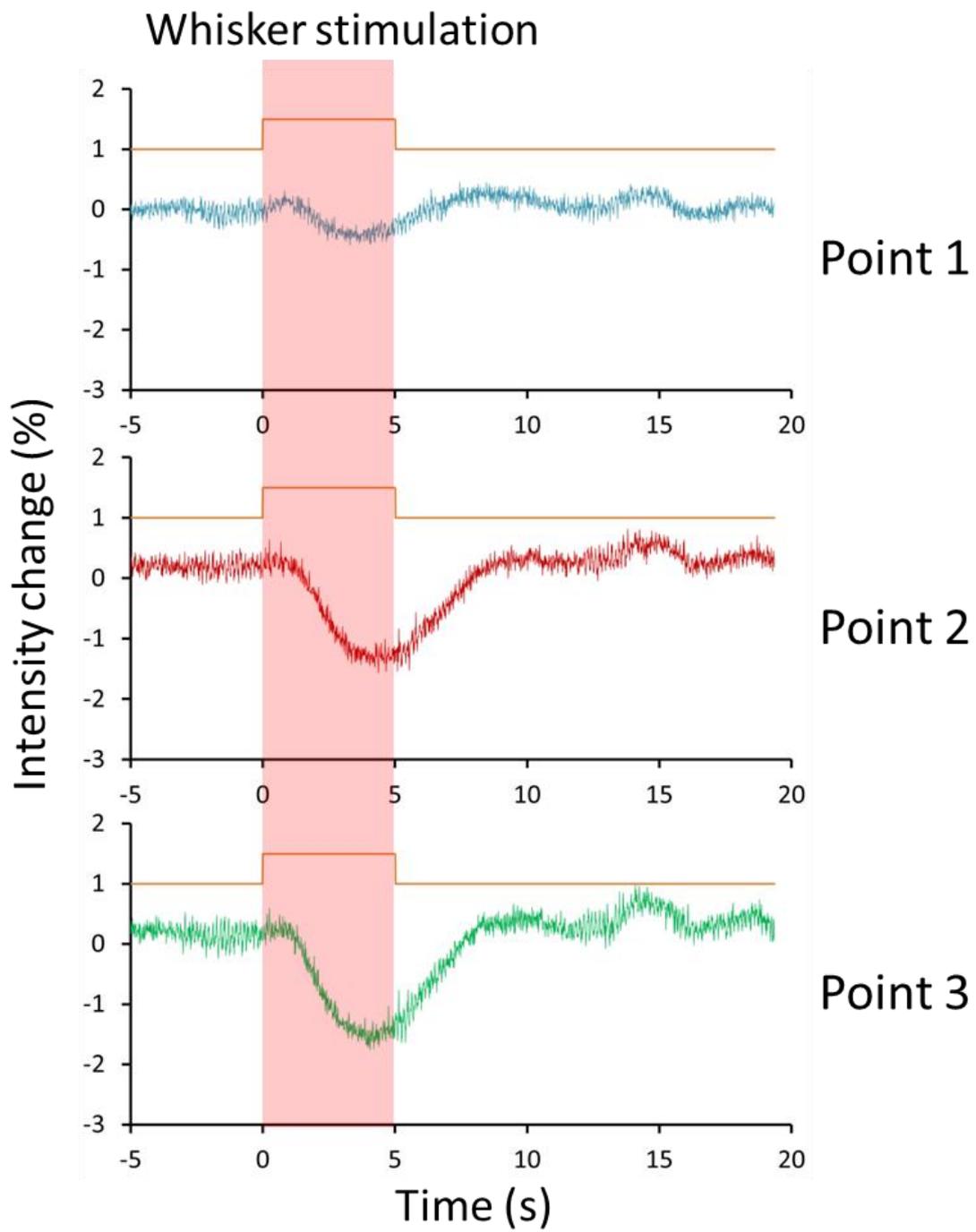


図 3.13 計測点における内因性シグナルの変化率

強い内因性シグナルが計測された図 3.12 の計測点 3 について、詳細な解析を行った。解析を行った領域は図 3.14 中の赤い四角枠で示す。図 3.15 に四角で囲った領域で計測された内因性シグナルの解析結果を示す。図 3.15(a)は、抜き出した領域の輝度変化率を擬似カラー表示したものである。輝度変化率が高い領域は赤色、低い領域は青色で示した。また、時間経過毎に並べることによって、内因性シグナルの広がりを示した。図 3.14 に矢印で示した計測点 3 を通る画素列を時間経過毎に並べるラインスキャンを行った結果を図 3.15(b)に示す。これらの結果でも、刺激後から約 2 秒後に内因性シグナルが計測され、4 秒後には最大値を計測した。

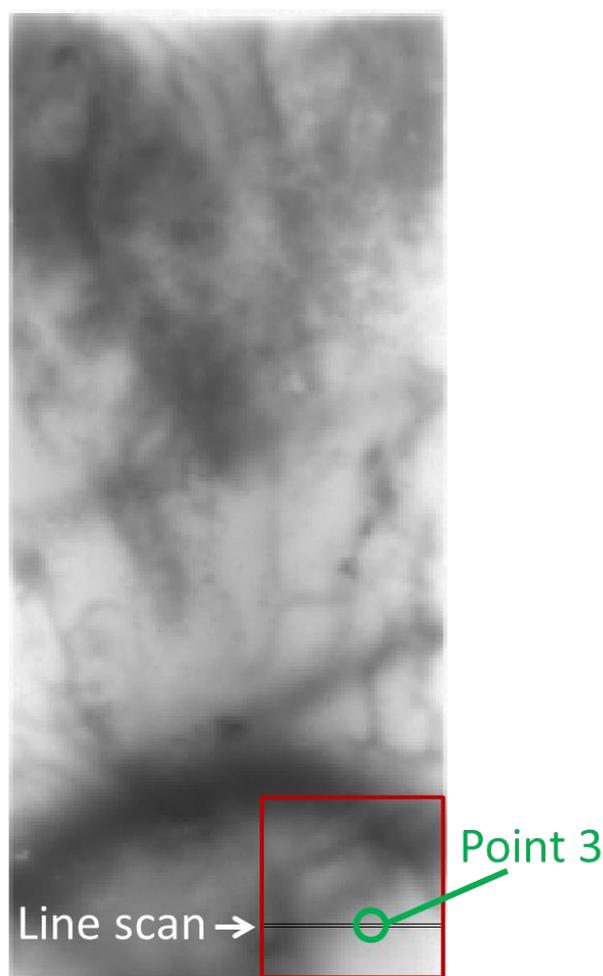


図 3.14 計測点 3 周辺の解析領域とラインスキャン領域

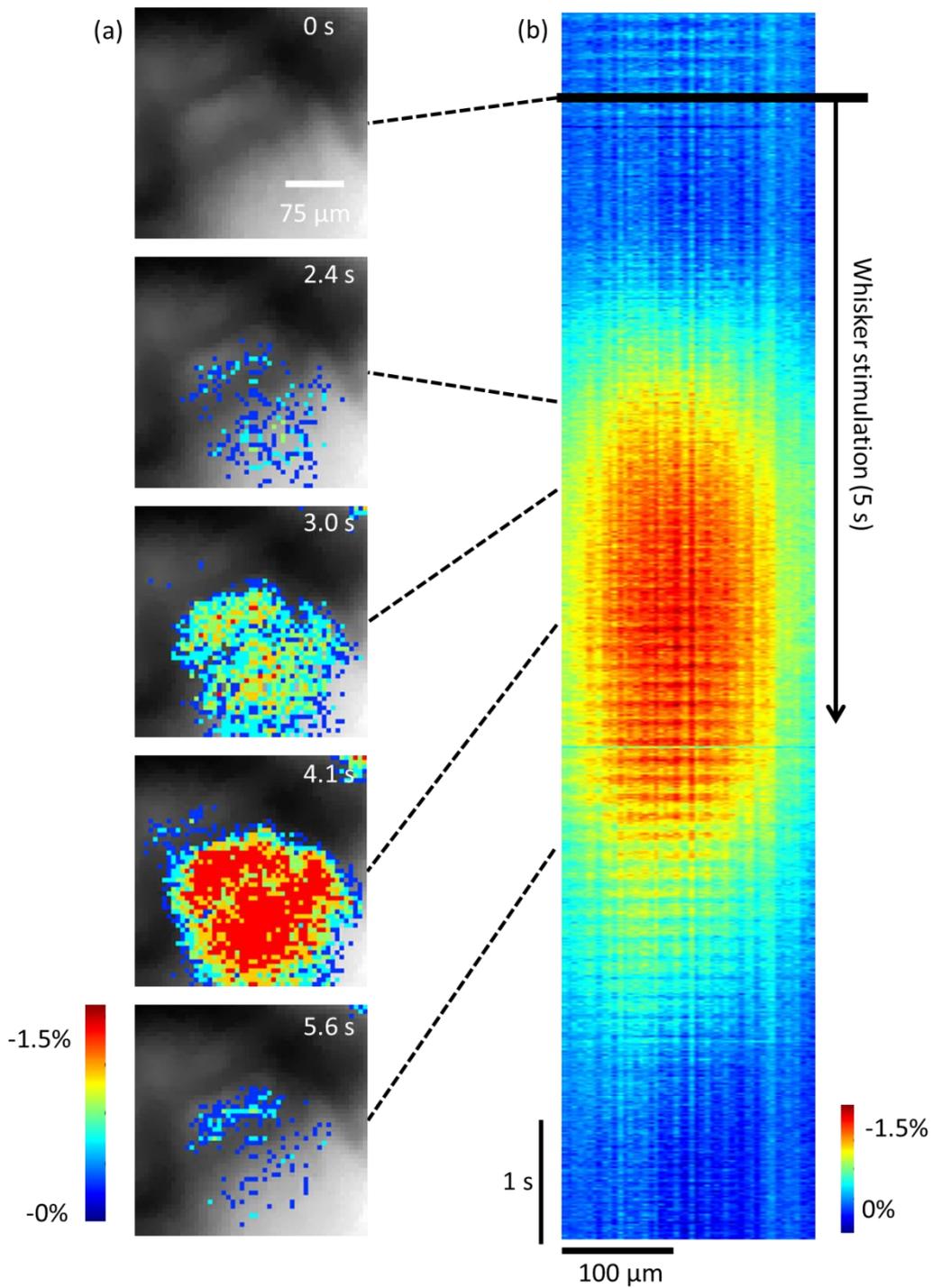
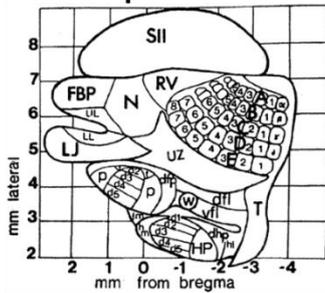


図 3.15 計測点 3 における内因性シグナル. (a)擬似カラー表示した内因性シグナル応答. (b)ラインスキャンイメージによる経時的な応答の可視化

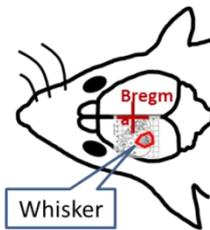
本研究で、内因性シグナルが観察された領域と他の論文[36]で紹介されているラットの脳地図を比較した結果を図 3.16 に示す。図 3.16 の脳地図はラットの

右脳の一次感覚野を示しているため、反転させて脳地図が示す領域を観察したラット脳表に照らし合わせてみるとヒゲの受容野が一致していることが確認できた。

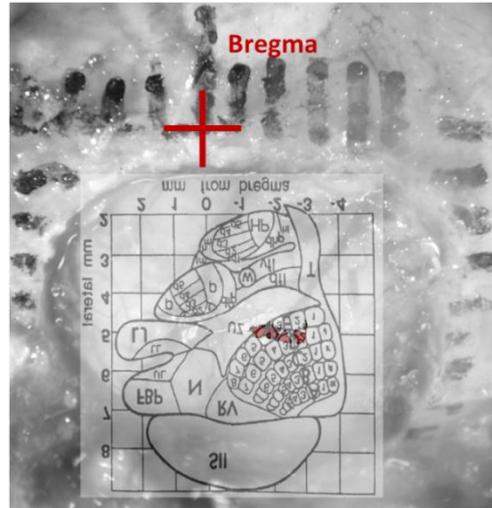
Brain map



B. Kolb and R. C. Tees, The Cerebral Cortex of the Rat



Superimposed the results and brain surface



The red area indicates the receptive area

図 3.16 大脳皮質一次感覚野の脳地図と内因性シグナル計測位置の比較

3.3.3 ヒゲ刺激時と後脚刺激時の応答の比較

右ヒゲと右後脚を刺激した時の左脳ヒゲ受容野における内因性応答の比較を行った。図 3.17 に比較実験の結果を示す。なお、この実験は、左脳の大脳皮質体性感覚野で観測された結果が右ヒゲに特異的な応答であることを確認するために行った。右後肢に与える感覚刺激もヒゲの刺激と同様に行なった。右ヒゲを刺激したときに左脳ヒゲ受容野で特異的な内因性シグナルが観測された。

実験の正確性を確かめるために、5匹のラットで同様のヒゲ刺激実験を行った。図 3.18 に比較実験の結果を示す。それぞれのラットの左右のヒゲを刺激した結果、左脳の大脳皮質一次体性感覚野で観察される内因性シグナルは右ヒゲへの刺激に対して優位に反応することが観察された。この結果から、領域特異的な血流変化による内因性シグナルの観察に成功したと考えられる。

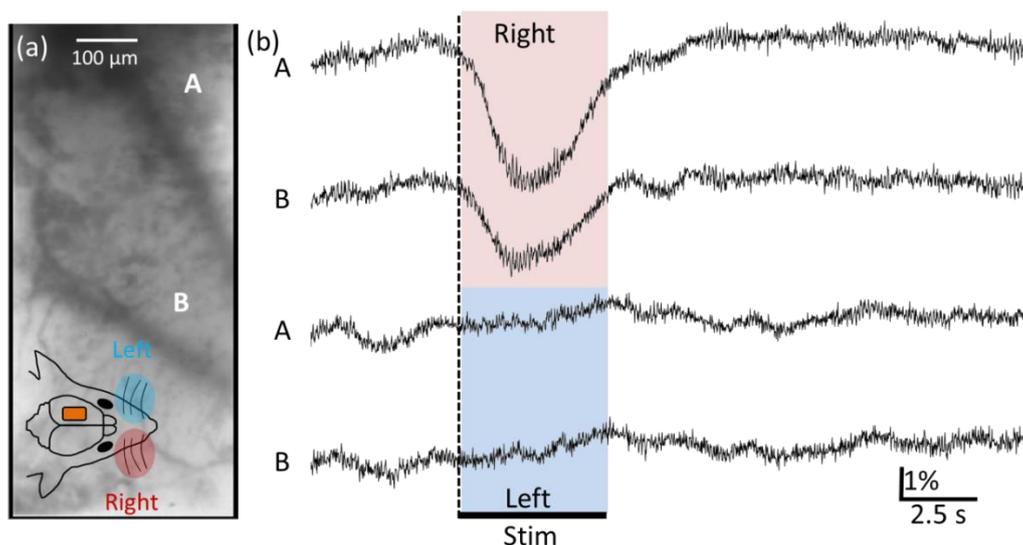


図 3.17 左右のヒゲ刺激に対する応答の比較

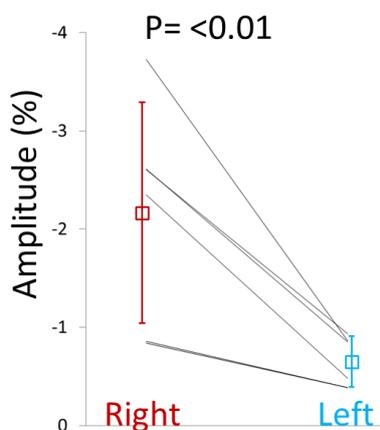


図 3.18 左右のヒゲに対する応答の比較(n=5)

3.3.2 内因性シグナルと電気生理記録の比較

電気生理学実験を用いて、取得した内因性シグナルの確認を行なった。ヒゲへの刺激方法は図 3.10 に示す刺激シーケンスに従って行った。図 3.19 に電気生理実験の構成を、図 3.20 に電気生理実験の様子を示す。電気生理学実験には抵抗値 5Ω のタングステン電極(A-M Systems)を使用して、単一神経細胞の細胞外電位を記録した。電気生理条件はゲイン 500 倍、Hi-pass: 150 Hz、Low-pass: 3 kHz である。電気生理実験では、計測電極をラットの大脳皮質一次体性感覚野ヒゲ領域に刺入した。また、計測点から少し離れた場所に参照電極を刺入した。電気生理記録では、心電図や呼吸によるノイズを取り除くため、記録電極で計測した電位変化と参照電極が計測した値の差分を算出することで、神経活動の電位変化を計測した。内因性シグナルの観測箇所と電気生理記録が同じ場所になるように行い、同様の感覚刺激実験を行なった。内因性シグナルと電気生理記録の比較を図 3.21 に示す。電気生理記録からは、神経活動による電位変化のみを波形データを元に抽出した。その結果、ヒゲを刺激している時に神経パルスが頻発していることが確認できた。これらのことから、今回取得した内因性シグナルは神経活動によって引き起こされているものであると考えられる。なお、図 3.21 に示す内因性シグナルの結果は加算平均を行っていない。

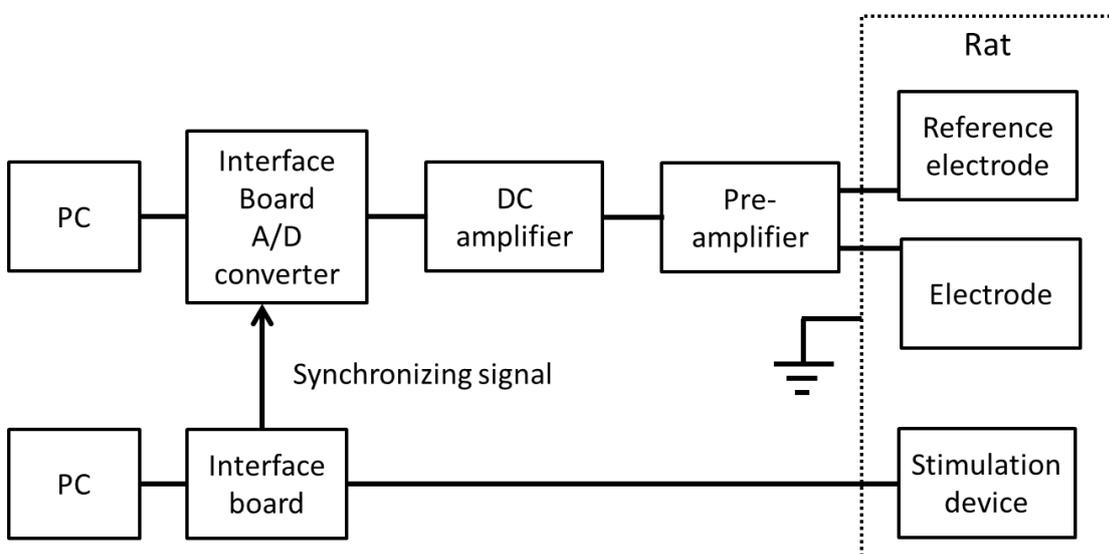


図 3.19 電気生理実験の構成

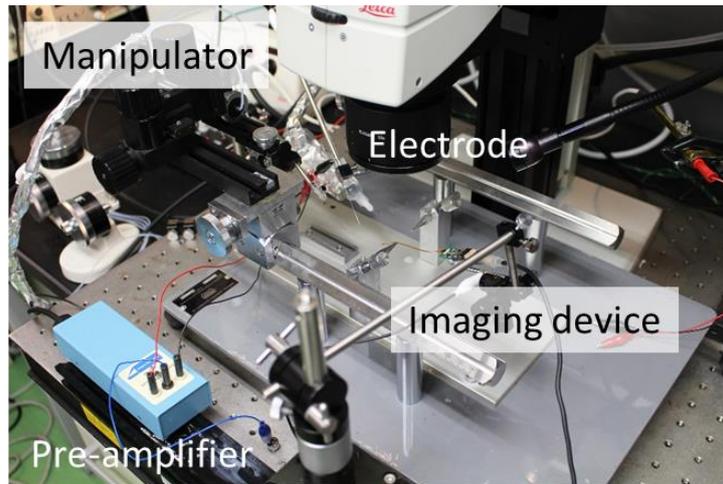


図 3.20 電気生理実験台

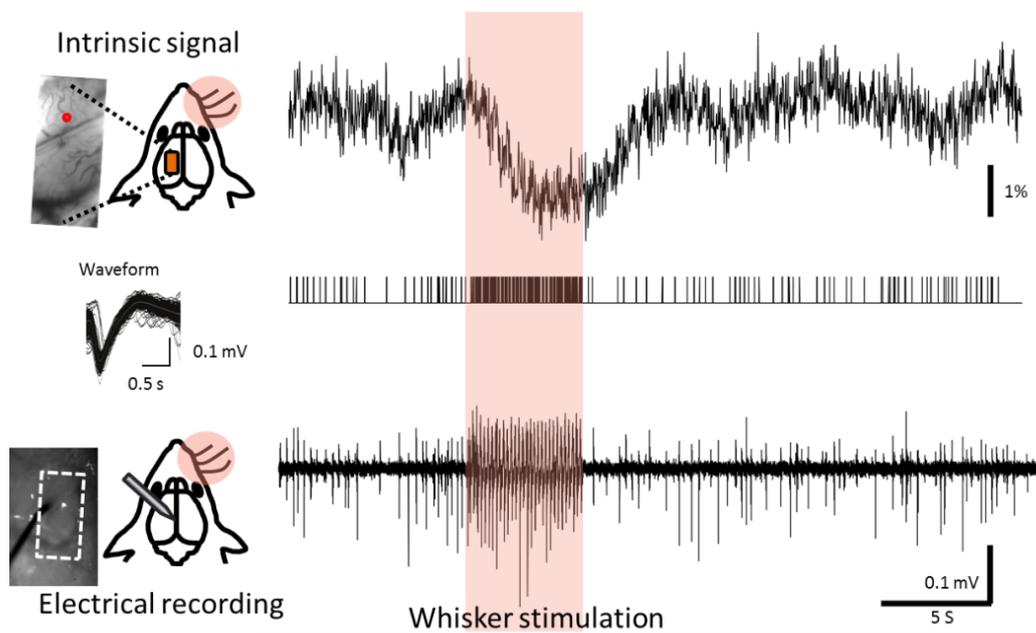


図 3.21 内因性シグナルと電気生理記録の比較

3.4 まとめと考察

埋植型超小型脳機能 CMOS イメージングデバイスを開発し、デバイスによる脳の内因性シグナルイメージングに成功した。麻酔下ラットの大脳皮質一時体性感覚野ヒゲ領野にイメージングデバイスを埋植し、ヒゲへの感覚刺激に応答する内因性シグナルの計測を行った。ヒゲへの刺激開始から 4 秒後に最大変化率-1.5%の内因性シグナルを計測することに成功した。また、刺激特異的な内因性シグナル応答であることを確認するために、刺激部位とは異なる部位を刺激した時の応答と比較した。実験の結果、計測したヒゲ領野に特異的な内因性応答であることが確認できた。さらに本章では、電気生理実験による電氣的な神経応答とイメージングデバイスで計測した内因性シグナル応答を比較する実験を行い、計測した内因性シグナルが神経応答と一致していることを確認した。

