

「プロセスインテグレーションによる機能発現ナノシステムの創製」  
平成 20 年度採択研究代表者

H23 年度 実績報告
----------------

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
  - ・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 主たる共同研究者: 櫻井 孝司 (豊橋技術科学大学エレクトロニクス先端融合研究所、特任准教授)
- 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

## § 2. 研究実施内容

(文中に番号がある場合は(3-1)に対応する)

### ・イオンイメージセンサの高解像度化

高解像度化, 高密度化に向けた研究に関しては平成 23 年度中に高画素密度 (128×128 画素, 256×256 画素) の開発に成功し, 画素ピッチ 25 ミクロン, フレームレート 30frame/sec で, プロトンおよび Na イオン, K イオンのリアルタイム取得ができた<sup>6,7)</sup>。図 1 に 1 万画素 (128×128 画素) のイメージセンサチップ, 図 2(a)にはプロトンのリアルタイムイメージ, (b)にはNa+イオンイメージを示す。

本イメージセンサをリアルタイムで PC 上に表示させるためのイメージング装置の開発も同時に行い成功した。装置の外観を図 3 に示す。この読み出し装置において, 各画素の感度のばらつきを自動的に補正する機能, さらに周囲の光による, 光混入する雑音除去機能を搭載している。図 4 に光り除去機能を動作させない時の画像, および除去機能を動作させたときの画像を示す。約 40dB 以上の除去機能があることが確認できている。通常の半導体型のイオンセンサデバイスは光信号が混入し, 光刺激によるイオンチャネルの働きなど観察は不可能であった。本プロジェクトで開発をおこなった電荷転送型イオンイメージセンサは光信号も併せて検出が可能であるため, 原理的に光り混入信号をイオン信号から除去可能である<sup>2,4,8)</sup>。この機能は, 現在神経科学研究において研究が活発化している, 光受容イオンチャネル・チャネルロドプシンなどを利用した研究に活用できる。

さらに高解像度・高感度イオン画像計測の為の新しい画素構成である“Q-Trap”構造の試作を行い, CCD 特殊プロセスを利用せずに CMOS プロセスに準拠したプロセスにより, 本センサの大きな特徴である“累積動作”を行える 1 万画素のイメージセンサの実現ができた。図 5 に Q-Trap を搭載した画素(a)とその感度特性(b)を示す。

本年度は最終目標である 1024×1024 画素デバイス/システムの開発および, 当初予定していなかった画素ピッチ 1 ミクロン以下の開発に着手開始した。超微細ピッチ, 高画素密度に向けた特許の出願も進めた。今後幅広い応用に向けた検討を進める。特に計測システム上に神経細胞ネットワーク培養のための環境を構築する工夫を加える。

