

## 2. 柔軟平面型神経再生電極

次に、柔軟平面型神経再生電極について記述する。

### 【作製方法】

本プローブの作製は、シリコンウエハ上で行った。

- ① シリコンウエハ上に、第一層目のパリレンCを10 μmと20 μmそれぞれ蒸着する(図2-9(1)参照)。
- ② 電極および配線用に、金を厚さ約400 nm蒸着しパターニングを行う(図2-9(2-3)参照)。
- ③ 第二層目のパリレンCを10 μmと20 μmそれぞれ蒸着する(図2-9(4)参照)。
- ④ 酸素プラズマエッチングにより、プローブ外形を成形する(図2-9(5)参照)。
- ⑤ 酸素プラズマエッチングにより、電極部、コネクタ部の金を露出させる(図2-9(6)参照)。
- ⑥ 60℃で19時間かけて酸化エチレンガスによる滅菌を行い、その後40時間放置し

### 【埋め込み方法】

作製した柔軟神経電極の評価には2匹のラット(Wistar/ST♀200g10w)を用いた。まず、ネプタール1mlを生理食塩水9mlで10倍希釈し、布に頭を入れ、尻尾を持ちあげて腹腔へ1ml注入する。左大腿部外側の毛を剃る。

尖ったメスで皮膚切開を行う。筋の分け目(白線)より約5mm下側の筋線維に沿って切開(図2-10参照)。

マイクロハサミで坐骨神経を切断。シリコンチューブに両端を挿し入れる。チューブには2回通さず、両断端に1針ずつ縫合する。長軸縦方向に針をかける。針は4mmの3/8丸針を用い、縫合糸にはナイロン糸を用いた。ナイロン

た。

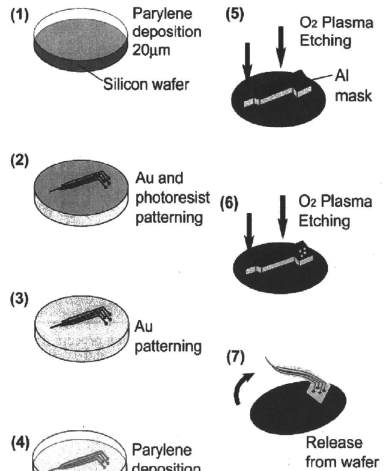


図2-9 作製方法

糸は1匹につき2ヶ所、計4ヶ所縫合したが、最初の1ヶ所は9-0ナイロン糸を用い、残りは10-0ナイロン糸を用いた。切開部より数cm上側を1cm程切開し、そこからコネクタ部を引っ張り皮下に取める(図2-12参照)。

埋め込み後、筋同士は8mmの角針を用い、5-0のナイロン糸で縫合した。皮膚の縫合は金属クリップ(ミッヘルクリップ)を用いた(図2-13参照)。このクリップは、専用のピンセットで簡単に装着できる上に、ラットが嘔んでも外れることがなく、外すときは専用のピンセットを用いなくても剪み等で簡単にことができ、治癒後自然に外れたりすることがある。

術後38.5℃の保温装置に床敷きを敷いたケージごとのせ、覚醒を待った。

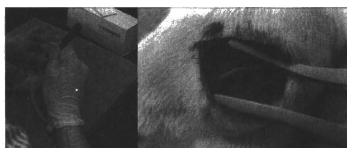


図 2-10 皮膚切開と坐骨神経



図 2-11 電極埋め込み



図 2-12 コネクタ部埋め込み



図 2-13 縫合直後

#### 【使用した計測機器について】

生体に刺激を与える刺激装置と、電極から得

た信号を増幅する生体アンプ、それらを制御するコンピュータを用いて計測する(図 2-14 参照).

#### 生体アンプ

筋内で発生した電位は、皮下の組織を伝導して体表面に到達するまでに 1/1000 以下に減衰するといわれ、体表面で得られる電位の大きさは約数十  $\mu$  V~数 mV であるため、これを生体アンプで 100~10000 倍に増幅し計測する。計測を始める前には、校正(Calibration : CAL) スイッチを操作して、校正値を計測しておく。校正値がないと、筋電位振幅の絶対値を計算することができなくなる。

周波数特性のうち、帯域通過の下限周波数は時定数で表現されることが多い。表面筋電図の周波数成分は 5~500Hz に分布するといわれているので、時定数の設定は、通常 0.03s とする。0.03s では 5.3Hz 以下がカットされることになる。

ローパスフィルタについては、標準的には 1kHz 以上が望ましい。サンプリング定理により、サンプリングする観測信号の最高周波数成分が、サンプリング周波数の半分以下でなければならないので、例えばハイカット周波数が 1kHz の場合、サンプリング周波数は 2KHz 以上とする。今回の実験では、生体アンプを用いて EMG を増幅する。なお、本実験で使用する生体アンプでは、時定数を設定できるようになっている。生体アンプは入力信号を理想的に増幅するわけではない。例えば、ステップ状の波形を生体アンプに入力すると、一旦出力が立ち上がったあと次第に出力が減少していく。この減少の度合いは、時定数が大きくなるにつれて小さくなる。

#### AD コンバータおよび計測ソフトウェア

今回の実験では、National Instrument 社の NI DAQPad-6015(16 Inputs, 200kS/s,

16-bit Multifunction I/O for USB) を用いる。  
 また、計測ソフトウェアは National Instrument 社の LabVIEW を用いる。

#### 計測電極へのコネクタ部

今回の実験では、電極への接続方法として、差込式のコネクタ Samtec 社の ZF5-10-01-T-WT を用いた。ここからサンハヤト社のエクステンション基板 ICB-067 へはんだで接続し、その反対側は mac8 社の 2 列コネクタ PM-1000 を 2 つ用いて挟みこみエポキシ接着剤で固定した。端子の反対側は、はんだでケーブルを接続した (図 2-16,17 参照)。

