

2.4. Electrode implantation

The devices were implanted in Wistar rats. We used them to record activity in the cerebral cortex, so each device was implanted on a rat's M1 area. The animals were anesthetized using isoflurane (2–3%) and maintained in a reflexive state throughout the surgical procedure. Each animal was attached to a standard stereotaxic frame, and three stainless steel bone screws were inserted into the skull. A craniotomy (approximately 3 mm) was performed over the target cortical area, and the dura was scarred using a 30-G needle. The assembled device was carefully lowered, until the electrode tip was in contact with the dura. The rest of the hole was covered by a spongel[®], and the device was fixed to the skull with dental cement.

All experiments were performed in accordance with guidelines provided by the Animal Experiment Committee of the University of Tokyo.

3. Result

3.1. Basic performance evaluation

We first checked for possible deformations of the signal due to the use of hydraulic fluid as part of the electrical circuit. The impedance of the hydraulic fluid is between 10 k Ω and 25 k Ω at 1 kHz. We then recorded neural signals from the rat's M1 area, using typical acute recording techniques. The signal from a single electrode was branched into two different circuits. One passed directly from the electrode to the amplifier, and the other was connected to our microdrive before being amplified (Fig. 4). By comparing these two signals, we could evaluate the deformation of the waveform caused by using conductive fluid used as part of the electrical circuit.

Next, we evaluated the accuracy of our electrode position calculation. The electrode was inserted into a model "brain" made from agar, which imitates the brain's elasticity. Fig. 5 depicts the trajectory of the electrode tip in terms of its measured and calculated positions at each 50 μm step. The position of each electrode was measured using a laser sensor, and its estimated position was calculated using Eq. (1). It can be seen that the calculated position traces the measured position with an error of only 50 μm . We also attempted to control the electrode's backward motion, but due to the nonlinear behavior of the pressure the electrode sometimes leapt back and the position calculation failed. We were able to pull back the electrode by more than 250 μm , however.

3.2. Recording

All experiments were performed on rats (Wister males with weights between 280 g and 320 g). We began recording two days after the surgical procedure. Prior to recording, a connector and hydraulic tube were attached to the device. In general, the presence of the device and recording apparatus did not have any ill effects on the behavior of the rats. Positioning of the electrode was automatically carried out as described in Section 2.3. The researcher thus did not need to touch the rats, and all recording

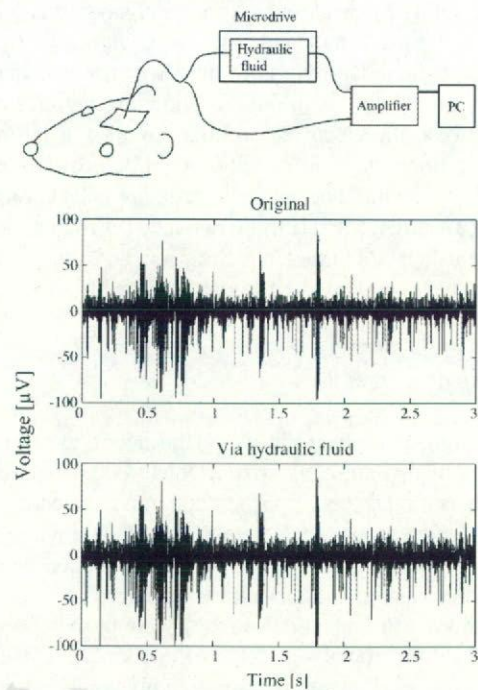


Fig. 4. The signal from a single electrode, branched into two different circuits. One was directly connected to an amplifier, and the other was amplified only after the signal passed through the hydraulic fluid. Both signals were recorded simultaneously and compared. The degree of correlation between the two signals was 0.98.

was done while the rats were awake. On each experimental day, the automated positioning procedure was applied to 5–8 channels and we could find neural signals in most cases. However due to reasons such as electrode drift or neuronal death, occasionally signals were lost. When this happened we were generally able to record signals from another neuron by moving the electrode tip, as depicted in Fig. 6. In one remarkable trial, we recorded good signals from 10 separate channels, although at the beginning of the day we started with recording data from

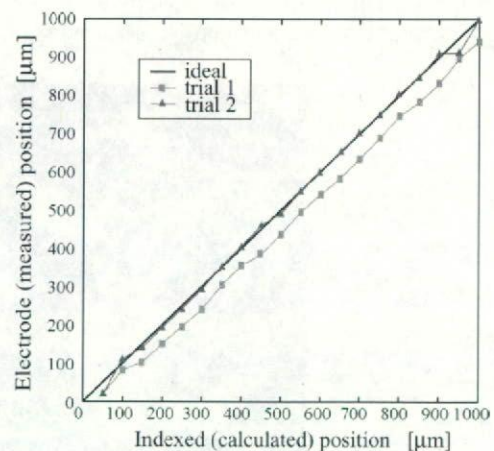


Fig. 5. The accuracy of electrode positioning. As the electrode tip is slowly driven forward, its calculated position (x-axis) is compared to its directly measured position (y-axis) at each stopping point. The calculated position traces the measured position with an error of only 50 μm .

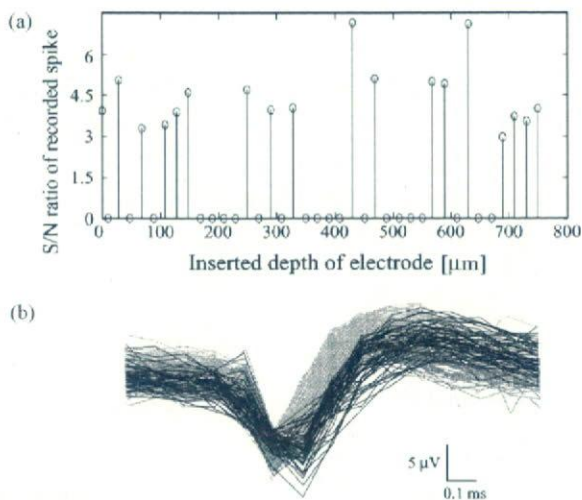


Fig. 6. (a) The S/N ratio of recorded spikes is plotted against the depth of the measuring electrode. By inserting an electrode deeper into the brain, we were usually able to find another neuron and restore the neural signal. Spikes with a S/N ratio less than 3 were neglected, (b) A clustered spike wave form, after automatic positioning.

only one or two channels. By the end of this recording period, electrolysis between the electrode guides and the flexible circuit could be observed in four of these channels. In addition, some of the electrodes appeared to have become stuck due to tissue fluid entering the guide tubes and solidifying. Nonetheless, for about two weeks we were able to record well-isolated signals from an average of five channels per device.

4. Discussion

We have described a microdrive which is capable of simultaneously recording signals from a large number of neurons in the cerebral cortex of waking animals (rats). The size and weight of the device did not affect the behavior of the rats. Some novel techniques were implemented in the design of our multi-electrode array; each such technique is examined in turn below.

4.1. Conductive fluid as a circuit element

Conductive fluid was used as a part of the electrical circuit connecting the electrodes. As seen in Fig. 4, this caused a negligible amount of signal distortion. A high degree of correlation was obtained between the direct recordings and those recordings which passed through the fluid. The signal was sufficient for spike detection in both cases.

Furthermore, our results have demonstrated that certain common wiring problems can be resolved by using conductive fluid in the electrical circuit. This is important because as the number of channels increases, and the implants diminish in size, it becomes more and more difficult to wire all the electrodes to a single connector.

Some problems remain for the long-term use of this technique, however, such as electrolysis and the relatively high impedance of fluid compared to wire. The high impedance did not cause any major problems in our experiments, but in some

noisy situations it could be problematic. This could be resolved by attaching an amplifier to the head or shielding the whole device. Electrolysis was observed in some of the channels, but it was found to be due to cracks in the gold coating. Thus, plating the electrodes with gold or some other metal should eliminate the problem.

4.2. Electrode placement

The amount of fluid and the supplied fluid pressure were used to estimate the position of the electrodes. The parameters used to estimate the position were calculated from the pressure prior to the onset of electrode movement. By recalculating these parameters at each session, any differences due to the channel and fluid state could be alleviated. As a result, we achieved an error of only 50 μm on our position estimates. The biggest portion of this error was due to offsets in the parameters of the calculation. In other words, the relative positioning error (which is more important) is smaller than the absolute positioning error. Thus, while the calculation is not perfect, we believe that this device is sufficiently accurate and precise.

At the moment, the most significant disadvantage of our microdrive is that it cannot pull the electrode back with enough control. When we applied suction to the hydraulic fluid, the electrode leapt back and its position became unmeasurable. In this case, however, we were still able to search for and find a signal even though the position of the electrode had become ambiguous. This sudden motion may be due to bubbles in the hydraulic fluid, or to friction between the stainless steel guide and the electrode housing, especially at the O-ring. This problem could be rectified by changing the hydraulic fluid to another conductive fluid, for example hydrargyrum, which will prevent bubble contamination. One could also use fluorine-coated O-rings to decrease friction. However, the risk of leakage and the cost of the driver should be considered in such design changes.

4.3. Recording quality

When controlling an electrode, in most cases we were able to detect a signal before the electrode overran its desired depth range. Nonetheless, under simultaneous recording only a small number of channels were functional at any given time. This may be due to mechanical interactions between the closely spaced electrodes (the tip separation is about 350 μm). Another possibility is that recordable neurons are dragged away by the movement of nearby electrodes. Also note that our microdrive uses scissor-cut electrodes, which cause more mechanical stress than finely tapered electrodes. In fact, it was observed that repositioning one electrode often degraded or destroyed the signal in other channels. This mechanical interaction can usually be rectified by precise control, but our microdrive is clearly lacking in precise backwards control. Our proportion of recordable channels was therefore relatively low compared to the result of Wilson and McNaughton (1993), although differences of the target brain area should also be considered (for example, the hippocampus has a higher density of neurons than the cortex).

Table 1
Independent controlled microdrive

Author (vendor)	Ch.	Weight [g]	Size ($L \times W \times H$) [mm]	Depth [mm]	Automation	Motion system	Precision (1/8 turn) [μm]
deCharms et al. (1999)	49	20	26 × 22 × 16	5	×	Pin push	^a
Venkatachalam et al. (1999)	6	1.4–3.3	Ø 5.85 × 14.5	3	×	Gear	20
Fee and Leonardo (2001)	3	1.5	Ø 6 × 17	3.5	○	Synchronous motor	^a
Cham et al. (2005)	4	40	Ø 28.23 × ^a	5	○	Piezoelectric actuator	1
Neuralynx [®]	28	16.9	Ø 37.5 × 52.8	10.5	×	Gear	20
Our microdrive	22	15	Ø 23.5 × 37	4	○	Hydraulic	50

Comparison of independently controlled and (semi-)implantable drivers.

