

—特集 [生命の階層を可視化・操作する最先端技術：  
神経科学が切り拓くバイオイメージングと疾患研究の新展開 (3)]—



## 半導体イメージセンサによる細胞外微小環境の 時空間遷移の可視化と神経科学的意義

堀内 浩 土井 英生 澤田 和明

豊橋技術科学大学次世代半導体・センサ科学研究所

### 緒言：細胞外微小環境計測のパラダイムシフト

細胞外環境は、イオン、代謝産物、神経伝達物質などの多様な生体化学物質によって構成され、細胞機能の制御および組織恒常性の維持に重要な役割を果たす動的システムである。特に中枢神経系において、シナプス間隙や細胞外スペースにおける化学物質の時空間動態は、神経回路活動の演算プロセスそのものを反映している。したがって、細胞外化学物質を計測する技術開発の推進は、生命科学領域、とりわけ神経科学の発展に多大なる貢献を果たしてきた。

1970年にBergveldによって提案されたIon-Sensitive Field-Effect Transistor (ISFET) は、電界効果トランジスタ (FET) のゲート絶縁膜を溶液に露出させた半導体センサである<sup>1</sup>。この絶縁膜に溶液が接触することで界面に電気二重層が形成され、その表面電位の変化をドレイン電流の変化として検出する。その後、Matsuoらによって窒化ケイ素膜を水素イオン感応膜とする構造が提案されたことで、安定な出力特性を有するISFETが実現された<sup>2</sup>。溶液と水素イオン選択性絶縁膜界面に生じるケミカルポテンシャルの変化はネルンストの式により記述され、理論的な感度は常温において約59.16 mV/pHに達する。しかしながら、従来のISFETは溶液中の一点におけるイオン濃度を検出する「点計測」技術であり、組織内におけるイオンの複雑な空間分布を計測することは不可能であった。神経伝達物質計測の分野では、高い時間分解能を有するFast-Scan Cyclic Voltammetry (FSCV)<sup>3</sup>や、多項目同時計測が可能なマイクロダイアリシス<sup>4</sup>が広く普及しているが、これらもまた空間分解能に乏しく、神経回路網における化学物質の拡散や局在を捉えるには至っていない。Light Addressable Potentiometric Sensors (LAPS)<sup>5,6</sup>や走査型電気化学顕微鏡 (SECM)<sup>7,8</sup>などのイメージング技術も報告されているが、光やプローブの物理的走査を必要とするため、ミリ秒単位で変化する細胞からの化学物質放出を

リアルタイムで追従するには限界があった。

筆者らは、CCD電荷転送技術およびCMOSイメージセンサ技術を融合・応用した新たなバイオイメージングツールの開発に取り組んできた<sup>9</sup>。本デバイスは、ISFETの原理をアレイ化し、イオンや神経伝達物質の二次元分布をリアルタイムかつ高感度に計測可能とするものである。本稿では、技術基盤となるpHイメージセンサの動作原理を詳述し、それを核として展開された各種生体化学物質センサ、および自由行動下の生体脳への応用を含む最新の知見について概説する。

### 1. 電荷転送型 pH イメージセンサの創生と物理的基盤

CMOS技術を用いて開発された電荷移動型イオンイメージセンサは、細胞外環境におけるプロトン(H<sup>+</sup>)濃度をラベルフリーでモニタリング可能な革新的デバイスである<sup>10,11</sup>。本センサは、水素イオンに敏感な窒化ケイ素(Si<sub>3</sub>N<sub>4</sub>)薄膜上の電位変化を、画素ごとの信号として可視化する(図1)。

#### 1.1 計測対象に応じたセンサ設計の最適化

現在、筆者らが運用しているセンサには、用途に応じて大きく二つのバリエーションが存在する。一つは、128×128画素を23 μmピッチで配置した汎用型センサであり、50 fpsでの読み出しが可能である<sup>10</sup>。これは組織スライス全体などの広範囲な観察に適している。もう一つは、より微小なシグナルの高速追従を目的とした、256×256画素、2 μmピッチ、2,000 fps駆動の超高解像型センサである(図1A, C)<sup>11</sup>。これにより、単一細胞レベルのイオン放出や、ミリ秒オーダーで変化する神経活動に伴う化学シグナルを非標識で可視化することが可能である。