本章では、血液中に含まれるヘモグロビンの吸光度特性を利用した脳機能イメージングを行った。脳内では、神経細胞が活動すると細胞に酸素や栄養を供給するために、血管が拡張され血流が上昇することは既に知られている。ヘモグロビンが強い吸光を持つ波長の光源を利用することで脳内の血流変化を計測することが可能になる。本デバイスには、波長 535 nm の LED 光源を搭載しており、血流量の増加に伴ってヘモグロビンが増加し脳内の緑色光の吸光が強くなる様子を計測した。観察された血流量の変化は、活動領域周辺の血液の総量が増加したことを示しており、感覚刺激に応答した神経活動に由来している。血流を利用した内因性シグナルは、蛍光イメージング法で見られる蛍光退色がなく、長期的に安定した脳機能観測を可能にする。

本論文で用いた血流による内因性シグナルは広い領域における神経活動の分布の観察や領域間の関係解明には有効な手段であるが、時間分解能が低いため詳細な神経活動を計測することには不向きである。例えば、神経細胞レベルでの脳機能解明においては、ミリ秒単位の時間分解能が求められる。電気生理学的手法は時間分解能に優れているが、空間分解能が劣っているため、神経ネットワークの解明には不向きである。この点を改良した電気生理型デバイスとして、電極を剣山状に並べたユタ電極が開発されている。この電極は、小形デバイスで 400 μm の間隔で電極が並んでいる[14][39]。しかし、我々のデバイスの空間分解能 7.5 μm と比較しても空間分解能が低い。神経細胞の大きさはおよそ 10 μm 程度である。時間分解能を向上させるための手法としては、電位感受性色素を用いた Ca^{2+} 感受性色素[29][40]や VSD イメージング[7]がある。特にカルシウムイメージングは、時間分解能が 10 ms、輝度変化率が 3%程度と優れている。また、カルシウムイメージング色素を遺伝子導入によって、GCaMP[16][41]系のカルシウム感受性タンパク質を慢性的に実験動物内で発現

させることが可能であり、長期間に渡る脳機能実験も可能となっている。さらに、カルシウムイメージングでは細胞内のカルシウム濃度変化を計測するため、個々の神経細胞の活動を観察することが可能である。本デバイスにおいても、カルシウム感受性色素を遺伝子導入されたトランスジェニックマウスを用いた行動実験中の脳機能蛍光イメージングが良いと考えられる。行動実験時に繰り返し脳の染色をする必要がなく安定した計測が可能である点に加えて、輝度変化が大きく、自由行動実験中においても脳機能計測が可能である。

本章の内因性シグナルイメージングで計測された結果のノイズレベルは 1%程度で、10 回の加算平均を行うことで 0.5%程度のノイズレベルに低下させることができた。現在使用しているデバイスでは、カルシウムイメージングに対する感度、時間分解能、SN 比の条件を満たすことができている。搭載したデバイスは 130 frames/s での駆動が可能である。しかし、蛍光イメージングするためには、蛍光のみを計測するために、励起光の除去が必要となる。そのため、現在のデバイスに励起光除去フィルタを搭載する必要がある。励起光除去フィルタには、透過性に角度依存性が少ない吸光フィルタを用いる。吸光フィルタの問題点として、波長スペクトルに対する鋭利なフィルタ特性を持たない点にある。また、LED 光源についても鋭利なスペクトル特性を持たない。これを解決する方法の開発を本研究室で現在行っている。

しかし、VSD イメージングについては、10 ms 以下と時間分解能が高いことが知られている。しかも、蛍光変化率が 0.5%未満であり、本実験で使用したデバイスでは観察が困難である。この問題の解決には、センサの SN 比向上と高速化の実現が不可欠であり、10 倍以上のセンサの SN 比の向上が求められる。

第 4 章 脳表における血流計測

4.1 脳表における血管の役割

4.1.1 脳表の血流

血液と神経活動には密接な関係があることが知られている。神経細胞は活動するために酸素や栄養を必要とし、神経活動に伴って血流調整が行われる。脳表を張り巡らす血管も、脳活動に関与していることが分かっている。

図 4.1 に示す研究では、ラットの前肢に感覚刺激を与えた時の脳表における血流変化を計測している[42]。この研究では、麻酔したラットの大脳皮質感覚野の血流計測を顕微鏡と波長 535 nm の LED 光源を利用して計測することに成功している。感覚刺激に応答して血流が変化することを示した。この様に、血中へモグロビンの吸光特性を利用することで脳表を流れる血流を測定することが可能となる。へモグロビンの吸光波長を利用することにより、脳内の血流量の変化から脳機能を計測することが可能となる。

図 4.2 の研究では、自由行動中のマウスの小脳における血流計測を行っている[11]。マウス頭部に設置した超小型顕微鏡を使い、血管造影剤を用いて行動と血流の関係を計測することに成功している。

4.1.2 CMOS イメージングデバイスによる脳表の血流計測

本章では、超小型埋植用 CMOS イメージングデバイスを用いた脳表における血流計測を行った。動物の頭部に完全に埋植可能なデバイスを用いることで、非麻酔の動物による行動実験を可能にし、行動実験中および自由行動下における脳機能解明が可能になる。本実験で利用する超小型埋植用 CMOS イメージングデバイスは、第 2 章で開発したデバイスを使用した。フレキシブルなポリイミド基板上に CMOS イメージセンサと 9 個の波長 535 nm の LED 光源を搭載し、パリレンコーティングにより防水処理と生体適合性の向上が行われている。また、自由行動下の脳機能計測実験を行うために、ラットの背中に搭載可能な小型中継基板を使用し、イメージングデバイスの入出力信号の安定化を行った。本章では血液中のへモグロビンの吸光度特性を利用した脳機能イメージングを行うために、へモグロビンが強い吸光を持つ波長 535 nm の光源を利用した。

本章は、脳表の血流計測に使用する実験動物と実験装置について述べた後に、脳表における血流計測と流速の解析方法について述べる。さらに、覚醒下にある実験動物を用いて、自由行動下と行動実験中における脳表の血流計測の結果について示す。

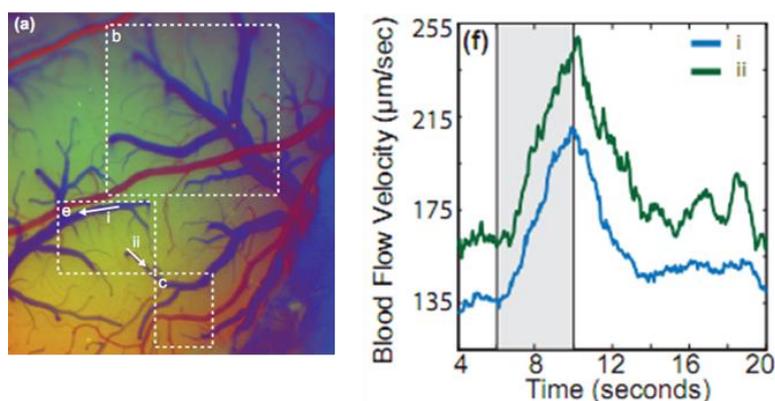


図 4.1 感覚刺激に応答する脳表の血流[42]

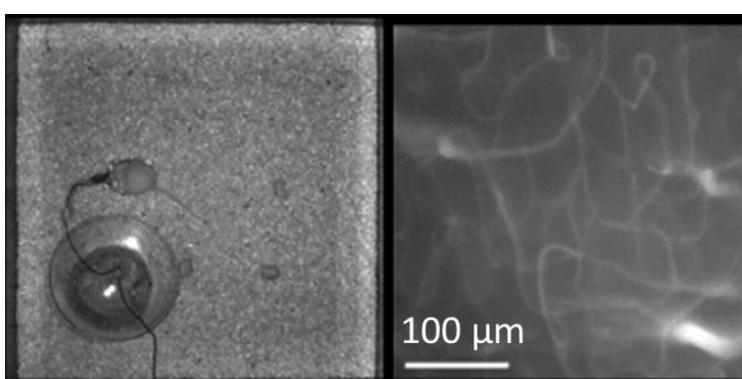


図 4.2 自由行動下における脳内の血流計測[11]

4.2 CMOS イメージングデバイスによる血流計測実験

4.2.1 実験動物と手術

本研究では、実験動物として SDrat (オス、7 週齢、体重 $200 \pm 10\text{g}$ 、Japan SLC, Inc.) を使用した。動物実験は奈良先端科学技術大学院大学の動物実験に関する規定に基づいて行なった。手術前に、麻酔としてペントバルビタールナトリウムの投与量 50 mg/kg となるようにソムノペンチル (共立製薬、ペントバルビタールナトリウム 64.8 mg/ml) を腹腔投与した。また、局所麻酔としてキシロカイン (アストラゼネカ、リドカイン塩酸塩) を頭皮に投与した。手術中は、Stereotaxic instrument (Narishige) に頭部を固定し、ヒートプレートにより腹部の保温を行なった。本実験では大脳皮質一次運動野の前肢と後肢領域における脳機能計測を行うため、図 4.3 に示すラットの運動野の脳地図[43]を参考にして開頭部位を決定した。計測部位の中心は、ブレグマと呼ばれる頭蓋骨の矢状縫合と冠状縫合との交点を基準に Anterior (前方向) に 2 mm 、正中線から Lateral (横方向) に 2 mm の場所とした。この場所を中心に、約 $8 \times 3 \text{ mm}$ 四方の頭蓋骨を除去した。血流計測のための手術手順は図 4.4 に示す。

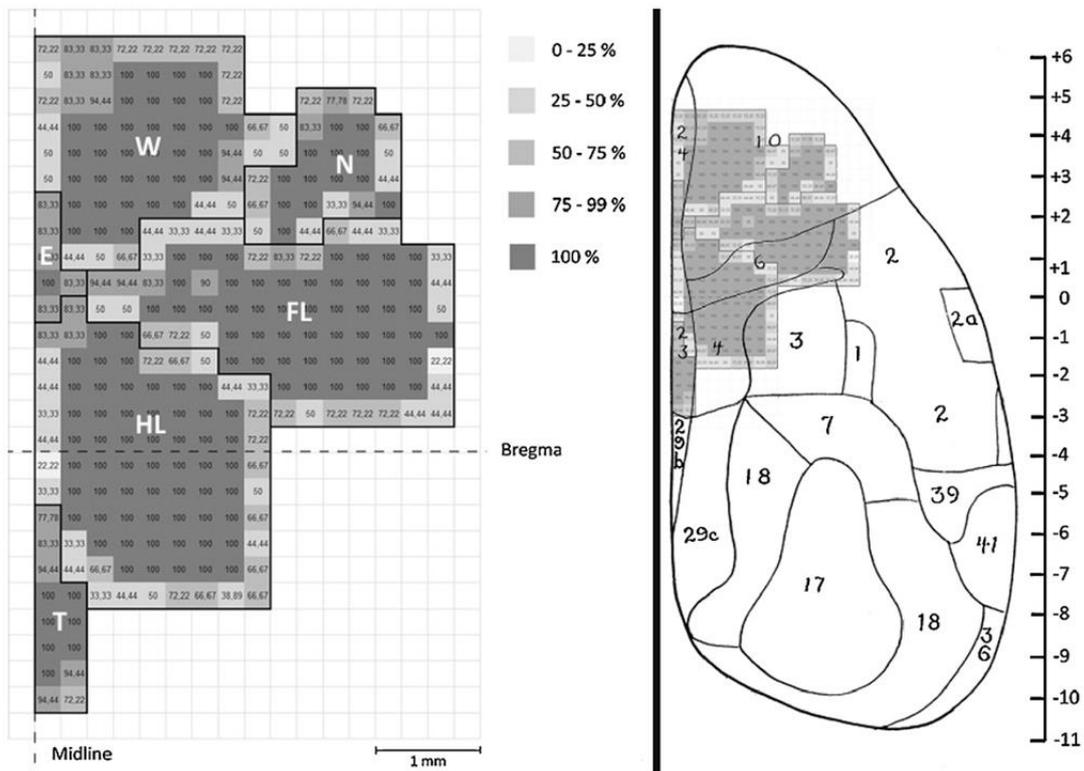


図 4.3 ラットの大脳皮質一次運動野の脳地図[43]

本実験における超小型埋植用 CMOS イメージングデバイスの埋植手術は、頭蓋骨を除去して脳表を露出させる過程まで内因性シグナルイメージング実験と同様である。脳表を露出させた後に、脳表を覆う硬膜を除去する。硬膜の下にはクモ膜が存在し、クモ膜には脳に直接繋がる血管が多く通っている。イメージングデバイスによる計測精度を向上させるに硬膜の除去を行った。デバイスの設置は、フレキシブル基板の配線部を頭蓋骨に瞬間接着剤（アロンアルファ）を用いて接着し、センサ部は脳表に乗せる状態にした。その後、デバイス上に人工硬膜を被せて露出した脳表とデバイスを覆った。次に、除去した頭蓋骨を戻し、歯科用セメントによってデバイスの配線部とともに頭蓋骨に固定した。頭蓋骨には金属製の小さなアンカーを設置することで、動物が動いてもデバイスや再設置した頭蓋骨が動かないようにしている。デバイスの設置と固定後に、ラットの頭皮を縫合した。これらの処置によってラットは、覚醒後でも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。

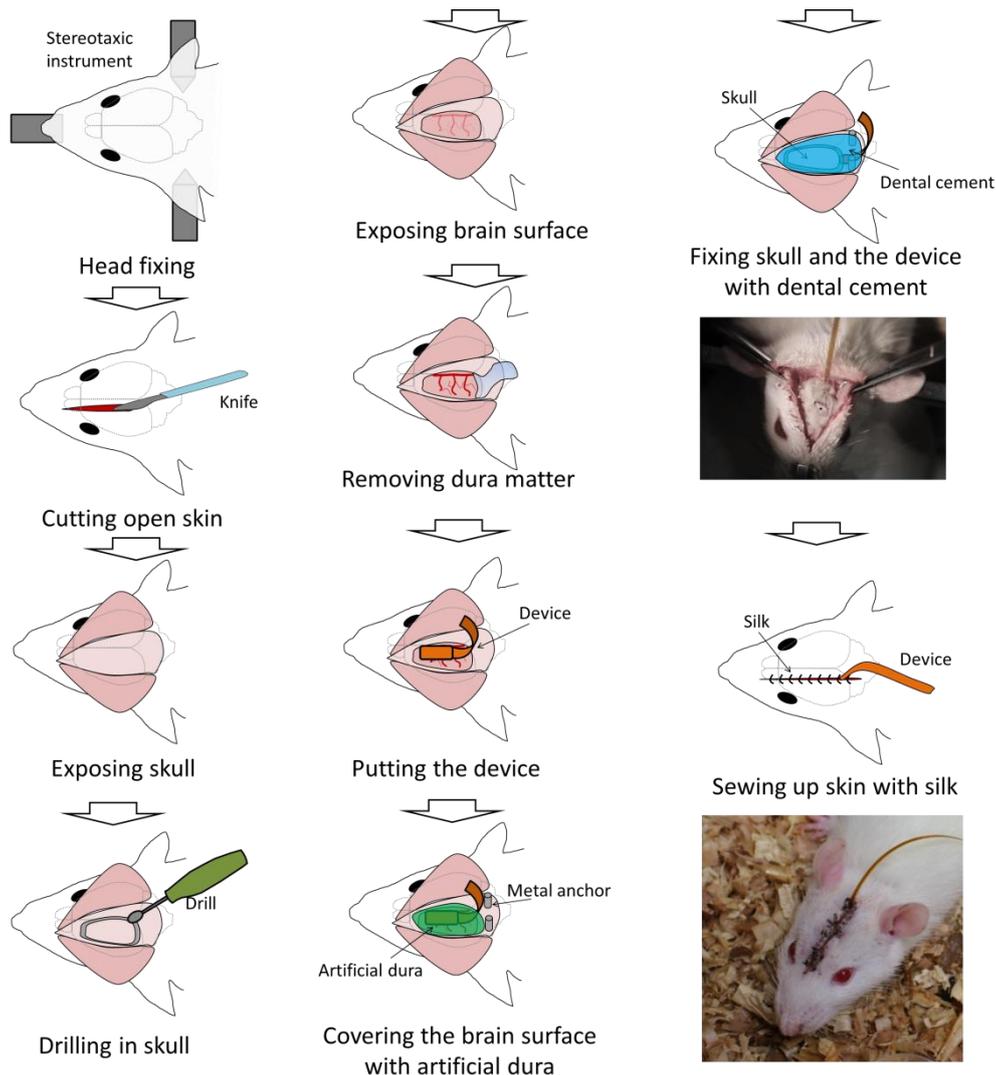


図 4.4 自由行動実験のためのデバイス埋植手術

4.2.2 血流計測用光源

血流計測に用いるデバイスに最適な光源を決定するために、脳表の血管像の撮像実験を行った。図 4.5 は顕微鏡による脳表での血流計測の撮像結果を示す。右側の図は、顕微鏡の緑色光源により観察した脳表の結果である。左側の白色光源で観察した結果に対して、緑色光を用いることで脳表の血管像を鮮明に捕らえられる事が確認できた。また、超小型埋植用 CMOS イメージングデバイスに搭載した LED 光源による撮像の比較も行った。図 4.6 は、赤色光と緑色光の光源を用いて脳表を撮像した結果である。生体イメージングにおいて長波長の光源ほど光の透過性が高く生体深部の観察に適していることが知られている。脳イメージングにおいても、脳深部を観察するためには長波長の光が用いられる[44]。しかし、長波長になるほど解像度は低下する。そのため、観察する対象

に応じて光源を選択する必要がある。赤色の波長では、生体組織への光透過性が高いため、脳表の血管を詳細に観察には適さなかった。これに対して、緑色光は血中ヘモグロビンによって吸光されやすく、赤色光と比較して組織透過性が低いため、脳表を詳細に観察することが可能である。本研究では大脳皮質の血管観察を目的としているため、脳表の血管観察に適した緑色光の波長を利用した。

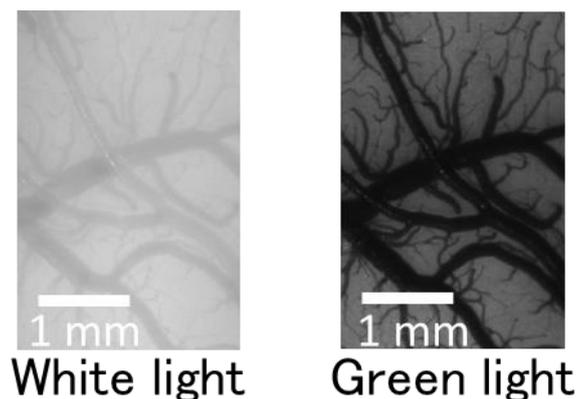


図 4.5 顕微鏡で撮像した脳表の血管画像の比較

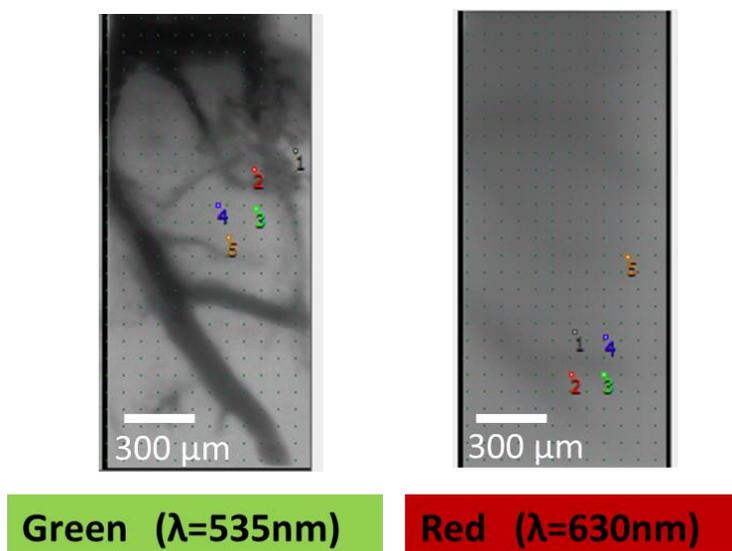


図 4.6 超小型埋植用 CMOS イメージングデバイスで撮像した血管画像の比較

4.2.3 血流計測実験

脳表の血流計測では内因性シグナルイメージングと同様のイメージングシステムを用いた。ラット脳表には血管径の異なる血管が張り巡らされており、血管中を流れる血液の方向や流速を観察することができる。本実験では、脳表にデバイスを設置し、脳表の撮像を試みた。図 4.7 に顕微鏡と緑色 LED を搭載し

た超小型埋植用 CMOS イメージングデバイスによって撮像したラットの脳表の血管画像を示す。この実験は麻酔したラットを用いて行った。イメージングデバイスによる画像では、顕微鏡と同様に脳表の細い血管を観察することができる。また、連続して取得した画像を動画再生させることによって、血管中を流れる血流の観察も可能である。

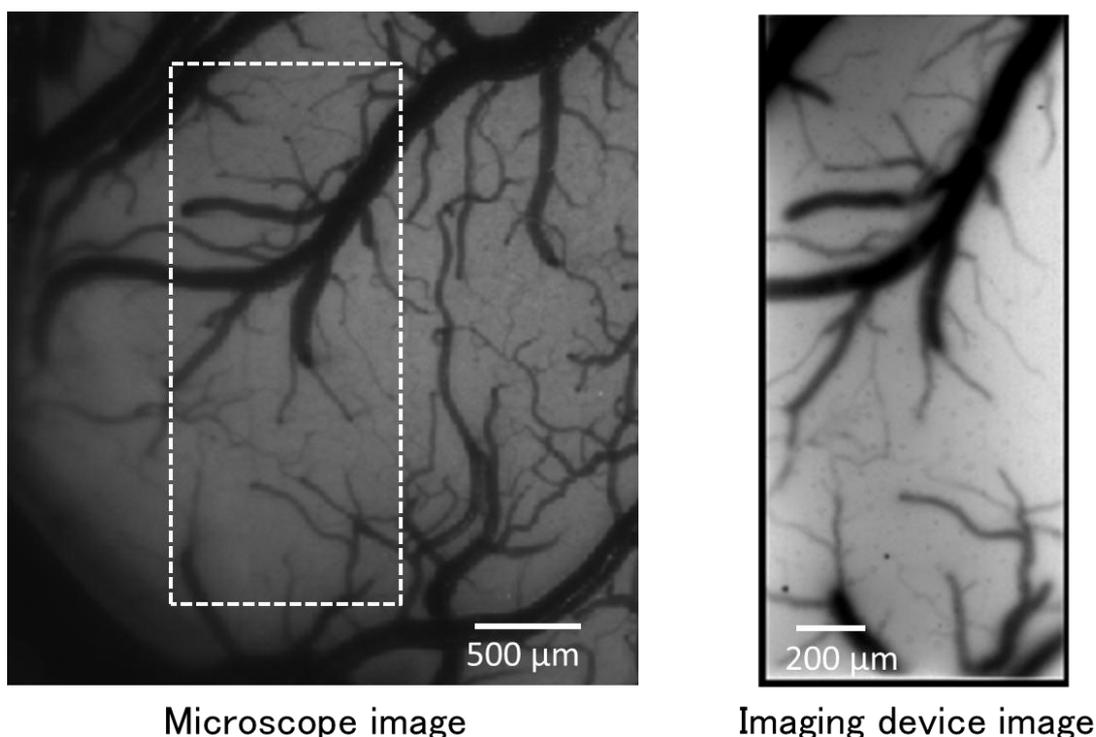


図 4.7 顕微鏡とイメージングデバイスによる脳表の撮像結果

本研究では、取得された血流イメージから血流の流速や方向を鮮明に観察するために、差分イメージを利用した解析を行った。脳表の計測で取得した各画像から基準画像からの変化分だけを抽出し、連続した動画を作り出すことによって、血液の動向をより詳細に観察することが可能になった。図 4.8 には差分イメージを利用した血流観察の結果を示す。左の取得画像の赤枠で囲まれた部分について、動画から 5 フレーム分取り出した結果を並べたものが右の連続画像である。矢印で示した血管中を流れる血流の様子を観察することに成功した。