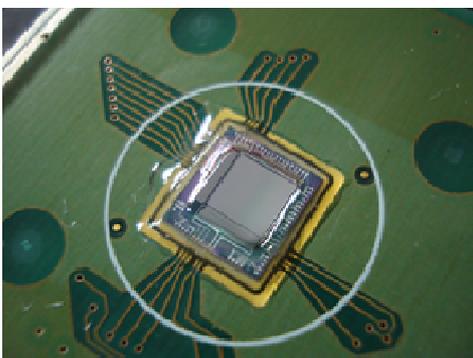


図 1 1 万画素 (128×128 画素) のイメージセンサチップ

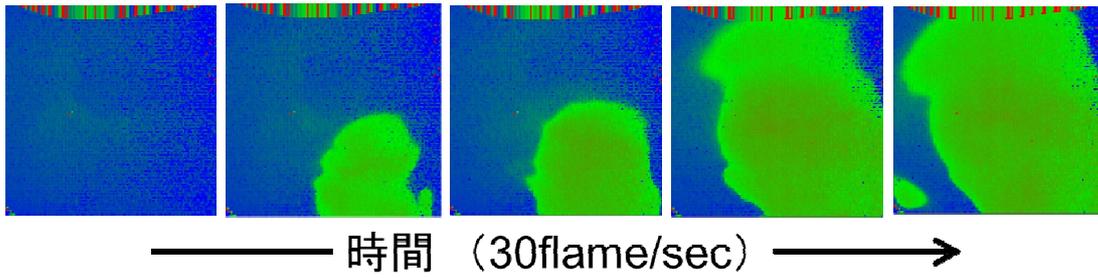


図 2(a) プロトンのリアルタイムイメージングのスナップショット

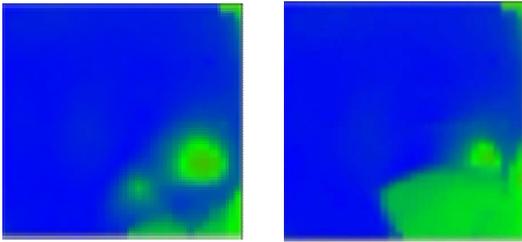


図 2(b) Na+イオンのリアルタイムイメージングのスナップショット



図 3 1 万画素および 6.5 万画素イオンイメージセンサ読み出し装置  
(自動感度補正, 光混入雑音除去機能を搭載)

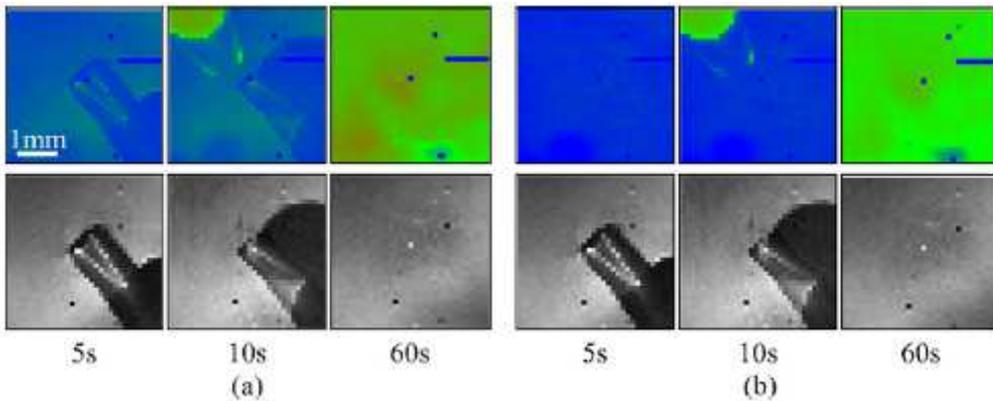


図 4 光除去機能無しの場合(a), 光雑音除去機能付加の場合(b)

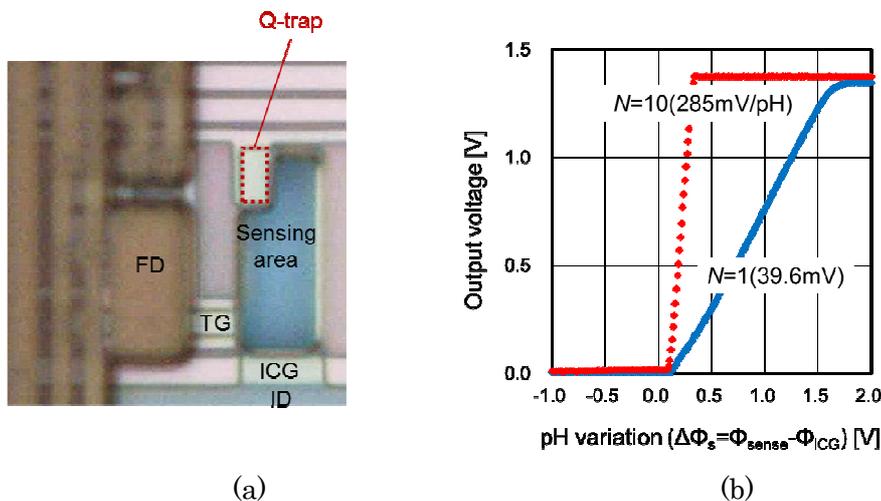


図 5 Q-Trap 付き画素(a) と 感度特性 (10 回累積)(b)

