

Takashi Sato, Takafumi Suzuki, Kunihiro Mabuchi	A new multi-electrode array design for chronic neural recording, with independent and automatic hydraulic positioning	Journal of Neuroscience Methods	160	45-51	2007
鈴木隆文, 小竹直樹, 満洲邦彦, 竹内昌治	束状微小流路を利用した神経再生型電極の開発	電気学会論文誌C	127(10)	1544-1548	2007
Takafumi Suzuki, Naoki Kotake, Kunihiro Mabuchi, Shoji Takeuchi	Bundled Microfluidic Channels for Nerve Regeneration Electrodes	Proc of the 3rd International IEEE EMBS Conference on Neural Engineering		17-18	2007
Takafumi Suzuki, Naoki Kotake, Kunihiro Mabuchi, Shoji Takeuchi	Nobel Flexible regeneration-type nerve electrode with integrated micro fluidic channels	Proceeding of International Conference on Microtechnologies in Medicine and Biology		303-305	2006
Yasuhiro Kato, Miharuru Nishino, Itsuro Saito, Takafumi Suzuki, Kunihiro Mabuchi	Flexible Intracortical Neural Probe with Biodegradable Polymer for Delivering Bioactive Components	Proceeding of International Conference on Microtechnologies in Medicine and Biology		143-146	2006
加藤康広, 鈴木隆文, 満洲邦彦	生分解性ポリマーを用いた薬剤徐放型柔軟神経プローブの開発	電気学会研究会資料 医用・生体工学研究会	MBE-06	85-90	2006
Yasuhiro Kato, Takafumi Suzuki, Kunihiro Mabuchi	Development of mesh-structure multichannel flexible neural probe	Proceedings of the 19th International Microprocesses and Nanotechnology Conference		370-371	2006
Yasuhiro Kato, Itsuro Saito, Takayuki Hoshino, Takafumi Suzuki, Kunihiro Mabuchi	Preliminary Study of Multichannel Flexible Neural Probes Coated with Hybrid Biodegradable Polymer	Proceedings of the 28th IEEE EMBS Annual International Conference		660-663	2006

鈴木隆文, 小竹直樹, 満洲邦彦, 竹内昌治	微小流路を利用した神経再生型電極の開発	第21回生体・生理工学シンポジウム論文集		155-158	2006
加藤康広, 西野美晴, 鈴木隆文, 満洲邦彦	生分解性ポリマーによるドラッグデリバリーシステムを用いた薬剤徐放型神経インタフェースの試作	第20回生体・生理工学シンポジウム論文集		17-18	2005

束状微小流路を利用した神経再生型電極の開発

正員 鈴木 隆文* 非会員 小竹 直樹**
非会員 満洲 邦彦* 非会員 竹内 昌治***

Regeneration-Type Nerve Electrode Using Bundled Microfluidic Channels

Takafumi Suzuki*, Member, Naoki Kotake**, Non-member,
Kunihiko Mabuchi*, Non-member, Shoji Takeuchi***, Non-member

Neural interface devices that will allow signals from the human nervous system to control external equipment are extremely important for the next generation of prosthetic systems. A novel multichannel regeneration-type nerve electrode designed to record from and stimulate peripheral nerves has been developed to allow the control of artificial hands and to generate artificial sensations. In this study a novel flexible regeneration microelectrode based on the nerve regeneration principle was designed and fabricated using MEMS technologies. The electrode, which was fabricated on a 25- μm -thick Parylene C substrate, has multiple fluidic channels. Each fluidic channel was 100 μm wide \times 30 μm high \times 1500 μm long and featured multiple electrodes inside them as recording and stimulating sites. They also served as guidance channels for the regenerating axons.

キーワード：神経再生型電極，ブレインマシンインタフェース，神経インタフェース，神経電極，末梢神経

Keywords：nerve regeneration electrode, brain-machine interface, neural interface, neural electrode, peripheral nervous system

1. 緒言

(1.1) 神経インタフェースデバイス 近年，生体の神経系と直接の情報入出力を行う神経インタフェースデバイスの開発が国内外で活発に行われている。神経系に対する多チャンネルかつ長期間安定した信号入出力が可能となれば，運動指令信号による義手などの補綴機器の制御や，自律神経系の情報を利用した人工臓器制御，あるいは逆に外部から感覚信号を入力することによる人工触覚等の人工感覚生成などが実現できるものと期待されている。

神経系と情報の入出力を行う箇所としては，中枢神経系と末梢神経系が考えられる。中枢神経系，特に脳を対象とする場合，埋め込み型のデバイスは頭蓋骨の中に位置するため，運動等の影響をうけにくく，比較的安定した信号入

出力が期待できる半面，万が一の感染等の事故の場合には，影響が重篤となる可能性を有する。一方，末梢神経系を対象とする場合には，事故の影響が限局的になり得る上，計測した神経信号の解釈に関しても，より効果器や受容器に近い位置であるために中枢神経系の場合よりも容易であることが期待できる。また，中枢神経系と直接の情報入出力を行うことによって未知の影響が起こるかどうかという問題も回避できることも利点である。その一方で，埋め込み箇所と筋肉とが隣接するため運動の影響を受け易く，埋め込んだデバイスを神経組織へとずれることなく長期間安定して固定することが大きな課題となる。このような末梢神経系を対象とする埋め込み型の神経インタフェースデバイスとして，末梢神経の再生能力を利用した神経再生型電極が提案され開発が進められてきた⁽¹⁾⁽²⁾。後述するように，原理的に「ずれ」を防ぐことが可能であることから，末梢神経系を対象とするデバイスとして大きく期待されているものである。

(1.2) 神経再生型電極 神経再生型電極の原理，特長について説明する。末梢神経系を構成する神経細胞の軸索（神経線維）を切断すると，細胞体から見て切断箇所より遠位側の部分ではシュワン細胞を残して軸索が変性（Waller 変性）していくが，近位側では切断箇所（の1～数个近位側のランビエ絞輪）から先へと軸索を再生させていく。その際に再生軸索が遠位側の断端の方に誘導されるこ

* 東京大学大学院情報理工学系研究科システム情報学専攻
〒113-8656 東京都文京区本郷 7-3-1

Department of Information Physics and Computing,
Graduate School of Information Science and Technology,
7-3-1, Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8656

** 東京大学大学院工学系研究科先端学際工学専攻
〒153-8904 東京都目黒区駒場 4-6-1

Department of Advanced Interdisciplinary Studies
Graduate School of Engineering, The University of Tokyo
4-6-1, Komaba, Meguro-ku, Tokyo 153-8904

*** 東京大学生産技術研究所

マイクロメカトロニクス国際研究センター
〒153-8904 東京都目黒区駒場 4-6-1

Institute of Industrial Science, The University of Tokyo
4-6-1, Komaba, Meguro-ku, Tokyo 153-8904

とが知られている。

そこで神経束を切断して、断端間に多数の小孔を備えた電極を置いて再生を待つと、電極上の小孔を通して軸索が再生する (Fig. 1)。各小孔はそれぞれ独立した電極として機能させる。以上が神経再生型電極の原理である。神経再生型電極は原理的に以下のような特徴を有している。

- ① 再生軸索が電極孔を通過しているため、電極と神経束が物理的、電気的にしっかりと固定される。このため、長期間の安定した計測、刺激が可能である。(針型の電極のようにずれることが無い。)
- ② 小孔の径を調整することによって1~数本の神経線維に対する計測、刺激が実現する可能性を有する。
- ③ 従来の金属電極、ガラス管電極では困難な多チャンネル入出力が可能になる。

こうした神経再生型電極の研究は従来、主にシリコンを基板材料として開発が行われてきたが、近年、ポリイミド等の高分子材料も利用されるようになってきた。しかしながら、いずれの電極も、Fig. 1に示されるような平面構造のものであり、一つの平面状の基板の上に、電極孔と配線とが配列されていた。このため、電極孔を通過した各神経線維と電極とは一点でのみ接することになり、有髄の神経線

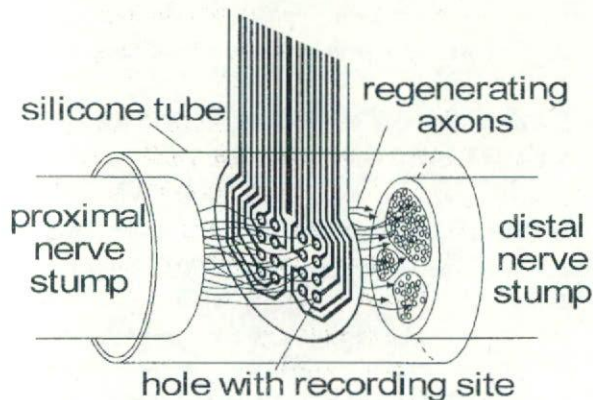


Fig. 1. Schematic of the regeneration-type nerve electrode (conventional model).

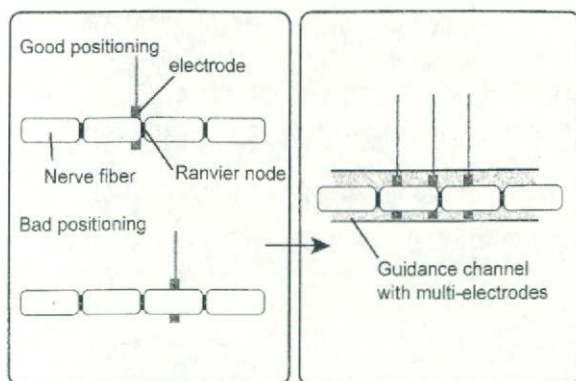


Fig. 2. Distance between the recording sites and the Ranvier node of a single nerve fiber.

維の場合には、ランビエ絞輪と電極孔との位置関係によっては、SN比の悪化が避けられないと考えられる (Fig. 2 左)。また、電極孔の中に複数の再生軸索が通過した際に、それらの信号を弁別するための手がかりも少ない。

〈1・3〉 本研究の目的 こうした問題を解決するため、本研究では微小流路を束ねた形状の三次元構造を有する神経再生型電極を新しく提案し、主に作成の可能性について検証することを目的とする。著者らはこれまでに、ポリイミドやパリレンC (ポリクロロパラキシリレン) などの高分子材料を利用して、柔軟型神経電極や、流路を備えた柔軟神経電極を開発してきたが^{(3)~(5)}、本研究で提案する新しい神経再生型電極はこれらの技術を応用したものである。

次節以降で、この電極の概念、設計、作成方法、および基礎的な評価について報告する。

2. 電極アレイ製作

〈2・1〉 概念 本研究で提案する神経再生型電極の概念図を Fig. 3 に示す。フィルム基板の上に流路を並べ、それを巻くことで流路の束を形成する。軸索はこの流路の中を再生していくようにする。巻く際には流路外のすきまを接着剤で埋めるようにして、軸索が流路の外を再生しないようにする。各流路の内部には電極を複数個並べる。これによって、ランビエ絞輪に近く SN 比の良い電極を選択して使用することが可能となる (Fig. 2 右)。また、流路内に複数の再生軸索が通過した際には、複数の電極から計測された信号によって弁別することも容易になると推測される。さらに流路構造自体が、細胞外計測における神経スパイクの高さの減衰を抑えることも期待できる。

また、電極を巻き上げていく際の最後の1周分については、流路長よりも電極基板の幅が大きくなるようにしておくことによって、従来型の神経再生型電極におけるシリコンチューブ (Fig. 1) のように神経束との接続に使用することができる。さらに、神経束との接続時に手術針と糸を通すための穴もあらかじめあけておく。

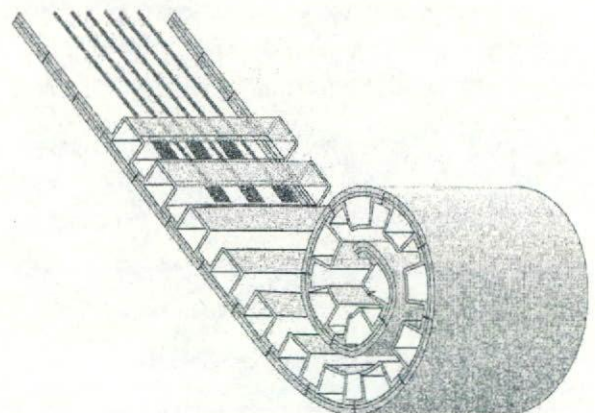


Fig. 3. Schematic of the new regeneration-type nerve electrode integrated with multiple guidance channels.

