

令和 2 年 6 月 5 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K01436

研究課題名(和文)Optical stimulationを用いたBMIの培養細胞による安全性評価

研究課題名(英文)Safety evaluation of brain machine interface using optical stimulation with cultured cells

研究代表者

田代 洋行(Tashiro, Hiroyuki)

九州大学・医学研究院・講師

研究者番号：70380384

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：高密度な神経刺激を可能にするため、Photoswitchおよび赤外線による光神経刺激法の安全性確認に取り組んだ。Photoswitchとは光に感受性のない神経細胞に、遺伝子改変無しに物質添加により光感受性を付与する技術である。光感受性物質の合成時における精製純度は90%以上でない場合、合成中間体や出発物質による毒性が問題になることが明らかになった。また中赤外線刺激は水中での減衰が激しくファイバー導光でなければ神経刺激が難しいことを確認した。中赤外線刺激を使った角膜を通した網膜刺激は実現が現実的に難しく、実現には波長変換などの方法が必要である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、高密度な神経刺激を実現するために光刺激を応用した神経刺激デバイスの実現を目標に取り組んだ。我々は失明者の視覚を再建する人工網膜の開発に取り組んでいるが、健常者に匹敵する視覚再建は広く応用されている電気刺激では実現が難しい。今回、Photoswitch合成における中間体の毒性、赤外線刺激の実現性を検証した。これらの結果は光刺激による人工網膜への応用が期待できる。加齢黄斑変性、網膜色素変性といった疾患により失明に至った患者の視覚再建を引き続き目指す。

研究成果の概要(英文)：It is necessary to confirm the safety of photoswitch and infrared nerve stimulation (INS) to achieve high-density nerve stimulation by optical stimuli. Photoswitch is a technique that endows photosensitivity to nerve cells without genetic modification. The toxicity due to intermediate organisms and starting materials becomes a problem unless the purity of the photo-active molecules at the time of synthesis is 90% or more. Additionally, mid-infrared stimulation strongly attenuates in water; therefore, INS is challenging to realize without fiber guided. Retinal stimulation through the pupil using mid-infrared stimulation is practically difficult to achieve. For example, the wavelength conversion is one of the potential methods to realize INS.

研究分野：生体医工学

キーワード：人工感覚器 光神経刺激 Photoswitch 赤外線神経刺激 ブレインマシンインターフェース ディレク
トニューラルインターフェース 人工視覚システム 人工網膜

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。

1. 研究開始当初の背景

国内外において、神経や脳を電気刺激することにより外界の感覚情報を直接、脳に伝える BMI (brain machine interface)、BCI (brain computer interface)、DNI (direct neural interface) に関する研究が盛んに行われている。これらの技術は、聴覚や神経などの感覚機能を喪失した患者に対し、人工的に感覚を再生することを目指し研究開発が進められている。現在の技術においては、金属電極を用いて末梢神経細胞、中枢神経細胞を電気刺激し外界の情報を伝える方法が実用化されている。一方で、人工網膜のように高密度に情報入力が必要なデバイスの場合、高密度化による電極面積の減少は、電気分解を起こさずに安全に流しうる電流値の上限値と、神経細胞の興奮を惹起する閾値電流とはトレードオフし、金属電極を用いた電気刺激による神経インターフェースはその解像度に安全上の上限がある。

われわれは、これまで人工視覚システムの開発を通じ、*in vitro*、*in vivo* での電極の性能評価、安全評価を行うと共に、ハイドロジェルコートや、金属表面をナノ構造状に粗し、単位密度あたりの電荷注入能力を向上させた電極などの開発を行ってきた。さらなる患者の QOL の向上には 1000 極ほどの多極電極アレイを必要とし、電極の電荷注入能力の問題だけでなく刺激電極と集積回路のあいだのコネクションのスペースをどのように確保するかという問題も生じる。