・神経伝達物質のイメージング

昨年度アセチルコリンの動きをノンラベルではかれる  $32 \times 32$  画素イオンイメージセンサ上で、ラットの胎生 19 日海馬の初代細胞を初代培養し、 $K^+$ 刺激をおこなったところ、 $K^+$ 刺激を行っていない離れた場所でもアセチルコリンが放出されているようすが観察でき<sup>3, 12)</sup>、また PC12 細胞に NGF を加えて培養し、神経細胞様になったものを  $Ca^{2+}$ の動きがわかるセンサ上にのせて、アセチルコリン刺激をおこなったところ PC12 細胞の周りの培地の  $Ca^{2+}$ 濃度が、はじめ 1mM 程度だったのが、瞬間的に 100microM まで下がり、数十秒で再び 1mM まで戻る様子を観察できた。今年度は  $32 \times 32$  画素イオンイメージセンサ上でのラット海馬の初代細胞を初代培養し、その神経ネットワークへの  $K^+$ 刺激におけるアセチルコリンの放出に関して詳細に検討した。図 6 に計測に使用した初代細胞の一例を示す。この細胞に  $K^+$ の刺激を行ったところ、 $K^+$ の刺激濃度に対応したアセチルコリン濃度の放出が確認できた。また対象の実験で行った細胞を培養していないアセチルコリンイメージセンサチップ上に  $K^+$ の刺激をおこなっても反応は見られなかった。図 7 に  $K^+$ 刺激濃度依存性を示す。詳細にアセチルコリン放出画像を検討した結果を図 8 に示す。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。その画像を図 8 に示す。図 8 に示すように  $K^+$ 刺激直後にアセチルコリンが放出され、 $K^+$ 刺激が続いているにもかかわらず減少していく様子をとらえている。また C 点では  $K^+$ が到達していない関わらず、アセチルコリンの放出が確認された。神経細胞間での化学的な信号伝達が捕まえ得た可能性がある。

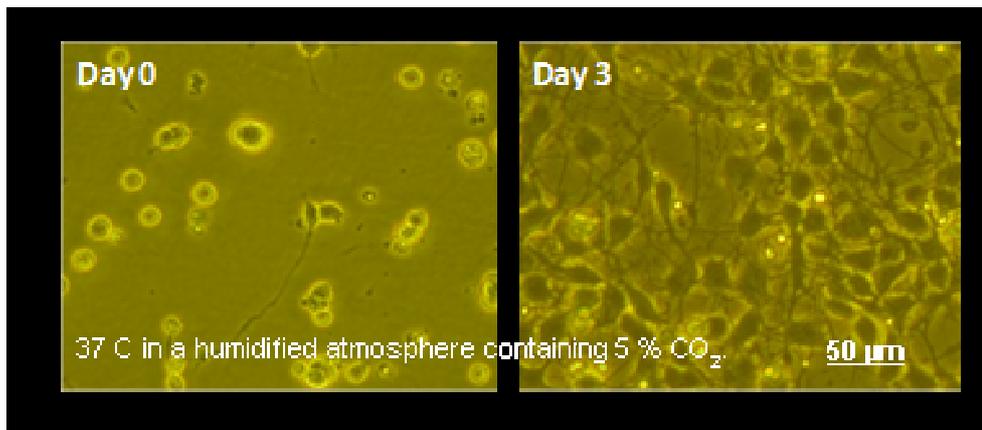


図 6 実験に使用したラット海馬の初代細胞 0 日目と3日目

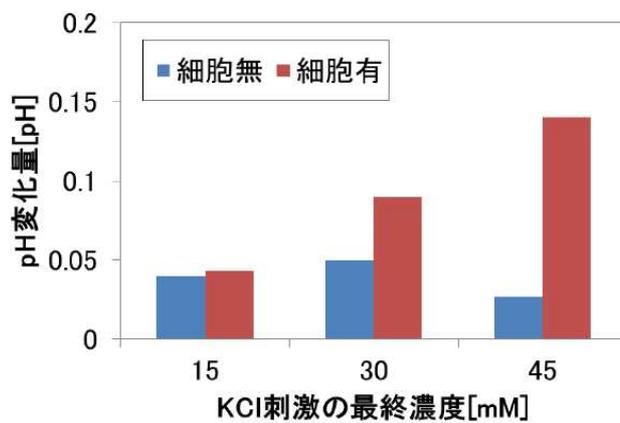


図 7 アセチルコリンイメージセンサ上に配した初代細胞ネットワークに KCl 刺激を行ったときの刺激濃度依存性(塩濃度は一定)

