

澤田 和明

豊橋技術科学大学大学院工学研究科 教授

イオンイメージセンサ技術を利用した医療生体ナノシステム構築

§1. 研究実施の概要

本研究では大きく分けて次の 2 つのステージで研究開発を行う。まず第 1 のステージとして、バイオテクノロジーとの融合によるイオンイメージセンサの医療・生化学分析システムへの展開である。第 2 のステージとして細胞、神経細胞、人工細胞(脂質二重膜)などの自己組織化を利用し、それらと 2 次元イオンイメージセンサとナノチャネルを信号入出力デバイスとした、電子細胞集積デバイスに関する開拓研究を行う。これまでに神経細胞の情報伝達関連物質である K⁺イオン、アセチルコリンを測定対象にリアルタイムに非標識でイメージングできるイメージセンサ実現を行い、本年度は細胞からのこれらの物質の放出現象をとらえることができるセンサの感度向上、および応答時間の高速化に成功した。また、センサアレイ構造を利用してアセチルコリンや K⁺イオン、Ca²⁺イオンなどの生体物質の検出をイメージセンサで実現できることを実証した。さらに、各単一細胞からの情報伝達関連物質の挙動を観察できるように、バイオイメージセンサの微細化、および高画素化を目指して、センサエリアを微細化することに伴う雑音特性を明らかにし、微細化に起因する雑音を解決する手段を見いだした。同時に微細化したセンサアレイを作るための各種パラメータ抽出を行うための TEG (Test Element Group)の作製を行い平成 22 年度は 128×128 画素、256×256 画素イメージセンサの設計・試作を行った。

§2. 研究実施体制

(1)「研究代表者」グループ

- ① 研究分担グループ長:澤田 和明 (豊橋技術科学大学大学院工学研究科、教授)
- ② 研究項目
 - ・イオンイメージセンサの高解像度及び高感度化
 - ・生体物質エミッションデバイスの製作
 - ・細胞レベルでの生体活動解明, 医療分野への応用検討

(2)「共同研究者」グループ

① 研究分担グループ長: 櫻井 孝司 (浜松医科大学光量子医学研究センター、助教)

② 研究項目

- ・イオンセンサへの神経細胞の初代培養系及び自己組織化の確立
- ・イオンセンサへ初代培養した神経細胞の機能評価系の確立

§3. 研究実施内容

(文中に番号がある場合は(4-1)に対応する)

・イオンイメージセンサの高解像度及び高感度化

本年度は高解像度化に向けての設計・試作をおこなった。本イメージセンサは Conventional な CMOS プロセスでは製作できないため、A 社の 0.35 ミクロンプロセスラインを利用して、新たなイオンイメージセンサプロセスフローの立ち上げと、設計パラメータ(スパイスパラメータ)の抽出をおこなった。パラメータの抽出のために 2 回のロット(1st, 2nd)を流した。そのパラメータ抽出後、128×128 画素および 256×256 画素イオンイメージセンサを設計しその試作を行うための 3rd ロットを流した。これまでの 32×32 画素のものとは違い、画素数が高くなることによる読み出し時間の遅延を防ぐために読み出し手法の変更、チップ内でのパルスの発生も行えるようにした。また、本イメージセンサの特徴である累積動作を単層 poly-Si プロセスで実現するための新しい手法(Q-Trap)を提案し、チップ内に組み入れた。各ピクセルピッチは約 20 ミクロンピッチとなりこれまでのデバイスの 6 分の 1 程度(面積比 32 分の 1)まで縮小化でき、細胞 1 個と同程度の大きさにすることができた。図 1 に設計をおこなったデバイスのレイアウトを示す。