^a Not mentioned.

To summarize, a high recording quality can be obtained using tapered electrodes by means of precision control, as discussed in Section 4.2.

4.4. Automatic control

One advantage of our microdrive is its implementation of an automatic control algorithm. Using our hydraulic multi-electrode array, it is possible to independently and automatically reposition all the electrodes during the actual recording period. In all these experiments, the rats were awake with no limitations on their movement. This freedom is greatly advantageous to research on task-related neurons.

In this paper, we used a simple algorithm based on SNR and spike count, and demonstrated that it could be used for automatic positioning. Other methods could also be implemented in this device. However, there seems to be no consensus among researchers on the best positioning algorithm. More sophisticated algorithms, such as those using a stochastic model or regression model, are expected in future research.

4.5. Advantage of the microdrive

For the sake of comparison, five other independently controllable microdrives are listed in Table 1 as well as our own invention. Each of these microdrives also adjusts its electrodes independently and automatically. Although this hydraulic system is somewhat lacking in precise control compared to the other methods, it has many balancing advantages. In a hydraulic system, the electrode density is limited only by the spacing of guide tubes; this is a remarkable advantage when the number and density of electrodes increases. In addition, the cost of this system is lower and its weight is less than that of motor-based systems. Our microdrive achieves a nice balance between electrode density, cost, and weight, and future extensions.

We succeeded in chronically recording neural signals from waking rats. Although it was difficult to record simultaneously from all channels, it was often possible to record clear neural activity from a large percentage of electrodes when each electrode was individually positioned. These results are a first step towards the permanent monitoring of neural activity, which of course would dramatically improve the quality of the data. We believe that this automated microdrive is a powerful research tool, which avoids many arduous tasks such as frequent repositioning to find and maintain high-quality neural signals.

Acknowledgments

We would like to thank the staff of "The Central Workshop, Institute of Industrial Science, The University of Tokyo" for developing the implant components. This work was partially supported by Grant-in-Aid for Scientific Research (A) 17206022, from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology of Japan; and also by, Grant-in-Aid for Research on Advanced Medical Technology H17-Nano-010 from the Ministry of Health, Labour and Welfare of Japan.

References

- Branner A, Normann RA. A multielectrode array for intrafascicular recording and stimulation in sciatic nerve of cats. *Brain Res Bull* 2000;51(4):293–306.
- Cham JG, Branchaud EA, Nenadic Z, Greger B, Andersen RA, Burdick JW. Semi-chronic motorized microdrive and control algorithm for autonomously isolating and maintaining optimal extracellular action potentials. *J Neurophysiol* 2005;93:570–9.
- Chapin JK, Moxon KA, Markowitz RS, Nicolelis MAL. Real-time control of a robot arm using simultaneously recorded neurons in the motor cortex. *Nat Neurosci* 1999;2(7):664–70.
- Collias JC, Manuelidis EE. Histopathological changes produced by implanted electrodes in cat brains. *J Neurosurg* 1957;14(3):302–28.
- deCharms RC, Blake DT, Merzenich MM. A multielectrode implant device for the cerebral cortex. *J Neurosci Methods* 1999;93:27–35.
- Donoghue JP. Connecting cortex to machines: recent advances in brain interfaces. *Nat Neurosci* 2002;5(Suppl.):1085.
- Fee MS, Leonardo A. Miniature motorized microdrive and commutator system for chronic neural recording in small animals. *J Neurosci Methods* 2001;112:83–94.
- Keating JG, Gerstein GL. A chronic multi-electrode microdrive for small animals. *J Neurosci Methods* 2002;117:201–6.
- Kipke DR, Vetter RJ, Williams JC, Hetke JF. Silicon-substrate intracortical microelectrode arrays for long-term recording of neuronal spike activity in cerebral cortex. *IEEE Trans Neural Sys Rehabil Eng* 2003;11(2):151–5.
- Kralik JD, Dimitrov DF, Krupa DJ, Katz DB, Cohen D, Nicolelis MA. Techniques for long-term multisite neuronal ensemble recordings in behaving animals. *Methods* 2001;25:121–50.
- Nichols AM, Ruffner TW, Sommer MA, Wurtz RH. A screw microdrive for adjustable chronic unit recording in monkeys. *J Neurosci Methods* 1998;81:185–8.
- Polikov VS, Tresco PA, Reichert WM. Response of brain tissue to chronically implanted neural electrodes. *J Neurosci Methods* 2005;148:1–18.
- Riehle A, Grun S, Diesmann M, Aertse A. Spike synchronization and rate modulation differentially involved in motor cortical function. *Science* 1997;278:1950–3.
- Rutten WL. Selective electrical interfaces with the nervous system. *Annu Rev Biomed Eng* 2002;4:407–52.
- Serruya MD. Instant neural control of a movement signal. *Nature* 2002;416(14):141.

- Swadlow HA, Bereshpolova Y, Bezdudnaya T, Cano M, Stoelzel CR. A multi-channel, implantable microdrive system for use with sharp, ultra-fine "reit-boeck" microelectrodes. *J Neurophysiol* 2005;93:2959–65.
- Taylor DM, Tillery SIH, Schwartz AB. Direct cortical control of 3d neuroprosthetic devices. *Science* 2002;296:1829–32.
- Venkatachalam S, Fee MS, Kleinfeld D. Ultra-miniature headstage with 6-channel drive and vacuum-assisted micro-wire implantation for chronic recording from the neocortex. *J Neurosci Methods* 1999;90:37–46.
- Wessberg J, Stambaugh CR, Kralik JD, Beck PD, Laubach M, Chapin JK, et al. Real-time prediction of hand trajectory by ensembles of cortical neurons in primates. *Nature* 2000;408:361–5.
- Wilson MA, McNaughton BL. Dynamics of the hippocampal ensemble code for space. *Science* 1993;261(5124):1055–8.

Author's personal copy

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

非会員 深山 理* 非会員 谷口 徳恭**
正員 鈴木 隆文* 非会員 満洲 邦彦*

Estimation of Locomotion States of a Rat by Neural Signals from the Motor Cortices Based on a Linear Correlation Model

Osamu Fukayama*, Non-member, Noriyuki Taniguchi**, Non-member, Takafumi Suzuki*, Member,
Kunihiko Mabuchi*, Non-member

We are developing a brain-machine interface (BMI) called "RatCar," a small vehicle controlled by the neural signals of a rat's brain. An unconfined adult rat with a set of bundled neural electrodes in the brain rides on the vehicle. Each bundle consists of four tungsten wires isolated with parylene polymer. These bundles were implanted in the primary motor and premotor cortices in both hemispheres of the brain. In this paper, methods and results for estimating locomotion speed and directional changes are described. Neural signals were recorded as the rat moved in a straight line and as it changed direction in a curve. Spike-like waveforms were then detected and classified into several clusters to calculate a firing rate for each neuron. The actual locomotion velocity and directional changes of the rat were recorded concurrently. Finally, the locomotion states were correlated with the neural firing rates using a simple linear model. As a result, the abstract estimation of the locomotion velocity and directional changes were achieved.

キーワード：ブレインマシンインターフェース、慢性神経計測、大脳皮質運動野、ラット

Keywords: brain-machine interface, chronic neural recording, motor cortex, Wistar rat

1. はじめに

我々は、ラットを用いた Brain-Machine Interface (BMI) として、RatCar と呼ぶシステムの開発を行っている。これは、ラットの運動中枢に対して慢性的に電極を埋め込み、ラット自身の搭載された車体を、計測された神経信号の発火パターン情報を基に、ラットの意図通りに動作させることを目指すものである。

このような、生体と機械とを直接接続する試みである BMI は、内外で 1990 年代後半より活発に研究が行われており⁽¹⁾、これまでにサルを実験対象として、運動野から計測された信号に基づく腕部の軌跡推定⁽²⁾や、ロボットアームの操

作⁽³⁾等が実現されてきた。また、医用工学技術の進展とコンピュータの高速化により、より信頼性の高い計測技術や複雑なアルゴリズムを用いた、ヒトを対象とする臨床応用の動きも既に見られている。

これらの多くは、生体外にあるデバイスの制御あるいは生体の意図を読み取ることそのものを目的としている。一方、我々のシステムは、何らかの意図を有して神経信号を発する源であるラットが、車体という BMI システムの内部に組み込まれ、全体が一体として移動する点で特徴的である。その結果、ラットには床面と身体の位置関係の変化による直感的な感覚フィードバックが呈示されることとなり、自身の移動に関する意図が実現されたことを、より明確に認識できるものと考えられる。

このとき、ラットの脳と BMI との相互作用には、大きく分けて 2 種類のシナリオが考えられる。一つは、ラットの脳が大きく可塑的变化を生じ、車体を車体として特に意識することなく制御できる可能性である。この場合、ラットが車体ごと自由に移動できることを容易に理解できるよう、適切な訓練方法を構築する必要がある。例えば、当初は車体の移動を前後進に限定するなど、段階的に車体制御

* 東京大学大学院情報理工学系研究科
〒113-8656 東京都文京区本郷7-3-1
Graduate School of Information Science and Technology, The University of Tokyo

** 東京大学大学院医学系研究科
〒113-0033 東京都文京区本郷7-3-1
Graduate School of Medicine, The University of Tokyo
7-3-1, Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-0033

の難易度を増していく方法等が考えられる。また一方、ラットが車体による身体の移動を、自身の四肢によるものと錯覚し、何ら脳の状態に変化を来さないことも起こりうる。ここでは神経信号からの意図の抽出に、より正確性が求められるが、生体側の学習に依存せず、訓練なく使用可能なBMIを構築できる可能性を有している。

いずれにせよ、実際にBMIを用いた場合に生じる現象は、上述した先行研究においても必ずしも明らかになっておらず、脳科学全般から新たな知見が求められている。また、神経信号によって制御される能動義手や電動車椅子の開発といった福祉工学の視点からは、システムの開発を通じた安全性の向上、効率の良い信号計測・処理手法の確立、そしてBMIの脳に及ぼす影響評価の実現は必須の課題である。筆者らは、RatCarシステムの開発とこれを用いた実験系の構築を通じ、これらの問題にも解決策を示していきたいと考えている。

本稿では、RatCarシステム開発の基礎段階として、神経信号から歩行速度および歩行方向の変化を導くモデルとその評価実験系を示す。さらに、実際に推定を行った結果を踏まえ、推定精度の向上と実験系の改善可能性について考察する。

2. 神経信号計測

Fig. 1にRatCarシステムの全体像を示す。ラットから計測された神経信号は生体アンプを介して増幅およびフィルタリングされ、A/D変換器を通じてコンピュータに取り込まれる。この信号から個々の神経細胞に対応する発火の頻度を算出し、これらと歩行状態とを相関づけるモデルに基づき、車体動作を決定する。

