

低侵襲マイクロニードル電極による
慢性 *in vivo* ニューロン計測技術の開発
(Development of chronic *in vivo* neural recording technology
using minimally invasive microneedle electrodes)

2026年1月

博士（工学）

佐々木 陽向

豊橋技術科学大学

低侵襲マイクロニードル電極による 慢性 *in vivo* ニューロン計測技術の開発

論文要旨

脳神経科学、医療分野、および BCI (brain-computer interfaces) の開発等において、マウスなどの実験動物のニューロン信号を長期的に記録する技術は極めて重要である。なかでも、高い時空間分解能を有する刺入型電極による手法が有力であるが、電極の太い刺入部 ($>10\ \mu\text{m}$) や高い剛性に起因する侵襲性が課題となっている。近年、脳組織との機械的ミスマッチを低減するため、Parylene やポリイミドなどの柔軟な材料を用いた電極の開発が進められている。しかし、これらの電極は慢性損傷を軽減する一方で、自立的な刺入が困難であり、ガイドなどの補助を必要とするため、依然として初期損傷は回避できていない。

この問題を解決するため、VLS (Vapor-Liquid-Solid) 結晶成長技術を用いた直径 $5\ \mu\text{m}$ のシリコン (Si) マイクロニードル電極が提案され、従来電極よりも急性組織損傷が少ないことが示されている。しかしながら、本電極は硬い Si 基板上に形成されており、ニードル自体も剛性の高い Si で構成されているため、基板の圧迫やニードルの機械的ストレス等による慢性損傷が課題として残っていた。

そこで本研究では、フレキシブルな基板とニードルを有しつつ自立的な刺入を可能とする、先端直径 $5\ \mu\text{m}$ の Parylene 製マイクロニードル電極デバイスを新たに開発し、マウスを用いた電気生理学的および免疫組織化学的評価により、その有用性を実証した。さらに、電極の微小化に伴う高インピーダンス化による記録信号の劣化を抑制するため、ノイズ低減手法も併せて提案した。

まず、慢性損傷低減に向けて、VLS-Si マイクロニードル電極に Parylene 基板を導入し、脳組織上で浮遊可能なデバイス構造を実現した。作製した電極デバイスをマウス脳に埋め込みニューロン信号を計測した結果、電極埋め込みから 1 日後に単一ニューロンに由来する spike 信号を取得し、さらに 1 年を超えてその信号取得能力を示した (最大 617 日間)。また、埋め込み 1 カ月後のパワースペクトル密度 (PSD : power spectral density) 解析では、ノイズレベルが低く、Si マイクロニードルによる組織損傷 (グリア細胞の凝集) が抑制されていることが示唆された。免疫組織化学解析においても、電極近傍 ($0\sim 50\ \mu\text{m}$) におけるニューロン死滅が

市販のタングステン電極より少なく、電極を刺入していない組織（sham control）と同程度のニューロン密度が確認された。

次に、記録信号の高品質化に向けて、デバイス構造を活かしたノイズ低減手法を提案した。記録電極である Si マイクロニードル電極とリファレンス電極を近接配置し、局所的な差動計測を行うことでノイズを低減した。マウス自由行動下での計測において、高周波ノイズ（500～1500 Hz）が従来比で約 20%に減少し、行動下での spike 記録が可能となった。

さらに、ニードルのフレキシブル化により、慢性損傷のさらなる低減を図った。Si マイクロニードル内部の Si を除去し、中空構造を有する直径 5 μm の Parylene マイクロニードル電極デバイスを実現した。マウス脳を用いた刺入実験の結果、自立刺入が可能であり、急性損傷を最小限に抑えられることを確認した。免疫組織化学解析により、剛性の高い Si マイクロニードルと比較して、電極近傍（0～10 μm ）のニューロン密度が高く、マイクロニードルの柔軟性が慢性損傷の低減に寄与していることが明らかとなった。1 ヶ月間の電気生理学的評価においても、spike 信号の SNR および発火率の上昇、LFP（ γ 帯域）の回復が観察され、電極近傍組織の機能的回復を反映していることが示唆された。

本デバイスは、脳組織および神経ネットワークの構造と機能を保持しながら長期的な神経活動記録を可能とするプラットフォームとして、将来の神経インターフェース技術への応用が期待される。

Development of chronic *in vivo* neural recording technology using minimally invasive microneedle electrodes

Abstract

Long-term recording of neuronal signals from experimental animals such as mice is essential for neuroscience, medical research, and the development of brain–computer interfaces (BCIs). Among various recording techniques, intracortical microelectrodes with high spatiotemporal resolution are particularly powerful. However, conventional electrodes with large shank diameters ($>10\ \mu\text{m}$) and high stiffness cause severe tissue damage, leading to signal degradation over time. To reduce mechanical mismatch with brain tissue, flexible electrodes made of polymers such as parylene, or polyimide have been developed. Although these flexible electrodes effectively reduce chronic damage, they require insertion guides due to their low stiffness, which still induces acute tissue damage during insertion.

To address these issues, 5- μm -diameter silicon (Si) microneedle electrodes, fabricated using vapor–liquid–solid (VLS) crystal growth, have been proposed and shown to cause less acute tissue damage than conventional electrodes. However, these electrodes are fabricated on rigid Si substrates, and the microneedle is composed of stiff Si, resulting in chronic tissue damage caused by substrate compression and mechanical stress from the needle.

In this study, we developed a parylene-based microneedle electrode device with a 5- μm -diameter tip that possesses both a flexible substrate and a flexible needle while maintaining self-insertion capability. In addition, to suppress signal degradation due to high impedance associated with electrode miniaturization, we also proposed a noise reduction method to improve recording quality.

First, to reduce chronic tissue damage, we introduced a parylene flexible substrate to the VLS-grown Si microneedle electrodes, achieving a device structure capable of floating on brain tissue. Neural recordings from mouse cortex using the fabricated electrodes demonstrated detection of spike

signals 1 day after implantation, and stable recording performance was maintained for more than one year (up to 617 days). Power spectral density (PSD) analysis 1 month after implantation revealed a lower noise level, suggesting that gliosis and impedance increases were suppressed by reducing tissue damage around the Si microneedles. Immunohistochemical analysis further confirmed that neuronal loss within 0–50 μm from the electrode was less than that observed for commercial tungsten electrodes and was comparable to the neuronal density in non-implanted regions (sham control).

Next, to further improve signal quality, we proposed a noise-reduction assembling method utilizing the device configuration. By placing the reference electrode near the recording Si microneedle electrode and performing local differential recording, noise was effectively reduced. During freely moving mouse recordings, high-frequency noise (500–1500 Hz) decreased to approximately 20% of that in conventional configurations, enabling spike detection during behavior.

Furthermore, to further reduce chronic damage, we developed flexible hollow parylene microneedle electrode devices with a 5- μm diameter by removing the internal Si core of the Si microneedles. Insertion experiments using mouse brain tissue demonstrated that the device was capable of self-insertion with minimal acute damage. Immunohistochemical analysis showed that neuronal density within 0–10 μm from the electrode was higher than that around stiff Si microneedles, indicating that the flexibility of the parylene microneedle contributed to reduced chronic damage. Electrophysiological evaluation over one month revealed increased spike signal-to-noise ratio (SNR) and firing rate, as well as recovery of gamma-band local field potentials (LFPs), suggesting functional recovery of the tissue surrounding the electrode.

These results demonstrate that the developed flexible-substrate 5- μm -diameter parylene microneedle electrode enables long-term, high-quality neural recordings while preserving the structural and functional integrity of brain tissue. This device is expected to serve as a promising platform for future neural interface technologies.

目次

第 1 章 序論	1
1.1 緒言	1
1.2 刺入型電極における損傷メカニズム	3
1.2.1 急性損傷	3
1.2.2 慢性損傷	3
1.3 自立刺入型の剛性電極	5
1.3.1 ユタ電極	5
1.3.2 ミシガン電極	7
1.3.3 剛性電極の課題	9
1.4 フレキシブル電極	10
1.4.1 Nanoelectronic thread (NET)	10
1.4.2 Mesh electronics	12
1.4.3 Ultra-Flexible Tentacle Electrodes (UFTEs)	13
1.4.4 フレキシブル電極の課題	15
1.5 VLS 結晶成長を用いた Si マイクロニードル電極	16
1.6 Si マイクロニードル電極の課題	17
1.6.1 基板の剛性	17
1.6.2 ニードルの剛性	18
1.6.3 高インピーダンス特性とノイズ	19
1.7 研究目的	20
1.8 本研究の概要	21
参考文献	22
第 2 章 細胞外計測	28
2.1 緒言	28
2.2 脳組織－電極界面における等価回路モデル	28
2.3 細胞外電位	30
2.4 瘢痕インピーダンス	32
2.4.1 グリア瘢痕による電極インピーダンスの上昇	32
2.4.2 ニューロン－電極間距離の増大	32
2.5 生体電気計測におけるノイズ	33
2.5.1 内部ノイズ	33
2.5.2 外部ノイズ	34
2.6 結言	35
参考文献	36
第 3 章 VLS 結晶成長による神経電極の作製	38

3.1 緒言	38
3.2 VLS 結晶成長法	38
3.3 選択的 VLS 結晶成長	39
3.4 VLS 結晶成長を用いた神経電極の作製	40
3.5 結言	41
参考文献	42
第 4 章 フレキシブル基板 Si マイクロニードル電極デバイス	43
4.1 緒言	43
4.2 デバイス作製	45
4.2.1 デバイス作製プロセス	45
4.2.2 デバイス実装	48
4.3 電気的特性評価	49
4.3.1 インピーダンス特性	49
4.3.2 入出力電圧信号比 (O/I) 特性	50
4.4 マウス <i>in vivo</i> 長期ニューロン計測	51
4.4.1 実験手法	51
4.4.2 長期ニューロン計測	54
4.4.3 長期安定性評価	56
4.5 組織損傷評価	60
4.5.1 実験手法	60
4.5.2 ニューロンの蛍光観察および定量評価	63
4.6 自由行動下計測	65
4.6.1 ノイズ低減手法	65
4.6.2 実験手法	67
4.6.3 ニューロン計測およびノイズ比較	69
4.7 考察	73
4.8 結言	75
参考文献	76
第 5 章 Parylene マイクロニードル 電極デバイス	80
5.1 緒言	80
5.2 剛性シミュレーション	82
5.3 デバイス作製	84
5.4 デバイス特性	87
5.4.1 電気的特性 (インピーダンス特性)	87
5.4.2 機械的特性 (刺入試験)	88
5.5 組織損傷評価	90
5.5.1 実験手法	90

5.5.2 ニューロンの蛍光観察および定量評価	93
5.6 マウス <i>in vivo</i> ニューロン計測	96
5.6.1 実験手法	96
5.6.2 ニューロン慢性計測	100
5.6.3 LFP の安定性評価	102
5.6.4 spike 信号の安定性評価	104
5.7 考察	107
5.8 結言	109
参考文献	110
第 6 章 総括	116
参考文献	120
謝辞	121
研究業績	122
学術論文	122
国際会議発表	122
国内会議発表	123
受賞	125

第1章 序論

1.1 緒言

近年，脳神経科学や医療分野に加え，ブレイン・マシン・インターフェース（BMI：brain-machine interfaces）やブレイン・コンピュータ・インターフェース（BCI：brain-computer interfaces）の研究開発において，脳機能や神経機能の解明を目的とした研究が活発に行われている．脳の構造や大まかな機能についてはこれまでの研究により明らかにされている部分もあるが，ヒトの脳は約 860 億個という膨大な数の神経細胞（ニューロン）によって構成されており¹，未だ不明な点が多く残されている．より詳細に脳機能を理解するためには，ニューロン信号を高い時空間分解能で計測する技術が求められている．

脳信号計測手法の分類を Figure 1.1 に示す．脳信号計測は，大きく非侵襲型（noninvasive）と侵襲型（invasive）の 2 種類に分類される．非侵襲型計測の代表的な手法として，脳波計測（EEG：electroencephalography）² や機能的磁気共鳴画像法（f-MRI: function magnetic resonance imaging）³，および近赤外分光分析法（f-NIRS: function near infrared spectroscopy）⁴ が挙げられる．これらの手法は生体への侵襲が小さい一方で，時空間分解能が低いという課題がある．これに対して侵襲型計測では，脳組織（皮質表面および皮質下）から直接的に電気生理計測を行う．代表的な手法として，皮質脳波計測（ECoG: electrocorticogram）⁵ や，刺入型神経電極を用いた計測がある．脳表に薄いフィルムを配置して硬膜下から計測を行う ECoG 電極は，刺入型電極と比較して組織損傷が小さい．しかし，脳表近傍の信号しか取得できないため，皮質下でのみ得られるような高精度な信号を記録することは困難である．一方で，刺入型電極は組織内の神経活動を直接計測でき，局所電場電位（LFPs：local field potentials）や単一ニューロンに由来する spike 信号の記録が可能である⁶．この特性により，刺入型の電極技術は基礎的な神経科学研究から臨床応用に至るまで幅広く利用されており，電気生理学研究における強力なツールとして機能している⁷⁻¹⁰．さらに，ヒトを対象とした BMI や BCI などの先進的な応用研究にも展開されている（Figure 1.2）¹¹⁻¹³．

さらに，齧歯類（マウス，ラット）等の実験動物を用いた計測では，自由行動下における長期的な神経記録技術が求められる．自由行動（freely moving）動物を用いた慢性記録の実験系では，(1)睡眠・覚醒を含む数日間にわたる連続記録が可能であること，(2)心理学で確立された行動実験を適用できること，(3)空間認知に関連する神経活動を解析できること，といった多数の利点がある¹⁴．この

ような背景から、近年では自由行動マウスにおける脳信号計測技術の開発が進められている^{15,16}。

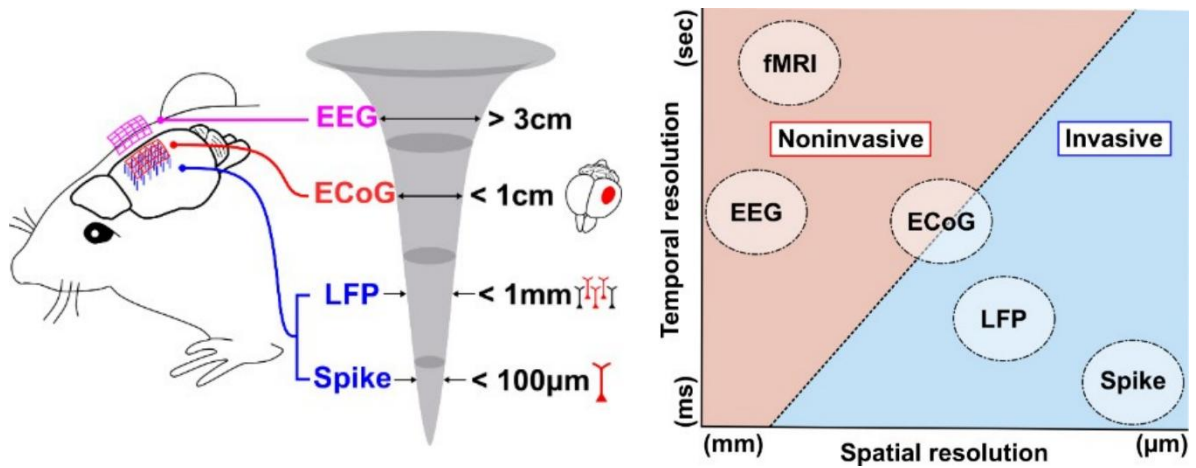


Figure 1.1 脳信号計測技術の分類

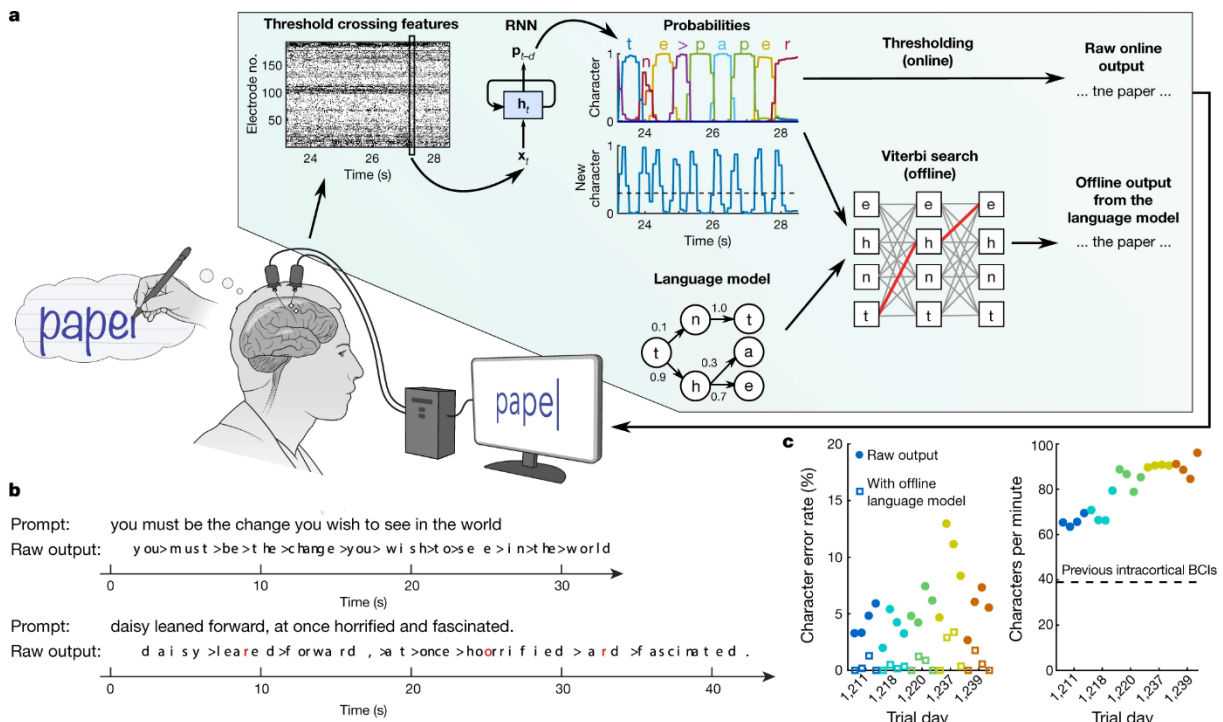


Figure 1.2 ブレイン・コンピュータ・インターフェース (BCI)

Copyright 2021, Springer Nature, 許諾済 (CCC 経由)¹²

1.2 刺入型電極における損傷メカニズム

1.1 節では、脳信号計測技術の分類と、高時空間分解能を有する刺入型電極（侵襲型計測）の優位性について述べた。しかしながら、慢性埋め込みを目的とした電極デバイスの開発が進められている一方で、安定的かつ高品質な長期記録の実現には依然として大きな課題が残されている^{8,17}。主な問題は、電極埋め込みによって生じる組織損傷と、それに続く異物反応に伴う計測機能の劣化である（Figure 1.3）^{9,18,19}。電極による組織損傷は、一般的に急性（初期）損傷と慢性損傷の二段階に分類される^{6,9,10,20}。本節では、これらの分類と、電極の劣化メカニズムの詳細について述べる。

1.2.1 急性損傷

本項では、脳組織への電極刺入に伴う急性損傷について述べる。電極刺入時には、脳組織の機械的破壊によりニューロン密度が著しく低下した領域（kill zone）が形成される^{21,22}。また、出血や血液脳関門（BBB：blood brain barrier）の破壊によって神経ネットワークが著しく障害されることが報告されている²³。さらに、刺入後 24 時間以内には活性化マイクログリアが電極周囲に集積し、グリア瘢痕形成が開始される²⁴。この異物反応は、直径 20 μm 以上の電極刺入で顕著に発生し、デバイス体積に比例して増大することが示されている²⁴⁻²⁶。そのため、長期的な神経記録の実現には、電極サイズの微細化が求められており、直径 10 μm 以下が望ましいとされている。また、わずかな細胞レベルの損傷であっても、大規模な神経ネットワーク活動に負の影響を及ぼすことが報告されている²⁷。このように、急性損傷によってネットワーク構成が大きく変化すると、埋め込み前とは異なる組織の情報しか得られない可能性がある。

1.2.2 慢性損傷

本項では、電極埋め込み後に継続的に進行する慢性損傷について記述する。慢性損傷は、電極の固定方法²⁸⁻³⁰、脳組織のマイクロモーション^{31,32}、およびデバイスと脳組織との機械的ミスマッチ^{33,34}によって生じる。これらの要因により、マイクログリア活性化とアストロサイト瘢痕化による電極周囲の被膜形成が持続的に進行する（gliosis）²¹。このようなグリア細胞の凝集は、信号対雑音比（SNR：signal-to-noise ratio）の低下などの記録品質の劣化を引き起こす。また、信号源であるニューロンが電極から遠ざかることで、長期計測を困難としている（Figure 1.4）^{34,35}。さらに、電極埋め込みにより、大脳皮質層内および層間における機能的ネットワーク結合性が変化することも報告されている³⁶。

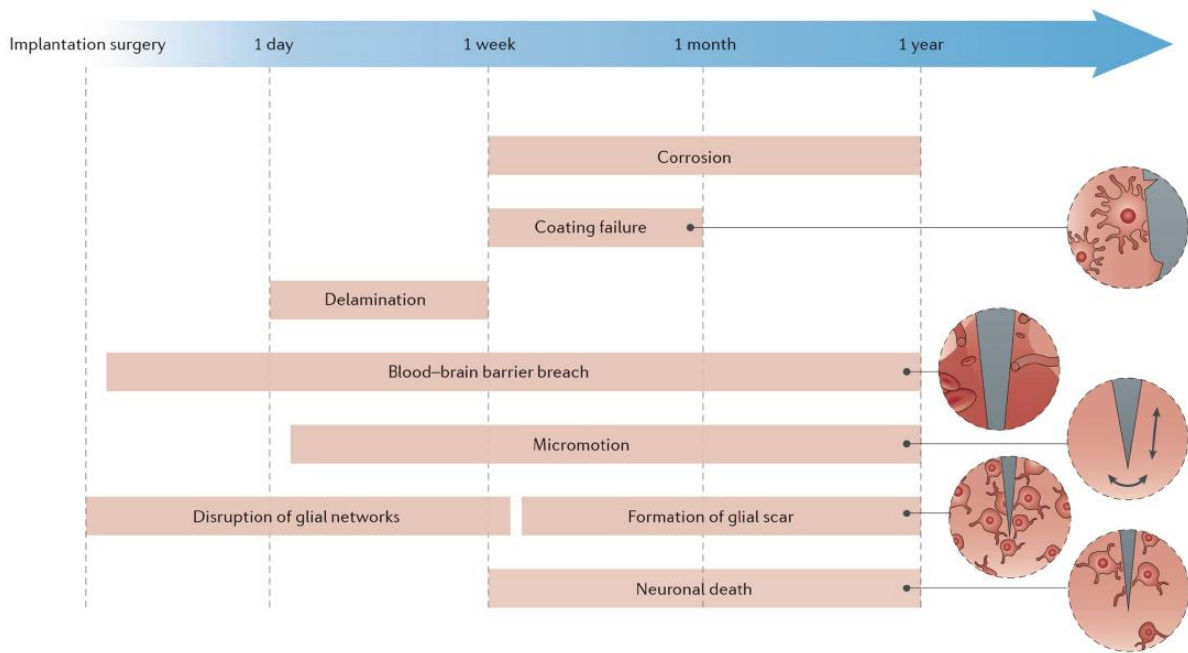


Figure 1.3 刺入型神経電極の劣化

Copyright 2019, Springer Nature, 許諾済 (CCC 経由) ³⁷

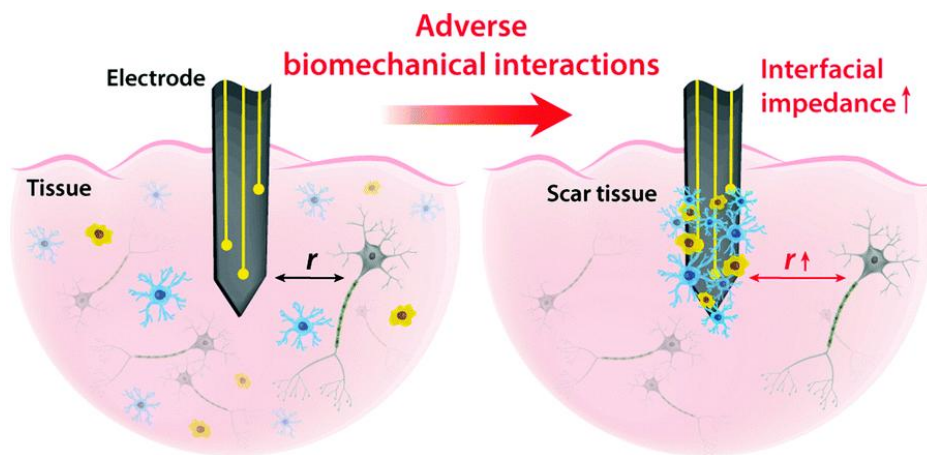


Figure 1.4 組織損傷によるニューロンの離反

Copyright 2019, RSC, CC BY-NC ライセンスに基づく転載 ³⁴

1.3 自立刺入型の剛性電極

本節では、これまでに提案されてきた剛性電極について概説する。さらに、各電極の利点と課題を整理し、現行デバイスの問題点を明らかにする。

1.3.1 ユタ電極

本項では、剣山型シリコン (Si) 製マイクロニードルアレイであるユタ電極および Silicon microneedle array (SiMNA) について記述する。

まず、ユタ大学によって開発されたユタ電極を紹介する (Figure 1.5a)。本電極は、厚さ 200 μm の Si 基板 ($4.2 \times 4.2 \text{ mm}^2$) 上に 10×10 本の合計 100 本の電極を有する。電極間隔は 400 μm 、電極の長さは 1500 μm 、先端直径は 50 μm である³⁸。電極作製プロセスとしては、まず Si ウェハ表面にラッピング処理を施し、ブレードダイシングによりニードルを形成する。次に、二段階エッチングにより鋭いテーパーを形成し、電荷移動を容易にするためニードルに金を成膜する。さらに、ニードル先端以外を生体適合性ポリイミドで覆うことで神経電極として完成する。各電極は絶縁性に優れた *mote of glass* と呼ばれる液状材料を溝に流し込み、熱処理を加えることで電氣的に絶縁されている。電極の電氣的接続は、裏面のアルミニウムパッドから行うことが可能である。このように、Si ウェハをダイシング加工することでプローブを形成できるため、容易に電極アレイを作製できる。ユタ電極は BMI 研究にも応用実績がある³⁹。しかしながら、電極直径が大きいため刺入時に神経ネットワーク破壊などの急性損傷が生じる可能性があり、さらに硬い Si 基板やニードルによる慢性損傷も懸念される (Figure 1.5b)⁴⁰。

次に、ユタ電極に類似した剣山型アレイ構造を持つ最新電極として Silicon microneedle array (SiMNA) を紹介する (Figure 1.6a)。SiMNA はデュアルサイドリソグラフィー微細加工プロセスを用いて作製された 1024 チャンネルの刺入型神経電極である。電極直径 10 μm 、長さ 100 μm と非常に小型である。基板はフレキシブルなポリイミドで構成されているため、ユタ電極のような硬い基板を有するデバイスと比較して低侵襲である (semi-flexible)。Figure 1.6b に示すように、デバイス埋め込みによる脳組織の歪みがほとんど生じないことが確認されている。さらに、SiMNA の基板は透明であるため、ニューロンの活動を光学的かつ電気生理学的に計測可能である。32 チャンネルの SiMNA を慢性的に埋め込んだマウスにおいて、光遺伝学的刺激に応答する spike 信号の記録に成功している⁴¹。しかしながら、硬い Si ニードルによる慢性損傷の懸念は残る。また、ニードル長さが 100 μm と短いため、皮質下領域の計測にはさらなる伸長化が求められる。

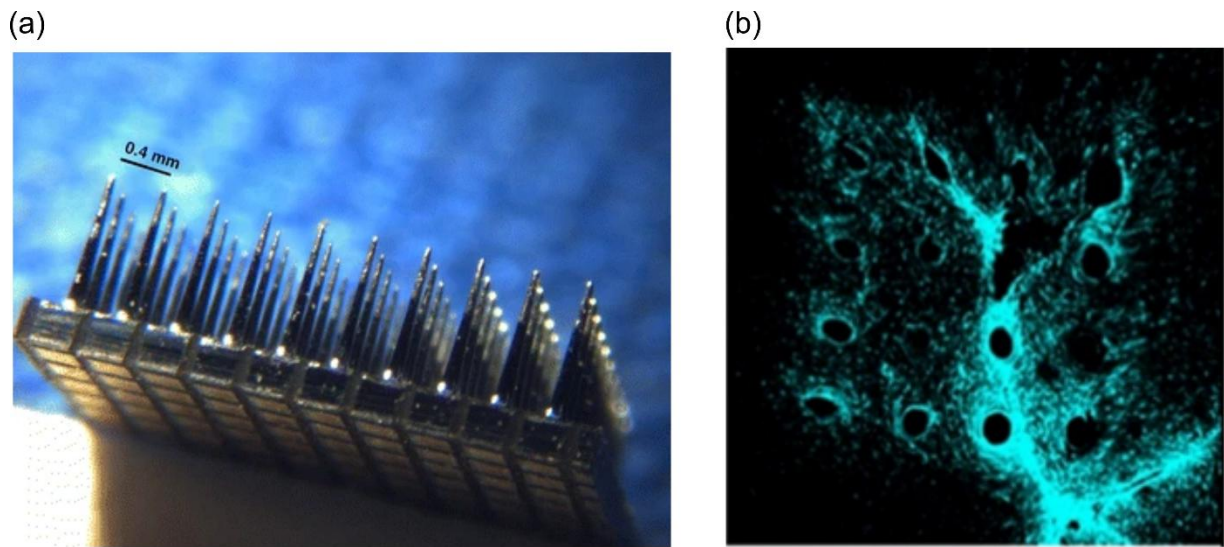


Figure 1.5 ユタ電極

Copyright 2009, Springer Nature, 許諾済 (CCC 経由) ⁴²

Copyright 2015, Elsevier, 許諾済 (CCC 経由) ⁴⁰

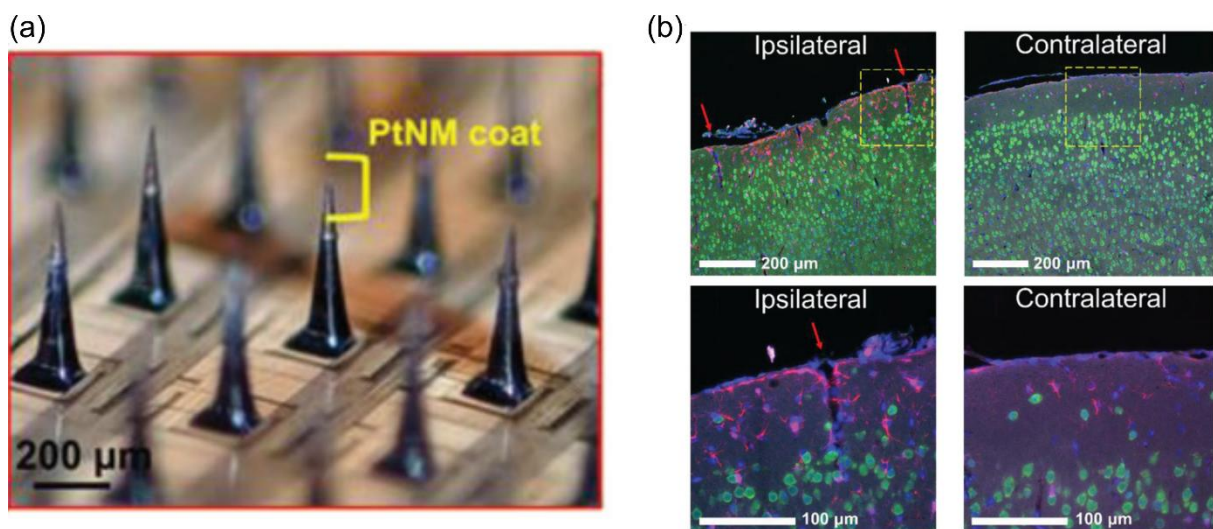


Figure 1.6 Silicon microneedle array (SiMNA)

Copyright 2022, Wiley-VCH GmbH, 許諾済 (CCC 経由) ⁴¹

1.3.2 ミシガン電極

本項では、シャンク型 Si 電極アレイであるミシガン電極および Neuropixels プロープについて記述する。

ミシガン電極は、長さ 1935 μm 、幅 40~60 μm の複数のプローブシャフト上に平面電極を複数配置した神経電極である。シャンク間隔は 150 μm 、各シャンク内の平面電極間隔は 100 μm である⁴³。ホウ素 (B) を注入した Si と比較して、不純物を注入しない Si の方がエッチングレートが速く、この特性を利用した選択的エッチングによりシャンク形状の電極を形成している (Figure 1.7a)⁴⁴。また、高品質な神経信号の取得のため、現在では集積回路を搭載することが一般的である⁴⁵。

近年では、従来のミシガン電極よりも電極ピッチが狭く (20 μm)、300 以上の測定電極をもち、フレキシブルプリント基板 (FPC : flexible printed circuits) を介して処理回路へ接続可能な Neuropixels プロープが注目されている (Figure 1.8)⁴⁶。さらに、より高集積化されたシャンクと小型化されたヘッドステージを有する Neuropixels 2.0 (NP 2.0) が開発されている⁴⁷。1 シャンクあたりの記録部位数は 960 から 1280 に増加し、ヘッドステージには 4 シャンクを搭載することが可能となった。1 匹のマウスに 2 つの 4 シャンク NP 2.0 プロープを刺入することで、計 10,240 個の記録サイトを慢性的に埋め込むことに成功している。

しかし、プロセス上の制約により、これら電極サイズのさらなる微細化は困難である。そのため、脳組織に対して高侵襲であり、刺入時の神経ネットワーク破壊などの急性損傷や、マイクロモーションに起因する慢性損傷が懸念される (Figure 1.7b)⁴⁸。

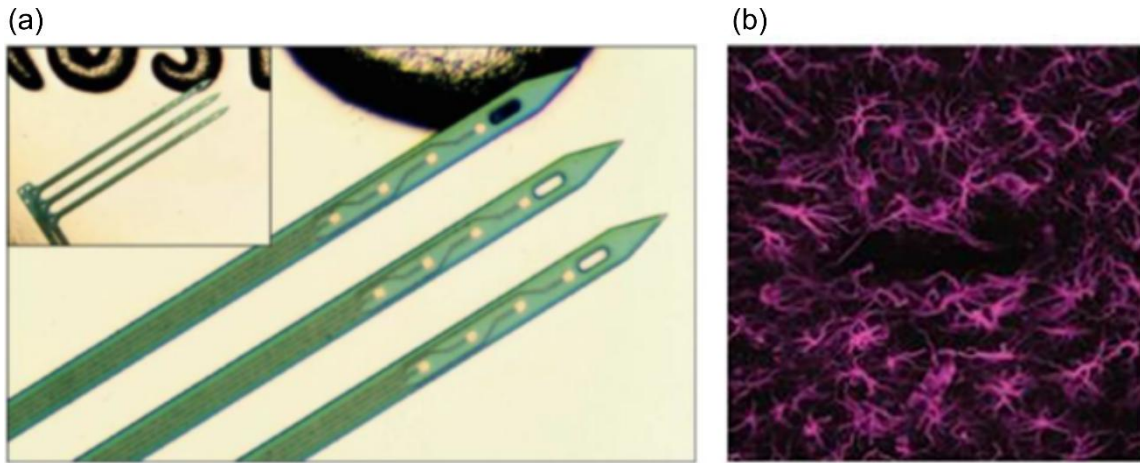


Figure 1.7 ミシガン電極

Copyright 2004, IEEE, 許諾済 (CCC 経由) ⁴⁴

Copyright 2013, Springer Nature, 許諾済 (CCC 経由) ⁴⁸

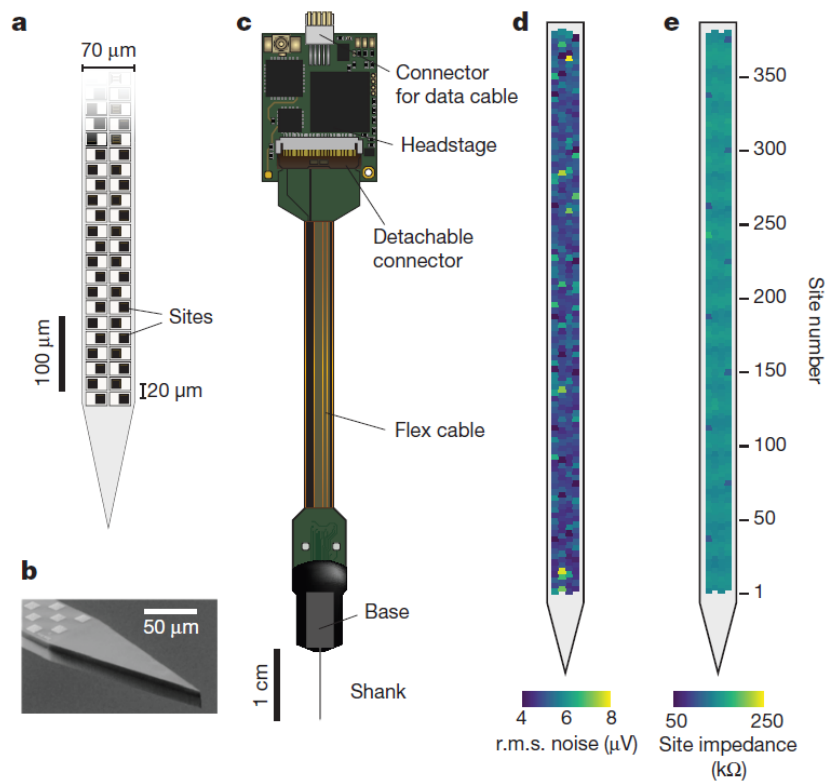


Figure 1.8 Neuropixels

Copyright 2018, Springer Nature, 許諾済 (CCC 経由) ⁴⁹

1.3.3 剛性電極の課題

本項では、本節で紹介してきた剛性電極に共通する課題を整理する。一般的に、電極サイズが $20\ \mu\text{m}$ 以上と非常に大きく、刺入に伴う急性損傷が大きい (Figure 1.9a)。これにより、ニューロンの死滅、BBB の破壊、神経ネットワークの障害が生じる。さらに、本節で紹介した電極は硬い Si 材料で構成されているため、脳組織のマイクロモーションに追従できず、継続的に組織に機械的ストレスが加わることで慢性損傷を引き起こす (Figure 1.9b)。このため、埋め込み期間が長くなるほど、アストロサイトなどのグリア細胞が電極周囲に蓄積し、長期的な計測を困難にしている。

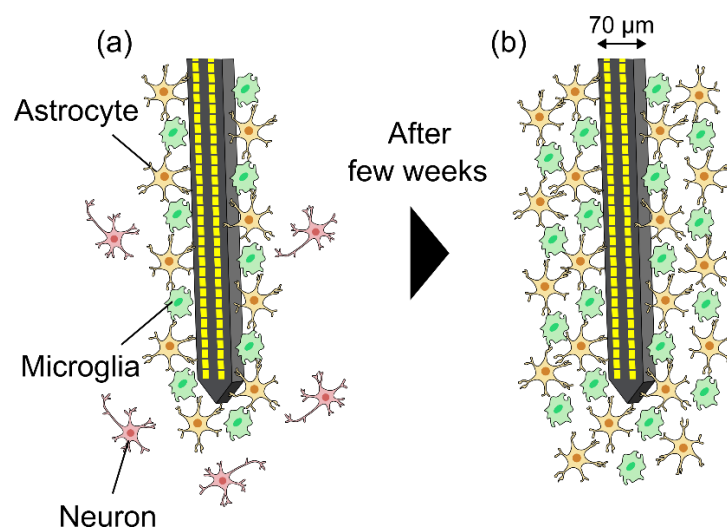


Figure 1.9 剛性電極による組織損傷

1.4 フレキシブル電極

1.3 節では、これまで提案されてきた剛性電極（Si 電極）について紹介し、急性損傷および慢性損傷に伴う免疫反応が、長期的な神経計測の可能性を著しく制限することについて述べた。この課題を克服する戦略の一つとして、ポリイミド（PI : polyimide）やパリレン（PaC : parylene-C）などの低ヤング率材料を用いたフレキシブル電極が提案されている（Figure 1.10）^{20,50}。フレキシブル電極を用いることで、1年以上にわたり単一ニューロン活動の記録を維持できることが報告されている⁵¹。しかし、柔軟性の高さゆえに刺入時に座屈が生じやすく、脳組織への安定した刺入が困難となる。本節では、近年提案されているフレキシブル電極と各種刺入手法について概説する。さらに、各フレキシブル電極の利点と課題を整理し、現行デバイスにおける問題点を明らかにする。

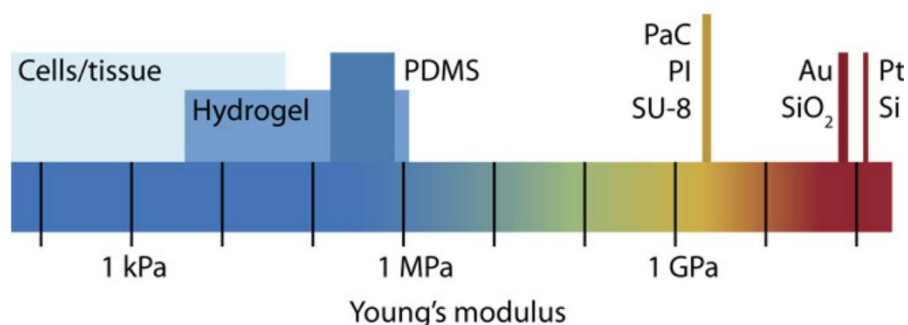


Figure 1.10 各材料のヤング率比較

Copyright 2017, AAAS, 許諾済（CCC 経由）²⁰

1.4.1 Nanoelectronic thread (NET)

Nanoelectronic thread (NET) は、糸状のフレキシブルなマイクロ電極であり、脳組織への慢性損傷を最小化し、長期的に安定した神経信号の記録を可能とするプローブである。NET-50 は幅 50 μm 、厚さ 1 μm の 4 層構造で 8 チャンネルを有し、NET-10 は幅 10 μm 、厚さ 1.5 μm の 7 層構造で両面に電極が配置されている。デバイス作製は、フォトリソグラフィにより金属配線（Au）および絶縁膜（ポリイミド、SU-8）の積層し、ビア孔で電極と配線を接続する方法で行われた。フレキシブル材料を用いているため自立的な刺入が困難であり、直径 50 μm のタングステンシャトルを用いて脳組織へ挿入される（Figure 1.11a）⁵²。マウス皮質にデバイスを埋め込んだ慢性実験では、埋め込み 2 週間後から 4 カ月間にわたり、単一ニューロン由来の spike 信号を安定して記録でき、信号劣化はほとんど認められなかった。さらに、二光子イメージングおよび組織解析により、血液脳関門（BBB : blood brain barrier）、ニューロン、グリア細胞の構造が維持され、

慢性損傷はほとんど生じないことが確認されている⁵²。

また、神経活動を三次元的かつ高密度に記録するための技術として、NET アレイが開発されている。高密度 NET アレイは、フレキシブルな高密度マルチチャンネル構造を有し、複数モジュールを組み合わせることで 1,000 チャンネルを超える大規模記録が可能である (Figure 1.11b)。NET アレイの埋め込みは、2 台の定位マニピュレータを用いてモジュールを 1 つずつ順次刺入することで実現され、モジュール間隔 150 μm で記録チャンネル $8 \times 8 \times 16$ (計 1,024 チャンネル) の配置を実現している。本手法により、最大 290 日の計測に成功している⁵³。

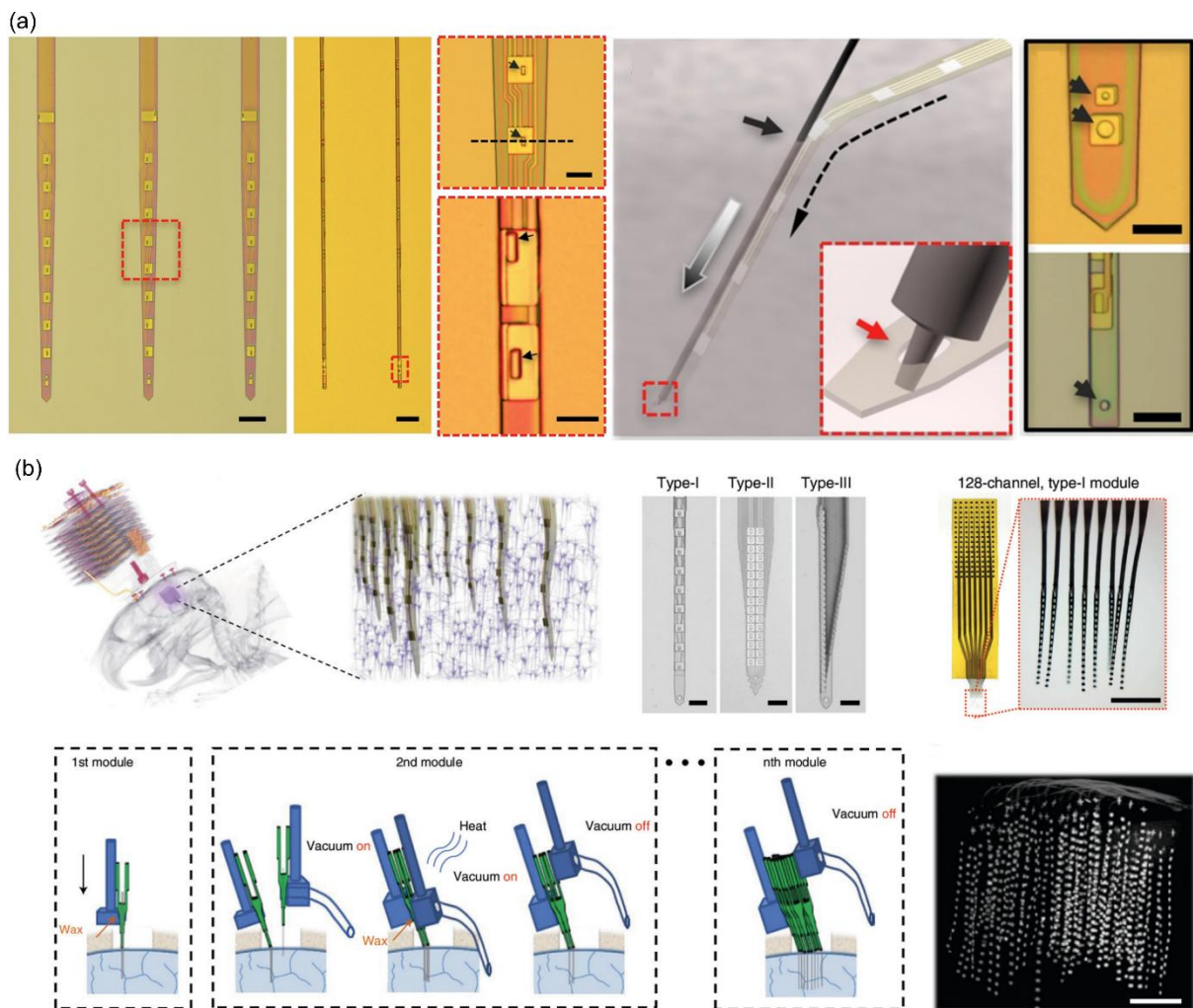


Figure 1.11 Nanoelectronic thread (NET)