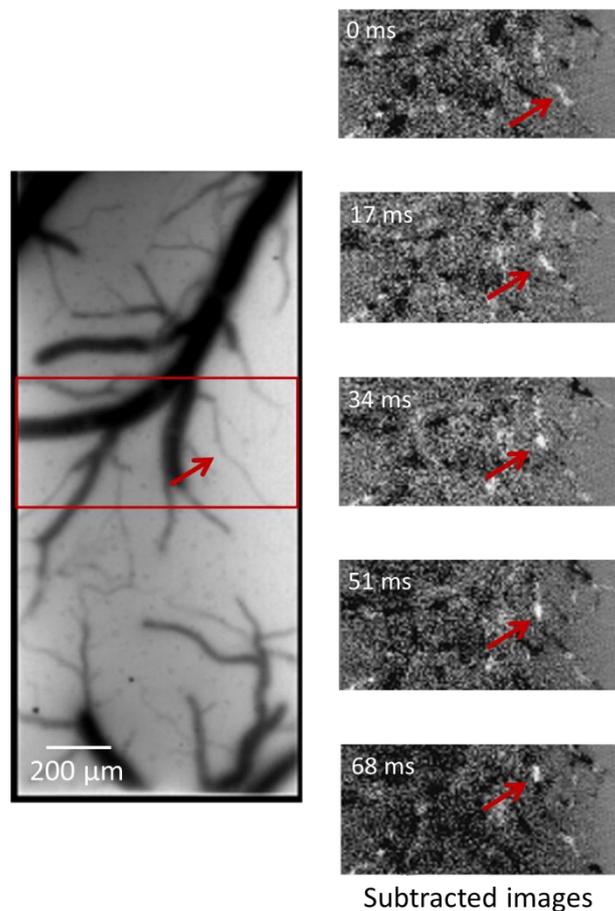


図 4.8 差分イメージを利用した血流観察

また、任意の血管に注目し、ラインスキャンイメージを取得することで、血管内の流速を知ることが可能になる[42], [45]–[47]。ラインスキャンイメージは図 4.9 に示すように、画像の血管上にある一列(20-30 画素)を時間毎に並べることで、血管内の移動度を知る方法である。本研究で用いたデバイスでは、ヘモグロビン単体を直接観察することはできないが、血管内のヘモグロビンの濃度を観察することで、流速を計測することが可能である。ヘモグロビン濃度が高い場所ではデバイスに計測される輝度が低く、低い場所では輝度が高い。この輝度の差を連続して計測することで、血流の流速測定を行う。ラインスキャンイメージ中の線状に黒く現れるものはヘモグロビン濃度が高い血液が移動したことを示している。傾きが流速、傾く向きが流れる方向を示している。また、傾きが少ないほど流速が速くなる。図 4.10 に図 4.7 で取得した脳表イメージから血流の流速を測定した結果を示す。血流を計測した血管を図 4.10(b)中に黒線で示す。注目した血管のラインスキャンイメージを取得し、図 4.10(c)の結果から 0.12 mm/s の流速が計測された。

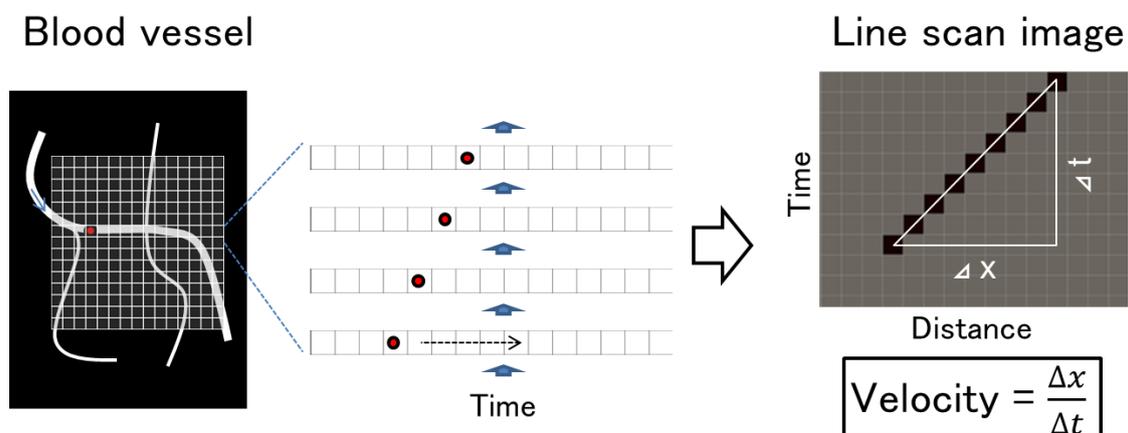


図 4.9 ラインスキャンイメージによる血流の流速解析

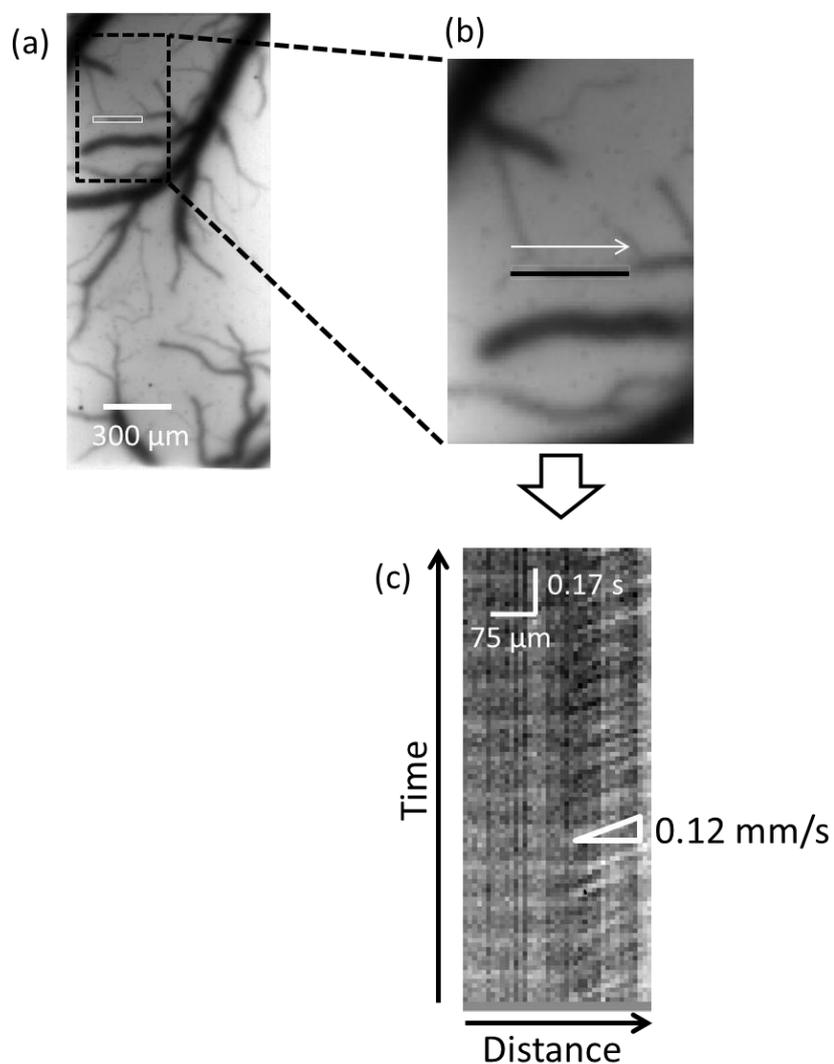


図 4.10 ラインスキャンイメージを利用した流速測定の結果

4.2.4 血流計測の計測精度の向上

本論文ではラインスキャン後の流速の算出は、一部の血管についてのみ行なっているが、今後はリアルタイム計測や計測精度の向上に向けて自動化する必要がある。計測精度を向上させるには、得られたイメージからの心拍等のノイズ除去とラインの連続的な読み取りが求められる。

本論文では、ラインスキャンイメージからのノイズ除去までを達成した。図 4.11 はノイズ成分の除去過程を示す。画素間の斑と心拍ノイズを取り除くことで、血流速度を示す斜め線を強調することができる。まず、計測された画素ごとの平均値を算出し、各画素値と平均値の差分を表示させることで、縦筋ノイズを取り除く。次に縦筋を取り除いたイメージの各フレーム間の平均値を算出し、各画素と平均値の差分を算出することで、心拍による輝度の斑を取り除き、斜め線を強調することができる。

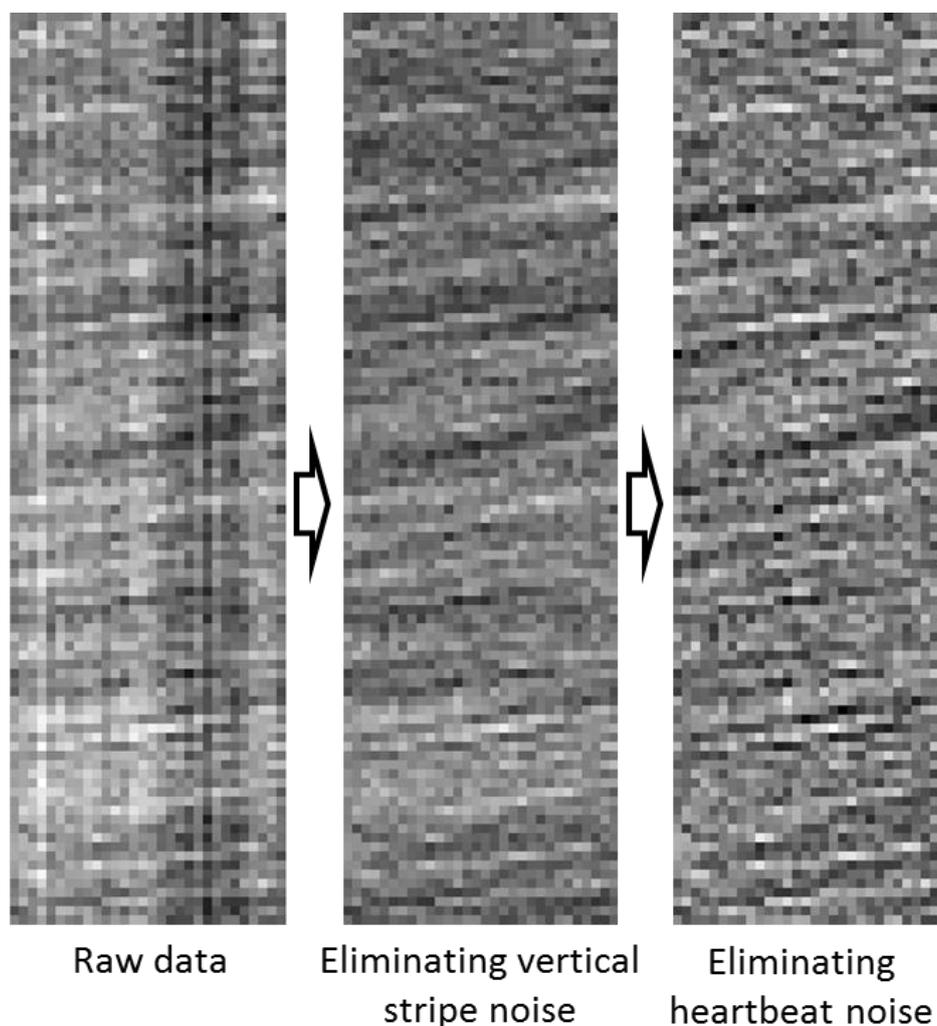


図 4.11 血流速度計測の精度の向上

4.3 脳表の血流計測

4.3.1 麻酔下における脳表の血流計測

大脳皮質の表面において、血管を流れる血液の方向や流速を計測する。実験では、麻酔したラットの脳表にデバイスを設置し、脳表の血流計測を行った。計測の速度は 58 Hz で行った。図 4.12(a)はデバイスで取得した脳表イメージである。本実験では、画像中の異なる太さの 3 本の血管に注目し、流速の測定を行った。また、図 4.12(a)の矢印は血液の流れる向きを示す。図 4.12(b)は、注目した血管周辺の拡大画像であり、実験では線で示した場所の計測を行った。ラインスキャンの結果は図 4.12(c)に示す。図 4.12(c)の 1 の血管では、撮像したイメージに対して、左向きに 2.1 mm/s の流速であることが計測できた。他の 2 本血管についても、それぞれの流速を計測することに成功した。実験の結果、太さの異なる血管では流速が異なり、太い順に 1.5 mm/s, 1.4 mm/s, 0.8 mm/s の流速を計測した。これらの結果は、他の研究で示された血流計測の結果とも一致している[46]。図 4.13 は、脳表の血管の太さと血流の流速の関係を示している。

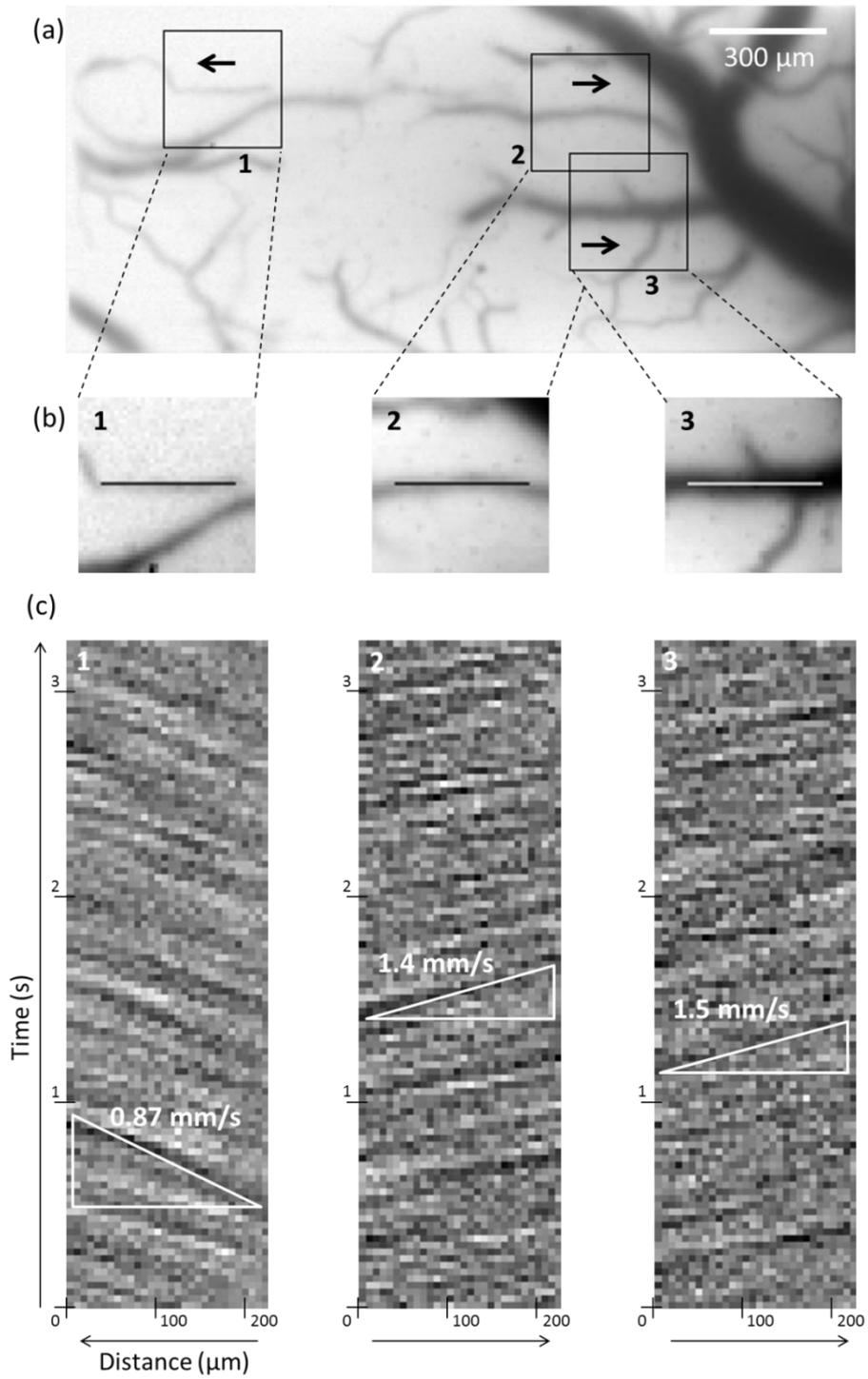


図 4.12 脳表における血流計測

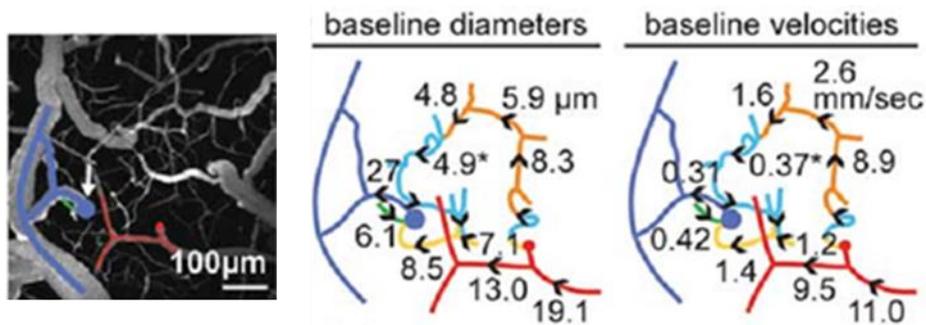


図 4.13 脳表の血管の太さと血流の関係[46]

4.3.2 自由行動下における血流計測

デバイスを埋植したラットを覚醒させてから、脳表における血流計測を行った。麻酔から覚醒までの間は、中継基板、制御基板は接続せずにデバイスのみをラットに設置した状態で放置した。本実験で用いた麻酔（ペントバルビタール塩酸塩）は術後に覚醒させることを目的とした麻酔であり、ラットは術後 2 時間程度で麻酔から覚める。完全に麻酔から覚醒させるため、術後 3 時間以上経過した後に実験を行った。図 4.14 は覚醒後のラットで行った自由行動下における血流計測実験の様子を示す。自由行動実験では、ラットの背中に中継基板を設置した後に、中継基板にデバイスと制御基板を接続した。自由行動実験における実験装置の構成は図 4.15 に示す。ラットの動きによる撮像への障害は見られなかった。自由行動実験で脳機能計測を行う際には、ラットの行動観察用の照明として青色光を用いた。青色光は生体への透過性が低くラットの皮膚と頭蓋骨を透過することができない。そのため、行動観察用の光源として有効である。図 4.14 の右側は、青色光の照明を用いたラットの観察の様子を示す。

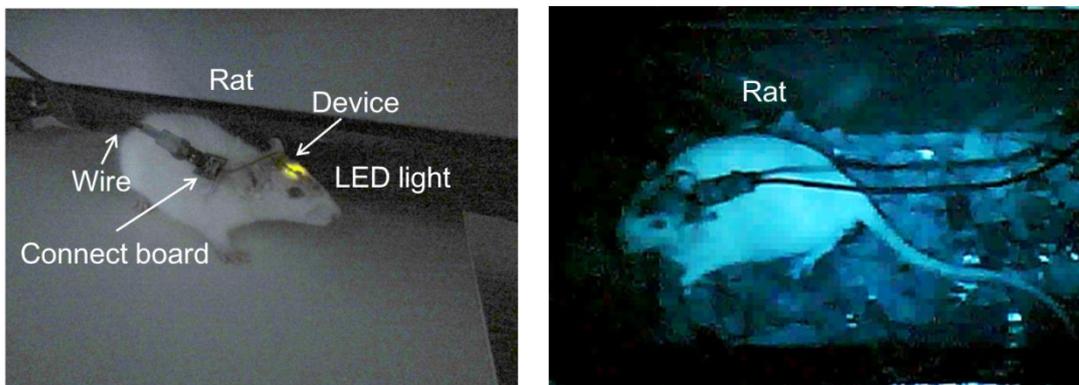


図 4.14 CMOS イメージングデバイスを埋植したラット

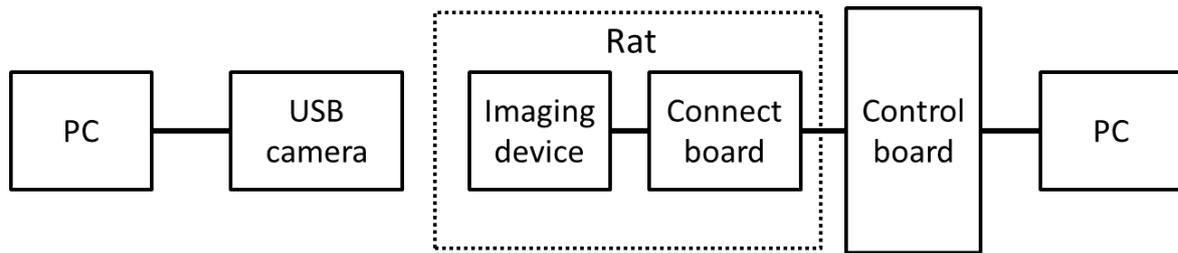


図 4.15 自由行動実験計測システムの構成

自由行動下での脳表の撮像結果は図 4.16(a)に示す。自由行動下においても、脳表の詳細な画像を取得することに成功した。自由行動実験中の血流計測を実施し、ラインスキャンイメージを用いた血液の流速の計測にも成功した。図 4.16(b)中の黒線で示した血管について、血流計測を行った。図 4.16(c)に示すラインスキャンイメージから、血管内を流れる血流は 0.93 mm/s であることが分かった。

