

分子インプリント高分子を利用した脳・機械インターフェースの開発

Development of brain-machine Interface using molecularly imprinted polymer

2041030



研究代表者 芝浦工業大学 工学部応用化学科 教授 吉見靖男

[研究の目的]

脳の意志に基づいて義肢や生活機器を操作する脳・機械インターフェース (Brain Machine Interface: BMI) の開発が、障害者の生活向上のために大きく期待されている。従来の BMI では脳に埋め込んだ金属電極で、神経膜電位変化を検出する方法が用いられてきたが、ノイズに大きく影響され、複雑なシグナルを検出できない。神経細胞が放出する伝達物質を高速・高感度な化学センサで捉えれば、より複雑な神経シグナルの感知に期待できる。そこで申請者が開発した分子インプリント高分子固定電極を利用して、神経伝達物質を高選択的、高速かつ高感度に検出できるセンサを開発し、当該センサが BMI 用デバイスとして有用であることを証明する。

[研究の内容]

1. 分子インプリント高分子固定電極の微細化

分子インプリント高分子 (Molecularly imprinted polymer: MIP) は、重合の際に添加された任意の目的物質 (鋳型) に対する特異結合能を付与された合成高分子である。申請者は、グラフト重合法によって MIP を固定した電極が、鋳型の濃度に依存して透過速度を変化させる現象 (ゲート効果) を示すことを発見した。

この現象を利用することで、高感度 (μM オーダー)、高選択性 (キラル識別も可能) かつ高速応答 (数百ミリ秒～数秒) の鋳型のセンシング法の開発に成功しており、これらの特性は、BMI 用センサに適していると考えた。

今までは、インジウム・スズ酸化物 (ITO) 電極の表面に重合開始剤を固定し、鋳型、機能性モノマー、架橋性モノマーの溶液に浸し、ラジカル重合を生じさせることで、MIP 固定電極を得ていた。この電極で、鋳型を含むフェロシアン化カリウムの溶液でサイクリックボルタメトリーを行ってきた。鋳型の存在によって、MIP 層のフェロシアン化物イオンの拡散透過速度が変化することで、鋳型濃度に依存する電流が得られる仕組みである。

本研究では神経組織内に留置する電極を目指している。その目的のためには、侵襲を小さくするために、電極の大きさを数 μm 程度にまで微細化しなければならない。微細電極としては炭素繊維電極や金ワイヤ電極がよく使われているが、これらの材質に MIP を固定することには成功しなかった。

ガラスは加熱による引き延ばしが可能である。神経細胞の膜電位を測定したり、細胞に薬剤を注入したりするのは、ガラス管を加熱しながら引き延ばし、先端を 1~10 μm まで小さくしたガラス管電極によって行われている。そこで申請者はガラス管の代わりにガラス棒を引き延ば

し、その側面に ITO の層を形成し、さらには MIP をグラフトすることを考えた。しかし針状のガラスの先端側面に一般的なスパッタリング法で ITO 層を形成するのは難しい。そこで申請者は、ガラス針に ITO 層をゾル・ゲル法で作製し、その上に MIP をグラフトし、微細 MIP 電極を作製することを試みた。

直径 1.0 mm のマイクロガラスロッド（成茂科学器械研究所：東京）を、水酸化カリウムの飽和メタノール溶液で洗浄した。膜電位測定用微小ガラス管電極作製器 PN-3（成茂科学器械研究所）で、加熱しながら引き延ばし、図 1 のような針状にした。先端は約 30 μm であった。