Copyright 2017, The Authors published by AAAS,

CC BY-NC ライセンスに基づく改変・転載⁵²

Copyright 2023, Springer Nature, 許諾済 (CCC 経由)⁵³

1.4.2 Mesh electronics

Mesh electronics は、脳内の神経ネットワークが有する複雑かつ三次元的な構造を模倣する設計となっている。このフレキシブルかつ微細な構造により、電極は神経組織内に自然に組み込まれ、長期にわたり安定した信号記録が可能である。主な埋め込み方法として、SU-8 ガイドアーム法⁵¹とシリンジインジェクション法⁵⁴⁻⁵⁸がある。前者では、厚さ 40 μm の SU-8 シャトルが、厚さ 2.5 μm のフレキシブルメッシュ電極のガイドアームとして用いられる (Figure 1.12a)。埋め込み前に SU-8 を加熱硬化させることで、分子間の架橋反応により機械的強度が増す。しかし、硬化後は不可逆であり、静電力により柔軟電極から分離しにくく、長期埋め込みでは組織との摩擦が増加する。この問題を解決するため、SU-8 と電極間に厚さ 2 μm の水溶性グルコース層を挿入する。埋め込み後、グルコース層が溶解し、SU-8 シャトルを除去することで、平面メッシュ電極を組織内に残すことが可能となる。この構造により、慢性炎症下でもニューロンの回復が促進され、13 ヶ月にわたり安定した電気生理学的記録が可能であることが確認された。

シリンジインジェクション法では、直径 100 μm 程度のガラスキャピラリー内に円筒状のメッシュ電極をセットし、マイクロインジェクションポンプを用いて組織内に埋め込む。記録チャンネル数は最大 32~128 個であり、spike 信号を記録することに成功している⁵⁶。免疫組織化学的解析の結果、埋め込み後 2 週間においてアストロサイトおよびマイクログリアの集積はわずかに抑えられ、さらに 3 ヶ月後にはメッシュ電極が脳組織に完全に統合されていることが確認されている。(Figure 1.12b)。

このようなメッシュ構造は、ニューロンのシナプス形成や栄養の流れを促進し、組織との相互作用を良好に保つことができる。また、フレキシブルであることから、埋め込み後の慢性損傷は極めて低いと期待される⁸。しかしながら、刺入時には厚さ 40 μm のガイドアームや直径 100 μm のシリンジを使用するため、広範囲の脳組織損傷や神経ネットワーク破壊が生じ、基本的に急性損傷を避けることができない^{54,58}。

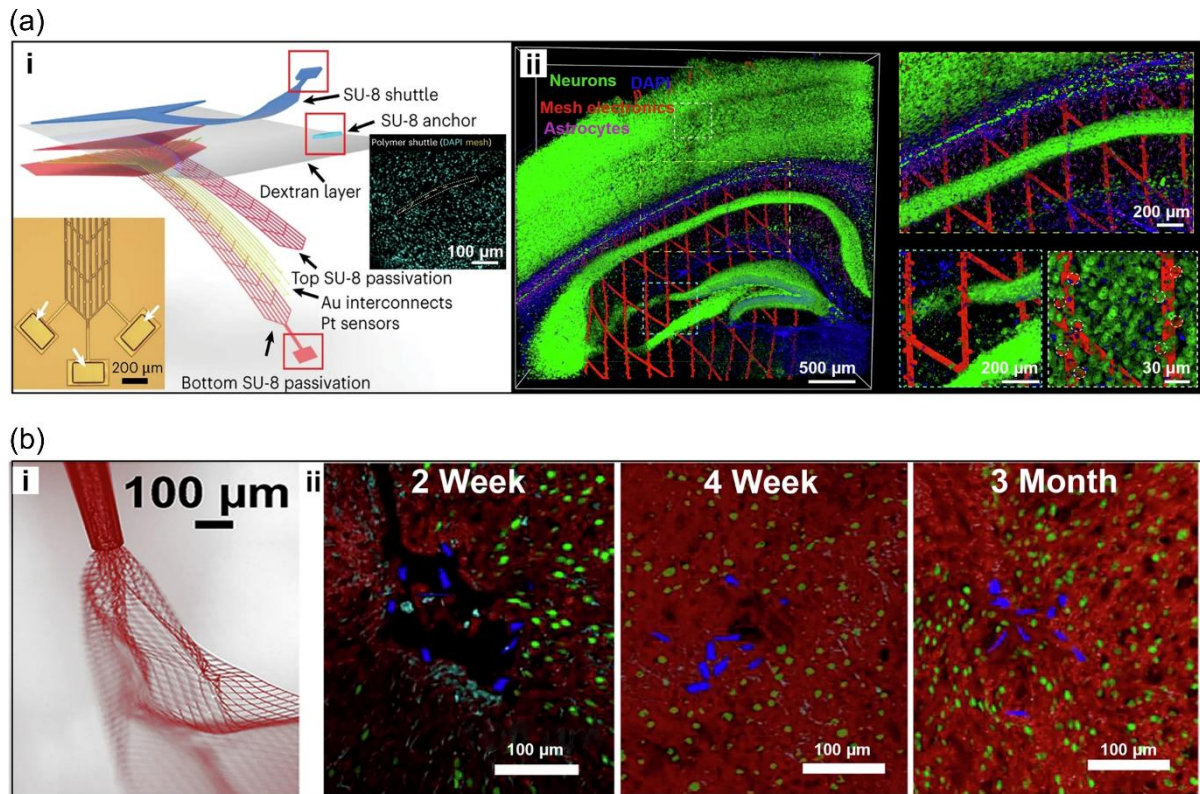


Figure 1.12 Mesh electronics

Copyright 2023, Springer Nature, 許諾済 (CCC 経由) ⁵¹

Copyright 2018, ACS, 許諾済 (CCC 経由) ⁵⁴

1.4.3 Ultra-Flexible Tentacle Electrodes (UFTEs)

Ultra-Flexible Tentacle Electrodes (UFTEs) は、256 個の記録電極を備えた触手状フレキシブル電極アレイである。本デバイスは、Ti/Au 金属層を 2 層のポリイミド層で挟んだ構造を持ち、各ファイバーに 1 つの記録電極が配置されている。すべてのファイバーが機械的に独立しているため、周囲組織への機械的ストレスを最小限に抑えることができる。各ファイバーの幅は 7 μm、厚さは 2.4 μm、断面積は 16.8 μm² であり、典型的なニューロン細胞体の断面積の約 1/10 に相当する。256 個の電極は、それぞれ 64 チャンネルずつの 4 つのバンドルに分けられ、異なる脳領域から任意の距離での記録が可能である (Figure 1.13a)。

電極埋め込みの際には、各バンドルをポリエチレングリコール (PEG : Polyethylene glycol) 溶液およびシルクフィブロインでコーティングし、ファイバーを束ねる。さらに、最も長いファイバーの先端には内径 25 μm のループが形成されており、これを用いて直径 50 μm のタングステンシャトルに機械的に固定し、脳組織への挿入を行う (Figure 1.13b)。

UFTEs を用いた免疫染色解析の結果、埋め込みから 3.5 ヶ月後において慢性的

な組織損傷は観察されなかった。また、UFTEs は同一ニューロンを少なくとも 10 ヶ月間追跡可能であることが確認されている。

各ファイバーは非常に細くかつフレキシブルな設計となっているが、刺入時には PEG コーティングおよび直径 50 μm のタングステンシャトルが必要であるため、刺入時のフットプリントは依然として大きい。その結果、慢性損傷の低減は可能であるものの、急性損傷は回避できない。

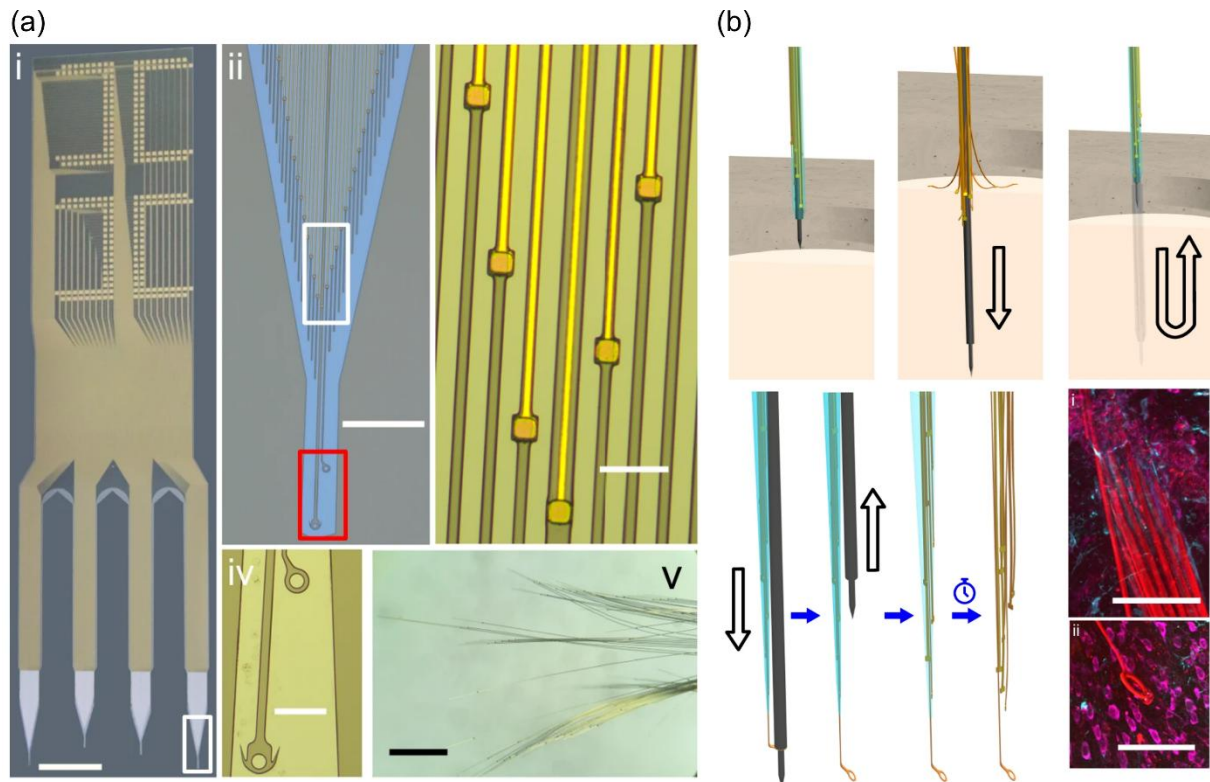


Figure 1.13 Ultra-Flexible Tentacle Electrodes (UFTEs)
Copyright 2024, The Authors published by Springer Nature,
CC BY ライセンスに基づく改変・転載⁵⁹

1.4.4 フレキシブル電極の課題

本項では、本節で紹介してきたフレキシブル電極の課題についてまとめる。電極材料として高ヤング率の Si を用いた剛性電極に代わり、柔軟な Parylene やポリイミドを用いたフレキシブル電極の発展によって、長期安定計測が可能となりつつある (Figure 1.14)。しかしながら、いずれの電極も自立的な刺入は困難であるため、シャトルデバイスや一時的硬化コーティング、シリンジを用いた刺入手法が補助として用いられている。いずれの手法も刺入フットプリントを拡大し、急性損傷を増大させるという問題が残る (Figure 1.14a)。急性損傷によってネットワーク構成が大きく変化すると、たとえ長期的な記録が可能となっても、埋め込み前とは異なる組織情報しか取得することができない。したがって、フレキシブルでありながら自立的に刺入可能な電極技術が強く求められる。

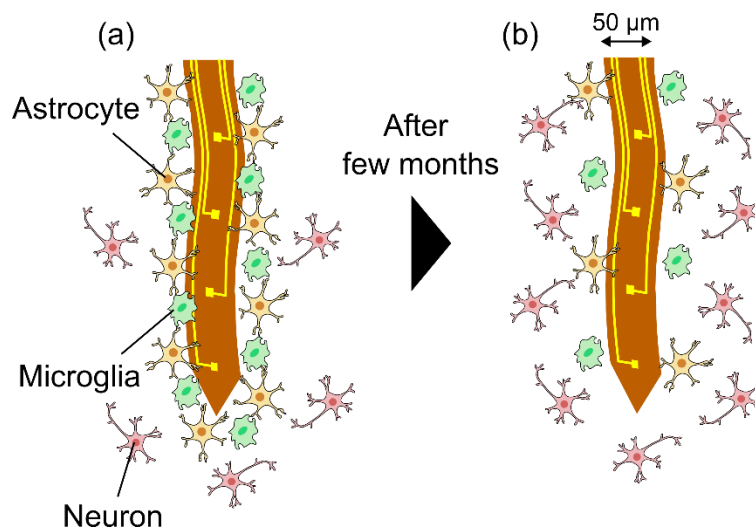


Figure 1.14 フレキシブル電極による組織損傷

1.5 VLS 結晶成長を用いた Si マイクロニードル電極

1.3 節および 1.4 節で述べたように、従来の電極では電極サイズや刺入フットプリントが大きいため、刺入に伴う急性損傷を避けることができない。この課題を解決するために、本研究室では、Vapor-Liquid-Solid (VLS) 結晶成長法を用いた刺入型神経電極を提案してきた (Figure 1.15) ^{26,60-64}。VLS 結晶成長を用いた Si マイクロニードル電極は、先端直径 $5\ \mu\text{m}$ 、長さ $400\ \mu\text{m}$ と微小であり、急性損傷の低減が期待される。これまで免疫染色学的評価により、脳組織への低侵襲性も確認されている (Figure 1.16) ^{26,65}。また、MOS (metal oxide semiconductor) 集積回路の搭載に成功しており ^{66,67}、さらに多チャンネル化の研究も進められている。現在では、本電極を慢性的に埋め込んだマウスにおいて、視覚刺激に応答する spike 信号を最大 6 ヶ月間にわたり記録することに成功している ⁶⁸。

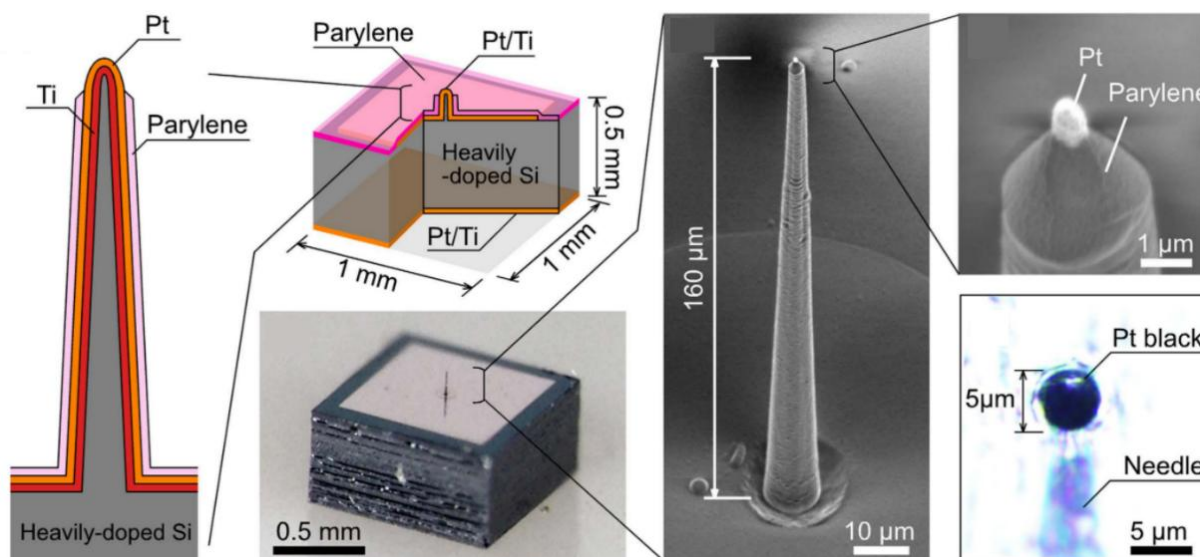


Figure 1.15 VLS-Si マイクロニードル電極

Copyright2016, The Authors published by Springer Nature,

CC BY ライセンスに基づく改変・転載 ⁶⁰

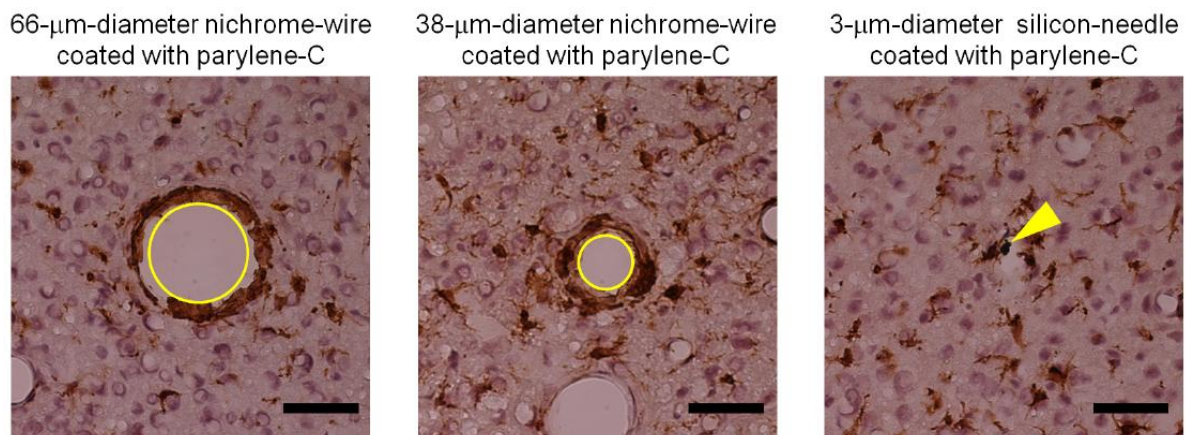


Figure 1.16 Si マイクロニードル電極の損傷評価
 Copyright 2015, The Authors published by Springer Nature,
 CC BY-NC-ND ライセンスに基づく転載²⁶

1.6 Si マイクロニードル電極の課題

1.5 節では、本研究室で開発された Si マイクロニードル電極デバイスについて紹介し、先端直径が非常に小さく、従来電極と比較して急性損傷を抑制できることを説明した。しかし、Si マイクロニードル電極にも複数の課題が存在し、これらが原因となり長期安定的なニューロン計測を妨げている。本節では、Si マイクロニードル電極の問題点を整理し、本研究の意義を明確にする。

1.6.1 基板の剛性

Si 成長技術（VLS 結晶成長法）を用いた直径 5 μm の Si マイクロニードル電極は、従来電極よりも組織損傷が少ないことを示してきた。しかし、Si マイクロニードルは 500 μm 厚の Si 基板上に作製されており、デバイス埋め込み時には基板を頭蓋骨に固定する必要がある。その結果、基板の圧迫による機械的ストレスやマイクロモーションが脳組織への慢性損傷を引き起こす課題が残る（Figure 1.17）。そのため、SiMNA（Figure 1.6）のようなフレキシブル基板の導入が求められる。

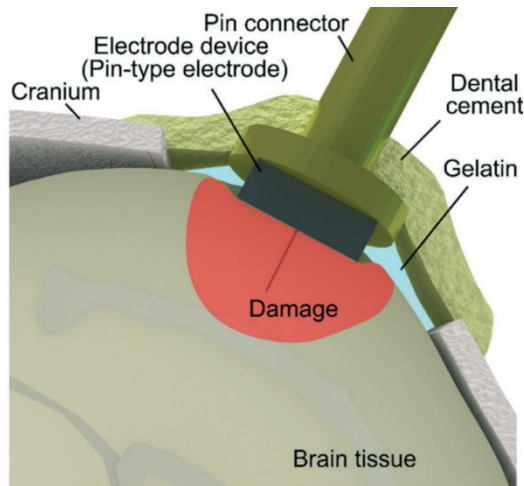


Figure 1.17 Si 基板による慢性組織損傷
 Copyright 2022, RSC, 許諾済 (CCC 経由) ⁶⁸

1.6.2 ニードルの剛性

VLS 結晶成長法を用いた直径 $5\ \mu\text{m}$ の Si マイクロニードル電極は急性損傷の低減が可能である (Figure 1.18a). 一方で, Si ニードルの剛性が高いため脳組織のマイクロモーションに追従することができず, 継続的な機械的ストレスが発生し, これに伴う慢性損傷が懸念される (Figure 1.18b). そのため, 1.4 節で例に挙げたフレキシブル電極のように, ニードルをフレキシブルな材料で構成することが求められる.

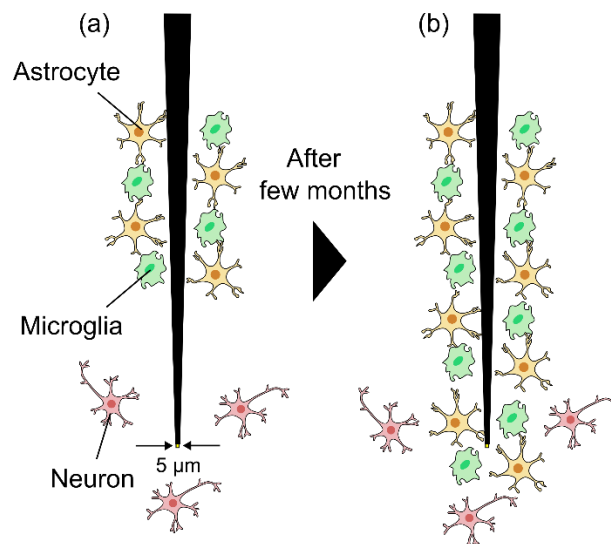


Figure 1.18 Si マイクロニードルによる慢性組織損傷

1.6.3 高インピーダンス特性とノイズ

電極の微小化は脳組織損傷の低減に有効であるが、電極表面積の縮小に伴いインピーダンスが増加し、SNRを低減させる⁶⁹。2～5 M Ω (1 kHz) を超えるような高インピーダンスは、記録信号の著しい減衰を招く^{70,71}。

さらに、実際の生体計測においてはノイズ対策が重要である⁷²。脳組織内の細胞外領域での伝搬過程における減衰の結果、多くの場合、生体電気計測の対象は微小信号となる。Si マイクロニードル電極のような極微小電極はインピーダンスが高いため、さらにノイズに弱くなってしまう。加えて、自由行動下では行動に起因するノイズが発生する⁷³。特に高インピーダンス電極では、高品質なニューロン計測が困難となるため、慢性計測では鎮静剤投与下で実験動物の行動を制限した状態で記録されることが多い⁶⁸。

1.7 研究目的

脳神経科学，医療分野，および BMI/BCI の開発等において，マウスなどの実験動物のニューロン信号を長期的に記録する技術は極めて重要である．なかでも，高い時空間分解能を有する刺入型電極による手法が有力であるが，電極の太い刺入部 ($>10\ \mu\text{m}$) や高い剛性に起因する侵襲性が課題となっている．近年，脳組織との機械的ミスマッチを低減するため，Parylene やポリイミドなどの柔軟な材料を用いた電極の開発が進められている．しかし，これらの電極は慢性損傷を軽減する一方で，自立的な刺入が困難であり，ガイドなどの補助を必要とするため，依然として急性（初期）損傷は回避できていない．この問題を解決するため，VLS 結晶成長技術を用いた直径 $5\ \mu\text{m}$ の Si マイクロニードル電極が提案され，従来電極よりも急性組織損傷が少ないことが示されている．しかしながら，本電極は硬い Si 基板上に形成されており，ニードル自体も剛性の高い Si で構成されているため，基板の圧迫やニードルの機械的ストレス等による慢性損傷が課題として残っていた．

そこで本研究では，フレキシブルな基板とニードルを有しつつ自立的な刺入を可能とする，先端直径 $5\ \mu\text{m}$ の Parylene 製マイクロニードル電極デバイスの開発を目的とする．さらに，電極の微小化に伴う高インピーダンス化による記録信号の劣化を抑制するため，ノイズ低減手法も併せて提案する．

課題であった慢性損傷の低減に向けて，まず Parylene 製のフレキシブル基板を導入し，組織上で浮遊可能なデバイス構造を実現する．さらに，ニードル自体をフレキシブル化することで，さらなる慢性損傷の低減を目指す．さらに，作製したデバイスの電気的特性評価，マウスを用いた電気生理計測，および免疫組織化学による組織損傷評価を通じて，長期計測における提案デバイスの有用性を検証する．また，記録信号の高品質化に向けて，作製したデバイスの構造を活かしたノイズ低減手法を提案し，自由行動下での計測を通して提案手法の有用性を確認する．

1.8 本研究の概要

本論文は、VLS 結晶成長法を用いた Si マイクロニードル電極の更なる低侵襲化、長期 *in vivo* ニューロン計測、組織損傷評価、および記録信号の高品質化に関する実験結果と考察をまとめたものである。

第 1 章では、脳信号計測の重要性と従来技術の問題点を提示し、本論文の目的を明確化した。第 2 章では、刺入型神経電極による細胞外計測の原理と、そこで生じる課題について説明する。第 3 章では、本研究の核である VLS 結晶成長による神経電極の作製について記述する。第 4 章では、Si マイクロニードル電極の基板をフレキシブル化し、電気的特性評価、マウスを用いた電気生理計測、免疫組織化学による組織損傷評価を通して、長期ニューロン計測における本デバイスの有用性を検討する。さらに、デバイスの構造を活かしたノイズ低減手法を提案し、マウスの自由行動下計測を実施する。第 5 章では、Si マイクロニードル電極のニードル部分をフレキシブル化し、機械的・電気的特性評価、電気生理計測、免疫組織化学解析を通じて低侵襲性を評価する。第 6 章で本論文を総括する。

参考文献

1. Herculano-Houzel, S. The human brain in numbers: a linearly scaled-up primate brain. *Front. Hum. Neurosci.* **3** (2009).
2. Kim, Y. J. *et al.* A study on a robot arm driven by three-dimensional trajectories predicted from non-invasive neural signals. *Biomed. Eng. Online* **14**, 1–19 (2015).
3. Cox, D. D. & Savoy, R. L. Functional magnetic resonance imaging (fMRI)“brain reading”: detecting and classifying distributed patterns of fMRI activity in human visual cortex. *Neuroimage* **19**, 261–270 (2003).
4. Wylie, G. R. *et al.* Using co-variations in the Hb signal to detect visual activation: a near infrared spectroscopic imaging study. *Neuroimage* **47**, 473–481 (2009).
5. Khodagholy, D. *et al.* NeuroGrid: recording action potentials from the surface of the brain. *Nat. Neurosci.* **18**, 310–315 (2015).
6. Wang, Y., Yang, X., Zhang, X., Wang, Y. & Pei, W. Implantable intracortical microelectrodes: reviewing the present with a focus on the future. *Microsyst. Nanoeng.* **9**, 7 (2023).
7. Cogan, S. F. Neural stimulation and recording electrodes. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* **10**, 275–309 (2008).
8. Hong, G. & Lieber, C. M. Novel electrode technologies for neural recordings. *Nat. Rev. Neurosci.* **20**, 330–345 (2019).
9. Kaszás, A. *et al.* Capturing the Electrical Activity of all Cortical Neurons: Are Solutions Within Reach? *Adv. Sci.* **12**, e06225 (2025).
10. Kozai, T. D. Y., Jaquins-Gerstl, A. S., Vazquez, A. L., Michael, A. C. & Cui, X. T. Brain tissue responses to neural implants impact signal sensitivity and intervention strategies. *ACS Chem. Neurosci.* **6**, 48–67 (2015).
11. Wandelt, S. K. *et al.* Representation of internal speech by single neurons in human supramarginal gyrus. *Nat. Hum. Behav.* **8**, 1136–1149 (2024).
12. Willett, F. R., Avansino, D. T., Hochberg, L. R., Henderson, J. M. & Shenoy, K. V. High-performance brain-to-text communication via handwriting. *Nature* **593**, 249–254 (2021).
13. Willett, F. R. *et al.* A high-performance speech neuroprosthesis. *Nature* **620**, 1031–1036 (2023).
14. Takahashi, M., Lauwereyns, J., Sakurai, Y. & Tsukada, M. A code for spatial alternation during fixation in rat hippocampal CA1 neurons. *J. Neurophysiol.* **102**, 556–567 (2009).

15. Liang, Y., Shi, W., Hu, D., Xiang, A. & Zhang, L. Protocol for recording the discharge of locus coeruleus neurons in free-moving mice during different sleep-wake stages. *STAR Protoc.* **2**, 100981 (2021).
16. Sun, C. *et al.* Low-cost and easy-fabrication lightweight drivable electrode array for multiple-regions electrophysiological recording in free-moving mice. *J. Neural Eng.* **19**, 016003 (2022).
17. Grill, W. M., Norman, S. E. & Bellamkonda, R. V. Implanted neural interfaces: biochallenges and engineered solutions. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* **11**, 1–24 (2009).
18. Erofeev, A., Antifeev, I., Bolshakova, A., Bezprozvanny, I. & Vlasova, O. In Vivo Penetrating Microelectrodes for Brain Electrophysiology. *Sensors* **22**, 9085 (2022).
19. Williams, N. P. *et al.* In vivo microelectrode arrays for neuroscience. *Nat. Rev. Methods Primers* **5**, 31 (2025).
20. Rivnay, J., Wang, H., Fenno, L., Deisseroth, K. & Malliaras, G. G. Next-generation probes, particles, and proteins for neural interfacing. *Sci. Adv.* **3**, e1601649 (2017).
21. Biran, R., Martin, D. C. & Tresco, P. A. Neuronal cell loss accompanies the brain tissue response to chronically implanted silicon microelectrode arrays. *Exp. Neurol.* **195**, 115–126 (2005).
22. Edell, D. J., Toi, V. Van, McNeil, V. M. & Clark, L. D. Factors influencing the biocompatibility of insertable silicon microshafts in cerebral cortex. *IEEE Trans. Biomed. Eng.* **39**, 635–643 (1992).
23. Wellman, S. M. *et al.* Cuprizone-induced oligodendrocyte loss and demyelination impairs recording performance of chronically implanted neural interfaces. *Biomaterials* **239**, 119842 (2020).
24. Szarowski, D. H. *et al.* Brain responses to micro-machined silicon devices. *Brain Res.* **983**, 23–35 (2003).
25. Seymour, J. P. & Kipke, D. R. Neural probe design for reduced tissue encapsulation in CNS. *Biomaterials* **28**, 3594–3607 (2007).
26. Fujishiro, A., Kaneko, H., Kawashima, T., Ishida, M. & Kawano, T. In vivo neuronal action potential recordings via three-dimensional microscale needle-electrode arrays. *Sci. Rep.* **4**, 1–9 (2014).
27. Boothe, D. L. *et al.* Impact of neuronal membrane damage on the local field potential in a large-scale simulation of cerebral cortex. *Front. Neurol.* **8**, 236 (2017).
28. Biran, R., Martin, D. C. & Tresco, P. A. The brain tissue response to implanted

- silicon microelectrode arrays is increased when the device is tethered to the skull. *J. Biomed. Mater. Res. A* **82**, 169–178 (2007).
29. Ersen, A., Elkabes, S., Freedman, D. S. & Sahin, M. Chronic tissue response to untethered microelectrode implants in the rat brain and spinal cord. *J. Neural Eng.* **12**, 016019 (2015).
 30. Kim, Y.-T., Hitchcock, R. W., Bridge, M. J. & Tresco, P. A. Chronic response of adult rat brain tissue to implants anchored to the skull. *Biomaterials* **25**, 2229–2237 (2004).
 31. Lind, G., Linsmeier, C. E. & Schouenborg, J. The density difference between tissue and neural probes is a key factor for glial scarring. *Sci. Rep.* **3**, 2942 (2013).
 32. Sharafkhani, N. *et al.* Neural tissue-microelectrode interaction: Brain micromotion, electrical impedance, and flexible microelectrode insertion. *J. Neurosci. Methods.* **365**, 109388 (2022).
 33. Subbaroyan, J., Martin, D. C. & Kipke, D. R. A finite-element model of the mechanical effects of implantable microelectrodes in the cerebral cortex. *J. Neural Eng.* **2**, 103 (2005).
 34. Yuk, H., Lu, B. & Zhao, X. Hydrogel bioelectronics. *Chem. Soc. Rev.* **48**, 1642–1667 (2019).
 35. Purcell, E. K., Thompson, D. E., Ludwig, K. A. & Kipke, D. R. Flavopiridol reduces the impedance of neural prostheses in vivo without affecting recording quality. *J. Neurosci. Methods.* **183**, 149–157 (2009).
 36. Chen, K., Forrest, A. M., Burgos, G. G. & Kozai, T. D. Y. Neuronal functional connectivity is impaired in a layer dependent manner near chronically implanted intracortical microelectrodes in C57BL6 wildtype mice. *J. Neural Eng.* **21**, 036033 (2024).
 37. Chen, R., Canales, A. & Anikeeva, P. Neural recording and modulation technologies. *Nat. Rev. Mater.* **2**, 1–16 (2017).
 38. Rousche, P. J. & Normann, R. A. Chronic recording capability of the Utah Intracortical Electrode Array in cat sensory cortex. *J. Neurosci. Methods* **82**, 1–15 (1998).
 39. Hochberg, L. R. *et al.* Reach and grasp by people with tetraplegia using a neurally controlled robotic arm. *Nature* **485**, 372–375 (2012).
 40. Nolta, N. F., Christensen, M. B., Crane, P. D., Skousen, J. L. & Tresco, P. A. BBB leakage, astrogliosis, and tissue loss correlate with silicon microelectrode array recording performance. *Biomaterials* **53**, 753–762 (2015).
 41. Lee, S. H. *et al.* Scalable thousand channel penetrating microneedle arrays on

- flex for multimodal and large area coverage brainmachine interfaces. *Adv. Funct. Mater.* **32**, 2112045 (2022).
42. Kim, S. *et al.* Integrated wireless neural interface based on the Utah electrode array. *Biomed. Microdevices* **11**, 453–466 (2009).
 43. Kipke, D. R., Vetter, R. J., Williams, J. C. & Hetke, J. F. Silicon-substrate intracortical microelectrode arrays for long-term recording of neuronal spike activity in cerebral cortex. *IEEE Trans. Neural Syst. Rehabil. Eng.* **11**, 151–155 (2003).
 44. Wise, K. D., Anderson, D. J., Hetke, J. F., Kipke, D. R. & Najafi, K. Wireless implantable microsystems: high-density electronic interfaces to the nervous system. *Proc. IEEE* **92**, 76–97 (2004).
 45. Lopez, C. M. *et al.* A Neural Probe with Up to 966 Electrodes and Up to 384 Configurable Channels in 0.13 μm SOI CMOS. *IEEE Trans. Biomed. Circuits Syst.* **11**, 510–522 (2017).
 46. Jun, J. J. *et al.* Fully integrated silicon probes for high-density recording of neural activity. *Nature* **551**, 232–236 (2017).
 47. Steinmetz, N. A. *et al.* Neuropixels 2.0: A miniaturized high-density probe for stable, long-term brain recordings. *Science* **372**, eabf4588 (2021).
 48. Kozai, T. D. Y. *et al.* Ultrasmall implantable composite microelectrodes with bioactive surfaces for chronic neural interfaces. *Nat. Mater.* **11**, 1065–1073 (2012).
 49. Jun, J. J. *et al.* Fully integrated silicon probes for high-density recording of neural activity. *Nature* **551**, 232–236 (2017).
 50. Lv, S. *et al.* Long-term stability strategies of deep brain flexible neural interface. *npj Flex. Electron.* **9**, 40 (2025).
 51. Zhao, S. *et al.* Tracking neural activity from the same cells during the entire adult life of mice. *Nat. Neurosci.* **26**, 696–710 (2023).
 52. Luan, L. *et al.* Ultraflexible nanoelectronic probes form reliable, glial scar-free neural integration. *Sci. Adv.* **3**, e1601966 (2017).
 53. Zhao, Z. *et al.* Ultraflexible electrode arrays for months-long high-density electrophysiological mapping of thousands of neurons in rodents. *Nat. Biomed. Eng.* **7**, 520–532 (2023).
 54. Hong, G., Viveros, R. D., Zwang, T. J., Yang, X. & Lieber, C. M. Tissue-like neural probes for understanding and modulating the brain. *Biochemistry* **57**, 3995–4004 (2018).
 55. Zhou, T. *et al.* Syringe-injectable mesh electronics integrate seamlessly with minimal chronic immune response in the brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*

- 114**, 5894–5899 (2017).
56. Fu, T.-M., Hong, G., Viveros, R. D., Zhou, T. & Lieber, C. M. Highly scalable multichannel mesh electronics for stable chronic brain electrophysiology. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **114**, E10046–E10055 (2017).
 57. Liu, J. *et al.* Syringe-injectable electronics. *Nat. Nanotechnol.* **10**, 629–636 (2015).
 58. Fu, T.-M. *et al.* Stable long-term chronic brain mapping at the single-neuron level. *Nat. Methods* **13**, 875–882 (2016).
 59. Yasar, T. B. *et al.* Months-long tracking of neuronal ensembles spanning multiple brain areas with Ultra-Flexible Tentacle Electrodes. *Nat. Commun.* **15**, 4822 (2024).
 60. Sawahata, H. *et al.* Single 5 μm diameter needle electrode block modules for unit recordings in vivo. *Sci. Rep.* **6**, 1–12 (2016).
 61. Ikedo, A., Kawashima, T., Kawano, T. & Ishida, M. Vertically aligned silicon microwire arrays of various lengths by repeated selective vapor-liquid-solid growth of n-type silicon/n-type silicon. *Appl. Phys. Lett.* **95**, (2009).
 62. Kawano, T. *et al.* Fabrication and properties of ultrasmall Si wire arrays with circuits by vapor–liquid–solid growth. *Sens. Actuators, A.* **97**, 709–715 (2002).
 63. Kawano, T. *et al.* Selective vapor-liquid-solid epitaxial growth of micro-Si probe electrode arrays with on-chip MOSFETs on Si (111) substrates. *IEEE Trans. Electron Devices* **51**, 415–420 (2004).
 64. Kawano, T. *et al.* Electrical interfacing between neurons and electronics via vertically integrated sub-4 μm -diameter silicon probe arrays fabricated by vapor–liquid–solid growth. *Biosens. Bioelectron.* **25**, 1809–1815 (2010).
 65. Sanda, R. *et al.* Low-invasive neural recording in mouse models with diabetes via an ultrasmall needle-electrode. *Biosens. Bioelectron.* **240**, 115605 (2023).
 66. Kita, Y. *et al.* Three-micrometer-diameter needle electrode with an amplifier for extracellular in vivo recordings. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **118**, e2008233118 (2021).
 67. Banno, T. *et al.* Nanoneedle-Electrode Devices for In Vivo Recording of Extracellular Action Potentials. *ACS Nano* **16**, 10692–10700 (2022).
 68. Yamashita, K. *et al.* A floating 5 μm -diameter needle electrode on the tissue for damage-reduced chronic neuronal recording in mice. *Lab Chip* **22**, 747–756 (2022).
 69. Fan, B., Wolfrum, B. & Robinson, J. T. Impedance scaling for gold and platinum microelectrodes. *J. Neural Eng.* **18**, 056025 (2021).
 70. Ludwig, K. A. *et al.* Poly (3, 4-ethylenedioxythiophene)(PEDOT) polymer

- coatings facilitate smaller neural recording electrodes. *J. Neural Eng.* **8**, 014001 (2011).
71. Neto, J. P. *et al.* Does impedance matter when recording spikes with polytrodes? *Front. Neurosci.* **715** (2018).
 72. 神保泰彦. 生体電気計測の基礎. 精密工学会誌 **73**, 1204–1207 (2007).
 73. Idogawa, S. *et al.* A lightweight, wireless Bluetooth-low-energy neuronal recording system for mice. *Sens. Actuators B Chem.* **331**, 129423 (2021).