〈2・2〉 設 計 今回の試作においては、体重 300 g 程度のラットの坐骨神経（直径約 1.5 mm）を埋め込み対象として想定し、電極全体の筒の径は 1.6 mm、流路の神経線維方向の長さは 1.5 mm、流路内寸は幅 100 μm 、高さ 30 μm 、隣接する流路間の間隔は 100 μm 、パリレン C による電極基板の厚さは、Fig. 4 の最下層が 10 μm 、配線の絶縁層が 5 μm 、最上層が 10 μm 、で合計 25 μm とした。上述した神経束との接続用のチューブの役割を果たす部分の長さについては、両側それぞれ 1.5 mm として、電極全体の筒の長さは 4.5 mm とした。配線部および電極部の材料としては金を使用し、厚さは約 300 μm とした。配線の幅は 30~60 μm で、電極部の金属が流路内で露出する窓の形状は 20 \times 50 μm の長方形とした。流路間隔は 100 μm で、流路数は 98 本とした。プローブ上の電極の一部（3 個~11 個）をコネクタとの接続部まで配線した。各寸法の決定理由や検討事項等に関しては考察の項にて詳述する。

〈2・3〉 作成方法 本電極の作成方法を Fig. 4 に示す。作成はシリコンウェハ上で行う。

- ① （作成中の土台として使用する）シリコンウェハ上にパリレン C を 10 μm コーティングして、この上に金を約 300 nm 蒸着し、パターニングを行い、幅 30~60 μm の配線及び電極部を作成する。
- ② 第二層のパリレン C を 5 μm コーティングし、電極部とコネクタ部が露出するように、アルミマスクを使用した酸素プラズマエッチングにより、電極用の窓

あけを行なう。

- ③ 厚膜レジスト（本研究では、THB-611P または SUNFORT AQ-4059 ドライフィルムレジストを選択して使用）をコーティングして、パターニングを行う。これは流路を形成するための犠牲層となる。
- ④ さらに、第三層のパリレン C を 10 μm コートした上で、外形の切り出しと流路の出口やコネクタ部等の露出のためにを行う。（Fig.4-1）
- ⑤ 電極をシリコンウェハから剥離しながら、あるいは一度全て剥離してから巻いていく。直径約 120 μm 、長さ約 5 cm のタングステンワイヤの中央付近を、電極の先端にシアノアクリレート系接着剤（アロンアルファ、東亜合成株式会社）で接着して、それを芯として巻く。その際、エポキシ系接着剤（エクセルエポ、セメダイン株式会社）を間に入れて、巻いた部分が開かぬよう固定する。（Fig.4-3）
- ⑥ 巻き終わった後で電極をアセトンに浸漬（1~24 時間）し、厚膜レジストを除去すると共に、芯として使用したタングステンワイヤを抜き取る。

以上の作成方法は、巻くことを除いては、基本的に著者等による流路を備えた柔軟神経電極⁵⁾の作成方法と同様のもののであるが、今回は、厚膜レジストに関しては、比較検討のため、フィルムレジスト型の SUNFORT AQ-4059 と通常型のレジスト（THB-611P）の 2 種類のレジストを使用した。

3. 結 果

〈3・1〉 試作結果 作成した電極の写真を Fig. 5 に示す。作成の各段階での経過が示されている。Fig. 5A と Fig. 5C に示されるように、巻き終わりの 1 周分については、神経束との接続用に、流路長よりも電極基板の幅が大きくなるようにした。各流路のサイズは、幅 100 μm 、高さ 30 μm 、長さ 1500 μm である。Fig. 5B に示されるように、電極先端には、タングステンワイヤを接着するための糊しろ部を用意すると共に、巻きはじめが容易になることを期待してあらかじめ角を落とした形状とした。コネクタとの接続部まで配線した 5 個の電極の電極インピーダンスを計測した結果、平均値は 376 k Ω （1 kHz）であった。

4. 考 察

〈4・1〉 作成に関して 試作結果から、提案した形状の立体型の神経再生型電極を、本作成方法で実現できることが示された。厚膜レジストに関して 2 種類のを比較検討したが、フィルムレジスト型の SUNFORT AQ-4059 は、巻いた後の流路から除去されずに残留してしまうケースが多くみられたために、通常型のレジスト（THB-611P）の方が今回の電極の作成には適していると考えられる。

また、厚膜レジストのコーティング厚を（スピニング速度調整等により）調整することで、流路の高さを変えることができる。これについては、今後 *in vitro* や *in vivo* の評価実験において必要に応じて適切なサイズな流路を作

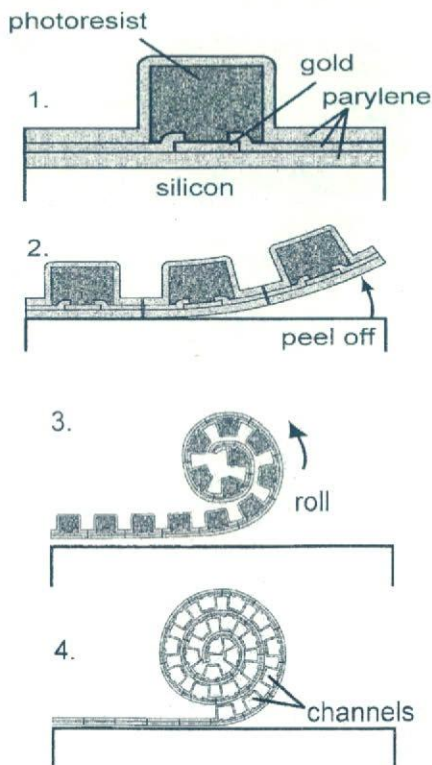


Fig. 4. Fabrication process. The photoresist was removed after rolling the fluidic channel area.

成する際に役立つと考えられる。

作成方法の⑥で示したように、巻くための芯として使用したタングステンワイヤを抜いたあとの穴が残ってしまった。これは流路の外であるので、流路以外の場所での軸索再生を避けたい場合には、穴を接着剤などで埋めるための作業が必要となる。周囲の流路を誤って塞がぬための注意が必要ではあるが、実現可能な作業だとは考えられる。しかしながら、より効率のよい巻き上げ方法の工夫と併せ、今後の検討が必要である。

〈4・2〉 設計に関して 今回の試作においては、対象として想定した体重約 300 g のウィスターラットの坐骨神経(直径約 1.5 mm)に合わせて電極の全体の筒の径を 1.6 mm としたが、径の余裕としてどれぐらいが適切であるかは、今後の埋め込み評価実験での検討事項の一つである。また、流路の神経線維方向の長さは、本試作においては主に電極配置上の都合から仮に 1.5 mm としたが、これは、長ければ長いほど、各流路についても、また配線の都合から全流路についてもより多数の電極を配置でき、また流路間での絶縁性も高くなると考えられる一方で、軸索の再生はより困難になると考えられるため、適切な寸法の決定には、軸索再生の評価を含めたさらなる検討が必要である。流路内寸(幅と高さ)については、各流路に再生させる軸索の本数と、個々の再生軸索の径から検討する必要があるが、軸索の再生過程の初期においては個々の軸索の径は細く、それが次第に太くなると考えられているため、適切な開口部の寸法決定にはやはり埋め込み実験による軸索再生の評価が必要である。流路の高さは、使用する厚膜レジストで実現できることが条件となるが、流路内部での再生軸索と電極との距離も、流路の高さ次第で大きくなるため、流路内での神経スパイクの振幅の減衰も含めた検討が必要となる。今回の試作においては、健常なラットの運動神経が複数本再生することを想定して、幅 100 μm 、高さ 30 μm とした上で、隣接する流路間の間隔は仮に 100 μm とした。パリレン C の厚さに関しては、著者らの先行研究における値を参考にして決定したが、これらは流路間隔と併せて電極全体の耐久性と柔軟性を決めるものであるため、長期の埋め込み評価実験により検討する必要がある。

流路の高さ、幅、間隔、そしてパリレン C の各層の厚さ、そして電極全体の筒の径は、電極内に配置可能な流路の最大本数を決定する。仮に今回試作した直径 1.6 mm の筒の中に、流路間隔を 20 μm としして流路を最大数詰め込むとすると、概算としては筒全体の断面積 ($0.8 \times 0.8 \times \pi [\text{mm}^2]$) を、各流路の外形に、巻き上げ時に仮に三角形になったとする流路間隙も含めた面積 ($(30+10+10) \times (100+10+10+10) [\mu\text{m}^2]$) で除して、309 本となる。流路の内側の断面積の総和と筒全体の断面積との比を開孔率と呼ぶこととすると、その値は上記の条件では 0.46 となる。この値はパリレン C の各層の厚さと流路間隔距離によって決まるものであるが、流路の軸索方向の長さや併せて神経束全体の再生の成功率に影響すると考えられる。本電極では従来型の神経再生型電極に