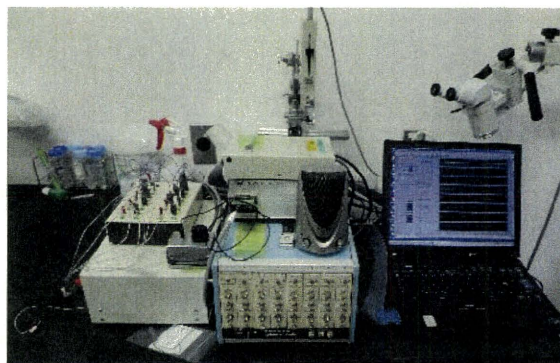


図 2-14 刺激計測機器

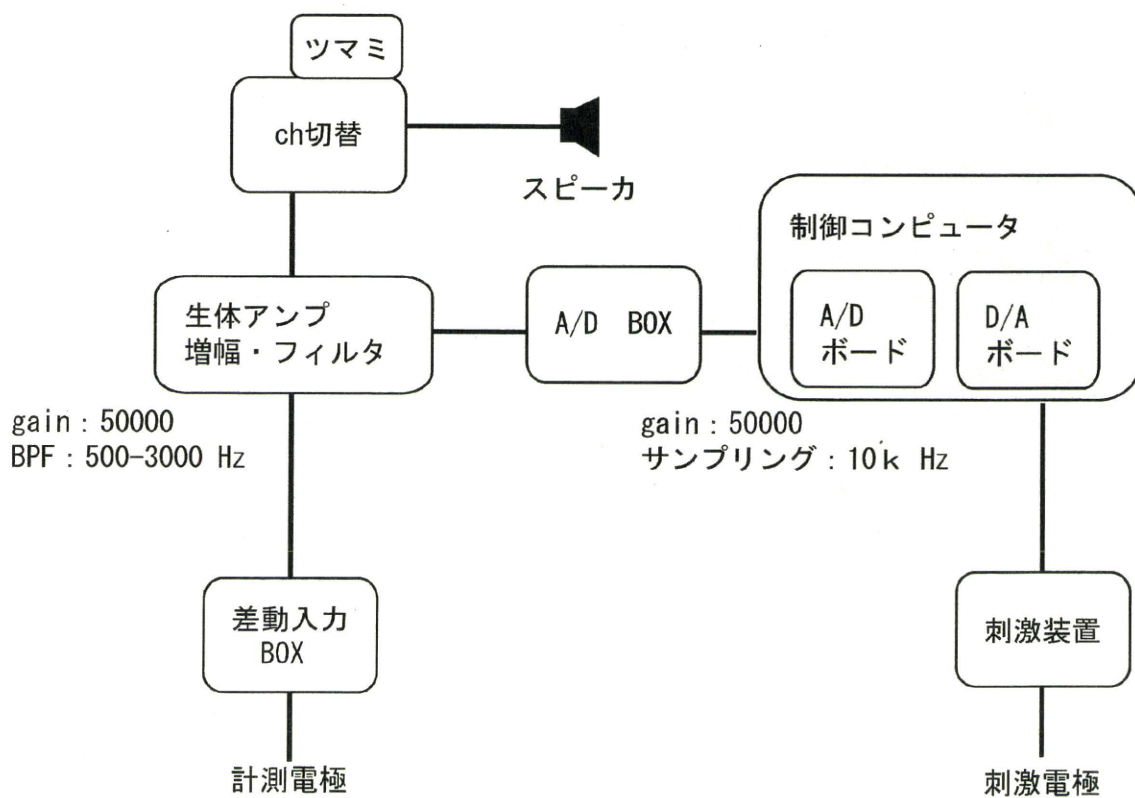


図 2-15 計測装置概念図

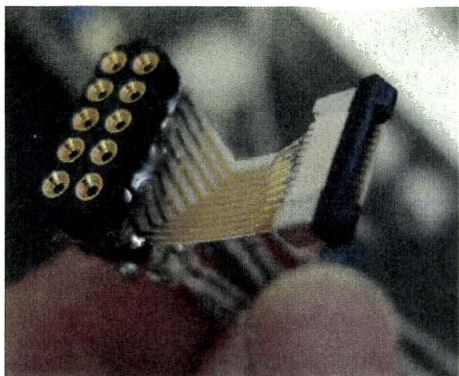


図 2-16 コネクタ部

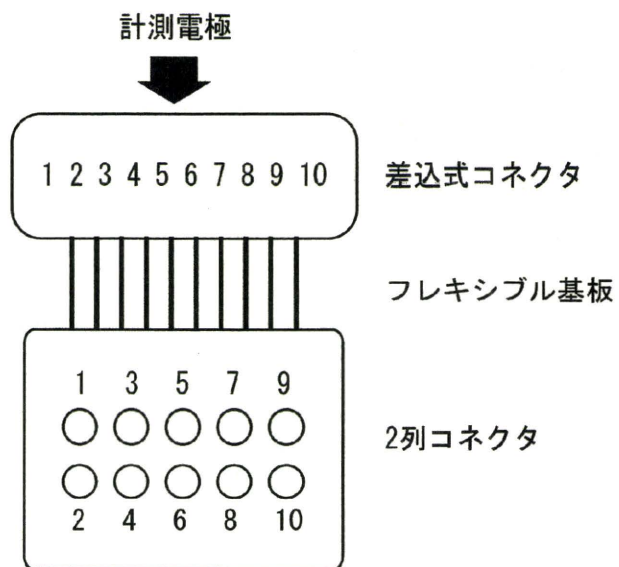


図 2-17 コネクタ配線図

【埋め込み試験】

設計

この電極は薄い金の配線（厚さ約 400 nm）を、高い柔軟性を持つ 2 枚のパリレンフィルムで被覆した構造となっている。フィルムの厚みは、上下を 10  $\mu\text{m}$  で挟んだのものと、20  $\mu\text{m}$  で挟んだものを 1 本ずつ用意した。電極のうち、神経に挿入する側をプローブ部、信号を外部へ取り出すためのケーブルを接続する側をコネクタ部と表す。また、単一の電極によって異なった部位への刺激を可能とするため、1 本のプローブに 8 つの電極露出部が作られている（図 2-18 参照）。ラットの坐骨神経（直径約 1.2 mm）を埋め込み対象として設計した。神経に埋め込まれるプローブ部は直径 1.2 mm の円形をしており、電極露出部の窓の形状は直径 60  $\mu\text{m}$  の電極穴に 20  $\mu\text{m}$  の高さの切込み部分を設けてある。プローブ部からコネクタ部へ

つながるケーブル部は、長さ 3.5 mm、幅 1.2 cm とした。金の配線は幅 50  $\mu\text{m}$  で、50  $\mu\text{m}$  の間隔をあけて配線した。プローブ部の 8 つの電極露出部は 500  $\mu\text{m}$  の間隔に配置した。コネクタ部は、Samtec 社の FZ5-10-01-T-WT の形状にあわせ、大きさは 5.64 mm $\times$ 3 mm とし、コネクタと接続するために露出する窓の形状は 0.25 mm $\times$ 1.8 mm の長方形とした。

プローブ部は、坐骨神経との接合用に内径 1.47 mm、外径 1.96 mm、のシリコンチューブ（サイラスティック医療用チューブ、ダウコーニング）に垂直に差し入れ、シリコン接着剤（一液型 RTV ゴム KE45T、信越シリコン）で固定してある。

コネクタ部まで含めて、全体をラットの皮下に埋め込むため、コネクタ部の電極露出部の変化を比較するために、一方（20  $\mu\text{m}$ +20  $\mu\text{m}$ ）を PDMS で被覆して保護した。

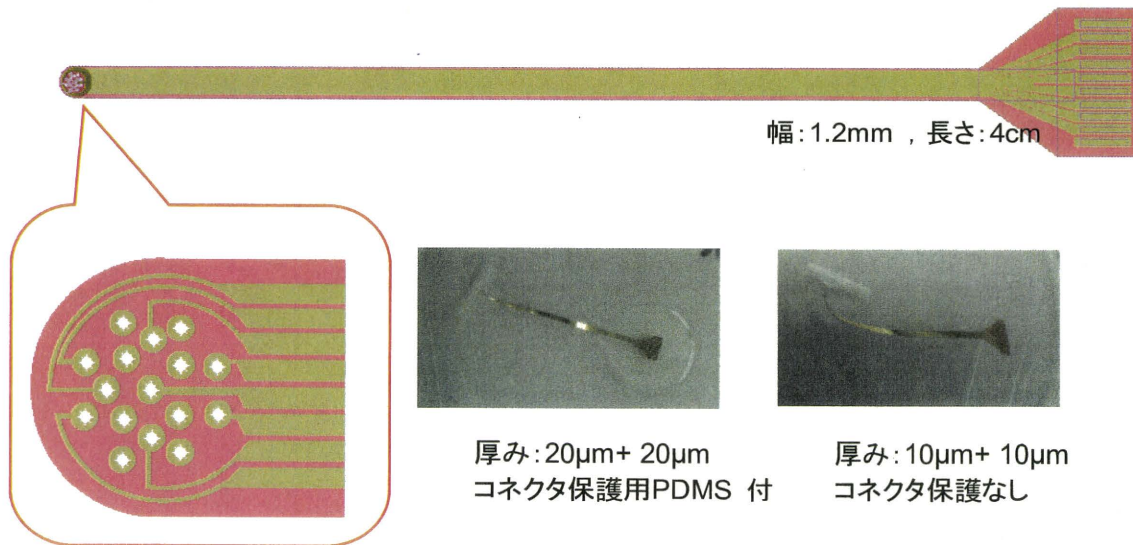


図 2-18 電極の設計と作製した電極

表 2-1 電極のインピーダンス

パリレンの厚み	Impedance Z ( $\Omega$ )	Phase $\theta$ ( $^\circ$ )
10 $\mu\text{m}$ +10 $\mu\text{m}$	8.5 M $\Omega$	-106.5 $^\circ$
20 $\mu\text{m}$ +20 $\mu\text{m}$	4.7 M $\Omega$	-134.2 $^\circ$