このガラス針を、ITO 微粒子トルエン分散液（巴製作所：大阪）に約 1 s 浸した後、小型電気炉 mini-I（日陶科学：名古屋）で 60 min 加熱し（500 $^{\circ}\text{C}$ ）、ITO を焼結した。3-アミノプロピルトリメトキシシランの 30 wt% トルエン溶液中で 6 h 加熱して、ITO 層の表面にアミノ基を導入した。さらに 4-クロロメチル安息香酸と水溶性カルボジイミドのジメチルホルムアミド溶液に浸し、アミノ基をクロロメチルベンジル基に置換した。そして、ジメチルジチオカルバミド酸ナトリウムのエタノール溶液に浸し、光ラジカル重合開始剤として機能する、ジメチルジチオカルバミドベンジル基を導入した。この開始剤固定ガラス針を、セロトニン、メタクリル酸、アクリルアミド、メチレンビスアクリルアミドの混合溶液に浸し、キセノンランプ光を照射して、セロトニンを鋳型とした MIP を固定した。この電極で 5 mM フェロシアン化カリウムのサイクリックボルタメトリーを行

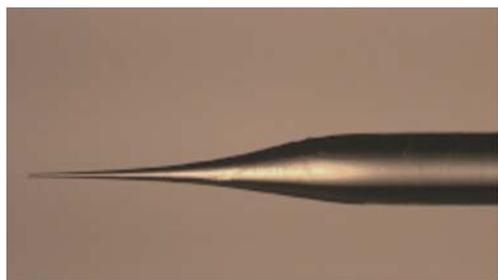


図 1 ガラス棒の引き延ばしによって得られたガラス針

い、電流に対するセロトニンの影響を観察した。

ゾル・ゲル法によって得られた ITO は、スパッタリングによって作られた市販のものに比べると導電性は低く、図 2 に示すようにボルタモグラムへのピークも鈍いものであった。

しかし、得られた電流は図 3 のように、セロトニンの濃度の増大に伴って上昇したが、構造が類似する L-トリプトファンに対してはほとんど感受性を持たなかった。

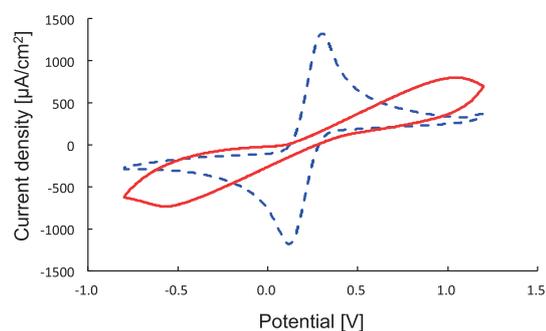


図 2 ガラス板の上にゾル・ゲル法で ITO 層を形成した電極（実線）とスパッタリングした電極（点線：フルウチ化学）における 5 mM フェロシアン化カリウムのサイクリックボルタモグラムの比較

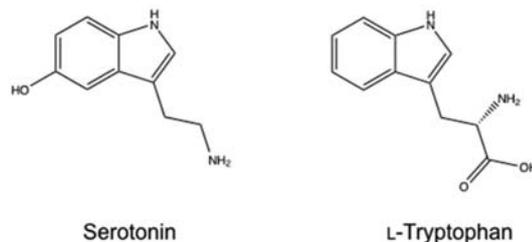
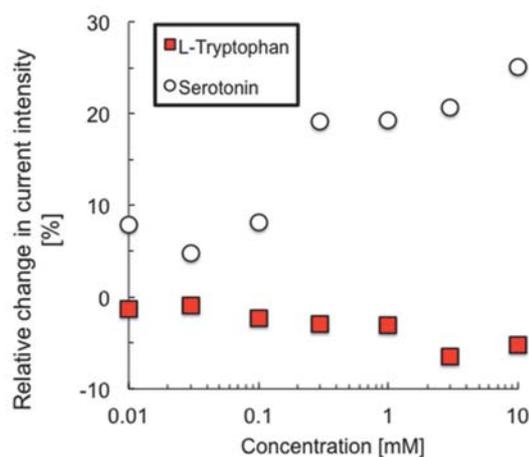


図 3 セロトニン MIP をグラフトした針状 ITO ガラス電極における 5 mM フェロシアン化カリウム酸化電流に与えるセロトニン (円) および L-トリプトファン (正方形) の濃度の影響

