

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ングとマルチ検出機能開発
  - ・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
  - ・in-vivo における神経伝達物質イメージング
  - ・個々のシナプスの受容体活動と解剖学的情報を解析できるシステムの実証

### (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 (自然科学研究機構生理学研究所基盤神経科学研究領域 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 29 年度は、これまで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、計測装置の改良などをおこない、設計の目標通りの 256×256 (6 万) 画素、画素ピッチ 2 ミクロン、時間分解能 0.52 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。センサピッチを 2 ミクロンにしたことで、イオンなどの実際の計測可能な分解能が向上するかどうかを検証した。水溶液中の化学物質の空間分解能の計測の手法が未確立であったため計測手法を提案し、その結果、ナイキスト周波数 (画素ピッチによって決まる理論的な限界空間解像度) と一致しており、画素ピッチを狭くすることでイオン画像の分解能を上げることができること示唆した重要な結果を得た。この装置を応用グループに提供し、海馬スライス計測を試みた。計測に当たり電気刺激装置からのノイズの混入が課題となり、平成 30 年度の課題が見つかった。昨年度、応用解析チームに提供した。挿入型 in-vivo イメージセンサの高性能化を進めた。空間解像度 2 μm、時間分解能 0.5 msec が実現できる予定であるが平成 30 年度にさらなる検証を進める。平成 29 年度までに酵素反応を用いて H イオンに ATP などの神経伝達物質変換する系では、実際の計測系 (たとえば HEPES バッファ) では、H イオンがバッファリングされてしまい、最低検出限界が 20 mM 程度であった。そこで H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> への変換から画像を取得する測定系を構築し、グルタミン酸、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> を 0.1 μM 程度まで検出する目処が立ち、海馬の計測にも成功した。

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、昨年度、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>) に着目して検討を進め、本年度は K<sup>+</sup> 濃度 ([K<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。K<sup>+</sup> 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 K<sup>+</sup> 濃度 ([K<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。海馬をセンサ上に設置し、海馬 CA1 上においた電極で電気刺激 (Stim) を行った。Stim 前 (Pre)、直後 (Stimulation) 及び後 (Post) の細胞外 [K<sup>+</sup>]<sub>o</sub> 変化を観察したところ、Stim によりゆっくりとした [K<sup>+</sup>]<sub>o</sub> 上昇が認められた。この [K<sup>+</sup>]<sub>o</sub> 上昇は、電極からの距離に依存しており、また Schaffer 側枝の走行に沿って認められた。Stim により惹起される [K<sup>+</sup>]<sub>o</sub> 上昇が活動電位に依存しているかどうかを検討した。TTX は Stim による [K<sup>+</sup>]<sub>o</sub> 上昇をほぼ抑制した。従って、Schaffer 側枝刺激による神経活動依存的に [K<sup>+</sup>]<sub>o</sub> 上昇が惹起されたことが示唆された。Stim により惹起される [K<sup>+</sup>]<sub>o</sub> 変化に対する、グリア選択的グルタミン酸トランスポーター阻害薬 Gfb-TBOA の影響を検討した。Gfb-TBOA はこの [K<sup>+</sup>]<sub>o</sub> 上昇をほぼ消失させた。従って、Stim による [K<sup>+</sup>]<sub>o</sub> 上昇は、グルタミン酸トランスポーターに依存していることが明らかとなった。今回、細胞外 K<sup>+</sup> も、アストロサイト GLT1 により強く制御されていることが明らかとなった。GLT1 は、glutamate を細胞内に取り込む際に、Na<sup>+</sup> 及び H<sup>+</sup> を同様に取り込み、逆に K<sup>+</sup> を細胞内から細胞外排出するトランスポーターである。このように Stim 後には glutamate の取り込みと共役した形で細胞外へ K<sup>+</sup> が排出されることで、[K<sup>+</sup>]<sub>o</sub> が上昇することが明らかとなった。Stim 後に、[K<sup>+</sup>]<sub>o</sub> が素早く一過性に上昇することが予想さ

れた。しかし実際は、Stimによりゆっくりとした $[K^+]_o$ 上昇が認められ、しかもこれはGLT1阻害薬で抑制された。従って、 $[K^+]_o$ の制御にもアストロサイトのGLT1が中心的な役割を果たしていることが強く示唆され、アストロサイトGLT1が神経細胞興奮後の細胞外環境制御で重要な役割を果たしていることが明らかとなった。

センサの生体応用を目指す生理学研究所グループは生体挿入型センサをマウス脳内に挿入し、脳内のpHの分布で差異が認められることを見出した。さらに、薬理学的的手法による神経興奮の惹起によって、スパイク様のpH低下が生じることを明らかにした。

本年度は例数を増やすとともに、この現象が神経活動依存的であるかを検証し、それを実験的に示した。さらに詳細な解析を行うことで、各ピクセルで同期的に生じていることが分かった。また、感覚刺激としてひげ刺激を選定し、それによっても同様の現象が生じるのかを検証した。また、別種の感覚刺激として視覚刺激のためのシステムの構築を行った。

#### 代表的な原著論文

・Morizawa, Y., Hirayama, Y., Ohno, N., Shibata, S., Shigetomi, E., Sui, Y., Nabekura, J., Sato, K., Okajima, F., Takebayashi, H., Okano, H., Koizumi, S. Reactive astrocytes function as phagocytes after brain ischemia via ABCA1-mediated pathway. Nat Commun. 8, Article number: 28. 2017

・You-Na Lee, Koichi Okumura, Tomoko Horio, Tatsuya Iwata, Kazuhiro Takahashi, Toshiaki Hattori, Kazuaki Sawada, A bio-image sensor for simultaneous detection of multi-neurotransmitters, Talanta, Vol.179, pp. 569-574, 2018

・Shin Nanasaki, Hiroshi Horiuchi, H.Inada, Y.Nakamura, F. Dasai, T. Iwata, K. Takahashi, J. Nabekura and K. Sawada, DEVELOPMENT OF NOVEL PH IMAGE SENSOR FOR IN-VIVO APPRICATION, Proceedings of Transducers 2017, M4B.002, pp.43-46, Kaohsiung, TAIWAN, June 18-22, 2017, 978-1-5386-2732-7/17/\$31.00