Electrode impedance at 1 kHz

## 【測定と結果】

埋め込みを行ったラットを5週目、8週目、11週目にそれぞれ切開し、電極部を取り出し刺激計測を行った。

埋め込み5週目においては、どちらも信号が測定されなかった。

埋め込み後、8週目に再度計測を試みたが、やはり信号がうまく計測されなかった。念のため再度体内へ戻し、縫合してさらに回復を待った。

11週目に観察を行ったところ、2本の電極のうち、PDMSでコネクタ接続部を被覆していなかった、厚さ20 $\mu\text{m}$ の電極は、ラットの体内に残っていなかった(図2-19参照)。神経と接続したシリコンチューブのみが残されており、前回の手術後なんらかの原因により傷口が開きラットが引き抜いてしまったか、体内のどこかに移動してしまったことが推測される

(図2-20参照)。この残されたチューブについては、クリオスタットによる凍結切片を作製し、神経再生を観察する。

同様に、埋め込み第5週目までPDMSでコネクタ接続部を被覆していた厚さ40 $\mu\text{m}$ の電極は、体内においてケーブル部で切断しており、信号が計測できなかった(図2-21参照)。注意深く観察すると、ケーブル部がよじれており、これにより切断されたものと思われる。切開や計測、埋め込みを繰り返した際によじれてしまったか、ケーブル部を納めるときに押し込んだことによりついた折り目のために切れてしまったと思われる。

残されたチューブと電極部を取り出し、クリオスタットによる凍結切片を作製し、軸索の再生の様子を観察する(図2-22参照)。

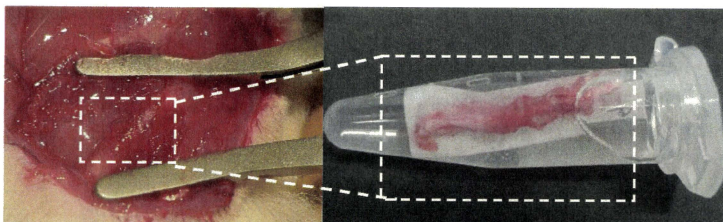


図2-19 チューブが残された神経

図2-20 取り出した神経とチューブ接続部



図2-21 切断していた電極

図2-22 取り出した神経

### 【最適な電極穴の直径】

ラットの坐骨神経（直径約1.2 mm）を埋め込み対象として設計した。神経に埋め込まれるプローブ部は直径1.2 mmの円形をしている。

神経の通過する電極穴は、小さすぎると神経が通らないが、逆に電極露出部の窓の形状が大きすぎると神経との距離が離れてしまい、ロスが大きくなる。

そこで対象となる神経信号を効率良く得るための最適な直径を求めるために、直径20  $\mu\text{m}$ 、40  $\mu\text{m}$ 、60  $\mu\text{m}$ 、80  $\mu\text{m}$ 、100  $\mu\text{m}$ 、の大きさをそれぞれ作製し、全部で5種類の電極を作製した。窓は18設計し、うち8つをコネクタ部へ引き出してある。プローブ部からコネクタ部へつながるケーブル部は、長さ3.5 mm、幅1.2 cmとした。金の配線は幅50  $\mu\text{m}$ で、50  $\mu\text{m}$ の間隔をあけて配線した。プローブ部の8つの電極露出部は500  $\mu\text{m}$ の間隔に配置した。コネクタ部は、Samtec社のFZ5-10-01-T-WTの形状にあわせ、大きさは5.64 mm $\times$ 3 mmとし、コネクタと接続するために露出する窓の形状は0.25 mm $\times$ 1.8 mmの長方形とした。

プローブ部は、坐骨神経との接合用に内径1.47 mm、外径1.96 mm、のシリコンチューブ（サイラステック医療用チューブ、ダウコーニング）に垂直に差し入れ、シリコン接着剤（一液型RTVゴムKE45T、信越シリコン）で固定してある。

コネクタ部まで含めて、全体をラットの皮下に埋め込むため、コネクタ部の電極露出部を保護するために、コネクタ部をPDMSで被覆して保護した。

計測実験は、電極とスピーカーおよびコンピュータとを接続し、ラットの足を刺激することで、音と波形で確認する方法で行った。感覚神経が再生していれば、電極部を通る信号の音と波形を確認できる。

刺激実験においては、コンピュータと刺激装置からラットの坐骨神経を刺激する。運動神経

が再生していれば、足が痙攣するのを肉眼で確認することができる。

埋め込み手術後、8週目と12週目に計測・刺激実験を行った。

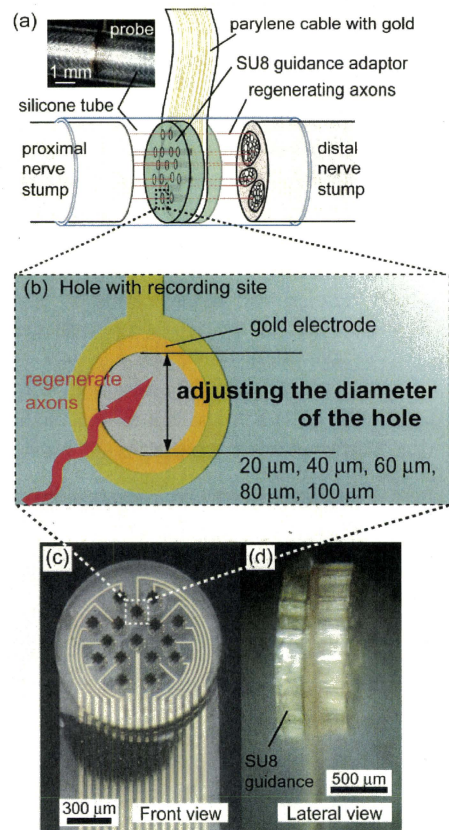


図 2-23 電極穴径の調整

8週経過した電極を用いた、計測実験の結果を表 2-2 に示す。計測の結果、ほぼ全ての条件下で感覚神経の再生が確認できた。神経再生には、埋め込みから8週間程度を経過すれば充分であると考えられる。

刺激実験の結果を表2-3に示す。計測の結果、ほぼ全ての条件下で運動神経の再生は確認できなかった。これまでの実験から、計測実験で感覚神経の再生が確認できた場合には、運動神経再生も確認できる傾向にあることから、刺激した電流値が閾値に達していなかった可能性が考えられる。さらに、電極を含む坐骨神経

を取り出して固定後、凍結切片を作成し、抗ニューロフィラメント抗体および抗MBP (Myelin Basic Protein) 抗体による染色を行った結果を図2-26に示す。

