

令和 4 年 5 月 17 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2020～2021

課題番号：20K21883

研究課題名(和文)安全・有効な神経精神疾患の薬物治療を実現する画期的な埋込型センサシステムの創製

研究課題名(英文)Development of an implantable sensory system that can approach safe and effective therapeutic interventions for neuropsychiatric disorders

研究代表者

日比野 浩(Hibino, Hiroshi)

大阪大学・医学系研究科・教授

研究者番号：70314317

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：てんかん治療の中心は薬物であるが、個人によって異なる薬の振る舞いから時に重篤な副作用を引き起こす。個別化投薬を実現するためには、刻々と変わる脳局所の薬物濃度や神経活動、全身症状などを、同時に測定の上、分析する必要がある。本研究では、申請者らが以前に開発した、ダイヤモンドセンサを用いた薬物測定システムを発展させ、覚醒・自由行動下で薬物濃度と神経活動および全身症状を同時にモニターできる埋め込み型センサシステムのプロトタイプを構築した。また、測定および解析法を工夫し、*in vivo*でも高感度に抗てんかん薬を計測する方法を確立した。本成果は、個別化投薬法の開発に資する計測基盤になると位置付けられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

てんかんでは長期間に渡り投薬される場合があり、重篤な副作用が発生する場合も少なくない。急性期においても、患者によって効果が異なる場合がある。これらの問題を解決するためには、実際の脳内での薬物濃度と神経活動の推移と、全身症状との関係を経時的に比較する必要があるが、従来の方法では不可能であった。これらの同時測定を達成しうる本研究の埋め込み型薬物モニタリングシステムの試作品は、自由行動下の動物を対象とすることが可能であるため、長年の課題にアプローチする重要な技術となりうる。従って、医学的、社会的意義は極めて高い。

研究成果の概要(英文)：Pharmacotherapy is the first-line treatment of epilepsy. Kinetics of anti-epileptic drugs *in vivo* is different between individual patients. This background leads to induction of severe adverse effects in some patients. To achieve personalized medication requires simultaneous detection of local drug kinetics, neuronal activity, and systemic conditions, each of which should change over time. To address this issue, in this study we constructed a prototype of the monitoring system implantable to the brain. This system contained a needle-type diamond microsensor, which tracks the drug concentrations as described in our earlier work. A preliminary assay with this implantable system monitored the three parameters after injection of an anti-epileptic drug. Moreover, for future *in vivo* experiments we optimized an analytical method for another drug with high stability and sensitivity. The system we proposed here would contribute to advances in personalized medication for patients with epilepsy.

研究分野：薬理学

キーワード：針状ダイヤモンドセンサ 局所薬物動態 てんかん 電気化学センサ 自由行動下

1. 研究開始当初の背景

我が国では、近年、鬱病、統合失調症、てんかんなどの神経精神疾患の患者数が急増している。治療の中心は薬物であるが、運動・排泄・心血管・内分泌に重篤な副作用が生じることが少なくない。深刻な問題は、薬効と副作用が個人で顕著に異なることである。従って、患者毎への個別化された投薬が、医療現場では求められている。血中濃度のモニタリングは解決策の一つであり、幾つかの薬物で行われているが、効果は限局的である。事実、血中濃度と薬効・副作用との相関を疑問視する声もある。従って、患者一人ひとりに合ったきめ細かい投薬を実現するには、刻々と変わる、脳の病巣部位の局所薬物濃度や神経活動、そして、血中濃度、全身症状を、全て同時に測定の上、それらを比較・分析する必要がある。しかし、その測定は従来法では困難であった。

2. 研究の目的

申請代表者は、以前に、最先端の電気化学センサである針状ダイヤモンドセンサを用いて、生体の局所薬物濃度と神経活動を同時に追尾するシステムを開発した（Ogata et al, *Nature Biomed Eng*, 2017）。本研究では、このシステムを進化させ、脳の局所薬物濃度と神経活動、血中濃度、全身症状の全てを、無麻酔下の覚醒動物において、同時かつ長期間に渡り、リアルタイム計測するマルチ・センサシステムを創製する計画を立てた。本研究では、抗てんかん薬に着目した。この薬物は、患者数が多く、薬物治療が中心であるが、約3割が治療に抵抗性を示すことが問題となっている。そこで、薬物動態と薬の作用のリアルタイムな関係を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

