

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26350561

研究課題名(和文) BMI, BCI医療機器の安全性評価のための培養細胞による通電毒性評価法の開発

研究課題名(英文) Development of toxicity evaluation method of electrical stimulation by cultured cells for safety assessment of BMI and BCI medical equipment

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) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：チャイニーズハムスター肺線維芽細胞のコロニー形成阻害評価による電気刺激の生体への安全性を評価する in vitro 評価系を開発した。また神経培養細胞を用い、蛍光カルシウムインジケータと Microelectrode array を用いた神経インパルスを記録し、in vitro で機能維持まで含めた評価系を開発した。家兔を用い、長期間の通電に対する安全性評価を行う実験系の開発に成功した。

研究成果の概要(英文)：We developed an in vitro evaluation system to evaluate the safety of electrical stimulation to the living body by observation of colony formation inhibition of Chinese hamster lung fibroblasts. We also used nerve cultured cells to record nerve activity using fluorescent calcium indicator and microelectrode array. This made it possible to evaluate safety, including whether the function is maintained in vitro. We succeeded in developing an experimental system that uses rabbits to evaluate safety against electrical stimulation for a long time.

研究分野：医用工学

キーワード：BMI BCI 医療評価技術 細胞毒性 電荷注入能力 電気刺激 安全性評価

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)に関する研究が盛んに行われている。これらの技術は、聴覚や視覚などの生体機能を喪失した患者に対し、人工的に感覚を再生する医療機器を供給することが研究・開発のインセンティブの主たるものである。医療機器としての実用化を考えた場合、脳や神経に直接接触する形で人工物を埋植し、電気刺激を長期間与え続けることの安全性の確認が機器そのものの開発以上に重要かつ、時間的にも金銭的にもコストのかかる問題となる。

BMI の要となる電気刺激が生体に及ぼす悪影響としては、刺激電流が生体組織に流れ、発熱することにより生じるジュール熱による熱的熱傷と、パルス状の刺激電流を通電した際、電極電位が水の電位窓(ファラデー窓)を超えることにより電極の電気分解が生じ、局所的な pH 変化や塩素ガスが発生することによる化学熱傷、同じく電極を通じて直流が流れることにより生じる化学熱傷の3つがある。このうち、電気分解に関するものは、電極の生体内での耐久性にも影響する。局所的な pH 変化に対する電極の性能としては、電荷注入能力 (Charge Injection Capacity; CIC) が知られているが、CIC の計測はリン酸緩衝生理食塩水などの生体模擬液の中で通電し、電極電位がファラデー窓を超えない範囲の最大電流(電荷注入能力)として評価される。CIC が大きな電極ほど、電気分解を起こしにくい電極であるが、生体模擬液と実際の生体内での反応様式は大きく異なり、CIC の値は同一条件下で計測した電極間の相対的な性能比の指標としては役立つが、その値をもって、生体内で電気分解を起こさない安全値とすることはできない。実際、*in vivo* での CIC の値は、*in vitro* での CIC 値の 1/4 ~ 1/5 ほどである。ただし、*in vivo* で CIC を超える電流を流しても生体側にも多少の耐性があり、ただちに危害が及ぶものでもなく、*in vivo* での CIC を計測してもその値が、安全閾値とはなり得ないことが分かっている。そのため、総合的な安全評価は実際に動物に埋込んで長期間の安全性を評価することになる。厚生労働省の次世代医療機器評価指針 - 神経機能修飾装置に関する評価指標 - においても、48 時間の通電における障害が生じる閾値電流の評価、6 ヶ月以上の長期埋植評価が必要としている。*in vivo* でのこのような評価は、機器の総合的な安全性を判断するには役立つが、障害が生じた際、なにが原因で生じているかの追求には向いていない。また指針で定める安全閾値のような評価も多量な頭数の動物を必要とし、パルス幅などの条件をふった評価値も薬事承認には必要と判断された場合には、組み合わせは膨大になり、そのために必要な労力、時間的、金銭的なコ

ストは計り知れない。

2. 研究の目的

BMI, BCI を構造上持つ医療機器の開発には、その安全性を評価するのに CIC 評価と *in vivo* での埋植試験の中間にあたるような評価系が開発されると、その実用化に大きく寄与する