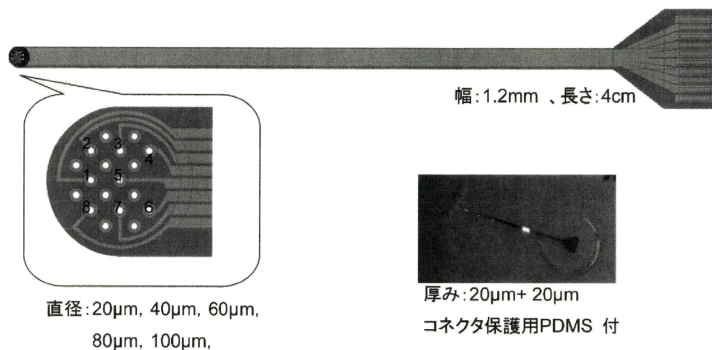


図 2-24 電極の設計と作製した電極

表 2-2 計測実験の結果

直径 ( $\mu\text{m}$ )	1 ch	2 ch	3 ch	4 ch	5 ch	6 ch	7 ch	8 ch	反応箇所
100 $\mu\text{m}$	◎	◎	◎	◎	◎	◎	◎	◎	かかと・足裏を押す
80 $\mu\text{m}$	○	○	△	×	×	×	×	×	足甲と裏をつまむ
60 $\mu\text{m}$	○	○	○	○	○	○	○	◎	甲をなでる
40 $\mu\text{m}$	◎	◎	◎	◎	◎	◎	◎	◎	第3指の甲側をなでる
20 $\mu\text{m}$	◎	◎	◎	◎	◎	◎	◎	◎	全体

◎ : 心音および計測音, ○ : 計測音, △ : 若干, × : 計測音なし



表 2-3 刺激実験の結果

直径 ( $\mu\text{m}$ )	1 ch	2 ch	3 ch	4 ch	5 ch	6 ch	7 ch	8 ch	反応箇所
100 $\mu\text{m}$	×	×	×	×	×	×	×	×	なし
80 $\mu\text{m}$	×	×	×	×	×	×	×	×	なし
60 $\mu\text{m}$	×	×	×	×	×	×	×	×	なし
40 $\mu\text{m}$	×	×	○	○	△	×	×	△	足首から先が微かに反応する
20 $\mu\text{m}$	×	×	×	×	×	×	×	×	なし

○：痙攣確認，△：若干，×：なし



図 2-25 ラットの潰瘍の有無

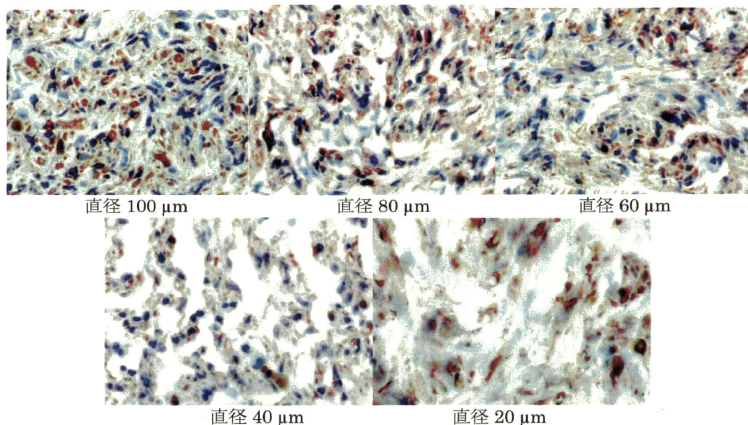


図 2-26 抗ニューロフィラメント抗体による染色

観察の様子では、電極部の穴の直径により回復の違いがみられるようである。歩行の様子から、直径 60  $\mu\text{m}$  以上の大きさのものが、順調に機能回復しているように見受けられる。直径 20  $\mu\text{m}$  のものは、回復が遅れているように見受けられた。図 2-25 に示すように、直径 80, 60, 40  $\mu\text{m}$  のものは足に潰瘍ができていた。これは中途半端に神経の再生がおこり、ラットが違和感を覚えるためではないかと思われる。

電極の遠位側の抗ニューロフィラメント抗体による染色を図 2-26 に示す。電極プローブ部の窓の直径が 20  $\mu\text{m}$  のものは再生軸索が少なく、直径 40  $\mu\text{m}$  以上では多数の再生軸索が認められた。抗 MBP 抗体による染色では、直径 20  $\mu\text{m}$  では陽性部分は小さく散在しており、直径 40  $\mu\text{m}$  以上では比較的大きな陽性部分が多く見られた。これらから、直径 40  $\mu\text{m}$  以上では、大径有髄線維も電極を通過して再生して

いるものと考えられた。

12 週を経過した計測実験の結果を表 1 に示す。計測の結果、ほぼ全ての条件下で感覚神経の再生が確認できた。前回、埋め込みから 8 週間程度においても同様だったので、十分に感覚神経が再生している状態であると考えられる。計測は、指やプラスチック製の注射針のキャップを用いて、押したりなでたりして刺激を与えた。全般的に、キャップを用いてなでた時には、スピーカーからスパイク音が発生し、指で押ししたりなでたりした場合には、鈍い音が発生した。計測には、指で押す場合とキャップでなでる方法を用いた (図 2-27)。

表 2-4 計測実験の結果

直径 ( $\mu\text{m}$ )	1 ch	2 ch	3 ch	4 ch	5 ch	6 ch	7 ch	8 ch	反応箇所
100 $\mu\text{m}$	◎	◎	◎	◎	◎	◎	◎	◎	かかと・甲をなでる, 指で押す (図 3a)
80 $\mu\text{m}$	◎	◎	◎	◎	◎	◎	◎	◎	指を曲げる, かかとをなでる (図 3b)
60 $\mu\text{m}$	○	○	○	○	○	○	○	○	指先・かかとをなでる
40 $\mu\text{m}$	○	○	○	○	○	○	○	○	指で甲を押す, 甲・かかとをな でる
20 $\mu\text{m}$	◎	◎	◎	◎	◎	◎	◎	◎	かかと・足裏をなでる

◎ : 心音および計測音, ○ : 計測音, △ : 若干, × : 計測音なし



図 2-27 a)指で押す様子, b)かかとをなでる様子

表 2-5 刺激実験の結果(mA) (20 kHz, 10 mA, 0.3 sec, × : なし)

直径 ( $\mu\text{m}$ )	±	1 ch	2 ch	3 ch	4 ch	5 ch	6 ch	7 ch	8 ch	備考
100 $\mu\text{m}$	-	1	1	1	1	0	0	0	0	
	+	.30	.42	.07	.26	.36	.43	.48	.49	
		1	1	1	1	0	0	0	0	
80 $\mu\text{m}$	-	×	0	0	0	0	0	0	0	
	+	×	.20	.16	.06	.11	.17	.26	.32	
			0	0	0	0	0	0	0	
60 $\mu\text{m}$	-	0	0	0	0	0	0	0	0	電極周辺 (腹) が先に痙攣する
	+	.26	.28	.55	.49	.87	.54	.54	.52	
		0	0	1	0	0	0	0	0	
40 $\mu\text{m}$	-	0	0	0	0	0	0	0	0	+ : アース付近から全身, 足へ 痙攣が広がっていく
	+	.58	.68	.78	.94	.86	.68	.62	.95	
		×	1	0	1	1	1	1	1	
20 $\mu\text{m}$	-	×	×	×	×	×	×	×	×	アース付近が若干痙攣している
	+	×	×	×	×	×	×	×	×	

