

令和2年12月21日

報道機関 各位

東北大学学際科学フロンティア研究所
東北大学大学院医工学研究科
東北大学大学院医学系研究科

生体への適用が可能な pH 可視化プローブの開発 脳深部における pH のリアルタイム観察に成功

【発表のポイント】

- 多機能ファイバ¹⁾と半導体センサ²⁾の複合により、生体への適用が可能な pH 可視化プローブを初めて開発した
- 脳内の複数点における pH の微小変化を、高感度かつ非標識で補足することに成功した
- 脳が正常に活動している状態とてんかんを起こした病態において、脳深部の海馬における pH をリアルタイムで可視化することに成功した

【概要】

脳の正常な活動には、適正なイオンバランスが不可欠です。特に pH は、ある一定の範囲内で厳密に調節されており、その範囲を大きく超えると脳の異常活動を引き起こすと指摘されています。高い時間・空間分解能で脳内の pH を測定できれば、脳機能の理解、病気のメカニズムの解明や予防・治療に繋がることが期待されます。

東北大学の学際科学フロンティア研究所郭媛元助教(本学医工学研究科・医学系研究科兼務)と医工学研究科吉信達夫教授、医学系研究科虫明元教授らは、熱延伸技術³⁾で作製された多機能ファイバと、イオン濃度分布を可視化できる半導体化学イメージセンサ²⁾を組み合わせることで、生体埋め込み型の新しい pH 可視化プローブを開発し、脳内の複数点において pH 変化を同時に高感度で測定することを可能にしました。また、世界で初めて、脳深部の海馬において、疼痛刺激に伴う pH の微小変化をリアルタイムで補捉することに成功しました。さらに、脳がてんかんを起こした病態において、海馬における pH をリアルタイムでイメージングすることにも初めて成功しました。

本研究成果をまとめた論文は、バイオセンサ分野におけるトップジャーナルである「Biosensors and Bioelectronics」に11月28日付で掲載されました。

【研究の背景】

脳の中には、神経細胞やグリア細胞があり、複雑な回路が形成されて様々な信号が細胞間で伝達されています。脳回路の中で、神経細胞が電気活動していることを記録する技術は既に成熟しています。しかし、脳内の細胞間コミュニケーションを担っているのは繊細な化学信号であり、その活動を観察する技術は今のところ、細胞や組織を蛍光標識する必要がある光学的なイメージング法に限られています。それ故、脳内で化学信号を高感度かつ非標識で記録できる新たな技術が必要とされていました。様々な化学信号のうち、pH（水素イオン濃度）は脳の恒常性を維持するために、ある一定の範囲内で厳密に調節されています。もし脳細胞周辺で pH がその範囲を大きく超えてしまうと、脳の異常活動を引き起こしてしまうことから、てんかん、脳虚血、うつ病などの病気との関連が指摘されています。脳細胞間の pH コミュニケーションを動的に可視化できれば、pH と脳活動の関連や、病気のメカニズムの解明および予防・治療にも繋がっていくと期待されます。

既存の主な生体内 pH 測定技術は以下のようにまとめられます。核磁気共鳴画像法（Nuclear Magnetic Resonance (NMR)）を用いた生体内 pH 測定法は、時間・空間分解能が低いため、脳内で起こっている細胞レベルの活動を観察することが難しいという問題があります。また、電気化学的原理に基づく pH 電極は、極めて局所の計測に限られてしまいます。光学的なイメージング法では、細胞や組織を蛍光標識することが必要となり、生体本来の活動を妨げる可能性があります。また、光学顕微鏡下での観察となるため、測定対象の動物は固定されたままとなり、行動との因果関係を調べる場合の制限となります。そこで、生体埋め込み型で、高い時間・空間分解能を持つイオン可視化ツールの新たな開発が重要となってきました。

【本研究の内容】

本研究では、イオン濃度の分布を可視化できる半導体化学イメージセンサと、多機能ファイバ技術を組み合わせることによって、新しい生体埋め込み型の pH 可視化プローブを実現しました。化学イメージセンサは Light-addressable potentiometric sensor (LAPS) と呼ばれる半導体センサの原理を利用しています。LAPS は半導体基板上にイオン感応面となる絶縁層を形成した構造を持ち、イオン濃度の空間分布に対応して、センサ面上に電位の分布が生じます。その結果、電界効果によって半導体中に生じる空乏層の静電容量が各点ごとに異なるため、各点を変調光で照射して得られる光電流を計測することによって、イオン濃度分布を画像化することができます。