第2章

細胞外計測

2.1 緒言

第1章では、刺入型神経電極の利点と課題について述べた。脳内に埋め込まれた刺入型電極による慢性ニューロン計測では、主に細胞外計測が行われている。本章では、細胞外計測によって得られる細胞外電位の発生機序を説明し、電極刺入による脳組織損傷が計測信号に与える影響について、等価回路モデルを用いて理論的に考察する。さらに、生体信号計測において避けられないノイズ要因とその影響について述べる。

2.2 脳組織－電極界面における等価回路モデル

生体組織は電氣的モデルにおいて、媒体中に溶解した移動性イオンによる中程度の導電率 ($\sigma=0.1\sim 1\text{ S}\cdot\text{m}^{-1}$) を有する体積導体として扱われる^{1,2}。電子は組織媒体中で電荷キャリアとして機能できないため、ニューロン間の電氣的信号伝達はイオンの流れに依存している^{3,4}。一方、神経組織と外部電子機器との接続では、電極を介してイオンの信号と電子的信号の相互変換が行われる。これは、自由電子を電荷キャリアとする金属電極と、イオン伝導性を有する生体組織との間に形成される電気化学的界面により実現される^{3,5}。

組織－電極界面における神経活動は、ナノスケールから組織スケールにわたる多様なイオンのおよび電子的相互作用を含んでいる (Figure 2.1(a))。細胞膜スケールでは、興奮性ニューロン膜におけるイオン電流が活動電位 (AP: action potential) の基本単位となる^{4,6}。静止状態における膜電位は、イオンの不均衡 (細胞内の K^+ 過剰と細胞外の Na^+ 過剰) により、負の値 ($-60\sim -75\text{ mV}$) を維持している (静止膜電位)。膜電位は、他のニューロンからの興奮性入力 (脱分極) や抑制性入力 (過分極) によって静止膜電位から変動する^{1,4}。興奮性入力により、閾値 ($-50\sim -55\text{ mV}$) を超える脱分極が起きると、電位依存性 Na^+ チャンネルが開口し、 Na^+ の急速流入によって活動電位が発生する。その後、膜電位が $+30\sim +40\text{ mV}$ 付近に達すると、 Na^+ チャンネルの不活性化および K^+ の緩やかな流出により膜電位は再分極し、静止膜電位へと戻る⁴。この過程により、細胞膜周囲の細胞外空間に、局所的なイオン電流および電位変化が生じ、活動電位が形成される。細胞外電位は、発生源 (細胞体や軸索) から離れるに従い急速に減衰し、おおむね $10\sim 100\ \mu\text{m}$ の距離で顕著に低下する^{1,6}。また、複数のニューロンが同時に活動

すると、それらの電位が重畳し、組織スケール（mm～cm）で周期的な電位変動が生じる⁷。これらは局所電場電位（LFP: local field potential）と呼ばれる（Figure 2.1(a)）¹。このように、神経組織内のバイオエレクトロニクス現象は、空間的および時間的スケールに依存したイオン流束の変化によって記述される。電極が取得する信号の特性は、ニューロンの距離に応じて変化する。組織スケール（mm～cm）では、LFP が多数のニューロンの集団活動を反映するが、個々のニューロンの寄与は識別できない^{1,8,9}。より細胞スケールに近い距離（<100 μm）では、個々のニューロン由来の細胞外電位が明瞭に観測され、単一ニューロンの spike 活動が検出可能となる^{6,10}。さらに小さいスケール（1～100 nm）では、イオン性組織媒体と金属電極が電解質-電極界面を形成し、ここでイオンの信号と電子的信号の交換が行われる（Figure 2.1(b)）。

このような組織-電極界面の複雑なバイオエレクトロニクス現象は、より定量的に理解するために、等価回路モデルとして表現される（Figure 2.1(c)）。 V_{rec} は外部電子回路側の出力電位（神経活動記録信号）を表す。電解質-電極界面は、最も単純化なモデルでは、漏れ抵抗（leakage resistance） R_e と電気二重層（EDL: electrical double layer）容量 C_e の並列回路として表現される^{3,8,10,11}。また、配線抵抗 R_{ic} は電極と電子回路を接続する導体部分の抵抗成分である。活動電位に伴うイオン電流 I_{AP} は、電解質媒体中に電位 V_e を生じさせ、これが電極表面に印加され、最終的に外部回路で記録される（Figure 2.1(c)）。

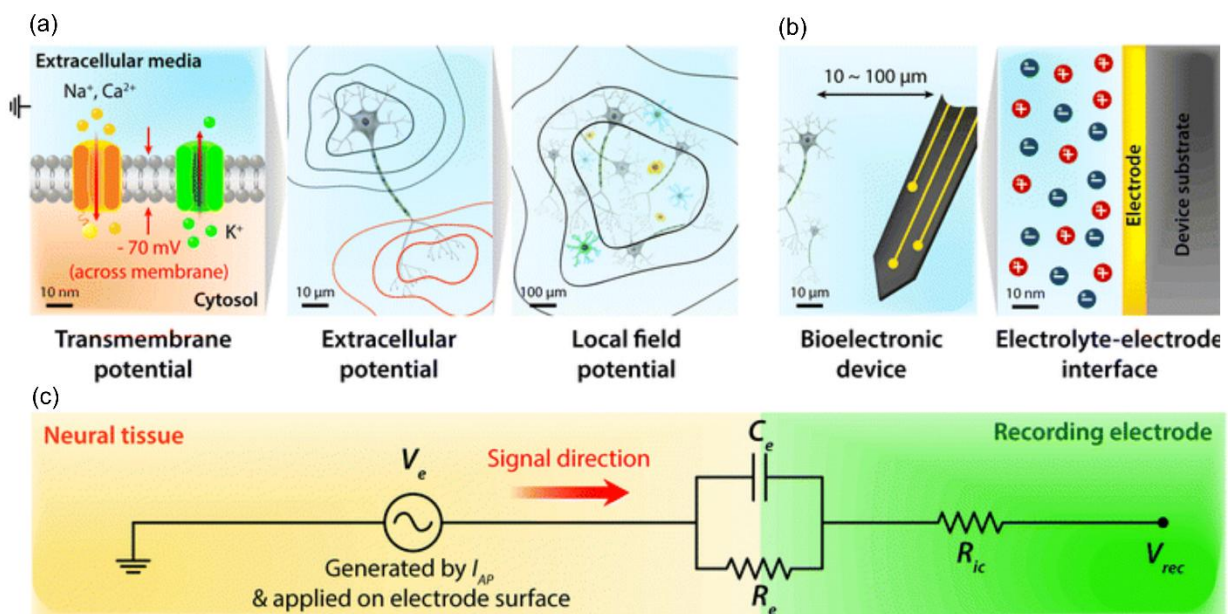


Figure 2.1 脳組織-電極界面における等価回路モデル

Copyright 2019, RSC, CC BY-NC ライセンスに基づく改変・転載¹²

2.3 細胞外電位

本節では、細胞外電位の基礎方程式について記述する。神経活動によって生じるイオン電流は、電解質中に局所的な電場を形成し、その結果として細胞外空間に電位分布 V_e を生じる。細胞外電極は、この局所電位 V_e を検出することにより、ニューロンの活動電位を記録することができる (Figure 2.2a) ⁹。

神経組織内の任意の位置における電位 V_e は、周囲の電解質媒体中における体積伝導電場によって決定される。体積伝導電場の起源はニューロン膜を介して流れるイオン電流であり、細胞外電位 V_e は細胞膜上のイオン電流密度 J ($\text{A}\cdot\text{m}^{-2}$) とマクスウェル (Maxwell) 方程式によって結びついている。静電近似 (磁場の影響を無視できる条件) を過程すると、マクスウェル方程式および局所的なオームの法則から、式(2.1)が得られる。

$$J = -\nabla(\sigma V_e) \quad (2.1)$$

ここで、 σ は組織媒体の電気伝導率 ($\text{S}\cdot\text{m}^{-1}$) である。組織媒体が均質かつ等方的なオーミック体積伝導体 (イオン電流が純抵抗的に伝わる媒体) であると仮定すると、 V_e は以下のラプラス方程式に従う。

$$\nabla^2 V_e = 0 \quad (2.2)$$

単一の点電流源 (ニューロン膜上の局所電流) を仮定して式(2.1)を解くと、電極位置で観測される細胞外電位 V_e は式(2.3)で表される ^{8,12}。

$$V_e = \frac{I_{AP}}{4\pi\sigma r} \quad (2.3)$$

ここで、 I_{AP} は点電流源の大きさ、 r は電流源から電極までの距離である。この関係式は、記録電位が電流源からの距離に反比例することを示している。

複数のニューロンや樹状突起から同時に電流源が発生する場合、重ね合わせの原理 (superposition principle) に基づき、各電流源の寄与を線形に加算することで、細胞外電位を式(2.4)のように表すことができる ^{8,12}。

$$V_e = \sum_n \frac{I_{AP,n}}{4\pi\sigma r_n} \quad (2.4)$$

ここで、 $I_{AP,n}$ は n 番目の電流源の強度、 r_n は n 番目の電流源から記録電極までの距離を表す。この式は、電極で観測される細胞外電位が、周囲の活動ニューロンによる電流源の空間的重ね合わせとして決定されることを示している。したがって、単一ニューロンの活動電位のみならず、局所的な神経集団活動に由来する LFP も、この理論の枠組みで説明できる。

電解質と電極間の電荷注入機構は、ファラデー反応 (faradaic) または容量性結合 (capacitive) によって生じる (Figure 2.2b) ^{3,6}。電解質-電極界面で誘起さ

れる電位 V_e によって電極内に流れる電子電流 I_e は、等価回路モデルに基づき式 (2.5) のように表される。

$$I_e = \left(\frac{1}{R_e} + sC_e \right) V_e \quad (2.5)$$

ここで、 s は活動電位の複素周波数成分を示す。また、電子電流 I_e と記録系出力電位 V_{rec} との関係はオームの法則により式 (2.6) で与えられる。

$$V_{rec} = I_e R_{ic} \quad (2.6)$$

これらの式を組み合わせると、神経活動記録における出力電位 V_{rec} と点電流源 I_{AP} の関係は以下の式 (2.7) のように表される。

$$V_{rec} = \frac{1}{4\pi\sigma r} \left[\left(\frac{1}{R_e} + sC_e \right) R_{ic} \right] I_{AP} \quad (2.7)$$

この式から、記録電位 V_{rec} の振幅は、EDL 容量 C_e および配線抵抗 R_{ic} に比例し、漏れ抵抗 R_e および電極-ニューロン間距離 r に反比例することがわかる。

神経活動記録の品質を評価する上で重要な指標の一つとして、信号対雑音比 (SNR : signal-to-noise ratio) があり、式 (2.8) で定義される^{8,13}。

$$SNR = \frac{V_{rec}}{V_{noise}} \quad (2.8)$$

この SNR の大きさは、記録信号の検出感度を決定する主要なパラメータである。

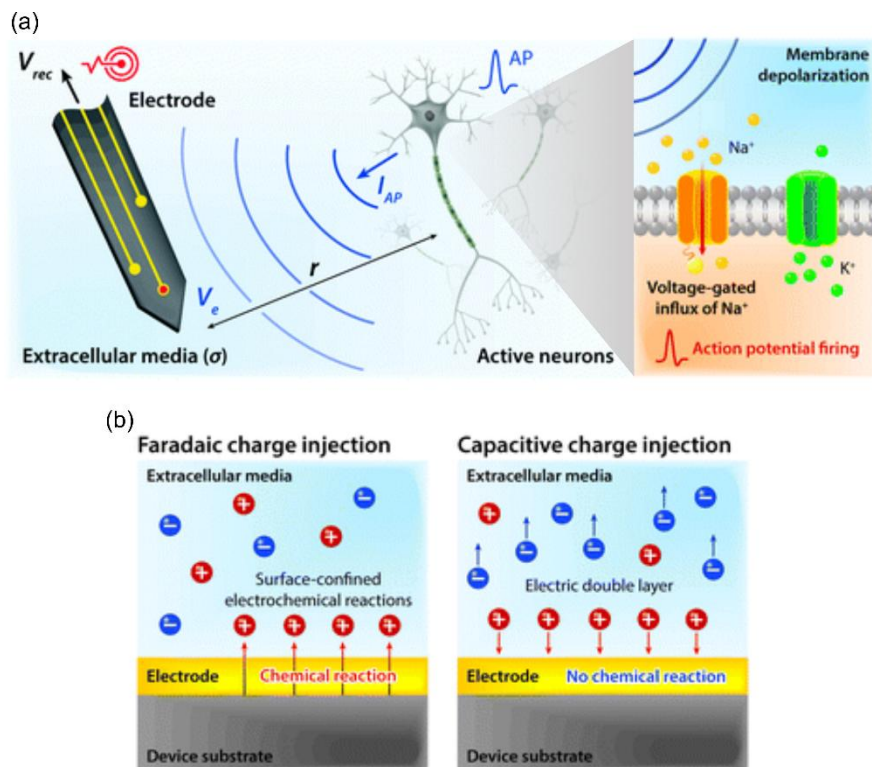


Figure 2.2 細胞外計測

Copyright 2019, RSC, CC BY-NC ライセンスに基づく改変・転載¹²

2.4 癩痕インピーダンス

刺入型神経電極は高い時空間分解能を有する一方で、電極の埋め込みに伴い組織損傷および炎症反応を引き起こす。本節では、電極刺入による脳組織の損傷が計測に与える影響を、等価回路モデルを用いて記述する。

炎症反応とは、中枢神経系における免疫系の応答であり、埋め込み電極などの異物を代謝または隔離するための化学的・細胞的プロセスから構成される。電極を埋め込むと直後にマイクログリア (microglia) が活性化し、電極表面に付着して炎症性サイトカインを放出する。その後、アストロサイト (astrocyte) が電極を取り囲み、グリア癩痕 (astrogliosis) と呼ばれる高密度な被膜を形成する¹⁴。急性の炎症反応は、損傷部位への炎症細胞の動員によって治癒を促進する生理的過程であるが、これが慢性化すると、長期的なニューロンの喪失やグリア癩痕形成を引き起こすことが知られている。電気生理学的観点から見ると、これらの生体反応は主に次の2つの問題を引き起こす¹⁰。

2.4.1 グリア癩痕による電極インピーダンスの上昇

Figure 2.3a に電極-組織界面の等価回路モデルを示す。ここではニューロンが電圧源 V_e として働き、アンプによって信号が増幅される構成を表している。炎症反応の進行により、広がり抵抗 R_{spread} (spreading resistance) が増加し、さらに癩痕インピーダンス Z_{scar} (scar impedance) が新たに生じる (Figure 2.3b)。これにより、電極-組織界面の総インピーダンスが上昇し、信号対雑音比 (SNR) の低下など、記録品質の劣化を引き起こす^{10,15,16}。

2.4.2 ニューロン-電極間距離の増大

炎症反応に伴うマイクログリアやアストロサイトの凝集、およびニューロンの死滅により、ニューロンと電極記録部位との距離が増大する [20]。式(2.3)に示すように、電極が取得する細胞外電位 V_e は、ニューロンとの距離 r に反比例するため、距離の増大は記録電位の低下を引き起こす (Figure 2.3b)¹²。

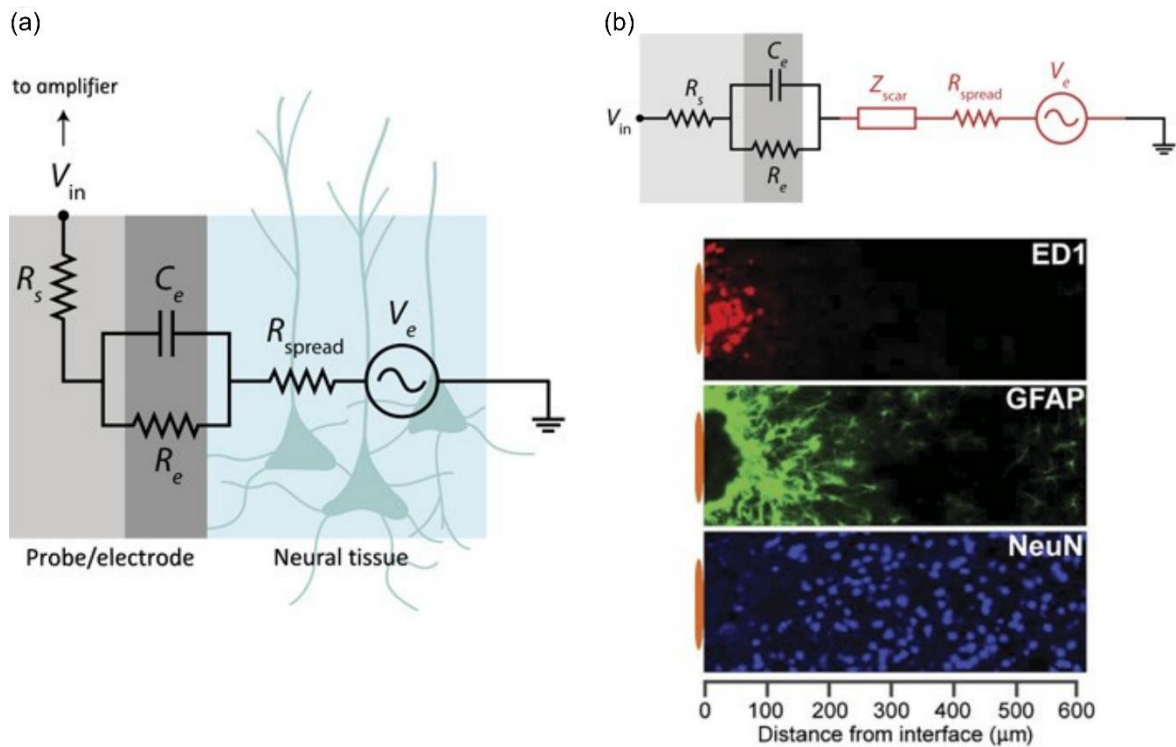


Figure 2.3 癭痕インピーダンス

Copyright 2017, AAAS, 許諾済 (CCC 経由) ¹⁰

Copyright 2005, Elsevier, 許諾済 (CCC 経由) ¹⁷

2.5 生体電気計測におけるノイズ

体積導体中における信号伝搬過程では減衰が生じるため、多くの場合、生体電気計測の対象は微小信号となる。このため、実際の生体計測においてはノイズ対策が無視できない¹⁸。しかしながら、マイクロニードル電極のような微小電極は、インピーダンスが高いため、ノイズの影響を受けやすい。そのうえ、2.4節で述べたように、組織損傷が発生すると癭痕インピーダンス Z_{scar} が生じ、さらなるノイズ増加に繋がる。ノイズは、内部ノイズと外部ノイズに分けられる。

2.5.1 内部ノイズ

内部ノイズは、計測システム内部で発生するものであり、代表例として熱ノイズ (ジョンソン・ナイキストノイズ) が挙げられる¹⁹。熱ノイズは、自由電子が熱エネルギーを受け取り運動が増加した結果、電流の揺らぎとして現れるものである。熱ノイズ $V_{noise,th}$ の大きさは以下の式(2.9)で表される。

$$V_{noise,th}^2 = 4kTR\Delta f \quad (2.9)$$

ここで k はボルツマン定数、 T は温度、 R は抵抗値、 Δf は周波数帯域幅である。

周波数に依らず一定の振幅を発生し、バックグラウンドノイズとして計測系に現れる。式(2.9)より、高インピーダンス電極での計測では、より大きく発生することが分かる。

2.5.2 外部ノイズ

外部ノイズの主な原因は、計測系と外部雑音源との静電結合および電磁結合である。直流的には絶縁されていても浮遊容量があると交流結合が生じ、外部の交流信号が混入するのが静電結合である¹⁸。回路的には、信号回路と他の回路との寄生容量 C_s を通して電流が流れ込む現象である。通常 C_s は非常に小さい値であるため、インピーダンスは大きくなる。したがって、負荷側から見るとノイズ源は定電流源となるため、電極のインピーダンス Z が大きい場合に問題となる。インピーダンスが Z の回路に、微小容量 C_s を通して周波数 f_n の雑音電圧 e_n が結合すると、混入するノイズの大きさ $V_{noise,cc}$ は、式(2.10)のようになる。

$$V_{noise,cc} = 2\pi f_n C_s Z e_n \quad (2.10)$$

同様に、交流電流が作る磁界 \mathbf{B} が計測系の配線などによるループ Γ と結合し、誘導起電力を生じるのが電磁結合である¹⁸。電磁結合による誘導電圧 $V_{noise,ic}$ は、マクスウェル方程式のファラデー（Faraday）則（積分形）より、式(2.11)のように表される。

$$V_{noise,ic} = -\oint_{\Gamma} \mathbf{E} \cdot d\mathbf{l} = \int_{\Sigma} \frac{\partial \mathbf{B}}{\partial t} \cdot d\mathbf{S} \quad (2.11)$$

ここで、 \mathbf{E} は電界、 \mathbf{B} は磁界、 Γ は信号回路ループ、その囲む閉曲面を Σ としている。つまり、他回路から発せられた磁界 \mathbf{B} による、ループ Γ 内の時間的磁束変化が、誘導電圧 $V_{noise,ic}$ となってループ（配線）に現れる。

さらに、自由行動下では行動に起因するノイズが発生する²⁰。特に高インピーダンス電極では、高品質なニューロン計測が困難となるため、慢性計測では鎮静剤を投与し、実験動物の行動を制限した状態で記録が行われている²¹。

2.6 結言

本章では、細胞外計測において観測される細胞外電位の発生機序について説明し、電極刺入による脳組織損傷が計測信号に与える影響について、等価回路モデルを用いて記述した。ニューロン死滅による電極との距離増大や、グリア細胞による瘢痕インピーダンスの形成が、電氣的計測に大きな影響を与えるため、低侵襲な刺入型電極の開発が求められる。本研究では、VLS 結晶成長技術を用いた微小な Si マイクロニードル電極デバイスを用いて、この課題の解決に取り組む。また、提案デバイスのような極微小電極は、高インピーダンスであるため、ノイズ低減手法の併用も重要であり、本研究ではその検討も行う。

参考文献

1. Buzsáki, G., Anastassiou, C. A. & Koch, C. The origin of extracellular fields and currents—EEG, ECoG, LFP and spikes. *Nat. Rev. Neurosci.* **13**, 407–420 (2012).
2. Grant, P. F. & Lowery, M. M. Effect of dispersive conductivity and permittivity in volume conductor models of deep brain stimulation. *IEEE Trans. Biomed. Eng.* **57**, 2386–2393 (2010).
3. Cogan, S. F. Neural stimulation and recording electrodes. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* **10**, 275–309 (2008).
4. Hodgkin, A. L. & Huxley, A. F. A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. *J. Physiol.* **117**, 500 (1952).
5. Wellman, S. M. *et al.* A materials roadmap to functional neural interface design. *Adv. Funct. Mater.* **28**, 1701269 (2018).
6. Ferro, M. D. & Melosh, N. A. Electronic and ionic materials for neurointerfaces. *Adv. Funct. Mater.* **28**, 1704335 (2018).
7. Miranda, P. C., Mekonnen, A., Salvador, R. & Ruffini, G. The electric field in the cortex during transcranial current stimulation. *Neuroimage* **70**, 48–58 (2013).
8. Obien, M. E. J., Deligkaris, K., Bullmann, T., Bakkum, D. J. & Frey, U. Revealing neuronal function through microelectrode array recordings. *Front. Neurosci.* **8**, 423 (2015).
9. Joye, N., Schmid, A. & Leblebici, Y. Electrical modeling of the cell–electrode interface for recording neural activity from high-density microelectrode arrays. *Neurocomputing* **73**, 250–259 (2009).
10. Rivnay, J., Wang, H., Fenno, L., Deisseroth, K. & Malliaras, G. G. Next-generation probes, particles, and proteins for neural interfacing. *Sci. Adv.* **3**, e1601649 (2017).
11. Moulton, S. E., Barisci, J. N., Bath, A., Stella, R. & Wallace, G. G. Studies of double layer capacitance and electron transfer at a gold electrode exposed to protein solutions. *Electrochim. Acta* **49**, 4223–4230 (2004).
12. Yuk, H., Lu, B. & Zhao, X. Hydrogel bioelectronics. *Chem. Soc. Rev.* **48**, 1642–1667 (2019).
13. Buzsáki, G. & Draguhn, A. Neuronal oscillations in cortical networks. *Science* **304**, 1926–1929 (2004).
14. Jorfi, M., Skousen, J. L., Weder, C. & Capadona, J. R. Progress towards

- biocompatible intracortical microelectrodes for neural interfacing applications. *J. Neural Eng.* **12**, 011001 (2014).
15. Kozai, T. D. Y. *et al.* Effects of caspase-1 knockout on chronic neural recording quality and longevity: insight into cellular and molecular mechanisms of the reactive tissue response. *Biomaterials* **35**, 9620–9634 (2014).
 16. Williams, J. C., Hippensteel, J. A., Dilgen, J., Shain, W. & Kipke, D. R. Complex impedance spectroscopy for monitoring tissue responses to inserted neural implants. *J. Neural Eng.* **4**, 410 (2007).
 17. Biran, R., Martin, D. C. & Tresco, P. A. Neuronal cell loss accompanies the brain tissue response to chronically implanted silicon microelectrode arrays. *Exp. Neurol.* **195**, 115–126 (2005).
 18. 神保泰彦. 生体電気計測の基礎. 精密工学会誌 **73**, 1204–1207 (2007).
 19. Nyquist, H. Thermal agitation of electric charge in conductors. *Physical review* **32**, 110 (1928).
 20. Idogawa, S. *et al.* A lightweight, wireless Bluetooth-low-energy neuronal recording system for mice. *Sens. Actuators B Chem.* **331**, 129423 (2021).
 21. Yamashita, K. *et al.* A floating 5 μm -diameter needle electrode on the tissue for damage-reduced chronic neuronal recording in mice. *Lab Chip* **22**, 747–756 (2022).

第3章

VLS 結晶成長による神経電極の作製

3.1 緒言

第1章および第2章において、高い時空間分解能を有する刺入型神経電極は、より詳細なニューロン情報の取得を可能とするが、脳組織への損傷が課題であることを述べた。従来のデバイスは電極体積が $20\ \mu\text{m}$ 以上と非常に大きく刺入に伴う急性損傷を避けることができなかった。この課題に対して本研究室ではこれまでに、Si の VLS 結晶成長技術を用いた直径 $5\ \mu\text{m}$ の刺入型電極デバイスを提案してきた。本章では、本研究の核である VLS 結晶成長技術を用いた神経電極について記述する。

3.2 VLS 結晶成長法

本節では、VLS 結晶成長法の原理について記述する。VLS 結晶成長は液体触媒を介して気相原料を固体結晶として析出させる成長促進機構の一つであり、原料の輸送過程が気相 (Vapor)、液相 (Liquid)、固相 (Solid) であることからこの名称で呼ばれている¹。VLS 結晶成長も他の結晶成長と同様に、相間の化学ポテンシャル差を駆動力とするが、大きな違いは金属触媒とその下にある固体との界面にのみ、結晶成長が制限される点にある。この方法は、高アスペクト比の単結晶構造が形成可能であるため、半導体微細加工技術としてナノワイヤやマイクロニードルなどに広く応用されている²。

Figure 3.1a に VLS 結晶成長の概略図、Figure 3.1b に Si-Au 合金系の相平衡状態図を示す。合金は構成する金属の組成比によって融点が異なる。Figure 3.1b から Au 単体の融点が 1414°C 、Si 単体の融点が 1064°C であり、Au が 81.4%、Si が 18.6% の組成において同時に固化する共晶点をもち、その温度が 363°C であることが分かる³。

Si 基板の上に Au 薄膜を形成し、成長温度 (Si-Au 合金系の融点) まで加熱すると、微小な Si-Au 合金の液滴が形成され、この液滴が気相原料との反応場として機能する。この状態から Si ガスを導入すると、液体金属中に Si が溶解し、十分な供給により取り込まれた Si の濃度が増加して過飽和に達すると、液相-固相界面において Si の析出反応が進行する。結晶成長が進むにつれ、触媒液滴は成長した結晶の先端に保持されたまま上方へ移動し、結果としてウィスカー状の結晶が形成される^{1,4,5}。

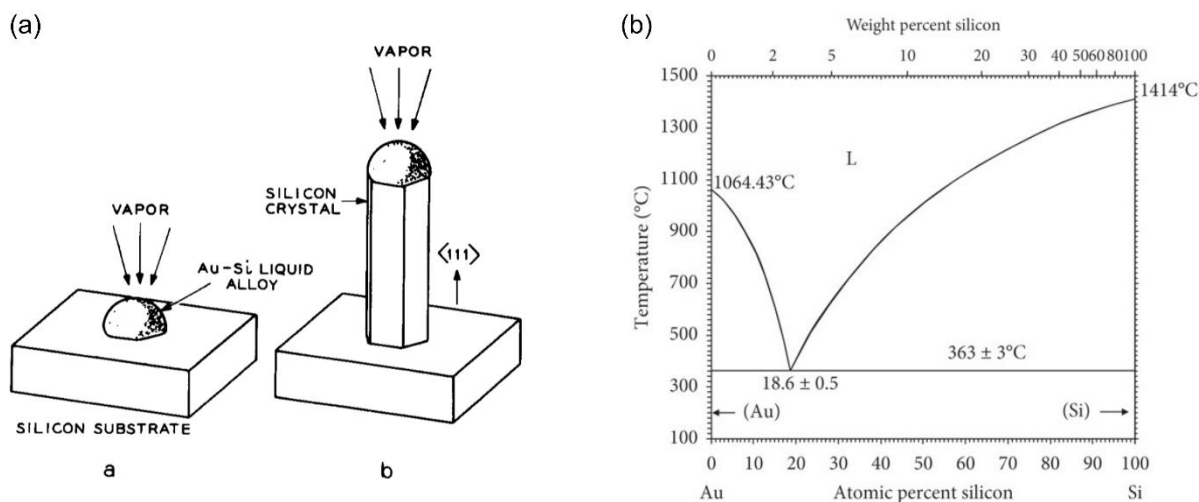


Figure 3.1 VLS 結晶成長法

Copyright 1964, AIP, 許諾済 (CCC 経由) ¹

Copyright 2020, The Authors published by Wiley-VCH GmbH,

CC BY ライセンスに基づく転載 ³

3.3 選択的 VLS 結晶成長

VLS 結晶成長は、プローブの成長位置と直径は、Si 基板の上にパターンニングされた Au ドットによって自由に制御可能である ^{4,6,7}。Figure 3.2 は、選択的 VLS 成長のプロセスを示している ⁴。VLS-Si プローブの成長方向が $\langle 111 \rangle$ であるため、Si(111)基板を使用する。まず、熱酸化を用いて Si 基板を酸化させ (Figure 3.2a)、フォトリソグラフィとフッ化水素によりプローブを形成する部分の Si を露出させる (Figure 3.2b)。次に、触媒となる Au を基板全面に蒸着し (Figure 3.2c)、リフトオフにより Au ドットのパターンニングを行う (Figure 3.2d)。その後、基板を GS-MBE (gas source molecular beam epitaxy) チャンバーに導入し、500~700°C でアニールして Au-Si 合金ドットを形成する (Figure 3.2e)。ここに Si_2H_6 (ジシラン) ガスを特定の圧力で供給することで、ガス中の Si が Au-Si 合金ドット中に取り込まれていく。Au-Si 合金ドット中の Si の含有量が過飽和状態になると、Au-Si 合金ドットと Si 基板の界面で Si の析出が起こる。その結果、Au-Si 合金ドットを先端に有するエピタキシャル単結晶 Si プローブが形成される (Figure 3.2f)。Figure 3.2g に、650°C で選択的成長した Si プローブの走査型電子顕微鏡 (SEM: scanning electron microscope) 画像を示す。 Si_2H_6 ガスに PH_3 (フォスフィン) や B_2H_6 (ジボラン) などのドーパントガスを混合することで、Si プローブへのドーピングが可能である。本研究では、Si プローブの形成に基板上への多結晶 Si (poly-Si) の不要な堆積を抑制することを目的として、 Si_2H_6 に PH_3 を混合している ⁸。

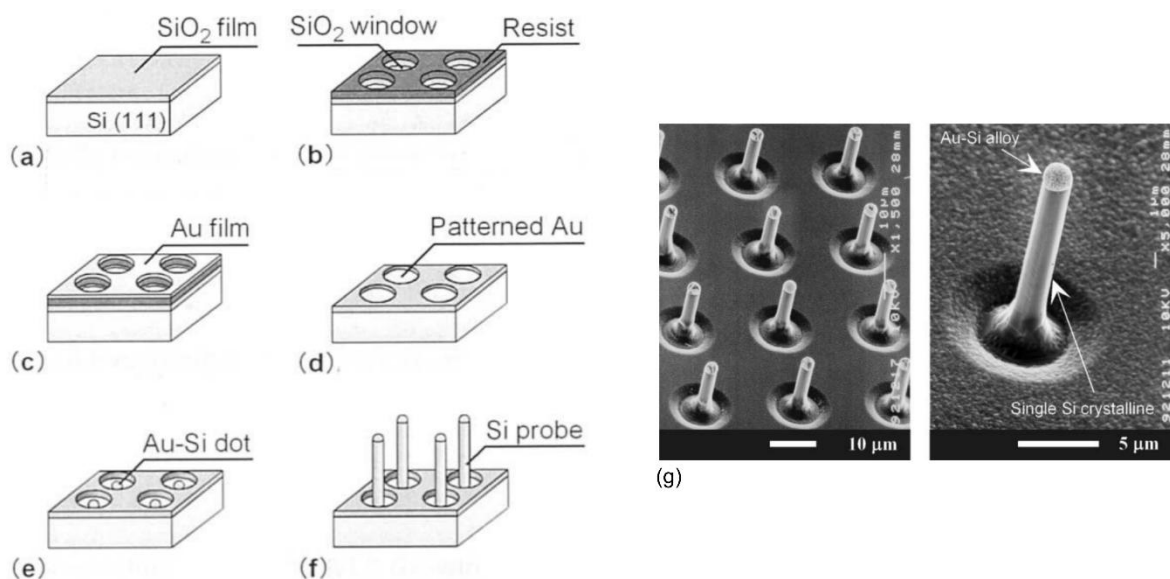


Figure 3.2 選択的 VLS 結晶成長

Copyright 2004, IEEE, 許諾済 (CCC 経由) 4

3.4 VLS 結晶成長を用いた神経電極の作製

3.2 節および 3.3 節では VLS 結晶成長技術を提示した。本節では、この技術を用いた神経電極の作製方法について記述する^{9,10}。本デバイスの作製には、抵抗率 $0.02 \Omega \cdot \text{cm}$ の Si(111)基板 (厚さ $500 \mu\text{m}$) を用いる。基板上に二酸化シリコン (SiO_2) 層を形成した後、ニードル部分の SiO_2 をエッチングし、そこに Au を蒸着する。Au 触媒による Si の VLS 成長 (3.2 節および 3.3 節) によって、長さ $400 \mu\text{m}$ の Si マイクロニードルを作製する (Figure 3.3a1)^{5,8}。Si の VLS 成長後、Si マイクロニードルおよび基板に、チタン (Ti) 結合層 (厚さ 50 nm) を介したプラチナ (Pt) (厚さ 150 nm) を配線としてスパッタリングする。Si 基板の裏面も同様の方法で成膜する (Figure 3.3a2)。その後、高い生体適合性を有する絶縁層として Parylene-C ($1 \mu\text{m}$ 厚) を基板上に堆積する。その後、ニードルの先端部分を酸素プラズマで露出させることでデバイスの完成とする (Figure 3.3a3)。

Figure 3.3b,c,d は、Si マイクロニードルブロックモジュールの模式図および写真、ニードルの断面図、ニードルの SEM 画像を示す。 $1 \times 1 \text{ mm}^2$ の Si ブロック (厚さ 0.5 mm) 上に先端直径 $4 \mu\text{m}$ の Si ニードルが形成されていることが分かる。この Si ブロックでは、マイクロニードルと裏面の Pt/Ti 層が、垂直方向の電氣的接続として機能しているため、Figure 3.3e のようにピンコネクタ (Au) 上に実装することで、計測したニューロン信号を取り出すことができる。また、ニードル先端に白金黒 (Pt black : platinum black) をめっきすることで、インピーダン

スを低下させることが可能であり (Figure 3.3f), これによって実験動物を用いた脳信号計測において LFP および spike 信号の取得に成功している。

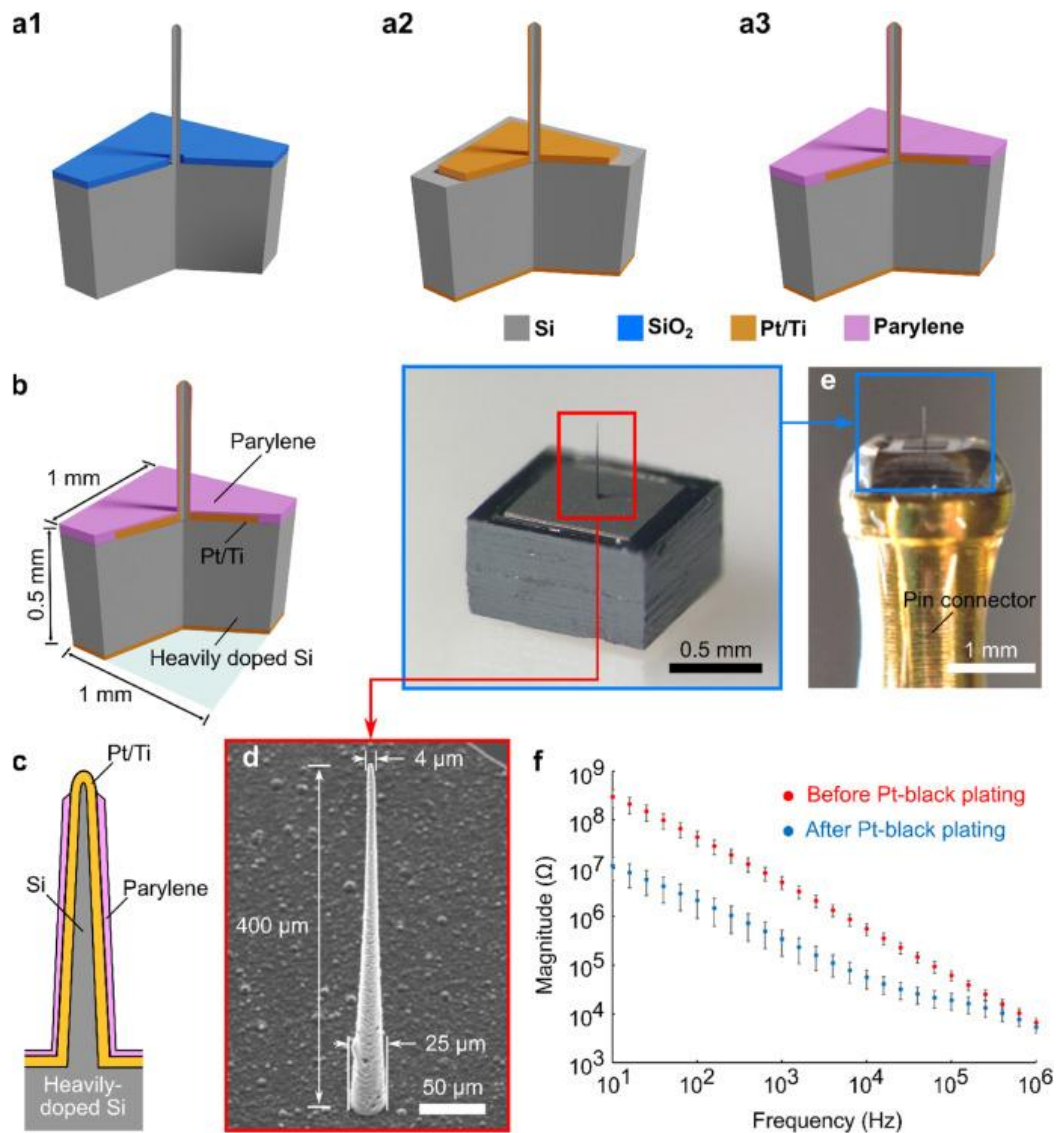


Figure 3.3 VLS 結晶成長を用いた神経電極の作製

Copyright 2023, Elsevier, 許諾済 (CCC 経由) ¹⁰

3.5 結言

本章では, VLS 結晶成長法の原理について記述した. さらに VLS 法を用いた, 低侵襲で高分解能な Si マイクロニードル電極の作製方法について説明した. 本電極デバイスは, ニードルが小さいため非常に低侵襲ではあるが, Si 基板の剛性や, Si ニードル自体の剛性が問題となる. 次章以降 (第 4 章および第 5 章) では, 本技術を用いた更なる低侵襲デバイスの作製に着手する.

参考文献

1. Wagner, R. S. & Ellis, W. C. Vapor-liquid-solid mechanism of single crystal growth. *Appl. Phys. Lett.* **4**, 89–90 (1964).
2. Güniat, L., Caroff, P. & Fontcuberta i Morral, A. Vapor Phase Growth of Semiconductor Nanowires: Key Developments and Open Questions. *Chem. Rev.* **119**, 8958–8971 (2019).
3. Xu, J., Wu, M., Pu, J. & Xue, S. Novel Au-Based Solder Alloys: A Potential Answer for Electrical Packaging Problem. *Adv. Mater. Sci. Eng.* **2020**, 4969647 (2020).
4. Kawano, T. *et al.* Selective vapor-liquid-solid epitaxial growth of micro-Si probe electrode arrays with on-chip MOSFETs on Si (111) substrates. *IEEE Trans. Electron Devices* **51**, 415–420 (2004).
5. Kawano, T. *et al.* Fabrication and properties of ultrasmall Si wire arrays with circuits by vapor–liquid–solid growth. *Sens. Actuators A Phys.* **97**, 709–715 (2002).
6. Sato, T. *et al.* Site-controlled growth of nanowhiskers. *Appl. Phys. Lett.* **66**, 159–161 (1995).
7. Asai, S., Kato, K., Nakazaki, N. & Nakajima, Y. Probe card with probe pins grown by the vapor-liquid-solid (VLS) method. *IEEE Trans. Compon., Packag., Manuf. Technol. A* **19**, 258–267 (1996).
8. Ikedo, A., Kawashima, T., Kawano, T. & Ishida, M. Vertically aligned silicon microwire arrays of various lengths by repeated selective vapor-liquid-solid growth of n-type silicon/n-type silicon. *Appl. Phys. Lett.* **95**, (2009).
9. Sawahata, H. *et al.* Single 5 μm diameter needle electrode block modules for unit recordings in vivo. *Sci. Rep.* **6**, 1–12 (2016).
10. Sanda, R. *et al.* Low-invasive neural recording in mouse models with diabetes via an ultrasmall needle-electrode. *Biosens. Bioelectron.* **240**, 115605 (2023).

第4章

フレキシブル基板

Si マイクロニードル電極デバイス

4.1 緒言

脳の生理状態を長期的に、かつ定量的に観察する技術は、脳神経科学や医療などの様々な分野において重要である^{1,2}。刺入型神経電極を用いた *in vivo* 電気生理計測は、高い時空間分解能でのニューロン活動記録を可能にするが、電極の埋め込みによる組織損傷が生じ、さらに記録期間が制限される。組織損傷は、デバイス刺入に伴う急性損傷^{3,4}と、マイクロモーション^{5,6}などの機械的ミスマッチによって引き起こされる慢性損傷の2つに分けられる。従来の剣山型およびシャंक型電極（ユタ電極⁷、ミシガン電極⁸、Neuropixels^{9,10}など）は、急性損傷および慢性損傷を引き起こすデバイスサイズと剛性を有する^{1,11}。フレキシブル電極（NET^{12,13}、Mesh^{14,15}、UFTEs¹⁶など）は、脳組織と電極の機械的ミスマッチを解消し慢性損傷を低減させるが、急性損傷は避けられない^{17,18}。

この課題に対処するため、本研究室では、SiのVLS結晶成長技術を用いて作製した、直径5 μm のSiマイクロニードル電極を提案してきた¹⁹⁻²⁴。この微小ニードルにより急性損傷を最小化できる^{20,25}。しかしSiマイクロニードル電極は、剛性の高い厚さ500 μm のSi基板上に作製されている^{19,25-27}。また、埋め込み時にデバイスを頭蓋に固定するため、基板の物理的ストレスやマイクロモーションによる損傷を与える。

本章では、Si基板による慢性損傷の低減に向けて、生体適合性Paryleneを用いたフレキシブル基板を導入し、組織上で浮遊するデバイス構成を可能にする^{27,28}。まず、Paryleneフレキシブル基板上に形成した直径5 μm マイクロニードル電極の作製プロセスを示し、電気的特性評価を行う。次に、従来のタングステン電極と比較しつつ、マウスを用いた1年以上の長期記録性能を実証する。また、電極埋め込みによる組織損傷をニューロンの免疫組織化学的解析により評価する。加えて、Siマイクロニードル電極のノイズ低減手法を提案し、自由行動マウスにおける計測性能の向上を試みる。

なお、本博士論文におけるすべての動物実験は、豊橋技術科学大学の動物実験倫理規定に則り、麻酔等の適切な処置を施し、マウスに苦痛を与えないよう配慮して実施した。

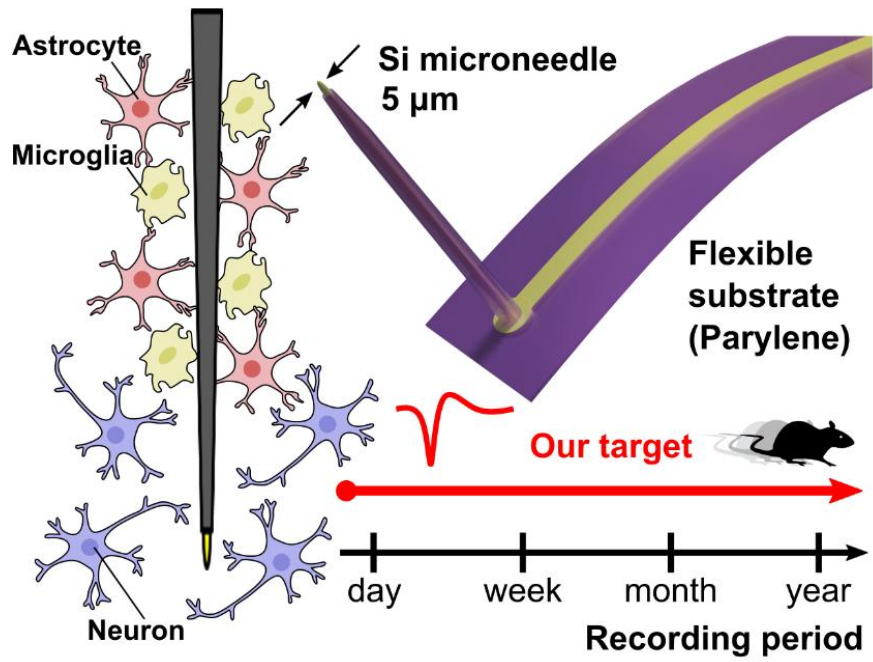


Figure 4.1 第4章における研究概念図

Copyright 2025, The Authors by Wiley-VCH GmbH,
 CC BY ライセンスに基づく転載²⁹

4.2 デバイス作製

4.2.1 デバイス作製プロセス

本節では、フレキシブル基板を有する Si マイクロニードル電極デバイスの作製および実装方法について記述する。本デバイスは、第 3 章で述べた Si の VLS 結晶成長技術に従って Si マイクロニードルを形成し、MEMS (micro electro mechanical systems) プロセスによる電極化を行うことで作製した。

Figure 4.2 に、作製プロセスの模式図を示す。基板として厚さ 525 μm の 4 インチ Si ウェハ [n-type, (111)方向, 抵抗率 $<10 \Omega\cdot\text{m}$]を使用した。ウェハ表面には、厚さ約 1 μm の SiO_2 酸化膜が形成されている。まず、バッファードフッ酸 (BHF : buffered hydrogen fluoride) により SiO_2 をエッチングし、金 (Au : gold) 蒸着およびリフトオフにより Si 基板上に直径 6 μm , 厚さ 200 nm の Au ドットをパターンニングした。Au を触媒とした Si の VLS 結晶成長により、Si マイクロニードルを形成した (Figure 4.2a)。原料ガスとしてジシラン (Si_2H_6) を用い、 $1.5 \times 10^{-3} \text{ Pa}$, 830°C の条件下で 3 時間成長させた。

結晶成長後、Si マイクロニードルおよび基板を、それぞれ厚さ 1 μm および 5 μm の Parylene-C で、真空蒸着装置 (PDS2010, Labcoter, 日本パリレン合同会社) によりコーティングした (Figure 4.2b)。次に、チタン (Ti : titanium) を接着層として 20 nm, Au を配線層として 180 nm の厚さで、ニードルと基板全体にスパッタリングした。その後、リフトオフにより電氣的配線を形成した (Figure 4.2c)。さらに、デバイス全体を厚さ 5 μm の Parylene-C で絶縁し (Figure 4.2d)、酸素プラズマエッチングによりマイクロニードル先端の Au を露出させた (Figure 4.2e)。その後、エタノールにより Si 基板と Parylene の密着力を低下させ、ピンセットで Si マイクロニードルの根元を折り、ニードルごと Parylene フィルムを剥離することで、フレキシブル基板上にマイクロニードルを保持したデバイスが完成した (Figure 4.2f)。

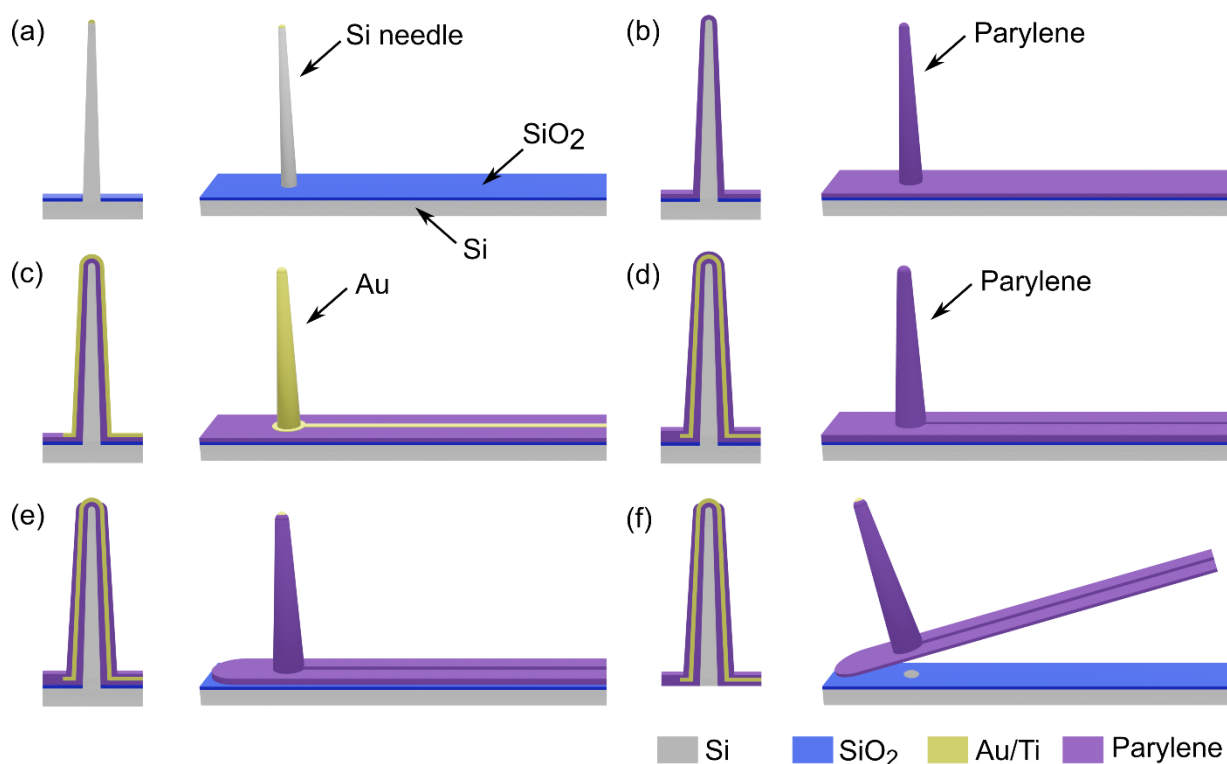


Figure 4.2 Si マイクロニードル電極デバイスの作製プロセス.