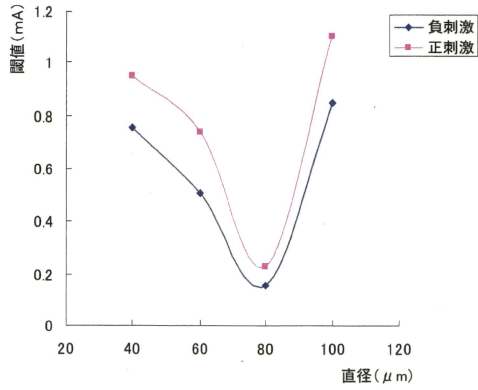


図 2-28 直径と刺激閾値

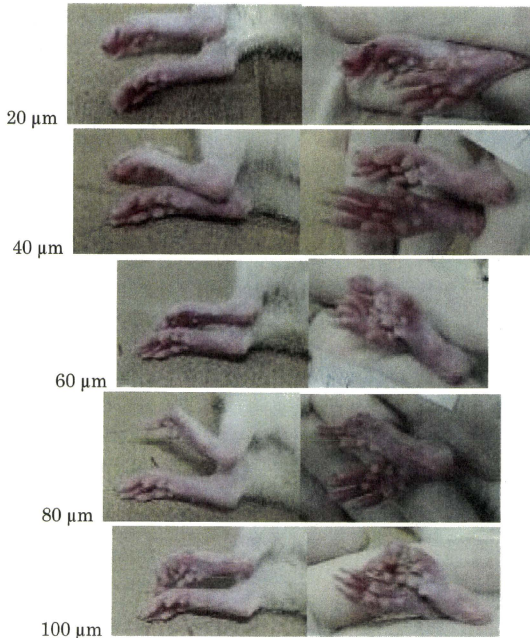


図 2-29 ラットの潰瘍の有無

刺激実験の結果を表 2-5 に示す。刺激実験は、電極とアース間に電流を流し、足の痙攣を目視で観察した。計測の結果、直径 20  $\mu\text{m}$  の電極を除く、ほぼ全ての条件下で運動神経の再生が確認できた。また図 4 から、穴の直径は 80  $\mu\text{m}$  が最も刺激閾値が低いことがわかる。

観察の様子では、電極部の穴の直径により回復に違いがみられるようである。以上の大きさのものが、順調に歩行などの機能回復しているように見受けられるようである。直径 40  $\mu\text{m}$  のものが最も潰瘍が少なかった。その他の直径のものは足に潰瘍ができていた。ラットが違和感を覚えるためか、時折かじっているような様子が観察された。

#### 【計測・刺激装置の検討】

本研究では、計測・刺激装置についても検討した。研究開始当初、刺激実験には、日本光電の可変増幅率・可変帯域生体信号増幅装置 SS-1960 (最大 16 ch ユニット MEG-6116) を用いた。この機器は 3ch までしか測定できないという短所があるが、きれいな波形の単極の刺激に適しており、実験データの精度が良いことが長所である。そのため、研究開始時の予備実験に最適といえる。

次に、少ないチャンネル数で測定結果を確立した後、多目的 16 入力、2 出力 A/D, D/A 変換ユニット (多目的 A/D, D/A 変換ユニット USB-6259) に変更した。このシステムは前述のシステムより精度が落ちるが、多チャンネルによる、刺激が可能となった。

長期飼育による感染症などの二次的な要因を防ぐために、電極部分をこれまで体内に全て埋め込んでいたため、実験の際は、麻酔下で開腹し刺激・計測実験を行っていた。

独マルチチャンネルシステムズ社製、小型 64ch 生体信号増幅装置 FA-64 または可変増幅率 64ch 生体信号増幅装置 PGA-64 を用いて、ケーブル部接続を改良し頭部まで延長するこ

とで、これまで行っていた開腹による接続を必要とせず、覚醒下で計測・刺激を行えるコネクタを頭部に設計した。

このシステムは、多チャンネルによる (双極) 刺激が可能である。時間精度が落ちるという短所もあるが、本研究においては問題がなく、最終的にこのシステムを採用した。

#### 【長期埋め込み実験】

本研究の電極は、柔らかく (低侵襲)・長期使用 (生体適合性) であることを特徴としている。その検証のため、長期埋め込み実験を行った。

また、感染症などの二次的な要因を防ぐために、これまで体内に電極部分を全て埋め込んでいたが、ケーブル部接続を改良し頭部まで延長することで、これまで行っていた開腹による接続を必要とせず、覚醒下で計測・刺激を行えるコネクタを頭部に設計した。

電極は、ラットの坐骨神経 (直径約 1.2 mm) を埋め込み対象として設計した。神経に埋め込まれるプローブ部は直径 2.0 mm の楕円形をしており、今回、電極露出部の窓の形状は、埋め込み後の歩行観察、潰瘍の観察、電極の遠位側の抗ニューロフィラメント抗体および抗 MBP (Myelin Basic Protein) 抗体による染色、計測、刺激実験の閾値 (図 2-28 参照) から総合的に判断し、穴の直径は 80  $\mu\text{m}$  の大きさで作製した。単一の電極によって異なった部位への刺激を可能とするため、1本のプローブに 16 つの電極露出部が作られている。

窓は 20 個設計し、うち 16 個をコネクタ部へ引き出してある。プローブ部からコネクタ部へつながるケーブル部は、長さ 3.5 mm、幅 1.2 cm とした。金の配線は幅 50  $\mu\text{m}$  で、50  $\mu\text{m}$  の間隔をあけて配線した。プローブ部の 8 つの電極露出部は 500  $\mu\text{m}$  の間隔に配置した。コネクタ部は、Samtec 社の FZ5-20-01-T-WT の形状にあわせ、大きさは 5.64 mm  $\times$  3 mm とし、コネクタ

と接続するために露出する窓の形状は0.25 mm×1.8 mmの長方形とした。

プローブ部は、坐骨神経との接合用に内径1.47 mm, 外径1.96 mm, のシリコンチューブ(サイラスティック医療用チューブ, ダウコーニング)に垂直に差し入れ, シリコン接着剤(一液型RTVゴムKE45T, 信越シリコン)で固定してある。

コネクタ部から頭頂部まで, 全体をラットの皮下に埋め込み, 頭頂部に外部機器接続のためのアダプタを固定する。

計測実験は, 図2-30に示すように, 電極とス

ピーカーおよびコンピュータとを接続し, ラットの足を刺激することで, 音と波形で確認する方法で行った。感覚神経が再生していれば, 電極部を通る信号の音と波形を確認できる。

刺激実験も同様に, 図2-30内に示す。コンピュータと刺激装置から, ラットの坐骨神経を刺激する。運動神経が再生していれば, 足が痙攣するのを肉眼で確認することができる。