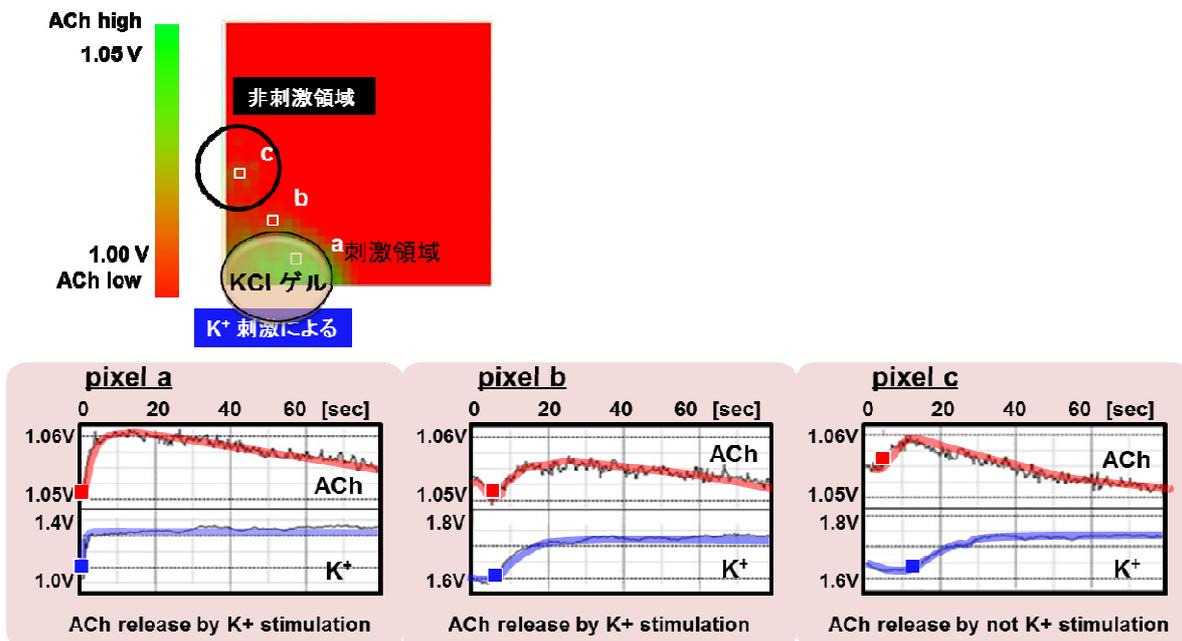


図 8 アセチルコリンイメージセンサ上に配した神経細胞ネットワークに KCl を局所的刺激の結果

プロトン検出が可能なイオンイメージセンサ装置を利用して、脳機能の解析についての検討の可能性を探った. プロトンイメージセンサ上に海馬スライスを載せてグルタミン刺激をおこなった結果を図 9 に示す. 窒息を行うと我々の海馬の CA1 の部分の細胞死がおき記憶障害が発生する. 窒息を模擬するためにグルタミン刺激を行ったところ, 0.1mM の刺激では CA1 領域と CA3 領域の違いはなかったが, 1mM の刺激では CA1 領域部分だけが pH 変化が生じている. 今後 pH 変化のメカニズムについて検討を進める. 海馬におけるプロトン検出に加え, 破骨細胞や胃壁細胞における酸放出のリアルタイム検出にも成功し, 成人病診断等の医用途へ向けた基礎検討も進める.