Copyright 2025, The Authors by Wiley-VCH GmbH,

CC BY ライセンスに基づく改変・転載²⁹

Figure 4.3a に作製したデバイスの写真を示す．柔軟性を有する厚さ 10 μm の Parylene 基板上に，Si マイクロニードルが垂直に形成されていることが分かる．Si マイクロニードルの長さは 400 μm であり，先端直径は 5 μm ，基部直径は 40 μm であった．Figure 4.3b にニードル全体，Figure 4.3c にニードルの先端部分を写した走査型電子顕微鏡 (SEM: scanning electron microscope) 画像を示す．Figure 4.3c より，マイクロニードル先端の Au が露出していることが確認できる．この露出部がニューロンからの細胞外電位を検出する記録点として機能する．

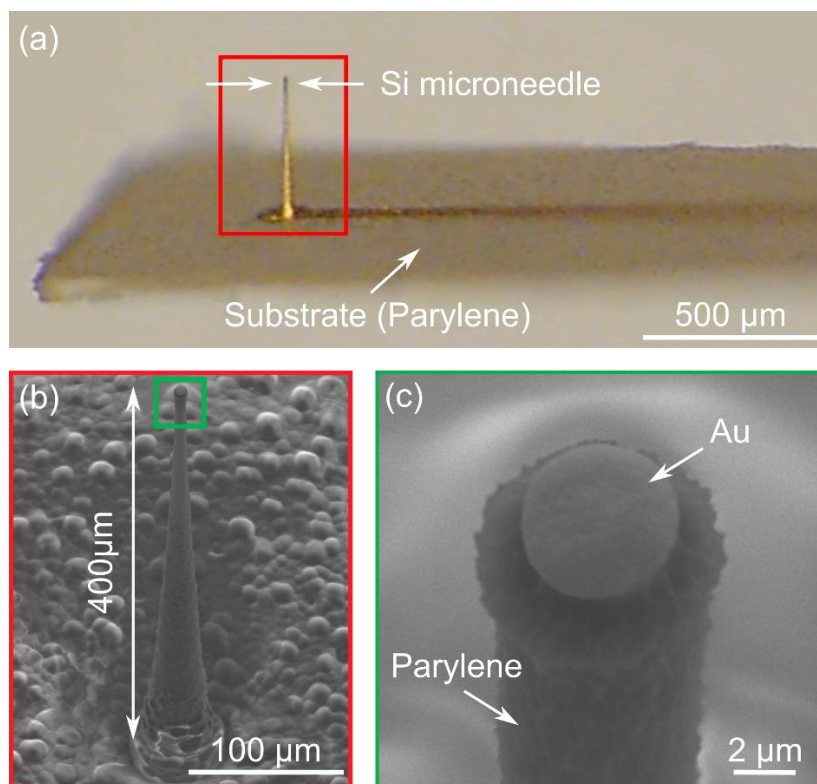


Figure 4.3 作製した Si マイクロニードル電極
Copyright 2025, The Authors by Wiley-VCH GmbH,
CC BY ライセンスに基づく改変・転載²⁹

4.2.2 デバイス実装

本項では、作製したフレキシブル基板 Si マイクロニードル電極デバイスの取り扱い方法および計測信号の取り出し方法について記述する。デバイスは、Auめっきされたピン型電極に実装された。電気的接続には導電性銀ペースト（TKペースト CN-7120，株式会社シー・エス・シー）を用い、接続部は紫外線硬化型アクリル樹脂（UV レジン）で絶縁した。実装したデバイスの模式図と写真をそれぞれ Figure 4.4a, Figure 4.4b に示す。

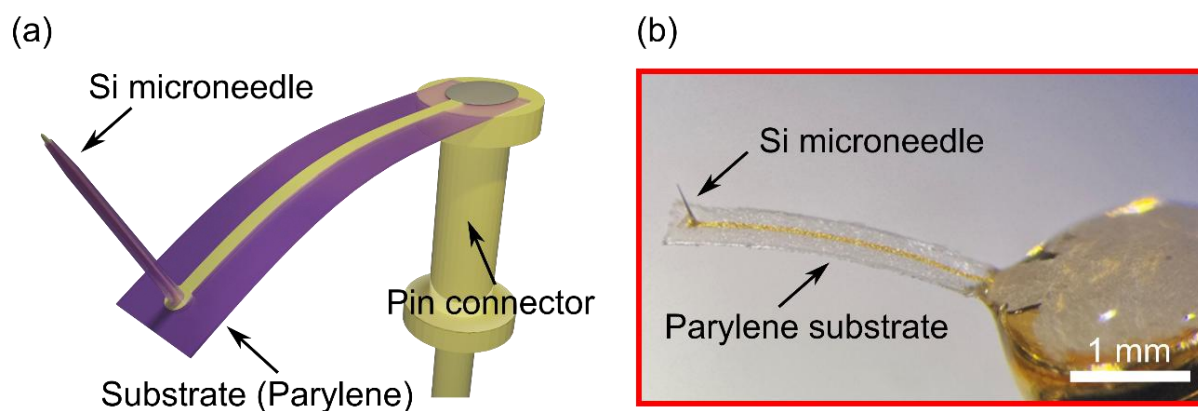


Figure 4.4 Si マイクロニードル電極の実装

Copyright 2025, The Authors by Wiley-VCH GmbH,

CC BY ライセンスに基づく改変・転載²⁹

4.3 電気的特性評価

本節では、4.2 節で作製したデバイスの電気的特性評価として、電極インピーダンス測定および入出力比特性について記述する。

4.3.1 インピーダンス特性

本項では、デバイスの電気化学インピーダンス測定方法と、神経計測に適したインピーダンス特性への改善方法について記述する。Figure 4.5a にインピーダンス測定システムの概略図を示す。インピーダンス測定は、金属製シャーレに生理食塩水を満たし、入力電圧端子をシャーレに接続する方法で行った。また、生理食塩水中に電流計を接続したデバイスを浸し、入力正弦波電圧 100 mV を 1 Hz ~ 10 kHz の範囲で印加した際の電極インピーダンスを測定した。生理食塩水中におけるマイクロニードル電極 (Au-tip) のインピーダンスは、 $979 \pm 122 \text{ k}\Omega \sim 1.2 \pm 0.22 \text{ G}\Omega$ の範囲を示した。spike 信号帯域である 1 kHz においては、 $8.0 \pm 0.83 \text{ M}\Omega$ であった (mean \pm SD, Figure 4.5b “Au-tip”)

電気化学インピーダンスは、金属 (Au) および電解質 (生理食塩水) 界面特性に起因するものであり、先端を低インピーダンス材料である白金黒 (Pt black : platinum black) でめっきすることにより低減可能である^{20,30}。そのため、ニードル先端の Au を Pt black でめっきした。めっき溶液は、 $\text{H}_2\text{PtCl}_6 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 10 g, $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 0.1 g, 希釈水 300 mg から調製した。電解めっきは、オートマチックポラリゼーションシステム (HSV-100, 明電北斗株式会社) を用い、-300 mV の負電圧を 0.2 s 印加して行った。なお、参照電極として銀塩化銀電極 (Ag/AgCl) を、対極としてプラチナ (Pt) 電極を使用した。マイクロニードル電極 (Pt black-tip) のインピーダンスは、同一周波数範囲 (1 Hz ~ 10 kHz) で $38 \pm 3.2 \text{ k}\Omega \sim 33 \pm 10 \text{ M}\Omega$ の範囲を示し、1 kHz において $249 \pm 22 \text{ k}\Omega$ に減少した (mean \pm SD, Figure 4.5b “Pt black-tip”)。各インピーダンス特性は、5 つのサンプルから取得した平均値と標準偏差で評価した。

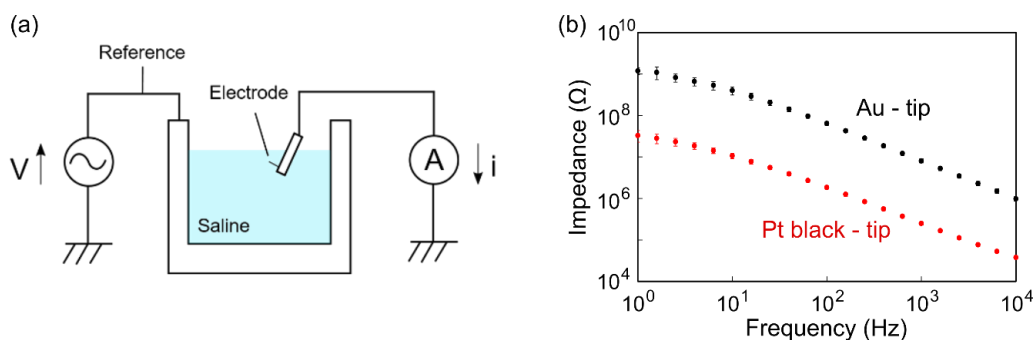


Figure 4.5 インピーダンス測定

Copyright 2025, The Authors by Wiley-VCH GmbH,

CC BY ライセンスに基づく改変・転載²⁹

4.3.2 入出力電圧信号比 (O/I) 特性

本項では、作製した Si マイクロニードル電極の神経信号記録可能性を示すため、入出力電圧信号比 (O/I: output / input signal amplitude ratio) 特性について記述する。インピーダンス測定と同様に、生理食塩水で満たしたシャーレの中で実施した (Figure 4.5a)。O/I 測定には、Tucker Davis Technologies (TDT) 社製の神経信号測定システムを用いた。計測器の構成として、Si マイクロニードル電極から取得した信号はリファレンス電極との差動増幅器 (ZC64, ゲイン 1 倍) に入力され、プリアンプで増幅後、デジタル信号に変換 (PZ2) される。変換されたデジタル信号はデジタル信号処理モジュール (RZ2) を介して、Windows PC 内のハードディスクへ記録データが保存される。

信号発生器からの正弦波電圧信号 100 mV_{p-p} (10~10 kHz) を、細胞外計測における spike 信号と同等の 100 μV_{p-p} までアッテネータで減衰させ、入力電圧と出力電圧を記録した。これらの比から O/I を算出した結果、1 kHz 未満において 98%以上を示した (Figure 4.6)。インピーダンスの低減により、信号振幅の顕著な減衰を伴うことなく、神経信号の記録が可能であることが確認された。

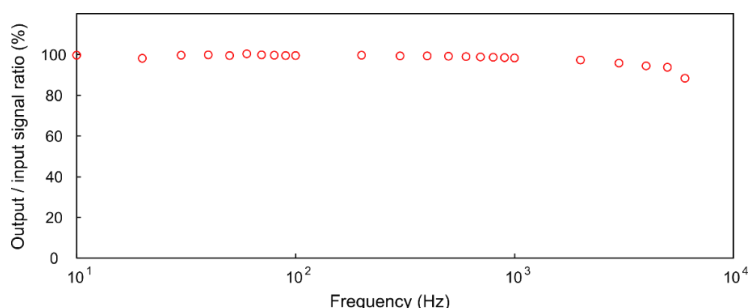


Figure 4.6 入出力信号比特性

Copyright 2025, The Authors by Wiley-VCH GmbH,

CC BY ライセンスに基づく改変・転載²⁹

4.4 マウス *in vivo* 長期ニューロン計測

本節では、4.2 節で作製した Si マイクロニードル電極の神経信号取得能力の確認、および *in vivo* 慢性計測における長期安定性を示すために、電極埋め込みマウスを対象としたニューロン計測について記述する。電極の埋め込み手術、視覚刺激による長期計測の実施、および市販タングステン電極との比較を通じて、Si マイクロニードル電極の長期計測における優位性を明らかにする。

4.4.1 実験手法

本項では、Si マイクロニードル電極によるマウスの長期ニューロン計測に向けた、デバイスの埋め込み手法および計測手法について記述する。

電極埋め込みに際しては、まずマウス (wild-type C57BL/6, オス, 体重 20~30 g, 日本エスエルシー株式会社) にはイソフルランガス (3%) による全身麻酔を施した。本薬品による全身麻酔を行うことで手術後の覚醒を可能としている。麻酔下で、イヤーパーおよびノーズーパーを用いて脳定位固定装置 (SR-50, 株式会社ナリシゲ) にマウス頭部を 3 点固定した後、頭部の剃毛を行い、剪刀を用いてマウス頭部皮膚を正中線に沿って切除した。また、鋭匙を用いて骨膜および筋肉を除去した。その後、ドリルとピンセットを用いて、左脳頭蓋の開頭を行い [前後方向 (AP: anterior-posterior) = -1.0 mm, 左右方向 (ML: medio-lateral) = 3.0 mm], リファレンス電極としてピン型電極 (Au, 直径 2 mm) を配置した。これは、マウスの一次体性感覚野バレル領域 (S1B: primary somatosensory barrel cortex) に相当する。同様に、右脳頭蓋に 1.5×1.5 mm² の開頭を行った (AP = -3.5 mm, ML = -2.5 mm)。これはマウスの一次視覚野 (V1: primary visual cortex) に相当する。開頭後、V1 脳表から約 400 μm (大脳皮質 IV 層) の位置にマイクロマニピュレータ (MO-10, 株式会社ナリシゲ) を用いて Si マイクロニードル電極を刺入した (3 匹)。脳表は、生理食塩水を含んだゼラチンスポンジ (スポンゼル, LTL ファーマ株式会社) で保護した。また、露出箇所を保護とデバイス固定のため、デンタルセメント (UNIFAST III, 株式会社ジーシー) を用いて頭部全体を覆い固めた。Figure 4.7 に電極を埋め込んだマウスの写真と電極埋め込み位置を表した模式図を示す。また、Figure 4.8a に電極埋め込み方法の模式図を示す。このような埋め込み手法を採用することで、デバイスが脳表に浮遊した構造が実現できる。

また、比較用として市販のタングステン電極 (TM31A10, World Precision Instruments 社, 1 MΩ, 1 kHz) を埋め込んだマウスを用意した。タングステン電極の実装として、電極の導通を確保するため、はんだごてにより壁面の Parylene-C を熔融し、導電性銀ペースト (TK ペースト CN-7120, 株式会社シー・エス・シー) を用いてピン型電極 (Au) に実装した。電極の先端直径は約 1 μm,

先端から 400 μm の直径は 30 μm であった。Figure 4.8b に埋め込み方法の模式図、および Figure 4.9 に実装したタングステン電極の写真を示す。Si マイクロニードル電極デバイスの埋め込み方法と異なる点は、タングステンニードルが頭蓋骨に完全に固定されている点である。

電極埋め込みマウスに対して、外科手術 1 日後、2 週間後、1 ヶ月後、およびそれ以降は 1~2 ヶ月毎に視覚刺激応答計測を行った。本実験では行動に起因するノイズ低減のため、鎮静剤として生理食塩水を希釈剤とした 0.5%濃度のクロルプロチキセン溶液を腹腔投与した（体重 10 g 当たり 0.05 ml）。視覚刺激は白色 LED（light emitting diode）を 0.5 s 間、3 s 間隔で与えた。LED はプロセッシングシステム（Arduino Uno, Arduino 社）により駆動し、刺激タイミングのパルス信号を神経信号の取得と同期させた。信号取得および処理においては、電極から記録された信号を神経信号増幅器（RHD2164, Intan Technologies 社、入力インピーダンス=13 M Ω , 1 kHz）で増幅し、フィルタ（0.1 Hz~7.5 kHz）を通してデジタル化した。増幅後の信号は、SPI（serial peripheral interface）ケーブル（C3216, Intan Technologies 社）を介して、デジタル信号処理装置（RHD USB Interface Board, Intan Technologies 社）に送られた。すべてのデジタルデータは、Windows PC のハードディスクにサンプリング周波数 25 kHz で保存した。データ解析は、数値計算ソフトウェア MATLAB（MathWorks 社）を用いた。

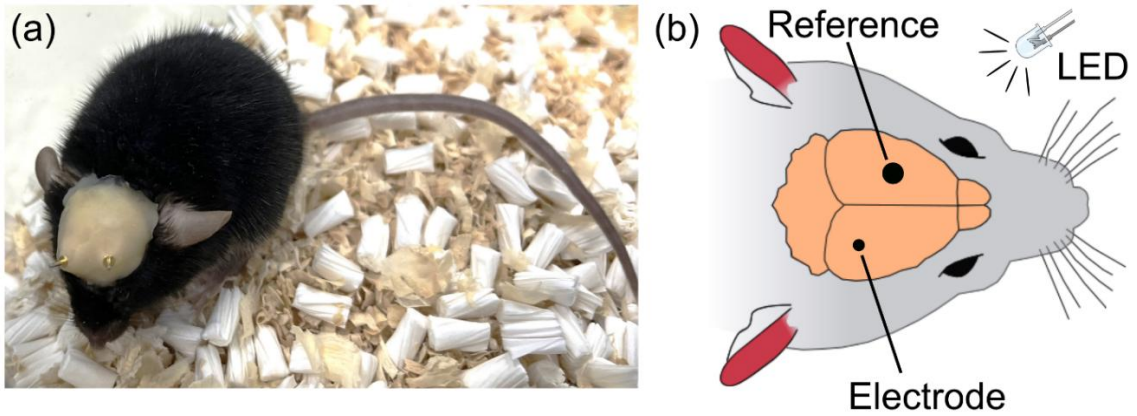


Figure 4.7 電極埋め込みマウスと埋め込み位置
 Copyright 2025, The Authors by Wiley-VCH GmbH,
 CC BY ライセンスに基づく改変・転載²⁹

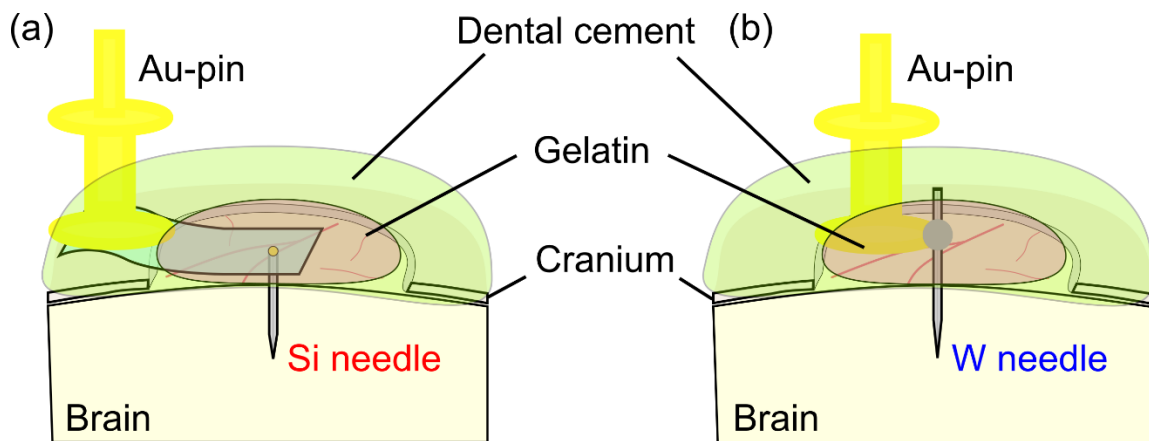


Figure 4.8 電極固定方法
 Copyright 2025, The Authors by Wiley-VCH GmbH,
 CC BY ライセンスに基づく改変・転載²⁹

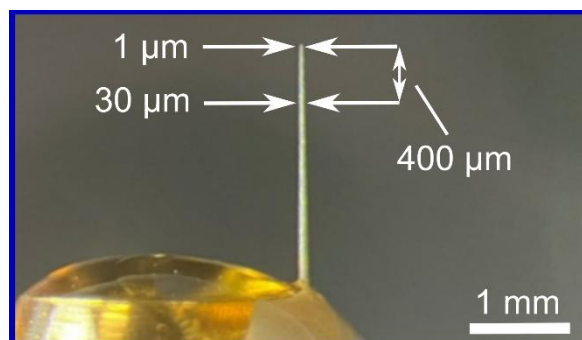


Figure 4.9 市販タングステン電極の実装

4.4.2 長期ニューロン計測

本項では、4.4.1 項で実施した Si マイクロニードル電極デバイスを用いた長期ニューロン計測の結果について記述する。

Figure 4.10a に手術後 24 時間後の Si マイクロニードル電極の計測結果を示す。Figure 4.10a1 は、低周波数帯域 [局所電場電位 (LFP : local field potential) 帯域] の信号 (2 次バターワースフィルタ, フィルタリング周波数 = 10 ~ 100 Hz, 試行回数 100) の平均波形を示す。刺激開始後 50 ms 付近で $\pm 150 \mu\text{V}$ の電圧振幅が観測され、複数ニューロンの集団活動に起因する LFP が取得できたことを示す。

Figure 4.10a2 は、高周波数帯域 (spike 帯域) の信号 (2 次バターワースフィルタ, フィルタリング周波数 = 500 ~ 1,500 Hz) の代表的な波形を示す。Figure 4.10a3 は、これら高周波数帯信号の PSTH (peri-stimulus time histogram) であり、spike の発火頻度 (firing rate) を示す。spike 信号の検出閾値は、刺激開始前 0.5 ~ 1.0 s の信号の標準偏差の 3 倍 [$3 \times \text{SD}$ (Standard deviation, σ)] とした。視覚刺激に応答する spike 信号は刺激開始後 50 ~ 100 ms に出現し、他の電極デバイスで記録された神経応答の傾向と一致していた^{19,26,27,31}。また PSTH において、刺激開始後 0.4 s 付近でもピークが現れているが、この信号も後期脱分極期 (late depolarization period)³² と呼ばれる神経性の応答であると考えられる。さらに、0.55 s 時点においても小さくはあるが、有意な増加が見られる。これは LED 消灯による刺激応答を示している。刺激開始 0 s および 0.5 s に出現したピークは、LED 動作中の電磁誘導によるアーチファクトである。Figure 4.10a4 は、刺激開始後 10 ~ 100 ms の時間範囲において検出閾値 (3σ) を超えた spike 信号の拡大平均波形である。Figure 4.10b, c に、それぞれ 6 ヶ月および 20 ヶ月後の計測結果を示す。埋め込み 1 日目と同様に、神経応答の記録に成功したため、今回作製した Si マイクロニードル電極デバイスを用いて 1 年を超える長期計測が実現できたと言える。

また、同一の記録システムを用いて、Si マイクロニードル電極とタングステンニードル (TM31A10, World Precision Instruments 社, $1 \text{ M}\Omega$, 1 kHz) との長期記録能力の比較も行った。タングステン電極の記録期間は、最大でも 6 ヶ月程度であり、Si マイクロニードル電極の長期計測における優位性が明らかとなった (Figure 4.11)。

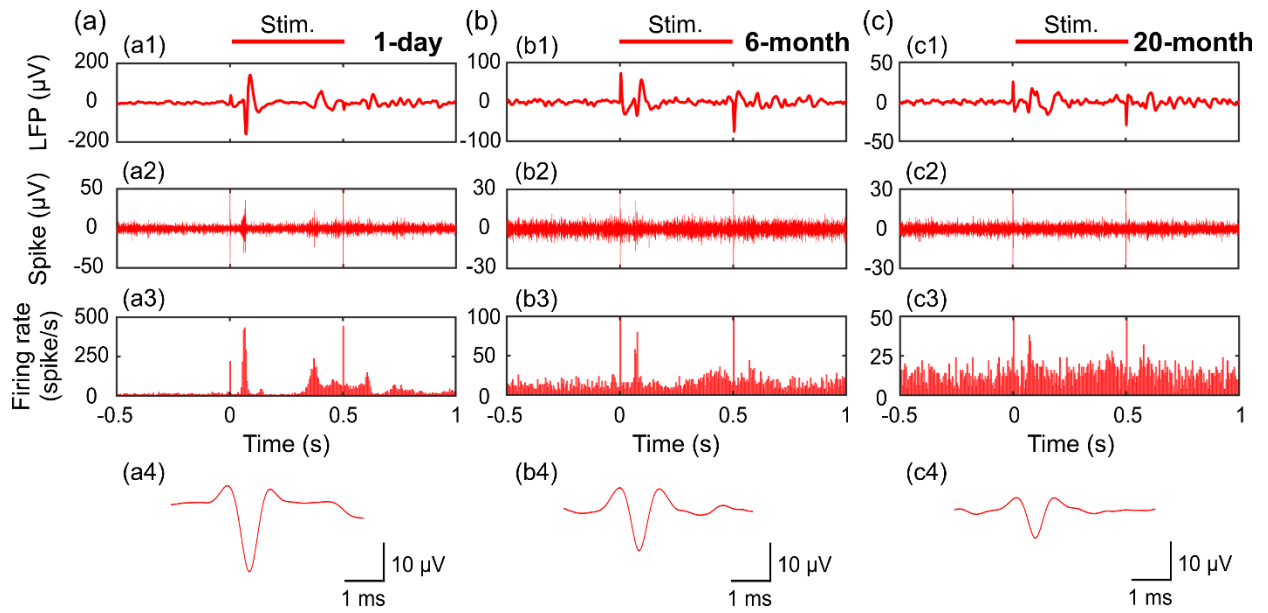


Figure 4.10 Si マイクロニードル電極による長期ニューロン計測
 Copyright 2025, The Authors by Wiley-VCH GmbH,
 CC BY ライセンスに基づく改変・転載²⁹

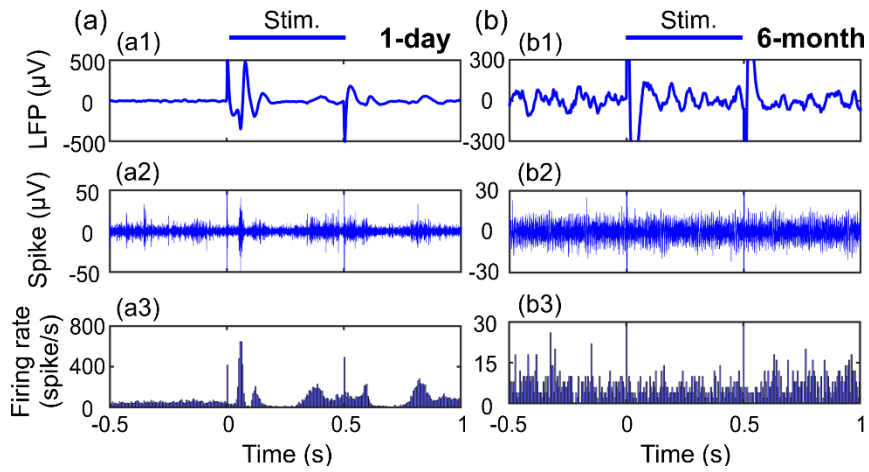


Figure 4.11 市販タングステン電極による長期ニューロン計測
 Copyright 2025, The Authors by Wiley-VCH GmbH,
 CC BY ライセンスに基づく改変・転載²⁹

4.4.3 長期安定性評価

埋め込み電極の記録性能の安定性は、長期記録能力を決定する重要な要因である。本項では、4.4.2項で示した Si マイクロニードル電極デバイスの長期安定性についてより詳細に言及する。神経信号の信号対雑音比 (SNR: signal to noise ratio) や発火頻度 (firing rate)、ノイズレベルなどの電気的特性の経時的変化について定量的に評価した結果を示す。

Si マイクロニードル電極を埋め込んだマウス (n=3) の記録性能を経時的に評価し、タングステン電極を埋め込んだマウス (n=3) と比較した。Si マイクロニードル電極の spike 帯域のノイズ (500~1500 Hz) は記録期間を通じて安定していた (Figure 4.12a)。一方で、タングステン電極では埋め込み後 2 週間以内にノイズレベルが急激に増加し、その後も高い状態で維持された (Figure 4.12a)。

Figure 4.12b, c は、それぞれ spike 信号の振幅と SNR の経時的変化を示す。spike 振幅は、刺激開始後 10~100 ms に得られた spike 波形の peak-to-peak 値として定義した。SNR は以下の式(4.1)で定義した。

$$SNR_{spike} = \frac{Signal}{Noise} = \frac{mean V_{pp,spike} (> 3\sigma, 0.01 s \text{ to } 0.1 s)}{rms(\sigma, -1.0 s \text{ to } -0.5 s)} \quad (4.1)$$

刺激前信号の標準偏差をノイズ (Noise, σ)、spike の peak-to-peak 値をシグナル (Signal, $V_{pp,spike}$) とし、これらの比を SNR として算出している。タングステン電極でノイズレベルが高くなったのは、ノイズとシグナル成分が重畳したためであると考えられる。3本の Si マイクロニードル電極のうち1本 (“Si microneedle 1”, Figure 4.12b, c) は、他の2本よりも高い信号振幅と SNR を示した。この電極間での差は、記録部位と標的ニューロンとの距離の違いに起因すると考えられる。一方、他の2本の Si マイクロニードル (“Si microneedle 2”, “Si microneedle 3”, Figure 4.12b, c) も、十分に高い SNR (約 5 以上) を維持し、タングステン電極に比べて優れた長期安定性を示した。

Figure 4.12d に示す spike の発火頻度は、刺激開始後に検出された 1 秒あたりの spike 数であり、刺激開始後 10~100 ms の区間を 10 ms のビン幅で分割し、その中で得られた最大値として算出した。タングステン電極では埋め込み後 1 ヶ月以内に急激に低下したのに対し、複数の Si マイクロニードル電極ではその低下が緩やかであった。その結果、2本の Si マイクロニードル電極 (“Si microneedle 2”, “Si microneedle 3”, Figure 4.12c) は、それぞれ 407 日および 617 日間にわたり安定した SNR で spike を検出した。もう 1 匹のマウス (“Si microneedle 1”) は 267 日で死亡したため、それ以降の測定は実施できなかった。タングステン電極の記録は 141 日で制限され、Si マイクロニードル電極が顕著に長期安定な記録性能を有することが明らかとなった (Figure 4.12)。

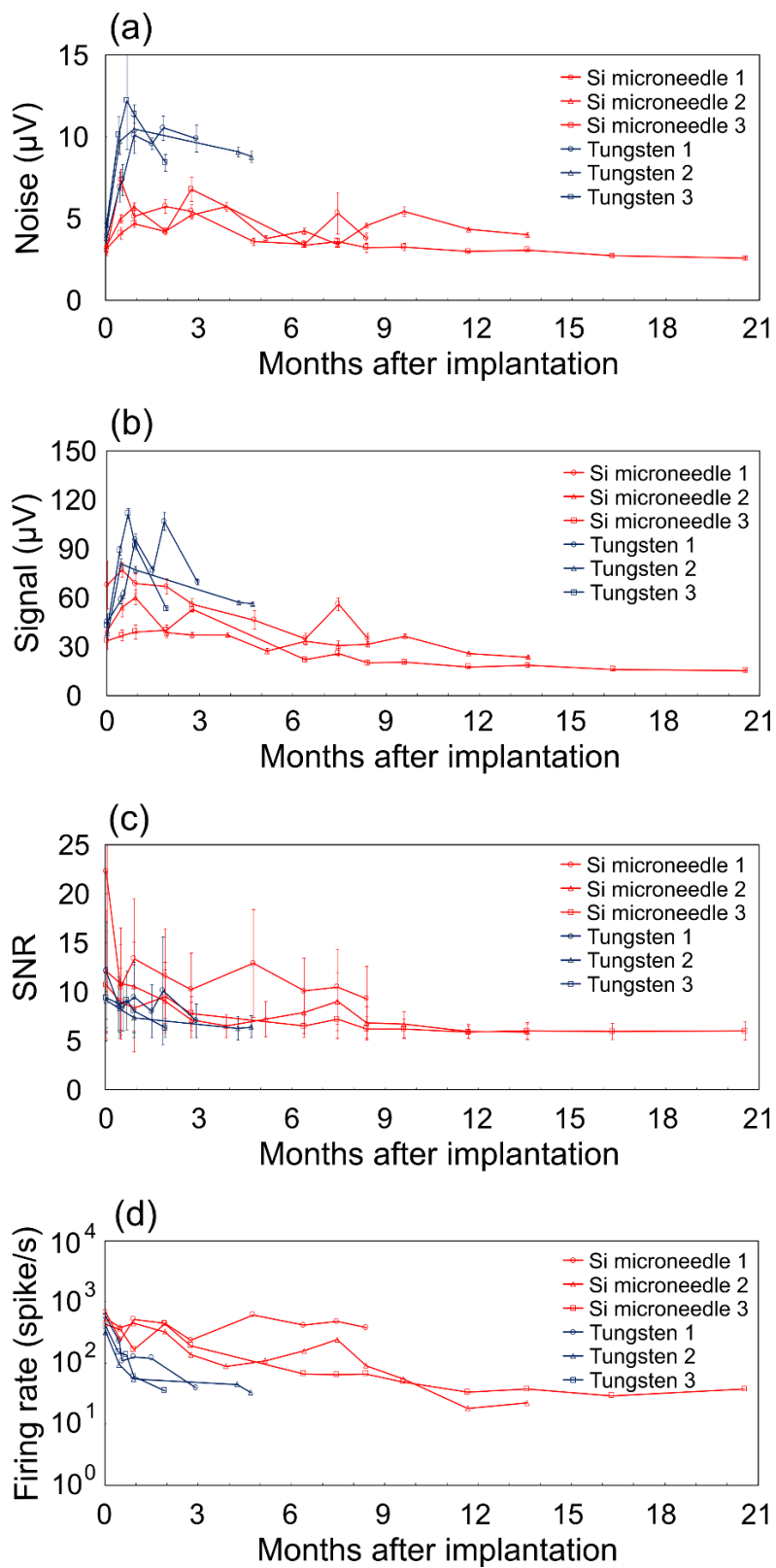


Figure 4.12 長期安定性評価

Copyright 2025, The Authors by Wiley-VCH GmbH,
 CC BY ライセンスに基づく改変・転載²⁹

埋め込み初期における Si マイクロニードル電極の電氣的安定性を明らかにするため、埋め込み後 1 ヶ月以内における LFP の SNR を評価した。Figure 4.13a に、埋め込み 1 日後のデータで正規化した LFP の SNR の経時的変化を示す。LFP の SNR は、LFP 振幅をノイズレベルで除した値として、以下の式(4.2)のように定義した。

$$SNR_{lfp} = \frac{Signal}{Noise} = \frac{mean V_{pp,lfp} (> 3\sigma, 0.01 s to 0.1 s)}{rms(\sigma, -1.0 s to -0.5 s)} \quad (4.2)$$

LFP 振幅は、刺激開始後 10~100 ms の範囲における低周波帯域（フィルタリング周波数 = 10~100 Hz）で検出された、LFP 波形の peak to peak 値として定義した。これらの信号の検出閾値は、刺激開始前 0.5~1.0 s の平均信号の標準偏差の 3 倍 [$3 \times SD (\sigma)$] とした。一方、ノイズレベルは標準偏差 (σ) として定義した。タングステン電極の SNR の平均値は、Si マイクロニードル電極よりも顕著に低下した (Figure 4.13b)。この結果は、タングステン電極周囲でニューロンの死滅やグリオシス（グリア細胞の凝集、活性化）が生じ、神経ネットワークが破壊されていることを示唆している。

Figure 4.13c, d, e は、それぞれ埋め込み 1 日後、2 週間後、1 ヶ月後のパワースペクトル密度 (PSD : power spectrum density, 10~2000 Hz) を示している。埋め込み 1 日後では Si マイクロニードル電極とタングステン電極の PSD に大きな差は見られなかった (Figure 4.13c)。しかし、埋め込み 2 週間後では、Si マイクロニードル電極と比較してタングステン電極で PSD 全体が高くなる傾向を示した (Figure 4.13d)。さらに、電極埋め込み 1 ヶ月後には、100 Hz 以上の周波数帯域においてタングステン電極の PSD が平坦化している (Figure 4.13e)。これは式 (2.9) で示した熱ノイズの影響が支配的であることを示している。熱ノイズは、周波数に依存せず一定の振幅を発生し、バックグラウンドノイズとして計測系に現れる。つまり、炎症細胞の形成（グリオシス）により瘢痕インピーダンス (scar impedance) が増加し、タングステン電極における記録インピーダンスが急激に上昇したことを意味している³³。

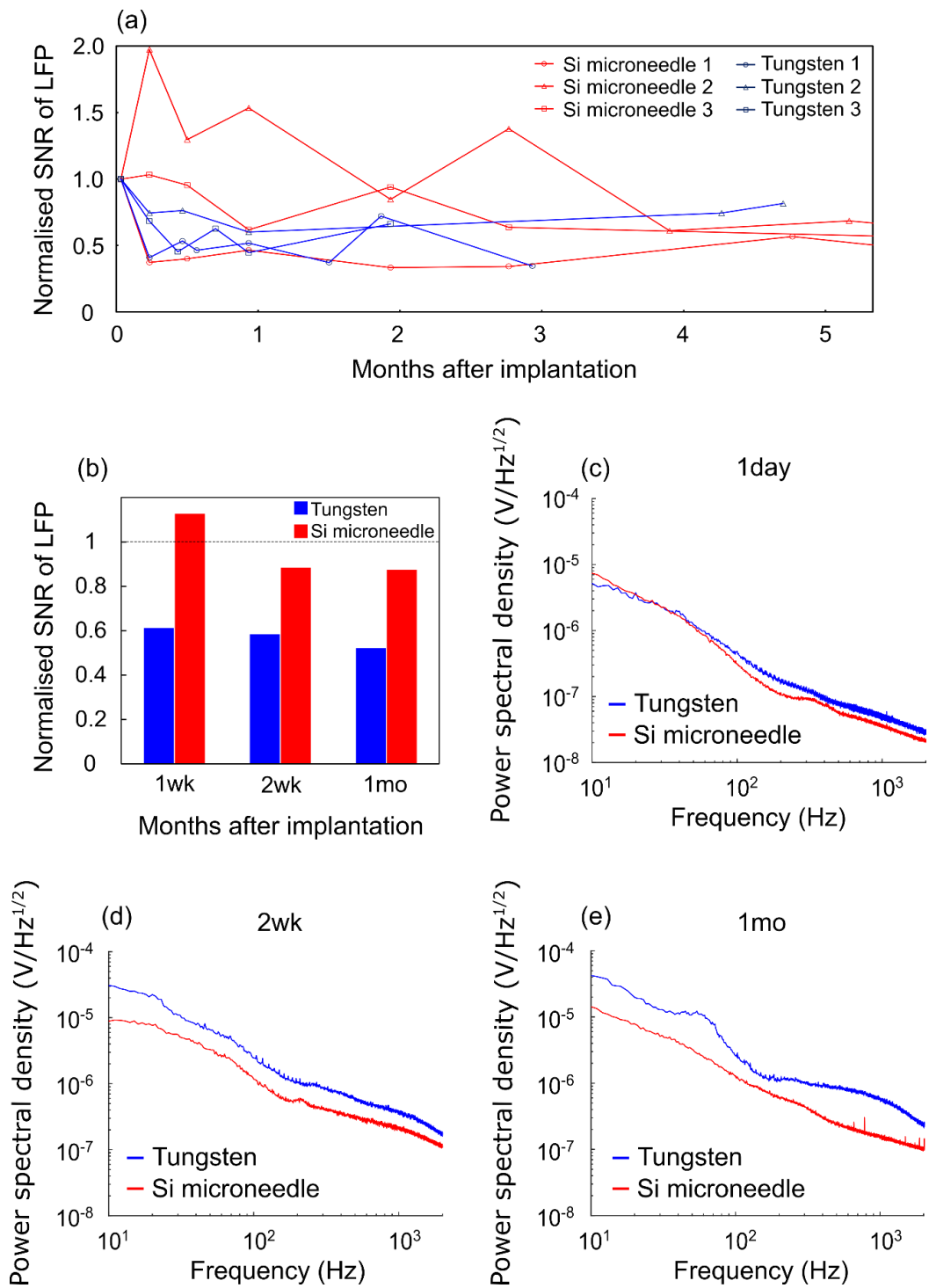


Figure 4.13 埋め込み初期の計測安定性評価
 Copyright 2025, The Authors by Wiley-VCH GmbH,
 CC BY ライセンスに基づく改変・転載²⁹

4.5 組織損傷評価

本節では、4.2 節で作製した Si マイクロニードル電極デバイスの低侵襲性を明らかにするために、免疫組織化学による組織損傷評価について記述する。本実験では、電極埋め込みマウスのニューロンを免疫染色により可視化し、電極周囲のニューロン密度を定量的に評価した。また、Si マイクロニードル電極と同程度のサイズを有するタングステン電極を用意し、これを頭蓋に固定する手法でマウス脳に埋め込み、両者の比較により提案デバイスの侵襲性を評価した。

4.5.1 実験手法

本項では、免疫組織化学による組織損傷評価の実験手法について述べる。まず、顕微鏡観察時、デバイスの埋め込み位置を特定するために、ピン型電極に実装した Si マイクロニードルおよびタングステン電極 (TM31A10, World Precision Instruments 社) の表面に、蛍光色素 DiO (3,3'-di-octadecyloxycarbocyanine perchlorate) を塗布した。

電極埋め込みに際しては、まずマウス (wild-type C57BL/6, オス, 体重 20~30 g, 日本エスエルシー株式会社) にイソフルランガス (3%) による全身麻酔を施した。本薬品による全身麻酔を行うことで手術後の覚醒を可能としている。麻酔下で、イヤバーおよびノーズバーを用いて脳定位固定装置 (SR-50, 株式会社ナリシゲ) にマウス頭部を 3 点固定した後、頭部の剃毛を行い、剪刀を用いてマウス頭部皮膚を正中線に沿って切除した。また、鋭匙を用いて骨膜および筋肉を除去した。その後、ドリルとピンセットを用いて、マウスの一次視覚野 (V1) に $1.5 \times 1.5 \text{ mm}^2$ の開頭を行った (AP = -4.0 mm, ML = -2.5 mm)。1 匹のマウスに対して、右半球 (V1) には Si マイクロニードルを、対側半球にはタングステンニードルを、それぞれ脳表に対して垂直に、深さ約 400 μm (大脳皮質 IV 層) の位置に埋め込んだ (Figure 4.14a, b)。電極の刺入および位置決めにはマイクロマニピュレータ (MO-10, 株式会社ナリシゲ) を用いた。また、別のマウスに対しては、右半球 (V1) の頭蓋のみを除去した (sham, Figure 4.14c)。対側半球の開頭は行わず、無処置の対照 (control) とした。デバイス設置後、脳表を保護するため、生理食塩水を含んだゼラチンスポンジ (スポンゼル, LTL ファーマ株式会社) で脳表全体を覆った。その後、露出箇所を保護とデバイスの固定のため、デンタルセメント (UNIFAST III, 株式会社ジーシー) を用いて頭部全体を覆い固めた。なお、Si マイクロニードル電極デバイスの基板パッド部分は、デンタルセメントに固定されているが、脳表上の基板部は脳の拍動に追従可能な構成 (フローティング電極) となっている (Figure 4.14)。

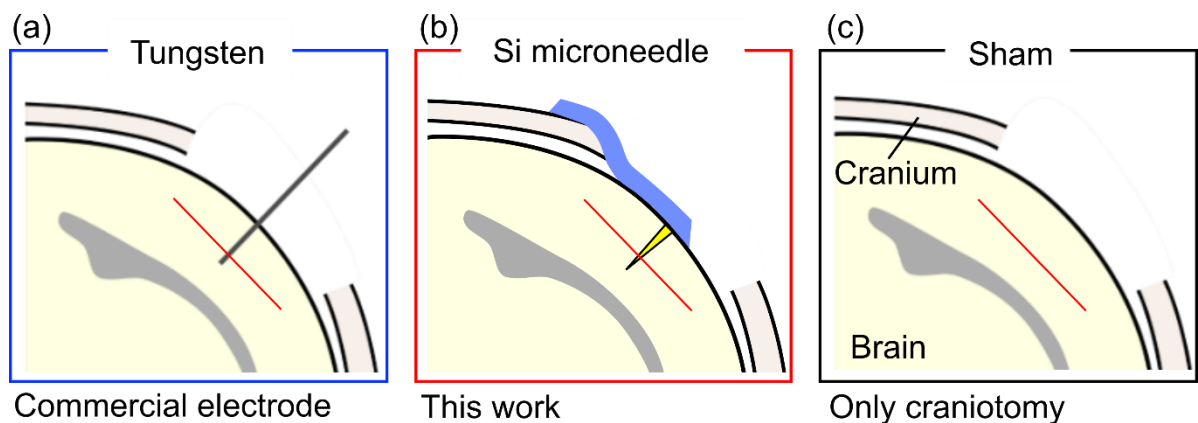


Figure 4.14 電極埋め込み方法

埋め込み 30 日後，マウスの腹腔内に 10%ウレタン溶液を体重 10 g あたり 200 μ l 投与し，麻酔を施した．その後，0.1 M リン酸緩衝液（PB：phosphate buffered solution）50 ml で灌流し，続いて 4% パラホルムアルデヒド（PFA：paraformaldehyde）30 ml で灌流固定を行い，脳を摘出した．脳は PFA 溶液中で 1 週間保存したのち，ビブラトームスライサー（LinearSlicer PRO7，堂阪イーエム株式会社）を用いて皮質表面に対して接線方向に切片化した．切片化は，皮質表面から 200 μ m 下方の位置から開始し，連続する 4 枚の 60 μ m 厚スライスを作製した．これらのスライスは，リン酸緩衝生理食塩水（PBS：phosphate buffered saline）を満たしたウェルプレート内に保存した．

得られた脳スライスは，まず 0.4% Triton X-100 で透過処理を行い，続いて 1% 胎仔ウシ血清（FBS：fetal bovine serum）でブロッキングを行った．各工程は振盪機上で 2 時間処理し，各工程後に PBS による洗浄を 10 分 \times 3 回行った．その後，脳スライスをスライドガラス上に移し，PBS を滴下した．スライスの周囲をブロッキングペンで囲うことで，PBS の漏出を防いだ．染色工程では，スライス上の PBS と抗体溶液を置換することで行った．

一次免疫染色では，ニューロン核（NeuN）に対するラットモノクローナル抗体 [Anti-NeuN antibody（EPR12763）；ab279297，Abcam 社] を 500 倍に希釈し，4 $^{\circ}$ C の冷蔵環境下で 12 時間反応させた．続いて，二次抗体染色として，ラット IgG（immunoglobulin G）に対するロバポリクローナル抗体 [Anti-Rat IgG（Alexa Fluor 647）；ab150151，Abcam 社] を 500 倍希釈で，3 時間反応させた．また同時に細胞核染色として，DNA（deoxyribonucleic acid）に結合する 4',6-diamidino-2-phenylindole（DAPI；富士フィルム和光純薬株式会社）を 50000 倍希釈で用いた．染色後，脳スライスに封入材（ProLong Diamond Antifade Mountant，Thermo Fisher Scientific 社）を滴下し，カバーガラスで覆った．また市販の透明樹脂系接着剤で，カバーガラスの周囲を固定することで，プレパラ