頭頂部に外部機器との接続を施した様子を 図 31 に示す。ケーブルは埋め込み後の計測・刺激実験に用いるもので, 飼育時にはケーブルを外して飼育可能である。

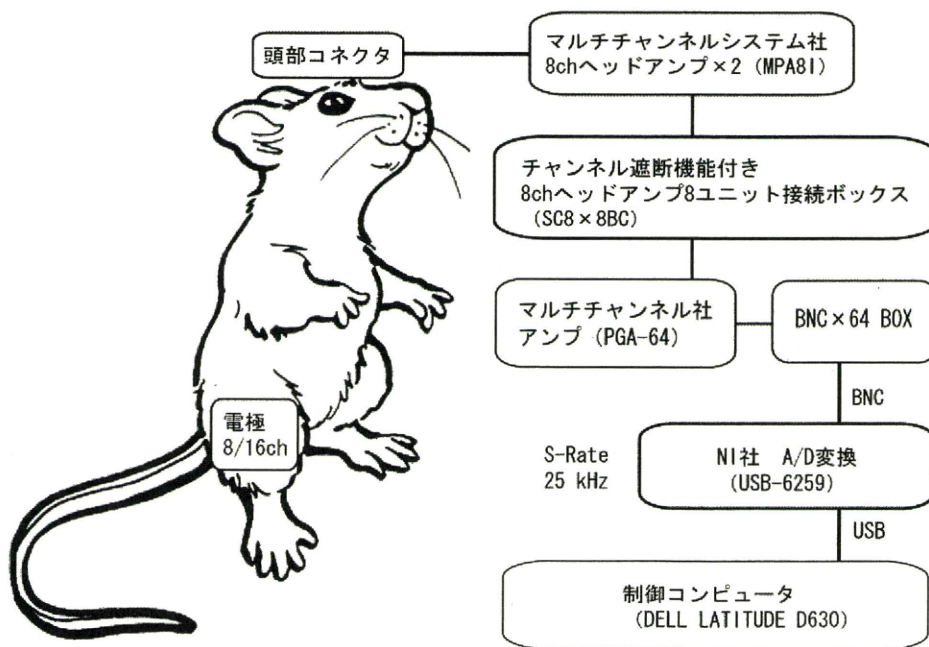


図 2-30 計測・刺激装置

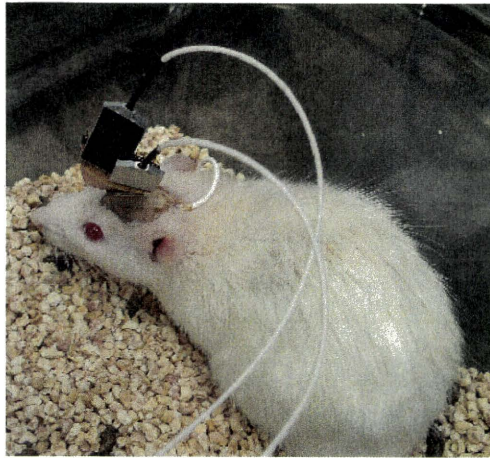


図 2-31 外部機器接続時

電極の埋め込み手術後 10 週経過したラットについて、感覚神経と運動神経の各神経に対する計測と刺激の実験を行った。このラットは、覚醒下で足を引きずるなどの様子もなく、順調に神経が再生し機能回復しているように見受けられた。

はじめに計測実験時の波形をチャンネル別に図 2-32 に示す。この図から各チャンネルの波形を比較すると、チャンネル毎にピークの有無が違っていることがわかる。この電極は直径 1.2 cm 程の末梢神経に配置された局所的な電極であるため、これらが外来ノイズだった場合、全チャンネルが同じような波形を示すか、波形の現れるチャンネルと全く現れないチャンネルに分かれると思われる。そのため、これらの図にみられる波形のピークは神経由来と断言できないものの、電極に非常に近い組織から生じた信号と考えられる。

同じラットの計測において図 2-33 では、横軸の 0.44 s, 0.047 s のあたりに感覚神経のスパイクらしき波形が観察された。このとき他のチャンネルでは、このような強さのスパイクは見られず、おそらく電極のこのチャンネル近くで出た神経活動ではないかと思われる。

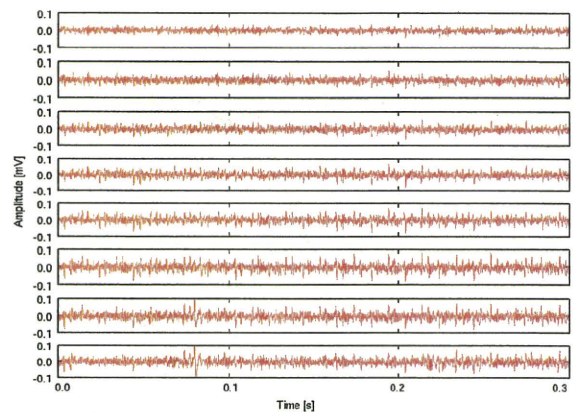


図 2-32 計測実験多チャンネル波形

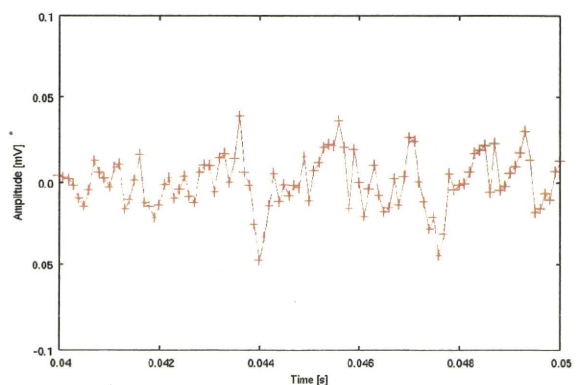


図 2-33 単チャンネル波形

刺激実験からは、ほぼ全ての条件下で運動神経の再生は確認できた。これまでの実験から、神経再生には、埋め込みから 8 週間程度を経過す

れば充分であると考えられる。計測実験で感覚神経の再生が確認できた場合には、運動神経再生も確認できる傾向にあることから、刺激した電流値が閾値に達成していなかった可能性が考えられる。

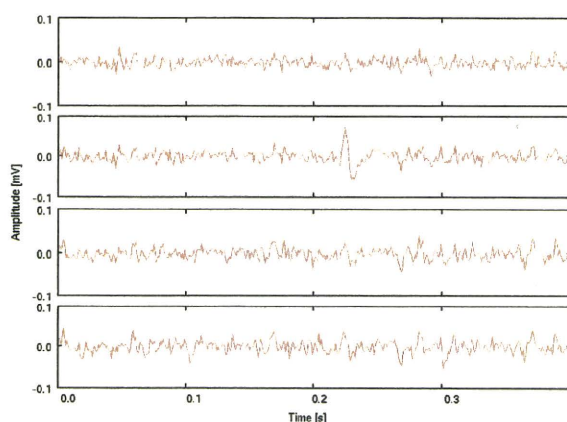


図 2-34 計測・刺激装置

また同様に、図 2-34 の 2 チャンネル目（上から 2 段目）の 0.22 s 付近においては、他のチャンネルより顕著に大きな波形が見られた。時間幅的には、神経由来のスパイクと考えられる波形である。若干他のチャンネルに回り込んでいるようにも見られるが、要因として考えられるのは信号を伝達する線の間の距離が狭いことによるクロストークとも考えられる。電極直下でインピーダンス変換することにより、クロストークはかなり軽減できるはずである。今後は超小型のアンプとともに埋め込むことを検討する。

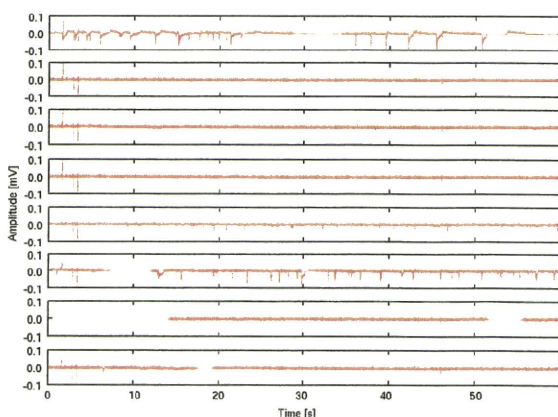


図 2-35 外部機器接続時

図 2-35 においては、1, 2, 5 チャンネルに継続的なスパイクが見られた。他チャンネルとの比較によると、スパイクの発生するタイミングはそれぞれ異なっていて、これらは別の軸索由来と考えられる。

1 チャンネルはスパイク状の信号が強く測定されたため基線がブレてしまっているが、アーチファクトにしてはスパイクの高さが小さくまちまちであるため、これも神経由来と考えられる。ただし、フィルタ設定の問題である可能性もあるため、慎重な検証が必要である。波形としては、5 チャンネルが最も神経活動による波形のように見られる。その他全チャンネルにわたって細かい波形が見えるが、これは周期や大きさから見て心電の回り込みあるいは脈波であると考えられる。

#### 【まとめ】

本研究において、電極を埋め込む手術を行った全てのラットにおいて、どのデザインの電極でも、ラットは歩行に問題なく神経を再生し、機能回復しているように観察された。また、埋め込み型実験に多くみられるような潰瘍も比較的少なく、ほぼきれいな状態で神経が再生しているのではないかと推測される。最も顕著な利点としては、埋め込み手術から計測できる日数が非常に長く長持ち型電極であること、埋め込み後のラットが順調に回復し、問題なく長期飼育できていることから、健康への影響が少ないということが言える。実際、最も長いもので体内に埋め込んでから 220 日後（約 7 ヶ月）の電極も使用することができ、ラットの体調にも影響がなかった。つまり、長期に使用可能な電極であると言える。