2. 研究の目的

これらの問題を解決するため、近年になり電気刺激によらず光学的な神経刺激 (optical nerve stimulation) が提案されている。非接触、非配線で神経刺激を行えるため、電気刺激によるインターフェースが抱える問題を解決できるが、現時点では、光学的方法で神経刺激が行えるという初期研究の報告だけで、実用化のための安全性評価などについての研究はない。optical nerve stimulation は広義には、従来から行われているチャンネルロドプシン (ChR2: channelrhodopsin-2) の導入により光応答のない神経に光感受性イオンチャンネルを遺伝子学的に発現させる方法も含まれるが、遺伝子操作技術の医療機器への応用は安全性、倫理面の意味でも解決しなくてはならない課題が多い。本研究では、photoactive molecule といった既存のイオンチャンネルに当該分子をカップリングさせ光応答性を付与する photoswitch と呼ばれる方法 (Fig. 1) と、赤外線による刺激方法 (INS: infrared neural stimulation) の 2 種の方法に着目する。photoactive molecules については、BENAQ、DeNAQ といった分子が報告されているが、生体内での代謝、細胞に対する安全性などは明らかになっていない。INS はおよそ 1800~2200 nm の範囲の中赤外線に対し、あらゆる神経細胞に応答性があるとの報告がある。同様に長期に中赤外線パルスを繰り返し暴露させた場合の、安全性などについての報告も無い。このように optical nerve stimulation の安全性、有効性が確認できれば、電気刺激を原理にした補綴装置の性能を飛躍的に向上させ、現在、実用化されている人工内耳、人工網膜といったデバイスにより治療を行っている患者の QOL (quality of life) を著しく改善できる可能性がある。

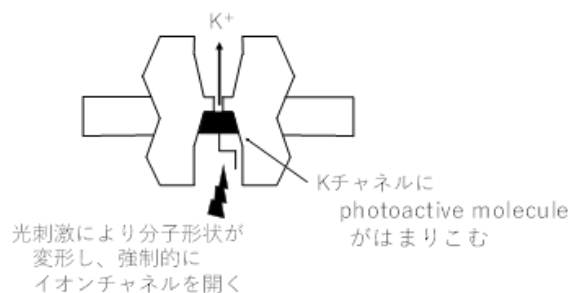


Fig. 1 photoswitch により光応答の神経細胞に光応答性を付与する原理

3. 研究の方法

BENAQ の合成過程を Fig. 2 に示す。p-nitroaniline を N-benzyl-N-ethylaniline とアゾカップリングし、アゾベンゼン誘導体である nitroazobenzene S1 を合成する。次いで、nitroazobenzene S1 存在下で、硫化ナトリウムにより芳香族ニトロ基をアミンに還元し、aminoazobenzene 4 を合成する。aminoazobenzene 4 と betain の間にアミド結合を形成し、アゾベンゼン第 4 級アンモニウム誘導体 BENAQ を得る。nitroazobenzene S1 は p-nitroaniline をジアゾ化して作製されたジアゾニウム塩を N-benzyl-N-ethylaniline とアゾカップリングして得られる。トリエチルグリシン (ベタイン) の合成は、トリエチルアミンとクロロ酢酸エチルの求核置換反応を利用する。

photoactive molecule (BENAQ) の安全性の確認のため、BENAQ 合成のために必要な出発物質、中間体の毒性評価を細胞毒性試験にて確認した。これにより BENAQ を合成する際の精製

純度を確認する。BENAQ 合成に必要な中間体、出発物質を培養液にまぜ、医療機器材料の毒性試験に一般的に使用される V79 細胞のコロニー形成率による毒性評価を行った。

また INS においてはコリメーターから出力させた 1950 nm のコリメートレーザーを光ファイバーに導入し、コア径 300 μm のファイバーから水中に出力させ、吸収エネルギー量を計測し、刺激に必要なパワー密度と神経細胞への近接距離の検討を行い、実現可能性を検討した。

