

令和 3 年 10 月 21 日現在

機関番号：32619

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17H02088

研究課題名(和文) 分子インプリント高分子型センサを用いたパーキンソン病治療用脳深部刺激制御法の開発

研究課題名(英文) Development of closed-loop system of deep brain stimulation using sensor by molecularly imprinted polymer

研究代表者

吉見 靖男 (YOSHIMI, Yasuo)

芝浦工業大学・工学部・教授

研究者番号：30267421

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,600,000円

研究成果の概要(和文)：前年度に引き続き、分子インプリント高分子(MIP)をグラファイト粒子の表面にグラフトし、ドーパミンに対して感応性のある電気化学センサの開発を試みた。MIPの合成の際にアリルアミノカルボキシプロピオン酸-3-フェロセン(ACPF)を加えることで、若干ドーパミンに対する選択性を高めることができることが確認できた。しかし脳内の疾患部位を厳密に特定するにはその選択性は不十分である。そのため、伝達物質に対して蛍光強度を変化させる蛍光分子インプリント高分子ナノ粒子をガラス板に固定することで、目的伝達物質を高選択的かつ高速に検出できるオプティカルセンサができることが解った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

神経伝達物質は、脳内疾患の主要因子であることが多く、この分泌の量やタイミングをモニタリングすることで、最適な治療を施せる可能性がある。脳内の伝達物質の検出には従来は柔軟な炭素電極を挿入する方法と、中空系透析膜を挿入する方法がある。しかし前者は選択性が低く、後者はタイムラグが大きい。当初計画していたMIPを電極に固定するタイプの電気化学センサでは十分な選択性が得られなかった。しかし並行して行った、蛍光MIPナノ粒子は選択性が高く、これを透明基盤に固定したオプティカルセンサは、応答速度も高い。脳内の伝達物質をリアルタイムにモニタリングするデバイスとして期待できる。

研究成果の概要(英文)：As in the previous year, we attempted to develop an electrochemical sensor sensitive to dopamine by grafting molecularly imprinted polymers (MIPs) onto the surface of graphite particles. The addition of ACPF to the synthesis of MIP slightly increased the selectivity for dopamine. However, the selectivity is insufficient for precise identification of the disease site in the brain. For this reason, it was found that an optical sensor that can detect the target transmitters selectively and rapidly can be made by fixing fluorescent molecularly imprinted polymeric nanoparticles that change their fluorescence intensity to the transmitters to a glass plate.

研究分野：医用化学工学

キーワード：神経伝達物質 分子インプリント高分子 モニタリング 神経 蛍光物質 ナノ粒子

1. 研究開始当初の背景

パーキンソン病は、中脳黒質におけるドーパミン分泌不全に起因する、安静時のふるえ、動作開始の遅れ、筋肉の極度なこわばりなどの運動障害を特徴的な症状とする進行性神経変性疾患である。この疾患の有病率は人口 1000 人に 1 人と、アルツハイマー病に次いで高いが、2016 年現在において根本的な治療法は、確立されていない。我が国では特定疾患に指定されている。対症療法としては、第一に薬剤投与によるドーパミン分泌促進が選択されるが、効果がない場合は外科療法の脳深部電気刺激 (Deep Brain Stimulation: DBS) が選択される。この DBS は脳内の視床、視床下核などに電極を留置し、パルス状に電流を発生させて、刺激することで、不足しているドーパミンの分泌を促す仕組みである。DBS で有効に治療するには、電極のパルス電位やパルス幅、周期が重要とされている。しかし、これらのパラメーターの調整は、患者の発作症状の観察所見に応じて、医師が手動で行っているのが現状である。この操作には、数週間の時間を要し、その間、患者は発作による苦痛に耐えなければならない。患者の生活の質を高めるためには、急な容態変化に常時対応でき、発作を未然に防げる、自動制御法の確立が望まれる。

脳内のドーパミンの放出をモニタリングできれば、その急激な変化に応じて電気刺激のパラメーターを自動調節するクローズドループ型の DBS を開発することで治療効果が高まると考えられる。これを実現するには、体内留置が可能なドーパミンセンサを新たに開発する必要がある。アンペロメトリー電極を脳内に留置して、ドーパミンを検出する方法については、国内外で多くの研究者に研究されているが (例えば、K. Yoshimi *et al*, Plos One, 2015 や H.R. Rees *et al*., *Anal. Chem.*, 2015)、電極に選択性を持たせる素子が使われていないため、ドーパミン濃度変化を正確に捉えるのに十分な選択性が無い。