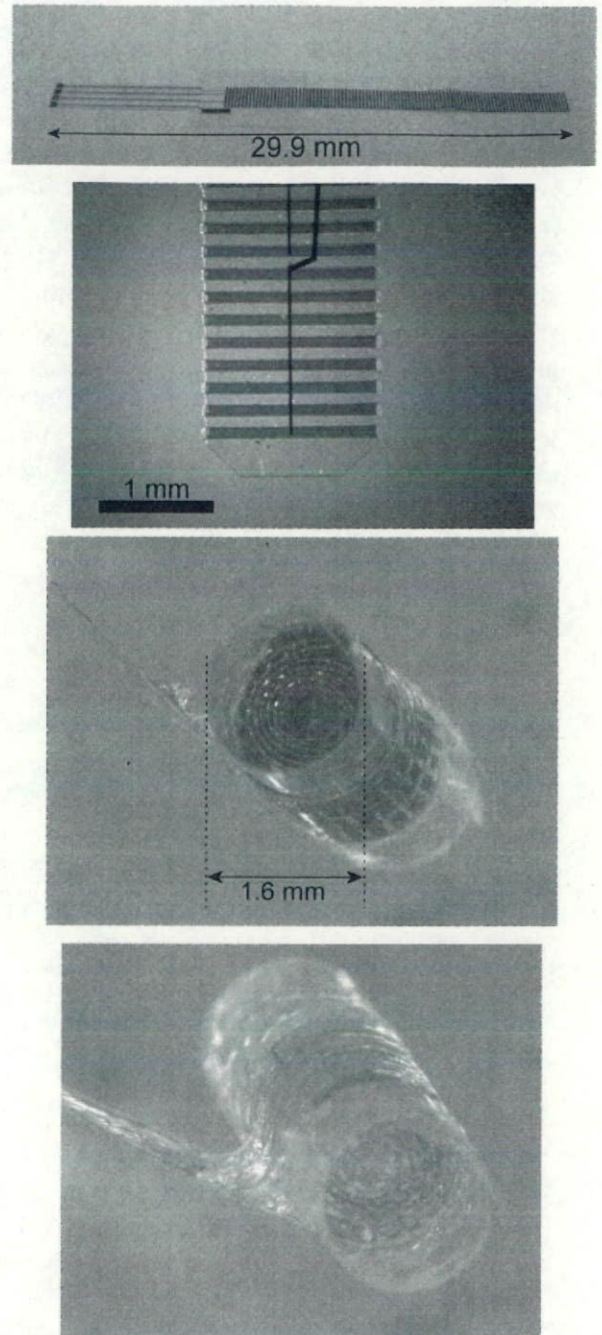


Fig. 5. Photo of the fabricated probe. (A) Overview of the probe before rolling. The whole length of the probe is 29.9 mm. (B) Tip of the probe. Each fluidic channel is W100 μm \times H30 μm \times L1500 μm (C) After rolling, but before removing the photoresist. (D) After removing the photoresist.

比べて、特に流路の長さが再生の阻害要因となることが懸念されるが、これについては流路内壁のコーティング材料や、流路内部に充填する物質の工夫と併せて検討が必要である。

流路の最大数や開孔率に関しては、実際には巻き上げる際にいかに「きつく」(各層を密着させて)巻けるか、そし

て上述の作成プロセス⑥にあるように巻くための芯を使用するかどうかによっても影響を受けるが、いずれにしても、電極の設計方針に従って調節可能である。つまり、より多くの流路を用意して各流路を通過する軸索の本数を少なくして信号の弁別精度を向上させたいとか、あるいは軸索再生の成功率を向上させるために開孔率を重視したいなどの方針に従って調節することが可能である。

神経束との接続用のチューブの役割を果たす部分の長さについては、本試作においては両側それぞれ 1.5 mm としたが、これについても埋め込み時の操作性、固定の確実性、さらに神経再生に与える影響などの観点から、埋め込み実験による評価と検討が必要と考えられる。

本試作においては少数の電極のみを、コネクタとの接続部まで配線したが、より多数の電極をコネクタに配線するためには、この接続部の微小化についても検討する必要がある。

(4-3) 電極インピーダンスについて 今回作成した電極は、金の層がパリエレン C の基板に挟まれ、その開口部が電極として機能するという点で、著者らによる先行研究(3~5)と構造的には同じものである。巻き上げていく過程で、金の配線層に負担が掛かり破損する可能性が考えられるが、先行研究(4)においては電極の配線部分を直角に曲げても電極インピーダンスへの影響が小さかったことが示されている。本研究においても巻き上げたあとの計測結果は、先行研究の結果とほぼ同等な値であるため、巻き上げのプロセスは電極や配線を破損していないと考えられる。

(4-4) 今後の展開と課題 提案する電極の末梢側には、従来型の神経再生型電極と同様に切断した神経束の遠位端を置くことを想定しているが、さらに各流路へと外部から薬液を注入可能な機能を付与することにより、NGF(神経成長因子)などの再生を促進する物質を各流路内に注入して、神経束の遠位端の留置が不要になるとも考えられる。

神経再生型電極は、デバイスを再生軸索が通過してはじめて機能するものであるため、早急に神経再生に関する評価実験を行なう必要がある。現在、ラット坐骨神経を対象とした埋め込み評価実験を行い、神経再生型電極としての有効性を検証中である。

5. 結 語

末梢神経系と長期間安定した信号入出力を実現することを目指して、従来の平面型の神経再生型電極の問題点を克服するために、流路を束ねた構造を有する新しい神経再生型電極を提案した。提案した形状がパリエレンと厚膜レジストの犠牲層を利用した作成方法で実現可能であることを試作によって実証し、電極の設計指針などに関する考察を加えた。

謝 辞

本研究において、マスクの作成は、東京大学大規模集積システム設計教育研究センター(VDEC)の設備を使用した。また、本研究の一部は、厚生労働省科学研究費補助金(H17-

ナノ-010)、および文部科学省科学研究費補助金(基盤研究(A)課題番号 17206022)によって行われた。ここに記して謝意を表します。

(平成 19 年 2 月 27 日受付, 平成 19 年 7 月 17 日再受付)

文 献

- (1) A. Mannard, R. B. Stein, and D. Charles: "Regeneration electrode units: Implants for recording from single peripheral nerve fibers in freely moving animals", *Science*, Vol.183, pp.547-549 (1974)
- (2) G. T. A. Kovacs, C. W. Stormont, and J. M. Rosen: "Regeneration Microelectrode Array for Peripheral Nerve Recording and Stimulation", *IEEE Trans. BME*, Vol.39, pp.893-902 (1992)
- (3) T. Suzuki, K. Mabuchi, and S. Takeuchi: "A 3D flexible parylene probe array for multichannel neural recording", *Proc. of 1st international IEEE EMBS Conference on Neural Engineering*, pp.154-156 (2003)
- (4) S. Takeuchi, T. Suzuki, K. Mabuchi, and H. Fujita: "3D flexible multichannel neural probe array", *Journal of Micromechanics and Microengineering*, Vol.14, No.1, pp.104-107 (2004)
- (5) S. Takeuchi, D. Ziegler, Y. Yoshida, K. Mabuchi, and T. Suzuki: "Parylene flexible neural probe with micro fluidic channel", *Lab on a Chip*, Vol.5, pp.519-523 (2005)

鈴木 隆 文



(正員) 1970 年生。1995 年東京大学大学院工学系研究科計数工学専攻修士課程修了。1998 年同研究科先端学際工学専攻博士課程修了。同年東京大学国際・産学共同研究センター助手。2002 年東京大学大学院情報理工学系研究科特任講師。2007 年同研究科講師。博士(工学)。神経工学、生体工学に関する研究に従事。日本生体医工学会、IEEE などの会員。

小 竹 直 樹



(非会員) 1980 年生。2003 年 3 月鹿屋体育大学体育スポーツ課程卒業。2005 年 3 月鹿屋体育大学大学院体育学研究科修士課程修了。現在、東京大学大学院工学系研究科先端学際工学専攻博士課程在学中。神経インタフェースに関する研究に従事。

満 洲 邦 彦



(非会員) 1951 年生。1976 年東京大学医学部医学科卒業。1978 年東京大学工学部計数工学科卒業。1986 年東京大学医学系大学院博士課程修了。1996 年東京大学国際・産学共同研究センター教授。2002 年東京大学大学院情報理工学系研究科教授。医学博士。医用生体工学、人工臓器、神経インタフェースの研究に従事。日本生体医工学会、日本人工臓器学会、IEEE などの会員。

竹 内 昌 治



(非会員) 1972 年生。2000 年 3 月東京大学大学院工学系研究科機械情報工学専攻博士課程修了。2001 年東京大学生産技術研究所講師。2003 年より助教授。博士(工学)。神経インタフェース、生体分子を用いた MEMS デバイスに関する研究に従事。日本生体医工学会、IEEE などの会員。

神経プローブ研究の現状と未来

鈴木 隆文* (東京大学)

Neural probes - Present status and future prospects -
Takafumi Suzuki (The University of Tokyo)

1. 緒言

Brain-Machine Interface (BMI) 技術の発展とともに、その基盤技術としての神経プローブ研究にも注目が集まっている。実際、近年のBMI技術の発展の大きなきっかけとなっているのは、神経プローブを含めた神経信号計測技術と信号処理技術の進歩であるし、また逆に、臨床応用を考える場合にボトルネックとなっているのも神経プローブ技術であると考えられる。神経プローブ研究は、電気生理学の歴史と同じだけの長い歴史を有しているが、特にBMIシステムに用いられる細胞外計測法に関しては、原理自体には大きな進歩はなく、微細化を中心とした作成技術を中心に進歩が重ねられてきた。しかしながらここ数年は、微細化以外の観点からの開発研究も行われるようになってきている。本発表では、神経プローブの現状を、課題を挙げつつ概観し、将来に向けた取り組み等について紹介する。そしてその一例として、著者らのグループで開発を進めている主に末梢神経系を対象とした立体構造の神経再生型電極についても簡潔に紹介する。

2. 神経プローブ研究

<2・1>理想的なBMI用神経プローブ

神経プローブは、BMI研究だけでなく、神経生理学、循環生理学を含めた生理学の各分野においても重要なツールであるが、本稿では、BMIのために用いられる神経プローブを想定して議論する。求められる性能の多くは他の応用例においても共通であるが、最終的にヒトに対して、長期間安定した安全な信号入出力が求められるため、主に動物を対象として急性あるいは短期間の実験が行なわれる生理学の実験とは、いくつかの点では大きく異なる。(例えばBMI研究において現状では細胞外計測のみが行われる。)

求められる性能をまとめると下記ようになる。

- 1) 個々の神経細胞または神経線維に対して独立した計測や刺激が可能であること。(ここは症例や戦略によって議論が必要な部分である。複数の細胞からの信号が混ざったものを計測したあとで分離する方法も採れるし、混ざった信号のままでも利用可能なケースもある。)
- 2) 長期間安定して(症例によっては数十年間)に亘って、安定して計測や刺激が可能であること。(対象の神経細胞からずれないこと、あるいはずれたあとで位置調節が可能であること。さらに結合組織等によるSN比の低下が起こらな

いことも含む。)

3) 何より安全であること。(ケーブルを通じた感染を防ぐためには無線化が望ましい。またプローブ自体による神経組織へのダメージも防ぎたい。無線化のための回路による発熱の影響についても注意が必要である。)

4) 多チャンネルの計測や刺激が可能であること。(必要なチャンネル数は、操作対象の機器の自由度、あるいは感覚生成の場合には、生成感覚の時空間的解像度等から決まる。例えば多自由度の義手を自由に操作したい場合には、Wessbergらの研究⁽¹⁾によると1自由度あたり数十個~百個程度の第一次運動野の神経細胞の信号が利用できれば、ある程度安定した制御が可能であることが示唆されている。より上位の部位の信号であれば、チャンネル数はより少なくてもすむ可能性もある。また義手の動きをいくつかの動作に限定するなどの工夫も考えられる。)