#### 1.2 電荷転送方式による高感度化メカニズム

本センサの特筆すべき点は、その読み出しに電荷転送方式を採用していることである(図1B)。これはデ

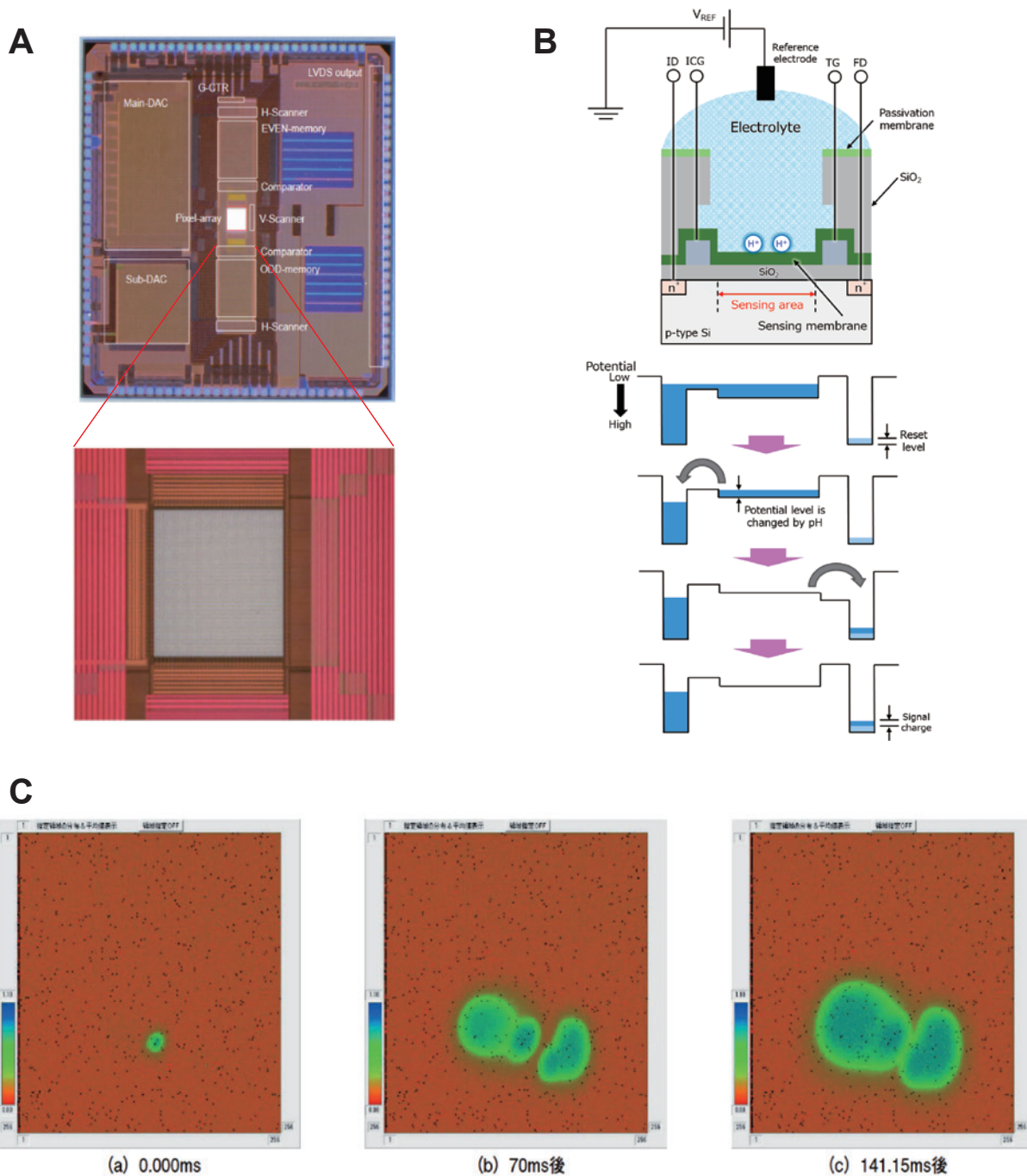


図1 pH イメージセンサ

- A, センサチップの外観 (上) とセンシングエリアの拡大図 (下)
  - B, pH 検出素子の断面図と電荷転送方式による計測原理
  - C, 酸性溶液を滴下した時の pH 変化の様子
- 文献9 © 2022 一般社団法人 表面技術協会. 許可を得て転載 (1A, 1C)

デジタルカメラの撮像素子で培われた技術をバイオセンシングに応用したものであり、以下のプロセスを経て pH 情報を電気信号へと変換する。

まず、センサ表面の感応膜に吸着した H<sup>+</sup> の量に応じて、Si 表面のポテンシャルが変化する。入力制御ゲート (IG) および転送ゲート (TG) の電位を制御するこ

とで、表面電位に対応した電荷量をセンサ領域下に保持する。その後、TG の電位を上昇させることで、蓄積された電荷をフローティング拡散 (FD) 領域へ転送し、ソースフォロワ回路を介して出力電位を得る。

この方式の最大の利点は、信号電荷の蓄積と倍増が可能である点にある。電荷の蓄積プロセスを繰り返す

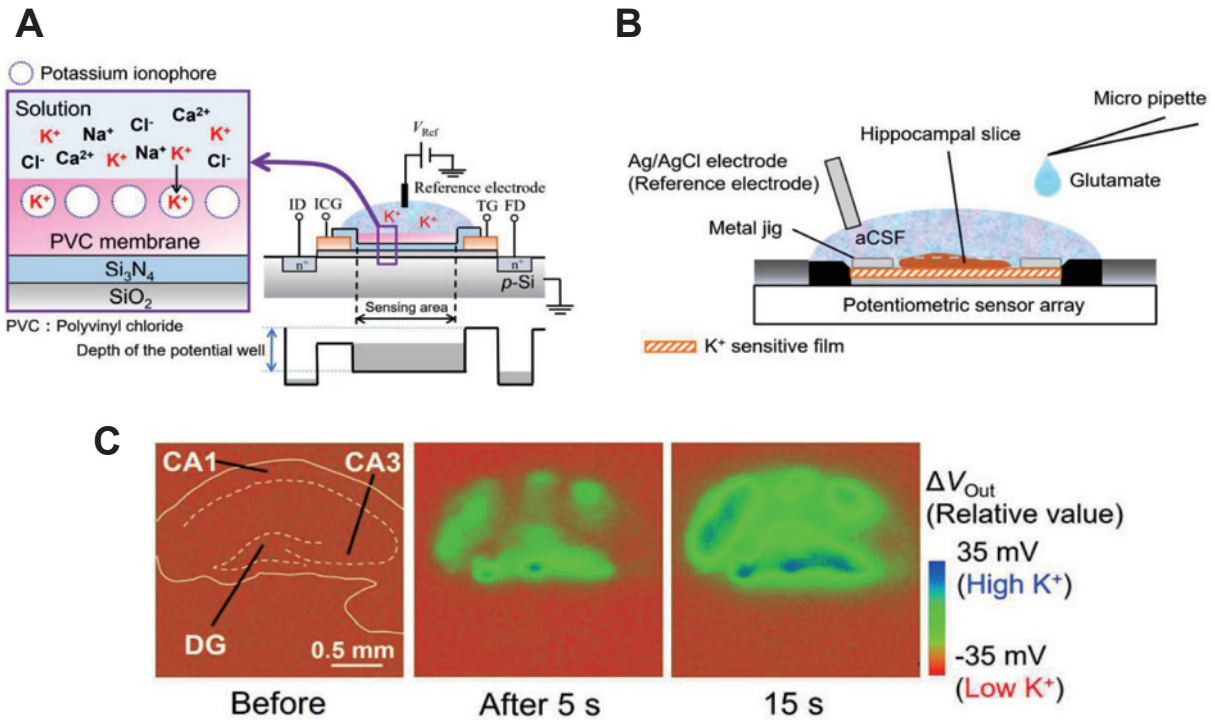


図2 イオノフォア成膜による  $K^+$  イメージセンサ

A,  $K^+$  イメージセンサの断面構造

B, センシングエリアに海馬スライスを固定し, グルタミン酸を滴下した

C, グルタミン酸滴下後の出力電位の変化

文献 16© 2022 IEEE. 許可を得て転載

ことで, 微小な pH 変化に起因する信号を背景ノイズに対して有意に増幅させることができ, 従来の電圧読み出し型 FET センサでは到達し得なかった高感度化を達成した. 具体的には, 2,000 フレーム/秒 (fps) という超高速駆動においても,  $2 \mu\text{m}$  ピッチという極めて微細な空間分解能で溶液中の pH 拡散動態を捉えることが可能である<sup>11</sup>.

## 2. イオノフォア成膜技術による陽イオン動態の可視化

生体機能の理解において,  $H^+$  のみならず,  $Na^+$ ,  $K^+$ ,  $Ca^{2+}$  といった主要陽イオンの時空間動態を把握することは極めて重要である. 特に脳機能において, これらのイオンは活動電位の発生やシナプス伝達の制御に直結している.