2. 研究の目的

パーキンソン病は神経伝達物質であるドーパミンの生成量が少なくなり運動能力が阻害される病気である。パーキンソン病の治療方法には脳深部刺激療法 (Deep Brain Stimulation: DBS) という、脳深部に電極を埋め込み直接電気刺激を与えることでドーパミンの放出を促す治療方法がある。しかし、電気刺激が適切でないと、副作用が発生するため、現状では 3~6 ヶ月かけて刺激を調整している。そこで本研究室では、この調整を自動化するために、分子インプリントポリマー (Molecularly Imprinted Polymer: MIP) を用いた体内留置型のドーパミンセンサの開発を検討している。MIP は鋳型物質と特異結合能を有する合成高分子であり、MIP の利点として、物理的にも化学的にも安定であり、体内留置に期待できる。MIP を用いたドーパミンセンサを開発することができれば、脳内のドーパミンの分泌量をモニタリングしながら電気刺激を随時調整できるため、調節期間を設けずに副作用を軽減することが期待できる。

3. 研究の方法

以下の手法を計画してきた。

(1) 分子インプリント高分子を固定した電極を作製

脳内の神経伝達物質であるドーパミンを鋳型とした MIP を固定したセンサを作製し、ドーパミンを高選択的に検出できるセンサを代表者の吉見が開発する。

(2) 分担者の氷見が、パーキンソン病モデルマウスを作製する。さらに脳深部刺激による

治療効果を評価できる、治療モデルを作製する。

(3) 脳深部に開発した電極を留置し、ドーパミン量をモニタリングしながら、電気刺激することで、高い治療効果をもたらすことを確認する。

4. 研究成果

4-1: 電気化学式ドーパミンセンサの開発

ドーパミンを鋳型とした MIP を表面に固定したグラファイト粒子をカーボンペースト (CP) 化した MIP-CP 電極を作製し、選択性と感度を評価した。

(ア) ドーパミン 0.24 g、3-メタクリルアミドボロン酸 0.5g、ジビニルベンゼン 1.86 g、ACPF 0.27 g、DMF 15 mL、蒸留水 5mL を混合し、MIP 電極の重合溶液を調整した。重合開始剤固定グラファイト 0.4 g と重合溶液を石英試験管に入れ、窒素により 30 min バブリングさせ、石英試験管中溶液から酸素を除いた。試験管との距離を 4 cm に保ちながら、3 h キセノンランプ光を照射して重合を行った。上澄みを除去した後で、DMF 15 mL と蒸留水 5 mL ずつ加えて、ファルコン管に移し分散させた。その後 2600 g で 5 min 遠心分離を一回行った。

(イ) 上澄みを除去して蒸留水に再分散し、遠心分離を行った。この操作をさらに 2 回繰り返した後、沈殿したカーボンを 80 mL の 1M HCl と混ぜ鋳型抽出を行った。その後、2600×g で 5 min 遠心分離を行い、沈殿物を回収して蒸留水中で再分散し、再び遠心分離を行った。その後、蒸留水中に分散させ遠心分離するという操作を 3 回繰り返した。沈殿したカーボンを 24 h 真空デシケーター内で乾燥した。

(ウ) 処理済みカーボン：シリコンオイルが重量比 7 : 3 になるように量り取って、20 min 乳鉢で練り、カーボンペーストを作製した。ヘマトクリット管の先にカーボンペーストを詰め、ガラス棒で上から 100 回タップして電極を作製した。

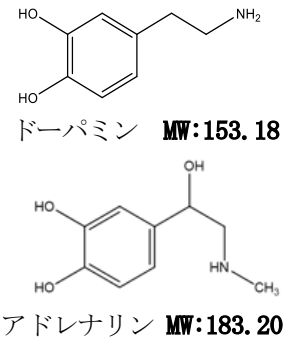
(エ) pH 7.4 の緩衝塩を含む 0.5~3 μM ドーパミン溶液を調製した。これを試験液として微分パルスボロタンメトリー (Differential Pulse Voltammetry: DPV) を行って、横軸にドーパミンおよびアドレナリン濃度、縦軸に電流密度をとりグラフに示し解析した。