これまでの研究で、欠伸発作や強直間代発作に適応のある抗てんかん薬ラモトリギンを対象にして、針状ダイヤモンドセンサを搭載したリアルタイム測定系を構築し、ラット脳局所における薬物動態と神経活動抑制効果について同時計測した（Ogata et al, *Nature Biomed Eng*, 2017）。しかしながら、この実験系では、てんかん発作症状に対する薬の作用は評価できなかった。また、麻酔下での実験では、神経活動が平常時より抑制されてしまう問題があった。そのため、より臨床の薬物治療に近い条件で解析するために、てんかん発作誘発モデルの樹立、および覚醒・自由行動下での薬効・薬物動態評価系の開発を実施した。てんかん発作モデルは、ラットに痙攣薬ペンテトラゾールあるいはカイニン酸を投与することで、作成した。痙攣発作を誘発する興奮性の異常発火が見られたラットに、ラモトリギンを投与し、神経活動の変化を観察した。覚醒・自由行動下での計測系としては、先端径が約 20 ~ 30 μm の針状ダイヤモンド電極と、神経活動を測定するための EEG 電極をラット大脳皮質に刺入・固定する埋め込み型センサシステムを構築した。ラットの覚醒後、静脈に投与した抗てんかん薬ラモトリギンの局所薬物濃度と神経活動に加え、行動をビデオ撮影して確認した。しかしながら、自由行動下での計測は、ノイズが大きく、濃度動態と薬効の相関性を明らかにするために十分な薬物シグナルを取得することができなかった。そこで、より高感度に測定できる抗てんかん薬を探索した。

一般に、抗てんかん薬は、病巣部位や症状によって分類されるてんかんの種類に合わせたものが処方される。そのため、現在までに世界で約 25 種類の抗てんかん薬が開発・承認されている。しかしながら、ラモトリギン以外の抗てんかん薬に対する測定可能性は検討していなかった。そこで、様々な抗てんかん薬に対して、平板型ダイヤモンド電極を用いた基礎的な測定を実施した。その中で、特に反応の高かった薬物に対して、リアルタイム測定系を構築した。さらに、この測定法を用いて、ラット脳における *in vivo* 測定を実施した。

4. 研究成果

抗てんかん薬の薬効を評価するためには、てんかん発作時の神経活動をどのように抑制するかを観測する必要がある。一般に、てんかんの実験モデルは、痙攣薬を投与して痙攣発作を誘発した動物が用いられる。本研究では、麻酔下ラットへのペンテトラゾールの皮下注射およびカイニン酸の腹腔投与によるてんかんモデルを確立した。これらの薬物の投与により、バースト状の異常な神経活動が見られたが、抗てんかん薬であるラモトリギンの腹腔投与によって、時間あたりの発火回数が減弱する傾向が見られた。

さらに、よりヒト疾患に近い条件で薬効や薬物動態を評価するために、覚醒・自由行動下で長期間、局所薬物濃度や神経活動、血中濃度、全身症状といった総合的なデータを取得するための埋め込み型センサシステムを試作した。先端径が約 20 ~ 30 μm の極細い針状ダイヤモンド電極と、神経活動を測定するための脳波 (EEG) 電極をラット大脳皮質に刺入し、歯科用セメントで固定した (図 1 A)。その後、ラットの覚醒と回復後に、局所薬物濃度と神経活動の計測に加え、行動をビデオ撮影した。ラモトリギンを静脈に投与したところ、明確な行動様式の変化は見られなかったが、直後に薬物シグナルの上昇が見られ、同時に神経活動が減弱する傾向が見られ