そこで、培養細胞に通電し、培養細胞に障害が生じる電流、*in vivo* での障害が生じる電流値、*in vivo*, *in vitro* での CIC を対比させることで、動物実験を行うより簡便に生体に与える影響を評価する系の開発をはかる。また、このような評価系は、動物実験では行いにくい、障害の生じる原因究明にも役立つ。

この研究では、このような動物実験や臨床試験による安全性評価の代替評価系となる、培養細胞による BMI の安全性評価系の開発を目的とする。実現されれば、BMI, BCI の開発が動物実験や臨床試験による安全性評価の閾の高さ、必要な期間の長さやコスト面から遅滞、断念するケースをなくし、BMI 機器、BCI 機器の実用化を加速する必須の評価技術となると考える。また、倫理的な観点からも、動物実験によらない安全試験系は重要な意味を持つ。簡易に行える安全評価系の作成やそれに基づくガイドライン策定は、レギュラトリーサイエンス分野では重要な課題で、医療機器産業を活性化させる上で貢献できる点も多い。既存の生体材料との安全性対比のため、細胞毒性評価に最も多用されるチャイニーズハムスター肺線維芽細胞(V79 細胞)を用いた評価系を確立する。また、マウス神経芽細胞(NG108-15 細胞)を用い、神経系への影響を V79 細胞と比較する。

3. 研究の方法

マイクロポアフィルター上に培養細胞を播種し、その直下においた刺激電極から刺激電流を7日間通電し、コロニー形成の違いを観察することにより毒性評価を行う(図1)。対照材料とし、医療機器の安全性評価において細胞毒性の程度がよく知られている ZDEC 含ポリウレタンフィルム、ZDBC 含ポリウレタンフィルムなどの材料を使用する。間接接触法を用いた試験を行う。培養細胞は、医療機器の細胞毒性試験に最も多用されるチャイニーズハムスター肺線維芽細胞(V79 細胞)を使用する。毒性の程度が明確な既存の細胞毒性試験の結果と対比させることにより、刺激電流が細胞に与える影響の大きさの推測、および、培養液中で電気化学的に計測した電荷注入能力値と対比させ、電荷注入能力値が細胞毒性に対して持っている意味合いを評価する。

刺激電流のパルス幅、繰返し頻度など電流振幅以外のパルスパラメーターを変化させ培養細胞に与える影響を、それらパラメーターの影響を電荷注入能力値と対比させた評価を行う。また、マウス神経芽細胞

(NG108-15 細胞)を用い、神経系細胞の活動を計測する。Ca²⁺蛍光プローブ Fluo-8 用いた光学応答、Microelectrode Array (MEA)を用いた電氣的神経応答をとらえ評価する。
 家兎眼に刺激電極を埋込み、埋植通電実験から、生体に与える評価を、誘発電位などを用いた生理学的評価および組織学的評価によって行う。

