

論文内容の要旨

博士論文題目 CMOS-based optoelectronic neural interface devices for
optogenetics and fluorescence imaging

(CMOS 集積回路技術によるオプトジェネティクスおよび蛍光イメージング向け光電気神経インターフェースデバイス)

氏名 Yosmongkol Sawadsaringkarn

(論文内容の要旨)

本研究は、CMOS (Complementary Metal Oxide Semiconductor) 集積回路技術によるオプトジェネティクスおよび蛍光イメージング向け光電気神経インターフェースデバイスの提案とデバイス試作, 及びその基本特性実証に関するものである。オプトジェネティクスは、遺伝子工学を利用して神経細胞への光刺激を実現する技術である。オプトジェネティクス技術を利用することで、低侵襲で高い選択性の神経刺激を実現することができる。

まず第 1 章では、本論文の基礎技術であるオプトジェネティクスと蛍光色素について述べ、更に本論文の目的と構成について述べている。第 2 章では、光電気神経インターフェースデバイスの基本要素となる CMOS イメージセンサについて特にバイオメディカル応用の視点から基本となる要素技術を論じている。

第 3 章では、電極アレイ搭載 CMOS イメージセンサの設計について述べている。このセンサチップには通常の CMOS イメージセンサ回路に加えて、独立に動作可能な、発光ダイオード(LED)駆動および神経信号計測のための電極アレイを搭載している。本研究では、InGaN LED アレイを光刺激用光源として採用した。発光ピーク波長は 470 nm であり、オプトジェネティクスで利用される ChR2 の励起スペクトルと整合している。InGaN LED アレイは、フリップチップボンディング技術を用いて CMOS センサチップに接合した。LED を搭載していない電極上には、神経活動計測のための Au 積層バンプ電極を形成した。LED アレイおよび Au 電極の搭載の後、チップをプリント基板上に接合し、エポキシ樹脂で包埋した。さらに、*in vitro*(生体外での)機能実証のため、細胞培養ディッシュ構造を接合した。

第 4 章では、試作したデバイスの評価とその結果について述べている。照射光密度を評価するために、脳ファントムを用いた光分布評価を行った。2 mm 厚の脳ファントムをデバイス上に置いた場合の LED 直上部での光照射密度は 0.85 mW/mm² であり、

脳ファントムがない場合の 45%の大きさだった。これよりデバイス表面から 2mm 程度までの距離の神経細胞を刺激可能であることが分かった。次に, Au 積層バンプ電極の電解質中のインピーダンスを測定し, 1 kHz で 100 k Ω 程度であり, 1 mV/200 Hz の正弦波の液中計測に成功した。これらの結果から, 本研究で開発したデバイスが神経細胞活動の細胞外計測に利用できると結論する。マウス海馬スライスを撮像対象としてイメージング機能を確認した。撮像実験の結果, 脳スライスの概形の観察に成功した。この光学イメージング機能は, 計測対象の配置などを把握するのに有効な機能である。

第 5 章では試作デバイスの *in vitro* 評価について述べている。オプトジェネティクスで広く利用されている光感受性の膜タンパクである ChR2 を発現させたマウス神経芽細胞腫由来の培養細胞である Neuro2A 細胞を *in vitro* 神経様細胞刺激実験の対象として選択した。本研究では, 試作したデバイス上に ChR2 を発現した Neuro2A を培養することに成功し, 更にオンチップ LED による光刺激に成功した。

第 6 章では光刺激と蛍光計測を同時に行えるデュアルカラーフィルター形成について実験を行い, オンチップフィルター形成を行い, Hoechst と RH795 の 2 種類の蛍光色素で染色した海馬スライスをチップ上に載せ, そこからの各々の蛍光の検出に成功した。最後の第 7 章では論文のまとめと今後の展望についてまとめている。

以上のように, 本研究では CMOS 集積回路技術による光電気神経刺激計測デバイスの可能性を広げることに成功した。本研究で得られた知見により, 神経科学への貢献だけでなく神経補綴デバイス等臨床応用にも発展が期待出来る。

氏名	Yosmongkol Sawadsaringkarn
----	-------------------------------

(論文審査結果の要旨)

本研究は、CMOS (Complementary Metal Oxide Semiconductor) 集積回路技術によるオプトジェネティクスおよび蛍光イメージング向け光電気神経インターフェースデバイスの提案とデバイス試作、及びその基本特性実証に関するものである。オプトジェネティクスは、遺伝子工学を利用して神経細胞への光刺激を実現する技術である。オプトジェネティクス技術を利用することで、低侵襲で高い選択性の神経刺激を実現することができる。

まず、光電気神経インターフェースデバイスの基本要素となる電極アレイ搭載 CMOS イメージセンサを設計した。このチップには通常の CMOS イメージセンサ回路に加えて、独立に動作可能な、発光ダイオード(LED)駆動および神経信号計測のための電極アレイを搭載した。本研究では、InGaN LED アレイを光刺激光源として採用した。発光ピーク波長は 470 nm であり、オプトジェネティクスで利用される ChR2 の励起スペクトルと整合している。InGaN LED アレイは、フリップチップボンディング技術を用いて CMOS センサチップに接合した。LED を搭載していない電極上には、神経活動計測のための Au 積層バンプ電極を形成した。LED アレイおよび Au 電極の搭載の後、チップをプリント基板上に接合し、エポキシ樹脂で包埋した。さらに、*in vitro*(生体外での)機能実証のため、細胞培養ディッシュ構造を接合した。

試作したデバイスの評価とその結果は以下のものである。照射光密度を評価するために、脳ファントムを用いた光分布評価を行った。2 mm 厚の脳ファントムをデバイス上に置いた場合の LED 直上部での光照射密度は 0.85 mW/mm^2 であり、脳ファントムがない場合の 45%の大きさだった。これよりデバイス表面から 2mm 程度までの距離の神経細胞を刺激可能であることが分かった。次に、Au 積層バンプ電極の電解質中のインピーダンスを測定し、1 kHz で $100 \text{ k}\Omega$ 程度であり、 $1 \text{ mV}/200 \text{ Hz}$ の正弦波の液中計測に成功した。これらの結果から、本研究で開発したデバイスが神経細胞活動の細胞外計測に利用できると結論する。マウス海馬スライス撮像対象としてイメージング機能を確認した。撮像実験の結果、脳スライスの概形の観察に成功した。この光学イメージング機能は、計測対象の配置などを把握するのに有効な機能である。オプトジェネティクスで広く利用されている光感受性の膜タンパクである ChR2 を発現させたマウス神経芽細胞腫由来の培養細胞である Neuro2A 細胞を *in vitro* 神経様細胞刺激実験の対象として選択した。本研究では、試作したデバイス上に ChR2 を発現した Neuro2A を培養することに成功し、更にオンチップ LED による光刺激に成功した。

更に光刺激と蛍光計測を同時に行えるデュアルカラーフィルター形成について実験を行い、オンチップフィルター形成を行い、Hoechst と RH795 の 2 種類の蛍光色素で染色した海馬スライスをチップ上に載せ、そこからの各々の蛍光の検出に成功した。

以上のように、CMOS 集積回路技術による光電気神経刺激計測デバイスのオプトジェネティクス分野への応用に成功した。本研究で得られた知見により、神経科学への貢献だけでなく神経補綴デバイス等臨床応用にも発展が期待出来る。その成果は、学術的に新しい知見を見出していると判断され、審査委員一同は、本論文が博士(工学)の学位論文として価値あるものと認めた。