た (図 1 B)。しかしながら、麻酔下での実験に比べてノイズが大きく、薬物濃度と神経活動変化の定量的な相関関係を明らかにすることはできなかった。

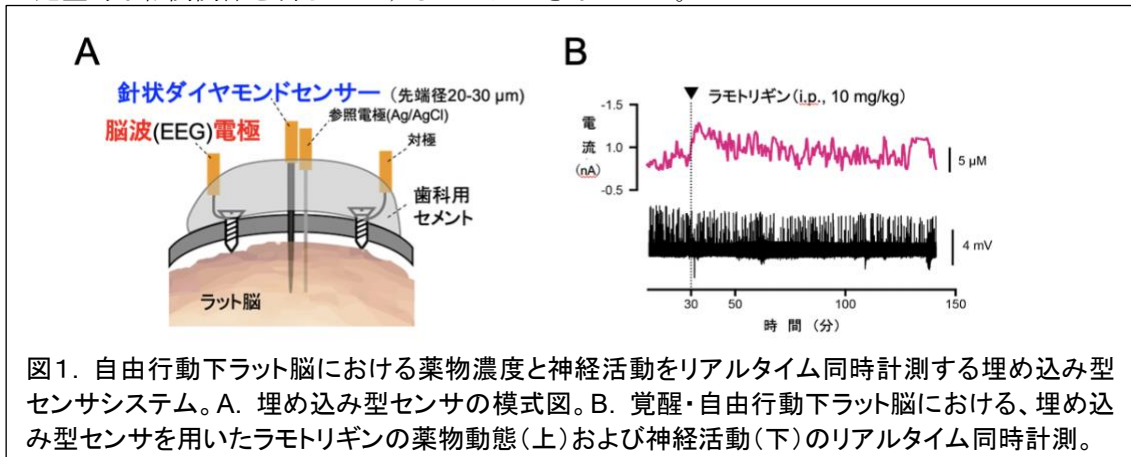


図1. 自由行動下ラット脳における薬物濃度と神経活動をリアルタイム同時計測する埋め込み型センサシステム。A. 埋め込み型センサの模式図。B. 覚醒・自由行動下ラット脳における、埋め込み型センサを用いたラモトリギンの薬物動態(上)および神経活動(下)のリアルタイム同時計測。

そこで、平板状ダイヤモンド電極を用いて、国内で入手できた 24 種類の抗てんかん薬の電気化学応答を網羅的に調べることで、より高感度に測定できる薬物を探索した。 $-1.0 \sim 1.5$ V (vs. 銀/塩化銀) の範囲の電位を走査する *Cyclic voltammetry* (CV) 法で測定したところ、14 種類について、酸化あるいは還元応答が見られた。この結果より、ダイヤモンド電極は様々な抗てんかん薬を計測する薬物センサとして幅広く利用できると考えられた。

反応が確認された薬物の中で、ベンゾジアゼピン系の抗てんかん薬である *Clonazepam* は、 -0.7 V にピークが見られる強い還元反応を示した (図 2 A)。この薬物は、ミオクローヌス発作や欠神発作に対して繁用されているが、体内への蓄積が進むと、時に重篤な副作用を引き起こすことから、国内外で治療薬物モニタリング対象に指定されている。この抗てんかん薬は、 $1 \mu\text{M}$ 以下の低濃度で薬効を発揮することから、測定には感度の高さが求められる。そこで、CV 法より高速・高感度な測定が可能な *Square wave voltammetry* (SWV) 法で、 $-0.5 \sim -1.2$ V の電位を走査することで、*Clonazepam* の還元応答を測定した (図 2 B)。さらに、解析において、反応のほとんどない電位を基準として、反応のピークが得られる電位におけるシグナルの比をとることで、ノイズやドリフトの影響を最小限にした。その結果、検出限界濃度が 4.2 nM という非常に高感度な計測が実現できた (図 2 C)。

