

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、
電気・電子情報工学系 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・基礎医学系・薬理学、教授)

② 研究項目

- ・グリア細胞及び神経細胞からの ATP 放出の時・空間ダイナミクス超高解像度解析法の確立
- ・In situ 脳標本からの ATP 放出法の開発と脳機能制御様式の解明

(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
発達生理学系生体恒常機能発達研究部門、教授)

② 研究項目

- ・神経細胞におけるシナプス入力活動および伝達物質放出の超高解像度解析法の確立
- ・超高解像度解析法を用いた神経ネットワーク活動ダイナミクスの抽出

§ 2. 研究実施の概要

平成 26 年度は、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を行うための基盤技術を確立することを念頭におきながら連携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、イメージセンサチップの高性能化を課題として開発を進めた。まず、センサチップに関して、画素ピッチ 1 ミクロン、時間分解能 0.5msec を実現できる、6 万画素(256×256 画素)センサ開発を平成 27 年度中の開発完了を目指すため、1 次試作を終え問題点、修正点の洗い出しをおこなった。今後、この試作で抽出した課題を平成 27 年度第 1 四半期に解決し、2 次試作につなげる。1 次試作のチップ断面図を図 1 に示す。また、本イメージセンサを in-vivo 用途に 薄さ 100 ミクロン、128×32 画素(チップ幅 1.8mm, 長さ 10mm)のセンサ設計を終了し、試作を進めている。さらに、センサチップが完成後イオン画像を取得できる装置、および表示ソフトの開発も進めた。最終的に 3 種類の神経伝達物質を同時にイメージング可能なシステム開発のため、本年度はこれまで可視化に成功していない ATP のイメージングを試みた。その結果、当初目標にしていた、100 μ M の最低検出濃度を越える、3 μ M の最低検出感度が実現できた。複数種類のイオンチャネルの開閉を同時に観察するために、K⁺, Na⁺, Ca²⁺ を同時に検出することを進める。微小領域固定化に関しては、インクジェット技術を活用および半導体微細加工技術で活用される露光技術の活用の検討を開始し、インクジェット装置の立ち上げを行った。

本センサをシナプス伝達機能解明に応用展開する山梨大グループは、in vitro 標本を用いた実験系を中心に基礎検討を行った。本年は、細胞外 ATP に注目し、豊橋グループが開発した種々の ATP センサを実際の脳組織に応用するための、実験環境、装置の調整、サンプル調整法、脳の生標本静置方法等、生標本の ATP イメージングに必要な実験条件の最適化を行った。使用した脳組織の生標本には、(1)マウス大脳皮質初代培養アストロサイト、(2)海馬スライス培養を用いた。様々な応用検討を進めており、スライス標本をセンサに静置後の取得した ATP イメージング像から、透過光像で示す海馬の錐体細胞層に沿った形で高い電位シグナルが認められ、初期には特に CA2, CA3 領域で高いシグナルが認められた。ATP は非刺激時にも自発的に放出されていることが知られており、本結果は海馬からの自発的 ATP 放出を反映している結果を得た。

生体への応用を目指す生理学研究所グループは光学イメージングとセンサを同時計測するための技術構築を行った。まずセンサに還流用のチャンバーをつける系を構築し、薬剤投与の系などを確立した。さらに 2 光子顕微鏡による細胞機能応答イメージングとセンサを組み合わせる系を構築した。既存の 2 光子顕微鏡のセットにセンサを組み込み、その際に 2 光子顕微鏡にもちいるレーザーがセンサのノイズ源になるため現在所持している 2 光子顕微鏡にシャッターの導入を行い、センサによる測定の間レーザーの照射が行われないように改造をおこなった。さらに vivo での測定系を確立するため、豊橋技術科学大学が作製した、厚みが 100,150,200,250 μ m の構造モデルセンサを用いた vivo の手術の系を確立し、センサの最適化を行った。



図 1: 1 次試作を終えた 2 μ m ピッチイオンイメージセンサチップ