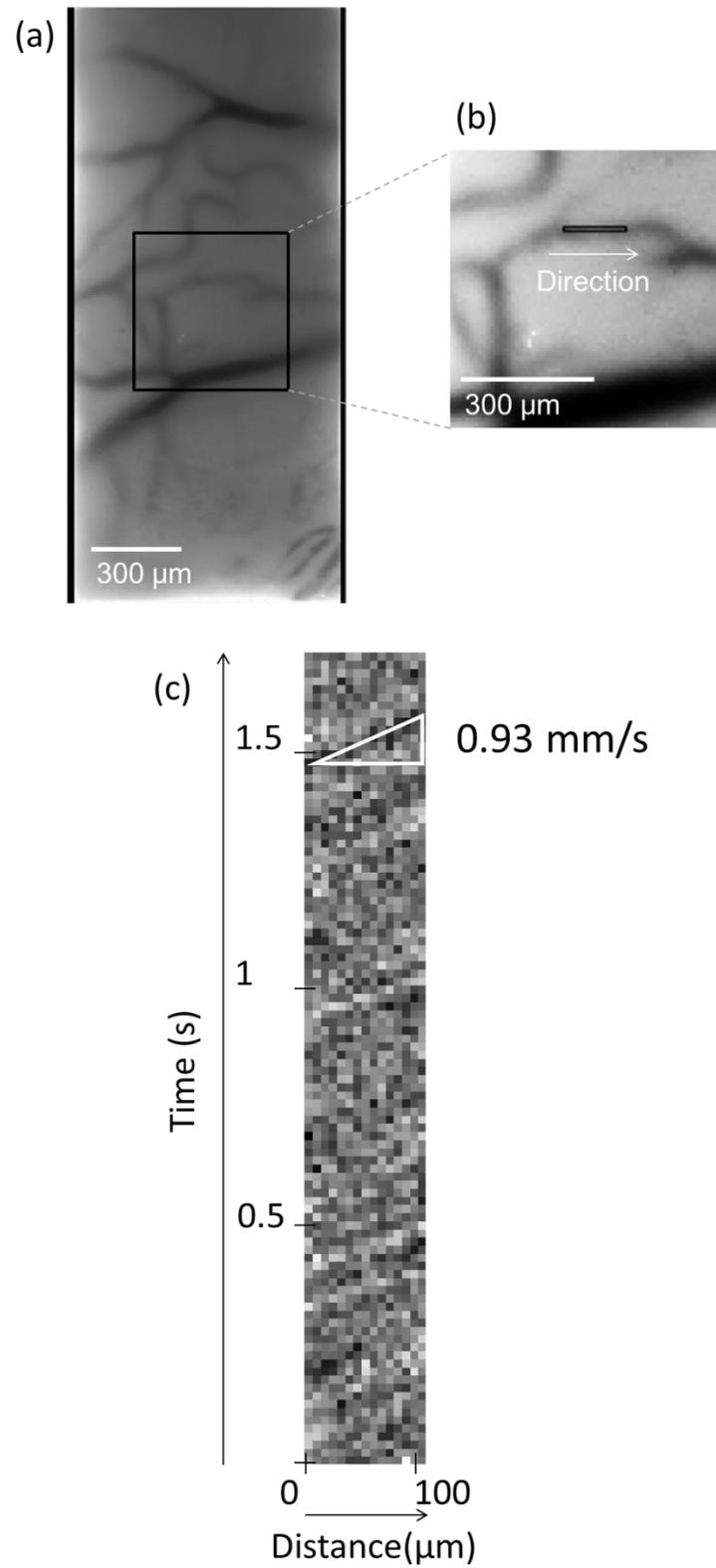


図 4.16 自由行動下にあるラット脳表の血流計測

4.4 行動実験中の脳表における血流計測実験

4.4.1 歩行型行動実験装置

行動実験中の脳機能計測を目的として、ラット用の歩行行動実験装置を作製した。図 4.17 に行動実験装置の概略図を示す。この装置は、ベルトコンベア(マルヤス機械、全長 50 cm)を中心に構成されており、歩行実験が可能である。ベルトコンベアは電動モーター(オリエントアルモーター)によって速度調整が可能である。本実験では、ラットが歩ける速度として 12 cm/s でベルトコンベアが移動するように設定した[48]。行動実験装置上部にはスリップリングが設置されており、ラットの動きによって配線がねじれることによって、デバイスに負担がかからないようになっている。これにより、ラットの行動に制限を与えないようにした。スリップリングからはシールドケーブルによって信号へノイズの混入を低減し、制御ボードへと繋がっている。図 4.18 に行動実験装置の構成を示す。行動実験装置は制御プログラム(Labview)によって制御した。制御プログラムは行動実験装置の制御と同時に USB カメラの制御を行う。USB カメラは、ラットの行動実験を観察する。また、イメージングシステムと同期を行う。行動実験のシーケンスを図 4.19 に示す。本実験では、ラットの静止時と行動時の血流を計測するために、トレッドミルが駆動開始する 15 秒前からイメージングシステムと観察用 USB カメラによる計測を開始し、トレッドミルは 15 秒間駆動させた。刺激終了後も 15 秒間の計測を続けた。図 4.20 に作製した行動実験装置を示す。

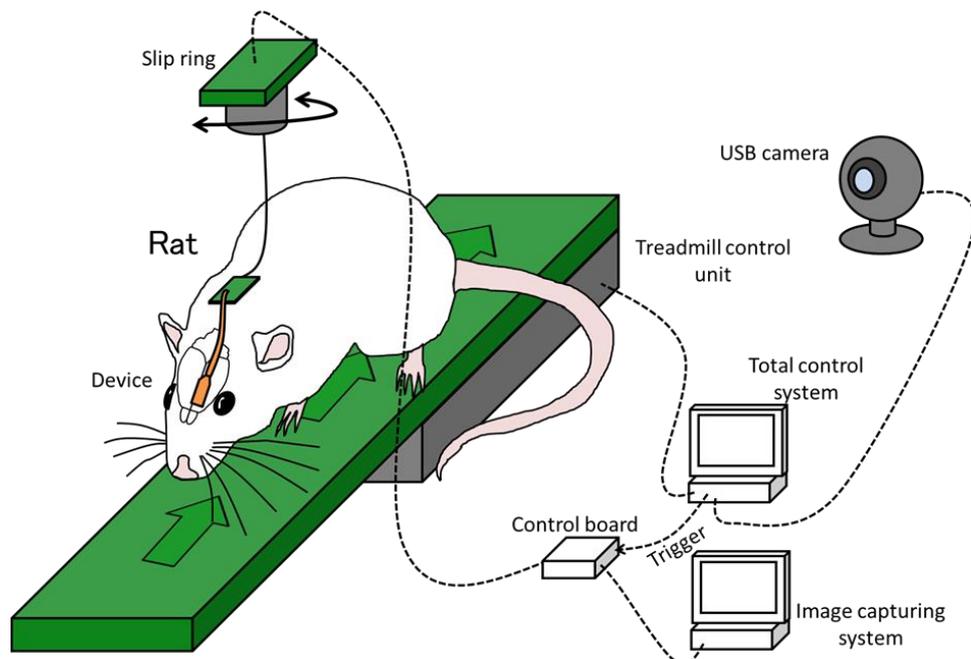


図 4.17. 自由行動実験の構成

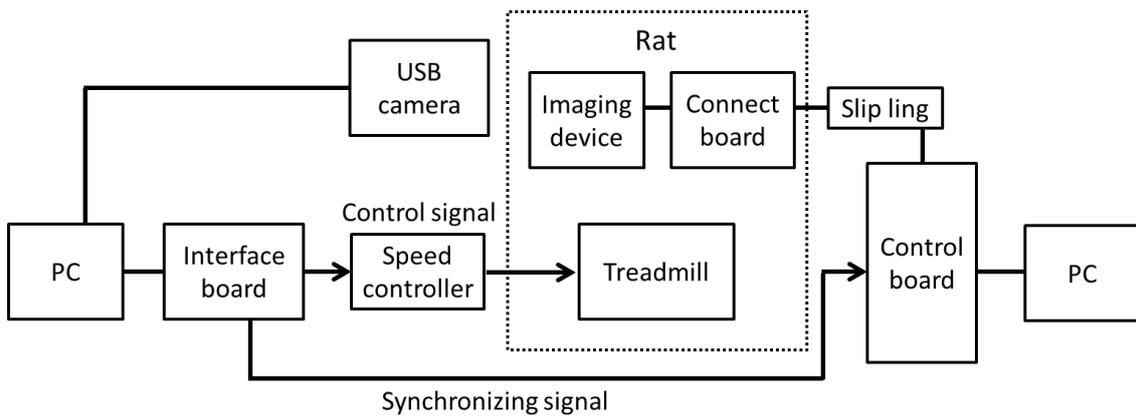


図 4.18. 行動実験装置の構成

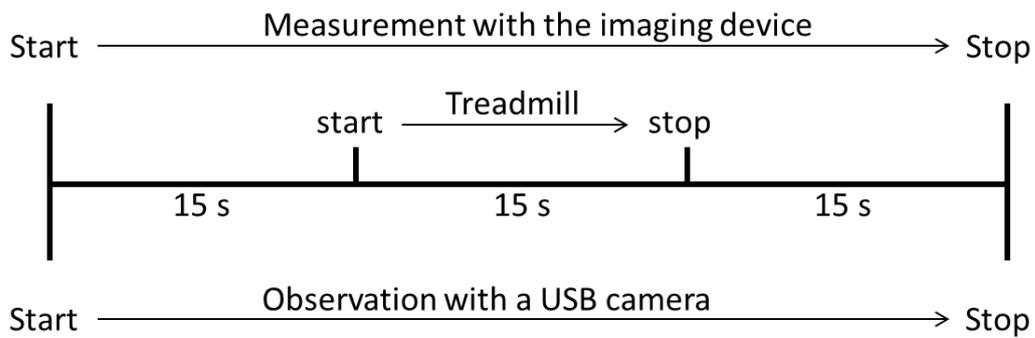


図 4.19 行動実験装置の制御シーケンス

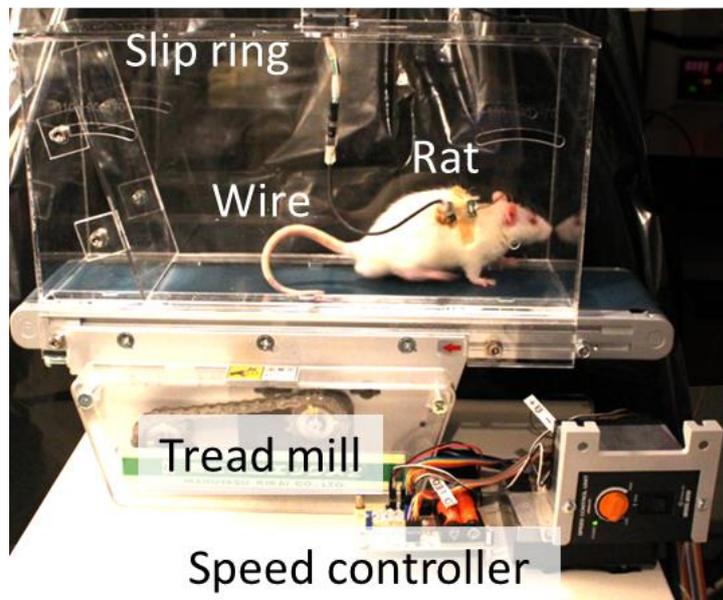


図 4.20 行動実験装置

4.4.2 行動実験中の脳表における血流計測

覚醒から 5 時間経過後、行動実験装置を用いて行動中におけるラットの脳表の血流計測を行った。行動実験装置を用いた本実験では、行動時の脳表計測の実証を目的として行った。行動実験は図 4.19 のシーケンスに従って行った。図 4.21 は行動実験の様子を示す。行動実験の観察には青色光の照明を用いて USB カメラで行った。トレッドミル駆動後にラットが歩行する様子が観察できた。図 4.22(a)に示す血管に注目し、ラットが歩行している時と静止している時における血流計測を行った。図 4.22(b)のラインスキャンイメージの結果から、静止時の血流は 0.73 mm/s 、歩行時は 0.82 mm/s を計測した。本実験は、ラットの手足の運動を制御する一次運動野の領域における血流計測を行った。本実験においても、図 4.22(b)に示す血流計測の結果では行動時における流速の方が静止時に対して増加している様子が観察できた。ただし、今後実験データについて判断するためには、複数回同様の実験を行って統計処理を行う必要がある。

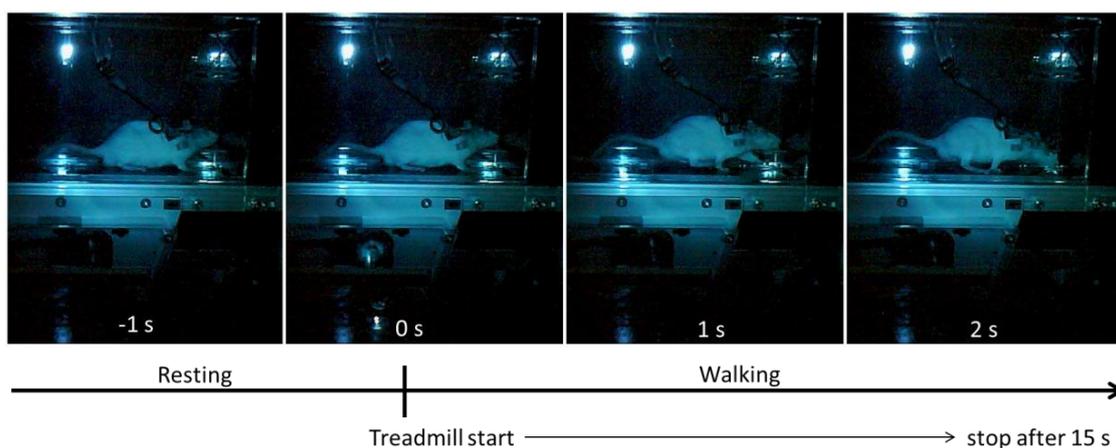


図 4.21 歩行行動実験の様子

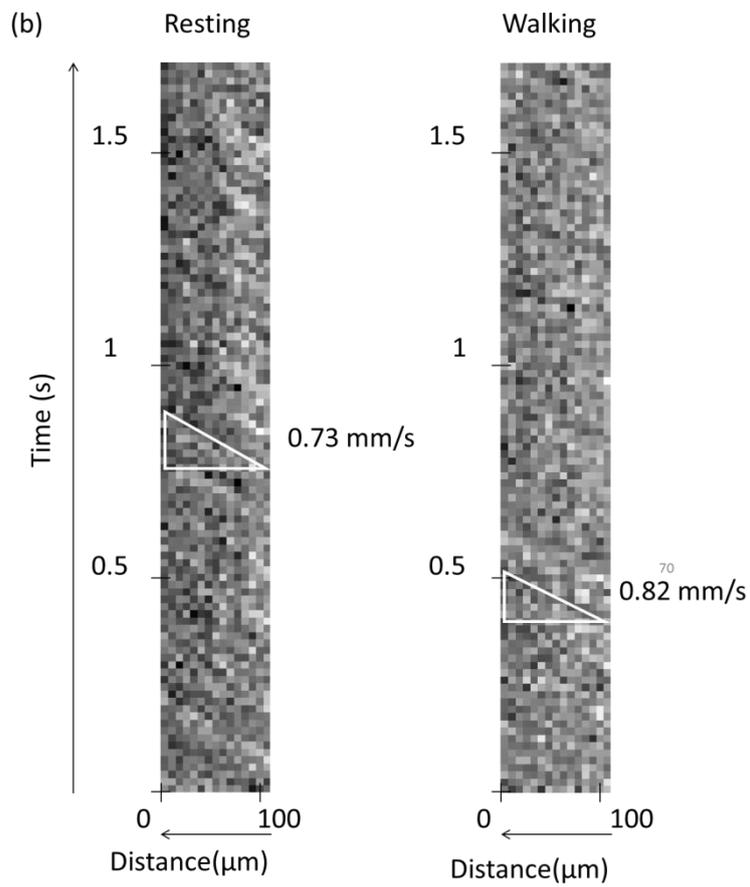
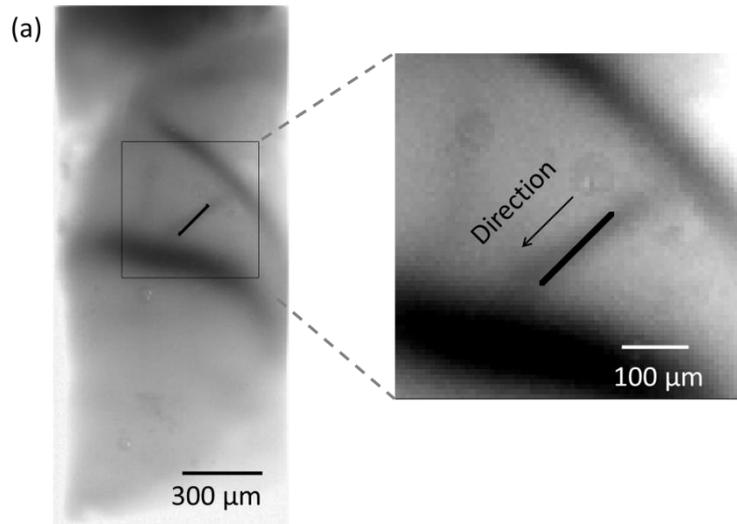


図 4.22 歩行行動実験中のラット脳表の血流計測

4.5 まとめと考察

本章では、麻酔下および覚醒下にあるラットの脳表における血流計測を行いその計測に成功した。生体内を流れる血液の動向を調べる光学的な観測方法には、血液造影剤やヘモグロビンの吸光スペクトルを利用した方法がよく用いられる。本研究でもヘモグロビンの吸光ピークを利用することによって、脳表における血流測定を行なった。赤血球のサイズは $4\ \mu\text{m}$ 程度と小さいため、今回使用したデバイスでは個々の赤血球を観測することは難しい。しかし、血液が血管内を流れる時の流速によって赤血球の濃淡が生じる。そこで、我々は変化する濃淡の移動度による流速の測定を行った。麻酔下における血流計測では、 $0.12\sim 1.5\ \text{mm/s}$ における血流速度の測定が可能であることが示された。血管内の流速は、血管の種類や太さによって様々な流速が存在する。血管には動脈と静脈があり、ラットの脳表の動脈の流速は、静脈に対して 10 倍以上の流速がある[46]。また、血管の太さによっても流速は異なる。ネコを使った報告[47]では、脳表の血流は血管によって異なる事が観察されており、動物の種類よりも血管の種類や血管径に依存した血液の流速が観察されている。ヒトにおける実験においても、デバイスサイズに対応した血管を観察することで、計測可能であると考えられる。

自由行動下および行動実験中の脳表の血流計測では、大脳皮質一次運動野にイメージングデバイスを埋植し、ラットの行動時の脳表における血流を観察した。実験動物の行動中にリアルタイムに血流の観察を観察することに成功した。行動実験中の血流計測では、ラットの歩行時と静止時の血流計測を行うことに成功し、それぞれ歩行時 $0.82\ \text{mm/s}$ 、静止時 $0.73\ \text{mm/s}$ の流速を示した。行動時における流速の方が静止時に対して増加している様子が観察できた。ただし、今後実験データについて判断するためには、今後、複数回の実験を行って統計処理を行う必要がある。

本章ではラインスキャン後の流速の算出を実験後に行っているが、今後はリアルタイム計測や定量性の向上に向けて自動化する必要がある。自動化に当たり、得られたイメージからの心拍成分によるノイズの除去と血管上の輝度変化勾配の読み取りが求められる。画素間の斑と心拍ノイズを取り除くことで、血流信号である斜線の成分を強調することができる。加えて、2次元フーリエ変換を用いる事により、流速により作られる信号成分勾配を抽出できる。本実験では、そのような処理は行なっていないが、画像解析プログラムを作成することにより自動化を行う。流速データの自動化により、イメージングにより観察されたそれぞれの血管の同時解析およびリアルタイム計測が可能となる。これは神経活動に対する血管の役割や疾患による血管の損傷を計測する技術に貢献可

能となる。

血流計測における分解能の向上には、画素サイズの縮小とセンサのフレームレートの増大で対応できる。本論文で使用しているデバイスの搭載画素の寸法は $7.5\ \mu\text{m}$ 角であるのに対して、血中のヘモグロビンの寸法は $4\ \mu\text{m}$ である。つまり、本デバイスでは直接個々のヘモグロビンの観察を行っていない。本論文における観察手法は、血中のヘモグロビンの濃度変化を利用したものである。ヘモグロビン濃度が高いと吸光量が増加し、暗く見える。血管内ではヘモグロビン濃度の斑が存在し、これらの移動を観察し血液の流速が計測される。画素サイズを縮小し、ヘモグロビンが直接的に観察可能な状態になれば、血管内のヘモグロビンの移動を知ることが可能になる。加えて、時間分解能の向上を行うことで、正確な流速を算出可能になる。

本実験ではラインスキャン法を用いているが、他の血管の観察方法としては、ドップラー効果を利用した方法が存在する。この手法は、ヘモグロビンに照射した光の反射時間差を計算する方法で、正確な流速を知ることができる。しかし、本論文のように自由行動下の動物に埋植する実験では、動物の動きによるノイズが多く、計測が困難である。ラインスキャン法は動物の動きに強いため、本論文の趣旨には適当であると考えられる。

第5章 広範囲イメージングデバイス

5.1 広範囲脳機能イメージング

動物の行動を制御している脳内の神経活動について明らかにするためには、脳内の異なる領域に分布する神経活動を同時観察することが必要となる。動物の運動を引き起こす神経活動は大脳皮質運動野だけではなく体性感覚野も関与していることが確認されており[49]、脳内のメカニズム解明には運動野だけでなく大脳皮質全体、さらには運動に関わる視床や小脳の神経活動を同時に観察することが重要である。

動物の行動と脳機能の解明においては、感覚や運動に関わる脳の領域の局在が一般的に知られている[1]。さらに近年の研究では、活動領域だけでなく異なる領域との連携した脳機能が構成されていることが発見されている[15]。運動は大脳皮質一次感覚野の神経活動で処理された命令が神経軸索を伝わって、末端神経である運動神経に伝達され、最終的に筋肉の収縮を引き起こすことで行われる。運動野の脳機能を解明することによって、一部の脳機能や伝達機能の損傷が原因でおこる脳機能障害の治療に貢献することが可能になる。

そこで本研究では、広範囲脳機能イメージングを目的とした広範囲脳機能イメージング用埋植型 CMOS デバイスを開発し、自由行動下にある動物の脳内神経活動を観察した。図 5.1 にはマルチイメージングシステムの概略図を示す。複数の CMOS 蛍光イメージセンサを動物の脳表面に対して稠密に配置した。これにより、これまでの蛍光イメージングでは不可能だった神経細胞レベルの観察と大脳皮質の異なる領域に広がる神経活動の観察を同時に行うことを可能とした。

本章では、広範囲脳機能イメージングを目的とした六角形 CMOS イメージングデバイスの開発について述べる。また、六角形 CMOS イメージングデバイスを用いた撮像評価と生体脳表における撮像評価を示す。さらに本章では、複数の六角形 CMOS イメージングデバイスを用いた脳表の広範囲計測実験について述べる。

Multi region imaging with CMOS devices

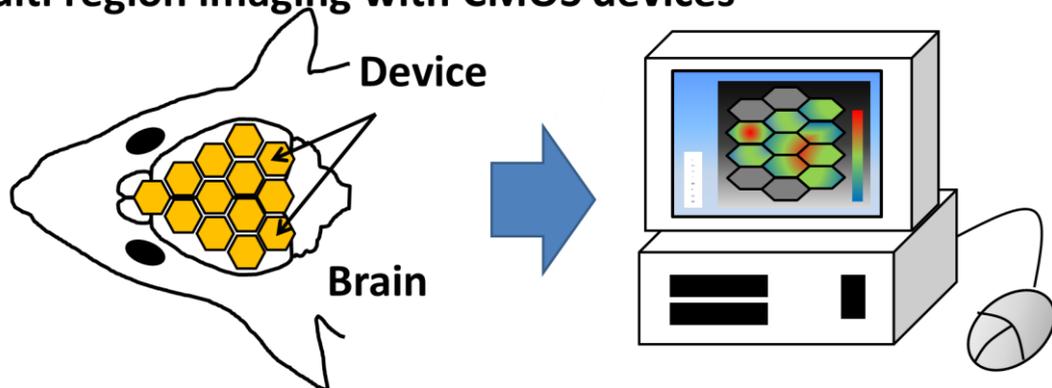


図 5.1 六角形マルチイメージングシステムの概略図

5.2 六角形 CMOS イメージングデバイス

広範囲脳機能イメージングを行う方法として、脳表上での六角形 CMOS 蛍光イメージセンサの多面配置を提案した。イメージセンサの形状を六角形にすることで、立体的な構造の脳表面に対しても稠密に配置することができる。

5.2.1 六角形 CMOS イメージングデバイスの仕様

六角形 CMOS 蛍光イメージセンサを 0.35 μm 2-poly 4-metal 標準 CMOS プロセスを用いて設計した。センサの中央に画素アレイを正六角形に配列し、画素アレイの周囲にイメージセンサの駆動回路を設置した。図 5.2 に CMOS センサの写真と仕様を示す。

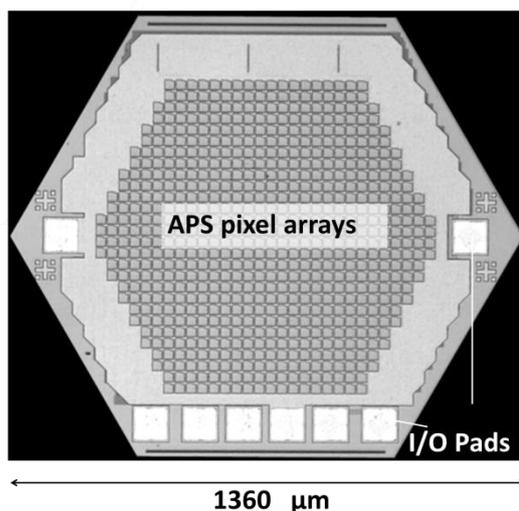
神経活動の蛍光イメージングではケミカルプローブである電位感受性色素や神経細胞の代謝過程に生じる物質を利用し神経活動に伴う蛍光の変化量を観察する。そのため、約 10 ms という高速で変化し、さらに 0.5% 以下の蛍光変化を観察する必要がある [50], [51]。