〈2・1〉 神経電極 神経信号の計測には自作のワイヤ電極を用いた。個々のワイヤ電極は、直線状の $\phi 50 [\mu\text{m}]$ の

タングステン線から成り、これを電解研磨した後にバリレン重合体によって厚さ約 $5 [\mu\text{m}]$ の絶縁コートを施し、さらにその先端付近を切断して計測点を作成した。この電極を生理食塩水に浸し、 1kHz 、 20mV の正弦波電圧を印加した時、計測点から十分遠方のリファレンス点までのインピーダンス（電極インピーダンス）は、およそ $100 [\text{k}\Omega]$ であった。

〈2・2〉 電極埋込 上述のワイヤ電極を、注射針を切断したガイドチューブによって4本ずつ束ねたものを2組作成し、それぞれ左脳、右脳の大脳皮質運動野に刺入した。このとき、ラット脳定位アトラス⁽⁴⁾、齧歯類の運動野機能マッピング⁽⁵⁾⁽⁶⁾に基づき、後肢から前肢に対応する大脳皮質一次運動野、およびその近傍の運動前野を埋め込み部位とした（Fig. 2）。ただし、この領域には直径の大きな血管が多数存在し、これらへの接触を回避するため、実際の電極の刺入においては最大 $100 [\mu\text{m}]$ 程度の位置ずれが生じ、正確な位置決めは困難であった。

一方、頭蓋骨にはステンレス製M2ネジを計4箇所埋め込み、これらをアンカーとして歯科用接着剤を用い、電極を固定した。最後に、電極から信号を外部に伝送するための着脱式コネクタを接着し、頭部皮膚を縫合した。これらの作業はインフルランガスを用いた麻酔下において、東京大学動物実験委員会の定めるガイドラインに準じて行われた。

〈2・3〉 信号取込 次に、神経電極から得られた信号を、日本光電社製の生体アンプSS-1960によってフィルタリング（ $500 [\text{Hz}] - 3 [\text{kHz}]$ ）および増幅し、 $10 [\text{kHz}]$ サンプリングのA/Dボード（National Instruments DAQCard-6024E）を介してコンピュータに取り込んだ（Fig. 3）。ここで、増幅率は概ね10万倍としたが、信号および雑音による出力値飽和、S/N比等に応じて条件を変更した。我々は各計測点毎に神経発火弁別を行い、また発火頻度情報の

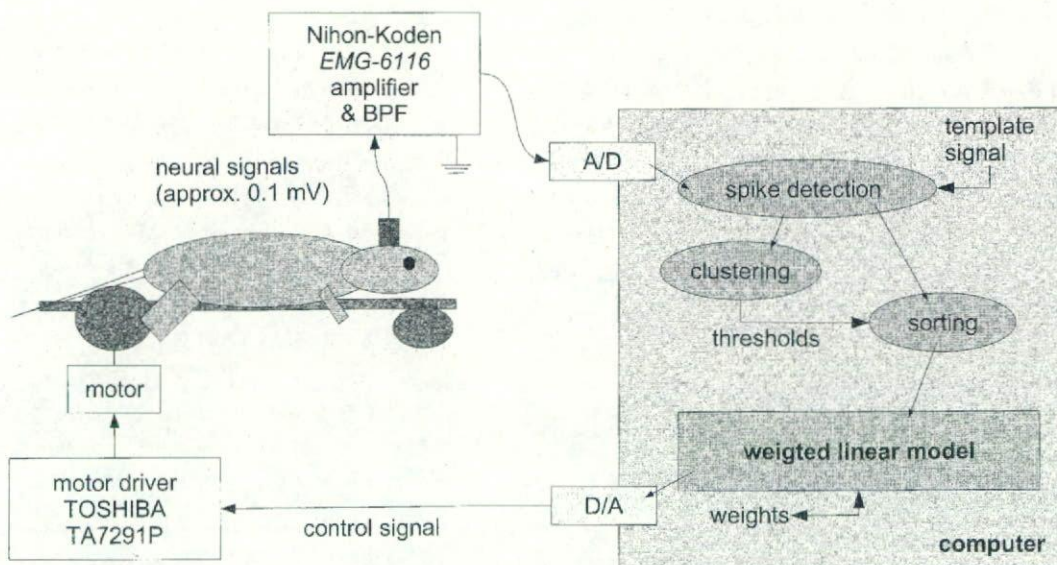


Fig. 1. A block diagram of the 'RatCar' system

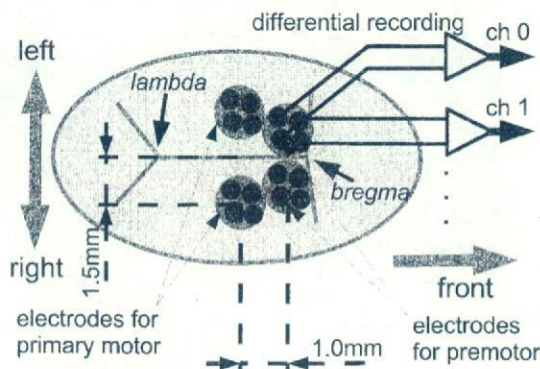


Fig. 2. Alignment of electrodes on the skull

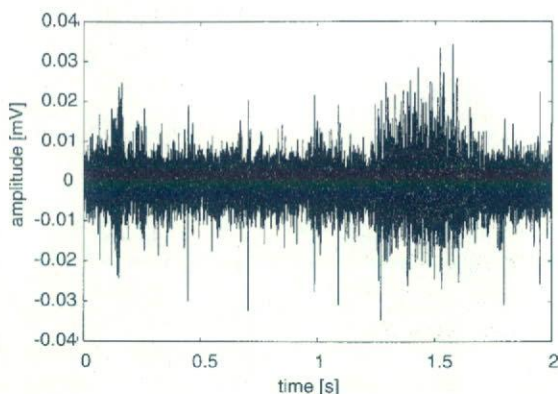


Fig. 3. A sample signal acquired from the motor cortex

みに着目するため、ここで増幅条件が試行・チャンネルによって異なることは以後の実験に対して本質的影響を与えないと考えられる。

(2・4) 発火弁別 筆者らの電極を用いて計測された信号は、複数の神経細胞に由来し、多様な電位差からなるスパイク状の発火が入り交じったものであった。そこで、まず信号に典型的なスパイク波形をテンプレートとするマッチングをかけ、S/N比の改善、動作等に伴うアーチファクト除去を行った。その上で、同一の神経細胞から生じた神経発火は同程度のスパイク高さを有するものと仮定し、テンプレートとの相関信号の局所ピーク値を混合正規分布(GMM)に従うよう分類を行なった。ここでは、GMMのパラメータ同定にEMアルゴリズム⁽⁷⁾を用いた。

3. 歩行状態推定

(3・1) 線形相関モデル 運動野の神経信号が発火によって表現する情報には、神経末端に存在する特定の筋肉の活動度、あるいは、より高次の行動意図など様々なものが仮説として提案されているが、未だ明確な結論は得られていない。そこで、筆者らは運動野に対して明示的に生理学的機能を仮定することなく、神経信号の発火パターンと歩行状態量との相関関係を表すモデルを採用した。さらに、計算量の軽減や、必要に応じた拡張の容易性を考慮し、ま

ずは両者の間に線形時不変な相関を仮定し、これによって実現可能な推定について検討を行った。

筆者らは、このモデルを以下のように導出した。

はじめに、処理時刻 t における神経ユニット n ($n = 1, \dots, N$; N は検出された神経ユニットの個数) の発火頻度を $x_n(t)$ とし、同様に処理時刻 t における歩行状態を表す量を $v(t)$ とする。

次に、 $x_n(t)$ と $v(t)$ との関係は、

$$v(t) = \sum_{n=1}^N a_n x_n(t) \dots \dots \dots (1)$$

として線形モデルによって表す。ただし、 a_n は神経ユニット n の発火頻度 $x_n(t)$ が歩行状態 $v(t)$ に対して有する相関の度合いを表す係数と考えることが出来る。

ここで、 $t = 0, \dots, T-1$ の範囲で式(1)を行列表記すると、

$$\begin{aligned} \vec{a} &= (a_1, a_2, \dots, a_i, \dots, a_n)^T, \\ \vec{v} &= (v(0), v(1), \dots, v(T-1))^T, \\ X &= \begin{bmatrix} x_1(0) & x_2(0) & \dots & x_N(0) \\ x_1(1) & x_2(1) & \dots & x_N(1) \\ \vdots & \vdots & & \vdots \\ x_1(T-1) & x_2(T-1) & \dots & x_N(T-1) \end{bmatrix} \end{aligned}$$

として、

$$X\vec{a} = \vec{v} \dots \dots \dots (2)$$

となる。

このとき、検出された神経ユニット数 N に比べて十分に多くの試行によって X, \vec{v} を実測すれば、重み係数 \vec{a} は一般化逆行列 $(X^T X)^{-1} X^T$ を用いて、

$$\vec{a} = (X^T X)^{-1} X^T \vec{v} \dots \dots \dots (3)$$

と同定できる。このような \vec{a} に対して、(2) は歩行状態 \vec{v} の最小自乗推定を与える。

このモデルは、ラットの歩行に関する状態量と、神経発火とを相関づけ可能な構造となっている。ここでは特に、歩行速度と方向変化の判別値について、本モデルを用いて推定した。

(3・2) 歩行速度 筆者らは Fig. 4 に示す小動物向けの運動器具を用いて神経信号と歩行速度の同時計測を行い、重みベクトル \vec{a} の同定と歩行速度 \vec{v} の推定を行った。この運動器具は、円柱状の車輪が上部でベアリングによって支持された構造であり、内部でラットが歩くにつれて自由に回転できるものであった。筆者らはこの回転速度をロータリーエンコーダによって計測し、これをラットの歩行速度とした。この実験系により、歩行距離に関わらずラットは器具の中央付近に留まるため、頭部から計測系までの距離を常に短く保つことが可能となった。

以上の系において、時間フレーム幅 10 ms, 100 ms, 200

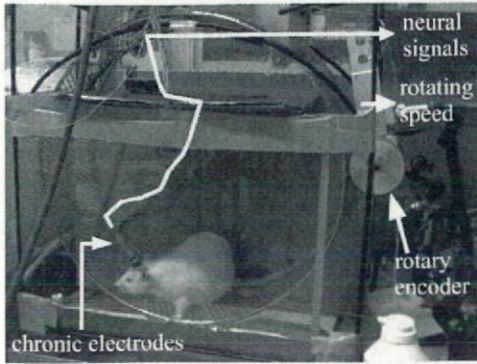


Fig. 4. A rat in an exercising wheel. The wheel rotates freely in both directions

