

澤田 和明

豊橋技術科学大学大学院工学研究科  
教授

非標識神経伝達物質イメージセンサによる細胞活動可視化システム構築と  
脳機能の時空間解析

## § 1. 研究実施体制

### (1) 「研究代表者」グループ

- ① 研究代表者: 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
  - ・神経伝達物質イメージセンサの高解像度化, 高速化
  - ・神経伝達物質イメージングとマルチ検出機能
  - ・センサの高感度化と開口率改善
  - ・*in vivo* 計測用イメージセンサの構築
  - ・集団レベル, 1細胞レベルの複数種類の神経伝達物質同時計測

### (2) 「共同研究」グループ

- ① 主たる共同研究者: 小泉 修一 (山梨大学大学院総合研究部医学域、教授)
- ② 研究項目
  - ・細胞外 ATP の高度時空間解析を可能とする ATP センサの高感度化とその脳スライス標本への応用
  - ・細胞外 H<sup>+</sup>変化の高度時空間解析を可能とする H<sup>+</sup>センサの開発とその脳スライスへの応用
  - ・細胞外 ATP 及び H<sup>+</sup>イメージングを用いた、グリア伝達物質が神経回路、グリア-神経機能連関に与える影響の生理学的、薬理的解明

### (3) 「共同研究」グループ

- ① 主たる共同研究者: 鍋倉 淳一 ((国研)自然科学研究機構生理学研究所、教授)
- ② 研究項目

・脳スライスの系において神経伝達物質の濃度変化をセンサで検出し、その変化によって引き起こされる機能応答を2光子イメージングで同定する。

・*in vivo*の系の構築

## § 2. 研究実施の概要

平成 28 年度は、平成 27 年度に実現したバイオイメージセンサの基盤技術を活用し、山梨大学医学部、生理学研究所の応用解析チームと豊橋技術科学大学のセンサ開発チームが神経細胞活動の非標識イメージングの *in-vitro* および *in-vivo* 観察を通して研究開発を進めた。

神経伝達物質イメージセンサ開発と基盤技術の構築を進める豊橋技術科学大学のチームは、前年度試作を行い課題が見つかった事項に関して、修正を 2 回行い 256×256 (6 万) 画素、画素ピッチ 2 ミクロン、時間分解能 1.8 msec、ノイズレベル 0.1 pH 以下で駆動させることに成功した。さらに、チップを駆動するためのソフトウェアを完成させ、応用解析チームに提供した。挿入型 *in-vivo* イメージセンサの封止工程を確立でき、実際に生理学研究所グループとともに、マウスの脳内に刺入させ、脳内 pH のリアルタイム観察に成功した。平成 27 年度に実現できた 3 種類の神経伝達物質 (ATP, ACh, H<sup>+</sup> イオン) を同時にイメージング可能なチップの課題であった画像のクロストークを解決できる手法を提案できた。また、H<sup>+</sup> イオンと K<sup>+</sup> イオンを同時に観察するチップの作製に成功し、山梨大学グループに提供し、神経伝達メカニズムの解明の研究を開始した。今後これらのチップを活用し、網羅的な神経活動計測のための検討を開始する。その他、昨年度行った過酸化水素のイメージング技術を元に、グルタミン酸の非標識検出のイメージングの見通しが立った。

脳機能の解剖学的情報と化学的な情報の統合解析システム構築を目指す山梨大学医学部グループは、本センサを用いグルタミン酸刺激及び電気刺激により惹起される細胞外 H<sup>+</sup> 濃度 ([H<sup>+</sup>]<sub>o</sub>) のイメージングを行い、基本情報の抽出及び最適化と応用研究を行った。その結果、Glu 刺激、電気刺激ともに、細胞周辺で一過性の 0.1 pH 強の細胞外 pH の上昇を示唆した。さらに、アストロサイトグルタミン酸トランスポーターの選択的阻害薬 Tfb-TBOA の影響を検討したところ、pH 上昇は顕著に抑制された。従って Glu の取り込みとともに、[H<sup>+</sup>]<sub>o</sub> もアストロサイトグルタミン酸トランスポーターにより取り込まれ、細胞外 pH の上昇が惹起されることが示唆された。細胞外の微弱な pH 上昇が神経機能に与えるか否かを調べるために、細胞外液 pH を僅かに変化させた際のシナプス伝達機能を解析した。pH を 7.2 から 7.4 に変化させると paired pulse 比は不変だが fEPSP が有意に大きくなったことから、主にポストシナプス機能が亢進したことが考えられた。今回 Stim や Glu により誘導された [H<sup>+</sup>]<sub>o</sub> 変化は 0.1 ~ 程度であるが、このような微細な pH 変化は十分に神経活動に影響を与えていることが明らかとなった。

神経回路(生体)への応用を目指す生理学研究所グループはセンサの生体応用の事前実験を目的として、神経細胞培養を用いたシナプスにおける神経伝達物質の可視化に継続して取り組んだ。さらに、生体用センサのプロトタイプ製作に伴い、マウス脳内 pH と薬理学的手法による神経活動変化による pH 変化の可視化を試みた。アデノ随伴ウイルスを用いて神経細胞特異的にチャネルロドプシンを発現させ、青色光を照射する手法が最も効率よく HEK 細胞の活動変化を惹起することが判明した。光照射領域のみ HEK 細胞の応答が認められることから、アセチルコリンの放出が確認できたが、イオンイメージセンサではとらえることができなかった。今後培養系などの改善を試みる。また、脳機能解明のため、マウスの脳に生体刺入型イオンイメージセンサを刺入し脳内のイオン分布の観察を行ったところ、脳内のイオン変化だけでは無く発火電位と思われる信号の検出が確認でき、今後応用展開して行く。

#### 代表的な原著論文

1. You-Na Lee, Koichi Okumura, Tatsuya Iwata, Kazuhiro Takahashi, Toshiaki Hattori, Makoto Ishida, Kazuaki Sawada, Development of an ATP and hydrogen ion image sensor using a patterned apyrase-immobilized membrane, *Talanta*, Vol.161, pp.419-424
2. Tatsuya Iwata, Hideo Doi, Koichi Okumura, Tomoko Horio, Toshiaki Hattori, Kazuhiro Takahashi, Kazuaki Sawada, Comparative study on the deposition of enzyme-entrapped membranes with spatial homogeneity for bioimaging, *Sensors and Actuators B: Chemical*, Vol.239, pp.800-806
3. Sota Matsuba, Hikaru Sato, Ryo Kato, Kazuaki Sawada, Tomoki Matsuda, Takeharu Nagai, Toshiaki Hattori, Fabrication of Ca<sup>2+</sup>-K<sup>+</sup> Image Sensor Using an Inkjet Method and Its Application to Living Cells, *ECS Trans.*, 75, pp.243-249