神経活動の蛍光イメージングにおける光計測システムには、高時間分解能、高空間解像度、高い S/N を持つことが要求されている。脳機能イメージングにおいて微弱な蛍光強度変化を検出するために画素部の改良を行った。

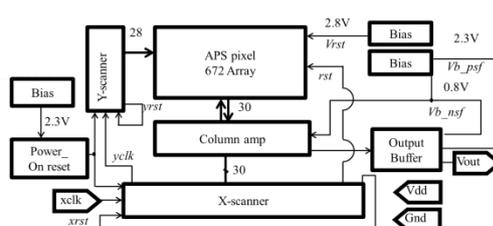
高 S/N かつ高感度な画素を搭載した高速駆動 CMOS 蛍光イメージセンサが必要とされ、六角形 CMOS 蛍光イメージセンサに搭載する画素の大型化と画素の受光部であるフォトダイオードの占める割合を大きくした。六角形 CMOS 蛍光イメージセンサに搭載した画素のサイズは $30 \times 30 \mu\text{m}^2$ に設定し、開口率は 78% となった。これにより、以前に我々が使用してきた CMOS 蛍光イメージセンサの開口率 35% よりも大きな受光部を得ることができた。搭載画素を図 5.3 に示

す。画素は n-well / p-sub 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) 方式回路を採用した。画素を大きくすることで 78%まで開口率の増加を達成した。画素読み出しには水平、垂直スキャナを搭載し、六角形の撮像領域には 672 個の画素を持つ。電源、グランド、クロック、画素出力の 4 配線で駆動するイメージセンサである。

Micrograph of the sensor chip



Block diagram



Specification

Technology	0.35- μm 2-poly 4-metal standard CMOS Process
Operating voltage	3.3 V
Chip size	1360 μm \times 1178 μm (max)
Pixel Array size	900 μm \times 840 μm (max)
Type	3-transistor Active Pixel Sensor
Photodiode	Nwell - Psub
Pixel size	30 μm \times 30 μm
Pixel count	672
Fill factor	78%

図 5.2 六角形型 CMOS イメージングデバイスとその仕様

搭載した $30 \times 30 \mu\text{m}^2$ 画素の評価を行なった。LED 光源 ($\lambda = 635 \text{ nm}$) から照射された光を光学スリットに通し、コリメーターにより平行光にした後、減光かつ集光した光を画素アレイに照射する。この光学系により画素の光電変換特性を調べた。その結果を図 5.3 に示す。縦軸を出力信号電圧、横軸を光強度として測定値をプロットした。ダイナミックレンジの定義は入射光強度範囲と定義し、従来の画素のダイナミックレンジが 55 dB であるのに対して、 $30 \times 30 \mu\text{m}^2$ 画素の出力電圧が 70 dB と広いダイナミックレンジを持つことを確認した。さらに、 $30 \times 30 \mu\text{m}^2$ 画素は $7.5 \times 7.5 \mu\text{m}^2$ 画素よりも光強度が小さい方に感度曲線がシフトしていることから、より暗い状態においても撮像が可能であることを示している。これらの結果から、 $30 \times 30 \mu\text{m}^2$ 画素は神経活動蛍光イメージングに要求される神経活動に伴う微弱な蛍光とその変化の検出に有用であると考えられる。

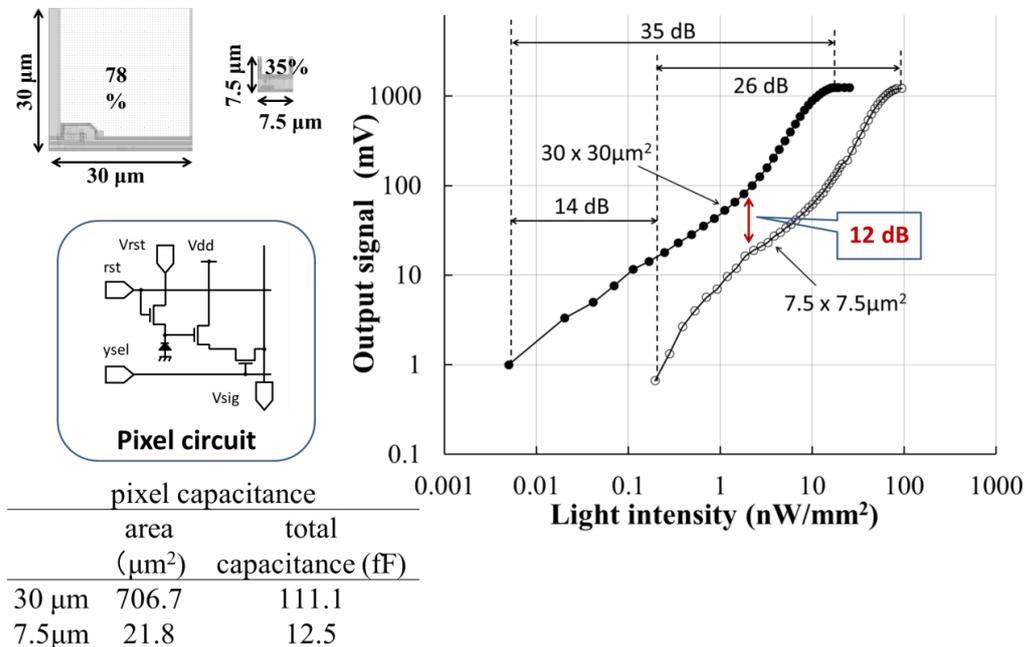


図 5.3 六角形型デバイスに搭載された高感度画素の仕様

5.2.2 六角形 CMOS イメージングデバイスの実装

多面配置を目的とした六角形蛍光 CMOS イメージセンサを試作した。図 5.4 に試作したデバイスを示す。このセンサは膜電位感受性色素(Molecular Probe: RH795 [Ex/Em]:[490 nm/712 nm])を使用した神経活動蛍光イメージングを行うことを目的としている。膜電位感受性色素は染色された神経細胞の膜電位が神経活動に応じて変化する時に色素の蛍光強度や吸光度が変化する。神経活動イメージングではこの蛍光強度変化を観察する。実装において、デバイスの基材としてポリイミド製のフレキシブル基板を使用し、基板の上に CMOS チップや LED を搭載する。励起光源として LED を使用し、イメージセンサの全周囲に 6 個の長方形 LED (EPISTAR corporation, ES-CEBHV08C, $\lambda=475$ nm, サイズ $600 \mu\text{m} \times 220 \mu\text{m}$)を配置することにより、神経細胞等の励起対象に対して均一な励起光を照射することが可能となる。画素アレイ面には励起光カットフィルタを搭載し蛍光のみを検出できるようにした。最後に生体内への埋植時に脳脊髄液や血液からイメージセンサを保護するために全体に防水処理を施した。

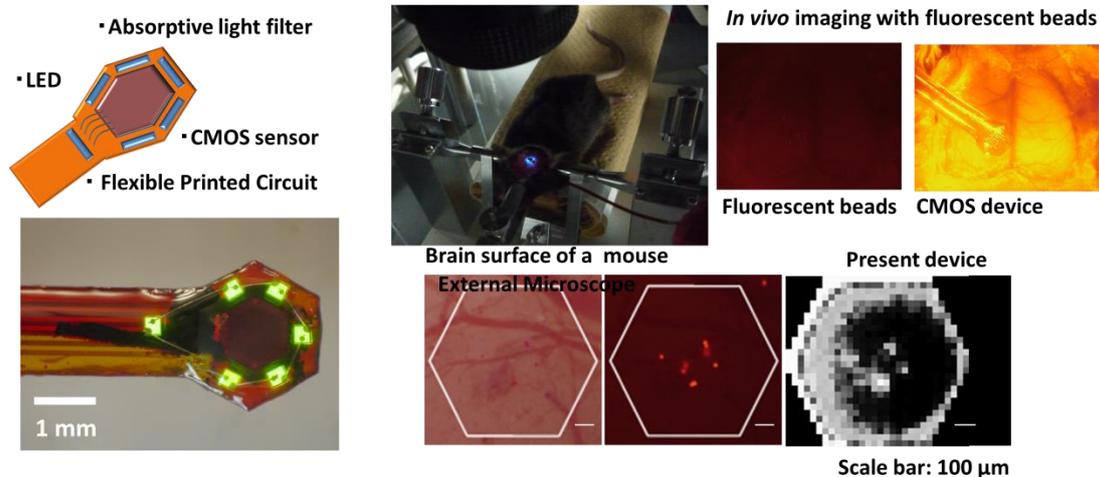


図 5.4 六角形 CMOS イメージングデバイスと蛍光ビーズ観察

5.3 脳表のマルチイメージング

5.3.1 実験動物と手術

本研究では、実験動物として C57BL/6JJmsSlc (マウス、オス、8 週齢、体重 25 ± 5 g、Japan SLC, Inc.) を用いた。動物実験は奈良先端科学技術大学院大学の動物実験に関する規定に基づいて行なった。手術開始前に、麻酔として 10%ウレタン (カルバミン酸メチルを生理食塩水で希釈) を投与量 1g/kg となるように腹腔投与した。麻酔したマウスを Stereotaxic instrument (Narishige) にイヤーパ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に、温度調整ができるホットプレートにより腹部の保温を行なった。本実験では、開頭手術によりマウスの左脳を露出させた。

5.3.2 脳表に埋植した蛍光ビーズの観察

実装した六角形 CMOS イメージングデバイスを用いて、生体内の蛍光イメージング実験を行なった。露出したマウスの脳表に蛍光ビーズをガラスニードルで挿入した。そして、脳表に挿入した蛍光ビーズを六角形イメージングデバイスにより観察した。図 5.4 に示したイメージングの結果と蛍光顕微鏡による観察結果から、脳表に挿入した蛍光ビーズをデバイスが検出できていることを確認した。これにより、本研究で開発した六角形 CMOS イメージングデバイスが生体内で使用可能であることを実証した。

5.3.3 生体脳表におけるマルチイメージング

複数の六角形イメージングデバイスによる広範囲脳機能計測を目的とした脳

表の観察実験を行った。麻酔したマウスの脳表に 3 台の六角形イメージングデバイスを密に並べて、3 台のデバイスによる脳表の観察を行った。本実験では、2 台のデバイスによる同時撮像を実現している。また、蛍光イメージングを目的として VSD によって脳表の染色を行った。図 5.5 は 3 台のデバイスによって撮像された脳表の血管像であり、顕微鏡によって VSD の蛍光を観察した。並べた各デバイスによる脳表の観察することに成功した。しかし、VSD の蛍光変化を計測することはできなかった。

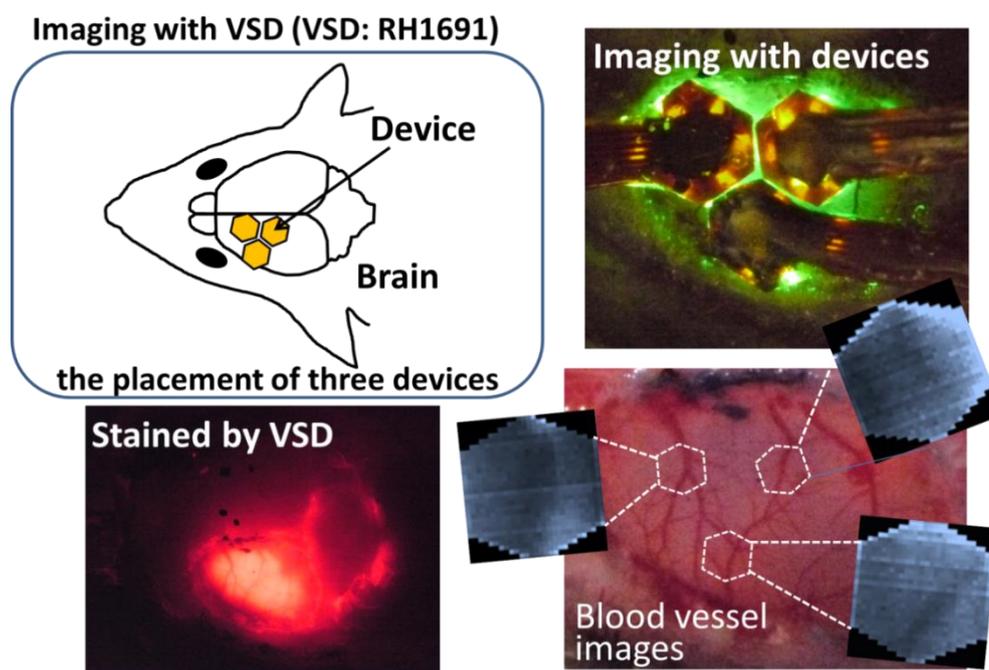


図 5.5 脳表におけるマルチイメージング

5.4 まとめと考察

本章では、広範囲脳機能計測を目的とした六角形 CMOS イメージングデバイスの開発を行った。本研究では、六角形の CMOS イメージングデバイスを脳表に稠密に配置することで、広範囲脳機能計測を実現する。埋植可能な小型デバイスを脳表に複数個並べることで、自由行動下における脳機能計測も実現可能になる。本章では、六角形の CMOS イメージセンサの設計を行い、このセンサを用いた六角形 CMOS イメージングデバイスの実装に成功した。設計した CMOS イメージセンサは画素の高感度化を行い、従来画素の約 4 倍の感度向上に成功した。また、六角形デバイスを複数使用した脳表の広範囲計測に成功した。3 台のデバイスを脳表に並べ、それぞれのデバイスにより脳表の血管像を取得することに成功した。

動物の脳機能は複数の領域が協力し合うことで、複雑な情報処理を行っている。神経ネットワークに関する研究によると、運動の制御も大脳皮質の運動野だけ行われておらず感覚野の脳活動も関与していること報告されている。そのため、脳機能解明を行うためには、広範囲に広がる神経活動を計測することが求められる。本デバイスにより、脳内の複数の領域による神経ネットワークの解明が期待できる。

VSD イメージングに関して、実験で使用される電位感受性色素は、輝度変化率は0.5%未満であり、開発した六角形イメージングデバイスでは計測できなかった。VSDによる蛍光変化を計測するためには、センサのS/Nと感度向上が必要と考えられる。

第 6 章 大型動物用イメージングデバイス

6.1 大型動物の脳機能計測用脳機能計測デバイスの開発

ニホンザルやチンパンジー等の霊長類はヒトに近い哺乳動物として、臨床研究のモデルとして用いられる。これら動物を用いることによって、ラットやマウスにはできない複雑な運動野や学習に関連する脳機能の解明が可能になる。サルを用いた脳機能計測実験について、図 6.1 に示す[52]。この研究では、手の動作を制御する脳機能を解析して、その時の活動パターンからモニター上で動作を再現する研究が行われている。さらに高度な内容の研究についても、図 6.2 に示す[53]。この研究では、チンパンジーを用いた数字の記憶学習に関する実験も行われている。しかし、前述の実験の多くではモンキーチェア等で拘束した条件下で行われている。霊長類における脳機能計測実験には図の様なモンキーチェアにサルを座らせて、頭部を完全に固定した状態にする。この状態では、電気生理実験ではマニピレーター、イメージング実験では顕微鏡を設置して実験を行う。このような実験系を用いる理由は、霊長類は力が強く器用な動作ができ、自由行動下における従来の脳機能計測装置では実験が困難なためである。自由行動下における実験を実現することにより、歩行動作の制御機能解明に加え、動物間のコミュニケーション時の脳活動等より高度で複雑な脳機能解明が可能になる。

本稿では、ニホンザル(ニホンマカゲザル)に埋植可能な広範囲脳機能計測デバイスの開発を行った。本研究は日本大学歯学部生理学研究室との共同研究によって行われ、侵襲刺激に対するニホンザルの弁別時間と大脳皮質一次体性感覚野の神経活動の関係の関係を目的としている。本研究が行われるまでは電気生理学的手法を用いた神経活動計測が行われてきたが、光学的イメージング技術を用いることで神経活動の広がりや分布が計測でき、弁別に必要な神経ネットワーク解明への貢献が期待される。本研究で用いるニホンザルの脳はラットやマウスに比べて大きく、計測部位である大脳皮質の顔面領野においても計測範囲が広がる。また、行動実験を行わせるためには、埋植手術後の回復期間や行動実験をニホンザルに忘れさせないためのトレーニングなど、半年から 1 年の長期的な実験期間が必要とされている。そのため、デバイスには、①広範囲の脳機能計測、②長期間の生体埋植に対する耐久性、③脳機能計測が可能な状態を長期間維持、という条件が求められる。本章では、行動実験中のニホンザルの脳機能計測を実現するデバイスの開発について述べる。

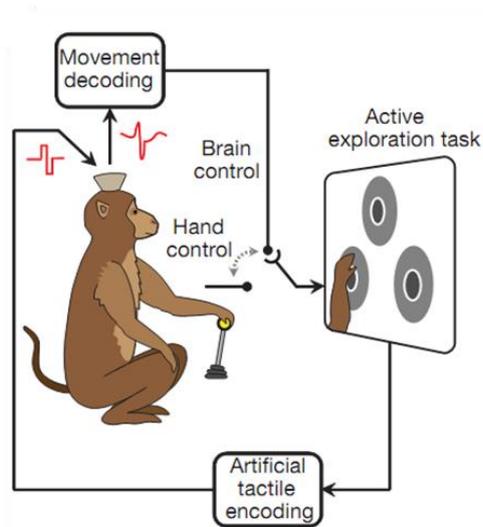


図 6.1 脳活動を利用してモニター上で手の動作を再現する研究[52]



図 6.2 数字の記憶学習に関する研究[53]

6.2 大型動物用イメージングデバイスの開発

本研究では、ニホンザルを使用した行動実験中の脳機能計測を実現するために、超小型埋植用 CMOS イメージングデバイスを応用した大型動物用イメージングデバイスの開発を行った。本デバイスには計測範囲の拡大と長期埋植に耐える耐久性が求められている。まず、イメージングデバイスのニホンザルへの埋植条件について述べる。ニホンザルによる実験の様子とデバイスの埋植状態を図 6.3 で示す。サルの拘束には、モンキーチェアを使用する。サルをモンキーチェアに座らせた状態で、頭部のみを専用の金属製器具で固定する。本実験では、サルの頭部は完全に固定させた状態で行うため、実験時はデバイス信号の

送受信は有線で行う。しかし、実験時以外のサルは拘束を解くため、デバイスからの信号用配線をチャンバー近くに設置したコネクタ部で切り離す。コネクタ部を含めた信号線の一部がサルの頭部から露出する。これを保護するために金属製のチャンバーの中に露出した配線を収納する。

配線が露出するため、生体外から配線を通じて細菌等が侵入し感染症を引き起こす可能性がある。特に、脳を感染症から守る必要がある。この問題を解決する方法として、頭蓋骨を除去した脳の露出部とチャンバー設置部に 5 cm 程の距離を設けて、感染源が侵入しても脳の露出部までは侵入しない様に工夫を施した。また、今回使用するデバイスは長期間生体内に埋植されるため防水性と生体適合性を向上させる必要がある。

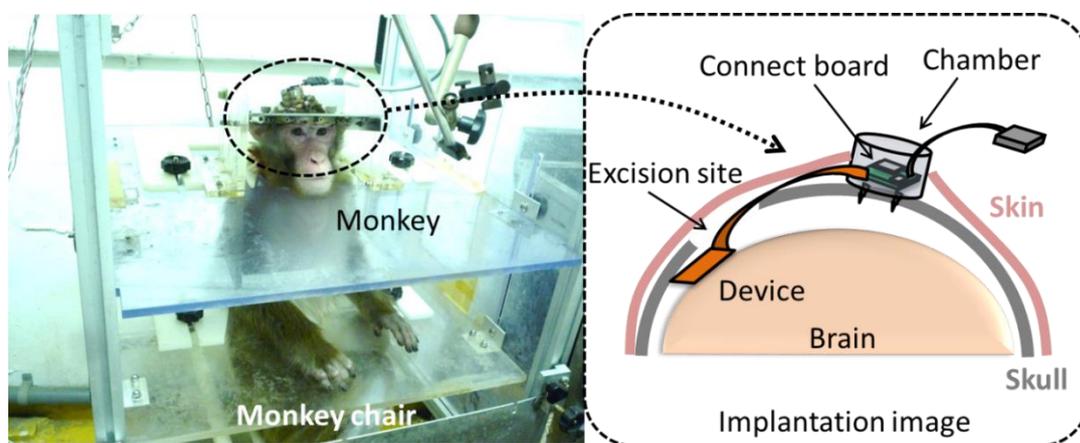


図 6.3 モンキーチェアに座るニホンザルとデバイスの埋植図

6.2.1 大型動物用イメージングデバイス

本研究では、ニホンザルの脳機能計測を目的とした広範囲観察用デバイスを開発した。フレキシブルなポリイミド基板上に、2 台の CMOS イメージセンサと 14 個の LED 光源($\lambda=535\text{ nm}$)を搭載する。図 6.4 にはデバイスの実装イメージを示す。長期埋植実験時の感染症対策として前述の理由により、デバイスの全長が 10 cm である。また、デバイスに搭載された 2 台の CMOS イメージセンサを同時に駆動することで計測範囲を広げる。本デバイスで 2 台のセンサによる計測を行う理由は、LED 光源からの照射光の均一性を高めるためである。視野範囲を広げるために CMOS イメージセンサの撮像面積を広げることで対応できるが、本研究で用いるコンタクトイメージによる脳機能計測では照射光が脳表で減衰し、撮像中心で計測される光強度が低下してしまう。これを防ぐ目的として、センサ間に LED を配置させる。センサ周りに E 型に LED を 14 個配置することで、光源の均一化を行った。

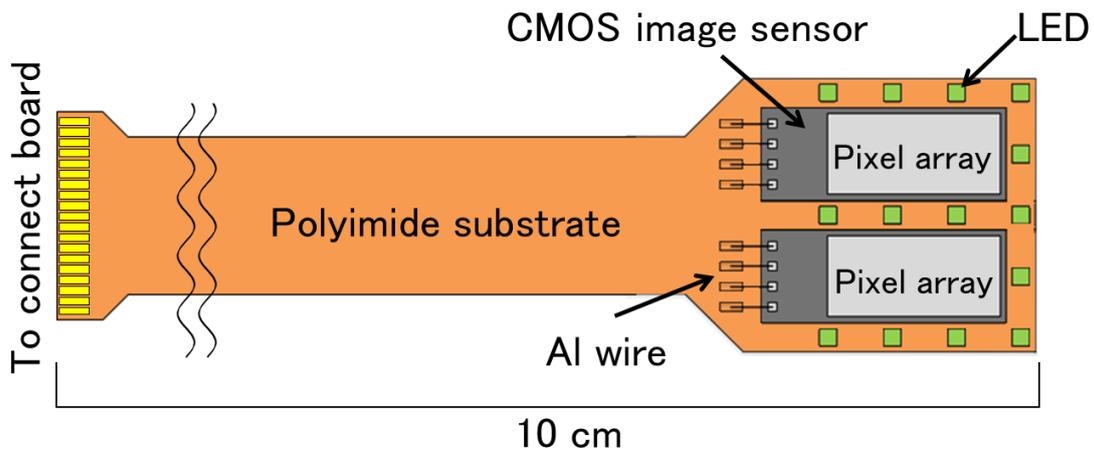


図 6.4 大型動物用イメージングデバイスのイメージ

6.2.2 大型動物用イメージングデバイスに搭載する CMOS イメージセンサ

大型動物用イメージングデバイスには、図 6.5 に示す CMOS イメージセンサを搭載した。7.5 μm 角の画素を 120 \times 268 個搭載し、チップサイズは 1000 μm \times 3500 μm である。本センサの回路構成と主な仕様については、図 6.6 と表 6.1 に示す。また、本センサの性能は、図 2.6 に記載した Previous work デバイスと同一である。