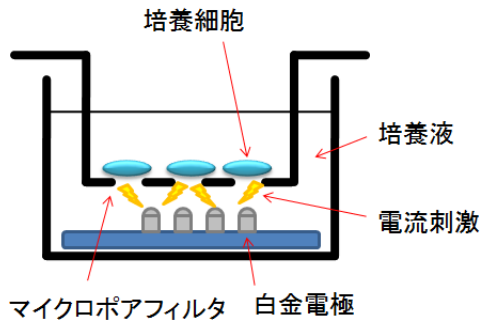


図1 培養細胞を用いた通電毒性評価系

4. 研究成果

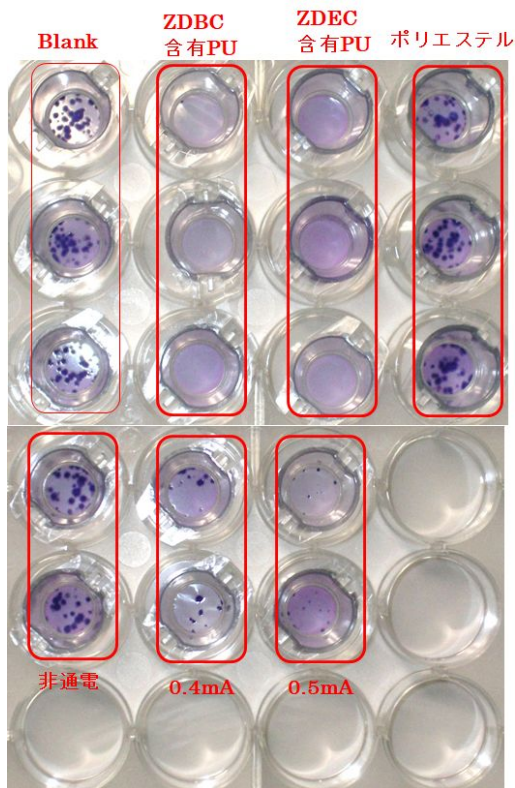


図2 V79 細胞を使用した通電毒性評価

図2に示すように間接接触による通電によりコロニー形成が阻害され、生体への影響を *in vitro* で評価可能なことが確認できた。対照材料による毒性は間接接触では細胞への負荷が大きく、完全にコロニー形成が阻害された。抽出法などによる段階的な毒性負荷が有用であると考える。V79 細胞は外部刺激によ

り変異しやすく、通電はCIC以下で行ったが、コロニー形成が阻害された。この方法で、評価できる安全率の見積もりは *in vivo* での評価結果の対比が必要である。図3に示すように図1と同様の電極配置で電気刺激を加えCa²⁺蛍光プローブ応答の記録に成功した。これにより、通電後コロニーの形成といった形態的な評価だけでなく、神経細胞の機能が維持されているかの機能的評価が可能である。また、図4に示すようにMEA上に培養した神経細胞からの自発スパイクの記録に成功し、より直接的に神経活動の評価が可能となった。

また、図5に示すように家兎眼球に長期間電気刺激を行える系を作成し、3ヶ月連続刺激(1日8時間)後の光刺激誘発電位、電気刺激誘発電位の記録に成功し刺激電流に対する安全性を評価する *in vivo* 実験系を確立した。図6に示すように摘出眼による形態的な損傷も観察可能である。今後は、*in vitro* の評価結果と *in vivo* での評価結果を対比させ、動物実験によらない培養細胞によるニューラルインターフェースの安全性評価系を確立する。

