

ドラッグデリバリーシステム機能を有する生分解神経プローブの開発

Development of Neural Probes Coated Biodegradable Polymer with Drug Delivery System

研究代表者 東京大学大学院工学系研究科 先端学際工学専攻博士課程 加藤康広
(現 日本電信電話株式会社 NTTコミュニケーション科学基礎研究所)

[研究の目的]

本研究は、“人間と機械の調和を、生体医工学の立場から促進する”ことを目指し、多点電極と薬剤徐放機能を賦与した、脳と機械を直接繋ぐ柔軟神経プローブの提案と開発を目的とした。このような神経プローブの実現は、人工視覚や人工内耳などの人工装具への応用のみならず、現在完治することのない脊椎損傷やパーキンソン病などの神経疾患に対して、新しい治療方法を提案・提供する強い意義がある。

[研究の内容、成果]

2005年米国のCyberkinetics社は、剣山型神経プローブを脊髄損傷患者の脳皮質に埋込み、脳を直接コンピュータへ接続してコンピュータを操作することに成功した。このような脳と機械を直接接続する生体医工学技術の発展は、神経部位との代替を可能にするとされ、中枢神経系の損傷や疾患によって衰えたまたは失った機能を回復させることができる新しい治療方法を提案、提供すると高く期待されている。一方、脳と機械を繋ぐ神経プローブの既存技術は、刺入や留置によって損傷させた脳組織を回復させることが困難であったために、計測対象である神経細胞の死滅などを招いて長期間安定した神経活動の計測を実現できなかった。そこで本研究は、ドラッグデリバリーシステム(DDS)技術を応用したマイクロスフィアからの薬剤徐放により、刺入や留置によって損傷した脳組織の回復促進と、柔軟材料をプローブ基板材料として微細加工技術にて作製される多点柔軟神経プローブによる留置時の脳損傷軽減という2つの機能

を同時に有した神経プローブを提案し、下記の課題に対する検討または開発を行った。

- 1) 損傷組織を回復させるDDSの応用
 - 2) 脳組織損傷を軽減するプローブ基板の開発
 - 3) 留置された神経プローブの脳への影響
- 以下に詳細を述べる。

1) 損傷組織を回復させるDDSの応用

従来の神経プローブでは、プローブによって損傷した脳組織の回復を望むことはできない。そこで、損傷した脳組織の回復を促進させるために、DDS、特にマイクロスフィアによる薬剤送達方法を神経プローブへと組み合わせることを提案し、溶媒蒸発法により作製した(図1)。

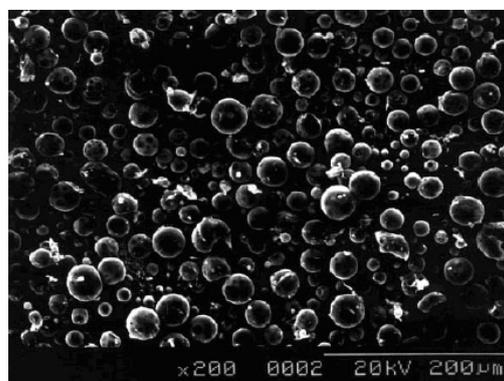


図1. 作製されたマイクロスフィアのSEM(scanning electron microscope)画像.

材料は、薬剤を包埋するキャリアとして1ヶ月程度の生分解速度を有する50/50 poly(DL-lactide-co-glycolide) (50/50 DLPLG)という生分解ポリマーと、損傷した神経細胞の回復促進と維持に効果があるとされるNGFを用いた。また、神経プローブに固着可能なサイズとなるようにホモジナイズの分散速度を調整し、NGFマイクロスフィアの粒子径が10[μm]から

30[μm]となるよう作製した。

次に、リン酸緩衝生理食塩水にマイクロスフィアを浸漬して 37 度でインキュベートし、NGF-Enzyme-linked Immunosorbent Assay を用いてマイクロスフィアからの NGF の徐放量を定量した。2 週間に渡るインキュベーションの結果、2~6[ng/ml]の NGF の徐放を確かめられた。さらに、マイクロスフィアから徐放された NGF の活性は、ラット副腎褐色細胞腫細胞 (PC12) を用いて確かめた。無血清下において 8 日間インキュベートしたコントロールと NGF が徐放された結果を、それぞれ図 2 に示した。図 2(a) がコントロール、図 2(b) が NGF の包埋されたマイクロスフィアがまかれたディッシュである。図 2(a) では、PC12 の神経化はみられないが、図 2(b) では、PC12 の神経化、Neurites の伸展と増加を観察でき、徐放された NGF の活性保持を定性的に確かめた。