以上の条件を兼ね備えた神経プローブが理想的であると考えられるが、以下に、現状と課題について述べる。

<2・2>従来型の神経プローブとMEMS神経プローブ⁽²⁾

神経生理学の分野では従来、微細なガラス管や金属線を利用した手作りの神経プローブが使用されてきた。MEMS技術により様々な神経プローブが開発されるようになってきた昨今においても、こうした従来型のプローブは一定の優位性と根強い需要があり、例えば動物を用いたBMI研究の多くは、こうした従来型のプローブで行われているのが現状である。その理由としては、入手の容易さの問題、チャンネル数の問題(MEMS技術により電極自体のチャンネル数を増やすことは容易となったが、配線や計測系の多チャンネル化が困難であるため、結局従来型のプローブのチャンネル数が十分ということになる)、頑強性の問題(現状のMEMSプローブは、従来型のプローブに比べると、まだ脆いものが多い)、位置調節の問題が挙げられる。

MEMS電極の代表的な例として、ここでは、ミシガン大学のWiseらによるシリコンプローブ電極とユタ大学のNormannらによる剣山型電極の2つを紹介する。

Wiseらは1980年代からシリコンプロセスを利用して作成した神経プローブを開発し報告している⁽³⁾。フォーク状のプローブを複数枚平行に配置することによって、計測点が三次元的に配置された剣山型の電極が実現できることも報告している。また、電極と同一の基板上に信号処理回路を

実装したプローブも開発している。

Normannらは、シリコンの針状の電極を100本アレイ状に並べた剣山型の神経プローブを開発している⁽⁴⁾。個々の針状電極の直径は基部では100 μm 、長さは1.0~1.5mmであり、電極間隔は400 μm である。動物での評価を経た上で近年ではヒトの末梢神経や運動野にも埋め込まれ、BMIシステムとして動作させた例⁽⁵⁾が報告されている。

どちらのMEMS電極も現在では(高額ではあるものの)市販されている。後述するような生体適合性などの面での改善が進められると共に、無線化を目指した研究が行われている。

<2・3>現状の課題と将来に向けた取り組み

前述のように、動物を対象としたBMIの基礎研究において従来型のプローブが依然有用であり続けていることから示唆されるように、現状の神経プローブは、従来型とMEMS型のどちらについても、未解決の課題が多く残されている。以下では課題と共に解決に向けた取り組みについて紹介する。

A) チャネル数に関する問題

上述の要求性能の4にも挙げたように、義手の制御、あるいは人工視覚の生成には、現状のプローブのチャネル数では不足している。チャネル数の増加は、計測系、刺激系全体の問題でもあるが、少なくとも配線の問題を解決するためには、無線化が欠かせないと考えられる。そしてそのためには、体内である程度の信号処理を行う必要も生じる。近年、この課題に取り組む研究グループは多く、また、32ch程度のものは市販もされるようになっている。

B) 電極周囲の組織反応の問題

神経組織内に神経プローブのような人工物を長期間留置すると、周辺で結合組織等によるカプセル化が生じ、電極抵抗の増大により、信号計測や刺激が最終的には不可能になる場合のあることが知られている。近年、プローブ周辺でのアストロサイト等の挙動の研究が詳細に行なわれるようになった⁽⁶⁾が、防止する方法については未解決である。関連の学会でもこの課題に関する研究報告が増加している。薬剤を生分解性材料に混ぜて徐々に放出する方法も提案されている。著者らのグループでは、プローブ表面にMPCポリマーをコーティングすることがある程度有効であることを報告している⁽⁷⁾。

C) 「ずれ」の問題、神経組織へのダメージの問題

現状の神経プローブは、MEMS型のものであっても、基部が太く、周囲の神経組織を圧迫しダメージを与えていることが危惧されている。また、構造が硬いために、柔軟な神経組織の動きに追従できず、ずれてしまい、計測していた神経細胞を逃してしまったり、あるいはその「ずれ」自体が神経組織へのダメージになることも危惧されている。

こうした問題に対処するために、プローブのさらなる微

細化に向けた取り組みがなされている。豊橋技術科学大学の石田らによるウィスカー結晶を利用したプローブ⁽⁸⁾は、微細であることに加えて、信号処理回路との親和性、柔軟性、強靭性を兼ね備えていることから期待を集めている。

また柔軟化に向けた取り組みも、著者らと同大の竹内研究室との共同研究をはじめとして内外の複数のグループによって進められている。さらに、柔軟プローブ研究の応用として、プローブと流路構造を統合することによって薬液注入機能を有するプローブも報告されている⁽⁹⁾。柔軟なプローブはそのままでは神経組織へと刺入できなくなってしまうため、刺入方法に関しても様々な提案がなされている。

3. 束流路を利用した神経再生型電極

神経プローブの現状の課題の解決に向けた著者らのグループによる取り組みの一つとして、束流路を利用した三次元構造を有する神経再生型電極⁽¹⁰⁾を紹介する。末梢神経では、一度切断された軸索が、切断部の中枢側から再生していくことが知られている。この再生軸索をプローブ内の流路に誘導することが、本プローブの原理である。流路構造を利用することによって、SN比の向上や、電極間の絶縁性の向上、さらには軸索誘導のための薬液注入機能の実現が図られている。

末梢神経系を対象とすること自体も、臨床応用においては実現の可能性を高める重要な要素であると考えられる。発表においてはこうした点についても議論したい。

文 献

- (1) J. Wessberg, et al: Real-time prediction of hand trajectory by ensembles of cortical neurons in primates, *Nature*, 408, 361-365 (2000)
- (2) 櫻井芳雄 他: ブレイン-マシン・インタフェース最前線-脳と機械を結ぶ革新技術-, 工業調査会 (2007)
- (3) K. D. Wise, et al: Microfabrication Techniques for Integrated Sensors and Microsystems, *SCIENCE*, 254, 1335-1342, 1991
- (4) P. K. Campbell, et al: A silicon-based, three-dimensional neural interface: manufacturing processes for an intracortical electrode array, *IEEE Trans. BME*, 38(8), 758-768, 1991
- (5) L.R. Hochberg, et al: Neuronal ensemble control of prosthetic devices by a human with tetraplegia, *Nature* 442, 164-171 (2006)
- (6) V.S. Polikov, et al: Response of brain tissue to chronically implanted neural electrodes, *J. Neuroscience Methods* 148 1-18, (2005)
- (7) N. Taniguchi, et al: Biocompatibility of wire electrodes improved by MPC polymer coating, *Proc of the 3rd International IEEE EMBS Conference on Neural Engineering*, 122-125 (2007)
- (8) T. Kawano, et al: Fabrication and properties of ultrasmall Si wire arrays with circuits by vapor-liquid-solid growth, *Sensors and actuators A*, 97-98, 709-715, 2002
- (9) S. Takeuchi, et al: Parylene flexible neural probe with micro fluidic channel, *Lab on a Chip*, 5, 519-523 (2005)
- (10) 鈴木隆文 他: 束状微小流路を利用した神経再生型電極の開発, *電気学会論文誌 C*, 127(10), 1544-1548 (2007)

神経電極へのマイクロダイアリシス機能付加の試み

小竹直樹*, 鈴木隆文, 満淵邦彦, 竹内昌治 (東京大学)

Development of a Neural Electrode Integrated with Microdialysis Function -Preliminary result-
Naoki Kotake*, Takafumi Suzuki, Kunihiko Mabuchi, Shoji Takeuchi (The University of Tokyo)

Abstract

We propose a neural electrode with microdialytic function, fabricated using MEMS technology. It was designed so that it can monitor both neuroelectrical and neurochemical activities, simultaneously. The electrode, which was fabricated on a 25- μm -thick parylene C substrate, consisted of four electrodes and a fluidic channel. The fluidic channel was 170 μm wide, 30 – 40 μm high, 1.5 mm long, and has 15- μm -thick semipermeable membrane for microdialysis.

キーワード: 神経電極, マイクロダイアリシス
(Neural Electrode, Microdialysis)

1. はじめに

神経電極は神経信号を計測するためのデバイスとして神経科学分野の研究にて用いられてきた。近年では、生体の神経系と外部機器を直接繋ぐための情報入出力デバイスとしても用いられるようになり、それぞれの用途に合わせた様々な神経電極が開発されている。特に神経電極の開発における Micro Electro Mechanical System (MEMS) 技術の応用が提案されたことによってその開発の余地は広がり、電極のさらなる微小化や多機能化が進んでいる。

一方、神経細胞から放出される神経伝達物質等の定量的な測定にはマイクロダイアリシス法が広く用いられてきた。

主に神経活動の観察に用いられる神経電極とマイクロダイアリシスプローブの統合は、神経活動をより詳細に観察するための有効なデバイスになりうると考えられる。

2. 目的

本研究では単一のプローブによって脳内の電気生理学的応答と生化学的応答をともに計測することを目指し、神経電極へのマイクロダイアリシス機能の付加を試みた。著者らはこれまでに流路を備えた柔軟神経電極等の開発を行ってきており⁽¹⁾⁽²⁾、その過程で培われた MEMS 技術を用いた電極の作成方法を応用して本プローブの試作を行った。

本稿では、特に本プローブの作成上で課題となっていた⁽³⁾半透膜部を含む流路構造の強度を向上させるべく、その作成工程に改善を加え、試作を行ったので報告する。

3. 方法

(3-1) 設計 本研究で提案する神経プローブは高分子材料であるパリレン C (ポリクロロパラキシリレン) を用いて作成した。プローブは 1 つの流路とその近傍に配された 4 つの電極から構成される。流路の一部には酢酸セルロースを材料とした半透膜が製膜され、この半透膜を介した神経伝達物質の回収を可能とする。本プローブは、流路はマイクロダイアリシスプローブとして機能し、それとともに流路近傍の電極によって神経信号の計測が行えるように設計された。

(3-2) 作成方法 本プローブの作成はシリコンウエハ上で行った。

- (1) 紫外線硬化型エポキシ樹脂である SU-8 を用いてシリコンウエハ上に流路形成のための型を作成し、その上にパリレン C を厚さ 15 μm 蒸着する。
- (2) 電極および配線用に金を厚さ約 300nm 蒸着し、パターニングを行う。
- (3) 厚膜レジストをコートしてパターニングを行う。これは流路を形成するための犠牲層となる。
- (4) 第二層目のパリレン C を厚さ 10 μm 蒸着した上で、酸素プラズマエッチングにより流路の一部を開口、同時に電極部、コネクタ部の金も露出させる。
- (5) アセトンに浸漬し、犠牲層となる厚膜レジストを除去する。
- (6) 酢酸セルロース、アセトンおよびホルムアミドを重量比 17:60:23 の割合で混合し、別のウエハ上へスピンコートする。

- (7) (6)にてフィルム状に成形された酢酸セルロース膜を流路の上へ貼る。
 (8) 約 4℃の冷水に 2 時間浸漬した後、約 90℃の熱湯に 10 分間浸漬する。
 (9) プローブ外形を成形してシリコンウエハから剥離する。

4. 結 果

作成した神経プローブの写真を図 1 に示す (ただし写真のプローブは作成の都合上、先述の工程 8 を省略したものである)。パリレン C を用いて形成したプローブの外形は幅 1.2mm、長さ 12mm であった (コネクタ部を除く)。その中に往路、復路の 2 本の流路と 4 つの電極が配置されている (図 1 B)。流路のサイズは幅 170 μ m、高さ 30-40 μ m、総延長はおよそ 15mm であった。回転数 3000rpm で 30 秒間スピンコートすることにより成形した半透膜の膜厚を触針式表面形状測定装置 (Dektak 6M, ULVAC 社) にて計測したところ、その膜厚はおよそ 15 μ m であった。