### 2.1 細胞外カリウムイオン ( $K^+$ ) イメージングの展開

細胞外  $K^+$  濃度の増加は, 神経細胞の興奮性を高め, 時には皮質拡延性抑制 (CSD) やてんかん様活動を引き起こす<sup>12-14</sup>. 筆者らは, pH 感応膜上に特定のイオンと選択的に錯体形成するイオノフォアを含有した可塑性ポリ塩化ビニル (PVC) 膜を成膜することで,  $K^+$  イメージセンサを構築した (図 2A). 開発の過程で最大

の障壁となったのは, PVC 膜とデバイス表面 ( $Si_3N_4$ ) との密着性であった. 生体試料は常に溶液下に置かれるため, 膜の剥離は致命的なノイズの原因となる. これに対し, 多面体オリゴメリックシルセスキオキサン (POSS) を PVC 膜中に添加することで, 疎水性と密着性を劇的に向上させることに成功した<sup>15</sup>. 最適化されたセンサは,  $10^{-5} \text{ M}$  から  $10^{-2} \text{ M}$  の範囲で良好な線形性を示し, その電位勾配は約  $28.8 \text{ mV/decade}$  と, 理論値に近い感度を達成した. さらに, 膜厚を  $3 \mu\text{m}$  から  $100 \mu\text{m}$  超まで制御して検討した結果, 約  $9 \mu\text{m}$  の薄膜化が空間分解能の向上と応答時間の短縮に寄与することを明らかにした<sup>16</sup>. この技術をマウス海馬スライス標本に応用し, 刺激に伴う細胞外  $K^+$  の放出が海馬 CA1, CA3, 歯状回の各領域で異なるパターンを示すことをリアルタイムで捉えることに成功した (図 2B, C)<sup>16,17</sup>. これは, 従来の微小電極法では不可能であった脳組織内の機能ドメインごとのイオン動態比較を可能にする成果である.

### 2.2 細胞外カルシウムイオン ( $Ca^{2+}$ ) イメージングと神経活動解析

細胞外  $Ca^{2+}$  は, シナプス伝達物質の放出を制御する

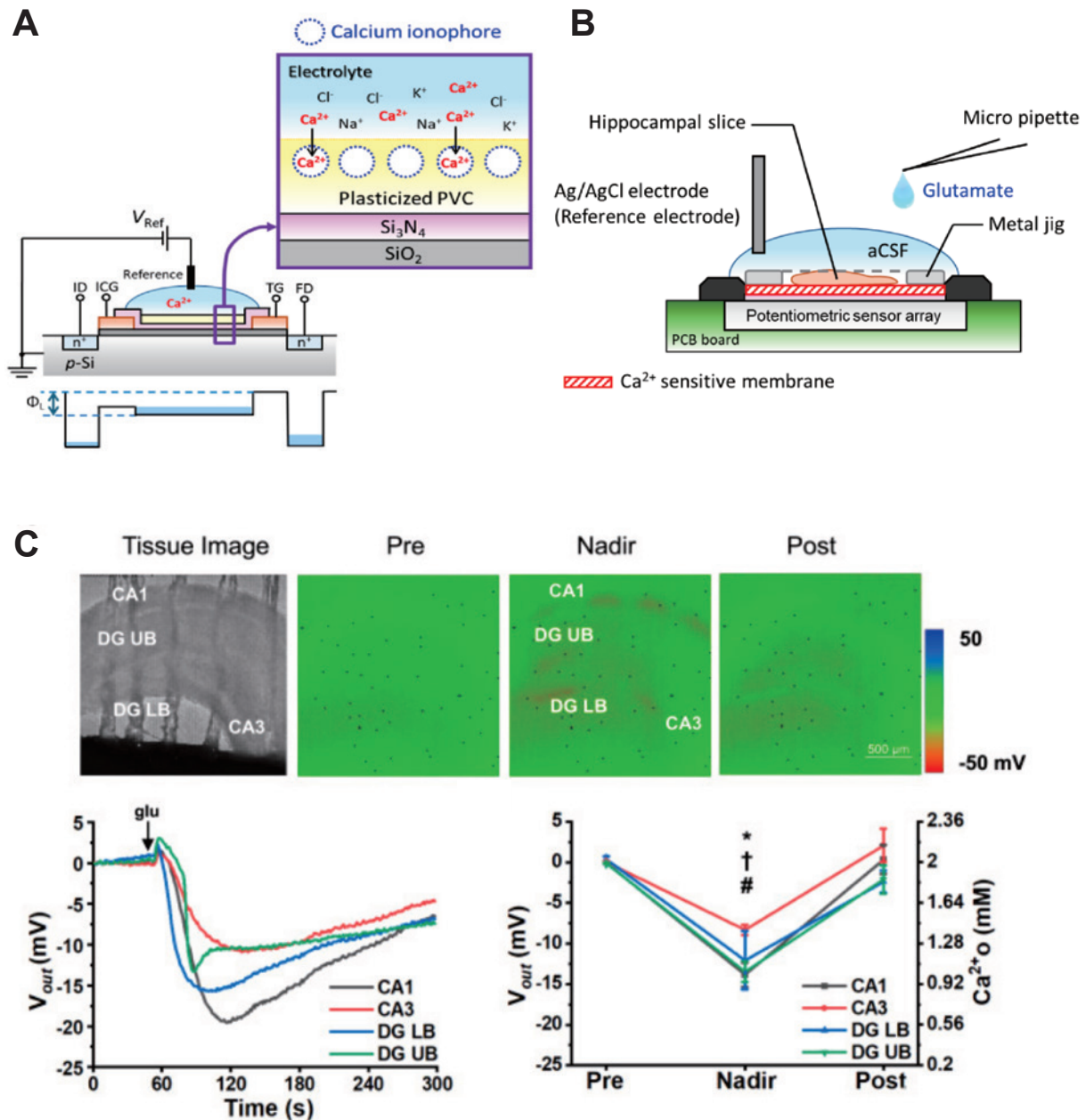


図3 イオノフォア成膜によるCa<sup>2+</sup>イメージセンサ

- A, Ca<sup>2+</sup>イメージセンサの検出画素の構造断面
  - B, 海馬スライスを固定し、グルタミン酸を滴下した
  - C, グルタミン酸滴下に伴い、海馬の領域ごとに異なる時間パターンでCa<sup>2+</sup>濃度の低下が認められ、CA1において特に顕著な低下を示した
- CC-BY 4.0に基づき、文献18より転載

だけでなく、NMDA受容体などを介して細胞内へ流入することで、可塑的变化のトリガーとなる。筆者らは、Ca<sup>2+</sup>イオノフォアV (ETH 1001)を用いたCa<sup>2+</sup>イメージセンサを開発した(図3A, B)<sup>18</sup>。

本センサは、Na<sup>+</sup>、K<sup>+</sup>、Mg<sup>2+</sup>、H<sup>+</sup>共存下においてもCa<sup>2+</sup>に対する極めて高い選択性を示す。特に、細胞外液中に高濃度(約145 mM)で存在するNa<sup>+</sup>の影響を最小限に抑えることに成功しており、生理的なNa<sup>+</sup>変

動範囲内においてCa<sup>2+</sup>信号に有意な干渉を与えないことを実証した。海馬スライスをを用いた実験では、グルタミン酸刺激に伴って海馬全体で異なる時空間パターンの細胞外Ca<sup>2+</sup>濃度低下を検出し、特にCA1錐体細胞層で最大の減少が認められた(図3C)。さらに、NMDA受容体の活性化に伴う細胞外Ca<sup>2+</sup>の一過的な減少が錐体細胞層を中心に明瞭に可視化された。この減少はNMDA受容体拮抗薬AP5によって消失するこ