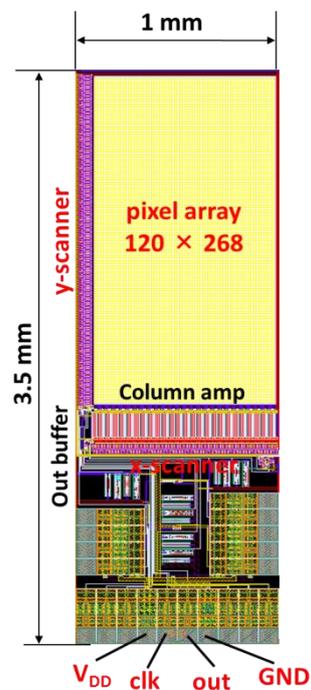


図 6.5 大型動物用デバイスに搭載した CMOS イメージセンサのレイアウト

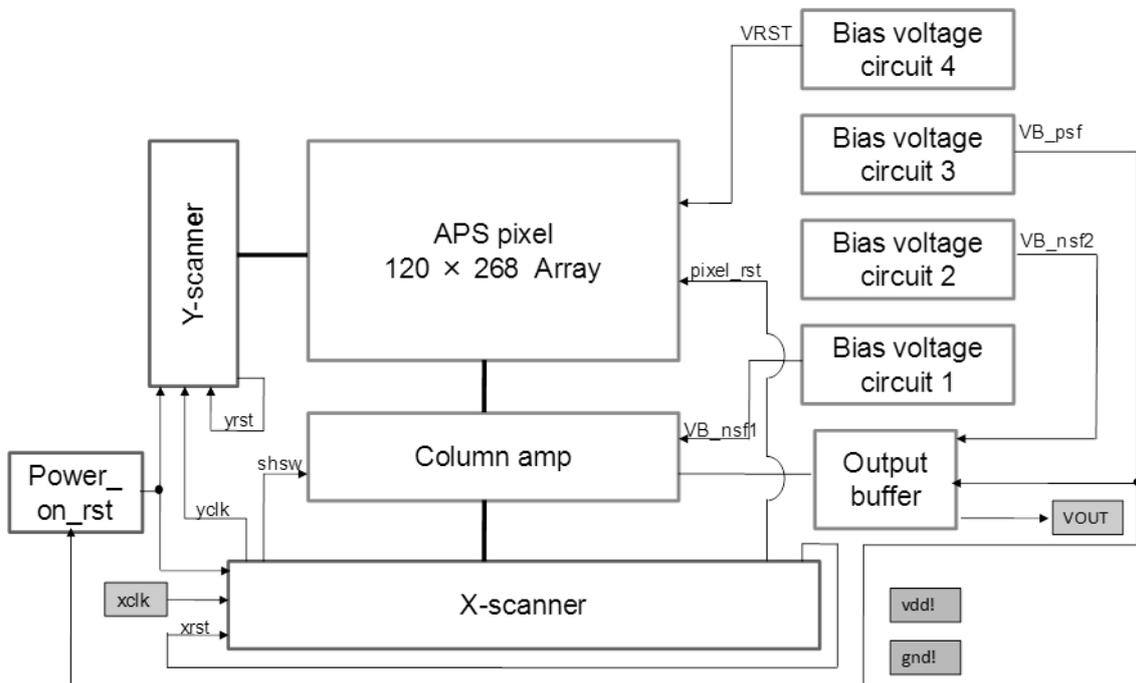


図 6.6 搭載センサのブロック図

表 6.1 搭載センサの仕様

Technology	0.35- μm 2-poly 4-metal standard CMOS process
Operating voltage	3.3 V
Chip size	1000 μm \times 3500 μm
Pixel Array size	900 μm \times 1920 μm
Type	3-transistor active pixel sensor
Photodiode	Nwell - Psub
Pixel size	7.5 μm \times 7.5 μm
Pixel count	33768
Fill factor	35%

6.2.3 大型動物用 CMOS イメージングデバイスの制御・計測システム

ニホンザルの行動実験中の脳機能計測に使用するイメージングシステムの構成を図 6.7 に示す。ニホンザル用イメージングデバイスは、計測範囲を広げるために 2 台の CMOS イメージセンサを同時駆動する。同時駆動するために、イメージングシステムの開発を行った。このイメージングシステムでは駆動信号の同期と電源ラインの共通化を行った。2 台の制御基板を用いて、制御基板間で駆動信号(clock 信号)の同期を行った。電源ラインも制御基板間で共通化した。センサからの出力信号は、別々に制御用 PC に送られ、プログラム上で同時表示を行った。

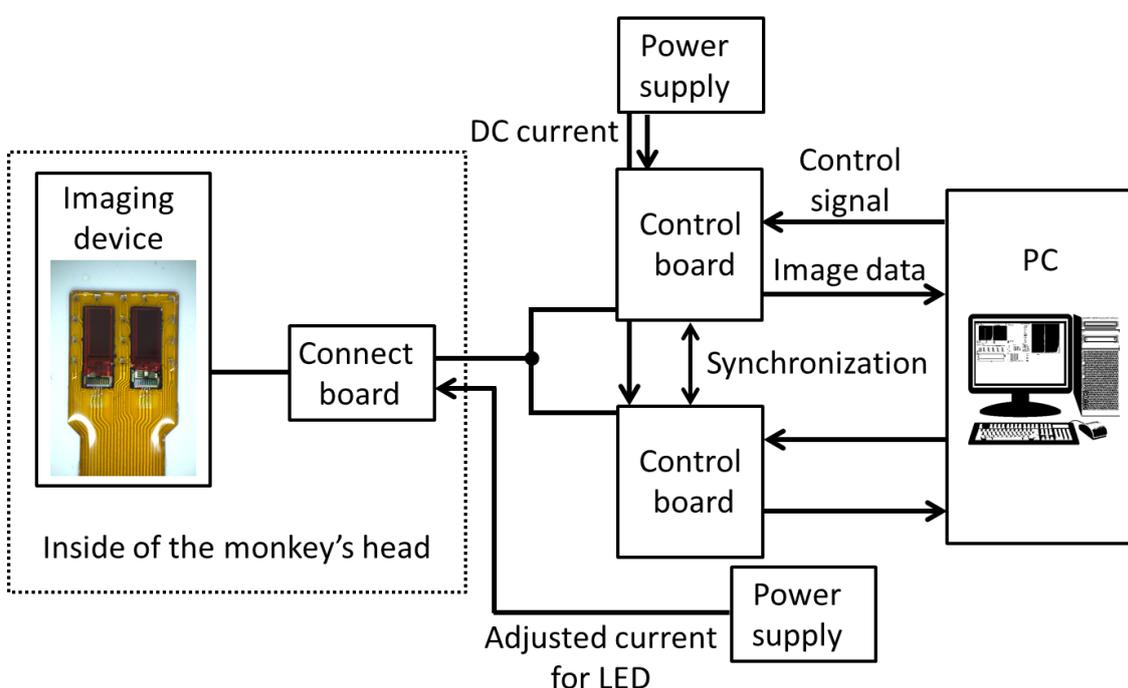


図 6.7 ニホンザルの脳機能計測用イメージングシステム

6.2.4 大型動物埋植用中継基板

ニホンザル脳機能計測実験では、中継基板とイメージングデバイスを頭部に埋植する。中継基板を直接頭部に固定することによって、脳表に設置されたイメージングデバイスが長期間埋植時に生体内で移動しないようにする。図 6.7 の図のように、しっかりと固定された中継基板からの配線と制御基板を実験時に接続することで、接続作業時にもデバイスに直接の力が加わらないようにする。中継基板と中継基板からの配線は、サルの頭部に設置された図 6.8 に示すステンレス製チャンバー内に収められる。そのため、配線と共にチャンバー内に収められる小型の中継基板であることが必要である。



図 6.8 ニホンザルの頭部に設置するステンレス製チャンバー

ステンレス製チャンバー内に収納可能な小型中継基板を設計した。作製した中継基板を図 6.9 に示す。中継基板にはオペアンプと 2 個デジタルバッファを搭載している、中継基板サイズは 2 cm × 2 cm で、チャンバー内に収納可能である。中継基板の回路構成は図 6.10 に示す。入力側に 2 つのデジタルバッファ回路、出力側に 2 つのユニティ・ゲイン・バッファ回路を搭載している。また、センサ用の電源ラインを共通化した。

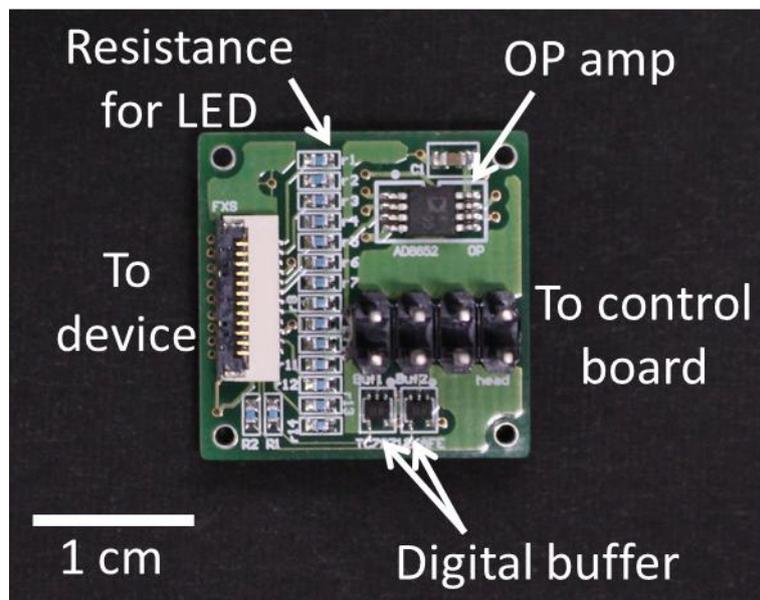


図 6.9 埋植用中継基板

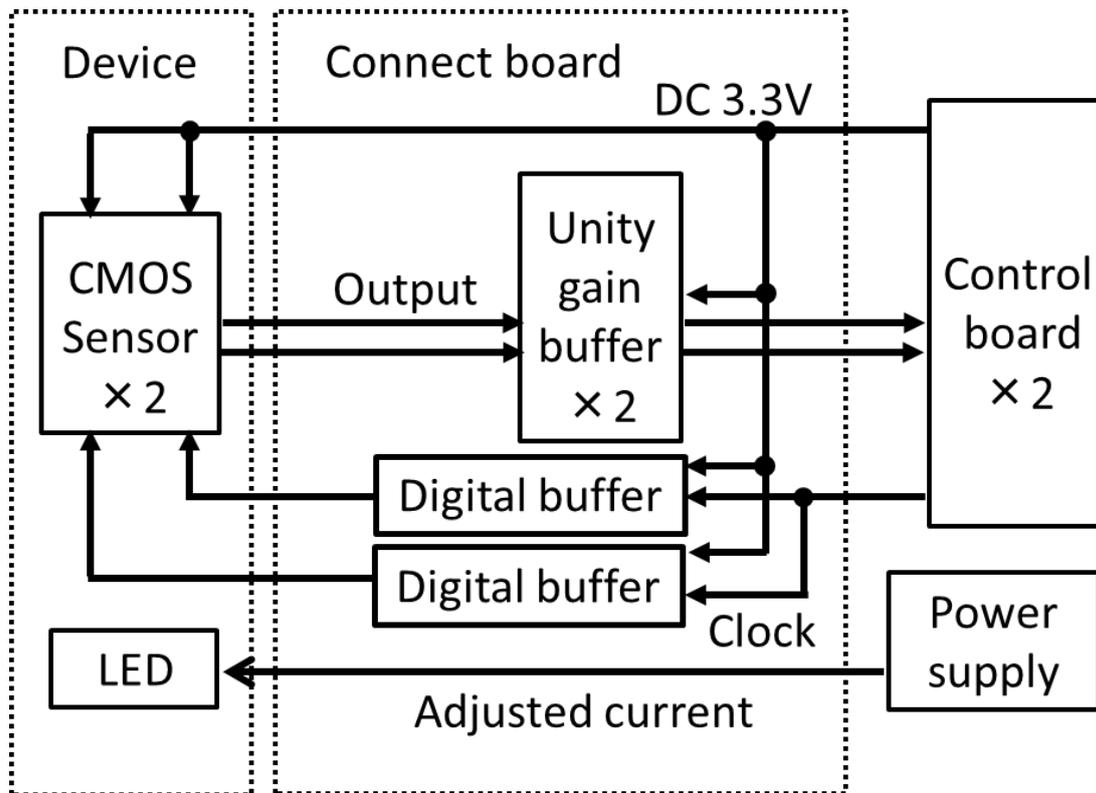


図 6.10 埋植用中継基板の回路構成

・大型動物用イメージングデバイスの実装

ニホンザルの様に大きな動物の脳機能イメージングに対応するために、2 台の CMOS イメージセンサを搭載した。図 2.10 に示す実装プロセスにより大型動物用イメージングデバイスの実装を行った。しかし、本実験は RH1691 呼ばれる電位感受性色素を使った脳機能蛍光イメージングを行うために緑色の LED と赤色の吸光フィルタを搭載した。実装後はパリレンコーティングによって生体適合性の向上と防水処理を施した。図 6.11 に実装後のデバイス写真を示す。右図は LED を点灯した時のデバイス写真である。LED をセンサ感に配置することで照射光の均一化を実現した。表 6.2 にデバイスの仕様を示す。実装後のデバイス重量は 0.05 g と小型の広範囲イメージングデバイスの開発に成功した。

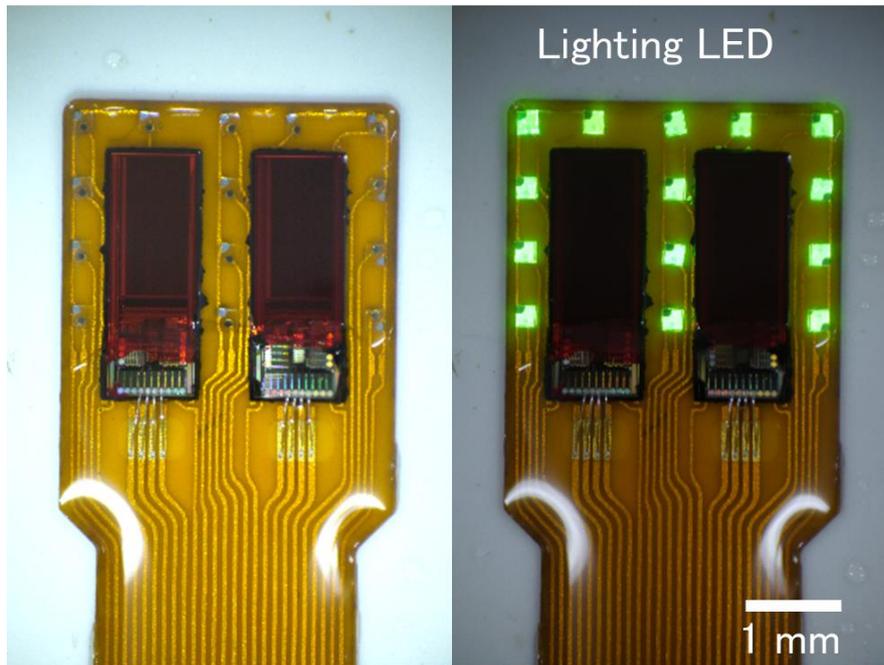


図 6.11 大型動物用イメージングデバイスの写真

表 6.2 デバイスの仕様

Device size (Drive part)	6.0 mm × 4.9 mm × 0.35 mm
Weight	0.05 g
Total length	100 mm
Substrate	Polyimide flexible substrate
Waterproof	Parylene film
Light source	Green LED ($\lambda = 535 \text{ nm}$) × 14

6.2.5 デバイス埋植実験の準備

中継基板と CMOS イメージングデバイスをニホンザルの頭部に埋植するために、中継基板と CMOS イメージングデバイスの一体化を行った。図 6.12 に一体化したデバイスを示す。中継基板までは、サルの頭部に埋植するため、エポキシ樹脂とパリレン膜によって防水処理を施した。中継基板からの配線は、実験時以外には頭部に設置したステンレス製チャンバー内に収納した。実験時は、制御ボードからの配線と接続した。

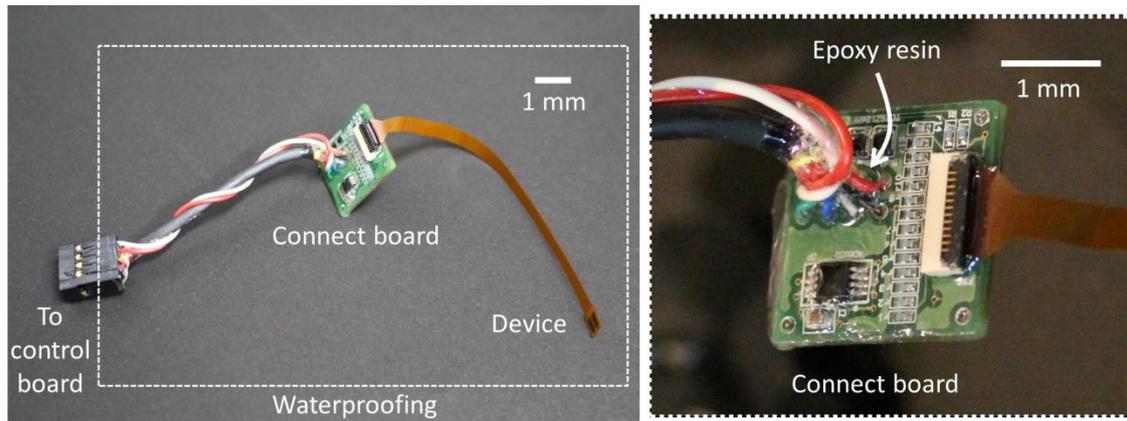


図 6.12 埋植用に一体化した中継基板と CMOS イメージングデバイス

6.3 ニホンザルを用いた脳機能計測の実験系

6.3.1 実験動物と手術

脳機能計測実験にはニホンザルの雄（推定年齢 6 才）を用いた。動物実験は日本大学歯学部の規定に従って行った。ケタミン・キシラジンを導入麻酔に用い、プロポフォル注射液を用いた麻酔の維持を行った。手術についての手順は図 6.13 に示す。除毛剤を用いて、サル頭部の毛を除去した後に、頭皮を切開した。サルの大脳皮質一次感覚野の顔面受容野にあたる部位周辺の頭蓋骨の除去を行い、硬膜を露出させた。顔面受容野の特定は硬膜上から電気生理実験によって行った。電気生理実験の様子を図 6.14 に示す。タングステン針による細胞外記録により脳機能計測を行った。次に、電気生理実験によって確認された顔面受容野にデバイスを設置した。観察領域の脳への損傷を可能な限り減らすため、観察領域から約 3 cm 程度離れた所の硬膜をデバイスが通るほどだけ切り開いた後に、デバイスを硬膜とクモ膜の隙間に挿入し、隙間に滑り込ませることで、目的の位置までデバイスを誘導した。デバイスの埋植時の様子を図 6.15 に示す。また、この硬膜の隙間から、脳表を染色する RH1691 溶液を送り込むための細いカニューレも挿入した。デバイスを設置し、仮固定後に取り出した頭蓋骨で開頭部に蓋をして、デンタルセメントにより頭蓋骨及びデバイス、カニューレを固定した。デンタルセメントがしっかりと頭蓋骨に接着するように金属製のネジを頭蓋骨に打ち込み、アンカーとした。デバイスのコネクタ部とカニューレの末端は実験毎に外部の機器と接続させるために、頭皮から露出している必要がある。そこで、本研究では露出部からの感染を低減するために、観察部から離れた場所にチャンバーを設置し、その中にデバイスのコネクタ部等を収納した。このチャンバー内はセメントによって皮下からの体液が入り込