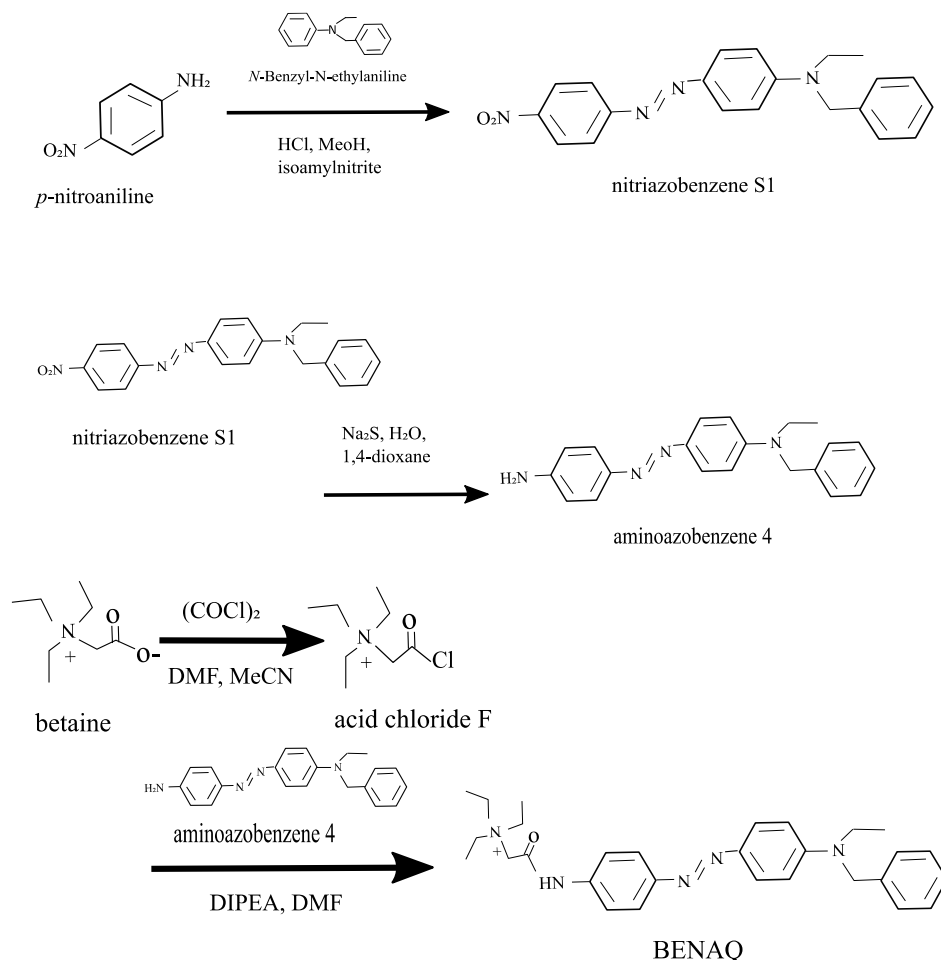


Fig. 2 BENAQ の合成

4. 研究成果

NMR (Nuclear Magnetic Resonance) を使い、nitroazobenzene S1、aminoazobenzene 4、betaine の合成の成功を確認した。aminoazobenzene 4 と betaine の間にアミド結合を形成し、アゾベンゼン第 4 級アンモニウム誘導体 BENAQ を得ることができる。nitroazobenzene S1、aminoazobenzene 4 と betaine の NMR スペクトルを Fig. 3~5 に示す。