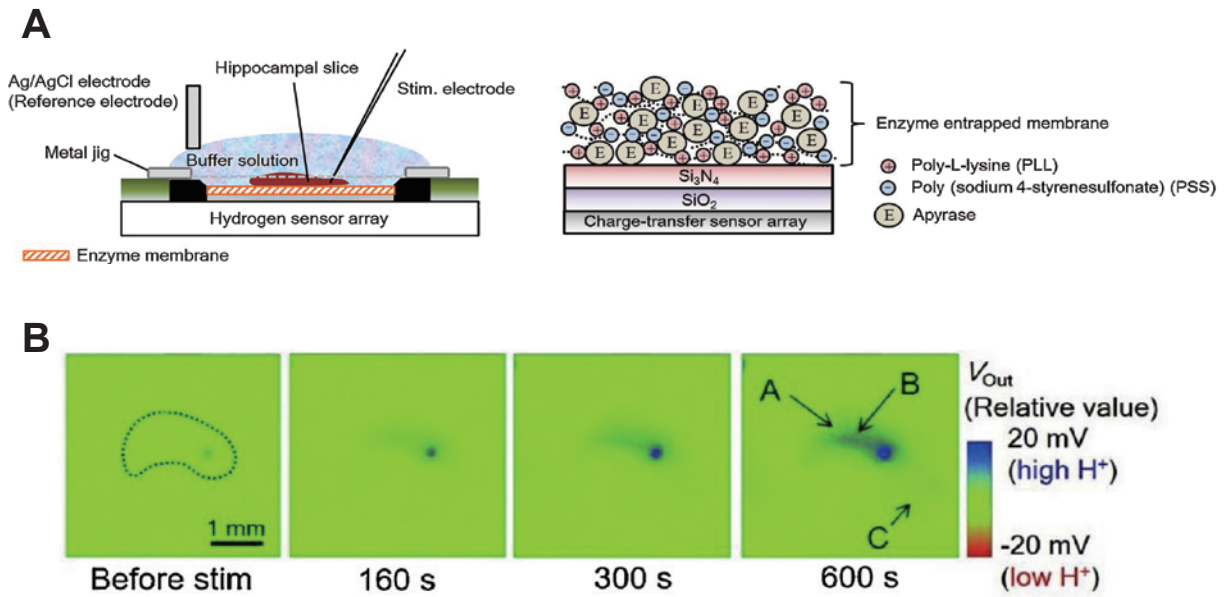


図4 酵素成膜による細胞外 ATP イメージング

A, pH センシングエリアに ATP 分解酵素アピラーゼを製膜し, その上に海馬スライスを固定し, 電気刺激を行った  
 B, 海馬電気刺激後の細胞外 ATP 濃度の変化  
 文献 21 © 2021 Elsevier B.V. 許可を得て転載

とから, チャネルを介した  $\text{Ca}^{2+}$  流入を直接的に反映していると考えられる. 細胞外イオン濃度の変化を空間的に捉える本手法は, 従来の細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  蛍光イメージングとは相補的な情報を提供するものであり, 神経回路の興奮性バランスを評価する新たな指標となり得る.

### 3. 酵素固定化による神経伝達物質の時空間計測

多くの神経伝達物質や代謝産物は, それ自体が FET で直接検出可能な電荷を持たない. これに対し, 酵素反応によって同価の  $\text{H}^+$  を生成させ, それを下層の pH センサで検出する手法を開発した.

#### ATP およびアセチルコリンのラベルフリー計測

ATP (アデノシン三リン酸) は, エネルギー代謝の基軸であると同時に, グリア細胞や神経細胞から放出される重要な情報伝達物質(グリオトランスミッター)でもある<sup>19</sup>. 筆者らは, ATP 分解酵素 (アピラーゼ) をポリイオン複合体 (PIC) 膜内に固定化し, これを pH センサ上に積層した ATP イメージセンサを開発した (図 4)<sup>20,21</sup>. すなわち, pH 感応膜上にアピラーゼを成膜し, 分解時に生じる  $\text{H}^+$  を計測することで, 間接的に ATP 濃度を計測することができる (図 4A).

まず, PIC 膜の空間的な均一性ならびに検出感度の観点で, PIC 膜の形成方法の最適化を行い, 混合積層法による膜形成において  $100 \mu\text{M}$  の優れた検出限界を示した<sup>20</sup>. ATP がアピラーゼによって加水分解される

際に生じる  $\text{H}^+$  を検出原理とするため, 膜厚の制御が感度と応答速度を決定づける. そこで, PIC 膜の形成プロセスを最適化し, 膜厚を  $0.2 \mu\text{m}$  まで薄膜化することで, 検出限界  $10 \mu\text{M}$  を達成した<sup>21</sup>. これにより, 海馬スライスのシャフター側枝刺激に伴うミリ秒単位の ATP 放出動態を捉えることに成功した (図 4B)<sup>21</sup>. また, 同様の原理でアセチルコリンエステラーゼを用いたアセチルコリンのイメージングにも成功しており<sup>22</sup>, 酵素の選択によって多様な分子へ応用可能な汎用性が示された.

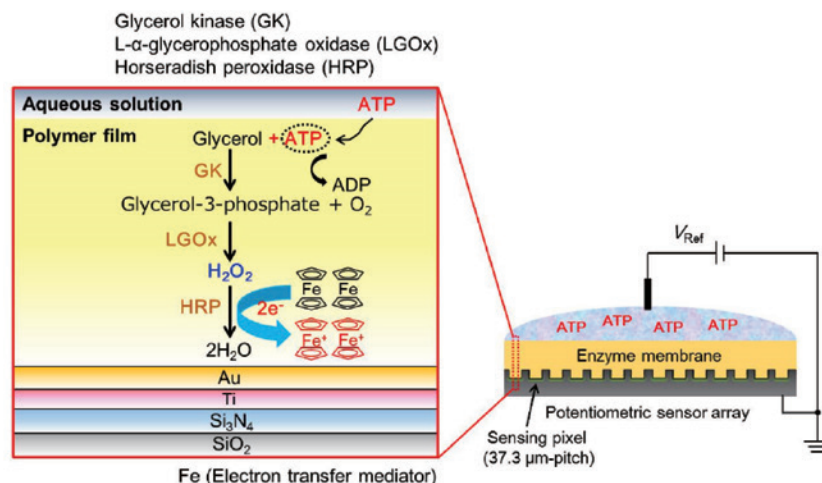
### 4. ポテンシOMETリック法による高感度化と酸化還元計測

酵素反応による  $\text{H}^+$  検出法は簡便であるが, 生体内には強力な pH 緩衝作用が存在するため, 微小な分子放出がマスクされる懸念がある. これを克服するため, pH に依存しないポテンシOMETリック型レドックスセンサの開発を進めた.