トを作製した。

染色画像の取得には、共焦点蛍光顕微鏡（Nikon A1Rsi-TY1, 株式会社ニコンソリューションズ）と NIS-Elements ソフトウェア（version 4.50）を用いた。共焦点顕微鏡画像の撮影に際して、埋め込み前に電極表面に塗布した DiO 蛍光を指標として、電極の埋め込み位置を同定した。電極埋め込み部を含む脳スライスでは、Figure 4.15a のように DiO 蛍光により組織内の電極位置を確認することができた。

ニューロン密度を定量的に評価するため、撮影した共焦点顕微鏡画像に対して ImageJ（NIH：National Institutes of Health）で画像解析を行った。画像解析では、「二値化（Binarization）」および「背景解析（Background）」（閾値：20～255, 8 bit 画像）処理を施した（Figure 4.15b, c）。さらに、距離に対するニューロン密度を定量評価するために、ニードル位置を中心として半径方向に 50 μm 間隔の同心円を描き（Figure 4.15c）、各領域のニューロン密度（強度）を算出した。得られた値を、開頭を施していない対照群（control）の平均値で除すことで正規化した。また、画像内のニューロンの個数は、同一ソフトウェアの「粒子解析（Analyze Particle）」機能を用いて算出した [particle size (square of pixel > 10)]。解析に使用したサンプルは、タングステンニードルで 8 スライス（マウス 3 匹）、Si マイクロニードルで 8 スライス（マウス 3 匹）、および sham で 9 スライス（マウス 3 匹）から取得した。統計解析には、Microsoft Excel 365（Microsoft 社）の T.TEST 関数を用い、等分散を仮定しない 2 標本 t 検定（Welch の t 検定）を実施した。

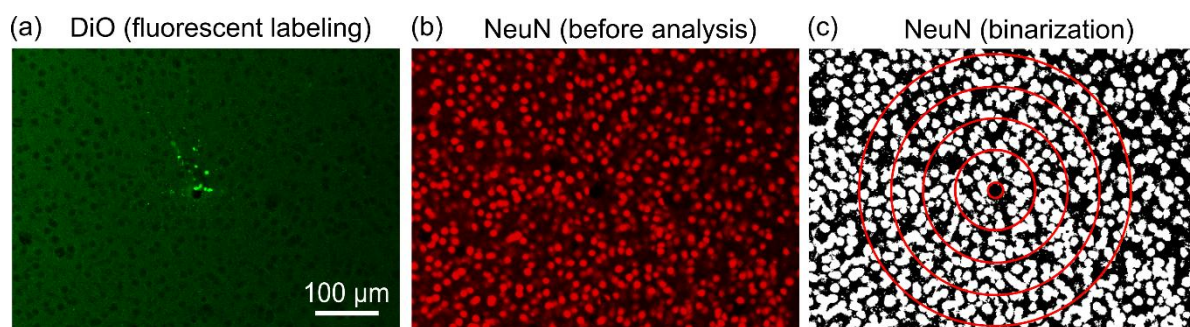


Figure 4.15 組織損傷の評価方法

Copyright 2025, The Authors by Wiley-VCH GmbH,

CC BY ライセンスに基づく転載²⁹

4.5.2 ニューロンの蛍光観察および定量評価

本項では、4.5.1 節で取得した蛍光顕微鏡画像および、それをもとにしたニューロン密度の定量的評価の結果を示す。

Figure 4.16a, b は、タングステンニードルおよび Si マイクロニードルを 1 ヶ月間埋め込んだマウス脳の NeuN (ニューロン核) および DAPI (細胞核) の共焦点顕微鏡画像を示す。タングステンニードル周囲では、顕著なニューロン死滅が確認された。開頭のみを行った組織 (sham) に見られる穴は、直径が 10 μm を超えることが知られている血管³⁴, もしくは脳スライス作製過程における機械的損傷によるものと考えられる。

Figure 4.16c は、電極表面から 50 μm ごとの距離に対して定量化したニューロン密度の分布を示す。電極表面から 50 μm 以内の領域において、Si マイクロニードルではタングステンニードルに比べて有意に高いニューロン密度が得られた。タングステンニードルは、50 μm 以内で最も顕著なニューロン死滅を示し、この領域は最も損傷が大きいと予測される場所でもあった。この結果は、開頭を施していない脳組織 (contral) と比較して 39.4%のニューロンが失われていることを意味する。一方で、Si マイクロニードルを埋め込んだ組織と開頭のみ組織 (sham) の間では、いずれの領域においても統計的有意差は認められなかった。これらの結果は、Si マイクロニードルの埋め込みに伴うニューロン死滅はタングステン電極より少なく、開頭のみ組織 (sham) と同程度であることを示唆している。

DAPI (細胞核) 染色の評価では、Si マイクロニードルおよび開頭のみ組織 (sham) の細胞密度は、開頭を施していない脳組織 (Contral) よりも高い値を示した (Figure 4.16d)。この細胞密度の増加は、開頭に伴う損傷応答として生じたアストロサイトなどの非神経細胞の増加によるものと考えられる。また、電極埋め込みによって失われたニューロンの絶対数を算出した結果、タングステンニードルでは平均 112 個、Si マイクロニードル電極では平均 51.6 個であった (Figure 4.16e)。

Si マイクロニードルとタングステンニードルでニューロン密度に差が生じた原因として、電極の埋め込み方法に起因するマイクロモーションの差が考えられる。脳と頭蓋骨との相対運動により、頭蓋骨に固定された埋め込み電極は脳組織に微小な剪断力を生じさせ、慢性的な組織損傷を引き起こすことが知られている³⁵。一方で、脳組織上に浮遊するように配置された電極 (フローティング電極) は、脳の動きに追従することができるため、この問題を大幅に軽減できる³⁶。フローティング電極は、頭蓋骨に固定する電極と比較して、形成されるグリア瘢痕の厚さが著しく小さいことが報告されている⁵。本研究では、タングステン電極を頭蓋骨固定型の対照として使用し、一方、Si マイクロニードル電極はフレキシブル基板上に形成し脳組織上に浮遊する構成 (フローティング構造) としたた

め、このような差が生じたと考えられる。

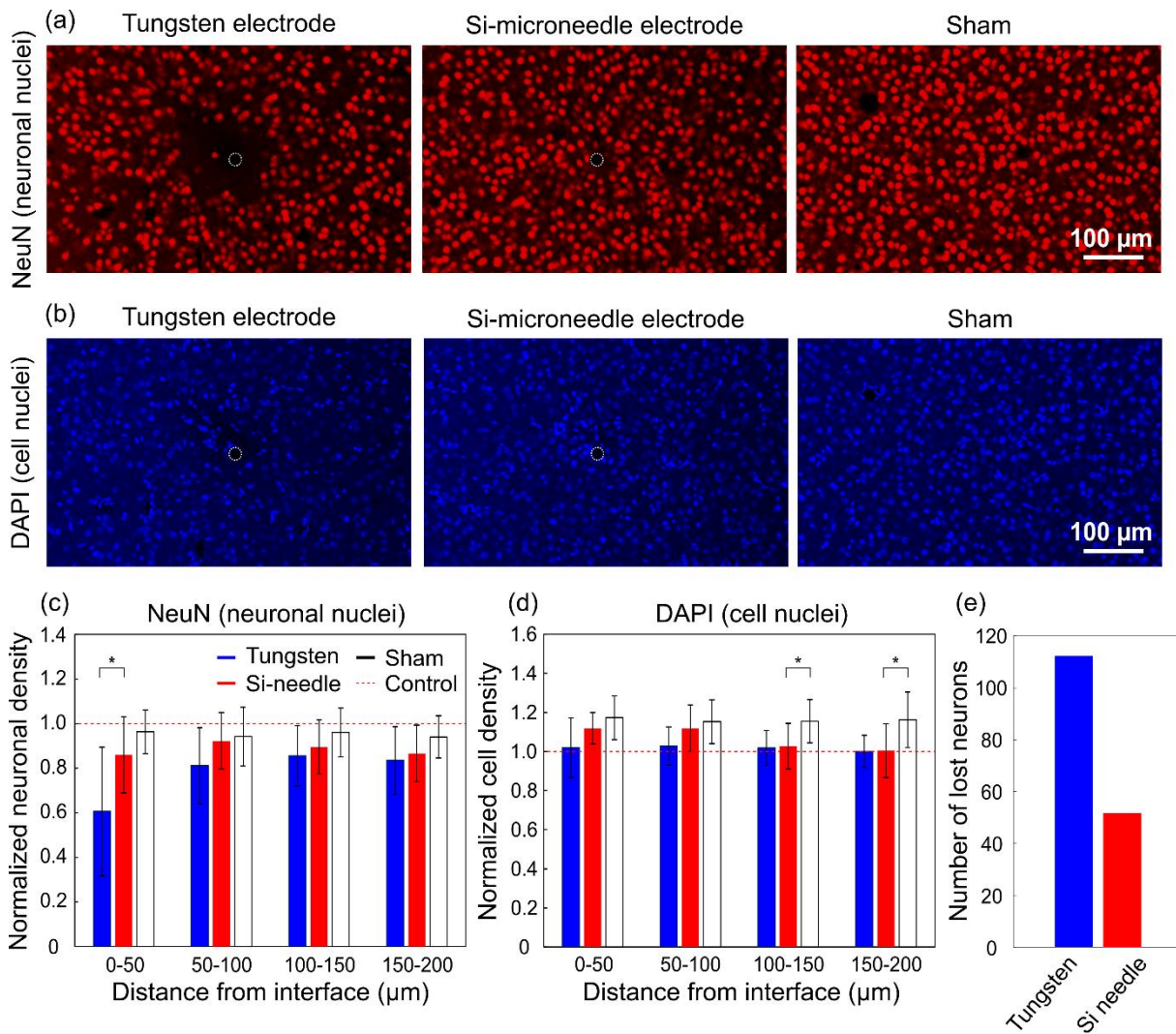


Figure 4.16 脳スライスの蛍光観察とニューロンの定量評価

Copyright 2025, The Authors by Wiley-VCH GmbH,

CC BY ライセンスに基づく転載²⁹

4.6 自由行動下計測

本節では、行動に起因するノイズの低減手法について記述する。4.2 節から 4.5 節では、Si マイクロニードル電極デバイスを作製し、長期ニューロン計測を通して、その低侵襲性を明らかにしてきた。しかし、本デバイスは高インピーダンス特性を有することに加え、マウスの行動に起因するノイズの影響を受けやすく、高品質なニューロン信号の記録が困難であることが知られている^{37,38}。動物を麻酔などで鎮静させることでノイズを低減できるが^{25,26}、その場合は行動解析の併用は不可能である。本節では、本デバイスの構造的特徴を活かした自由行動下でのノイズ低減手法を提案する。まず、ノイズ低減を目的とした計測手法を提案し、埋め込み手技の確立を行った。続いて本手法を用いて、鎮静下および自由行動下マウスにおける視覚刺激応答計測を実施し、それぞれの計測条件でのノイズ特性を比較した結果について示す。

4.6.1 ノイズ低減手法

本項では、行動に起因する主なノイズ源である筋電位 (EMG: electromyography) と、その低減方法について記述する。筋電位は、脳周囲の筋肉の収縮により発生するもので、自由行動下では特に顕著に観察される。マウスの行動によって発生した筋電位は、頭蓋骨や脳表を伝搬し、記録電極やリファレンス電極が検出することでノイズとして観測される。筋電位は、単一ニューロンに由来する spike 信号と同程度の周波数帯域 (500~1500 Hz) に重畳するため、高分解能でのニューロン計測において深刻な問題となる。

本項では、筋電位の低減を試みる。筋電位は脳表における空間分布が異なるため、リファレンス電極を記録電極の近傍に配置し、差動計測を行うことで除去できると考えられる。これまでに本研究室では、コアキシャル神経電極による局所的な差動計測を行ってきた³⁹。コアキシャル神経電極は、中心電極 (コア電極) の外側に層間絶縁膜を介してシェル電極を形成した構造を有し、同軸ケーブルのような形態をしている (Figure 4.17a)。この構造により、およそ 5 μm という超至近距離での差動計測が可能となった (Figure 4.17c)。脳定位固定下ではあるが、spike の信号対雑音比 (SNR: signal to noise ratio) と発火頻度 (firing rate) の向上に成功した (Figure 4.18)。一方で、この手法にはいくつかの課題がある。記録電極とリファレンス電極が過度に近接しているため、複数ニューロンの集合電位である LFP (local field potential) が減衰し、さらにニューロンとの位置関係によっては spike 信号の検出が困難になる場合がある。また、シェル構造を形成するために電極サイズが大型化し、侵襲性が増加するという問題もある。

これらの課題を踏まえ、本研究では新たに、記録電極の直上脳表にピン型電極を配置し、差動計測を行う手法を提案する (Figure 4.19)。この構成により、ニ

ニューロン信号を減衰させることなくノイズを低減できると考えられる。さらに、コアキシャル構造を形成する複雑なプロセスを必要としないため、簡便かつ実装性の高い方法である。

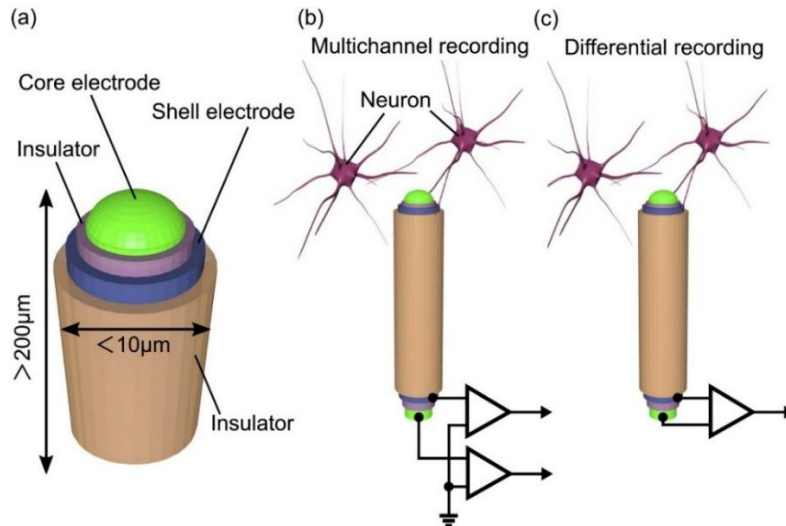


Figure 4.17 コアキシャルマイクロニードル電極
Copyright 2020, Elsevier, 許諾済 (CCC 経由) ³⁹

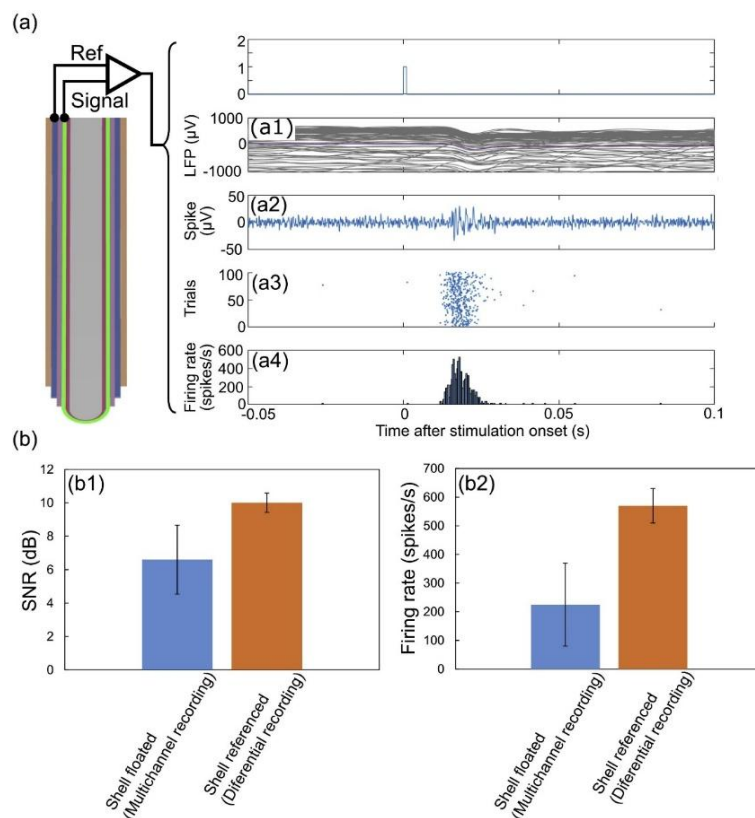


Figure 4.18 コアキシャルマイクロニードル電極による局所差動計測
Copyright 2020, Elsevier, 許諾済 (CCC 経由) ³⁹

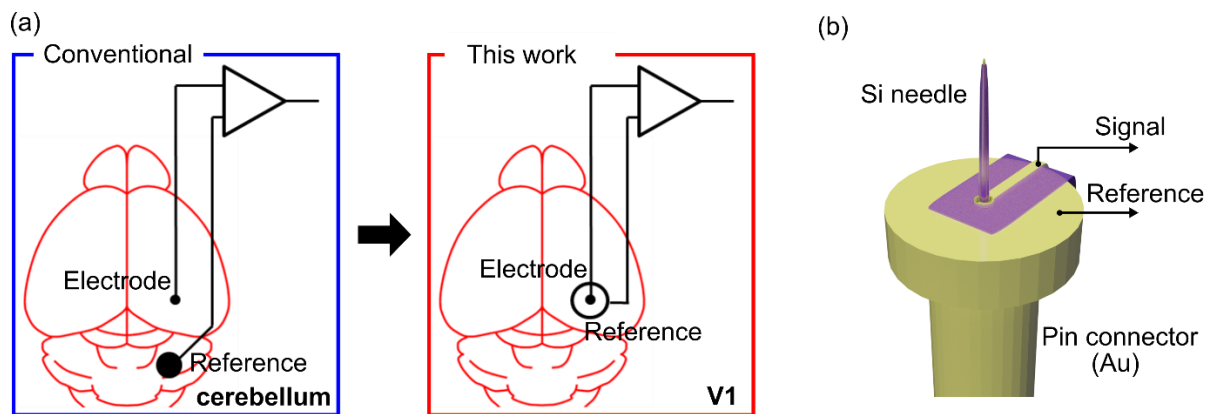


Figure 4.19 提案するノイズ計測手法および電極実装方法

Copyright 2025, The Authors by Wiley-VCH GmbH,

CC BY ライセンスに基づく改変・転載²⁹

4.6.2 実験手法

本項では、4.6.1 節で述べた提案手法を実現するための電極実装方法、埋め込み手技、および計測手順について記述する。

まず、フレキシブル基板の Si マイクロニードル電極を、Figure 4.20a のようにピン型コネクタ (Au) に実装した。Si マイクロニードル電極はピン型電極上に設置されているが、両者は電氣的に絶縁されており、ステンレスワイヤを介して別のピン型電極に接続されている (Figure 4.20b)。この構成により、Si マイクロニードル電極を支持するピン型電極をリファレンス電極として利用でき、記録電極と同一領域の脳表直上から差動計測を行うことが可能となる。

続いて、実装したデバイスを用いてマウスの埋め込み手術を行った。まず、別途用意したピン型電極 (Au) を、比較用のリファレンス電極として小脳に配置した。次に、実装した Si マイクロニードル電極およびリファレンス用ピン型電極を右脳一次視覚野 (V1) に刺入・配置した (AP = -3.5 mm, ML = -2.5 mm)。最後に、Si マイクロニードル電極の出力端子を含む 3 つの電極を、デンタルセメント (UNIFAST III, 株式会社ジーシー) により固定した。電極埋め込み方法および埋め込み位置を Figure 4.20c および Figure 4.21a に示す。また、実際に埋め込み手術を行ったマウスの写真を Figure 4.21b に示す。

電極埋め込みマウスに対して、視覚刺激応答計測を実施した。まず、行動に起因するノイズを低減するために、鎮静剤として生理食塩水を希釈剤とした 0.5% クロルプロチキセンをマウス腹腔に体重 10 g 当たり 0.05 ml 投与した。その後、LED を用いて視覚刺激を行い (0.5 s 間, 3 s 間隔, 試行回数 100 回), その応答信号を、(1)小脳を基準とした場合、および、(2)V1 脳表を基準とした場合、の 2 つの条件下で計測した (Figure 4.21a)。さらに、自由行動下マウスに対しても同様の条件下で計測を行い、無麻酔下での EMG 低減効果を評価した。

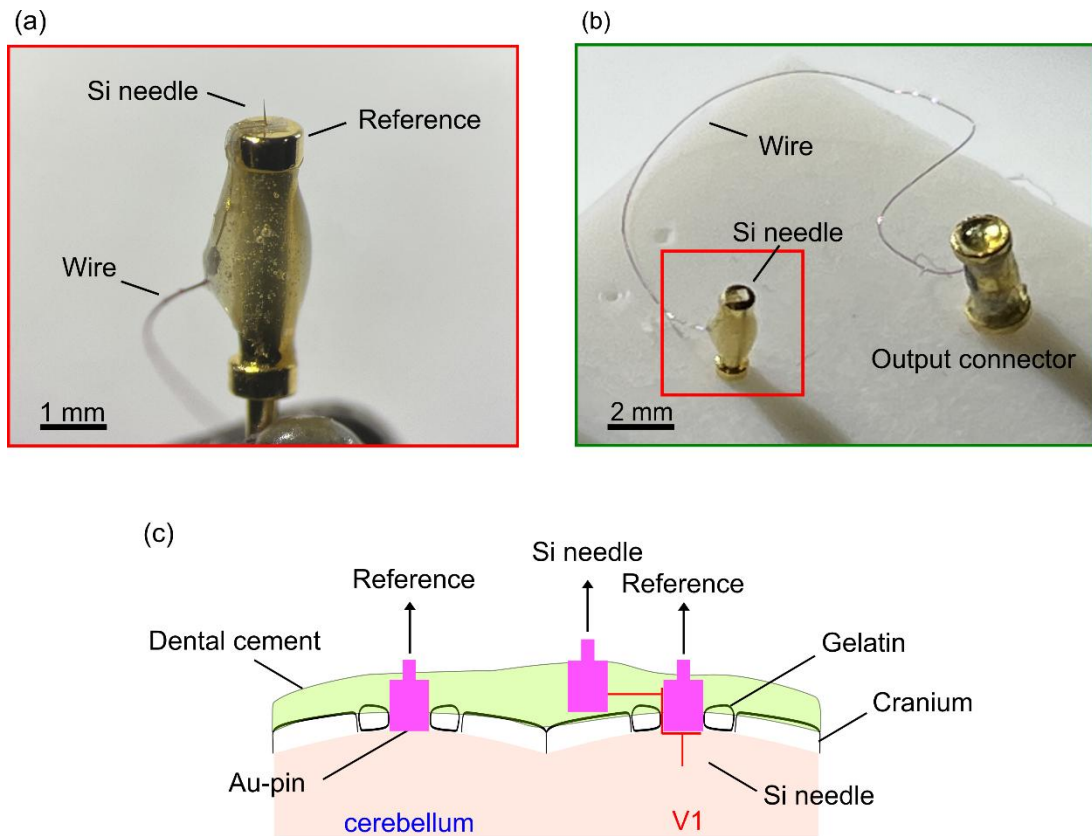


Figure 4.20 デバイス実装と埋め込み方法

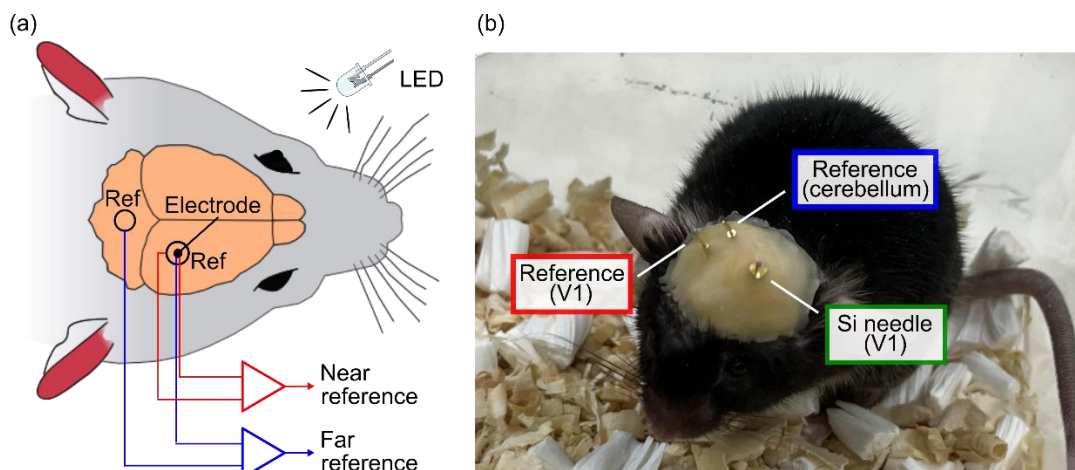


Figure 4.21 デバイス埋め込み位置と手術後マウス

Copyright 2025, The Authors by Wiley-VCH GmbH,

CC BY ライセンスに基づく改変・転載²⁹

4.6.3 ニューロン計測およびノイズ比較

本項では、4.6.2 項で実施した視覚刺激計測の解析結果について述べる。ニューロン計測は電極埋め込みから 13 日後に実施し、対象は鎮静剤投与マウスおよび自由行動マウスの 2 種類である。鎮静剤投与マウスでは、自発行動に伴うノイズはほぼ存在しないと想定している。

Figure 4.22 に鎮静剤投与マウスの視覚刺激応答計測の解析結果を示す。Figure 4.22a がコントロール条件（リファレンス電極を記録電極から離し、小脳に配置した場合）であり、Figure 4.22b が提案手法条件（リファレンス電極を記録電極に近づけ、V1 脳表に配置した場合）を表している。視覚刺激応答の解析方法は 4.4.2 項に準ずる。いずれの条件においても、視覚刺激後約 50 ms 後に応答が検出され、局所電場電位（LFP）と単一ニューロンに由来する spike 信号が確認された。よって、マウスの自発行動がない環境下では、リファレンス電極を小脳または V1 脳表に配置しても計測可能であることが示された。

一方、自由行動マウスにおける視覚刺激応答計測の解析結果を Figure 4.23 に示す。リファレンス電極を小脳に配置した場合（Figure 4.23a）と V1 脳表に配置した場合（Figure 4.23b）のいずれにおいても、視覚刺激後約 50 ms 後に LFP が検出された。しかし、リファレンスを V1 脳表とした場合では、刺激前後で発火頻度に明瞭な差が見られたのに対し、リファレンスを小脳とした場合では差が見られなかった（Figure 4.23a3, b3）。原因として、リファレンスが小脳の場合は spike 信号が行動ノイズ（EMG）に埋もれ、かつ EMG により検出閾値（ 3σ ）が上昇し spike 信号が検出されにくくなったことが挙げられる。対して V1 脳表をリファレンスとした場合は、EMG が低減され、spike 信号検出が可能になったと考えられる。

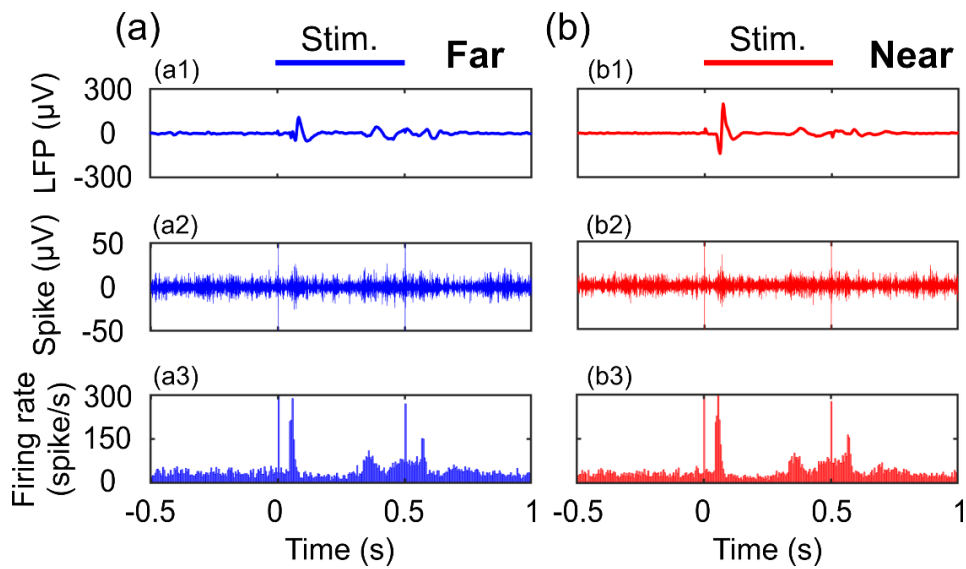


Figure 4.22 鎮静剤投与マウスのニューロン信号
 Copyright 2025, The Authors by Wiley-VCH GmbH,
 CC BY ライセンスに基づく改変・転載²⁹

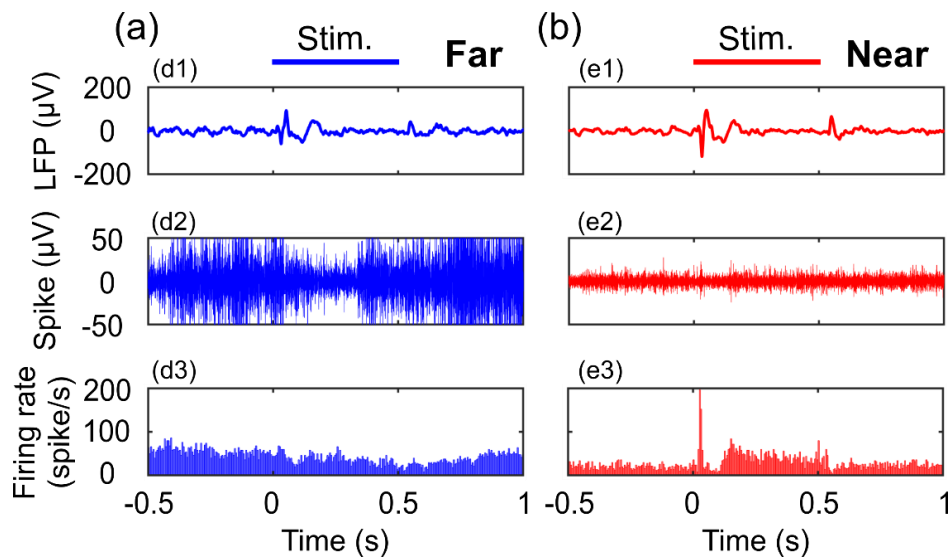


Figure 4.23 自由行動マウスのニューロン信号
 Copyright 2025, The Authors by Wiley-VCH GmbH,
 CC BY ライセンスに基づく改変・転載²⁹

Figure 4.24 に鎮静剤投与マウスのノイズスペクトル密度 (PSD : power spectral density), および spike 帯域のノイズレベルとして算出したバックグラウンドノイズ (500~1500 Hz) の標準偏差 σ を示す. いずれの比較においても, 小脳を基準とした場合を青, V1 脳表を基準とした場合を赤で示している. PSD の結果から, リファレンス電極を記録電極に接近させることで, ニューロン信号が検出される 10 Hz~2 kHz の帯域においてノイズが低減されることが分かった. 特に LFP 帯域 (10~100 Hz) では顕著な低減が見られた. また, Mann-Whitney の U 検定 (有意水準 0.05) を行った結果, spike 帯域 (500~1500 Hz) においてもバックグラウンドノイズに有意な差が認められた ($p < 0.001$). このノイズ低減は, マウスのわずかな行動によるノイズ成分や, 外部回路とのカップリングなど行動に依存しない外来ノイズが, リファレンス電極の接近によって共通成分として打ち消されたためであると考えられる. したがって, リファレンス電極と記録電極の接近は, マウスの運動がない環境においても, 有効な手法であることが示された. ただし, 統計的な有意差が認められた一方で, ノイズレベル σ 差はわずかであったため, 発火頻度の PSTH 解析結果には大きな影響を及ぼさなかったと考えられる.

Figure 4.25 に自由行動マウスの PSD およびバックグラウンドノイズ σ (500~1500 Hz) の結果を示す. PSD の結果から, マウスの自発的な行動に伴い spike 帯域 (500~1500 Hz) のノイズが増加することが分かる. しかし, ノイズ増加が顕著であったのはリファレンス電極を離れた場合のみであり, リファレンス電極を記録電極近傍に配置した場合には spike 帯域ノイズの増加, すなわち EMG 成分の重畳を抑制できていることが確認された. 一方で, 100 Hz 以下の低周波ノイズは両条件でほぼ同等であり, これはマウスの動作に伴うケーブル振動などのノイズが支配的であったためと考えられる.

これらの結果は, 記録電極直上にリファレンス電極を構成する Si マイクロニードル電極が spike 帯域のノイズを効果的に低減し, 自由行動下マウスにおいても神経活動信号の検出を可能にすることを示している.

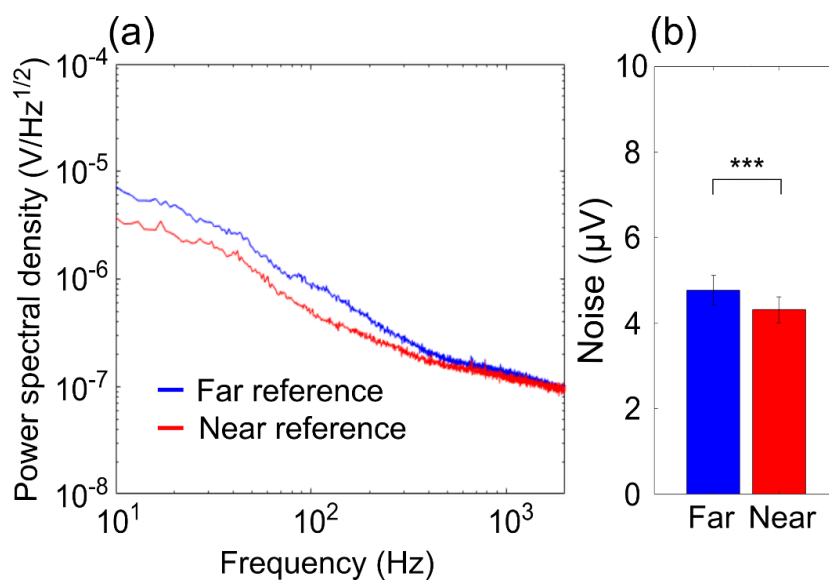


Figure 4.24 鎮静剤投与マウスの PSD

Copyright 2025, The Authors by Wiley-VCH GmbH,
CC BY ライセンスに基づく改変・転載²⁹

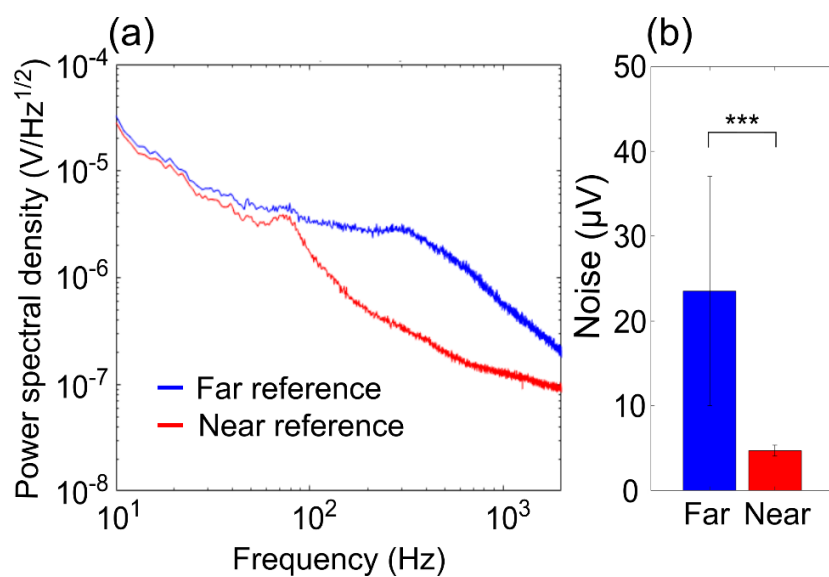


Figure 4.25 自由行動マウスの PSD

Copyright 2025, The Authors by Wiley-VCH GmbH,
CC BY ライセンスに基づく改変・転載²⁹

4.7 考察

本章では、フレキシブル基板を有した直径 5 μm のマイクロニードル電極デバイスによる、低侵襲な *in vivo* 神経記録技術を示した。電極デバイスは、Si の VLS 結晶成長および微細加工プロセスによって作製した。この技術により、従来の刺入型神経電極と比較してニューロンの死滅をほとんど伴わずに長期的な神経記録を実現し、記録品質を向上させることができた。筆者の知る限り、直径 5 μm の刺入型電極デバイスを用いて 1 年以上にわたる *in vivo* 神経記録を達成したのは本研究が初めてである。さらに、ノイズ低減を目的とした電極実装を施すことで、自由行動下マウスからの神経記録にも成功した。

Si マイクロニードル電極デバイスの長期記録性能を検証するため、マウス脳内への埋め込みを行い、市販電極の中でも最小クラスであるタングステン電極と比較した。Si マイクロニードル電極では 617 日以上 spike 検出が可能であったのに対し (Figure 4.10)、タングステン電極では 141 日までにとどまった (Figure 4.11)。この記録期間は、NET (290 日)、UFTEs (300 日)、Neuropixels (309 日) などに代表される、近年の刺入型電極デバイスの多くを上回っている^{9-11,13,16,17,40-42}。本研究では、Si マイクロニードル電極およびタングステン電極をそれぞれ 3 匹のマウスに埋め込んだ ($n=3$)。そのうち、Si マイクロニードルを埋め込んだ 2 匹のマウスでは、1 年以上にわたるスパイク記録が得られた。残り 1 匹 (Si microneedle 1, Figure 4.12) は 267 日で死亡したため、それ以降の記録は得られなかったが、死亡直前まで安定した SNR を維持していた。記録期間の差 (407~617 日; Si microneedle 2, Si microneedle 3, Figure 4.12) には、手術時に生じる組織損傷や、脳組織中での電極安定性 (絶縁皮膜の劣化) などの要因が影響していると考えられる。これらは長期記録において重要な要素であり、今後さらなる改善が必要である。タングステン電極では、埋植後 2 週間以内にノイズが急増する現象が観察された (Figure 4.12a)。このような特性は、電極のインピーダンス上昇 (瘢痕インピーダンス) に伴ってノイズが増加する報告と一致する^{33,43}。電極性能の劣化要因としては、慢性損傷および炎症反応により形成されるグリア被膜が挙げられる。グリア被膜は、活性化マイクログリア、瘢痕化アストロサイトが層状に集積した絶縁性イオンバリアである¹。アストロサイトの活性化マーカーであるグリア線維性酸性タンパク質 (GFAP: glial fibrillary acidic protein) 陽性細胞の増加とインピーダンス上昇の相関が報告されている⁴⁴。本研究におけるノイズ変化の結果は、Si マイクロニードル電極がタングステン電極に比べて侵襲性が低いことを示唆している。また、タングステン電極記録で観察された spike 発火頻度の減少 (Figure 4.12d) は、インピーダンスの上昇およびニューロンの死滅を反映していると考えられる。

免疫組織化学的評価の結果から、提案する直径 5 μm の Si マイクロニードル電

極デバイスは、電極埋め込みを行わなかった組織 (sham, Figure 4.16c) と同程度のニューロン密度を示し、電極埋め込み前後で脳組織への影響がほとんど生じないことが明らかになった (電極表面から 0~50 μm の範囲)。このような結果は、他の刺入型電極デバイス (幅 70 μm の Si シャンクを有する Neuropixels^{9,10}, 直径 50 μm のタングステンシャトルで刺入する UFTEs¹⁶ など) では得られない。本研究において、損傷評価の比較として先端直径約 1 μm の市販タングステン電極を使用したところ、Si マイクロニードル電極デバイスの約 2 倍のニューロン死滅が観察された (Figure 4.16e)。つまり、他の体積の大きな電極デバイスでは、より多くのニューロン死滅をもたらすことは明白である。組織損傷の大きさを決定する主な要因は電極形状にあるが、Si マイクロニードルとタングステン電極の寸法はほぼ同等であるため、両者の損傷差は他の要因に起因すると考えられる。脳組織損傷は埋め込み手法にも依存することが知られている⁴⁵。脳と頭蓋骨の相対運動により、頭蓋骨に固定された電極は脳内に微小な機械的ストレスを発生させ、慢性損傷を引き起こす³⁵。一方で、脳組織上に浮遊する電極 (フローティング電極) は脳のマイクロモーションに追従し、この問題を回避できる³⁶。フローティング電極では頭蓋固定型に比べ瘢痕形成が著しく小さいことが分かっている⁵。本研究では、タングステン電極をコントロールの頭蓋固定型電極として用い、Si マイクロニードル電極デバイスはフレキシブル基板上に実装し、脳表面に浮遊するフローティング電極とした。そのため、このような損傷差が現れたと考えられる。また、ヤング率の差 (タングステン: 410 GPa, Si: 140–180 GPa) がマイクロモーションによる損傷に影響を及ぼしたと考えられる^{46,47}。さらに、電極材料と脳組織との密度差が損傷に影響を与えることが知られている⁵。タングステン (19.25 g cm^{-3}) は Si (2.3 g cm^{-3}) より一桁程度高密度であり、脳組織 (0.99 g cm^{-3}) との間により大きな慣性力が生じる。

これまでも長期記録を可能にする新規電極デバイスが報告されており、月単位の長期ニューロン計測が実現している。しかし今回提案するデバイスは、他の新規デバイスとの明確な差を有しており、それは電極刺入に伴う急性損傷の低さである。慢性損傷を低減する目的で柔軟材料を用いたフレキシブル電極も提案されているが、刺入時の急性損傷は依然として避けられない。一方、本研究の Si マイクロニードル電極では、ノイズおよびニューロン死滅の増加が認められず、さらに1年を超える長期ニューロン計測に成功したため、急性損傷および慢性損傷の両方を最小化できたと考えられる。

一般的に、マイクロニードル電極の高インピーダンス特性は、計測ノイズを増加させ、SNR を低下させる³⁷。さらに自由行動マウスの計測では、EMG などの行動に起因するノイズ成分が含まれる³⁸。本研究では、記録電極である Si マイクロニードル電極の近傍にリファレンス電極を配置することで、マウスの行動に起因するノイズを低減した (Figure 4.19)。自由行動下マウスの V1 領域から近傍

のリファレンスで記録した場合、視覚刺激に応答する spike 信号を検出することができ (Figure 4.22), spike 帯域のノイズは離れた位置のリファレンスで記録した場合の約 1/5 に抑制された (Figure 4.25). 高周波ノイズが両リファレンス電極間で共通して現れるため、差動記録によってコモンモードノイズの除去が可能となった。また、鎮静剤投与マウスでの記録では、両リファレンス配置間のノイズ差は約 10%と小さかった (Figure 4.24). これらの結果は、記録領域近傍のリファレンスによる記録が、マウスの行動に起因するノイズの低減に有効であることを裏付けている。また、低周波帯域ノイズの主な要因として、マウスの行動によるケーブル振動などが考えられる (Figure 4.24, Figure 4.25)³⁸.

本研究では、剛性の高い Au ピンコネクタを記録領域近傍のリファレンスとして用いたため、長期的には組織損傷を引き起こす可能性がある。我々の以前の研究でも、Si 基板のような硬質材料は物理的ストレスにより慢性炎症や組織反応を誘発することを確認している²⁷。この課題の解決策として、Si マイクロニードル電極とリファレンス電極を同一のフレキシブル基板上に統合する手法が考えられる。

本デバイスの応用可能性として、ヘルスケアおよび神経科学領域への展開が挙げられる。たとえば、微小性の利点を活かした幼齢個体および老齢個体からの神経記録は、発達障害やアルツハイマー病などの解明に貢献する可能性がある。また、自由行動下での記録技術は、自然睡眠状態における神経活動研究にも有用である。本研究ではマウスを用いて電極デバイスの有効性を確認したが、本技術は、長期記録がより求められる霊長類を含む他の動物種への応用にも期待できる。

4.8 結言

本章では、フレキシブル基板を有した直径 5 μm のマイクロニードル電極デバイスを用いた電気生理学的記録技術を提案した。本電極は、Si の VLS 成長およびその後の微細加工プロセスにより作製し、柔軟な Parylene 基板上に形成した。本デバイスをマウスに埋め込み、1 年以上にわたる神経活動の記録を実証したことで、脳内の生理状態を長期的かつ定量的に観察可能な有望な技術であることを示した。慢性的な神経記録および免疫組織化学的評価により、Si マイクロニードル電極は、電極刺入時の急性損傷の低減や、マイクロモーションなどの機械的ミスマッチによって生じる慢性損傷の抑制、といった利点を有することが明らかとなった。今後の課題としては、Si マイクロニードル電極デバイスにおけるニードル部分の剛性であり、第 5 章ではこの解決を試みる。

参考文献

1. Kozai, T. D. Y., Jaquins-Gerstl, A. S., Vazquez, A. L., Michael, A. C. & Cui, X. T. Brain tissue responses to neural implants impact signal sensitivity and intervention strategies. *ACS Chem. Neurosci.* **6**, 48–67 (2015).
2. Hong, G. & Lieber, C. M. Novel electrode technologies for neural recordings. *Nat. Rev. Neurosci.* **20**, 330–345 (2019).
3. Szarowski, D. H. *et al.* Brain responses to micro-machined silicon devices. *Brain Res.* **983**, 23–35 (2003).
4. Seymour, J. P. & Kipke, D. R. Neural probe design for reduced tissue encapsulation in CNS. *Biomaterials* **28**, 3594–3607 (2007).
5. Lind, G., Linsmeier, C. E. & Schouenborg, J. The density difference between tissue and neural probes is a key factor for glial scarring. *Sci. Rep.* **3**, 2942 (2013).
6. Sharafkhani, N. *et al.* Neural tissue-microelectrode interaction: Brain micromotion, electrical impedance, and flexible microelectrode insertion. *J. Neurosci. Methods* **365**, 109388 (2022).
7. Rousche, P. J. & Normann, R. A. Chronic recording capability of the Utah Intracortical Electrode Array in cat sensory cortex. *J. Neurosci. Methods* **82**, 1–15 (1998).
8. Wise, K. D., Anderson, D. J., Hetke, J. F., Kipke, D. R. & Najafi, K. Wireless implantable microsystems: high-density electronic interfaces to the nervous system. *Proc. IEEE* **92**, 76–97 (2004).
9. Jun, J. J. *et al.* Fully integrated silicon probes for high-density recording of neural activity. *Nature* **551**, 232–236 (2017).
10. Steinmetz, N. A. *et al.* Neuropixels 2.0: A miniaturized high-density probe for stable, long-term brain recordings. *Science* **372**, eabf4588 (2021).
11. Kozai, T. D. Y. *et al.* Ultrasmall implantable composite microelectrodes with bioactive surfaces for chronic neural interfaces. *Nat. Mater.* **11**, 1065–1073 (2012).
12. Luan, L. *et al.* Ultraflexible nanoelectronic probes form reliable, glial scar-free neural integration. *Sci. Adv.* **3**, e1601966 (2017).
13. Zhao, Z. *et al.* Ultraflexible electrode arrays for months-long high-density electrophysiological mapping of thousands of neurons in rodents. *Nat. Biomed. Eng.* **7**, 520–532 (2023).
14. Zhao, S. *et al.* Tracking neural activity from the same cells during the entire adult life of mice. *Nat. Neurosci.* **26**, 696–710 (2023).