しかし、感覚神経に対する計測実験と、運動神経に対する刺激実験において同時に波形がリンクしにくい結果が得られた。これは、それぞれの神経の太さが異なるため、焦点とする神経の直径と電極の穴の隙間によるものと思



われる。実験の結果、感覚神経に対しては 40  $\mu\text{m}$ 、運動神経に対しては 80  $\mu\text{m}$  が適しているように考えられる。今後は、ひとつの電極に対し複数の種類の神経をターゲットとするいくつかの直径で、かつ多チャンネルを持った電極の開発が必要であると考えられる。

### 3. 束流路型神経再生電極

再生型神経電極は、原理的には、1) 再生した神経線維が電極孔の中を通る形となるので、物理的に確実に固定され、電気的にも安定した計測が期待しうる、2) 孔の数と径を調整する事によって、特定の神経線維を選択的に（究極的には1本ずつ）電極孔に通す事も可能（即ち、選択的な入出力が可能）、などの利点が考えられ、多くのグループがこのタイプの電極の開発を試みてきているが、その多くは、非常に薄いシリコン基板やフレキシブルフィルムをベースとして、平面上に電極孔を配置するという形態をとっており、このために、記録部が（末梢神経線維で跳躍伝導の電気活動が生じる）ランビエ絞輪の位置から離れた状態になってしまい、S/N比が劣化してしまう可能性がある。また、個々の神経線維の活動を分離して記録・或いは刺激するためにはチャンネル数を増やす事が必要であるが、その際に配線の問題が生じてくる事、などの問題点もある。

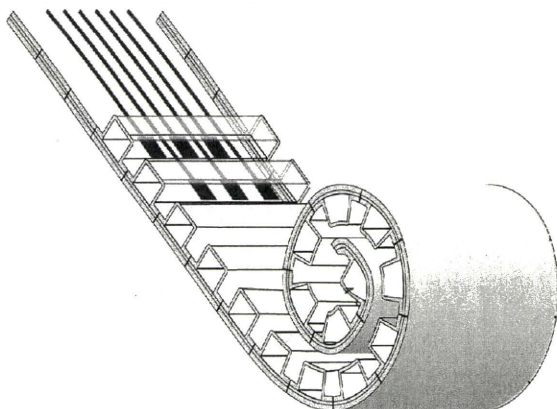


図 2-36 流路を持つフレキシブル神経再生電極の基本構造

我々が、別のプロジェクトで試作段階まで開発を進めた電極に、「束流路型神経再生電極」があり、本プロジェクトではこの電極のさらなる改良を目指している。この「束流路型神経再生電極」は柔軟なパリレンフィルム上にマイクロ流路のチャンネルを形成・集積した新しい型の神経再生型電極であり、図 2-36 に示すような構造を有している。

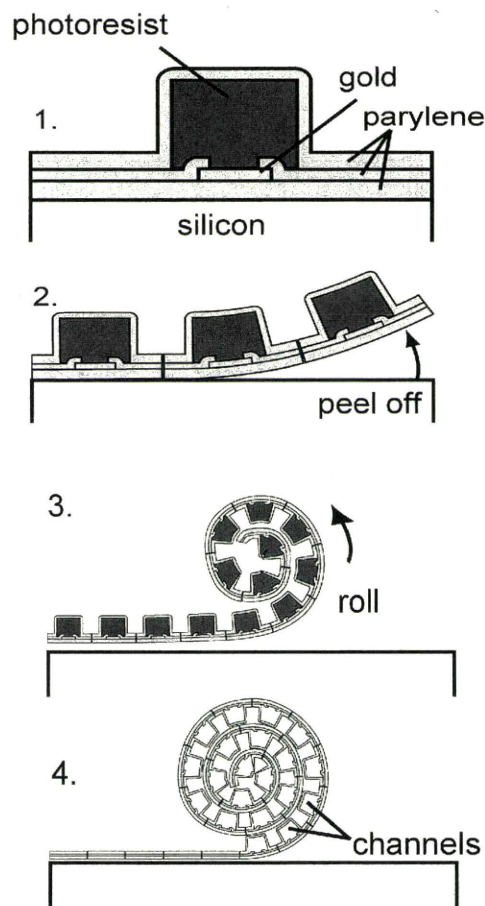


図 2-37 束流路型神経再生電極の作成プロセス

#### 【作成方法】

試作に関しては、体重 300 g 程度のラットの坐骨神経（直径は 1.5mm 程度）を対象として想定し、電極の筒の直径は 1.6mm、流路の神経線維方向の長さは 1.5mm、流路の内寸は、幅 100 $\mu\text{m}$ 、高さ 30 $\mu\text{m}$ 、隣接する流路間の間隔

は  $100\mu\text{m}$  とした。作成プロセスを図 2-37 に示す。各流路は、1つ或いは複数の記録（或いは刺激）電極部を持っており、また、再生軸索を通すガイド（路）ともなっている。フォトレジストは犠牲層として働き、流路を巻いた後には除去される事になる。

#### 【作成結果と埋め込み実験】

試作した電極の写真を図 2-38 に示す。この試作品では、全長（幅）は  $2\text{mm}$  で、流路の数は  $80\sim 200$  本となっており、各流路は、 $100\mu\text{m}(\text{W})\times 40\mu\text{m}(\text{H})\times 1500\mu\text{m}(\text{L})$  である。フォトレジストとしては THB-611P あるいは、東京応化 PMER P-HA1300PM を使用している。流路の高さを規定する事になる厚みを  $40\sim 100\mu\text{m}$  に調節するために、SUNFORT AQ-4059 ドライフィルムレジスト (Asahi Kasei) も一部用いている。

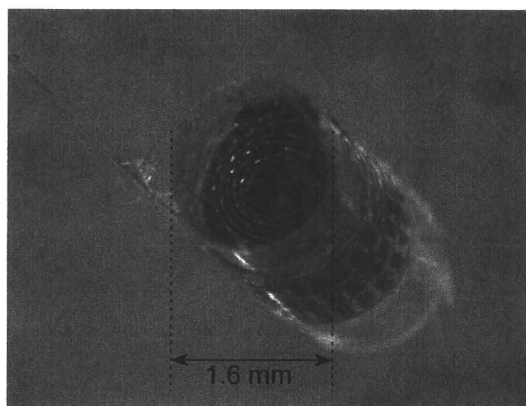


図 2-38 束流路型神経再生電極

これまでに我々は、培養神経細胞 (Primary culture neural cells) を用いてこの電極の生体適合性に関して *in vitro* test を行い、良い結果を得ており、流路の機械的強度を向上するための作成面での改良を施すとともに、ラットの脛骨神経を対象とした評価実験を行った。

#### 流路構造の機械的強度向上

従来手法で流路電極を作製すると、流路の天井部分が破壊されるといった問題があった。こ

れは、厚膜レジストをパターニングするとその断面は図 2-39(a)のような形状となり、その上の蒸着するアルミマスクの欠陥へつながり、それがパリエンのエッチング時に流路上部のパリエン構造の欠陥へつながるためである。

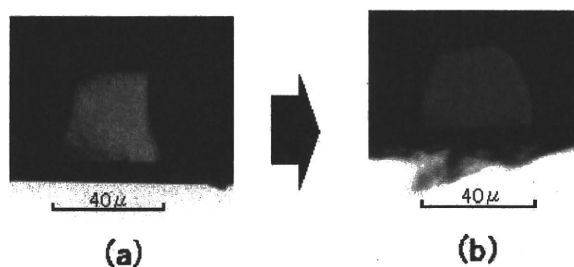


図 2-39 厚膜レジストの変形

ウェハを切断後光学顕微鏡で観察 (a)パターニング後の厚膜レジストの断面 (b)  $120^{\circ}\text{C}$  で  $20\text{min}$  熱した後の厚膜レジストの断面