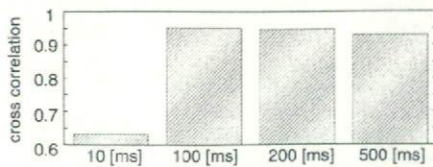


Fig. 5. Maximum value of cross correlation between estimated and actual locomotion velocity of a rat for 10 ms, 100 ms, 200 ms, 500 ms time width of a frame

ms, 500 ms 毎の神経発火頻度を用いて、速度の推定を試みた。ここでは、ラットが安定して歩行を継続した約 30 秒の区間のうち、前半部分 (約 15 s) を用いて重みベクトル \vec{a} を同定した。次に、後半部分 (約 16 s) の発火頻度をこのモデルに与えて得た推定歩行速度 \vec{v} を実測値と比較し、同定されたモデルが新規に計測された神経発火頻度に対しても適用可能であることを検証した (Fig. 8)。

その結果、処理時間幅が短い場合には、推定速度の分散が非常に大きく (Fig. 8(a)), またこれを平滑化した場合でも実測値との間にバイアスが生じることが分かった。一方、処理時間幅が長すぎる場合 (Fig. 8(d)) には、実測値に対する十分な追従が出来なかった。Fig. 8 に示す例では、時間フレーム幅 100 ms に対して実測値との相互相関が最大となり、他の試行についても同様の傾向が見られた (Fig. 5)。

さらに全体としては、実際の歩行速度の急激な変化には十分追従できていないものの、歩行の開始終了のタイミングを表現する程度の情報は十分に得られ、実測値との相関も見られることが確認された。

(3・3) 歩行方向変化 一方、歩行方向の変化と神経信号との同時計測には Fig. 6 に示す実験装置を用いた。基本的な構造は、生理学実験で汎用される Y maze と同様であり、ラットの体幅程度の直線通路が Y の字状に分岐したものである。ラットは 3 方向の経路のうち 1 つから進入して分岐点を通り、左右いずれかの枝の末端に至る。各枝の入口にはラットを検知するセンサを設置し、ラットがセンサ上を通過する直前 1 s 間の神経信号を計測した。

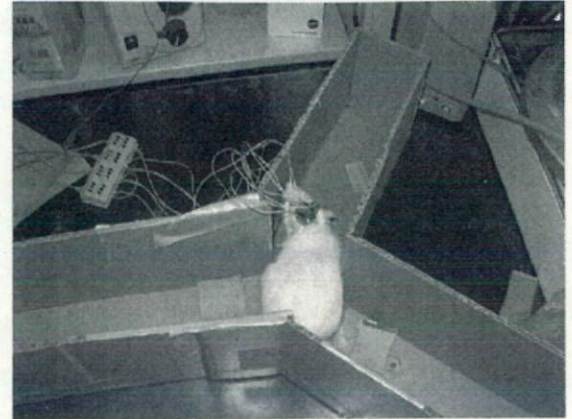


Fig. 6. A Y maze-like passage for a rat to walk through. A touch sensor is installed on the each passage near the branch point for a trigger to record nerve signals from a rat

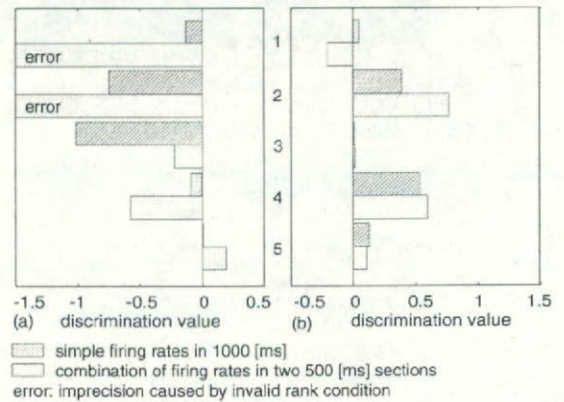


Fig. 7. Estimated values representing the turning directions of a rat (-1 for the left, +1 for the right). Trials are shown that the rat turned (a) left and (b) right

この実験系を用い、この計測区間全体にわたる神経発火の頻度から、分岐点でのラットの進路方向変化の予測を試みた。この場合、推定される出力が左または右の 2 値となるため、歩行状態量 v を

- 左に曲がる場合: $v = -1$
- 右に曲がる場合: $v = +1$

として定義した。

本稿ではさらに、神経信号計測区間を 500ms 毎の 2 区間に分離し、前半に対応する歩行状態量を $v = 0$ 、後半を $v = \pm 1$ とすることで、方向変化に無関係な発火パターンの影響を低減し、判別性能の改善を試みた。

この実験では、ラットが左折した試行 7 例、右折した試行 5 例を用い、モデルの重みパラメータを同定した。次に、その後に行った計 10 試行 (左折 5 例、右折 5 例) について、左右方向の判別値を推定した。

Fig. 7(a) に左折試行、(b) に右折試行を示す。理想的にはそれぞれ $-1 / 1$ を示すべき判別値は、全体的に絶対値の

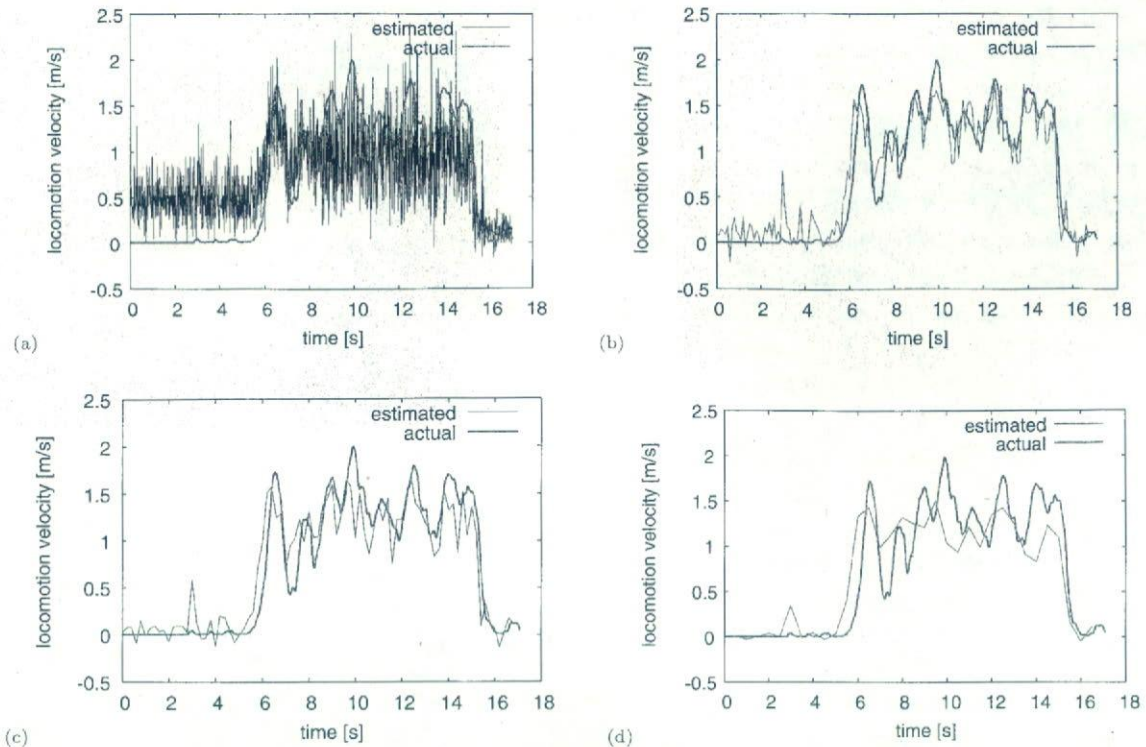


Fig. 8. Estimated and actual locomotion velocity of a rat for (a) 10 ms, (b) 100 ms, (c) 200 ms, (d) 500 ms time width of a frame

小さな値を示したが、正負の傾向としては右左折に応じて分離されていた。

一方、500 ms の 2 フレームに分割した発火頻度分布を用いる効果については、判別性能の改善には必ずしも寄与せず、計算誤差の蓄積による異常値を与えるケースも見られた。

4. 考 察

〈4・1〉電極埋め込み 神経電極の埋め込みに際し、特に運動前野は比較的大脳の中心線に近い部位に存在するため、埋め込み目標部位付近の血管から出血を生じたり、電極が血管組織を貫通できずに彎曲してしまうケースが見られた。これらはいずれも脳に悪影響を与え、浮腫の誘発などによって電極位置のずれの原因となる。脳の任意の部位に確実に電極を配置・固定する手技の開発と共に、電極そのものについても脳組織や血管を傷つけにくい構造を採用する等の工夫が必要である。

〈4・2〉歩行状態推定 筆者らが用いているような、一般化した線形モデルのパラメータ同定を行う手法では、本来の計測対象である神経信号以外の信号波形までも入力として取り込んでしまう恐れがある。これを防止するためには、良好な計測環境の構築と、神経以外の情報を内包しにくい特徴量を選択する必要がある。テンプレートマッチングや混合正規分布を用いた自動的な発火検出・分布により、計測データへの動作アーチファクトや環境雑音の影響を軽減することができた。一方、混合正規分布に用いる Gaussian

数や神経発火として判定する発火頻度、発火電位の条件など、人為的な要素も残されており、今後ともこれらの自動設定化を進めていきたい。

また、この手法では、検出された神経ユニットが具体的に運動発現のどのような機序に参与するのか明らかにできない。しかし、逆にこれらのメカニズムが未解明あるいは同定不可能な場合においても、BMI コントローラとして適用可能である点は有力な長所である。

今回得られた歩行速度推定の結果からは、時間フレーム幅 100 ms での推定において、相互相関値が最大となった。時間フレーム幅による推定精度の違いは、過去に遡って歩行速度の決定に影響が生じる時間の長さに関連しているものと思われるが、その機序を明確とするに足る再現性は得られなかった。

一方、歩行方向変化の判別値については、ラットが方向を変化させる瞬間が必ずしも明らかでないことから、1 s 間と長めの間隔を用いた。しかしこの期間内には、明示的な方向変化以外にも、姿勢の維持や経路に沿って歩くための微調整が絶えず行われていると考えられ、判別誤差が蓄積する要因となっている。また、本稿での実験方法では、車体の方向変化のタイミングが外的に与えられる場合には判別が可能であるものの、時間的に逐次変化する方向変化の推定には十分に対応できているとは言いがたい。これを実現するモデルの構築には、ラットの姿勢、歩行方向を連続的に実測する必要があり、光学的記録方法などの採用を検討する必要があるだろう。