表 1 に ACPF を加えてない MIP・NIP 電極の感度、重合時間が 180 min 及び 30 min の ACPF を加えた MIP・NIP 電極の感度を示す (何れも、ドーパミンの脳漿中の濃度範囲において高い直線性を示した)。

MIP 電極の選択性を評価するにあたり、MIP の感度を、鋳型を加えずに重合した NIP の感度で割った値を用いた。この値は結合サイト由来の電流密度なのか否か判断でき、ドーパミンの方がアドレナリンよりも顕著に大きくなって選択性があるといえる。重合時間 180 min で ACPF を加えていない場合の MIP/NIP の感度比はドーパミンで 1.2 倍、アドレナリン 0.57 倍であるのに対し、ACPF を加えたものはどちらも 1.3 倍であり鋳型識別サイトが十分に機能していないと言える。しかし、重合時間が 30 min の場合はドーパミンで 1.8 倍とアドレナリンの 1.0 倍を上回り鋳型識別サイトが多少なりとも機能していることがわかった。また、この 30 min の MIP 電極のドーパミン/アドレナリンの感度比は 4.5 倍と ACPF を加えていない MIP 電極の 3.8 倍と比べて大きくなった。したがって、ACPF を加えて 30 min で重合することで選択性が改善されることが分かった。しかし感度は著しく犠牲になった。サイト由来の電流値が大きいことから、ACPF の酸化還元反応によりドーパミンが MIP のサイトに結合した際に放出される電子が高収率で電極に伝えられたと考えられる。また、180 min の重合時間では ACPF が酸化して、ドーパミンとの親和性が損なわれ、選択性高いサイトが形成されなかったと考えられる。

表 1. 各電極の感度

		MIP	NIP	MIP/NIP
		[A·m/mol]	[A·m/mol]	[-]
ACPF なし (180 min)	ドーパミン	15.0	13.0	1.2
	アドレナリン	4.0	7.0	0.57
ACPF あり (180 min)	ドーパミン	8.0	6.0	1.3
	アドレナリン	4.0	3.0	1.3
ACPF あり (30 min)	ドーパミン	9.0	5.0	1.8
	アドレナリン	2.0	2.0	1.0



このように MIP を電極に固定したタイプのドーパミンセンサの選択性は低く、生体留置に適するものは開発できなかった。これはドーパミンは電気化学的に活性が高いため、MIP の特異結合とは無関係な酸化反応を電流として検出されることが、選択性を低いものとしている。そこで、酸化還元反応に頼らずにドーパミンを検出する方法の新規開発の必要性に迫られた。

そこで光学的なセンサの開発を進めることにした。まずは鋳型とする目的物質との特異結合によって蛍光強度を変化させる MIP のナノ粒子 (fluorescent MIP nanoparticles: fMIP-NP) を合成し、これを透明基板の表面に化学結合で固定して、蛍光強度の変化から鋳型とするオプティカルセンサの開発を試みることにした。

4-2: 蛍光 MIP ナノ粒子を用いたオプティカルセンサの開発

まずはドーパミンの代わりに、パーキンソン病でも分泌不全が確認されるセロトニンに対して応答する fMIP-NP を開発した。以下の手順を試みた。

- (1) ガラスビーズに 3-アミノプロピルトリメトキシシランおよび 3-(アミノエチル) アミノプロピルトリメトキシシランの混合液トルエン溶液、ガラスビーズ表面にアミノ基を導入した。
- (2) 導入したアミノ基をグルタルアルデヒドと反応させ、アルデヒド基に置換した。
- (3) アルデヒド基をセロトニンと反応させ、ガラスビーズ表面にセロトニンを固定した。
- (4) セロトニン固定ガラスビーズを、機能性モノマー (メタクリル酸)、架橋性モノマー (ジメタクリル酸エチル)、蛍光性モノマー (ジアリルフルオレセイン)、光ラジカル重合開始剤 (ジエチルジチオカルバミドベンジル) をジメチルホルムアミドに溶解し、セロトニン固定ガラスビーズを投入した。
- (5) 窒素の吹送で流動化させながら紫外線照射して、ラジカル重合を進行させた。
- (6) DMF で洗浄して、ガラスビーズ表面に形成された高分子を遊離させた。
- (7) 回収した液をナス型フラスコに入れて乾留した後、緩衝溶液を入れて浸透し、fMIP-NP 分散液を得た。