#### 4.1 酸化還元型ラベルフリー ATP イメージセンサ

金電極を修飾した CMOS センサアレイ上に, グリセロールキナーゼ (GK), L- $\alpha$ -グリセロリン酸オキシダーゼ (LGOx), および西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP) を重層的に固定化した (図 5A)<sup>23</sup>. ATP の存在下で生じる一連の酵素反応により, 最終的に過酸化水素 ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) が生成される. この  $\text{H}_2\text{O}_2$  がレドックスメ

A



B

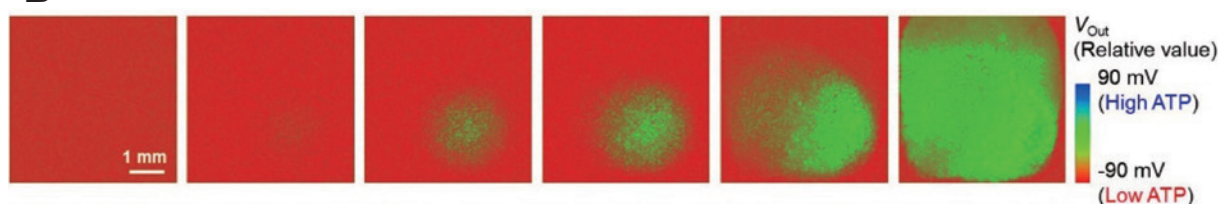


図5 ポテンショメトリックセンサによる ATP 検出

A, 酸化還元型センサにおける ATP 検出原理. pH 感応膜 ( $\text{Si}_3\text{N}_4$ ) に堆積された Au/Ti 上に, 酵素機能化膜が固定化されている. 酵素機能化膜は, レドックス酵素であるグリセロールキナーゼ (GK), L- $\alpha$ -グリセリン酸オキシダーゼ (LGOx), 西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP), 電子移動メディエータとして機能するフェロセニルメタノール (FcMeOH) から構成される.

B, 1 mM ATP を滴下した際の出力電位の時空間分布  
CC-BY 4.0 に基づき, 文献 23 より転載

ディエータを介して金電極表面で酸化還元反応を引き起こし, 電極電位 (ネルンスト電位) を変化させる. この手法により, 最低検出濃度は従来の  $\text{H}^+$  変換方式と比較して約 4 倍向上し, 2.8  $\mu\text{M}$  に達した. 感度も 77 mV/decade と大幅に強化され, 組織内の pH 緩衝能の影響を回避しつつ, 低濃度の ATP 放出を高精度に捉えることが可能となった (図 5B).

#### 4.2 グルタミン酸動態の精密計測

中枢神経系における主要な興奮性伝達物質であるグルタミン酸についても, グルタミン酸オキシダーゼを用いたポテンショメトリックセンサを開発した<sup>24</sup>. 電子メディエータの酸化状態を精密に制御することで, 検出限界 1  $\mu\text{M}$  を達成した. これは, シナプス間隙外に漏れ出すグルタミン酸の動態を議論する上で十分な感度である.

5. 微細成膜技術とマルチケミカルイメージングの統合  
生体組織内では, 単一の物質ではなく, 複数の化学

因子が相互作用しながら情報伝達を行っている. これを統合的に理解するためには, 同一平面上で複数種類の物質を同時にイメージングする技術が不可欠である.

#### 5.1 リソグラフィによる異種画素のパターニング

筆者らは, 半導体露光技術 (リソグラフィ) を応用し, pH 感応膜上に特定のイオノフォア膜や酵素膜を微細な格子状にパターニングする技術を確立した. ネガ型フォトレジストを用いたプロセスにより, 16  $\mu\text{m}$  ピッチで pH 感受性画素と  $\text{K}^+$  感受性画素を混載させた pH/ $\text{K}^+$  デュアルイメージセンサを作製した (図 6A)<sup>25</sup>. マウス脳組織を用いた評価では, NMDA 刺激に伴う  $\text{K}^+$  の放出と  $\text{H}^+$  の取り込みという相反する挙動を同一の空間領域で同時かつ独立して記録することに成功した (図 6B, C).

#### 5.2 次世代マルチケミカルセンサ: TiN および Au 電極の精密形成

さらに高い空間分解能と感度を追求するため, チタ

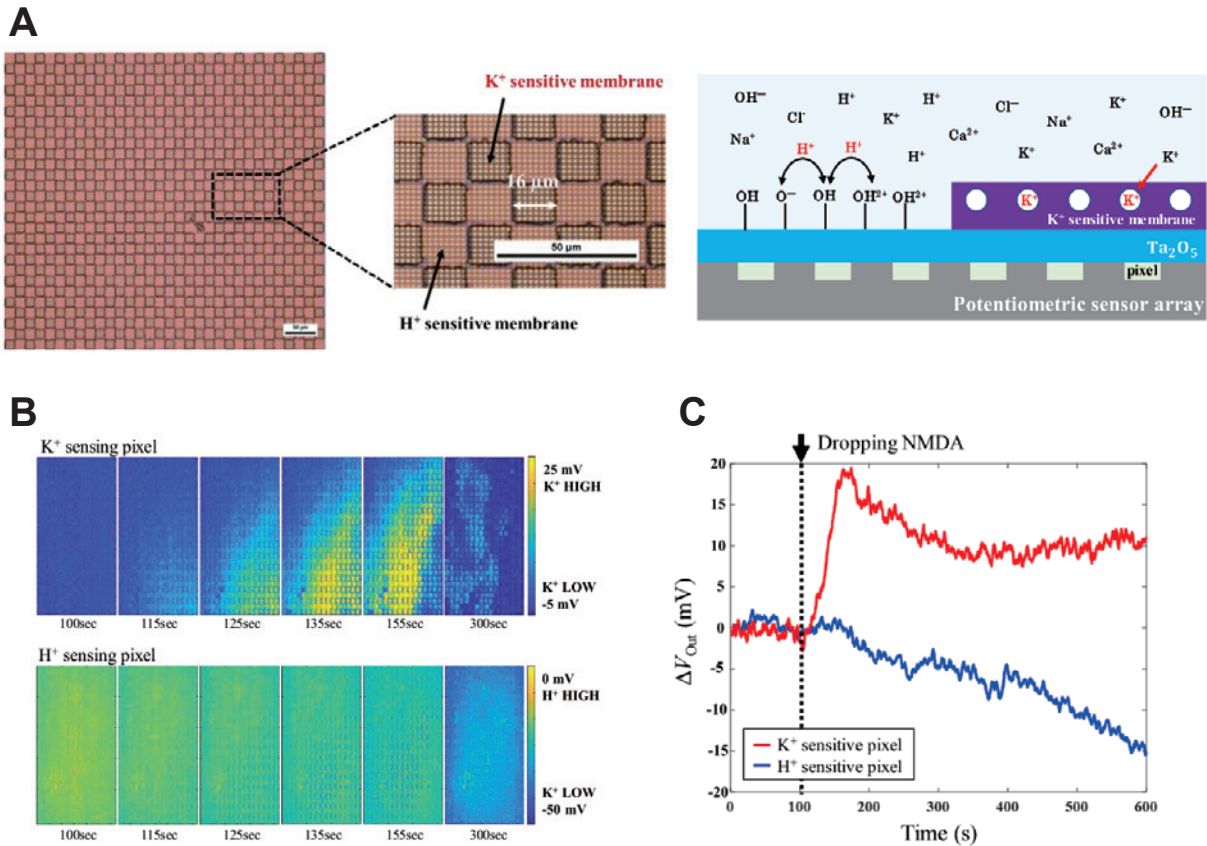


図6 微細イオノフォア成膜による pH/K<sup>+</sup>デュアルイメージング

- A, フォトリソグラフィによる K<sup>+</sup>イオノフォアの微細パターンニング (16 μm 幅)  
 B, マウス海馬に NMDA 刺激後の K<sup>+</sup> (上段) と pH (下段) の同時イメージング  
 C, K<sup>+</sup>感応画素と pH 感応画素における NMDA 刺激後の出力電位  
 CC-BY 4.0 に基づき, 文献 25 より転載