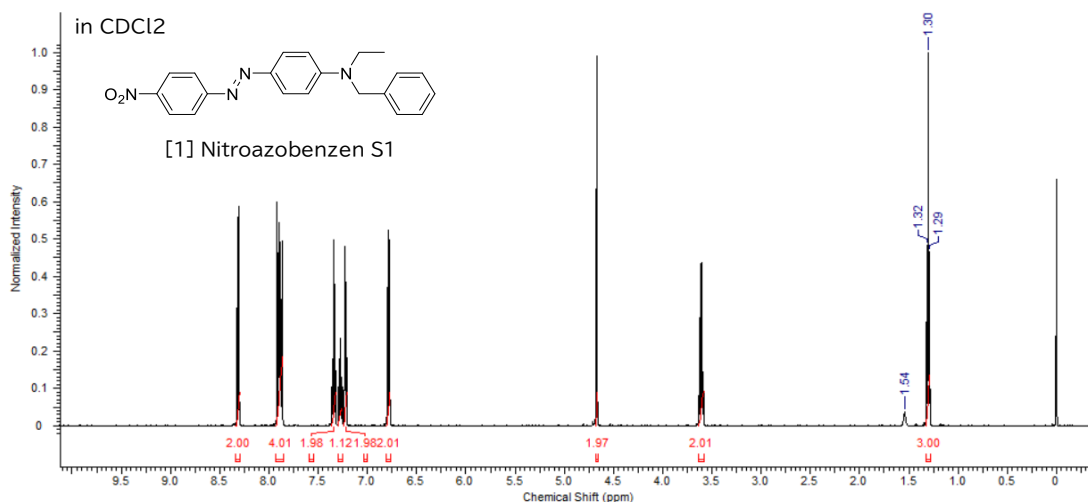


Fig. 3 nitroazobenzene S1 の NMR スペクトル

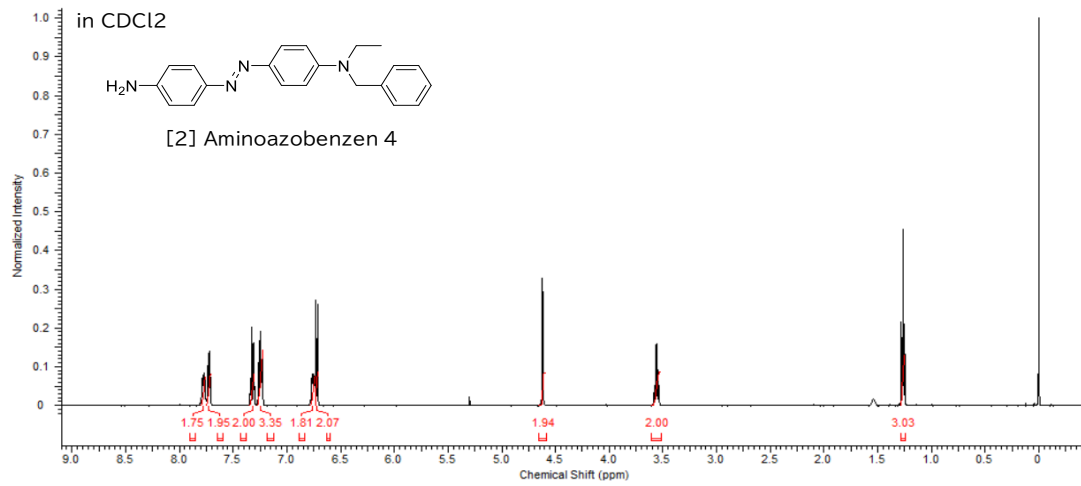


Fig. 4 aminoazobenzene 4 の NMR スペクトル

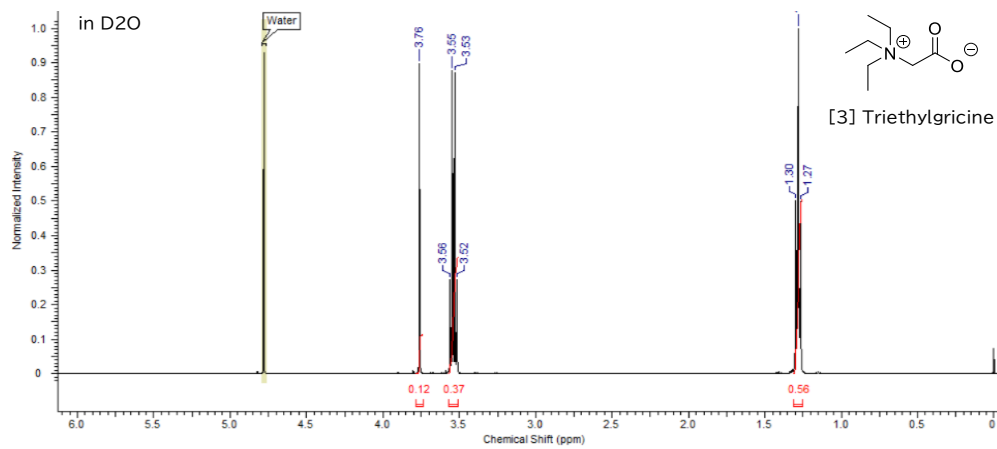


Fig. 5 triethylglycine の NMR スペクトル

BENAQ の合成中間体 nitroazobenzene S1 の毒性評価結果を Fig. 6 に示す。nitroazobenzene S1 は 10 $\mu\text{mol/L}$ 以上の濃度で、nitroazobenzene S1 を添加しない培地で培養した場合に比べ、形成コロニー数が有意に減少した。rd1 マウス網膜に対する最大効果濃度 100 $\mu\text{mol/L}$ の BENAQ 中に残留する nitroazobenzene S1 が細胞毒性を示さないためには、精製時に 90%以上の純度の分取クロマトグラフィーが要求されることが分かった。