(4.3) 評価実験系 歩行速度推定を目的とした動物用運動器具を用いた実験では、ラットが連続歩行する間の神経信号と歩行速度とを効率的に収集することが可能となった。しかしその一方、個体によって器具内での歩行の有無や様子に大きな差が見られ、統一された実験条件でのデータ収集には非常に多くの試行を行う必要があった。また、この実験系ではラットの絶対座標は器具の底面付近に留まるため、加減速感による体性感覚呈示がなされていない。より大型の実験装置を用い、ラットの物理的な行動可能面積を拡大する必要があると考えられる。

同様に、Y字状経路を用いた歩行方向判別においても、ラットが出発点から分岐を経て、速やかに終点まで到達して初めて1試行として成立し、試行数の増加は困難であった。特に現状においては、S/N比が良く推定に適した神経信号が長期間安定して計測できる例は少ないため、実験の効率化は緊急の課題である。学習や動機付けの導入により、自発的にラットを安定して歩行させ、計測された神経信号を確実に試行数の増加に結びつけていきたい。

5. おわりに

本稿では、RatCarシステムの車体動作決定に必要な、神経信号を計測し、各神経細胞の発火頻度に応じて歩行状態を推定する手法を示した。その結果、推定値の個体間でのばらつきや実測値との誤差は大きいものの、簡易な線形モデルを用いて両者の大まかな相関関係を明らかとし、これを歩行状態の推定に用いることが確認された。

謝 辞

本研究の一部は、厚生労働省科学研究費補助金(H17-ナノ-010)、文部科学省科学研究費補助金(基盤研究(A)課題番号17206022)、及び文部科学省科学研究費補助金特定領域研究(「身体・脳・環境の相互作用による適応的運動機能の発現—移動知の構成論理解—」)の助成を受けて行われた。ここに記して謝意を表す。

(平成19年2月19日受付, 平成19年6月11日再受付)

文 献

- (1) J.K. Chapin, K.A. Moxon, R.S. Markowitz, and M.A. 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)
- (2) J. Wessberg, C.R. Stambaugh, J.D. Kralik, P.D. Beck, M. Lauback, 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) G. Paxinos and C. Watson: "The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates, Compact Third Edition", Academic Press (1997)
- (5) R.D. Hall and E.P. Lindholm: "Organization of Motor and Somatosensory Neocortex in the Albino Rat", *Brain Research*, Vol.66, pp.22-38 (1974)
- (6) S.P. Wise and J.P. Donoghue: Motor cortex of rodents, In

Motor Cortex, Plenum Press (1984)

- (7) G. Celeux and G. Govaert: A classification EM algorithm for clustering and two stochastic versions, *Computational Statistics & Data Analysis*, Vol.14, pp.315-332 (1992)

深 山 理 (非会員) (非会員) 1981年生。2003年3月東京



大学工学部計数工学科卒業。2005年3月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修士課程修了。現在、同専攻博士課程在学中。Brain-Machine Interfaceの開発研究に従事。IEEE、計測自動制御学会学生会員。

谷 口 徳 恭 (非会員) (非会員) 1980年生。2003年3月共立



薬科大学薬学部薬学科卒業。2003年5月薬剤師取得。2005年3月東京大学大学院医学系研究科医科学専攻修士課程修了。現在、東京大学大学院医学系研究科生体物理医学専攻博士課程在学中。神経インターフェースの研究に従事。日本神経科学会学生会員。

鈴 木 隆 文 (正員) (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。

満 洲 邦 彦 (非会員) (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。

流路を備えた神経電極のマイクロダイアリスへの応用

小竹 直樹^{*1}, 鈴木 隆文², 竹内 昌治³, 満淵 邦彦²

1 東京大学大学院工学系研究科, 2 東京大学大学院情報理工学系研究科, 3 東京大学生産技術研究所

【目的】本研究では脳内の電気生理学的および生化学的応答の同時計測を目指し、マイクロダイアリス機能を付加した多チャンネル神経プローブの開発を試みた。本発表では試作した神経プローブの設計およびその作成について報告する。

【方法】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）を用いて作ったフィルム基板上に流路を形成し、その流路の上に半透膜を製膜した。流路の一部には開口部が設けられ、その開口部の半透膜を介して神経伝達物質等の回収を可能とする。なお、本研究では半透膜として酢酸セルロース膜を用いた。流路の近傍には神経信号計測のための電極を配置した。

【結果】コネクタ部を除いたプローブ外形は幅 1.2mm, 長さは 12mm であり (図 1. A), その上に 4 つの電極と往路, 復路 2 本の流路が並んでいる (図 1. B)。流路のサイズは幅 200 μ m, 高さ 30 μ m, プローブの先端で折り返している流路の総延長はおよそ 15mm である。流路上の半透膜は回転数 3000rpm にて 30 秒間スピンコートした結果, 膜厚がおよそ 15 μ m であった。

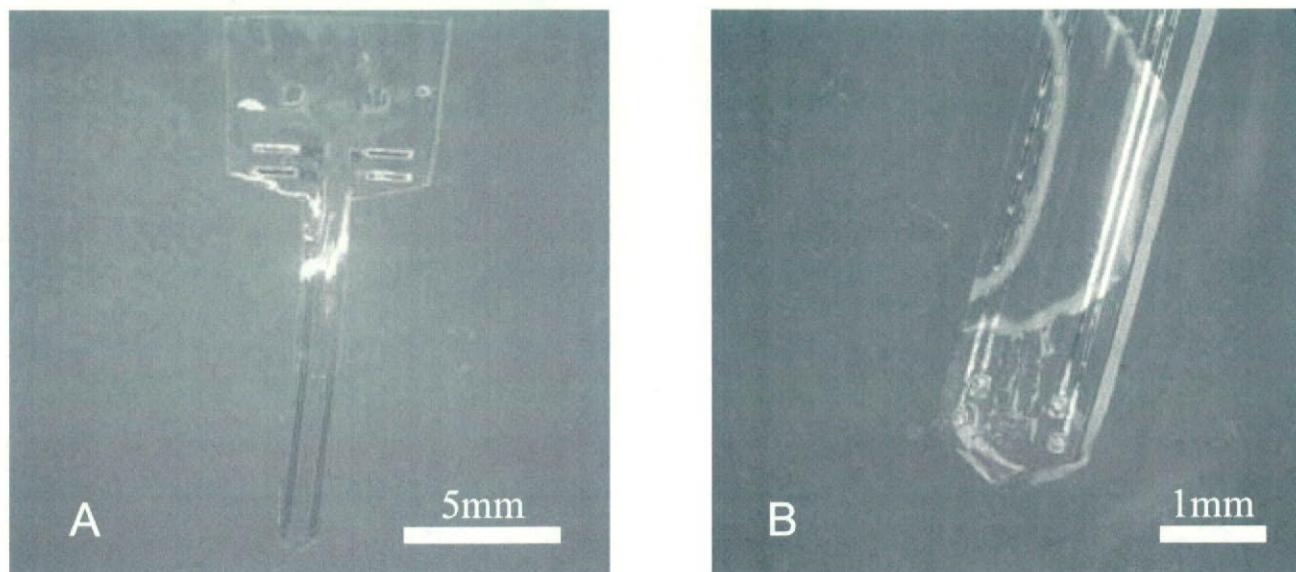


図 1. 作成した神経プローブの写真 A: プローブ全体像 B: プローブ先端部
プローブの外形は幅 1.2mm×長さ 12mm

流路を備えた神経電極のマイクロダイアリシスへの応用

小竹 直樹^{*1}, 鈴木 隆文², 竹内 昌治³, 満渕 邦彦²

¹東京大学大学院工学系研究科, ²東京大学大学院情報理工学系研究科, ³東京大学生産技術研究所

Application of Neural Probes Integrated with Fluidic Channel for Microdialysis

Naoki Kotake^{*1}, Takafumi Suzuki², Shoji Takeuchi³, Kunihiko Mabuchi²

¹Graduate School of Engineering, The University of Tokyo

²Graduate School of Information Science and Technology, The University of Tokyo

³Institute of Industrial Science, The University of Tokyo

Abstract We propose a neural probe integrated with a fluidic channel for microdialysis fabricated using MEMS technologies. This probe, which was designed to record neural signals, and to sample biochemical constituents from the area of recording, consists of four electrodes with a fluidic channel covered with semipermeable membrane. It was fabricated on a 20 μ m-thick Parylene C substrate, and semipermeable membrane was made from cellulose acetate. The fluidic channel, which was 200 μ m wide x 30 μ m high x 1.5 mm long, has windows covered with semipermeable membrane. The thickness of semipermeable membrane was about 15 μ m. We have succeeded in fabricating a concept model of the neural probe.

In this paper, we described design and fabrication of the neural probe.

キーワード: 神経電極, マイクロダイアリシス

(Neural electrode, Microdialysis)

【背景】

神経科学分野の研究における神経信号計測デバイスとして、あるい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神経電極の開発が活発に行なわれている。近年ではMicro Electro Mechanical System (MEMS) 技術を応用した神経電極の開発が提案されたことにもなつて電極の微小化、多点計測化が進み、さらには電極の多機能化も試みられてきた。

他方で、神経伝達物質遊離を無麻酔で測定する脳マイクロダイアリシス法も神経科学分野の研究を行なう上で有用な方法の一つとなっている。

これら神経活動計測に用いられる2種類のデバイスの統合は、神経活動をより詳細に、かつ低侵襲に観察するための有効なシステムになりうると考えられる。

【目的】

本研究では脳内の電気生理学および生化学的応答の同時計測を目指し、マイクロダイアリシス機能を付加した多チャンネル神経プローブの開発を試みた。なお、本研究で提案する神経プローブはこれまでに著者らが開発した柔軟神経電極や、流路を備えた柔軟神経電極における作成技術[1-3]を応用したものである。

本研究では試作した神経プローブの設計およびその作成について報告する。

【方法】

・設計概要

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) を用いて作ったフィルム基板上に流路を形成し、その流路上に半透膜を製膜した。流路の一部には開口部が設けられ、その開口

部の半透膜を介して神経伝達物質等の回収を可能とする。なお、本研究では半透膜として酢酸セルロース膜を用いた。流路の近傍には神経信号計測のための電極を配置した。これにより半透膜を介した神経伝達物質等の回収とともに、その周囲の脳神経細胞の電気的な活動を計測しうると考えられる。

・作成方法

- ① 酢酸セルロース、アセトンおよびホルムアミドを重量比で17:60:23の割合で混合する。
- ② シリコンウエハ上にパリレンCを10 μ mコートして、その上に電極および配線用の金を約300nm蒸着し、パターニングを行なう。
- ③ 厚膜レジストをコートして、パターニングを行なう。これは流路を形成するための犠牲層となる。
- ④ 二層目のパリレンCを10 μ mコートした上で、流路上の開口部の形成と電極を露出させるためにアルミマスクによる酸素プラズマエッチングを行なう。
- 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 ①にて作った液状の膜材料を基板上にスピコート(3000rpm, 30s)し、約4 $^{\circ}$ Cの冷水に2時間浸漬した後、約90 $^{\circ}$ Cの熱湯に10分間浸漬する。
- ⑦ プロープの外形を成形してシリコン基板から剥がす。