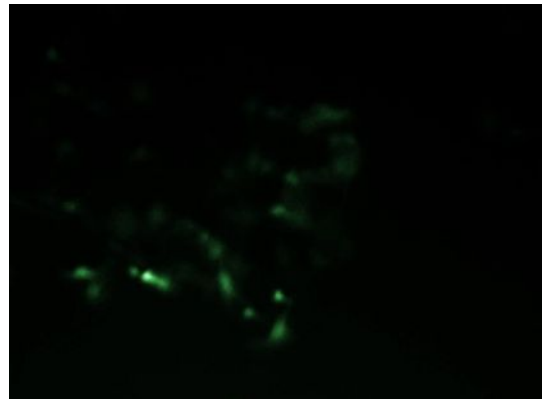


図3 電気刺激によるCa²⁺蛍光プローブを用いたNG108-15細胞のCa²⁺応答

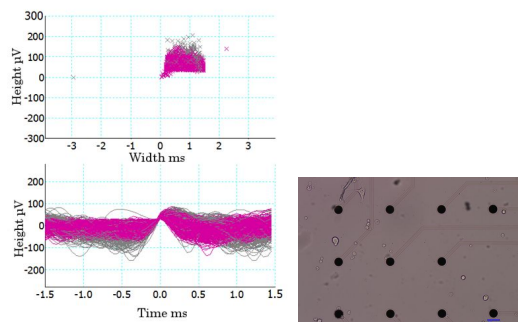


図4 MEA上の神経細胞からの自発スパイクの記録

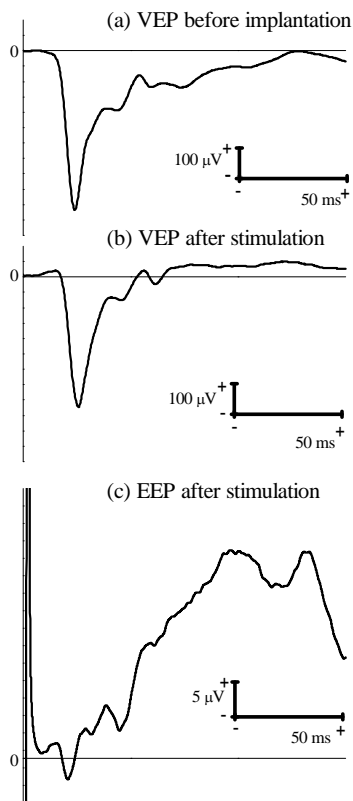


図5 兎眼球に対する長期刺激に後の誘発電位記録による安全性評価

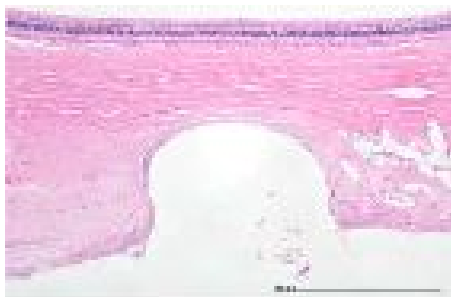


図6 兎眼球に対する長期刺激後の組織学的評価

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計3件)

Kuwabara Mariko, Hiroyuki Tashiro, Yasuo Terasawa, Koji Osawa, Takashi Tokuda, Jun Ohta, Takashi Fujikado, Development of Chronic Implantable Electrodes for Long-term Visual Evoked Potential Recording in Rabbits, *Advanced Biomedical Engineering*, 査読有, 6, 2017, 59-67
DOI: 10.14326/abe.6.59

桑原 真理子, 田代 洋行, 寺澤 靖雄, 中野 由香梨, 吉村 優里奈, 大澤 孝治, 野田 俊彦, 徳田 崇, 太田 淳, 人工視覚システム安全性評価のためのEISを用いた *in vivo* における誘発電位記録電極の界面特性解析, 電子情報通信学会技術研究報告, 査読無, Vol. IEICE-116, No. 435, 2017, 25-29

<http://www.ieice.org/ken/paper/20170128ybPX/>

Hiroyuki Tashiro, Yasuo Terasawa, Kuwabara Mariko, Koji Osawa, Takashi Tokuda, Takashi Fujikado, Initial Evaluation of the Safety and Durability of Retinal Prostheses Based on Suprachoroidal-transretinal Stimulation using Bullet-shaped Platinum Electrodes, *Advanced Biomedical Engineering*, 査読有, Vol. 6, 2017, 8-14
DOI: 10.14326/abe.6.8

〔学会発表〕(計13件)

Yasuo Terasawa, Hiroyuki Tashiro, Yukari Nakano, Motoki Ozawa, Stability of the suprachoroidal electrode array during one-month implantation in rabbit eyes, The Annual Meeting of the Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO) 2017, 2017/05/10, Baltimore Convention Center, Baltimore, USA

桑原 真理子, 田代 洋行, 寺澤 靖雄, 中野 由香梨, 太田 淳, 家兎におけるセボフルラン吸入麻酔を用いた視覚誘発反応の計測, 2017年日本生体医工学会九州支部学術講演会, 2017/03/04, 九州大学

桑原 真理子, 田代 洋行, 寺澤 靖雄, 中野 由香梨, 吉村 優里奈, 大澤 孝治, 野田 俊彦, 徳田 崇, 太田 淳, 人工視覚システム安全性評価のためのEISを用いた *in vivo* における誘発電位記録電極の界面特性解析, 電子情報通信学会 ME と バイオサイバネティクス研究会, 2017/01/28, 九州大学

Kuwabara Mariko, Hiroyuki Tashiro, Yasuo Terasawa, Yukari Nakano, Yurina Yoshimura, Koji Osawa, Toshihiko Noda, Takashi Tokuda, Jun Ohta, Long-term Analysis of the *In Vivo* Characteristics of a Recording Electrode with Electrochemical Impedance Spectroscopy, International Conference on BioSensors, BioElectronics, BioMedical Devices,