このように、ガラス針の側面に導電ITO層をゾル・ゲル法によって形成する手法は、MIP固定電極の微細化に有効である。

2. 分子インプリント高分子固定電極のリエージェントレス化

本研究では、MIP固定電極を神経組織内に留置することを目的としている。これまで試料にレドックスマーカを加えて、酸化電流を検出する方法を採ってきたが、組織内に留置する場合はマーカを加えるわけにはいかない。試薬を加えずに測定できるリエージェントレスセンシング法を新たに開発しなければならない。そこで、MIP電極にレドックス官能基を内在させ、その酸化電流から鑄型濃度を測定する方法を考案した。

ITOガラス電極（フルウチ化学）の表面に、2通りの方法で、レドックス性のフェロセニル基と、セロトニンに対するMIP薄膜層を共に固定した電極を作製した。

(A) フェロセニル基をITO表面に直接固定する方法：フェロセニル基と光重合開始剤であるジメチルジチオカルバミド酸ベンジル基を共にITO表面に固定した。一方、セロトニン、メタクリル酸、アクリルアミド、メチレンビスアクリルアミドを水-ジメチルホルムアミド混合溶媒に溶か

した。この液にレドックス基と開始剤を固定した電極を浸した。そこに紫外線を照射し、グラフト重合によってMIP固定電極を得た。

(B) MIP層の中にフェロセニル基を含ませる方法：光重合開始剤のみを固定したITOを、レドックス性のビニルフェロセンとセロトニン、メタクリル酸、アクリルアミド、メチレンビスアクリルアミドを水-ジメチルホルムアミド混合溶媒に溶かした。この中に重合開始剤ジメチルジチオカルバミド酸ベンジル基のみを導入したITOを浸した。そこに紫外線を照射し、グラフト重合によってMIP固定電極を得た。

得られたMIP電極を作用極として、0.1 Mの塩化ナトリウムと0.05 Mのリン酸緩衝塩(pH 7.4)を含むセロトニン水溶液中での微分パルスボルタメトリー(DPV)を行った。得られた酸化電流とセロトニン濃度の関係を観察した。

上記二つの方法でセロトニンを鑄型として作られたフェロセニル基含有MIP固定電極における酸化電流と、セロトニン濃度、およびそれに構造が類似するL-トリプトファンとの関係を図4に示す。いずれの方法で作られた電極においても、酸化電流はセロトニン濃度の増加と

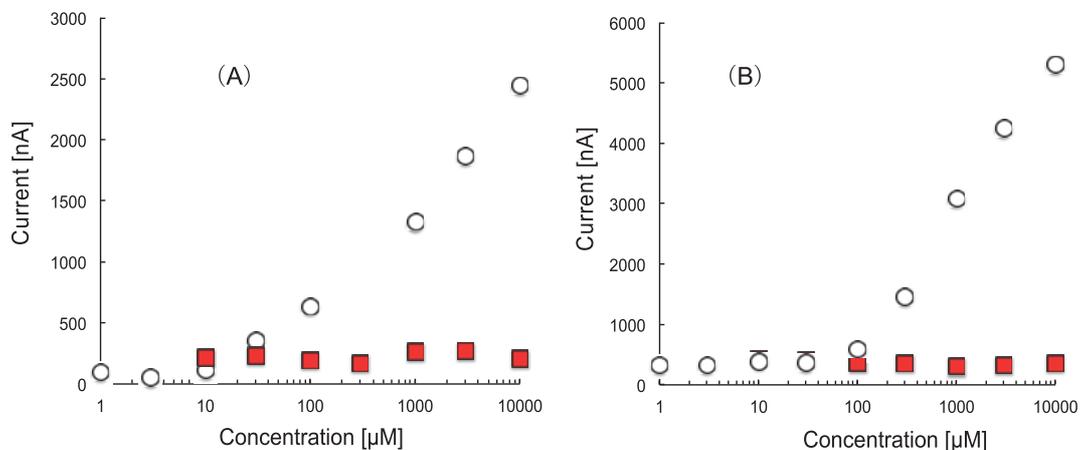


図4 セロトニンMIP固定電極の微分パルスボルタメトリーにおける酸化電流のセロトニン(□)またはL-トリプトファン濃度依存性
(A) フェロセニル基をITO表面に直接固定する方法, (B) MIP層の中にフェロセニル基を固定する方法