しかし、平面構造を持つ LAPS は、そのままでは生体内に埋め込むことが困難でした。この課題を解決するため、必要な構造や機能を自在に組み合わせたプロ

ープを作製することができる熱延伸技術を活用し、LAPS の生体内の応用に必要な光導波路バンドル・導線・参照電極などの機能を集積した複合プローブを開発しました。この方法は「金太郎飴」を作る方法と似ており、まず集積したい各要素を束ねた成形物（～20 mm）を作製し、これを加熱しながら引き伸ばすことによって、内部の幾何学的構造を維持したまま、直径が数百マイクロンのプローブを作製することができます。さらに、LAPS と多機能ファイバの複合化により、オールインワン (all-in-one) プローブ型のイオン可視化ツールを実現しました。開発した pH 可視化プローブを用いて、脳深部の海馬において、疼痛刺激に伴う pH の微小変化を世界で初めてリアルタイムに捕捉することに成功しました。さらに、海馬回路への光刺激によっててんかんを起こす遺伝子組み換えラット (Thy1-CHR2V)⁴を用い、病態における脳深部海馬回路の pH 変化をリアルタイムで可視化することにも成功しました。

【本研究の成果・意義】

新規開発したオールインワンプローブ型のイオン可視化ツールは、多機能ファイバと光アドレス型半導体センサを組み合わせることにより、多機能ファイバ本来の機能にイオンイメージング機能を付与し、ファイバや半導体センサ単体だけでは実現できない飛躍的な機能を集積した発明になります。

この pH 可視化プローブを利用し、世界で初めて、脳深部において、細胞や組織を蛍光標識することなく、pH 変化をリアルタイムで可視化することに成功しました。さらに、これを利用し、遺伝子組み換えラット (Thy1-CHR2V) の脳深部の海馬回路に光刺激を与え、てんかんの発生や伝播と pH 変化の関連性を詳しく調べることができました。今後も、てんかんの病理や新たな予防・治療方法につながっていくと期待されます。

本研究で開発したイオン可視化ツールは、斬新な脳機能研究を発展させることができ、これまでに解明されていない病気の原因や治療法の研究において重要な貢献になると考えています。

本研究は、東北大学学際科学フロンティア研究所が主体となり、科学技術振興機構 (JST) センター・オブ・イノベーション (COI) プログラム (H31W15-1・R02W02-3)、および日本学術振興会科学研究費助成事業若手研究 (18K15337) からの支援を受けて実施されました。本研究成果をまとめた論文は、バイオセンサ分野におけるトップジャーナルである「Biosensors and Bioelectronics」に 11 月 28 日付で掲載されました。

【今後の展望】

- 本研究で開発した pH 可視化プローブは、時間分解能が 30 ms、空間分解能が 250 μm であり、従来の方法では困難だった高時間分解能と高空間分解能の両立を可能とした。今後は時間・空間分解能をさらに改善し、神経活動に伴うイオン濃度の速い変化を測定できるようにしたい。

- pHだけではなく、さまざまなイオンや神経伝達物質なども同時に計測できるように開発を進めたい。
- 複数の機能を自在に集積できるファイバ技術を駆使し、神経の光刺激・電気記録・化学的可視化などの機能を一体化した複合多機能デバイスを開発し、脳機能のより深い理解に貢献したい。

【用語説明】

1) 多機能ファイバ

直径 100～500 μm 程度の繊維の中に、光・電気・液体・化学・機械など、さまざまな要素を操作したり測定したりするのに必要な構造を集積したものである。

2) 光アドレス型半導体化学センサ (LAPS)

LAPS は化学センサの一種であり、非標識 (ラベルフリー) でセンサ表面の pH 分布を取得することができる。LAPS は電解質溶液-絶縁体 ($\text{Si}_3\text{N}_4/\text{SiO}_2$)-半導体 (Si) からなる構造を有している。 Si_3N_4 表面が pH 感応部として機能する。外部から電圧を印加した状態で半導体基板に変調光を照射すると、光励起により外部回路に交流光電流が流れる。この光電流は Si_3N_4 表面上の溶液の pH に依存している。したがって、外部回路に流れる交流光電流の振幅値を計測することにより、照射領域における試料の pH 測定が可能である。このように、LAPS では光の照射面積で測定領域を定義できるという特徴があるため、光でスキャンして得られる各測定点の光電流値から、 Si_3N_4 表面上の溶液の pH の二次元分布を取得することが可能である。

3) 熱延伸技術

熱延伸技術で利用できる材料は単一の材料に限定されず、金属・半導体・ポリマーなど多種類を組み合わせることが可能である。この技術は「金太郎飴」を作る方法と似ており、最初に、必要な多種類の材料を組み合わせた大きいプリフォームという成形物を作り、これを加熱しながら引き伸ばすことによって、電気・化学・光などの機能をマイクロからナノレベルで集積した、長さ数千メートルのファイバを作製することができる。