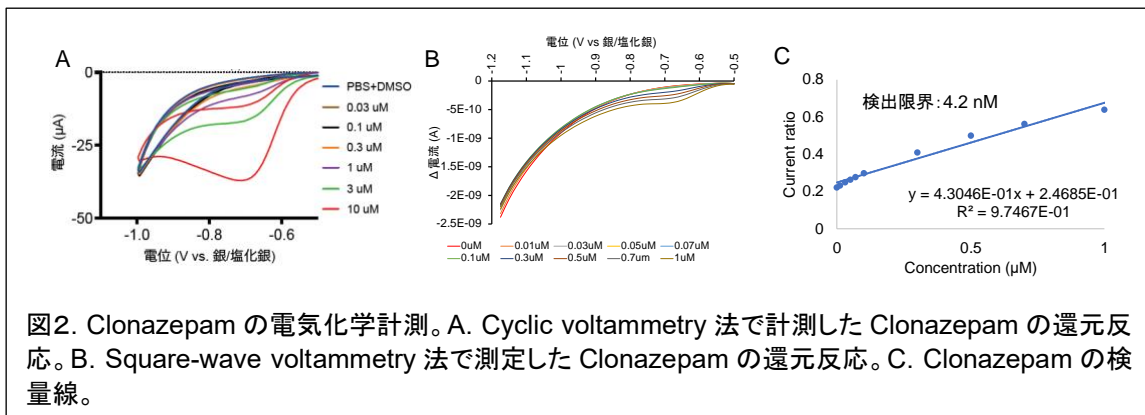


図2. *Clonazepam* の電気化学計測。A. *Cyclic voltammetry* 法で計測した *Clonazepam* の還元反応。B. *Square-wave voltammetry* 法で測定した *Clonazepam* の還元反応。C. *Clonazepam* の検量線。

次に、この測定法を利用して、ラット脳における *in vivo* 計測を実施した。麻酔下のラット脳に針状ダイヤモンドセンサを刺入し、頸静脈に投与した *Clonazepam* の濃度動態をリアルタイムに測定した。その結果、脳実質中の *Clonazepam* 濃度は、投与後すぐに上昇を始め、約 5.8 分後に最大濃度 $0.96 \mu\text{M}$ に達した。この血液から脳への高い移行性は、羊に静脈投与した際に、投与の 1 分後に脳脊髄液における濃度のピークが検出された先行研究の結果と矛盾しない (Parry G, *Pharmacology*, 1977)。以上より、麻酔下ではあるが、*in vivo* でも高感度・リアルタイムに抗てんかん薬を測定する手法を確立した。

今後、この測定・解析法を埋め込み型センサシステムに適用し、自由行動下での全身および局所の薬物動態と薬効のリアルタイムな相関関係を明らかにすることで、個別化投薬治療の実現に役立つ知見を得る。

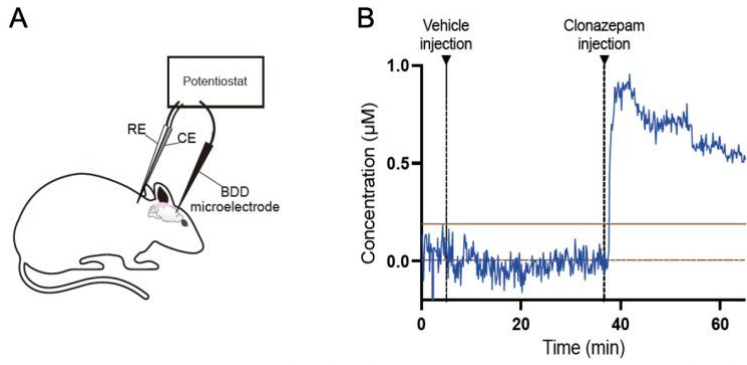


図3. ラット脳における Clonazepam の in vivo 計測。A. 測定系の模式図。B. 脳内 Clonazepam 濃度の時間変化。測定開始 5 分後にコントロール液 (Vehicle) を、36 分後に Clonazepam 溶液 (12.5 mg/kg) を頸静脈から投与した。In vitro における検出濃度下限 ($5.49 \times 10^{-3} \mu\text{M}$) を破線、in vivo における検出濃度下限 (0.19 μM) を実線で示した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7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 4件）