この分散液の蛍光強度と、粒径はともに濃度に依存することが確認された。また何れもセロトニンと構造が類似する L-トリプトファンには反応せず、高い選択性が確認された。

続いて、fMIP-NP 合成の際にアリルアミンを加え、アミノ基を導入した fMIP-NP を合成した。一方で、グリシジルプロピルトリメトキシシランで表面にエポキシ基を導入したガラス板を用意し、アミノ基導入 fMIP-NP 分散液に浸し、表面に fMIP-NP を固定した。これをフローセルに固定した。高い分解能で蛍光強度を測定できる蛍光顕微鏡 (MiCAM02、ブレインビジョン、東京) で、観察しながらセロトニンを含まない溶液を流入し、十分に蛍光強度を安定させてから、500 μ M のセロトニン溶液を流入させたところ、著しい蛍光の増減が見られた。一方、500 μ M のセロトニン溶液を流入しても同様の変化は見られなかった。

以上の結果から、fMIP-NP を透明基板に固定して、オプティカルセンサを作製することが可能であることが示された。透明基板に、マイクロプリズムや GRIN レンズを用いることにより、脳深部に留置可能なセンサを作製できると期待できる。

次に、ドーパミンに対して選択応答する fMIP-NP も合成した。手順はセロトニンの場合と、

若干異なるものを開発する必要があった。

- (1) ガラスビーズに 3-アミノプロピルトリメトキシシランおよびプロピルアミノプロピルトリメトキシシランの混合液トルエン溶液、ガラスビーズ表面にアミノ基を導入した。
- (2) 導入したアミノ基をグルタルアルデヒドと反応させ、アルデヒド基に置換した。
- (3) アルデヒド基をセロトニンと反応させ、ガラスビーズ表面にセロトニンを固定した。
- (4) セロトニン固定ガラスビーズを、機能性モノマー（メタクリル酸および 3-メタクリルアミドフェニルボロン酸）、架橋性モノマー（ジメタクリル酸エチル）、蛍光性モノマー（ジアリルフルオレセイン）、光ラジカル重合開始剤（ジエチルジチオカルバミドベンジル）をジメチルホルムアミドに溶解し、セロトニン固定ガラスビーズを投入した。
- (5) 窒素の吹送で流動化させながら紫外線照射して、ラジカル重合を進行させた。
- (6) DMF で洗浄して、ガラスビーズ表面に形成された高分子を遊離させた。
- (7) 回収した液をナス型フラスコに入れて乾留した後、緩衝溶液を入れて浸透し、fMIP-NP 分散液を得た。

得られた fMIP-NP はドーパミンに対して蛍光強度変化を示すのに対し、分子構造が類似する L-ドーパに対する変化を見せなかった。

以上のように、ドーパミンを固定鑄型とすることにより、選択性の高い fMIP-NP を合成できることが示された。この fMIP-NP を GRIN レンズ、マイクロプリズムや、光ファイバーに固定することにより、脳内のドーパミンをモニタリングするオプティカルセンサの開発が可能であることが示された。