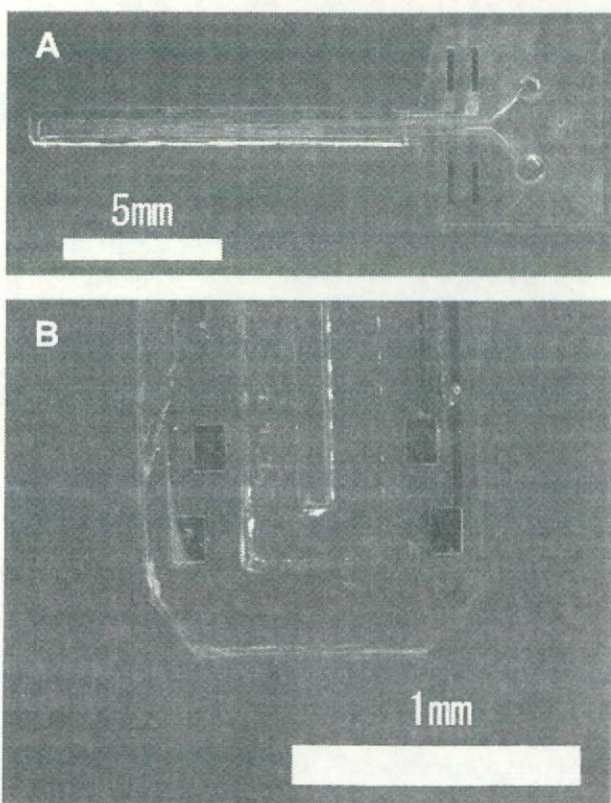


図 1 作成された電極写真

Fig. 1 Photo of the fabricated probe.

(A) Overview of the probe. (B) Tip of the probe.

5. 考 察

試作の結果、提案した神経プローブがおおよそこのような作成方法により実現できることが示された。特に半透膜部を含む流路構造の強度を向上させるための方策として、今

回は先ずシリコンウエハ上に SU-8 で型を作り、その上にパリレン C を蒸着することで流路構造を形成した。著者らがこれまで行ってきた作成方法ではシリコンウエハ上で流路構造が凸状に形成されるため、流路構造自体が外部からの物理的刺激に弱く、その後の作成工程で壊れることが少なからずあった⁽³⁾。この点に関して、SU-8 の型を利用した今回の作成方法では流路構造は型の凹部分に形成されるため、その後の作成工程において流路に対する物理的な刺激が軽減できたと考えられる。また、型を利用したことで表面の凹凸を減らすことができ、流路上へ半透膜を製膜し易くもなった。作成工程におけるこれらの改善により流路構造の強度を向上させることができた。

しかしながら、現段階では流路上の開口部のサイズや半透膜の膜厚等の条件設定が不十分であり、今後、これらの条件がマイクロダイアリス機能にあたる影響について検討を続ける予定である。

謝 辞

本研究の一部は、文部科学省科学研究費補助金 (基盤研究 (A) 課題番号 17206022, 特定領域研究「移動知」)、厚生労働省科学研究費補助金 (H17-ナノ-若手-010) の助成を受けて行われた。ここに記して謝意を表す。

文 献

- (1) Takafumi Suzuki, Kunihiko Mabuchi, Shoji Takeuchi : A 3D flexible parylene probe array for multichannel neural recording, Proc. of 1st international IEEE EMBS Conference on Neural Engineering, 154-156 (2003)
- (2) Shoji Takeuchi, Dominique Ziegler, Yumi Yoshida, Kunihiko Mabuchi, Takafumi Suzuki : Parylene flexible neural probe with micro fluidic channel, Lab on a chip, 5, 519-523 (2005)
- (3) 小竹直樹・鈴木隆文・竹内昌治・満洲邦彦: 「流路を備えた神経電極のマイクロダイアリスへの応用」, 電気学会 電子・情報・システム部門大会. 229-230 (2007)

原稿受付日	平成 20 年 3 月 18 日
-------	------------------

ラット搭載車体型 BMI 「ラットカー」の開発： 広域多点神経電極による歩行関連情報の抽出

深山 理*, 谷口 徳恭, 鈴木 隆文, 満洲 邦彦 (東京大学)

Development of "RatCar" a BMI vehicle for a rat:

Extraction of locomotion related firings using neural electrodes implanted in multiple regions of brain

Osamu Fukayama*, Noriyuki Taniguchi, Takafumi Suzuki, Kunihiko Mabuchi (The University of Tokyo)

Abstract

Novel neural electrodes and a spikes discrimination technique were applied to 'RatCar' system; a brain-machine interface (BMI) vehicle controlled by neural signals of a rat's brain. A rough control of the vehicle by neural signals recorded in the motor cortices had been achieved imitating actual locomotion of the rat. In this paper, an electrodes array to simultaneously record multiple regions of the motor center was applied. Recorded signals were then automatically sorted into neural units and artifacts by applying Gaussian-mixture model to the feature quantities of their waveforms, which enabled a more reproducible estimation.

キーワード：ブレイン・マシン・インターフェース, 神経電極, 発火弁別, 歩行推定
(Brain-machine interface, neural electrodes, spike sorting, locomotion estimation)

1. はじめに

本研究では、ラットを用いた車体形状の brain-machine interface (BMI) である RatCar に対し、

- 運動中枢の広範囲から同時計測可能な神経電極アレイ、
- 自動化した発火特徴量の抽出および弁別、
- ノイズに由来する偽性発火波形の除去

を導入し、効率的な信号情報収集および推定手法の再現性向上を試みた。

RatCar システムは、ラットの運動中枢に神経電極を埋め込み、計測された信号に基づいてラットの意図に沿った車体移動を行うものである。これまでに線形モデルを用い、神経信号と歩行状態との対応付けが実現されてきた⁽¹⁾。将来的に、BMI によって脳に生じる可塑的影響から、環境の変化に対する脳の運動学習機能の解明を目指す。同様の BMI による生体動作の推定は、2000 年頃よりサルを対象として、Wessberg ら⁽²⁾や Nicolelis ら⁽³⁾によって行われた、手先位置の推定および推定結果を用いたロボットハンドの制御が知られている。

これらに対し、本研究の RatCar ではラットを車体上に搭載し、生来の四肢を車輪によって代替することによって、より直感的な感覚フィードバックをラットに与える。このとき、BMI によって脳に生じる可塑的影響から、環境の変化に対する脳の運動学習機能の解明を目指す。例えば、1999 年にラットの運動野神経信号を用いてロボットアームの操作を行った Chapin らの研究では、当初レバー押しの実動作に対して行った神経信号との対応付けが、時間経過とともに変化したことが報告された⁽⁴⁾。RatCar の場合では、車体とラット自身の身体とが一体として移動するため、同様の現象が顕著に現れることも考えられる。

2. RatCar

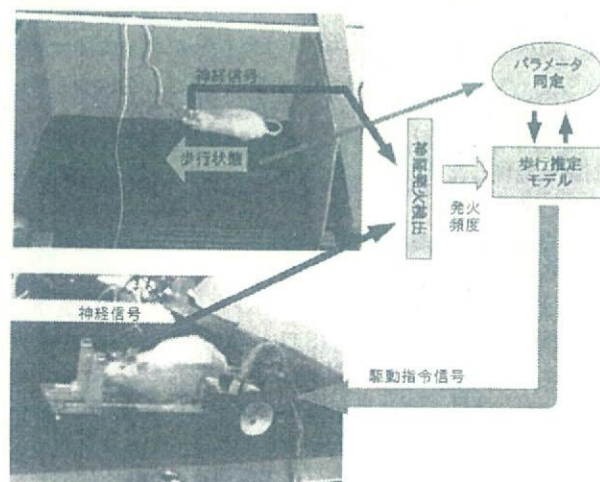


図1 Basic structure of "RatCar" system. Signals recorded by electrodes were transferred to the band-pass filter, the amplifier, then to the computer.

神経信号による歩行推定法を以下に示す。

図1のように、ラットから計測された神経信号は、増幅・フィルタリングを経て、100 ms 毎の時刻フレーム t に対して神経細胞 n ($n = 1, \dots, N$) 毎の過去 100 ms 間の発火頻度 $y(p) = (y_1(p), \dots, y_N(p))$ として計測された。この発火頻度情報は、ラットが自由に平面上を歩行した際の歩行状態 $x(p)$ (i.e., 歩行速度 v m/s および方向変化 $\Delta\theta$ rad/s からなる 2次元ベクトル) と同時記録され、式 (1), (2) に示す

状態空間表現モデルによって対応付けられた。

$$x(p+1) = Fx(p) + \xi \dots\dots\dots (1)$$

$$y(p) = Hx(p) + \eta \dots\dots\dots (2)$$

ただし、状態遷移行列 F 、出力行列 H は、計測開始冒頭 30 s の区間を用いて

$$F = \begin{pmatrix} f_{11} & 0 \\ 0 & f_{22} \end{pmatrix}$$

$$= \arg \min_F E \{ |x(p+1) - Fx(p)|^2 \}$$

$$H = \begin{pmatrix} h_{11} & h_{12} \\ \vdots & \vdots \\ h_{N1} & h_{N2} \end{pmatrix}$$

$$(h_{n1} \ h_{n2}) = \arg \min_{(h_{n1} \ h_{n2})} E \{ |y_n(p) - (h_{n1} \ h_{n2})x(p)|^2 \}$$

として同定し、その際のモデル誤差を以ってシステム誤差 ξ 、観測誤差 η の初期値とした。($E\{\cdot\}$ は期待値を表す。)

その上で、逐次計測される発火頻度 $y_n(p)$ から、歩行の実動作を示す内部状態 $\hat{x}(p)$ を Kalman filter⁽⁵⁾ 型アルゴリズム

$$\hat{x}(p+1) = F(I - K_p H)\hat{x}(p) + FK_p y(p) \dots\dots\dots (3)$$

(K_p : Kalman gain)

によって逐次推定し、神経信号による歩行推定および車体制御を実現した⁽⁶⁾。

3. 提案手法

(3・1) 広域多点神経電極 本研究では、図 2 に示す広域多点神経電極を開発し、RatCar システムに導入した。これは、従来の大脳皮質一次運動野 (M1) に加えて、大脳基底核のうち特に視床下核 (STR)、線状体 (STN)、淡蒼球 (GP) への同時埋込および計測を可能としたものである。運動野に対しては 6 本、基底核 3 箇所に対しては各領野毎に 4 本ずつ、計 18 本の計測用電極を配置した。各電極は ϕ 50 μ m のタンガステン微小ワイヤに厚さ 5 μ m のパリレンを皮膜し、先端部を切断して作成した。この他に、不関電極として図中 b, c, d, e の 4 点を配置した。これらは計測用電極と同様の構造であるが、先端部の被覆が 3 ~ 5 mm 程度の長さ互に互って剥がされ、金属面が広く露出している。