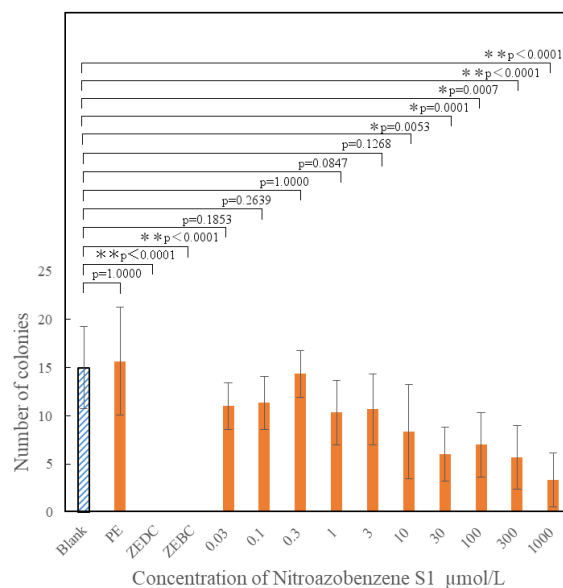


Fig. 6 nitroazobenzene S1 の毒性評価結果

中赤外線の純水中の透過曲線を Fig. 7、生理食塩水通の透過曲線を Fig. 8 に示す。水中での吸光係数は純水に対して 100 cm^{-1} 、生理食塩水などの電解液に対しては $120\sim 130\text{ cm}^{-1}$ であった。これより、 $10\sim 20\ \mu\text{m}$ の距離で $1/10$ ほど減衰することが分かる。人工網膜に応用する際、角膜を通して中赤外線刺激を非侵襲的に網膜刺激を行うのは現実的ではなく、直接、中赤外線刺激を行う場合は、光ファイバーで導入したり赤外域のレーザーダイオードアレイの開発などが必要である。より波長が短い近赤外領域の光をカーボンナノチューブシートに照射し、そこから放出される中赤外線で刺激する方式も考えられる。