ンナイトライド (TiN) や金 (Au) の微細電極を各画素上に形成したデバイスを開発した (図 7A)<sup>26</sup>. 4.19 μm ピッチという極めて高密度なアレイ上で, 特定の画素には乳酸感受性を, 隣接する画素には pH 感受性を持たせることが可能である (図 7B). これにより, 細胞代謝の産物である乳酸と, 酸塩基恒常性に関わるプロトンの動態を, 単一細胞レベル以下の解像度で同時に追従することが可能となった (図 7C)<sup>27</sup>.

## 6. 生体 (in vivo) 脳計測への実装と 自由行動下計測への展開

スライス標本や培養細胞での成果を基盤に, 筆者らは生体の脳内で動作するセンサ開発を進めてきた. 脳は全身の循環・代謝系と連動して初めて本来の機能を発揮するため, in vivo 計測は医学・神経科学的な究極の目標である.

### 6.1 生体適用型 pH イメージセンサによる生体脳の細胞外 pH 動態計測

従来の MRI による pH 計測は空間分解能が数 mm 単位であり, 神経活動の微細な変化を捉えるには不十分であった<sup>28</sup>. 筆者らは, チップ幅を極限までスリム化し, 厚さを抑えた「刺入型 pH イメージセンサ」を開発した (図 8A)<sup>29</sup>. これを生きたマウスの一次視覚野に挿入し, 視覚刺激を提示した際の局所的な pH 変化を計測した (図 8B). その結果, 特定の視覚パターンに応答してマイクロン単位の広がりを持つプロトンダイナミクスを同定することに成功した. これは, 神経活動に伴う微小環境における細胞外 pH を極めて高い時空間分解能で捉えた例である.

### 6.2 小型軽量化センサによる自由行動マウスの細胞外 pH イメージング

小型動物 (マウス) の自由行動下で計測を行うためには, センサシステム全体の重量が行動を阻害しないことが絶対条件となる. 筆者らは, 画素サイズを 5.65

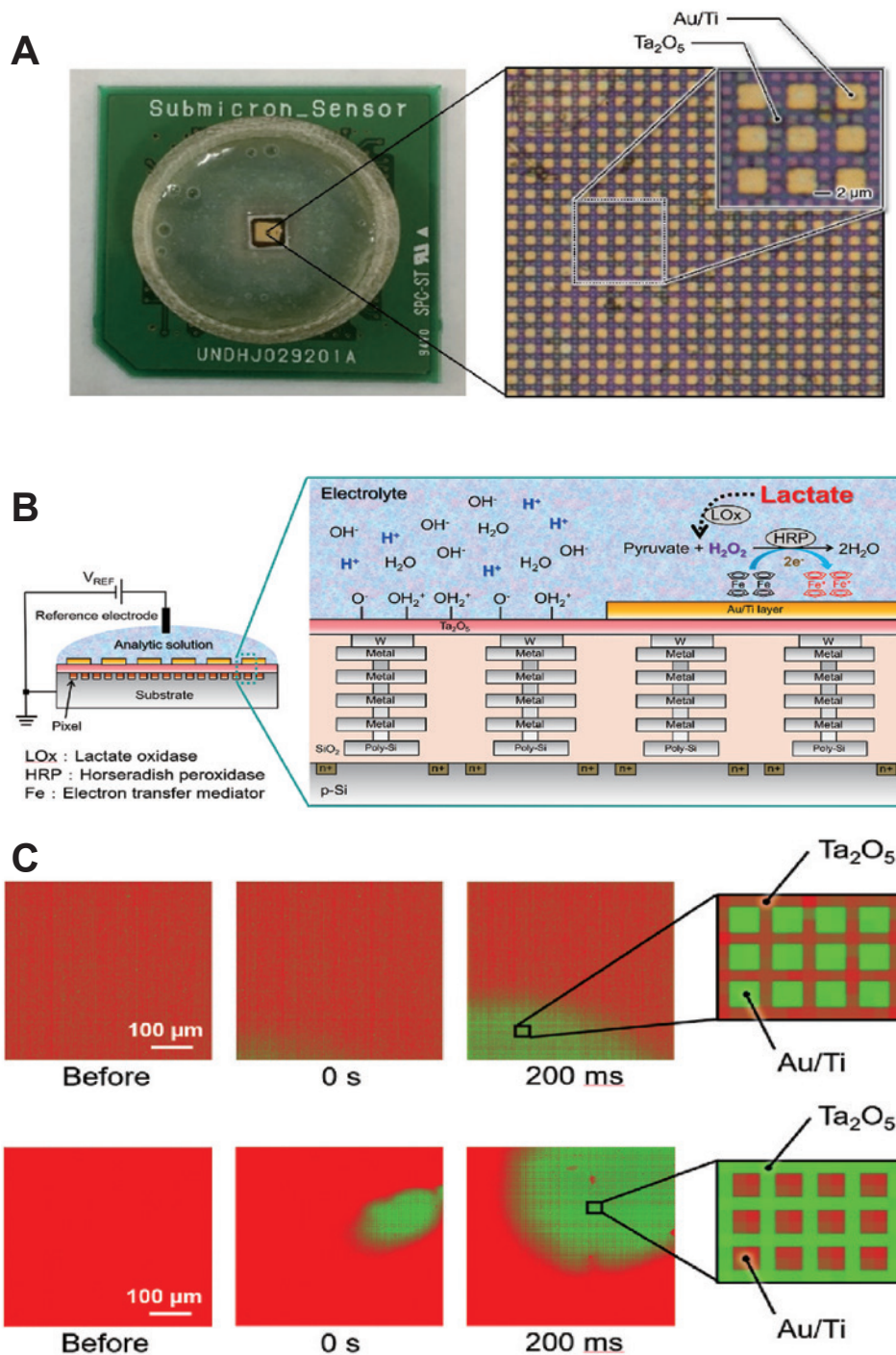


図7 Au/Tiの微細成膜によるpH/乳酸デュアルイメージング

- A, pH/乳酸センサの外観
  - B, pH/乳酸センサの計測原理
  - C, pH/乳酸センサに乳酸（上段）と低pH溶液（下段）を滴下した際の実出力電位変化
- CC-BY 4.0に基づき、文献27より転載