【結果】

作成した神経プロープの写真を図1に示す。コネクタ部を除いたプロープ外形は幅1.2mm、長さが12mmであり、その上に4つの電極と往路、復路2本の流路が並んでいる。また、流路のサイズは幅200 μ m、高さ30 μ m、プロープの先端で折り返している流路の総延長はおよそ15mmである。蝕針式表面形状測定装置(Dektak 6M, ULVAC社)にて測定された半透膜の膜厚はおよそ15 μ mであった。

【考察】

試作結果から、提案した神経プロープが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。ただし現段階においては、特に作成方法④における開口部形成に関わる条件設定が不十分であり、今後、この開口部サイズや膜厚、製膜条件等がマイクロダイアリスプロープとしての機能や性能に与える影響について、検討を続けていく予定である。

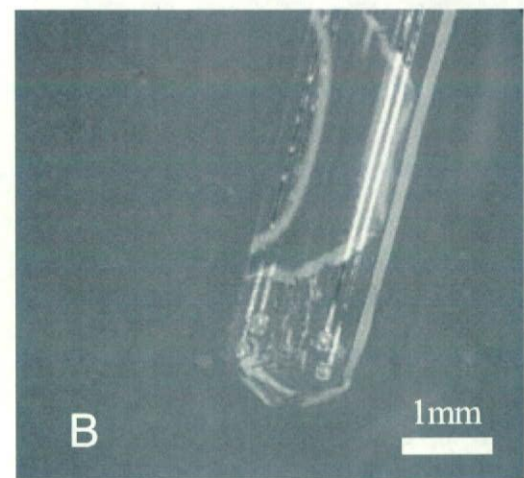
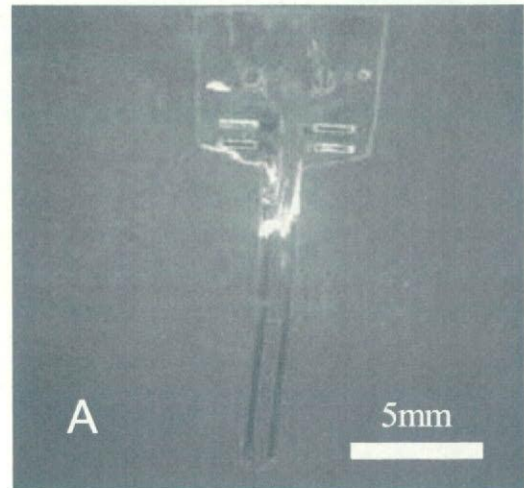


図1. 作成した神経プロープの写真

A: 神経プロープの全体像 B: 神経プロープの先端部
プロープの外形は幅1.2mm×長さ12mm

【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。

【参考文献】

- [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, Takafumi Suzuki, Kunihiko Mabuchi, Hiroyuki Fujita: 3D flexible multichannel neural probe array, Journal of Micromechanics and Microengineering, 14(1), 104-107 (2004)
- [3] 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)

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ーフェースの試作

Preliminary Model of a Flexible Neural Probe Containing Biodegradable Polymer for Delivering Bioactive Components

加藤 康広¹, 西野 美晴², 鈴木 隆文², 満洲 邦彦²

Yasuhiro KATO¹, Miharu NISHINO², Takafumi SUZUKI², Kunihiro MABUCHI²

¹東京大学大学院工学系研究科 先端学際工学専攻

²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

¹Dept. of Advanced Interdisciplinary Studies, Grad. School of Engineering, The University of Tokyo

²Dept. of Information Physics and Computing,

Grad. School of Information Science and Technology, The University of Tokyo

ABSTRACT A preliminary model of a flexible neural probe containing a biodegradable polymer for delivering bioactive components was designed and fabricated. The probe based on the flexible material of parylene has a hollow structure to seed biodegradable polymeric microspheres with bioactive components, such as nerve growth factor (NGF), in order to promote regrowth of damaged neural tissues around electrodes. NGF was slowly released from the microspheres in a phosphate-buffered saline (PBS) solution for 2 weeks, and the released NGF increased the number of PC-12 neurites and extended their length. These results have shown the possibility that the preliminary model of the neural probe can be applied for chronically recording along with neural regeneration.

1 INTRODUCTION

1.1 Neural Probe

In the past decade, a neural probe has been used in Brain-Machine Interface (BMI), neuroscience like an electrophysiological investigation, and a medical treatment such as Parkinson's disease and epilepsy. There are, however, no suitable electrodes for long-term neural recording, nor are there optimal probes to stimulate the brain for the treatments and use of BMI systems chronically. In order to solve these issues, the neural probe must be designed to perform multi-channel recording and stimulation, to be inserted less invasively in the brain tissue, and to promote regrowth of damaged neural tissues around the electrodes. Therefore, we have been developing a new flexible neural probe to achieve better recording and stimulation of neural activities for a long-term[1], while integrating Micro Electro Mechanical System (MEMS) technology, parylene[2] which is biocompatible and flexible materials, and a drug delivery system (DDS). In the DDS, a biodegradable polymer with bioactive components of nerve growth factor (NGF) was applied for delivering bioactive components to damaged neurons around the electrodes in the neural probe as shown in Figure 1.

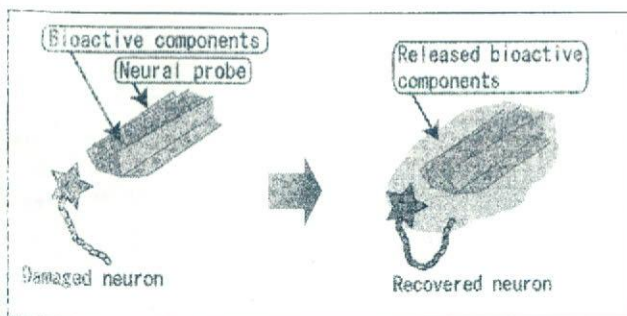


Fig. 1 Concept of effect of released bioactive components on damaged neurons. The left figure shows a neuron damaged by probe's insertion. The right figure shows a neuron recovered by released bioactive components from the neural probe.

2 METHODS

2.1 Neural Probe Fabrication

Figure 2 illustrates the method of fabricating the neural probe fabrication.

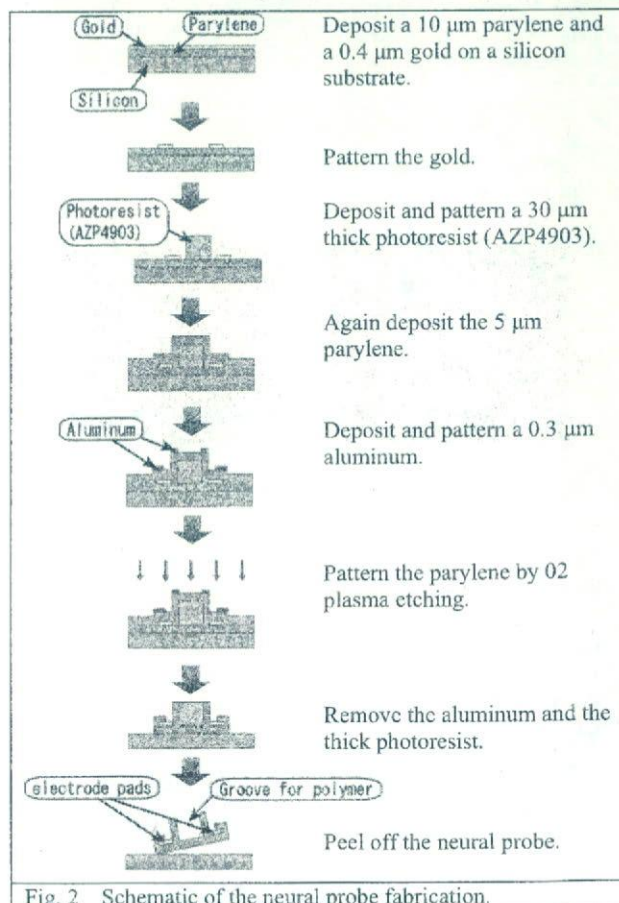


Fig. 2 Schematic of the neural probe fabrication.

2.2 Microsphere Preparation

NGF with ovalbumin (OVA) was encapsulated in the biodegradable polymer of PLGA 85/15 by a solvent evaporation method[3]. The method of fabricating the microspheres is as follows. First, 0.2g of OVA and 30 μ g of NGF in 4ml of a chloroform solution with 1g of PLGA were dispersed by a polytron homogenizer for 5 min at 8000 rpm. The protein-polymer dispersion was again homogenized in 20 ml of a 1% PVA solution for 5 min at 8000 rpm. The formed emulsion was stirred in 300 ml of a 0.1 % PVA solution for 3 hours at room temperature. The microspheres were centrifuged, washed repeatedly with distilled water more than 3 times, and freeze dried for 48 hours. The microspheres were stored at -20°C prior to use.

3 RESULTS

3.1 Neural Probe

A preliminary neural probe was designed (Fig. 3). A complete structure of the probe is in the process of fabrication to increase the height and adjust the width of a groove for seeding microspheres.

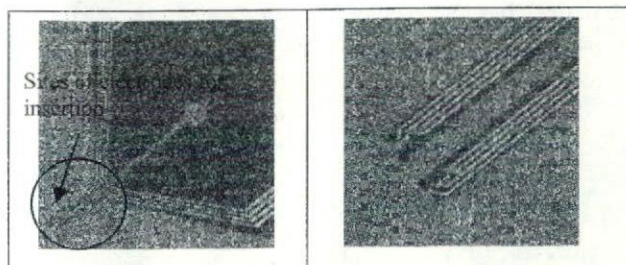


Fig. 3 Photos of the preliminary neural probe. The left photo shows the neural probe. The right photo is the magnification of the electrode's site.

3.2 Microspheres

The microspheres were fabricated with an optimal size between 10 and 30 μ m to seed in the groove of the probe (Fig. 4).

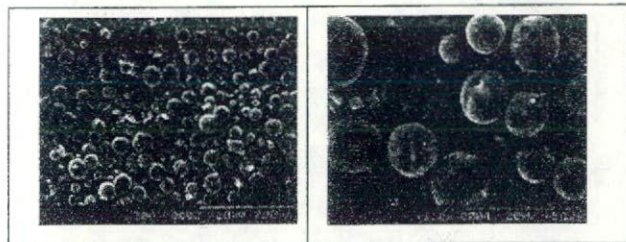


Fig. 4 Photos of the size distribution of the microspheres by a scanning electron microscope.