まないようにし、蓋を閉めることで実験時以外は部品を収納可能である。これらの実験は日本大学歯学部動物実験に関する指針に従って行った。

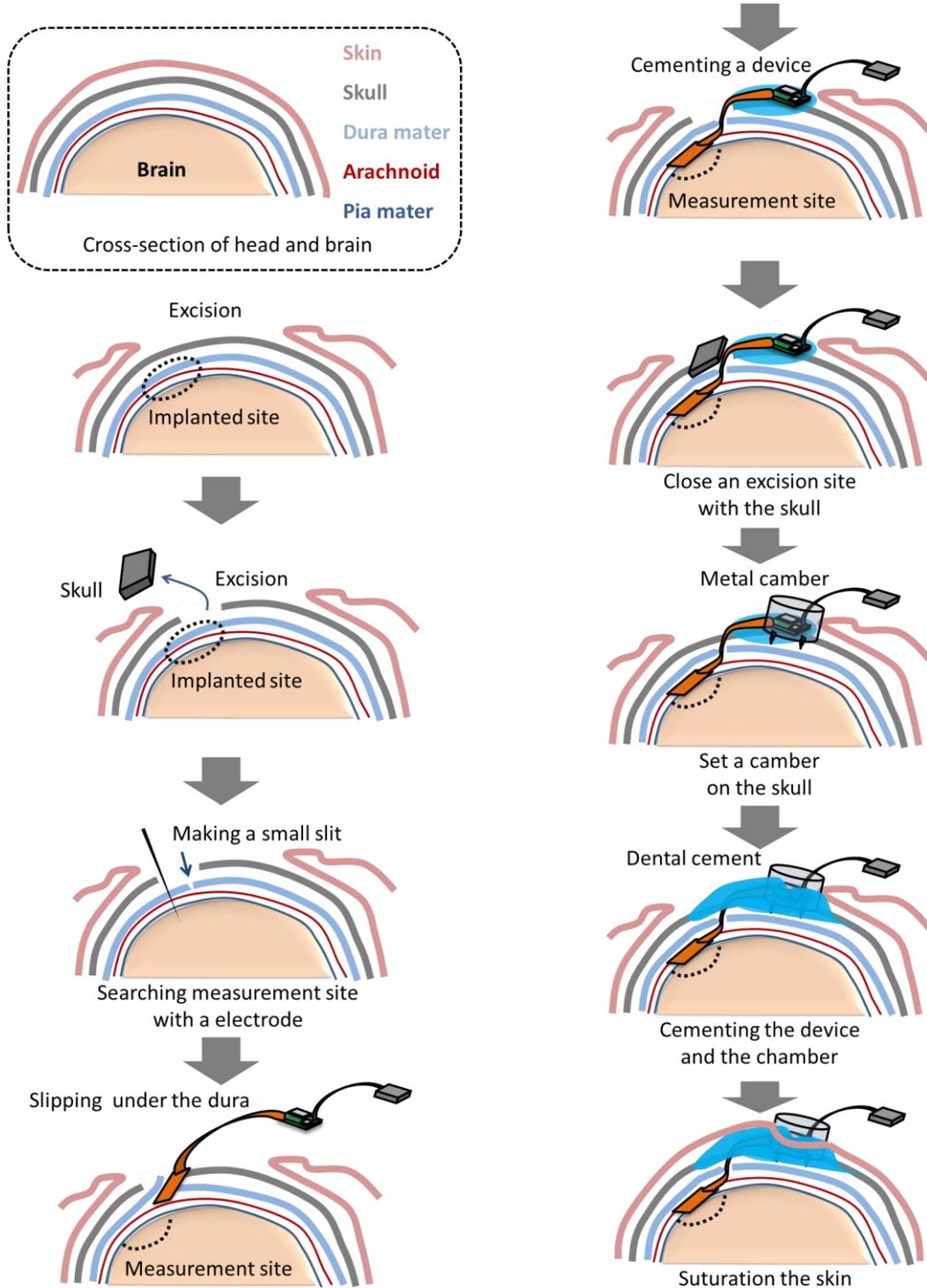


図 6.13 デバイスの埋植手術

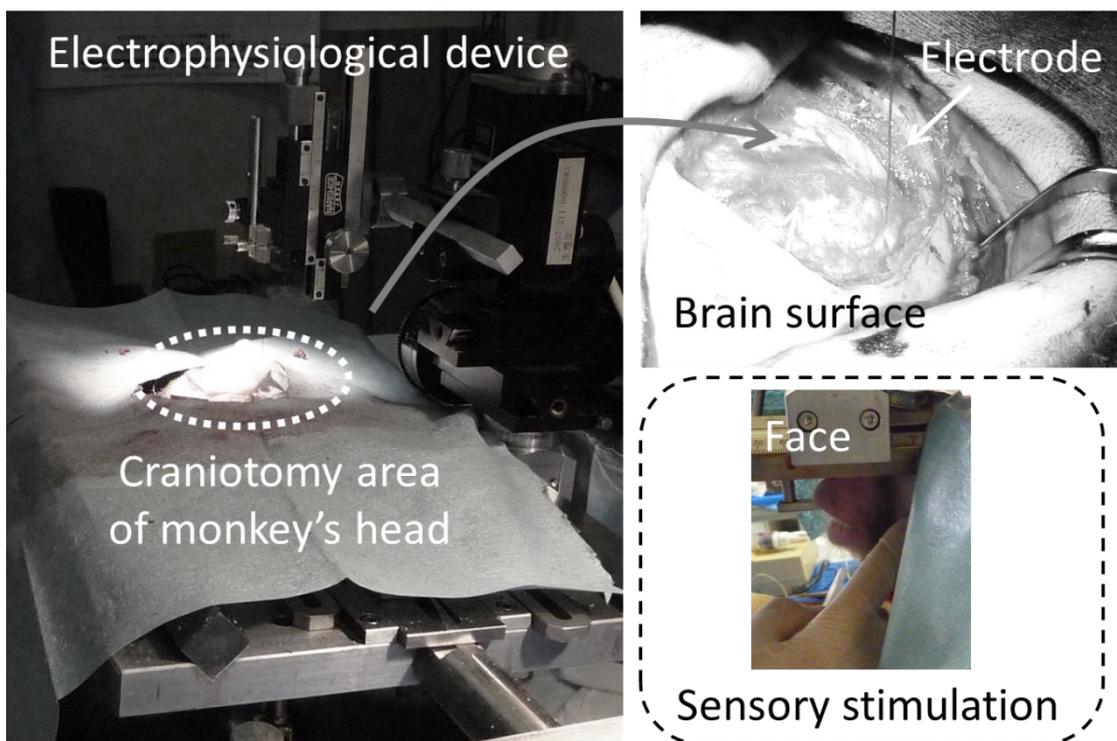


図 6.14 電気生理実験によるデバイスの埋植位置の決定

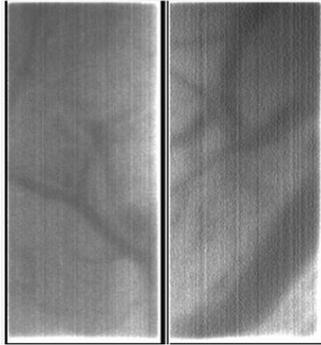


図 6.15 デバイスの硬膜下への挿入

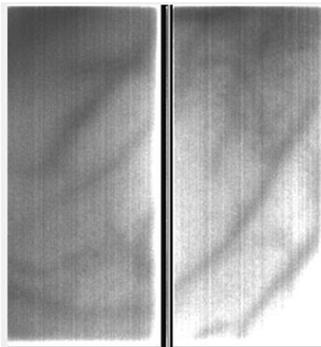
6.3.2 埋植手術後の経過

ニホンザルの頭部への CMOS イメージングデバイスの埋植手術後のデバイスの状態を観察した。図 6.16 に埋植後から 27 日経過した時のデバイスによって撮像した脳表イメージを示す。手術日と術後 9 日目では、脳表の撮像に成功した。脳表の血管を撮像できており、術後 9 日目には、ニホンザルによる行動実験を行った。しかし、術後 14 日目以降には、血管像の撮像はできず、脳機能イメージングを行うことができなかった。術後 14 日以降に、脳表の計測が不能になった理由は、生体の免疫反応により埋植されたデバイスが異物として認識され、デバイスの周囲に結合組織が形成された事が原因であると考えられる。

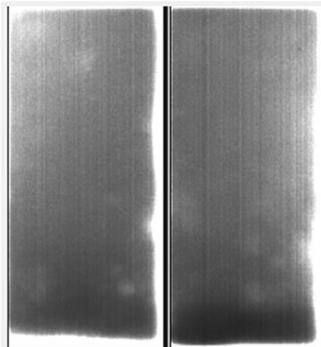
Day 0



Day 9



Day 14



Day 27

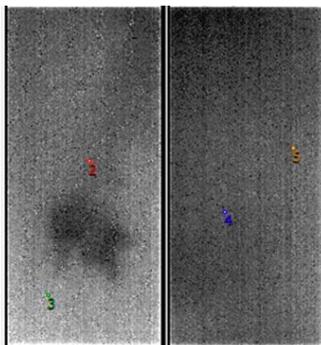


図 6.16 埋植後のイメージング結果の推移

6.3.3 埋植したデバイスの計測不能の原因

埋植手術から 37 日経過後に、ニホンザルのデバイス埋植部を再び開頭し状態の確認を行った。図 6.17 に開頭後のデバイス埋植部の写真を示す。デバイス周辺には結合組織や分厚くなった硬膜が形成されていることを確認した。図では、埋植したデバイスの上部に分厚く形成された硬膜が観察できる。図 6.18 には、デバイスのイメージング部の下に形成された結合組織の写真を示す。デバイス下に形成された結合組織は 1 mm 程の厚さがあり、濃い赤色をしており光透過性は見られなかった。

本実験では、観察部位の脳表組織の損傷を抑える目的として、観察部位よりも 2-3 cm 程離れた領域の硬膜を小さく切開し、デバイスをゆっくりと挿入した。しかし、硬膜の切除による出血とデバイス挿入時に与える損傷がデバイスの周囲に結合組織を形成させた。さらに、硬膜への損傷は、結合組織により形成されている硬膜の再生を促進し、結果観察部位にまで結合組織の形成が広がった。

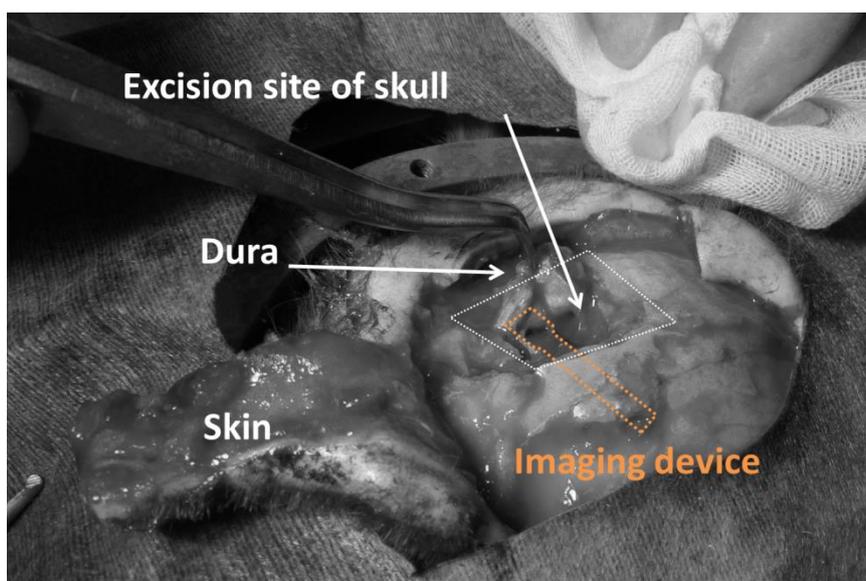


図 6.17 露出させたデバイスの埋植部

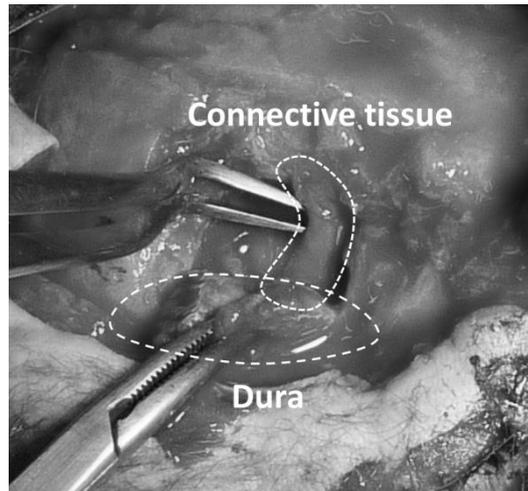


図 6.18 デバイスの下に形成された結合組織

6.4 デバイス埋植されたサルによる行動実験

6.4.1 ニホンザルによる行動実験

イメージングデバイスを埋植したサルを用いて、行動実験を行った。行動実験は手術後 9 日目に行った。行動実験については図 6.19 に示す。行動実験の内容は、図 6.21 に示す様に T1 と T2 から成る 2 種類の温度刺激をサルの顔面に与えて、T1 から T2 への温度変化を感知した時に、サルがスイッチの操作を行うと報酬が与えられる行動実験系になっている。行動実験時のサルは写真の拘束具に固定され、覚醒下で行動実験が行われる。プログラムで制御されており、すべて自動で行われる。また、行動実験の制御装置とイメージングシステムは同期されており、実験開始、温度刺激、サルによるボタン操作のタイミングがイメージングシステム上に記録される。本実験では、サルの大脳皮質一次感覚野の顔面受容野における温度刺激に対する感覚応答をイメージングデバイスにより観察した。

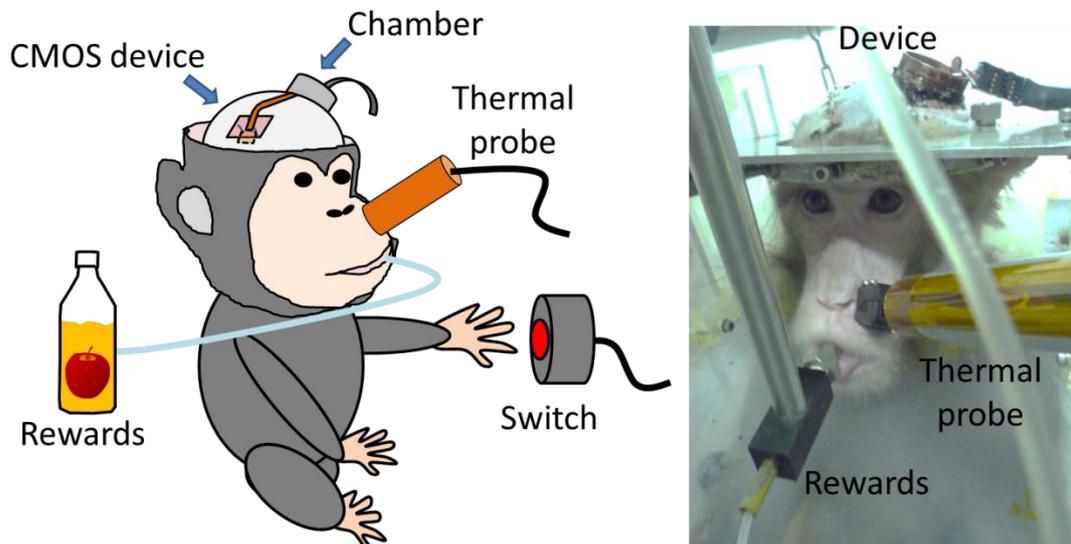


図 6.19 行動実験の概略図と実験中のサルの写真

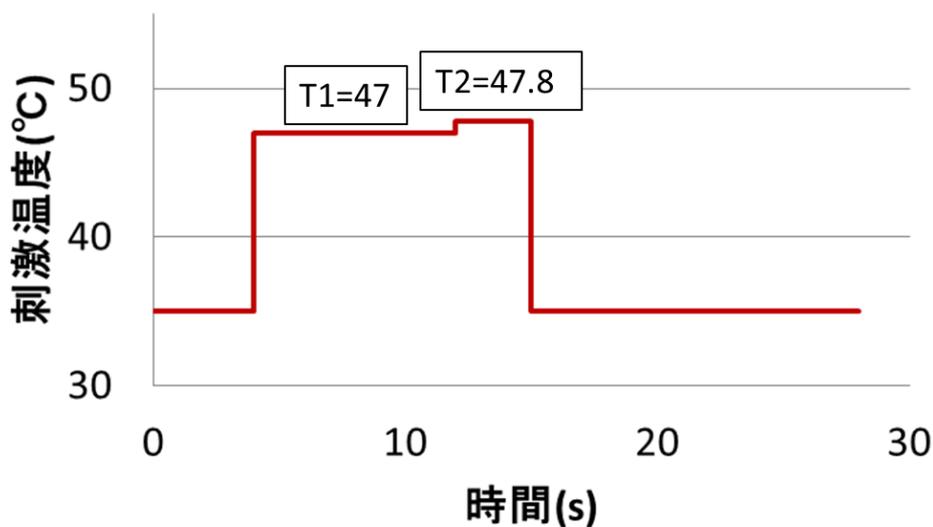


図 6.20 行動実験の温度刺激条件

6.4.2 行動実験に伴う脳機能計測

脳機能イメージングは、術後 9 日目のニホンザルで行った。画像中の黒い筋は、脳表の血管を表している。

温度刺激は通常時は 35 度に設定し、T1(45°C)から T2(47.5°C)へと二段階の刺激を行った。温度刺激実験の刺激シーケンスについて図 6.20 に示す。図 6.21 に示す実験時の脳表イメージ中の 1 番から 5 番までの点は輝度変化計測を行った各計測点を示す。感覚刺激に対する脳機能計測の結果を図 6.22 に示す。図中のオレンジ色の線は刺激開始時を示している。刺激開始約 5 秒後に、大きな輝

度変化が観察された。今回の実験では刺激後に輝度の低下が計測された。今回観察された結果は、内因性シグナルイメージングの結果と一致しており、今回のサルの実験においても血流変化による内因性シグナルが観察された。

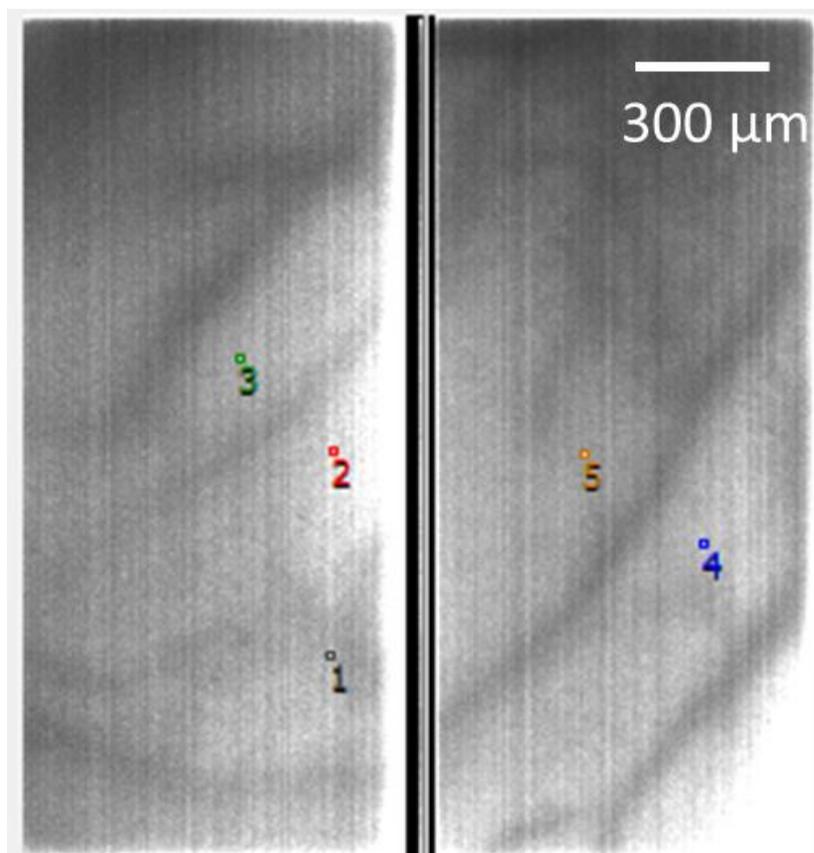


図 6.21 脳表における計測点

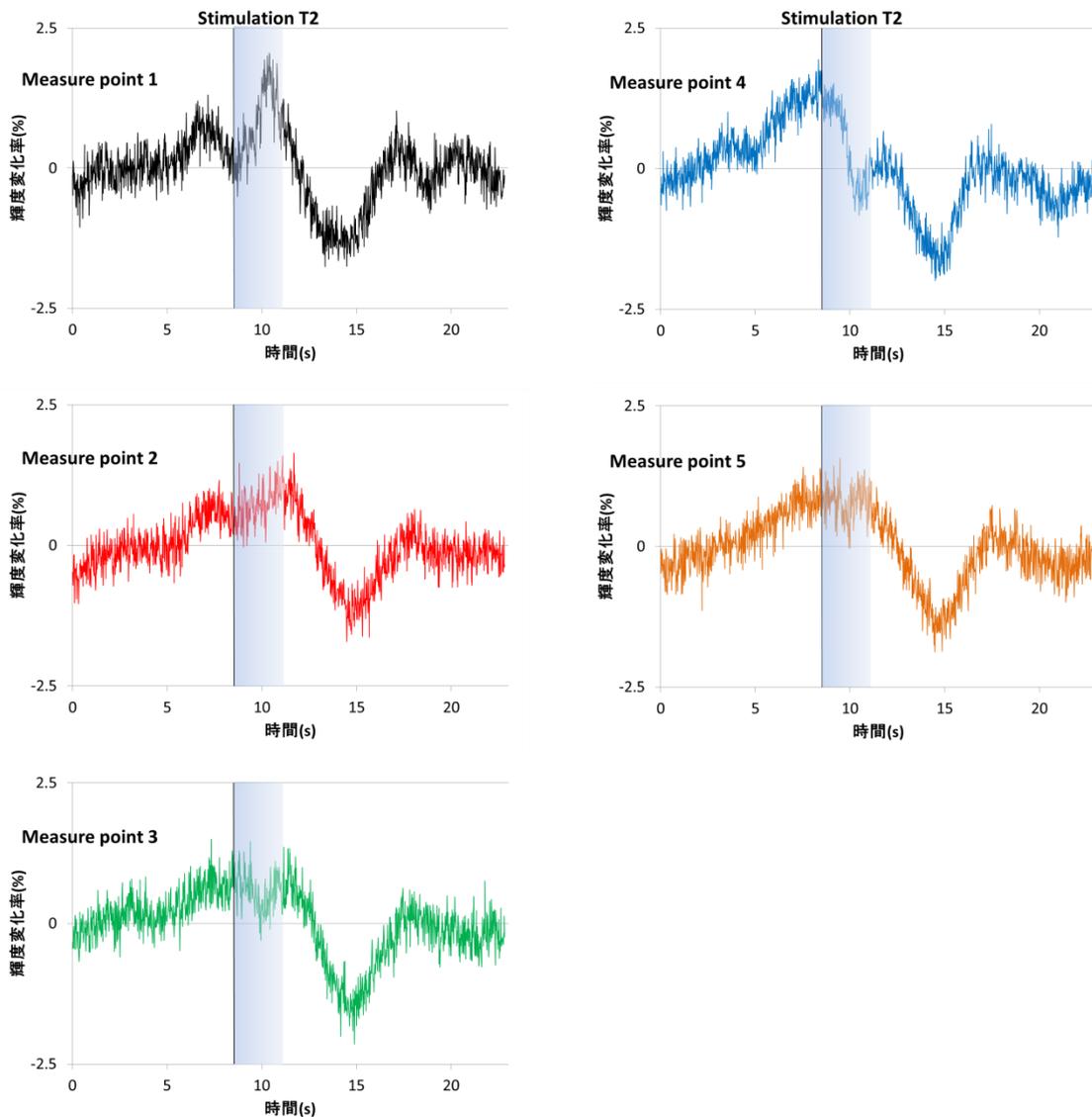


図 6.22 サルの脳表における手術後の経過観察図 6-7 サルの脳表において観察された内因性シグナル

6.5 まとめと考察

本章では、ニホンザルにおける行動実験中の脳機能計測に使用可能な埋植用 CMOS イメージングデバイスを開発し、感覚刺激に応答する内因性シグナルの計測に成功した。ニホンザルを用いることによって、ラットやマウスにはできない複雑な運動野や学習に関連する脳機能の解明が可能になる。しかし、ニホンザルの脳は小型動物の脳に対して大きく、その分計測範囲も広くなる。この問題を解決するために、本実験では広範囲計測が可能な CMOS イメージングデバイスを開発した。2 台の CMOS イメージセンサを搭載することで、視野範囲

を広げること成功した。また、ニホンザルを用いた実験では長期間の埋植が求められるため、デバイスの埋植部全体をパリレン膜によってコーティングし、防水性と生体適合性を向上させた。開発した広範囲計測が可能な埋植用 CMOS イメージングデバイスを用いて、埋植手術から 9 日後に覚醒下におけるニホンザルの行動実験を行った。行動実験では温度刺激に対する大脳皮質一次感覚野顔面領野の神経応答を計測した。温度刺激は T1、T2 の 2 種が類与えられ、特定の刺激に対して反応するようにサルは訓練されている。本実験では、T1 から T2 への温度変化時のサルの脳機能計測を行った。実験の結果、T2 刺激後に輝度の低下をデバイスが検知した。これは第 3 章で示した血流による内因性シグナル応答の結果と同じであり、本実験においても感覚刺激に応答する内因性シグナルを計測することに成功した。

しかし、本実験において術後 14 日以降に脳表の計測ができなくなった。これは CMOS イメージングデバイスを埋植したことによる生体の治癒機能による影響であると考えられる。CMOS イメージングデバイスを用いた長期埋植実験において、デバイス撮像面の結合組織形成は、デバイスの撮像能力の低下を引き起こす。そのため、結合組織の形成を防ぐ手法の考案が必要となる。結合組織の形成は生体が持つ治癒機能の一つであり、損傷部位では、血球系細胞や繊維芽細胞の遊走、繊維芽細胞の増殖と細胞外マトリックスの誘導、血管新生、上皮細胞の増殖と皮膚形成の順に治癒が行われる [54]。治癒機構の初期に行われる活性化マクロファージや血小板等の血球系細胞の遊走が炎症反応を引き起こす主役と考えられており、炎症により繊維芽細胞の増殖等の作用が誘引される。つまり、炎症反応を抑制することにより、結合組織の形成を防ぐ事が可能となる。炎症反応の原因は①組織の損傷、②感染症、③異物の混入の 3 つが考えられる。①組織の損傷については、手術方法の改善が有効である。特に硬膜は再生が早い部位と言われている。これを改善する方法として、コラーゲンが主な組織である硬膜に対してコラーゲン分解酵素を用いて硬膜を薄くする方法が考えられる。この方法を用いることで、脳表への直接的な損傷の抑制と出血を伴わないことによるサイトカインの分泌抑制により、結合組織形成を抑制できると考えられる。また、硬膜自体の再生は抑えられないため、硬膜の結合組織形成がデバイス上 (撮像面の反対側) に行われるように誘導することができれば、長期埋植実験に耐えることが可能になる。