×4.39 μm<sup>2</sup>にまで微細化し、周辺回路を統合することで、総重量わずか1gの超小型軽量センサパッケージを実現した(図8C)<sup>30-32</sup>。このデバイスを刺入したマウスは、ケージ内を自由に探索可能であり、個体行動に関連した脳内細胞外pHのリアルタイム変化を可視化

することに成功している。個体の行動と、その背後にある化学的微小環境の変化を直結させる本技術は、行動神経科学に新たな知見を与える可能性がある。

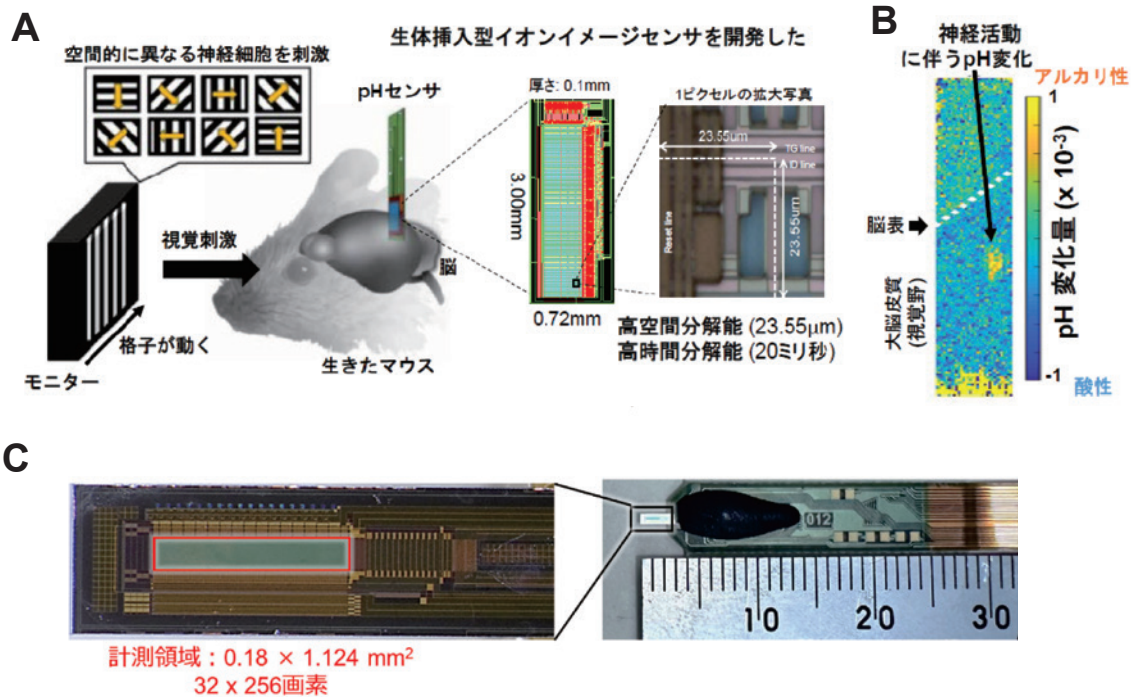


図8 生体脳における細胞外pHイメージング

- A, 生体適用型pHイメージセンサを一次視覚野に挿入し、視覚刺激を提示した  
B, 視覚刺激に伴う微小領域における細胞外pH変化  
C, 自由行動下計測のための小型軽量化pHイメージセンサ  
CC-BY 4.0に基づき、文献29を改変して転載(8A, 8B)

## 7. 医学応用への展望

本技術がもたらす最大の医学的インパクトは、病態生理における化学的理解の深化である。例えば、虚血性脳疾患において、組織の酸性化（アシドーシス）は不可避であり、その程度と範囲が予後を左右する<sup>33</sup>。本センサを用いれば、再灌流療法時におけるpH回復の時空間パターンを詳細に追跡し、細胞死を回避するための治療閾値を正確に策定できる可能性がある。また、てんかん学においても革新をもたらす。てんかん焦点における神経細胞の異常同期発火は、激しいイオン動態の乱れを伴う<sup>34</sup>。本センサによる $K^+$ や $H^+$ のマルチイメージングは、異常放電の起始点とその伝播経路を、電氣的計測よりも鮮明に「化学的広がり」として描写できる。これは、将来的な焦点切除術の術中モニタリング技術としての応用を示唆している。さらに、神経変性疾患（アルツハイマー病など）においては、アミロイドの蓄積に先立って微小環境の代謝異常が生じることが示唆されている<sup>35</sup>。高感度乳酸イメージングやpHイメージングを用いることで、加齢や疾患進行に伴う神経代謝連関の破綻を早期に発見するための診断基盤を構築できる可能性がある。

## 8. 終わりに

本稿で概説した半導体イメージセンサ技術は、従来の「点」の計測や、標識を必要とする光学的な計測の限界を打破し、細胞外微小環境の真のダイナミクスを可視化する強力なプラットフォームへと進化した。pH、主要陽イオン、ATP、グルタミン酸、乳酸、アセチルコリンといった多岐にわたる分子を、単一細胞レベルの解像度とミリ秒単位の時間分解能で捉えることが可能となり、さらにそれらを同時計測する「マルチケミカルイメージング」の基盤が確立された。

現在、本技術はさらなる深化を遂げており、ドパミンやGABAといった他の重要神経伝達物質への対象拡大、さらには深部脳領域への低侵襲挿入技術の開発が進められている。半導体技術とバイオロジーの融合によって生み出されたこのイメージングツールが、神経活動、代謝、そして病態を統合的に理解するための不可欠な研究基盤となると信じている。また、基礎医学から臨床医学までを貫く新たなバイオイメージング基盤として、今後のさらなる発展が期待される。