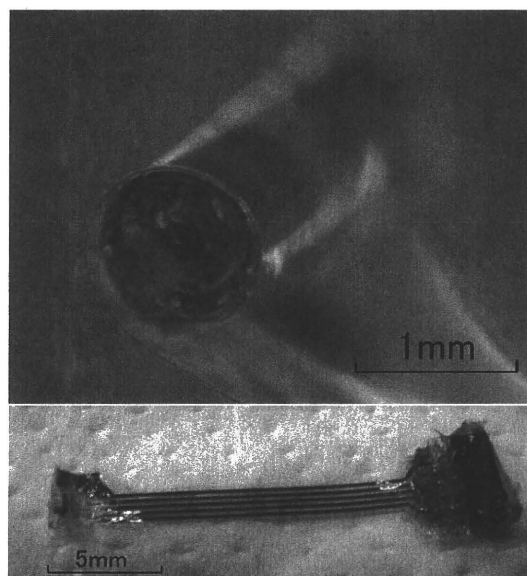


図 2-40 作製した流路電極

そこで、レジストを滑らかな形にする手法の開発を行った。レジストは、熱により変形する。このことを利用し、パターニング後、加熱することにより流路形成レジストを滑らかな形状にするよう試み、適切な加熱温度・時間に関する条件の調査を行った。その結果、 $120^{\circ}\text{C}$  で  $20$

分熱することでレジストを滑らかな形状に変形させることに成功した(図 2-39(b))。提案手法により作製した流路電極を図 2-40 に示す。

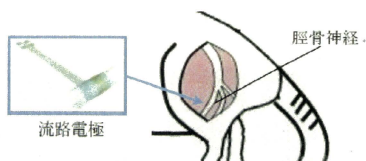


図 2-41 ラット脛骨神経への埋め込み

#### 評価実験

作製した流路電極を実際にラットの脛骨神経に埋め込み、評価実験を行った。(図 2-41)

埋め込み後 2 ヶ月間、神経軸索の再生を待った上で、電気刺激実験(図 2-42 に系を示す)を行った結果、再生電極からの電気刺激に対応して、脚部の筋が活動することが示された。また、再生軸索が電極を通過していることを組織学的にも確認した(図 2-43)。

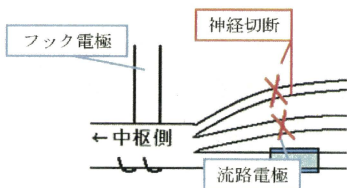


図 2-42 電気刺激実験

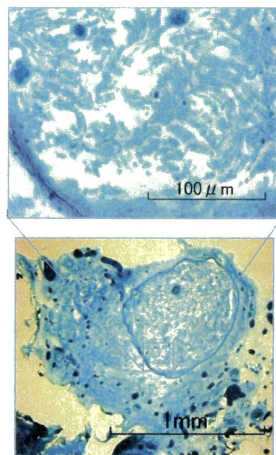


図 2-43 電極埋込部より末梢側での神経束の様子。(LFB 染色)

#### 4. 多層型神経再生電極の開発

【設計概念】末梢神経用の神経再生電極における最大のと言っても良い問題点は、電極孔として開ける孔の大きさと数の問題である。末梢神経は、非常に多数の神経線維（運動神経線維・感覚神経線維・自律神経線維）が束になって走行する形をとっており、神経幹を構成して

末梢神経型の電極を用いてこれらの神経線維とインタフェーシングを行なう事により、義手に満足できる随意的運動機能や感覚機能を与えるためには、莫大な数の神経線維のうちどれだけのものとインタフェーシングを行なう必要があるかについては、今後、検討を要する問題であるが、1本1本とまではいかなくとも、いずれにせよ、インタフェーシングデバイ

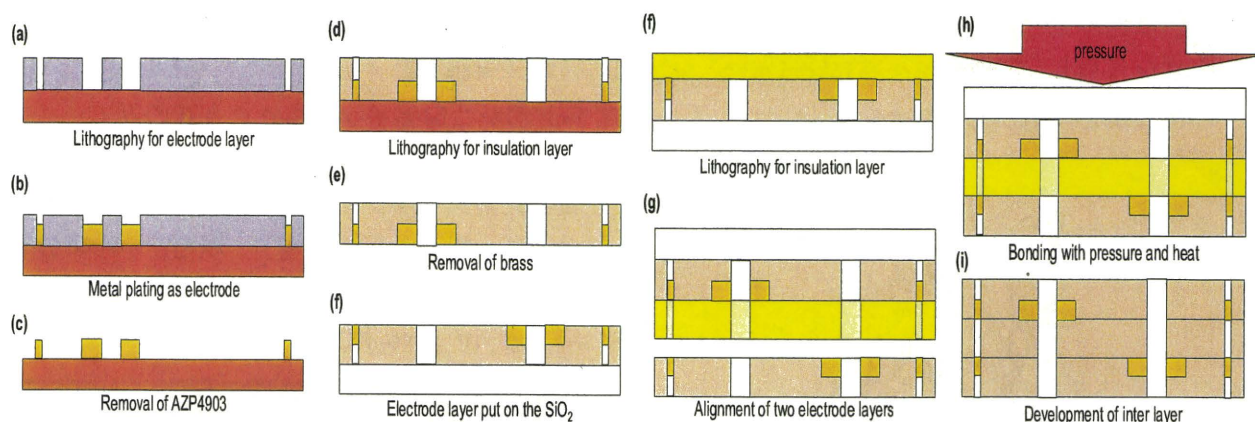


図 2-44 積層型神経再生電極の作成工程

いる神経線維の数は、高位にもよるが、例えば前腕部の正中神経では数千本～万本のオーダーに達するが、もし、最終的な目標として個々の（運動）神経線維の活動を個別に記録したり、また、個々の（感覚）神経線維を個別に刺激したりする事を可能としようとするれば、1本1本の神経線維を個別の電極孔を通す事が要求され、神経線維数と同じ数のチャンネル（電極孔）を必要とする事になる。もし神経線維が同じ機能を持つのであれば、まとめて同一の電極孔を通す事も可能と思われるが、末梢神経においてやりとりされる情報は、感覚神経線維では個々のセンサ（受容器）が検出した物理的刺激量のデータそのもの、また、運動神経線維では、目的とする筋肉の運動ユニットを収縮させるための信号（出力）であり、いずれにせよ、機能的に細分化された末端の信号であるので、同一の信号を伝達している神経線維群をまとめるという事は困難である。

スである電極としては非常に多数の電極のチャンネル数が必要となる事が予測される。古典的な再生型電極の場合は、1枚の中隔部に電極を集中して設置する形をとっており、電極部との中隔部の配線もすべて、この（スペースが制限されている）中隔部に集中して設置される事になるため、配線が複雑かつ極細とならざるを得ないという問題が必然的に生じてくる。本電極ではこの問題を解決する事を目的として、電極孔を設置する中隔部を複数層の積層構造とし、1層の電極層における配線された電極の数は一定数とする代わりに、これを多数積層させる事によって、全体での電極チャンネル数を増やして行くという形で電極の設計・試作を行ない、そのプロセスが可能である事を確かめた。

具体的には、今回の設計・試作において、電極孔の大きさは 30、60、90 $\mu\text{m}$  の 3 種類の大きさとし、個々の電極が計測時に干渉しないように電極部の配線、配線間の幅は最小の部分で