また、本実験で使用したデバイスには、パリレン膜でコーティングを行なっている。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 に認定されている。そのため、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。しかし、これら装置にとっても、結合組織形成は問題として挙げられている。電気刺激・計測用デ

バイスでは、電極周辺への結合組織形成が刺激強度や計測精度を低下させている。本論文でも光学的計測方法を用いるため、結合組織形成は重要な問題である。これを解決する方法の研究も行われている[55]。電極表面におけるタンパク質吸着が炎症の原因の一つと考えられており、これらを寄せ付けない皮膜を形成することで、炎症や異物認識の少ない電極の作製に成功している。本研究においても、脳表に形成される結合組織の除去技術を CMOS イメージングデバイスの埋植時に用いることは有効な手段となる。

第7章 結論

7.1 本研究の成果

本研究では、超小型埋植用 CMOS イメージングデバイスによる自由行動下および覚醒下にある動物の脳機能活動の観測を行った。CMOS イメージングデバイスの高機能化と小型化を目的としたデバイスの試作を行い、実際にラットやニホンザルといった哺乳動物の脳機能活動の観測に成功した。本研究で行った実験によって、以下の成果を得ることができた。

- ・超小型埋植用 CMOS イメージングデバイス

自由行動下にあるラットやマウスの頭部に埋植可能なサイズの小型デバイスを開発した。フレキシブル基板の最適化と LED 実装方法の改良によりデバイスの重量は、0.02g となり、成体ラットの 1/10,000、成体マウスの 1/1,000 のサイズを実現した。

- ・内因性シグナルによる脳機能計測

長期的に安定した脳機能イメージングを実現するために、血液を利用した内因性シグナルイメージングにより、ラットの脳機能観察を行った。ラットの大脳皮質一次感覚野ヒゲ受容野においてヒゲ刺激時の神経活動計測に成功した。特定の刺激のみに反応する領域の観測に成功した。

- ・自由行動下における脳表の血流計測

自由行動下および行動実験中のラットにおいて、脳表を張り巡らされている血管中の血流計測を行った。血液中のヘモグロビンの吸光特性を利用することで、血管中のヘモグロビン濃度の異なりから血流の流速と流れる方向を計測することに成功した。さらに、行動実験中においても、リアルタイムに血流を観察することに成功した。

- ・広範囲脳機能イメージング

動物の脳機能解明には神経ネットワークの観察が必要である。そのため、広範囲計測が求められる。そこで本研究では、小型かつ広範囲のイメージングが可能なデバイスとして六角形型 CMOS イメージングデバイスを開発した。複数個の六角形デバイスを多面配置することで、広範囲イメージングを可能とする。3つのデバイスによる脳表のマルチイメージングに成功し、脳表の血管像の取得を行った。

- ・大型動物用デュアルイメージングデバイス

よりヒトに近い哺乳類を利用することにより、ヒトの脳機能解明の発展につながる事が可能となる。本研究では、ニホンザルを用いた脳機能計測を行った。サルの脳はラットに比べると巨大で、広範囲観測が可能なイメージングデ

バイスが必要となる。そのため、本研究では、2 台のデバイスを並べて配置することで観察範囲を拡大した。サルの脳機能計測実験は覚醒下にあるサルで行い、大脳皮質一次感覚野顔面受領野において内因性シグナルの取得に成功した。

これらの研究成果は、動物体内に埋植した超小型埋植用 CMOS イメージングデバイスによる脳機能観測技術の確立に成功したことを示している。血流を利用した内因性シグナルイメージング手法とコンタクトイメージング法を取り入れることによって、デバイスの頭部への完全埋植による長期間の脳機能観測への可能性を示すことができた。行動実験を伴う脳機能観測には、動物に試行内容を記憶させ条件を安定させるために長期間の実験が求められる。本研究の実証により、行動実験中の脳機能観測が可能になり、本デバイスを用いた新たな脳機能解明に貢献することが期待される。

7.2 今後の展望

本研究では、血流を利用した内因性シグナルイメージングによって、脳機能観測に成功した。血流を用いた内因性シグナルは、反応が見られるまでに 1 秒以上のタイムラグが存在する。神経活動に伴う血流量の変化は、①神経活動が発生する、②エネルギー源であるブドウ糖と酸素を神経細胞が消費する、③神経細胞へのエネルギー源の補給のため、神経細胞周辺の毛細血管内で、ヘモグロビンの脱酸素化反応により酸素が生成され、ブドウ糖と共に神経細胞に供給される、④脱酸素化反応の増加に伴い、血流増加が二次的に生じる、である。今回観察した血流は二次的応答であるために、数秒のタイムラグが存在している。本論文で計測した内因性シグナルよりも時間分解能が高い内因性シグナルイメージングとして、ヘモグロビンの脱酸素化反応の計測がある。この手法においてもヘモグロビンの吸光度特性を利用しているが、脱酸素化反応の場合には酸化型と還元型のヘモグロビンの吸光度特性が異なる波長を用いる。一般的には、波長 605 nm, 630 nm の光源を用いることで脱酸素化反応を計測する。しかし、生体実験においての問題点として、血流変化（心拍や流量変化）に伴う輝度変化が大きなノイズとなる。これを取り除きつつ観察を行う必要がある。そのため、赤色光のみの脳機能計測では不十分で、緑色光の光源も用いた脳機能計測が有効であると考えられる。2 色の光源をパルス上に交互に点灯させ、これに同調させたイメージセンサの駆動を行う。これにより、赤色光で観察された結果から、緑色光で観察された血流変化を取り除くことで、ヘモグロビンの脱酸素化反応のみを観察することが可能となる。

細胞レベルでの神経活動計測には、内因性シグナルは神経活動に比べて遅い

反応であるため適していない。実際の神経細胞の活動時間は速く、その時間はわずか約 1 ms と短い。これを可能にするために、電位感受性色素やカルシウム指示薬を利用した蛍光イメージングを取り入れる必要がある。今後は蛍光イメージングが可能な超小型埋植型脳機能イメージングデバイスの開発を目指していく。そのためには、デバイスに搭載する励起光除去フィルタの条件検討や CMOS イメージセンサの高感度化を行う必要がある。

さらに、電気生理学的手法と脳機能イメージングを組み合わせることで、高時間分解能かつ高空間分解能が実現可能になる。電気生理実験は時間分解能に優れているが、空間分解能が低い問題がある。これに対して脳機能イメージングでは、空間分解能が高い。しかし、脳機能イメージングは観察深度と深度に伴う空間分解能の低下という問題がある。これらの問題を解決する方法として、蛍光イメージングと電気生理実験を組み合わせたデバイスを提案する。細長い電極を用いることで電気生理手法によって深度計測と高時間分解能を実現し、脳機能イメージングと組み合わせることによって、三次元的に構築される神経ネットワークの解析が可能となる。このようなデバイスは動物頭部に埋植可能であり、自由行動実験下における三次元的脳機能計測にも期待できる。

参考文献

- [1] 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.
- [2] L. R. Hochberg, D. Bacher, B. Jarosiewicz, N. Y. Masse, J. D. Simeral, J. Vogel, S. Haddadin, J. Liu, S. S. Cash, P. van der Smagt, and J. P. Donoghue, “Reach and grasp by people with tetraplegia using a neurally controlled robotic arm,” *Nature*, vol. 485, no. 7398, pp. 372–5, May 2012.
- [3] K. L. Kroeker, “Improving brain-computer interfaces,” *Commun. ACM*, vol. 54, no. 10, p. 11, Oct. 2011.
- [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] 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.
- [7] 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.
- [8] D. H. O’Connor, D. Huber, and K. Svoboda, “Reverse engineering the mouse brain,” *Nature*, vol. 461, no. 7266, pp. 923–9, Oct. 2009.
- [9] 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.

- [10] 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.
- [11] 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.
- [12] 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.
- [13] J. P. Donoghue, “Connecting cortex to machines: recent advances in brain interfaces,” *Nat. Neurosci.*, vol. 5 Suppl, pp. 1085–8, Nov. 2002.
- [14] 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.
- [15] 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.
- [16] 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.
- [17] M. Tohmi, H. Kitaura, S. Komagata, M. Kudoh, and K. Shibuki, “Enduring critical period plasticity visualized by transcranial flavoprotein imaging in mouse primary visual cortex,” *J. Neurosci.*, vol. 26, no. 45, pp. 11775–85, Nov. 2006.

- [18] 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.
- [19] 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.
- [20] 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.
- [21] 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, 01AG02, Jan. 2010.
- [22] 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, 117001, Nov. 2010.
- [23] J. Ohta, T. Tokuda, K. Sasagawa, and T. Noda, “Implantable CMOS Biomedical Devices,” *Sensors (Basel)*, vol. 9, no. 11, pp. 9073–93, Jan. 2009.
- [24] 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.
- [25] 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.
- [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] 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.
- [28] 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.” バイオ・マイクロシステム研究会, 東京大学 本郷キャンパス, Mar. 2013.
- [29] J. Zhang, J. B. Ackman, H.-P. Xu, and M. C. Crair, “Visual map development depends on the temporal pattern of binocular activity in mice,” *Nat. Neurosci.*, vol. 15, no. 2, pp. 298–307, Feb. 2012.
- [30] 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.
- [31] F. Lauwers, F. Cassot, V. Lauwers-Cances, P. Puwanarajah, and H. Duvernoy, “Morphometry of the human cerebral cortex microcirculation: general characteristics and space-related profiles,” *Neuroimage*, vol. 39, no. 3, pp. 936–48, Mar. 2008.
- [32] G. C. Petzold and V. N. Murthy, “Role of astrocytes in neurovascular coupling,” *Neuron*, vol. 71, no. 5, pp. 782–97, Sep. 2011.
- [33] D. Attwell, A. M. Buchan, S. Charpak, M. Lauritzen, B. A. MacVicar, and E. a Newman, “Glial and neuronal control of brain blood flow,” *Nature*, vol. 468, no. 7321, pp. 232–43, Nov. 2010.
- [34] Oregon Medical Laser Center [<http://omlc.ogi.edu/>].

- [35] H. Ojima, M. Takayanagi, D. Potapov, and R. Homma, “Isofrequency 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.
- [36] 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.
- [37] J. G. Bjaalie, T. B. Leergaard, S. Lillehaug, F. Odeh, I. A. Moene, J. O. Kjode, and D. Darin, “Database and tools for analysis of topographic organization and map transformations in major projection systems of the brain,” *Neuroscience*, vol. 136, no. 3, pp. 681–95, Jan. 2005.
- [38] M. E. Diamond and E. Arabzadeh, “Whisker sensory system - from receptor to decision,” *Prog. Neurobiol.*, vol. 103, pp. 28–40, Apr. 2013.
- [39] R. S. Petersen and M. E. Diamond, “Spatial-temporal distribution of whisker-evoked activity in rat somatosensory cortex and the coding of stimulus location,” *J. Neurosci.*, vol. 20, no. 16, pp. 6135–43, Aug. 2000.
- [40] L. M. Palmer, J. M. Schulz, S. C. Murphy, D. Ledergerber, M. Murayama, and M. E. Larkum, “The cellular basis of GABA(B)-mediated interhemispheric inhibition,” *Science*, vol. 335, no. 6071, pp. 989–93, Feb. 2012.
- [41] D. Huber, D. a Gutnisky, S. Peron, D. H. O’Connor, J. S. Wiegert, L. Tian, T. G. Oertner, L. L. Looger, and K. Svoboda, “Multiple dynamic representations in the motor cortex during sensorimotor learning,” *Nature*, vol. 484, no. 7395, pp. 473–8, Apr. 2012.
- [42] M. B. Bouchard, B. R. Chen, S. a Burgess, and E. M. C. Hillman, “Ultra-fast multispectral optical imaging of cortical oxygenation, blood flow, and intracellular calcium dynamics,” *Opt. Express*, vol. 17, no. 18, pp. 15670–8, Aug. 2009.

- [43] E. T. Fonoff, J. F. Pereira Jr., 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.
- [44] 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.
- [45] A. Villringer, A. Them, U. Lindauer, K. Einhaupl, and U. Dirnagl, “Capillary perfusion of the rat brain cortex. An in vivo confocal microscopy study,” *Circ. Res.*, vol. 75, no. 1, pp. 55–62, Jul. 1994.
- [46] J. Nguyen, N. Nishimura, R. N. Fetcho, C. Iadecola, and C. B. Schaffer, “Occlusion of cortical ascending venules causes blood flow decreases, reversals in flow direction, and vessel dilation in upstream capillaries,” *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, vol. 31, no. 11, pp. 2243–54, Nov. 2011.
- [47] T. Deneux, S. Takerkart, A. Grinvald, G. S. Masson, and I. Vanzetta, “A processing work-flow for measuring erythrocytes velocity in extended vascular networks from wide field high-resolution optical imaging data,” *Neuroimage*, vol. 59, no. 3, pp. 2569–88, Feb. 2012.
- [48] J.-Y. Chang, L.-H. Shi, F. Luo, and D. J. Woodward, “High frequency stimulation of the subthalamic nucleus improves treadmill locomotion in unilateral 6-hydroxydopamine lesioned rats,” *Brain Res.*, vol. 983, no. 1–2, pp. 174–84, Sep. 2003.
- [49] F. Matyas, V. Sreenivasan, F. Marbach, C. Wacogne, B. Barsy, C. Mateo, R. Aronoff, and C. C. H. Petersen, “Motor control by sensory cortex,” *Science*, vol. 330, no. 6008, pp. 1240–3, Nov. 2010.
- [50] A. Grinvald and R. Hildesheim, “VSDI: a new era in functional imaging of cortical dynamics,” *Nat. Rev. Neurosci.*, vol. 5, no. 11, pp. 874–85, Nov. 2004.

- [51] C. C. H. Petersen, A. Grinvald, and B. Sakmann, “Spatiotemporal dynamics of sensory responses in layer 2/3 of rat barrel cortex measured in vivo by voltage-sensitive dye imaging combined with whole-cell voltage recordings and neuron reconstructions,” *J. Neurosci.*, vol. 23, no. 4, pp. 1298–309, Feb. 2003.
- [52] J. E. O’Doherty, M. a Lebedev, P. J. Ifft, K. Z. Zhuang, S. Shokur, H. Bleuler, and M. a L. Nicolelis, “Active tactile exploration using a brain-machine-brain interface,” *Nature*, vol. 479, no. 7372, pp. 228–31, Nov. 2011.
- [53] T. Matsuzawa, “Evolution of the brain and social behavior in chimpanzees,” *Curr. Opin. Neurobiol.*, vol. 23, no. 3, pp. 443–9, Jun. 2013.
- [54] 大沢 利昭, “サイトカイン —免疫応答および細胞の増殖・分化因子— 第3版,” 東京化学同人, 1992, ISBN: 4-8079-1318-2.
- [55] 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.

研究発表目録

発表論文

- 1) M.Haruta, C. Kitsumoto, Y. Sunaga, H. Takehara, T. Noda, K. Sasagawa, T. Tokuda, J. Ohta, "An implantable CMOS device for blood-flow imaging under freely moving experiments of rats," Jpn. J. Appl. Phys. accepted

国際会議における発表

- 1) M. Haruta, C. Kitsumoto, Y. Sunaga, H. Takehara, T. Noda, K. Sasagawa, T. Tokuda, J. Ohta, "Implantable device for intrinsic signals imaging in cortices of freely moving rats", NEUROSCIENCE 2013, Nov.13, 2013, Sandiego, USA (ポスター)
- 2) M. Haruta, C. Kitsumoto, Y. Sunaga, H. Takehara, T. Noda, K. Sasagawa, T. Tokuda, J. 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 (口頭)
- 3) M. Haruta, C. Kitsumoto, Y. Sunaga, H. Takehara, T. Noda, Kiyotaka S., T. Tokuda, J. 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
- 4) M. Haruta, T. Kobayashi, C. Kitsumoto, T. Noda, K. Sasagawa, T. Tokuda, J. Ohta, "An implantable CMOS-based device with hexagonal shape for wide-area brain functional imaging," NEUROSCIENCE 2012, Oct.14, 2012, New Orleans, USA (ポスター)
- 5) T. Kobayashi, M. Motoyama, H. Masuda, Y. Ohta, M. Haruta, T. Noda, K. Sasagawa, T. Tokuda, H. Tamura, Y. Ishikawa, S. Shiosaka, J. Ohta, "Fluorescence potentiometry using an implantable multiple imaging system to visualize the neural activities in both visual hemispheres of freely-moving mouse", Federation of European Neuroscience Societies, G11, Jul. 16, 2012, Barcelona, Spain (ポスター)
- 6) K. Sasagawa, M. Haruta, C. Kitsumoto, T. Kobayashi, T. Noda, T. Tokuda, J. Ohta, "An Implantable CMOS Sensor Device for Multi-Area Fluorescence Imaging of A Rat Brain," Neural Interface Conference, H-11, Jun. 18, 2012, Salt Lake City, USA (ポスター)

- 7) M. Haruta, T. Kobayashi, T. Noda, K. Sasagawa, T. Tokuda, J. Ohta, "Development of a CMOS-based implantable imaging device for wide-area brain imaging," (won the award for second-best poster), GIST/NAIST/NCTU joint symposium on advanced materials, Nov. 7, 2011, South Korea (ポスター)
- 8) M. Haruta, C. Kitsumoto, Y. Sunaga, H. Takehara, T. Noda, K. Sasagawa, T. Tokuda, J. Ohta, "Intrinsic Optical Signal Imaging Based on Blood Flow with a Biomedical Photonic LSI," Seventh International Conference on Molecular Electronics and Bioelectronics, D-O7, Mar. 19, 2013, Fukuoka, Japan (口頭)
- 9) M. Haruta, T. Kobayashi, C. Kitsumoto, T. Noda, K. Sasagawa, T. Tokuda, J. Ohta, "A CMOS-based implantable imaging device for wide-area brain functional imaging", 2012 International Conference on Solid State Devices and Materials, Sep.25, 2012, Kyoto, Japan, (口頭)
- 10) M. Haruta, T. Kobayashi, C. Kitsumoto, T. Noda, K. Sasagawa, T. Tokuda and J. Ohta. "Development of a CMOS-based implantable device for wide-area brain functional imaging," The 2012 International Meeting for Future of Electron Devices, Kansai, May 10, 2012, Osaka, Japan, (ポスター)

国内会議における発表

- 1) 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
- 2) 春田 牧人, 橋本 力, 須永 圭紀, 竹原 浩成, 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", 情報センシング研究会, 2013/5/31, 東京, (ポスター)
- 3) 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", 関西学生研究論文講演会, 2013/3/6, 和歌山, (ポスター)
- 4) 春田 牧人, 小林 琢磨, 橋本 力, 野田 俊彦, 笹川 清隆, 徳田 崇, 太田 淳, "生体内脳機能イメージング用 CMOS 広域計測デバイス", 応用物理学会学術講演会, 12a-H3-1, 2012/9/12, 愛媛, (口頭)

- 5) 春田 牧人, 小林 琢磨, 野田 俊彦, 笹川 清隆, 徳田 崇, 太田 淳, " 広範囲脳機能イメージング用埋植型 CMOS デバイスの開発", バイオ・マイクロシステム研究会, 2012/3/14, 東京, (口頭)
- 6) T. Kobayashi, M. Haruta, C. Kitsumoto, M. Motoyama, Y. Ohta, T. Noda, K. Sasagawa, T. Tokuda, Y. Ishikawa, S. Shiosaka, J. Ohta, "脳内埋植型センサによる、げっ歯類の視覚野、体性感覚野の広範囲脳機能蛍光イメージング", 日本神経科学大会, P4-e23, 2012/9/21, 名古屋, (ポスター)

その他 (受賞歴等)

- 1) 情報センシング研究会(2013年5月) 優秀ポスター発表賞受賞
- 2) GIST/NAIST/NCTU joint symposium on advanced materials(2011年11月) 準ポスター賞受賞

謝辞

本研究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において、太田淳教授の3年に亘る厳しくも温かい御指導の下で遂行されました。太田淳先生には主指導教員として、研究の方針や進め方、実験結果の考察から論文構成など、研究者として必要な技術や考え方を懇切丁寧に多岐にわたる御指導を頂きました。ここに深く感謝しています。

同研究科 微細素子科学研究室 冬木隆教授には、副指導教員として博士後期課程を通して、専門的な知識に基づく有益な御指導、御提言を頂きました。ここに深く感謝いたします。

同研究科 光情報分子科学研究室 河合壯教授には、スーパーバイザとして博士後期課程を通して、豊富な知識に基づく有益な御指導、御提言を頂きました。ここに深く感謝致します。

同研究室 徳田崇准教授には、研究の方針や進め方、実験結果の考察から論文構成、学会発表に関する御助言など、懇切丁寧に多岐にわたる御指導を頂きました。ここに深く感謝いたします。

同研究室 笹川清隆助教には、実験方針に対するアドバイスを頂くと同時に、豊富な知識と経験に基づき、実験方法から実験結果、考察に至るまで有益な御提言と熱心な御指導を賜り、日々有益な御議論を頂きました。ここに深く感謝致します。

同研究室 野田俊彦助教には、研究を進めるにあたり、プロセスや実験装置に関する豊富な知識と経験に基づき適確な御指導、御提言を頂きました。ここに深く感謝致します。

同研究室 研究員 太田安美博士、前澤安代博士、野田佳子氏、元山真由美氏にはデバイスの実装や生物実験について多くの御助言と御支援を頂きました。ここに深く感謝致します。

同研究室 秘書 松本和美氏には、研究活動に伴う諸手続き等において心強いサポートを賜りました。ここに深く感謝いたします。

同学 バイオサイエンス研究科 神経機能科学研究室 塩坂貞夫教授、田村英樹助教には、神経科学に関する豊富な知識に基づき、御指導、御提言を頂きました。また、博士後期課程進学に際しても御相談させていただきました。ここに深く感謝致します。

前橋工科大学 システム生体工学科 神経機能工学研究室 石川保幸准教授には、神経科学に関する豊富な知識に基づき、御指導、御提言を頂きました。脳機能計測実験において熱心なご指導を頂きました。ここに深く感謝いたします。

日本大学 歯学部 生理学教室 岩田幸一教授、本田訓也博士、海野俊平博士には、サルを用いた脳機能計測実験に関してひとからならぬお世話になりました。実験において電気生理実験の技術や指針について多くの御助言をいただきました。ここに深く感謝いたします。

近畿大学 東洋医学研究所 分子脳科学研究部門 小林琢磨助教には、実験方針や結果に対するアドバイスを頂き、本研究において厳しい指導を賜りました。また、同じ研究者を目指す先輩として多くのご相談をさせていただきました。ここに深く感謝いたします。

本研究ではラット、マウス、ニホンザルといった実験動物を使用してきました。研究の遂行に際しては、各研究機関の動物実験に関する指針に準拠し、動物の使用数を必要最低限に抑え、可能な限り苦痛を与えることがないよう細心の注意を払ってきました。本研究が実験動物の犠牲の上に成り立っており、この場を借りてこれら科学技術の進歩のために犠牲となった動物達の冥福をお祈りさせていただきます。

同研究室の皆様とは、同じ研究室で互いに助け合い、研究を行うことで良い刺激を受けると共に、多くのアドバイスと御議論の機会を頂き、実りある学生生活を送ることが出来ました。ここに深く感謝致します。

チップ試作は東京大学大規模集積システム設計教育研究センター(VDEC)を通し日本ケイデンス株式会社の協力の下で行われた。

最後に、大学院への進学に理解を示し、日々の研究活動を暖かく見守り、多大な支援を頂いた家族と片山茜氏に心から感謝します。