4-3: モデルマウスおよび DBS 評価システムの開発

DBS 性能評価のために、Parkinson 病(PD)モデルラット川崎医科大学にて氷見が進めてきた。黒質から線条体への dopamine 神経線維に 6-Hydroxydopamine (6-OHDA)を注入して神経を変性させ PD の症状を誘発するモデルを用いた。注入 2 週間後のラット脳に対して抗 Tyrosine Hydroxylase (TH) 抗体による組織免疫染色を行い dopamine 神経の欠損を組織学的に確認した。この PD モデルは 6-OHDA 注入側の対側に運動障害が生じることにより、dopamine 類似物質である apomorphine 注入時に回旋運動が誘発される。この回旋運動の頻度を症状の指標として、DBS の効果を検討した。6-OHDA 注入 3 週後に十分に回旋運動(210 回/30min 以上)が観察されたラットに対し視床下核領域 (Bregma から 3.6mm、2.6mm、7.8mm)に同心円型電極を刺入して頭蓋骨に歯科セメントにて固定した。前年度の検討では同心円電極の先端が血液などで短絡し脳実質に十分な電流が流れていない可能性が示唆されたため、今年度は同心円電極の芯にあたる陰極が 1mm 外周電極（陽極）から突出したテーパタイプの電極を用いた。6-OHDA 非注入の対象群において通電により拘縮行動が見られたため、より正確な刺激を付与できたと考えた。しかしながら PD ラットにおいて回旋運動評価中に DBS を行っても回旋頻度に影響は見られなかった。位置が正確に視床下核に 2019 年度までは電極 DBS の条件として回旋運動頻度への影響を調べたが、どのパラメータでも有意な変化は見られなかった。そこで 2020 年度はインターバル刺激を行うと同時に刺激電極より刺激間における基底核（視床下核）の活動を記録し、ニューロン活動が変化している証拠を得ようと試みた。結果として PD 側と健常側で視床下核の活動頻度に有意な差は見られなかった。しかしながら刺激強度を上げると両側とも活動頻度は上昇した。本研究では視床下核全体から記録したことが、脳の左右差を認められなかった要因と考えられ、今後は脳スライス標本を用い、視床下核の単一ニューロンレベルの記録を行う必要があると考えられた。例えば、ドーパミンに対する fMIP-NP でモデルラットの脳スライス標本を染色し、蛍光強度分布を観察することで、ドーパミンの分泌不全が) 起きている箇所を同定することを、助成終了後も検討している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Takashi Inutsuka, Maya Okamoto, Yasuo Yoshimi, Risako Mori, Yuto Katsumata2), Kenji Umeta	4. 巻 99
2. 論文標題 New approach for neuropharmacology profile: In-situ real-time neuropharmacology monitoring by imaging technique using the molecularly imprinted polymers (MIPs) probe.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J. Pharmacol. Toxicol. Methods,	6. 最初と最後の頁 106595
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.vascn.2019.05.132	査読の有無 有
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 Aaryashree, Takeda Yuuto, Kanai Momoe, Hatano Akihiko, Yoshimi Yasuo, Kida Masahito	4. 巻 20
2. 論文標題 A "Single-Use" Ceramic-Based Electrochemical Sensor Chip Using Molecularly Imprinted Carbon Paste Electrode	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Sensors	6. 最初と最後の頁 5847 ~ 5847
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/s20205847	査読の有無 有
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9件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 吉見靖男、手島成洋、遠藤健太
2. 発表標題 学習に関する神経伝達物質分泌の蛍光分子インプリントナノ粒子による可視化
3. 学会等名 化学工学会86年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 吉見靖男
2. 発表標題 Molecularly imprinted polymer nanoparticles working as imaging probes for neurotransmitter secretion
3. 学会等名 日中化学工学シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 吉見靖男
2. 発表標題 学習に關与する神經伝達物質分泌の蛍光分子インプリントナノ粒子による可視化
3. 学会等名 化学工学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yuto KATSUMATA, Narumi TESHIMA, Yasuo YOSHIMI
2. 発表標題 Dopamine-imprinted polymer nanoparticle working as a highly selective fluorescent probe for dopamine secretion
3. 学会等名 APCCHE 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Risaki Mori, Kenji Umeta, Yuto Katsumata, Yasuo Yoshimi
2. 発表標題 Serotonin imaging using fluorescent serotonin-imprinted polymer nanoparticles as a probe
3. 学会等名 Society for Neuroscience
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 N. Himi, N. Okabe, E.M. Nakamura, H. Takahashi, N. Hayashi, I. Sakamoto, T. Koga, Y. Yoshimi, O. Miyamoto
2. 発表標題 The effects of embolism induced by varied particle number of microsphere on motor and cognitive functions and parkinsonism
3. 学会等名 Society for Neuroscience
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Y. Katsumata, N. Osawa, R. Mori, Y. Yoshimi
2. 発表標題 Synthesis of serotonin-imprinted polymer as highly selective fluorescent probe for neurotransmitter-imaging
3. 学会等名 Society for Neuroscience
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 吉見 靖男、日高 愛子
2. 発表標題 分子インプリント高分子固定カーボンペースト電極を用いたドーパミンセンサ
3. 学会等名 電気化学回秋季大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 勝俣 湧斗, 森 莉紗子, 吉見 靖男
2. 発表標題 蛍光分子インプリントナノ粒子の選択性と鑄型固定法の関係
3. 学会等名 化学工学会83年会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔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
研究分担者	六車 仁志 (Muguruma Hitoshi) (20309719)	芝浦工業大学・工学部・教授 (32619)	

6. 研究組織（つづき）

	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 分 担 者	氷見 直之 (HIMI Naoyuki) (70412161)	川崎医科大学・医学部・講師 (35303)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関