次に細胞からのイオン、生化学物質検出の高感度化、低雑音化をすすめた。昨年度までに K⁺イオン、アセチルコリンのイメージングを実現できたが、実際に細胞とのやりとりをとらえるためにはその高感度化、低雑音化、さらには高いイオンなどの選択性が必要となる。また、細胞からのイオンなどの放出を捕まえるためにはイオン選択膜を均一性よくイメージセンサ上に固定化の必要があった。アセチルコリンの検出のための酵素固定化法としてのポリイオン複合膜の形成法を改善し、1mM 以下の最低検出感度で画像化できることに成功した⁽¹⁾。改善した雑音特性を図 2 に示す。PVC を利用したイオン選択膜により、これまでの K⁺イオンに加え、Ca²⁺イオン、Na⁺イオンの検出ができるイメージセンサを実現し、同様な手法でグルタミン酸もイメージングできた。最低検出感度として 1microM 程度、各種イオン選択度として 2-3 桁を確保でき、細胞からのイオン放出を捕まえるだけの高感度化が実現できた⁽²⁾。

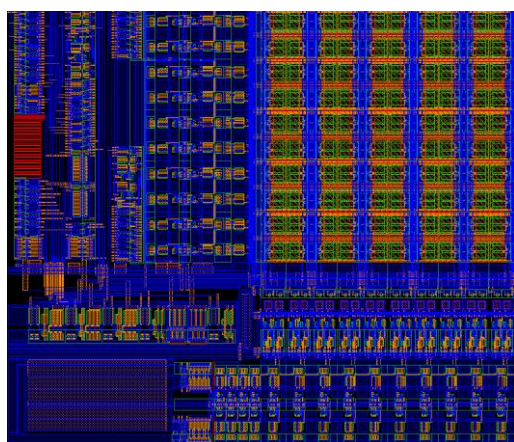


図 1

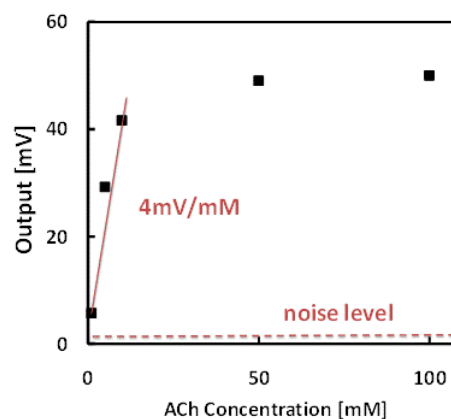


図 2

・生体物質エミッションデバイスの製作

昨年度にナノチャンネルに電極を配置することで、イオン伝導を制御できる可能性を示した。しかしながら、デバイスの歩留まりが悪く、アレイ化を行うことができなかったことから、製作プロセスを変更した。これまでバルクマイクロマシニング技術により生体物質を基板背面から入れることを考えていた。しかし、基板裏面側からのエッチングプロセスがナノチャンネル形成に悪影響を与えることが判明したため、本年度はサーフェスマイクロマシニング技術により表面側から導入する手法に変更した。H22.12 時点では設計にミスがあったため未だ実現に至っていないが、本手法によりアレイ状の生体物質エミッションデバイスが実現できる見通しが立った。

・細胞レベルでの生体活動解明, 医療分野への応用検討

イオン・生体物質検出のイメージセンサ技術が整ったことから、細胞からのイオン・生体物質の放出・吸収のリアルタイム画像化に向けた検討を行った。本年度はそれらのセンサの上に直接細胞培養するところは、種々の困難が予備実験で明らかになったことから、コラーゲンシート上に神経細胞を培養し、そのコラーゲンシートをセンサ上に正着させ、細胞からのイオン・生体物質の可視化の可能性を探った。