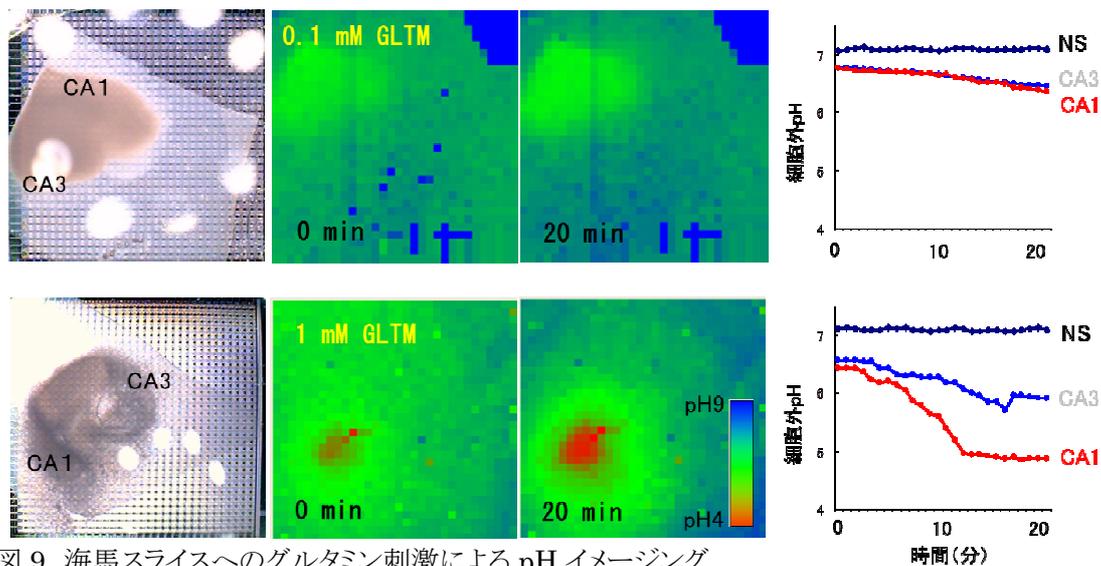


図 9 海馬スライスへのグルタミン刺激による pH イメージング

・神経細胞の培養系確立

プレーナ型イオン刺激デバイスアレイ上において神経細胞の培養を行い、自己組織化を起こさせるための検討を進めた。ポリエルリジンをコートした窒化珪素膜(Si3N4)上に PC12 細胞をプラスチック基板同等に7日以上静着・培養できた。細胞のネットワーク形成を誘導するために神経栄養因子である NGF(Neuron Growth Factor)を添加することにより添加後2日目より、突起伸展および細胞間結合を認めることもできた。イオン濃度勾配による細胞培養の制御状態の評価に関しては、予備実験より細胞外カルシウムイオン濃度に依存して突起伸展速度が変化することを確かめることができた。図 10 に培養細胞像および細胞増殖の経日変化を示す。イオン感知による回路過疎化を誘導するために、微小流路付帯した培養タイムラプス共焦点顕微鏡システムを構築し、イオン濃度勾配による細胞培養の制御状態の評価を進める。

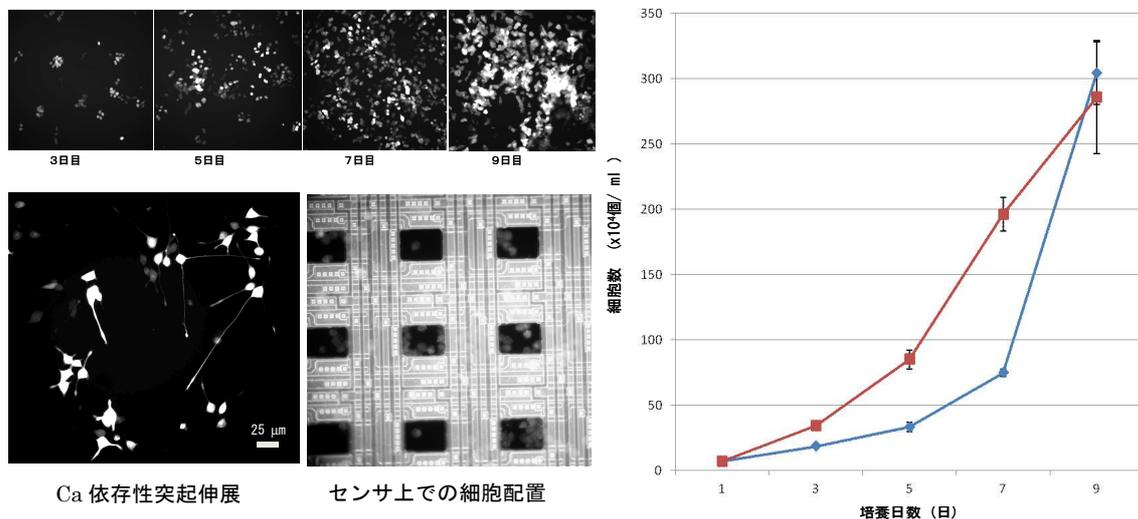


図 10 培養細胞像および細胞増殖の経日変化

PC12 細胞の培養、左) 細胞形態、右) 細胞増殖プロット (赤線 : イオンイメージセンサ上、青線 : プラスチック上で培養したもの)