3.3 NGF Release

0.2 g of the microspheres were immersed in 10 ml of a phosphate-buffered saline solution (PBS) and incubated at 37°C. At each time point (24h, 48h, 72h, 168h, 336h), the suspension of the microspheres was centrifuged (10 min, 1000 rpm). 5 ml of the supernatant was then collected and replaced with 5 ml of a fresh PBS. The microspheres were again suspended by vortexing for 5 min. The total amount of NGF released from the microspheres was measured by an Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay. NGF was constantly released between 2-6 ng/ml at each time point, and more than 160 ng of NGF had been released after 336 hours.

The bioactivity of NGF released from the microspheres was assessed using the PC12 cells (Riken Cell Bank). The PC12 cells were incubated on a collagen dish with a serum-free condition. Control consisted of the PC12 cells with no microspheres. After the microspheres were incubated on a dish for 8 days, it was observed that the neurites of the PC12 cells were longer and more numerous than those of the control neurites. This indicates that the NGF released from the microspheres remained bioactivity.

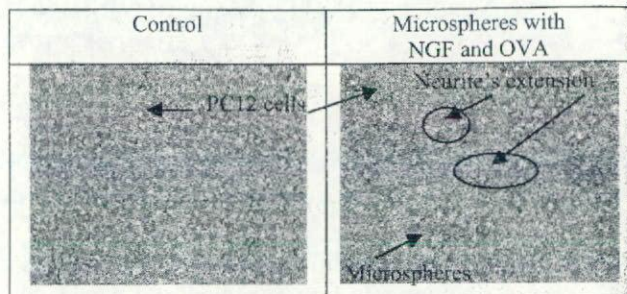


Fig. 5 Photos showing PC12 cells with extended neurites on a collagen dish eight days after NGF and OVA were released from the microspheres. The left photo is a control with no microspheres (i.e., there are no NGF in the dish). The right photo shows that NGF released from the microspheres extended the neurites of the PC12 cells.

4 CONCLUSIONS

The preliminary flexible neural probe was designed and fabricated. It was succeeded in loading bioactive components of NGF with OVA into the biodegradable polymer. The size of the polymer was optimized between 10 and 30 μ m for embedding the probe. NGF was slowly released in 2 weeks that may induce regeneration of neural tissues. In the in vitro experiment, an efficacy of the released bioactive components was observed, since the neurites of the PC12 cells were extended and increased by the NGF released from the microspheres. Thus, these have shown possibilities that the neural probe provides an optimal implant environment and extends the longevity of the tissue-electrode interface along with neural regeneration.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Dr.Saito and Dr.Nakagawa at Chinzei Laboratory in Research Center for Advanced Science and Technology at Graduate School of Engineering in the University of Tokyo for practical suggestions and a probe fabrication. We also thank VLSI Design and Education Center in the University of Tokyo for a mask fabrication.

REFERENCES

- [1] 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神経プローブに関する基礎的研究, 生体医学工学, 43, suppl.1(2005)
- [2] TAKEUCHI S, SUZUKI T, MABUCHI K, FUJITA H: 3D Flexible Multichannel Neural Probe Array, Journal of Micromechanics and Microengineering, vol.14, pp.104-108, 2004.
- [3] CAO X, SCHOICHT MS: Delivering neuroactive molecules from biodegradable microspheres for application in central nervous system disorders, Biomaterials. Feb;20(4), pp.329-39, 1999.

微小流路を利用した神経再生型電極の開発

Novel Regeneration-type Nerve Electrode with Integrated Microfluidic Channels

鈴木 隆文¹, 小竹 直樹¹, 満淵 邦彦¹, 竹内 昌治²

Takafumi SUZUKI¹, Naoki KOTAKE¹, Kunihiro MABUCHI¹, Shoji TAKEUCHI²

¹ 東京大学大学院情報理工学系研究科,

² 東京大学生産技術研究所

¹ Graduate School of Information Science and Technology, The University of Tokyo

² Institute of Industrial Science, The University of Tokyo

Abstract Neural interface devices that will allow signals from the human nervous system to control external equipment is extremely important for the next generation of prosthetic systems. A novel 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 regeneration-type nerve electrode 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 x 30 μm high x 1500 μm long and featured multiple electrodes inside them as recording and stimulating sites. They also served as guidance channels for the regenerating axons. The authors are currently attempting to evaluate the probes using the sciatic nerve of rats.

1. 背景

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も中枢での場合よりも容易であることが期待できる。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やすく、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いる[1-2]。

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〜数個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、電氣的にしっかりと固定されるため、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。

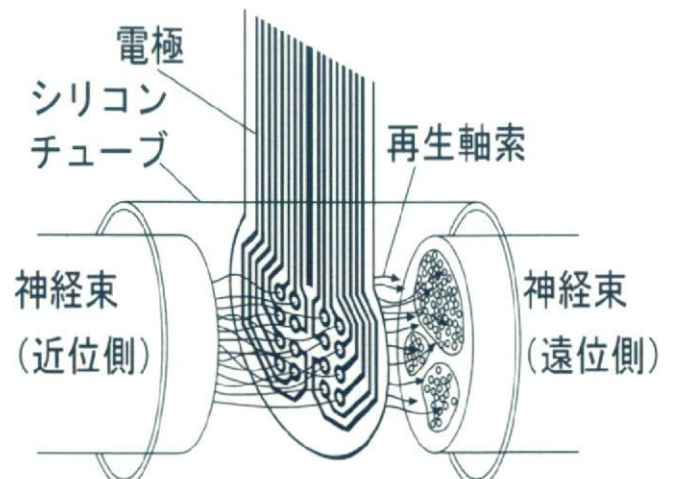


Fig. 1 Schematic of the regeneration-type nerve electrode (conventional model).

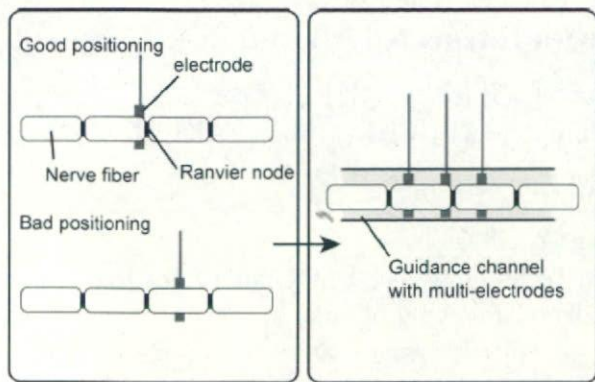


Fig. 2: Distance between the recording sites and the Ranvier node of a single nerve fiber.

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)。

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する。さらに薬液注入可能な別の流路によって、軸索の再生誘導機能を付加することも提案する。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いるが[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。

本研究では、この電極の設計、製作、および基礎的な評価を行ったので、報告する。

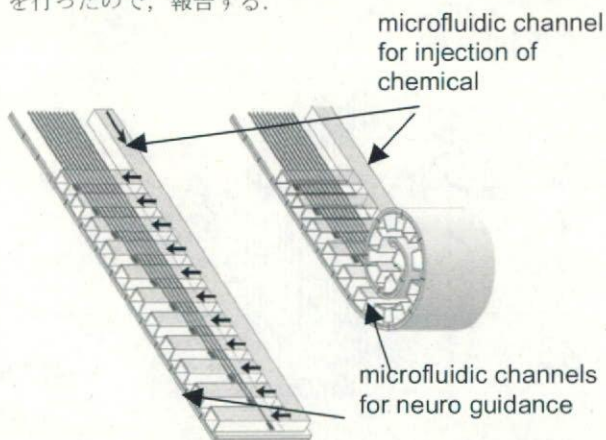


Fig. 3: Concept sketch of the regeneration nerve electrode in this work.

The electrode has a microfluidic channel for injection of chemicals and microfluidic channels for neuro guidance.

2. 方法

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。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。

流路の遠位側には、従来型の神経再生型電極のように切断した神経束の遠位端を置くこともできるが、Fig.3 のように薬液注入用の流路を付加することにより、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することも可能となると考えられる。

2.2 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 ウェハ上にパリレン C を 10 μ m コートして、この上に電極及び配線用の金を約 300nm 蒸着し、パターンニングを行う。
- ② 第二層のパリレン C を 5 μ m コートし、電極部とコネクタ部が露出するようにパターンニングを行う。
- ③ 厚膜レジスト (THB-611P または SUNFORT AQ-4059 ドライフィルムレジスト (旭化成) をコートして、パターンニングを行う。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 μ m 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アルミマスクによる酸素プラズマエッチングを行う。(Fig.4-1)
- ⑤ 流路部をはがしてから、あるいははがしながら巻いていく。その際、エポキシ接着剤を間に入れる。(Fig.4-3)
- ⑥ 巻き終わった後で電極をアセトンに入れ、犠牲層となる厚膜レジストを除去する。

これらのプロセスは、巻くことを除いては、基本的に著者ら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である。

3. 結果

3.1 試作結果

作成した電極の写真を図 5 及び Fig.6 に示す。Fig. 6 は薬液注入用流路の無いタイプのものについて、作成の各段階での経過を示すものである。Fig.6 の A 図と C 図に示されるように、巻き終わりの 1 周分については、流路長よりも電極基板の幅が大きく(2mm)なるようにしてあり、これが従来型の神経再生型電極における神経束接続用のシリコンチューブの役割を果たす。各流路のサイズは、幅 100 μ m、高さ 30 μ m 長さ 1500 μ m である。薬液注入用流路の有無だけでなく、神経再生用流路の数についても 80 本から 200 本のいくつかの種類を試作した。厚膜レジストのコーティング厚を (スピンの速度調節等により) 調整することで、流路の高さを変えることができる。

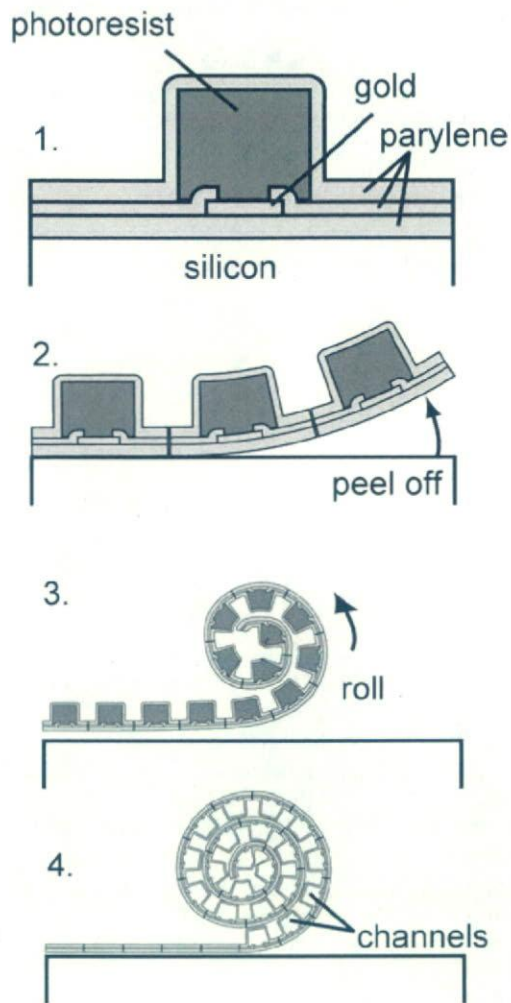


Fig. 4: Fabrication process.
The photoresist was removed after rolling the fluidic channel area.