(3・2) 自動神経発火抽出および弁別 次に、電極毎にサンプリング間隔 $\Delta t = 100$ ms で計測された時系列神経信号 $s(t)$ に対し、式 (4) のように発火テンプレート波形 $u(\tau_m)$ を $\tau_m = [-500 \text{ ms}, 1500 \text{ ms}]$ の範囲で重畳し、相関値 $c(t)$ が極大/極小値を与える時刻および値を以って神経発火を検出した。

$$c(t) = \sum_{m=-5}^{15} u(t - \tau_m)s(t)$$

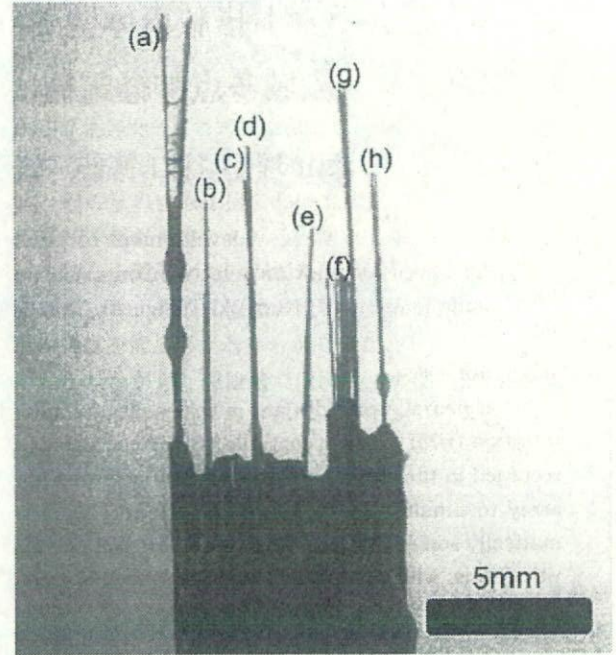


図 2 Developed neural electrodes for wide regions. A tip of each wire was designed to record signals from (a) STN, (g) GP, (h) STR in basal ganglia, and from (f) motor cortex while the rest of them ((b), (c), (d), (e)) were reference electrodes.

$$= \sum_{m=-5}^{15} u(t - m\Delta t)s(t) \dots\dots\dots (4)$$

ここで、テンプレート波形 $u(\tau)$ は、S/N 比や波形形状等から、経験的に明らかと判断された神経発火波形の脱分極ピーク電位をトリガーとし、加算平均処理によって作成した。

続いて、上で得られた電極毎の神経発火を表す系列 $c(t_k)$ ($k = 1, \dots, K$) に対し、混合正規分布 (GMM) のフィッティングを行った。これは、同一の神経細胞に由来する発火が短期的には同様の波形を示すとする仮定の下、テンプレートとの相関値が Gauss 性雑音によって乱されて観測されたものと見做し、GMM を構成する各々の正規分布をそれぞれ神経細胞に対応させる手法である。すなわち、上述の相関値 $c(t)$ が極大/極小値を与える時刻を t_i とし、その際に相関値 c_n を定常的に与える神経細胞 n が発火したものとおくと、

$$c(t_i) = \sum_{n=1}^N c_n + N(c(t); 0, \sigma^2)$$

$$= \sum_{n=1}^N N(c(t); \mu_n, \sigma^2)$$

$$= \sum_{n=1}^N \frac{1}{\sqrt{2\pi}\sigma} \exp \left\{ -\frac{(c(t) - \mu)^2}{2\sigma^2} \right\} \dots\dots\dots (5)$$

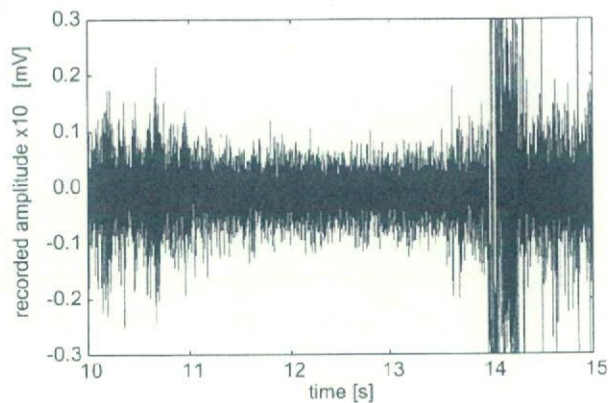
として記述される。ただし簡単のため、複数の神経細胞の

同時発火については無視した。

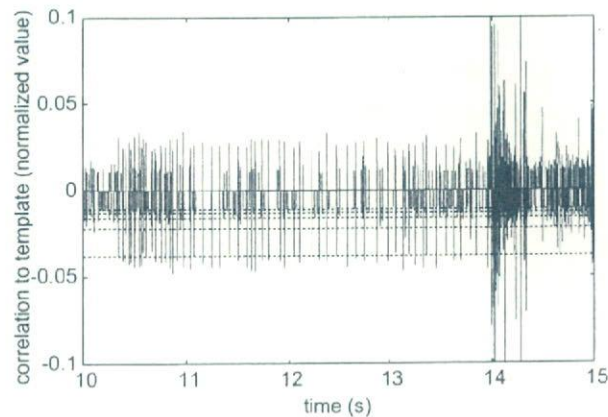
このような問題に対しては、分布全体の対数尤度を最大化することで、分布のパラメータ（正規分布の荷重、期待値、分散）を決定でき、本研究では Expectation Maximization (EM) アルゴリズム⁽⁷⁾によって実装した。さらに、GMMに含まれる Gaussian の個数についても、得られる尤度の値が最大となるよう定め、信号波形から自動での発火弁別を行った。

最後に、検出頻度が 100 Hz を越える分布や複数の計測電極に互って観測される同期した発火様波形は、脳外のアーチファクトに由来する偽性発火信号として除外した。

4. 結果



(a)



(b)

図 3 (a) Raw signals recorded in the motor cortex and (b) sorted neural firings. Horizontal dashed lines superimposed over recorded signals indicates means of Gaussians.

図 3(a) に運動皮質より計測された信号の一例を示す。この信号に対して前節の平均発火波形畳み込み処理を行い、神経発火様の波形を抽出した結果、図 3(b) 中の時系列波形が示す間欠的な出力が得られた。区間前半において、元の

信号では見られた基線変動の影響が、処理後の信号では軽減されていることが分かる。また、縦軸の値にして -0.05, -0.01, 0.03 付近に見られるように、検出された発火を示す相関値ピーク値は、4 つ程度の振幅に局在していた。

ただし、この結果においては特に縦軸値 0 近傍で見かけ上の発火頻度が 1000 Hz を超えるなど、神経発火とするには不自然な発火様信号が混入しており、これらは事後的に除外する必要があった。また、時間軸 14 s 付近に見られる大きな値の変動は、複数の計測チャンネルに互って観測され、これらも除外の対象とした。

5. 考察

広域多点電極の導入により、一回の埋め込み作業によって運動皮質と大脳基底核からの同時計測が可能になった。各電極の相対位置関係は予め固定して設計されているため、埋め込み手技による位置ずれが防止された。脳内の運動指令の生成には、複数の領野が複合的に関わるため、広範囲からの条件の揃った同時計測は有意義と考えられる。

神経発火ピークを混合正規分布に当てはめ、EM アルゴリズム（またはこれを高速化した CEM アルゴリズム）によって弁別する手法は、Kluskwik⁽⁸⁾ といった汎用ソフトウェアにおいても採用されている。本研究では、EM アルゴリズムを単一の電極から計測された信号に対して適用し、さらに平均発火波形との畳み込みを組み合わせ用いた。この弁別手法においては計測信号の波形としての神経発火らしさのみに着目するため、領野毎の信号特性に依存しない弁別が可能である。ただしその一方、ノイズ・アーチファクトに由来する発火様信号をも発火として誤検出する恐れがあったが、事後的に神経発火の生理学的特徴として不応期等の情報を導入することでこれを回避した。

6. おわりに

本研究では、RatCar システムにおいて広域多点神経電極および自動発火検出・弁別法を適用し、歩行に関連する神経活動の効率的な計測を実現した。

謝 辞

本研究の一部は、文部科学省科学研究費補助金（基盤研究 (A) 課題番号 17206022、特定領域研究「移動知」）の助成を受けて行われた。ここに記して謝意を表す。

参考文献

- (1) 深山理, 谷口徳恭, 鈴木隆文, 満洲邦彦. 線形相関モデルを用いた運動野神経信号によるラット歩行状態推定. 電気学会論文誌 C, Vol. 127, No. 10, pp. 1686-1691, 2007.
- (2) J. Wessberg, C. R. Stambaugh, J. D. Kralik, P. D. Beck, M. Laubach, J. K. Chapin, J. Kim, S. J. Biggs, M. A. Srinivasan, and M. A. L. Nicolelis. Real-time prediction of hand trajectory by ensembles of cortical neurons in primates. *Nature*, Vol. 408, pp. 361-365, 2000.
- (3) M. A. L. Nicolelis. Brain-machine interfaces to restore motor function and probe neural circuits. *Nature Reviews: Neuroscience*, Vol. 4, pp. 417-422, 2003.

- (4) J. K. Chapin, K. A. Moxon, R. S. Markowitz, and M. A. L. Nicolelis. Real-time control of a robot arm using simultaneously recorded neurons in the motor cortex. *nature neuroscience*, Vol. 2, No. 7, pp. 664-670, 1999.
- (5) 片山徹. 新版 応用カルマンフィルタ. 朝倉書店, 2002.
- (6) 深山理, 谷口徳恭, 鈴木隆文, 満洲邦彦. 中枢神経信号を用いたラット搭載車の制御. 神経発火パターンに基づく適応的オンライン歩行状態推定. 平成 19 年 電気学会 電子・情報システム部門大会, 2007.
- (7) A. P. Dempster, N. M. Laird, and D. B. Rubin. Maximum likelihood from incomplete data via the em algorithm. *Journal of Royal Statistical Society, Series B (Methodological)*, Vol. 39, No. 1, pp. 1-38, 1977.
- (8) G. Celeux and G. Govaert. A classification em algorithm for clustering and two stochastic versions. *Comput. Stat. Data. Anal.*, Vol. 14, pp. 315-332, 1992.

原稿受付日	平成 20 年 3 月 13 日
-------	------------------

Bundled Microfluidic Channels for Nerve Regeneration Electrodes

Takafumi Suzuki*, Naoki Kotake*, Kunihiko Mabuchi*, Shoji Takeuchi**

Abstract- The development of a neural interface that allows signals from the human nervous system to control external equipment is extremely important for the next generation of prosthetic systems. A novel multichannel regeneration-type nerve electrode that was designed to record from and stimulate peripheral nerves has been developed to allow for the control of artificial hands and to generate artificial sensations. In this study we propose a neural probe with multiple microfluidic channels for measuring signals from regenerated axons passing through the fluidic channels. Each channel also serves as a guidance tube of the nerve regeneration and as fluidic pathways for injecting chemicals such as nerve growth factors (NGF). Parylene microfluidic channels were formed with microelectrodes and then the substrate was rolled up, resulting in bundled channels. We have succeeded in injecting NGF from the channels and observed the regeneration of an axon guided by the channels.