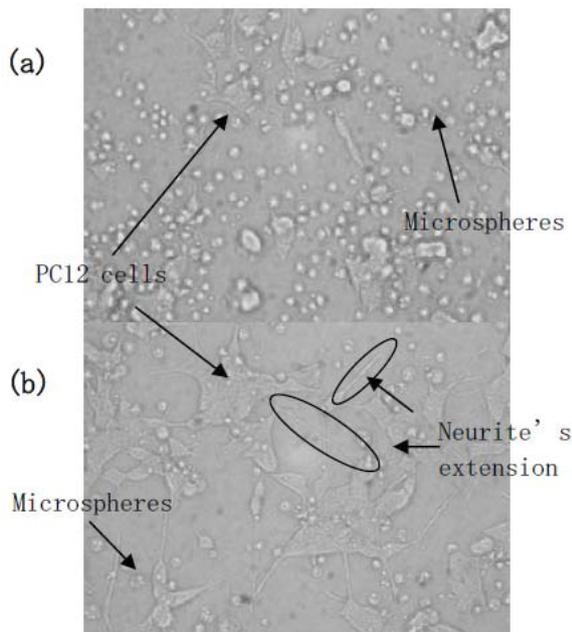


図 2. 徐放された NGF による PC12 神経化の写真(無血清下において 8 日間インキュベート). (a)コントロール(マイクロスフィアに NGF が包埋されていない). PC12 の神経化はみられない. (b) PC12 の神経化、Neurites の伸展と増加がみられる.

2) 脳組織損傷を軽減するプローブ基板の開発

従来の神経プローブ基板は容積が大きく、プローブの刺入と留置によって脳組織を大きく損傷させていた。そこで、留置後における脳への侵襲を小さくするために、神経プローブ基板の容積を加工限界まで縮小したスケルトン型神経プローブを提案した (図 3)。これは計測に必要な金配線とパリレン絶縁層のみ残し、固着されたマイクロスフィアにより薬剤を徐放することで、脳組織の損傷軽減と損傷した脳組織の回復を同時に図ることができる、従来にない神経プローブである。

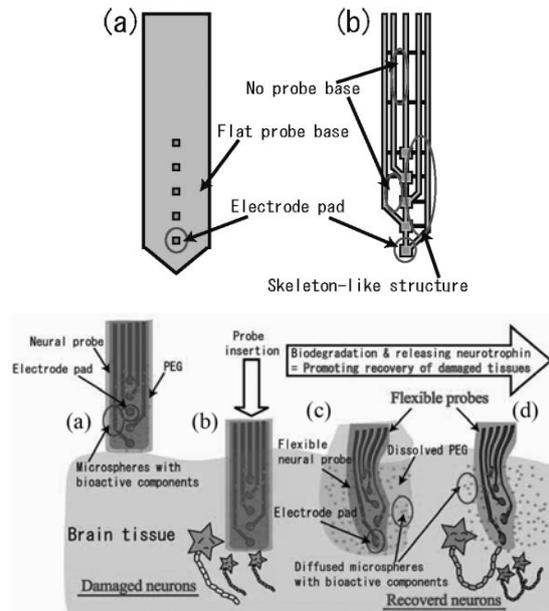


図 3. スケルトン構造を有する神経プローブの概念図. 上図: (a)は従来の神経プローブを示し、スケルトン構造を有した神経プローブ(b)がプローブ容積を縮小したことを示す. 下図: (a) 薬剤を徐放するマイクロスフィアと刺入強度を高める PEG が固着されたプローブ. (b) PEG により刺入強度を高めて、脳へ刺入されたプローブ. この際、刺入により神経などの脳組織が損傷する. (c) 刺入後に PEG は溶解し、プローブの柔軟性が戻る. スケルトン構造を有し薄く極細のプローブは、脳の動きに柔軟に追従すると共に脳組織と一体化し、プローブと脳組織のずれなどによる組織損傷を軽減する. (d)マイクロス