BioMEMS/NEMS & Applications (Bio4Apps 2016), 2016/12/14, Griffith University, Gold Coast, Australia

Mariko Kuwabara, Hiroyuki Tashiro, Yasuo Terasawa, Koji Osawa, Takashi Tokuda, Jun Ohta, Takashi Fujikado, Development of Chronic Implantable Electrodes for Long-term Visual Evoked Potential Recording to Evaluate the Safety of Visual Prostheses in Rabbits, 生体医工学シンポジウム 2016, 2016/09/17, 旭川大雪クリスタルホール国際会議場

Hiroyuki Tashiro, Yasuo Terasawa, Mariko Kuwabara, Koji Osawa, Takashi Tokuda, Jun Ohta, Takashi Fujikado, Development of an Evaluation System for Chronic Safety of Retinal Prostheses, 生体医工学シンポジウム 2016, 2016/09/17, 旭川大雪クリスタルホール国際会議場

桑原 真理子, 田代 洋行, 寺澤 靖雄, 大澤 孝治, 人工視覚システム安全性評価のための長期間視覚誘発電位記録電極の経時的特性変化の解析, 2016年電子情報通信学会総合大会, 2016/03/15, 九州大学

吉村 優里奈, 田代洋行, 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, 2016年日本生体医工学会九州支部学術講演会, 2016/03/05, 佐賀大学

Yukari Nakano, Yasuo Terasawa, Hiroyuki Tashiro, Koji Osawa, Motoki Ozawa, Takashi Fujikado, Safety assessment of chronic electrical stimulation to rabbit retina for six months by Femtosecond Laser-induced Porous electrode of visual prosthesis, The Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO) 2015 Annual Meeting, 2015/05/03, Colorado Convention Center, Denver, USA

Yasuo Terasawa, Hiroyuki Tashiro, Yukari Nakano, Koji Osawa, Motoki Ozawa, Toshihiko Noda, Takashi Tokuda, Jun Ohta, Takashi Fujikado, Long Term Recording of Charge Injection Capacities of Suprachoroidally implanted Porous Platinum Electrodes, The Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO) 2015 Annual Meeting, 2015/05/03, Colorado Convention Center, Denver, USA

中野 由香梨, 寺澤 靖雄, 田代 洋行, 大澤 孝治, 大槻 幹, 人工視覚システム用レーザー加工刺激電極による1ヶ月間の慢性電気刺激の評価, 第52回日本生体医工学会大会, 2014/06/26, 仙台国際センター

Yasuo Terasawa, Hiroyuki Tashiro, Yukari Nakano, Koji Osawa, Motoki Ozawa, Toshihiko Noda, Takashi Tokuda, Jun Ohta, Takashi Fujikado, Charge Injection Capacities of Femtosecond Laser-induced Porous Electrodes measured in vitro and in vivo: Comparison between porous and smooth electrodes, The Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO) 2014 Annual Meeting, 2014.05.05, Orange County Convention Center, Orlando, USA

Hiroyuki Tashiro, Yasuo Terasawa, Yukari Nakano, Koji Osawa, Motoki Ozawa, Toshihiko Noda, Takashi Tokuda, Jun Ohta, Takashi Fujikado, Safety Assessment of Chronic Suprachoroidal-Transretinal Stimulation in Normal Rabbits by the Femtosecond Laser-induced Porous Electrodes, The Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO) 2014 Annual Meeting, 2014/05/05, Orange County Convention Center, Orlando, USA

〔産業財産権〕

出願状況 (計0件)

取得状況 (計0件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田代 洋行 (TASHIRO, Hiroyuki)
九州大学・大学院医学研究院保健学部門検査技術科学分野・講師
研究者番号: 70380384

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

桑原 真理子 (KUWABARA, Mariko)
九州大学大学院医学研究院保健学部門検査技術科学分野・助教
研究者番号: 80772938
(平成27年度より連携研究者)

(4)研究協力者

寺澤 靖雄 (TERASAWA, Yasuo)

(株)ニデック・研究開発本部人工視覚研
究所・所長