15. Hong, G., Viveros, R. D., Zwang, T. J., Yang, X. & Lieber, C. M. Tissue-like neural probes for understanding and modulating the brain. *Biochemistry* **57**, 3995–4004 (2018).
16. Yasar, T. B. *et al.* Months-long tracking of neuronal ensembles spanning multiple brain areas with Ultra-Flexible Tentacle Electrodes. *Nat. Commun.* **15**, 4822 (2024).
17. Fu, T.-M., Hong, G., Viveros, R. D., Zhou, T. & Lieber, C. M. Highly scalable multichannel mesh electronics for stable chronic brain electrophysiology. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **114**, E10046–E10055 (2017).
18. Kaszás, A. *et al.* Capturing the Electrical Activity of all Cortical Neurons: Are Solutions Within Reach? *Adv. Sci.* **12**, e06225 (2025).
19. Sawahata, H. *et al.* Single 5 μm diameter needle electrode block modules for unit recordings in vivo. *Sci. Rep.* **6**, 1–12 (2016).
20. Fujishiro, A., Kaneko, H., Kawashima, T., Ishida, M. & Kawano, T. In vivo neuronal action potential recordings via three-dimensional microscale needle-electrode arrays. *Sci. Rep.* **4**, 1–9 (2014).
21. Ikedo, A., Kawashima, T., Kawano, T. & Ishida, M. Vertically aligned silicon microwire arrays of various lengths by repeated selective vapor-liquid-solid growth of n-type silicon/n-type silicon. *Appl. Phys. Lett.* **95**, (2009).
22. Kawano, T. *et al.* Fabrication and properties of ultrasmall Si wire arrays with circuits by vapor–liquid–solid growth. *Sens. Actuators A Phys.* **97**, 709–715 (2002).
23. Kawano, T. *et al.* Selective vapor-liquid-solid epitaxial growth of micro-Si probe electrode arrays with on-chip MOSFETs on Si (111) substrates. *IEEE Trans. Electron Devices* **51**, 415–420 (2004).
24. Kawano, T. *et al.* Electrical interfacing between neurons and electronics via vertically integrated sub-4 μm -diameter silicon probe arrays fabricated by vapor–liquid–solid growth. *Biosens. Bioelectron.* **25**, 1809–1815 (2010).
25. Sanda, R. *et al.* Low-invasive neural recording in mouse models with diabetes via an ultrasmall needle-electrode. *Biosens. Bioelectron.* **240**, 115605 (2023).
26. Kita, Y. *et al.* Three-micrometer-diameter needle electrode with an amplifier for extracellular in vivo recordings. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **118**, e2008233118 (2021).
27. Yamashita, K. *et al.* A floating 5 μm -diameter needle electrode on the tissue for damage-reduced chronic neuronal recording in mice. *Lab Chip* **22**, 747–756 (2022).
28. Schander, A. *et al.* Design and fabrication of novel multi-channel floating

- neural probes for intracortical chronic recording. *Sens. Actuators A Phys.* **247**, 125–135 (2016).
29. Sasaki, H. *et al.* A Flexible-Substrate 5- μ m-Diameter Needle Electrode: Minimizing Neuronal Death and Enabling Year-Long Neural Recording. *Adv. Mater. Interfaces* **12**, 2400974 (2025).
 30. Oka, H., Shimono, K., Ogawa, R., Sugihara, H. & Taketani, M. A new planar multielectrode array for extracellular recording: application to hippocampal acute slice. *J. Neurosci. Methods* **93**, 61–67 (1999).
 31. Yamashita, K. *et al.* Flexible parylene-thread bioprobe and the sewing method for in vivo neuronal recordings. *Sens. Actuators B Chem.* **316**, 127835 (2020).
 32. Funayama, K., Hagura, N., Ban, H. & Ikegaya, Y. Functional organization of flash-induced V1 offline reactivation. *J. Neurosci.* **36**, 11727–11738 (2016).
 33. Rivnay, J., Wang, H., Fenno, L., Deisseroth, K. & Malliaras, G. G. Next-generation probes, particles, and proteins for neural interfacing. *Sci. Adv.* **3**, e1601649 (2017).
 34. Steinman, J., Koletar, M. M., Stefanovic, B. & Sled, J. G. 3D morphological analysis of the mouse cerebral vasculature: Comparison of in vivo and ex vivo methods. *PLoS One* **12**, e0186676 (2017).
 35. Ersen, A., Elkabes, S., Freedman, D. S. & Sahin, M. Chronic tissue response to untethered microelectrode implants in the rat brain and spinal cord. *J. Neural Eng.* **12**, 016019 (2015).
 36. Biran, R., Martin, D. C. & Tresco, P. A. The brain tissue response to implanted silicon microelectrode arrays is increased when the device is tethered to the skull. *J. Biomed. Mater. Res. A* **82**, 169–178 (2007).
 37. Fan, B., Wolfrum, B. & Robinson, J. T. Impedance scaling for gold and platinum microelectrodes. *J. Neural Eng.* **18**, 056025 (2021).
 38. Idogawa, S. *et al.* A lightweight, wireless Bluetooth-low-energy neuronal recording system for mice. *Sens. Actuators B Chem.* **331**, 129423 (2021).
 39. Idogawa, S. *et al.* Coaxial microneedle-electrode for multichannel and local-differential recordings of neuronal activity. *Sens. Actuators B Chem.* **320**, 128442 (2020).
 40. Chung, J. E. *et al.* High-density, long-lasting, and multi-region electrophysiological recordings using polymer electrode arrays. *Neuron* **101**, 21–31 (2019).
 41. Lee, S. H. *et al.* Scalable thousand channel penetrating microneedle arrays on flex for multimodal and large area coverage brain-machine interfaces. *Adv. Funct. Mater.* **32**, 2112045 (2022).

42. Mols, K., Musa, S., Nuttin, B., Lagae, L. & Bonin, V. In vivo characterization of the electrophysiological and astrocytic responses to a silicon neuroprobe implanted in the mouse neocortex. *Sci. Rep.* **7**, 15642 (2017).
43. Kozai, T. D. Y. *et al.* Effects of caspase-1 knockout on chronic neural recording quality and longevity: insight into cellular and molecular mechanisms of the reactive tissue response. *Biomaterials* **35**, 9620–9634 (2014).
44. Williams, J. C., Hippensteel, J. A., Dilgen, J., Shain, W. & Kipke, D. R. Complex impedance spectroscopy for monitoring tissue responses to inserted neural implants. *J. Neural Eng.* **4**, 410 (2007).
45. Kim, Y.-T., Hitchcock, R. W., Bridge, M. J. & Tresco, P. A. Chronic response of adult rat brain tissue to implants anchored to the skull. *Biomaterials* **25**, 2229–2237 (2004).
46. Subbaroyan, J., Martin, D. C. & Kipke, D. R. A finite-element model of the mechanical effects of implantable microelectrodes in the cerebral cortex. *J. Neural Eng.* **2**, 103 (2005).
47. Yuk, H., Lu, B. & Zhao, X. Hydrogel bioelectronics. *Chem. Soc. Rev.* **48**, 1642–1667 (2019).

第5章

Parylene マイクロニードル 電極デバイス

5.1 緒言

刺入型神経電極は、神経科学研究、臨床応用、およびBMI、BCIの開発において、神経活動を高い時空間分解能で記録可能な強力なツールとして機能している¹⁻³。しかし、電極埋め込みによって引き起こされるニューロン死滅、異物反応、および神経ネットワークの破壊などの組織損傷により、ニューロン活動の安定した慢性記録はいまだ困難である³⁻⁵。これらの課題に対処するため、低ヤング率材料で構成されたフレキシブル電極が有力なアプローチとして注目されている⁶。ポリイミドやParyleneなどのポリマー材料を用いた皮質内電極⁷⁻¹²は、埋め込み後数週間から安定した記録を可能にし、1年以上の単一ユニット記録も報告されている¹³。一方で、低剛性ゆえに組織表面で座屈しやすく、組織への貫通刺入が困難であるという課題がある¹⁴。この制約に対して、シャトルデバイスの使用¹¹、一時的な硬化コーティングの適用^{7,8,10,12,13}、およびシリンジインジェクション^{9,15-17}といった戦略が提案されているが、いずれの手法も挿入体積を増大させ、急性損傷を助長させるという欠点を有している^{3,18}。したがって、真に低侵襲なフレキシブル電極技術の確立が強く求められている⁶。この課題を克服するためには、電極の微細化、機械的柔軟性、および外部支持を必要としない自立刺入機構の実現が不可欠である。

本研究室ではこれまでに、VLS結晶成長技術を用いて作製した、直径5 μm のSiマイクロニードル電極を提案しており¹⁹⁻²⁴、従来の大型電極に比べて組織損傷が著しく低減されることを実証してきた^{20,25}。さらに第4章においては、Siマイクロニードル電極をフレキシブル基板上に統合することで、組織表面上で浮遊する構成を実現し、ニューロン死滅を最小限に抑えつつ1年以上の長期記録を達成した²⁶。しかしながら、ニードル部のSiが依然として高剛性であるため、慢性損傷の完全な抑制には至っていない。

本章では、Siマイクロニードル電極内部のSiを除去し、フレキシブルかつ自立刺入が可能な直径5 μm のParyleneマイクロニードル電極を作製することにより、さらなる慢性損傷の低減を目指す。まず、提案デバイスの作製プロセスを示し、機械的および電気的特性を評価する。次に、電極埋め込みによる組織損傷をニューロンの免疫組織化学的解析により評価する。さらに、マウスを用いた電気生理

学的計測を実施し，従来のタングステン電極およびSiマイクロニードル電極との比較により，慢性計測における優位性を明らかにする．

なお，本博士論文におけるすべての動物実験は，豊橋技術科学大学の動物実験倫理規定に則り，麻酔等の適切な処置を施し，マウスに苦痛を与えないよう配慮して実施した．

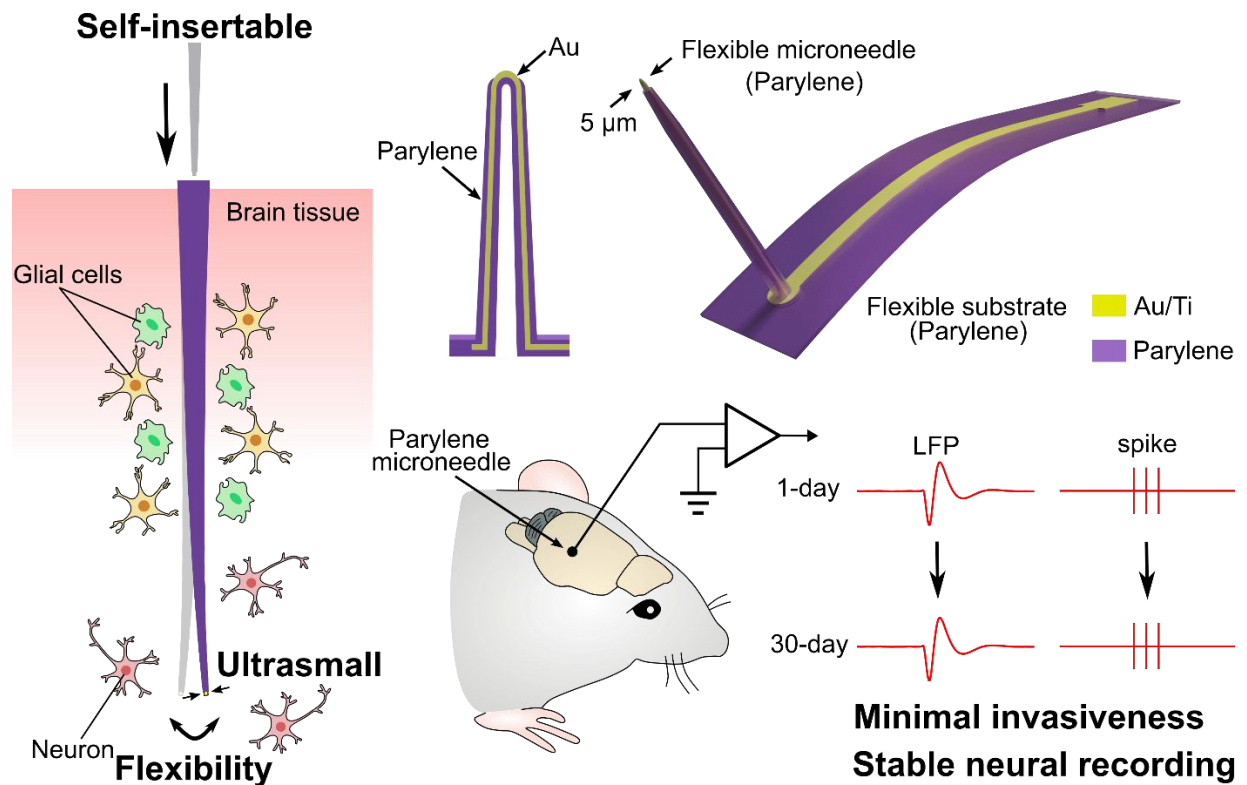


Figure 5.1 第5章における研究概念図
 Copyright 2025, The Authors by Elsevier,
 CC BY ライセンスに基づく転載²⁷

5.2 剛性シミュレーション

刺入型神経電極の脳内埋め込みにおける慢性的な組織損傷を最小限に抑えるためには、ニードル直径の縮小に加えて、機械的柔軟性が重要な要素となる。本章では、VLS結晶成長技術により形成したSiマイクロニードルにParylene層を成膜し、その後Siコアを除去するという簡易的な手法により、柔軟性を有するParyleneマイクロニードル電極デバイスを提案する (Figure 5.2)。本節では、デバイスの作製に先立ち、提案するParyleneマイクロニードルの機械的柔軟性を有限要素解析により評価した。

ニードルの機械的柔軟性は、有限要素解析法 (COMSOL Multiphysics, ver. 6.1, COMSOL社) を用いたシミュレーションにより解析した。Paryleneマイクロニードルは、先端直径3 μm 、基部直径30 μm 、高さ400 μm の円錐形状としてモデル化した。ニードル外壁には先端部に厚さ1 μm 、基部に厚さ6 μm のParylene層を付与した。比較のため、同一形状のSiマイクロニードルおよび従来型タングステンニードルについても、同様にParylene層を付与したモデルを作成した (Figure 5.3a)。シミュレーションに用いた材料特性は、タングステン (ヤング率: 360 GPa, ポアソン比: 0.28, 密度: 17800 kg/m³)、Si (188 GPa, 0.18, 2329 kg/m³)^{28,29}、およびParylene-C (2.76 GPa, 0.40, 1289 kg/m³) である。

ニードルの剛性は、ニードル基部を固定した状態で先端に横方向の力を加えることにより評価した。成体ラット脳において観察される1~3 μm の運動変位³⁰を考慮して、3 μm の横方向変位を与えた。円錐形状のため、フォンミーゼス (von Mises) 応力はすべてのニードルで先端部に集中した (Figure 5.3b)。応力はタングステンニードルで最大となり、次いでSiマイクロニードル、Paryleneマイクロニードルの順であった。Figure 5.3cに、3 μm 以下の変位における力-変位特性を示す。ニードルの剛性値は、タングステン、Si、Paryleneでそれぞれ44.3, 25.7, 2.86 N/mであり、Paryleneニードルが最も柔軟性を有することが確認された (Figure 5.3d)。これら剛性値は、ニードル先端に印加した外力とそれに対応する変位の比により算出した。

これらの結果より、Paryleneニードルの剛性低下は低ヤング率のParylene層とコアを有しない中空構造の双方に起因するものであり、Paryleneのみで構成されたマイクロニードル電極は脳組織との機械的ミスマッチを緩和し、埋め込み後の慢性損傷リスクを低減し得ることが示唆された。

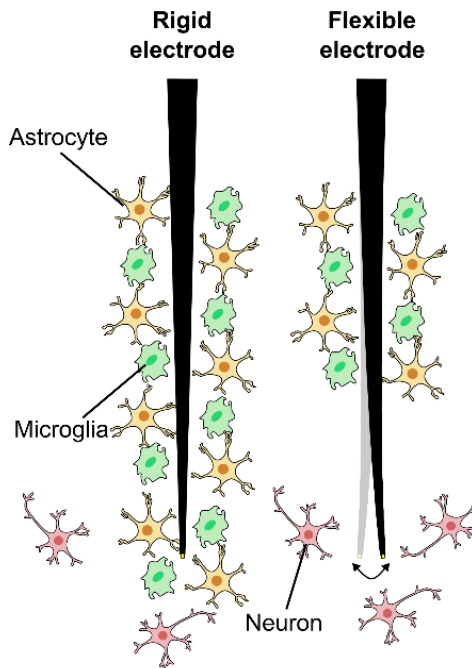


Figure 5.2 マイクロニードル電極の剛性による侵襲性の違い
 Copyright 2025, The Authors by Elsevier,
 CC BY ライセンスに基づく改変・転載²⁷

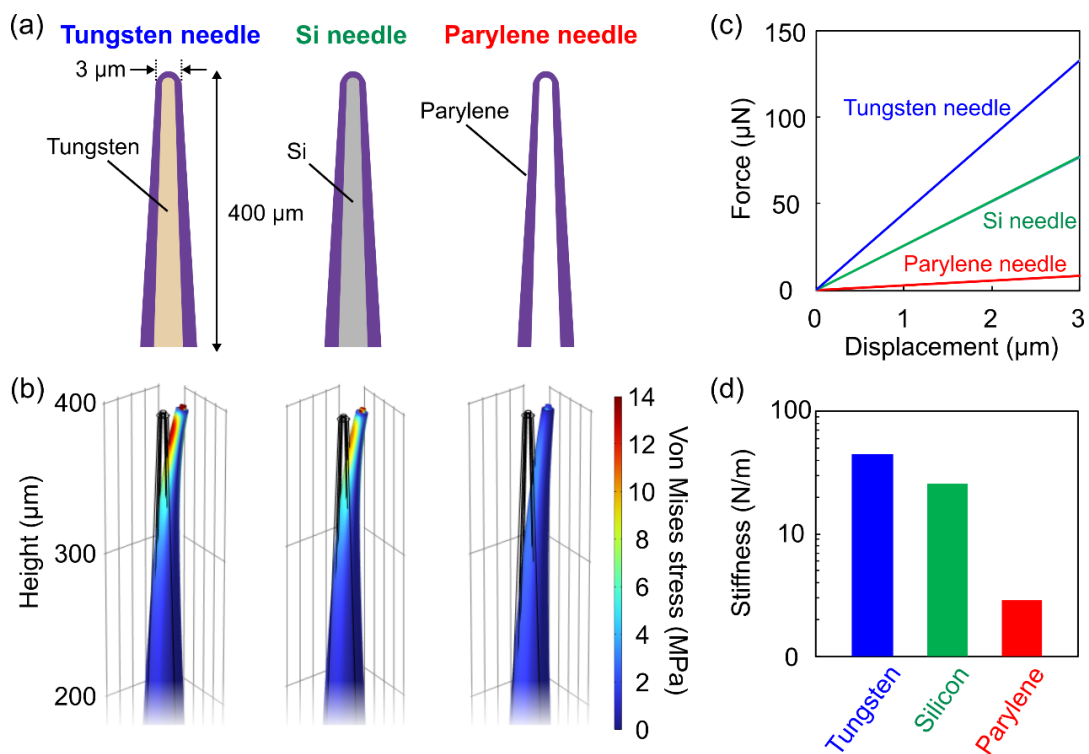


Figure 5.3 剛性シミュレーション
 Copyright 2025, The Authors by Elsevier,
 CC BY ライセンスに基づく改変・転載²⁷

5.3 デバイス作製

本節では、フレキシブルなParyleneのみで構成されたParyleneマイクロニードル電極デバイスの作製手法について記述する．本デバイスは第3章で述べたSiのVLS結晶成長技術によってSiマイクロニードルを形成し，MEMSプロセスによる電極化を行うことで作製した．Siマイクロニードル電極作製までの工程は，第4章4.2.1項に記述した手法と同様であり，その後，内部のSiを除去することで作製した（Figure 5.4）．

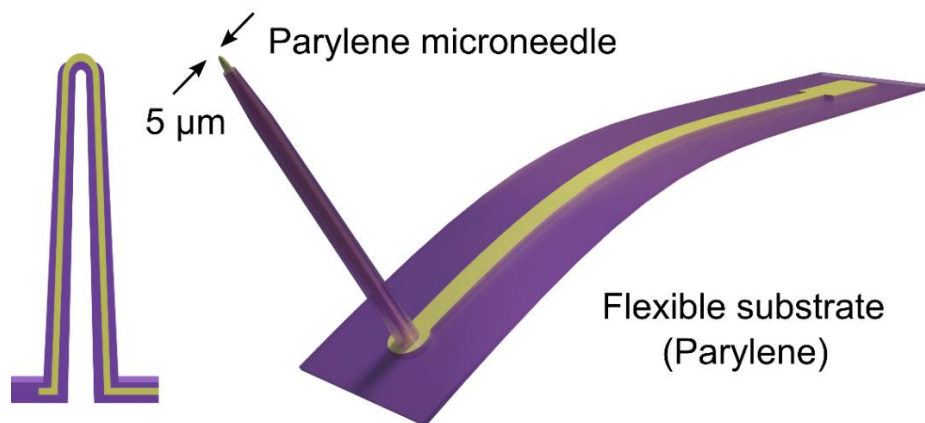


Figure 5.4 Parylene マイクロニードル電極デバイスの模式図

Copyright 2025, The Authors by Elsevier,
CC BY ライセンスに基づく改変・転載²⁷

Figure 5.5に，作製プロセスの模式図を示す．基板として厚さ525 μm の4インチSiウェハ[n-type, (111)方向，抵抗率 $<10 \Omega\cdot\text{m}$]を使用した．ウェハ表面には，厚さ約1 μm の SiO_2 酸化膜が形成されている．まず，バッファードフッ酸（BHF）により SiO_2 をエッチングし，Au蒸着およびリフトオフによりSi基板上に直径6 μm ，厚さ200 nmのAuドットをパターンニングした（Figure 5.5a）．Auを触媒としたSiのVLS結晶成長により，Siマイクロニードルを形成した（Figure 5.5b）．原料ガスとしてジシラン（ Si_2H_6 ）を用い， $1.5 \times 10^{-3} \text{ Pa}$ ，830 $^\circ\text{C}$ の条件下で3時間成長させた．

結晶成長後，Siマイクロニードルおよび基板を，それぞれ厚さ1 μm および5 μm のParylene-Cで，真空蒸着装置（PDS2010, Labcoater, 日本パリレン合同会社）によりコーティングした（Figure 5.5c）．次に，Tiを接着層として20 nm，Auを配線層として180 nmの厚さで，ニードルと基板全体にスパッタリングした．その後，リフトオフにより電氣的配線を形成した（Figure 5.5d）．さらに，デバイス全体を厚さ5 μm のParylene-Cで絶縁し（Figure 5.5e），酸素プラズマエッチングによりマイクロニードル先端のAuを露出させた（Figure 5.5f）．その後，エタノールによりSi

基板とParyleneの密着力を低下させ、ピンセットでSiマイクロニードルの根元を折り、ニードルごとParyleneフィルムを剥離した (Figure 5.5g). 最後に、ニードル裏面のSiが露出しているため、ニフッ化キセノンガス (XeF_2 : xenon difluoride) を用いてニードル内部のSiをエッチングした (Figure 5.5h).

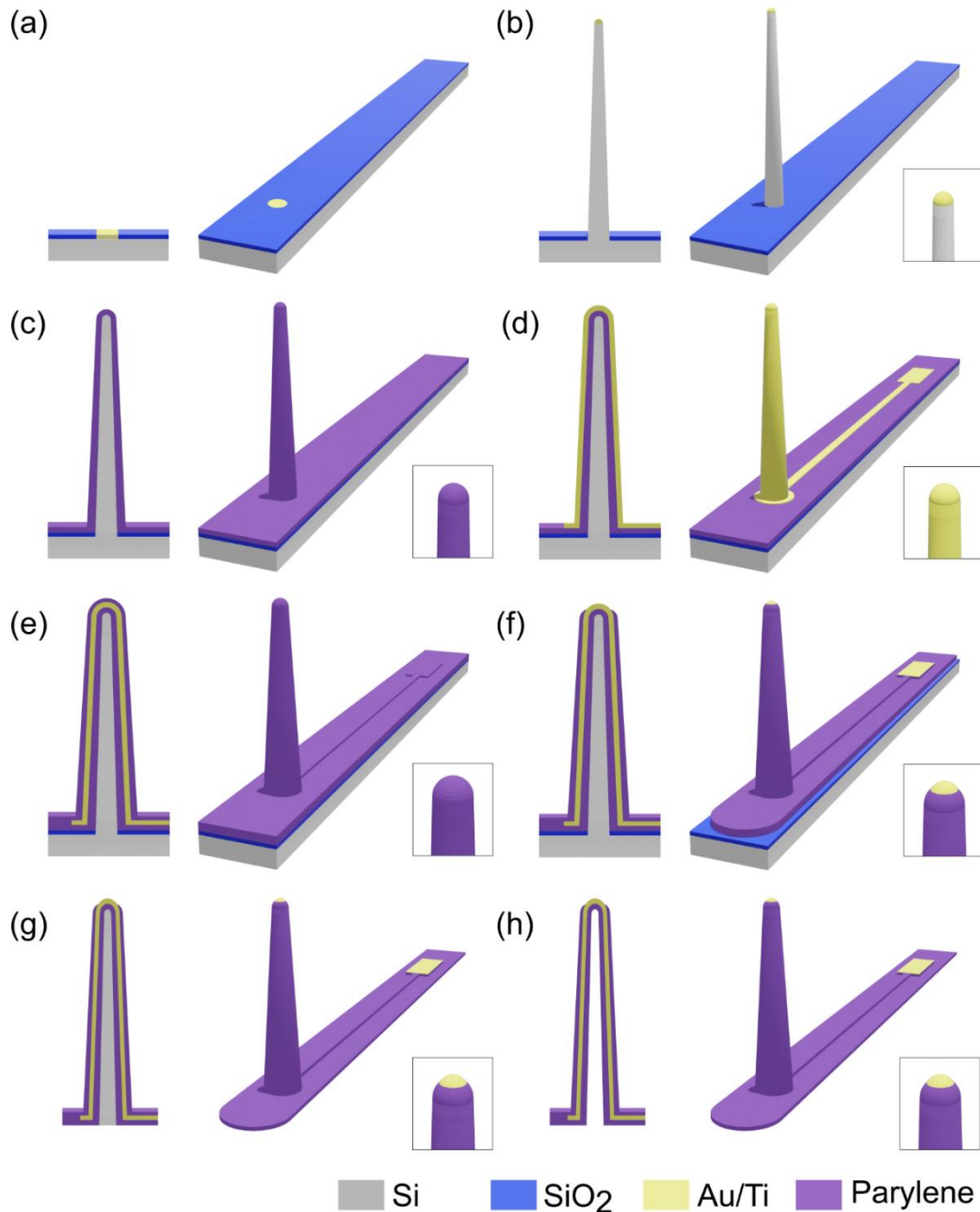


Figure 5.5 Parylene マイクロニードル電極の作製プロセス

Copyright 2025, The Authors by Elsevier,
 CC BY ライセンスに基づく改変・転載²⁷

Figure 5.6a に作製したデバイスの写真を示す。柔軟性を有する厚さ $10\ \mu\text{m}$ の Parylene 基板の上に、Parylene マイクロニードルが垂直に形成されていることが分かる。Parylene マイクロニードルの長さは $400\ \mu\text{m}$ であり、先端直径は $5\ \mu\text{m}$ 、基部直径は $40\ \mu\text{m}$ であった。Figure 5.6b にニードルを写した SEM 画像を示す。また、集束イオンビーム (FIB: focused ion beam) を用いてニードル先端から $5\ \mu\text{m}$ の位置を切断し、断面を観察した結果、内部の Si が完全に除去され、中空構造が形成されていることが確認された (Figure 5.7)。

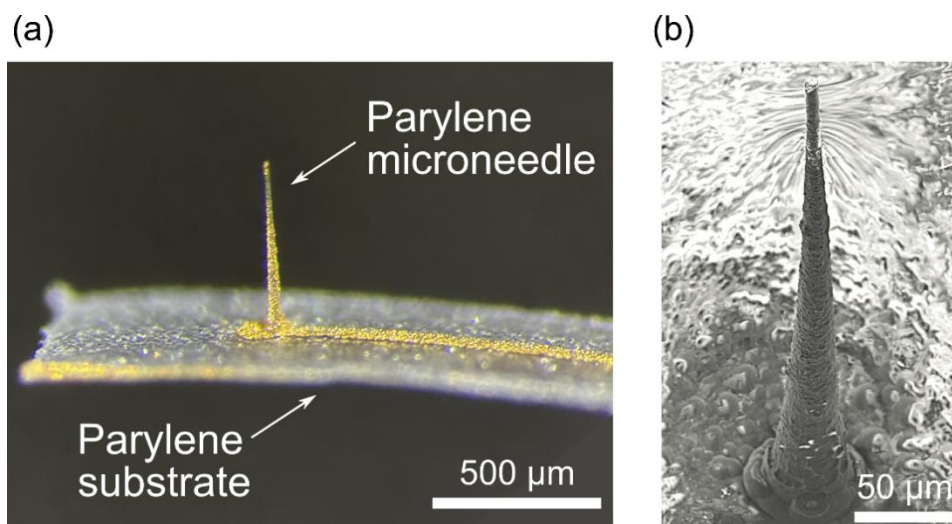


Figure 5.6 Parylene マイクロニードル電極デバイス

Copyright 2025, The Authors by Elsevier,
CC BY ライセンスに基づく改変・転載²⁷

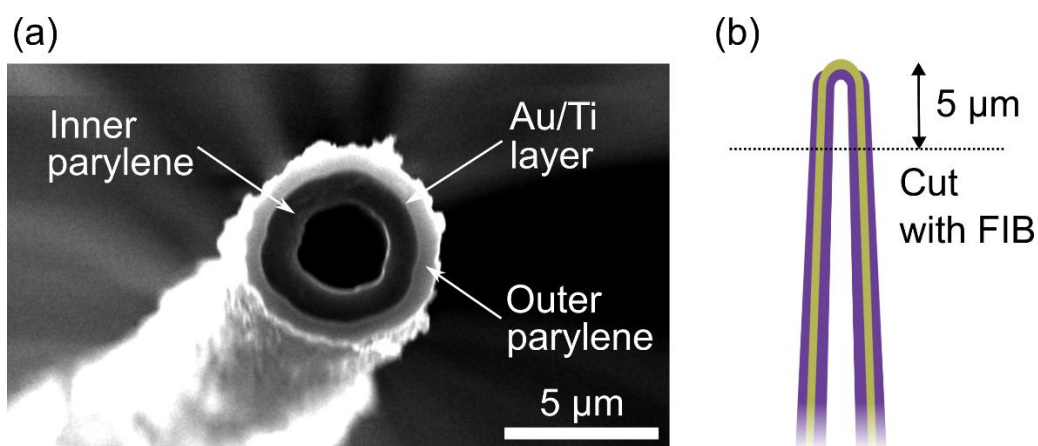


Figure 5.7 Parylene マイクロニードルの水平断面図

Copyright 2025, The Authors by Elsevier,
CC BY ライセンスに基づく改変・転載²⁷

5.4 デバイス特性

本節では、5.3節で作製したParyleneマイクロニードル電極の各種特性について記述する。まず、デバイスの電気的特性としてインピーダンス特性を評価し、その後、機械的特性としてマウス脳を用いたデバイスの刺入能力を検証する。

5.4.1 電気的特性（インピーダンス特性）

本項では、電気化学インピーダンスの測定結果と、神経計測に適したインピーダンスへの改善方法について記述する。インピーダンス測定は第4章4.3.1項と同様の手法を採用した（Figure 4.5a）。生理食塩水中におけるマイクロニードル電極（Au-tip）のインピーダンスは、 $346 \pm 435 \text{ k}\Omega \sim 7.32 \pm 4.47 \text{ M}\Omega$ の範囲を示した。spike信号の帯域である1 kHzにおいては、 $0.916 \pm 1.09 \text{ M}\Omega$ であった（mean \pm SD, Figure 5.8a “Au-tip”）。

また、デバイスの低インピーダンス化として、第4章4.3.1項と同様の手法でPt blackめっきを施した。マイクロニードル電極（Pt black-tip）のインピーダンスは、同一周波数範囲（1 Hz～10 kHz）で、 $61.4 \pm 80.2 \text{ k}\Omega \sim 3.33 \pm 1.32 \text{ M}\Omega$ の範囲を示し、1 kHzにおいて $185 \pm 145 \text{ k}\Omega$ に減少した（mean \pm SD, Figure 5.8a “Pt black-tip”）。また、インピーダンス位相特性を Figure 5.8b に示す。位相特性はPt blackのめっきを行った後に抵抗性から容量性へのシフトを示した。各インピーダンス特性は、10個のサンプルから取得した平均値と標準偏差で評価した。

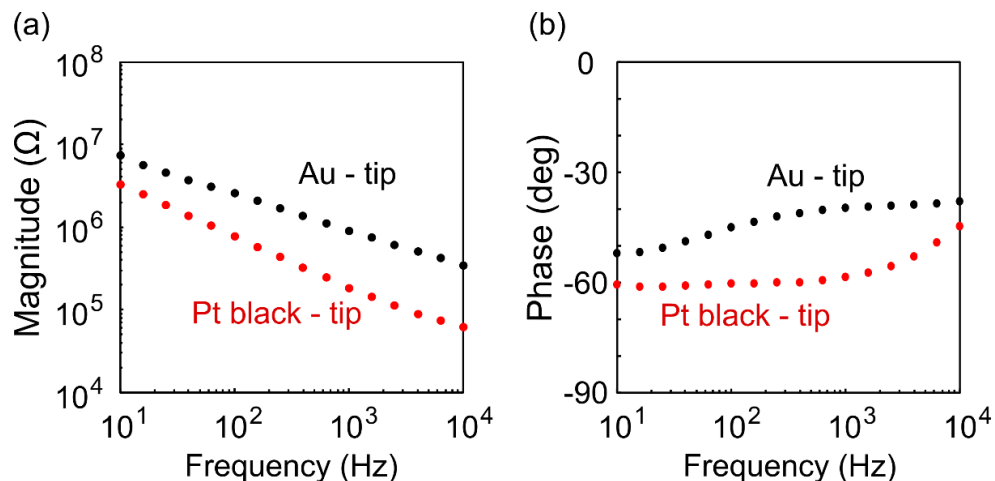


Figure 5.8 Parylene マイクロニードル電極のインピーダンス特性

Copyright 2025, The Authors by Elsevier,
CC BY ライセンスに基づく改変・転載²⁷

5.4.2 機械的特性（刺入試験）

本項では、5.3節で作製したフレキシブルなParyleneマイクロニードル電極が、マウス脳への刺入に耐えうる機械的強度を有しているかを確認するため、マウス脳を用いた刺入試験を行った。

マウス（wild-type C57BL/6, オス, 体重20~30 g, 日本エスエルシー株式会社）に対して、まず鎮静剤として生理食塩水を希釈剤とした0.5%濃度のクロロプロチキセン溶液をマウス腹腔に投与した（体重10 g当たり0.1 ml）。続いて、同様に生理食塩水で希釈した10%濃度のウレタン溶液を投与し、（体重10 g 当たり0.05 ml）全身麻酔を施した。麻酔が十分に浸透するまでの間にマウス頭部を剃毛した。麻酔投与から約10分後、ピンセットを用いてマウス尾部、頭部皮膚を軽く圧迫することで全身に麻酔が浸透したことを確認した。

麻酔浸透を確認した後、粘滑表面麻酔剤であるリドカイン塩酸塩（キシロカインゼリー2%, サンドファーマ株式会社）を頭部皮膚および外耳道に塗布し、局所麻酔を施した。その後、イヤバーおよびノーズバーを用いて脳定位固定装置（SR-50, 株式会社ナリシゲ）にマウス頭部を3点固定した。次に、頭部の剃毛を行い、剪刀を用いてマウス頭部皮膚を正中線に沿って切除した。また、鋭匙を用いて骨膜および筋肉を除去した。その後、ドリルとピンセットを用いて、右脳頭蓋に3×2 mm²の開頭を行った（AP=-1.5 mm, ML=-3.0 mm）。この際、硬膜の除去は行わなかった。開頭後、マイクロマニピュレータ（MO-10, 株式会社ナリシゲ）を用いてParyleneマイクロニードル電極の刺入を行った（Figure 5.9a）。

結果として、作製したParyleneマイクロニードル電極は、硬膜を除去することなく大脳皮質への刺入に成功した。従来のフレキシブル電極では、シャトルデバイスや一時的な硬化コーティングなどの機械的補助を必要としたが^{8,10-12}、本デバイスはそれらを用いることなく自立的な刺入が可能であることを示した。刺入後の観察においても、ニードルの変形や座屈は確認されず、硬膜および脳組織への刺入に耐えうる十分な機械的強度を有していることが確認された（Figure 5.9b, c）。

以上の結果より、Paryleneマイクロニードル電極は柔軟性を保持しつつ、マウス脳への刺入に必要な剛性を有することが明らかとなった。

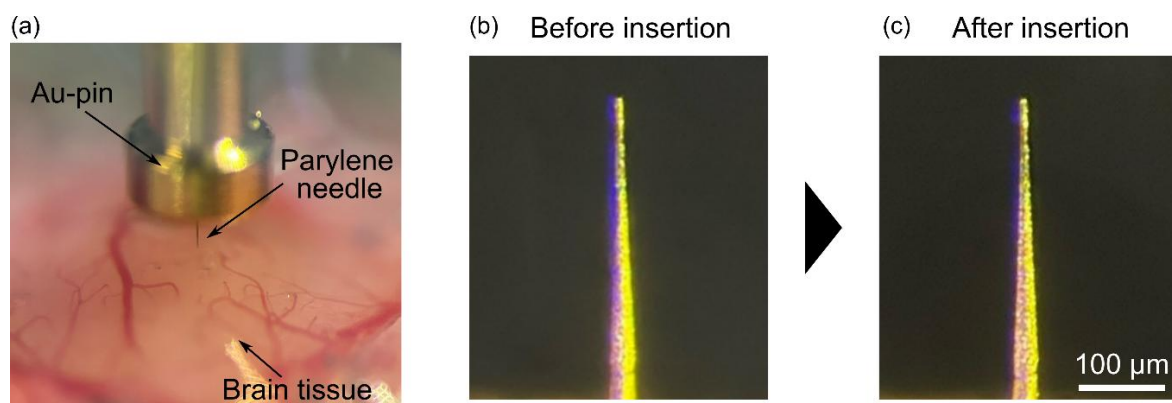


Figure 5.9 Parylene マイクロニードル電極の刺入試験

Copyright 2025, The Authors by Elsevier,
CC BY ライセンスに基づく改変・転載²⁷

5.5 組織損傷評価

本節では、5.3節で作製したParyleneマイクロニードル電極デバイスの低侵襲性を明らかにするために、免疫組織化学による組織損傷評価について記述する。本実験では、電極埋め込みマウスのニューロンを免疫染色により可視化し、電極周囲のニューロン密度を定量的に評価した。5.3節で作製したParyleneマイクロニードル電極、第4章4.2節で作製したSiマイクロニードル電極、および同等サイズのタングステン電極の3種類を用意し、これらの結果を比較することで提案デバイスの侵襲性を評価した。

5.5.1 実験手法

本項では、免疫組織化学による組織損傷評価の実験手法について述べる。デバイス準備のために、Parylene マイクロニードル電極デバイスおよび Si マイクロニードル電極デバイスを、ポリエチレングリコール (PEG) を一時的な接着剤として用い、ピン型コネクタ (Au, 直径 1 mm) 上に実装した。一方、タングステンニードル電極 (TM31A10, World Precision Instruments 社) は、紫外線硬化型アクリルエステル樹脂を用いてピン型コネクタ (Au, 直径 2 mm) の側面に固定した。タングステンニードルの先端直径は約 1 μm , 先端から 400 μm の位置では直径 30 μm であった。ニードル側面は厚さ 1 μm の Parylene で絶縁されている。また、顕微鏡観察時、埋め込み位置を特定するために、ピン型電極に実装した Parylene マイクロニードル, Si マイクロニードル, およびタングステンニードルの表面に、蛍光色素 DiO (3,3'-dioctadecyloxacarbocyanine perchlorate) を塗布した。

電極埋め込みに際しては、まずマウス (wild-type C57BL/6, オス, 体重 20~30 g, 日本エスエルシー株式会社) にイソフルランガス (3%) による全身麻酔を施した。本薬品による全身麻酔を行うことで手術後の覚醒を可能としている。麻酔下で、イヤーパーおよびノーズーパーを用いて脳定位固定装置 (SR-50, 株式会社ナリシゲ) にマウス頭部を 3 点固定した後、頭部の剃毛を行い、剪刀を用いてマウス頭部皮膚を正中線に沿って切除した。また、鋭匙を用いて骨膜および筋肉を除去した。その後、ドリルとピンセットを用いて、一次視覚野 (V1) に 1.5 \times 1.5 mm² の開頭を行った (AP = -4.0 mm, ML = -2.5 mm)。1 匹のマウスに対して、右半球 (V1) には Parylene マイクロニードルを (Figure 5.10c), 対側半球には Si マイクロニードルを、それぞれ脳表に対して垂直に埋め込んだ (Figure 5.10b)。電極の刺入および位置決めにはマイクロマニピュレータ (MO-10, 株式会社ナリシゲ) を用いた。刺入後は、デバイスおよびピン型コネクタに生理食塩水を滴下して PEG を溶解し、皮質表面に電極デバイスのみを残した³¹。また別のマウスに対しては、右半球 (V1) にタングステンニードルを脳表に対して垂

直に、深さ約 400 μm （大脳皮質IV層）の位置に埋め込み（Figure 5.10a），また一方で対側半球の頭蓋骨を除去した（Sham, Figure 5.10d）. デバイス設置後，脳表を保護するため，生理食塩水を含んだゼラチンスポンジ（スポンゼル，LTLファーマ株式会社）で脳表全体を覆った．その後，露出箇所の保護とデバイスの固定のため，デンタルセメント（UNIFAST III，株式会社ジーシー）を用いて頭部全体を覆い固めた．なお，Parylene マイクロニードル電極デバイスおよび Si マイクロニードル電極デバイスの基板パッド部分は，デンタルセメントに固定されているが，脳表上の基板部は脳の拍動に追従可能な構成（フローティング電極）となっている（Figure 5.10）.