共に増大するのに対し、L-トリプトファン濃度には依存しなかった。いずれのMIPにおいても、鋳型とMIP中のサイトの特異的な反応が、フェロセニル基とITO電極との間の電子移動に強く影響することを示している。レドックス種を内在するMIP固定電極によって、試料溶液中に試薬を加えない簡便なリエージェントレスセンシングが可能になることが示された。

3. 神経シグナル解析法の確立

本研究の目的を遂行するためには、複数の神経の活動を同時に検出できなければならない。そこで申請者は、神経を膜電位感受性色素で染色し、高速蛍光顕微鏡で蛍光強度分布の変化を検出する膜電位イメージングを開発することにした。実験動物には、巨大な神経細胞を持つ米国産アメフラシ (*Aplysia californica*) を用いることにした。アメフラシの口(口球)の運動を司る口球神経節を、神経束による口球との接続を維持したまま、テトラエチルアンモニウム(TEA)を100 mM含む人工海水(ASW)に1.5 h浸漬した。続いて、TEAを100 mM含む膜電位感受性色素(Di-4-ANEPPS)の溶液に30 min浸して染色した。

アメフラシが好む海藻に豊富に含まれるアミノ酸(L-アスパラギン:L-Asn)、または嫌う海藻に豊富なアミノ酸(L-アスパラギン酸:L-Asp)を1 mM溶解したASW 200 μ Lを、口球の歯舌部位に投与した。各アミノ酸投与に対する口球神経節内Sクラスターの蛍光強度変化を、蛍光顕微鏡により検出した。

その結果、各アミノ酸投与に対し、Sクラスターの全領域の神経細胞が応答を示したため、味覚を司る神経のネットワークは、この領域内に存在するといえる。また、嫌忌物質であるL-Aspは、Sクラスター内の細胞を嗜好物質

であるL-Asnよりも投与後短時間で興奮させた。本結果は、摂取に不適な物は、咀嚼せずに即座に吐き出す必要がある事実と整合性がある。一方、この膜電位イメージングにより算出した応答タイムラグは、微小電極法(従来法)によって得られた値と変わらなかった。膜電位イメージングに必要な化学処理は、神経細胞の味覚応答速度には影響を与えないことが示された。

このように膜電位イメージングは神経活動分布を捉える方法として有効である。

[研究成果]

知的財産
特許出願「分子インプリント高分子薄膜を用いたセンサ」、特願2015-042755 吉見靖男

新聞報道
プレス発表
3月30日 日刊工業新聞
3月25日 化学工業日報

[学会発表]

レドックス種を内在した分子インプリント固定電極によるリエージェントレスセンシング, 吉見靖男 日本膜学会37年会, 東京2015年5月

レドックス基を導入した分子インプリント高分子電極による薬剤リエージェントレスセンシング, 吉見靖男 化学工学会80年会, 東京2015年3月

ドックス基を導入した分子インプリント高分子薄膜を用いた治療薬モニタリング用リエージェントレスセンサの開発, 吉見靖男 電気化学会82年会, 横浜, 2015年3月

Design of voltage sensitive dye imaging for analysis of taste-recognition neural network in *Aplysia buccal ganglion*, Y. Miyake, Y. Yoshimi, T. Nagahama, Annual Meeting of Society for Neuroscience, 2014年11月, Washington DC

ゾル・ゲル法でインジウム・スズ酸化薄膜を形成した分子インプリント高分子固定微小電極, 吉見靖男, 電気化学会秋季大会, 2014年9月, 札幌