4) 遺伝子組み換えラット (Thy1.2-CHR2V)

光によって活性化するイオンチャネルである「チャンネルロドプシン 2 (ChR2)」をラットの脳神経細胞に導入したトランスジェニックラットである。このラットの一系統においては、中枢神経系の様々な神経細胞に ChR2 が発現し、光刺激に

応答した活動を惹起できる。

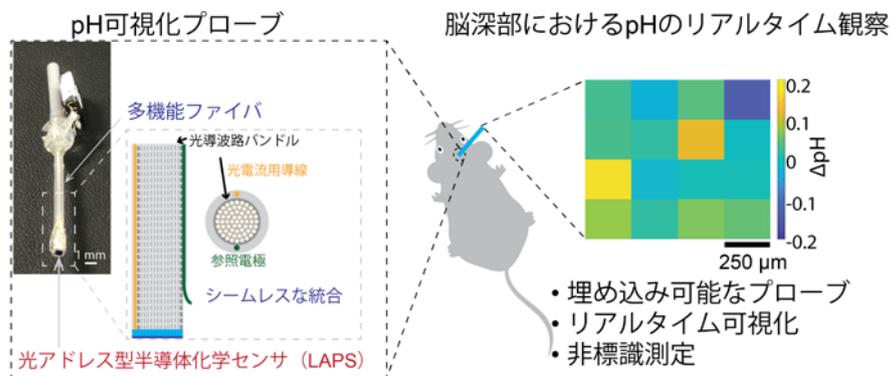


図 1：pH 可視化プローブの開発と脳内 pH 測定への応用。多機能ファイバとイオン分布を可視化できる半導体センサ LAPS の複合により、pH 可視化プローブを開発することができた。さらに、脳深部における pH の変化を高感度かつリアルタイムで可視化することに成功した。

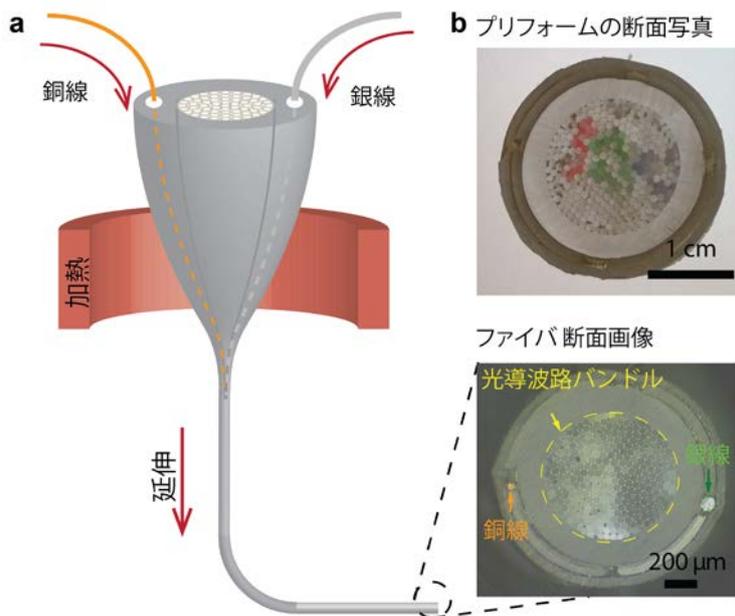


図 2：「金太郎飴」の作り方に似た、熱延伸プロセスによる多機能ファイバの作製。従来の熱延伸技術を革新し、熱機械的な特性が不揃いな材料（例えば、融点が高い銅線や銀線など）も同じファイバ内に収容できるように改良した。

【論文情報】

Yuanyuan Guo*, Carl Frederik Werner, Shoma Handa, Mengyun Wang, Tomokazu Ohshiro, Hajime Mushiake, Tatsuo Yoshinobu, (*corresponding author)

Miniature multiplexed label-free pH probe in vivo,
Biosensors and Bioelectronics, 2020, 112870,
ISSN 0956-5663,
DOI: 10.1016/j.bios.2020.112870

【問い合わせ先】

(研究に関して)

東北大学学際科学フロンティア研究所

助教 郭媛元

E-mail: yyuanguo@fris.tohoku.ac.jp

(報道に関して)

東北大学学際科学フロンティア研究所

URA 鈴木一行

電話: 022-795-4353

E-mail: suzukik@fris.tohoku.ac.jp