ィアから一定期間薬剤が徐放され、損傷した脳組織の回復が促進する。

A: 非感光性材料の工程 B: 感光性材料の工程

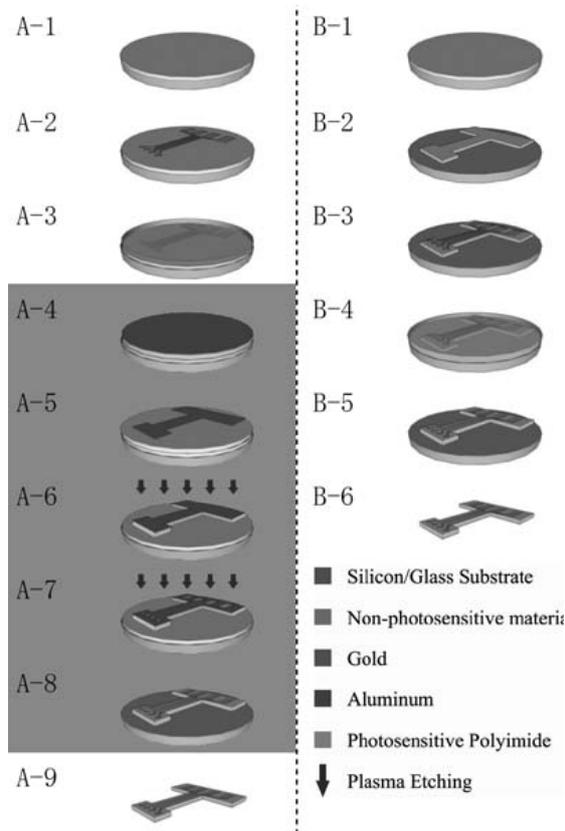


図 4. 神経プローブの作製工程. A: 非感光性材料による作製工程. B: 感光性材料による作製工程. A-4 から A-8 の灰色背景部はドライエッチング工程を示す. (A-1) 非感光性材料を基板にコート, (A-2) 金の蒸着と金配線をパターンニング, (A-3) さらに金配線を絶縁するために非感光性材料をコート, (A-4) ドライエッチング (プラズマエッチング) の保護膜としてアルミニウムを蒸着, (A-5) 神経プローブの外枠形状にパターンニング, (A-6) ドライエッチングにより神経プローブの外枠形状を作製, (A-7) ドライエッチングにより非感光性材料に絶縁された電極を露出, (A-8) アルミニウム保護膜を除去, (A-9) 基板から神経プローブを剥離. (B-1) 基板に感光性材料をコート, (B-2) 感光性材料を神経プローブの外枠形状にパターンニング, (B-3) 金の蒸着と金配線のパターンニング, (B-4) さらに金配線を絶縁するために感光性材料をコート, (B-5) 神経プローブの外枠形状と露出する電極をパターンニング, (B-6) 基板から神経プローブを剥離.

まず、微細加工技術を用いた設計と試作を行い、微細なスケルトン構造が作製可能であることを示した。しかしながら、図 4 左図に示すように、パリレンに代表される非感光性材料を用いた神経プローブの作製工程は非常に複雑であるばかりか、ドライエッチング装置などを含む高額な装置と維持管理を費やし、廉価に作製することは困難であった。そこで、パリレンなどの非感光材料にかわり、感光性ポリイミドを柔軟材料基板とする神経プローブの作製を行った。感光性ポリイミドを用いることで複雑なドライエッチング工程を省略し、より容易にかつ廉価な神経プローブの作製を実現した (図 5)。

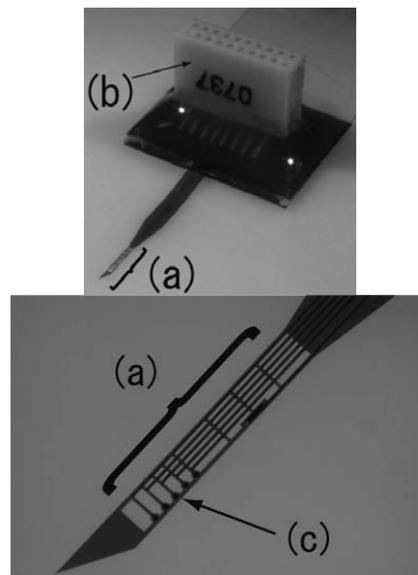


図 5. 感光性ポリイミドを用いて作製したスケルトン神経プローブの写真. 上図: スケルトン神経プローブの全体図. 下図: スケルトン神経プローブの刺入部位拡大図. (a) スケルトン構造を有する刺入部位. (b) コネクタ部. (c) 計測用電極.