I INTRODUCTION

The development of a man-machine interface between the human nervous system and external equipment, such as artificial hands, is extremely important for the next generation of prosthetic systems. A regeneration-type nerve electrode is a key device in this research field. Regeneration-type nerve electrodes hold promise as key devices for producing these neural interface systems. The underlying principle of the regeneration-type electrodes is that the peripheral nerves of vertebrates will regenerate after being severed. In this process, the axons in the distal portion will degenerate, but will regenerate from the proximal portion and reach the distal end of the severed nerve bundle. Therefore, if a device consisting of many microelectrode holes is implanted between the severed stumps, the axons can regenerate through the holes, and the action potential of the regenerating axons can be measured by the electrode (Fig. 1). This electrode has many advantages, such as a

We thank the VLSI Design and Education Center, the University of Tokyo for the mask fabrication. This work was partially supported by a Grant-in-Aid for Scientific Research (A) 17206022 and Grant-in-Aid for Scientific Research on Priority Areas "Emergence of Adaptive Motor Function through Interaction between Body, Brain and Environment" from the Ministry of Education, Science, and Culture of Japan, and Research on Advanced Medical Technology H17-NANO-010 from the Ministry of Health, Labour and Welfare of Japan.

*Department of Information Physics and Computing, Graduate School of Information Science and Technology, the University of Tokyo, Hongo 7-3-1 Bunkyo-ku Tokyo 113-8656, Japan. Tel +81-3-5841-6880, Fax +81-3-5841-6882, E-mail suzuki@ecr.u-tokyo.ac.jp

**Institute of Industrial Science, the University of Tokyo, Komaba 4-6-1 Meguro-ku Tokyo 153-8904, Japan

long-term and stable input/output due to good electrical and physical compatibility between the electrode and nerve fibers [1]. However, in many previous works, the electrodes have had a plane structure (Fig. 1) [2], and they also have problems, such as difficulty in recording signals with a good S/N ratio if the position of the recording site is located far from the Ranvier node (Fig. 2). We have developed a 3D-structured regeneration nerve electrode with bundled microfluidic channels using a flexible Parylene film (Fig. 3). The proposed electrode has many advantages including: 1) it hardly ever fails to record signals as long as one of the Ranvier nodes is located in the channels, because the signal attenuation is small in each fluidic channel, 2) it has a high S/N ratio because it has a large recording site, and each recording site is sufficiently insulated, and 3) it promotes the regeneration of axons by allowing for the injection of medicines like NGF.

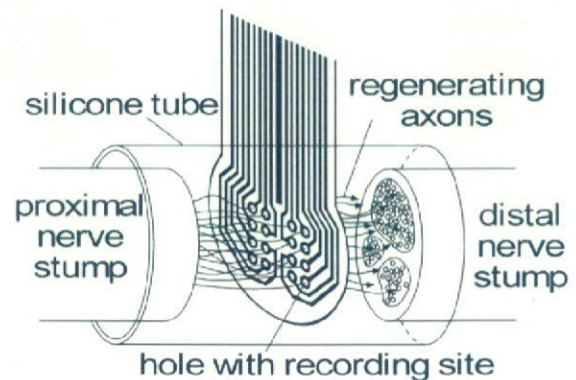


Fig. 1: Schematic of regeneration-type nerve electrode

II METHODS

A schematic of the flexible regeneration-type electrode we fabricated is shown in Fig. 3. Each fluidic channel has one or multiple recording/stimulation sites and serves as a guidance tube for the regenerating axons. The fabrication process is shown in Fig. 4. This process is similar to that of the probe integrated with microfluidic channels that we have previously reported [3]. A 30- μm -thick photoresist was sandwiched by Parylene thin films used as a sacrifice layer and removed by using acetone after rolling; consequently multiple microfluidic channels were created. Each channel has an electrode underneath.

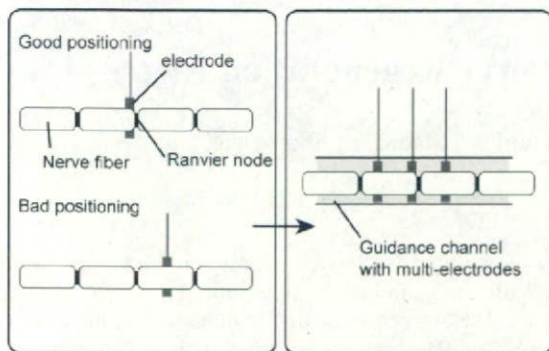


Fig. 2: Distance between recording sites and Ranvier node of single nerve fiber

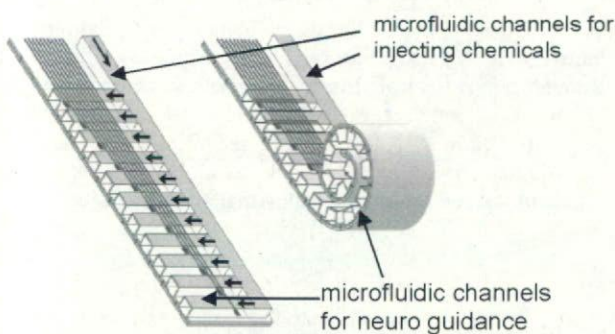


Fig. 3: Schematic of new regeneration-type nerve electrode. The electrode has a microfluidic channel for the injection of chemicals and other microfluidic channels for neuro guidance.

III RESULTS and DISCUSSIONS

Figure 5 shows the entire structure of the fabricated neural probe. The 125 microfluidic channels (124 guidance channels + one injection channel) were bundled in the probe. The average impedance of the recording sites was 613 k ohm at 1 kHz. Even when the probe was bundled, it retained the same impedance. The bundled electrodes did not break and retained their conductivity.

We performed an injection test on the microfluidic channels by using blue ink to visualize the stream. The device was immersed in a water bath and then the ink was introduced using a syringe. The ink nicely distributed to all the 24 outlets without any leakage, demonstrating the feasibility of the microfluidic channels.

In vitro experiments were performed to evaluate the efficiency of injecting NGF into the channels by using unrolled probes attached to culture dishes. Primary cultured neural cells which were derived from a rat embryo brain were plated in front of the outlets of the channels. We injected 500 ng/ml of NGF into the microfluidic channels once a day. Although it was a preliminary result,

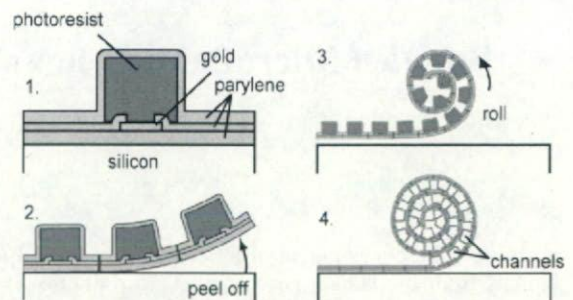


Fig. 4: Fabrication process. The photoresist is removed by using acetone after rolling the fluidic channel area.

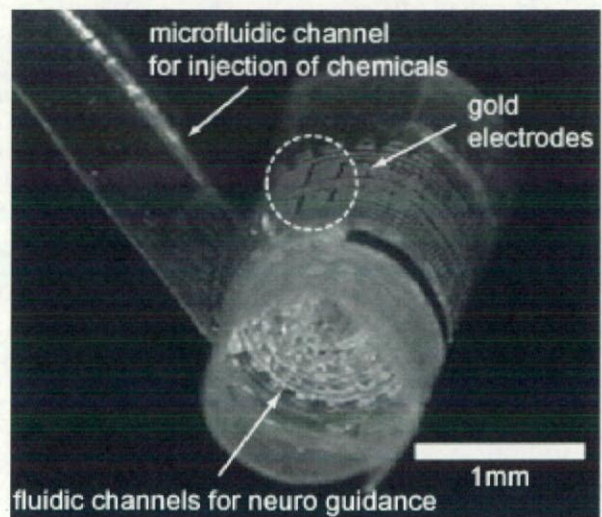


Fig. 5: Photograph of fabricated probe. Each microfluidic channel for neuro guidance is W 100 μ m \times H 30 μ m \times L 1500 μ m.

we observed an axon that regenerated into the channel filled with NGF. These results suggest that our electrode will work in guiding and promoting the regeneration of axons. We are attempting to gather more clear evidence using both *in vitro* and *in vivo* experiments.

REFERENCES

- [1] A. Mannard, R. B. Stein, D. Charles: Regeneration electrode units: Implants for recording from single peripheral nerve fibers in freely moving animals, *Science*, 183, 547-549 (1974)
- [2] G. T. A. Kovacs, C. W. Stormont, J. M. Rosen: Regeneration Microelectrode Array for Peripheral Nerve Recording and Stimulation, *IEEE Trans. BME*, 39, 893-902 (1992)
- [3] S. Takeuchi, D. Ziegler, Y. Yoshida, K. Mabuchi, T. Suzuki: Parylene flexible neural probe with micro fluidic channel, *Lab on a Chip*, 5, 519-523 (2005)

A new multi-electrode array design for chronic neural recording, with independent and automatic hydraulic positioning

T. Sato*, T. Suzuki, K. Mabuchi

*Department of Information Physics and Computing, Graduate School of Information Science and Technology,
The University of Tokyo, 7-3-1, Tokyo, 113-8656, Japan*

Received 12 June 2006; received in revised form 16 August 2006; accepted 21 August 2006

Abstract

We report on a new microdrive design, which enables the construction of multi-electrode arrays capable of chronically recording the multi-unit neural activity of waking animals. Our principal motivation for inventing this device was to simplify the task of positioning electrodes, which consumes a considerable amount of time and requires a high level of skill. With the new microdrives, each electrode is independently and automatically driven into place. A hydraulic drive system is adopted to reduce the size, weight, and cost of the structure. The hydraulic fluid is also used as a part of the electrical circuit, and facilitates the wiring of the electrodes. A routing system has been attached to reduce the number of tube connections. The microdrive is cylindrical, has a diameter of 23.5 mm, a height of 37 mm, and a weight of 15 g. It allows for up to 22 electrodes, which are arranged on a 0.35 mm grid. Each electrode can be positioned at any depth up to approximately 4 mm. The microdrive was evaluated under acute and chronic recording experiments, and is shown to be capable of automatically positioning each electrode and successfully recording the neural signals of waking rats.

© 2006 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Automatic microdrive; Hydraulic base; Chronic neural recording; Neural interface

1. Introduction

Extracellular recording using a fine wire electrode is a valuable technique for measuring the neural activity of freely moving animals. Single electrodes have long been used in electro-physiology to measure spikes in both acute and chronic recording modes. The concept of coding in large populations of neurons, however, has increased the importance of chronic recording from multiple channels simultaneously. The relationship between simultaneous spikes and motor, for example, was revealed by multi-unit recordings (Riehle et al., 1997). Brain-machine interfaces have also succeeded thanks to technical improvements in chronic recording (Chapin et al., 1999; Donoghue, 2002; Serruya, 2002; Taylor et al., 2002; Wessberg et al., 2000).

The experimental focus of such studies has mainly been on primates and rodents, both of which can be trained to perform tasks concurrent with electrophysiological recording. In the case

of rodents, the entire recording apparatus must be fixed to the head so as to allow access to the dura. The apparatus must also not be intrusive, so as to permit free movement of the head and limbs. Many types of multi-electrode array systems have been developed, to meet these requirements, especially in the MEMS field (Rutten, 2002).