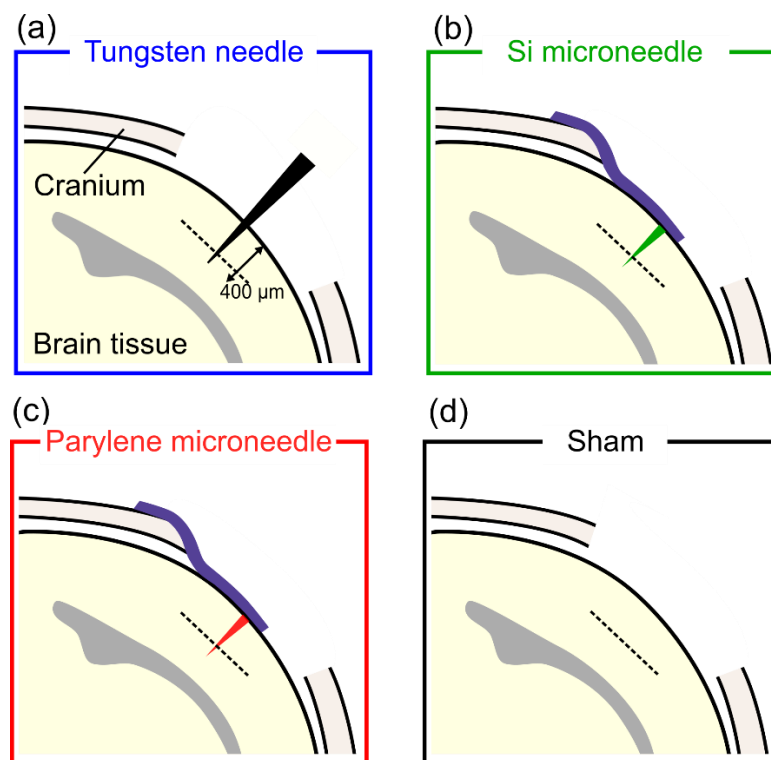


Figure 5.10 電極埋め込み方法

Copyright 2025, The Authors by Elsevier,
CC BY ライセンスに基づく改変・転載²⁷

埋め込み 30 日後，マウスの腹腔内に 10%ウレタン溶液を体重 10 g あたり 200 μl 投与し，麻酔を施した．その後，0.1 M リン酸緩衝液（PB：phosphate buffered solution）50 ml で灌流し，続いて 4%パラホルムアルデヒド（PFA：paraformaldehyde）30 ml で灌流固定を行い，脳を摘出した．脳は PFA 溶液中で 24 時間保存したのち，ビブラトームスライサー（LinearSlicer PRO7，堂阪イーエム株式会社）を用いて皮質表面に対して接線方向に切片化した．切片化は，皮質表面から 200 μm 下方の位置から開始し，連続する 4 枚の 60 μm 厚スライスを作

製した。これらのスライスには、リン酸緩衝生理食塩水（PBS：phosphate buffered saline）を満たしたウェルプレート内に保存した。

得られた脳スライスは、まず 0.4% Triton X-100 で透過処理を行い、続いて 1% 胎仔ウシ血清（FBS：fetal bovine serum）でブロッキングを行った。各工程は振盪機上で 2 時間処理し、各工程後に PBS による洗浄を 10 分×3 回行った。その後、脳スライスをスライドガラス上に移し、PBS を滴下した。スライスの周囲をブロッキングペンで囲うことで、PBS の漏出を防いだ。染色工程では、スライス上の PBS と抗体溶液を置換することで行った。

一次免疫染色では、ニューロン核（NeuN）に対するラットモノクローナル抗体 [Anti-NeuN antibody（EPR12763）；ab279297, Abcam 社] を 500 倍に希釈し、4°C の冷蔵環境下で 12 時間反応させた。続いて、二次抗体染色として、ラット IgG（immunoglobulin G）に対するロバポリクローナル抗体 [Anti-Rat IgG（Alexa Fluor 647）；ab150151, Abcam 社] を 500 倍希釈で、3 時間反応させた。また同時に細胞核染色として、DNA（deoxyribonucleic acid）に結合する 4',6-diamidino-2-phenylindole（DAPI；富士フイルム和光純薬株式会社）を 50000 倍希釈で用いた。染色後、脳スライスに封入材（ProLong Diamond Antifade Mountant, Thermo Fisher Scientific 社）を滴下し、カバーガラスで覆った。また市販の透明樹脂系接着剤で、カバーガラスの周囲を固定することで、プレパラートを作製した。

染色画像の取得には、共焦点蛍光顕微鏡（Nikon A1Rsi-TY1, 株式会社ニコンソリューションズ）と NIS-Elements ソフトウェア（version 4.50）を用いた。共焦点顕微鏡画像の撮影に際して、埋め込み前に電極表面に塗布した DiO 蛍光を指標として、電極の埋め込み位置を同定した。

ニューロン密度を定量的に評価するため、撮影した共焦点顕微鏡画像に対して ImageJ（NIH：National Institutes of Health）で画像解析を行った。画像解析では、「二値化（Binarization）」および「背景解析（Background）」（閾値：20～255, 8 bit 画像）処理を施した。さらに、距離に対するニューロン密度を定量評価するために、ニードル位置を中心として半径方向に 10 μm 間隔の同心円を描き、各領域におけるニューロン密度（強度）を算出した。得られた値を、電極埋め込みの影響が及ばない 150～200 μm の範囲の密度で正規化を行った。解析に使用したサンプルは、タングステンニードルで 12 スライス（マウス 4 匹）、Si マイクロニードルで 12 スライス（マウス 4 匹）、Parylene マイクロニードルで 11 スライス（マウス 3 匹）、および sham で 19 スライス（マウス 6 匹）から取得した。統計解析には、Microsoft Excel 365（Microsoft 社）の T.TEST 関数を用い、等分散を仮定しない 2 標本 t 検定（Welch の t 検定）を実施した。

5.5.2 ニューロンの蛍光観察および定量評価

本項では、5.5.1 節で取得した蛍光顕微鏡画像および、それをもとにしたニューロン密度の定量的評価の結果を示す。

Figure 5.11a, b, c は、タングステンニードル、Si マイクロニードル、および Parylene マイクロニードルを 1 ヶ月間埋め込んだ際の、マウス脳の NeuN（ニューロン核）および DAPI（細胞核）の共焦点顕微鏡画像を示す。また、開頭のみを行った組織（sham）の画像を Figure 5.11d に示す。Figure 5.11a より、タングステンニードル周囲では顕著なニューロン死滅が確認された。

Figure 5.12a に、各電極表面から 10 μm ごとのニューロン密度を定量評価した結果を示す。電極表面から 40 μm 以上離れた領域では、タングステンニードル、Si マイクロニードル、Parylene マイクロニードル電極の間に有意な差は認められなかった。しかし、電極表面から 40 μm 未満の領域では統計的な差が観察された。特に、電極表面から 10 μm 以内では、Parylene マイクロニードルが 3 種類の電極の中で最も高いニューロン密度（84.8%）を示し、Si マイクロニードルは中程度の減少（60.9%）を示し、タングステン電極は最も低い密度（33.3%）を示した。注目すべきことに、Parylene マイクロニードル周囲のニューロン密度は、電極を埋め込まない組織（sham）と有意差がなかった。これらの結果は、マイクロニードルの柔軟性がニューロンの死滅のリスクを低下させ、電極を埋め込まない組織（sham）と同等のニューロン密度を維持できることを示唆している。

さらに、DAPI で染色した細胞核の解析では、タングステン電極周囲で顕著に高い細胞密度（167%）が観察され、統計的に有意な増加が示された（Figure 5.12b）。この結果は、タングステンニードルの場合では、周囲の組織でグリオシスが発生する一方で、Parylene マイクロニードルは非神経細胞の集積を最小限に抑えることを示唆している。

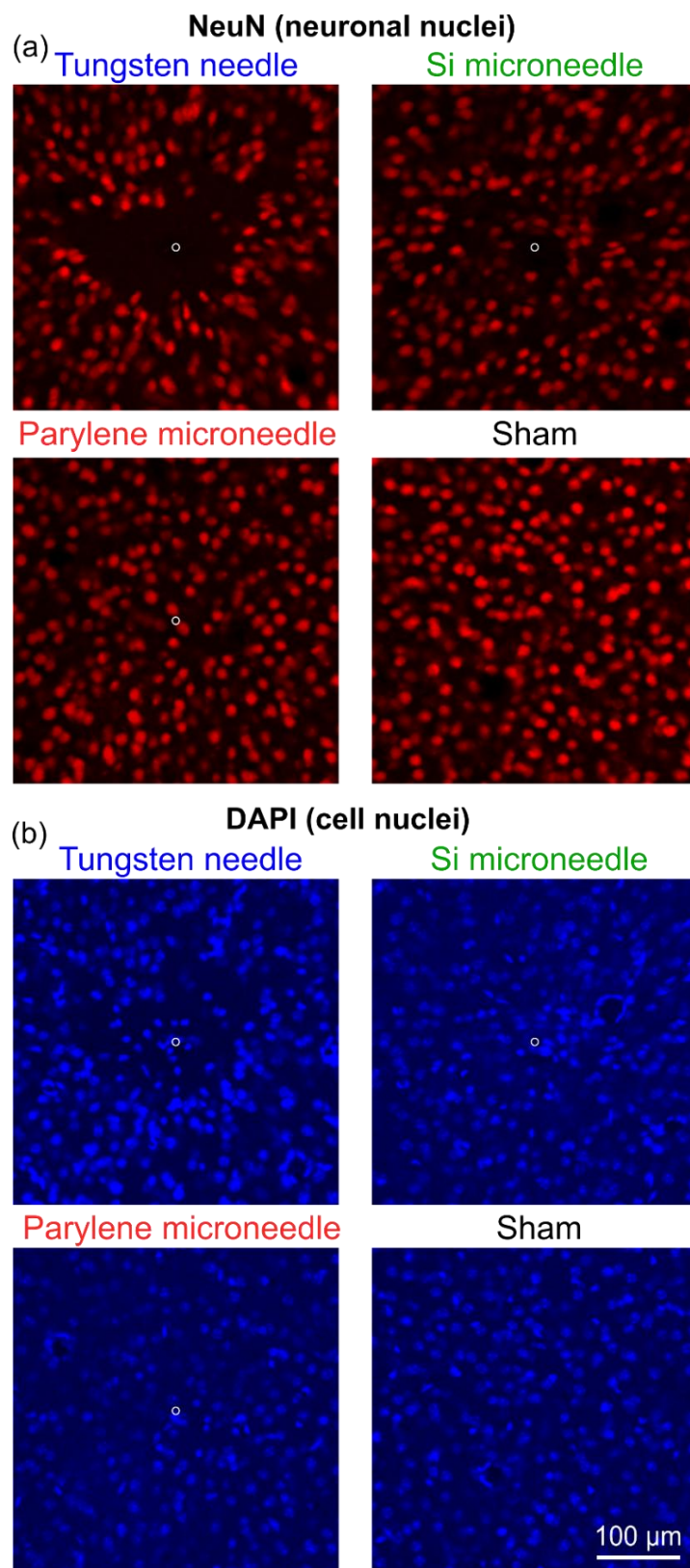


Figure 5.11 Parylene マイクロニードルの免疫染色画像

Copyright 2025, The Authors by Elsevier,
 CC BY ライセンスに基づく改変・転載²⁷

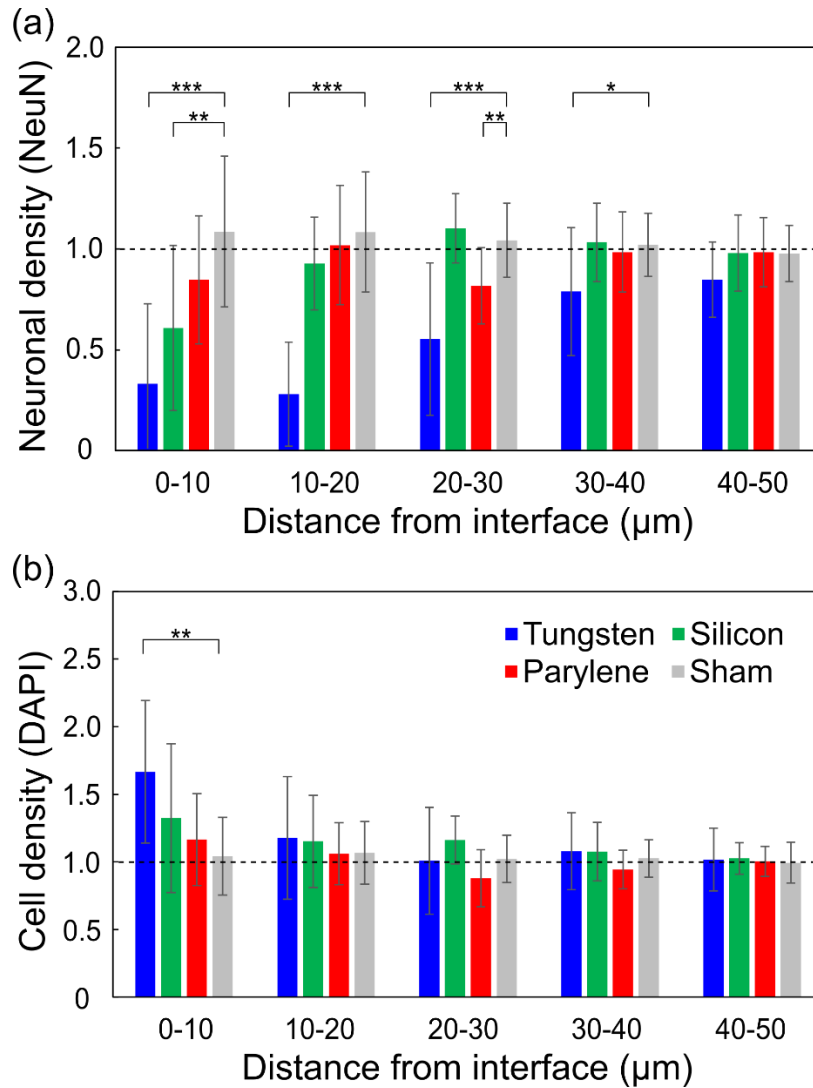


Figure 5.12 ニューロンおよび細胞核の定量的評価

Copyright 2025, The Authors by Elsevier,

CC BY ライセンスに基づく改変・転載²⁷

5.6 マウス *in vivo* ニューロン計測

本節では、5.3 節で作製した Parylene マイクロニードル電極の神経信号取得能力、および *in vivo* 計測における記録信号の安定性を示すため、マウスを対象とした慢性ニューロン計測について記述する。まず、電極をマウス脳に埋め込むための手術手技を記す。次に、視覚刺激によるニューロン応答計測の結果を示す。最後に、市販のタングステン電極および第 4 章 4.2 節で作製した Si マイクロニードル電極との記録信号の違いを示すことで、Parylene マイクロニードル電極の長期計測における優位性を明らかにする。

5.6.1 実験手法

本項では、Parylene マイクロニードル電極によるマウスの慢性ニューロン計測に向けた、デバイスの埋め込み手法および計測手法について記述する。

デバイス準備のために、Parylene マイクロニードル電極デバイスおよび Si マイクロニードル電極デバイスを、ポリエチレングリコール (PEG) を一時的な接着剤とし用い、ピン型コネクタ (Au, 直径 1 mm) 上に実装した。デバイスパッドには導電性銀ペースト (TK ペースト CN-7120, 株式会社シー・エス・シー) を用いてワイヤを接続し、接続部は紫外線硬化型アクリルエステル樹脂で絶縁した。一方、タングステンニードル電極 (TM31A10, World Precision Instruments 社, 1 M Ω , 1 kHz) は、ニードル側壁の Parylene 被膜をはんだごてにより壁面の Parylene-C を熔融し、導電性銀ペーストを用いてピン型コネクタ (Au, 直径 2 mm) に電氣的に接続した。その後、紫外線硬化型アクリルエステル樹脂を用いて接続部を絶縁し、ピン型コネクタ (Au, 直径 2 mm) に固定した (Figure 4.9)。

電極埋め込みに際しては、まずマウス (wild-type C57BL/6, オス, 体重 20~30 g, 日本エスエルシー株式会社) にイソフルランガス (3%) による全身麻酔を施した。本薬品による全身麻酔を行うことで手術後の覚醒を可能としている。麻酔下で、イヤバーおよびノーズバーを用いて脳定位固定装置 (SR-50, 株式会社ナリシゲ) にマウス頭部を 3 点固定した後、頭部の剃毛を行い、剪刀を用いてマウス頭部皮膚を正中線に沿って切除した。また、鋭匙を用いて骨膜および筋肉を除去した。その後、ドリルを用いて、小脳に直径 0.9 mm の開頭を行い、リファレンス電極としてワイヤを接続したステンレス製ねじ電極 (1 mm, 鍋屋バイテック株式会社) を 2 つ配置した。また、ドリルとピンセットを用いて、一次視覚野 (V1) に 1.5 \times 1.5 mm² の開頭を行った (AP = -4.0 mm, ML = -2.5 mm)。1 匹のマウスに対して、右半球 (V1) には Parylene マイクロニードルを (Figure 5.13c), 対側半球には Si マイクロニードルを、それぞれ脳表に対して垂直に埋め込んだ (Figure 5.13b)。電極の刺入および位置決めにはマイクロマニピュレータ (MO-10, 株式会社ナリシゲ) を用いた。刺入後は、デバイスおよびピン型コ

ネクタに生理食塩水を滴下して PEG を溶解し，皮質表面に電極デバイスのみを残した³¹．また別のマウスに対しては，右半球（V1）にタングステンニードルを脳表に対して垂直に，深さ約 400 μm （大脳皮質IV層）の位置に埋め込んだ．デバイス設置後，脳表を保護するため，生理食塩水を含んだゼラチンスポンジ（スポンゼル，LTLファーマ株式会社）で脳表全体を覆った．その後，露出箇所の保護とデバイスの固定のため，デンタルセメント（UNIFAST III，株式会社ジーシー）を用いて頭部全体を覆い固めた．なお，Parylene マイクロニードル電極デバイスおよび Si マイクロニードル電極デバイスの基板パッド部分は，デンタルセメントに固定されているが，脳表上の基板部は脳の拍動に追従可能な構成（フローティング電極）となっている．一方で，タングステンニードルは頭蓋骨に完全に固定されている点で異なる（Figure 5.13）．

電極埋め込み後，マウス頭部にファラデーケージ（Faraday cage）を設置した．ケージは，4枚の銅メッシュを頭部上部で囲うようにして組み立てた．まず，4枚のメッシュの下部をデンタルセメントでマウス頭部に固定し，隣り合うメッシュをはんだ付けで接続した．次に，記録電極（Parylene マイクロニードル電極，Si マイクロニードル電極，もしくはタングステン電極），およびリファレンス電極（ねじ電極）をそれぞれ出力コネクタ（A79022-001，Omnetics Connector Corporation 社）に接続した．また，もう一方のリファレンス電極（ねじ電極）とコネクタのグランド端子を，銅メッシュにはんだ付けで接続した．最後に，デンタルセメントでコネクタをケージ内部に固定し，ケージ外側全体をデンタルセメントで覆った（Figure 5.14）．Figure 5.15a に電極埋め込み手術の模式図，Figure 5.15b に手術後のマウスの写真を示す．このような構成にすることで，式(2.10)や式(2.11)で示した外部ノイズを低減できると考えられる．

電極埋め込みマウスに対して，手術1日後，2週間後，および1ヵ月後に視覚刺激応答計測を行った（Figure 5.15a）．本実験では行動に起因するノイズを低減させるために，鎮静剤として生理食塩水を希釈剤とした 0.5%濃度のクロルプロチキセン溶液をマウス腹腔に投与した（体重 10 g 当たり 0.05 ml）．視覚刺激は白色 LED を 0.5 s 間，3 s 間隔で与えた．LED はプロセッシングシステム（Arduino Uno, Arduino 社）により駆動し，刺激タイミングのパルス信号を神経信号の取得と同期させた．信号取得および処理においては，電極から記録された信号を神経信号増幅器（RHD2164 with accelerometer, Intan Technologies 社，入力インピーダンス=13 M Ω ，1 kHz）で増幅し，フィルタ（2.5 Hz~7.6 kHz）を通してデジタル化した（Figure 5.15b）．増幅後の信号は，SPI（serial peripheral interface）ケーブル（C3216, Intan Technologies 社）を介して，デジタル信号処理装置（Open Ephys Acquisition Board, Open Ephys 社）に送られた．すべてのデジタルデータは，Open Ephys GUI（version 0.67）を用いて Windows PC のハードディスクにサンプリング周波数 20 kHz で保存した．データ解析は，数値計算ソフトウェア MATLAB

(R2024b, MathWorks 社) を用いた。解析の前処理として、マウスの動きに起因するノイズを除去するため、ヘッドステージに搭載した加速度センサから得られた運動信号によりマウスの運動したタイミングを特定し、その時間区間を生データから除外した。解析に使用したサンプルは、タングステン電極 3 本、Si マイクロニードル電極 3 本、および Parylene マイクロニードル電極 4 本である。

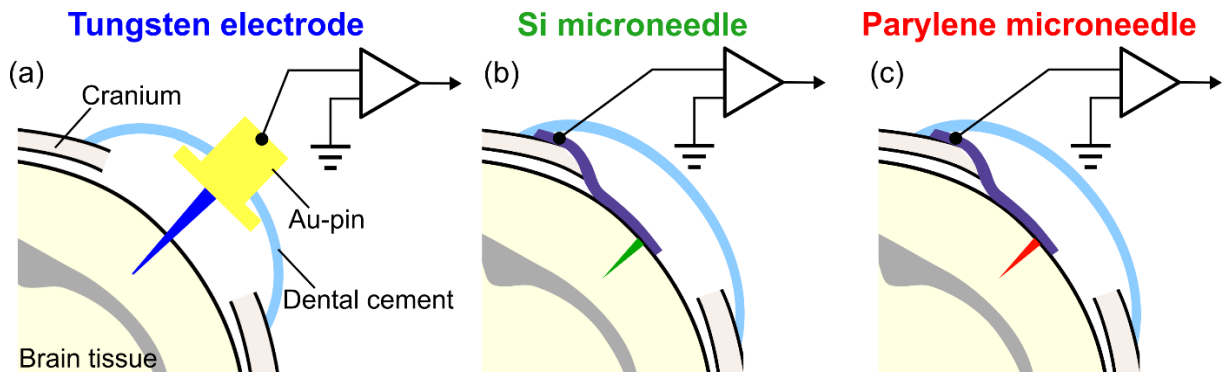


Figure 5.13 ニューロン計測に向けた電極埋め込み

Copyright 2025, The Authors by Elsevier,
CC BY ライセンスに基づく改変・転載²⁷

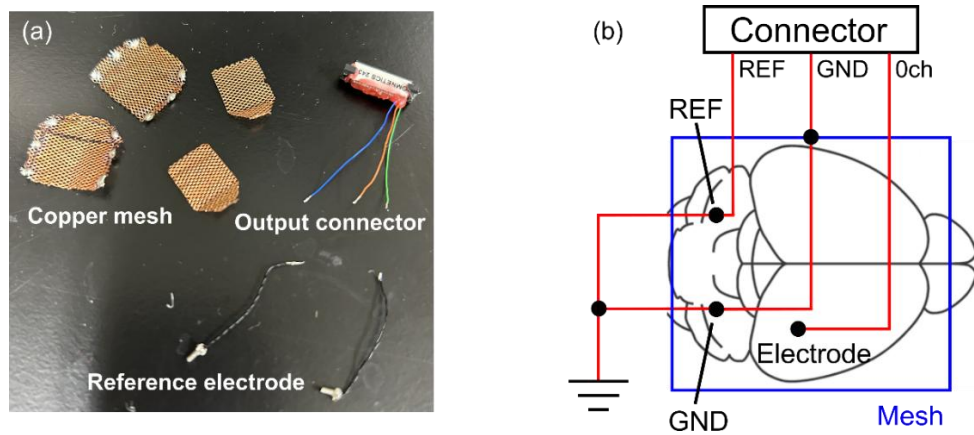


Figure 5.14 ファラデーケージの設置

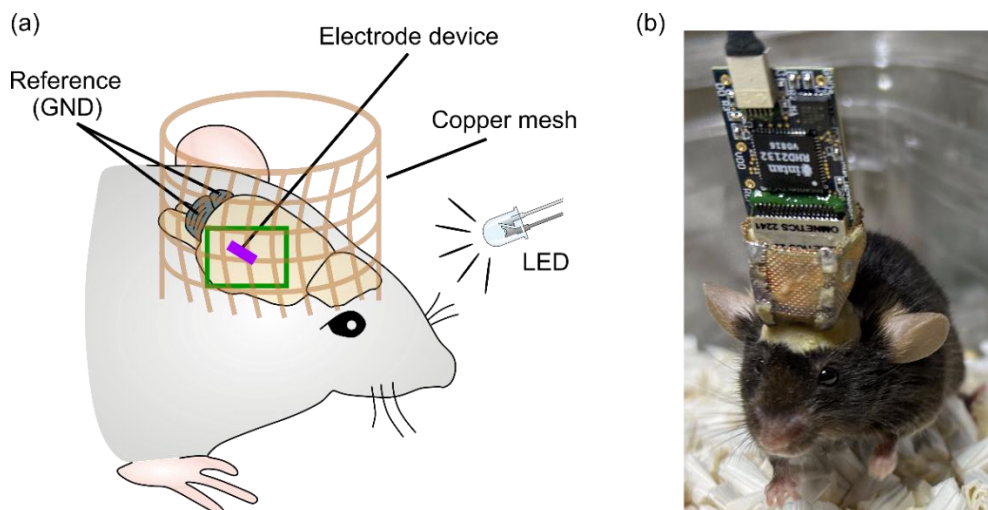


Figure 5.15 電極埋め込みマウス

Copyright 2025, The Authors by Elsevier,
CC BY ライセンスに基づく改変・転載²⁷

5.6.2 ニューロン慢性計測

本項では、5.6.1項で実施したParyleneマイクロニードル電極デバイスを用いた慢性埋め込みニューロン計測の結果について記述する。

Figure 5.16a, b, cに、手術後24時間経過後のタングステン電極、Siマイクロニードル電極、およびParyleneマイクロニードル電極による神経信号の計測結果および解析結果を示す。Figure 5.16a1, b1, c1は、低周波数帯域〔局所電場電位（LFP）帯域〕の信号（2次バターワースフィルタ、フィルタリング周波数=10~100 Hz、試行回数500）の平均波形を示す。刺激開始後50 ms付近で電圧振幅が観測され、複数ニューロンの集団活動に起因するLFPが取得できたことを示す。

Figure 5.16a2, b2, c2は、高周波数帯域（spike帯域）の信号（2次バターワースフィルタ、フィルタリング周波数=500~1,500 Hz）の代表的な波形を示している。また、Figure 5.16a3, b3, c3およびFigure 5.16a4, b4, c4は、これら高周波数帯域信号のラスタプロット（raster plot）およびPSTHであり、spikeの発火タイミングおよびspike発火頻度（firing rate）を示す。spike信号の検出閾値は、刺激開始前0.1~0.4 sの信号の標準偏差の3倍〔 $3 \times SD$ （Standard deviation, σ ）〕とした。視覚刺激に応答する信号は刺激開始後50~100 msの範囲で出現し、これまでに報告された他の電極デバイスによる神経応答の傾向と一致していた^{19,25,31-33}。また、本実験で得られた波形には、第4章4.4.2項のFigure 4.10やFigure 4.11で観察されたLED動作中のアーチファクトが現れなかった。これは、マウス頭部にヘッドステージを直接取り付け付けた構成や、ファラデーケージによって、電磁誘導が発生しなかったためと考えられる。

Figure 5.16d, e, fは、手術後30日経過後の各電極の計測結果を示している。視覚刺激応答は30日間にわたり繰り返し観察され、Paryleneマイクロニードル電極デバイスが他の電極と比較して優れた記録品質（PSTH；Figure 5.16f4）を示すことが確認された。そこで次項以降では、LFP（5.6.3項）およびspike信号（5.6.4項）の経時的変化について定量的比較を行った。

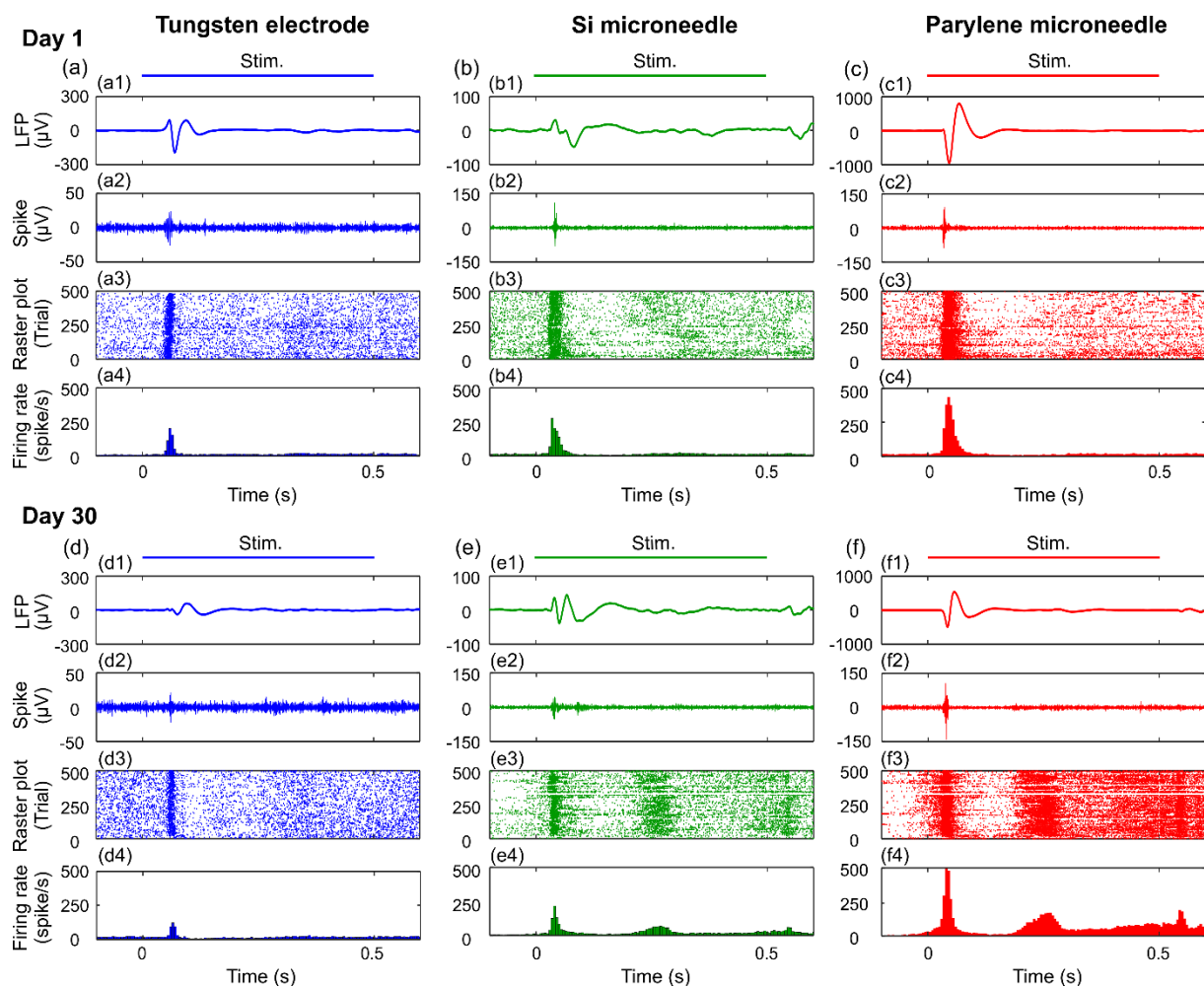


Figure 5.16 ニューロン計測結果

Copyright 2025, The Authors by Elsevier,
 CC BY ライセンスに基づく改変・転載²⁷

5.6.3 LFP の安定性評価

5.6.2項では、Paryleneマイクロニードル電極デバイスの神経信号取得能力を確認した。本項では、経時的な信号の変化を定量的に評価するため、埋め込み初日と30日後の記録信号を比較した。本項では、まずLFPについて解析を行った。

Figure 5.17a～fに、埋め込み1日後および30日後に記録されたLFP (<150 Hz) の代表的なパワースペクトログラム (power spectrogram) を示す。パワースペクトログラムは短時間フーリエ変換 (STFT: short-time Fourier transform) により算出した。各スペクトログラムは、以下の式(5.1)で算出したパワー P の分布を示している。

$$P = 20 \log_{10} \frac{V_{(t,f)}}{V_{before(f)}(-0.4 \text{ s to } -0.1 \text{ s})} \text{ [dB]} \quad (5.1)$$

ここで、 $V_{(t,f)}$ は各時刻・各周波数における電圧値、 $V_{before(f)}$ は各周波数における刺激前0.4 s～0.1 sの電圧値である。なお、カラーバーは電極ごとに統一されている。いずれのグラフにおいても、刺激開始から約50 msに応答が見られた。特にガンマ (γ) 帯域 (40～80 Hz) においてピークが観察された。この結果は、マウス一次視覚野 (V1) 第IV層における刺激誘発性ガンマ活動に関する先行研究と一致する^{34,35}。30日後には、タングステン電極およびSiマイクロニードル電極では記録された γ 帯域のパワーは1日後と比べて低下した (Figure 5.17a, d, Figure 5.17b, e)。一方で、Paryleneマイクロニードル電極では逆に増加を示した (Figure 5.17c, f)。

Figure 5.17gは、各電極の γ 帯域パワーを初日で正規化し、グラフ化したものである。ここで、 γ 帯域パワーは40～80 Hzの範囲におけるピーク値として定義した。Paryleneマイクロニードルの正規化 γ 帯域パワーは30日間で154%に増加したのに対し、タングステン電極およびSiマイクロニードル電極では低下した。平均 γ 帯域パワーの比較においても同様の傾向が確認された (Figure 5.17h)。

これらの結果から、フレキシブルなParyleneマイクロニードル電極デバイスは、慢性埋め込み環境下においてLFP信号品質を長期的に維持・向上させ、周囲のニューロンおよび神経ネットワークへの侵襲を最小限に抑制していることが示唆された。

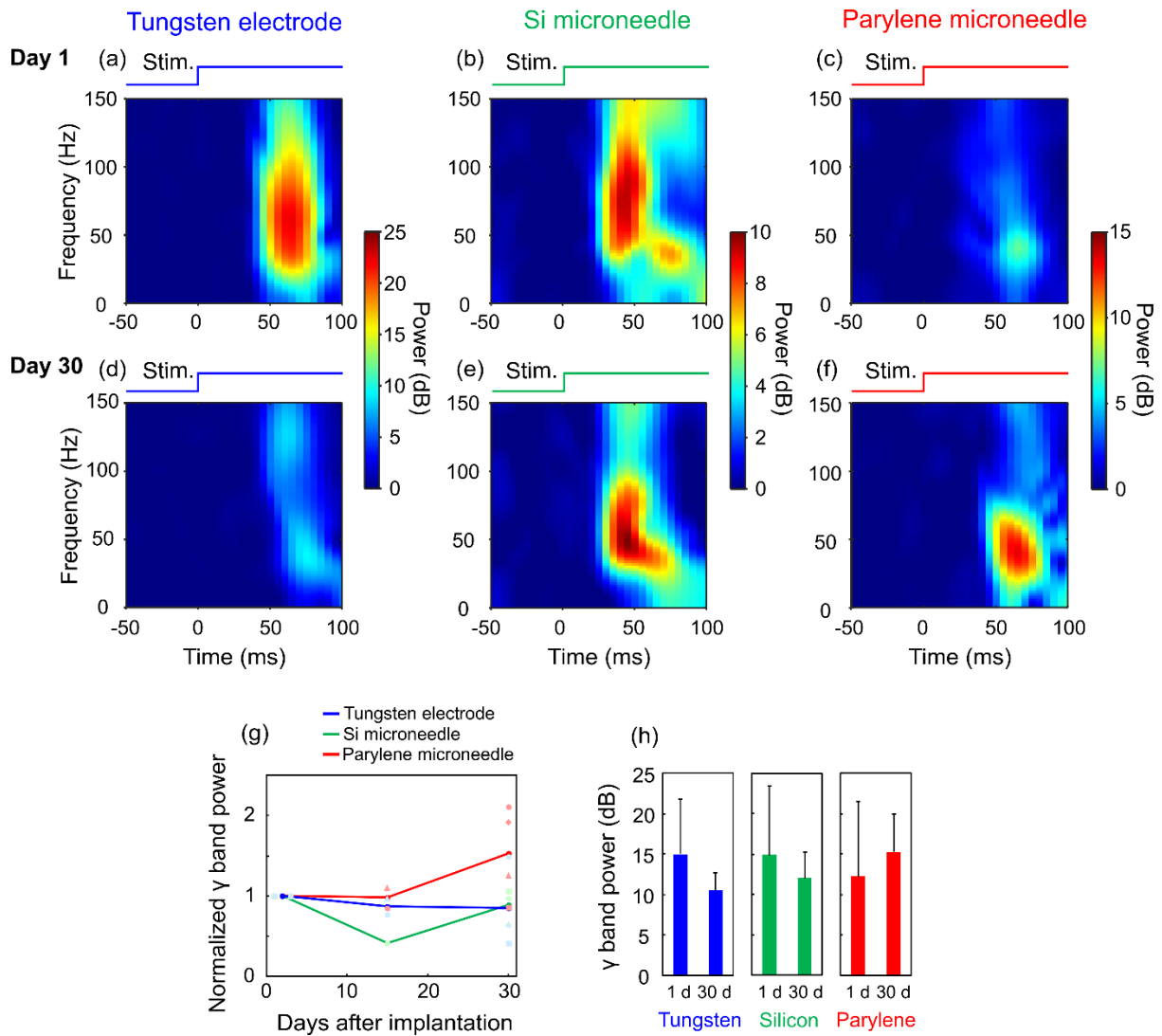


Figure 5.17 LFP の安定性評価

Copyright 2025, The Authors by Elsevier,
CC BY ライセンスに基づく改変・転載²⁷

5.6.4 spike 信号の安定性評価

5.6.3項では、記録信号の経時的変化を定量的に評価するため、埋め込み初日と30日後のLFPを比較した。本項では、spike信号の経時的変化について解析を行った。

Figure 5.18～Figure 5.20に、ハイパスフィルタ (>500 Hz) により抽出したspike信号の経時的な品質変化 (30日間) をタングステン電極, Siマイクロニードル電極, およびParyleneマイクロニードル電極の間で比較した結果を示す。Figure 5.18に、慢性ニューロン計測から得られた代表的なspike波形を示す。記録信号の質は埋め込まれた電極の電気的特性に大きく依存し、記録部位周囲のグリア瘢痕 (glial scar) によるインピーダンス (scar impedance) の増加に伴って劣化する可能性がある³⁶⁻³⁸。Figure 5.19は、各電極のインピーダンス特性 (1 kHz) の経時的な変化を示している。縦軸は初日の値で正規化したものである。タングステン電極では30日間で有意なインピーダンス増加が認められた ($p=0.0447$, 片側対応t検定, $\alpha=0.05$)。一方, Siマイクロニードル電極およびParyleneマイクロニードル電極では有意な変化は認められなかった。

記録信号の各特性を経時的に解析した結果を Figure 5.20 に示す。電気的特性の評価項目として、バックグラウンドノイズ (Figure 5.20a), spike 電圧振幅 (Figure 5.20b), 信号対雑音比 (SNR) (Figure 5.20c), spike 発火頻度 (firing rate, Figure 5.20d) を解析した。タングステン電極ではノイズの増加を示した (132%, $p=3.34\times 10^{-4}$, Figure 5.20a)。これはグリア瘢痕形成に伴うインピーダンス上昇を示唆する結果であった。Parylene マイクロニードル電極でもノイズ増加は認められたが (137%, $p=0.0128$, Figure 5.20a), タングステン電極と異なり 30 日後には spike 振幅が有意に増加した (211%, $p=0.0244$, Figure 5.20b)。この結果は、記録部位とニューロンがより接近したことを示唆している。また, SNR は以下の式(5.2)で定義した。

$$SNR_{spike} = \frac{Signal}{Noise} = \frac{mean V_{pp,spike} (> 3\sigma, 0.01 s to 0.1 s)}{std(\sigma, -0.4 s to -0.1 s)} \quad (5.2)$$

ここでは、刺激前信号の標準偏差をノイズ (Noise, σ), spikeのpeak-to-peak値をシグナル (Signal, $V_{pp,spike}$) とし、これらの比をSNRとして算出している。埋め込み30日後のSNRは、1日目の結果と比較して、Paryleneマイクロニードルで有意に増加した (149%, $p=0.0325$) (Figure 5.20c)。さらに、発火頻度も大幅に増加した (538%, $p=0.0409$, Figure 5.20d)。発火頻度は、刺激開始後に検出された1秒あたりのspike数であり、刺激開始後10～100 msの区間を10 msのビン幅で分割し、その中で得られた最大値として算出した。

これらの結果は、5.6.3項で記したLFP記録と一致して、フレキシブルなParyleneマイクロニードル電極が慢性記録の品質を向上させることを示している。

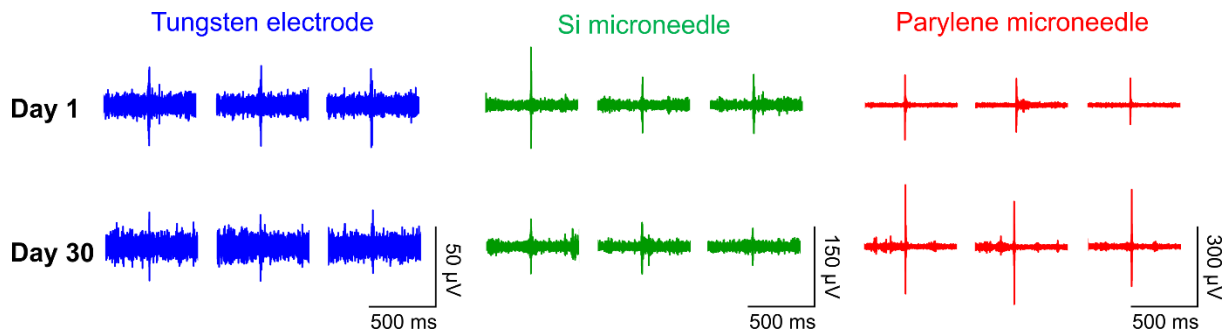


Figure 5.18 spike 信号の波形

Copyright 2025, The Authors by Elsevier,
CC BY ライセンスに基づく改変・転載²⁷

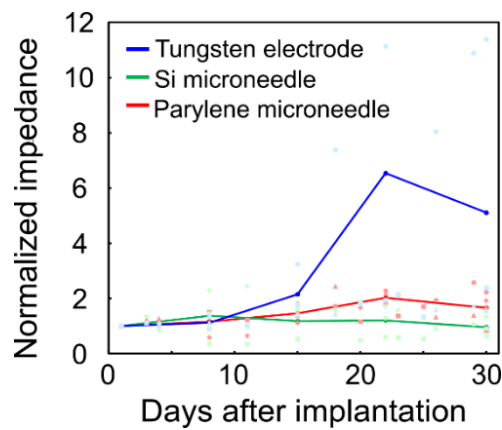


Figure 5.19 電極インピーダンスの経時的変化

Copyright 2025, The Authors by Elsevier,
CC BY ライセンスに基づく改変・転載²⁷

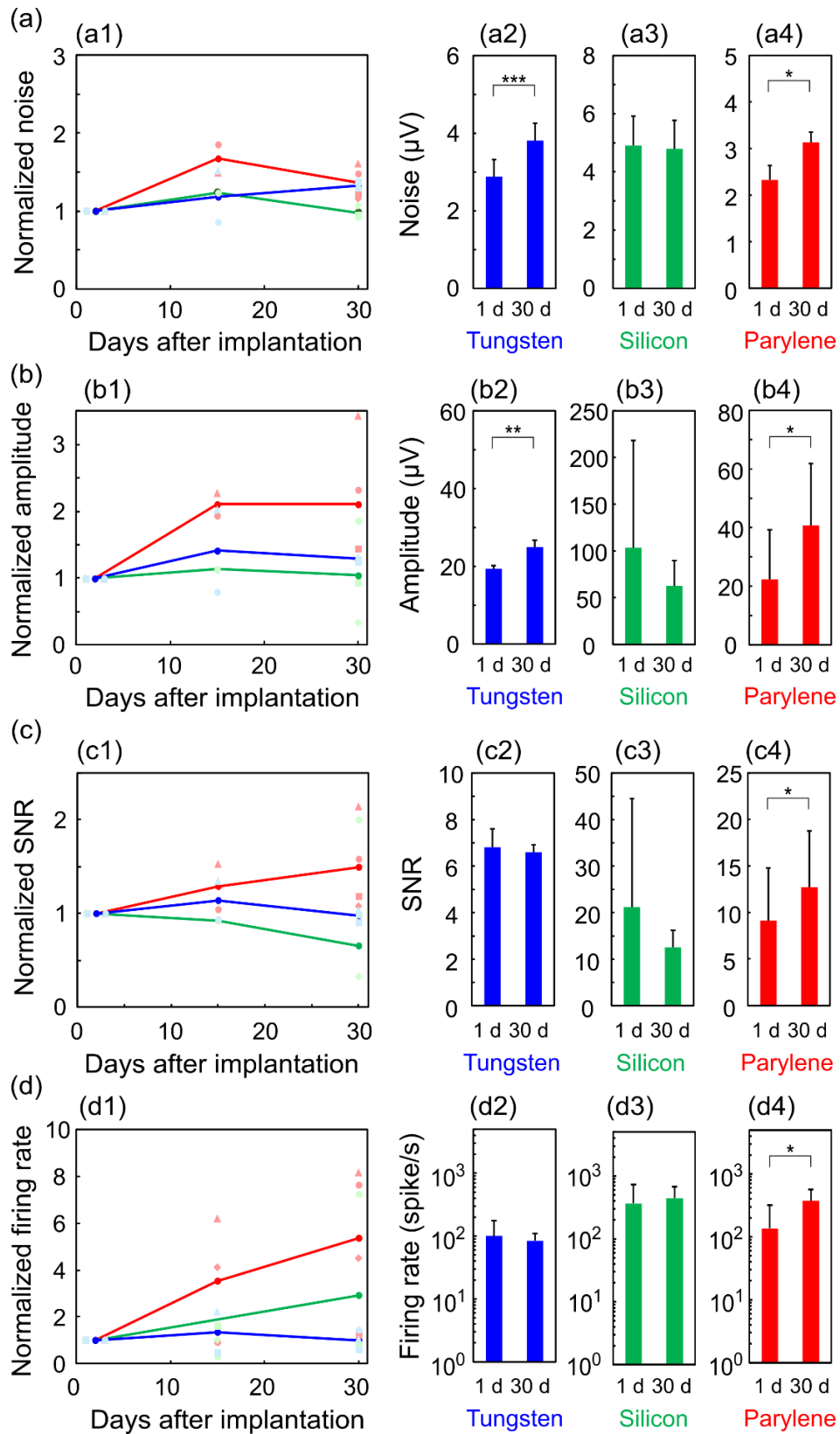


Figure 5.20 spike 信号の経時的変化

Copyright 2025, The Authors by Elsevier,
CC BY ライセンスに基づく改変・転載 ²⁷

5.7 考察

本章では、超小型、機械的柔軟性、および自立刺入可能という3つの主要な特徴を有する、完全Parylene製マイクロニードル電極デバイスを提示した。これらの特性により、血管および血液脳関門（BBB：blood brain barrier）の破壊が最小限に抑えられ、ニューロン死滅やグリア活性化の抑制を通じて、神経ネットワーク機能の維持が可能となった。従来のタングステン電極、および第4章で提示したSiマイクロニードル電極デバイス²⁶と比較して、Paryleneマイクロニードル電極デバイスは低侵襲性かつ高品質な*in vivo*ニューロン記録性能を示した。

超小型なParyleneマイクロニードル電極デバイスは、埋め込みデバイスの体積に比例する急性損傷を低減する³。デバイス体積は、直接的にニューロン死滅領域（kill zone）を決定し、それに応じたグリア活性化を誘発する^{39,40}。さらに、血管およびBBBの破壊を引き起こし、神経ネットワーク機能を損なう⁴¹。Paryleneマイクロニードルは先端直径が5 μm と極めて小さく（Figure 5.6）、ユタ電極（50~100 μm ）⁴²、ミシガン電極（40 μm ）⁴³、およびNeuropixels（70 μm ）^{44,45}などの大型電極と比較して、急性損傷を最小限に抑えることができる。さらに本デバイスは、微小な円錐構造であることから²⁸、サポートを用いず自立的に硬膜および脳組織への刺入が可能である（Figure 5.9）。硬膜除去（durotomy）を回避することで、脳浮腫、血管損傷、および手術時間を減少させ、結果として侵襲性の低減に寄与する^{46,47}。一方、ほとんどのフレキシブル電極は、挿入用シャトルデバイスやコーティング材料などの機械的サポートを必要とする^{7,8,10-13}。これらの補助構造は、デバイス自体のサイズを小さく設計できたとしても、正味の刺入体積を増大させる（UFTEs；デバイス本体：幅13 μm ，タングステンシャトル：直径50 μm ¹²）。

さらに、フレキシブルなParyleneマイクロニードル電極デバイスは、慢性損傷の低減にも寄与する。慢性損傷は主に、硬い電極と柔らかい脳組織の機械的ミスマッチおよび脳のマイクロモーションに起因する^{48,49}。従来のSi（140-180 GPa）およびタングステン（360 GPa）など高ヤング率材料で構成された電極⁴²⁻⁴⁵では、慢性損傷を避けられない。一方で、Siコアを持たないParyleneマイクロニードルは高い柔軟性を有し（2.76 GPa）、特に横方向のマイクロモーションに伴う組織へのストレスを緩和する。有限要素解析の結果、形状が同一であっても、Paryleneマイクロニードルの剛性は、Siマイクロニードルおよびタングステン電極より著しく低いことが確認された（Figure 5.3）。さらに、埋め込みおよび固定方法も慢性損傷に影響を与える^{31,50-52}。頭蓋骨に固定された電極は微小運動による損傷を生じるが、Paryleneマイクロニードル電極デバイスはフレキシブル基板を有するため、縦方向のマイクロモーションに追従し、組織へのストレスを軽減する。免疫組織化学的解析により、本デバイスが慢性損傷を低減することが確認された（Figure 5.11, Figure 5.12）。埋め込み30日後のNeuN（ニューロン）染色による定量評価に

において、Paryleneマイクロニードル電極デバイスは電極表面から10 μm 以内の領域においてニューロン死滅をほとんど誘発せず、開頭のみでの対照群 (sham) と同程度であった (Figure 5.12a). 一方、タングステン電極およびSiマイクロニードル電極デバイスでは有意なニューロン死滅が観察された. さらに、DAPI (細胞核) 染色の結果から、Paryleneマイクロニードル周囲における非神経細胞の集積が少なく、グリア反応の抑制が示唆された (Figure 5.12b). これらの結果は、慢性損傷の軽減が電極形状のみならず、その機械的柔軟性にも依存することを示している.