Conflict of Interest: 開示すべき利益相反はなし。

## 文 献

1. Bergveld P: Development of an ion-sensitive solid-state device for neurophysiological measurements. *IEEE Trans Biomed Eng* 1970; 17: 70–71.
2. Matsuo T, Wise KD: An integrated field-effect electrode for biopotential recording. *IEEE Trans Biomed Eng* 1974; BME-21: 485–487.
3. Venton BJ, Cao Q: Fundamentals of fast-scan cyclic voltammetry for dopamine detection. *Analyst* 2020; 145: 1158–1168.
4. Chefer VI, Thompson AC, Zapata A, Shippenberg TS: Overview of brain microdialysis. *Curr Protoc Neurosci* 2009; Chapter 7: Unit7.1.
5. Yoshinobu T, Iwasaki H, Ui Y, et al.: The light-addressable potentiometric sensor for multi-ion sensing and imaging. *Methods* 2005; 37: 94–102.
6. Nomura S, Nakao M, Nakanishi T, Takamatsu S, Tomita K: Real-time imaging of microscopic pH distribution with a two-dimensional pH-imaging apparatus. *Anal Chem* 1997; 69: 977–981.
7. Bard AJ, Fan FRF, Kwak J, Lev O: Scanning electrochemical microscopy. Introduction and principles. *Anal Chem* 1989; 61: 132–138.
8. Gyurcsányi RE, Jággerszki G, Kiss G, Tóth K: Chemical imaging of biological systems with the scanning electrochemical microscope. *Bioelectrochemistry* 2004; 63: 207–215.
9. 澤田和明：バイオイメージセンサの研究開発動向. *表面技術* 2022; 73: 422–426.
10. Futagawa M, Suzuki D, Otake R, Dasai F, Ishida M, Sawada K: Fabrication of a 128×128 pixels charge transfer type hydrogen ion image sensor. *IEEE Transactions on Electron Devices* 2013; 60: 2634–2639.
11. Lee YN, Araki T, Kimura Y, et al.: High-density 2- $\mu$ m-pitch pH image sensor with high-speed operation up to 1933 fps. *IEEE transactions on biomedical circuits and systems* 2019; 13: 352–363.
12. Somjen GG: Mechanisms of spreading depression and hypoxic spreading depression-like depolarization. *Physiol Rev* 2001; 81: 1065–1096.
13. Smith JM, Bradley DP, James MF, Huang CL: Physiological studies of cortical spreading depression. *Biol Rev Camb Philos Soc* 2006; 81: 457–481.
14. Ying T, Grayden DB, Burkitt AN, Kameneva T: An increase in the extracellular potassium concentration can cause seizures. *BMC Neurosci* 2015; 16: 113.
15. Hattori T, Masaki Y, Atsumi K, Kato R, Sawada K: Real-time two-dimensional imaging of potassium ion distribution using an ion semiconductor sensor with charged coupled device technology. *Anal Sci* 2010; 26: 1039–1045.
16. Doi H, Horio T, Parajuli B, et al.: Development of PVC membrane-based label-free K<sup>+</sup> image sensor and imaging extracellular K<sup>+</sup> dynamics in brain tissue. *IEEE Sensors* 2022; 1–4.
17. Kono A, Sakurai T, Hattori T, Okumura K, Ishida M, Sawada K: Label free bio image sensor for real time monitoring of potassium ion released from hippocampal slices. *Sens Actuators B Chem* 2014; 201: 439–443.
18. Parajuli B, Doi H, Shigetomi E, et al.: Development of a label-free Ca(2<sup>+</sup>) image sensor to visualize extracellular Ca(2<sup>+</sup>) dynamics in the biological samples. *Biosens Bioelectron* 2025; 287: 117729.
19. Fields RD, Burnstock G: Purinergic signalling in neuron-glia interactions. *Nat Rev Neurosci* 2006; 7: 423–436.
20. Iwata T, Doi H, Okumura K, et al.: Comparative study on the deposition of enzyme-entrapped membranes with spatial homogeneity for bioimaging. *Sens Actuators B Chem* 2017; 239: 800–806.
21. Doi H, Parajuli B, Horio T, et al.: Development of a label-free ATP image sensor for analyzing spatiotemporal patterns of ATP release from biological tissues. *Sens Actuators B Chem* 2021; 335.
22. Takenaga S, Tamai Y, Okumura K, Ishida M, Sawada K: Label-free acetylcholine image sensor based on charge transfer technology for biological phenomenon tracking. *Jpn J Appl Phys* 2012; 51: 027001.
23. Doi H, Horio T, Choi YJ, Takahashi K, Noda T, Sawada K: CMOS-based redox-type label-free ATP image sensor for in vitro sensitive imaging of extracellular ATP. *Sensors* 2021; 22: 75.
24. Iwata T, Okumura Y, Okumura K, et al.: Redox sensor array with 23.5- $\mu$ m resolution for real-time imaging of hydrogen peroxide and glutamate based on charge-transfer-type potentiometric sensor. *Sensors* 2021; 21: 7682.
25. Kato M, Ohtsuka J, Doi H, et al.: Fabrication of high-resolution multi-ion image sensor using rubber-based negative resist and extracellular ion imaging in the hippocampal slice. *The 22nd International Conference on Solid-State Sensors, Actuators and Microsystems (Transducers)* 2023; 509–512.
26. Doi H, Otsuka J, Horio T, et al.: Titanium nitride electrode-based CMOS multichemical image sensor for high-resolution imaging of neurotransmitter and hydrogen ion. *Jpn J Appl Phys* 2025; 64.
27. Doi H, Muraguchi H, Horio T, et al.: Real-time simultaneous visualization of lactate and proton dynamics using a 6- $\mu$ m-pitch CMOS multichemical image sensor. *Biosens Bioelectron* 2025; 268: 116898.
28. Magnotta VA, Heo HY, Dlouhy BJ, et al.: Detecting activity-evoked pH changes in human brain. *Proc Natl Acad Sci USA* 2012; 109: 8270–8273.
29. Horiuchi H, Agetsuma M, Ishida J, et al.: CMOS-based bio-image sensor spatially resolves neural activity-dependent proton dynamics in the living brain. *Nat Commun* 2020; 11: 712.
30. Madokoro M, Horiuchi H, Kobayashi T, et al.: In-vivo pH imaging system for hydrogen ion dynamics observation in the brain of a freely-moving mouse. *IEEE Biomedical Circuits and Systems Conference (BioCAS)* 2022; 620–624.
31. Madokoro M, Nakamura Y, Horiuchi H, et al.: Implantable in vivo pH image sensor with integrated reference electrode for biological experiments on awake mouse, *The 22nd International Conference on Solid-State Sensors, Actuators and Microsystems (Transducers)* 2023; W4P.092.
32. Sakamoto K, Madokoro M, Horiuchi H, et al.: Needle-type 5 $\mu$ m pixel pitch pH-image sensor and imaging of proton emissions in the cerebral cortex. *The 21st International Conference on Solid-State Sensors, Actuators and Microsystems (Transducers)* 2021;

- 271-274.
33. Tóth OM, Menyhárt Á, Frank R, Hantosi D, Farkas E, Bari F: Tissue acidosis associated with ischemic Stroke to Guide Neuroprotective Drug Delivery. *Biology* 2020; 9: 460.
34. Raimondo JV, Burman RJ, Katz AA, Akerman CJ: Ion dynamics during seizures. *Front Cell Neurosci* 2015; 9: 419.
35. Pontrello CG, McWhirt JM, Glabe CG, Brewer GJ: Age-related oxidative redox and metabolic changes precede intraneuronal amyloid- $\beta$  accumulation and plaque deposition in a transgenic Alzheimer's disease mouse model. *J Alzheimers Dis* 2022; 90:

1501-1521.

(受付：2026年2月19日)

(受理：2026年2月24日)

日本医科大学医学会雑誌は、本論文に対して、クリエイティブ・コモンズ表示 4.0 国際 (CC BY NC ND) ライセンス (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>) を採用した。ライセンス採用後も、すべての論文の著作権については、日本医科大学医学会が保持するものとする。ライセンスが付与された論文については、非営利目的の場合、元の論文のクレジットを表示することを条件に、すべての者が、ダウンロード、二次使用、複製、再印刷、頒布を行うことができる。