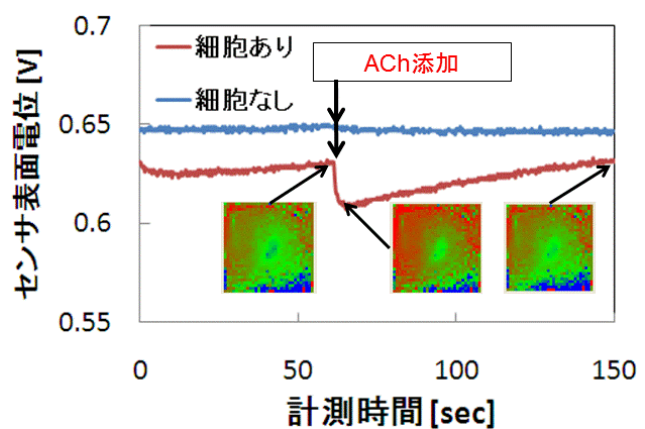


図 3

本年度 2 種類の細胞をコラーゲンシート上で培養する技術を整えた。1 つは PC-12 細胞へ NGF を添加し神経細胞様になったもの、もう一つはラットの海馬の初代細胞を初代培養したものである。タイプ 1 のコラーゲンシート上に培養することができた。コラーゲンシート上に培養した PC-12 細胞を Ca^{2+} イオンイメージセンサに乗せて、アセチルコリン刺激を行ったところ図 3 に示すように培地内の Ca^{2+} イオンは刺激直後に低下して、次第に増えていくイメージを撮影できた。細胞を培養していないコラーゲン膜ではこのような現象が確認できないことから、培地内の Ca^{2+} イオンを細胞がイオンチャンネルを介して吸収したものと考え、つぎにアセチルコリンイメージセンサ上に初代細胞を初代培養したコラーゲンシートをのせて、 K^{+} イオン刺激を行ったところ、アセチルコリン放出が確認でき、さらに K^{+} イオン刺激を行っていない場所においても、アセチルコリン放出が見えたことから、細胞間での伝達も捕まえたものと考えている。その画像を図 4 に示す。

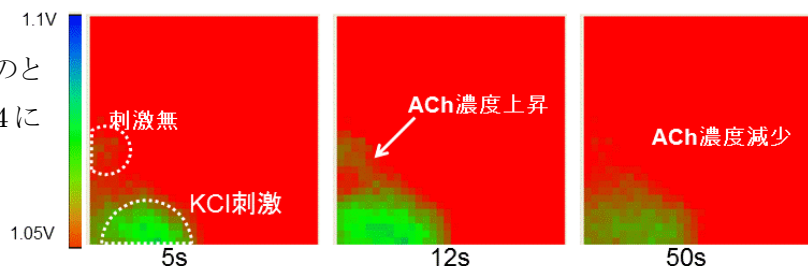


図 4

・宇理須チームとの共同研究

イオンチャンネル電流計測用の小型増幅器回路を本学と協力して設計し、製作した。単一チャンネルで HEK293 に ChR2 を発現し、レーザー励起での信号検出に成功した。

・イオンイメージセンサへの神経細胞の初代培養系及び自己組織化の確立

Si₃N₄ のセンサ応答部を持つ H⁺イオンイメージセンサ (IIS) および神経伝達物質分解酵素膜上へ神経細胞をはじめ癌細胞や破骨細胞の培養と静着化を実施した。神経細胞はラット脳より単離し、アセチルコリン水解酵素コート膜上へ静着させることまでには至ったが、偏在性があり、特にセンサ領域へ配置することが困難であった。一方で、ヒト脳由来の癌化グリア (U251) 細胞はセンサ表面の洗浄とコート方法の改良により、センシング部を含む全面において静着させることができた (図5)。U251 細胞は2~7日間安定状態を維持できたため、神経細胞を重層・共培養することで均一化の実現を試行中である。

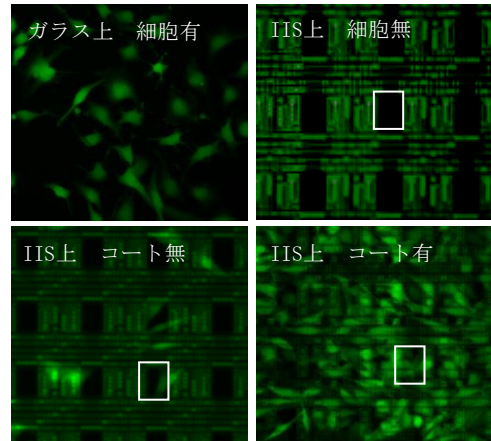


図5 IISならびに U251 細胞の蛍光画像
□はセンシング部領域例

・イオンイメージセンサ上へ初代培養した神経細胞の機能評価系の確立

グリア細胞 (U251細胞) を IIS 上で2~7日間培養した後で、細胞の形態や機能を倒立式共焦点蛍光顕微鏡で観察し、細胞内カルシウムイオン濃度の変化 (Ca 応答) を機能指標として測定したところ、ATP やヒスタミン刺激による陽性応答をセンサおよび配線領域で検出できた (図6)。IIS 上へ培養した細胞からの生理活性物質放出の検出は現在試行中である。