1. 著者名 Choi Samuel, Ota Takeru, Nin Fumiaki, Shioda Tatsutoshi, Suzuki Takamasa, Hibino Hiroshi	4. 巻 29
2. 論文標題 Rapid optical tomographic vibrometry using a swept multi-gigahertz comb	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Optics Express	6. 最初と最後の頁 16749 ~ 16749
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1364/OE.425972	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Sawamura Seishiro, Ogata Genki, Asai Kai, Razvina Olga, Ota Takeru, Zhang Qi, Madhurantakam Sasya, Akiyama Koei, Ino Daisuke, Kanzaki Sho, Saiki Takuro, Matsumoto Yoshifumi, Moriyama Masato, Saijo Yasuo, Horii Arata, Einaga Yasuaki, Hibino Hiroshi	4. 巻 12
2. 論文標題 Analysis of Pharmacokinetics in the Cochlea of the Inner Ear	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Pharmacology	6. 最初と最後の頁 1-11
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fphar.2021.633505	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Zhang Qi, Ota Takeru, Yoshida Takamasa, Ino Daisuke, Sato Mitsuo P., Doi Katsumi, Horii Arata, Nin Fumiaki, Hibino Hiroshi	4. 巻 599
2. 論文標題 Electrochemical properties of the non excitable tissue stria vascularis of the mammalian cochlea are sensitive to sounds	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The Journal of Physiology	6. 最初と最後の頁 4497 ~ 4516
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1113/JP281981	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 Hanawa Ai, Ogata Genki, Sawamura Seishiro, Asai Kai, Kanzaki Sho, Hibino Hiroshi, Einaga Yasuaki	4. 巻 92
2. 論文標題 In Vivo Real-Time Simultaneous Examination of Drug Kinetics at Two Separate Locations Using Boron-Doped Diamond Microelectrodes	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Analytical Chemistry	6. 最初と最後の頁 13742 ~ 13749
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.analchem.0c01707	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 Uen Tinnlea, Kushiro Keiichiro, Hibino Hiroshi, Takai Madoka	4. 巻 309
2. 論文標題 Surface functionalization of carbon-based sensors with biocompatible polymer to enable electrochemical measurement in protein-rich environment	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Sensors and Actuators B: Chemical	6. 最初と最後の頁 127758 ~ 127758
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.snb.2020.127758	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 Ota Takeru, Nin Fumiaki, Choi Samuel, Muramatsu Shogo, Sawamura Seishiro, Ogata Genki, Sato Mitsuo P., Doi Katsumi, Doi Kentaro, Tsuji Tetsuro, Kawano Satoyuki, Reichenbach Tobias, Hibino Hiroshi	4. 巻 472
2. 論文標題 Characterisation of the static offset in the travelling wave in the cochlear basal turn	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Pflugers Archiv - European Journal of Physiology	6. 最初と最後の頁 625 ~ 635
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00424-020-02373-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Nin Fumiaki, Choi Samuel, Ota Takeru, Qi Zhang, Hibino Hiroshi	4. 巻 28
2. 論文標題 Optimization of spectral-domain optical coherence tomography with a supercontinuum source for in vivo motion detection of low reflective outer hair cells in guinea pig cochleae	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Optical Review	6. 最初と最後の頁 239 ~ 254