・宇理須チームとの共同研究

宇理須チームが進めているイオンチャンネル電流計測用の小型増幅器回路設計に関する議論をすすめ、基本動作の確認に貢献した。

### §3. 成果発表等

#### (3-1) 原著論文発表

- 論文詳細情報

1. Hirokazu Nakazawa, Keita Yamasaki, Kazuhiro Takahashi, Makoto Ishida, Kazuaki Sawada, "A FILTER – LESS MULTI – WAVELENGTH FLUORESCENCE DETECTOR", Proceedings of The 15th International Conference on Solid State Sensors, Actuators and Microsystems (TRANSDUCERS 2011), M3P.022, pp.100-103 (2011), ISBN 978-1-4577-0156-6.
2. H.Nakazawa, M.Ishida, and K.Sawada, "MULTIMODAL BIO – IMAGE SENSOR FOR REAL – TIME PROTON AND FLUORESCENCE IMAGING", Proceedings of The 15th International Conference on Solid State Sensors, Actuators and Microsystems (TRANSDUCERS 2011), W2D.005, pp.1966-1969 (2011), ISBN 978-1-4577-0156-6.
3. Shoko Takenaga, Yui Tamai, Kengo Hirai, Kazuhiro Takahashi, Takashi Sakurai, Susumu Terakawa, Makoto Ishida, Koichi Okumura, Kazuaki Sawada, "Label-Free Real Time Imaging of Neural Communication using Acetylcholine Image Sensor", Proceedings of The 15th International Conference on Solid State Sensors, Actuators and Microsystems (TRANSDUCERS 2011), T2C.003 pp. 954-957, (2011), ISBN 978-1-4577-0156-6.
4. Hirokazu Nakazawa, Makoto Ishida, and Kazuaki Sawada, "Multimodal bio-image sensor for real-time proton and fluorescence imaging", Sensors and Actuators B: Chemical, (in press), (DOI: 10.1016/j.snb.2011.11.010).
5. Hirokazu Nakazawa, Hiroto Watanabe, Makoto Ishida, and Kazuaki Sawada, "Multimodal sensor for simultaneous proton and light sensing using a hole and electron accumulation technique", Transactions on Electron Devices, (in press), (DOI: 10.1109/TED.2012.2191788).
6. Toshiaki Hattori, Masaki Yoshitomo, Satoshi Mori, Daichi Miyamoto, Ryo Kato, Kazuaki Sawada, "CCD-type Sodium Ion Image Sensor: Dynamic Observation of Ion-Exchange Reactions of a Single Na-type Cation-Exchange Resin Bead",

Electroanalysis, vol.24 Issue1, pp.114-120, 2011, (DOI: 10.1002/elan.201100442).

7. 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.1039-1045,2011, (DOI: 10.2116/analsci.26.1039).
8. Hirokazu Nakazawa, Makoto Ishida, and Kazuaki Sawada, “Reduction of interference between pH and optical output signals in a multimodal bio-image sensor”, IEEE Sensors Journal, vol. 11 , pp.2718-2722, 2011, (DOI: 10.1109/JSEN.2011.2157340).
9. Takenga, S., Tamai, Y., Ishida, M., Sawada, K. “Charge Accumulation Type Hydrogen Ion Image Sensor with High pH resolution”, Jpn. J. Appl. Phys., 50(2), 027001 (2011), (DOI: 10.1143/JJAP.50.027001).
10. Nemoto M, Hoshi Y, Sato C, Iguchi Y, Hashimoto I, Kohno E, Hirano T, Terakawa S. “Diversity of neural–hemodynamic relationships associated with differences in cortical processing during bilateral somatosensory activation in rats”. NeuroImage, 59, 3325-3338 (2012).(DOI: 10.1016/j.neuroimage.2011.11.067).
11. Nawa Y, Inami W, Chiba A, Ono A, Miyakawa A, Kawata Y, Lin S, Terakawa S. “Dynamic and high-resolution live cell imaging by direct electron beam excitation”. Optics Express 20, 5629-5635 (2012).(DOI: 10.1364/OE.20.005629)
12. Shoko Takenaga, Yui Tamai, Koichi Okumura, Makoto Ishida, and Kazuaki Sawada, “Label-Free Acetylcholine Image Sensor Based on Charge Transfer Technology for Biological Phenomenon Tracking”, Jpn.J.Appl.Phys., 51, 027001,(2012), (DOI: 10.1143/JJAP.51.027001).

### (3-2) 知財出願

- ① 平成 23 年度特許出願件数(国内 3 件)
- ② CREST 研究期間累積件数(国内 4 件)