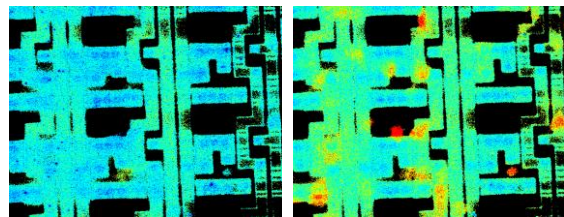


図6 IIS 上に培養した U251 細胞の Ca 応答
左: 静止時、右: 刺激後。

細胞外に放出された生理活性物質を IIS で直接検出するために、モルモット胃から胃腺組織を単離して腺ならびに周辺の pH 変化を測定した。胃腺を静置してからヒスタミン刺激を行ったところ、腺部外における pH 低下 (Δ pH は最大で 1) が検出できた (図7)。pH 低

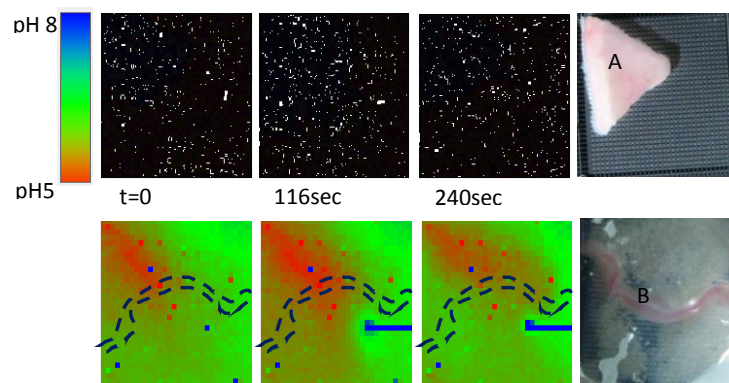


図7 2次元 pH イメージと IIS 上に静置した胃組織写真 (右)
(A) 胃腺開口部をセンサ側に配置、(B) 胃腺を横向きに配置。

下は開口側のほうが顕著であったことから、酸放出の直接検出に成功したと考えられた。

§4. 成果発表等

(4-1) 原著論文発表

● 論文詳細情報

1. Shoko Takenga, Yui Tamai, Makoto Ishida, Kazuaki Sawada : Charge Accumulation Type Hydrogen Ion Image Sensor with High pH resolution, Japanese Journal of Applied Physics(JJAP), Vol.50, No.2, 027001, 2011 (doi:10.1143/JJAP.50.027001)
2. Toshiaki Hattori, Yoshitomo Masaki, Kazuya Atsumi, Ryo Kato and Kazuaki Sawada : Real-Time Two-Dimensional Imaging of Potassium Ion Distribution Using an Ion Semiconductor Sensor with Charged Coupled Device Technology, ANALYTICAL SCIENCES, vol.26, No.10, pp.1039-1045, 2010 (doi:10.2116/analsci.26.1039)
3. Hirokazu Nakazawa, Makoto Ishida and Kazuaki Sawada : Progressive-Type Fused pH and Optical Image Sensor, Japanese Journal of Applied Physics, Vol.49, 04DL04, 2010 (doi:10.1143/JJAP.49.04DL04)
4. Shoko Takenaga, Yui Tamai, Makoto Ishida, Kazuaki Sawada: Highly Sensitive Charge Transfer Type Hydrogen Ion Image Sensor by Charge Accumulation Technique, Proceeding of The 5th Asia-Pacific Conference on Transducers and Micro-Nano Technology (APCOT2010), APCOT2010-CSM11 pp.273
5. H. Nakazawa, M. Ishida, and K. Sawada: REDUCTION OF INTERFERENCE BETWEEN pH AND OPTICAL OUTPUT SIGNAL IN A MULTIMODAL BIO-IMAGE SENSOR, Proceeding of IEEE Sensors 2010 Conference, pp.2299-2302

(4-2) 知財出願

- ① 平成22年度特許出願件数(国内 0件)
- ② CREST 研究期間累積件数(国内 1件)