次に、ラットを用いた急性実験を行った。単一の生分解性ポリマーでは、刺入強度と薬剤を適切に徐放する機能を同時に保有できない。そこで PEG (polyethylene glycol) と、薬剤を徐放するマイクロスフィアによるハイブリット生分

解性ポリマーを作製し、それらをプローブに固着させることで、座屈や破断などを生じず柔軟神経プローブの脳皮質または小脳への刺入と、神経活動の計測に成功した。なお、全ての動物実験は、東京大学実験動物委員会及び NTT コミュニケーション科学基礎研究所研究倫理委員会の定めるガイドラインに準拠して実施した。

3) 留置された神経プローブの脳への影響

作製したスケルトン型神経プローブを1週間ラット脳内へ留置し、脳を摘出して所定の細胞を各々染色することで脳組織における神経プローブの影響を観察した(図 6)。染色は、ヘマトキシリン・エオジン染色(全ての細胞を染色)、NewN 染色(神経細胞を染色)、GFAP 染色(アストロサイトを染色)、CD68 染色(ミクログリアを染色)を行った。

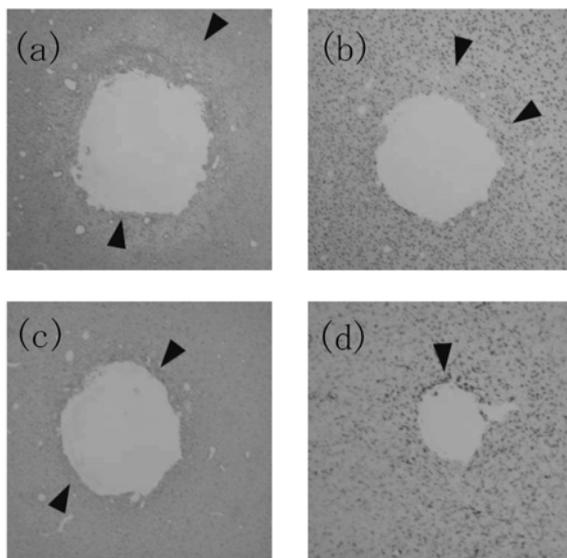


図 6. 1 週間ラット脳内へ留置された神経プローブ周囲の脳組織染色写真. 中心の空隙部位がプローブの留置部位を示し、矢印は特徴的に染色されている部位を示す. (a) ヘマトキシリン・エオジン染色された写真. (b) NewN 染色された写真. (c) GFAP 染色された写真. (d) CD68 染色された写真.

神経プローブが留置された空隙部周囲には、

神経細胞が少なく(図 6(b))、アストロサイトとミクログリアが凝集した瘢痕化(図 6(c), (d))が観察される。これは、神経プローブの刺入と留置により周囲の脳組織が損傷した結果、神経細胞が死滅し、瘢痕化したと考えられる。しかし、瘢痕部位は、周囲近傍のみに限られ、空隙部周囲への広い拡散はみられない。従って、留置された神経プローブの大きなずれなどは生じず、スケルトン構造によって脳組織とのプローブのずれを軽減できたと考えられる。

[今後の研究の方向、課題]

本研究では、NGF を包埋した DDS マイクロスフィアを作製し、NGF の徐放量と薬剤の活性を *in vitro* で評価し、*in vivo* に向けた有用性を示した。また、スケルトン構造を有する神経プローブを提案し、より簡易で廉価に作製する方法を実現と、神経系活動の計測に成功した。今後は、慢性埋め込みによる神経活動の計測と、神経プローブより徐放された薬剤の脳組織への影響評価を検討している。

[成果の発表、論文等]

- 1) Yasuhiro Kato, Katuhiro Maki, Shigeto Furukawa, Makio Kashino: A Photosensitive Polyimide based Method for an Easy Fabrication of Multichannel Neural Electrodes, Proc. IEEE Engineering in Medicine and Biology Society, 2008. 8(予定).
- 2) 加藤康広, 牧勝弘, 古川茂人, 柏野牧夫: 聴皮質計測に向けた感光性ポリイミドによる脳表電極の開発, 第 31 回日本神経科学大会, 東京, 2008 年 7 月(予定)
- 3) Y. Kato, T. Suzuki, K. Mabuchi: Development of mesh-structure multichannel flexible neural probe, Proc. 19th International Microprocesses and Nanotechnology Conference, pp.370-371, 2006. 10.
- 4) Y. Kato, I. Saito, T. Hoshino, T. Suzuki, K. Mabuchi: Preliminary Study of Multichannel Flexible Neural Probes Coated with Hybrid Biodegradable Polymer, Proc. IEEE Engineering in Medicine and Biology Society, pp.660-663, 2006. 8.
- 5) 加藤康広, 鈴木隆文, 満洲邦彦: Skeleton-Like Multichannel Flexible Neural Probe Coated with Hybrid Biodegradable Polymer, 第 29 回日本神経科学大会, 京都, 2006 年 7 月
- 6) Y. Kato, M. Nishino, I. Saito, T. Suzuki, K. Mabuchi: Flexible Intracortical Neural Probe with Biodegradable Polymer for Delivering Bioactive Components, Proc. 2006 International Conference on

Microtechnologies in Medicine and Biology,
pp. 143-146, 2006. 5