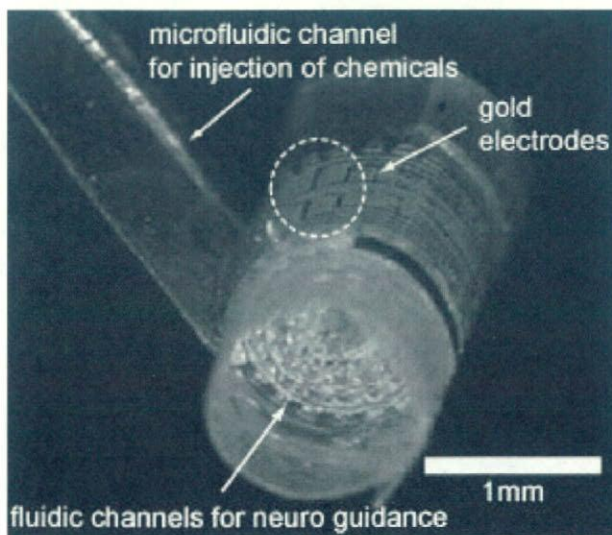


Fig. 5: Photo of the fabricated probe.
Each microfluidic channel for neuro guidance is W 100 μm \times H 30 μm \times L1500 μm .

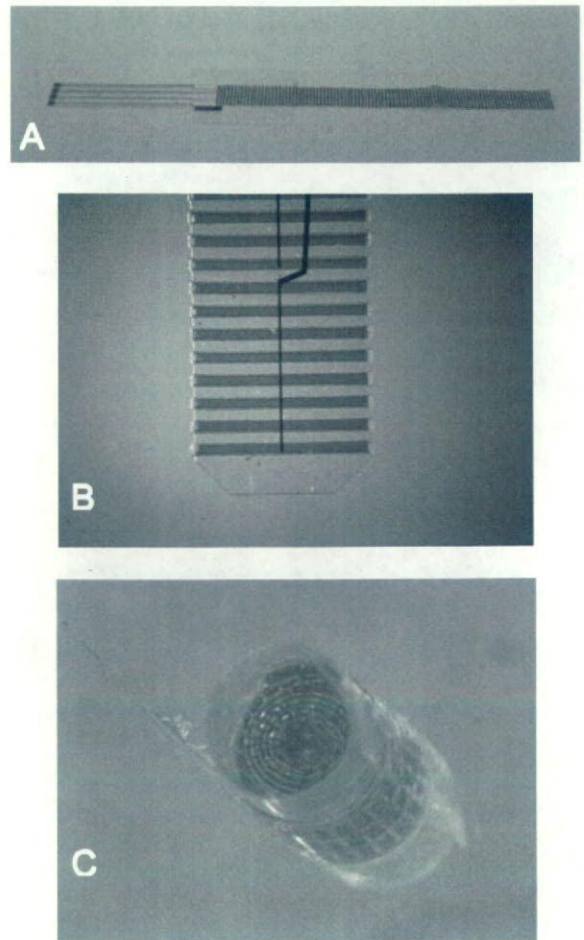


Fig. 6: Photo of the fabricated probe. (A) Overview of the probe before rolling. (B) Tip of the probe. (C) After rolling, but before removing the photoresist.

3.2 薬液注入に関する評価実験

各流路への薬液注入機能を評価するために、実験を行なった。プローブを巻かない状態で実験を行なうために、プローブを巻かないまま厚膜レジストを除去したプローブを作成して使用した。薬液注入部から青インクを注入し各流路の出口における放出の様子を撮影した写真を Fig.7 に示す。

図に示されるように、薬液注入流路に近い側（写真では下側）から先に順にインクが放出され、流路の抵抗はほぼ一様であるように観察された。

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。ただし、プロセスの再現性に若干の課題が残っており、厚膜レジストの使用条件、あるいはレジストの選定について現在も検討中である。

4.2 薬液注入機能の評価に関して

評価実験の結果から、完成した電極においては、流路の抵抗はほぼ一様であることが示された。今後、各流路から同時に薬液を放出するために、薬液注入部に近い側で流路抵抗を上げるなどの調整方法についても検討を行う予定である。

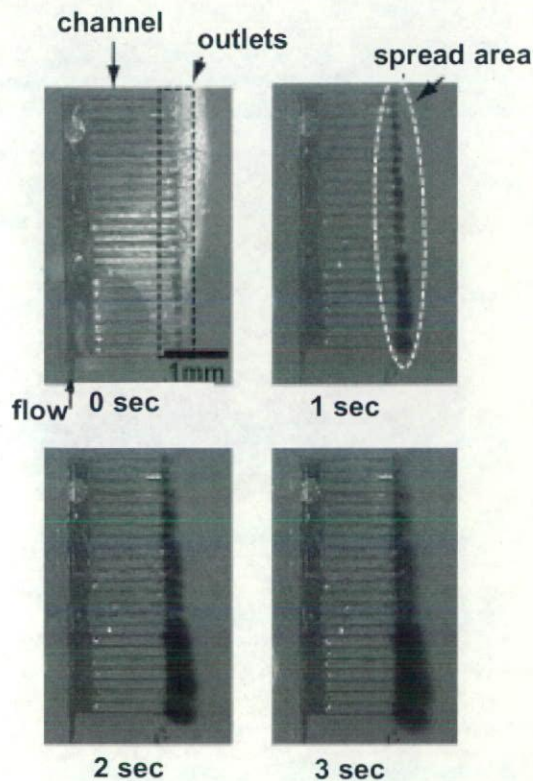


Fig. 7: Injection Test.
Blue ink spread from 24 outlets in a water bath.

4.3 今後の予定

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. 結論

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、設計、試作、及び基礎的な評価実験を行なった。

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)、文部科学省科学研究費補助金 (基盤研究(A) 課題番号 17206022)、および財団法人新世代研究所研究助成によって行われた。ここに記して謝意を表します。

参考文献

- [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] 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)
- [4] Shoji Takeuchi, Takafumi Suzuki, Kunihiko Mabuchi, Hiroyuki Fujita: 3D flexible multichannel neural probe array, *Journal of Micromechanics and Microengineering*, 14 (1), 104-107 (2004)
- [5] 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)

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

加藤康広*、鈴木隆文、満洲邦彦（東京大学）

Development of a Flexible Neural Probe Composing Biodegradable Polymer
for Delivering Bioactive Components

Yasuhiro Kato*, Takafumi Suzuki, Kunihiro Mabuchi (The University of Tokyo)

Abstract

A flexible neural probe containing a biodegradable polymer for delivering bioactive components, such as nerve growth factor (NGF), was developed. This was designed to promote regrowth of damaged neural tissues around the implanted neural probe for a long-term recording and stimulation. The neural probe based on the flexible material of parylene has a groove structure to seed biodegradable polymeric microspheres with NGF, to promote recovery of the damaged tissues and improve mechanical stiffness for the probe implantation. In *in vitro* experiment, NGF from the microspheres was slowly released in 2 weeks. The neural probe was successfully inserted in and recorded neural signals from a cerebral cortex of a rat.

キーワード：生分解性ポリマー、ブレイン・マシン インタフェース、ドラッグデリバリーシステム、微小電気機械システム、神経成長因子、神経インタフェース、神経プローブ

(Biodegradable polymer, Brain-machine interface, Drug delivery system, Micro Electro Mechanical System, Nerve growth factor, Neural interface, Neural probe)

1. はじめに

現在日本には、350万人以上の身体障害者⁽¹⁾がおり、様々な医療が日々試みられている。しかし、その多くは治療が困難であり、完治に至っていない。そこで、失われたもしくは衰えた身体能力の補綴を目的として、Brain-Machine Interface (BMI)という医用工学技術が必要とされて近年急速に発展してきた。BMIとは、脳と機械を直接接続することにより、脳からの信号を直接取得する、逆に生体外からの信号を直接脳へ伝達するといった、生体-機械間の入出力信号を通して生体を補綴する器機を制御するシステムである。このBMIにおいて、生体の神経信号と生体外の計測・制御信号を直接入出力するデバイスを神経インタフェースという。このような神経インタフェースを完成させBMIを実現することで、人工視覚、人工内耳といった人工感覚生成への応用、そして脊椎損傷患者や筋萎縮性側索硬化症、パーキンソン病、てんかんなどの神経学的な障害や身体的問題のある患者に対しての治療や介護において大きな可能性を秘めていると考えられており、開発が進められている。特に、患者の生涯にわたり脳・神経に埋め込み、かつ神経制御をできるような、長期間安定した神経活動の多点計測と刺激を可能とする神経インタフェースの実現が望まれて

いる。しかし、莫大な神経細胞との入出力に必要とされる電極数の不足や、刺入と埋植による脳組織への損傷などの問題により、実現には至っていない。

そこで、電極数の増加とその配置など容易にするためにMicro Electro Mechanical System (MEMS)を応用した、ミシガン大学のプローブ型⁽²⁾やユタ大学の剣山型⁽³⁾のような神経インタフェースが開発された。しかし、ミシガン大学やユタ大学などのMEMSで作製された多くの神経インタフェースは、脳組織に対して硬いシリコン材料を用いた構造により神経に対する侵襲が大きく、目的とする神経細胞が計測・刺激範囲外へ物理的にずれやすいなどの課題を残した。また刺入時による外傷や刺入後の電極のずれなどによる損傷で、計測・刺激対象である脳組織の死滅、また電極部周辺の炎症反応やグリア瘢痕の形成による電極周囲のインピーダンスの変化などにより、長期間安定した神経活動の計測・刺激が困難とされた。

このような課題を解決するために、我々はMEMSを応用し、複数の神経信号を十分な分解能を持って計測・刺激できる微細な電極を多点配置するような設計と加工をするだけでなく、シリコンのような硬い材料に代わり柔らかく生体適合性が高いパリレン材料を用いた、複数の神経細胞活動の同時多点計測と刺激を可能とする柔軟な構造を持つ神経