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10043-021-00654-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計11件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 齋木 琢郎, 緒方 元気, 澤村 晴志朗, ラズピナ オリガ, 渡邊 航太, 加藤 里都, 浅井 開, 松本 吉史, 森山 雅人, 楠原 洋之, 栄長 泰明, 西條 康夫, 日比野 浩
2. 発表標題 A Method Designed for Point-of-Care System Monitoring Plasma Concentration of an Anticancer Molecular Targeting Drug with Diamond Electrode
3. 学会等名 第95回日本薬理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 稲生 大輔, 日比野 浩
2. 発表標題 新規蛍光センサーによる脳内オキシトシン動態のリアルタイム測定
3. 学会等名 第95回日本薬理学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 稲生 大輔, 日比野 浩, 西山 正章
2. 発表標題 脳内細胞外シグナルのリアルタイム測定を実現する蛍光センサーの開発と応用
3. 学会等名 2021(令和3)年度 細胞の局所コミュニティ研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 澤村 晴志朗, Norzahirah Binti Ahmad, 緒方 元気, 秋山 洸英, 石井 あゆみ, 栄長 泰明, 日比野 浩
2. 発表標題 ダイヤモンド電極を用いた皮膚刺入型薬物センサの開発
3. 学会等名 2021(令和3)年度 細胞の局所コミュニティ研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 齋木 琢郎, 緒方 元気, 澤村 晴志朗, ラズビナ オリガ, 渡邊 航太, 加藤 里都, 浅井 開, 松本 吉史, 森山 雅人, 楠原 洋之, 栄長 泰明, 西條 康夫, 日比野 浩
2. 発表標題 Rapid Measurement of Drug Concentration of Pazopanib in Human Plasma with Diamond Sensor.
3. 学会等名 第19回日本臨床腫瘍学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Seishiro Sawamura, Ogata Genki, Koei Akiyama, Einaga Yasuaki, Hiroshi Hibino.
2. 発表標題 A micro sensing system for in vivo real-time monitoring of drug kinetics in brain.
3. 学会等名 第11回生理研 豊長研 新潟脳研合同シンポジウム (The 11th NIPS-PRI-BRINU Joint Symposium)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Hideto Moriyama, Haruma Nashimoto, Genki Ogata, Yoshiaki Furukawa, Hiroshi Hibino, Hiroyuki Kusahara, Yasuaki Einaga.
2. 発表標題 Electrochemical detection of free drug fraction in human serum using boron-doped diamond electrodes.
3. 学会等名 The International Chemical Congress of Pacific Basin Societies 2021 (国際学会) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 森山 英人、緒方 元気、梨本 遥馬、古川 良明、日比野 浩、楠原 洋之、栄長 泰明
2. 発表標題 ダイヤモンド電極を用いた抗がん剤ドキシソルピシンのヒト血清中遊離型測定
3. 学会等名 2021年電気化学秋季大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 緒方 元気、齋木 琢郎、澤村 晴志朗、ラズピナ オリガ、渡邊 航太、加藤 理都、浅井 開、松本吉 史、森山 雅人、西條 康夫、栄長 泰明、日比野 浩
2. 発表標題 ダイヤモンド電極を用いた分子標的薬パゾパニブ血漿中濃度の測定
3. 学会等名 2021電気化学秋季大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 緒方 元気、齋木 琢郎、澤村 晴志朗、ラズピナ オリガ、渡邊 航太、加藤 理都、浅井 開、花輪 藍、松本 吉史、森山 雅人、西條 康夫、栄長 泰明、日比野 浩
2. 発表標題 ダイヤモンドセンサを用いた血漿中分子標的薬パゾパニブ迅速濃度測定機の開発
3. 学会等名 第139回 日本薬理学会近畿部会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 緒方 元気、齋木 琢郎、澤村 晴志朗、ラズピナ オリガ、渡邊 航太、加藤理都、浅井 開、花輪 藍、松本 吉史、森山 雅人、西條 康夫、楠原 洋之、栄長 泰明、日比野 浩
2. 発表標題 血漿パゾパニブ濃度の迅速・簡便測定を目指した計測システムの構築
3. 学会等名 第60回日本生体医工学会大会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Genki Ogata, Seishiro Sawamura, Kai Asai, Hiroyuki Kusuhara, Yasuaki Einaga & Hiroshi Hibino	4. 発行年 2022年
2. 出版社 Springer, Singapore	5. 総ページ数 248
3. 書名 Diamond Electrodes	

〔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	楠原 洋之 (Kusuhara Hiroyuki) (00302612)	東京大学・大学院薬学系研究科(薬学部)・教授 (12601)	

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	緒方 元気 (Ogata Genki) (80452829)	大阪大学・医学系研究科・招へい教員 (14401)	

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