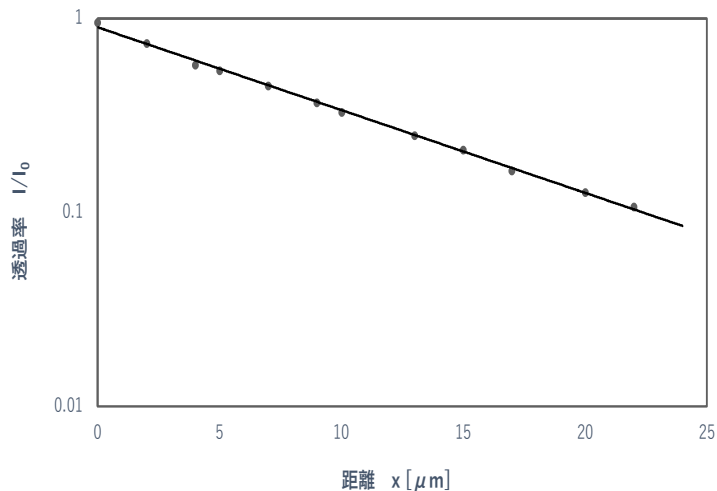


Fig. 7 超純水中における中赤外線レーザー光の減衰

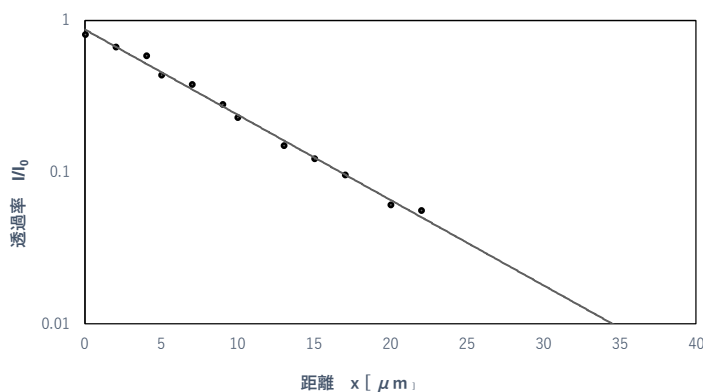


Fig. 8 超純水中における中赤外線レーザー光の減衰

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 7件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 7件）

1. 著者名 吉村 優里奈, 土井 春奈, 寺澤 靖雄, 田代 洋行	4. 巻 117
2. 論文標題 Nitoroazobenzene S1の細胞毒性試験による Photoswitch・BENAQ合成で要求される精製純度の検討	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 電子情報通信学会技術研究報告	6. 最初と最後の頁 59-64
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 吉村優里奈, 田代 洋行, 栢森 裕三	4. 巻 117
2. 論文標題 神経インターフェースの安全性評価のための神経培養細胞を用いた動物実験代替法の基礎的検討	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 電子情報通信学会技術研究報告	6. 最初と最後の頁 13-16
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計19件（うち招待講演 3件 / うち国際学会 6件）

1. 発表者名 野村修平, 田代洋行, 寺澤靖雄, 太田淳
2. 発表標題 失われた視覚機能の再生を目指した光による網膜神経刺激法
3. 学会等名 2020年日本生体医工学会九州支部学術講演会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 遠坂眞悠, 田代洋行
2. 発表標題 光刺激を使用した視覚再生に向けた中赤外線レーザー光の生体内減衰量の計測
3. 学会等名 2020年日本生体医工学会九州支部学術講演会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Hiroyuki Tashiro
2. 発表標題 A review of optical neural stimulation: considering applications to artificial retina
3. 学会等名 2019 NAIIST NCTU Joint Workshop on Biomedical Devices and Materials (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 吉村 優里奈, 土井 春奈, 寺澤 靖雄, 田代 洋行
2. 発表標題 Nitoroazobenzene S1の細胞毒性試験による Photoswitch・BENAO合成で要求される精製純度の検討
3. 学会等名 MEとバイオサイバネティクス研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 吉村 優里奈, 田代 洋行, 栢森 裕三
2. 発表標題 神経インターフェースの安全性評価のための神経培養細胞を用いた動物実験代替法の基礎的検討
3. 学会等名 MEとバイオサイバネティクス研究会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 Takashi Tokuda, Jun Ohta, Hiroyuki Tashiro, Yasuo Terasawa, John G. Webster (ed.)	4. 発行年 2018年
2. 出版社 John Wiley & Sons	5. 総ページ数 17
3. 書名 Encyclopedia of Electrical and Electronics Engineering, Ch. Retinal Prosthesis	

1. 著者名 Hiroyuki Tashiro, et al., Marko B. Popovic (Ed.)	4. 発行年 2019年
2. 出版社 Elsevier	5. 総ページ数 668
3. 書名 Biomechatronics	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	寺澤 靖雄 (Terasawa Yasuo)	(株)ニデック・人工視覚研究所・所長	
連携研究者	太田 淳 (Ohta Jun) (80304161)	奈良先端科学技術大学院大学・先端科学技術研究科・教授 (14603)	
連携研究者	桑原 真理子 (Kuwabara Mariko) (80772938)	帝京大学・福岡医療技術学部・非常勤講師 (17102)	
連携研究者	野村 修平 (Nomura Shuhei) (00825432)	帝京大学・福岡医療技術学部・助教 (32643)	