Some experiments have also demonstrated the feasibility of recording single-unit activity from the neocortex (Kipke et al., 2003; Branner and Normann, 2000). Nonetheless, several difficulties still plague the recordings of single-unit activity in freely moving animals, such as small detection sites and the lack of biocompatible electrodes. Unexpected impacts to the electrodes or tissue rejection observed as encapsulation (Collias and Manuelidis, 1957; Polikov et al., 2005) often cause destructive deformation of the signal. Precise and independent positioning of the electrodes is therefore needed, to ensure their continued sensitivity to single units within the same animal (Kralik et al., 2001).

Several researchers have tried to solve these problems by developing screw-based microdrives (Nichols et al., 1998; deCharms et al., 1999; Venkatachalam et al., 1999; Keating and Gerstein, 2002; Swadlow et al., 2005). In these systems,

* Corresponding author. Tel.: +81 3 5841 6880; fax: +81 3 5841 6882.
E-mail address: Takashi_Sato@ipc.i.u-tokyo.ac.jp (T. Sato).

each electrode can be moved independently after implantation. In most cases, however, the positioning is performed manually. This procedure requires a considerable amount of time, and is strongly affected by the researcher's skill.

Even though automating the procedure may alleviate these problems, only a few automated microdrives have been developed. The main reason for this is the excess size and weight of the attached motor. Although the pioneering work of Fee and Leonardo (2001) and Cham et al. (2005) has demonstrated an automated positioning process with several promising advantages, their system designed supports only a few channels due to the limitations of the mechanical structure and motor size.

In response to the above issues, we have designed and developed a microdrive for the chronic recording of neural activity in rodents. The design and development of this microdrive were motivated by the above issues. A hydraulic drive is used to independently and automatically adjust each electrode, and the recording apparatus can hold up to 22 electrodes. We evaluated the electrical connection and positioning precision of this novel design in acute experiment. Chronic experiments were also conducted, in which it is shown that the electrodes can be positioned individually and automatically. During individual recording sessions, well-isolated single units were typically recorded on about a quarter of the channels.

2. Materials and methods

A chronic microdrive has several technical requirements. Our device was designed to fulfill the following design criteria: (1) it should have as many channels as possible; (2) it should have an electrode tip capable of moving more than several mm or more (assuming that the cerebral cortex is the target); (3) each electrode should be capable of moving independently; (4) it should be capable of fixing the electrode tip positions after adjustment; (5) it should be sufficiently small and light enough to be implanted in rodents; and (6) the position of the electrodes should adjust automatically.

2.1. Implant

First we explain the overall design, followed by its details of specification. The basic design of our microdrive is illustrated in Fig. 1. To allow fine spacing ($350\ \mu\text{m}$) and independent movement of the electrodes, they are arrayed closely together at the bottom of the implant but fan out towards the top through individual guide tubes. A hydraulic system is used to drive each electrode, and a router was built into the device to select the particular electrode.

The electrodes are made of tungsten wire ($\text{Ø } 30\ \mu\text{m}$), coated with $5\ \mu\text{m}$ of poly-monochloro-paraxylylene (Parylene C) and cut with fine scissors at the tip. Their typical impedance was between $100\ \text{k}\Omega$ and $200\ \text{k}\Omega$. The electrodes are attached to stainless steel guides with a diameter of $\text{Ø } 1.3\ \text{mm}$ as shown in Fig. 2. The guides move like pistons through the holes and help stabilize the electrode motions. The guides, along with their electrodes, are inserted into holes drilled in the electrode housing. Twenty-four holes are drilled in two concentric circles towards

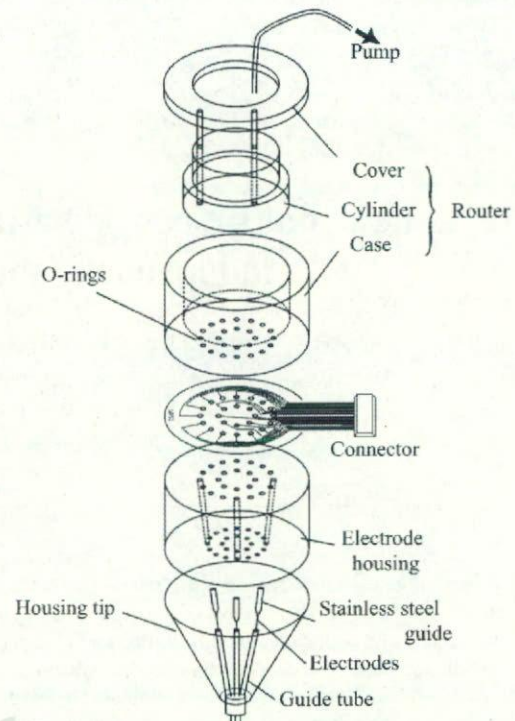


Fig. 1. Overall view of the implant, which consists of router, electrode housing, and tip. The electrodes are attached to stainless steel guides, which move like pistons through their housing by hydraulic fluid pressure. The router selects which channel to move.

a central point, to achieve fine spacing at the cusp. Two holes are kept as empty channels for the purpose of initializing the hydraulic fluid; the other 22 are used as electrode channels. This device can be used for any electrode type and material, as long as it fits in the stainless steel guides.

The router consists of a cylinder, case, and cover. By rotating the cylinder, the hydraulic fluid flows from the pump to selected channels (i.e., the holes drilled in the electrode housing). In each channel, an O-ring between the cylinder and the casing seals the channels when they are not selected. This gasket also prevents further motion of the electrode after it has been positioned. At the end of the positioning procedure, the router is lined up with the empty channels and any hydraulic fluid left in the path is vacuumed out.

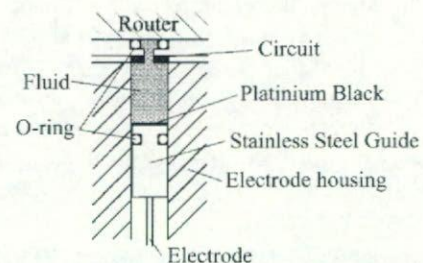


Fig. 2. Schematic figure of a piston-like driver. O-rings set into the grooved, stainless steel guide prevent fluid leakage and provide for smooth locomotion. Signals from the electrode are transferred to the circuit via the conductive hydraulic fluid, at any electrode position.

Connecting electrodes to a circuit is always a challenge, especially in multi-channel and drivable devices. To resolve this problem, conductive hydraulic fluid was used so that it could partially complete the circuit. As shown in Fig. 2, the connection between the electrode and the circuit will be maintained via the conductive fluid for any electrode position. Electronic insulation is ensured because the structure is leakproof. We can therefore sandwich a 2D circuit between the router and the electrode housing, a solution which is much simpler than wiring each connection. The circuit board is flexible (Sanhayato 1K), and coated with gold to prevent rust.

2.2. Implant assembly

We aligned the electrode tip and the electrode housing using a specially made fixture clamp. Each electrode wires was inserted through its guides tube, tip-first, then into the electrode housing until a sufficient length of wire emerged. The wires were then attached to the stainless steel guide, and pushed back into the electrode housing. Silicon grease was applied to the stainless steel guides as a sealant before they were pushed back.

After all electrodes were set into the device, fluid was supplied to the electrode housing (avoiding bubbles). The electrode tip, housing, flexible circuit board, and router were clamped together with screws, forming a tight seal. Finally, the device was cleaned, and the tip of each electrode wire was cut with fine scissors and prepared for implanting. The microdrive was 23.5 mm in diameter, 37 mm in height, and 15 g in weight. Photographs of the fabricated device are displayed in Fig. 3.

2.3. Pump and electrode position control system

Gears and lead screws, which are commonly used, can often introduce a significant amount of imprecision in such drives due to gearing backlash. The use of hydraulics involves a similar problem, which arises from fluid compression and friction between the electrode and the electrode housing. This suggests that the electrode position cannot be estimated accurately by measuring the amount of fluid supplied by the pump. One way to avoid this problem is to use a pre-pressurized system, which

is not affected by friction instability. This kind of structure, however, usually needs to be larger. To achieve high precision movements, we measured the fluid pressure continuously and used this information to control the amount of fluid supplied. Assuming that the electrode position can be calculated simply from the pressure and volume of fluid, we obtain the equation below:

$$x = aV + bP \quad (1)$$

where x is the electrode position, V the quantity of supplied, P the fluid pressure, and a , b are constants. While a is invariant, b depends on many factors such as micro-bubbles contaminating in the fluid. We can calculate b during the initial phase of fluid supply, when the pressure is increasing but the electrodes are fixed in place by friction.

To introduce very small amounts of fluid, we use a stage and a hand-made syringe pump (ϕ 1 mm). The minimum step rate of this pump is 0.004 mm^3 (or $2.8 \text{ }\mu\text{m}$ in terms of electrode movement). The stage is controlled by a computer (National Instrument DAQ), which is also used to record neural activity (sampling interval 10 kHz, bandpass 500 Hz to 3 kHz). The hydraulic fluid used was physiological saline solution, to minimize harm to the animal in case of leakage.

The electrodes are controlled automatically using the following procedure. The selected electrode is advanced until it reaches a set range (for example, from $500 \text{ }\mu\text{m}$ to $1500 \text{ }\mu\text{m}$ inside the cerebral cortex). Once the device is positioned over the desired recording region and the electrodes are extended to roughly the desired depth, control proceeds to an automatic search mode. In the search mode, the electrode is moved in constant increments. In our experiments, the electrode was stopped every $50 \text{ }\mu\text{m}$ and the insertion speed was $5 \text{ }\mu\text{m/s}$. Silence should be maintained for 20 s at each step, to avoid tissue dimpling and stabilize the electrode state. After each such pause, the electrode records data for 20 s, and a spike detection algorithm is applied to the signal. If there is a spike detection that exceeds a given threshold (in our case, $\text{SNR} > 3$ and $\text{spikes/s} > 5$), the electrode is fixed to that position and the hydraulic fluid pressure is reset to atmospheric pressure.

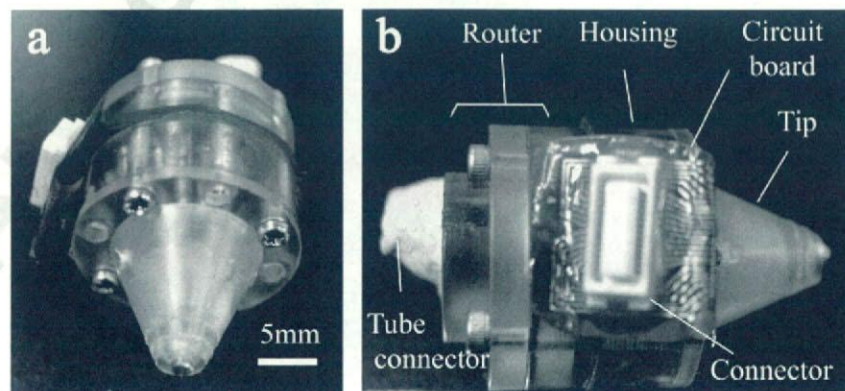


Fig. 3. Photographs of our microdrive. (a) Bottom view: The guide tube array is extended about 1.5 mm from the housing tip to make contact with the dura, (b) Side view: The router, flexible circuit board, housing, and tip are fixed together with screws. A pump connected to the tube moves the electrodes by hydraulic pressure. Its diameter is 23.5 mm, its height is 37 mm, and its weight is 15 g.