電気生理学的解析結果もこれらの示唆を裏付けている. SNRおよびspike発火率の上昇 (Figure 5.20) は、電極近傍 (<50 μm ^{53,54}) の組織回復を反映しており、ニューロンの再接近、神経アンサンブルの回復、およびグリア被膜の抑制を示唆する. これらの結果は、電極周囲のニューロン密度の維持・回復を示す組織学的観察結果と一致している (Figure 5.12). 電気生理学的計測の観点からは、spike検出の改善が、単一ニューロン (single unit) の分離精度を向上させ、後続の解析精度を高めると考えられる⁵. LFP記録においても、Paryleneマイクロニードル電極の埋め込み後30日間で、 γ 帯域の視覚応答が増大し (Figure 5.17)、組織回復が反映された. LFP振幅はBBB、グリア活性、およびシナプス電位を反映するため⁵³、このパワー増加は局所組織 (電極から数百 μm 範囲) の回復、神経同期性の向上、および機能的結合の再構築を示唆する^{55,56}. このように、高品質な慢性LFP記録は、疾患モニタリング、睡眠研究、およびBMI/BCI技術などの応用において有望である⁵⁷.

本研究では、埋め込み30日間にわたって記録品質および組織状態の改善が進行することを示した. この傾向は他のフレキシブル電極の報告とも一致する^{12,13}. 記録品質の回復 (Figure 5.17, Figure 5.20) は、初期の反応性アストログリオシスが一過的であり、重度のグリア瘢痕形成へ進行しないことを示唆し^{58,59}、機能的回復の可能性を示している. さらに、組織学的および電気生理学的解析から、電極表面から10 μm 以内の微小な組織状態の違い (Figure 5.12) が記録品質に著しい影響を及ぼすことが示唆された (Figure 5.17, Figure 5.20). 現状の研究では、組織学的解析の空間分解能が十分でないため、今後の埋め込み型電極を用いた研究では、より高分解能な組織評価手法の導入が必要である.

フレキシブル基板を有したParyleneマイクロニードル電極デバイスの開発により、侵襲性を抑制することに成功したが、それでもなお、いくつかの課題が残されている. VLS成長によって得られるマイクロニードルの長さは他の電極^{11,12,42-45,60}と比較して相対的に短く、本研究で作製した長さ400 μm のニードル電極では、海馬や視床などの深部脳領域の記録には十分ではない. 理論的には、Au触媒によるVLS結晶成長によりミリスケール長のSiニードルの作製は可能であり^{61,62}、本研究室の以前の研究でも、長さ1.5 mmのSiニードル成長を実証している²⁰. VLS成長条件の最適化により長尺化が可能と考えられるが、刺入時の座屈や曲がりを防ぐ

ためには、ニードル根本への一時的コーティングなどによる機械的補強も有効であると考えられる²⁹。また、本デバイスのチャンネル数は限定されており、複数領域にわたる高密度脳マッピング^{63,64}には不十分である。VLS成長過程において触媒Auドットをアレイ化することで、多点記録用のSiニードルアレイの形成も可能である^{20,32}。さらに、Parylene膜厚の低減、ニードル基部直径の縮小、および先端のナノスケール化^{28,65}により柔軟性を高め、組織損傷をより一層抑制できると期待される。一方で、デバイス基板材料として用いたParylene-C (2.8 GPa)は、従来のSi基板 (140~180 GPa)よりも低いヤング率を示すが、依然として脳組織 (0.1-16 kPa⁹)よりは硬い。この機械的ミスマッチは、ポリジメチルシロキサン (PDMS : polydimethylsiloxane ; 0.73 MPa⁶⁶) やハイドロゲル (0.1~100 kPa⁶⁷) など、より低ヤング率の材料を基板に用いることで解決することができ、さらなる低侵襲化および組織密着性の向上に繋がる⁶⁸⁻⁷⁰。

5.8 結言

本章では、低侵襲な皮質内電気生理計測に向けた、完全 Parylene 製の直径 5 μm フレキシブルニードル電極デバイスを開発した。本電極デバイスは、Si マイクロニードルの VLS 結晶成長、Parylene 被覆、および Si コアの除去によって作製された。作製したデバイスの刺入実験を通して、本デバイスは自立刺入が可能であり、急性損傷が最小限に抑えられることを確認した。さらに、慢性記録および免疫組織化学的解析により、本デバイスの機械的柔軟性が慢性損傷の軽減に寄与することを明らかにした。

これらの結果から、超小型、自立刺入、および柔軟性を兼ね備えることで、本電極デバイスは従来の刺入型電極と比較して急性・慢性損傷の双方を低減し、電気生理学的記録品質を向上させることが示された。今後の課題としては、Parylene マイクロニードルのアレイ化および伸長化によって、マルチサイト記録および脳深部記録を実現し、脳領域をまたぐ高密度マッピングを可能にすることが挙げられる。

本章で開発したデバイスは、脳組織および神経ネットワークの構造と機能を保持しつつ計測を行う新たなプラットフォームとして、将来の神経インターフェース技術への応用が期待される。

参考文献

1. Cogan, S. F. Neural stimulation and recording electrodes. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* **10**, 275–309 (2008).
2. Hong, G. & Lieber, C. M. Novel electrode technologies for neural recordings. *Nat. Rev. Neurosci.* **20**, 330–345 (2019).
3. Kaszás, A. *et al.* Capturing the Electrical Activity of all Cortical Neurons: Are Solutions Within Reach? *Adv. Sci.* **12**, e06225 (2025).
4. Grill, W. M., Norman, S. E. & Bellamkonda, R. V. Implanted neural interfaces: biochallenges and engineered solutions. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* **11**, 1–24 (2009).
5. Williams, N. P. *et al.* In vivo microelectrode arrays for neuroscience. *Nat. Rev. Methods Primers* **5**, (2025).
6. Lv, S. *et al.* Long-term stability strategies of deep brain flexible neural interface. *npj Flex. Electron.* **9**, 40 (2025).
7. Cointe, C. *et al.* Scalable batch fabrication of ultrathin flexible neural probes using a bioresorbable silk layer. *Microsyst. Nanoeng.* **8**, 21 (2022).
8. Ferro, M. D. *et al.* NeuroRoots, a bio-inspired, seamless brain machine interface for long-term recording in delicate brain regions. *AIP Adv.* **14**, (2024).
9. Fu, T.-M., Hong, G., Viveros, R. D., Zhou, T. & Lieber, C. M. Highly scalable multichannel mesh electronics for stable chronic brain electrophysiology. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **114**, E10046–E10055 (2017).
10. Guan, S. *et al.* Elastocapillary self-assembled neurotassels for stable neural activity recordings. *Sci. Adv.* **5**, eaav2842 (2019).
11. Luan, L. *et al.* Ultraflexible nanoelectronic probes form reliable, glial scar-free neural integration. *Sci. Adv.* **3**, e1601966 (2017).
12. Yasar, T. B. *et al.* Months-long tracking of neuronal ensembles spanning multiple brain areas with Ultra-Flexible Tentacle Electrodes. *Nat. Commun.* **15**, 4822 (2024).
13. Zhao, S. *et al.* Tracking neural activity from the same cells during the entire adult life of mice. *Nat. Neurosci.* **26**, 696–710 (2023).
14. Xue, N. *et al.* A biodegradable porous silicon and polymeric hybrid probe for electrical neural signal recording. *Sens. Actuators B Chem.* **272**, 314–323 (2018).
15. Hong, G., Viveros, R. D., Zwang, T. J., Yang, X. & Lieber, C. M. Tissue-like neural probes for understanding and modulating the brain. *Biochemistry* **57**,

- 3995–4004 (2018).
16. Zhou, T. *et al.* Syringe-injectable mesh electronics integrate seamlessly with minimal chronic immune response in the brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **114**, 5894–5899 (2017).
 17. Liu, J. *et al.* Syringe-injectable electronics. *Nat. Nanotechnol.* **10**, 629–636 (2015).
 18. Fu, T.-M. *et al.* Stable long-term chronic brain mapping at the single-neuron level. *Nat. Methods* **13**, 875–882 (2016).
 19. Sawahata, H. *et al.* Single 5 μm diameter needle electrode block modules for unit recordings in vivo. *Sci. Rep.* **6**, 1–12 (2016).
 20. Fujishiro, A., Kaneko, H., Kawashima, T., Ishida, M. & Kawano, T. In vivo neuronal action potential recordings via three-dimensional microscale needle-electrode arrays. *Sci. Rep.* **4**, 1–9 (2014).
 21. Ikedo, A., Kawashima, T., Kawano, T. & Ishida, M. Vertically aligned silicon microwire arrays of various lengths by repeated selective vapor-liquid-solid growth of n-type silicon/n-type silicon. *Appl. Phys. Lett.* **95**, (2009).
 22. Kawano, T. *et al.* Fabrication and properties of ultrasmall Si wire arrays with circuits by vapor–liquid–solid growth. *Sens. Actuators A Phys.* **97**, 709–715 (2002).
 23. Kawano, T. *et al.* Selective vapor-liquid-solid epitaxial growth of micro-Si probe electrode arrays with on-chip MOSFETs on Si (111) substrates. *IEEE Trans. Electron Devices* **51**, 415–420 (2004).
 24. Kawano, T. *et al.* Electrical interfacing between neurons and electronics via vertically integrated sub-4 μm -diameter silicon probe arrays fabricated by vapor–liquid–solid growth. *Biosens. Bioelectron.* **25**, 1809–1815 (2010).
 25. Sanda, R. *et al.* Low-invasive neural recording in mouse models with diabetes via an ultrasmall needle-electrode. *Biosens. Bioelectron.* **240**, 115605 (2023).
 26. Sasaki, H. *et al.* A Flexible-Substrate 5- μm -Diameter Needle Electrode: Minimizing Neuronal Death and Enabling Year-Long Neural Recording. *Adv. Mater. Interfaces* **12**, 2400974 (2025).
 27. Sasaki, H. *et al.* A self-insertable 5- μm -diameter flexible microneedle for minimally invasive and stable in vivo neural recording. *Sens. Biosensing Res.* **50**, 100915 (2025).
 28. Kubota, Y. *et al.* Nanoscale-Tipped High-Aspect-Ratio Vertical Microneedle Electrodes for Intracellular Recordings. *Small* **12**, 2846–2853 (2016).
 29. Yagi, S. *et al.* Dissolvable base scaffolds allow tissue penetration of high-aspect-ratio flexible microneedles. *Adv. Healthc. Mater.* **4**, 1949–1955

- (2015).
30. Muthuswamy, J., Gilletti, A., Jain, T. & Okandan, M. Microactuated neural probes to compensate for brain micromotion. *Proceedings of the 25th Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society (IEEE Cat. No. 03CH37439)* **2**, 1941–1943 (2003).
 31. Yamashita, K. *et al.* A floating 5 μm -diameter needle electrode on the tissue for damage-reduced chronic neuronal recording in mice. *Lab Chip* **22**, 747–756 (2022).
 32. Sieng, C. K. T. *et al.* Magnetic assembly of microwires on a flexible substrate for minimally invasive electrophysiological recording. *Biosens. Bioelectron.* **271**, 116927 (2025).
 33. Kita, Y. *et al.* Three-micrometer-diameter needle electrode with an amplifier for extracellular in vivo recordings. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **118**, e2008233118 (2021).
 34. Lemercier, C. E., Krieger, P. & Manahan-Vaughan, D. Dynamic modulation of mouse thalamocortical visual activity by salient sounds. *iScience* **27**, (2024).
 35. Welle, C. G. & Contreras, D. Sensory-driven and spontaneous gamma oscillations engage distinct cortical circuitry. *J. Neurophysiol.* **115**, 1821–1835 (2016).
 36. Williams, J. C., Hippensteel, J. A., Dilgen, J., Shain, W. & Kipke, D. R. Complex impedance spectroscopy for monitoring tissue responses to inserted neural implants. *J. Neural Eng.* **4**, 410 (2007).
 37. Kozai, T. D. Y. *et al.* Effects of caspase-1 knockout on chronic neural recording quality and longevity: insight into cellular and molecular mechanisms of the reactive tissue response. *Biomaterials* **35**, 9620–9634 (2014).
 38. Rivnay, J., Wang, H., Fenno, L., Deisseroth, K. & Malliaras, G. G. Next-generation probes, particles, and proteins for neural interfacing. *Sci. Adv.* **3**, e1601649 (2017).
 39. Edell, D. J., Toi, V. Van, McNeil, V. M. & Clark, L. D. Factors influencing the biocompatibility of insertable silicon microshafts in cerebral cortex. *IEEE Trans. Biomed. Eng.* **39**, 635–643 (1992).
 40. Seymour, J. P. & Kipke, D. R. Neural probe design for reduced tissue encapsulation in CNS. *Biomaterials* **28**, 3594–3607 (2007).
 41. Wellman, S. M. *et al.* Cuprizone-induced oligodendrocyte loss and demyelination impairs recording performance of chronically implanted neural interfaces. *Biomaterials* **239**, 119842 (2020).

42. Rousche, P. J. & Normann, R. A. Chronic recording capability of the Utah Intracortical Electrode Array in cat sensory cortex. *J. Neurosci. Methods* **82**, 1–15 (1998).
43. Wise, K. D., Anderson, D. J., Hetke, J. F., Kipke, D. R. & Najafi, K. Wireless implantable microsystems: high-density electronic interfaces to the nervous system. *Proc. IEEE* **92**, 76–97 (2004).
44. Jun, J. J. *et al.* Fully integrated silicon probes for high-density recording of neural activity. *Nature* **551**, 232–236 (2017).
45. Steinmetz, N. A. *et al.* Neuropixels 2.0: A miniaturized high-density probe for stable, long-term brain recordings. *Science* **372**, eabf4588 (2021).
46. Joo, H. R. *et al.* A microfabricated, 3D-sharpened silicon shuttle for insertion of flexible electrode arrays through dura mater into brain. *J. Neural Eng.* **16**, 066021 (2019).
47. Wang, Y., Yang, X., Zhang, X., Wang, Y. & Pei, W. Implantable intracortical microelectrodes: reviewing the present with a focus on the future. *Microsyst. Nanoeng.* **9**, 7 (2023).
48. Lind, G., Linsmeier, C. E. & Schouenborg, J. The density difference between tissue and neural probes is a key factor for glial scarring. *Sci. Rep.* **3**, 2942 (2013).
49. Sharafkhani, N. *et al.* Neural tissue-microelectrode interaction: Brain micromotion, electrical impedance, and flexible microelectrode insertion. *J. Neurosci. Methods* **365**, 109388 (2022).
50. Biran, R., Martin, D. C. & Tresco, P. A. The brain tissue response to implanted silicon microelectrode arrays is increased when the device is tethered to the skull. *J. Biomed. Mater. Res. A* **82**, 169–178 (2007).
51. Ersen, A., Elkabes, S., Freedman, D. S. & Sahin, M. Chronic tissue response to untethered microelectrode implants in the rat brain and spinal cord. *J. Neural Eng.* **12**, 016019 (2015).
52. Kim, Y.-T., Hitchcock, R. W., Bridge, M. J. & Tresco, P. A. Chronic response of adult rat brain tissue to implants anchored to the skull. *Biomaterials* **25**, 2229–2237 (2004).
53. Buzsáki, G., Anastassiou, C. A. & Koch, C. The origin of extracellular fields and currents—EEG, ECoG, LFP and spikes. *Nat. Rev. Neurosci.* **13**, 407–420 (2012).
54. Harris, K. D., Quiroga, R. Q., Freeman, J. & Smith, S. L. Improving data quality in neuronal population recordings. *Nat. Neurosci.* **19**, 1165 (2016).
55. Boothe, D. L. *et al.* Impact of neuronal membrane damage on the local field

- potential in a large-scale simulation of cerebral cortex. *Front. Neurol.* **8**, 236 (2017).
56. Chen, K., Forrest, A. M., Burgos, G. G. & Kozai, T. D. Y. Neuronal functional connectivity is impaired in a layer dependent manner near chronically implanted intracortical microelectrodes in C57BL6 wildtype mice. *J. Neural Eng.* **21**, 036033 (2024).
 57. Jeakle, E. N. *et al.* Chronic stability of local field potentials using amorphous silicon carbide microelectrode arrays implanted in the rat motor cortex. *Micromachines (Basel)*. **14**, 680 (2023).
 58. Sofroniew, M. V. Molecular dissection of reactive astrogliosis and glial scar formation. *Trends Neurosci.* **32**, 638–647 (2009).
 59. Sofroniew, M. V & Vinters, H. V. Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathol.* **119**, 7–35 (2010).
 60. Chung, J. E. *et al.* High-density, long-lasting, and multi-region electrophysiological recordings using polymer electrode arrays. *Neuron* **101**, 21–31 (2019).
 61. Wagner, R. S. & Ellis, W. C. Vapor-liquid-solid mechanism of single crystal growth. *Appl. Phys. Lett.* **4**, 89–90 (1964).
 62. Asai, S., Kato, K., Nakazaki, N. & Nakajima, Y. Probe card with probe pins grown by the vapor-liquid-solid (VLS) method. *IEEE Trans. Compon., Packag., Manuf. Technol. A* **19**, 258–267 (1996).
 63. Lee, S. H. *et al.* Scalable thousand channel penetrating microneedle arrays on flex for multimodal and large area coverage brainmachine interfaces. *Adv. Funct. Mater.* **32**, 2112045 (2022).
 64. Obaid, A. *et al.* Massively parallel microwire arrays integrated with CMOS chips for neural recording. *Sci. Adv.* **6**, eaay2789 (2020).
 65. Kubota, Y. *et al.* Long nanoneedle-electrode devices for extracellular and intracellular recording in vivo. *Sens. Actuators B Chem.* **258**, 1287–1294 (2018).
 66. Khanafer, K., Duprey, A., Schlicht, M. & Berguer, R. Effects of strain rate, mixing ratio, and stress–strain definition on the mechanical behavior of the polydimethylsiloxane (PDMS) material as related to its biological applications. *Biomed. Microdevices* **11**, 503–508 (2009).
 67. Yuk, H., Lu, B. & Zhao, X. Hydrogel bioelectronics. *Chem. Soc. Rev.* **48**, 1642–1667 (2019).
 68. Goding, J. *et al.* A living electrode construct for incorporation of cells into bionic devices. *MRS Commun.* **7**, 487–495 (2017).

69. Liu, Y. *et al.* Body temperature enhanced adhesive, antibacterial, and recyclable ionic hydrogel for epidermal electrophysiological monitoring. *Adv. Healthc. Mater.* **11**, 2200653 (2022).
70. Shan, Y., Cui, X., Chen, X. & Li, Z. Recent progress of electroactive interface in neural engineering. *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomed. Nanobiotechnol.* **15**, e01827 (2022).

第6章

総括

本論文では、低侵襲な *in vivo* ニューロン計測技術の開発を目的として、フレキシブルな基板とニードルを有しつつ自立的な刺入を可能とする、先端直径 5 μm ニードル電極デバイスを提案した。また、マウスを用いた電気生理計測、および免疫組織化学による組織損傷評価を通して、提案デバイスの低侵襲性を評価した。さらに、電極の微小化に伴う高インピーダンス化による記録信号の劣化を抑制するため、ノイズ低減手法も併せて提案した。

第1章では、脳信号計測の重要性と従来の計測技術や電極デバイスの問題点を提示し、本研究の意義を明確にした。脳計測手法として、高い時空間分解能を有する刺入型電極が有力であるが、電極の太い刺入部 ($>10 \mu\text{m}$) や高い剛性に起因する侵襲性が課題であった。近年では、脳組織との機械的ミスマッチを低減するため多様なフレキシブル電極が開発されている。しかし、これらの電極は慢性損傷を軽減する一方で、自立的な刺入が困難であり刺入用シャトルや一時的な硬化コーティングなどのサポートを必要とするため、急性損傷は回避できていない。この課題を解決するため、VLS 結晶成長法を用いた直径 5 μm の Si マイクロニードル電極が提案されている。しかしながら本電極にも、硬い Si 基板と Si ニードルによる慢性損傷や、高インピーダンス特性による信号劣化などの課題が残されている。そこで本研究では、VLS 結晶成長法を用いた Si マイクロニードル電極の更なる低侵襲化、および記録信号の高品質化を目的とした。

第2章では、刺入型神経電極を用いた細胞外計測において記録される細胞外電位の発生機序について説明し、電極の埋め込みによる組織損傷が計測にどのような影響を与えるのか、等価回路モデルを用いて記述した。ニューロン死滅による距離の増大、およびグリア細胞の凝集による瘢痕インピーダンスが、SNR 等の記録品質の劣化を引き起こすため、低侵襲な刺入型電極の開発が求められる。さらに、生体計測を行うにあたって問題となるノイズについて説明し、特に高インピーダンス電極での計測や、マウスが自由に行動する環境下では、高品質なニューロン計測が困難であることを述べた。

第3章では、低侵襲デバイスの作製に向けて、本研究の核である VLS 結晶成長技術の原理と、本技術を用いた神経電極である Si マイクロニードル電極デバイスの作製方法について述べた。VLS 結晶成長は、液体金属触媒を介して気相原料を固体結晶として析出させる成長促進機構である。触媒の大きさや位置により結晶成長を自由に制御可能であり、高アスペクト比の単結晶構造が形成可能で

あることから、マイクロニードルの作製に適している。そのため次章以降では、この技術を基盤として、低侵襲マイクロニードル電極の開発を行った。

第4章では、従来の VLS-Si マイクロニードルブロックモジュールの課題であった、剛性基板による慢性損傷の低減に向けて、Parylene 基板を導入し、脳組織上で浮遊可能なデバイス構造を実現した。まず、“フレキシブル基板 Si マイクロニードル電極”の作製プロセスを示した。作製プロセスとして、まず従来の VLS 結晶成長技術に従って、Si マイクロニードルを Si 基板上に形成した。その後、Parylene 蒸着により基板を形成し、Au のスパッタリングによる配線形成、および Parylene による絶縁皮膜形成を行った。最後に、ニードル先端を開口し、Parylene 基板をニードルごと硬い Si 基板からリリースすることで、デバイスの完成とした。また、Pt black を先端にめっきすることで、インピーダンスを低下させた。次に、マウスを用いた長期ニューロン計測を行った。マウスの大脳皮質一次視覚野 (V1) に作製したデバイスを埋め込み、LED による視覚刺激を与えることで、神経性の応答信号を記録した。その結果、埋め込みから 1 日後に spike 信号の計測に成功し、さらに 1 年を超えてその信号取得能力を示した (最大 617 日間)。また、埋め込み 1 ヶ月後の PSD 解析では、ノイズレベルが低く、Si マイクロニードルによる組織損傷 (グリオーシス) が抑制されていることが示唆された。免疫組織化学解析においても、電極近傍 (0~50 μm) におけるニューロン死滅が市販のタングステン電極より少なく、電極を埋め込んでいない組織 (sham control) と比較しても差がないことが明らかとなった。ここで用いたタングステン電極は、提案デバイスと同程度のサイズであるが、頭蓋に完全に固定するような埋め込み方法を採用している。この結果から、基板のフレキシブル化が慢性損傷の低減に直接的に寄与していることを示している。これらの結果から、“フレキシブル基板 Si マイクロニードル電極”の低侵襲性が証明されたが、ニードルの剛性が慢性損傷の原因として懸念されるため、第5章においてこの解決を試みた。

また、記録信号の高品質化に向け、作成したデバイスの構造を活かしたノイズ低減手法を提案した。記録電極である Si マイクロニードル電極とリファレンス電極を近接配置し、局所的な差動計測を行うことでノイズを低減した。実装方法として、Si マイクロニードル電極を支持するピン型電極をリファレンス電極として用いることで、記録電極と同一領域の脳表直上で差動計測を行うことを可能とした。マウス自由行動下での計測において、高周波ノイズ (500~1500 Hz) が従来比で約 20%に減少した。これによって、微小電極の課題であった記録信号の高品質化を達成し、自由行動下においても spike 信号の記録が可能となった。

第5章では、ニードルのフレキシブル化により、慢性損傷のさらなる低減を行った。第4章で作製した Si マイクロニードル電極内部の Si を除去し、中空構造を有する直径 5 μm の“Parylene マイクロニードル電極デバイス”を実現した。

まず、シミュレーションによってタングステンニードル、Si ニードル、Parylene ニードルの機械的柔軟性を算出した結果、それぞれ 44.3 N/m, 25.7 N/m, 2.86 N/m であり、Parylene ニードルが最も柔軟性を有することが分かった。また、マウス脳を用いた刺入実験の結果、挿入用シャトルなどを必要としない自立刺入が可能であり、柔軟性を有したまま急性損傷を最小限に抑えられることを確認した。また、免疫組織化学解析により、剛性の高い Si マイクロニードルと比較して、電極近傍 (0~10 μm) のニューロン密度が高いことが明らかとなった。これは、ニードルの柔軟性が慢性損傷の低減に寄与することを示している。さらに、1 ヶ月間の電気生理学的評価においても、spike 信号の SNR および発火頻度の上昇、LFP (γ 帯域) の回復が観察され、電極近傍組織の機能的回復を反映していることが示唆された。

本研究全体を通じて、提案する“フレキシブル基板 Parylene マイクロニードル電極デバイス”の低侵襲性が明確に示された。まず、ニードルの先端直径が 5 μm と非常に微小であるため、刺入時の組織変性や血管損傷を大幅に抑制し、急性損傷が低減可能である。また、デバイスをフレキシブル基板上に構成することで、継続的な脳のマイクロモーションに追従し、慢性損傷の抑制にも寄与する。主に基板は縦方向の動きに、ニードルは横方向の動きにそれぞれ追従する構造的な特性を持つため、脳組織との相対的ずれを効果的に緩和する。また、Parylene マイクロニードル電極での計測は 30 日間までしか行えていないが、“フレキシブル基板 Si マイクロニードル電極”を用いて 20 ヶ月以上の長期ニューロン計測に成功しているため、同等以上の成果が期待できる (Table 6.1, Figure 6.1)。

他のデバイスと比較した際の決定的な差は、急性損傷の低さにある (Table 6.1, Figure 6.1) ¹⁻⁸。一般的に、フレキシブル電極は自立刺入が困難であり、挿入用シャトルなどの補助構造を必要とするが、本研究で開発したデバイスは、柔軟性を保ちつつも自立刺入が可能であり、硬膜を直接貫通できる点で他に類を見ない。この特性により、硬膜除去に伴う手術中の損傷を回避でき、スムーズな電極刺入が実現した。さらに、急性損傷が低いことは神経ネットワークの構造的・機能的維持にもつながり、より自然な状態の神経活動を長期にわたり記録できるという点で、従来デバイスでは到達し得なかった領域を切り開いたといえる。

一方で、今回作製したデバイスは、近年開発されている他の電極と比べて、ニードル長さ、およびチャンネル数が限られる点が課題として挙げられる。本研究で作製した長さ 400 μm の単一チャンネルニードル電極では、海馬や視床などの深部領域の記録は不可能であり、また複数領域にわたる高密度脳マッピングにも不十分である。そのため、VLS 成長条件の最適化による伸長化や、触媒ドットアレイ形成によるマルチチャンネル化が次の重要なステップとなる。さらに、Parylene 膜厚の低減、ニードル基部直径の縮小、および先端のナノスケール化により柔軟性を高めることで、さらなる組織損傷の抑制が期待される。

本提案デバイスは、脳組織および神経ネットワークの構造と機能を保持したまま神経活動を計測できる新たなプラットフォームとして、次世代の神経インターフェース技術への応用が見込まれる。優れた慢性記録性能は、神経疾患モデル動物を対象とした長期モニタリングや、自由行動下における神経活動の解析など、多様な神経科学研究への展開を可能にする。特に、慢性疼痛モデルへの応用においては、アストロサイトの慢性的な活性化が病態形成に関与すると考えられているため^{9,10}、電極埋め込みに伴う炎症の影響を抑制できる点で有用である。さらに、ニードルの微小性を活かすことで、幼齢・老齢個体からの神経記録が可能となり、発達障害やアルツハイマー病の病態解明への寄与が期待される。加えて、血管が脆弱な糖尿病モデルに対しても有用である¹¹。将来的には、本技術を発展させることで、ヒト応用を見据えた低侵襲型 BMI/BCI への展開が期待される。

Table 6.1 従来技術と本研究を比較したベンチマーク¹⁻⁸

Electrode device	Diameter (Width)	Flexibility	Term	Acute damage	Chronic damage
MTE probe ^[1]	8.6 μm	rigid	70 days	\triangle	\times
VLS-Si microneedle ^[2] (Si-block substrate)	< 5 μm	rigid	180 days	\circ	\times
SiMNA ^[3]	10 μm	semi-flexible	196 days	\triangle	\triangle
Mesh electronics ^[4] (Syringe injection)	100 μm	flexible	240 days	\times	\circ
NET electrode ^[5]	50 μm	flexible	290 days	\times	\circ
UFTEs ^[6]	50 μm	flexible	300 days	\times	\circ
Neuropixels ^[7]	70 μm	rigid	309 days	\times	\times
Mesh electronics ^[8] (Guide arm)	400 μm	flexible	400 days	\times	\circ
VLS-Si microneedle (Parylene substrate)	< 5 μm	semi-flexible	617 days	\circ	\triangle
Parylene microneedle	< 5 μm	flexible	—	\circ	\circ

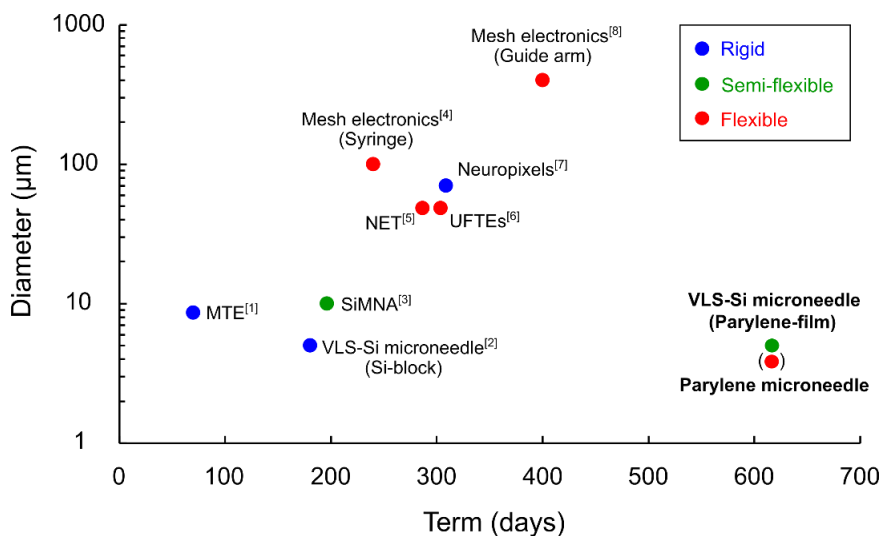


Figure 6.1 電極直径と記録期間を指標としたベンチマーク

参考文献

1. Kozai, T. D. Y. *et al.* Ultrasmall implantable composite microelectrodes with bioactive surfaces for chronic neural interfaces. *Nat. Mater.* **11**, 1065–1073 (2012).
2. Yamashita, K. *et al.* A floating 5 μm -diameter needle electrode on the tissue for damage-reduced chronic neuronal recording in mice. *Lab Chip* **22**, 747–756 (2022).
3. Lee, S. H. *et al.* Scalable thousand channel penetrating microneedle arrays on flex for multimodal and large area coverage brainmachine interfaces. *Adv. Funct. Mater.* **32**, 2112045 (2022).
4. Fu, T.-M., Hong, G., Viveros, R. D., Zhou, T. & Lieber, C. M. Highly scalable multichannel mesh electronics for stable chronic brain electrophysiology. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **114**, E10046–E10055 (2017).
5. Zhao, Z. *et al.* Ultraflexible electrode arrays for months-long high-density electrophysiological mapping of thousands of neurons in rodents. *Nat. Biomed. Eng.* **7**, 520–532 (2023).
6. Yasar, T. B. *et al.* Months-long tracking of neuronal ensembles spanning multiple brain areas with Ultra-Flexible Tentacle Electrodes. *Nat. Commun.* **15**, 4822 (2024).
7. Steinmetz, N. A. *et al.* Neuropixels 2.0: A miniaturized high-density probe for stable, long-term brain recordings. *Science* **372**, eabf4588 (2021).
8. Zhao, S. *et al.* Tracking neural activity from the same cells during the entire adult life of mice. *Nat. Neurosci.* **26**, 696–710 (2023).
9. Nam, Y. *et al.* Reversible Induction of Pain Hypersensitivity following Optogenetic Stimulation of Spinal Astrocytes. *Cell Rep.* **17**, 3049–3061 (2016).
10. Miyamoto, K., Ishikura, K. ichiro, Kume, K. & Ohsawa, M. Astrocyte-neuron lactate shuttle sensitizes nociceptive transmission in the spinal cord. *Glia* **67**, 27–36 (2019).
11. Sanda, R. *et al.* Low-invasive neural recording in mouse models with diabetes via an ultrasmall needle-electrode. *Biosens. Bioelectron.* **240**, 115605 (2023).

謝辞

本論文は、筆者が豊橋技術科学大学 電気・電子情報工学専攻 集積電子システムコース 河野研究室 博士後期課程において行った研究をまとめたものである。

本研究の機会を与えて頂くとともに、研究の遂行ならびに本博士学位論文の執筆にあたって終始懇切丁寧な御指導と、多くの御助言を賜りました豊橋技術科学大学 教授 博士（工学） 河野 剛士 先生に、謹んで感謝の意と敬意を表します。

本研究を進めるにあたり、多大なる御指導と御助言を賜りました豊橋技術科学大学 教授 博士（医学） 沼野 利佳 先生，特任助教 博士（工学） 山下 幸司 先生，東北大学 教授 博士（工学） 鯉田 孝和 先生，帝京大学 博士（薬学） 大澤 匡弘 先生，釧路工業高等専門学校 准教授 博士（工学） 井戸川 慎之介 先生に、この場を借りて心からの感謝の意を表します。

本論文の審査にあたり、審査会委員を務めて頂きました豊橋技術科学大学教授 博士（工学） 高橋 一浩 先生に、厚く御礼申し上げます。

また、実験の遂行に際し、常に有益な御討論と御助言を賜りました、豊橋技術科学大学 修士（工学） 四方 潤一郎 氏，修士（工学） 小谷 裕太 氏，修士（工学） 三田 理央毅 氏，修士（工学） Claire King Teck Sieng 氏，修士（工学） 清木場 悠 氏，修士（工学） Khong Yi Nern 氏，修士（工学） 斗内 凌平 氏，修士（工学） 阪野 友亮 氏，修士（工学） 淵上 晃広 氏，修士（工学） 長谷川 緑樹 氏，修士（工学） 八木 勇樹 氏，修士（工学） Chan Jun Yi 氏，修士（工学） 坂本 兼盛 氏，修士（工学） 清水 快季 氏，修士（工学） 鈴木 尚也 氏，修士（工学） 富田 健太 氏，修士（工学） 伊藤 寛記 氏，修士（工学） 近藤 悠輝 氏，修士（工学） 神園 ひなの 氏，博士前期課程 2 年 高橋 尚大 氏，Rexy Alvian Nerchan 氏，Gu Jiakuan 氏，村松 丈一郎 氏，博士前期課程 1 年 川崎 純平 氏，松下 剛芽 氏，南島 遼 氏，Goh Pei Jin 氏，Wei Ziyuan 氏，学部 4 年 米澤 栄祐 氏，岩田 流聖 氏，Yingyongpaisankul Pongsakorn 氏，TechnoPro R&D 鈴木 功 氏，横山 翔平 氏，帝京大学 学部 6 年 茅根 莉那 氏，学部 5 年 倉繁 優利佳 氏に、深く感謝の意を表します。

さらに本研究は、TUT-DC プログラム（JST 科学技術イノベーション創出に向けた大学フェロシップ創設事業 JPMJFS2121，JST 次世代研究者挑戦的研究プログラム JPMJSP2171）の助成を受けて実施されました。本プログラムを通じて、生活費および研究費の支援を受けるとともに、実務訓練においても極めて貴重な経験を積むことができました。ここに記して深く感謝申し上げます。

最後に、博士後期課程への進学を快く理解し、日々精神的・経済的に学生生活を支えてくれた両親をはじめとする家族に、心より深く感謝致します。

佐々木 陽向

研究業績

学術論文

主著

1. Hinata Sasaki, Koji Yamashita, Sayaki Shimizu, Kensei Sakamoto, Rika Numano, Kowa Koida, Takeshi Kawano, “A flexible-substrate 5- μ m-diameter needle electrode: minimizing neuronal death and enabling year-long neural recording”, *Advanced Materials Interfaces*, Volume 12, Issue 11, 2400974, June 9, 2025.
2. Hinata Sasaki, Sayaki Shimizu, Remy Alvian Nerchan, Koji Yamashita, Naohiro Takahashi, Rina Chinone, Yurika Kurashige, Rika Numano, Kowa Koida, Masahiro Ohsawa, Takeshi Kawano, “A self-insertable 5- μ m-diameter flexible microneedle for minimally invasive and stable in vivo neural recording”, *Sensing and Bio-Sensing Research*, Volume 50, 100915, December 2025.

共著

1. Joichiro Muramatsu, Kazuhiro Sonoda, Koji Yamashita, Hinata Sasaki, Takeshi Kawano and Rika Numano, “Neural activity analysis of depressive disorder model mice using the Toyohashi probe”, *Japanese Journal of Applied Physics*, Volume 64, Number 3, 03SP63, March 24, 2025.

国際会議発表

主著

1. Hinata Sasaki, Koji Yamashita, Sayaki Shimizu, Rika Numano, Kowa Koida, Takeshi Kawano, “A 5- μ m-diameter microneedle electrode-based chronic neural recording for freely moving mice”, *Neuroscience 2023*, PSTR056.12, Washington D.C., USA, November 2023.

国内会議発表

主著

1. 佐々木 陽向, 山下 幸司, 沼野 利佳, 鯉田 孝和, 河野 剛士, “マイクロニードル電極を用いた行動下マウスの脳計測技術”, 第 82 回応用物理学会秋季学術講演会, 2021 年 9 月
2. 佐々木 陽向, 山下 幸司, 清水 快季, 中村 翼, 鈴木 功, 坂本 兼盛, 神園 ひなの, 沼野 利佳, 鯉田 孝和, 河野 剛士, “低侵襲マイクロニードル電極を用いた行動下マウスの長期ニューロン計測技術”, 第 39 回「センサ・マイクロマシンと応用システム」シンポジウム, 2022 年 11 月
3. 佐々木 陽向, 山下 幸司, 清水 快季, 沼野 利佳, 鯉田 孝和, 河野 剛士, “自由行動マウスの長期脳計測に向けた低侵襲マイクロニードル電極とその実装技術”, 第 84 回応用物理学会秋季学術講演会, 2023 年 9 月
4. 佐々木 陽向, 山下 幸司, 清水 快季, 坂本 兼盛, 沼野 利佳, 鯉田 孝和, 河野 剛士, “低侵襲マイクロニードル電極による長期ニューロン計測と損傷評価”, 第 85 回応用物理学会秋季学術講演会, 2024 年 9 月
5. 佐々木 陽向, 山下 幸司, 清水 快季, 坂本 兼盛, 沼野 利佳, 鯉田 孝和, 河野 剛士, “フレキシブル基板直径 5 μm ニードル電極デバイス-組織損傷の低減による長期ニューロン計測-”, 第 34 回神経行動薬理若手研究者の集い, 2025 年 3 月
6. 佐々木 陽向, 清水 快季, Remy Alvian Nerchan, 高橋 尚大, 山下 幸司, 沼野 利佳, 鯉田 孝和, 河野 剛士, “低侵襲ニューロン計測に向けた直径 5 μm パリレンマイクロニードル電極デバイス”, 第 86 回応用物理学会秋季学術講演会, 2025 年 9 月
7. 佐々木 陽向, 山下 幸司, 清水 快季, 坂本 兼盛, 沼野 利佳, 鯉田 孝和, 河野 剛士, “低侵襲ニューロン計測に向けたフレキシブル基板直径 5 μm ニードル電極デバイス”, 第 42 回「センサ・マイクロマシンと応用システム」シンポジウム, 2025 年 11 月

共著

1. 長谷川 緑樹, 井戸川 慎之介, 山下 幸司, 佐々木 陽向, 鈴木 功, 沼野 利佳, 鯉田 孝和, 河野 剛士, “Bluetooth low energy 技術を用いたマウス脳信号の多チャンネル無線計測”, 第 82 回応用物理学会秋季学術講演会, 2021 年 9 月
2. 八木 勇樹, 清木場 悠, 山下 幸司, 佐々木 陽向, 井戸川 慎之介, 飛沢 健, 赤井 大輔, 沼野 利佳, 鯉田 孝和, 河野 剛士, “ニューロン計測用 PMOS バッファアンプの製作とマウス脳計測評価”, 第 39 回「センサ・マイクロマシンと応用システム」シンポジウム, 2022 年 11 月
3. 長谷川 緑樹, 伊藤 寛記, 井戸川 慎之介, 佐々木 陽向, 山下 幸司, 鈴木 功, 沼野 利佳, 鯉田 孝和, 河野 剛士, “マウス脳多チャンネル計測に向けた小型無線デバイスの作製”, 第 39 回「センサ・マイクロマシンと応用システム」シンポジウム, 2022 年 11 月
4. 伊藤 寛記, 長谷川 緑樹, 井戸川 慎之介, 山下 幸司, 佐々木 陽向, 沼野 利佳, 鯉田 孝和, 河野 剛士, “マウス脳用マルチチャンネル小型軽量無線計測システムの製作と評価”, 第 84 回応用物理学会秋季学術講演会, 2023 年 9 月
5. 清水 快季, 中村 翼, 佐々木 陽向, 山下 幸司, 歌 大介, 大澤 匡弘, 久米 利明, 沼野 利佳, 鯉田 孝和, 河野 剛, “脳, 脊髄ニューロン計測に向けたフレキシブル基板マイクロニードル電極の製作”, 第 40 回「センサ・マイクロマシンと応用システム」シンポジウム, 2023 年 11 月
6. 伊藤 寛記, Jiaxuan Gu, 長谷川, 緑樹, 山下 幸司, 佐々木 陽向, 沼野 利佳, 鯉田 孝和, 河野 剛士, “マウス神経介入用ワイヤレス刺激システムの製作と評価”, 第 41 回「センサ・マイクロマシンと応用システム」シンポジウム, 2024 年 11 月
7. 近藤 悠輝, 八木 勇樹, 松下 剛芽, 山下 幸司, 佐々木 陽向, 飛沢 健, 赤井 大輔, 沼野 利佳, 鯉田 孝和, 河野 剛士, “ニューロン計測用 PMOS バッファアンプ搭載マイクロニードル電極 デバイスとマウス脳計測評価”, 第 41 回「センサ・マイクロマシンと応用システム」シンポジウム, 2024 年 11 月
8. 村松 丈一郎, 佐々木 陽向, 山下 幸司, 河野 剛士, 沼野 利佳, “うつ病モデルマウスにおけるジアシルグリセロールキナーゼ β (DGK β)の薬理学的研究”, 第 47 回日本分子生物学会年会, 2024 年 11 月
9. 川崎 純平, 山下 幸司, 清水 快季, 佐々木 陽向, 沼野 利佳, 鯉田 孝和, 河野 剛士, “直径 5 μm マイクロニードル電極を用いたニューロン刺激”, 第 86 回応用物理学会秋季学術講演会, 2025 年 9 月

受賞

主著

1. 第 59 回（2025 秋季）応用物理学会講演奨励賞

佐々木 陽向，清水 快季，Rexy Alvian Nerchan，高橋 尚大，山下 幸司，沼野 利佳，鯉田 孝和，河野 剛士，“低侵襲ニューロン計測に向けた直径 5 μm パリレンマイクロニードル電極デバイス”，第 86 回応用物理学会秋季学術講演会，2025 年 9 月（受賞：2026 年 3 月）

2. 第 42 回「センサ・マイクロマシンと応用システム」 シンポジウム 五十嵐賞

佐々木 陽向，山下 幸司，清水 快季，坂本 兼盛，沼野 利佳，鯉田 孝和，河野 剛士，“低侵襲ニューロン計測に向けたフレキシブル基板直径 5 μm ニードル電極デバイス”，第 42 回「センサ・マイクロマシンと応用システム」シンポジウム，2025 年 11 月

共著

1. 第 39 回「センサ・マイクロマシンと応用システム」 シンポジウム 奨励賞

八木 勇樹，清木場 悠，山下 幸司，佐々木 陽向，井戸川 槇之介，飛沢 健，赤井 大輔，沼野 利佳，鯉田 孝和，河野 剛士，“ニューロン計測用 PMOS バッファアンプの製作とマウス脳計測評価”，第 39 回「センサ・マイクロマシンと応用システム」 シンポジウム，2022 年 11 月

2. 第 41 回「センサ・マイクロマシンと応用システム」 シンポジウム 奨励賞ファイナリスト

近藤 悠輝，八木 勇樹，松下 剛芽，山下 幸司，佐々木 陽向，飛沢 健，赤井 大輔，沼野 利佳，鯉田 孝和，河野 剛士，“ニューロン計測用 PMOS バッファアンプ搭載マイクロニードル電極 デバイスとマウス脳計測評価”，第 41 回「センサ・マイクロマシンと応用システム」 シンポジウム，2024 年 11 月